

にて測定した。[1] 血小板凝集塊への取り込み率、[2] 内包 ADP 放出率は以下の計算式に従った。

$$[1] \text{ Co-sediment ratio of vesicles into platelet aggregates (\%)} = \frac{B_{3H} - C_{3H}}{A_{3H}} \times 100$$

$$[2] \text{ Release of ADP from vesicles (\%)} = \frac{\frac{A_{14C}}{A_{3H}}(B_{3H} - C_{3H}) - (B_{14C} - C_{14C})}{\frac{A_{14C}}{A_{3H}}(B_{3H} - C_{3H})} \times 100$$

$A_{3H}, A_{14C}$ : PRPに添加した全放射線量  
 $B_{3H}, B_{14C}$ : ADP添加後における凝集塊中の放射線量  
 $C_{3H}, C_{14C}$ : ADP添加前における血小板ペレット中の放射線量

### 3.7. ADP 内包安定性試験

各種 H12-(ADP)小胞体([lipid]=10 mg/mL)を振とう後(4°C, 37°C, 60°C)、ゲル濾過(Sephadex G-25)して、ラウリルエーテルにて可溶化した。HPLC (TSKGel ODS-100V, 1 mL/min, Ab. 260 nm, リン酸 (pH=7.0)/メタノール = 97/3 (v/v) (TEA 30 mM))にて残存 ADP を定量し、脂質濃度(リン脂質テストワーク)で補正することで ADP 内包率を算出した。

### 3.8. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢, 230-280 g)にブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を 0, 3 日目に尾静脈投与し(全投与量 20 mg/kg)、投与開始から 10 日目を血小板減少ラット([PLT] =  $19.6 \pm 2.6 \times 10^4 / \mu\text{L}$ )を作製した。

セボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体(a)-(c)を尾静脈投与した(4 mL/kg)。また、生理食塩水、ADP 未内包の H12-小胞体(d)を対照群とした。投与 5 分経過後、尾先端から 1cm の部位にクイックヒール®(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて切傷した(長さ 2.5 mm, 深さ 1 mm)。尾先端を生理食

塩水に浸して出血時間を計測した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 血小板減少モデルウサギの作製法、血小板輸血モデルの確立

#### 1.1. 血小板減少ウサギの作製

ブスルファンを 0 と 3 日目に下腹部投与したところ(全投与量 30, 40, 50 mg/kg)、各群とも再現性良く血小板数が減少し、減少速度は投与量依存的に加速した(Fig. 3)。しかし、40, 50 mg/kg 投与時では、14 日以降からヘマトクリット値(HCT)や白血球も血小板と同様に徐々に減少する傾向が判明した(Fig. 4 (b), (c))。他方、30 mg/kg 投与時では、その影響は認められなかった(Fig. 4 (a))。HCT の減少は、出血時間の延長を引き起こすため、ブスルファンの投与量は 30 mg/kg に決定した。

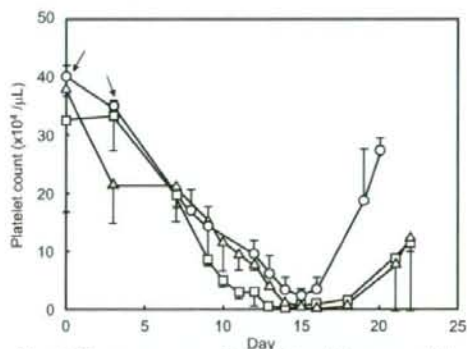


Fig. 3 Dose-response effect of busulphan on rabbits. Rabbits were injected with busulphan at total doses of 30 mg/kg (○), 40 mg/kg (△), or 50 mg/kg (□). Ear vein blood was collected at intervals and platelet count measured. Arrows show injection day of busulphan (N = ...)

30 mg/kg 投与時、投与開始から 13, 14, 15 日目の血小板数は、それぞれ  $6.9 \pm 0.1 \times 10^4 / \mu\text{L}$ ,  $3.5 \pm 1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ ,  $2.6 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$  (正常値の約 1/15~1/20)まで減少し、16 日目以降から血小板数の回復が認められ、死亡例は一例もなかった(Fig. 3)。

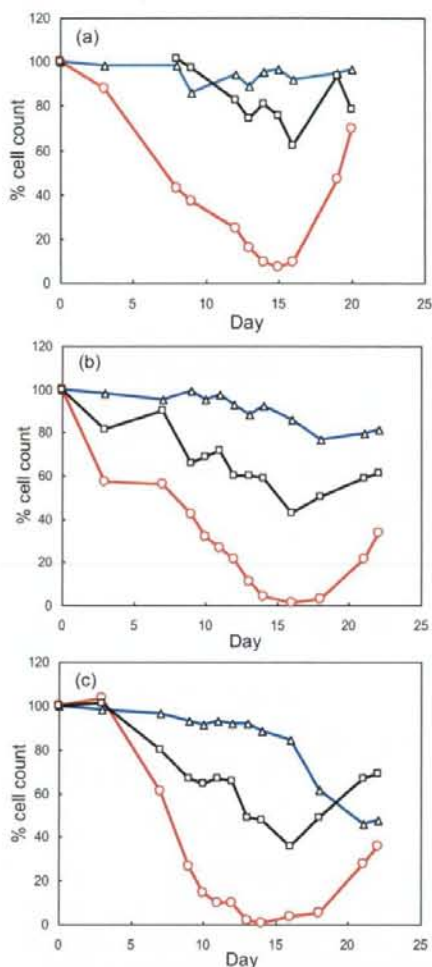


Fig. 4 Hematological parameters before and after busulphan injection at total doses of (a) 30 mg/kg, (b) 40 mg/kg, and (c) 50 mg/kg. (○) shows PLT, (△) shows WBC, and (□) shows HCT.

## 1.2. 出血時間測定

ブスルファン投与開始から 13、14、15 日目の出血時間を測定したところ、それぞれ  $647 \pm 46$ 、 $1170 \pm 161$ 、 $1536 \pm 364$  秒であり、血小板数の減少に伴って出血時間は顕著に延長した (Fig. 5)。特に、15 日目の出血時間は、正常ウサギ ( $[PLT]=41.1 \times 10^4 / \mu L$ ) のそれ ( $112 \pm 24$  秒) と比較して約 15 倍に延長した。従って、より重篤な血小板減少症モデルと

してブスルファン投与開始から 15 日目のウサギを採用し、以下の血小板輸血、H12-PEG-polyAlb の止血能評価を行った。

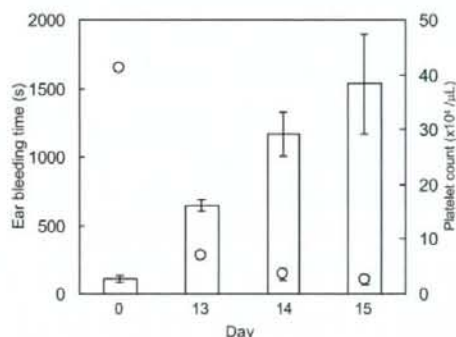


Fig. 5 Correlation of ear bleeding time (white columns) with platelet counts (○) in the rabbits. (N=3)

## 1.3. 血小板輸血

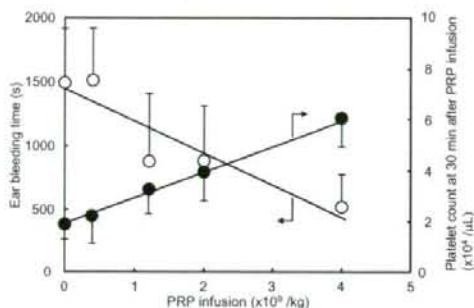
種々の血小板数に調整した PRP ( $[PLT] = 10, 30, 50, 100 \times 10^4 / \mu L$  (投与血小板数:  $0.4 \times 10^9, 1.2 \times 10^9, 2.0 \times 10^9, 4.0 \times 10^9$  PLT/kg)) を耳静脈から投与したところ、時間経過と共に血小板数が増大した。投与終了後 (約 30 分) で血小板数は最大となり、それぞれ  $2.2 \pm 1.1 \times 10^4 / \mu L$ 、 $3.2 \pm 0.9 \times 10^4 / \mu L$ 、 $4.0 \pm 1.1 \times 10^4 / \mu L$ 、 $6.1 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu L$  と推移した (Fig. 6 (●))。

方法 1.2 に従い、出血時間を測定したところ、PPP 投与群 ( $1473 \pm 442$  秒) は、生理食塩水投与群 ( $1656 \pm 250$  秒) とほぼ同等であり、同種の血漿を投与しても出血時間には影響しないことを確認した。そこで、各 PRP ( $[PLT] = 10, 30, 50, 100 \times 10^4 / \mu L$  (投与血小板数:  $0.4 \times 10^9, 1.2 \times 10^9, 2.0 \times 10^9, 4.0 \times 10^9$  PLT/kg)) を投与したところ、それぞれ  $1505 \pm 410$  秒、 $863 \pm 540$  秒、 $867 \pm 440$  秒、 $505 \pm 257$  秒となり、投与血小板数依存的に出血時間を短縮させた (Fig. 6 (○))。従って、血小板輸血モデルの確立に成功し、血小板

代替物の陽性対照群として適切であることが確認できた。さらに、投与血小板数 vs. 出血時間の近似式は

$$y = -252.03x + 1425.6 \quad (r^2 = 0.85) \quad \text{式(1)}$$

と算出できた。この式を用いて、H12-PEG-polyAlb や H12-(ADP)小胞体の出血時間測定値から、それらと血小板とを比較した止血能力価の計算に利用できると考えられる。

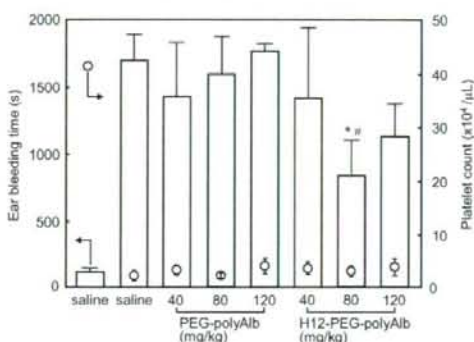


**Fig. 6** Effects of platelet transfusion on ear bleeding time (○). The transfused amount of PRP was 0.4, 2.0, 4.0 × 10<sup>9</sup>/kg. ●; platelet count in the rabbits at 30 min after platelet transfusion (N = 6).

#### 1.4. H12-PEG-polyAlb の止血能評価

上述したように、正常ウサギ([PLT]=41 × 10<sup>4</sup> /μL)、血小板減少ウサギ([PLT]=(2.6 ± 0.8) × 10<sup>4</sup> /μL)に生理食塩水を投与したときの出血時間は、それぞれ 112 ± 24 秒、1695 ± 197 秒であった。PEG-polyAlb をそれぞれ 40、80、120 mg/kg (rHSA 換算、約 3.7 × 10<sup>13</sup>、7.4 × 10<sup>13</sup>、1.5 × 10<sup>14</sup> 粒子/kg に相当)で投与したが出血時間の短縮は認められなかった。そこで、H12-PEG-polyAlb を同容量にて投与したところ、出血時間はそれぞれ 1416 ± 533、834 ± 266、1133 ± 241 秒であり、特に、80 mg/kg 投与時は、生理食塩水群、PEG-polyAlb 群と比較して有意な短縮効果が認められた(Fig. 7)。

が認められた(Fig. 7)。



**Fig. 7** Effects of the administration of H12-PEG-polyAlb on ear bleeding time. ○; platelet count in the rabbits (N = 4-6). \*P<0.05 vs. saline groups, and #P<0.05 vs. PEG-polyAlb group at the same dose.

従って、止血能を発現させるためには、H12 の担持が必須であり、H12-PEG-polyAlb は重篤な血小板減少モデルでかつ動物種を変更しても止血効果が発現することを実証できた。

そこで有意な短縮効果が認められた H12-PEG-polyAlb 投与群 (80 mg/kg ⇨ 7.4 × 10<sup>13</sup> 粒子/kg に相当)の出血時間を式(1)に代入すると、2.4 × 10<sup>9</sup> PLT/kg の血小板を投与したときの止血能と同等であると算出できた。従って、粒子数を基準に H12-PEG-polyAlb の止血能を血小板のそれと比較すると、3.1 × 10<sup>4</sup> 粒子の H12-PEG-polyAlb で血小板 1 個の止血能と同等と算出できる。ところが、体積を基準とした場合、H12-PEG-polyAlb(φ 約 250 nm)は血小板(φ 約 2500 nm)の 31 倍の体積相当を投与した計算になった。

## 2. CT を用いた H12-小胞体の出血部位に対する特異的集積性評価

### 2.1. H12-(IOP)小胞体の内包安定性

H12-(IOP)小胞体を 4°C にて保存し、経時



的に採取して IOP 内包率を算出したところ、4 日経過しても調製直後の IOP 内包率を維持した(Fig. 8)。従って、IOP は安定にカプセル化されていることを確認し、以下に示す動物実験を行った。

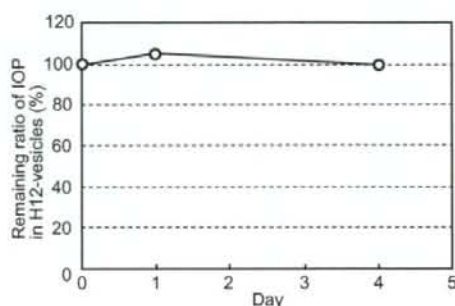


Fig. 8 Remaining ratio of IOP into H12-vesicles.

## 2.2. IOP 水溶液と H12-(IOP)小胞体の体内動態

IOP 水溶液(80 mM)を尾静脈投与したところ、投与 5 分後には腎臓(Fig. 9 (a), (b))および膀胱(Fig. 9 (c))が鮮明に造影され、速やかに代謝されることを確認した。これは、IOP 水溶液の臨床での適応(静脈性尿路撮影等)による動態と矛盾しない結果であった。他方、H12-(IOP)小胞体を投与したところ、腎臓や膀胱は造影されず、投与約 1 時間後には脾臓(Fig. 10 (a), (b))や肝臓への集積が観察された。これは、小胞体の体内動態<sup>2)</sup>を再現する結果であると共に、IOP が小胞体に安定に内包されていることを示しており、Fig. 8 の結果を支持した。さらに、IOP を小胞体に内包させることで、造影剤としての体内動態を腎臓から脾臓や肝臓に変換させることに成功し、造影剤の適応拡大にも繋がると考えられる。他方、心臓も造影されたことから、H12-(IOP)小胞体は投与約 1 時間後も血中を循環していることが示唆された。

2) Sou, K. *et al. J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 312, 702-709 (2005).

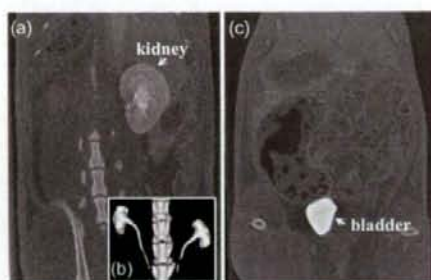


Fig. 9 CT images of IOP-injected rat. (a) 2-D CT image of kidney, (b) 3-D CT image of kidney, and (c) 2-D CT image of bladder.

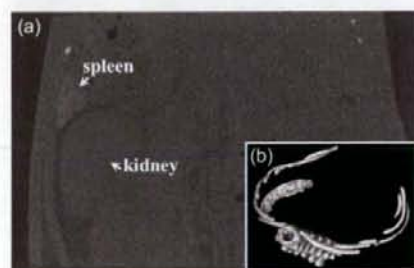


Fig. 10 CT images of H12-(IOP)vesicles-injected rat. (a) 2-D and (b) 3-D CT images of spleen.

## 2.3. H12-(IOP)小胞体の尾静脈の出血部位への特異的集積と定量

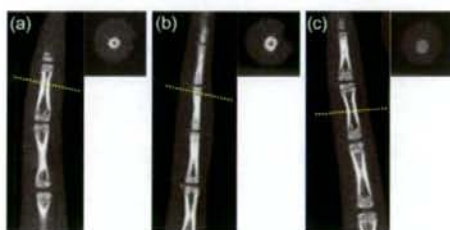
H12-(IOP)小胞体を投与 5 分後に尾静脈をメスで切傷し(Fig. 11 (a))、止血完了後に CT 観察したところ、出血部位に対応する部位が造影された(Fig. 11 (b))。断面図(Fig. 11 (c))、3D 像(Fig. 11 (d))もそれを支持した。他方、生理食塩水投与群(Fig. 12 (a))、IOP 水溶液投与群(Fig. 12 (b))、(IOP)小胞体群(Fig. 12 (c))では造影されなかった。従って、(IOP)を内包させることによって、H12-小胞体が出血部位に対して特異的に集積することを *in vivo* 試験で初めて証明できた。

そこで、脂質濃度既知の H12-(IOP)小胞体を CT 測定することで、1 voxel あたりの脂質重量に対する 1 voxel あたりの CT 値を算出し、検量線を作成した(Fig. 13)。Fig. 11 (d)

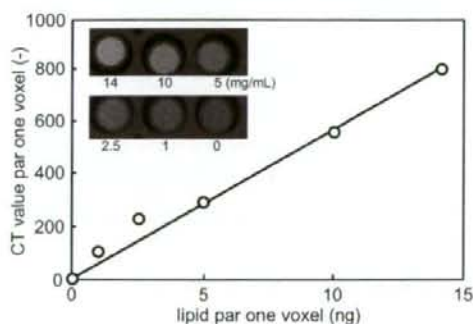
から、H12-(IOP)小胞体によって造影された部位の1 voxelあたりのCT値は54.1 (-)と算出された。検量線に外挿したときの1 voxelあたりの脂質重量は0.0913 (ng)となり、造影部位は77072 voxelからなることから、7  $\mu$ gに相当する脂質重量が傷害部位に集積した計算となった。



**Fig. 11** Specific accumulation of H12-(IOP)vesicles to the vascular injury. (a) 2-D CT image of tail of rat. (b) cross-sectional CT image of the tail. (c) 3-D CT images of the tail.



**Fig. 12** CT images of tail of rat received with (a) saline, (b) IOP solution, and (c) (IOP)vesicles.



**Fig. 13** Correlation of lipid concentration of H12-(IOP) vesicles with CT value.

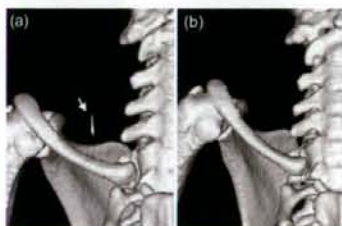
以上より、実験小動物用 CT を用いることで H12-(IOP)小胞体の出血部位に対する特異的集積性が証明でき、集積性の定量化が可能となった。

#### 2.4. 塩化鉄傷害モデルを用いた H12-(IOP)小胞体の頸静脈への集積

H12-(IOP)小胞体を投与5分後に塩化鉄溶液を添加し、添加30分後にCT観察したところ(Fig. 14)、傷害部位に対応する部位が造影された(Fig. 15 (a))。他方、(IOP)小胞体群(Fig. 15 (b))では造影されなかった。これは、ラット尾静脈出血部位へのCT撮影の結果を支持しており、このモデルにおいてもH12-(IOP)小胞体が血栓に特異的に集積することが確認できた。



**Fig. 14** Photo of ferric chloride-induced thrombosis model.



**Fig. 15** Specific accumulation of (a) H12-(IOP)vesicles to the juglar vein. (b) (IOP)vesicles did not accumulate. Arrow shows accumulation site of H12-(IOP)vesicles.

### 3. H12-(ADP)小胞体の膜物性とADP放出特性の相関

#### 3.1. 膜流動性の異なる H12-(ADP)小胞体の

## 被覆層数と粒径の制御

Table 1 に示すように、小胞体膜の主成分を DMPC、DPPC、DSPC としてその相転移温度の違いを利用することで、膜流動性の異なる小胞体を調製することができる(膜流動性 DMPC > DPPC > DSPC の順に低下する)。

各混合脂質(a)-(c)の造粒温度を制御((a): 4°C, (b),(c): r.t.)して H12-(ADP)小胞体を調製した。得られた (a)-(c)の体積分率 (Lc) から被覆層数を算出したところ、それぞれ  $1.1 \pm 0.1$ ,  $1.1 \pm 0.2$ ,  $1.2 \pm 0.2$  枚となり、粒径と同様にほぼ同一に制御可能であった(Table 2)。さらに、造粒温度を上昇させるだけで((a'): r.t., (b') 60°C)、約 2 枚の被覆層数を有する (a'), (b') を作り分けること可能であった。

Table 2 Lamellarities of H12-(ADP)vesicles (a)-(c).

vesicles	Diameter (nm)	Lamellarity (-)
(a)	$240 \pm 68$	$1.1 \pm 0.1$
(b)	$285 \pm 78$	$1.1 \pm 0.2$
(c)	$298 \pm 107$	$1.2 \pm 0.2$
(a')	$240 \pm 70$	$1.9 \pm 0.5$
(b')	$287 \pm 83$	$1.8 \pm 0.3$

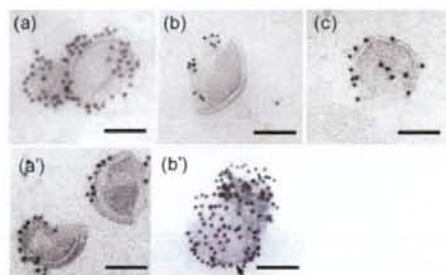


Fig. 16 TEM images of H12-(ADP)vesicles (a)-(c), (a') and (b'). Colloidal golds show H12 conjugated to the surface of the vesicles using anti H12 antibody. Scale bars: 100 nm.

さらに、凍結超薄切片した小胞体の透過型電顕像からもそれらを支持すると共に、ウサギ由来抗ヒト H12 抗体を用いた金コロイド標識により、H12 が小胞体膜上に均一に

導入されていることも確認した(Fig. 16)。

## 3.2. H12-(ADP)小胞体の活性化血小板に対する結合能評価

DiOC<sub>18</sub> 標識した H12 未結合の(ADP)小胞体を TRAP-6 刺激にて活性化させた血小板に添加し、フローサイトメーターを用いてその結合率を測定したところ、いずれも結合しなかった(Fig. 17)。H12-(ADP)小胞体(a)-(c)では、活性化血小板に対していずれも特異的に結合し、その結合率はいずれも同程度であった(Fig. 17)。また、(a'), (b')も同等の結合率を維持した。従って、膜流動性や被覆層数を変化させても活性化血小板に対する結合能は同等であることを確認した。

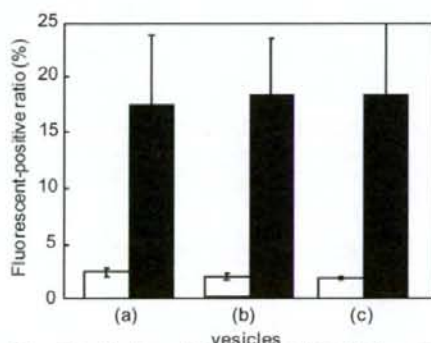


Fig. 17 Binding abilities of H12-(ADP)vesicles (a)-(c) (black column) or (ADP)vesicles (a)-(c) (white column) toward the TRAP-stimulated platelets.

## 3.3. H12-(ADP)小胞体の血小板凝集促進能評価

PRP ([PLT]= $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L)に ADP 未内包 H12-小胞体(d) (f.c. ca.  $1 \times 10^9$  particles)を添加し、ADP にて血小板凝集を惹起させたところ、最大透過率は約 35%に留まり、H12-(ADP)小胞体(c)を添加した場合も同程度であった(Fig. 18)。



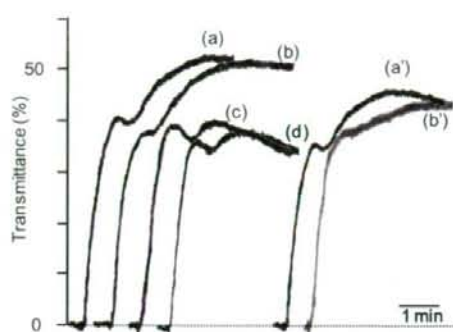


Fig. 18 ADP-induced platelet aggregation in the presence of H12-(ADP)vesicles (a)-(c), (a'), (b'), and H12-vesicles (d).

そこで(a)や(b)を添加したところ、その透過率は両者とも顕著に増大し、血小板の二次凝集を促進させる効果が認められた(Fig. 18)。他方、(a')と(b')の透過率は、(d)の添加時と比較して増大したもの(a), (b)のそれには及ばなかった。これは、内包ADPの放出量に伴う凝集促進効果の差と考えられ、ADP放出は小胞体の膜流動性と被覆層数に起因する可能性が示唆された。

### 3.4. RI 標識 H12-(ADP)小胞体を用いた ADP 放出率測定

RI 標識 H12-(ADP)小胞体を用いて、3と同等条件下(37°C)にて血小板凝集試験を行った。遠心分離によって回収した血小板凝集塊を Solvable<sup>®</sup>にて可溶化後、LSCにて測定し、[1] 血小板凝集塊への取り込み率と[2] 内包ADP放出率を算出した。

(c)は血小板凝集塊に  $8.3 \pm 1.1\%$ 取り込まれたが、内包ADPは全く放出されなかった(Table 3)。他方、(a)や(b)の血小板凝集塊へ取り込み率は(c)と同程度であったが、ADP放出率は、(a)  $58.8 \pm 6.1\%$ 、(b)  $49.9 \pm 5.0\%$ と算出され、膜流動性の増大((a) > (b) > (c))と共にADP放出率も増大した(Table 3)。

さらに、約2枚の被覆層数を有する(a'), (b')のADP放出率は、(a)や(b)のそれと比較して半分に低下した。

Table 3 Co-sediment ratio of vesicles into platelet aggregates and release of ADP from vesicles.

vesicles	Co-sediment ratio of liposomes into platelet aggregates (%)	ADP release (%)
(a)	$9.5 \pm 1.2$	$58.8 \pm 6.1$
(b)	$10.8 \pm 2.3$	$49.9 \pm 5.0$
(c)	$8.3 \pm 1.1$	<0
(a')	$11.3 \pm 3.1$	$24.5 \pm 4.2$
(b')	$13.3 \pm 1.0$	$21.2 \pm 6.9$

次いで、血小板凝集塊をパラホルムアルデヒド固定化後、凍結超薄切片観察したところ、(a)や(b)の添加時では(c)のそれと比較して明らかに大きな凝集塊を形成しており、活性化血小板間にH12-(ADP)小胞体(金コロイド標識)が存在する所見が得られた(Fig. 19, 分担研究者: 鈴木英紀博士と共同)。従って、H12-(ADP)小胞体はH12を介して血小板と多点結合して血小板凝集塊に巻込まれ(Fig. 19)、その際に受ける物理的な刺激によって内包ADPを放出するが、その放出には小胞体の膜流動性と被覆層数が関与する(即ち、膜流動性が高く被覆層数が少ない小胞体ほど、ADP放出率が增大する)ことを明らかにした。

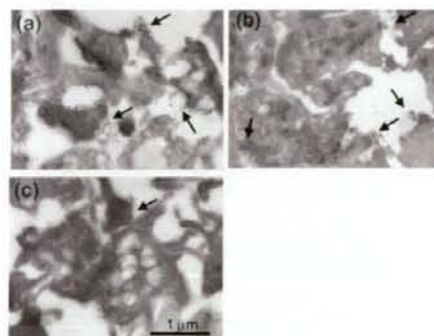
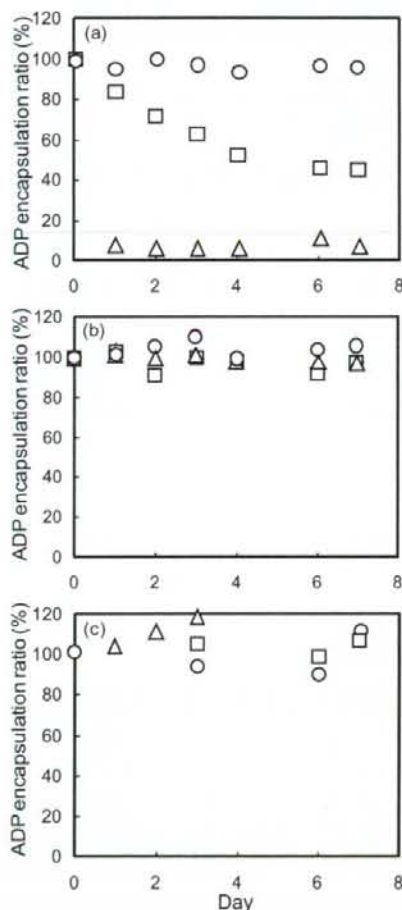


Fig. 19 TEM images of platelet aggregation involving with H12-(ADP)vesicles (a)-(c) after platelet aggregation studies. Colloidal golds (arrows) show H12 conjugated to the surface of the vesicles using anti human H12 antibody.

### 3.5. ADP 内包安定性

H12-(ADP)小胞体**(b)**、**(c)** ([lipid] = 10 mg/mL)を4°C、37°C、あるいは60°Cで振とうさせたところ、いずれの温度においても少なくとも1週間は安定にADPを内水相に保持していた(**Fig. 20 (b), (c)**)。特に、加速試験下(60°C, 7日間)においても安定に内包されていた(4°Cで7年間の安定性試験に相当)。



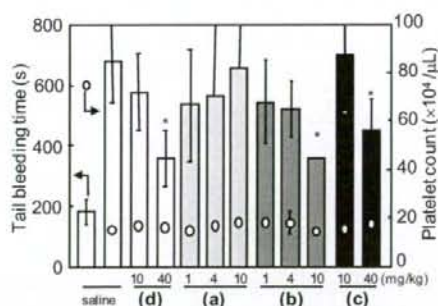
**Fig. 20** Stability of ADP encapsulated into the vesicles (a)-(c) at the temperature of 4°C (○), 37°C (□), and 60°C (△).

他方、**(a)**を4°Cで振とうさせたところ比較的安定に保持されたが、37°CではADPが

徐々に漏出し(7日後のADP保持率: 43.4 ± 1.0%), 60°Cでは1日後にしてほぼ全量漏出することが明らかとなった(**Fig. 20 (a)**)。これは、小胞体の膜流動性に 관련된結果であると考察され、膜流動性を高めてADP放出能を向上すると、保存時のADPの内包安定性が担保できなくなると思われた。

### 3.6. 止血能評価

血小板減少ラット([PLT]=(1.9 ± 0.2) × 10<sup>5</sup> /μL)に生理食塩水を投与したところ、出血時間は682 ± 198秒であり、正常ラット([PLT]= 8.1 ± 0.8 × 10<sup>5</sup> /μL)のそれ(178 ± 56秒)と比較して、約3.8倍延長した(**Fig. 21**)。ADP未内包H12-小胞体**(d)**を投与したところ、投与量依存的に出血時間は短縮した(10、40 mg/kgにおける出血時間は、それぞれ573 ± 127、335 ± 96秒)。H12未結合体では短縮効果が確認できなかったことから、H12-小胞体は止血能を有するナノ粒子であることを確認した(**Fig. 21**)。



**Fig. 21** Hemostatic effects of administration of (a)-(c) H12-(ADP)vesicles and (d) H12-vesicles on rat tail bleeding time. ○, platelet count in rats (n=6-10). \*P<0.05 for H12-(ADP)vesicles or H12-vesicles group vs. saline group.

そこで、**4**の *in vitro* 試験で最も高いADP放出能を有するH12-(ADP)小胞体**(a)**を投与したが、止血能の発現には至らなかった(1、4、10 mg/kgにおける出血時間はそれぞれ



540 ± 180, 565 ± 324, 656 ± 338 秒)。これは、(a)が ADP 内包安定性が低いため、血流中でかなりの ADP が漏出したためと推測できる(現在、RI 標識体を用いて血中濃度推移を測定中)。

次いで、H12-(ADP)小胞体(b)を投与したところ、1、4、10 mg/kg における出血時間はそれぞれ 543 ± 134, 521 ± 88, 349 ± 49 秒となり、H12-小胞体にて短縮効果の確認できた 1/4 の投与濃度で同等の短縮効果が得られた。他方、ADP を放出しない H12-(ADP)小胞体(c)を投与したところ、ADP 未内包体(d)と同等の出血時間短縮傾向を示し、これは H12 による止血効果のみ発現した結果であると考えられる(10、40 mg/kg における出血時間は、それぞれ 650 ± 189, 454 ± 100 秒) (Fig. 21)。

従って、ADP を安定に内包でき、且つ血小板凝集塊中で特異的に内包 ADP を放出する機構を持つ小胞体を投与すれば、止血能を向上できることを *in vivo* にて実証した。

#### D. 結論

平成 18 年度

- (1) プスルファンを 30 mg/kg を下腹部皮下投与することで、正常値の 1/15~1/20 まで血小板数が減少した重篤な血小板減少モデルウサギの作製法を確立した。
- (2) 血小板輸血により、投与血小板数の増大に伴い出血時間を短縮させた。
- (3) 重篤な血小板減少モデルウサギでも H12-PEG-polyAlb 投与により有意に出血時間を短縮させた。

平成 19 年度

- (1) H12-小胞体は、IOP を内包させることが

でき、4 日後でも安定に内包されていた。

- (2) H12-(IOP)小胞体を投与 1 時間後の CT 観察により、脾臓・肝臓へ集積することを明らかにした。

- (3) *in vivo* CT システムを用いて、H12-(IOP)小胞体がラット尾静脈の出血部位、頸静脈の塩化鉄傷害血栓に対して特異的集積することを初めて明らかにした。

平成 20 年度

- (1) H12-(ADP)小胞体を RI 標識することにより、血小板凝集をトリガーとして内包 ADP を放出することによって血小板凝集が促進される機構を初めて示すことができた。

- (2) 内包 ADP の放出には、小胞体の膜流動性と被覆層数が関与する(即ち、膜流動性が高く被覆層数が少ない小胞体ほど ADP 放出能が向上する)ことを明らかにした。

- (3) 保存時の ADP 内包安定性が高く、且つ血小板凝集塊中で内包 ADP が放出されやすい小胞体(平成 18 年度に確立した H12-(ADP)小胞体(b))を投与すれば、止血能が向上できることを *in vivo* にて実証した。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okamura, Y., Handa, H., Suzuki, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. New strategy of platelet substitutes for enhancing platelet aggregation at high shear rates; cooperative effects of a mixed system of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide- or glycoprotein Iba-conjugated latex beads under flow conditions *J. Artif.*

*Organs*, **9**, 251-258 (2006).

(2) 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司 「血小板代替物の開発の現状」 *人工血液* **13** (4), 155-160 (2006).

(3) 武岡 真司, 岡村 陽介 「血小板代替物の開発」 *月刊『BIO INDUSTRY』* **23** (7), 65-71 (2006).

(4) 武岡 真司, 岡村 陽介, 阿閉 友保 「動く臓器としての血液に学ぶ -人工赤血球・人工血小板への挑戦-」 “ファイバー” スーパーハイオパティクス ~近未来の新技术創成~, *Advanced Biomimetics series 2*, 453-457 (2006).

(5) Okamura, Y., Fujie, T., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. *Transfusion* **47**, 1254-1262 (2007).

(6) Fujie, T., Okamura, Y., and Takeoka, S. Ubiquitous transference of free-standing polysaccharide nanosheet in the development of a nano-adhesive plaster. *Adv. Mater.* **19**, 3549-3553 (2007).

(7) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* **18**, 158-166 (2008).

(8) Okamura, Y., Utsunomiya, S., Suzuki, H., Niwa, D., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of freestanding nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using

sacrificial film. *Colloids and Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects* **318**, 184-190 (2008).

(9) 武岡 真司, 岡村 陽介. 「血液の仕組みと人工血液(血液代替物)へのアプローチ」 *化学と教育 ~ヘッドライン~* **56** (6), 2-5 (2008).

(10) 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫. 「人工血小板の開発」 *Medical Science Digest* **34** (4), 138-140 (2008).

(11) 半田 誠, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫. 「特集: 血小板をつくろう -血小板代替物-」 *日本血栓止血学会誌* **19** (6), 774-778 (2008).

(12) Okamura, Y., Takeoka, S., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., and Handa, M. Development of fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 470-477 (2009).

(13) Okamura, Y., Goto, T., Niwa, D., Fukui, Y., Otsuka, M., Motohashi, N., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having hetero-surface. *J. Biomed. Mater. Res. A* **89A**, 233-241 (2009).

(14) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Specific accumulation of iopamidol-encapsulated phospholipid vesicles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide to vascular injury using computed tomography. *Nanomedicine* (2009) *submitted*.

(15) Okamura, Y., Fukui, Y., Suzuki, H., Kabata, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Disk-shaped biodegradable nanosheets carrying

fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide and their enhanced effects of platelet aggregation as a novel platelet substitute. *Bioconjugate Chem.* (2009) to be submitted.

(16) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide in platelet aggregation-dependent manner. *J. Controlled Release* (2009) to be submitted.

(17) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Biodistribution of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes. *Nanomedicine* (2009) to be submitted.

## 2. 学会発表

(1) Okamura, Y., Fujie, T., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. Particles 2006; Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Applications of Particle Technology at Florida, USA (2006.5.).

(2) Okamura, Y., Goto, T., and Takeoka, S. Preparation of albumin nano-sheets using patterning hydrophobic monolayers. Particles 2006; Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Applications of Particle Technology at Florida, USA (2006.5.).

(3) Okamura, Y., Goto, T., and Takeoka, S.

Preparation of freestanding albumin nano-sheets having hetero-surface. 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06) at Tokyo, Japan. (2006.5.).

(4) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06) at Tokyo, Japan. (2006.5.).

(5) Mochizuki, Y., Okamura, Y., and Takeoka, S. Synthesis and characterization of human serum albumin gel. 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06) at Tokyo, Japan. (2006.5.).

(6) Okamura, Y., Fujie, T., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin nanoparticles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. American Chemical Society 232nd National Meeting & Exposition at San Francisco, USA (2006.9.).

(7) Takeoka, S., and Okamura, Y. Preparation of freestanding nano-adhesive plasters having hetero-surfaces. American Chemical Society 232nd National Meeting & Exposition at San Francisco, USA (2006.9.).

(8) 後藤 隆宏, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いたアルブミンナノシートの構築」第 28 回バイオマテリアル学会 (2006.11., 東京).



- (9) 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いた微粒子融合シート構築と表裏へのヘテロ修飾」第 28 回バイオマテリアル学会 (2006.11., 東京).
- (10) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「任意の膜厚を有する(アルギン酸/キトサン)ナノシートの作製」第 28 回バイオマテリアル学会 (2006.11., 東京).
- (11) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「H12 ペプチド結合ポアルブミン重合体の PEG 修飾と止血能の延長効果」第 29 回日本血栓止血学会学術集会 (2006.11., 宇都宮).
- (12) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と血小板代替物としての止血能増幅効果」第 29 回日本血栓止血学会学術集会 (2006.11., 宇都宮).
- (13) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「H12 ペプチド結合ポアルブミン重合体の PEG 修飾と止血能に及ぼす効果」第 44 回日本人工臓器学会大会 (2006.10., 横浜).
- (14) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血能増幅効果」第 44 回日本人工臓器学会大会 (2006.10., 横浜).
- (15) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血能増幅効果」第 13 回日本血液代替物学会年次大会 (2006.8., 東京).
- (16) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血能増幅効果」第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5., 名古屋).
- (17) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「H12 ペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体調製と止血能評価」第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5., 名古屋).
- (18) 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いた蛋白質吸着マイクロシートの構築」第 55 回高分子学会年次大会 (2006.5., 名古屋).
- (19) 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血効果」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).
- (20) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ヘテロ表面を持つ(アルギン酸ナトリウム/キトサン)ナノシートの作製」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).
- (21) 後藤 隆宏, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いたアルブミンナノシートの構築」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).
- (22) 望月 佑次, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ヒト血清アルブミンゲルの合成及び化学修飾による物性制御」第 86 回日本化学会春季年会 (2006.3., 船橋).
- (23) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress at Geneva,

Switzerland. (2007.7.).

(24) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., and Ikeda, Y. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress at Geneva, Switzerland. (2007.7.).

(25) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress at Geneva, Switzerland. (2007.7.).

(26) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. American Chemical Society 234nd National Meeting & Exposition at Boston, USA (2007.8.).

(27) Takeoka, S., Fujie, T., and Okamura, Y. Modification of free-standing polysaccharide nanosheets and their application on a nano-adhesive plaster. American Chemical Society 234nd National Meeting & Exposition at Boston, USA (2007.8.).

(28) Fujie, T., Okamura, Y., and Takeoka, S. Fabrication of free-standing polysaccharide nanosheet in application of "nano-adhesive plaster". 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes (MMC-12) at

Fukuoka, Japan (2007.8.).

(29) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y. Hemostatic effects of liposomes bearing fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide amplified by encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitutes. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs at Osaka, Japan (2007.10.)

(30) 岡村 陽介, 宇都宮 沙織, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いた微粒子融合シートの構築と表裏へのヘテロ修飾」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(31) 福井 慶仁, 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いたポリ乳酸ナノ粒子シートの調製と表裏ヘテロ修飾」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(32) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「交互積層法による多糖ナノシートの構築とナノ絆創膏としての応用」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(33) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合 ADP 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(34) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-ニリン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(35) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田



- 康夫, 武岡 真司. 「重篤な血小板減少モデル動物を用いた H12 ペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の止血能評価」第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).
- (36) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 福井 慶仁. 「新しいバイオマテリアルとしてのフリースタANDINGな高分子ナノシートー血小板代替物からナノ絆創膏までの医用展開ー」第 56 回高分子討論会 (2007.9., 富山)
- (37) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「止血増幅機能を発現する人工血小板ー血小板凝集をトリガーとして血小板凝集惹起物質を放出するリン脂質小胞体の構築ー」第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).
- (38) 福井 慶仁, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ポリ乳酸ナノシートによる活性化血小板認識評価」第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).
- (39) 岡村 陽介, 武岡 真司, 鈴木 英紀, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 30 回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).
- (40) 鈴木 英紀, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「トロンビン刺激による H12 結合リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討」第 30 回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).
- (41) Okamura, Y., Takeoka, S., Maekawa, I., Eto, K., Ikeda, Y., and Handa, M. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide on the surface and adenosine 5'-diphosphate inside as a platelet substitute. The 13th Meeting on Thrombosis and Rheology at Tokyo, Japan (2008).
- (42) Okamura, Y., Eto, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Development of liposome-based platelet substitutes having an excellent hemostatic ability amplified by releasing adenosine 5'-diphosphate in the platelet aggregates. 11th Liposome Research Days Conference at Yokohama, Japan (2008).
- (43) Handa, M., Okamura, Y., Takeoka, S., and Ikeda, Y. Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-incorporated liposomes as a synthetic platelet substitute. American Association of Blood Banks annual meeting & Txpo. at Montreal, Canada (2008).
- (44) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合 ADP 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 88 回日本化学会春季年会 (2008.3., 東京).
- (45) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ADP内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第57回高分子学会年次大会 (2008.5., 横浜).
- (46) 福井 慶仁, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ポリ乳酸ナノシートによる活性血小板の認識能評価」第57回高分子学会年次大会 (2008.5., 横浜).
- (47) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣. 「表裏面の機能が異なるナノシートの構



築」第57回高分子討論会 (2008.9., 大阪).

(48) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠, 武岡 真司, 「血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリボソームの血小板代替物としての止血能評価」第14回日本血液代替物学会 (2008.10., 東京).

(49) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠, 「止血能を増幅する人工血小板: 血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリボソームの止血能評価」第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

(50) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠, 「ドデカペプチド結合リボソームの血管損傷部位に対する特異的集積性評価」第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫, 「薬物運搬体」特願 2007-000296.

(2) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 宇都宮 沙織, 後藤 隆宏 「薄膜状高分子構造体とその調製方法」特願 2006-292688.

臨床応用可能な人工血小板としての H12 結合微粒子の *in vivo* 評価  
-人工血小板の微小循環動態解析と安全性評価-

分担研究者	梶村 眞弓（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・講師）
研究協力者	森川 隆之（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・修士課程）
	岡村 陽介（早稲田大学・理工学研究所、 ヒューマンサイエンス振興財団研究員）
	菱木 貴子（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・助教）
	川村 友美（慶應義塾大学・医学部・医化学教室・研究員）
	江藤 薫子（早稲田大学・理工学術院・修士課程）
	丸山 仁美（慶應義塾大学・医学部・血液内科・研究員）
	武岡 真司（早稲田大学・理工学術院・教授）

## 研究要旨

血小板膜上に発現する活性化型 GPIIb/IIIa を特異的に認識する fibrinogen  $\gamma$  鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させたアルブミン重合体 (H12-PEGpolyAlb) 粒子は、血小板止血機能を補助する微小粒子として本研究班で開発された。そこで、H12 結合アルブミン重合体の止血効果のメカニズムを検討するため、*in vivo* 微小循環実験モデルを用いて、生体内で本粒子と血小板を可視化し、H12 結合アルブミン重合体と活性化血小板の特異的な相互作用を捉えることを目指した。laser ablation 技術を駆使して微小血管の任意の場所に血栓を作製し、形成過程にある一次血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子と活性化血小板接着・凝集支持作用を解析した。さらに血流速度を勘案した条件下で、本粒子と白血球や内皮細胞との相互作用を検討した。その結果、本粒子が活性化した血小板に選択的に接着し、非活性型の血小板とは相互作用しないことが確認された。このことから H12-PEGpolyAlb 粒子が有する止血増強作用は活性化血小板との特異的な結合により発揮される可能性が示唆された。

また最終研究年度には、本班で開研究発され人工微小血小板粒子としての実用化の最有力候補粒子である H12-(ADP)小胞体の安全性評価を行った。H12-(ADP)小胞体は H12 を担持させたリン脂質小胞体に ADP を内包させた小胞体である。本粒子は血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる効果に加え、血小板凝集塊の中でのみ、特異的に ADP を放出することによりさらなる止血能を発揮する。これまでの本班の研究により投与後の血小板、凝固・線溶系マーカーの変動がないこと、披験動物の急性の死亡例もないことなど安全性の検討がなされてきた。本年度はさらなる安全性評価の一端として、H12-(ADP)小胞体粒子単回投与による網内系負荷によって臓器代謝がどのように変動するかを捉えることを目標とした。そのため、まず小胞体投与後のラット肝

臓及び脾臓を試料とし、これまでにストレス応答性に発現レベルが調節されることが知られている誘導型酵素である heme oxygenase-1 (HO-1) の発現量を western blot および免疫組織化学を用いて検討した。その結果 H12-(ADP) 小胞体粒子投与後 6 時間では、肝臓及び脾臓の HO-1 の発現の上昇が認められた。しかしこの上昇は一過性で 24 時間までにベースラインレベルまで減少した。そこで HO-1 の誘導が最大に達した投与後 6 時間の肝臓のメタボローム解析を施行したところ、糖代謝、ペントースリン酸経路、クエン酸回路の代謝物に変化がある傾向が認められた。

## A. 研究目的

本分担研究では、人工血小板の実用化に必須のプロセスである人工血小板粒子の生体内挙動の評価系を確立するため詳細な検討を展開してきた。

血小板の膜上に発現する活性化型 GPIIb/IIIa を特異的に認識する fibrinogen  $\gamma$  鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV; H12) を担持させたアルブミン重合体 (H12-PEGpolyAlb) 粒子は、血小板止血機能を補助する微小粒子として本研究班で開発された。これまでの研究により、この H12-polyAlb 粒子が、血小板減少ラット及びラビットを用いた実験系で出血時間を短縮させる効果を有することが確認されている。しかしながら、H12-polyAlb 粒子の有する止血増強効果が活性化血小板との特異的な結合により発揮されるか否かは、*in vitro* の実験系においては示唆されていたが、*in vivo* の系では証左が得られていなかった。そこで、本粒子の微小循環内挙動および活性化血小板との相互作用を *in vivo* 実験系を用い検討した。粒子の微小循環内での可視化を容易にするため、粒子径約 1 $\mu$ m という通常の約 4 倍の径を有する H12 結合アルブミン重合体を作製し、この粒子と活性化血小板の特異的な相互作用を捉えることを目指した。laser ablation 技術を駆使して任意の場所の血管内皮細胞を障害し、

微小血管に血栓を惹起し、形成過程にある一次血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子と活性化血小板接着・凝集支持作用を解析した。その結果、本粒子が活性化した血小板に選択的に接着し、非活性化型の血小板とは相互作用しないことが確認された。

また、血小板の膜上に発現する活性化型 GPIIb/IIIa を特異的に認識する fibrinogen  $\gamma$  鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV; H12) を担持させたリン脂質小胞体に ADP を内包させた (H12-(ADP) 小胞体) は、血小板止血機能を補助する微小粒子として本研究班で開発された。これまでの研究により、この H12-(ADP) 小胞体が、血小板減少ラット及びラビットを用いた実験系で出血時間を短縮させる効果を有することが確認されている。しかしながら、H12-(ADP) 小胞体粒子単回投与による網内系負荷によって、ラット肝臓、脾臓などの臓器代謝がどのような変動するかについては証左が得られていなかった。そこで本年度は生化学的手法及び網羅的代謝解析技術を用いて本粒子投与による臓器代謝の変動を解析した。

## B. 研究方法

### B-1. 生体顕微鏡システムと微小循環観察記録システム



Suematsu らの方法に従い (Suematsu M, et al. Lab Invest 1994)、腸間膜微小循環を intravital microscope で観察した。Wistar 系雄性ラット (200 - 250 g) を pentobarbital sodium 50mg/kg 筋肉注射で麻酔し、大腿静脈にカテーテルを挿入し、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) を 1 mg/kg 投与し、体内の血小板を生体染色した。回盲部腸間膜を腹腔外に展開し、微小循環系を正立型レーザー共焦点顕微鏡 (BX51WI; Olympus, CSU21; Hamamatsu Photonics) で観察した。対物レンズは 40 倍 (LUMPlanFI/IR, NA 0.8) 及び 60 倍水浸 (LUMFL, NA 1.1) を使用した。三次元構築を目的とし z 軸方向に focal plane を制御するために、対物レンズに piezo actuator (P-721, Physik Instrumente) を装着し LVPZT position servo-controller (PZ73E E-662, Physik Instrumente) により 20 ms 毎に 0.1 micron の精度での制御を可能にした。

顕微鏡光路には CFSE 蛍光を画像化する 488 nm の argon laser、および rhodamine B を画像化する 568 nm の laser 出力が可能であり、前者の緑色蛍光のみ、あるいは後者の赤色蛍光のみ、さらには両者を同時に撮像し、merge を画像化するフィルターを実装し、自由に切り替えを行った。フィルターなしの状態での透過光線像の取得も可能とした。また、出力を自由に定量的に制御できる nitrogen-dye-laser (Micropoint 社) が実装され、微小血管の任意の場所を顕微鏡画面中央に設置することにより、1 micron の光束で細胞障害を起こすことを可能にした。出力エネルギーを可変することにより、破綻出血を伴う出血 (すなわち基

底膜損傷を伴うコラーゲン露出型の微小血管障害) の作成から、数個の赤血球漏出のみで、血小板の一次凝集塊形成を伴わない、junctional leakage のみの血管内皮細胞障害までを作成することができた。

CFSE 標識の血小板および rhodamine B 標識の liposome の画像を取得するために顕微鏡光路に高感度 3CCD カメラ (JK-TU52H 東芝製) を装着した。CCD カメラからの composite signal を RGB 変換し Meteor II ボードを介してすべて digital 画像として 24-bit の color digital 保存を行った。

## **B-2. Laser ablation による微小血管上への血栓形成**

Laser ablation のための窒素色素レーザー (Micropoint 社) の出力エネルギーは、破綻性出血を伴わず血管内皮細胞を障害し血栓形成を惹起し血小板を活性化させるレベルを用いた。具体的には frequency, 3Hz, filter transmission, 30-45 % で行った。照射を行う微小血管は、feeding artery や collecting vein で三角州のように構成されている腸間膜の triangle panel の中心部にあるもののみを選択した。これは、anatomical location を限定することにより、laser が通過する mesothelium の厚みをできる限り一定に保ち、血管壁に到達するレーザーのエネルギーを一定レベルに保つためである。

任意の場所の血管内皮細胞を障害し、微小血管に血栓を惹起し、形成過程にある一次血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子と活性化血小板接着・凝集支持作用を 10 分間記録・観察した。

### B-3. H12-PEG-polyAlbumin の投与

Rhodamine B 標識 H12-PEG-polyAlb 分散液([HSA]=14 mg/mL, Table 1)は、早稲田大学武岡真司教授から供与を受けた。

Table 1

Characterization of H12-PEG-polyAlb		
	H12-PEG-polyAlb	L-Cys-PEG-polyAlb
diameter (nm)	930 ± 220	702 ± 294
H12 (/particle)	1.6 × 10 <sup>4</sup>	-
[HSA] (mg/mL)	14	14
LPS (EU/mL)	<0.05	<0.05
label	rhodamine	rhodamine

ラット回盲部腸間膜を腹腔外に展開後、laser ablation により血管内皮細胞を障害することにより微小血管に血栓を惹起し、活性化した血小板が可視化できるようになったところで、頸動脈カテーテルより H12-PEG-polyAlb を投与した(500 µL/rat, injection rate; 1 mL/min)。

### B-4. 実験動物および H12-(ADP) 小胞体の投与

Wistar 系雄性ラット (180–260 g) は日本クレアより購入した。H12-(ADP)小胞体は、早稲田大学武岡真司教授から供与を受けた。Diethyl ether 麻酔後、H12-(ADP)小胞体を尾静脈投与した(40 mg/kg)。また、生理食塩水を陰性対照群とした。投与後、3, 6, 9, 24 時間で再度 diethyl ether 麻酔下、脾臓及び肝臓を採取した。また心臓採血後、全血を遠心分離(1580G, 4°C, 7min)にて血漿を回収し肝機能マーカーである GOT (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ) と GPT(グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ) GOT を測定した(SRL 委託)。

### B-5. Western blot

ラット肝臓、および脾臓組織から microsomal 画分を調製し、western blot 解析を行った。陽性対照群としては、recombinant HO-1 (Stressgen, Ann Arbor, MI)を使用した。試料 120 µg と recombinant HO-1 10 µg を 12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PolyVinylidene DiFluoride(PVDF)膜に転写した。1 次抗体として、抗ラット HO-1 モノクローナル抗体である GTS-1(Takara)を使用した。また α-tubulin を loading control とした。PVDF 膜は 0.1% TritonX-100 を含む Tris-buffer (以下 TBST) にスキムミルクを 5%加えた溶液の中で 1 時間インキュベートした後に、0.5µg/ml の GTS-1、または 1000 倍希釈した抗 α-tubulin 抗体 (Cell Signaling Technology)を反応させた。これらの抗体は 5%ウシ血清アルブミンを含む TBST で溶解し 4°C で一晩反応させた。1 次抗体を洗浄後、PVDF 膜を 2 次抗体として Horse radish peroxidase (HRP)標識抗マウス IgG<sub>1</sub> 抗体(GE Healthcare)、または HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (GE Healthcare) で 60 分間、室温にてインキュベートした。蛋白の発現は enhanced chemiluminescence system(GE Healthcare)を用いて検出した。

### B-6. 免疫組織化学

ラットから肝臓、脾臓を採取後、Periodate /Lysine/ Paraformaldehyde (PLP) 液で浸漬固定を行った(4°C, 4 時間)。固定後、10%、15%、20%ショ糖溶液で段階的に洗浄を行い、OCT compound ( Miles Laboratories,



Elkhart, IN) で包埋した。クライオスタットにて、厚さ 60 $\mu$ m の切片を作成した。1 次抗体として、抗ラット HO-1 モノクローナル抗体である GTS-1 を、macrophage を認識する抗体 Ki-M2R (BMA Biomedicals) を使用した。凍結切片は 0.3% TritonX-100 を含む PBS (PBST) に正常ヤギ血清 5% を加えた溶液中で 1 時間インキュベートした後に、GTS-1 を 5 $\mu$ g/ml、また KiM2R は 0.4 $\mu$ g/ml の濃度で反応させた。これらの抗体は 5% ウシ血清アルブミンを含む PBST で溶解し 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。1 次抗体を洗浄後、切片を 2 次抗体 Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG1 抗体、Alexa Fluor 555 標識抗体ラビット IgG 抗体、及び TO-PRO-3 (Invitrogen, Basle, Switzerland) で 4 時間、室温にてインキュベートした。2 次抗体を洗浄後、4% Paraformaldehyde /PBS で 10 分間再固定した。レーザー共焦点顕微鏡 Radiance2100 MP (BioRad, Hercules, CA) を用いて撮像した。

### B-7. メタボローム解析

ラットから肝臓、脾臓を摘出し、液体窒素にて凍結した。内部標準として L-Methionine sulfone (Wako 502-76641) and 2-Morpholinoethane sulfonic acid (MES, Dojindo 349-01623) 各 300  $\mu$ M を含んだ methanol 溶液 2 mL に約 300 mg の組織を入れ、超音波破碎器で 2 分間破碎した。十分攪拌した後、水を 500  $\mu$ L 加え再攪拌した。300  $\mu$ L-aliquot に 200  $\mu$ L のクロロホルムを添加し、これを遠心した (15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15 min)。上層の水-methanol 層から 200  $\mu$ L を限外濾過フィルター(分

画分子量 5,000, Amicon Ultrafree MC 5,000, Millipore) に移し、90 分間遠心した (10,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C)。ろ液を遠心濃縮し capillary electrophoresis (CE)-Mass spectrometry (MS) (Agilent) 解析試料とした。

## C. 研究結果及び考察

### C-1. H12-PEG polyAlb と活性化血小板の相互作用

本実験で用いた CFSE 標識プロトコールは過去の我々の報告にあるように、循環血液中の約 80% の血小板を染色した。

図 1 にラット腸間膜細静脈に形成された血小板血栓内及びその近傍での rhodamine 標識 H12-PEGpolyAlb の挙動を示した。H12-PEGpolyAlb を注入すると CFSE で染色された血小板に混じって rhodamine B 標識 H12-PEG polyAlb が血

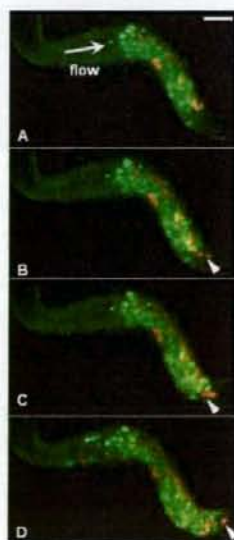


図 1. 血小板血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子の挙動。矢頭；活性化血小板と接着した後乖離する H12-PEG polyAlb 粒子。

栓表面の活性化した血小板と接着し、さらに大きな血栓を形成していく様子が