

膜組成の異なるリポソームの調製と機能評価

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 新井 愛美 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)

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)

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-リポソームは、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)リポソームは、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 22 年度は、さらなる止血能を有する H12-リポソームの創製を目指し、リポソームの膜組成の性質に着目した検討を行った。従来のリポソーム (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.033/0.033(モル比))よりも負電荷脂質である DHSG の含量を増やしたリポソーム組成 (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比))の検討を行った。このリポソームを用いて血小板との結合能評価を行ったところ、従来の組成に比べて顕著に活性化血小板との結合能が高まることが明らかとなった。さらに血小板凝集能評価を行ったところ、H12 未結合リポソームにおいても血小板の二次凝集促進効果が認められた。

A. 研究目的

リポソーム表面の 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)リポソームは、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。現在までに、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場合に顕著な止血能が確認されている^{1),2)}。

平成 22 年度は、さらなる止血能を有する H12-リポソームの設計と構築を目指して、リポソームの膜由来の性質に着目した検討を行った。リポソームの機能評価として、フローサイトメーターを用いた血小板との結合能評価、及び血小板凝集計を用いた凝集の評価を行った。

- 1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
 2) 平成 18, 19, 20 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 g, 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. 膜組成の異なるリポソームの構築

2.1. 膜組成の異なるリポソームの調製

混合脂質 (Table 1) を PBS (pH 7.4) 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リポソームを調製し (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-リポソーム (a), (b) 及び H12 未結合リポソーム (a'), (b') を得た。なお、平成 18 年度に確立した H12-(ADP) リポソームは (a') に示す組成からなるものである。

Table 1 Lipid components of various liposomes.

liposome	(a)	(a')	(b)	(b')
DPPE	5	5	5	5
Cholesterol	5	5	5	5
DHSG	1	1	5	5
PEG-DSPE	0.033	0.033	0.045	0.045
H12-PEG-Glu2C18	-	0.033	-	0.045

2.2. リポソームの粒径及び電位測定

各リポソーム (a), (a'), (b), (b') を [lipid]_{fc} = 0.05 mM になるよう PBS (pH 7.4) にて希釈し、N4PLUS (BECKMAN COULTER 社製) にて粒径を、Zetasizer Nano (Sysmex 社製) にて電位を測定した。

3. フローサイトメーターを用いたリポソ

ームの血小板との結合能評価

洗浄血小板 ([PLT]= $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$, $5\mu\text{L}$)に DiOC18 標識した各リポソーム(a), (b), (a'), (b') (f.c. 0.03 mg/ml)を混合し、PAR-4 agonist (f.c. 1 mM)にて血小板を活性化させて振とう(37°C , 10 min)し、ホルムアルデヒド(f.c. 2.0%)で固定した。フローサイトメーターを用いて血小板の蛍光陽性強度を測定した。

4. 血小板凝集計を用いたリポソームの血小板凝集能評価

PRP ([PLT]= $2.0 \times 10^5/\mu\text{L}$)に各リポソーム(f.c. 0.05 mg/ml)を添加、攪拌後、ADP (f.c. 2.5 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。

C. 研究結果及び考察

1. 各リポソームの物性評価

各リポソームの粒径を測定したところ、250 nm 前後に制御されたほぼ同一の粒径に制御できた(Table 2)。次いで、 ζ 電位を測定したところ、負電荷脂質 DHSG 含量を増やしたリポソームでは、負電荷の増加により ζ 電位は負に増加していた。

Table 2 Properties of various liposomes.

liposome	diameter (nm)	z-potential (mV)
(a)	249 ± 79	-12.6 ± 1.4
(a')	242 ± 52	-8.4 ± 1.1
(b)	267 ± 109	-17.4 ± 1.2
(b')	244 ± 45	-15.9 ± 2.3

2. フローサイトメーターを用いたリポソームと血小板との結合能評価

各リポソームと血小板との結合能を評価したところ、PBS を添加しただけの活性化していない血小板へのリポソームの結合は

見られなかった(Figure 1)。一方、PAR-4 agonist である TRAP にて活性化した血小板に対しては、H12-結合リポソーム(a'), (b')の結合が見られ、負電荷脂質 DHSG の含量を増やしたリポソーム(b')は、従来のリポソーム(a')の約7倍の結合能を示した。また、H12 未結合のリポソームにおいても約4倍の結合能を示した。このことから、負電荷脂質 DHSG の含量を増やすことで、活性化血小板との結合能が高まり、血小板代替物としての機能が高まる可能性が示唆された。

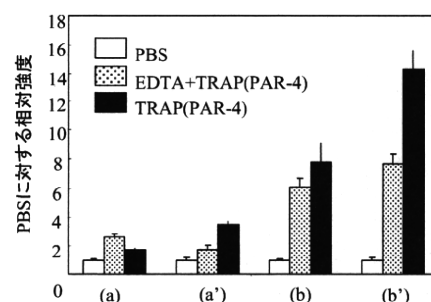


Figure 1 Binding abilities of various liposomes toward the PAR-4 agonist-stimulated platelets.

3. 各リポソームの血小板凝集促進能評価

PRP ([PLT] = $2.0 \times 10^5/\mu\text{L}$)に H12-未結合リポソーム(a)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 20%であった。(Figure 2)。一方、H12-リポソーム(a')を添加した場合、その透過率は約 30%に増加した。次に、負電荷脂質 DHSG の含量を増やしたリポソーム(b), (b')にて検討したところ、(b')の方が(b)よりも上回っていたものの透過率は大幅に増大し、 T_{\max} は約 70%に達した。これは、フローサイトメーターの結果を支持しており、今後 *in vivo* による止血能評価試験を行い、従来のリポソームとの効果を比較する計画である。

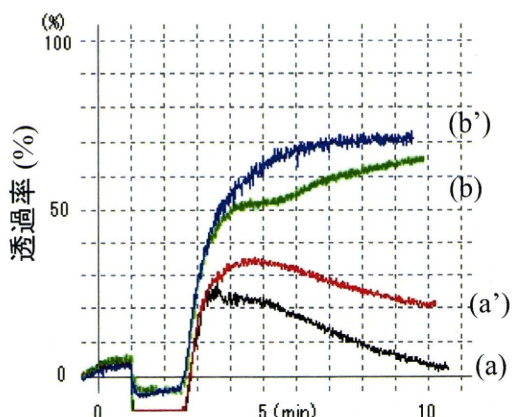


Figure 2 ADP-induced platelet aggregation in the presence of various liposomes.

