

加した系も同時に検討した。

4. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

Wistar 系雄性ラット(8 週齢、250-300 g)にブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を 0、3 日目に尾静脈投与(全投与量 20 mg/kg)し、血小板減少ラットを作製した。

投与 10 日目のラットを血小板減少症モデルとし、出血時間の測定に使用した。血小板減少ラットに生理食塩水またはリポソーム(a), (b)を投与し([lipid]=10 mg/kg)、5 分後にラット尾静脈をクイックヒールにて切傷し(長さ 1 mm x 深さ 0.5 mm)、出血時間を測定した。

C. 研究結果及び考察

1. 各リポソームの物性評価

調製したリポソームの粒径およびゼータ電位を測定したところ、粒径は膜組成によらずほぼ同程度に制御できており、ゼータ電位は負電荷脂質 DHSG の含量を増やしたリポソーム(b)がより負に帯電した(Table 1)。

2. リポソームの血小板凝集促進能評価

リポソーム(a)を PRP に添加し ADP 凝集させたところ、一次凝集にとどまり最大透過率(T_{max})は約 30%であった(Figure 1 (a))。一方、リポソーム(b)を添加したところ、二次凝集まで到達し、 T_{max} は約 65%まで増大した(Figure 1 (b))。リポソーム(b)は活性化血小板の認識部位である H12 が結合していないにもかかわらず、血小板凝集促進効果が発現したことから、膜構成成分である負電荷脂質 DHSG の含量を増やすことで、リポソームの血小板凝集能を高めることが明らかとなった。

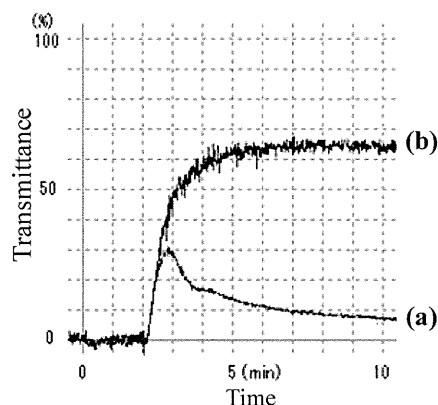


Figure 1 Enhancement effects of platelet aggregation in the presence of various liposomes. (2 min: ADP stimulation).

3. 活性化血小板とリポソームとの結合能評価

非活性化血小板(PBS, PBS + EDTA)に対しては、リポソーム(a), (b)のいずれも結合はほとんどみられなかった(Figure 2)。一方、活性化血小板(PAR-4 agonist)に対してはリポソーム(a)の結合量は変化しなかったが、リポソーム(b)では未刺激群の約 8 倍程度の結合がみられた。さらにリポソーム(b)はインテグリンを介した反応を阻害した場合(PAR-4 + EDTA)でも活性化血小板との結合が未刺激群の約 5 倍程度みられた。このことからリポソーム(b)は二価陽イオン依存性および非依存性の結合に起因し、活性化血小板と特異的に結合することが明らかとなった。

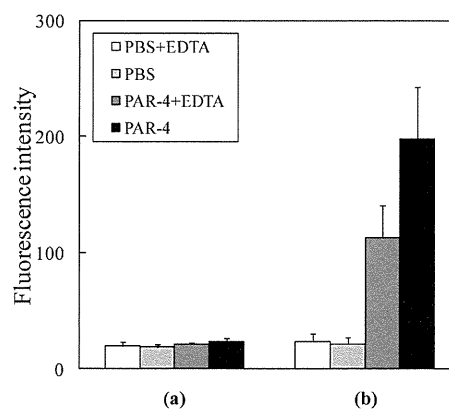


Figure 2 Binding abilities of various liposomes to the washed platelets measured by flow cytometer.

4. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

Wistar 系雄性ラット(8 週齢、250-300 g)にブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を 0、3 日目に尾静脈投与(全投与量 20 mg/kg)し、各血球変動を計測した(Figure 3)。白血球数は経過日数とともに徐々に減少がみられた(Figure 3(i))。一方、赤血球数は 11 日目まで変動なく、それ以降に急激に低下した(Figure 3(ii))。また血小板数は投与 7 日目より徐々に減少し、10 日目は約 10 万/ μL (正常値の約 1/5-1/15)となった(Figure 3(iii))。そこで投与 10 日目のラットを血小板減少症モデルとし、出血時間の測定に使用した。

正常血小板数のラット([PLT]= $73 \pm 6.5 \times 10^4/\mu\text{L}$)に生理食塩水を投与したところ、出血時間は 400 秒であったが、血小板減少ラット([PLT]= $10 \pm 2.7 \times 10^4/\mu\text{L}$)に生理食塩水を投与したところ、出血時間は 1230 秒と約 3 倍に延長した。一方、リポソーム(a), (b)を 10 mg/kg にて投与したところ、出血時間はそれぞれ 990 秒([PLT]= $8.7 \pm 2.5 \times 10^4/\mu\text{L}$)、960 秒([PLT]= $9.2 \pm 2.7 \times 10^4/\mu\text{L}$)であり(Figure 4)、生食群と比較して有意な出血時間の短縮は見られなかった。またいずれの投与群においても測定前後での血小板数の大きな変動はみられなかった。

以上より、DHSG 含量を増やしたリポソーム(b)は、*in vitro* 試験では活性化血小板を特異的に認識して顕著な血小板凝集促進能を示すものの、止血能は持たないことが *in vivo* 試験から示された。したがって、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ことが示唆された。

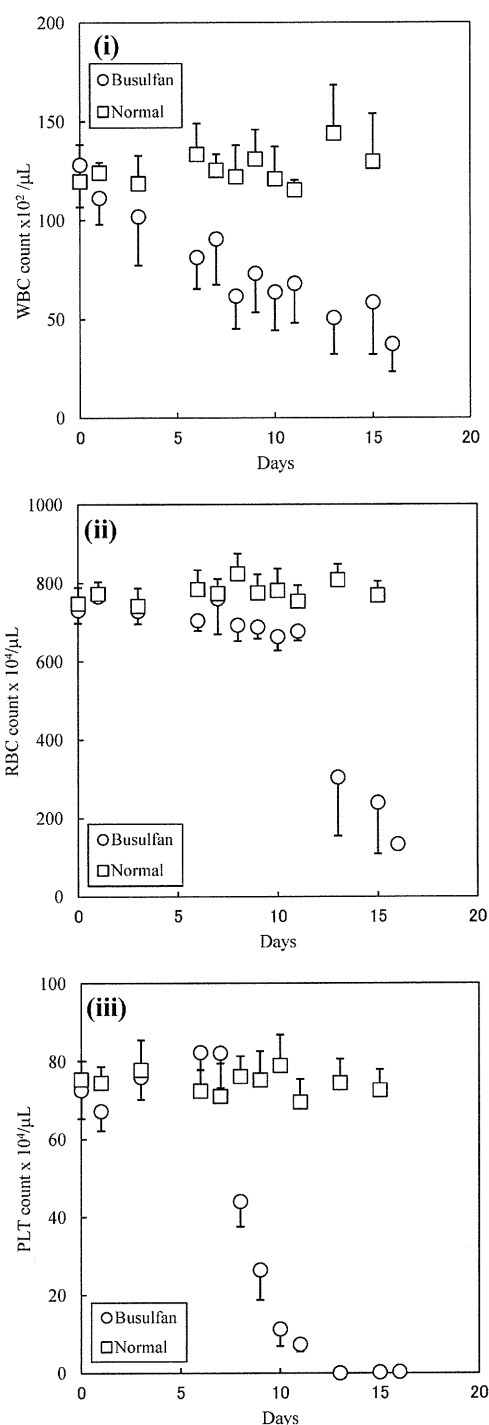
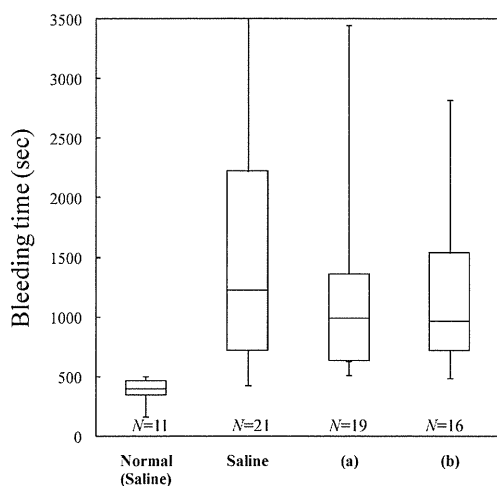


Figure 3 Preparing of Busulfan -induced rat thrombocytopenia model at a dose of 20 mg/kg.

(i): WBC, (ii): RBC, (iii): PLT count.



PLT count Before	73 ± 6.5	10 ± 2.7	8.7 ± 2.5	9.2 ± 2.7
(x 10 ⁴ /μL)				
After	69 ± 6.6	9.8 ± 2.4	9.2 ± 4.1	9.7 ± 2.9

Figure 4 Hemostatic effects of administration of liposomes on rats' tail bleeding time (N = 11-21). PLT count: means ± SD, Bleeding time: median.

D. 結論

1. 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た。
2. DHSG 含量を増やしたりポソームは活性化血小板に対して特異的に結合し、二価陽イオン依存性および非依存性の結合が起因していた。
3. DHSG 含量を増やしたりポソームを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。その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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

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 γ -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 γ -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)

2. 学会発表

- (1) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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総合研究事業)
分担研究報告書

H12-(ADP)リポソームの品質保証体制の構築

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)
土井 麻実 (早稲田大学 先進理工学部)
藤山 敦史 (早稲田大学 先進理工学部)

【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。更に内水相に血小板凝集惹起物質である、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 を放出し、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。

本分担研究者は、H12-(ADP)リポソームの試料の調製と分担研究者への提供を担当しており、これまでのスペックは、仕込み組成と得られた試料の物性評価値 3 項目(濃度、粒子径、ゼータ電位)のみであった。平成 23 年度は、H12-(ADP)リポソームの機能性部位である H12 の含有量、脂質構成比および内包 ADP 量を新たな物性評価項目として追加し、その測定方法を確立することを目的としている。さらに、各製造工程の標準化のために H12-(ADP)リポソームの調製手順書を作成し、製剤の品質保証体制を構築した。H12 含有量は、H12 に含まれる 3 個のアミノ基を蛍光標識する方法により定量した。脂質構成比の解析には NMR を用い、各脂質に固有のピークを基に構成比を算出した。内包 ADP 量は、外水相に存在する未内包 ADP を除去した後 HPLC にて定量した。

以上の測定方法の確立により、試料提供する H12-(ADP)リポソームの標準スペックの決定を目指した。

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)を導入し、更に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、血小板凝集塊中で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)}。

分担研究者らは、H12-(ADP)リポソームの調製と提供を担当しており、これまでのス

ベックは仕込み組成と得られた試料の濃度、粒子径、ゼータ電位の3項目の物性評価値のみであった。平成23年度は、H12-(ADP)リポソームの機能性部位であるH12の含有量、内包ADP量および脂質構成比を新たな物性評価項目として追加し、その測定方法を確立することを目的としている。

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-(ADP)リポソームの作製

各脂質 (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C₁₈=5/5/1/0.033/0.033 (by mol))を秤量後、t-ブチルアルコールに溶解させ凍結乾燥 (over 6 hrs)にて混合脂質を得た。この混合脂質粉末に対して1mM ADP溶液(in PBS)を2 wt%の最終濃度になる様に加えて水和後(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径を制御 (ϕ 0.2 μ m)、超遠心分離にて精製した(100,000 g, 30 min, 4°C)。次いで、これをPBSに再分散、ゲル濾過精製し(Sephadex G25)、H12-(ADP)リポソームを得た。調製したリポソームについて、N4 Plus(Beckman Coulter 社)を用いて粒子径を、Zetasizer nano (Malvern 社)を用いてゼータ電位を測定した。

2. 蛍光定量法によるH12含有量の定量

2.1. フルオレスカミンによる蛍光定量法の検討

H12に蛍光標識を施すために、アミノ基標識試薬であるフルオレスカミンを用いて蛍光定量を検討した。

各脂質溶液(DPPC, cholesterol, DHSG,

PEG-DSPE, H12-PEG-Glu2C₁₈)、ADP溶液(1mM)およびPBSに、同量のn-octyl glucoside (1 M)を加え、可溶化した後、ホウ酸緩衝液(pH 9.0, 150 μ L)およびフルオレスカミン溶液(0.1 mg/mL, 50 μ L)を加え、蛍光強度(ex/em=400/480 nm)を測定した。

次いで、異なる濃度のH12-PEG-Glu2C₁₈溶液(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)に、同様の方法にて蛍光標識、蛍光強度の測定を行い、検量線を作成した。

2.2 H12-(ADP)リポソームのH12担持量の定量

H12-(ADP)リポソーム分散液(20 mg/mL, 10 μ L)にn-octyl glucoside (1 M, 10 μ L)を加え可溶化した後、ホウ酸緩衝液(pH 9.0, 150 μ L)およびフルオレスカミン溶液(0.1 mg/mL, 50 μ L)を添加、攪拌し、蛍光強度を測定し、検量線からH12担持量を定量した。

3. NMRを用いたH12-(ADP)リポソームの脂質組成比定量

H12-(ADP)リポソーム(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C₁₈=5/5/1/0.033/0.033 (by mol))の各構成脂質を重クロロホルムに溶解させ(f.c. 5 mM)、¹H-NMR測定により特徴的なスペクトルを探索した(**Table 1**)。次いで、凍結乾燥後のH12-(ADP)リポソームおよび混合脂質(20 mg)を重クロロホルム(ca. 1.5 mL)に溶解させ¹H-NMR測定を行った。解析に際しては、cholesterolにのみ特徴的なスペクトル5.35 ppm(1H, s, -CCHCH₂-)を基準として積分比を求め、各脂質の混合比を算出した。尚、PEG-DSPEとH12-PEG-Glu2C₁₈は含有量が少ないことから、共通のPEG繰返しユニットのピーク

を用いることとし、PEG 比のみでの算出とした。

Table 1 Characteristic spectrum.

Lipid	Characteristic spectrum
DPPC	5.20 (q, 1H, -CH ₂ CHCH ₂ -)
Cholesterol	5.35 (d, 1H, -CCHCH ₂ -)
DHSG	4.52-4.71 (dd, 1H, -COONHCHCH ₂ -)
PEG-DSPE	3.65 (m, 456H, -OCH ₂ CH ₂ -)
H12-PEG-Glu2C18	3.65 (m, 312H, -OCH ₂ CH ₂ -)

4. HPLC を用いた ADP 内包量測定

4.1. HPLC を用いた品質確認

H12-(ADP)リポソーム調製の最終工程であるゲルろ過精製において、リポソームに未内包の ADP が除去されていることを確認するため、HPLC(TSKGelODS-100V, 1 mL/min, Ab. 260 nm, リン酸(pH=7.0)/メタノール=97/3(v/v) (TEA 30 mM))を用いた解析法を検討した。

リポソームの外水相に ADP 溶液を共存させた系を遠心分離、再分散後、そのリポソーム分散液(1 mL)を Sephadex G25 にてゲルろ過し、ボイド容量から 0.4 mL ずつ合計 14 mL 回収した。ゲルろ過後のリポソームを同量の n-octyl glucoside (1 M)にて可溶化し、HPLC で ADP のピーク面積を測定した。また、同様の操作にて調製された H12-(ADP)リポソーム試料の外水相 ADP は完全に除去されていることを確認した。

4.2. HPLC を用いた内包 ADP 量の測定

濃度既知の H12-(ADP)リポソームを同量の n-octyl glucoside (1 M)にて可溶化後、4.1. と同様の HPLC 測定条件にて ADP 量を測定した。また同時に既知濃度の ADP 溶液にて検量線を作成し、各サンプルの ADP ピーク面積よりリポソーム分散液中の ADP 濃度を求めた。

C. 研究結果及び考察

1. H12-(ADP)リポソームの物性

Table 2 に本年度試料提供した H12-(ADP)リポソームの粒子径とゼータ電位を示す。

Table 2 Physical properties of H12-(ADP)liposome.

