

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 熊本大学薬学部 医療薬剤学分野 教授

研究要旨

病態時における H12 (ADP) リポソームの体内動態を評価するためには、基盤情報となる健常時の体内動態に関する詳細な解析が必要不可欠である。そこで本研究では、健常動物を用い、H12 (ADP) リポソームの構成成分である脂質膜及び内部包含 ADP をそれぞれ ^3H と ^{14}C で標識し、これらを対象とした体内動態の検討を行った。その結果、健常動物に投与された H12 (ADP) リポソームは小胞体構造を保持しながら循環血中を滞留した後、肝臓及び脾臓の細網内皮系 (Kupper 細胞及び脾臓マクロファージ) に取り込まれて代謝され、脂質膜成分は主に胆汁排泄により糞中に、他方、ADP ほとんどが尿中に排泄されることが判明した。また、体内動態を経時的にモニタリングした結果、H12 (ADP) リポソーム及びその構成成分の血中及び臓器蓄積性は低いことが明らかとなった。これらの知見から、病態モデル動物における H12 (ADP) リポソームの体内動態解析、並びにヒトにおける半減期を予測する上での基盤情報を構築することができた。

A. 研究目的

人工血小板としての機能が期待される H12 (ADP) リポソームの開発に際しては、その体内動態特性を明らかにし、血中滞留性、臓器分布、蓄積性などを評価する必要がある。また、これらの情報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。

H12 (ADP) リポソームの場合、リポソームを構成する脂質膜成分と内部に包含されている ADP から成り立っているため、体内動態を解析する上では、それぞれの構成成分毎に評価する必要がある。また、H12 (ADP) リポソームは大量出血時や抗がん剤使用時などの血小板減少状態で投与することが想定されているため、前臨床段階では、これら病態モデル動物を用いて体内動態を解析する必要があるが、その結果を適切

に評価するためには健常動物での体内動態を詳細に検討し、基盤情報を構築することが必要不可欠である。事実、我々は同様な手法でリポソーム製剤の体内動態を解析し、その情報に基づき安全性及び有用性を評価している。

そこで本研究では、健常動物 (マウス、ラット) における H12 (ADP) リポソームの体内動態解析を目的とし、脂質膜成分を ^3H により、他方、内部包含 ADP を ^{14}C で標識し、それぞれの体内挙動について検討した。

B. 研究方法

1. 動物実験

ddY 系雄性マウス (6 週齢、30~33g) は SLC より購入、SD 系雄性ラット (6 週齢、180~200g) は九動より購入し、ともに 1 週間の予備飼育後、7 週齢で実験に使用した。

また、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、実験をおこなった。

2. ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソームの作成

10 mg lipid/mL に調製した H12 ($[8-^{14}\text{C}]$ ADP) リポソームに $[1,2-^3\text{H}]$ cholesterol を 25 \cdot L/mL とするよう添加し、37°C、12 hr で振とうした。その後、PD-10 カラムによるゲルろ過をおこない精製した。

3. ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソームの体内動態解析

3.1. マウスにおける検討

ddY 系雄性マウスの尾静脈から ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソーム (10 mg lipid/kg) を投与した。ヘパリン処理した注射筒で下大静脈から採血を行い、3000 rpm、5 min で遠心分離後、処理をおこない、血漿中の放射活性を測定した。また、MULTI を用いて動態パラメータを算出した。

摘出した臓器は、秤量、ミンス後、一部 (90 mg) を solune-350 (1 mL) で溶解し、処理をおこない、放射活性を測定することで臓器分布を測定した。

さらに、代謝ゲージで尿・糞を継続的に回収し、臓器と同様の操作をおこない、放射活性を測定した。

3.2. ラットにおける検討

SD 系雄性ラットの尾静脈から ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソーム (10、20、40 mg lipid/kg) を投与し、経時的にヘパリン処理した注射筒で尾静脈から採血をおこなった。マウスと同様の方法で血漿中濃度、動態パラメータ、臓器分布、尿・糞中排泄を測定した。

C. 結果

1. マウスにおける ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソームの体内動態評価

1.1. 血漿中濃度推移

ddY 系雄性マウスに ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソーム (10 mg/kg) を投与し、継続的に血漿中の放射活性を測定することで、リポソームの血漿中濃度変化を検討した。その結果、投与後 3 時間までは、 ^3H 及び ^{14}C の両標識体がほぼ同様な血漿中濃度推移を示しており、小胞体を保持したまま血中を滞留していることが判明した。ただし、3 時間以降では ^3H と ^{14}C の乖離が認められるようになった。(Fig. 1)

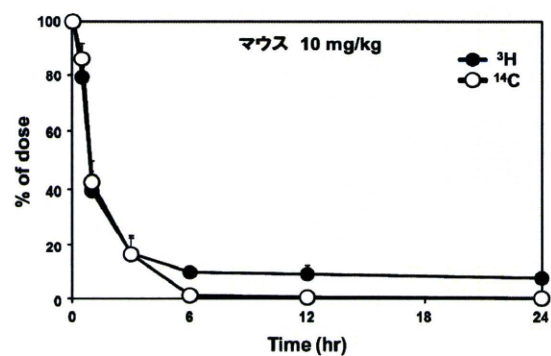


Fig.1 マウスにおける ^3H 、 ^{14}C の血漿中濃度推移

次に、血漿中濃度から MULTI を用いて動態パラメータを算出した。その結果、 ^3H に比べ ^{14}C の β 相半減期 ($T_{1/2\beta}$) が短いこと、また血漿中濃度 - 時間曲線化面積 (AUC) が小さいことが確認された (table. 1)。

Table.1 マウスにおける動態パラメータ

10 mg/kg	^3H	^{14}C
$T_{1/2\alpha}$ (hr)	0.53 \pm 0.02	0.75 \pm 0.18
$T_{1/2\beta}$ (hr)	28.3 \pm 11.3	23.0 \pm 15.1
AUC (hr \cdot % of dose/mL)	59.9 \pm 13.9	17.8 \pm 2.71
CL_{tot} (mL/hr)	1.73 \pm 0.39	5.71 \pm 0.80
V_1 (mL)	8.29 \pm 0.79	8.24 \pm 0.34

1.2. 臓器分布

マウスに H12 (ADP) リポソーム (10 mg/kg) を投与した 1 時間後に、 ^3H 及び ^{14}C の臓器分布性を検討した。その結果、両放射体は主に肝臓と脾臓に分

布していることが判明した (Fig. 2)。このことから、投与されたリポソームの大部分が肝臓や脾臓中の細網内皮系 (Kupper 細胞及び脾臓マクロファージ) に取り込まれている可能性が推察させた。

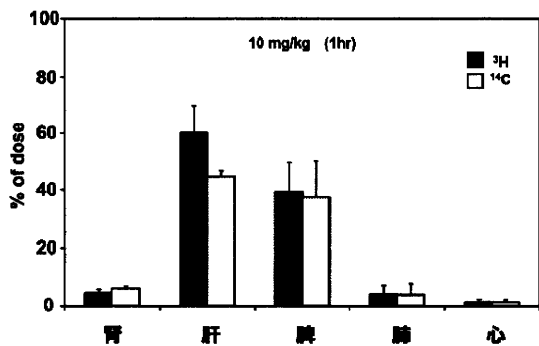
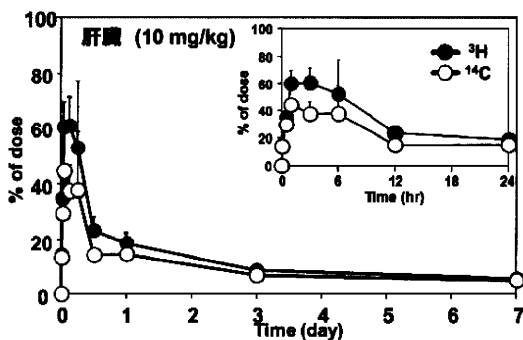


Fig.2 マウスにおける投与 1 時間後の ^3H 、 ^{14}C の臓器分布

そこで次に、主要分布臓器である肝臓、脾臓における ^3H 及び ^{14}C の分布を経時的に評価した。その結果、肝臓では投与 3 時間後、脾臓では投与 1 時間後において放射体の分布が最大となった。その後、放射活性は時間の経過とともに消失していき、投与 7 日後では、ほぼ全てが臓器から消失していることが確認された (Fig. 3)。

(A) 肝臓



(B) 脾臓

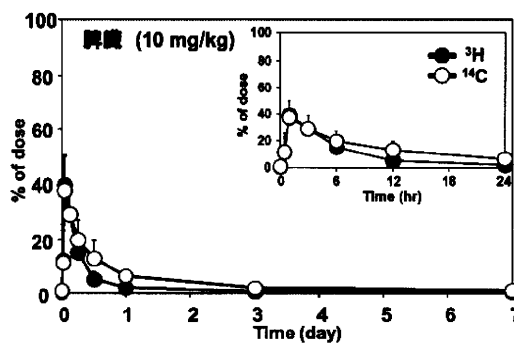
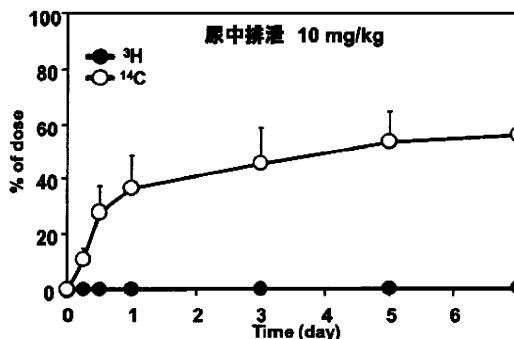


Fig.3 マウスにおける肝臓 (A)、脾臓 (B)への経時的な ^3H 、 ^{14}C の臓器分布

1. 3. マウスにおける H12 (ADP) リポソームの排泄経路

H12 (ADP) リポソームの排泄経路を検討すべく、尿中及び糞中における放射活性を測定した。その結果、尿中には ^{14}C が、他方、糞中には ^3H が主に排泄されていた (Fig. 4)。また、 ^3H と ^{14}C のいずれも投与 7 日後には、ほぼ全てが体外に排泄されていた。このことにより、脂質膜成分と ADP の多くは、それぞれ糞中及び尿中に排泄されることが判明した。

(A) 尿中排泄



(B) 糞中排泄

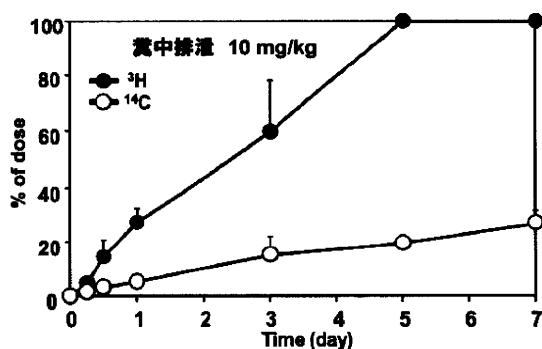
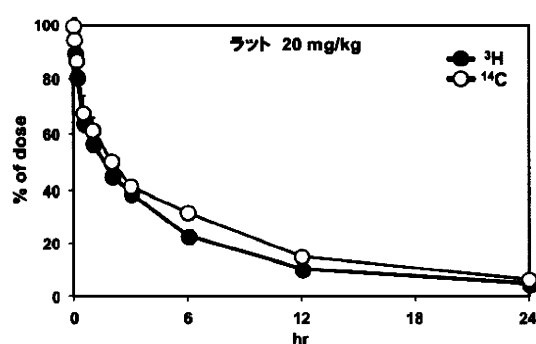


Fig.4 マウスにおける ^3H 、 ^{14}C の尿中 (A)、糞中 (B) 排泄

(B) 20 mg/kg



(C) 40 mg/kg

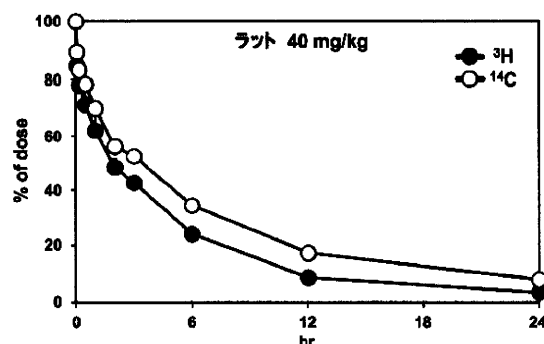


Fig.5 ラットにおける H12 (ADP) リポソームを 10 (A)、20 (B) 及び 40 (C) mg/kg 投与時の血漿中濃度推移

2. ラットにおける ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソームの体内動態評価

2.1. 血漿中濃度推移

SD系雄性ラットに ^3H 、 ^{14}C 標識 H12 (ADP) リポソーム (10、20、40 mg/kg) 投与後、継時的に血漿中の放射活性を測定した。その結果、すべての投与群において、 ^3H と ^{14}C は非常に類似した血漿中濃度推移を示した (Fig. 5)。また、投与 24 時間後には血漿中から放射活性がほとんど検出されなかった。これらの結果から、マウスの場合と同様、ラットにおいても H12 (ADP) リポソームは小胞体構造を保持したまま血中を循環し、その後に組織へ分布していることが推察された。

次に、血漿中濃度推移を MULTI により解析し、動態パラメータを算出した。その結果、ラットと同様、 ^{14}C よりも ^3H において、 $T_{1/2\beta}$ の短縮と AUC の減少が観察された (table. 2)。

(A) 10mg/kg

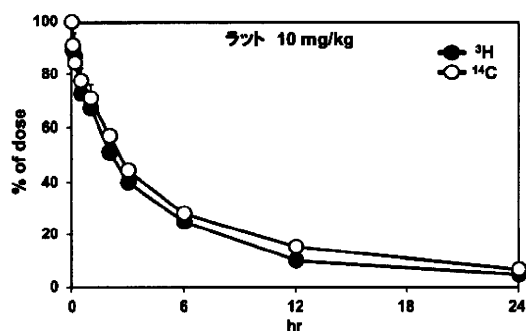


Table.2 ラットにおける動態パラメータ

10 mg/kg	^3H	^{14}C
$T_{1/2\alpha}$ (hr)	2.3±0.2	2.0±0.4
$T_{1/2\beta}$ (hr)	19.0±2.3	12.4±4.8
AUC (hr·% of dose/mL)	59.7±6.6	66.0±14.3
CL_{ext} (mL/hr)	1.7±0.2	1.6±0.3
V_1 (mL)	11.3±1.1	11.4±1.3
20 mg/kg	^3H	^{14}C
$T_{1/2\alpha}$ (hr)	2.4±0.3	1.3±0.3
$T_{1/2\beta}$ (hr)	18.7±2.6	10.4±4.2
AUC (hr·% of dose/mL)	56.3±2.2	62.6±7.6
CL_{ext} (mL/hr)	1.8±0.1	1.6±0.2
V_1 (mL)	12.3±1.3	11.3±0.3
40 mg/kg	^3H	^{14}C
$T_{1/2\alpha}$ (hr)	2.8±0.3	2.4±1.0
$T_{1/2\beta}$ (hr)	20.6±4.6	11.1±2.3
AUC (hr·% of dose/mL)	53.0±3.4	73.1±6.1
CL_{ext} (mL/hr)	1.9±0.1	1.4±0.1
V_1 (mL)	12.3±0.7	11.3±0.7

2.2. 臓器分布

Fig.5 で示したように、H12 (ADP) リポソーム (10 mg/kg) 投与 24 時間後には、リポソームがほぼ血漿中に存在しないことから、投与 24 時間後における ^3H 、 ^{14}C の臓器分布を検討した。その結果、放射活性は肝臓と脾臓で強く認められた (Fig. 6)。また、投与 7 日後の臓器分布について検討したところ、いずれの臓器に対しても蓄積性は低いことが判明した (Fig. 7)

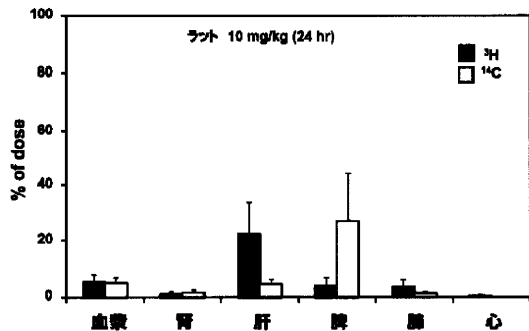


Fig.6 ラットにおける投与 1 時間後の ^3H 、 ^{14}C の臓器分布

(C) 40 mg/kg

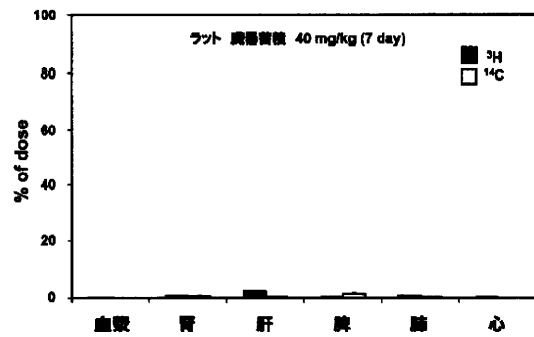
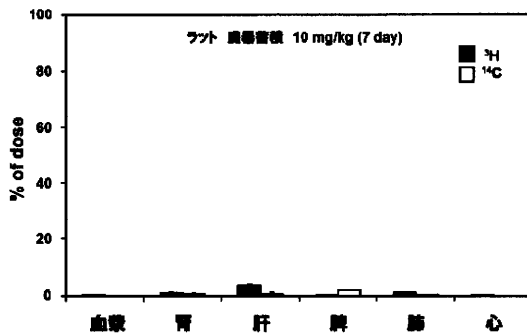


Fig.7 ラットにおける投与 7 日後の ^3H 、 ^{14}C の臓器分布

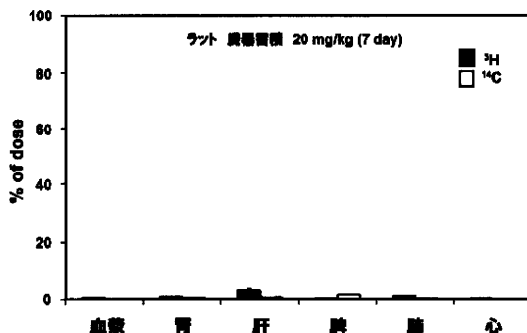
2.3. ラットにおける H12 (ADP) リポソームの排泄経路

尿中及び糞中における ^3H 、 ^{14}C の放射活性を測定した。その結果、マウスと同様、尿中には ^{14}C 、糞中には ^3H が主に排泄されていた。また、いずれも投与 7 日後には投与量の半分以上が体外に排泄されていた (Fig. 8)。

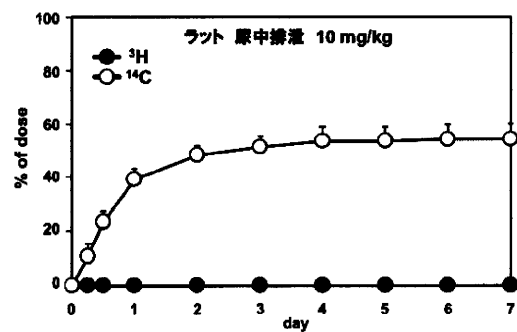
(A) 10 mg/kg



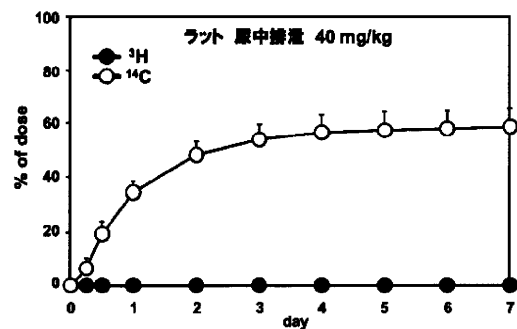
(B) 20 mg/kg



(A) 10 mg/kg



(B) 20 mg/kg



(C) 40 mg/kg

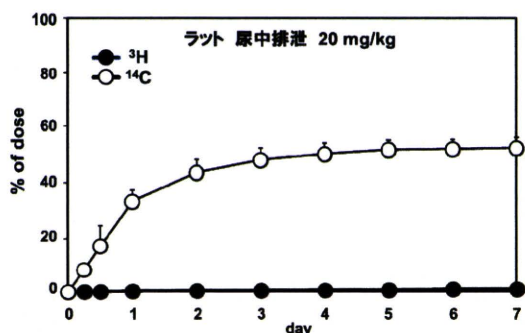


Fig.8 ラットにおける ^3H 、 ^{14}C の尿中排泄

今回の検討結果から、H12(ADP)リポゾームは小胞体構造を保持した状態で血中を循環し、主に肝臓・脾臓に存在する網内皮系に取り込まれ、代謝・分解を受けることが判明した。ただし、リポゾームの分解後は、内部含有 ADP と脂質膜成分の挙動は異なり、ADP の場合は7日以内に主に尿中に排泄されるのに対して、脂質膜成分は臓器に一時的な蓄積性を示すものの、その大部分は7日以内に胆汁中から糞中へ排泄されることが明らかとなった。これら一連の体内動態特性は、H12(ADP)リポゾームの生体蓄積性が少ないことや、内因性の ADP や脂質膜成分と同様の経路で代謝排泄されることを意味している。したがって、H12(ADP)リポゾームは代謝・排泄性に優れている可能性が強く示唆された。ただし、今回の検討はあくまでも健常動物での結果であることから、H12(ADP)リポゾームの安全性を体内動態の観点から実証するためには、臨床試験を想定した病態モデルにおいて同様の検討を行う必要がある。

今後はウサギにおける体内動態解析を行い、今回得られたマウス及びラットにおける結果を加味して、アロメトリック式の構築を試み、それよりヒトにおける H12(ADP)リポゾームの半減期を外挿する予定である。加えて、血小板減少モデル動物での体内動態解析と PK/PD モデリングに取り組むつもりである。

以上述べたように、今回の健常動物を用いた検

討により、血小板減少状態あるいは出血性ショックなどの病態モデルでの体内動態を解析する上で、の基盤情報を構築することができた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, **Maruyama T**, Otagiri M. Fluid Resuscitation with Hemoglobin Vesicles Prevents Escherichia coli Growth via Complement Activation in a Hemorrhagic Shock Rat Model. *J Pharmacol Exp Ther.* (2011) 337: 201-8.

2. Tanaka M, Tokunaga K, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Watanabe H, Kadowaki D, **Maruyama T**, Otagiri M, Fukagawa M. Vitamin D receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial.* (2011) 15: 161-8.

3. Miyamoto Y, Watanabe H, Otagiri M, **Maruyama T**. New insight into the redox properties of uremic solute indoxyl sulfate as a pro- and anti-oxidant. *Ther Apher Dial.* (2011) 15:129-31.

4. Taguchi K, **Maruyama T**, Otagiri M. Pharmacokinetic properties of hemoglobin vesicles as a substitute for red blood cells. *Drug Metab Rev.* (2011) in press

5. Mera K, Nagai R, Takeo K, Izumi M,

- Maruyama T**, Otagiri M. An autoantibody against N-(carboxyethyl)lysine (CEL): Possible involvement in the removal of CEL-modified proteins by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* (2011) in press
6. Nishi K, Ono T, Nakamura T, Fukunaga N, Izumi M, Watanabe H, Suenaga A, **Maruyama T**, Yamagata Y, Curry S, Otagiri M. Structural insights into differences in drug binding selectivity between two forms of human α 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms. *J Biol Chem.* (2011) in press
7. Taguchi K, Iwao Y, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, **Maruyama T**, Otagiri M. Repeated injection of high doses of hemoglobin-encapsulated liposomes (hemoglobin vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metab Dispos.* (2011) 39:484-9.
8. Miyamoto Y, Watanabe H, Noguchi T, Kotani S, Nakajima M, Kadowaki D, Otagiri M, **Maruyama T**. Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. *Nephrol Dial Transplant.* (2011) in press
9. Taguchi K, Miyasato M, Watanabe H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, **Maruyama T**, Otagiri M. Alteration in the pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of chronic liver cirrhosis is associated with Kupffer cell phagocyte activity. *J Pharm Sci.* (2011) 100:775-83.
10. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kawai K, Komatsu T, Tsuchida E, **Maruyama T**, Otagiri M. Superior plasma retention of a cross-linked human serum albumin dimer in nephrotic rats as a new type of plasma expander. *Drug Metab Dispos.* (2010) 38:2124-9.
11. Taguchi K, Miyasato M, Ujihira H, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, **Maruyama T**, Otagiri M. Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2010) 248:234-41.
12. Ikuta S, Chuang VT, Ishima Y, Nakajou K, Furukawa M, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M. Albumin fusion of thioredoxin--the production and evaluation of its biological activity for potential therapeutic applications. *J Control Release.* (2010) 147:17-23.
13. Ishima Y, Hiroyama S, Kragh-Hansen U, **Maruyama T**, Sawa T, Akaike T, Kai T, Otagiri M. One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. *Nitric Oxide.* (2010) 23:121-7.
14. Miyamoto Y, Iwao Y, Tasaki Y, Sato K,

Ishima Y, Watanabe H, Kadowaki D, **Maruyama T**, Otagiri M. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. FEBS Lett. (2010) 584:2816-20.

15. Hirata K, **Maruyama T**, Watanabe H, Maeda H, Nakajou K, Iwao Y, Ishima Y, Katsumi H, Hashida M, Otagiri M. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics. J Control Release. (2010) 145:9-16.

16. Katayama N, Nakajou K, Ishima Y, Ikuta S, Yokoe J, Yoshida F, Suenaga A, **Maruyama T**, Kai T, Otagiri M. Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells. Nitric Oxide. (2010) 22:259-65.

2. 学会発表 国内学会

1. Minomo A, Ishima Y, Suwa Y, Uchida M, **Maruyama T**, Morioka H, Otagiri M フェージディスプレイ法を用いた HSA 分子上の BR 結合部位の探索 第 130 回日本薬学会年会 (岡山コンベンションセンター, 2010, 3/28-30)

2. 宮本洋平、岩尾康範、渡邊博志、門脇大介、佐藤圭創、小田切優樹、**丸山徹** 尿毒症物質 CMPF の酸化ストレス誘発機序解明 第 25 回日本薬剤学会 (あわぎんホール 徳島県郷土文化会館, 2010, 5/11-14)

3. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、

丸山徹 一酸化炭素結合型赤血球による肝チトクローム P450 の保護効果. 第 25 回日本薬剤学会 (あわぎんホール 徳島県郷土文化会館, 2010, 5 /11-14)

4. Komori H, Watanabe H, Syuto T, **Maruyama T**, Otagiri M ・1-酸性糖タンパク質による CD163 の発現誘導 第 35 回 西日本薬剤学研究会 (大分, 九重共同研修所, 2010, 9/17-18)

5. Kohei Nagumo, Tsuyoshi Sugimori, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Kazuyuki Kubota, Naoyuki Yamada, Masaki Otagiri and **Toru Maruyama**. CHARACTERIZATION OF STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN PATIENTS WITH LIVER DISEASE 日本薬物動態学会 第 25 回年会 (大宮ソニックシティ, 2010, 10/7-9)

6. 田中遼大, 古川真斗, 異島優, 田中健一郎, 水島徹, 渡邊博志, 小田切優樹, **丸山 徹**. IMPROVED THERAPEUTIC EFFECT OF THIOREDOXIN BY FUSION TO HUMAN SERUM ALBUMIN AGAINST BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS 日本薬物動態学会 第25回年会 (大宮ソニックシティ, 2010, 10/7-9)

7. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹** 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球のチトクローム P450 の保護効果. 第 17 回日本血液代替物学会 (熊本国際交流会館, 2010, 10/18-19)

8. Komori H, Watanabe H, Syuto T, **Maruyama T**, Otagiri M ・1-acid glycoprotein enhances the expression of hemoglobin scavenge receptor CD163 through the activation of TLR4 signaling 第 4 回次世代を担う若手医療薬科学

シンポジウム（東京大学武田先端知ビル，2010，11/27-28）

9. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹** 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球の肝チトクローム P450 保護効果. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（富山国際会議場，2010，11/29-30）

10. 宮本洋平、岩尾康範、渡邊博志、門脇大介、佐藤圭創、小田切優樹、**丸山徹** 尿毒症物質 CMPF の生体内レドックス特性 第 27 回臨床フリーラジカル会議（京都，畑川，2010，12/3-4）

11. 南雲恒平、杉森剛志、田中基彦、佐々木裕、異島優、渡邊博志、窪田和幸、山田尚之、小田切優樹、**丸山徹**. 肝疾患時におけるアルブミンの構造及び機能評価. 第 27 回日本薬学会九州支部大会（長崎大学薬学部，2010，12/11-12）

12. 田中遼大、古川真斗、異島優、田中健一郎、水島徹、渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹**. BLM 誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有用性評価 第 27 回日本薬学会九州支部大会（長崎大学薬学部，2010，12/11-12）

13. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹**. 一酸化炭素を付加した赤血球は大量出血時における肝チトクローム P450 を保護する. 第 27 回日本薬学会九州支部大会（長崎大学薬学部，2010，12/11-12）

14. 宮本洋平、岩尾康範、米良克美、渡邊博志、門脇大介、異島優、佐藤圭創、小田切優樹、**丸山徹** 尿毒症物質 CMPF の酸化ストレス誘発メカニズム 日本薬学会第 131 年会（ツインメッセ静岡，2011，3/28-31）

15. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、門脇大介、小田切優樹、**丸山徹** 一酸化炭素結合型赤血球による肝 CYP 保護効果. 日本薬学会第 131 年会（静岡，グランシップ，2011，3/28-31）

16. 田中遼大、古川真斗、異島優、田中健一郎、水島徹、渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹**. プレオマイシン誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価 日本薬学会第 131 年会（静岡，グランシップ，2011，3/28-31）

17. 南雲恒平、杉森剛志、窪田和幸、山田尚之、異島優、渡邊博志、田中基彦、佐々木裕、小田切優樹、**丸山徹**. MS 解析を用いた慢性肝炎時におけるヒト血清アルブミンのレドックス解析と構造及び機能との関連性 日本薬学会大 131 年会（静岡，グランシップ，2011，3/28-31）

18. 本田大輔、宮本洋平、渡邊博志、門脇大介、**丸山徹**、小田切優樹 尿毒症物質 p-cresyl sulfate の酸化ストレスに及ぼす影響. 日本薬学会第 131 年会（ツインメッセ静岡，2011，3/28-31）

国際学会

1. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M Hepatic uptake of α -1-acid glycoprotein through hemoglobin α -chain-mediated endocytic pathway 9th International ISSX meeting, 2010 9/4-8, Istanbul

2. Minomo A, Ishima Y, Suwa Y, Uchida M, **Maruyama T**, Morioka H, Otagiri M Characterization of bilirubin binding site in human serum albumin via construction and

bilirubin binding screening of a phage library ISSX 9th International Meeting, 2010 9/4-8 Istanbul

3. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M Involvement of hemoglobin α -chain on plasma membrane in uptake of human α 1-acid glycoprotein into liver ThePharmaceutical Sciences World Congress 2010, 2010 11/14-18, New Orleans

G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし

好中球機能を用いた血小板減少・外傷性出血における人工血小板投与の *in vivo* 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	木下 学	(防衛医科大学校 免疫微生物学、准教授)
	西川可穂子	(防衛医科大学校 救急部、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)
	齋藤 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)
	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)
	溝上 翼	(早稲田大学 スポーツ科学部)
	菅間 薫	(東京農工大学・早稲田大学共同大学院 先進健康科学専攻)
	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

血小板減少状態で外傷性出血を起こすウサギ病態モデルにおいて、人工血小板の投与が末梢血好中球の機能に及ぼす影響について検討を行った。脱血と外傷、出血により好中球の接着・遊走能と活性酸素産生能の上昇がみられたが、人工血小板の投与による明らかな影響は認められなかった。本研究における動物実験での *in vivo* 評価のみならず、前年度のヒト末梢血を用いた詳細な *in vitro* 評価においても、血中好中球機能に特に異常反応は認められなかったことから、人工血小板自体が炎症や酸化ストレスを惹起する可能性は低いと考えられた。

A. 研究目的

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。このように好中球の数や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バイオマーカーと位置づけられる(Alexander D. et al. Neutrophils as biologic markers of the inflammatory response. *Sepsis* 2:119-125, 1998)。特に手術侵襲や循環病態時に好中球による活性酸素の過剰生成が病態形成に関与すると報告されてきており、ラットの出血性ショックに

よる虚血モデルでは、好中球が活性酸素を過剰に産生すると不可逆的な組織傷害や多臓器不全を惹起し、好中球活性酸素産生能が致死性を予測する上で有力な指標となる可能性も指摘されてきた(Barroso-Aranda J and Schmid-Schonbein GW: Transformation of neutrophils as indicator of irreversibility in hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol.* 257: H846-852, 1989)。

人工血小板の有力候補薬剤である H12(ADP)リポソームは、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、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好中球に対して異物反応を起こして、炎症反応を惹起する可能性が考えられる。H12(ADP)リポソームの創薬化への前臨床開発段階においては、人工血小板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。そこで前年度は、まず素材の異物反応を検出する評価指標を選定するために、健常者の末梢血を用いて好中球機能とサイトカイン産生能を中心に各種 *in vitro* 測定系を設定して多面的な素材のスクリーニングを行った。その結果、H12(ADP) リポソーム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、H12 や ADP を含有しない素材においては薬理的濃度を上回る 1 mg/mL の高濃度で好中球の活性酸素産生能や脱顆粒能の亢進と好中球活性化因子 (IL-8) の産生が促進され、炎症や酸化ストレスを惹起する可能性が示唆され、これらの測定系が安全性の評価指標として有用な候補となる可能性が示唆された。

好中球機能測定系のなかでも、特に全血とハイドロゲルを接触させる反応系は、好中球がハイドロゲルに接着し浸潤しやすくなるように足場を付与したものをを用い、全血からハイドロゲルに接着・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(鈴木克彦ら、好中球機能検査システムおよび好中球機能検査方法、特開2008-107210)。このような足場付きのハイドロゲルを用いることにより、止血局所に人工血小板が集積する状況に近い条件での好中球機能を評価できる可能性が考えられる。また、活性酸素の検出に用いる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種に選択性が高く、高感度測定も可能であるため、異物反応を検出するスクリーニング系としても生体影響評価のバイオマーカーとしても有用な測定系と考えられる (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)。

そこで本年度は、このハイドロゲルを用いた好中球機能測定法を *in vivo* での生体反応の解析に応用し、血小板減少時に外傷性出血を起こすウサギ病態モデルにおいて人工血小板投与の影響を検討することにより、リポソーム素材の生体適合性と安全性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験動物と脱血手順

本年度の木下学らの分担研究報告に示すように、NZW ウサギ (日本 SLC) を用い、急性血小板減少モデルにて検討を行った。すなわち、ネンプ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。脱血と洗浄赤血球輸血は、大腿動脈より 25 mL の脱血を行い、対側の大腿静脈より 25 mL の Lactated Ringer (0.5% albumin) を投与した。脱血した血液を用いて、platelet-rich plasma (PRP) 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、25 mL の脱血を大腿動脈より同様に行い、さらに作製した洗浄赤血球を Lactated Ringer (0.5% albumin) で 25 mL 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、最後に 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 200 mL) 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。

2. PRP、洗浄赤血球の調整

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 platelet-poor plasma (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を用いて 500×g で 10 分間遠心洗浄し、洗浄赤血球

として用いた。

3. H12(ADP)リポソーム、PRP、ADPリポソームの投与条件

計 200 mL の脱血と等量の洗浄赤血球輸血が終了した後に、H12(ADP)リポソーム 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、H12 が付いていない(ADP)リポソーム 8 mg/kg (PPP で 30 mL に調整) を各々静脈内投与し 10 分後に採血を行った。その後、開腹し肝臓に直径 5 mm の Derma punch を用いて組織損傷を作製した。H12 が付いていない(ADP)リポソームについては 5 羽、H12(ADP)リポソームについては外傷前投与 2 羽、外傷時投与 3 羽(同時投与)の計 5 羽、さらに参考のため人工血小板を全く含まない PRP 投与についても 1 羽検討し、末梢血の血球数と好中球機能を測定した。

4. 末梢血の採取と血球測定

採血は大腿動脈ルートより、脱血前(以下、「実験開始」と略)、8 回目の洗浄赤血球輸血終了後の薬物投与前(以下、「脱血後」と略)、各種薬物投与後(以下、「輸液後」と略)の 3 点で行った。末梢血中の血小板数、ヘモグロビン濃度、好中球数は動物用全自動血球計数装置(PCE-210, エルマ, 東京)を用いて測定した。

5. 好中球機能の測定

5.1. 測定系の概要

好中球の接着・遊走能と活性酸素産生能についてはハイドロゲル法を用いて検討した。この測定法では、好中球が選択的に接着・侵入するハイドロゲルを用いることにより、好中球を予め全血から分離することなく、微量検体で簡便・迅速に好中球機能を生体内に近い条件で評価できる。熱可逆ハイドロゲルが低温でゾル状態、体温ではゲル化するゾルーゲル転移現象を生じる特性を利用し、透明なゲルに接着・侵入した好中球の活性酸素産生をルミノール依存性化学発光により測定した後、冷却してゾル化し、均一に攪拌して好

中球数を測定して接着・遊走能とした。

5.2. 試薬の準備

ルミノール溶液の調整は、まず Luminol (SIGMA ALDRICH, USA) を 17.72 mg ガラスビーカーに入れ、1 N NaOH を 3 mL 加えてよく攪拌して溶解した。沈殿が生じないようにゆっくりと 1 N HCl を 2.5 mL 滴下し、さらにハックス培養液(HBSS)を 30 mL 加え、攪拌しながら 0.2 N HCl で pH 7.4 (37°C) に調整した。これに HBSS を加えて 40 mL にメスアップし、最終濃度を 2 mM とした。これを 1.5 mL チューブに分注し遮光して -20°C で凍結保存し、使用当日に解凍して使用した。

熱可逆ハイドロゲル(メビオール株式会社、神奈川)は冷蔵庫(4°C)に保管した凍結乾燥品に HBSS を 16.7 mL 加え、4°C に一晩放置した後、37°C と 4°C 保存を数日間繰り返し均一なゾル状態とした。気泡がなく透明に溶解したものを 1.5 mL チューブに分注し、-20°C で凍結保存した。

測定当日に使用分を解凍し、氷上でゾル化した熱可逆ハイドロゲルを 2 mL チューブ (AXYGEN, Inc. USA) の底に 50 μ L 塗布した。熱可逆ハイドロゲルは 20°C 以上でゲル化が進行するため、ゲル、チューブ、ピペッティングチップを氷上で冷却しながら操作を行った。また、気泡の存在やゲル表面の偏りは化学発光測定の妨げとなるため、細心の注意をはらって調整し、37°C のブロックインキュベーター(e-Thermo Bucket, TAITEC, 東京)内に 10 分以上静置し、完全にゲル化したことを確認してから使用した。

5.3. 測定手順

ヘパリン処理した全血に等量のルミノール溶液を混和し、素早く 150 μ L をゲル上に均一になるよう広げ、速やかにルミノメーター(GENE LIGHT 55, マイクロテック・ニチオン社製, 千葉)で化学発光量(relative light unit: RLU)を測定した。その後、20 分、40 分、60 分まで 1 サンプルにつき計 4 回トリPLICATEにて測定し、化学発光量を記録した。

ルミノメーターで測定終了後、ただちにハイドロゲル上の血液を除去し、37°C に加温した pH 7.4

のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 900 μL 加えながら洗浄・除去を 3 回行った。血色素が認められなくなったことを確認した後、残っている水分を除去した。さらに氷上で冷却してゾル化し、50 μL のチュルク液 (Wako, 大阪) を添加した後 10 回攪拌し、血球計算盤 (C-Chip, Disposable Hemocytometer, Neubauer Improved, DHC-No. 1, Digital Bio, Seoul) に適量注入して顕微鏡下で細胞数を計測した。計算盤の 1 mm^2 の 4 区画をカウントし、その平均値を 20 倍したものを 1 μL 中の細胞数とした。

なお、すべての測定結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。

C. 研究結果

1. 血中血小板数の推移

好中球機能を測定したすべての検討例において、末梢血中の血小板数は脱血と洗浄赤血球輸血の反復により血液交換終了時には 5 万/ μL 程度にまで減少した (図 1)。

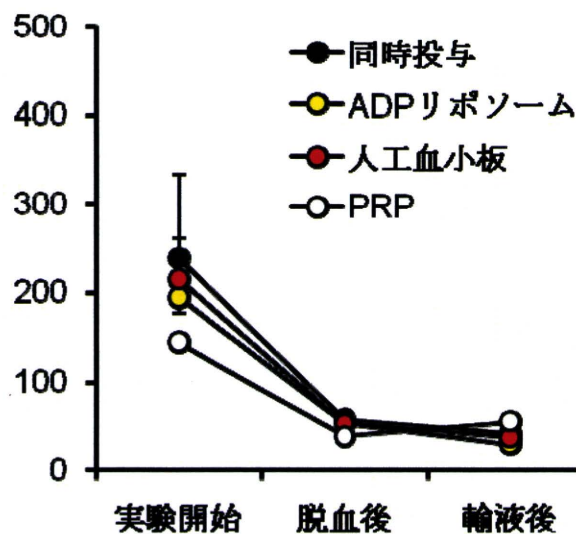


図 1. 末梢血中の血小板数 ($10^3/\mu\text{L}$) の推移

2. 血中ヘモグロビン濃度の推移

好中球機能を測定したすべての検討例において、末梢血中のヘモグロビン濃度は低下したが、人工血小板の H12 (ADP) リポソームの投与条件と PRP の投与条件では 10 g/dL 前後に維持された

(図 2)。一方、H12 の付いていない (ADP) リポソームの投与条件と外傷時に H12 (ADP) リポソームを投与した条件 (同時投与) では、ヘモグロビン濃度が 5 g/dL 程度まで低下し続けた。

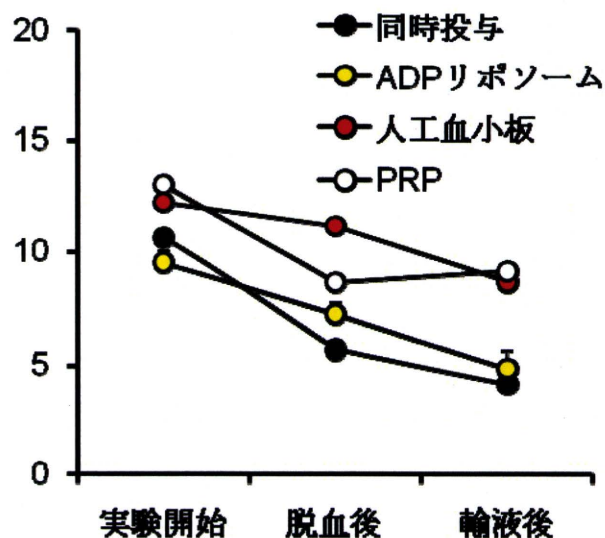


図 2. 末梢血のヘモグロビン濃度 (g/dL) の推移

3. 血中好中球数の推移

好中球機能を測定したすべての検討例で、末梢血中の好中球数も減少する傾向がみられたが、薬剤投与に伴う顕著な増減は認められなかった。一方、外傷時に H12 (ADP) リポソームを投与した条件 (同時投与) では、実験開始時から好中球数の増加した症例があったため高値を示したが、脱血後の外傷と出血でさらに好中球数が低下し続けた (図 3)。

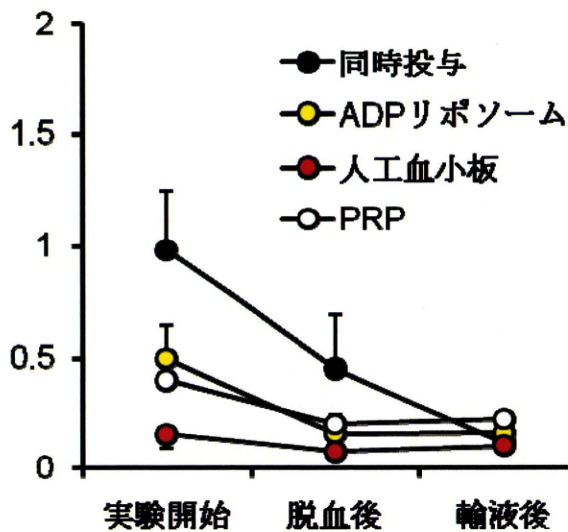


図3. 末梢血中の好中球数 (10³/μL) の推移

4. 血中好中球の接着・遊走能の推移

好中球の接着・遊走能は脱血後に上昇したが、(ADP)リポソームとH12(ADP)リポソームの投与条件では輸液後には抑制される傾向がみられた。一方、外傷時にH12(ADP)リポソームを投与した条件(同時投与)では、脱血後の外傷で好中球の接着・遊走能が低下せず、やや増加する傾向を示した(図4)。

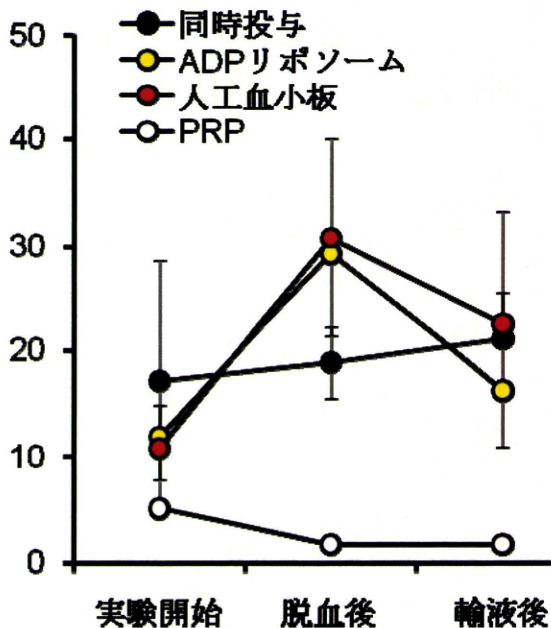
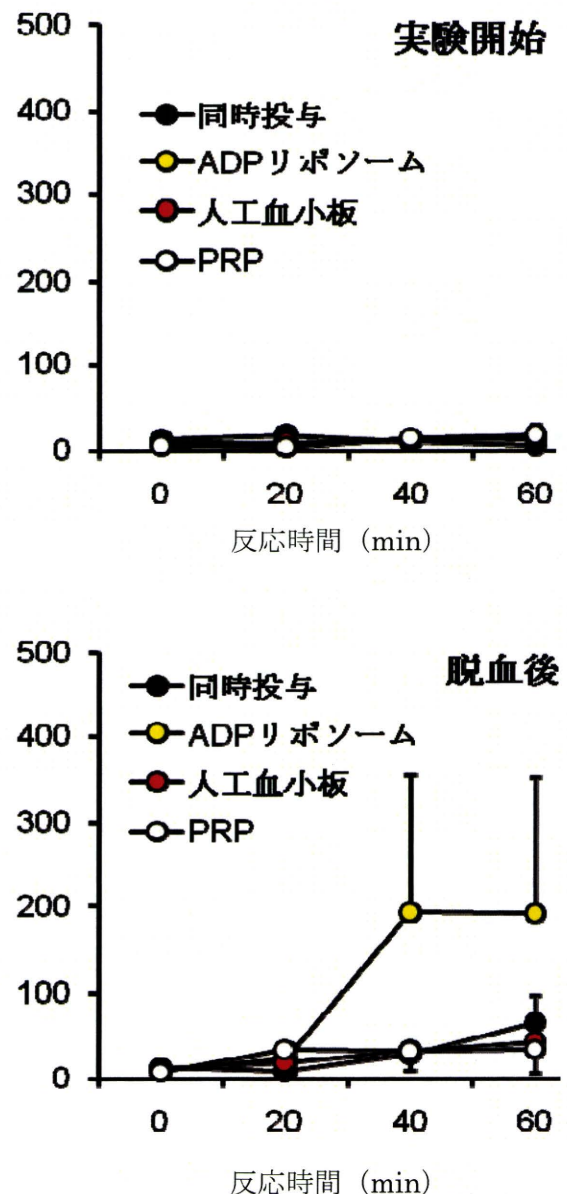


図4. 末梢血好中球の接着・遊走能(ハイドロゲル回収細胞数/μL)の推移

5. 血中好中球の活性酸素産生能の推移

実験開始時には、好中球活性酸素産生能はほとんど検出されなかった(図5上段)。念のため健康人でも採血し同時に測定を行ったところ100倍以上の値が得られたが、実験動物は衛生的環境で飼育されているためか種差か、好中球の活性がもともと低くなっているものと考えられた(マウスで好中球機能を測定した場合も同様であった)。しかし、脱血後には好中球の活性酸素産生能の上昇例がみられた(図5中段)。外傷時にH12(ADP)リポソームを投与した条件(同時投与)でも、活性酸素産生能の亢進例がみられた(図5下段)。図5中段でみられた(ADP)リポソームによる上昇は、輸液後には抑制されていた(図5下段)。



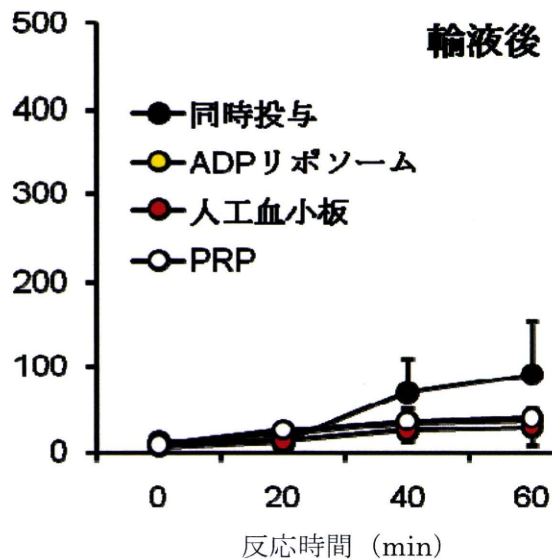


図5. 末梢血好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光量: RLU) の推移

D. 考察

本研究では、血小板を減少させる目的で脱血操作を繰り返し行ったが、ルートを通じた体外循環や遠心操作等で人工物に好中球が付着したり、採血・出血も加わりヘモグロビン濃度と好中球数が減少したものと考えられる。一方、好中球の血中細胞数は減少したが、脱血後には好中球の接着・遊走能の上昇や活性酸素産生能の亢進がみられ、好中球の活性化が生じたものと考えられた。これに対し、脱血後には各種薬剤の輸液投与がなされ、(ADP) リポソーム、H12(ADP) リポソームおよびPRPでは好中球数に増減はみられず、好中球機能についてはむしろ活性化が抑制される現象がみられた。これは、人工血小板成分のADP (アデノシン) に好中球の接着・遊走能や活性酸素産生能を抑制する作用があることと関係する可能性が考えられた (Elzschig HK, et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation. *Blood* 104: 3986-3992, 2004; Kumar V and Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* 616: 7-15, 2009)。前年度の健常人の血液を用いた *in vitro* の検討でも、ADP を含有しない

H12(PBS) リポソームにおいて好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光) やMPO脱顆粒能の亢進が認められ、活性酸素の代謝がMPOの脱顆粒によって促進されるか、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。

また、他の輸液中の血漿成分や血小板成分の抗炎症作用・抗酸化作用が好中球機能に影響した可能性も考えられる (Jancinova V, et al. Blood platelets decrease concentration of reactive oxygen species produced by polymorphonuclear leukocytes. *Bratisl. Lek. Listy.* 105:250-155, 2004)。たとえば、血小板から放出されるセロトニンにはMPOの酵素活性阻害作用や活性酸素消去作用も報告されており (Ciz M, et al.

Serotonin modulates the oxidative burst of human phagocytes via various mechanisms.

Platelets. 18: 583-590, 2007)、今後、素材の最適化やメカニズムの究明においてもセロトニンの介在を考慮する必要があると考えられる。

一方、同時投与の実験条件では、肝臓に外傷性出血を起こす侵襲が加わったために、さらに好中球数の減少と好中球機能の亢進がみられた。この現象は、末梢血中に活性化好中球が出現し、それらが組織浸潤する可能性を示唆する。また、外傷性出血時のH12(ADP) リポソームの同時投与条件と(ADP) リポソームの投与条件では、出血が遷延し血中ヘモグロビン濃度が低下した。赤血球にはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) やカタラーゼなどの抗酸化酵素が大量に含まれており、止血効果が十分でなく赤血球が失われる状態では活性酸素の発生が増大し、酸化ストレスが顕在化しやすくなる可能性が示唆された。したがって、より効力の高い人工血小板は炎症や酸化ストレスの防御においても効果が期待できるものと考えられた。

E. 結論

本研究では、血小板減少状態で外傷性出血を起こす動物実験モデルにおいて、人工血小板の投与が末梢血好中球の機能に及ぼす影響について検

討を行った。脱血と外傷、出血により好中球の接着・遊走能と活性酸素産生能の上昇がみられたが、人工血小板の投与による明らかな増減等の影響はみられなかったものの、好中球機能の抑制作用が示唆された。前年度の検討でも、H12(ADP)リポソームに活性化好中球の機能を抑制する抗炎症作用、抗酸化作用がみられたため、引き続きこの点を強化した素材の最適化と有効性・安全性に関する評価指標の確立が必要と考えられる。

F. 健康危険情報：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) リポソームは止血機能を増強する。血液は、直径数 10 μm の微小血管系まで必要物質を運搬する能力を有する。血液中の過度の止血機能の増強は微小血管における血流の維持、あるいは直径数 mm の臓器灌流血管における閉塞性血栓の形成阻止に悪影響を与える可能性がある。

止血/血栓形成は生体内のバランスであるため、人工血小板の開発にあたって血栓性合併症を全く惹起しないとのコンセプトを満たすことは困難である。心筋梗塞、脳梗塞などの血栓イベントの既往を有する症例は、消化管出血、頭蓋内出血などの出血イベント増加を理解しても、抗血小板薬、抗凝固薬などの抗血栓薬を服用する場合がある。現在の、不可逆性の高い抗血小板服用中の症例が頭蓋内出血などを惹起した場合には、血栓イベントリスクの増加を覚悟しても止血機能の増強を図らなければならない場合がある。

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うとともに、H12 (ADP)リポソーム投与前後におけるマウスの行動を観察し、リポソーム投与の微小循環障害の有無を機能的に評価した。マウスの精巣動脈血栓モデルにおける血小板、血小板血栓中への H12 (ADP)リポソームの集積動態とともに H12 (ADP)投与前後のマウスの脳組織を用いて、微小血管内における H12 (ADP)の集積の有無を評価した。

高濃度の H12 (ADP)投与後にはマウスの行動異常を認めた。しかし、行動異常を起こしたマウスの脳組織内に H12 (ADP)リポソームの過度の集積を認めなかった。同一条件にて尾静脈切断部位に形成された血栓内には過剰な H12 (ADP)リポソームの集積を認めた。

H12 (ADP)リポソームは必ず速度の低い出血部位の止血血栓中に選択的集積した。しかし、過剰投与時のマウスの行動異常のメカニズムについて更なる検討が必要である。

A. 研究目的

止血と血栓は生体内の微妙なバランスである。ヒトの血液は末梢の微小循環まで酸素、栄養素などの物質を滞りなく運搬する流動性と同時に血管損傷部位では速やかに凝固して血管の恒常性を維持するという矛盾した性質を有している。太古の人類において、止血機能の存在が重要で

あった。人類は外的による襲撃、暗闇のなかでのけがなど多くの失血リスクを負っていたからである。一方、近年長寿化とともに止血機能の過剰が問題となる場合が生じた。心臓、脳などの重要臓器を灌流する直径数mmの臓器灌流血管の血栓性閉塞による心筋梗塞、脳梗塞などが過度の止血機能により惹起される典型的な問題

である。

過度の止血機能による心筋梗塞、脳梗塞などの予防、治療を目的としてアスピリンに代表される抗血小板薬が広く使用されている。抗血小板薬の服用により心筋梗塞、脳梗塞などの血栓イベントの発症を25%程度予防できる。一方、頭蓋内出血に代表される重篤な出血イベントは1.5倍程度に増加する。個別の症例の病態に応じて、個別的に止血機能を調節する必要がある所以である。

H12 (ADP)リポソームは止血機能の損なわれた症例において重篤な出血を避ける、ないし治療するために用いることを想定する。血栓イベントリスクの上昇が予想されるが、その詳細を明確に理解する必要がある。

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. H12 (ADP) リポソームの投与

ケタミンによる前麻酔ののち、ネ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. マウスの行動異常の観察

昨年度の検討の時点から、H12(ADP)リポソーム投与マウスにおける行動異常を飼育者が観察していた。本年度は、マウスの飼育ケージ内にハイビジョンビデオカメラを設置して H12 (ADP)リポソーム投与後のマウスの行動を、同量

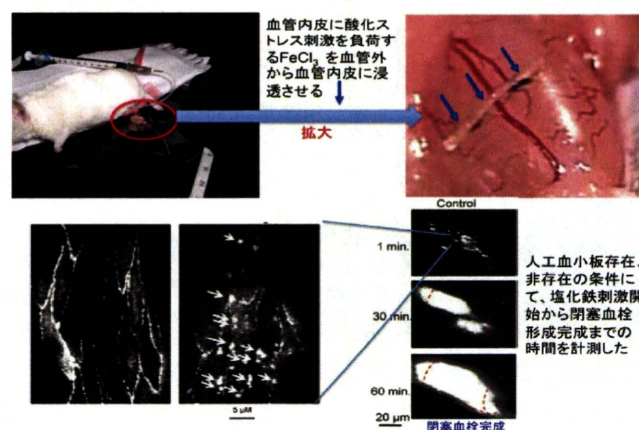
の生理食塩水投与群と比較検討した。

5. 脳組織中の H12(ADP)リポソームの集積の有無の確認

行動異常の原因として脳虚血などが想定された。H12(ADP)リポソームは蛍光を有しているため脳組織を蛍光顕微鏡にて観察し H12(ADP)リポソームの集積の有無を確認した。

6. 精巣動脈血栓モデル内、尾静脈損傷止血モデル内における H12(ADP)リポソームの集積

脳微小血管内における H12(ADP)リポソーム集積のコントロールとして、同一条件下における昨年度作成したマウス精巣動脈血栓モデル(下図)内および尾静脈止血血栓モデル内の H12(ADP)リポソームの集積の有無を確認した。

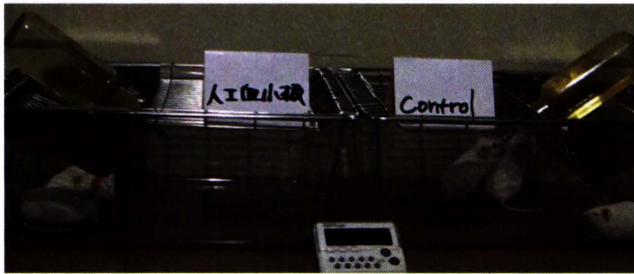


C. 結果

1. H12 (ADP) リポソーム投与後のマウスの挙動

投与前において、両ケージ内のマウスともに活発に行動していた。投与開始 15 分後において、両群には大きな差異を認めなかった。しかし、投与開始 30 分後よりのちにおいては、H12(ADP)リポソーム投与マウスにおいて、行動の活力が低下しマウスはケージの隅に居るようになった。この経過は投与開始 70 分後まで持続した (次ページ左上図、右：生理食塩水投与マウス、左：H12(ADP)リポソーム投与マウス)

同様の挙動異常は H12(ADP)リポソームを 10 mg/kg 以上投与した時にのみ認められた。10 mg/kg 以下の投与後には挙動異常は全く認められなかった。



2. 脳組織中の H12(ADP)リポソームの集積の有無の確認



脳組織切片中には上図に示すようにH12(ADP)リポソームの蛍光を認めた。行動異常を起こしたマウスにおいて、H12自体の著しい集積は認めなかった。

3. 精巣動脈血栓モデル内、尾静脈損傷止血モデル内における H12(ADP)リポソームの集積

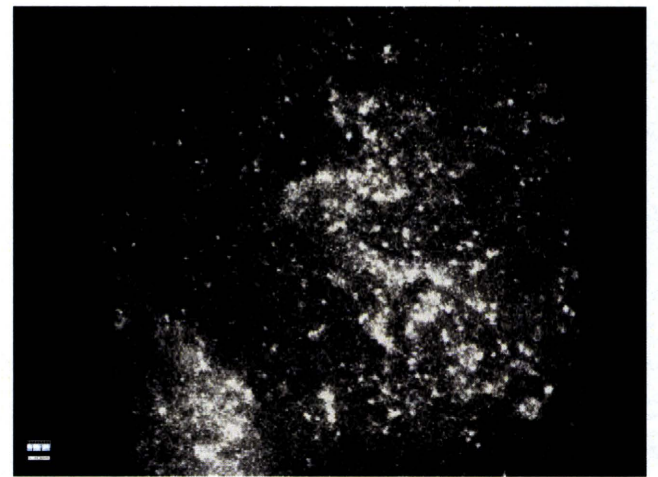
心臓から採取した血液中のH12(ADP)リポソームの分散を右カラム上図に示した。前節の脳組織中の分散よりも単位面積当たりのH12(ADP)リポソームが多いことが分かる。真マウスが行動異常を起こした原因を脳内微小血管に集積したH12(ADP)リポソームとすることは難しい。

同一実験条件にて尾静脈損傷部位に形成され

た血栓中のH12(ADP)リポソームの集積も検討した。右カラム下図に示したようにH12(ADP)リポソームの著しい集積を認めた。



上図：心臓から採取した血液



上図：微静脈損傷部位に形成された止血血栓

H12 (ADP)リポソームの局在を左図に示す。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（左図赤の部分か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に対する配慮が必須である。頭蓋内出血、輸血にもかかわらず死に至る致死性出血、など出