D. 結論

(1)より止血能の高い H12-(ADP)リポソームの創製を目指し、従来の H12-(ADP)リポソームよりも負電荷脂質である DHSG 含量を増やしたりポソームを構築した。

(2) この高 DHSG 含量 H12-(ADP)リポソームは、従来の H12-(ADP)リポソームよりも活性化血小板に対する結合能が顕著に高まり、血小板凝集促進効果が見られた。

(3) 今後は高 DHSG 含量 H12-(ADP)リポソームを用いて *in vivo* による止血能評価試験を行い、従来の H12-(ADP)リポソームと比較する計画である。

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, 148, 373-379 (2010).

(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*, 6, 391-396 (2010).

2. 学会発表

(1) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 鈴木 英紀, 渡邊 直英, 池田 康夫, 武岡 真司, 半田 誠. 「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ADP放出特性とその止血能評価」 第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4., 鹿児島).

(2) 武岡 真司. 「アミノ酸型脂質からなる pH 応答性リポソームとナノ医療としての可能性開」 第 17 回日本血液代替物学会年次大会 (2010.10., 熊本)

(3) 新井 愛美, 岡村陽介, 勝野峻介, 渡邊直英, 半田誠, 池田康夫, 武岡真司. 「止血能を有する血小板代替物としてのリポソーム組成の検討」 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11., 広島).

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

外傷性大量出血時の急性易出血性病態に対する H12(ADP)リポゾームの止血制御効果

- 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す、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。昨年度はまず、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。本年度は、この家兎の急性血小板減少モデルを用いて、肝臓に外傷性臓器損傷による臓器出血モデルを作製し、H12(ADP)リポゾーム投与による臓器出血に対する止血制御効果を検討した。

家兎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し、外科的な血管損傷による出血と輸血を念頭に置いた急性の血小板減少状態をまず作製した。本モデルでは、血圧など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 $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ にまで低下し、耳介出血時間でも 20 分以上と著しく延長することが確認された(正常約 2 分)。また、ソノクロットで解析した血栓形成能も、1

次血栓(血小板血栓)および2次血栓(フィブリン血栓)の形成能共に強く阻害されていた。このような血小板減少家兔に開腹後、肝臓に直径5mmの円柱状の組織欠損を加えると同部位からの出血により死に至り、致死的な外傷性出血モデルであることが確認された。本モデルにおいて、肝臓の外傷性臓器出血を作製する前にH12(ADP)リポゾームを投与し、これが出血時間や肝臓の臓器出血に及ぼす効果を、血小板を多く含むplatelet-rich plasma (PRP)や凝固因子は含むが血小板成分をほとんど含まないplatelet-poor plasma (PPP)の投与と比較検討した。その結果、耳介出血時間に関してはH12(ADP)リポゾーム投与によりPRP投与と同様に、PPP投与に比し明らかな出血時間の短縮を認めた。また、肝臓からの臓器出血作製後の予後もH12(ADP)リポゾーム投与群ではPRP投与群と同様に全例救命出来たが、PPP投与群ではほとんどが死に至った。予後と一致して肝臓からの臓器出血量もH12(ADP)リポゾーム投与群ではPRP投与群と同様にPPP投与群に比して有意な減少が認められ、また臓器出血時間も明らかに短縮した。さらにソノクロットでみた血栓形成能も、H12(ADP)リポゾーム投与群ではPRP投与群と同様にPPP投与群に比して、1次血栓(血小板血栓)や2次血栓(フィブリン血栓)の形成能が共に著しく改善していた。このように、外傷性の急性血小板減少病態時の肝臓からの臓器出血に対してH12(ADP)リポゾームの投与は顕著な止血改善および救命効果が実験的に確認された。また、fibrinogen γ 鎖C末端(H12)を担持しない形のADPリポゾームを投与したが、H12(ADP)リポゾームの投与でみられたような顕著な止血制御効果は認められず、fibrinogen γ 鎖C末端(H12)が止血制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

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、現在その供給状況は必ずしも十分とは言い難く、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代替物の開発が急務である。救急医療の現場では、時に血小板の輸血のみが唯一の命を繋ぐ救命手段となることも現実に起こり得ると考える。とくに大規模な震災等では大量出血を伴う多発外傷患者の同時大量発生が容易に

想像できる。このような非常事態では輸血用血小板が、例えこれが唯一の救命手段であっても、全く入手出来ない事態が広範囲において発生すると考えられる。

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を研究することである。昨年度は、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モデルを家兎において作製した。今年度は、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した。

B. 研究方法

1. 実験動物

NZW ウサギ（日本 SLC, 1.8-2.0 kg）を用いて実験を行った。

2. 急性血小板減少モデルの作製

2.1. 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、脱血用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、薬物投与用とした。

2.2. 脱血および洗浄赤血球輸血

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 (5% albumin) を投与した。脱血した血液を用

いて、2.3. に示すように PRP 成分と PPP 成分を分離した後、残った赤血球成分より洗浄赤血球を作製した。続いて、25mL の脱血を大腿動脈より同様にを行い、さらに作製した洗浄赤血球を Lactated Ringer (5% albumin) で 25mL に調整した後、静脈内投与を行った。以後、この脱血と洗浄赤血球輸血操作を計 7 回繰り返し、最後は 8 回目の脱血血液から作製した洗浄赤血球の輸血のみを行った。これにより計 8 回の脱血(合計 200mL)とこれら脱血検体より得られた赤血球成分の返却(洗浄赤血球輸血)が行われたことになる(Fig. 1)。

2.3. 洗浄赤血球および platelet-rich

plasma (PRP)、platelet-poor plasma (PPP) の採取と作製

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、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)、洗浄赤血球として用いた(Fig. 2)。

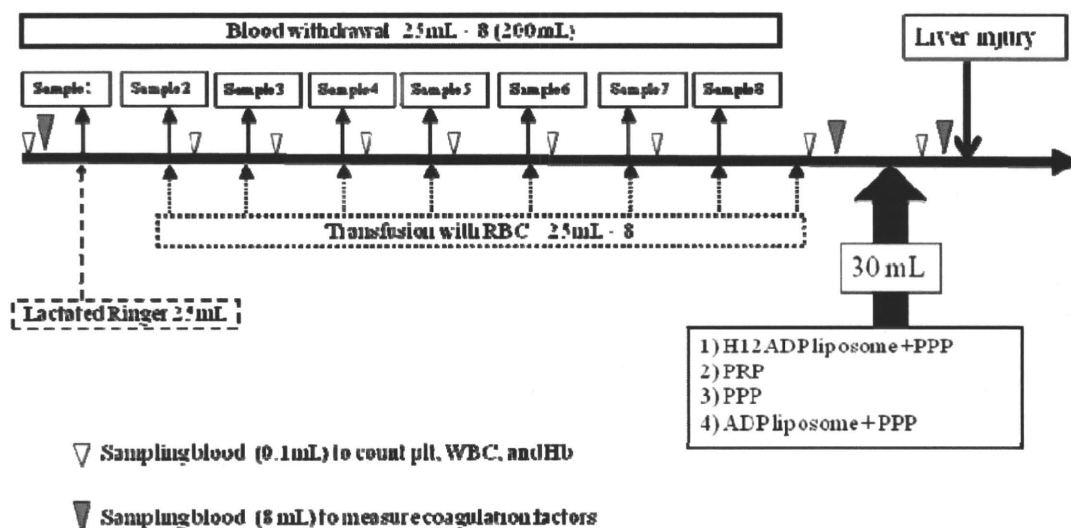


Fig. 1. Experimental design of blood withdrawal and transfusion and following H12(ADP) liposome administration