Lot No.	Diameter (nm)	Zeta-potential (mV)
110901-k	222.4±56.82	-12.4±0.976
110902-k	202.9±65.34	-11.4±0.897
110903-k	237.9±86.97	-12.9±1.01
111001-k	236.1±80.02	-10.2±0.798
111002-k	231.6±73.37	-9.87±0.779
110902-m	231.8±50.40	-9.25±0.891
111003-ka	231.5±83.48	-9.86±1.68
111004-ka	225.1±75.25	-8.32±2.11
Mean	227.4±70.35	-10.5±1.07

2. 蛍光定量法による H12 担持量の定量

2.1 フルオレスカミンによる蛍光定量法の検討

蛍光標識操作を施した各脂質の蛍光強度を測定したところ、H12-PEG-Glu2C₁₈ 以外の構成脂質および ADP の蛍光強度は、陰性対照群(PBS)と同程度であったことから、フルオレスカミンによる蛍光標識は H12-PEG-Glu2C₁₈ にのみ施されることが確認された(**Figure 1**)。

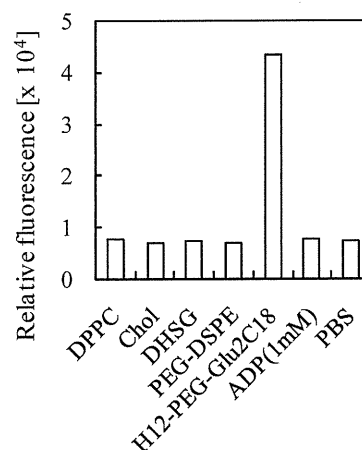


Figure 1 Relative fluorescence with lipid and ADP.

また、**Figure 2** の検量線では、良好な直

線性が得られ($R^2=0.9961$)、本方法による定量が可能であることが確認された。

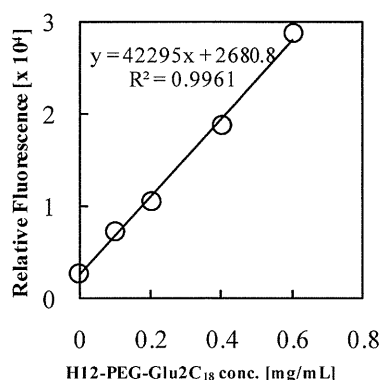


Figure 2 Standard curve of H12-PEG-Glu2C₁₈.

2.2 H12-(ADP)リポソームのH12担持量の定量

H12-(ADP)リポソーム(20 mg/mL)のH12担持量を定量したところ、 0.39 ± 0.07 mg/mLと算出された。仕込み値(0.53 mg/mL)と比較すると、リポソームの調製操作の過程でH12が脱離することが示唆された。

3. 提供サンプルの構成脂質比測定結果

平成23年度提供したリポソームの内、5ロットのリポソームおよび原料として用いた混合脂質の脂質組成比を測定した結果、原料である混合脂質とリポソームで比較した場合、脂質混合比に大きな差は見られず、リポソームおよび混合脂質ともに設定値に近い値となった(**Table 3**)。また異なるロットの混合脂質間およびリポソーム間で比較をすると、**Table 3**で示した混合比に落ち着いており、設定値より大きく外れた値を示したものはなかった。このことより当研究室で調製されたH12-(ADP)リポソームは全て同等の膜組成であることが確認された。

Table 3 Analysis of lipid ratios.

Lot.	DPPC	cholesterol	DHSG	PEG Ratios
Set values	5	5	1	0.033
Mixed Lipid 110905	4.85	5	0.90	0.030
Liposome 110901-k	4.87	5	1.09	0.029
Liposome 110902-k	4.83	5	1.01	0.031
Mixed Lipid 111005	5.11	5	0.89	0.029
Liposome 111001-k	5.12	5	0.84	0.025
Mixed Lipid 111013	4.91	5	1.01	0.028
Liposome 111002-k	4.93	5	0.90	0.026
Mixed Lipid 111102	4.98	5	0.88	0.027
Liposome 111101-k	5.02	5	0.84	0.027
*Mixed Lipid	4.96 ± 0.11	5	0.93 ± 0.06	$0.029 \pm 1.4 \times 10^{-2}$
*Liposome	4.94 ± 0.12	5	0.96 ± 0.11	$0.028 \pm 2.4 \times 10^{-2}$

*Means \pm S.D.

4. HPLCを用いたADP内包量測定

4.1. HPLCを用いた品質確認

H12-(ADP)リポソームの外水相にADPが存在している溶液をゲル濾過し、HPLC測定したところ、ボイド容量約3.6 mLでADPを内包したリポソームが溶出され、その後、外水相のADPが溶出されることが示唆された(**Figure 3 (a)**)。次に、ADP水溶液(1 mM, 1 mL)で同様の操作を行い、**Figure 3 (a)**の後方(ボイド容量 8.4 mL)のピークが外水相に存在するADP水溶液由来であることを確認した(**Figure 3 (b)**)。これより、ADP水溶液はボイド容量5.6 mLから溶出され始めることがわかり、またゲル濾過精製の際、3 mLのボイド容量から約1.3 mLリポソーム分散液を回収していることから、Sephadex G25を用いたゲルろ過精製によってH12-(ADP)リポソームと分離可能であることが確認できた(回収率 83%)。また、**Figure 3 (c)**より、この手法により精製されたH12-(ADP)リポソームの外水相にはADPが存在しないことが確認できた。

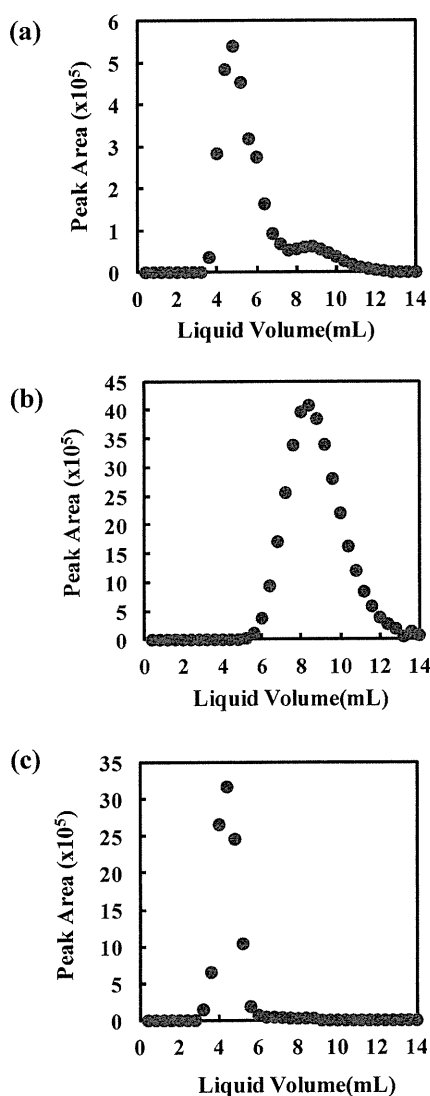


Figure 3 HPLC profiles of (a) a liposome dispersion with ADP, (b) an ADP solution and (c) H12-(ADP) liposome dispersion.

4.2. HPLC を用いた内包 ADP 量の測定

2. でゲル濾過精製後の H12-(ADP) リポソームの外水相には ADP が存在していないことが示されたので、精製後の各 H12-(ADP) リポソームを n-octyl glucoside (1 M) にて可溶化し、HPLC にて ADP のピーク面積を測定し、リポソーム濃度に対する ADP 内包量を求めた (Table 4)。リポソーム濃度あたりの ADP 内包量はロット間ではほぼ同量であった。今後は本手法により、調

製した全サンプルの内包 ADP 量を測定し、ADP 内包量の標準値を決定する。

Table 4 Amount of ADP per lipid concentration.

Sample	ADP concentration (mM)	ADP/Lipid (mol/mg)
(i)	0.159	7.96×10^{-3}
(ii)	0.16	7.79×10^{-3}
(iii)	0.163	8.14×10^{-3}

D. 結論

- (1) H12-(ADP) リポソームの新たな物性評価項目として、H12 の含有量、脂質構成比および内包 ADP 量の測定法を確立した。
- (2) 確立された測定法から平成 23 年度に調製された H12-(ADP) リポソームの物性を評価したところ、高い再現性が確認された。
- (3) 今後、H12-(ADP) リポソームの物性評価結果を、*in vitro* による機能評価試験や *in vivo* による止血能評価試験の結果と照合し H12-(ADP) リポソームの標準スペックを決定する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

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 γ -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 γ -chain peptide on adenosine

diphosphate-encapsulated liposomes enhances binding of the liposomes to activated platelets, *International Journal of Pharmaceutics*, **407**, 151-157 (2011)

2. 学会発表

(1) 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)

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
—臓器出血後の投与効果について—

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	（防衛医科大学校 生理学、助教）
	柳川練平	（防衛医科大学校 防衛医学、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。一昨年度はまず、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。昨年度は、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)リポゾームの前投与による臓器出血に対する止血制御効果を検討した。昨年度の検討から、H12(ADP)リポゾームを前投与することで急性血小板減少病態における肝臓器出血が制御出来、これにより救命効果が得られることが分かった。しかしながら、実臨床では、ほとんどの症例で既に臓器出血を来たした状態での H12(ADP)リポゾームの投与になると考えられるため、H12(ADP)リポゾームの後投与における臓器出血制御効果を検討する必要があると考えられた。そこで今年度は

家兎の急性血小板減少モデルを用いて、これに肝臓器出血を作製した後に H12(ADP)リポゾームの後投与を行い、その臓器止血制御効果を検討した。

急性の血小板減少状態は、外科的な血管損傷による出血と輸血を念頭に置き、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輸血することで作製した。本モデルでは、大量出血とこれに対する大量赤血球輸血により、血小板数が $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ にまで低下し、耳介出血時間も 20 分以上(正常約 2 分)と著しく延長することがこれまでの研究で分かっている。ソノクロットで解析した血栓形成能も、本モデルでは 1 次血栓(血小板血栓)形成能、2 次血栓(フィブリン血栓)形成能が共に強く阻害されていた。このような血小板減少家兎に開腹後、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る致死的な外傷性出血モデルとなることがこれまでに確認されている。本モデルにおいて、肝臓の外傷性臓器出血を作製し、出血部位を 5 分間圧迫している間に H12(ADP)リポゾームを投与、H12(ADP)リポゾームが肝臓の臓器出血に及ぼす止血効果を、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)の投与と比較した。その結果、H12(ADP)リポゾームの後投与により PRP の後投与と同等もしくはそれ以上に、肝臓からの臓器出血量の減少と出血時間の短縮を認め、これによる救命率の向上も認められた。他方、PPP の投与では臓器出血が止血出来ずに全例死亡した。ソノクロットでみた血栓形成能も、PPP の後投与群では臓器出血によりさらに血栓形成能が低下し増悪したが、H12(ADP)リポゾームの後投与群では PRP の後投与と同様に、1 次血栓(血小板血栓)や 2 次血栓(フィブリン血栓)の形成能が改善した。このように、今年度の研究により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)リポゾームの後投与による止血改善および救命効果が実験的に確認された。これは実臨床において、大量出血による易出血傾向を伴う臓器出血時に H12(ADP)リポゾームが投与されるであろう状況を再現していると考えられ、H12(ADP)リポゾームの外科救急時における臨床応用への有用性が期待された。

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出来る。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ことが危惧される。

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否かを研究することである。一昨年度は、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。昨年度は、本モデルを用いて、これに肝臓器損傷を作製し肝臓器出血が H12(ADP)リポゾームの前投与により止血制御出来るかを研究した。この結果、H12(ADP)リポゾームの前投与により顕著な止血制御効果とこれによる救命率改善が認められた。しかしながら、実際の臨床ではほとんどの症例で臓器出血を来たした後の、これに対する止血制御を目的に止血剤が投与されるため、H12(ADP)リポゾームの出血後の投与における臓器出血制御効果を検討する必要があると考えられた。そこで今年度は家兎の急性血小板減少モデルを用いて、肝臓器出血を作製した後に、実臨床と同様に臓器損傷部を圧迫し出血を制御しながら H12(ADP)

リポゾームの投与を行い、臓器止血制御効果を検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

NZW ウサギ（日本 SLC, 2.0-2.2 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 12.5 mL/kg の脱血を行い、対側の大腿静脈より等量(12.5 mL/kg)の Lactated Ringer 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、12.5 mL/kg 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 12.5 mL/kg 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 100 mL/kg)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)。

3.外傷性臓器損傷による肝臓器出血の作成と損傷部圧迫による出血制御

計 100mL/kg の脱血と等量の洗浄赤血球輸血が終了し、血小板数が $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 程度になったところで、下記の各種検査項目の採血を行った後に開腹し肝臓に直径 5mm の Derma punch を用いて組織損傷を作製した(Fig. 3A, B)。手術用手袋に開けた穴に肝葉をくぐらせ、出血が腹腔内に漏れずに手袋内に貯まるようにした後に Derma punch にて肝損傷を作製した(Fig. 3C, D)。損傷部圧迫止血は、くり抜いた肝損傷部を小児用尿道カテーテルを用いて 5 分間圧迫することで止血した (Fig. 4)。しかしながら、本モデルのような急性血小板減少状態 (血小板数が $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以下) では 5 分間の圧迫による止血効果は全く認められないことをあらかじめ確認している。

4. H12(ADP)リポゾーム後投与および PRP、PPP の後投与

肝損傷作成後の臓器出血を確認した後に、バルーンによる損傷部圧迫を 5 分間行い、この間に H12(ADP)リポゾーム 20 mg/kg を PPP で 15 mL/kg に溶解したものを静脈内投与した (H12(ADP)リポゾーム群, n=5)。対照として、採取した PRP を 15 mL/kg、PPP を 15 mL/kg をそれぞれ H12(ADP)リポゾーム群と同様に投与した群を作製した(PRP 群 n=5, PPP 群 n=3)。

5. 測定項目

5.1. 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。

5.2. 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、さらに各種薬物を投与した後の肝損傷作製 20 分後に 0.1 mL 採血し、測定に供した。

5.3. 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 (肝損傷作製前)、各種薬物を投与した後の肝損傷作製 20 分後に 0.8 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。

5.4. 肝損傷部からの臓器出血量

バルーン圧迫の解除から 5 分間と、それに続く 5 分間の損傷部からの出血量を測定した。

5.5. 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）、肝損傷作成 20 分後（バルーン圧迫解除 15 分後）に採血し、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。

C. 研究結果

1. 急性血小板減少モデル作製時の各種パラメーターの推移

1.1. 動脈圧の推移

血液交換開始直後に一端、血圧は 80 mmHg まで低下したが、その後はこれを維持して 80-90 mmHg で推移し顕著な低血圧は認められなかった(Fig. 5A)。

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. 5B)。

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 7~8 g/dL で推移した(Fig. 5C)。

白血球数も血液交換開始直後に低下したが、その後は $1.5 \sim 2 \times 10^3 / \mu\text{L}$ で推移した(Fig. 5D)。

1.4. 凝固因子の変化

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

脱血前の正常家兎血液を用いたソノクロットによる血栓形成能の解析を Fig. 6A に示す。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. 6A)。血液交換終了後では Fig. 6B 右のように血栓形成がほとんど認められなくなった。血液交換により active clotting time が極端に延長し、clot rate も顕著に低下していたことから(Fig. 7)、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。

2. 急性血小板減少家兎での肝臓器出血に対する H12(ADP)リポゾームや PRP、PPP の後投与の効果

2.1. 肝損傷部からの臓器出血後の予後

H12(ADP)リポゾームの後投与により 5 例中 3 例を救命し得た(60% survival)。一方、PRP の後投与では 5 例中 1 例を救命し得たに留まった(20% survival)。肝出血後に PPP を後投与しても全例救命出来ず死に至った(Fig. 8)。

2.2. 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 分以内で、その止血効果が顕著であった(Fig. 9)。さらに H12(ADP)リポゾーム投与群は PRP 投与群に比しても肝損傷作製から 5 分以内の初期

の出血量が有意に抑制されていた(Fig. 9)。肝損傷作製から5~10分後の出血量は3群共に減少していたがH12(ADP)リポゾーム投与群で最も少なく、次いでPRP投与群、PPP投与群の順に出血量が多い傾向が認められた(Fig. 9)。PPP投与群ではいずれも止血を認めなかったが、肝損傷作製5~10分後では出血量が減少していた。これには最初の5分間で大量出血を来たしたために血圧が低下し出血量が減少した可能性も推測される。PPP投与群はn=3と少なく、今後更なる検討の追加を要すると考える。

2.3. 肝損傷部からの臓器出血時間

PPP投与群では完全な止血が認められなかったが、H12(ADP)リポゾーム投与群ではPRP投与群と同様に、肝損傷作製から25分前後で止血が認められた(Fig. 10)。Fig. 11にH12(ADP)リポゾームの後投与による止血経過を示す。本症例では肝損傷を作成後、H12(ADP)リポゾームを投与し25分後に肝臓器出血の止血完了が認められ、翌日の開腹所見でも腹腔内に血液の貯留は認めなかった(Fig. 11)。

2.4. 動脈圧やヘモグロビン濃度、血小板数、白血球数

肝臓器出血後にH12(ADP)リポゾームを投与することで出血20分後の動脈圧低下が回避された。一方、PPPやPRPの投与では動脈圧は低下する傾向にあり(Table 2)、とくにPPP投与群ではその後も出血が持続し血圧が低下、死に至った。肝臓器出血後のヘモグロビン濃度の低下もH12(ADP)リポゾーム投与群で出血量が抑制されたため

PPP投与群やPRP投与群のような低下は認められなかった(Table 2)。白血球数は各種薬剤投与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の投与でのみ肝臓器出血後にもかかわらず上昇を認めたが、血小板成分を含んでいないH12(ADP)リポゾームの投与では変化はなく、PPPの投与ではさらに低下していた(Table 2)。

2.4. 各種凝固因子

肝臓器出血後にH12(ADP)リポゾーム、PRP、PPPいずれを投与してもfibrinogen値の改善(上昇)は認められなかった。とくにPRP投与群、PPP投与群ではいずれも50mg/dL以下と測定限界以下であった(Table 3)。Prothrombin time (PT)も、肝臓器出血後の各種薬物投与では明らかな改善を認めず、PRP投与群、PPP投与群では計測し得ないほど延長していた(Table 3)。APTTも3群共に計測し得ないほど延長していた。AT III値も肝臓器出血後の薬物投与では3群共改善を認めなかった(Table 3)。

2.5. 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。1次血栓(血小板血栓)の形成能の指標であるactive clotting timeは、肝臓器出血後のH12(ADP)リポゾーム投与でも血液交換終了時(603 ± 54 sec)より改善する傾向にあり、PRP投与群でも同様であった(Table 3)。しかし、PPP投与群では血液凝固が認められなかった。2次血栓(フィブリン血栓)の形成能の指標であるclot rateも、肝臓器

出血後の H12(ADP)リポゾーム投与で血液交換終了時(1.6 ± 0.3 sec)より改善する傾向にあり、PRP 投与群でも同様の傾向が認められた(Table 3)。PPP 投与群では血液凝固が認められなかったため、clot rate も active clotting time と同様に検出できなかった(Table 3)。肝臓器出血作製 20 分後の H12(ADP)リポゾームや PRP、PPP 投与群のソノクロット解析の典型例を Fig. 12 に示す。

D. 考察

一昨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、昨年度はこのモデルにおいて肝臓器出血を作製し H12(ADP)リポゾームの出血前投与による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た。今年度はさらに実臨床での使用を念頭に、あらかじめ本モデルにおいて肝臓器出血を作製し、この出血に対して H12(ADP)リポゾームを後投与することで止血制御効果が得られるかを検討した。

今回用いた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では、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で、血小板のみが $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ と顕著に低下するがヘモグロビン濃度は 7~8 g/dL に留まるモデルが作製出来た。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。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)リポゾーム投与時には凝固因子を含む PPP もあわせて投与した。昨年度の検討から、これにより凝固因子がある程度改善することが分かっている。しかし、今回は各種薬剤の出血後投与であるため、出血後は凝固因子が消費されるため、fibrinogen, PT, APTT, AT III の各因子の改善は 3 群いずれでも認められなかった(Table 3)。

本実験中に採取した PRP は従来の検討から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 には血小板成分が含まれていないことを確認している。

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 の出血後投与では臓

器出血が止血制御出来ずに全例が死亡した。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後の投与であっても、20%の救命率が得られた。昨年度行った PRP の前投与では全例が救命出来ていたが、20%の救命に留まったのは、いかに血小板減少状態での大量臓器出血の制御が困難かを物語っているとも言え、我々の臨床経験とも一致する印象を受ける。注目すべきは H12(ADP)リポゾームを出血後に投与することでも血小板輸血と同等、もしくはそれ以上の止血制御効果が得られたことである。とくに救命率は 60%と PRP 投与群の 20%を凌ぐ救命効果が認められた。また、肝臓器出血後の投与であるにもかかわらず、H12(ADP)リポゾーム投与でソノクロットで評価した血液凝固能が若干改善したことは(Fig. 11)、今後想定される臨床現場での H12(ADP)リポゾームの止血制御効果を考える上で非常に興味深い。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する後投与でも認められ、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。昨年度の研究において、H12(ADP)リポゾームの臓器出血前からの投与では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ていた。しかし、今年度の H12(ADP)リポゾームの出血後投与では、早い段階から止血制御効果が認められ、実臨床での有用性が示唆された。今後、その機序に関して研究する必要があると考える。

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. 本モデルにおいて肝臓に外傷性臓器損傷による臓器出血を作製後に H12(ADP)リポゾームを投与すると、臓器出血に対する止血救命効果が得られた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

(原著)

1. Miyazaki H, Kinoshita M, Saito A, Fujie T, Kabata K, Hara E, Ono S, Takeoka S, Saitoh D. An ultra-thin poly(L-lactic acid) nanosheet as a burn-wound dressing for protection against bacterial infection. *Wound Repair Regen* (in press)
2. Kimura A, Ono S, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Miyazaki H, Kinoshita M, Hatsse K, Daizoh Saito, Hase K, Yamamoto J. The postoperative serum interleukin-15 concentration correlates with organ dysfunction and the prognosis of septic patients following emergency gastrointestinal surgery. *J Surg Res* (in press)
3. Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, Tsujimoto H, Takahata, R., Miyazaki H., Saitoh D, Seki S, Hase K. Neutralization of IL-10 restores the down-regulation of IL-18 receptor on NK cells and IFN- γ production in septic mice, thus leading to an improved survival. *SHOCK* (in press)
4. Nakashima M, Kinoshita M, Nakashima H, Habu Y, Miyazaki H, Hiroi S, Nakanishi K, Seki S. Characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity. *J. Leukocyte. Biol.* (I press).
5. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya S, Seki S, Nemoto K, Hamblin M, Dai T, Huang L, Morimoto Y. Cytotoxicity on neutrophils by PDT with the photosensitizers used for localized microbial infection. *Photochem. Photobiol.* (in press)
6. Maemura T, Kinoshita M, Shin M, Miyazaki H, Tsujimoto H, Ono S, Hase K, Saitoh D. Assessment of a Tissue-Engineered Gastric Wall Patch in a Rat Model. *Artif. Organs* (in press)
7. Shono S, Habu Y, Nakashima M, Sato A, Nakashima H, Miyazaki H, Kinoshita M, Tsumatori G, Shinomiya N, Seki S. The immunologic outcome of enhanced function of mouse liver lymphocytes and Kupffer cells by high-fat-cholesterol diet. *SHOCK* 35; 45-52, 2011.
8. M Kinoshita, Miyazaki H., Ono S, Inatsu, A., Nakashima, H., Tsujimoto, H., Shinomiya, N., Saitoh, D., Seki, S. Enhancement of neutrophil function by IL-18 therapy protects burn-injured mice from MRSA infection. *Infect Immun* 79; 2670-80, 2011.
9. K Fujino, M Kinoshita, A Saitoh, H Yano, K Nishikawa, T Fujie, K Iwaya, M Kakihara, S Takeoka, D Saitoh, and Y Tanaka. Novel overlaying technique of poly L-lactic acid (PLLA) nanosheet for adhesion prophylaxis and fixation of intraperitoneal onlay polypropylene mesh in a rabbit model. *Surg Endosc* 25; 3428-36, 2011.
10. Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, Tsujimoto H, Takahata, R., Miyazaki H., Saitoh D, Hase K. Neutralization of interleukin-10

- or tumor growing factor-beta decreases the percentages of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thus leading to an improved survival. *Surgery* 151;313-22, 2012.
11. Miyazaki H., Kinoshita M, Ono S, Nakashima M, Hara E, Ohno H, Seki S, Saitoh D. Augmented bacterial elimination by Kupffer cells after IL-18 pretreatment via IFN-gamma produced from NK cells in burn-injured mice. *BURNS* 37; 1208-1215, 2011.
 12. Takahata, R., Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Kimura A, Kinoshita M, Miyazaki H., Saitoh D, Hase K. Postoperative serum concentrations of High Mortality Group Box chromosomal protein-1 correlates to the duration of SIRS and pulmonary dysfunction following gastrointestinal surgery. *J Surg Res* (in press)
 13. Tanaka M, 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* 43; 221-229, 2011.
 14. 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* 35; 365-371, 2011.
 15. 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. Seki S, Nakashima H, Nakashima M, Kinoshita M. Antitumor immunity produced by the liver Kupffer cells, NK cells, NKT cells and CD8+ CD122+ T cells. *Clin. Dev. Immunol.* (in press)
 2. 木下 学:CRP (C-reactive protein). *外科と代謝* 45: 43-47, 2011.
 3. 木下 学: プロカルシトニン. *外科と代謝* 46: 15-18, 2012.
 4. 木下 学、庄野聡、中島弘幸、中島正裕、佐藤厚志、五十嵐正巳、宮崎裕美、小野聡、関修司 : 貪食活性酸素産生 Kupffer 細胞とサイトカイン産生 Kupffer 細胞. *ショック学会誌* 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 : 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)

2. 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)
3. 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし