

H12(ADP)リポゾームが本来の血小板と同様の止血制御効果を有するかを純粋に比較する必要があった。このため、大量出血によるショック病態が生体の止血凝固機能へ及ぼす影響を出来るだけ排除しなければならず、循環動態を維持する必要があった。今回の検討では、1回25mLの脱血と等量のアルブミン加輸液、もしくは輸血を行うことで循環動態を維持することが出来た(Fig. 1)。体重1.8-2.0kgの家兔の循環血液量にほぼ相当する200mLの脱血と、これらから得られた赤血球成分のみを輸血することにより、血小板のみが $55 \times 10^3/\mu\text{L}$ と顕著に低下し(Fig. 6)、ヘモグロビン濃度はほとんど低下しないモデルが作製出来た(Fig. 8A)。また、脱血と輸血を繰り返すことで、生体における炎症反応の惹起が懸念され、これらの生体反応も止血凝固機能へ何らかの影響を与えることが考えられたが、本モデルでは白血球数の上昇も認められず、そのような可能性をあらかじめ除外することが出来た(Fig. 8B)。その一方で、易出血性病態の指標でもある耳介出血時間は著明な延長が認められ、重度の易出血性病態が誘導出来たと考えられる(Fig. 9)。

このような外科的な急性の血小板減少による易出血性病態モデルにおいて、肝臓や脾臓に外傷性の臓器損傷を作製したところ、臓器損傷部位からの出血により全例が死亡した。同様の臓器損傷を無処置の家兔において作製しても、正常な凝固機能により止血がなされ、通常は死に至らないことから、本モデルでは止血凝固機能の破綻によ

り臓器からの出血が止血制御出来ず、死に至ったことが示唆される。今後は、本モデルにおいて、血小板を輸血投与することで臓器出血が制御出来るか、またH12(ADP)リポゾームを投与することで血小板輸血と同等の止血制御効果が得られるかを研究する予定である。

本モデルは臨床に即したモデルでもあり、致死性の血小板減少性易出血モデルであるにもかかわらず、正常な機能を有する血小板は生体内にある程度は存在することから、H12(ADP)リポゾームが出血部位での血小板凝集を促進することで臓器出血の止血制御を促進し、救命効果が得られることは十分に期待出来ると考える。Preliminaryな結果ではあるが、H12(ADP)リポゾームを投与した3羽の家兔においては、救命率に関して良好な結果を得ており、さらに検討を重ねる予定である。

本実験中に採取したPRPは十分な止血制御機能を有していることを確認しており、これらPRPを脱血/輸血後に投与することで、血小板輸血とすることが出来ると考える。また、本モデルでは洗浄赤血球のみの輸血としたが、救急医療の現場では新鮮凍結血漿の大量投与により、凝固成分の補充が通常行われている。PRPと同様に採取したPPPを投与することで、このような凝固成分の補充も可能であり、臨床に即したモデルが作製し得ると考えられる。PPPには血小板成分が全く含まれていないことは確認している。

E. 結論

1. 家兎において、脱血と洗浄赤血球輸血を繰り返すことで、血小板減少性の易出血性病態モデルを作製した。
2. 本モデルを作製後、肝臓や脾臓に外傷性の臓器損傷を作製したところ、損傷部位からの出血により全例が死に至り、本モデルが致死性の血小板減少性易出血性病態モデルとなることが確認された。
3. 以上より、本モデルが、H12(ADP)リポゾームの外傷性大量出血時の血小板減少性易出血病態に対する止血制御効果を検討するのに適切なモデルであると考えられた。今後は、本モデルを用いて H12(ADP)リポゾームの止血制御効果を検討予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Inatsu, A., Kinoshita, M., Nakashima, H., Shimizu, J., Saitoh, D., Tamai, S., and Seki, S. : Novel mechanism of C-reactive protein for enhancing mouse liver innate immunity. *Hepatology* 49: 2044-2054, 2009.
2. Fujie, T., Matsutani, N., Kinoshita, M., Okamura, Y., Saito, A., and Takeoka, S. : Adhesive, flexible, and robust polysaccharide nanosheets integrate for tissue-defect repair. *Adv. Funct. Mater.* 19: 2560-2568, 2009. (Nature Nonotechnology introduced at Research Highlights, 19, June, 2009)
3. Okamura, Y., Kabata, K., Kinoshita, M., Saitoh, D., and Takeoka, S. : Free-standing biodegradable poly(lytic acid) nanosheet for sealing operations in surgery. *Adv. Mater.* 21: 1-5, 2009.
4. Matsumoto, A., Tsujimoto, H., Ono, S., Kinoshita, M., Habu, Y., Kawabata, T., Shinomiya, N., and Seki, S. : Loss of hepatic B cells following lipopolysaccharide injection and polymicrobial sepsis. *J. Gastroen. Hepatol.* 24: 262-269, 2009.
5. Nogami, Y., Kinoshita, M., Takase, B., Inatsu, A., Ishihara, M., Seki, S., and Maehara, T. : Cardiac dysfunction induced by experimental myocardial infarction impairs the host defense response to bacterial infection in mice due to reduced phagocytosis of Kupffer cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg. (in press)*.
6. Fujie, T., Kinoshita, M., Shono, S., Saito, A., Okamura, Y., Saitoh, D., and Takeoka, S. : Sealing effect of a polysaccharide nanosheet for murine cecal puncture. *Surgery (in press)*.
7. Tanaka, M., Kinoshita, M., Yoshihara, Y., Shinomiya, N., Seki, S., Nemoto, K., and Morimoto, Y. : Influence of Intraarticular Neutrophils on the Effects of Photodynamic Therapy for Murine

- MRSA Arthritis. Photochem. Photobiol. (*in press*).
8. Yamamoto, T., Kinoshita, M., Shinomiya, N., Hiroi, S., Sugasawa, H., Matsushita, Y., Majima, T., Saitoh, D., and Seki, S. : Pretreatment with ascorbic acid prevents lethal gastrointestinal syndrome in mice receiving a massive amount of radiation. J. Radiat. Res. (*in press*).
 9. Kawarabayashi, N., Seki, S., Hatsuse, K., Kinoshita, M., Takigawa, T., Tsujimoto, H., Kawabata, T., Nakashima, H., Shono, S., and Mochizuki, H. : Immunosuppression in the livers of mice with obstructive jaundice participates in their susceptibility to bacterial infection and tumor metastasis. Shock (*in press*).
 10. Shono, S., Kinoshita, M., Takase, B., Nogami, Y., Kaneda, S., Ishihara, M., Saitoh, D., Kikuchi, M., and Seki, S.: Intraosseous transfusion with liposome-encapsulated hemoglobin improves mouse survival after hyperhemoglobinemic shock without scavenging nitric oxide. Shock (*in press*).
 11. 宮崎裕美, 木下 学, 四木久美子, 高木智絵, 庄野 聡, 小野 聡, 関 修司, 齋藤大蔵 : 熱傷後の Interleukin-18 投与によるマウスクッパー細胞の活性化に関する研究. 防衛衛生, (*in press*).
 12. 木下 学, 小野 聡, 藤枝俊宣, 平木修一, 辻本広紀, 木村曉史, 下野浩貴, 岡村陽介, 宮崎裕美, 庄野 聡, 武岡真司, 齋藤大蔵, 関 修司 : ナノテクノロジーにより作製した超極薄膜ナノシートを用いた穿孔性腹膜炎時の穿孔部閉鎖治療. 日本腹部救急医学会雑誌, 29: 807-808, 2009.
 13. 庄野 聡, 木下 学, 羽生仁子, 中島正裕, 佐藤厚志, 関 修司 : 高脂肪食摂取時のエンドトキシンと大腸菌感染に対するマウスの免疫反応の特徴, エンドトキシン研究 12 (日本エンドトキシン研究会編), 第 1 版, 医学図書出版, 東京, 2009, 49-53 頁.
 14. 木下 学, 藤枝俊宣 : 超極薄膜ナノシートの外科への応用. 医学の歩み, 288: 187-189, 2009.
 15. 稲津昭仁, 木下 学, 清水 潤, 関 修司 : CRP の炎症性サイトカインの産生抑制. 臨床免疫・アレルギー科, 51: 187-195, 2009.
 16. 小野 聡, 木下 学, 辻本広紀, 平木修一, 長谷和生, 齋藤大蔵 : 熱傷, Sepsis に対するサイトカイン療法. ICU と CCU, 33: 371-378, 2009.
 17. 野上弥志郎, 木下 学, 庄野 聡, 高瀬凡平, 石原雅之, 菊地 眞, 前原正明 : 出血性ショックに対する人工赤血球 (リポゾーム内包型ヘモグロビン) の救命蘇生効果. 防衛医科大学校雑誌, 34: 203-216, 2009.
 18. 辻本広紀, 平木修一, 木下 学, 愛甲聡, 小野 聡, 山本順司, 長谷和生 : 腹部救急における敗血症の病態と治療戦略 特に血液浄化療法について:

制御性 T 細胞に着目した sepsis に続発する免疫抑制状態. 日本腹部救急医学会雑誌, 29: 711-715, 2009.

学会発表

1. Inatsu, A., Kinoshita, M., Shinomiya, N., Saitoh, D., Tamai, S., and Seki, S. : Treatment with synthetic C-reactive protein can rescue mice from lethal endotoxin shock and improve postburn infections. Chemical and biological defense science and technology conference, 2009, Dallas, (CBD S&T proceeding: 279, 2009.)
2. Yamamoto, T., Kinoshita, M., Shinomiya, N., Hiroi, S., Hagsiawa, K., Matsushita, Y., Majima, T., Saitoh, D., and Seki, S. : Pretreatment with ascorbic acid prevents lethal gastrointestinal syndrome in mice receiving a massive amount of radiation. Chemical and biological defense science and technology conference, 2009, Dallas, (CBD S&T proceeding: 121, 2009.)
3. Shinomiya, N., Kinoshita, M., Tokuno, S., Kaku, K. Takei, E., Shono, S., and Yamada, N. : Retrospective analysis of subway train attack incident. Chemical and biological defense science and technology conference, 2009, Dallas, (CBD S&T proceeding: 516, 2009.)
4. Miyazaki, H., Kinoshita, M., Shono, S., Takagi, T., Hara, E., Ono, S., Seki, S. and Saitoh, D. : Lethicimized superoxide dismutase improves hepatic injury induced by hemorrhagic shock. Society for free Radical Biology and Medicine 16th Annual Meeting, 2009, San Francisco, USA, (Free Radical Biology & Medicine, 47: S147, 2009.)
5. Watanabe, S., Takase, B., Kinoshita, M., Nogami, Y., Maehara, T., and Ohsuzu, F. : Heart Rate Variability Indices Correlate APACHE Prognostic Score, Cytokines and Catecholamines in Intensive Care Patients. 13th Congress of International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, 2009, Yokohama, Japan.
6. Saitoh, D., Miyazaki, H., and Kinoshita, M. : Lecithinized SOD treatment improves the survival rate of animals with *Escherichia Coli* infection after burn injuries. 7th Asia Pacific Burns Congress, 2009, New Delhi, India, (Proceedings of APBC: 98, 2009.)
7. Fujie, T., Matsutani, N., Kinoshita, M., Okamura, Y., Saito, A., and Takeoka, S. : Biomedical application of polysaccharide nanosheet for tissue-defect repair. The 236th ACS National Meeting, 2009, Washington DC, USA, (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem., 50: 432, 2009.)
8. Kinoshita, M., Uchida, T., Sato A., Nakashima, M., Nakashima, H., Shono, S., Habu, Y., Miyazaki, H., and Seki, S. : Functional and Phenotypical

- characterization of Kupffer cell subsets in mice. 第 39 回日本免疫学会総会, 2009, 大阪. (日本免疫学会誌, 39: 27, 2009.)
9. Miyazaki, H., Kinoshita, M., Ono, S., Habu, Y., Nakashima, H., Seki, S., and Saitoh, D. : Reduced superoxide production and restored phagocytotic activity of neutrophils by lecithinized SOD treatment improves the survival of burn-injured mice infected with *E. coli*. 第 39 回日本免疫学会総会, 2009, 大阪. (日本免疫学会誌, 39: 241, 2009.)
 10. 佐藤厚志, 木下 学, 羽生仁子, 庄野聡, 中島弘幸, 中島正裕, 稲津昭仁, 宮崎裕美, 関 修司 : 合成 CRP がヒト PBMC の細菌性刺激に対する免疫応答へ及ぼす影響-TNF 産生抑制効果と相反する IFN- γ 産生亢進効果について-. 第 39 回日本免疫学会総会, 2009, 大阪. (日本免疫学会誌, 39: 41, 2009.)
 11. 木下 学, 中島正裕, 佐藤厚志, 庄野聡, 稲津昭仁, 宮崎裕美, 中島弘幸, 羽生仁子, 四ノ宮成祥, 関 修司 : Activating neutrophils by IL-18 therapy protects burn-injured mice from MRSA infection. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009, 名古屋. (日本細菌学会誌, 64: 235, 2009.)
 12. 稲津昭仁, 木下 学, 齋藤大蔵, 玉井誠一, 関 修司 : A novel mechanism of C-reactive protein for enhancing mouse liver innate immunity. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009, 名古屋. (日本細菌学会誌, 64: 230, 2009.)
 13. 中島正裕, 木下 学, 羽生仁子, 宮崎裕美, 庄野 聡, 中島弘幸, 佐藤厚志, 関修司 : B 細胞による貪食について. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009, 名古屋. (日本細菌学会誌, 64: 234, 2009.)
 14. 庄野 聡, 木下 学, 羽生仁子, 中島正裕, 関 修司 : 高脂肪食マウスにおける大腸菌感染と腫瘍細胞に対する免疫反応. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009, 名古屋. (日本細菌学会誌, 64: 237, 2009.)
 15. 羽生仁子, 木下 学, 庄野 聡, 中島弘幸, 中島正裕, 佐藤厚志, 関 修司 : 高脂肪・高コレステロール食摂取マウスの Con-A あるいは α GalCer 誘導性肝炎に対する影響. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009, 名古屋. (日本細菌学会誌, 64: 240, 2009.)
 16. 佐藤厚志, 木下 学, 羽生仁子, 庄野聡, 中島弘幸, 中島正裕, 稲津昭仁, 宮崎裕美, 関 修司 : 合成 CRP がヒト PBMC の細菌性刺激に対する免疫応答へ及ぼす影響—TNF 産生抑制効果と相反する IFN- γ 産生亢進効果について—. 第 92 回日本細菌学会関東支部会総会, 2009, 東京, (第 92 回日本細菌学会関東支部会総会講演抄録集: 44, 2009.)
 17. 木下 学, 小野 聡, 川端利信, 庄野 聡, 辻本広紀, 平木修一, 木村暁史, 齋藤大蔵, 長谷和生, 関修司 : 腹部外科感染症の病態に及ぼす加齢の影響とそ

- の機序に関する検討—細菌 DNA と TLR-9 に注目して—。第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009, 福岡。(日本外科学会雑誌, 110: S317, 2009.)
18. 平木修一, 小野 聡, 辻本広紀, 木村暁史, 木下 学, 末山貴浩, 菅澤英一, 坂本直子, 矢口義久, 愛甲 聡, 市倉 隆, 齋藤大蔵, 山本順司, 長谷和生 : 外科侵襲時における制御性 T 細胞の意義に関する実験的検討。第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009, 福岡。(日本外科学会雑誌, 110: S662, 2009.)
 19. 小野聡, 辻本広紀, 平木修一, 木村暁史, 木下 学, 菅澤英一, 矢口義久, 坂本直子, 愛甲 聡, 市倉 隆, 山本順司, 長谷和生, 齋藤大蔵 : 腹部救急疾患術後の病態形成における interleukin-15 の役割とその臨床的意義に関する検討。第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009, 福岡。(日本外科学会雑誌, 110: S662, 2009.)
 20. 辻本広紀, 市倉 隆, 菅澤英一, 平木修一, 坂本直子, 矢口義久, 赤瀬崇嘉, 木下 学, 愛甲 聡, 小野 聡, 山本順司, 長谷和生胃穿孔症例の術中診断と予後に関する検討。第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009, 福岡。(日本外科学会雑誌, 110: S549, 2009.)
 21. 菅澤英一, 市倉 隆, 間嶋 崇, 小野 聡, 辻本広紀, 平木修一, 坂本直子, 矢口義久, 赤瀬崇嘉, 木下 学, 山本順司, 長谷和生 : 胃癌におけるサイトカイン、ケモカインを介した癌宿主応答に関する検討。第 109 回日本外科学会定期学術集会, 2009, 福岡。(日本外科学会雑誌, 110: S547, 2009.)
 22. 木下 学, 小野 聡, 川端利信, 庄野 聡, 平木修一, 辻本広紀, 長谷和生, 関 修司 : CpG-ODN の抗腫瘍効果と加齢生体での臓器傷害増強作用およびその対策。第 64 回日本消化器外科学会総会, 2009, 大阪。(日本消化器外科学会雑誌, 42: 355, 2009.)
 23. 小野 聡, 辻本広紀, 平木修一, 木村暁史, 木下 学, 矢口義久, 坂本直子, 市倉 隆, 山本順司, 長谷和生 : 消化器外科周術期感染症の病態形成における制御性 T 細胞の役割とその対策に関する検討。第 64 回日本消化器外科学会総会, 2009, 大阪。(日本消化器外科学会雑誌, 42: 1038, 2009.)
 24. 木下 学, 小野 聡, 藤枝俊宣, 平木修一, 辻本広紀, 木村暁史, 下野浩貴, 岡村陽介, 宮崎裕美, 庄野 聡, 武岡真司, 齋藤大蔵, 関 修司 : ナノテクノロジーにより作成した超極薄膜ナノシートを用いた穿孔性腹膜炎時の穿孔部閉鎖治療。第 45 回日本腹部救急医学会総会(診療と研究のトピックス), 2009, 東京, (日本腹部救急医学会雑誌, 29: 328, 2009.)
 25. 辻本広紀, 小野 聡, 木下 学, 菅澤英一, 平木修一, 坂本直子, 矢口義久, 赤瀬崇嘉, 愛甲 聡, 市倉 隆, 山本順司, 長谷和生 : 胃穿孔症例の臨床病理学的特徴と予後に関する検討。第 45