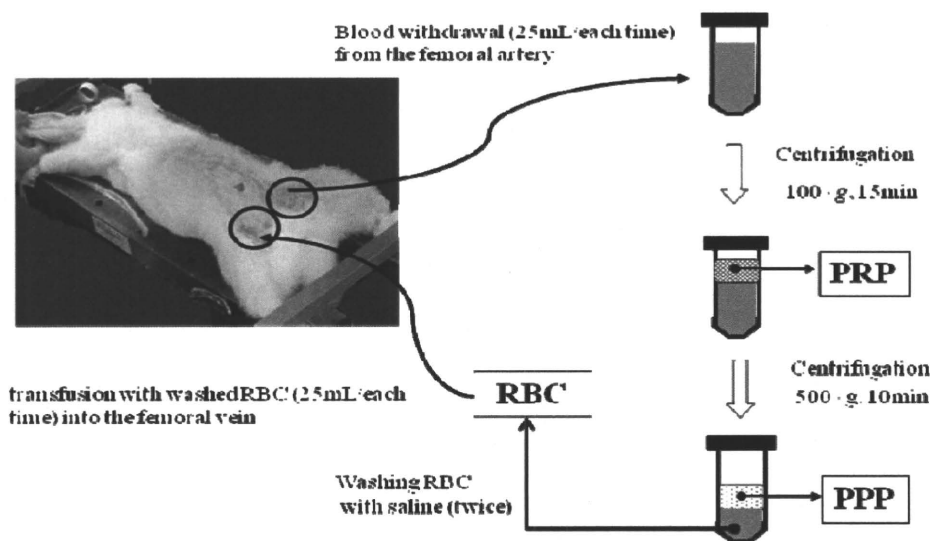


Fig. 2. Collection of PRP, PPP, and washed RBC

3. H12(ADP)リポゾームや PRP, PPP, ADP リポゾームの投与

計 200mL の脱血と等量の洗浄赤血球輸血が終了し、薬物投与前の耳介出血時間を測定した後に、H12(ADP)リポゾーム 8 mg/kg を PPP で 30 mL に溶解したもの、もしくは採取した PRP を 30 mL、PPP を 30 mL、H12

が付いていない ADP リポゾーム 8 mg/kg

(PPP で 30 mL に調整)を各々静脈内投与した。薬物投与後、さらに耳介出血時間測定や採血を行った後に開腹した。肝臓に Derma Punch で臓器損傷を作製し、臓器出血に対する薬物投与による止血制御効果を検討した。H12(ADP)リポゾーム投与群、PRP 投与群、PPP 投与群は各群 7 羽、ADP リポ

ゾーム投与群は4羽を用いて行った。

4. 測定項目

4.1. 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。

4.2. 血小板数、ヘモグロビン濃度、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、薬物投与前（8回目の洗浄赤血球輸血終了後）、各種薬物投与後に0.1 mL採血し、測定に供した。

4.3. 凝固因子の測定

同様に大腿動脈ルートより、脱血前、血液交換終了後（薬物投与前）、各種薬物投与終了後に8 mLを採血し、fibrinogenやProthrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), antithrombin III (AT III)などの各種凝固因子を測定した。

4.4. 耳介出血時間

脱血前と血液交換終了後（薬物投与前）、各種薬物投与後に、家兔の耳介に1cmの傷をメスで作製し、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。

4.5. ソノクロットによる血栓形成能

脱血前と血液交換終了後（薬物投与前）、各種薬物投与後に0.8 mL採血し、1次血栓（血小板血栓）および2次血栓（フィブリン血栓）の形成能をソノクロット（Sienco社、Morrison, CO）を用いて解析した。

4.6. 肝臓からの臓器損傷による出血

耳介出血時間測定後および各種採血後、開腹し肝臓に直径5mmのDerma punchを用いて組織損傷を作製した(Fig. 3)。

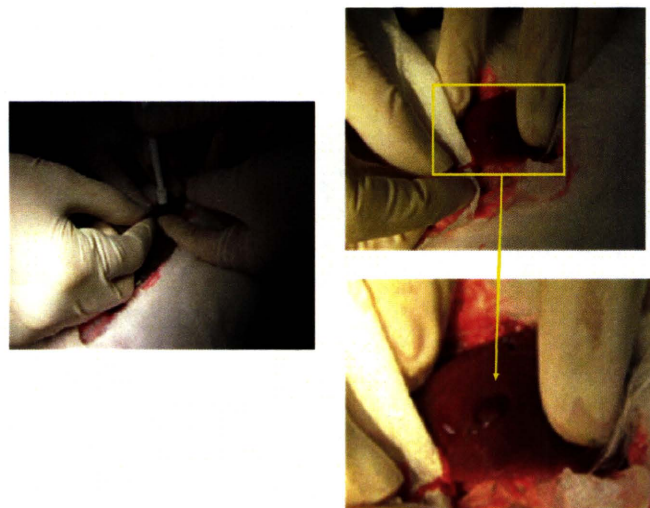


Fig. 3. Traumatic liver injury (hollowing out) using Derma punch

C. 研究結果

1. 血液交換中の各種パラメーターの推移

1.1. 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. 4A)。

1.2. 血小板数の推移

血小板数は脱血と洗浄赤血球輸血の反復により持続的に減少し、血液交換終了時には $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ にまで低下した(Fig. 4B)。

1.3. ヘモグロビン濃度、白血球数の推移

ヘモグロビン濃度は血液交換開始直後に低下したが、その後は8 g/dLとほぼ一定で推移した(Fig. 4C)。

白血球数も若干の増減を繰り返したが顕著な増減は認められず、血液交換終了時にはほぼ実験前値と同程度になっていた(Fig. 4D)。

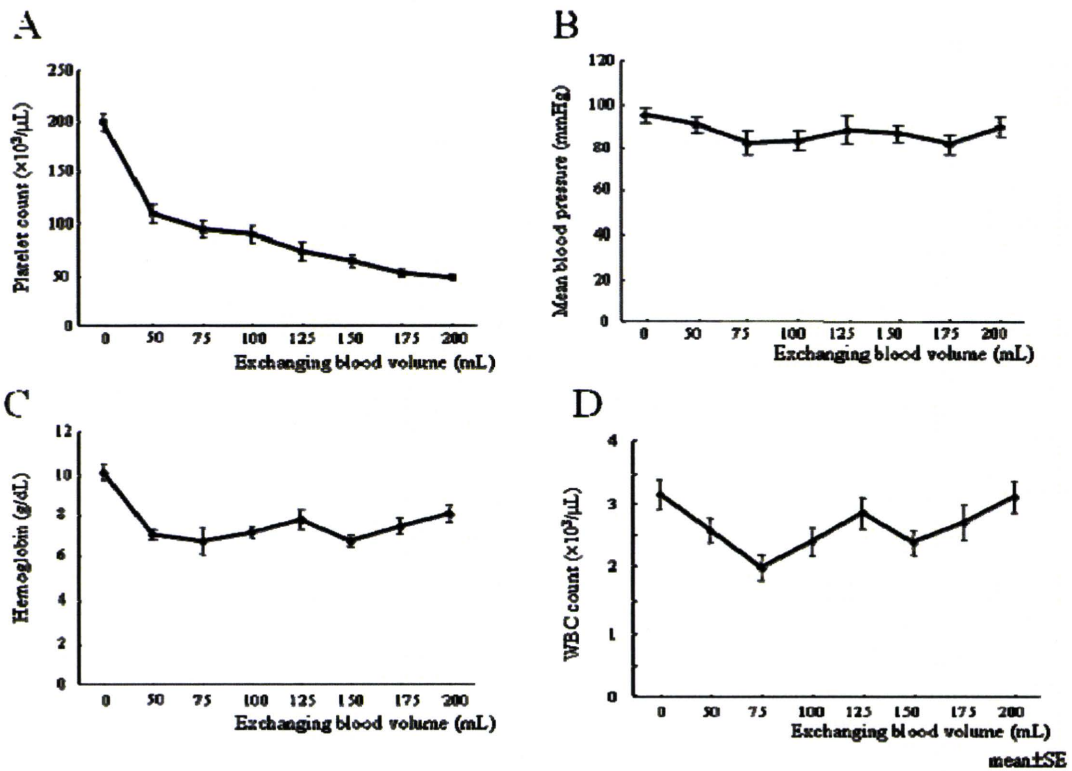


Fig. 4. Change of hematological parameters and blood pressure during blood withdrawal and fusion

1. 4. 凝固因子

血液交換終了後、脱血前に比し fibrinogen 値の明らかな低下や、PT、APTT 値の延長、AT III 値の低下が認められ (Table 1)、血液交換 (脱血と洗浄赤血球輸血) による凝固因子の喪失が示唆された。

1. 5. 耳介出血時間

耳介出血時間は脱血前に比し、血液交換終了後著しい延長を認めた (230 ± 7 vs 1193 ± 48 sec, $p < 0.01$)。

1. 6. 1 次血栓 (血小板血栓) および 2 次血栓 (フィブリン血栓) の形成能

脱血前の正常家兎血液を用いたソノクロット (Fig. 5 右下) による血栓形成能の解析であるが、1 次血栓 (血小板血栓) の形成能が active clotting time として、2 次血栓 (フィブリン血栓) の形成能が clot rate として表

わされる (Fig. 5)。血液交換終了後は Fig. 6 のように脱血前に比し active clotting time が極端に延長し (123 ± 6 vs 382 ± 41 sec, $p < 0.01$)、clot rate も顕著に低下していたことから (16.7 ± 1.3 vs 1.7 ± 0.2 clot signal/min, $p < 0.01$)、1 次血栓 (血小板血栓) 形成能と 2 次血栓 (フィブリン血栓) 形成能が共に著しく阻害されたことが示唆された。

Table 1. Changes of the coagulation factors by the blood exchange in rabbits

	Before blood exchange	After blood exchange	
Fibrinogen (mg/dL)	180 ± 8.4	51.6 ± 1.9	p: 0.01
Prothrombin time (sec)	9.7 ± 0.2	27.3 ± 2.2	p: 0.01
APTT (sec)	23.6 ± 1.5	37.7 ± 2.5	p: 0.01
ATIII (%)	120.7 ± 2.5	40.9 ± 2.4	p: 0.01

mean ± SE

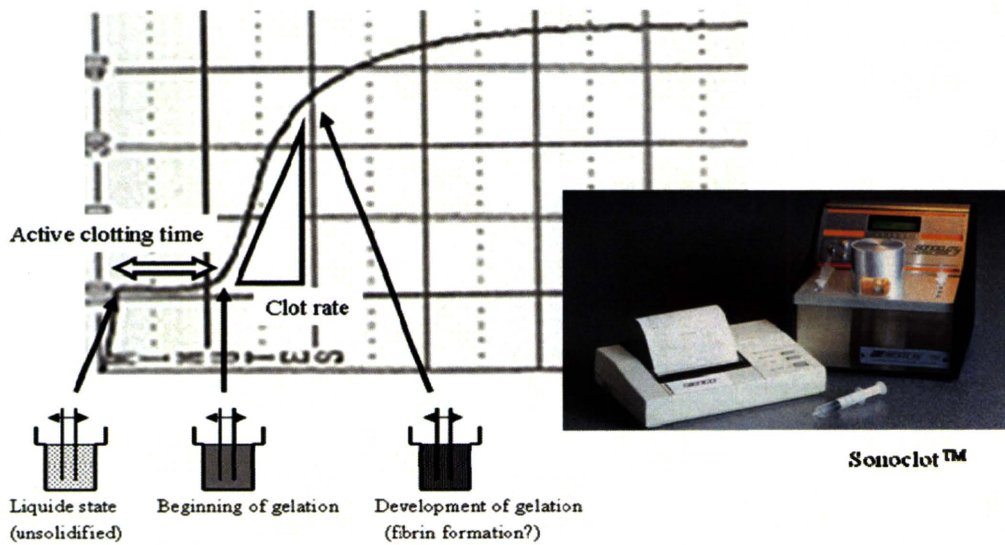


Fig. 5. Analyses of activating clotting time and clot rate using Sonoclot™

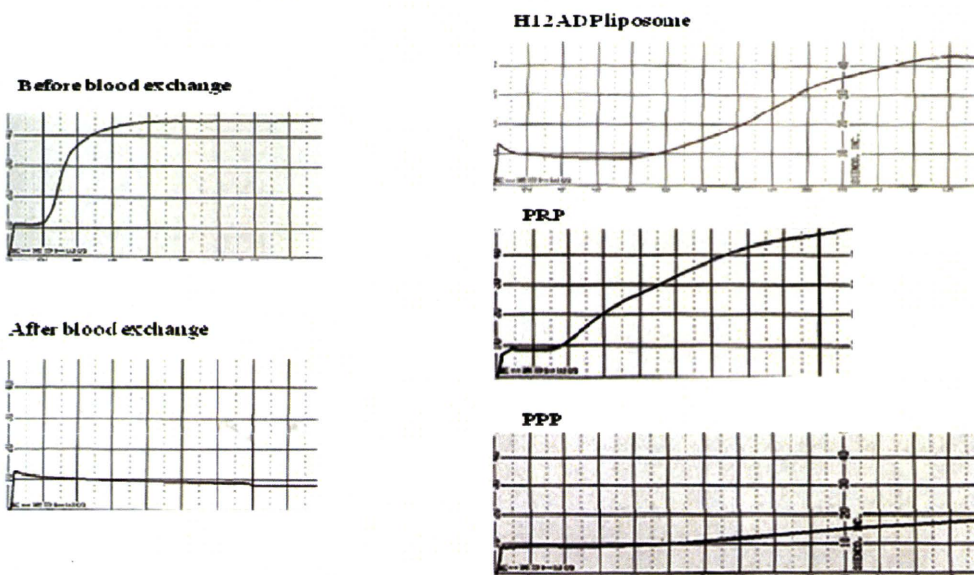


Fig. 6. Analyses of activating clotting time and clot rate in each group

2. H12(ADP)リポゾームや PRP、PPP、ADP リポゾームの投与が各種パラメーターに与える影響

2.1. 動脈圧やヘモグロビン濃度、血小板数、白血球数

動脈圧は H12(ADP)リポゾームはじめ各種薬剤の投与前後で顕著な差を認めなかった(Table 2)。ヘモグロビン濃度や白血球数も各種薬剤投与前後で顕著な差はなかった(Table 2)。血小板数は血小板成分を多く含んだ PRP の投与でのみ明らかな上昇を認めた。血小板成分を含んでいない H12(ADP)リポゾームや ADP リポゾーム、PPP の投与では上昇を認めなかった(Table 2)。

2.2. 各種凝固因子

H12(ADP)リポゾームはじめ各種薬剤投与により、fibrinogen 値の改善(上昇)を認めた (Table 3)。薬物投与前に延長していた Prothrombin time (PT)も、各種薬物投与により短縮、もしくは短縮傾向を認めた (Table 3)。APTT も各種薬物投与により短縮傾向を認め、AT III 値も増加を認めた(Table 3)。

2.2. 耳介出血時間

H12(ADP)リポゾームの投与により PRP 投与と同様に耳介出血時間の著しい短縮を認めたが、PPP や ADP リポゾームの投与では耳介出血時間は延長したままの状態改善を認めなかった(Fig. 7)。

3. H12(ADP)リポゾームの投与が肝損傷部からの臓器出血に与える影響

3. 1. 肝損傷部からの臓器出血後の予後

H12(ADP)リポゾームの投与により、PRP

投与と同様に全例を救命し得たが、PPP や ADP リポゾームの投与ではいずれも生存率が 20%以下に留まっていた(Fig. 8)。このように H12(ADP)リポゾーム投与群や PRP 投与群では PPP 投与群や ADP リポゾーム投与群に比し、明らかに生存率が改善していた (Fig. 8)。

Table 2. Changes of the blood pressure and hematological parameters

		H12ADPliposome	PRP	PPP	ADPliposome
Mean blood pressure (mmHg)	Before administration	90 ± 7	91 ± 7	89 ± 7	88 ± 4
	After administration	96 ± 10	98 ± 7	87 ± 8	90 ± 7
Hemoglobin (g/dL)	Before administration	8.3 ± 0.6	7.9 ± 0.5	8.6 ± 1.3	7.1 ± 0.4
	After administration	6.4 ± 0.5	6.2 ± 0.6	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.6
Platelet count (×10 ⁹ /μL)	Before administration	50 ± 5	50 ± 6	46 ± 7	47 ± 6
	After administration	47 ± 5	108 ± 12 ^{***}	42 ± 4	29 ± 5
WBC count (×10 ⁹ /μL)	Before administration	3.2 ± 0.1	3.5 ± 0.6	3.6 ± 0.3	1.3 ± 0.2
	After administration	3.3 ± 0.4	4.1 ± 0.8	4.0 ± 0.7	0.9 ± 0.1

***p<0.01 vs before administration mean±SE

Table 3. Changes of the coagulation factors

		H12ADPliposome	PRP	PPP	ADPliposome
Fibrinogen (mg/dL)	Before administration	50	52.6 ± 2.6	53.8 ± 2.6	50
	After administration	68.7 ± 5.7	79.0 ± 4.4 ^{***}	77.8 ± 6.5 ^{***}	50.2 ± 0.2
Prothrombin time (PT) (sec)	Before administration	34.2 ± 7.1	28.1 ± 5.5	24.8 ± 3.3	24.8 ± 1.6
	After administration	18.3 ± 1.5 [*]	18.2 ± 2.2	15.4 ± 1.3 ^{**}	21.6 ± 0.9
APTT (sec)	Before administration	34.2 ± 4.4	45.8 ± 5.3	40.4 ± 3.9	48.8 ± 16.1
	After administration	23.1 ± 3.8	35.9 ± 0.9	27.8 ± 3.9	42.7 ± 11.5
AT III (%)	Before administration	37.8 ± 4.0	44.6 ± 6.3	37.0 ± 4.2	44.0 ± 5.7
	After administration	52.0 ± 2.4 [*]	57.2 ± 2.3	52.6 ± 4.8 [*]	47.6 ± 5.7

***p<0.01, *p<0.05 vs before administration mean±SE

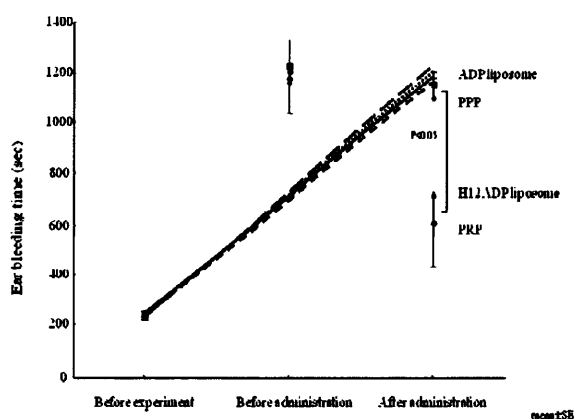


Fig. 7. Ear bleeding time

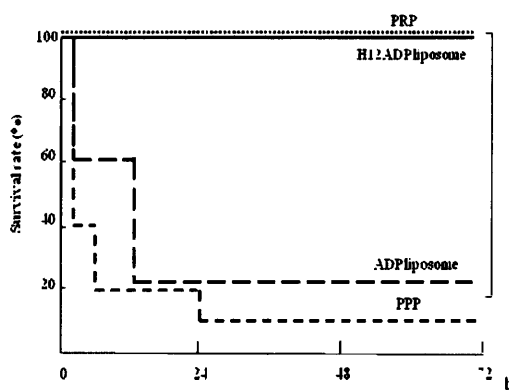


Fig. 8. Survival rates after traumatic hemorrhage from the liver

3.2. 肝損傷部からの臓器出血量

H12(ADP)リポゾーム投与群では肝臓からの臓器出血が PPP 投与群と比べて少なく、とくに肝損傷作製から 5 分以上経過した後、その止血効果が顕著になった(Fig. 9)。

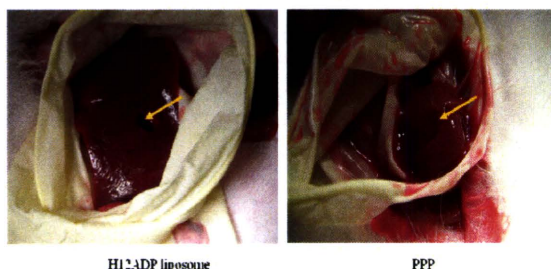


Fig. 9 Traumatic hemorrhage from hollowed out site in the liver using the Denna Punch

H12(ADP)リポゾーム投与群では、肝損傷作製から 5 分以内の初期の出血量は PPP 投与群より少ない傾向にあったものの血小板を多く含んだ PRP 投与群に比べるとやや多い傾向にあった。しかし、H12(ADP)リポゾーム投与群ではそれに続く 5 分間（損傷作製から 5~10 分後）の出血量は顕著に減少しており、PRP 投与群よりむしろ出血量が少ない傾向にあった(Fig. 10)。PRP 投与群は出血初期の 5 分間で既に出血量が少なかったが、その後の 5 分間では H12(ADP)リポゾーム投与群のような顕著な出血量の減少は認められなかった(Fig. 10)。凝固因子のみを含んだ PPP 投与群では初期の 5 分間、それに続く 5 分間のいずれでも、他群に比し出血量は多かった(Fig. 10)。ADP リポゾーム投与群は肝損傷初期の 5 分間では H12(ADP)リポゾーム投与群と同程度の出血量であったが、その後の 5 分間では出血量がむしろ増加する傾向にあった(Fig. 10)。

3.3. 肝損傷部からの臓器出血時間

H12(ADP)リポゾーム投与群では PRP 投

与群と同様に、PPP 投与群に比し肝臓からの出血量が明らかに減少していた(Fig. 11)。一方、ADP リポゾーム投与群では、出血量が PPP 投与群と同程度と抑制されていなかった(Fig. 11)。

4. H12(ADP)リポゾームの投与が血栓形成能に与える影響

各群の血栓形成能をソノクロットで解析した。H12(ADP)リポゾームの投与により PPP 投与群と比較して、1 次血栓(血小板血栓)の形成能の指標である active clotting time が有意に低値となり(Fig. 12A)、2 次血栓(フィブリン血栓)の形成能の指標である clot rate も有意に高値となった(Fig. 12B)。これは H12(ADP)リポゾームの投与により 1 次血栓(血小板血栓)の形成能、2 次血栓(フィブリン血栓)の形成能が共に改善したことを示唆している。PRP 投与群でも同様に PPP 投与群と比較して active clotting time の低値と clot ratio の高値が認められ、血栓形成能が改善したことが示唆された(Fig. 12 A, B)。一方、ADP リポゾームの投与では PPP 投与と同様に血栓形成能の改善は認められなかった(Fig. 12 A, B)。H12(ADP)リポゾームや PRP、PPP 投与後のソノクロット解析の典型例を Fig. 6 に示す。

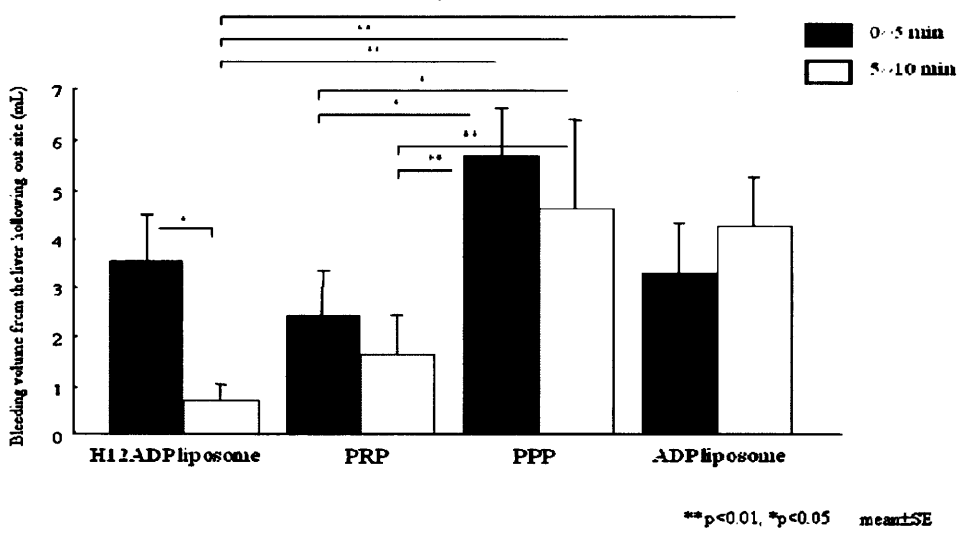


Fig. 10. Bleeding volume from the liver following out site

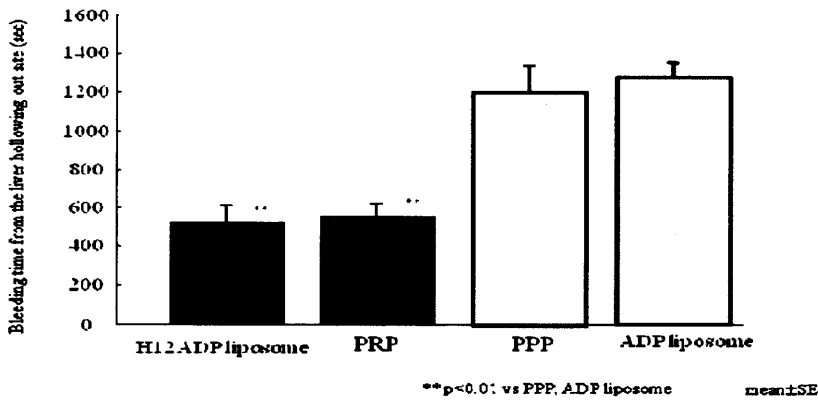


Fig. 11. Bleeding time from the liver following out site

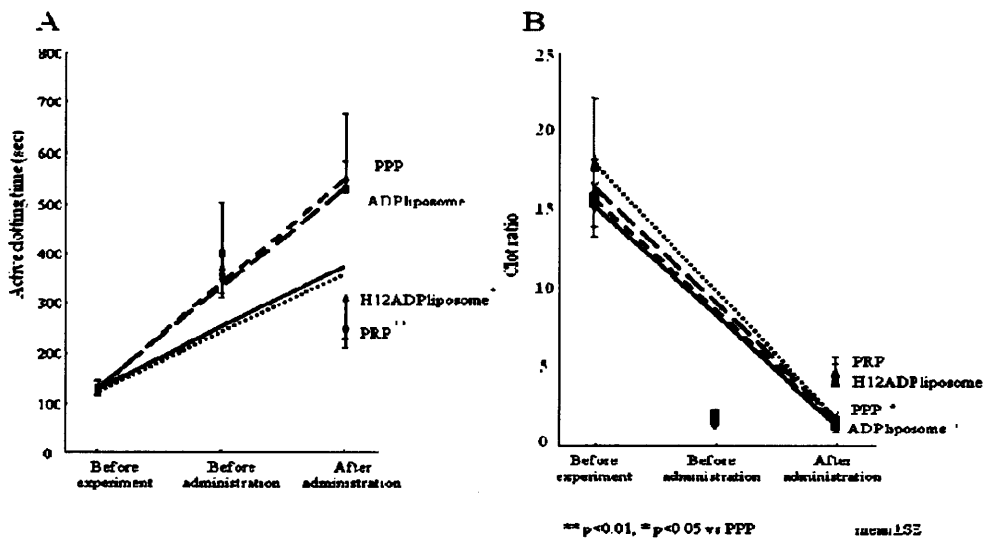


Fig. 12. Change of active clotting time and clot ratio

D. 考察

前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が、今年度はこのモデルを用いて H12(ADP)リポゾームの止血制御効果を血小板成分を多く含む PRP 投与群や血小板成分を含まない PPP 投与群と比較検討し、さらには fibrinogen γ 鎖 C 末端(H12)のついていない ADP リポゾームに関して止血効果を検討した。

まず、脱血と洗浄赤血球輸血により作製した家兎の急性血小板減少モデルにおいて、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検討する必要があった。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. 4B)。体重 1.8-2.0 kg の家兎の循環血液量にほぼ相当する 200mL の脱血と、脱血検体から得られた赤血球成分のみを返却輸血することにより、血小板のみが $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ と顕著に低下する一方で (Fig. 4A)、ヘモグロビン濃度は 8 g/dL に留まるモデルが作製出来た (Fig. 4C)。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懸念されたが、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排除することが出来た (Fig. 4D)。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、重度の急性易出血性病態が誘導出来たと考えられた (Fig. 7)。また、1次血栓(血小板血栓)の形成能を反映する active clotting time の顕著な延長や2次血栓(フィブリン血栓)の形成能を反映する clot rate の顕著な低下も認められ、血栓形成能の増悪が示唆された (Fig. 6, 12A, B)。しかし、本モデルでは凝固因子も血小板同様、著明に低下したことから (Table 1)、易出血性病態の発現には血小板低下のみならず、凝固因子の低下も関与していることが考えられた。そこで、H12(ADP)リポゾームや ADP リポゾームの投与時には凝固因子を含む PPP もあわせて投与した。

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、有効な血小板輸血が行われたと考えることが出来る。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多くの場合、新鮮凍結血漿の大量投与により、凝固成分の補充が通常は行われている。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たと考えられる。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。

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、肝臓に外傷性の臓器損傷を作製したところ、血小

板成分を含まない PPP の投与では臓器からの出血によりほとんどが死亡した（致死率 90%、Fig. 8）。これは PPP 投与によりある程度凝固因子を補充しても、血小板の補充がなければ止血制御が出来ず、救命出来なかったことを示唆させる。本モデルにおいて、PRP として血小板を輸血投与することで臓器出血が制御出来、また H12(ADP)リポゾームを投与することでも血小板輸血と同等の止血制御効果が得られたことは注目に値する。血小板を多く含む PRP や H12(ADP)リポゾームを補充することで、PPP を投与した時に比べ血小板血栓の形成能を反映する active clotting time が短縮したことは(Fig. 12A)、H12(ADP)リポゾームが血小板と同等な 1 次血栓形成能を有することを示唆させ、非常に興味深い。さらに、PPP 投与のように例え凝固因子を投与して fibrinogen や AT III 濃度を上げても、血小板がなければ 1 次血栓が形成されないため、引き続き起こる fibrin による 2 次血栓も形成されないことは、血小板減少時の止血制御を考える上で示唆に富む所見である。すなわち実際の臨床現場において、血小板低下を伴う易出血性病態を呈する症例に対し、いくら凝固因子を新鮮凍結血漿などで補充しても血小板を輸血しなければ効果的な止血制御が出来ないことを示唆させる。

H12(ADP)リポゾームによる止血効果が、急性血小板減少時の外傷性損傷による臓器からの出血に対しても認められ、さらに救命効果があったことは、臨床応用を考える上でも非常に意義深い。とくに、H12(ADP)

リポゾームの止血効果が出血直後から現れるのではなく、ある程度出血した後に顕著に発揮される点が興味深いと考える(Fig. 10)。血小板輸血 (PRP 投与) では出血直後 (5 分以内) の止血制御効果は顕著ではあるが、その後 (出血 5~10 分後) の止血効果は H12(ADP)リポゾームの方がより顕著であった。これは H12(ADP)リポゾーム自らが直接止血機能を発揮するのではなく、出血部位に集積して来た血小板を足場に血小板同士を架橋することで血小板をより集積、活性化させ、1 次血栓形成を促進し止血制御を行ったためではないかと考える。このような H12(ADP)リポゾームの作用機序は、出血部位以外の血小板が集積していない部位では血栓形成が起こり得ないことを推察させ、注意すべき副作用とも言える血栓症を回避出来る可能性を期待させる。

D. 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、急性の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、肝臓に外傷性の臓器損傷を作製したところ、臓器からの出血により死に至る致死性の血小板減少性易出血性病態モデルとなり得ることが確認された。
3. 本モデルにおいて、H12(ADP)リポゾームを投与し、肝臓に外傷性臓器損傷による臓器出血を作製すると、血小板を多く含む PRP 投与時と同様に、臓器出血に対する顕著な止血救命効果が得られた。
4. 本モデルでは、血小板数が極端に少ない

ため、PPPのような凝固因子のみの投与では止血効果が認められず、血小板やH12(ADP)リポゾームの投与によってのみ止血制御効果が認められた。

5. fibrinogen γ 鎖C末端(H12)のついていないADPリポゾームでは、H12(ADP)リポゾームのような有効な止血制御効果が認められず、止血制御にはH12が重要な役割を果たすことが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

(原著)

1. Tanaka S, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya S, Seki S, Nemoto K, Hamblin M, Morimoto Y. Photodynamic therapy using intra-articular photofrin for murine MRSA arthritis: biphasic light dose response for neutrophil-mediated antibacterial effect. *Laser Surg Med (in press)*
2. Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Kinoshita M, Hase K. Preoperative Toll-like receptor expression in monocytes is associated with host immunological responses following gastrointestinal surgery. *World J Surg (in press)*
3. Hyoudo T, Oda T, Kikuchi Y, Higashi K, Kushiya T, Yamamoto K, Yamada M, Suzuki S, Hokari Y, Kinoshita M, Seki S, Fujinaka F, Yamamoto T, Miura S, Kumagai H. Voltage gated potassium channel Kv1.3 blocker as apotential treatment for rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Physiol-Renal (in press)*
4. Nogami, Y., Takase, B., Kinoshita, M., Shono, S., Kaneda, S., Ishihara, M., Kikuchi, M., Maehara, T. Characteristic changes in heart rate variability induces during hemorrhagic shock, and effect of liposome-encapsulated hemoglobin in rats. *J Arrhythmia* 26: 189-198, 2010.
5. Kinoshita, M., Uchida, T., Sato, A., Nakashima, M., Nakashima H., Shono S., Habu, Y., Miyazaki, H., Hiroi, S., and Seki, S. Characteriation of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J. Hepatol.* 53; 903-910, 2010.
6. Takahashi, T., Kinoshita, M., Shono, S., Habu, Y., Ogura, T., Seki S., and Kazama, T. The effect of ketamine anesthesia on the immune function of mice with postoperative septicemia. *Anesthesia & Analgesia* 111; 1051-1058, 2010.
7. Fujie, T., Saito, A., Kinoshita, M., Ohtsubo, S., Saitoh, D., and Takeoka, S. : Dual therapeutic action of antibiotic-loaded nanosheets for the treatment of gastrointestinal tissue defects. *Biomaterials* 31; 6269-6278, 2010.
8. 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 hypohemoglobinemic shock without scavenging nitric oxide. *Shock* 35; 45-52, 2011.
9. 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.* 140: 624-632, 2010.
 10. 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* 148; 48-58, 2010.
 11. 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.* 86; 403-409, 2010.
 12. 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.* 51: 145-156, 2010.
 13. 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* 33: 500-506, 2010.
 14. 松谷哲行, 藤枝俊宣, 木下 学, 尾関雄一, 武岡真司 : 肺癒修復における超薄膜状ナノバイオマテリアルの臨床応用へ向けた基礎的検討. *日本呼吸器外科学会誌*, 24: 2-7, 2010.
 15. 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*, 57: 95-104, 2010. 防衛衛生学会最優秀論文.
 16. 高木智絵, 宮崎裕美, 木下 学, 庄野聡, 小野 聡, 関 修司, 齋藤大蔵: 出血性ショック時の superoxide dismutase 投与の臓器保護効果について. *防衛衛生*, 57: 177-186, 2010.
 17. 辻本広紀, 矢口義久, 平木修一, 小野聡, 木下 学, 山本順司, 長谷和生: 上部消化管穿孔症例における腹膜 CT 値測定の意義. *日本腹部救急医学会雑誌* 31: 13-17, 2011.
 18. 木下 学, 小野 聡, 稲津昭仁, 佐藤厚

志, 平木修一, 高畑りさ, 辻本広紀, 齋藤大蔵, 関 修司: 合成 CRP の致死的重症感染症に対する予後改善効果—クッパー細胞の貪食能亢進効果と炎症性サイトカイン抑制効果—. *Shock (in press)*

(総説)

1. 藤枝俊宣, 松谷哲行, 木下 学, 武岡真司: ナノシートからなる手術用フィルムの開発. *MATERIAL STAGE* 10: 4-6, 2010.
2. 藤枝俊宣, 木下 学, 齋藤大蔵, 武岡真司: 穿孔性腹膜炎に対するナノシートの応用. *Surgery Frontier* 17: 37-43, 2010.
3. 木下 学: HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1). *外科と代謝* 44: 271-274, 2010.
4. 木下 学, 藤枝俊宣: 外科手術用創傷被覆材 (ナノシート). *化学と教育* 58: 570-573, 2010.
5. 小野 聡, 辻本広紀, 木下 学: 制御性 T 細胞(Treg). *外科と代謝* 44: 339-342, 2010.
6. 木下 学: CRP (C-reactive protein). *外科と代謝* 45: 43-47, 2011.

G.学会発表

1. 西川可穂子, 木下学, 萩沢康介, 庄野聡, 勝野俊介, 宮崎裕美, 小野聡, 阪本敏久, 齋藤大蔵, 関修司: 人工血小板 H12(ADP)リポソームを用いた外傷性大量出血に伴う血小板減少時の止血制御

に関する研究. 第 25 回日本 shock 学会総会 2010, 東京.(日本 Shock 学会雑誌, p52: 25, 2010)

2. 西川可穂子, 木下学, 萩沢康介, 庄野聡, 勝野俊介, 宮崎裕美, 小野聡, 齋藤大蔵, 関修司, 阪本敏久: 外傷性大量出血時の大量輸血に伴う血小板減少に対して人工血小板 H12(ADP)liposome を用いた止血制御効果. 第 17 回日本血液代替物学会 2010, 熊本. (人工血液 p75: 18, 2010)
3. 萩沢康介, 松下芳太郎, 勝野俊介, 西川可穂子, 庄野聡, 木下学, 齋藤大蔵: 人工血小板による止血制御. 第 56 回防衛衛生学会 2011, 東京. (防衛衛生, p56:58, 2011)
4. 庄野聡: 外傷性大量出血時の大量輸血に伴う血小板減少に対して人工血小板 H12(ADP)liposome を用いた止血制御効果. 第 16 回日本集団災害学会, 2011, 大阪. (集団災害医学会雑誌, p399:15, 2011)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし