

素材と混和しただけの条件において、H12をもつ2つの素材では濃度依存的に活性酸素産生が抑制される現象（抗酸化作用）が観察された。

次にハイドロゲル法では、好中球の接着・遊走のステップでの生体内により近い条件での機能変化を検討したが、ADPを含有しない2つの素材では1 mg/mLの高濃度において有意な高値となった。先行研究においてアデノシンには好中球の機能抑制作用が報告されているが、局所で人工血小板が集積するような状況ではADPが存在しないと好中球が活性化される可能性が示唆された。

以上の検討で活性酸素の検出に用いたルミノール依存性化学発光は、好中球のアズール顆粒に含まれるミエロペルオキシダーゼ（MPO）の脱顆粒を介して生成される次亜塩素酸を中心として、殺菌や組織傷害に直接関与する毒性の高い活性酸素分子種に選択性が高く、異物反応を検出する測定指標としても生体影響評価としても有用な測定系の候補になると考えられる。

実際にMPOの脱顆粒能においてもADPを含有しないH12-(PBS) Vにおいて有意な亢進が認められ、活性酸素の代謝がMPOの脱顆粒によって促進される可能性と、あるいはそれがADPによって阻止される可能性が示唆された。

IL-6は急性炎症において最も血中濃度が変動しやすいサイトカインのひとつであり、好中球の活性化作用も報告されているが、本研究でのIL-6産生については人工血小板の各素材は高濃度でむしろ抑制する作用を示した。IL-8は好中球活性化蛋白1の別名がある通り、好中球の活性化に最も影響するサイトカインであるが、本研究においてH12-(PBS) VがIL-8の産生を有意に亢進させ、好中球機能促進とも対応したことから、ひとつの作用機序としてIL-8が関与した可能性が考えられた。

しかしながら、今回の検討では顕著な濃度依存性や作用時間依存性は認められず、特にH12-(ADP) Vについては異物反応は認められなかった。一方でADPを有さない素材において一部炎症反応性の変化が生じたため、今後、素材の最適化の

評価において今回の測定系が有用になる可能性が考えられる。さらに生体に投与した場合には血液以外の臓器の関与や抗体産生も生じる可能性があるため、*in vivo*での安全性の評価指標として好中球機能やサイトカイン産生能が有用であるか否かについて今後さらに検討を進める必要があると考えられる。

E. 結論

H12-(ADP) V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ず、少なくとも*in vitro*では安全な素材であると考えられた。しかしADPを含有しない素材において1 mg/mLの高濃度では好中球の活性酸素産生能やMPO脱顆粒能、IL-8産生能が促進され、炎症や酸化ストレスを惹起する可能性が示唆された。本研究で影響が認められた測定系が、安全性の評価指標として有用な候補となるか否かについては、今後さらに検討を要する。

F. 健康危険情報：特になし。

G. 研究発表：なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし。

マウス精巣動脈血栓モデルを用いた血栓性評価

分担研究者 後藤 信哉（東海大学医学部 内科学系 循環器内科 教授）

研究要旨

H12 (ADP) リポソームの止血増強効果は *in vitro* 実験、動物実験により既に示されている。本物質を人工血小板として臨床使用する場合の最大の懸念事項は心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患発症リスクの増加である。

心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患は動脈硬化巣破綻という血管内の損傷部位への血小板の集積が発症の契機となる。血管内腔方向に3次的に急速に成長すれば、心臓、脳などの重要臓器を灌流する血管が閉塞し臓器の虚血症状が惹起される。人工血小板の臨床開発には「血栓リスクを増加させず」に止血機能を亢進させることが必須である。

本年度の研究では、臨床応用を前提とした前臨床試験として動物実験を用いた血栓性評価を行った。心筋梗塞、脳梗塞などの発症病態と類似した血栓モデルとしてマウスの精巣動脈血栓モデルを用いた。塩化鉄を用いて血管内皮細胞を機能的に障害させ、そこでの血小板の集積、血小板血栓中への H12 (ADP) リポソームの集積動態を評価した。

塩化鉄刺激の直後から精巣動脈内に血栓形成が始まる。血栓中に H12 (ADP) リポソームが混在することから、経静脈的に投与した H12 (ADP) リポソームは全身循環して動脈系にも達することが示された。H12 (ADP) リポソームとしては血栓内に集積する蛍光を認めなかった。精巣動脈を閉塞するまでの時間も H12 (ADP) リポソームの添加の有無により影響を受けなかった。

われわれは過去の *in vitro* 実験成果に基づいて、血管内腔方向への血栓の成長に影響を与え難いリポソームとして H12 (ADP) リポソームを選択した。限られた動物種ではあるが、選択した H12 (ADP) リポソームは血栓の動脈内腔方法への成長を著しく増加させることなく止血機能を増強させる可能性があることが示された。

A. 研究目的

過去の *in vitro* 実験では、各種接着蛋白を結合させるリポソームを用いて、血栓性合併症を惹起することなく止血機能を有する分子種を選択を目指して研究を行った。症候性動脈血栓性疾患は、冠動脈、脳血管などの臓器灌流血管において直径数 mm におよぶ太い臓器灌流血管の血栓性閉塞が原因となる。止血は血管損傷部位を広く血小板などの固形物質により覆うことにより

達成されるので、血栓性合併症を惹起することなく止血機能を増強させるリポソームの選択にあたっては、血管内腔方向への3次的成長を促進させることなく、広く血管壁損傷部位に広がるリポソームが選択された。*in vitro* 実験と実際の人体の間には多くの条件の解離がある。開発した H12 (ADP) リポソームの臨床応用前には動物実験を用いた仮説の検証が必須である。そこで、われわれは血管内の動脈硬化巣の破綻を契

機として発症する心筋梗塞、脳梗塞などのモデルとしてマウス精巣動脈の血栓モデルを用いた。われわれのモデルでは、血管外から塩化鉄を血管に浸潤させることにより内皮細胞に参加ストレス刺激を与えた。血栓形成の基本メカニズムは心筋梗塞、脳梗塞などの症候性動脈血栓性疾患のモデルになり得る。

H12 (ADP)リポソームは経静脈的に投与する。投与したリポソームが精巣動脈まで達するか否か、native血小板とは異なる蛍光色のH12 (ADP)リポソームの灌流により確認した。また、塩化鉄刺激に形成される閉塞血栓に対するH12 (ADP)リポソームの寄与の定量化を目指した。さらに、塩化鉄刺激による内皮細胞刺激が血管内皮細胞に与える形態変化を検討し、本モデルの妥当性を検証した。

B. 研究方法

1. 動物

週齢 10-11 週の ICR マウスを用いた。(CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan),

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、東海大学実験動物委員会の定める各種規約を遵守して実験を施行した。

3. 抗 H12 (ADP) リポソームの投与

ケタミンによる前麻酔ののち、ネンブタールにより深麻酔を行った。尾静脈より 10 mg/kg にて H12 (ADP)リポソームを投与した。

4. 精巣動脈血栓モデルの作成

マウスの精巣動脈を分離した。図に示すように血管外膜面より塩化鉄を浸透させた (図 1)。



図 1 精巣動脈血栓モデル

塩化鉄刺激前の健常血管内皮細胞は図 2 に示すように敷石状に結果を被覆しており、このような内皮細胞の存在下では血小板、白血球などが接着することはない。

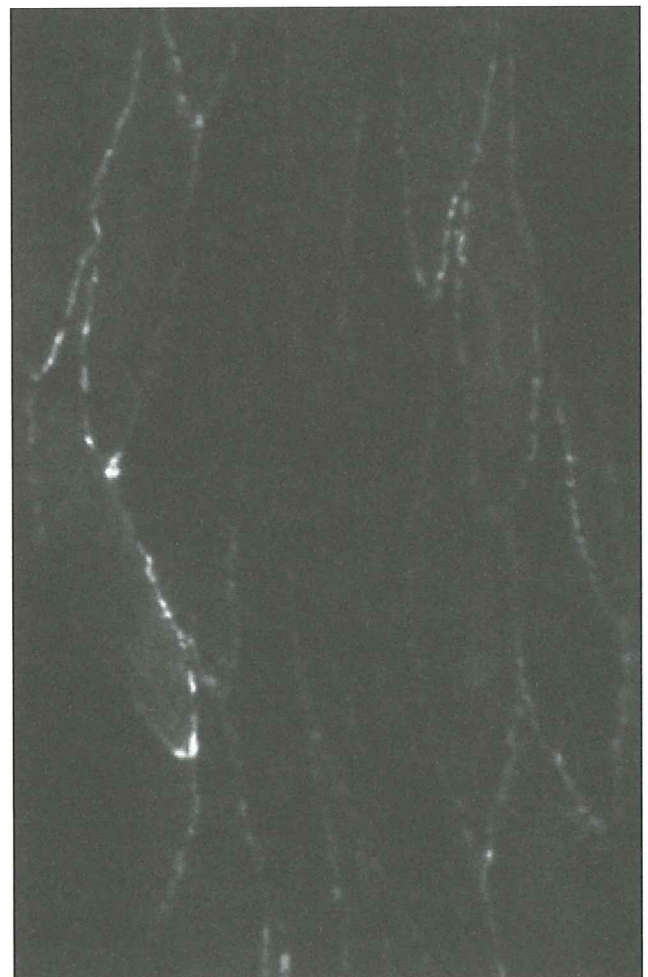


図 2 塩化鉄刺激前の健常血管内皮細胞
塩化鉄刺激後には血管内皮上に血小板の集積が始まる。本動物モデルは既に確立されている。

C. 結果

1. H12 (ADP) リポソーム検出

Native血小板、白血球を赤色に、H12 (ADP) リポソームを緑色にて蛍光標識した (図3)。

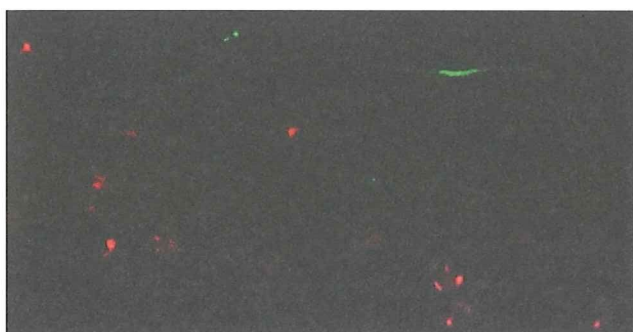


図3 H12 (ADP) リポソーム灌流開始直後のリポソームの集積

H12 (ADP) リポソーム灌流開始直後より、native血小板血栓周囲にリポソームの集積を認めた (上図)。右上に軌跡を示しているのはH12 (ADP)リポソームが、native血小板血栓周囲に生じた乱流により比較的遅い血流による移動している様子を示している。不動の緑の点が血栓中に存在するH12 (ADP)リポソームである。静脈投与したH12 (ADP)リポソームが網内系にトラップされることなく動脈まで循環していることを示している。

2. 閉塞血栓の形成におよぼす H12 (ADP) リポソームの役割

H12 (ADP)リポソームを10 mg/kg濃度にてマウスに投与した時と、非投与時の塩化鉄刺激開始後精巣動脈閉塞までの時間を計測した。H12 (ADP)リポソーム投与時には精巣動脈閉塞までの時間は 63 ± 18 分 (Mean \pm SEM、n=4)であった。一方、リポソーム非投与時の閉塞時間は 38 ± 7 分 (Mean \pm SEM、n=17)であった (図4)。両群間には統計学的には差を認めなかった。H12 (ADP)リポソーム投与時には血管閉塞時間が短縮し、血栓性が亢進することが懸念されたが、実際にはむしろ閉塞までの時間はH12 (ADP)リポソーム投与時の方が長い傾向であった。

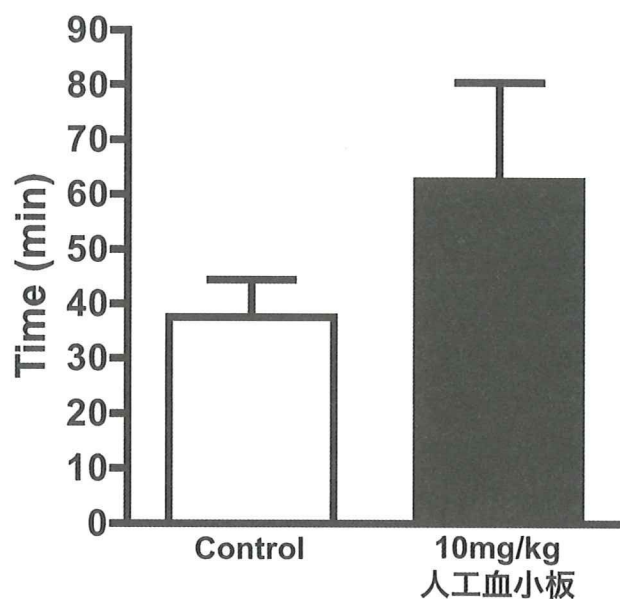


図4 塩化鉄刺激開始後精巣動脈閉塞までの時間

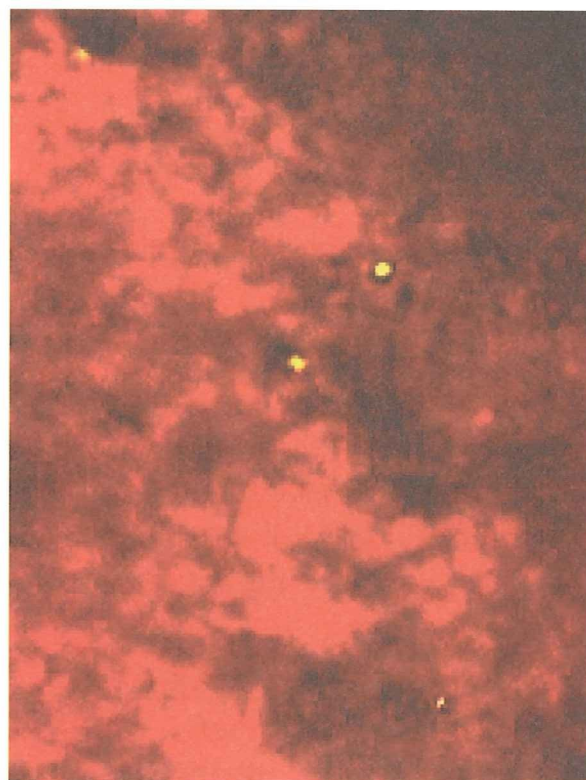


図5 閉塞血栓中のH12 (ADP)リポソームの局在

図4の縦軸が精巣動脈閉塞までの時間である。閉塞血栓中のH12 (ADP)リポソームの局在を図5に示す。Native血小板、白血球が集積して精巣動脈の閉塞血栓を形成している (左図赤の部分)がnative血小板、白血球)。緑がH12 (ADP)リポソームであるが、図に示すようにリポソームは血

栓内にばらばらに存在し集積することはなかった。

D. 考察

H12 (ADP) リポソームの臨床使用を考える場合、止血機能の増強と同時に起こる血栓性の亢進が危惧される。特に、心筋梗塞、脳梗塞などの動脈系の血栓性疾患は死亡、quality of lifeの障害などの重篤な予後に直結するため十分な注意が必要である。われわれは過去の一連の検討において、動脈系の血栓の形成には血小板膜糖蛋白の中でもGPIb α が必須の役割を演じることを報告してきた (Ikeda Y, et al. J Clin Invest, 1991, Goto S, et al. J Clin Invest, 1998など)。そこで臨床応用を目指した人工血小板としては、GPIb α との相互作用に関与しないH12を結合したリポソームを選択した。実際に、H12 (ADP)リポソーム添加時にも精巣動脈閉塞血栓形成までの時間の短縮を認めなかったことから、H12 (ADP)リポソームの選択は正しかったことが示唆される。実際、閉塞血栓中のリポソームの局在を見ても、個々のリポソームは血栓中にばらばらに存在しており、短時間に同一部位に集積して閉塞血栓の形成を促進する効果は本リポソームにはないことが示唆された。

血管内腔方向に向かう3次元的な血栓の成長に影響を与えることなく、広い範囲の組織欠損部位にばらばらに集積するH12 (ADP)リポソームは血栓性合併症の発症リスクを増加させることなく止血機能を増強させるナノ粒子として、人工血小板への臨床応用が期待できる。報告書には記載していないが、われわれが血管内皮細胞の構造変化を電子顕微鏡により精緻に観察する技術も開発した。今後、H12 (ADP)リポソームの濃度を変化させ、止血と血栓におよぼす効果を定量的に評価していきたい。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1 Poldermans D, Winkel TA, Hoeks SE, Schouten O, Zeymer U, Limbourg T, Baumgartner I, Bhatt DL, Steg PG, Goto S, Röther J, Cacoub PP, Verhagen HJ, Bax JJ: Prognosis of atrial fibrillation in patients with symptomatic peripheral arterial disease: data from the REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* in press (2010).

2. Kawai T, Yamagishi T, and Goto S. Circadian Variations of Gastrointestinal Mucosal Damage Detected with Transnasal Endoscopy in Apparently Healthy Subjects Treated with Low-Dose Aspirin (ASA) for a Short Period. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 16(3):155-163, Jan. 2009

3. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, and Eto K: Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. *J Clin Invest*, in press (2010)

4. Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, Togane Y, Goto S, Ozaki Y, Uchiyama S, and Ikeda Y: Assessment of an ELISA Kit for Platelet-Derived Microparticles by Joint Research at Many Institutes in Japan. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 16(6):878-887, Dec. 2009

5. Meadows TA, Bhatt DL, Hirsch AT, Creager MC, Califf RM, Ohman EM, Cannon CP, Eagle KA, Alberts MJ, Goto S, Smith SC, Wilson PWF, Watson KE, Steg PG, on behalf of the REACH Registry Investigators: Ethnic differences in the prevalence and treatment of cardiovascular risk factors in US outpatients with peripheral arterial disease: Insights from the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Am Heart J* 158:1038-45, 2009

6. Uchiyama S, Goto S, Matsumoto M, Nagai R, Origasa H, Yamazaki T, Shigematsu H, Shimada

- K, Yamada N, Bhatt DL, Steg PG, Ikeda Y; on behalf of the REACH Registry Investigators. Cardiovascular event rates in patients with cerebrovascular disease and atherothrombosis at other vascular locations: Results from 1-year outcomes in the Japanese REACH Registry. *J Neurol Sci.* in press, 2009
7. Serebruany V, Rao S, Silva MA, Donovan JL, Kannan AO, Makarov L, Goto S, and Atar D. Correlation of inhibition of platelet aggregation after clopidogrel with post discharge bleeding events: assessment by different bleeding classifications. *Eur Heart J* 31(2): 227-235, 2010
 8. Alberts MJ, Bhatt DL, Mas JL, Ohman EM, Hirsch AT, Rother J, Salette G, Goto S, Smith SC, Liau CS, Wilson PWF, Steg PG for the REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry Investigators. Three-year follow-up and event rates in the international REduction of Atherothrombosis for Continued Health Registry. *European Heart Journal.* 30(19):2318-2326, (2009)
 9. Uchiyama S, Demaerschalk BM, Goto S, Shinohara Y, Gotoh F, Stone WM, Money SR, Kwon SU: Stroke Prevention by Cilostazol in Patients with Atherothrombosis; Meta-analysis of Placebo-controlled Randomized Trials, *Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases* 18(6):482-490, Nov. 2009
 10. Goto S, Yamaguchi T, Ikeda Y, Kato K, Yamaguchi Y, Jensen P. Safety and Exploratory Efficacy of the Novel Thrombin Receptor (PAR-1) Antagonist SCH 530348 for Non-ST Segment Elevation Acute Coronary Syndrome. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17(2):156-164, 2010
 11. Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H and Goto S. Imaging of Structural Changes in Endothelial Cells and Thrombus Formation at the Site of FeCl₃-Induced Injuries in Mice Cremasteric Arteries. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 16(6):807-814 (2009)
 12. Uchiyama S, Shibata Y, Hirabayashi T, Mihara B, Hamashige N, Kitagawa K, Goto S, Origasa H, Shimada K, Kobayashi H, Isozaki M, Ikeda Y for the J-TRACE investigators. Risk factor profiles of stroke, myocardial infarction, and atrial fibrillation: A Japanese multicenter cooperative registry. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, in press (2009)
 13. Aichner FT, Topakian R, Alberts MJ, Bhatt DL, Haring HP, Hill MD, Montalescot G, Goto S, Touzé E, Mas JL, Steg PG, Röther J; REACH Registry Investigators. High cardiovascular event rates in patients with asymptomatic carotid stenosis: the REACH Registry. *Eur J Neurol.* 16(8):902-8, 2009
 14. Tamura N, Kitajima I, Kawamura Y, Toda E, Eguchi Y, Ishida H, Goto S: Important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombi formed under arterial blood flow conditions, *Circulation Journal* 73:540-548, 2009
 15. Moriguchi-Goto S, Yamashita A, Tamura N, Soejima K, Takahashi M, Nakagaki T, Goto S, Asada Y. ADAMTS-13 attenuates thrombus formation on type I collagen surface and disrupted plaques under flow conditions. *Atherosclerosis* 203:409-16, 2009
 16. Cacoub, T, Abola MT, Baumgartner I, Bhatt DL, Creager MA, Liau CS, Goto S, Röther J, Steg PG, Hirsch AT, on behalf of the REACH Investigators Cardiovascular risk factor control and outcomes in peripheral artery disease patients in the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *Atherosclerosis*, 204: 1879-1484, 2009
- (総説、著書など)
1. Angiolillo DJ, Capodanno D, and Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *European Heart J*, 31(1):17-28, 2010
 2. Goto S and Toda E. Antiplatelet therapy after coronary intervention in Asia and Japan. *Hamostaseologie*, 29(4):321-325. 2009 (2009)
 3. Serebruany VL and Goto S. Clopidogrel and proton pump inhibitors: Gastric protection at expense of vascular benefit? *Thrombosis and Haemostasis* (Editorial) 101: 607-9, 2009
 3. Goto S, Bhatt DL, Steg PG. Response to Atrial Fibrillation and Atherothrombosis: The importance of anticoagulation by Escobar C and Barrios B. *Am Heart J* online (March 2009)
- G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含む)
該当なし

H12-(ADP)小胞体の安全性評価 (血液凝固系、生化学検査)

分担研究者 村田 満 (慶應義塾大学 医学部 臨床検査医学, 教授)

研究要旨

血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性評価を行うことを目的として、血液凝固系などの臨床検査値への影響を検討してきた。平成 20 年度は、H12-(ADP)小胞体を抗がん剤投与後の血小板減少症モデルのラットやウサギに投与し、ルーチンの血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値に異常は見られなかったことを明らかにした。そこで、平成 21 年度は、同様の観点から H12-(ADP)小胞体の臨床検査値への影響を、血小板数の正常な健康ラットで検討した。止血機能を発揮する標準量 (40 mg/kg) やその 2 倍量の過剰の H12-(ADP)小胞体を投与し、1 週間後(30 分、1 日、2 日、4 日、7 日)までの血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値を測定した。その結果、一番危惧されていた血小板の活性化を示唆する血球数や凝固系検査や、肝機能や腎機能検査に意味のある変動はみられなかった。一方、脂質関連検査値 (コレステロール、リン脂質、LDL コレステロール) は、小胞体の血中濃度を反映して、一過性に、その投与量依存性に増加し、一方、脾臓と肝臓での臓器内含量も、脾臓優位に一過性の上昇を示した。止血機構や臓器機能が健全な動物においても、ルーチンの臨床検査値に及ぼす H12-(ADP)小胞体の影響は、血小板減少動物と同様であったことから、当該ナノ粒子の安全性への危惧を示唆する証拠は得られなかった。

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。

平成 20 年度は、血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性評価を行うことを目的とし、H12-(ADP)小胞体を血小板減少症モデルラット、ウサギに投与しても、血

球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値に異常は見られなかったことから、血液適合性の観点から安全性の高いナノ粒子であることを明らかにした。

平成 21 年度は、同様の観点から H12-(ADP)小胞体を正常ラットに投与し (40 mg/kg)、1 週間後(30 分、1 日、2 日、4 日、7 日)までの血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値、正常ラットの臓器内 (脾臓・肝臓) 脂質検査 や H12-(ADP)小胞体・(ADP)小胞体を正常ラットに過剰投与 (40 mg/kg, 80mg/kg)した時の影響に注目し、H12-(ADP)小胞体が正常ラットにおいて

も安全性の高いナノ粒子であることを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 正常ラットへの投与後 数日間の影響

血球数変動、血液凝固検査、血液生化学的検査 方法

Wistar 系雄性ラット(三協ラボ, 8 週齢, 230-280 g, [PLT] = $8.1 \pm 0.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$)にセボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体(早大 武岡真司先生より供与)を尾静脈から投与した(4 mg/kg)。また、陰性対照群として生理食塩水を投与した。投与 1 週間後(30 分、1 日、2 日、4 日、7 日)まで各グループ (N=5) の血球測定や凝固検査・生化学検査・臓器内脂質検査を行った。

血球測定装置(K-4500, Sysmex)にて各血球を測定した。

3.13 %クエン酸ナトリウム入真空採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液凝固検査用の血漿を回収した。プロトロンビン時間(PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), フィブリノーゲン抗原量(Fbg), の 3 項目を測定した(SRL に委託)。

他方、血清分離剤入採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液生化学的検査用の血清を回収した。一般生化学の項目 アルブミン(ALB)、総コレステロール(TC)、リン脂質、アラニン・アミノトランスフェラーゼ(ALT)、クレアチニン(Cr) の 7 項目と脂質の項目 高密度リポ蛋白質(HDL)、低密度リポ蛋白質(LDL)、トリグリセリド(TG)、遊離型コレステロール、エステル型コレステロール、エステル型コレステロールの 6 項目を測定した(SRL に委託)。

2. 正常ラットへの投与後 数日間の影響

臓器内脂質検査 方法

心臓から全採血(犠牲死)後の Wistar 系雄性ラットから脾臓・肝臓を摘出し重量を測定しメノウ乳鉢にて生理食塩水を 1 ml 添加しながらホモジナイズ(氷冷中)を施し -60°C にて保存した。総重量と測定したホモジナイズ量から組織中の総コレステロール・HDL・LDL・カイロミクロン(理論値)の 4 項目を算出・測定した。(組織化学研究所に委託)

3. 正常ラットへの投与量の影響

血液凝固検査、血液生化学的検査 方法

Wistar 系雄性ラット(三協ラボ, 8 週齢, 230-280 g, [PLT] = $8.1 \pm 0.8 \times 10^5 / \mu\text{L}$)にセボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体・(ADP)小胞体(早大 武岡真司先生より供与)を尾静脈から投与した(40 mg/kg, 80mg/kg)。また、陰性対照群として生理食塩水を投与した。投与 1 日後に血球測定や凝固検査・生化学検査を行った。

研究方法 1. 正常ラットへの投与後 数日間の影響 と同様の操作・方法で血液凝固検査と血液生化学検査を測定した(SRL に委託)。

C. 研究結果及び考察

1. H12-(ADP)小胞体の物性

H12-(ADP)小胞体は、早大 武岡真司先生より提供された。以下にその物性を示す (Table 1, 2)。

Table 1 Lipid components of H12-(ADP)vesicles.

components	Molar ratio
DPPC ¹⁾	5
Cholesterol	5
DHSG ²⁾	1
PEG-DSPE ³⁾	0.03
H12-PEG-Glu2C18	0.03

1) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine

2) 1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate

3) 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[monomethoxy] poly(ethylene glycol) (5000)

Table 2 Characterization of H12-(ADP)vesicles.

sample name	H12-(ADP)vesicles
diameter (nm)	280 ± 70
lipid concentration (mg/mL)	10
Encapsulated ADP (mM)	1
LPS (EU/mL)	<0.2

2. 血球数測定

正常ラットに H12-(ADP)小胞体 (40 mg/kg)を投与し、投与後 1 週間までの各グループ(0日：未投与、30分、1日、2日、4日、7日) (N=5) の血球数を測定した(Fig. 1-1)。

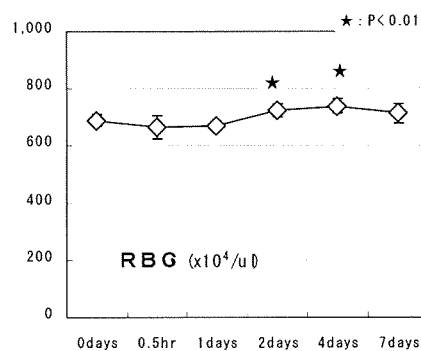
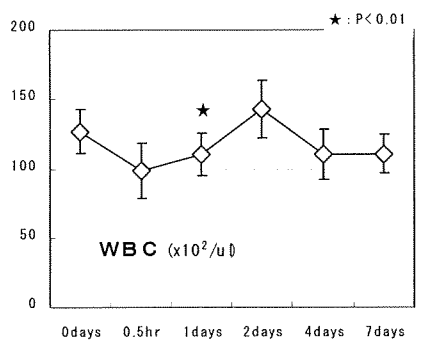
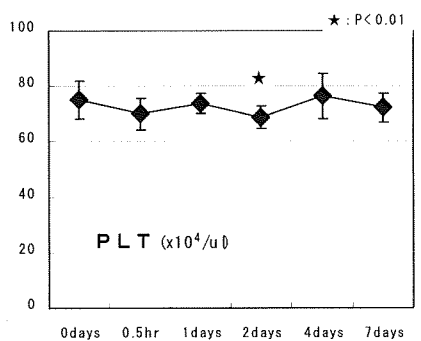


Fig. 1-1 Blood counts 0.5hr & 1, 2, 4 and 7days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats (N=5 平均±標準偏差). ★P<0.01

各時点での血球数は、多少の変動がみられ、未投与群に比較して一部では統計学的な有意差みられたが、変動幅は微量で、かつ一過性であることから、臨床的に意義のある変動とは考えられなかった。さらに、通常の2倍量 (80 mg/kg) の過剰な小胞体を投与しても、1 日後の血小板数の有意な変動は観察できなかった(Fig. 3-1)。

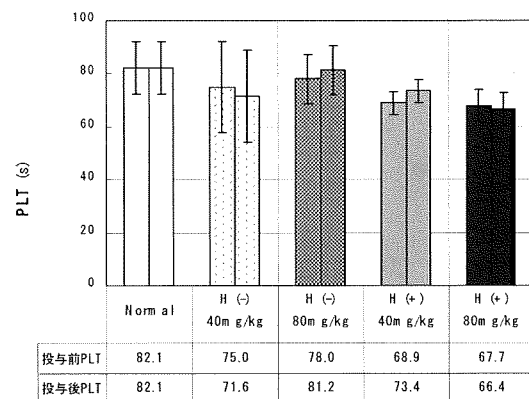
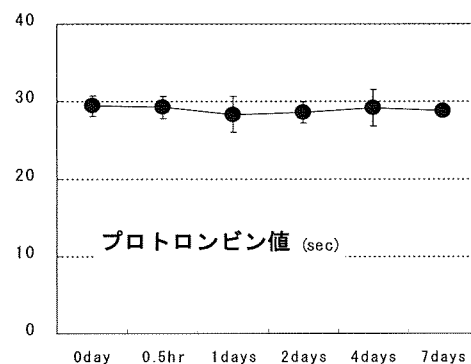


Fig. 3-1 Platelet count 0days & 24days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats (N=5 平均±標準偏差).

今後、サンプル数を増やして検討すべきである。

3. 血液凝固検査

正常ラットに H12-(ADP)小胞体 (40 mg/kg)を投与し、1週間後まで(30分、30分、1日、2日、4日、7日) の各グループ (N=5) 血液凝固スクリーニング検査(PT, APTT, Fbg,の3項目)を行ったが、3項目とも、未投与群に比較して、有意な変動はなかった(Fig. 1-2)。



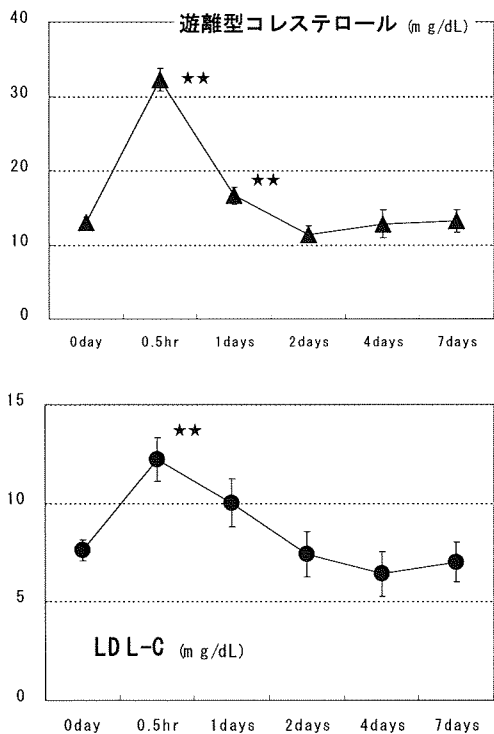


Fig. 1-2 Blood cholesterol parameters (PT: APTT: フィブリノーゲン) 0.5hr & 1, 2, 4 and 7days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats (N = 5 平均±標準偏差).

さらに、通常の2倍量 (80 mg/kg) の過剰な小胞体を投与したところ、3項目のうちフィブリノーゲンのみが、未投与群と比較して、測定値が有意に上昇した (Fig. 3-2)。

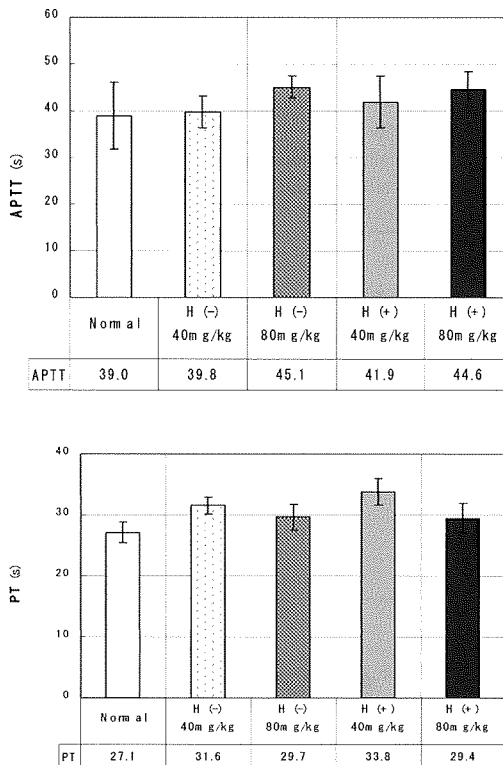
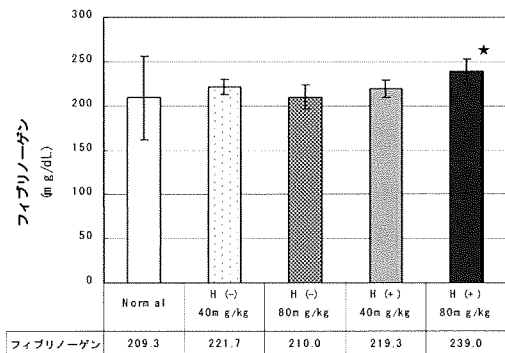
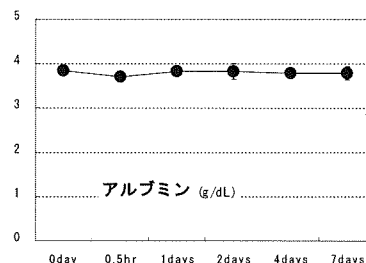


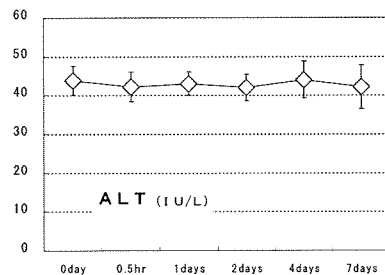
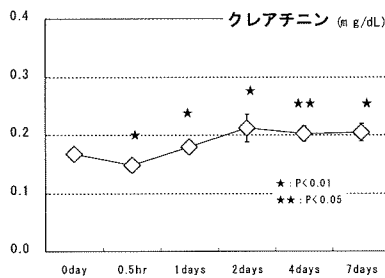
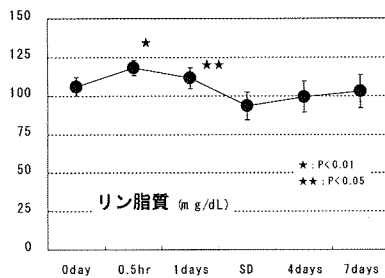
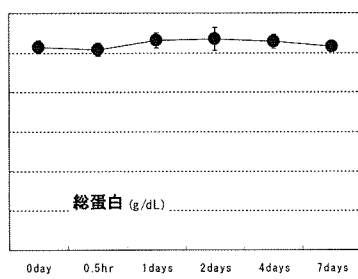
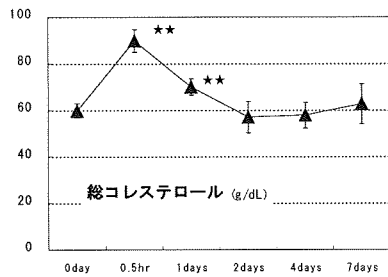
Fig. 3-2 Blood coagulation parameters (PT: APTT: フィブリノーゲン) 24hr after H12-(ADP)vesicles, (ADP)vesicles {40mg/kg, 80mg/kg} injection into the normal rats (N = 5-8 平均±標準偏差). ★P<0.01

しかし、小胞体の作用機序から考えて、この変動が臨床的に直接関連した意義のあるものとは考えられなかった。

4. 血液生化学的検査

正常ラットに H12-(ADP)小胞体 (40 mg/kg)を投与し、1週間後まで (30分、30分、1日、2日、4日、7日)の各グループ (N = 5)の血清生化学検査 (総蛋白、アルブミン、総コレステロール、リン酸、クレアチニン、ALT の6項目)を行った (Fig. 1-3)。





その結果、総コレステロールとリン脂質が、投与 0.5 時間群で最大となり、その上昇は 1 日目まで有意に持続した。これらの脂質成分は小胞体膜の主な構成成分であることから、その増加は血液中に停留した小胞体濃度を直接反映した値であると考えられた。実際、脂質関連検査をさらに検討したところ、LDL コレステロール、遊離型コレステロールとエステル型コレステロール値の増加が互いに同期して測定されたが、HDL コレステロールとトリグリセライドは有意な変動を示さなかった。そして、2 倍量の過剰投与でもたらされる質関連検査値の 24 時間後の変動は、標準量投与後の変動と類似のパターンを示し、その変動幅は投与量依存性であることが、確認された (Fig. 3-3、3-4)。

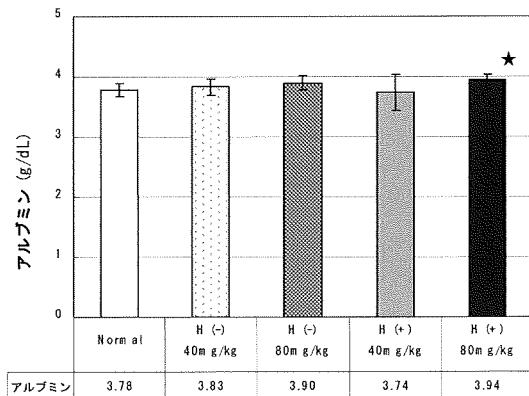
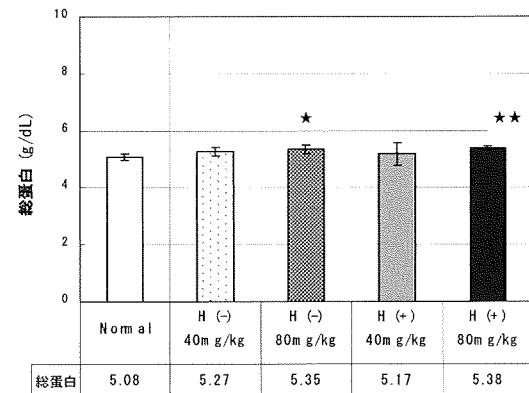


Fig. 1-3 Biochemical blood parameters(総蛋白: アルブミン: 総コレステロール: リン酸: クレアチニン: ALT) 0.5hr & 1, 2, 4 and 7days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats(N = 5 平均±標準偏差). ★P<0.01, ★★P<0.05

{40mg/kg, 80mg/kg} injection into the normal rats(N = 5~8 平均±標準偏差). ★P<0.01, ★★P<0.05

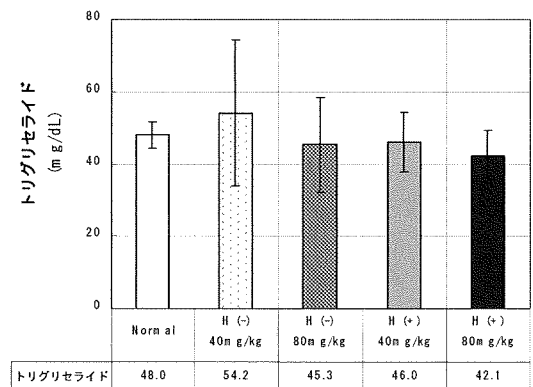
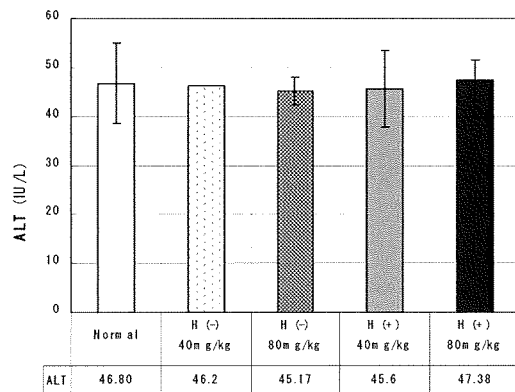
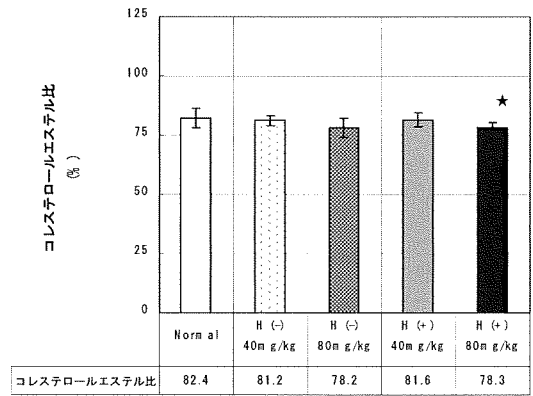
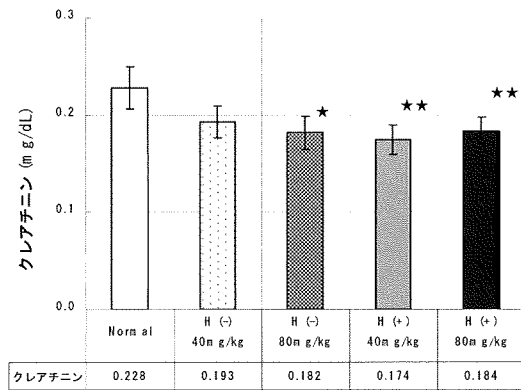
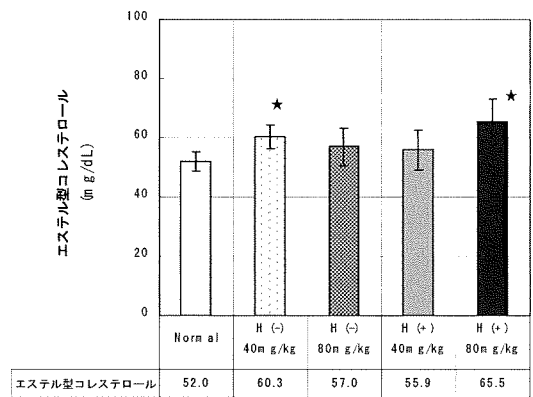
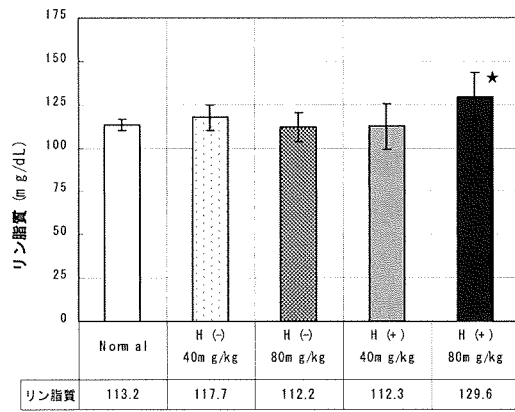
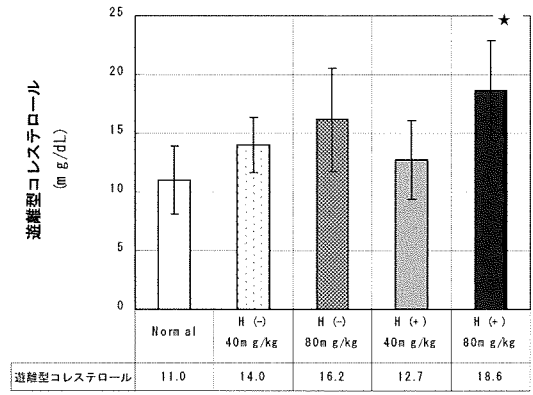
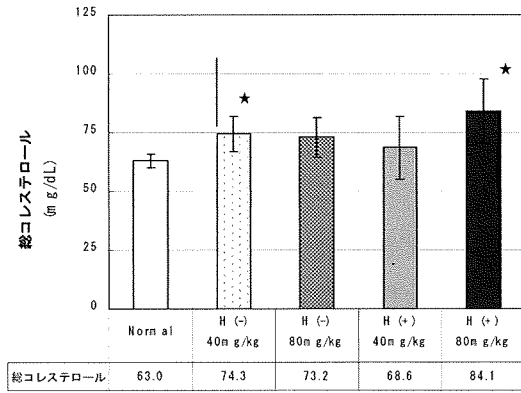


Fig. 3-3 Biochemical blood parameters(総蛋白: アルブミン; 総コレステロール; リン酸: クレアチニン; ALT) 24hr after H12-(ADP)vesicles, (ADP)vesicles

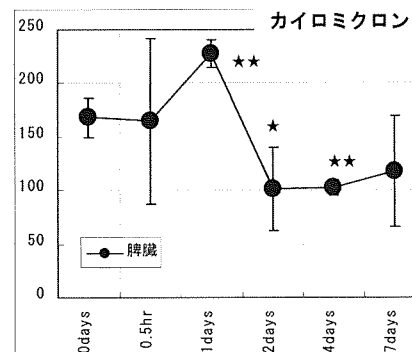
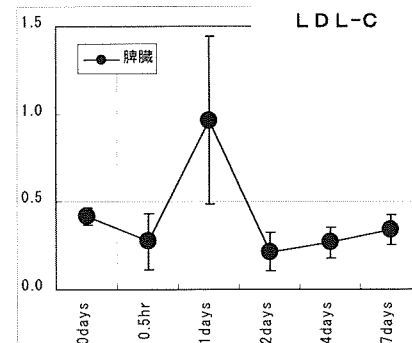
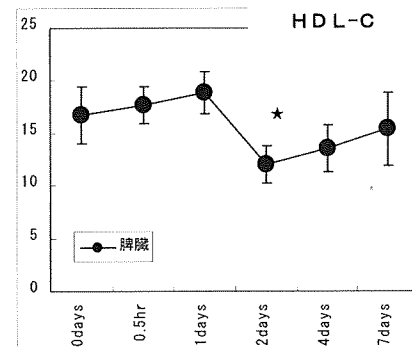
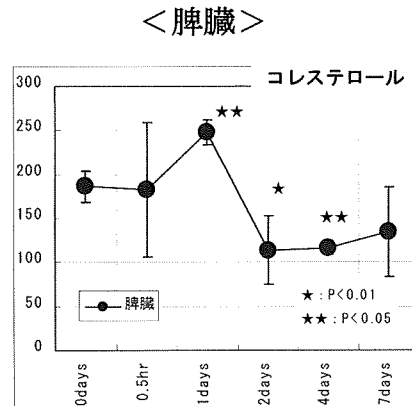
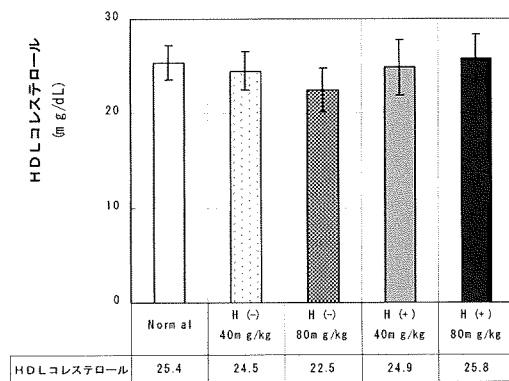
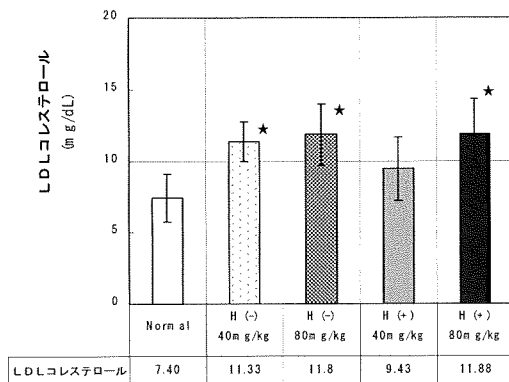


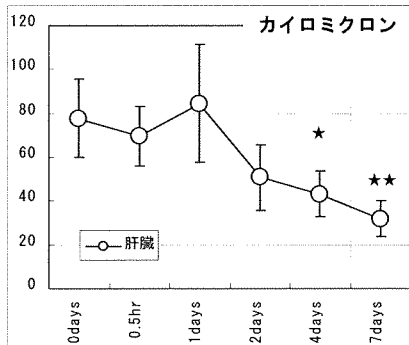
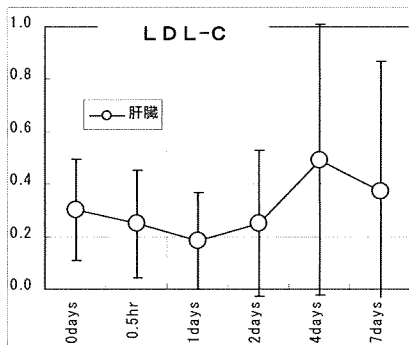
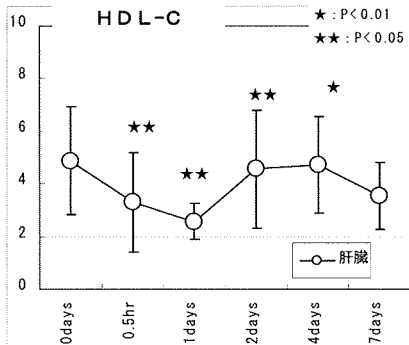
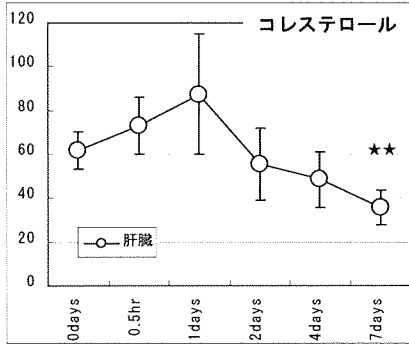
Fig. 3-4 Biochemical blood parameters(HDL: LDL: TG: トリグリサライド: 遊離型コレステロール: エステル比コレステロール: エステル型コレステロール) 24hr after H12-(ADP)vesicles, (ADP)vesicles {40mg/kg, 80mg/kg} injection into the normal rats(N=5~8 平均±標準偏差). ★P<0.01

さらに、ALT、アルブミンと総蛋白に変動はなかったものの、クレアチニンが、0.5時間以降 168 時間まで、有意に上昇した。しかし、2倍量の過剰投与では、むしろクレアチニンは 24 時間後に減少したことから、この変動が直接腎障害を示唆するものではない可能性が指摘できた(Fig. 3-3)。

5. 臓器内脂質検査

正常ラットに H12-(ADP)小胞体(40 mg/kg)を投与し、1週間後まで(30分、1日、2日、4日、7日)各グループ(N=5)の臓器内脂質検査(総コレステロール、HDL、LDL、カイロミクロンの4項目)を行った(Fig. 2)。

<肝臓>



<血清>

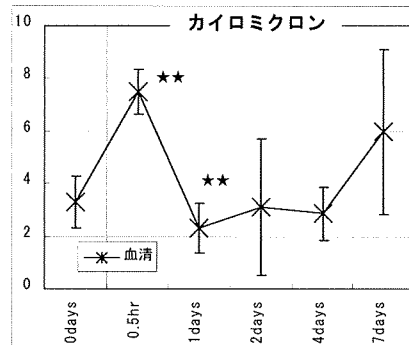
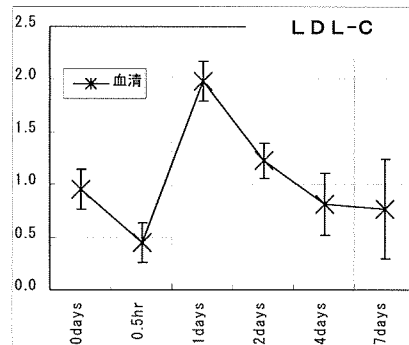
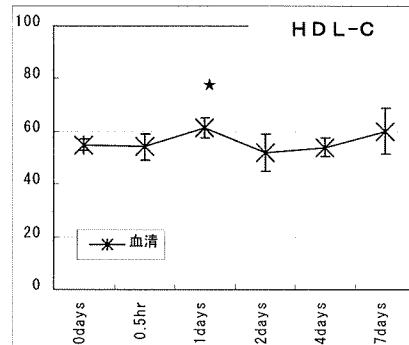
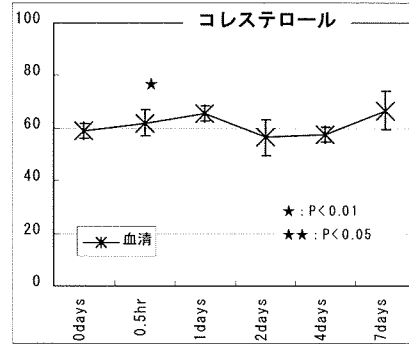


Fig. 2 Biochemical blood, Spleen & Liver parameters(コレステロール :HDL: LDL: カイロミクロン) 0.5hr & 1, 2, 4 and 7days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats(N = 5 平均±標準偏差).
★P<0.01, ★★P<0.05

肝臓と脾臓でのコレステロール含量は上昇傾向が見られ1日後には減少する傾向がみられ7日目では正常ラットと比較すると減少していた。そして、その上昇幅は、肝臓より脾臓で顕著であることから、アイソトープ標識した小胞体の網内系での代謝が主に脾臓で行われることと合致した結果であった。さらに、脾臓と血清中のLDLとカイロミクロンは、1日目で上昇傾向を示したのに対して、肝臓では一旦減少し4日目には上昇した。小胞体の主な構成成分である脂質の代謝経路を反映した検査値の変動であることが確認された。

D. 結論

H12-(ADP)小胞体を正常ラットに一定量投与しても、脂質関連検査を除いて、血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値に問題となるほどの異常は見られなかったことから、血液適合性の観点から安全性の高いナノ粒子であることを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

・Naomi Ito, Hideo Wada, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Mitsuru Murata, Takashi Izuno, Minoru Sugita Yasuo Ikeda: National questionnaire survey of TMA. **Int J Hematol.** 2009 Oct;90(3):328-35. Epub 2009 Sep 18.

・ Junko Ishikawa, Hiromi Okada, Hisao Kato, Satoshi Takeshita, Shigenori Honda, Tomio Kawasaki, Etsuji Suehisa, Hajime Tsuji, Seiji

Madoiwa, Yoichi Sakata, Tetsuhito Kojima, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Yoshihiro Kokubo, Tomonori Okamura, Hitonobu Tomoike and Toshiyuki Miyata: Association of Asn221Ser mutation in tissue factor pathway inhibitor - β with plasma total tissue factor pathway inhibitor level. **Blood coagulation and Fibrinolysis** 2009, Vol20 No1 22-26

・ Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378: 716-720, 2009

・ Fujimura Y., Matsumoto M., Kokame K., Isonishi A., Soejima K., Akiyama N., Tomiyama J., Natori K., Kuranishi Y., Imamura Y., Inoue N., Higasa S., Seike M., Kozuka T., Hara M., Wada H., Murata M., Ikeda Y., Miyata T., and George JN.: Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of foetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *British Journal of Haematology*, 144(5): 742-754, 2009

・ Homma K, Hida M, Ikeda K, Yamaga N, Murata M, Hasegawa T : Measurement of Serum 17 α -hydroxyprogesterone in Newborn Infants by Stable Dilution- Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Clinical Pediatric Endocrinology.** 2009;18(3),77-80.

・ 宗慶太郎、小峰梨沙、酒井宏水、小林絃一、槌田英俊、村田 満 : ヘモグロビン小

胞体を含む血液検体の臨床検査-デキストラン添加による干渉作用の回避- 人工血液 Vol.17 No.1 6-15 2009

・矢作かおり、村田 満：偽性血小板減少症 最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC63 血小板減少症・増加症第6章トピックス 215-221 最新医学社 2009年7月

・村田 満：動脈硬化/炎症と血小板 **Mystery of Platelet 第1回**：血小板の発見から血栓形成機序の解明へ **Therapesearch** Vol.30 No.6 P841 2009年7月

・村田 満：動脈硬化/炎症と血小板 **Mystery of Platelet 第2回**：生活習慣病と血小板 **Therapesearch** Vol.30 No.6 P1051 2009年7月

・猪狩敦子、村田 満：<抗血栓療法モニター>抗血小板療法のPOCT(Point of care testing) 臨床検査 今の特集血栓症と臨床検査 第53巻第10号 1175-1179 2009年10月

・村田 満：急性冠症候群治療の発展を支えた抗血小板薬 **Mystery of Platelet 第3回**：急性冠症候群と血小板 **Therapesearch** Vol.30 No.10 1525-1534 2009年10月

・村田 満、Catherine P. Hayward: 対談 Standardization of platelet function testing 血小板機能検査の標準化 **International Review of Thrombosis** 2009;Vol.4 No4 9-27

2. 学会発表

・Kimihito Matsumoto, Yumiko Matsubara, Haruhiko Hoshino, Kenji Yokoyama, Gentaro Watanabe, Toshiro Shibano, Norihiro Suzuki, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata. An Inhibitory

Role of Platelet CD109 in Platelet Function.第22回 国際血栓止血学会 2009年7月 アメリカ (ボストン)

・Kenzaburo Yamaji, Yumiko Matsubara, Haruhiko Hoshino, Norihiro Suzuki, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata. Effect of Aspirin Administration on GPIb α Shedding: Association of Glycocalicin Level with Platelet Sensitivity to Aspirin 第22回 国際血栓止血学会 2009年7月 アメリカ (ボストン)

・Mayumi Ono, Yumiko Matsubara, Toshiro Shibano, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata. GSK-3 β Negatively Regulates Thrombopoiesis in an *in vitro* Normal Human CD34-positive Cell-derived Differentiation System 第22回 国際血栓止血学会 2009年7月 アメリカ (ボストン)

・Koyama Y, Homma K, Miwa M, Ikeda K, Muroya K, Murata M, Hasegawa T: Urinary Free Steroids in Newborn Infants with 21-Hydroxylase Deficiency using stable Isotope Dilution Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. **LWPES/ESPE 8th Joint Meeting**. 2009 アメリカ (ニューヨーク)

・Koyama Yuhei, Homma Keiko, Fukami Maki, Horikawa Reiko, Miwa Masayuki, Ikeda Kazushige, Murata Mitsuru, Ogata Tsutomu, Hasegawa Tomonobu: Discrimination P450 oxidoreductase deficiency from classical 21-hydroxylase deficiency in Japanese infants using urinary 11 β -hydroxyandrosterone by gas chromatography / mass spectrometry. 14th International Congress of Endocrinology. March. 2010 Kyoto

・猪狩敦子、森木隆典、山口雄亮、中川央充、村田 満：液相静止条件下のVWFに結合するADAMTS13 アミノ酸エピトープ配

列 第 10 回日本検査血液学会学術集会

平成 21 年 7 月 山梨

・坂ノ上容子、松原由美子、星野晴彦、芝野俊郎、鈴木則宏、池田康夫、村田 満：

血小板機能の簡易モニタリング開発機器

PEF-100 を用いた日本人における血小板機能

評価の検討 第 56 回日本臨床検査医学

会学術集会 平成 21 年 8 月札幌

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 21 年度「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」
『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）』

分担研究報告書

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

分担研究者 鈴木 英紀 (東京都臨床医学総合研究所・研究員)

研究要旨: フィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合させ、さらに ADP を内包させた H12(ADP)リポソームは、ADP による血小板凝集を促進させることを報告してきた。今回、内包 ADP の凝集に対する効果を明らかにするために、PRP に生食、コントロールリポソーム、H12 または H12(ADP)リポソームを添加し、次いで低濃度コラーゲンを加えて惹起される血小板凝集に対する各リポソームの効果を比較検討した。同時に、凝集形態およびリポソームの分布についても電子顕微鏡で観察した。その結果、生食、コントロールまたは H12 リポソームを加えた PRP では、低濃度コラーゲン (0.2 $\mu\text{g/ml}$) 添加後、15~25%の透過度の上昇を示すに過ぎなかったが、H12(ADP)リポソーム添加 PRP のそれは約 40%の透過度の上昇が観察された。電顕観察では、H12(ADP)リポソーム添加 PRP のコラーゲン凝集は他のものに比べて大きな凝集塊が形成され、さらに抗 H12 抗体を使う免疫電顕法では、本リポソームは凝集塊の血小板間に存在した。これらの結果から、内包された ADP は凝集局所でリポソームから漏れ出ることによって凝集をさらに増強すると考えられた。

A. 研究目的

これまで ADP を内包させた H12 リポソーム(H12(ADP)リポソーム)は、ヒト多血小板血漿(PRP)の ADP 凝集を促進させることを報告してきた。すなわち、本リポソームはその表面に標識された H12 によって血小板のフィブリノゲン受容体(GPIIb/IIIa)に結合し、血小板相互を架橋することによって凝集をまず促進させ、次いで内包する ADP が凝集塊中で漏れ出ることによって凝集をさらに増強させると考えられる。ところで、凝集がほとんど惹起されない低濃度の ADP またはコラーゲンを添加された血小板に、最初に添加した逆の低濃度コラーゲンまたは ADP を追加して添加すると、その相乗効果が出現してある程度の凝集を示すことが知られている。今回、内包する ADP の凝集に対する関与をさらに明らかにするために、ヒト PRP に H12 未結合のコントロールリポソーム、H12 または H12(ADP)リポソームを

あらかじめ加え、さらに低濃度コラーゲンを添加し、惹起される凝集を凝集計で比較、検討した。さらに、その凝集形態を超薄切片法で、リポソームの分布については抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で検討した。

B. 研究方法

1) 低濃度コラーゲン血小板凝集能の検討

健康成人から 3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として血液を採血し、これを遠心して多血小板血漿 (PRP)および貧血小板血漿 (PPP)を得て、血小板数を 2×10^5 個/ μl に調整した。血小板凝集計を使い、PRP に低濃度コラーゲン (0.1~0.5 $\mu\text{g/ml}$)を加え、生じる凝集曲線を観察した。次いで、この低濃度コラーゲン凝集時における H12(ADP)リポソームの効果を明らかにするために、ヒト PRP にあらかじめ生食、H12 非結合のコントロールリポソーム(最終濃度 2 mg/ml)、H12 リポソーム(同)、または

H12(ADP)リポソーム (同)を加え、1分後にさらに0.1~0.2 $\mu\text{g/ml}$ のコラーゲンを添加し、生じる凝集曲線を観察した。

2) 低濃度コラーゲン凝集の形態観察

前記 1) の低濃度コラーゲンで惹起される凝集および H12(ADP)リポソーム等を前もって加え、さらに低濃度コラーゲンを加えて惹起される凝集のピーク時に、0.1Mリン酸緩衝0.4%グルタルアルデヒド液 (pH7.4)を凝集計のキュベット内に等量加えて凝集反応を停止させた。これをエッペンドルフ遠心管に移し、3,000 rpm で1分間遠心し、得たペレットを4°Cで静置してさらに30分間固定した。これらの試料は0.1Mリン酸緩液で洗浄後、同液緩衝1%四酸化オスミウム後固定、エタノール系列で脱水、Epon 812に包埋し、熱重合した。試料のブロックから超マイクロトームを使って超薄切片を得て、グリッドメッシュに回収し、これを酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色後、透過型電顕で観察した。

3) 低濃度コラーゲン血小板凝集時におけるH12(ADP)リポソームの分布 (免疫電顕法)

H12またはH12(ADP)リポソームをあらかじめ加えた試料について、抗H12抗体を使う免疫電顕法を実施し、これらリポソームの凝集塊中における分布を検討した。すなわち、上記2)で得た固定血小板ペレットをPBSで5回洗浄し、1Mショ糖液中で1時間、さらに2.3Mショ糖液中にオーバーナイトで浸漬した。この試料を凍結用試料ピンに載せて液体窒素中で凍結後、凍結超マイクロトームを使って超薄切片を作製した。切片は0.5%BSAで15分間ブロッキング後、家兎抗H12抗体で4°C、オーバーナイトでインキュベートし、PBSで水洗後、さらに15nmのコロイド金標識ヤギ抗ウサギIgGで室温、1時間インキュベートした。以下、Tokuyasu法に従って酢酸ウラニルで電子染色し、透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

1) 低濃度コラーゲン血小板凝集能の検討

ヒトPRPに0.1~1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のコラーゲンを添加すると、0.1~0.5 $\mu\text{g/ml}$ の間で濃

度依存性の凝集が見られた(図1A)。0.1 $\mu\text{g/ml}$ のコラーゲン添加では透光度の上昇はわずかであったが、コラーゲン濃度の増加に伴って透光度は上昇し、0.5 $\mu\text{g/ml}$ のコラーゲンでほぼ平衡に達した。

0.1 $\mu\text{g/ml}$ コラーゲンをPRPに添加し、さらに2分後に単独ではほとんど凝集が起きない0.1 μM ADPを加えると、約30%以上の透光度の上昇が見られた(図1B)。0.1 μM ADPをPRPに先に加え、2分後に0.1 $\mu\text{g/ml}$ コラーゲンの添加をした場合でも、同様な相乗効果による明らかな凝集が出現した。

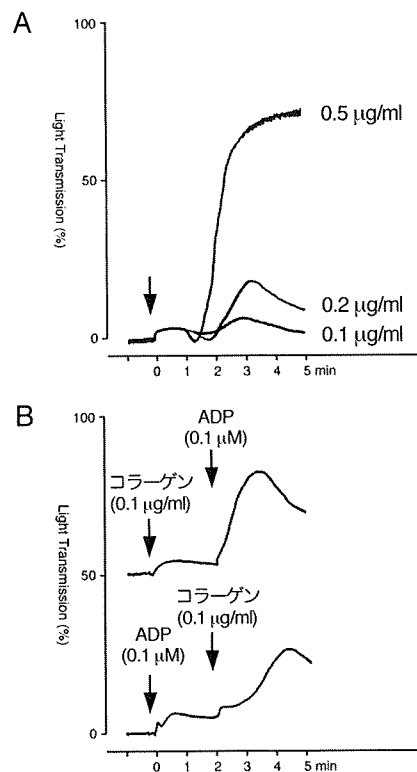


図1. ヒトPRPに対する低濃度コラーゲン凝集
A) 0.1~0.5 $\mu\text{g/ml}$ のコラーゲン添加で濃度依存性の凝集が見られる。

B) コラーゲン0.1 $\mu\text{g/ml}$ またはADP0.1 μM では凝集がほとんど見られないが、同濃度のADPまたはコラーゲンを追加すると、相乗効果が出現して明瞭な凝集が生じる。

PRPにあらかじめ生食、H12非結合のコントロールリポソーム、およびH12リポソームを加え、さらに1分後に0.2 $\mu\text{g/ml}$ コラーゲンを添加すると、15~25%の透過度の上昇が見られた(図2)。一方、H12(ADP)リポソームでは、約40%の上昇を示し、生食、コントロー

ルまたは H12 リポソームとは異なる大きな凝集能を示した。

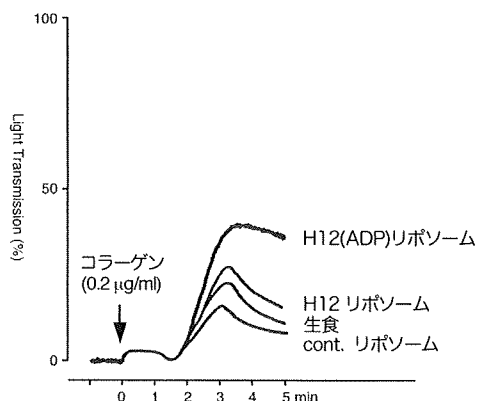


図2. 各種リポソームを添加したPRPに対する低濃度コラーゲン(0.2 µg/ml) 凝集

生食、H12非結合のコントロールリポソーム、およびH12リポソームを加えたPRPでは、わずかに15~25%の透過度の上昇しか見られないが、H12(ADP)リポソームでは約40%の透光度上昇が見られる。

2) 低濃度コラーゲン凝集の形態観察

図1Aで示した低濃度コラーゲンに反応したPRPの血小板形態を電顕観察した(図3)。

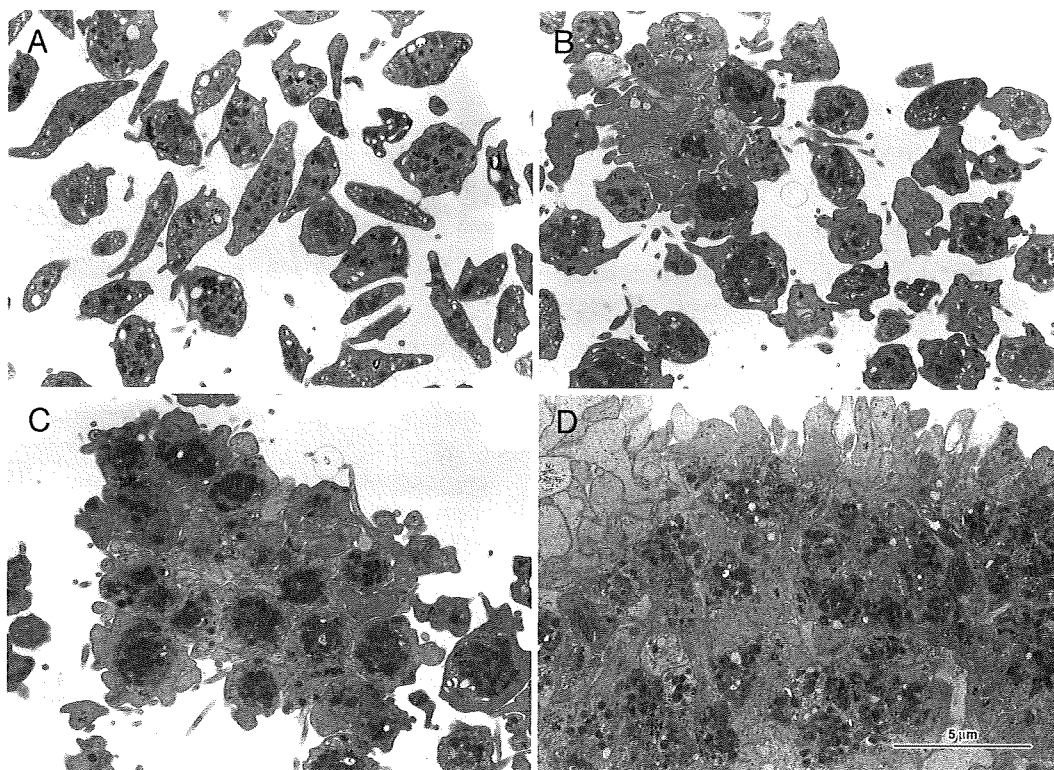


図3. 低濃度コラーゲン添加3分の血小板の電顕像

A) コラーゲン添加前のPRP。わずかに形態変化している血小板も見られるが、凝集は起こしていない。B) 0.1 µg/mlのコラーゲン添加。血小板は形態変化を起し、極小凝集塊がわずかに存在している。C) 0.2 µg/mlのコラーゲン添加。変形した単独血小板が少なくなり、小凝集塊が形成されている。D) 0.5 µg/mlのコラーゲン添加。大凝集塊が形成され、辺縁部では顆粒の放出像が観察される。

コラーゲン添加前のPRPでは、わずかに形態変化している血小板も見られたが、凝集は起こしていなかった(図3A)。0.1 µg/mlコラーゲン添加時は、ほとんどの血小板は形態変化を起していた。また、変形し単独に存在している血小板の間に極小凝集塊が部分的に存在した(図3B)。0.2 µg/mlコラーゲン添加時は、変形した単独血小板が少なくなり、明らかな凝集塊が形成された(図3C)。0.5 µg/mlコラーゲン添加時は、大凝集塊が形成され、辺縁部では顆粒の放出像が観察された(図3D)。

次いで、図2で示した生食、コントロールリポソーム、H12およびH12(ADP)リポソームを前もってPRPに加え、さらに0.2 µg/mlコラーゲンを添加した血小板を電顕観察した(図4)。生食、コントロールリポソームおよびH12リポソーム添加時は、明らかな凝集塊の形成が見られたが、これらはほとんど同サイズの凝集塊であった(図4A-C)。一方、H12(ADP)リポソーム添加時は、比較的大きな凝集塊が形成された(図4D)。