- 回日本腹部救急医学会総会(パネルディスカッション), 2009, 東京, (日本腹部救急医学会雑誌, 29: 256, 2009.)
26. 平木修一, 小野 聡, 辻本広紀, 木村暁史, 末山貴浩, 木下 学, 菅澤英一, 矢口義久, 坂本直子, 愛甲 聡, 市倉 隆, 齋藤大蔵, 山本順司, 長谷和生 : 腹部外科侵襲時における制御性T細胞の意義に関する検討. 第 45 回日本腹部救急医学会総会(診療と研究のトピックス), 2009, 東京, (日本腹部救急医学会雑誌, 29: 332, 2009.)
 27. 木下 学, 小野 聡, 稲津昭仁, 平木修一, 高畑りさ, 木村暁史, 辻本広紀, 長谷和生, 齋藤大蔵, 関修司 : 外科侵襲後の重症感染症に対する CRP の炎症性サイトカイン抑制効果と Kupffer 細胞貧機能賦活化効果. 日本外科代謝・栄養学会 第 46 回学術集会, 2009, 東京, (外科と代謝・栄養, 43: 98, 2009.)
 28. 辻本広紀, 平木修一, 小野 聡, 木下学, 菅澤英一, 坂本直子, 矢口義久, 堀尾卓矢, 熊野勲, 愛甲 聡, 山本順司, 長谷和生 : 樹状細胞と制御性 T 細胞に着目した spesis の免疫抑制状態に関する検討. 日本外科代謝・栄養学会 第 46 回学術集会, 2009, 東京, (外科と代謝・栄養, 43: 97, 2009.)
 29. 宮崎裕美, 木下 学, 齋藤大蔵 : 熱傷後感染に対する活性酸素阻害による救命効果. 第 35 回日本熱傷学会総会・学術集会, 2009, 東京, (第 35 回日本熱傷学会総会・学術集会 プログラム・抄録集, 125, 2009.)
 30. 庄野 聡, 木下 学, 羽生仁子, 小野 聡, 関 修司 : 高脂肪食摂取マウスの蛋白レベル、mRNA レベルでみた Kupffer 細胞の TLR4 発現について. 第 15 回日本エンドトキシン研究会, 2009, 東京, (日本エンドトキシン研究会プログラム・講演抄録集, 28, 2009.)
 31. 小野 聡, 宮崎裕美, 齋藤大蔵, 辻本広紀, 平木修一, 高畑りさ, 山本順司, 長谷和生, 木下 学, 庄野 聡 : 敗血症時のサイトカイン飯能における病原関連分子パターンの役割に関する実験的検討. 第 15 回日本エンドトキシン研究会, 2009, 東京, (日本エンドトキシン研究会プログラム・講演抄録集, 48, 2009.)
 32. 宮崎裕美, 木下 学, 齋藤大蔵 : 熱傷ラットモデルにおけるレシチン化 SOD の投与効果. 第 17 回日本熱傷学会関東地方会, 2009, 東京, (第 17 回日本熱傷学会関東地方会 プログラム・抄録集, 17, 2009.)
 33. Takase, B., Shono, S., Kinoshita, M., Nogami, Y., and Ishihara, M. : Resuscitation with Intraosseous Infusion of Artificial Oxygen Carrier (Liposome-Encapsulated Hemoglobin) from Lethal Hemorrhagic Shock and Its Effect on Cytokins. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会, 2009, 大阪, (Circulation Journal 73: 441, 2009)
 34. 庄野 聡, 矢部一憲, 木下 学, 高瀬凡

- 平, 緒方嘉貴, 金田伸一, 関 修司, 齋藤大蔵, 石原雅之, 菊地 眞 : 致死性出血性ショックにおける人工赤血球の投与後の再投与と輸血について. 第 54 回防衛衛生学会, 2009, 東京, (防衛衛生 56:59, 2009.)
35. 藤枝俊宣, 松谷哲行, 木下 学, 岡村陽介, 武岡真司 : 多糖ナノシートの構築および胸膜欠損モデルイヌに対する創傷被覆効果. 第 89 回日本化学会春季年会, 2009, 船橋.
36. 齋藤晃広, 藤枝俊宣, 木下 学, 武岡真司 : 多糖ナノシートからなる薬物担持絆創膏の構築と抗炎症効果. 第 89 回日本化学会春季年会, 2009, 船橋.
37. 藤枝俊宣, 松谷哲行, 木下 学, 岡村陽介, 齋藤晃広, 武岡真司 : 医用応用可能な高分子ナノシートの構築とその創傷被覆効果. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009, 京都.
38. 齋藤晃広, 藤枝俊宣, 木下 学, 武岡真司 : 多糖ナノシートからなる薬物担持ナノシートの抗炎症効果. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009, 京都.
39. 下野浩貴, 岡村陽介, 藤枝俊宣, 木下 学, 武岡真司 : 断片化ポリ乳酸ナノシートの再構成と細菌透阻止能評価. 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 2009, 京都.
40. 藤枝俊宣, 松谷哲行, 木下 学, 岡村陽介, 齋藤晃広, 武岡真司 : 高分子超薄膜からなる新規創傷被覆材の開発. 第 18 回ポリマー材料フォーラム, 2009, 東京.
41. 下野浩貴, 岡村陽介, 藤枝俊宣, 木下 学, 武岡真司 : ポリ乳酸ナノシートの構築とマウス胃切開モデルを用いた創傷被覆効果. 日本化学会 第 3 回関東支部大会, 2009, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

分担研究者 丸山 徹（熊本大学生命科学研究部 薬物動態制御学分野 教授）

研究要旨

近年、リポソーム製剤，特に脂質膜表面を PEG 修飾したリポソームにおいて、2 回目に投与した同一リポソームのクリアランスが 1 回目投与時と比べて著しく増大する Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC 現象) が報告されており、加えて、そのクリアランスの増大には抗リポソーム IgM が関与していることが報告されている。

H12 (ADP) リポソームにおいても脂質膜表面が PEG 修飾されているため、頻回投与時に ABC 現象の誘導が懸念される。H12 (ADP) リポソームは様々な疾患において引き起こされる血小板減少症に対する適応を目指しているため、臨床使用された場合、頻回投与が予想される。そこで本研究では、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時の ABC 現象誘導の可能性について検討した。その結果、H12 (ADP) リポソーム 10, 20, 40 mg/kg 投与時において血清中に抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の産生が確認された。一方、抗 H12 (ADP) リポソーム IgG の産生は確認されなかった。また、抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の H12 (ADP) リポソーム構成成分に対する認識部位の検討により、10, 20 mg/kg 投与時では IgM は脂質膜構成成分の一つである 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-PEG (DSPE-PEG) を認識し、40 mg/kg 投与時では 1,5-bis-*O*-hexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSGL) を認識していることが明らかとなった。今回得られた知見より、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時において ABC 現象が誘導される可能性が示唆された。ただし、この IgM の変化はこれまで報告されているリポソーム製剤の結果に比べて小さいので、実際の体内動態には影響を及ぼさない可能性も充分考えられる。また、ABC 現象は病態や動物種により大きく影響されることを考え合わせると、H12 (ADP) リポソームの体内動態に及ぼす ABC 現象を結論付けるには、今後 *in vivo* での検証が必要である。

A. 研究目的

近年、リポソーム製剤を、ある一定期間内に頻回投与した場合、2回目投与時の半減期が著しく低下する Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC現象)が報告されている。さらに、ABC現象の誘導には初回リポソーム投与後に脾臓より産生される、抗リポソーム IgMが強く関与していることが知られている。H12 (ADP) リポソームは様々な疾患において引き起こされ

る血小板減少症に対する適応を目指しているため、臨床使用された場合、頻回投与が予想される。H12 (ADP) リポソーム頻回投与時にH12 (ADP) リポソームの体内動態が変動するとH12 (ADP) リポソームの薬理作用の変動や副作用の原因になり得ると思われる。従って、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時における体内動態の詳細な把握は、臨床試験の投与スケジュールを考慮する上での基盤情報となるのは基よりのこと、

臨床使用に向けた有用な基礎的情報になることが期待される。

そこで本研究では、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時のABC現象誘導の可能性について明らかにすることを目的とし、ABC現象の誘導に強く関与する血清中抗H12 (ADP) リポソーム IgM産生についての検討を行い、さらに産生したIgMのH12 (ADP) リポソーム構成成分に対する認識部位の検討も行った。

B. 研究方法

1. 動物

SD系雄性ラット (6週齢、180~200g) は九動より購入し、1週間の予備飼育後、7週齢で実験に使用した。

2. 倫理面への配慮

動物実験は、動物の生命を尊重するという基本的観点に基づく動物福祉を護持するための配慮を念頭に置き、熊本大学実験動物倫理委員会のもとに、実験を施行した。

3. 抗H12 (ADP) リポソーム IgG 及び IgM の検出

SD系雄性ラットに非絶食、エーテル麻酔下において、H12 (ADP) リポソームを 10, 20, 40 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 1~7, 10, 14 日後にヘパリン処理したシリンジで尾静脈から採血後、3000rpm で遠心分離を行い、血漿を得た。残存 H12 (ADP) リポソームを除去するために超遠心処理(100000 g, 40 min)を行い、その上清を血漿サンプルとした。

96 well プレートに H12 (ADP) リポソーム、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, 1,5-bis-*O*-hexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) 及び 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-PEG (DSPE-PEG) を固定化し、アルブミン溶液で

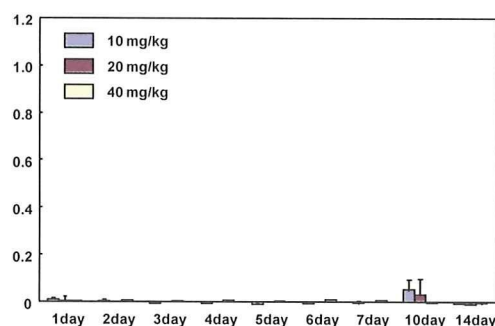
blocking 後、希釈した血漿サンプルを添加し、37°C, 1 時間インキュベートした。wash 後、Horseradish peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG または peroxidase-labeled affinity purified antibody to mouse IgM (μ) を添加し 37°C, 1 時間インキュベートした。*o*-phenylene diamine で発光後、490nm の吸光度で評価した。

C. 結果

1. 抗H12 (ADP) リポソーム IgM の検出

SD系雄性ラットに、H12 (ADP) リポソームを 10, 20, 40 mg/kg で尾静脈より投与後 1~7, 10, 14 日目の抗H12 (ADP) リポソーム IgG 及び IgM 産生の確認を行った。その結果、抗H12 (ADP) リポソーム IgG の産生は確認されず、抗H12 (ADP) リポソーム IgM はすべての投与群において産生が確認された (Fig. 1)。

(A) IgG



(B) IgM

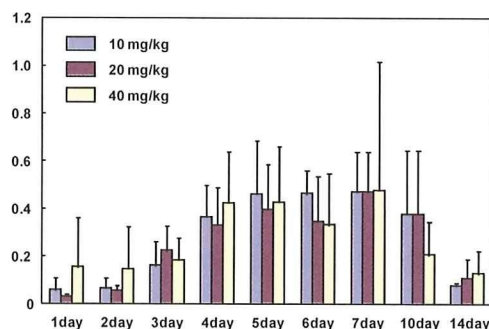


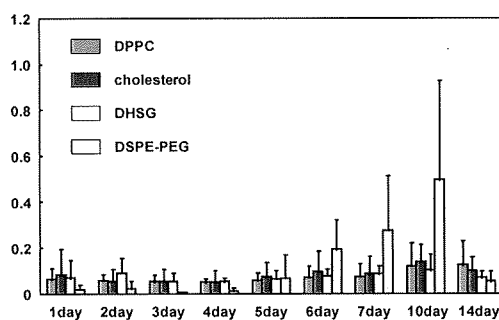
Fig.1 Production of serum (A) IgG and (B) IgM against H12 (ADP) liposome after H12 (ADP) liposome injection at a dose of 10, 20 or 40 mg/kg.

2. 抗H12 (ADP) リポソーム IgMの認識部位

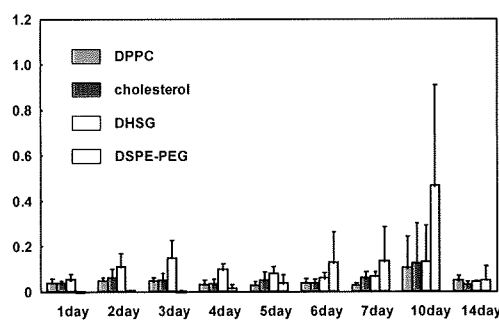
次に、抗H12 (ADP) リポソーム IgMの認識部位についての確認を脂質膜構成成分別 (DPPC, cholesterol, DHSG, DSPE-PEG) に検討を行った。

その結果、すべての投与群において、その認識部位はDSPE-PEGであることが確認され、その認識は投与10日後が最も高値を示した。興味深いことに、40 mg/kg投与群においては投与初期よりDHSGを認識することが明らかとなった (Fig. 2)。

(A) 10 mg/kg



(B) 20 mg/kg



(C) 40 mg/kg

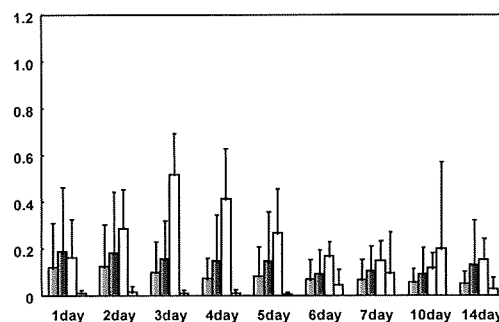


Fig. 2. The recognition site of serum IgM against H12 (ADP) liposome after H12 (ADP) liposome injection at a dose of (A) 10, (B) 20 or (C) 40 mg/kg.

D. 考察

H12 (ADP) リポソームの臨床使用を考えた場合、その頻回投与が十分に考えられるため、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時の体内動態を把握することは重要であるが、これまでに検討した報告はない。そこで、今年度はH12 (ADP) リポソーム投与時におけるABC現象誘導に関する検討を行った。その結果、H12 (ADP) リポソーム投与時ではABC現象誘導の原因とされている抗H12 (ADP) リポソーム IgMの産生が確認された。また、その認識部位は脂質膜構成成分の一つであるDSPE-PEGであり、40 mg/kg投与時ではDHSGを強く認識した。これまでに、H12 (ADP) リポソームの脂質膜及びADPを³Hまたは¹⁴C標識し、H12 (ADP) リポソームの投与量依存性検討により、投与量40 mg/kgにおいても細網内皮系細胞の飽和現象は確認されなかった。そのため今回の結果より、H12 (ADP) リポソームに対するIgMが産生されたことは、H12 (ADP) リポソームを頻回投与した場合にABC現象が誘導される可能性が十分に示唆していると考えられる。今回得られた知見は、今後のH12 (ADP) リポソームの臨床開発、特に至適投与設計において有用な基礎資料になるものと思われる。来年度は今年度に引き続き、H12 (ADP) リポソーム構成成分の詳細な体内挙動、特に分解過程及び分解産物までを明らかにし、さらに、今回の結果を基にABC現象の誘導についてin vivoでの体内動態実験を行い、単回投与時のPK/PDモデリングに加え、ABC現象誘導時におけるPK/PDモデリングを行い、その詳細について評価していく予定である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishi K, Fukunaga N, Ono T, Akuta T, Yumita N,

- Watanabe H, Kadowaki D, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Construction of an Expression System for Human α 1-Acid Glycoprotein in E. coli: the Role of Oligosaccharide Moieties on Structural and Functional Properties. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2010) *in press*
2. Matsumoto K, Nishi K, Kikuchi M, Watanabe H, Nakajou K, Komori H, Kadowaki D, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Receptor-mediated uptake of human α 1-acid glycoprotein into liver parenchymal cells in mice. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2010) *in press*
3. Katayama N, Nakajou K, Ishima Y, Ikuta S, Yokoe JI, Yoshida F, Suenaga A, **Maruyama T**, Kai T, Otagiri M. Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells. *Nitric Oxide.* (2010) *in press*
4. Mera K, Takeo K, Izumi M, **Maruyama T**, Nagai R, Otagiri M. Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin. *J Pharm Sci.* (2010) 99(3):1614-25.
5. Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Taguchi K, Shimoishi K, Seo H, Hirata S, **Maruyama T**, Otagiri M. Evaluation for antioxidant and renoprotective activity of olmesartan using nephrectomy rats. *Biol Pharm Bull.* (2009) 32(12):2041-5.
6. 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.
7. Tomida H, Fujii T, Furutani N, Michihara A, Yasufuku T, Akasaki K, **Maruyama T**, Otagiri M, Gebicki JM, Anraku M. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. *Carbohydr Res.* (2009) 344(13):1690-6.
8. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, **Maruyama T**, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab Dispos.* (2009) 37(7):1456-63.
9. Taguchi K, **Maruyama T**, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J Control Release.* (2009) 136(3):232-9.
10. Nishi K, Ueno M, Murakami Y, Fukunaga N, Akuta T, Kadowaki D, Watanabe H, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. A site-directed mutagenesis study of drug-binding selectivity in genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein. *J Pharm Sci.* (2009) 98(11): 4316-26.
11. Iwao Y, Hiraike M, Kragh-Hansen U, Kawai K, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Altered chain-length and glycosylation modify the pharmacokinetics of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* (2009) 1794(4):634-41.
12. Anraku M, Fujii T, Furutani N, Kadowaki D, **Maruyama T**, Otagiri M, Gebicki JM, Tomida H. Antioxidant effects of a dietary supplement: reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. *Food Chem Toxicol.* (2009) 47(1):104-9.
- (総説、著書など)
1. Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M. Updates on contemporary protein binding techniques. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2009) 24(4):358-64. *Review*
2. Ishima Y, Kragh-Hansen U, **Maruyama T**, Otagiri M. Albumin as a nitric oxide-traffic protein: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2009) 24(4):308-17. *Review*
3. **Maruyama T**, Kadowaki D. To facilitate the compliance of phosphate binder for the control of hyperphosphatemia in chronic kidney disease patients. *Clin Calcium.* (2009) 19(2):248-52. *Review*
2. 学会発表
1. 田口和明, 浦田由紀乃, 安楽誠, **丸山徹**, 門脇大介, 甲斐俊哉, 小林紘一, 土田英俊, 小田切優樹 人工酸素運搬体へモグロビン小胞体 (HbV) の頻回投与時における体内動態特性 日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 26 日-28 日
2. 末永 綾香, 山田 純嗣, 岩尾 康範, 野口大之, 米良 克美, 異島 優, **丸山 徹**, 小田

切 優樹 抗酸化能に富むアルブミンの設計：
抗酸化活性に関するアミノ酸残基の探索 日
本薬学会第129年会2009年3月26日-28日

3. 異島 優、赤池孝章、廣山 秀一、澤 智裕、
末永 綾香、丸山 徹、甲斐 俊哉、小田切優樹
S-ニトロソヒト血清アルブミンの臓器保護作用
は、脂肪酸結合により増強される 第 9 回日本
NO 学会学術集会 2009 年 5 月 8 日-9 日

4. 平田 憲史郎、異島 優、末永綾香、丸山 徹
小田切 優樹 組換え型糖鎖付加アルブミンの
肝ターゲティング担体としての有用性評価 第
9 回日本 NO 学会学術集会 2009 年 5 月 8 日-9 日

5. 小田切 優樹、金子 健一、福田 光、チュアン・
トゥアン ギャム、山崎 啓之、川原 浩一、中山
仁、末永 綾香、丸山 徹 イヌアルブミン分子
上のケトプロフェン結合部位のトポロジー解析
第9回日本蛋白質科学会年会 2009年5月20日
-22日

6. 異島 優、赤池孝章、廣山 秀一、澤 智裕、
末永 綾香、丸山 徹、甲斐 俊哉、小田切優樹
S-ニトロソヒト血清アルブミンの臓器保護作用
は、脂肪酸結合により増強される 第 9 回日本
蛋白質科学会年会 2009 年 5 月 20 日-22 日

7. 小森 久和、上原 奈緒、菊池 真理、西 弘
二、丸山 徹、小田切 優樹 $\alpha 1$ -酸性糖たんぱ
く質のヘモグロビン β 鎖を介した肝細胞取り込
み機構の解析 日本薬剤学会第24年会 2009年
5月21日-23日

8. 異島 優、陳 迪、末永 綾香、丸山 徹、
小田切 優樹 DDS 担体としての組換え型アル
ブミン二量体の有用性評価 第 25 回日本 DDS
学会 2009 年 7 月 3 日-4 日

9. 田口 和明、浦田 由紀乃、安楽 誠、土田
英俊、小林 紘一、丸山 徹、小田切優樹 ヘ
モグロビン小胞体の体内動態の検討 第25回日
本 DDS 学会 2009 年 7 月 3 日-4 日

10. 異島 優、赤池孝章、廣山秀一、澤 智裕、末
永綾香、丸山 徹、甲斐俊哉、小田切優樹 強力
な臓器保護剤としての新規 S-ニトロソヒト血清
アルブミンの開発 第16回血液代替物学会年次

大会 2009 年 10 月 15 日-16 日

11. 田口和明、丸山 徹、甲斐俊哉、酒井宏水、土田英
俊、小林紘一、小田切優樹 出血性ショックモデ
ルラットにおけるヘモグロビン小胞体頻回投与
時の体内動態解析 第16回血液代替物学会年次
大会 2009 年 10 月 15 日-16 日

12. 宮里麻友美、田口和明、渡邊博志、酒井宏水、堀
之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山 徹、小田切優
樹 四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけ
るヘモグロビン小胞体の体内動態の評価 第16
回血液代替物学会年次大会 2009年10月15日-16
日

13. 小森久和、上原奈緒、西 弘二、児玉 彬、
渡邊博志、丸山 徹、小田切優樹 $\alpha 1$ -酸性糖
タンパク質のヘモグロビン β 鎖を介した肝細胞
取り込み機構 第 3 回次世代を担う若手医療薬
科学シンポジウム 2009 年 11 月 14 日-15 日

14. Takeo K, Mera K, Izumi M, Maruyama T,
Nagai R, Otagiri M REACTIVE ALDEHYDES
INDUCE STRUCTURAL CHANGE AND
DISFUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN
第 24 回日本薬物動態学会年会 2009 年 11 月 26
日-29 日

15. Kugimiya T, Ando Y, Saito S, Watanabe H,
Kadowaki D, Jono H, Ueda M, Otagiri M,
Maruyama T EFFECT OF ALBUMIN BINDING
AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY ON
TRANSTHYRETIN AMYLOID FORMATION 第
24 回日本薬物動態学会年会 2009 年 11 月 26 日
-29 日

16. Furukawa M, Ishima Y, Ikuta S, Watanabe H,
Otagiri M, Maruyama T IMPROVED
THERAPEUTIC EFFECT OF THIOREDOXIN BY
FUSION TO HUMAN SERUM ALBUMIN
AGAINST OVALBUMIN-INDUCED LUNG
INJURY 第 24 回日本薬物動態学会年会 2009 年
11 月 26 日-29 日

17. Tokunaga K, Maruyama T, Mera K, Watanabe
H, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M IMPACT OF
CINACALCET ON SERUM OXIDATIVE STRESS
IN SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM 第
24 回日本薬物動態学会年会 2009 年 11 月 26 日
-29 日

18. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kobayashi K, Tsuchida E, **Maruyama T**, Otagiri M PHARMACOKINETIC STUDY OF ENCLOSED HEMOGLOBIN AND OUTER LIPID COMPONENT AFTER THE ADMINISTRATION OF HEMOGLOBIN VESICLES AS AN ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER 第24回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

19. Hoshino H, Ishima Y, Akaike T, Watanabe H, Otagiri M, **Maruyama T** THE DETECTION OF ENDOGENOUS S-GUANYLATED HUMAN SERUM ALBUMIN. 第24回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

20. Komori H, Uehara N, Nishi K, Kodama A, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M Involvement of hemoglobin β -chain mediated endocytic pathway in hepatic uptake of α 1-acid glycoprotein. 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009年11月29日-12月1日

21. Yoshida F, Ishima Y, Kai T, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M NO Transferring from Poly-S-Nitrosylated Human Serum Albumin is Involved in Cell-Surface Protein Disulfide Isomerase. 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009年11月29日-12月1日

22. Miyamoto Y, Iwao Y, Watanabe H, Sato K, Otagiri M, **Maruyama T** 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan propionate, an uremic toxin, increase oxidative stress through over-generation of super-oxide anion radical. 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009年11月29日-12月1日

23. Minomo A, Ishima Y, Suwa Y, Uchida M, **Maruyama T**, Morioka H Otagiri M Identification of bilirubin binding site in human serum albumin via construction and bilirubin binding screening of a phage library 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日-12日

24. 宮里麻友美、田口和明、渡邊博志、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、**丸山徹**、小田切優樹 肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性 第26回日本薬学会九州支部大会 2009年12月12日-13日

国際学会

1. Taguchi K, **Maruyama T**, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Otagiri M. Pharmacokinetic profiles of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. XII Symposium on Blood Substitute, Parma, 2009 8/25-29

2. Hirata K, Ishima, Y, Watanabe H, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M Mannosylated-Recombinant albumin as a NO traffic protein for the treatment of hepatic ischemia /reperfusion injury XII Symposium on Blood Substitute, Parma, 2009 8/25-29

3. Chuang VTG, Ikuta S, **Maruyama T**, Otagiri M HUMAN ALBUMIN BASED DRUG DELIVERY: ALBUMIN FUSION OF THIOREDOXIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

4. Mera K, Takeo K, Izumi M, **Maruyama T**, Nagai R, Otagiri M MODIFICATION WITH REACTIVE ALDEHYDES ALTERS THE STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

5. Taguchi K, Watanabe H, Urata Y, Anraku M, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, **Maruyama T**, Otagiri M. PROPOSED DOSE OF HEMOGLOBIN VESICLES, PEGYLATED LIPOSOMES DEVELOPED AS A RED BLOOD SUBSTITUTE, DOES NOT INDUCE THE ACCELERATED BLOOD CLEARANCE PHENOMENON IN MICE Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

6. Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Taguchi K, Shimoishi K, Suenaga A, Watanabe H, Hirata S, **Maruyama T**, Otagiri M EVALUATION FOR ANTIOXIDANT AND RENOPROTECTIVE ACTIVITY OF OLMESARTAN USING NEPHRECTOMY RATS Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

7. Anraku M, Fujii T, Kondo Y, Yasufuku T, **Maruyama T**, Otagiri M, Tomida H ANTIOXIDANT PROPERTY OF SEVERAL MOLECULAR WEIGHT CHITOSANS IN IN VITRO AND IN VIVO STUDIES Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

8. Ishima Y, **Maruyama T**, Akaike T, Sawa T, Suenaga A, Kai T, Otagiri M FATTY ACIDS

COULD BE A NOVEL TYPE OF MEDIATOR OF
S-DENITROSATION FROM S-NITROSYLATED
HUMAN SERUM ALBUMIN Asian Federation for
Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

9. Hirata K, Maeda H, Watanabe H, Nakajou K,
Ishima Y, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M
GENETICALLY ENGINEERED MANNOSY-
LATED-HUMAN SERUM ALBUMIN AS A

VERSATILE CARRIER FOR LIVER-SELECTIVE
THERPEUTICS Asian Federation for
Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし

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

分担研究者	鈴木 克彦	（早稲田大学 スポーツ科学学術院 准教授）
研究協力者	鈴木 洋子	（早稲田大学 人間科学研究科）
	菅間 薫	（早稲田大学 人間科学研究科）
	神田 和江	（早稲田大学 スポーツ科学研究科）
	沢田 秀司	（早稲田大学 スポーツ科学研究科）
	勝野 俊介	（早稲田大学 先進理工学研究科）
	武岡 真司	（早稲田大学 理工学術院 教授）

研究要旨

人工血小板の安全性の評価指標について、まず健常者の末梢血を用いて *in vitro* での検討を進めた。特に炎症、酸化ストレスを惹起する可能性について好中球の遊走能・活性酸素産生能・脱顆粒能と全血の炎症性サイトカインの産生能を比較検討した。その結果、H12-(ADP)小胞体には好中球を活性化したり、炎症性サイトカインの産生を促進するような異常反応は検出されなかったが、ADP を含有しない素材において薬理的濃度を上回る高濃度（1 mg/mL）で好中球の活性酸素産生能や MPO 脱顆粒能、インターロイキン 8（IL-8）産生能が促進され、これらが評価指標の候補となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

H12-(ADP)小胞体（vesicle：V）の創薬化への前臨床開発段階において、素材の生体適合性と安全性について評価し、あわせて臨床検査の候補指標を選定する必要がある。また、素材の最適化に資する評価指標については、特に異物に対する生体反応である炎症関連の各種測定系が有用と考えられるため、本研究ではまず健常者の血液にて *in vitro* で評価できるよう検討することにした。

白血球の一種である好中球（多形核白血球、顆粒球）は、体内に侵入した微生物を殺菌する生体防御の第一線に位置づけられる食細胞であり、その機能低下は易感染性をもたらす。好中球の数や機能が低下するために起こる感染症は、ある種の免疫不全症や抗がん剤等の薬剤の副作用である骨髄抑制においてみられる。一方、好中球が殺菌物質として産生する活性酸素は組織傷害・遺伝子損傷等の酸化ストレスを引き起こすため、好中球の炎症細胞としての病態への関与も重要視されている。このように好中球機能は各種病態に密接に関与しており、生体の異常もよく反映する

（Alexander D. et al. Neutrophils as biologic markers of the inflammatory Response. *Sepsis* 2:119-125, 1998）。

そこで本研究では、好中球活性酸素産生能（ルミノール依存性化学発光量）をマイクロプレートによって多検体・多条件同時に比較検討できるハイスループット解析・評価法（以下、マイクロプレート法）を用いて、素材単独の影響のみならず、好中球の刺激物質として頻用される酵母菌体であるザイモザン（zymosan）を用いた刺激応答性の修飾作用まで含め、まず生じうる作用を多面的にスクリーニングした。すなわち、①直接の刺激作用、②活性酸素消去作用（抗酸化作用）については、素材の濃度段階を設定することによって濃度依存的な変化から評価できる。さらに素材とのプレインキュベーションの作用時間を設定することにより、③プライミング（賦活）作用や④down-regulation（抗炎症作用）を評価できると考えられる（Hasegawa H, Suzuki K, et al. Analysis and assessment of the capacity of

neutrophils to produce reactive oxygen species in a 96-well microplate format using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. *J. Immunol Methods*. 210:1-10, 1997)。

次に、止血局所に人工血小板が集積する状況を想定して、*in vitro* で全血とハイドロゲルを接触させる反応系（以下、ハイドロゲル法）に人工血小板素材を添加し、好中球機能への影響を評価した。今回用いた「足場付きハイドロゲル (scaffold thermo sensitive gelation polymer: S-TGP)」は、コラーゲンタイプ I を含有し好中球がハイドロゲルに接着して浸潤しやすくなるように足場を設計したもので、20°C以上でゲル化する特性を生かし、S-TGP を 37°C に保ち、ゲル上に重層した全血からゲル中に遊走する好中球の細胞数を測定し、さらに産生する活性酸素をルミノール依存性化学発光で定量するものである（鈴木克彦ほか。）。これにより、生体内により近い条件での評価が可能になると考えられる（鈴木克彦ら、好中球機能検査システムおよび好中球機能検査方法。http://jstore.jst.go.jp/cgi-bin/patent/advanced/detail_print.cgi?pat_id=18174 特開 2008-107210）。

さらに、炎症反応や免疫応答などを制御する細胞間情報伝達物質であるサイトカインは、通常は末梢組織において極微量で作用するが、重症感染症や外傷、激運動、熱傷、循環不全など生体に極端な刺激が加わると、血中濃度が上昇して全身に炎症反応が波及し、好中球の活性化や血管内皮傷害、循環障害、ひいては多臓器不全を起こす原因となる。そこで好中球を活性化するサイトカインとして、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン (IL) 6、8 (IL-6、IL-8) の全血中の産生量を測定し、実際に好中球の脱顆粒物質の濃度もザイモザンによる刺激条件まで含め評価し、細胞機能解析から物質レベルまでの機序究明を試みた。

B. 研究方法

4 種類の人工血小板の素材として H12-(ADP)V、H12-(PBS)V、(ADP)V、(PBS)V をそれぞれ反応系での最終濃度が 0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL になるように PBS (pH 7.4) で調整した。検体の血液は、特に疾患を有していない健常男性 6 名よりヘパリン採血管に 3 ml 末梢血を採取し、以下の *in vitro* の各種測定系による評価に供した。なお血液学的検査値（平均値±標準偏差）については、白血球数 5550±1455 個/ μ L、好中球数 3233±1388 個/ μ L、ヘモグロビン濃度 15.5±0.7 g/dL、血小板数 22.1±4.7 万個/ μ L であり、すべて正常範囲内であった。

マイクロプレート法では、96 well マイクロプレートに添加物 (H12-(ADP)V、H12-(PBS)V、(ADP)V、(PBS)V、対照として溶媒の PBS) を 20 μ L ずつ入れ、全血を 1 well 当たり 35 μ L とし、等量の活性酸素検出試薬 (2.5 mM ルミノール溶液) と混合して 70 μ L ずつ添加し、5 mg/mL のザイモザン懸濁液 10 μ L を指定の well に添加し、37°C で 1 well 当たり 1 秒の下方測定を行い、マイクロプレート一巡後に 10 秒間自動攪拌するカイネティック測定を行った。ザイモザンによる刺激は 0 分と 45 分後に行い、無刺激の条件も含め、各種素材の濃度依存性と作用時間依存性について影響を解析・評価した。

ハイドロゲル法では、冷却した S-TGP を各チューブの底に 50 μ L 塗布して 37°C でゲル化させた後、血液とルミノール溶液を 1:1 に混和したものを、150 μ L ずつすばやくゲル上に均一に添加し、ルミノメーターにセットして化学発光量 (relative light unit: RLU) を測定した。その後 20 分、40 分、60 分の計 4 回測定し、化学発光量を記録した。ルミノメーターでの測定終了後、ただちにゲルの上層の血液を 37°C に加温した PBS にて洗浄し取り除いた。洗浄は血色素が見えなくなるまで各チューブ 3 回行い、洗浄後冷却してゾル化させた。ゾル化させた溶液に等量 (50 μ L) のチュルク液を加え、十分攪拌し、血球計算盤にて細胞数を測定した。

好中球脱顆粒物質とサイトカインの測定は、上記のマイクロプレート法で90分間反応させた各wellに200 μ LのPBSを加え、攪拌したあと遠心し、その上清を回収して酵素免疫測定法により定量した。それぞれ、人工血小板素材単独で反応させた条件と、さらにザイモザンを添加して刺激した場合の2通りについて測定を行った。TNF- α とIL-6はQuantikine HS (R&D Systemes, USA)、IL-8はOptEIA (BD Biosciences, USA)、好中球脱顆粒能についてはミエロペルオキシダーゼ(MPO)とカルプロテクチン(Calprotectin) (Hycult biotechnology, Netherlands)を測定した。

測定結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。統計学的検定は、等分散性の検定で正規性が仮定できない場合が多かったため、ノンパラメトリック検定のFreedman testを行い、多重比較にはScheffe's testを行い、それぞれ危険率5%未満を有意とした。

C. 研究結果

まず好中球活性酸素産生能に及ぼす影響についてマイクロプレート法を用いて4種類の人工血小板の濃度依存性・作用時間依存性をスクリーニングした。ザイモザンで刺激しない条件(図1)ではH12-(ADP)Vの0.01 mg/mL (A1)、0.1 mg/mL (A2)、1 mg/mL (A3)、H12-(PBS)Vの0.01 mg/mL (B1)、0.1 mg/mL (B2)、1 mg/mL (B3)、(ADP)Vの0.01 mg/mL (C1)、0.1 mg/mL (C2)、1 mg/mL (C3)、(PBS)Vの0.01 mg/mL (D1)、0.1 mg/mL (D2)、1 mg/mL (D3) および対照としての溶媒のPBSのそれぞれを全血と混和し90分間モニターしたが、ルミノール依存性化学発光の反応はほとんど検出できなかった。各素材において、総平均値を算出して比較したところH12をもつ素材では濃度依存的に活性酸素産生が抑制される現象が観察されたが、反応自体が微弱で個人差も大きかったため有意差は認められなかった(図2)。

次に、45分間各素材と混和して上述のようにルミノール依存性化学発光をモニターした上で、

45分時にザイモザンで刺激を行った(図3)。前半は上記と同様でほとんど反応が観察されず、各素材自体に好中球の刺激作用はないことが再現性よく確認された。45分時にザイモザンで刺激を行ったところ良好な刺激応答性の反応曲線が示されたが(図3)、各素材に濃度依存性や作用時間依存性は認められなかった(図4)。同様に反応開始時にザイモザンで刺激した実験条件でも良好な反応曲線が再現されたが(図5)、素材の濃度依存性は示されなかった(図6)。

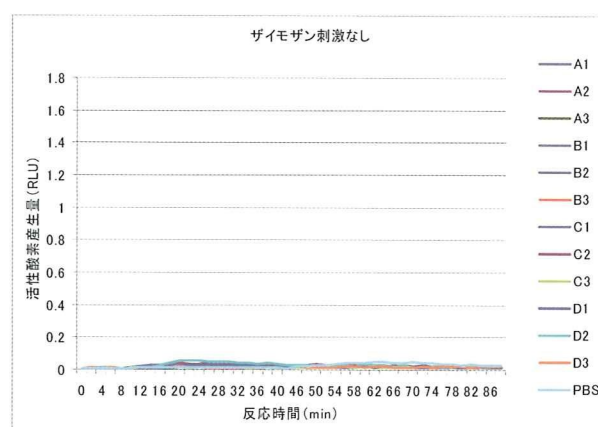


図1. マイクロプレート法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響に関する反応曲線(ザイモザン刺激なし)

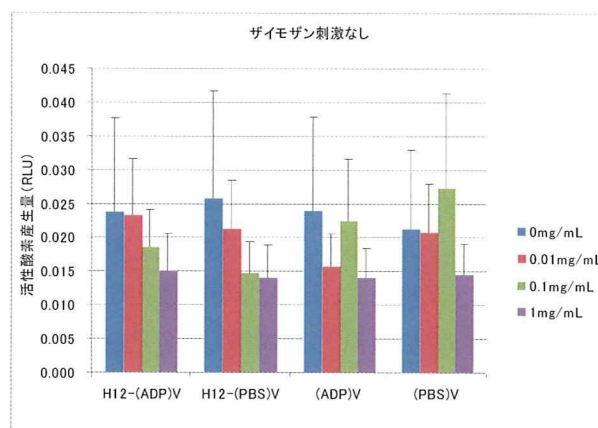


図2. マイクロプレート法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響(ザイモザン刺激なし)

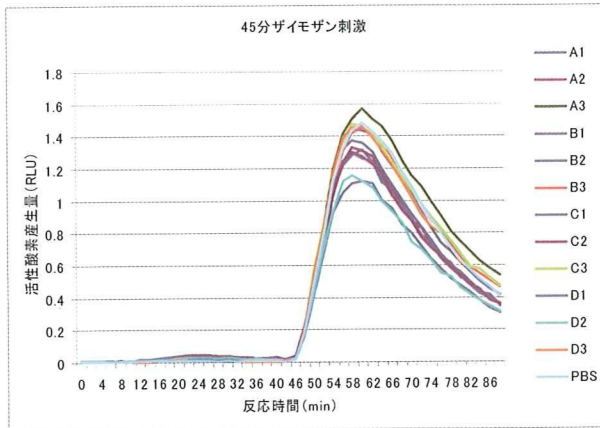


図3. マイクロプレート法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響に関する反応曲線 (45分ザイモザン刺激)

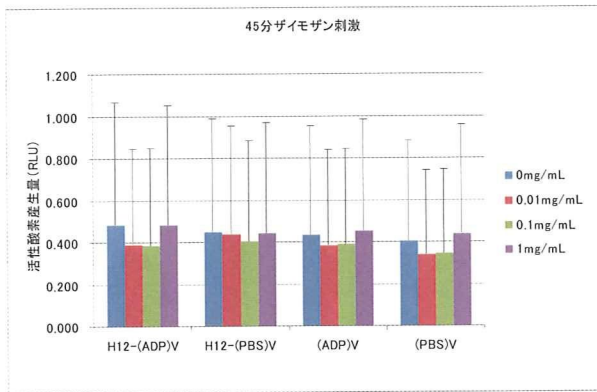


図4. マイクロプレート法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響 (45分ザイモザン刺激)

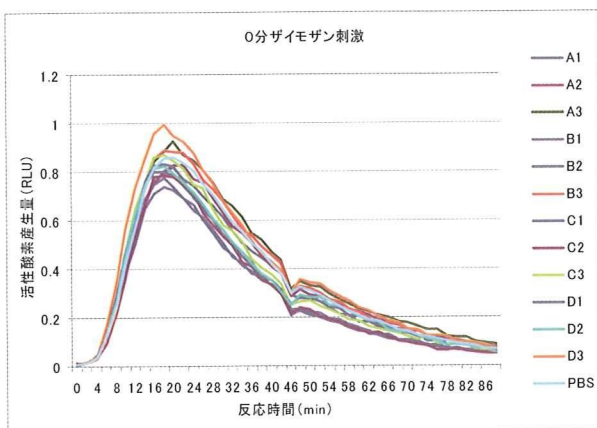


図5. マイクロプレート法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響に関する反応曲線 (0分ザイモザン刺激)

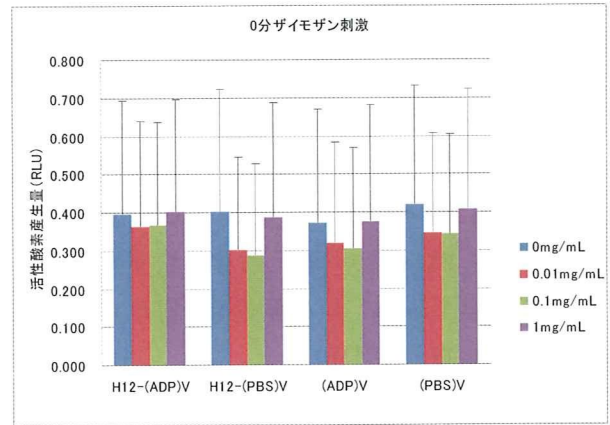


図6. マイクロプレート法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響 (0分ザイモザン刺激)

次にハイドロゲル法により好中球の遊走能と活性酸素産生能について4種類の人工血小板素材の影響を評価した。好中球遊走能に関しては濃度依存性が認められなかった(図7)。一方、活性酸素産生能についてはH12-(PBS)Vと(PBS)Vで濃度依存的な増加を認め($p < 0.05$)、それぞれ高濃度の1 mg/mLで有意な上昇が認められた($p < 0.05$) (図8)。

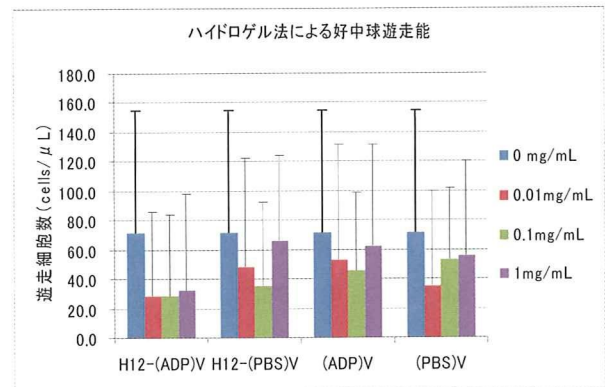


図7. ハイドロゲル法で評価した各種人工血小板素材の好中球遊走能に及ぼす影響

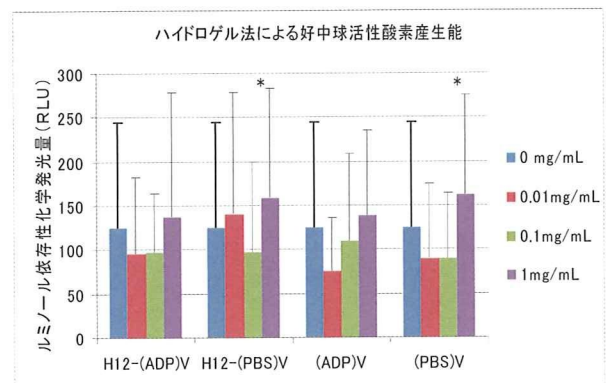


図 8. ハイドロゲル法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響

好中球の脱顆粒能については、カルプロテクチン、MPO とともにザイモザンによる刺激で促進されたが、特にザイモザン刺激時の MPO 脱顆粒能は、H12-(PBS) V において濃度依存的な有意な上昇を示し、0 と 1 mg/ml との濃度間で有意差が認められた ($p < 0.05$) (図 9)。

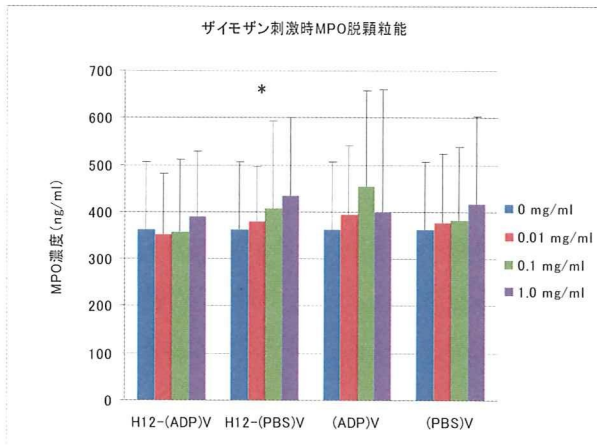


図 9. ザイモザン刺激時の好中球による MPO 脱顆粒能

全血のサイトカイン産生能についてはザイモザンで刺激する場合としない場合の実験条件を設定したが、刺激した場合には有意な影響が認められなかった。ザイモザンで刺激せずに各素材単独で反応させた実験条件では、IL-6 の産生能が H12-(ADP)V と H12-(PBS)V と (PBS)V において高濃度の 1 mg/mL では有意に抑制された ($p < 0.05$) (図 10)。一方、IL-8 については、H12-(PBS)V において有意な変動が認められ、0.01 mg/mL に対して 1 mg/mL で有意に上昇した ($p < 0.05$) (図 11)。TNF- α については、有意な影響は認められなかった。

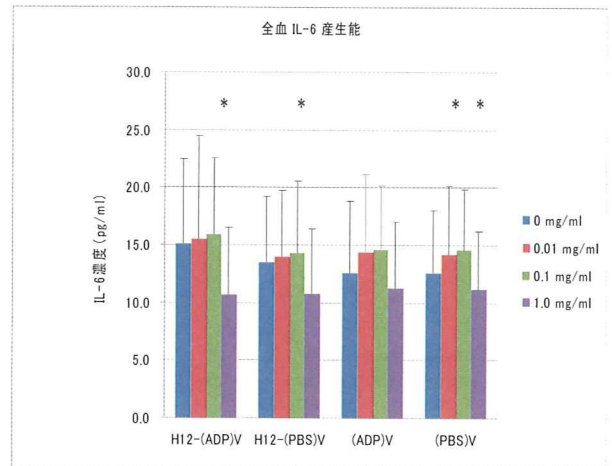


図 10. 全血の IL-6 産生能

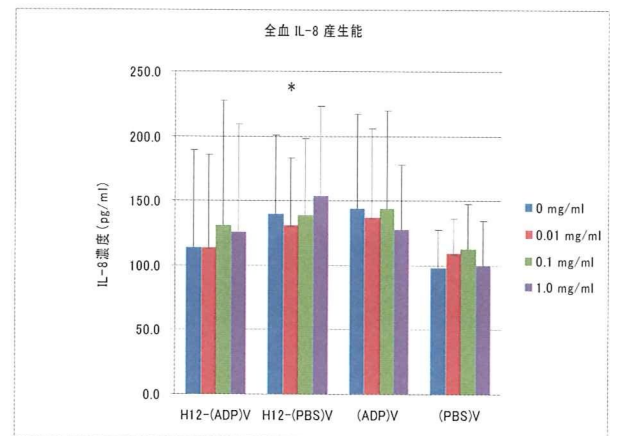


図 11. 全血の IL-8 産生能

D. 考察

H12-(ADP)V は、フィブリノゲンの血小板認識部位 (H12) と血小板刺激物質 (ADP) を有するため、血液と混和するとそれらの生物学的作用により血液凝固カスケードや血小板活性化を介して、あるいは人工物質が直接白血球に対して異物反応を起こし、炎症反応を惹起する可能性が考えられる。そこで本研究では炎症関連の各種測定系を用いて素材の評価を行った。

まずマイクロプレート法では、各素材と血液を混和し検討したが、濃度依存性や作用時間依存性は認められず、好中球に対して各素材は①直接の刺激作用、②活性酸素消去作用 (抗酸化作用)、③プライミング作用、④down-regulation (抗炎症作用) のいずれも示さなかった。ただし有意な影響ではなかったものの、ザイモザンで刺激せず、