

Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen γ -chain peptide in platelet aggregation- dependent manner. *J. Controlled Release* (2009) to be submitted.

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

(5) 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)

(6) 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)

2. 学会発表

(1) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 江藤 薫子, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「放射性同位元素標識したドデカペプチド結合(ADP内包)リン脂質小胞体からのADP放出特性」第89日本化学会春季年会 (2009.3., 千葉).

(2) 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).

(3) 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).

(4) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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：政策創薬総合研究事業総合研究事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 池田 康夫 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科, 教授)
研究協力者 勝野 峻介 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
研究協力者 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)
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)
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】

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)をその表面に結合させ、生理的血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包化させたリン脂質小胞体(H12-(ADP)小胞体)は、止血部位で活性化した血小板の凝集反応を著明に増強させて、血小板輸血の代替物として、血小板減少動物の低下した止血能を顕著に改善させることを示してきた。そこで今回は、H12-(ADP)小胞体のさらなる適応対象の可能性を探るべく、日常診療で遭遇する血小板機能低下症のモデルとして、抗血小板薬であるアスピリンの投与により顆粒放出障害を惹起させた血小板機能低下症モデルラットの作製法を検討した。同時に、血小板凝集計を用い、アスピリン惹起機能低下症血小板の調整を検討した。アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットは 2%CMC を溶媒とした溶液(アスピリン：50 mg/kg 以上かつ溶液量：10 mL/kg 以上)を経口投与し、少なくとも 1 時間以上経過後に、出血時間を測定することで作製可能であることが示された。アスピリン起因性機能低下血小板は、コラーゲン凝集の測定系で、多血小板血漿にアスピリン(f.c. 10 μ M)を添加し、常温にて 30 分反応させることで調製可能であった。

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)を内包させれば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能が顕著に

向上できることを *in vivo* にて証明してきた^{1),2)}。

平成 21 年度は、H12-(ADP)小胞体のさらなる適応対象の可能性を探るべく、抗血小板薬であるアスピリンの投与により顆粒放出障害を惹起させた血小板機能低下症モデルラットの作製を検討した。同時に、血小

板凝集計を用い、H12-(ADP)小胞体のアスピリン惹起機能低下症血小板に対する血小板凝集能促進効果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, 272 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、高压押出法を用いて 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. 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

3.1. アスピリンによる血小板機能低下確認試験

Wistar 系雄性ラット (三協ラボサービス, 8

週齢、230-280 g)にアスピリン(ASA)-ポリエチレングリコール(PEG、Mw: 400 Da)溶液(2.5、12.5、25 mg/mL)を経口投与した(4 mL/kg)。投与 3 時間後に心臓採血し、全血(1/10 (v/v) 3.13 % クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(2500 rpm, 2 min, r.t.)、多血小板血漿(PRP)を得た。PRP([PLT] = 20×10^4 / μ L)に、ADP(f.c. 20 μ M)あるいは collagen(f.c. 20 μ g/mL)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて連続的に透過率の変化を測定した。

3.2. 溶媒の検討

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢、230-280 g)に ASA-PEG 溶液(2.5、12.5、25 mg/mL)を経口投与した(4 mL/kg)。また、PEG 溶液を陰性対照群とした。投与 3 時間後に尾先端から 1 cm の部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(深さ 1 mm x 長さ 10 mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。他方、ASA-2%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液を投与したラットを用い、同様の試験を行った。

3.3. 投与量の検討

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢、230-280 g)に ASA-2%CMC 溶液(2.5、12.5 mg/mL)を経口投与した(4 mL/kg、10 mL/kg)。また、2%CMC 溶液を陰性対照群とした。投与 1 時間後に尾先端から 1 cm の部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(深さ 1 mm x 長さ 10 mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。

3.4. 投与後切傷までの時間の検討

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢、230-280 g)に ASA-0.5%CMC 溶液(1、5 mg/mL)を経口投与した(10 mL/kg)。また、0.5%CMC 溶液を陰性対照群とした。投与開

始から 1、3 時間後に尾先端から 1 cm の部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(深さ 1 mm x 長さ 10 mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。

4. 血小板凝集計を用いた H12-(ADP)小胞体の血小板凝集促進能評価

4.1. アスピリン起因性機能低下症血小板の調製

全血(1/10 (v/v) 3.8 % クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(600 rpm, 15 min, r.t.)、多血小板血漿(PRP)を得た。アスピリン(ASA、f.c. 5、10、20 μ M)を PRP([PLT] = 20×10^4 / μ L)に添加後、振とうし(15、30、45 min, r.t.)、collagen(f.c. 1 μ g/mL)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて連続的に透過率の変化を測定した。

C. 研究結果及び考察

1. アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットの止血能評価

1.1. アスピリンによる血小板機能低下確認試験

アスピリン(ASA)ポリエチレングリコール(PEG、Mw: 400 Da)溶液を投与したラットの多血小板血漿(PRP)を ADP(f.c. 20 μ M)にて血小板凝集を惹起させたところ、ASA 投与濃度によらず、透過率はほぼ同程度であった(**Table 1**)。他方、collagen(f.c. 20 μ g/mL)にて血小板凝集を惹起させたところ、ASA 投与濃度依存的に透過率は減少し、ASA 投与濃度 50 mg/kg 以上では血小板凝集が見られなかった。これは、ASA の血小板に対する作用機序を支持する結果であった。すなわち、ASA が選択的にシクロオキシゲナーゼのセリン基をアセチル化することで不可

逆的にその作用を阻害し、顆粒放出依存性である collagen 凝集を抑制していることを確認できた。

Table 1 Effects of ASA on platelet aggregation induced by ADP and collagen in PRP derived from rats (N=4-6).

Treatment	collagen(f.c. 20 µg/mL)	ADP(f.c. 20 µM)
Control	72.5 ± 3.5 %	56.7 ± 5.8 %
ASA 10 mg/kg	37.2 ± 15.6 %	60.6 ± 1.0 %
50 mg/kg	< 0	55.8 ± 1.2 %
100 mg/kg	< 0	57.1 ± 3.5 %

1.2. 溶媒の検討

Wistar 系雄性ラットに PEG 溶液を経口投与し(4 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 402 ± 72 秒であった(**Fig. 1**)。ASA-PEG 溶液(2.5、12.5 mg/mL)を経口投与したところ(4 mL/kg)、出血時間の延長はほとんど見られなかった(10、50 mg/kg における出血時間はそれぞれ 507 ± 207、578 ± 117 秒)。さらに、ASA-PEG 溶液(25 mg/mL)を経口投与したところ、出血時間は有意に延長し、100 mg/kg 投与時における出血時間は 761 ± 289 秒になった。

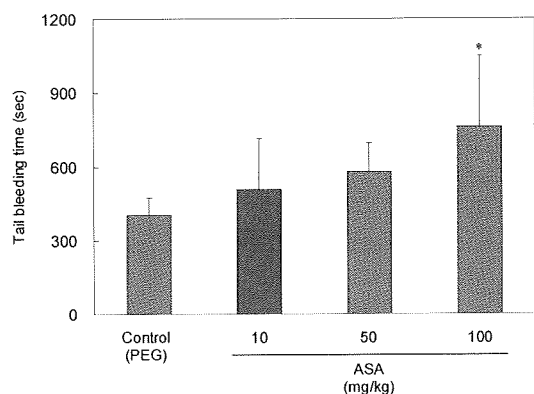


Fig. 1 Prolonged effects of tail bleeding time by administration of ASA into rats. *P<0.05 for ASA group vs. PEG solution group. (N = 5-18).

そこで、Wistar 系雄性ラットに 2%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液を経口投与したところ(4 mL/kg)、出血時間は 368 ± 6 秒であった(**Fig. 2**)。ASA-2%CMC 溶液(2.5、12.5、25mg/mL)を経口投与したところ(4 mL/kg)、PEG 溶液時と同程度の出血時間となった(10、50、100 mg/kg における出血時間はそれぞれ 398 ± 177、353 ± 36、813 ± 265 秒)。

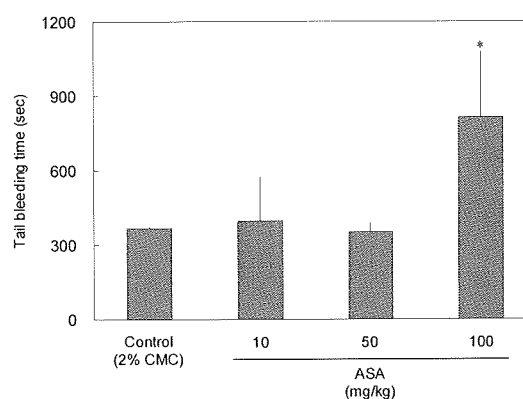


Fig. 2 Prolonged effects of tail bleeding time by administration of ASA into rats. *P<0.05 for ASA group vs. 2% CMC solution group. (N = 3-4).

従って、溶媒の相違による ASA の吸収の差は見られなかった。そこで以後の実験では、CMC を溶媒として採用することにした。次いで、より低容量の ASA で出血時間延長を図るべく、投与後切傷までの時間の検討と、投与量の検討を行った。

1.3. 投与量の検討

Wistar 系雄性ラットに 2%CMC 溶液を経口投与し(4 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷した結果は 1.2.に示した。すなわち、4 mL/kg 投与時には出血時間の延長は見られなかった(**Fig. 3**)。

他方、2%CMC 溶液を経口投与し(10 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 342 ± 126 秒となり、

陰性対照群における投与量に起因する出血時間の差はほとんど見られなかった(**Fig. 3**)。次いで、ASA-2%CMC 溶液(1、5 mg/mL)を経口投与したところ、出血時間は 10 mg/kg 投与時に 450 ± 233 秒となり、出血時間の延長は見られなかったが、50 mg/kg 投与時に 953 ± 76 秒となり、出血時間は有意に延長した。

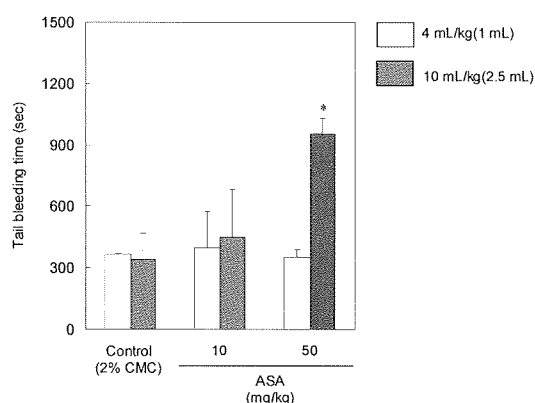


Fig. 3 Prolonged effects of tail bleeding time by administration(4 mL/kg or 10 mL/kg) of ASA into rats. *P<0.05 for ASA group vs. 2% CMC solution group. (N = 3-4).

従って、以後の実験では、投与濃度の増加につれ、出血時間の延長が見られる 10 mL/kg(2.5 mL)投与を採用することにした。

1.4. 投与後切傷までの時間の検討

Wistar 系雄性ラットに 0.5%CMC 溶液を経口投与し(10 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 260 ± 22 秒であった(**Fig. 4**)。次いで、ASA-0.5%CMC 溶液(1、5 mg/mL)を経口投与したところ(10 mL/kg)、出血時間は 10 mg/kg 投与時に 382 ± 10 秒となり、出血時間の延長は見られなかったが、50 mg/kg 投与時に 996 ± 437 秒となり、出血時間は有意に延長した。

他方、0.5%CMC 溶液を経口投与 1 時間後

に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 352 ± 104 秒となり、陰性対照群における投与後の時間差に起因する出血時間の差はほとんど見られなかった(**Fig. 4**)。ASA-0.5%CMC 溶液(1、5 mg/mL)を経口投与したところ(10 mL/kg)、出血時間は 10 mg/kg 投与時に 450 ± 233 秒、50 mg/kg 投与時に 887 ± 147 秒となり、時間差による出血時間の違いは見られなかった。

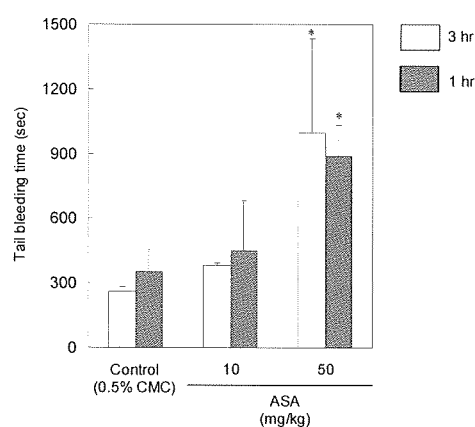


Fig. 4 Prolonged effects of tail bleeding time by 1 hour or 3 hours after administration of ASA into rats. *P<0.05 for ASA group vs. 0.5% CMC solution group. (N = 3-5).

以上から、ASA 起因性血小板機能低下症モデルラットは 2%CMC 溶液(50 mg/kg 以上かつ 10 mL/kg 以上)の経口投与し、少なくとも 1 時間以上経過後に出血時間を計測することで作製できることが明らかとなった。

2. 血小板凝集計を用いた H12-(ADP)小胞体の血小板凝集促進能評価

2.1. アスピリン起因性機能低下症血小板の調製

アスピリン(ASA)を PRP([PLT] = 20×10^4 / μ L)に添加後、振とうし(15、30、45 min, r.t.)、collagen(f.c. 1 μ g/mL)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて連続的に透過

率の変化を測定したところ、ASA 添加濃度が濃く、反応時間が長いほど、透過率は減少した(**Table 2**)。また、collagen(f.c. 1 µg/mL) 刺激下において、透過率が約 15%にまで低下した時が酵素反応(シクロオキシゲナーゼ阻害反応)の終点、すなわち collagen 凝集機能低下をきたした血小板となることが明らかになった。しかし、反応時間が進むほど、ASA 未添加 PRP においても透過率がわずかに低下してしまうことから、これからの実験では、ASA(f.c. 10 µM)を添加し、常温にて 30 分反応させた血小板を ASA 起因性機能低下症血小板として採用することにした。

Table 2 Effects of ASA on platelet aggregation induced by collagen (f.c. 1 mg/mL) in PRP derived from human (N = 3-4).

Treatment	15 min	30 min	45 min
Control	72.3 ± 4.8 %	70.0 ± 0.6 %	62.0 ± 5.1 %
ASA 5 µM	62.0 ± 9.8 %	48.0 ± 11.5 %	29.5 ± 0.7 %
10 µM	37.8 ± 6.2 %	19.9 ± 3.8 %	16.5 ± 0.6 %
20 µM	23.3 ± 8.5 %	16.7 ± 2.1 %	14.8 ± 1.5 %

D. 結論

- (1) アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットは 2%CMC を溶媒とした溶液(アスピリン : 50 mg/kg 以上かつ溶液量 : 10 mL/kg 以上)を経口投与し、少なくとも 1 時間以上経過後に、出血時間を測定することで作製可能であることが示めされた。
- (2) アスピリン起因性機能低下血小板は、コラーゲン凝集の測定系で、多血小板血漿にアスピリン(f.c. 10 µM)を添加し、常温にて 30 分反応させることで調製可能であることが明らかになった。

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, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen γ -chain peptide in platelet aggregation- dependent manner. *J. Controlled Release* (2009) *to be submitted*.
- (4) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Biodistribution of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-coated, adenosine diphosphate- encapsulated liposomes. *Nanomedicine* (2009) *to be submitted*.
- (5) 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)
- (6) 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)

2. 学会発表

(1) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 江藤 薫子, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「放射性同位元素標識したドデカペプチド結合(ADP内包)リン脂質小胞体からのADP放出特性」第89日本化学会春季年会 (2009.3., 千葉).

(2) 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).

(3) 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).

(4) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H12-(ADP/5HT)小胞体の調製とその止血能評価

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
研究協力者 池田 康夫 (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】

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 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る機能を有する。内水相に血小板凝集惹起物質、adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)小胞体は、血小板凝集塊中で ADP を放出するので、更に血小板を活性化させて止血能が顕著に向上できることを *in vivo* にて証明してきた。

平成 21 年度は、さらなる止血能を有する H12-小胞体の調製を目指し、ADP の内包に加えて血小板凝集補助能と傷害血管収縮作用を有するセロトニン(5-hydroxytryptamine: 5-HT)を内包させた H12-(ADP/5HT)小胞体を構築し、その止血能を探ることを目的とした。まず、ADP、5HT の内包安定性試験を行ったところ、両者を安定に内包できる小胞体膜組成は DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比)であった。この H12-(ADP/5HT)小胞体を用いて血小板凝集試験を行ったところ、従来の H12-(ADP)小胞体を上回る血小板の 2 次凝集促進効果が得られた。そこで、血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価を行ったところ、H12-(ADP/5HT)小胞体は従来の H12-(ADP)小胞体より低い濃度で有意に出血時間を短縮できた。止血機能に関与する内包物質を選択することで、小胞体の止血機能を制御できることが証明できた。

A. 研究目的

リン脂二分子膜小胞体の表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させ、その内水相に血小板凝集惹起物質の adenosine

5'-diphosphate(ADP) を内包させた H12-(ADP)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する機能を有する。従って、血小板数を減少させた実験動物に静脈投与し

て出血時間を測定したところ、顕著な止血能が認められている^{1),2)}。

平成 21 年度は、さらなる止血能を有する H12-小胞体の設計と構築を目指し、ADP に加え、血小板凝集補助能と傷害血管収縮作用を有するセロトニン(5-hydroxytryptamine: 5-HT)を同時に内包できる H12-小胞体(H12-(ADP/5HT)小胞体)を調製し、その止血能を探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)。溶媒を減圧留去後、残渣をクロロホルム 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、溶媒を減圧留去した。これをメタノールから再結晶し濾過回収後、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 中に得られた Glu2C18 (575.5 mg, 880 μmol)を溶解させ、TEA (122.5 μL, 880 μmol)を添加後、

MALPEG-NHS (Mw:3400, 1.5 g, 279 μmol)を溶解させて、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、ベンゼン中から凍結乾燥して白色粉末 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/5HT)小胞体の構築

2.1. 5HT の血小板凝集補助能の確認試験

全血(1/10 (v/v) 3.8% クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(100g, 15 min, r.t.)、多血小板血漿(PRP)を得た。PRP([PLT]= 2.0×10^5 /μL)に関して、ADP 水溶液(f.c. 0-10 μM)あるいは 5-HT 水溶液(f.c. 0-10 μM)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて透過率を連続的に測定した。次いで、[ADP]_{f.c.} = 3 μM に固定し、5-HT 水溶液(f.c. 0-1 μM)を同時添加し、同様の血小板凝集試験を行った。

2.2. H12-(ADP/5HT)小胞体の調製

混合脂質(**Table 1**)を ADP/5HT 溶液(共に f.c. 1 μM)にて水和後 (3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径が制御された小胞体を調製し(φ 0.20 μm)、超遠心分離精製した

(100,000g, 30 min, 4 °C)。次いで、これを PBS にて再分散、ゲル濾過精製し(Sephadex G25)、H12-(ADP/5HT)小胞体(a)-(c)を得た。なお、平成 18 年度に確立した H12-(ADP)小胞体は (a)に示す組成からなるものである。

Table 1 lipid components of H12-(ADP/5HT)vesicles

components	vesicles		
	(a)	(b)	(c)
DPPC	5	5	5
Cholesterol	5	5	5
DHSG	1	3	5
PEG-DSPE	0.033	0.039	0.045
H12-PEG-Glu2C18	0.033	0.039	0.045

2.3. ADP、5HT 内包安定性試験

(a)-(c) の各 H12-(ADP/5HT) 小胞体 ([lipid]=10 mg/mL)を振とう後(37°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. 280 nm, リン酸 (pH=7.0)/メタノール = 97/3 (v/v) (TEA 30 mM))にて残存 ADP、5HT を定量し、脂質濃度(リン脂質テストワコー)で補正することで ADP、5HT 内包率を算出した。

2.4. H12-(ADP/5HT)小胞体の被覆層数の算出

(a)-(c)の各 H12-(ADP/5HT)小胞体([lipid] = f.c. 9 mg/mL)に PEG 水溶液 (M_w = 100 kDa) を添加 (f.c. 10 mg/mL)、Vortex にて攪拌後、ヘマトクリット管に封入し、遠心分離 (12,000 rpm, 30 min, r.t.)させた。沈降した小胞体の体積分率(リポクリット: Lc)を測定し、以下の計算式から被覆層数(N)を算出した。

$$\text{Lamellarity: } N = \frac{P \times C \times S \times 10^{-3}}{2V \times Lc \times 10^{-8}}$$

- C: 小胞体濃度 (M)
- Lc: リポクリット (%)
- V: 小胞体1粒子の体積 (m³)
- S: 小胞体1粒子の表面積 (m²)
- P: 分子占有面積 (m²)

2.5. H12-(ADP/5HT)小胞体のζ電位測定

(a)-(c) の各 H12-(ADP/5HT) 小胞体 [lipid]_{f.c.} = 0.05 mM になるよう PBS(pH 7.4) にて希釈し、Zetasizer Nano(Sysmex 社製)にて、37 °C、5 分後にζ電位を測定した。

3. 血小板凝集計を用いた H12-(ADP/5HT)小胞体の血小板凝集促進能評価

PRP ([PLT]=2.0 × 10⁵/μL)に H12-(ADP/5HT)小胞体(c) (f.c. ca.1 × 10⁹ particles)を添加、攪拌後、ADP (f.c. 3 μM)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて分散液の透過率を連続的に測定した。

4. 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 ± 2.6 × 10⁴ /μL)として提供した。

セボフラン麻酔後、H12-(ADP/5HT)小胞体(c)を尾静脈投与した(4 mL/kg)。また、生理食塩水、ADP 未内包 H12-小胞体、H12-(ADP)小胞体を対照群とした。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、出血時間を計測した。

C. 研究結果及び考察

1. 5HT の血小板凝集補助能の確認試験

血小板凝集計を用い、PRP([PLT]=2.0 × 10⁵ /μL)を、ADP 水溶液(f.c. 0-10 μM)にて血小

板凝集を惹起させたところ、ADP 添加濃度の増加に伴い、最大透過率(T_{max})は増大し、ADP 最終濃度 6 μM 以上で飽和に達した (Fig. 1、 T_{max} : 約 80%)。他方、5HT 水溶液(f.c. 0-10 μM)にて血小板凝集の惹起を検討したが、5HT 水溶液単独では血小板凝集が起らなかった (Fig. 1)。

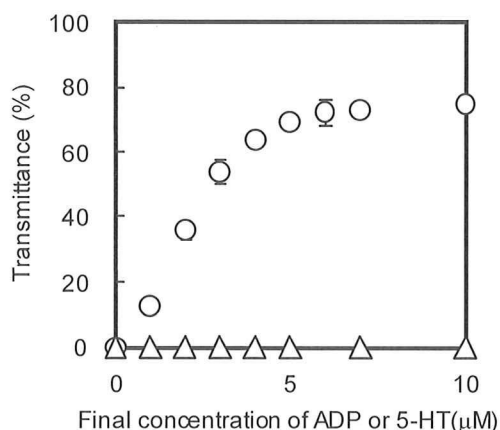


Fig. 1 Platelet aggregation induced by ADP (○) or 5HT (△). [PLT]: $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$.

そこで、 $[\text{ADP}]_{f.c.} = 3 \mu\text{M}$ に固定して 5HT 水溶液(f.c. 0-1 μM)を加えて調製した混合溶液にて血小板凝集を惹起させたところ、5HT 添加濃度の増加に伴い、 T_{max} は顕著に増加した (Fig. 2、 T_{max} : 約 80%)。5HT は単独では血小板凝集を惹起しないが、ADP 凝集を促進する補助機能を有することが確認できた。

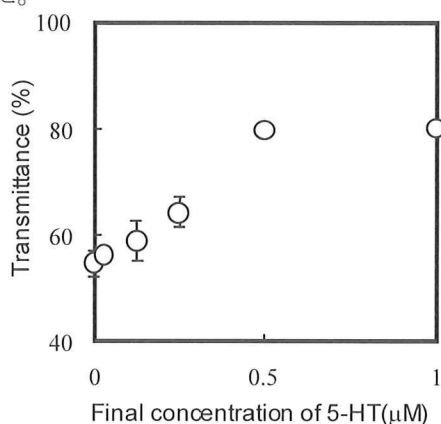


Fig. 2 Enhanced effects of ADP(f.c. 3 μM)-induced platelet aggregation induced by 5-HT. [PLT]: $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$.

従って、ADP と 5HT をリポソームに同時に内包することで、更なる止血能の向上が期待できることが示唆された。

2. H12-(ADP/5HT)小胞体の物性評価

2.1. ADP、5HT の内包安定性

(a)-(c)の各 H12-(ADP/5HT)小胞体([lipid] = 10 mg/mL)を 37°C で振とうさせたところ (Fig. 3)、この加速試験下において ADP は 1 日後も安定に内包されていた (未発表データ)。他方、5HT を H12-小胞体(a)、(b)に内包させた場合、1 時間後に保持率がそれぞれ 40%、80%、1 日後にはそれぞれ 20%、70%に低下した (Fig. 3)。H12-小胞体(a)、(b)は 5HT を安定に保持できない小胞体膜と判断された。そこで、H12-小胞体(c)に 5HT を内包させたところ、5HT は 1 日後も安定に保持されていた。

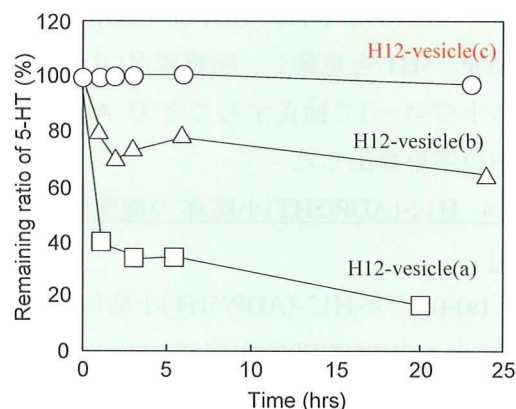


Fig. 3 Stability of 5HT encapsulated into the H12-vesicle (a)-(c) ((a): □, (b): △, (c): ○) at the temperature of 4 °C

これは、小胞体の膜電荷に相關する性質と思われる、負電荷をもつ 5HT と小胞体膜との静電的反発により 5HT を安定に内水相に保持させるためには、従来の H12-小胞体(a)より負電荷度の高い小胞体(c)にする必要がある。

従って、ADP、5HT 共に安定に内包できる小胞体膜組成は DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比)であることが明らかになった。

2.2. H12-(ADP/5HT)小胞体の粒径、被覆層数、 ζ 電位

(a)-(c)の各 H12-(ADP/5HT)小胞体の粒径を測定したところ、それぞれ 242 ± 52 、 241 ± 58 、 244 ± 45 nm となり、ほぼ同一の粒径に制御できた(Table 2)。次いで、各小胞体(a)-(c)の体積分率 (L_c)から被覆層数を算出したところ、それぞれ 1.16 ± 0.16 、 1.31 ± 0.04 、 1.33 ± 0.04 枚となり、粒径と同様にほぼ同一の被覆層数に制御できた(Table 2)。通常被覆層数は膜中に負電荷を導入した方が低下する傾向にあるが、既に(a)の小胞体ではほぼ一枚膜であるので、(b)や(c)も一枚であった考察できる。さらに、各小胞体(a)-(c)の ζ 電位を測定したところ、それぞれ -8.4 ± 1.1 、 -13.4 ± 1.1 、 -15.9 ± 2.3 mV となり、負電荷脂質 DHSG の組成比の大きい小胞体膜ほど、より負に帯電した小胞体であったが(Table 2)、導入率に比例して値が大きくなっている訳ではなかった。

Table 2 Lamellalities of H12-(ADP/5HT)vesicle.

vesicles	Diameter (nm)	Lamellality (-)	ζ -potential/mV
(a)	242 ± 52	1.16 ± 0.16	-8.4 ± 1.1
(b)	241 ± 58	1.31 ± 0.04	-13.4 ± 1.1
(c)	244 ± 45	1.33 ± 0.04	-15.9 ± 2.3

3. H12-(ADP/5HT)小胞体の血小板凝集促進能評価

以降の実験は、H12-(ADP/5HT)小胞体(c)に固定して行った。

PRP ([PLT] = 2.0×10^5 / μ L)に(ADP)小胞体

(a)(f.c. ca. 1×10^9 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(T_{max})は約 50%の増加に留まった(Fig. 4)。次いで、(ADP)小胞体の代わりに H12-(ADP)小胞体(b)を添加した場合、その透過率が顕著に増大し(T_{max} : 約 60%)、H12 表面導入による血小板の 2 次凝集促進効果が確認できた。そこで、H12-(ADP/5HT)小胞体(c)を添加したところ、さらに透過率が増大し、 T_{max} は約 70%に達した。これは、Fig. 2 で認められた、ADP に加え 5-HT を内包させたことによる血小板凝集促進効果と考えられ、ADP と 5-HT の共封入は止血能増幅効果につながる可能性が示唆された。

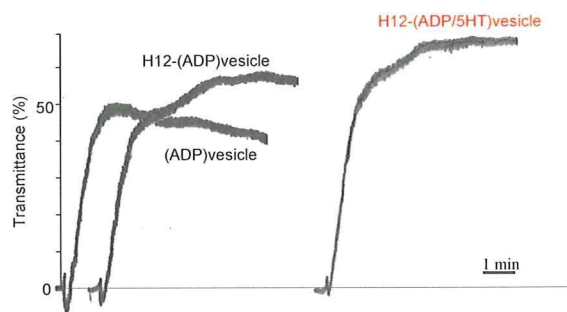


Fig. 4 ADP-induced platelet aggregation in the presence of (ADP)vesicle, H12-(ADP)vesicle and H12-(ADP/5HT)vesicle.

4. 止血能評価

血小板減少症モデルラット([PLT]= $(1.9 \pm 0.2) \times 10^5$ / μ L)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]= $8.1 \pm 0.8 \times 10^5$ / μ L)の出血時間(178 ± 56 秒)と比較して、約 3.8 倍延長した(Fig. 5)。ADP 未内包 H12-小胞体を投与したところ、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)。また、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。

次いで、H12-(ADP)小胞体を投与したところ、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の投与量で同等の短縮効果が得られた。

そこで、3.の *in vitro* 試験で最も高い最大透過率となった H12-(ADP/5HT)小胞体(c)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 566 ± 73 、 397 ± 102 、 343 ± 70 秒となり、H12-(ADP)小胞体より低い投与濃度(4 mg/kg)で有意に出血時間を短縮できることを初めて実証した。

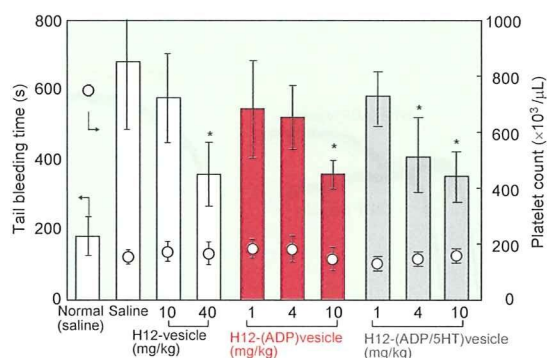


Fig. 5 Hemostatic effects of administration of (a)-(c) H12-(ADP)vesicles and (d) H12-vesicles on rat tail bleeding time. \circ , platelet count in rats ($n=6-10$). * $P<0.05$ for H12-(ADP)vesicles or H12-vesicles group vs. saline group.

従って、血小板凝集惹起物質(ADP、5HT)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、5HT を放出する機構を持つ小胞体を投与すれば、止血能が向上できることを *in vivo* にて示すことができた。

D. 結論

- (1) H12-(ADP)小胞体にさらに血小板凝集補助能を有する 5HT を同時に内包させた H12-(ADP/5HT)小胞体を構築した。
- (2) H12-(ADP/5HT)小胞体は平成 18 年度に

確立した H12-(ADP)小胞体よりも低濃度で血小板減少症モデルラットに対して出血時間短縮傾向を示し、*in vivo* 評価からより高い止血能を有するものと思われた。

以上から、止血機能に関与する内包物質を選択することで、小胞体の止血機能を制御できることが証明できた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen γ -chain peptide in platelet aggregation- dependent manner. *J. Controlled Release* (2010). submitted.

(2) 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* (2010) *in press*.

doi: 10.1016/j.nano.2009.07.004

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

(4) 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).

(5) 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. Thrombosis Haemostasis*, 7, 470-477 (2009).

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

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

2. 学会発表

(1) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 江藤 薫子, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「放射性同位元素標識したドデカペプチド結合(ADP内包)リン脂質小胞体からのADP放出特性」第89日本化学会春季年会 (2009.3., 千葉).

(2) 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).

(3) 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).

(4) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者 木下 学 (防衛医科大学校 免疫微生物学、准教授)
研究協力者 西川 可穂子 (防衛医科大学校 救急部、助教)
萩沢 康介 (陸上自衛隊 部隊医学実験隊)
庄野 聡 (防衛医科大学校 免疫微生物学、助教)
宮崎 裕美 (防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門、助教)
小野 聡 (防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門、准教授)
阪本 敏久 (防衛医科大学校 救急部、教授)
斎藤 大蔵 (防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門、教授)
関 修司 (防衛医科大学校 免疫微生物学、教授)

研究要旨

多発外傷や外科手術時の大量出血には輸血が行われることが多いが、大量輸血は生体に血小板減少を伴う出血傾向をもたらし、これが出血部位からの止血制御をより困難なものにすることがある。この結果、更なる輸血をせざるを得ず、出血傾向がさらに増悪し負の連鎖に陥り、最終的には大量失血により死に至ることが決して少なくない。H12(ADP)リポゾームは fibrinogen γ 鎖 C 末端(H12)を担持させたリポゾームで、出血部位に存在する活性化血小板同士を架橋して血小板凝集形成を促進し、かつ内包した ADP を局所で放出し血小板凝集をさらに促進する止血効果が期待されている。平成 21 年度はまず、外傷性大量出血と大量輸血に伴う血小板減少モデルを作製し、これが H12(ADP)リポゾームによる止血制御の解析に適したモデルであるか否かを検討した。

家兔の大腿動静脈にカニューレーションを行い、1 回 25mL の動脈血を脱血すると共に、洗浄赤血球を経静脈的に輸血することで、外科的な血管損傷による出血と輸血を念頭に置いた血小板減少状態を作製した。これにより、血圧やヘモグロビン濃度は実験開始前に比しほとんど低下しないものの、血小板数が $55 \times 10^3/\mu\text{L}$ と開始前の 1/3 強にまで低下し、耳介出血時間でも 760 ± 86 秒(正常約 120 秒)と顕著な延長を認めるモデルが作成出来た。また、このような血小板減少家兔に開腹後、肝臓や脾臓に外傷性の臓器損傷を加えると出血により死に至ることが確認され、致死的な外傷性出血モデルとなることが示唆された。

次年度以降は、本モデルを用いてこれに H12(ADP)リポゾームを投与することで、出血時間や肝臓や脾臓の臓器損傷時の臓器出血に及ぼす影響を、本来の血小板や血漿のみの投与と比較検討し、その止血制御効果を研究する予定である。

A. 研究目的

多発外傷や外科手術時の大量出血では輸血により対処せざるを得ない事態に遭遇することが時にある。しかし、大量輸血は生体に血小板減少を伴う出血傾向をもたらし、止血制御に難渋した場合の大量輸血では、これがさらに出血部位からの止血制御を困難なものにすることがしばしば経験される。この結果、更なる輸血をせざるを得ず、出血傾向がさらに増悪するといった負の連鎖に陥り、最終的には大量失血により患者を死に至らしめることが決して少なくない。

このような場合、外科的には血小板輸血が極めて有効であるが、その供給状況は十分とは言い難く、緊急時にはさらに入手困難なものとなる。このため、本来の血小板輸血に代わり得るものの開発が急務であると考え。本研究の目的は、H12(ADP)リポゾームが前述のような外科的な急性の血小板減少を伴う易出血性病態で、血小板輸血に代わり得る効果があるか否かを研究することである。平成 21 年度はまず、外傷時の血管破綻などによる大量出血とこれに対する大量輸血により生じる、急性の血小板減少を伴う易出血性病態を家兎において作製することを目的とした。次年度以降、本モデルを用いて H12(ADP)リポゾームの止血制御効果を研究する予定である。

B. 研究方法

1. 実験動物

NZW ウサギ（日本 SLC,1.8-2kg）を用いて実験を行った。

2. 脱血および輸血用ルートの確保

ネンブタールとキシラジンの麻酔下に、一方の大腿動脈に 21G サフロー針にてカニューレーションを行いルート確保し、脱血と動脈圧測定用とした。次に対側の大腿静脈に 21G サフロー針にて同様にカニューレーションを行いルート確保し、輸液および輸血用とした。

3. 初期脱血(1,2 回目)および Lactated Ringer 輸液

まず、大腿動脈より 25mL の脱血を行い、対側の大腿静脈より 25mL の Lactated Ringer (0.5% albumin)を投与した。ヒトアルブミンは膠質浸透圧を上げることで循環動態に与える影響を出来るだけ軽減することを目的に使用した。血圧（動脈圧）に変動のないことを確認した後、さらに 25mL の脱血と 25mL の Lactated Ringer (0.5% albumin)の静脈内投与を行った。

4. 洗浄赤血球および platelet-rich plasma (PRP)、platelet-poor plasma (PPP)の採取

大腿動脈より脱血した動脈血を 100 ×g で 15 分間遠心分離し、上清を PRP として採取した。その後、さらに 500 ×g で 10 分間遠心分離を行い、この上清を PPP として採取した。残った赤血球を含む血球成分を生理食塩水で洗浄し(500 ×g,10 分間)、洗浄赤血球とした(Fig. 1)。

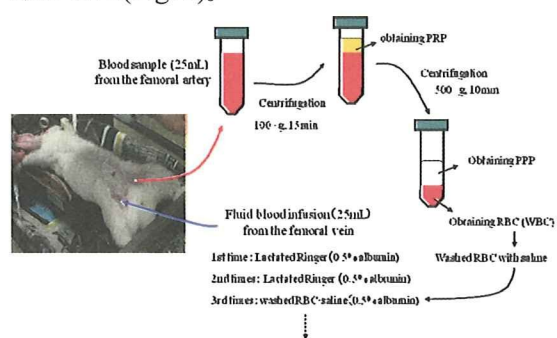


Fig. 1. Collection of PRP, PPP, and washed RBC from the rabbit

5. 脱血(3 回目以降)および洗浄赤血球輸血

引き続き 3 回目の脱血を大腿動脈より同様に行い、1,2 回目の脱血で得られた洗浄赤血球を 0.5% albumin 加生理食塩水で 25mL にして大腿静脈より輸血した。

さらに同様に 25mL の脱血(4 回目)を行い、3 回目の脱血で得られた洗浄赤血球を生理食塩水で 25mL として輸血した(Fig. 1)。このように、1 回 25mL の脱血を計 8 回 (合計 200mL) 行い、最後の 8 回目の脱血で採取した洗浄赤血球はさらなる脱血を行わずに生理食塩水で 25mL にして投与した(Fig. 2)。

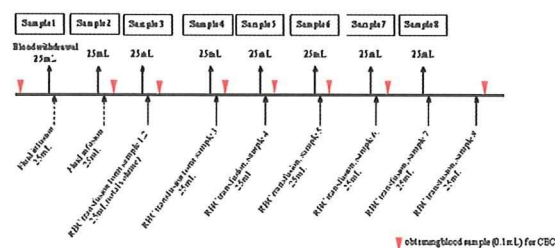


Fig. 2. Experimental design of blood withdrawal and transfusion in the rabbit

6. 測定項目

6.1. 動脈圧

大腿動脈に挿入したルートより動脈圧を圧測定装置にて経時的に測定した。

6.2. ヘモグロビン濃度、血小板数、白血球数

大腿動脈ルートより、脱血前、50mL 脱血後、75、100、125、150、175、200mL 脱血後に 0.1μL 採血し、測定に供した。

6.3. 耳介出血時間

脱血と輸血の操作終了後、家兔の耳介に 1cm の傷をメスにて作製し、切開部位からの出血を 25°C の生理食塩水中で観察し止血されるまでの時間を計測した。

6.4. 肝臓および脾臓からの組織損傷による出血

耳介出血時間測定後、開腹し肝臓に直径 5mm の Derma punch を用いて臓器損傷を作製した(Fig. 3)。

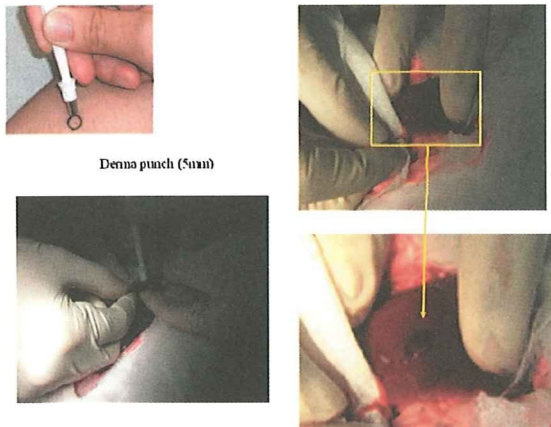


Fig. 3. Traumatic tissue injury of the liver using the Derma punch

同様に脾臓に Derma punch を用いて臓器損傷を作製した(Fig. 4)。

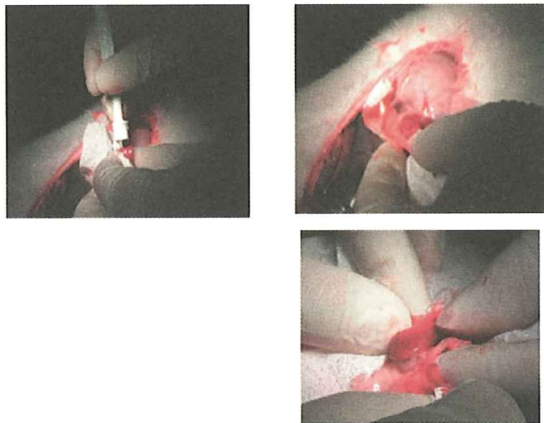


Fig. 4. Traumatic tissue injury of the spleen using the Derma punch

C. 研究結果

1. 動脈圧の推移

実験期間中、顕著な動脈圧の低下は認められなかった(Fig. 5)。

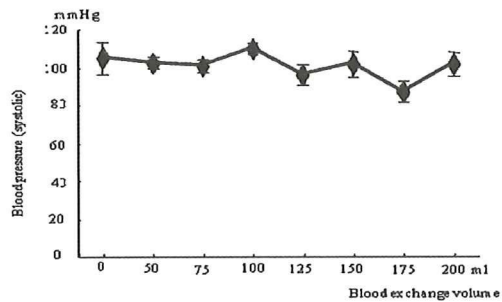


Fig. 5. Change of systolic arterial blood pressure

2. 血小板数の推移

血小板数は第1回目、2回目の脱血後(計50mL、輸液は Lactated Ringer のみ)、 $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ 前後へと顕著な低下を認めたが、その後の脱血では更なる減少は認められなかった。しかし、8回目の脱血(計200mL)とその後の輸血後、 $55 \times 10^3/\mu\text{L}$ と更なる低下が認められた(Fig. 6)。

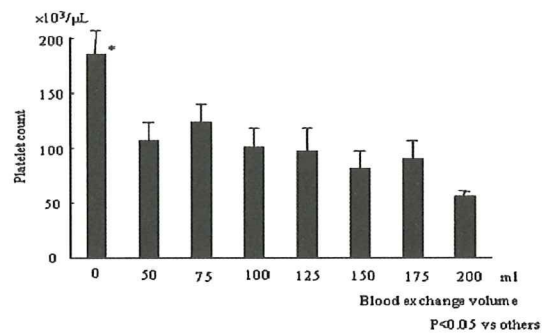


Fig. 6. Change of platelet count

脱血血液から採取した PRP の血小板数は第3回目までは1回の脱血あたり 2×10^6 個前後であったが、その後若干減少傾向を認め、 1.5×10^6 個前後で推移した(Fig.7)。

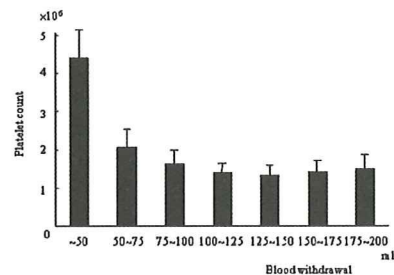


Fig. 7. Platelet count in the PRP obtained from the withdrawing blood

3. ヘモグロビン濃度、白血球数の推移

ヘモグロビン濃度は実験開始後、低下を認めたが、8回目の脱血(計200mL)とその後の輸血後ではほぼ実験前値に復しており、明らかな低下は認められなかった(Fig. 8A)。

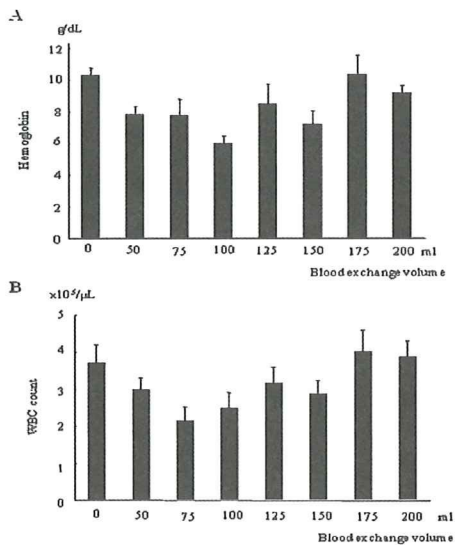


Fig. 8. Change of hemoglobin concentration and WBC count

白血球数も実験開始後、低下を認めたが、8回目の脱血(計 200mL)とその後の輸血後ではほぼ実験前値と同程度になっていた(Fig. 8B)。

4. 耳介出血時間

耳介出血時間は8回目の脱血(計 200mL)とその後の輸血後、実験開始前値に比し著しい延長を認めた(Fig. 9)。

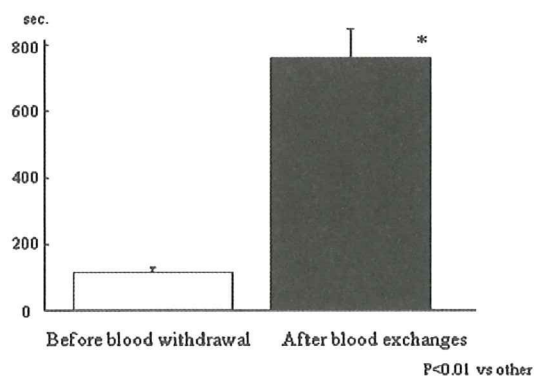


Fig. 9. Ear bleeding time

5. 肝臓および脾臓の臓器損傷による出血と予後

脱血と輸血によるモデル作製後、肝臓と脾臓に臓器損傷を作製した。両臓器とも組織損傷による顕著な出血を認め、全例とも出血死に至った(Fig. 10)。

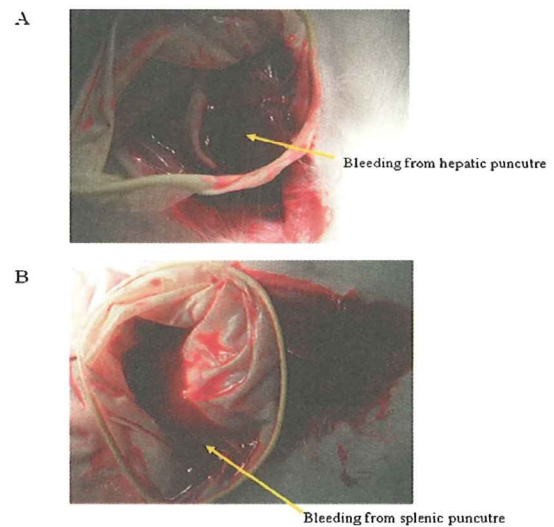


Fig. 10 Bleeding from the traumatic tissue injury

また、preliminary な結果ではあるが、本実験において得られた PRP を耳介出血時間測定後に投与したところ、その 10 分後に測定した耳介出血時間の短縮を認め、引き続き行った肝脾の臓器損傷後も家兎は出血死を来さなかった(2羽の結果)。さらに H12(ADP)リポゾームを PRP の代わりに投与しても、耳介出血時間の短縮を認め、同様に肝脾の臓器損傷後も家兎は生存し得た(3羽の結果)。これらの結果に関しては今後さらに羽数を重ねて検討する必要があるが、H12(ADP)リポゾームの効果が期待される。

D. 考察

平成 21 年度は、外傷性の血管破綻による大量出血とこれに対する大量輸血の際に発生する、急性の血小板減少を伴う易出血性病態を家兎において作製した。今後、本モデルにおいて H12(ADP)リポゾームの止血効果を、血小板輸血と比較検討する予定であるが、血小板減少病態において、