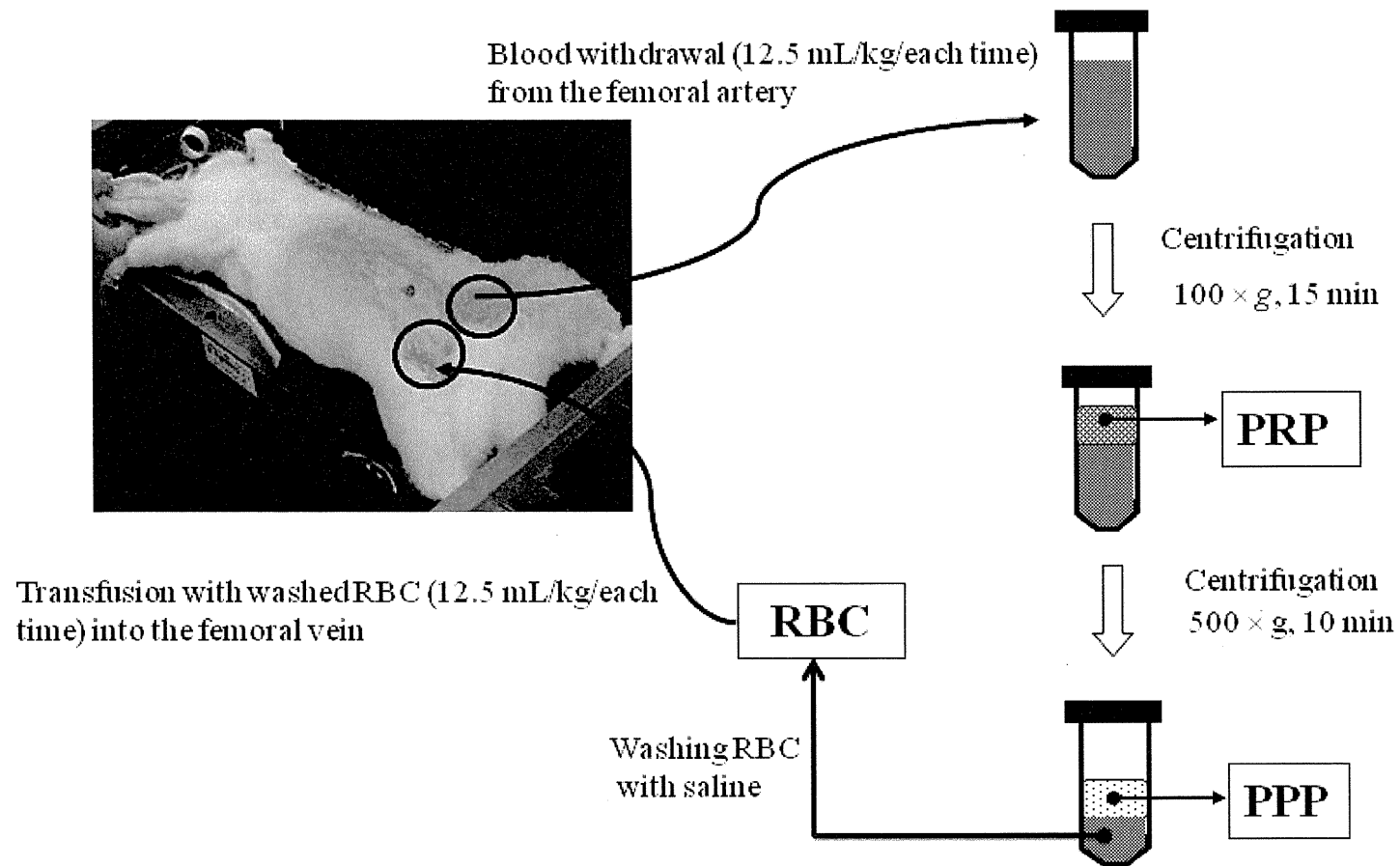


∇ Collection of blood samples for the measurements of coagulation factors and Sonoclot analyses

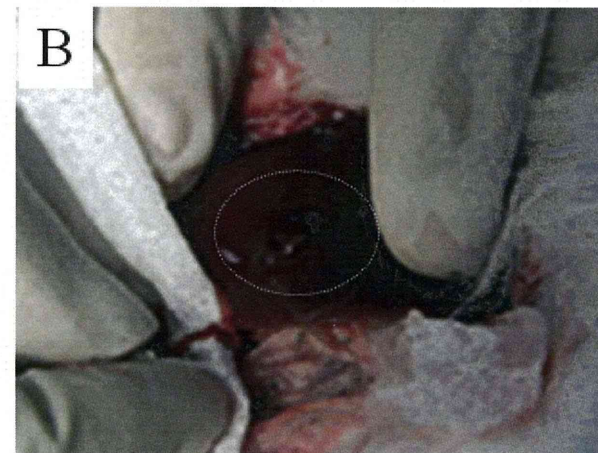
Fig. 1. Experimental design of blood withdrawal/transfusion followed by transfusion of H12-(ADP)-liposome after liver injury.



**Fig. 2.** Scheme of blood withdrawal from rabbits; preparations of PRP, PPP, and washed RBC, and transfusion of washed RBC into rabbits.



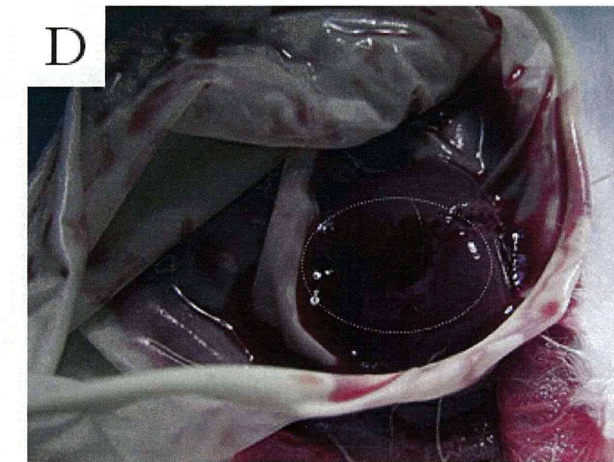
Penetrating liver injury



Liver hemorrhage (immediately after injury)

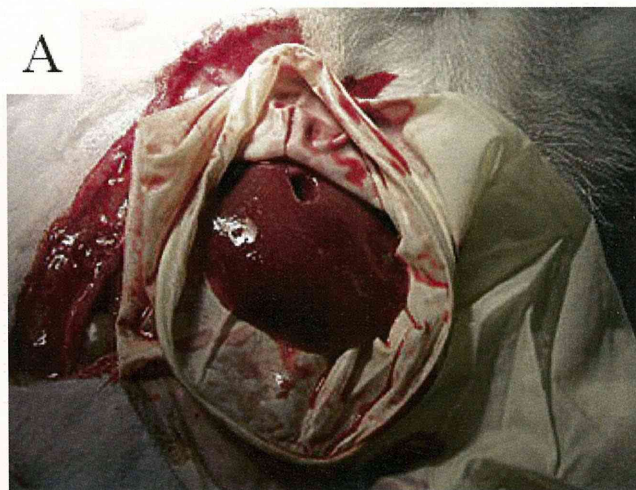


H12-(ADP)-liposomes/PPP (at 10 min)

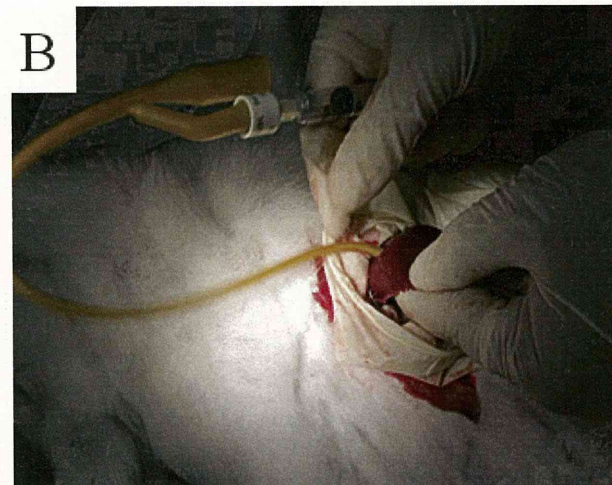


PPP (at 10 min)

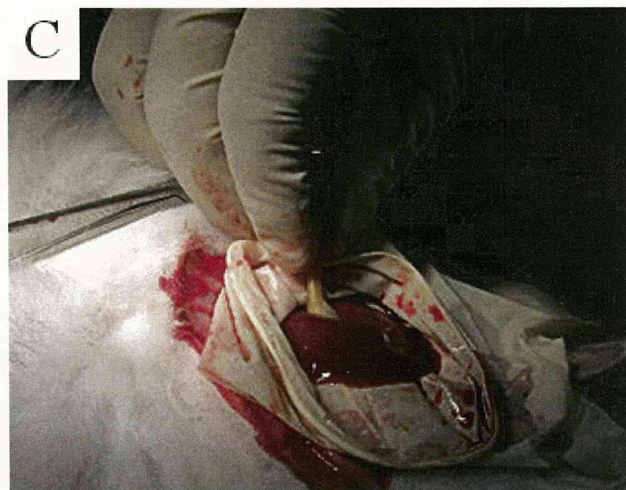
**Fig. 3.** Non-compressible liver hemorrhage in thrombocytopenic rabbits. (A) Penetrating liver injury using DermaPunch. (B) Liver hemorrhage from the injured site immediately after injury. Liver hemorrhage in the H12-(ADP)-liposomes/PPP-transfused (C) or PPP-transfused (D) rabbits 10 min after injury. Representative data with similar results from ten rabbits in H12-(ADP)-liposomes/PPP or PPP group are shown (C, D).



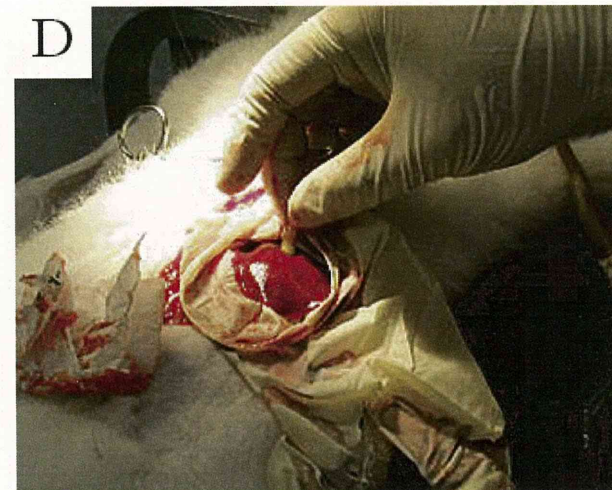
Liver bleeding from the penetrating liver injury



Hemostasis by balloon compression (setting in a lesion)

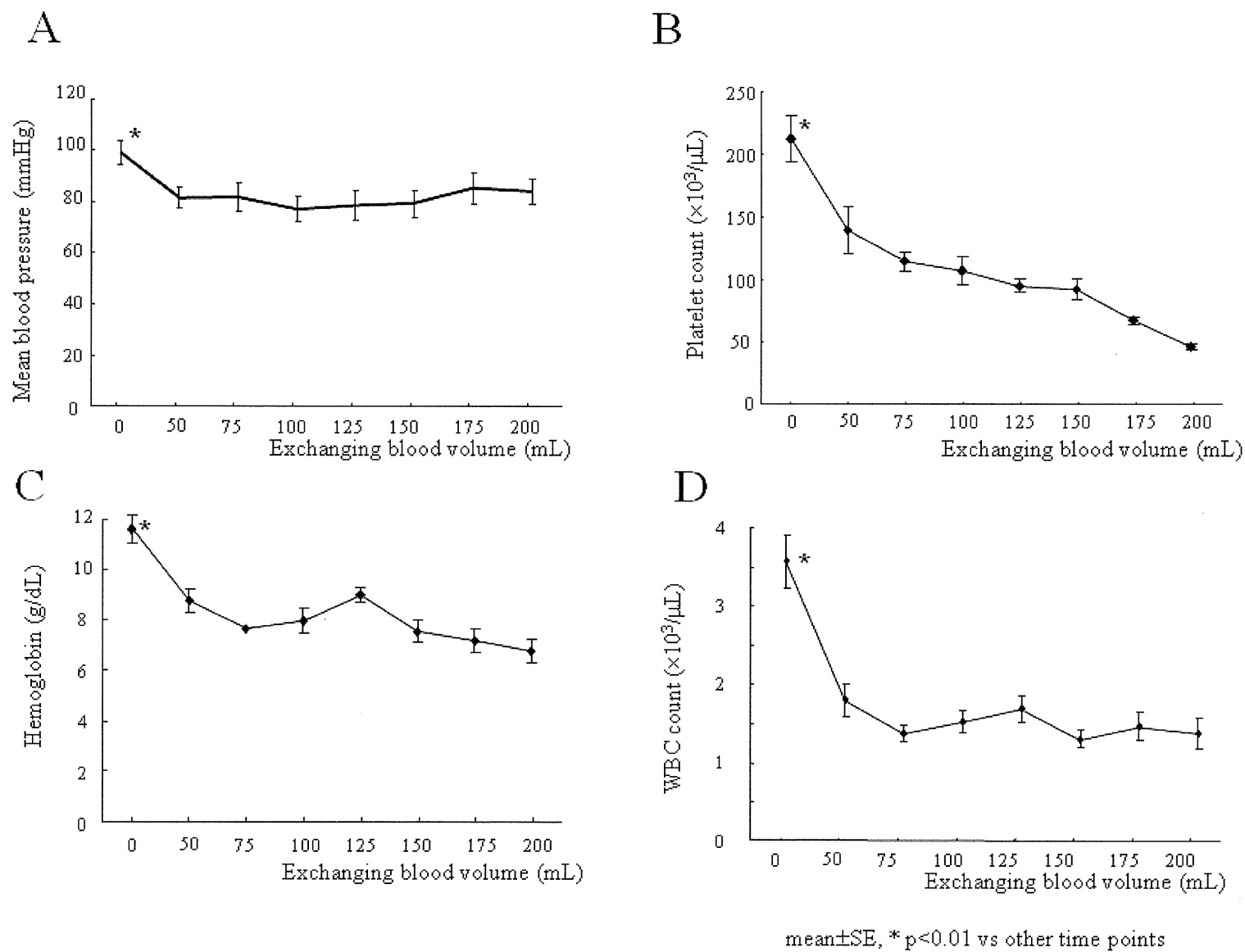


Hemostasis by balloon compression (balloon clamping)



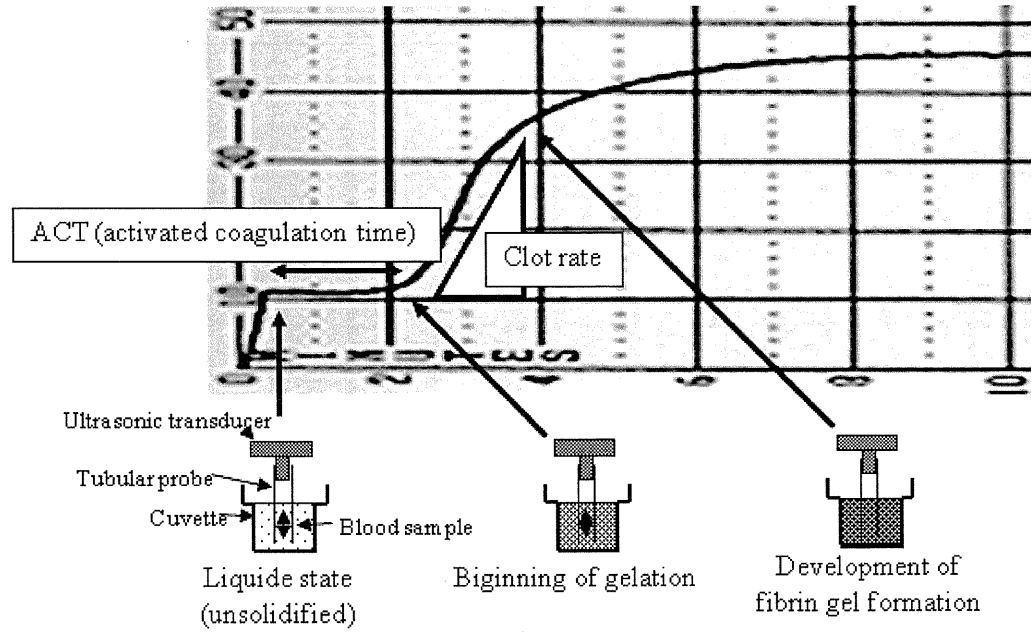
Hemostasis by balloon compression (balloon declamping)

**Fig. 4.** Hemostasis by balloon compression. (A) Penetrating liver injury site before hemostasis. (B-D) Hemostasis of penetrating liver injury using balloon compression of indwelling urethral catheter.



**Fig. 5.** Change of hematological parameters and blood pressure during blood withdrawal/transfusion

A



B

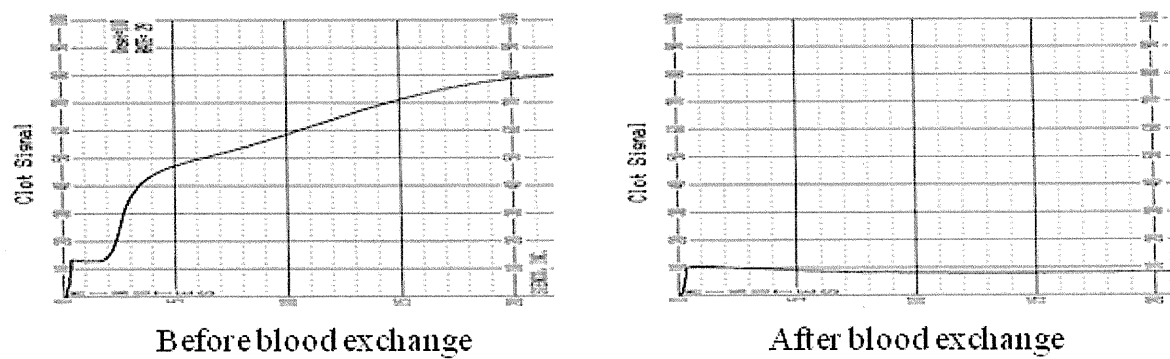
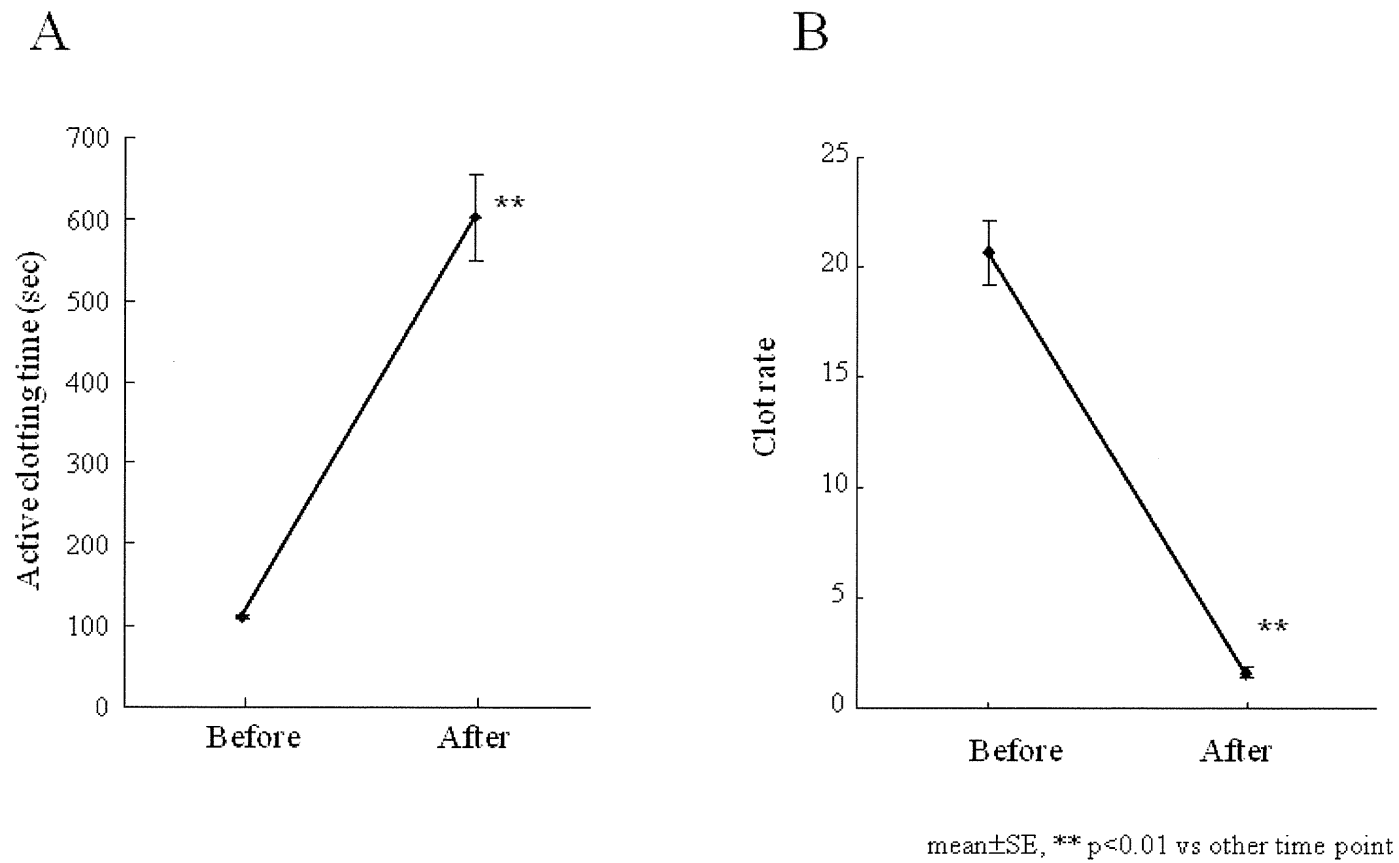
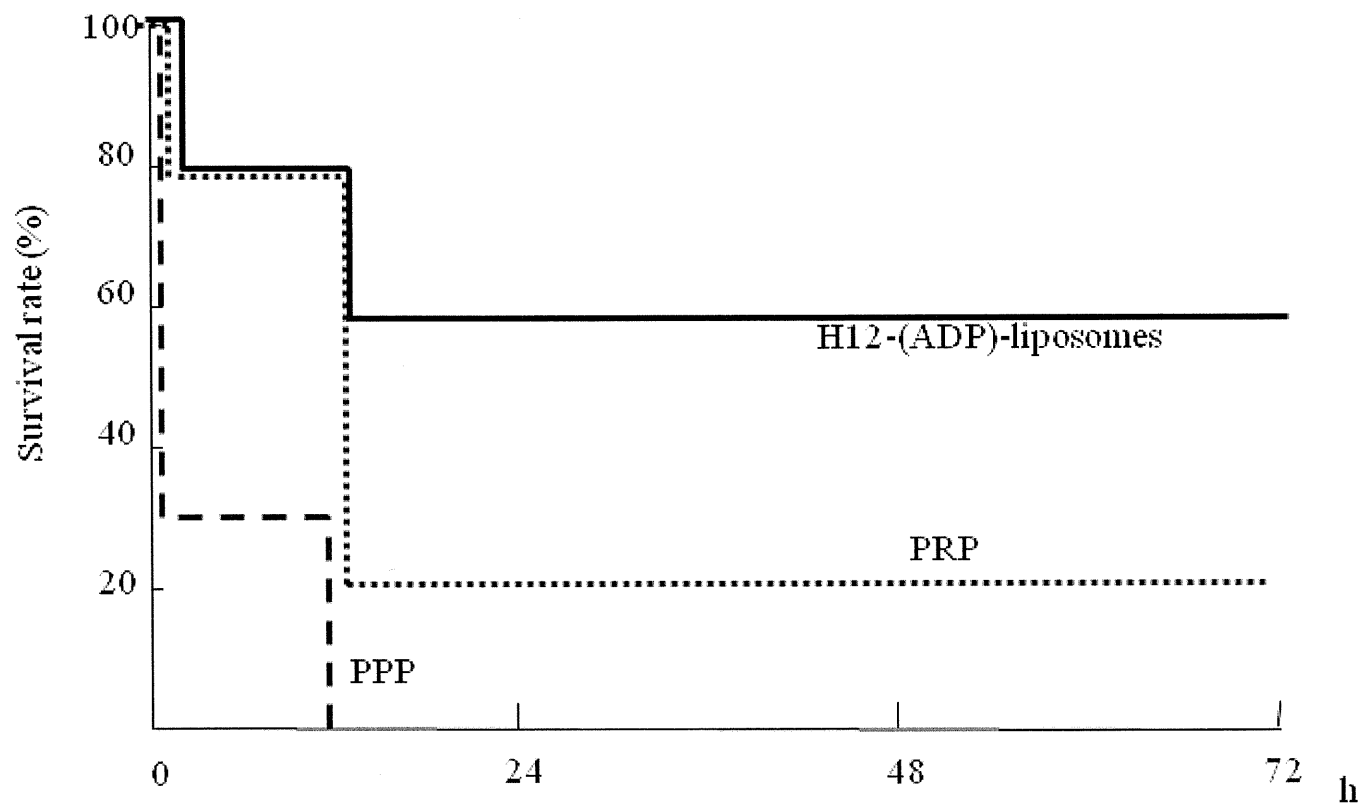


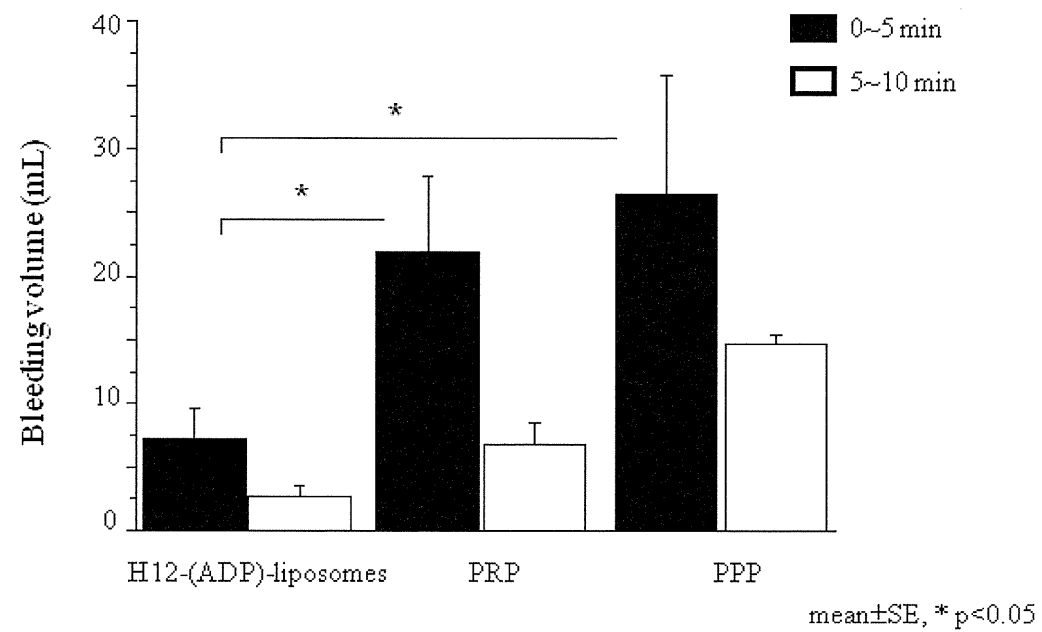
Fig. 6. Analyses of activating clotting time and clot rate using Sono-clt



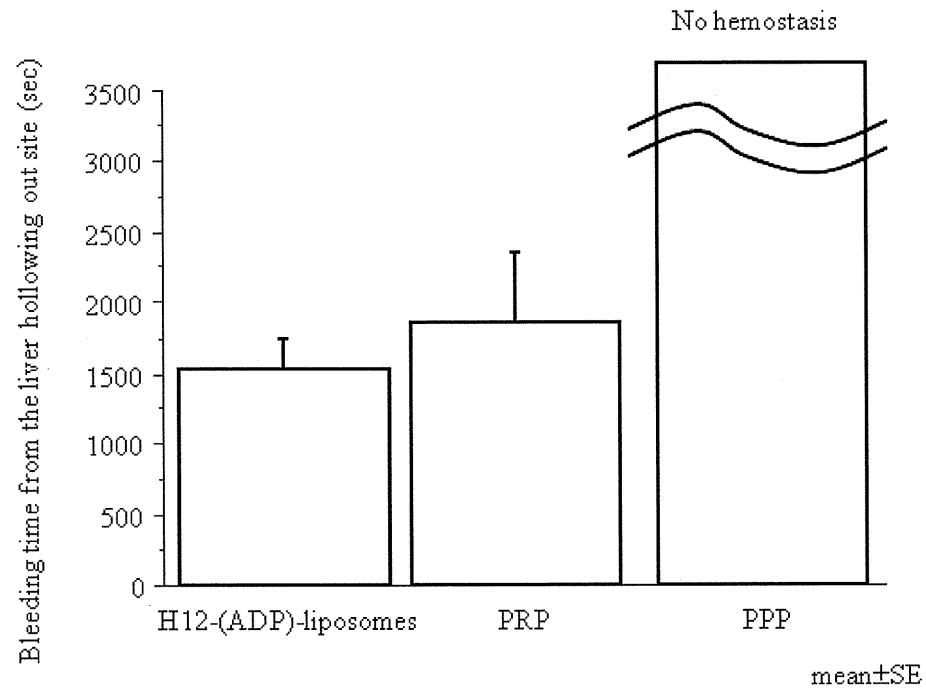
**Fig. 7.** Analyses of activating clotting time and clot rate before and after blood exchanges



**Fig. 8.** Survivals after penetrating liver injury in acute thrombocytopenic rabbits



**Fig. 9.** Bleeding volume from the liver injured site



**Fig. 10.** Bleeding time from the liver injured site



Immediately after penetrating liver injury



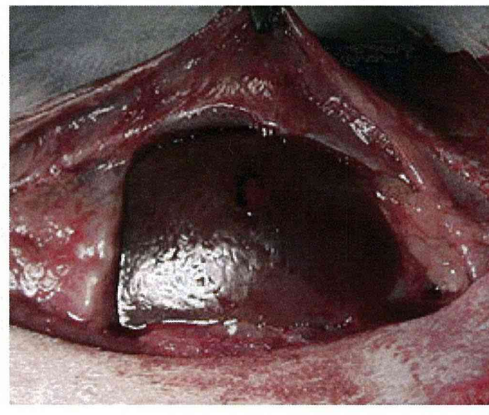
At 5 min after injury



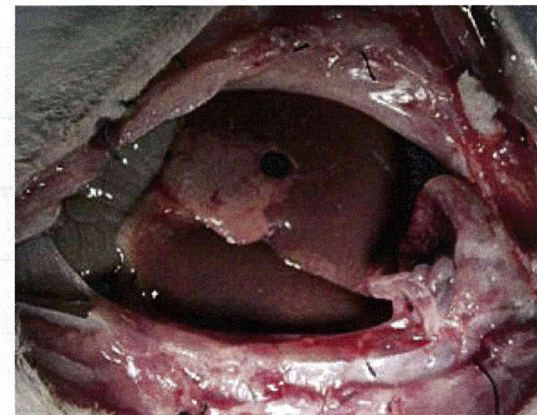
At 10 min after injury



At 15 min after injury



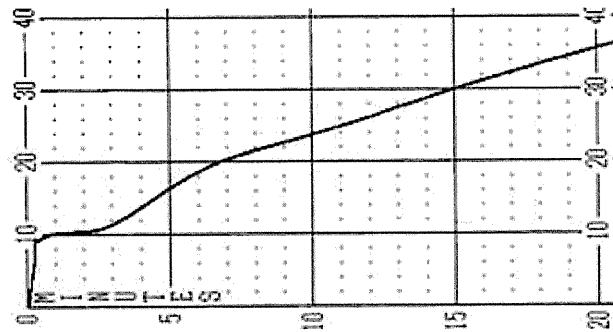
At 25 min after injury  
(Stop bleeding)



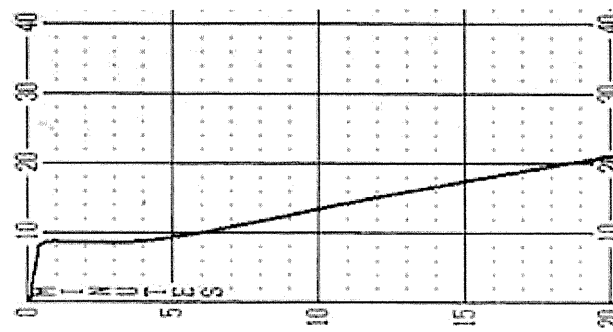
At 24 hours after injury

**Fig. 11.** Hemostasis by administration of H12(ADP)liposome after bleeding from the penetrating liver injury

H12ADP liposome



PRP



PPP

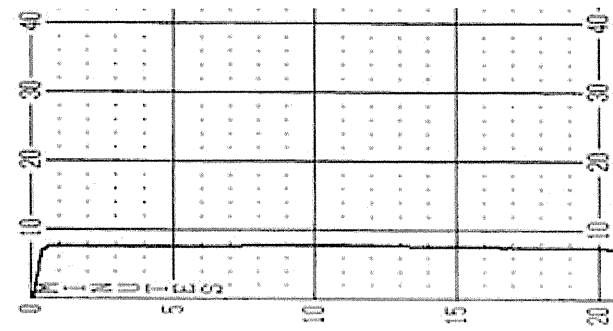


Fig. 12. Analyses of coagulation activity using sonoclot after hemorrhage

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

	Before blood exchange	After blood exchange	
Fibrinogen (mg/dL)	198.7 ± 7.7	51.1 ± 4.5	p<0.01
Prothrombin time (sec)	9.9 ± 0.1	26.3 ± 3.4	p<0.01
APTT (sec)	23.9 ± 0.8	N.D.	
AT III (%)	121.6 ± 4.1	43.1 ± 2.6	p<0.01
			mean±SE

Table 2. Changes of the blood pressure and hematological parameters

		H12ADPliposome	PRP	PPP
Mean blood pressure (mmHg)	Before hemorrhage	84 ± 12	85 ± 9	85 ± 13
	After administration	84 ± 13	74 ± 5	68 ± 11
Hemoglobin (g/dL)	Before hemorrhage	6.9 ± 1.4	6.8 ± 1.6	7.2 ± 1.1
	After administration	6.5 ± 1.6	5.4 ± 1.8	5.1 ± 1.7
Platelet count (×10 <sup>3</sup> /μL)	Before hemorrhage	48 ± 4	46 ± 7	47 ± 4
	After administration	45 ± 7	65 ± 7 *	41 ± 3
WBC count (×10 <sup>3</sup> /μL)	Before hemorrhage	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.7
	After administration	1.6 ± 0.6	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.6

\*p<0.05 vs before hemorrhage

mean±SE

Table 3. Changes of the coagulation factors and coagulation activities after hemorrhage

	H12ADPliposome	PRP	PPP
Fibrinogen (mg/dL)	52.9 ± 4.4	< 50	< 50
Prothrombin time (PT) (sec)	26.2 ± 1.9	N.D.	N.D.
ATIII (%)	44.6 ± 6.5	44.0 ± 7.8	39.8 ± 8.0
Active clotting time (sec)	515 ± 173	520 ± 129	Not coagulated
Clot rate	3.4 ± 1.9	2.2 ± 0.6	Not coagulated

\*\*p<0.01, \*p<0.05 vs before administration

mean±SE

分担課題：H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

主任研究者 丸山 徹 熊本大学薬学部 医療薬剤学分野 教授

### 研究要旨

H12 (ADP) liposome は膜表面をデカペプチド ( $^{400}\text{HHLGGAKQAGDV}^{411}$  : H12) で修飾した直径約 250 nm の均一な粒径リン脂質二分子膜より構成される小胞体構造を有する人工血小板代替物である。これまでに、ブスルファン誘発血小板減少症動物モデルにおける止血実験で、H12 (ADP) liposome は血小板輸血に匹敵する止血補助効果を発揮することが確認されている。そのため、H12 (ADP) liposome は血小板輸血にとって代わる血小板代替物として期待されているが、医薬品開発の前臨床試験段階において必須な体内動態特性に関する検討は行われていない。そこで、本研究では、血小板代替物 H12 (ADP) liposome の体内動態特性に関する基盤情報を構築すべく、健常マウス、ラット及びウサギにおける血漿中濃度推移、分布、代謝及び排泄特性を検討した。加えて、ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットにおける H12 (ADP) liposome の体内動態特性の評価も行った。

### A. 研究目的

H12 (ADP) liposome は血小板輸血にとって替わる血小板代替物として期待され、実用化に向けて様々な分野での研究が進められているが、医薬品開発の前臨床試験段階において必須な体内動態特性に関する検討は行われておらず、動態学的な観点から H12 (ADP) liposome の安全性及び有効性を評価する必要がある。

H12 (ADP) liposome の臨床応用としては、血小板減少状態における予防的投与と、出血時の血小板代替補充療法が想定されている。実用化に際しては前臨床段階において、動態学的な観点から H12 (ADP) liposome の安全性及び有効性を評価するには、次の3項目 (i) 血中滞留性、(ii) 代謝・排泄経路の同定、(iii) 生体内蓄積性が挙げられる。加えて、現在上市されているリポソーム製剤の抗真菌薬 AmBisome (amphotericin B 内封リポソーム製剤) や人工酸素運搬体であるヘ

モグロビン小胞体では、健常時と病態時で体内動態が異なることが見出されているため、H12 (ADP) liposome についても適用疾患時における体内動態の変動を把握することは、臨床開発上、非常に意義深い。

そこで本研究では、H12 (ADP) liposome の血漿中濃度、分布、代謝及び排泄経路を明らかにすべく、H12 (ADP) liposome の脂質膜を構成するコレステロール及び内包したADPをそれぞれ $^3\text{H}$ 及び $^{14}\text{C}$ で標識した $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome を用いて、マウス、ラット及びウサギにおける体内動態を評価した。また、適用疾患の一つである薬剤誘発血小板減少症における $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome の体内動態について、ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットを用いた実験系で検討した。

## B. 研究方法

### 1. 動物

ddY系雄性マウス（6週齢、28-30 g）は日本SCLより購入した。Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラット（6週齢、200-220 g）は九動より購入した。New Zealand white (NZW) 系雄性ウサギ（8週齢、2.0-2.2 kg）はバイオテック（株）より購入した。すべての動物は1週間の予備飼育後、実験に使用した。

### 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、熊本大学実験動物倫理委員会のもとに、実験を施行した。

### 3. $^3\text{H}$ ラベル化法

$^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome もしくは H12 (ADP) liposome 1 mL と Cholesterol, [1,2- $^3\text{H}$ (N)]- 10  $\mu\text{L}$  を混合し、12 時間室温で放置することにより標識を行い、 $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ - H12 (ADP) liposome もしくは  $^3\text{H}$ - H12 (ADP) liposome を作製した。また、投与液は  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  標識体を  $^{14}\text{C}$  標識体もしくは非標識体で希釈して調製した。

### 4. マウスにおける体内動態実験

ddY マウスに  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ - H12 (ADP) liposome を 10 mg lipid/kg で尾静脈内投与した。規定時間毎に下大静脈から採血を行い、遠心分離により血漿を採取した。得られた血液、血漿を、soluene-350 / イソプロピルアルコール (1 : 1) 混合液で可溶化後 (50°C, 24 時間)、過酸化水素で脱色し、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) を加え、放射活性を測定した (LSC-5121, アロカ)。摘出した臓器は、秤量した後、その一部を soluene-350 で可溶化後 (50°C, 24 時間)、血液と同様の処理により放射活性を測定した。尿・糞中への排泄については、代謝ゲ

ージに入れたマウスより経時的に採尿・採糞を行い、その一部を臓器と同様の処理により放射活性を測定することで評価した。

### 5. ラットにおける体内動態実験

SD ラットに  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ - H12 (ADP) liposome を 10 mg lipid/kg の用量で尾静脈内投与した。規定時間毎に尾静脈から採血を行った。以後の操作は、マウスの血液及び血漿、臓器、尿、糞の操作に準じて実験を行った。

### 6. ウサギにおける体内動態実験

NZW ウサギに  $^3\text{H}$ - H12 (ADP) liposome を 10 mg lipid/kg の用量で耳介静脈内に投与した。規定時間毎に耳介静脈から採血を行った。以後の操作は、マウスの血液及び血漿の操作に準じて実験を行った。

### 7. ADP 代謝物の同定

ラットより規定時間毎に尿を採取し、得られた尿に 10 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を添加し、遠心分離後、上清を pH 7.0 に調整した。遠心分離後、0.20  $\mu\text{m}$  の滅菌済フィルター (Dismic-25cs, アドバンテック) で処理を行い、HPLC に注入した。また、ADP 及びアラントインをミリ Q 水、ヒポキサンチン及びキサンチン、尿酸を 0.1 N NaOH にそれぞれ溶解し、終濃度がそれぞれ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように混合したものを標準試料とした。

#### 【HPLC の測定条件】

カラム : LiChroCART 250-4 RP-18

(Merck Chemicals)

ポンプ : Waters 2695 (Waters)

検出器 : Waters 2487 (Waters)

測定波長 : 220 nm

流速 : 1.0 mL/min

移動相 : 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

さらに、HPLC で分離したピーク毎にフラクションコレクターを用いて分取した。得られたフラクションに液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) を加え、放射活性を測定した。

## 8. ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットにおける体内動態実験

### 8-1. ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットの作成

SD ラットに PEG (分子量 400) に溶解したブスルファンを 10 mg/kg の投与量で投与 0 日目及び 3 日目に合計 20 mg/kg 腹腔内投与し、10 日間飼育することでブスルファン誘発血小板減少症モデルラットを作成した。

### 8-2. 血球パラメータの測定

規定日毎に尾静脈から約 500  $\mu$ L 採血を行い、血球計数装置 (KX-21NV, シスメックス) により血球パラメータを測定した。

### 8-3. 体内動態実験

ブスルファン誘発血小板減少症モデルラット作成終了後、非絶食、エーテル麻酔下で、 $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome を 10 mg lipid/kg の用量で尾静脈内投与した。規定時間毎に下大静脈から採血を行い、遠心分離により血漿を採取した。得られた血液、血漿を、soluene-350 /イソプロピルアルコール (1 : 1) 混合液で可溶化後 (50 $^{\circ}$ C, 24 時間)、過酸化水素で脱色し、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) を加え、放射活性を測定した (LSC-5121, アロカ)。摘出した臓器は、秤量した後、その一部を soluene-350 で可溶化後 (50 $^{\circ}$ C, 24 時間)、血液と同様の処理により放射活性を測定した。尿・糞中への排泄については、代謝ゲージに入れたマウスより経時的に採尿・採糞を行い、その一部を臓器と同様の処理により放射活性を測定することで評価した。

## C. 結果

### 1. 健常マウス・ラットにおける H12 (ADP) liposome の体内動態解析

マウス及びラットに 10 mg lipid/kg の  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome を投与した際の血漿中濃度推移について検討した。

#### 1-1. 血漿中濃度推移

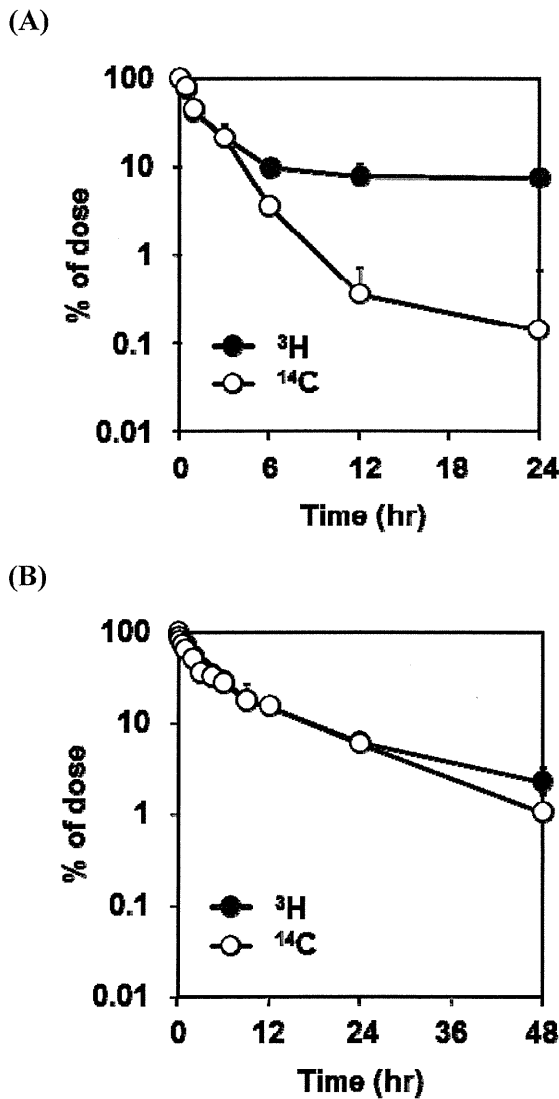
マウスにおいて、 $^3\text{H}$ 及び $^{14}\text{C}$ ラベル体の放射活性は、投与3時間後まではほぼ同様な血漿中濃度推移を示したが、それ以降では両者が解離し始め、 $^3\text{H}$ ラベル体はゆっくりと消失するのに対し、 $^{14}\text{C}$ ラベル体は比較的速やかに消失した (Fig. 1A)。このことから、マウスの場合、投与3時間以降では、リポソームからADPが漏れ出始めている可能性が示唆された。

ラットにおいても同様に10 mg lipid/kgの  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposomeを投与した際の血漿中濃度推移について検討した。その結果、 $^3\text{H}$ 及び $^{14}\text{C}$ ラベル体の血漿中濃度は投与24時間後まで同様な推移を示した (Fig. 1B)。このことから、ラットの場合、H12 (ADP) liposomeは投与24時間まで、ほぼADPを内包した状態で血中を循環している可能性が示唆された。

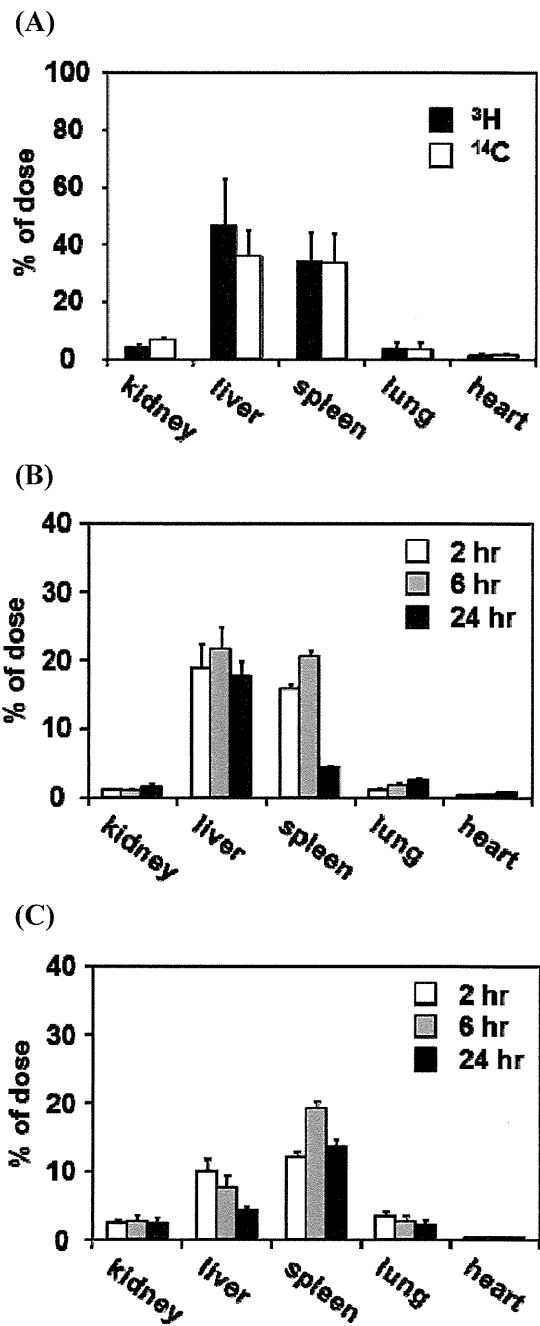
#### 1-2. 臓器分布

マウス及びラットにおける臓器分布を検討したところ、両ラベル体ともに肝臓及び脾臓へ高濃度で分布していた (Fig. 2A~C)。このことから、肝臓及び脾臓がH12 (ADP) liposomeの主要な分布臓器であることが判明した。一方、投与7日後における放射活性を測定したところ、放射活性はほとんど検出されなかった (data not shown)。一般に、リポソーム製剤は肝臓、脾臓等に存在する細網内皮系細胞 (MPS) により捕捉され、分解されることが知られているため、H12 (ADP) liposomeもMPSへの捕捉を介して肝臓及び脾臓に分布・代謝されたと考えられる。これらの結

果より、H12 (ADP) liposomeは血小板代替物として十分な代謝特性を有しており、臓器蓄積性は低いことが確かめられた。



**Fig.1**  
Time course for the plasma concentration of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome after i.v. administration at a dose of 10 mg lipid/kg to (A) mice and (B) rats.  
Each point ( $^3\text{H}$  : closed circles,  $^{14}\text{C}$  : opened circles) represents the mean  $\pm$  SD (n=5).



**Fig.2**  
(A) The tissue distribution of radioactivity at 1 hr after i.v. administration of  $^3\text{H}$  (closed column),  $^{14}\text{C}$  (opened column)-H12 (ADP) liposome to mice.  
(B) The tissue distribution of  $^3\text{H}$  and (C)  $^{14}\text{C}$  radioactivity at 2 (opened column), 6 (gray column), 24 hr (closed column) after i.v. administration of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome to rats.  
Each column represents the mean  $\pm$  SD (n=5).

### 1-3. 排泄経路

次に、マウス及びラットにおける H12 (ADP) liposome の排泄経路の同定を試みた。マウスの場合、投与した  $^3\text{H}$  ラベル体のほぼ 100 % が糞中へ排泄されていた。他方、 $^{14}\text{C}$  ラベル体では約 65 % が尿中へ、残り約 35 % が糞中へ排泄されていた。また、投与 7 日後には  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  ラベル体のいずれも、ほぼ 100 % が尿と糞中で回収された (Fig. 3A)。ラットにおいても同様な検討を行ったところ、マウスと類似した結果が得られた (Fig. 3B)。したがって、H12 (ADP) liposome は肝臓及び脾臓でリポソーム構造が破壊された後、脂質成分と ADP に分解され、脂質成分は糞中へ、ADP は尿中へ排泄されることが判明した。

### 1-4. ADP の代謝経路

H12 (ADP) liposome の臨床応用を勘案する上では、安全性の観点から構成成分の代謝経路を明らかにする必要がある。内因性の ADP はヒト

において様々な経路を経て最終的に尿酸へと代謝され尿中に排泄されることが知られているが、リポソームに内包された ADP が内因性の ADP と同じ代謝経路により排泄されるか否かについては明らかにされていない。そこで、ラットにおいて、H12 (ADP) liposome に含有される ADP の最終代謝産物の同定を試みた。齧歯類では、ADP は尿酸に変換された後、最終的にアラントインまで代謝されることが知られているため、ADP、尿酸及びアラントインに加え、中間代謝産物であるヒポキサンチン、キサンチンを標準試料として用い、ラットに  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome 投与後の尿中の H12 (ADP) liposome 由来 ADP 代謝産物を HPLC により測定した。Fig. 4 にはラットに  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome 投与 6 時間後のクロマトグラムを示す。生体内由来の代謝物の混在を排除するために、ピーク毎の放射活性を測定し、H12 (ADP) liposome 由来の ADP 代謝物を同定した。その結果、H12 (ADP) liposome 由来の ADP 代

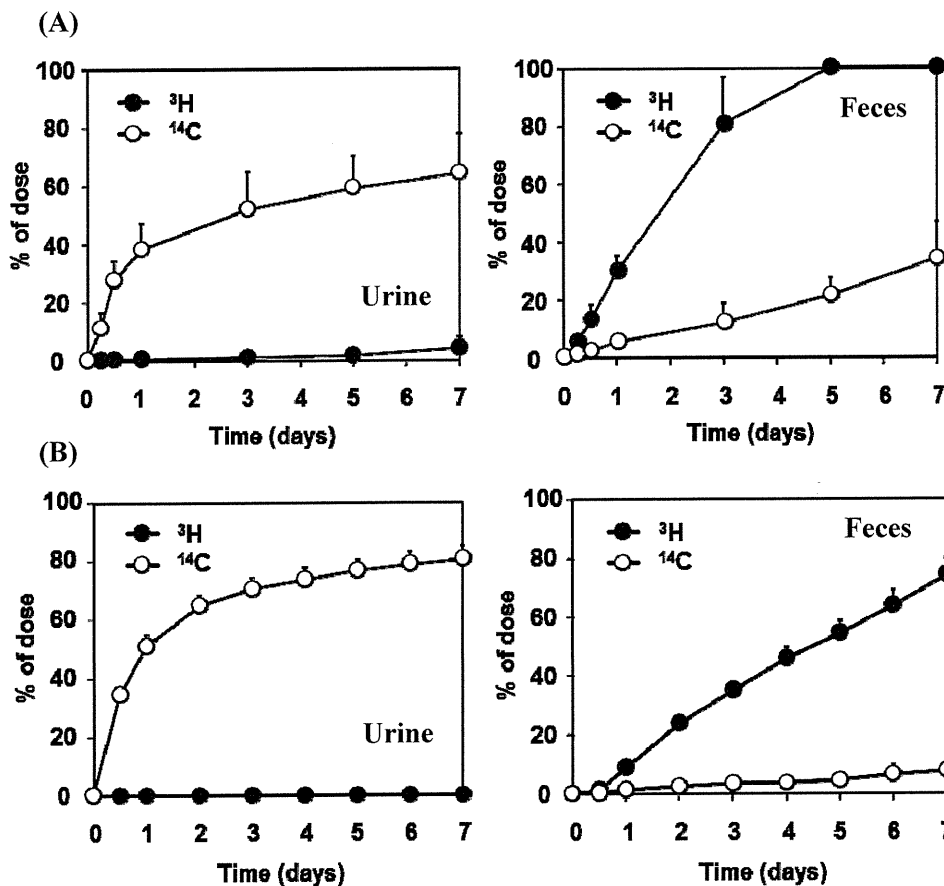


Fig. 3. Time dependent in urine and feces excretion of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome after i.v. administration to (A) mice and (B) rats at a dose of 10 mg lipid/kg. Each point ( $^3\text{H}$  : closed circles,  $^{14}\text{C}$  : opened circles) represents the mean  $\pm$  SD (n=5).