

200908016A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

H12(ADP)リポソームの人工血小板としての
前臨床評価(効力と安全性)

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

H12 (ADP) リポソームの人工血小板としての前臨床
評価 (効力と安全性)

(H21- 政策創薬- 一般- 005)

平成21年度

総括・分担研究報告書

平成22年3月

..... 研究組織

(研究代表者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

池田康夫 早稲田大学理工学術院 教授

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

木下学 防衛医科大学校 准教授

丸山徹 熊本大学薬学部 教授

鈴木克彦 早稲田大学スポーツ科学術院 准教授

後藤信哉 東海大学医学部 教授

村田満 慶應義塾大学医学部 教授

鈴木英紀 東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所 主任研究員

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

目 次

H12(ADP)リポソームの人工血小板としての前臨床評価
(効力と安全性)

平成21年度研究報告

I. 総括研究報告書

半田 誠 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 血小板減少症モデル動物を用いた H12(ADP)小胞体の止血能評価：用量依存性について

池田 康夫 ----- 15

2. アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットの作製法と、アスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討

池田 康夫 ----- 20

3. H12(ADP/5HT)小胞体の調製とその止血能評価

武岡 真司 ----- 27

4. 外傷性大量出血時の易出血性病態に対する H12(ADP)リポソームの効果：予後や止血効果、循環動態への影響について

木下 学 ----- 34

5. H12(ADP)リポソームの体内動態の解析に関する検討

丸山 徹 ----- 47

6. 好中球機能・サイトカイン産生能からみた各種人工血小板素材の in vitro 評価

鈴木 克彦 ----- 54

7. マウス精巣動脈血栓モデルを用いた血栓性評価

後藤 伸哉 ----- 60

8. H12(ADP)リポソームの安全性評価（血液凝固系、生化学検査）

村田 満 ----- 65

9. 試験物の効力評価（3）形態的観察；H12(ADP)リポソームの低濃度コラーゲン凝集に対する効果の検討-

鈴木 英紀 ----- 76

10. α IIb β 3 インテグリンと H12 の結合機序に関する研究

鎌田 徹治 ----- 82

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

V. その他

I . 総括研究報告

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業)

H12(ADP) リポソームの人工血小板としての前臨床評価 (効力と安全性)
総括研究報告書

研究代表者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

研究要旨

【研究目的】 H12(ADP) リポソーム(フィブリノゲンの γ 鎖 C 末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12)をその表面に担持させ、アデノシン 5' -二リン酸(ADP)を内包させたリン脂質小胞体)の効力と安全性について検討を加え、人工血小板としての適格性を評価する。

【研究方法】 ブスルファン惹起血小板減少症(ラット、ウサギ)の出血時間を指標に、リポソームの止血機能と投与量の関連を評価した。アスピリンによる血小板機能異常症をラットで、大量出血に合併する希釈性血小板減少症モデルをウサギで検討した。リポソーム投与で惹起される抗体をラットで検討した。リポソームの炎症系への作用を、ヒト好中球の活性化酸素産生能(ルミノール反応)等を指標に *in vitro* で評価した。リポソームの血栓症誘発作用を塩化鉄惹起マウス精巣動脈血栓症モデルで評価した。リポソームを投与されたラットやウサギの臨床検査値を測定した。遺伝子変異体を用い、2価イオン依存性の活性型 α IIb β 3インテグリンの構造解析を行った。

【研究結果】 リポソームには至適用量が存在し、それ以上の投与量ではむしろ効果は減弱した。人工血小板の適応である血小板機能異常症と大量出血に合併する希釈性血小板減少症の動物モデルが構築できた。リポソームの膜脂質成分へのIgM抗体が惹起され、薬剤の連続投与によるクリアランスの亢進が危惧される。好中球への直接作用や活性化酸素産生能への影響は認められず、動脈血栓症の増強作用もみられなかった。単回投与で血清脂質濃度の一過性の上昇以外臨床検査値の異常は認めなかった。H12の標的となる活性型 α IIb β 3インテグリンへの構造変化は β 鎖の2価イオン結合ドメインで制御されている。

【考察・結論】 種々の *in vitro in vivo* 評価系を用いて、H12(ADP) リポソームの人工血小板としての適格性を、効力と安全性の面から評価することができた。また、ニーズの高い対象(血小板機能異常症や大量出血に合併した希釈性血小板減少症)への適応について、評価モデルを設定した。

(研究分担者)

池田康夫	早稲田大学理工学術院	教授
武岡真司	早稲田大学理工学術院	教授
木下学	防衛医科大学校	准教授
丸山徹	熊本大学薬学部	教授
鈴木克彦	早稲田大学スポーツ科学術院	准教授
後藤信哉	東海大学医学部	教授
村田満	慶應義塾大学医学部	教授
鈴木英紀	(財)東京都医学研究機構	東京都臨床医学総合研究所 主任研究員
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部	講師

A. 研究目的

輸血用血液のうち、保存期間が短く、緊急使用が困難な血小板製剤を代替する人工血小板の開発は、欧米では50年以上の歴史があるにもかかわらず、いまだ実用化に至っていない。一方、我が国では、平成9年度より厚生労働科学研究費の補助を得て、独自の人工物の開発研究が開始され、多くの候補微粒子の中から、すべての構成成分が人工的に合成された H12(ADP)リポソームが人工血小板の最終候補薬剤として絞り込まれた（V その他：参考資料を参照）。

本微粒子は、ヒトフィブリノゲン γ 鎖のカルボキシ末端を構成する12個のアミノ酸配列（400HHLGGAKQAGDV411：H12）の人工ペプチドをその表面に結合させ、生理的な血小板刺激物質のアデノシン2リン酸（ADP）を内包化させた平均粒径250ナノメートルのリン脂質小胞体である。H12(ADP)リポソームは活性化した血小板に特異的に結合することで、出血部位に特異的に集積し、血小板凝集を増強するとともに、凝集依存性に内包化されたADPを放出することで、血小板輸血に匹敵する止血補助効果を発揮することが抗がん剤惹起血小板減少症動物モデルを用いて示された（Okamura Y, *et al*: Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477, 2009.）。

本研究（3カ年計画の1年目）は、創薬化への前臨床開発ステップとして、H12(ADP)リポソームの効力と安全性について、従来の輸血／血栓止血学的アプローチに加え、侵襲防御学、薬物動態学、免疫学等の見地から、1）ニーズのある病態モデルでの薬効と、2）炎症や病的血栓の誘発等の安全性について集学的なマイクロ／マクロ評価を行い、3）最適化を平行して押し進めながら、十分な安全域（薬効／毒性のマージン）が確保できる薬剤であるかを検討した。

B. 研究方法

1. *H12(ADP)/H12(ADP/5HT)* リポソームの調整:

DPPC、cholesterol、DHSG、polyethylen glycol (PEG) -DSPE、H12-PEG-Glu2C18 を、モル比 5/5/1/0.033/0.033 でベンゼンに溶解後、凍結乾燥させ、ADP 水溶液 (1 mM) と水和させ、押出造粒法を用いて H12(ADP) リポソームを製造し (粒径 250 ± 80 nm)、超遠心分離後 PBS に分散させ、ゲルろ過してリポソーム分散液を調整した。H12(ADP/5HT) リポソームは、上記以外に構成成分のモル比の異なる 2 種類 (5/5/3/0.039/0.039、5/5/5/0.045/0.045) の微粒子を、ADP/5HT 溶液 (ともに 1 mM) と水和させて製造した。

2. *H12(ADP)* リポソームの *in vivo* 効力評価:

1) 血小板減少動物モデルの作成と出血時間の測定 (池田、武岡): ラットおよび家兎に、抗がん剤のブスルファンをそれぞれ静脈と皮下投与し、投与後それぞれ 10 日目と 15 日目を血小板減少動物とした。リポソームの効力 (*in vivo* 止血能) は、それぞれ尾切法ならびに耳介法を用いて出血時間で解析した。2) 血小板機能低下症動物モデルの作成 (池田): ラットにアスピリンを投与し、出血時間と *ex vivo* 血小板凝集能を測定した。3) ウサギ大量出血モデルの作成 (木下): 家兎の大腿動脈から循環血液量相当の脱血を行い、洗浄赤血球やアルブミン溶液を補充して、脾臓や肝臓からの大量出血に起因した希釈性血小板減少症モデルを作成した。

3. *H12(ADP)* リポソームの *in vivo/ex vivo* 安全性評価:

1) リポソーム構成成分に対する抗体産生 (丸山): リポソームを単回投与したラットの血清中の抗体 (IgG と IgM) を抗原固相化したプレートを用いた酵素抗体法を用いて経時的に検出した。2) 血栓症増強作用の評価 (後藤): 塩化鉄でマウス精巣動脈内に誘発した動脈血栓症モデルを用い、リポソームの血栓生成への影響をリアルタイムに定量評価した。

4. その他の *in vitro/ex vivo* 実験系:

1) 血小板凝集計による血小板凝集能の測定と透過型電子顕微鏡解析 (池田、武岡、鈴木英)、2) マイクロプレートを用いて、好中球の活性酸素産生能等の測定 (鈴木克)、3) 健常ラットやウサギの血小板数や血液凝固検査、血液生化学検査の測定 (村田)、4) CHO 細胞発現系で site mutagenesis による変異体を用いた血小板 α IIb β 3 インテグリンの構造分子学的な解析 (鎌田)、を行った。

C. 研究結果及び考察

1. H12(ADP)リポソームの効力評価 (池田、武岡、鈴木英)

1) H12(ADP)リポソームの止血促進効果には至適用量が存在する : H12(ADP)リポソームの投与量とその効力について、血小板減少動物の延長した出血時間の短縮効果を用いて評価した。ラットを用いた検討では、既報の如く、血小板減少に伴い健常動物に比して約 3.8 倍に延長した出血時間を、脂質濃度が 10 mg/kg の投与量で、対照動物 (生食投与群と H12 未結合リポソーム投与群) に比して有意な短縮効果を示した。ところが、さらに用量を 40 mg/kg から 80 mg/kg に増やしてゆくと、むしろ投与量とともに出血時間の短縮効果は減弱して、最大投与量ではその効果に有意差は認められなくなつた (池田 H21 分担研究報告書 # 1、図 1)。血小板減少ウサギを用いた場合も、H12(ADP)リポソームは同様の用量/効果のパターンを示し、投与量を 10 mg/kg から、20、40、80 mg/kg と増加させると、最大効果を示す至適投与量は 20-40 mg/kg で、80 mg/kg の最大用量ではその出血時間短縮効果は消失することが示された (図 2)。H12(ADP)リポソームの止血機能は残存した血小板の機能を増強することで発揮されると考えられている。しかしながら、血小板に対してリポソームの濃度比が至適域を越えて過剰になると、むしろ血小板の凝集を阻害する方向に H12(ADP)リポソームが働く可能性が示唆された。血小板凝集の増強作用を定量的に評価できる *in vitro* 評価系 (たとえば、低濃度の血小板数で検出可能なレーザ散乱光による血小板凝集計を使用したアゴニスト惹起血小板凝集) を用いて、血小板とリポソームの濃度比が及ぼす影響を検証したい。

2) H12(ADP)リポソームの効力を、もう一種類の血小板刺激物質である 5HT (セロトニン) を追加して内包化することで、増強させることが可能であった : 5HT (セロトニン) は、血小板の濃染顆粒に濃縮され、ADP とともに血小板の活性化によって細胞外に放出され、血小板の活性化を増強 (ポジティブフィードバック) する生理活性化物質である。実際、凝集計を用いた ADP によるヒト血小板凝集反応への作用を *in vitro* で検討すると、5HT (終濃度、最大 $1\mu\text{M}$) 自体には凝集を惹起させる能力はないものの、終濃度 $3\mu\text{M}$ の ADP 凝集を最大凝集率で 50%程度から 80%まで濃度依存性に増強する作用があることが示された (武岡 H21 分担研究報告書、図 2)。そこで、5HT の安定的な内包化と放出効率が得られるリポソームの物性を、膜電荷の異なる 3 種類のリポソームを作成して検討した。その結果、膜負電荷脂質 DHSG の組成比の最も高い (すなわち負に

最も強く帯電した) 微粒子が、37℃震盪条件下24時間後の内包化安定性が最も高く、この脂質組成で作成した H12(ADP/5HT) リポソームは、H12(ADP) リポソームに比して、その ADP 惹起血小板凝集能の増強作用を増幅した (図4)。すなわち、ADP と 5HT の共封入は H12 リポソームの止血能増幅効果につながる可能性が示された。そこで、実際の効力を血小板減少ラットの出血時間で評価したところ、H12(ADP) リポソーム (10 mg/kg) に比して、より低い用量 (4 mg/kg) で有意な出血時間短縮効果を発揮することが示された (図5)。内包物質による血小板凝集促進作用について、透過型電子顕微鏡による形態的観察により、リポソームが活性化した血小板を架橋して、その内容物である ADP を放出して、凝集塊の密度やサイズを増加させていることを示唆する結果が示された (鈴木英 H21 分担研究報告書)。以上のことから、止血機能を有する内包物質を選択することで、微粒子の止血機能を制御できることが示され、同時にこの微粒子が止血部位に特異性を有する薬物運搬体であることがあらためて示唆された。

2. 適応対象となる評価系の確立 (池田、木下)

1) 人工血小板の適応となりうる血小板機能低下症の動物モデルとしてアスピリン起因性モデルラットを作成した：アスピリンは血小板のサイクロオキシゲナーゼ1を不可逆的に抑制することで、強力な血小板刺激作用を有するトロンボキサン A2 の産生を抑え、血小板の凝集能を抑制する。そこで、ラットにアスピリンを投与して、その血小板機能抑制効果を ex vivo の血小板凝集能と出血時間を用いて検討して、投与量、溶媒や最適時間について基礎的検討を加えた結果、メチルセルロースに低濃度 (溶液量が 10 ml/kg 以上) で溶解したアスピリン (水に難溶性) 溶液を用い、総投与量 50mg/kg 以上を経口投与することで、少なくとも1時間後には、ex vivo のコラーゲンによる血小板凝集能の消失と、出血時間の延長が安定的に得られることがわかった (池田 H21 分担研究報告書#2、表1、図3、4)。

2) 外傷性大量出血に合併した希釈性血小板減少症のウサギモデルを作成した：多発性外傷等による大量出血に伴う止血異常は、大量の輸血や輸液によって引き起こされる希釈性の血小板減少や凝固因子低下に起因し、輸血療法の適応対象として重要である。緊急的に供給が困難な血小板製剤に代わって人工血小板の最も有望な適応症と考えられ、ウサギを使用した希釈性血小板減少症モデルを開発した。全身麻酔下で、家兎から1回25mlの採血と採血量に対応したアルブミンを含む生理食塩水で浮遊した自己洗浄赤血球の投与を8回繰り返す。

て、合計で動物の循環血液量(200ml)相当の脱血を行い、血小板のみが平均17万/ μ lから5.5万/ μ lへ低下した希釈性血小板減少症を作成することができた(木下 H21 分担研究報告書、図1、2、6)。その結果、耳介出血時間の平均はおよそ120秒から760秒へ延長し(図9)、肝臓や脾臓に作成した外傷性損傷からの大量出血により全例が(図3、4、10)死に至るモデルが構築できた。ごく少数例での Preliminary な結果であるが、血小板(脱血した血液由来の多血小板血漿)の投与により出血死が防げ、さらに、H12(ADP)リポソーム投与でも救命できたことから、対照実験と比較して、H12(ADP)リポソームの人工血小板としての有効性を検討してゆく。

3. H12(ADP)リポソームの体内動態(丸山)

H12(ADP)リポソームのラットへの単回投与により、脂質膜の構成成分に対するIgM抗体が惹起された。リポソームを構成する脂質成分に対する抗体が惹起されることで、薬剤の頻回投与により網内系でのクリアランスが加速され、リポソーム製剤の効果が低下する現象(accelerated blood clearance phenomenon:ABC現象)が一般に知られている。実際、治療域での投与量(10mg/kgから20mg/kg)で、脂質構成成分の一つであるDSPE-PEGに対するIgM抗体が投与後5-10日をピークとして誘発された(丸山 H21 分担研究報告書、図1、2)。一方、IgG抗体は検出されなかった。さらに、投与量を40mg/kgに増やした場合では、他の構成成分であるDHSGに対するIgMが投与後3日をピークに誘発された(図2)。類似の脂質構成成分を有するリポソーム型酸素運搬体での検討では、IgM抗体が惹起されるにもかかわらず、その大量投与(1g/kgレベル)によりマウスの網内系が完全阻害されることでABC現象が回避された。平成20年度の研究によって、今回検討した単回の投与量でのリポソームの半減期はおよそ6時間で、脾臓を中心とした網内系の活動により排除される。したがって、今回明らかとなったIgM抗体が人工血小板の連続投与スケジュールにどのように影響するかを、投与量や網内系の処理能力(capacity)と抗体の関係について体内動態解析を通じて検討してゆく必要がある。

4. H12(ADP)リポソームの安全性について(鈴木克、後藤、村田)

1) in vitro 好中球機能(活性化酸素産生能、脱顆粒能、サイトカイン生成能)の評価により、H12(ADP)リポソームの生体適合性を支持する結果が得られた。すでに薬剤として使用されているリポソームであるが、本微粒子は表面にフィブリノゲン由来の人工ペプチドを結合させ、さらに生体アミンであるADP

を含有していることから、それらの因子が重要な役割を演じている炎症系への影響が危惧される。実際、終濃度が最大 1mg/ml（治療域での in vivo 濃度はおよそ 0.1 mg/ml）までの各種リポソーム存在下で、ルミノール反応を用いた活性化酸素測定法により、健常人好中球への直接作用や zymosan による活性化酸素産生能への修飾作用は認められなかった（鈴木克 H21 分担研究報告書、図 1-6）。一方、ハイドロゲル内に遊走した好中球の活性化酸素産生能や、zymosan によるミエロペルオキシダーゼ放出能やサイトカイン（IL-6, -8）産生能は、高濃度（1mg/ml）の ADP を含有しないリポソーム（H12 リポソームや mock リポソーム）の存在下で修飾を受けた（図 7-1 1）。少なくとも、H12(ADP) リポソームに関しては、好中球に対する明らかな異物反応は今回の検討では認められなかったが、ADP の修飾作用も含めて、作用濃度や時間との関連からリポソームの炎症系への影響についてさらに検討する必要性が示された。

2) 実験的動脈血栓症マウスモデルにおいて、H12(ADP) リポソームによる動脈血栓の形成を助長する作用は認められなかった。 H12(ADP) リポソームは血小板の凝集を促進することで止血機能を発揮するが、血小板が主役である病的な動脈血栓への影響は薬剤の安全性から最も危惧される。H20 年度までの報告では、少なくとも in vitro の実験系では、リポソームの動脈血栓の形成促進作用は認めなかった。そこで、今回は塩化鉄の局所処理によりマウスの精巣動脈に誘発させた血栓へのリポソームの影響を in vivo で検討した結果、治療域の投与濃度（10 mg/kg）において、動脈の血栓による閉塞時間は対照と比較して、有意な変化を示さなかった（後藤 H21 分担研究報告書、図 4）。今回の結果は、H12(ADP) リポソームと活性化血小板の結合は、ずり速度の高い条件下では成立しにくいとの知見と一致する。安全性を担保した前臨床データを集積するためには、動脈硬化を基盤とした血栓症や静脈血栓症のモデルを使用した検討が動物種を代えて必要と考えられる。

3) H12(ADP) リポソームの健常動物への大量投与で安全性を危惧する臨床検査値の変化は認められなかった。 H20 年までの検討では、リポソームも単回投与に関して、血小板減少動物（ラット、ウサギ）における臨床検査値を検討し、出血凝固系検査への影響は一切認められなかった。そこで、今回は健常ラットを対象として、リポソームの単回投与による臨床検査値への影響を検討した。その結果、標準量の 2 倍の過剰投与（80 mg/kg）においても、血小板数の変化は起こらなかった（村田 H21 分担研究報告書、図 1-1、3-1）。一方、コレス

テロールや中性脂肪などの脂質項目は、投与したリポソームの脂質含量に依存して、一過性に血清値が上昇した（図1-3、-4）。また、それとともに、主な異化臓器である脾臓での脂質含量が増加した（肝臓では増加せず）（図2）。

5. *H12(ADP) リポソームの結合標的である活性型 GPIIb/IIIa 複合体 (α IIb β 3 インテグリン) の2価イオン依存性の構造変化の解析 (鎌田)*

α IIb β 3 インテグリンは、血小板の活性化で惹起された屈曲型 (bent conformer) から伸展型 (extended conformer) への起き上がりと β 鎖の hybrid ドメインの swing-out による構造変換に伴いフィブリノゲン (H12 ドメインを介して) の低親和性受容体から高親和性受容体に転換することが知られている。H20 までの報告では、リコンビナント構造変異体を用いて、H12(ADP) リポソームの結合は α IIb β 3 インテグリンの活性化構造変化に依存して著しく増加し、血小板凝集を増強することを支持する結果を報告した。そこで、今回は、この複合体のフィブリノゲン受容体機能に不可欠な2価イオンによる構造変化について検討を加えた。その結果、Ca/Mg イオン存在下での必要な構造変化 (受容体機能を保持するためには) は、起き上がりと β 鎖の hybrid ドメインの swing-out が、一方 Mn イオン存在下では起き上がり変化のみが必要であることが示された (鎌田 H21 分担研究報告書、図4)。さらに構造変異体の検討により、 β 鎖の2価イオン結合部位である ADMIDAS 部分の構造が、上記2種類の2価イオン依存性の複合体の構造変化を制御していることが明らかとなった (図6、7)。H12 リポソームの標的となる α IIb β 3 インテグリンの構造変化の解析は、より親和性/特異性の高いペプチドリガンドの設計に寄与するであろう。

D. 結論

H12(ADP) リポソームの効力と安全性について検討した結果、1) 人工血小板としてその機能を発揮するには至適濃度 (投与量) が存在すること、そして内包化物質の選択 (5HT を共封入) によりその機能を増強できること、を明らかにした。2) 必要性の高い適応対象となる血小板機能異常症 (アスピリンによる) や大量出血に伴う止血異常症 (希釈性血小板減少症) の動物モデルを構築した。3) リポソームの投与 (ラットへ) により脂質構成成分に対する抗体 (Ig M) が惹起され、継続使用時の薬効に影響する可能性が指摘できた。4) 炎症系への影響 (活性化酸素生成能などの in vitro 好中球機能) や血小板・凝固系の活性化による血栓症 (塩化鉄による in vivo 動脈血栓) の誘発作用は認められず、

薬剤の安全性を危惧するデータは得られなかった。5) H12 ペプチドが認識する活性型 GPIIb/IIIa 受容体の発現は、2 価イオンの結合部位の構造変化に依存して誘導されることを分子構造学的に明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

(原著)

(1) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Visualization of Liposomes Carrying Fibrinogen γ -Chain Dodecapeptide Accumulated to Sites of Vascular Injury Using Computed Tomography. *Nanomedicine*, 6, 391-396(2010).

(2) Okamura, Y., Fukui, Y., Kabata, K., Suzuki, H., Handa, M., Ikeda, Y., Takeoka S. Novel Platelet Substitutes: Disk-Shaped Biodegradable Nanosheets and their Enhanced Effects on Platelet Aggregation. *Bioconj Chem.*, 20, 1958-1965 (2009).

(3) Okamura, Y., Goto, T., Niwa, D., Fukui, Y., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having heterosurfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 89A, 233-241(2009).

(4) Tsuji, T., Takeoka, S., Okamura, Y., Sudo, R., Ikeda, Y., Tanishita, K. Motion of polymerized albumin particles in a model arteriole in the presence of red blood cells. *J. Biorheol.*, 1, 29-34(2009)

(5) Wada, T., Okamura, Y., Takeoka, S., Sudo, R., Ikeda, Y., Tanishita, K. Deformability and adhesive force of artificial platelets measured by atomic force microscopy. *J. Biorheol.*, 1, 35-40(2009)

(6) Fujie, T., Matsutani, N., Kinoshita, M., Okamura, Y., Saito, A., and Takeoka, S. : Adhesive, flexible, and robust polysaccharide nanosheets integrate for tissue-difect repair. *Adv. Funct. Mater.* 19: 2560-2568, 2009.

(7) Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M. Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce

the accelerated blood clearance phenomenon in mice. Drug Metab Dispos. (2009) 37(11):2197-203.

(総説)

- (1) 半田誠：トピックス：人工血小板、Anesthesia 21 Century 11, 43-48(2009).
- (2) 半田誠：人工血小板の開発「新しい診断と治療のABC、63、血液7：血小板減少症・増加症」最新医学、別冊、175-181(2009).

2. 学会発表

- (1) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 渡邊 直英, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「膜流動性の異なるドデカペプチド結合(ADP内包)リポソームの構築とADP放出特性」第31回日本バイオマテリアル学会大会 (2009. 11., 京都).
- (2) Handa, M. Artificial platelets and platelet substitutes, Novel developments, Plenary lecture, XXth regional congress of International Society of Blood Transfusion, Nagoya (2009. 10., Nagoya).
- (3) 半田 誠. 人工血小板代替物の過去・現在・未来、日本血液代替物学会 第16回年次学術総会 特別講演、東京、(2009. 10., 東京).
- (4) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「膜流動性の異なる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調製とADP放出特性」第16回日本血液代替物学会年次大会 (2009. 10., 東京).
- (5) 武岡 真司, 岡村 陽介, 江藤 薫子, 半田 誠, 池田 康夫. 「放射性同位元素標識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調製とその血中動態・臓器分布」第16回日本血液代替物学会年次大会 (2009. 10., 東京).

H. 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.

Ⅱ. 分担研究報告

血小板減少症モデル動物を用いた H12-(ADP)小胞体の止血能評価：用量依存性 について

分担研究者 池田 康夫 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
勝野 峻介 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
新井 愛美 (早稲田大学 先進理工学部)
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 技術員)
渡邊 直英 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 助教)
半田 誠 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 教授)

研究要旨

これまでの研究で、フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を表面に結合させ、血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させたリン脂質小胞体(H12-(ADP)小胞体)は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させながら ADP を放出し、血小板輸血を代替して、血小板減少動物の止血機能を改善させることを実証してきた。

平成 21 年度は、血小板減少症モデル動物(ラット、ウサギ)に対する H12-(ADP)小胞体の投与最適濃度の存在を明らかにすることを目的とした。血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価では、投与濃度 1、4、10 mg/kg までは投与量依存的に出血時間の短縮効果が得られたが、40、80 mg/kg と投与量が増加すると、10 mg/kg 投与時に比べ、むしろ出血時間短縮効果の減少が見られた。同様に、血小板減少症モデルウサギを用いた止血能評価でも、投与濃度 1、4、10、20 mg/kg までは投与量依存的に出血時間の短縮効果が見られたが、40、80 mg/kg と投与量が増加すると、20 mg/kg 投与時に比べ、その効果は低減する傾向が見られた。これらの動物モデルでの結果から、H12-(ADP)小胞体が有効な止血効果を発揮するためには、投与最適濃度が存在する可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させたリン脂質小胞体(H12-小胞体)は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成を促進させながら内包物質を放出し、特に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包化させ

れば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能が著明に増強されることを *in vivo* で証明してきた^{1),2)}。

平成 21 年度は、血小板減少症モデル動物(ラット、ウサギ)に対する H12-(ADP)小胞体の投与最適濃度の存在を明らかにすることを目的とした。

- 1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
- 2) 平成 18, 19 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書

B. 研究方法

1. H12 結合 PEG 脂質 (H12-PEG-Glu2C18) の合成

1.1. Glu2C18 の合成

グルタミン酸 (2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物 (4.56 g, 24 mmol) をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた (105°C, 1 hr)。この系にステアリルアルコール (11.9 mg, 44 mmol) を添加して沸点還流させた (105°C, 14 hr)。溶媒を減圧除去後、残分をクロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で 2 回、水 150 mL で 2 回分液洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧除去した。メタノール再結晶、濾過後、乾燥させて白色粉末 Glu2C18 (13.3 g, 収率 85%) を得た。

1.2. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MALPEG-Glu2C18) の合成

クロロホルム 10 mL 中に Glu2C18 (575.5 mg, 880 μmol)、TEA (122.5 μL, 880 μmol) を添加後、MALPEG-NHS (Mw:3400, 1.5 g, 279 μmol) を溶解、攪拌した (r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した後、ベンゼン中に溶解し凍結乾燥後、白色粉末 MALPEG-Glu2C18 (1448.1 mg, 収率 70%) を得た。

1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18) の合成

MAL-PEG-Glu2C18 (1000 mg, 253.7 μmol) と C 末端にシステインを結合させた H12

(328 mg, 253.7 μmol) を DMF 10 mL に溶解、攪拌した (r.t., 72 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製後、メタノールにて抽出し、シリカゲルカラムにて精製した (展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水=65/25/4, v/v/v)。真空乾燥後、ベンゼンに溶解させて凍結乾燥し、淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18 (427.6 mg, 収率 32%) を得た。

2. H12-(ADP)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl choline (DPPC) (1000 mg, 1.36 mmol)、cholesterol (527 mg, 1.36 mmol)、1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) (190 mg, 136 μmol)、PEG-DSPE (47.4 mg, 8.17 μmol)、H12-PEG-Glu2C18 (43.4 mg, 8.17 μmol) をベンゼンに溶解させ、凍結乾燥させた (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.03/0.03, モル比)。ADP 水溶液 (1 mM) にて水和させ、押出造粒法を用いて H12-(ADP)小胞体を調製した (粒径 250 ± 80 nm)。超遠心分離後 (33000 rpm, 30 min, 4 °C)、PBS に分散させ小胞体分散液とした。さらに、小胞体分散液をゲルろ過 (Sephadex G25) し、外水相に微量に残存する ADP を完全に除去した。

3. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

Wistar 系雄性ラット (三協ラボ, 8 週齢, 250-270 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)、投与開始後 10 日目を血小板減少ラット ([PLT] = 19.6 ± 2.6 × 10⁴ /μL) とした。セボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体を尾静脈から投与した (4

mL/kg)。また、生理食塩水を陰性対照群とした。投与5分経過後、尾先端から1 cm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中に浸し出血時間を測定した。

4. 血小板減少症モデルウサギを用いた止血能評価

ニュージーランドホワイトウサギ(雄性, 11週齢, 2.5 kg)は、三協ラボより購入した。ケタミン(60 mg/mL)とセラクター(2%)の混合溶液(ケタミン/セラクター = 3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔後、ブスルファン ポリエチレングリコール溶液(10 mg/mL)を0、3日目に下腹部皮下投与した(全投与量 30 mg/kg)。投与開始後15日目を血小板減少ウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$)とした。ケタミン/セラクター麻酔後、23G翼状針を装着したシリンジポンプにて検体(H12-(ADP)小胞体、生理食塩水、PRP([PLT] = 10, 50, $100 \times 10^4 / \mu\text{L}$))を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与開始から30分経過後、耳の血管が確認できない部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(長さ6 mm)。耳の切傷部位を生理食塩水中に浸し出血時間を測定した。

C. 研究結果及び考察

1. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

血小板減少ラット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([血小板] = $80 \times 10^4 / \mu\text{L}$)の出血時間(178 ± 56 秒)と比較して、約3.8倍延長した(Fig. 1)。脂質濃度を0.25、1、2.5、10、

20 mg/mLに調整した(ADP)小胞体分散液を投与したところ、投与量依存な出血時間の短縮傾向は見られず、1、4、10、40、80 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ 690 ± 97 、 631 ± 103 、 665 ± 184 、 586 ± 70 、 586 ± 257 秒とほぼ同等であった。そこで、脂質濃度0.25、1、2.5 mg/mLに調整した H12-(ADP)小胞体分散液を投与したところ(4 mL/kg)、1、4、10 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ 543 ± 134 、 521 ± 88 、 349 ± 49 秒となり、投与量依存的に出血時間の短縮効果が得られることが立証できた。しかし、10、20 mg/mLに調整した H12-(ADP)小胞体分散液を投与したところ(4 mL/kg)、40、80 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ 397 ± 102 、 508 ± 175 秒となり、10 mg/kg 投与時に比べ、むしろ出血時間延長傾向が見られた。この結果から、血小板減少症モデルラット([PLT] = $19.6 \pm 2.6 \times 10^4 / \mu\text{L}$)には H12-(ADP)小胞体の投与最適濃度があることが実証された。投与リポソーム濃度が増大し、投与リポソーム数が増大することで、血小板凝集阻害が起こっている可能性が考えられた。

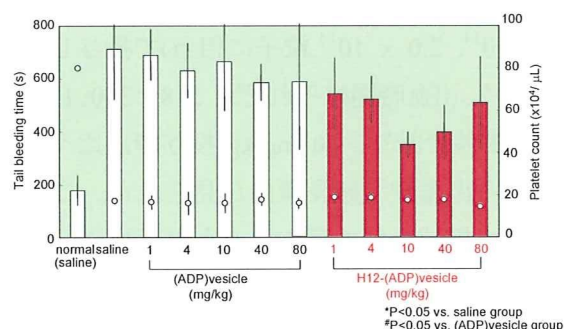


Fig. 1 Effects of the administration of (ADP)vesicle or H12-(ADP)vesicle on tail bleeding time. The administered amount of (ADP)vesicle or H12-(ADP)vesicle was 1, 4, 10, 40, 80 mg/kg equivalent of lipid. ○; platelet count in the rats (N = 8-12).

2. 血小板減少症モデルウサギを用いた止血能評価

血小板減少症モデルウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4$ / μ L)に生理食塩水を投与したところ(4 mL/kg)、出血時間は 1695 ± 197 秒であり、正常ウサギ([PLT] = 41×10^4 / μ L)のそれ(112 ± 24 秒)と比較して約 15 倍延長した(**Fig. 2**)。陽性対照群としてウサギ血小板を 0.4×10^9 、 2.0×10^9 、 4.0×10^9 PLT/kg (1.0×10^9 、 5.0×10^9 、 1.0×10^{10} PLT に相当)で投与したところ、投与血小板数依存的に出血時間を短縮させた(それぞれ 1505 ± 410 、 863 ± 440 、 505 ± 257 秒)。そこで、H12-(ADP)小胞体をそれぞれ 10、20 mg/kg (脂質量換算、約 2.5×10^{13} 、 5.0×10^{13} 粒子に相当)で投与したところ、出血時間はそれぞれ 881 ± 303 、 428 ± 44 秒であり、生理食塩水群(1696 ± 197 秒)あるいは(ADP)小胞体群(10、20、40、80 mg/kg で 1429 ± 643 、 1375 ± 663 、 1371 ± 639 、 1257 ± 412 秒)と比較して、投与量依存的に有意に出血時間を短縮させ、血小板投与群のそれに匹敵した。従って、H12-(ADP)小胞体は血小板減少ウサギの出血時間を効率よく短縮させる微粒子であることが確認できた。しかし、40、80 mg/kg (脂質量換算、約 1.0×10^{14} 、 2.0×10^{14} 粒子に相当)で投与したところ、出血時間はそれぞれ 518 ± 350 、 1176 ± 223 秒であり、20 mg/kg 投与時に比べ、むしろ出血時間延長傾向が見られた。これは血小板減少症モデルラットと同様に、血小板減少症モデルウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4$ / μ L)にも H12-(ADP)小胞体の投与最適濃度が存在することが実証された。

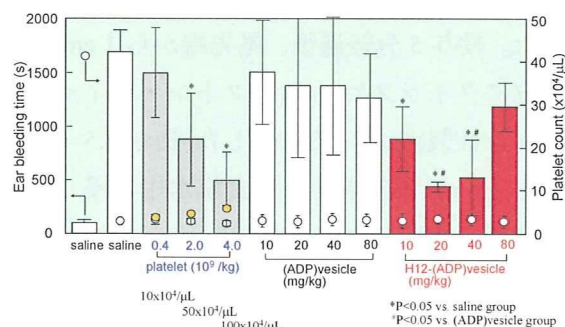


Fig. 2 Effects of the administration of H12-(ADP)vesicle and PRP on ear bleeding time. The administered amount of H12-(ADP) vesicle was 10, 20, 40, 80 mg/kg, and PRP was 0.4, 2.0, 4.0 $\times 10^9$ /kg. \circ ; platelet count in the rabbits (N = 6). *P<0.05 vs. saline groups, and #P<0.05 vs. (ADP)vesicle group at the same dose.

D. 結論

血小板減少症モデル動物を用いた止血能評価において、H12-(ADP)小胞体の投与最適濃度の存在が実証された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Visualization of Liposomes Carrying Fibrinogen γ -Chain Dodecapeptide Accumulated to Sites of Vascular Injury Using Computed Tomography *Nanomedicine* (2009) *in press*.
- (2) Okamura, Y., Fukui, Y., Kabata, K., Suzuki, H., Handa, M., Ikeda, Y., Takeoka S. Novel Platelet Substitutes: Disk-Shaped Biodegradable Nanosheets and their Enhanced Effects on Platelet Aggregation. *Bioconjug Chem.* (2009) *in press*.
- (3) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda,