

201108004A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

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)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠  
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

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)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠  
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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)

(H21- 政策創薬- 一般- 005)

平成 23 年度  
総括・分担研究報告書

平成 24 年 3 月

・・・・・・・・・・・・・・・・ 研究組織 ・・・・・・・・・・・・・・・・

(研究代表者)

半田 誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

池田康夫 早稲田大学理工学術院 教授

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

木下 学 防衛医科大学校 准教授

丸山 徹 熊本大学薬学部 教授

鈴木克彦 早稲田大学スポーツ科学術院 准教授

後藤信哉 東海大学医学部 教授

村田 満 慶應義塾大学医学部 教授

鈴木英紀 日本医科大学 准教授

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

## 目 次

# 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)

## 平成 23 年度研究報告

### I. 総括研究報告書

半田 誠……………1

### II. 分担研究報告

#### 1. 止血能向上を目指した血小板代替物としてのリポソーム組成の検討

池田 康夫……………13

#### 2. H12-(ADP)リポソームの品質保証体制の構築

武岡 真司……………18

#### 3. 外傷性大量出血時の急性易出血性病態に対する H12(ADP)リポソームの止血制御効果 —臓器出血後の投与効果について—

木下 学……………24

#### 4. H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

丸山 徹……………50

#### 5. その 1 : 人工血小板投与が血液生化学検査指標と肝臓の炎症性サイトカイン産生に 及ぼす影響

その 2 : 血小板減少ウサギモデルにおける外傷性出血に対する人工血小板投与が  
好中球機能に及ぼす影響

鈴木 克彦……………67

#### 6. マウスモデルを用いた安全性評価

後藤 伸哉……………76

#### 7. H12-(ADP)小胞体の安全性評価 : 血栓誘発性の検討/静脈血栓マーカへの影響

村田 満……………81

#### 8. 血小板凝集塊に巻き込まれた H12(ADP)リポソームの形態について

—急速凍結割断レプリカ法による検討—

鈴木 英紀……………89

#### 9. $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンと H12 の結合機序に関する研究 : 機能評価系の確立

鎌田 徹治……………94

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

……………103

### IV. 研究成果の刊行物・別冊

## I . 総括研究報告

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業)

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)

総括研究報告書

研究代表者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

## 研究要旨

**【研究目的】** H12 (ADP) リポソーム (LP) の効力と安全性について、品質保証体制の構築に向けた基礎検討とともに、人工血小板としての適格性を評価した。

**【研究方法】** 外傷性臓器損傷ウサギモデルを用いて大量輸血に伴う急性血小板減少症への適応を実地臨床に則したプロトコルで評価し、炎症系への作用を好中球の活性化酸素産生能などを指標に検討した。また、肝臓における炎症性サイトカインの発現を測定した。RI 標識物の体内動態を健常マウス、ラット、ウサギと薬剤起因性血小板減少ラットで解析し、データのヒトへの外挿を試みた。血栓症誘発作用を DIC ラットモデルやマウスの脳循環観察系で評価した。LP の品質保証について、製造工程の標準化に向けた物性評価項目を検討し、*in vitro* 高性能を有する脂質組成改変 LP の止血効果を薬剤性血小板減少ラットで評価し、LP の微細形態解析を急速凍結切断レプリカ法で、そして、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 発現細胞への蛍光標識 LP の結合測定系の性能検定法としての有用性を検討した。

**【研究結果】** LP の事後投与により、一過性の圧迫止血を施した肝臓損傷部位からの出血が効果的に阻害され、モデル動物の救命率が向上した。また、LP は全血及び肝臓での炎症反応を惹起しなかった。LP は薬剤として十分な血液滞留性と体外排泄性を示し、ヒトでの予測半減期からも予防投与への適応拡大の可能性も指摘できた。ラットおよびマウスでの血栓誘発・増強作用を認めなかった。物性評価項目として H12 含有量、脂質構成比と内包 ADP 量が追加できた。物理的变化を受けて LP は ADP を放出することがわかった。脂質改変 LP は機能せず、止血作用には H12 と ADP の必要性が明らかとなった。標的蛋白発現細胞へ結合能測定により LP ロット間の性能評価を行なうことができたが、不安定な培養細胞を用いる必要性から、標準検定法には適さない可能性が示唆された。

**【考察・結論】** 効力と安全性の面から、当該 LP の人工血小板としての適格性が評価できた。緊急性があり血小板輸血が不便な外傷性急性血小板減少症への適応を目指した次なるステップへの移行の妥当性が明確となった。

(研究分担者)

池田康夫	早稲田大学理工学術院	教授
武岡真司	早稲田大学理工学術院	教授
木下 学	防衛医科大学校	准教授
丸山 徹	熊本大学薬学部	教授
鈴木克彦	早稲田大学スポーツ科学術院	准教授
後藤信哉	東海大学医学部	教授
村田 満	慶應義塾大学医学部	教授
鈴木英紀	日本医科大学	准教授
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部	講師

## A. 研究目的

輸血用血液のうち、保存期間が短く、緊急使用が困難な血小板製剤を代替する人工血小板の開発は、欧米では50年以上の歴史があるにもかかわらず、いまだ実用化に至っていない。一方、我が国では、平成9年度より厚生労働科学研究費の補助を得て、独自の人工物の開発研究が開始され、多くの候補微粒子の中から、すべての構成成分が人工的に合成された H12(ADP) リポソームが人工血小板の最終候補薬剤として絞り込まれた。

ポリエチレングリコール (PEG) 鎖で表面修飾された本微粒子は、ヒトフィブリノゲン $\gamma$ 鎖のカルボキシ末端を構成する12個のアミノ酸配列(400HHLGGAKQAGDV411 : H12)の人工ペプチドを、PEG鎖を介してその表面に結合させ、血小板のアルファ顆粒に存在する生理的な血小板刺激物質のアデノシン2リン酸 (ADP) を内包化させた平均粒径250ナノメートルのリン脂質小胞体である。H12(ADP) リポソームは H12 を介して活性化した血小板に高親和性結合することで、出血部位に特異的に集積し、血小板凝集を増強するとともに、内包化された ADP を凝集依存性に放出することで、血小板輸血に匹敵する止血補助効果を発揮することが抗がん剤 (ブスルファン) 惹起血小板減少症動物モデルを用いて示された (Okamura Y, *et al*: Development of fibrinogen g-chain peptide-coated, adenosine diphosphate- encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* 7: 470-477, 2009)。

本研究 (3カ年計画の最終年度) は、創薬化への前臨床開発ステップとして、H12(ADP) リポソームの効力と安全性について、従来の輸血/血栓止血学的アプローチに加え、侵襲防御学、薬物動態学、免疫学等の見地から、1) ニーズのある病態モデルでの薬効と、2) 炎症や病的血栓の誘発等の安全性について集学的なミクロ/マクロ評価を行い、3) 製造物の品質保証体制の構築に向けた基礎検討とともに、物性能の最適化を平行して押し進めながら、人工血小板として十分な安全域(薬効/毒性のマージン)が確保できる可能性が十分な試験物であるか否かについて最終確認を行なった。



## B. 研究方法

### 1. H12(ADP) リポソーム及び脂質構成比改変リポソームの調整 (武岡) :

DPPC、cholesterol、DHSG、polyethylen glycol (PEG) -DSPE、H12-PEG-Glu2C18 を、モル比 5/5/1/0.033/0.033 でベンゼンに溶解後、凍結乾燥させ、ADP 水溶液 (1 mM) と水和させ、押出造粒法を用いて H12(ADP) リポソームを製造し (粒径  $250 \pm 80$  nm)、超遠心分離後 PBS に分散させ、ゲルろ過してリポソーム分散液を調整した。陰性荷電脂質である DHSG の含量を増やしたりリポソーム (H12 非結合、ADP 非内包) は、上記構成成分のモル比を 5/5/5/0.045/0.045 に変えて製造した。この改変リポソームの止血効果の評価は、ブスルファン惹起血小板減少症モデルラットの尾切出血時間で検討した (Okamura Y, *et al*: *J Thromb Haemost* 7: 470, 2009) (池田)。

### 2. H12(ADP) リポソームの事後投与プロトコルによる効力評価: 外傷に伴う大量出血/輸血による急性血小板減少ウサギモデルでの検討 (木下)

麻酔したウサギの大腿動・静脈から 25 ml の脱血と自己洗浄赤血球/アルブミン溶液の輸血を 8 回繰返すことで最終的に総循環血液量相当の用量交換を行って、大量出血/輸血に合併する希釈性血小板減少症モデルを作成した。続いて動物を開腹して肝臓に Derma punch で直径 5mm の損傷を作成し、組織欠損箇所を 5 分間小児用尿道カテバルーンで圧迫し、その間に乏血小板血漿 (PPP) に浮遊させた H12(ADP) リポソームやその対照物: PPP に浮遊させた (ADP) リポソーム、多血小板血漿 (PRP)、PPP 単独を投与し、創部からの持続的な出血を定量的に解析した後、循環容量補正なしにそのまま閉腹して飲水のみで予後を観察した。血算や血液凝固パラメータ、耳介出血時間、Sonoclot を用いた全血凝固能を脱血前、血液交換後、薬剤投与後に適宜測定した。また、炎症反応への影響は、各タイムポイントで採血した全血をハイドルゲルに上層して、好中球の活性化酸素活性をルミノール発光反応で、また接着・遊走能をゲル内侵入細胞数で評価した (鈴木克)。

### 3. H12(ADP) リポソームの *in vivo* 安全性評価:

1) リポソームの体内動態 (丸山): 脂質コレステロール及び包含 ADP をそれぞれ  $^3\text{H}$  と  $^{14}\text{C}$  で標識したリポソームを健常マウス、ラット及びウサギに投与してその血中濃度、臓器移行、糞や尿への排泄の動態を解析した。得られた動物の実測パラメータをアロメトリック式に外挿して、ヒトにおける体内動態を予測した。ブスルファン惹起血小板減少症モデルラットは既報 (Okamura Y, *et al*:

*J Thromb Haemost* 7: 470, 2009) に従い作製した。リポソーム内包化 ADP の代謝経路を検討するために、ラットの尿中の代謝産物を HPLC にて測定した。

2) 血栓症誘発作用の評価 (後藤、村田): リポソームの脳血管内集積の有無を健常マウスの脳組織を用いて検索した (後藤)。種々の濃度に希釈した組織トロンボプラスチン試薬 (トロンボチェック PT プラス、Sysmex、ウサギ脳由来) を 60 分間持続投与して DIC ラットモデル作製し、陰性対照と比較して、常用量および高用量のリポソームの投与によるアンチトロンビンや D-ダイマー等の血液凝固パラメータの変動を測定した (村田)。

3) 肝臓での炎症反応惹起作用 (鈴木克): リポソームを健常マウスに投与して、24 時間後の血液生化学検査および肝臓組織における種々の炎症性サイトカインの産生 (mRNA) を PCR で定量した。

#### 4. その他の *in vitro/ex vivo* 実験系:

1) リポソームの血小板への反応形式の形態的検索 (鈴木英): 急速凍結割断レプリカ法を用いて、トロンビンで活性化し、あるいは凝集した血小板との反応を透過型電子顕微鏡で観察した。

2) リポソームの機能検定法の検討 (鎌田):  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリン発現 CHO 細胞と蛍光標識リポソームの結合をフローサイトメータで解析し、リポソームのロット間での差異を検討した。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. H12(ADP) リポソームの効力評価 (木下)

1) H12(ADP) リポソームの事後 (出血後) 投与により、比較した血小板輸血と同様もしくはそれ以上に肝臓損傷部位からの出血が強力に阻害され、大量出血/輸血に伴う急性血小板減少症モデル動物の救命率が著明に改善された: 前年度までの薬剤事前投与 (損傷 10 分前) から、より実地臨床に合わせて肝臓損傷後に、局所にバルーンカテを挿入して 5 分間の止血処置 (ダメージ・コントロール) を行ないながらの投与 (事後投与) プロトコルを検討した (木下 H23 年度分担研究報告、図 1-4)。実験動物の循環血液量 (100ml) に相当する血液交換 (脱血と自己洗浄赤血球輸血を 8 回繰返す) を行うことで、ヘモグロビン値や白血球数の大きな変動なしで、血小板数は  $200 \times 10^3 / \cdot 1$  から  $50 \times 10^3 / \cdot 1$  に減少し (図 5)、同時に凝固因子も前値の 30% 程度に低下して (表 1)、希釈性血小

板減少症／凝固因子欠乏症が安定的に再現できた。常用量の 20 mg/kg の H12(ADP)リポソーム／PPP 浮遊液 (N=5) と比較対照の PRP (多血小板血漿、N=5) と PPP (乏血小板血漿、N=3) の臨床効果を検討したところ、PPP 投与群では 24 時間後までには全例が出血性ショックで死亡したが、それに比較してリポソーム群では 3 例 (60%) が 72 時間まで生存した。一方、期待に反して、血小板輸血に相当する PRP 群では投与 15 分後の血小板数が  $46 \pm 7 \times 10^3 / \cdot 1$  から  $65 \pm 7 \times 10^3 / \cdot 1$  増加したにもかかわらず (表 3)、初期の死亡は PPP 群にくらべて抑えられる傾向にあったが、最終的には 1 例 (20%) のみが 72 時間後に生存した (図 8、11)。実際の肝臓からの出血量を比較すると、最初及びそれに続く 5 分間とも、陰性対照群 (PPP) と比較してリポソーム群では著明な減少を示したが、PRP 群では後の 5 分間でのみ有意な減少を示した (図 9)。一方、リポソーム群と PPP 群では遜色ない止血効果が認められたが、PPP 群では止血が得られなかった (図 10)。大変興味あることに、*in vitro* で二次止血を評価する Sonoclot 全血凝固時間はリポソーム投与 15 分後で明らかな改善が観察され、その効果は PRP に匹敵するかそれ以上で、一方、PPP では全く改善効果は認められなかった (図 12)。

今回の我々の報告は、H12(ADP)リポソームが人工血小板として、緊急処置が必要な大量出血・輸血に伴う稀釈性血小板減少症の治療薬剤として実際の実地臨床に利用できる可能性を示した。しかしながら、事前投与 (H22 報告) に比較して、圧迫止血処置を併用したにもかかわらず、薬剤の事後投与の止血効果は明らかに低かった (72 後の救命率：100% vs 60%)。今後は、実験例数を増やしながら (例えば、今回の陰性対照である PPP 群の例数はわずかに 3 例)、より solid なデータの蓄積を行なうことを基本として、薬剤の投与量や投与方法等の実験プロトコルさらに検討してゆく必要がある。また、陽性対照である PRP 群との間で、その止血効果 (止血するまでの時間、凝固時間への影響) の違いがなぜ起こるのかも解明する必要がある。

## 2. 安全性の評価 (丸山、鈴木克、村田、後藤)

1) H12(ADP)リポソームは健常及び血小板減少動物のいずれでも十分な血液滞留性と低い臓器蓄積性を示し、小動物の体内動態パラメータからの推定によりヒトへ応用が十分可能であることがわかった：<sup>3</sup>H-コレステロールおよび／または <sup>14</sup>C-ADP で標識されたリポソーム (10mg/kg) の体内動態を健常のマウスとともに今回はラットとウサギを加えて検討した。マウスおよびラットにおける標識体の血中動態解析から、マウスにおいては <sup>3</sup>H と比較して <sup>14</sup>C の血漿濃度が時

間とともにより急速に減少することが示された(丸山 H23 分担研究報告、図 1)。  
一方、主に肝臓と脾臓への臓器内移行や糞と尿への体外排泄の動態パターンは  
両者で相違はなかった(図 2、3)。さらに、ウサギにおいても十分な血中滞留性  
を認めた(図 5)。マウスにおける標識 ADP のより速い消失の原因は不明である  
が、リポソームからの漏れの可能性が考えられた。HPLC による尿中代謝産物の  
解析によって、内包化された ADP のラットにおける代謝は、ヒト(尿酸が最終  
物)とは異なり、げっ歯類で知られているアラントインを最終物とした生理的  
経路を取ることが明らかとなった(図 4、表 1)。3種類の小動物から得られた  
動態パラメータをアロメトリック式に外挿して、得られた数値からヒトにおけ  
る半減期を計算したところ約 18 時間と予測された(図 6)。抗癌剤のブスルファ  
ンによる血小板減少症をラットに作製して、リポソームの体内動態を検討した  
ところ、健常動物に比較してそのパターンに大きな差異はないものの、血中滞  
留時間の減少とともにより肝臓への(脾臓との比較)移行比率が高い傾向を認  
めた(図 9、10)。そして、体内動態を反映して、尿および糞への排泄促進の傾  
向が認められた(図 11)。

以上より、H12(ADP)リポソームは健常動物および薬剤性血小板減少症動物モ  
デルで十分な血中滞留性と体外への排泄性を有していることが明らかとなった。  
そして、アニマルスケールアップによるヒトへのデータ適用で、出血を予防す  
る薬剤としても開発する価値がある可能性が予測された。今後は、サルでの実  
証を視野に、もう一つの機能成分である H12 ペプチドの体内動態解析も含めて、  
PK/PD 解析や毒物試験の基礎となる solid なデータの集積が必要である。

2) H12(ADP)リポソームは健常マウスおよび急性血小板減少ウサギモデルに  
おいて明らかな炎症反応の誘発や増強作用をそれぞれ認めなかった：健常マウ  
スへの投与によって、対照物とも比較して、血清中の肝機能(AST、ALT、ALP、  
LAP など)も含めた血液生化学検査値の有意な変動はなかったが、クレチニンキ  
ナーゼ値の上昇傾向が認められた(鈴木克 H23 分担研究報告、その 1、表 1、図  
1)。肝臓内での炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-1)の合成促  
進(mRNA)作用も認められなかった。一方、全血を使用した末梢血好中球の活  
性化酸素の産生レベルやハイドロゲル内への接着・遊走能は血液交換後に増加  
したが、他の対照物と同様にリポソーム投与で増加しなかった(その 2、図 1-  
6)。当該リポソームが炎症や酸化ストレスを誘発あるいは増強する可能性は低  
く、異物反応の観点からその安全性が示された。

3) H12(ADP)リポソームは DIC モデルにおいて血栓症誘発・増強作用を示さなかった：当該リポソームは止血局所で活性化した血小板に結合することで血小板凝集を促進して、その止血作用を発揮することが今までの検討により明らかにされてきた。しかし、出血ばかりでなく動脈硬化や炎症等の全身的な病態で血小板は容易に活性化されることから、この薬剤の血栓症誘発・促進作用が危惧されてきた。今までは、健常もしくは血小板減少動物を対象に検討を行い、血栓症マーカーの測定や組織学的観察で、血栓症を引き起こす証拠は一切得られていなかった。そこで、より鋭敏な血栓症モデルとして DIC ラットを作製し、血栓症マーカー (D-ダイマー、アンチトロンビンなど) を指標に当該リポソームおよび対照物が及ぼす影響を検討した (H23 村田分担報告、図 3a)。その結果、常用量 (20 mg/kg) および高用量 (40 mg/kg) において、陰性対照と比較して、DIC 増強作用は認めなかった (図 3b)。DIC は全身性の微小血管血栓症であり、血中にも大量の活性化血小板が循環していると考えられる。それにもかかわらずリポソームの DIC 促進作用は認めなかった。トロンボプラスチンの投与量を変えることで、いくつかの DIC レベルでの検討や投与量をより増加させた場合の影響などを通じて、より広範な解析が必要である。

一方、リポソームの投与で、マウスに異常行動が観察された (H22 後藤分担報告)。そこで、蛍光標識体の血管局在を脳組織で検討したが、脳内の血栓症の可能性を示す証拠は得られなかった (H23、図 1、2)。観察された動物の異常な行動様態の科学的妥当性を示すには、対照実験や dose-response 効果などの基礎データの取得が不可欠であることが指摘できた。

### 3. H12(ADP)リポソームの品質・物性最適化/標準化 (武岡、池田、鈴木英、鎌田)

1) 品質保証体制構築に向けた物性評価基準項目の追加：リポソーム製造物の物性評価項目について、従来の3項目 (脂質定量による濃度、粒子径、ゼータ電位) に加えて、蛍光定量法による H12 結合量の定量 (H23 武岡分担報告、図 1、2)、NMR による脂質構成比の定量 (表 3)、そしてゲル濾過/HPLC による内包化 ADP の含量定量 (図 3、表 4) が達成され、上記項目についてロット間の検定を行なった。

2) H12(ADP)リポソームの止血機能には H12 と ADP が不可欠である：H12 非結合及び ADP 非内包でありながらその脂質構成比を改変して、表面陰性荷電を高

めた mock リポソームは、活性化血小板に特異的に高親和性に結合し、血小板凝集計でのアゴニスト惹起血小板凝集の増強作用を示した。そこで、その *in vivo* 機能を確かめるために、ブスルファン惹起血小板減少症をラットで作製して、延長した尾切出血時間の短縮作用を検討した。しかしながら、期待に反して、脂質改変リポソームの効果は陰性対照と同様に、認められなかった (H23 池田分担報告、図 4)。陽性対照が設定されていないため断言はできないが、*in vitro* の効果が必ずしも *in vivo* で反映されないこと、そして H12 表面修飾と ADP 内包化が当該リポソームの止血機能に不可欠である可能性が指摘できた。脂質構成比の改変による性能の最適化は達成できなかった。

3) H12(ADP) リポソームは活性化した血小板と結合することで物理的な形態変化を起こし、その内部から ADP を放出する：急速凍結割断レプリカ法による電顕解析にて、リポソームは直径 100-250 nm の球状を示し (H23 鈴木英分担研究報告、図 1)、一方、血小板凝集に巻き込まれたリポソームはラグビーボール様の楕円形に変形し (図 3、4)、興味あることには一部ではその表面に小孔様の穴が観察された (図 5)。リポソームからの ADP 放出は血小板凝集に依存性であることから、凝集に伴う相互の接着力に関連した物理的変化を受けて脂質膜が攪乱された漏出の結果ではないかと想像されてきた。今回の形態的観察結果はこれまでの予想を裏付けるものであった。

4) H12(ADP) リポソームの性能評価には培養細胞を使用した測定系は有用であるが標準化法としては適切でない：ヒトから採取した血小板を用いずに、リポソームの活性化血小板への結合が評価できる測定系を開発することは、品質保証体制の構築には不可欠である。 $\alpha$  IIb $\beta$ 3 インテグリンの一過性高発現細胞への蛍光標識リポソームの結合実験を検討したところ、活性化インテグリン (抗体惹起及び変異型) に依存性の結合が測定でき、実際、2つのロット標品間でその親和性に相違が見られた。(H23 鎌田分担報告、図 3、4、5)。一方、安定発現細胞では複合体の発現レベルが低く結合実験には適さなかった (図 6、7)。今回のヒト血小板にかわって培養細胞を用いた測定系は、リポソームの性能 (活性化血小板への結合能) を高感度で評価するのに有用であることが示された。しかしながら、細胞を使用することを含めていくつかの不確定要因が認められることから、標準測定法としては無細胞系の構築が必要であることが示された。

## D. 結論

H12(ADP)リポソームの人工血小板としての適格性を、効力と安全性の面から確認することができた。とくに、緊急性があり血小板輸血のタイムリーな利用が困難なニーズの高い対象（外傷に伴う大量出血／輸血による急性血小板減少症）への適応を視野に入れた臨床試験への移行準備の方向性が示された。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

（原著）

### 1. 論文発表

- (1) Suzuki, H., Okamura, Y., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M. Ultrastructural analysis of thrombin-induced interaction between human platelets and liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute, *Thrombosis Research*, **128**(6), 552-559 (2011)
- (2) Tokutomi, K., Tagawa, K., Korenaga, M., Chiba, M., Asai, T., Watanabe, N., Takeoka, S., Handa, M., Ikeda, Y., Oku, N. Decoration of fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide on adenosine diphosphate-encapsulated liposomes enhances binding of the liposomes to activated platelets, *International Journal of Pharmaceutics*, **407**, 151-157 (2011)
- (3) Yoshida, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Ikeda, Y., Handa, M., Share-dependent suppression of platelet thrombus formation by phosphodiesterase 3 inhibition requires low levels of concomitant Gs-coupled receptor stimulation. *Thrombosis and Haemostasis*, **105**(3), 487-495 (2011)
- (4) 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)

(総説)

(1) 半田誠：人工血小板. 脈管学、51(3)、333-338 (2011)

(2) Taguchi K, Maruyama T, Otagiri M. Pharmacokinetic properties of hemoglobin vesicles as a substitute for red blood cells. *Drug Metab Rev.* 43:362-73. (2011)

## 2. 学会発表

(1) Handa M, Nishikawa K, Takeoka S, Kinoshita, M. Synthetic platelet H12-(ADP) liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver bleeding. *American Association of Blood Banks Annual Meeting 2011*. Oct 22, 2011, San Diego, USA

(2) 新井愛美、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2報)」，第33回日本バイオマテリアル学会 (2011. 11, 京都)

(3) 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：大量出血に伴う急性血小板減少病態に対する人工血小板 H12 (ADP) リポソームを用いた止血救命対策. 第26回日本 shock 学会総会 2011, 浜松. (日本 Shock 学会雑誌, p55: 26, 2011)

(4) 萩沢康介、木下学、西川可穂子、庄野聡、勝野俊介、鈴木英紀、齋藤大蔵、関修司：急性血小板減少病態における H12 (ADP) liposome の臓器出血部位への集積と止血制御効果. 第18回日本血液大体物学会 2011, 札幌. (人工血液 p73: 19, 2011)

(5) 萩沢康介、木下学、西川可穂子、庄野聡、齋藤大蔵、勝野俊介、西田育弘：大量出血時の血小板減少性易出血病態での外傷性肝出血と人工血小板による止血救命効果. 第48回日本腹部救急医学会総会 2012, 金沢. (日本腹部救急医学会雑誌, p365:32, 2012)

(6) 氏平隼人、田口和明、渡邊博志、勝野峻介、新井愛美、武岡真司、池田康夫 半田誠、小田切優樹、丸山徹：マウス及びラットにおける血小板代替物 (H12 (ADP) リポソーム) の体内動態評価 第18回日本血液代替物学会年次大会 2011年10月27日-28日

(7) 氏平隼人、田口和明、渡邊博志、勝野俊介、新井愛美、武岡真司、池田康



夫、半田誠、異島優、小田切優樹、丸山徹：血小板代替物（H12（ADP）リポソーム）の体内動態評価 第28回日本薬学会九州支部大会 2011年12月10日-11日

(8) Suzuki H, Okamura Y, Ikeda Y, Takeoka Y, Handa M: Thrombin-induced interaction between human platelets and fibrinogen g-chain dodecapeptide-modified liposomes as a synthetic platelet substitute. XXIIIrd Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011.7.24-28. Kyoto.

(9) Kamata T, Handa M, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Separation of the two extracellular tails is required to propagate activation signals initiated in the cytoplasmic tails of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin. XXIIIrd Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011.7.24-28. Kyoto

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No. 7, 887, 837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

## Ⅱ. 分担研究報告

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業: 政策創薬総合研究事業)  
分担研究報告書

止血能向上を目指した血小板代替物としてのリポソーム組成の検討

分担研究者 池田 康夫 (早稲田大学 理工学術院, 教授)  
研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)  
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 $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を表面に結合させたリポソームは、活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させると共に、血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包することで(H12-(ADP)リポソーム)、その止血能が向上できることを *in vivo* にて証明してきた。

平成 22 年度、従来の H12-(ADP)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 含量を増やしたりポソーム(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比))を構築し、活性化血小板に対する結合能が顕著に高まること、血小板凝集促進効果を発揮することが明らかとなった。

そこで平成 23 年度は、DHSG 含量を増やしたことに起因するリポソーム機能への影響を明らかにするため、H12 未結合かつ ADP 未内包のリポソームを調製し、その機能評価を行った。具体的には *in vitro* 評価として血小板凝集促進能および活性化血小板との結合能の評価、血小板減少症モデルラットを用いた止血能を *in vivo* 評価した。*in vitro* 評価の結果、DHSG 含量を増やしたりポソームは H12 が結合していないにもかかわらず顕著な血小板凝集促進効果を示し、活性化血小板に対して特異的に結合することが分かった。しかしながら、*in vivo* 評価の結果、血小板減少症モデルラットに投与しても、生食群および従来組成のリポソーム投与時と比較して出血時間を短縮することはなかったため血小板の活性化を促す ADP の内包が止血のための要件であると示唆された。

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 $\gamma$ 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その止血能が顕著に向上することが確認されている<sup>1),2)</sup>。

平成 22 年度までに、従来の H12-(ADP) 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 含量を増やしたリポソーム (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18=5/5/5/0.045/0.045(モル比))を構築し、活性化血小板に対する結合能が顕著に高まること、血小板凝集促進効果を発揮することが明らかとなった<sup>3)</sup>。

そこで平成 23 年度は、DHSG 含量を増やしたことに起因するリポソーム機能への影響を明らかにするため、H12 未結合かつ ADP 未内包のリポソームを調製し、その機能評価を行った。具体的には *in vitro* 評価として血小板凝集促進能および活性化血小板との結合能の評価、血小板減少症モデルラットを用いた止血能を *in vivo* 評価した。

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

3) 平成 22 年度政策創薬総合研究事業 研究報告書

## B. 研究方法

### 1. 膜組成の異なるリポソームの調製と物性評価

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制御( $\phi$  ca. 0.20  $\mu$ m)、超遠心分離精製した(100,000g, 30 min, 4°C)。次いで、PBS にて再分散、ゲル濾過にて精製し(Sephadex G25)、膜組成の異なる 2 種類の H12 未結合かつ

ADP 未内包のリポソーム(**(a)**, **(b)**)を得た。またこれらの粒径を N4PLUS (BECKMAN COULTER 社製)にて、 $\zeta$ 電位を Zetasizer Nano(Sysmex 社製)にて測定した。

**Table 1** Composition and properties of liposomes.

Lipid components	(a)	(b)
DPPC <sup>1)</sup>	5	5
Cholesterol	5	5
DHSG <sup>2)</sup>	1	5
PEG-DSPE <sup>3)</sup>	0.033	0.045
Diameter (nm)	238.6 ± 98.0	238.6 ± 98.6
$\zeta$ -potential (mV)	-13.4 ± 1.1	-19.8 ± 1.6

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)

### 2. リポソームの血小板凝集促進能評価

全血(1/10 (v/v) 3.8% クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(100g, 15 min, r.t.)、多血小板血漿 (PRP) を得た。各リポソーム (**(a)**, **(b)**) ([lipid]<sub>f.c.</sub>=0.05 mg/mL)を PRP([PLT]= $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L)に添加後、ADP(f.c. 2.5  $\mu$ M)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて透過率を連続的に測定した。

### 3. 活性化血小板とリポソームとの結合能評価

Hepes-Tyrode buffer(pH 7.4, 30  $\mu$ L)中に洗浄血小板([PLT]= $1.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, 5  $\mu$ L)を分散させ、各リポソーム(**(a)**, **(b)**)([lipid]<sub>f.c.</sub>=0.03 mg/mL, 5  $\mu$ L)を添加した。PAR-4 agonist (f.c. 1 mM, 5  $\mu$ L)にて血小板を活性化、振とう後 (10 min, 37°C)、ホルムアルデヒド(4%(v/v), 50  $\mu$ L)で固定し、Hepes-Tyrode buffer (pH 7.4, 120  $\mu$ L)にて希釈後、FACS Calibur(Becton Dickinson 社製)を用いて測定を行った。この時 PBS 添加群を未刺激(非活性化)血小板とした。また二価陽イオン依存性の反応を阻害する EDTA を添