

謝物は主にアラントインであった (Table 1). したがって, ADPはリポソームに内包された状態であっても, 生体内に存在するADPと同様, 最終代謝産物 (ヒトの場合は尿酸) に代謝され, 尿中へ排泄されることが示唆された.

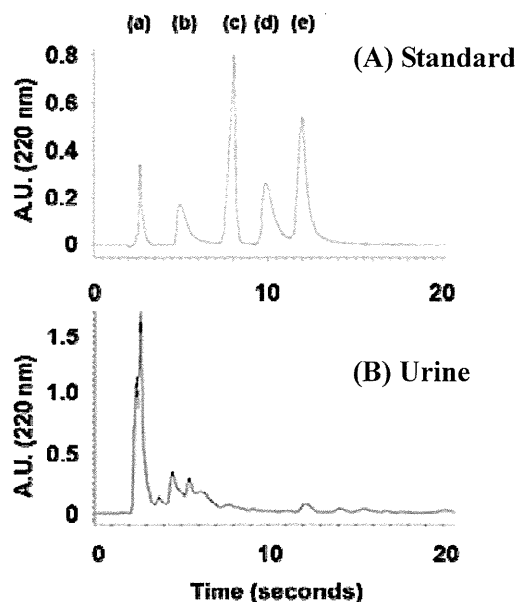


Fig. 4.
Chromatogram of standard mixture (A) and urine (B) analyzed by HPLC

The standard peaks are allantoin (a), ADP (b), uric acid (c), hypoxanthine (d) and xanthine (e).

2. ウサギにおける H12 (ADP) liposome の血中動態解析

ウサギにおける³H-H12 (ADP) liposomeの体内動態を検討した. Fig.5には投与72時間後までにおけるH12 (ADP) liposomeの血漿中濃度推移を示す. 血漿中濃度推移より算出した消失半減期は ($t_{1/2\beta}$) は約32時間であり, ラットやマウスより短かったものの, 分布容積及びクリアランスはいずれもラット及びマウスよりも大きな値を示した (data not shown).

3. アニマルスケールアップ

H12 (ADP) liposomeの臨床試験を想定した場合, ヒトにおける半減期の予測, いわゆるアニマルスケールアップは投与設計を行う上で非常に有用である. そこで, マウス, ラット, ウサギにおけるH12 (ADP) liposomeの体内動態の結果から, アロメトリック式を用い, ヒトにH12 (ADP) liposomeを10 mg lipid/kgで投与した場合の分布容積及びクリアランスを外挿した (Fig. 6). 次いで, これらの値を用いてヒトにおける半減期を予測したところ, 約18時間と見積もられた.

Table 1

Time course of radioactivity derived from ADP and its metabolism in urine to

	ADP	hypoxanthine	xanthine	uric acid	allantoin
6 hr	1.3 ± 1.2	N.D.	N.D.	N.D.	89.7 ± 12.2
12 hr	3.9 ± 1.1	N.D.	1.2 ± 1.1	0.7 ± 0.6	92.6 ± 1.3
1 day	16.0 ± 15.8	N.D.	N.D.	N.D.	78.7 ± 13.3
3 day	N.D.	N.D.	11.2 ± 10.5	N.D.	71.8 ± 15.9
5 day	N.D.	N.D.	6.7 ± 5.9	3.9 ± 3.4	75.0 ± 20.8

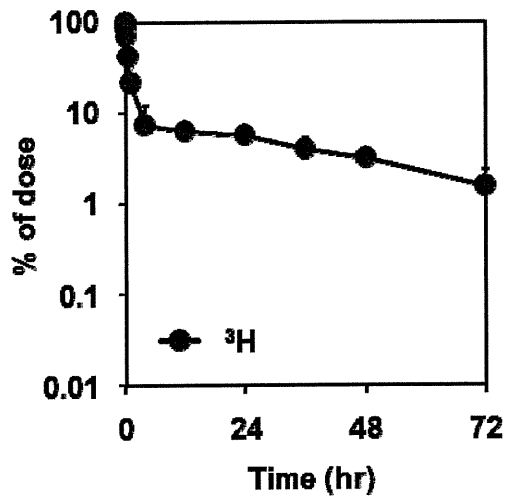


Fig. 5. Time course for the plasma concentration of ³H-H12 (ADP) liposome after i.v. administration at a dose of 10 mg lipid/kg to rabbits. Each point represents the mean ± SD (n=4).

4. 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 の体内動態解析
 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) の場合、健常時と病態時において体内動態が異なることが報告されており、同じリポソーム製剤である H12 (ADP) liposome も適用疾患時における体内動態を把握することは臨床応用を考える上で非常に意義深い。そこで、H12 (ADP) liposome に対する適応疾患の一つである血小板減少症のモデルである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を検討した。

4-1. ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットの作成

抗がん剤であるブスルファンを分子量400 Da のPEGに溶解し、ラットに5または10 mg/kgの投与量で投与0日目及び3日目に腹腔内投与し(それぞれ合計10, 20 mg/kg)、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。その結果、血小板数は時間の経過とともに減少した。また、この効果には用量依存性が認められ、投与20 mg/kg群でのみ、血小板減少症と判定される健常時の25%以下にまで血小板数が低下した (Fig. 7)。加えて、血小板以外の血球パラメータにおい

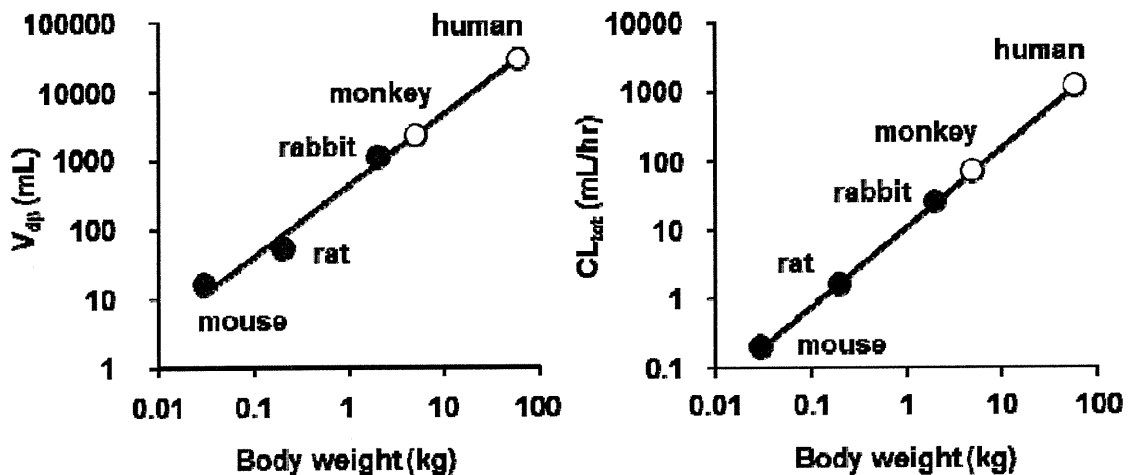


Fig. 6. Allometric relationships between body weight (BW) and phase distribution volume (V_d) (A) or total body clearance (CL_{tot}) (B)

The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method (A, $y=431.17x^{1.0195}$, $r=0.9907$; B, $y=10.342x^{1.1471}$, $r=0.9999$). The extrapolated human (60 kg) and monkey (5 kg) values (opened circle) are also shown.

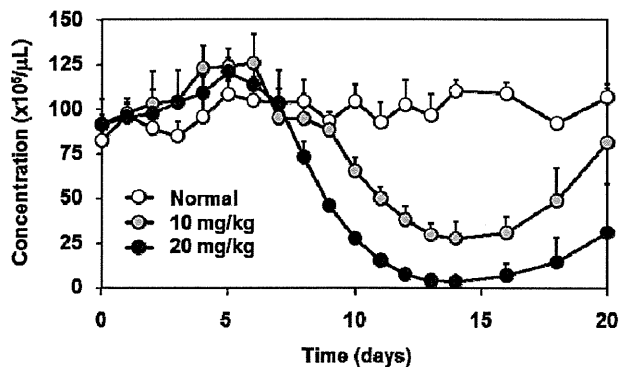


Fig.7. Time course for platelet counts after i.p. administration of busulfan to rats.

Each point represents the mean \pm SD (n=3-4).

でも、投与20 mg/kgラットにおいて赤血球 (RBC) の減少 (Fig. 8A) に伴いヘモグロビン (Hb), ヘマトクリット値 (HCT) の低下が観察され (data not shown)、白血球 (WBC) は両投与量においても減少していた (Fig. 8B)。これらの結果から、本病態モデルでは、ブスルファン副作用である汎血球減少症に伴い、血小板減少状態が引き起こされたものと推察された。また、ブスルファン投与ラットでも、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), 尿素窒素 (BUN), 血清クレアチニン (CRE) の有意な変化は確認されなかったことから (data not show)、ブスルファン投与によりH12 (ADP) liposomeの体内動態に重要な役割を担う肝臓・腎臓の障害等はないことが確認された。

これらの結果に基づき、以後の実験にはブスルファン20 mg/kg投与により惹起された血小板減少症モデルラットを用いた。

4-2. 体内動態解析

ブスルファンを投与して10日目の血小板減少症モデルラットを用いて、10 mg lipid/kg H12 (ADP) liposomeを投与したときの体内動態について解析した。

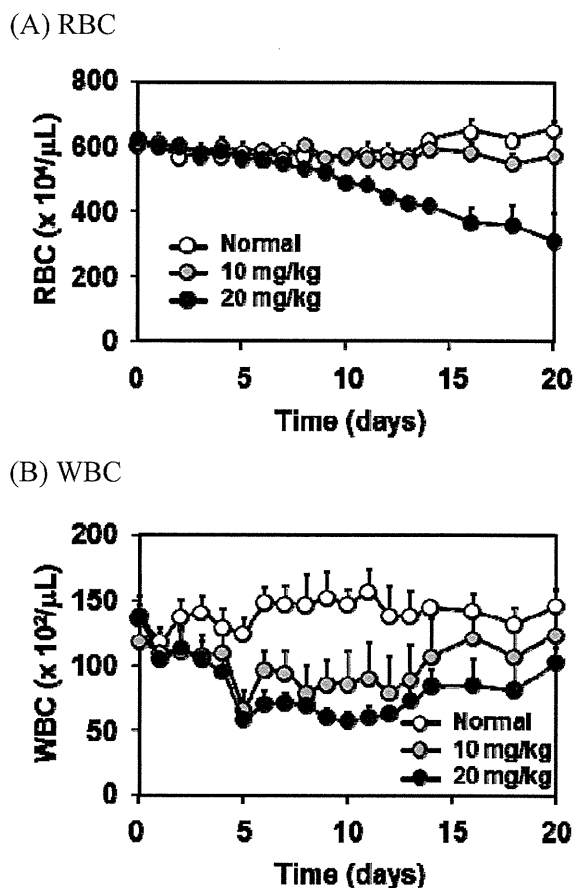


Fig. 8. Time course for RBC (A) and WBC (B) after i.p. administration of busulfan to rats

Each point represents the mean \pm SD (n=3-4).

4-2-1. 血漿中濃度推移

^3H , ^{14}C -H12 (ADP) liposome を尾静脈内投与後における血小板減少症モデルラットの血漿中濃度を検討したところ (Fig. 9)、血小板減少症モデルラットでは、健常ラットと比べて、血漿中濃度の減少傾向が観察された。

4-2-2. 臓器分布

次に、血小板減少症モデルラットにおける肝臓及び脾臓への ^3H , ^{14}C -H12 (ADP) liposomeの臓器分布を検討した。その結果、健常ラットと比べて、血小板減少症モデルラットでは、 ^3H , ^{14}C ラベル体ともに肝臓への分布が増大し (Fig. 10

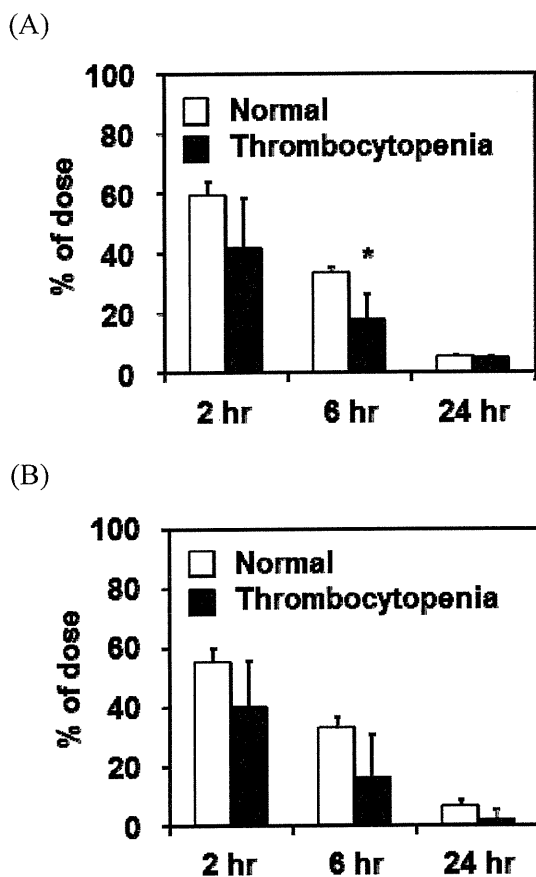


Fig. 9. Plasma concentration of ³H (A) and ¹⁴C (B) at 2, 6 and 24 hr after i.v. administration of ³H, ¹⁴C-H12 (ADP) liposome to normal (opened column) and thrombocytopenic (closed column) rats. Each column represents the mean \pm SD (n=4). *:p<0.05 vs. Normal.

A, B), 逆に、脾臓への分布は減少していた (Fig. 10 C, D).

1-2-2. 排泄経路

さらに、排泄過程を検討したところ、健常ラットに比べて病態ラットでは、尿及び糞中への排泄が促進していた (Fig. 11).

D. 考察

本研究では、血小板代替物 H12 (ADP) liposomeの体内動態を解析し、動態学的な観点か

ら安全性及び有効性を評価すべく、H12 (ADP) liposomeの脂質膜を構成するコレステロールを³H標識、並びに内包したADPを¹⁴C標識した³H, ¹⁴C-H12 (ADP) liposomeを作製し、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詳細に解析した。さらに、臨床使用を想定し、血小板減少症モデルラットにおける体内動態を評価した。

³H, ¹⁴C-H12 (ADP) liposomeを10mg lipid/kgをマウス及びラットに投与した際の体内動態を解析した結果、マウスでは、投与後3時間以降において³H及び¹⁴Cラベル体の血漿中濃度推移に解離が生じており、ADPの漏れ出ている可能性が示唆された。一方、ラットでは、投与24時間後においても両放射核種の血漿中濃度推移に大きな違いが認められなかったことから、この条件下ではADPが漏れ出ている可能性は低いと思われた。ここで観察されたラットとマウスにおける脂質膜とADPの血中濃度推移において違いを生じた原因は不明であるが、ヒトにおける臨床応用を考える上で、ADPの放出性は重要な視点であり、今後、原因の究明が必要であると思われる。また、他のリポソーム製剤と同様にマウス及びラットの両者において、H12 (ADP) liposomeの主要分布臓器は肝臓及び脾臓であった。一般に、リポソーム製剤は肝臓、脾臓などの細網内皮系組織 (MPS) に存在する食細胞によって取り込まれることから、H12 (ADP) liposomeにおいても同様な経路で肝臓及び脾臓に分布したものと推察された。さらに、H12 (ADP) liposomeの排泄過程の検討結果から、マウス、ラットともに脂質成分は糞中へ、ADPは尿中へ主に排泄されることが、また投与7日後にはほぼ全量が体外に排泄されることが明らかとなった。さらに、尿中へ排泄されたADPの代謝経路を検討した結果、アラントイン (齧歯類におけるADPの最終代謝産物) であることが判明したことより、H12 (ADP) liposome由来のADPは、

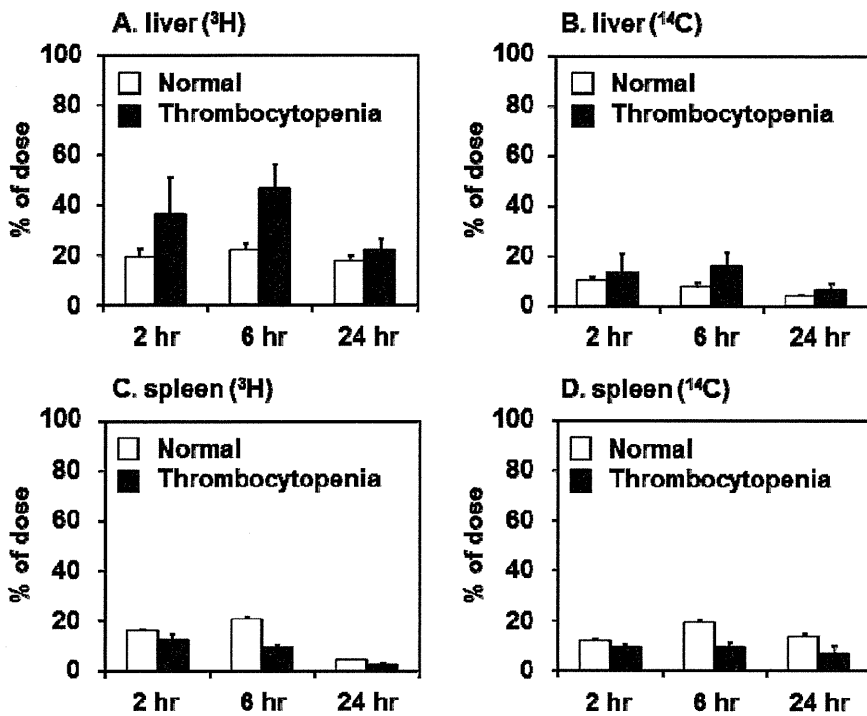


Fig. 10.

The tissue distribution of ^3H (A) and ^{14}C (B) to liver and ^3H (C) and ^{14}C (D) to spleen after i.v. administration of ^3H , ^{14}C -H12 (ADP) liposome to normal (opened column) and thrombocytopenic (closed column) rats.

Each column represents the mean \pm SD (n=4).

内因性の ADP と同様の経路で代謝排泄される可能性が高く、十分な代謝性を保持していると思われる。

また、健常ウサギで求めた体内動態パラメータをマウス、ラットの結果に加味して、アロメトリック式を作成し、ヒトにおける H12 (ADP) liposome の消失半減期の予測は、約 18 時間と算出された。この結果から、H12 (ADP) liposome

は、外科手術や大量出血時などにおける緊急時だけでなく、血小板減少症状態に対する予防的な使用も可能ではないかと推察される。

最後に、ブスルファン投与により作成した血小板減少症モデルラットを用いて H12 (ADP) liposome の体内動態を検討したところ、健常ラットと比べ血漿中濃度の低下、肝臓への取り込み増大が観察された。その要因として、血小板減

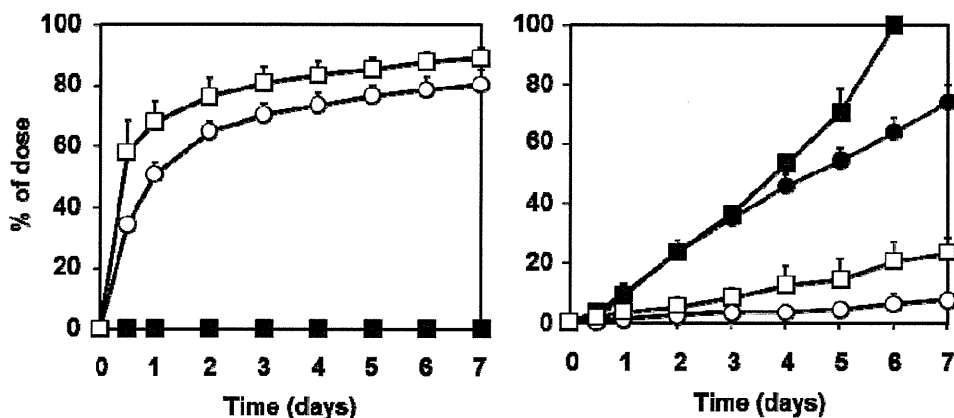


Fig. 11.

Time dependent in urine (A) and feces (B) excretion of ^3H (closed), ^{14}C (opened)-H12 (ADP) liposome after i.v. administration to normal (circle) and thrombocytopenia (square) rats at a dose of 10 mg lipid/kg

Each point represents the mean \pm SD (n=4).

少に伴い Kupffer 細胞によるリポソームの取り込みが促進したためと考えられる。また、血小板減少症モデルラットでは、H12 (ADP) liposome の体外排泄が促進しているものの、代謝過程には影響が認められず、投与 7 日後では臓器にほとんど存在していなかったことから、血小板減少状態においても、H12 (ADP) liposome の生体蓄積性は低いものと思われる。

以上、動態学的検討結果より、H12 (ADP) liposome は、1) 血小板代替物として十分な血中滞留性を有していること、2) 主に肝臓及び脾臓に分布すること、3) 脂質膜成分は主に糞中へ、内包された ADP は主に尿中へ排泄されること、4) 臓器蓄積性が低いこと、が判明した。また、血小板減少状態では、健常時に比べて、若干血中滞留性は低下するものの、代謝・排泄経路や臓器蓄積性は大きく影響されないことが明らかとなった。これらの結果は、H12 (ADP) liposome の有効性及び安全性の一端を動態学的観点から実証したものであり、臨床開発を指向する上での有用な基礎資料となるものである。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life*. (2012) in press.

2. Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-Hansen U, Kai T, Watanabe H, **maruyama T**, Otagiri M. S-Guanylation of human serum albumin is a unique

post-translational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci*. (2012) in press.

3. Anraku M, Tomida H, Michihara A, Tsuchiya D, Iohara D, Maezaki Y, Uekama K, **Maruyama T**, Otagiri M, Hirayama F. Antioxidant and renoprotective activity of chitosan in rephrectomized rats. *Carbohydrate Polymers*. (2012) in press.

4. Kondo Y, Ishitsuka Y, Kadowaki D, Kuroda M, Tanaka Y, Nagatome M, Irikura M, Hirata S, Sato K, **Maruyama T**, Hamasaki N, and Irie T. Phosphoenolpyruvic acid (PEP), an intermediary metabolite of glycolysis, as a potential cytoprotectant and anti-oxidant in HeLa cells. *Bio Pharm Bull*. (2012) in press.

5. Ishima Y, Chen D, Fang J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Kai T, **Maruyama T**, Otagiri M. S-Nitrosated Human Serum Albumin Dimer is not only a Novel Anti-Tumor Drug but also a Potentiator for Anti-Tumor Drugs with Augmented EPR Effects. *Bioconjug Chem*, 23:264-71. (2012).

6. Komori H, Nishi K, Uehara N, Watanabe H, Shuto T, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Characterization of hepatic cellular uptake of α 1-acid glycoprotein (AGP), part 2: Involvement of hemoglobin β -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells. *J Pharm Sci*, 101:1607-15. (2012).

7. Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Misumi S, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Characterization of the hepatic cellular uptake of α (1) -acid glycoprotein (AGP), part 1: A peptide

moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin β -chain on mouse liver parenchymal cells. *J Pharm Sci*, 101:1599-606. (2012).

2011 年

8. 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 $\{\alpha\}$ 1-Acid Glycoprotein Genetic Variants, the A and F1*S Forms. *J Biol Chem*. 286:14427-34. (2011).

9. Furukawa M, Tanaka R, Chuang VT, Ishima Y, Taguchi K, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury. *J Control Release*. 154:189-95. (2011).

10. Kugimiya T, Jono H, Saito S, **Maruyama T**, Kadowaki D, Misumi Y, Hoshii Y, Tasaki M, Su Y, Ueda M, Obayashi K, Shono M, Otagiri M, Ando Y. Loss of functional albumin triggers acceleration of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Lab Invest*. 91(8):1219-28. (2011).

11. Kaneko K, Chuang VT, Minomo A, Yamasaki K, Bhagavan NV, **Maruyama T**, Otagiri M. Histidine146 of human serum albumin plays a prominent role at the interface of subdomains IA and IIA in allosteric ligand binding. *IUBMB Life*. 63:277-85. (2011).

12. Mera K, Nagai R, Takeo K, Izumi M, **Maruyama T**, Otagiri M. An autoantibody against N(ϵ)-(carboxyethyl) lysine (CEL) : Possible

involvement in the removal of CEL modified proteins by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 407:420-5. (2011).

13. 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*. 337:201-8. (2011).

14. Minomo A, Ishima Y, Kragh-Hansen U, Chuang VT, Uchida M, Taguchi K, Watanabe H, **Maruyama T**, Morioka H, Otagiri M. Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IX α revealed by phage display. *FEBS J*, 278:4100-11. (2011).

15. Guo J, Jono H, Kugimiya T, Saito S, **Maruyama T**, Misumi Y, Hoshii Y, Su Y, Shono M, Ueda M, Obayashi K, Otagiri M, Ando Y. Antioxidative effect of albumin on amyloid fibril formation in transthyretin-related amyloidosis. *Amyloid*.18:12-3. (2011).

16. Ishima Y, Yoshida F, Kragh-Hansen U, Watanabe K, Katayama N, Nakajou K, Akaike T, Kai T, **Maruyama T**, Otagiri M. Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin. *Free Radic Res*.45:1196-206.(2011).

17. Tanaka M, Tokunaga K, **Maruyama T**, Otagiri M, Tominaga Y, Itoh K, Matsushita K, Komaba H, Fukagawa M Parathyroidectomy markedly reduces oxidative stress in a patient with primary

hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial.* 15 :38-41. (2011).

18. Watanabe H, Miyamoto Y, Otagiri M, **Maruyama T**. Update on the pharmacokinetics and redox properties of protein-bound uremic toxins. *J Pharm Sci.*100:3682-95.(2011).

19. Anraku M, Takeuchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Kitamura K, Tomita K, Kuniyasu A, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Quantitative analysis of cysteine-34 on the antioxidant properties of human serum albumin in hemodialysis patients. *J Pharm Sci.* 2011.100:3968-76.(2011).

20. 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).

21. 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.* 15:161-8. (2011).

22. 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.*15:129-31. (2011)

23. 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.*26:2498-502. (2011).

24. 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.*39:484-9.(2011).

25. 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.*100:775-83.(2011)

2. 学会発表

1. 異島 優、原 茉莉絵、末永 綾香、甲斐 俊哉、**丸山 徹**、小田切 優樹 Mono-SNO-HSA と Poly-SNO-HSA による細胞内 NO 輸送機構の解明 第 11 回日本 NO 学会学術集会 2011 年 5 月 13 日 -14 日

2. Minomo A, Ishima Y, Morioka H, **Maruyama T**, Otagiri M Lys199 is involved in stereoselective interaction between 4Z,15Z-bilirubin and serum albumin Symposium on Molecular Chirality 2011 2011/5/20-21

3. Komori H, Watanabe H., Shuto T., **Maruyama T.**, Otagiri M., AGP の CD163 誘導作用に基づく新規抗炎症機序解明 日本薬剤学会 26 年会 2011 年 5 月 29 日-31 日

4. 大柿 滋、田口 和明、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 一酸化炭素付加型赤血球はクッパー細胞を介して輸血誘発肝P450機能障害を保護する 日本薬剤学会 26 年会 2011 年 5 月 29 日-31 日
5. 野口 剛、宮本 洋平、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質 *p*-クレジル硫酸とインドキシル硫酸との相互作用の動態学的機序解明 日本薬剤学会 26 年会 2011 年 5 月 29 日-31 日
6. 本田 大輔、宮本 洋平、渡邊 博志、門脇 大介、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質 *p*-クレジル硫酸が慢性腎臓病の酸化ストレスに及ぼす影響 日本薬剤学会 26 年会 2011 年 5 月 29 日-31 日
7. 異島 優、原 茉莉絵、末永 綾香、甲斐 俊哉、丸山 徹、小田切 優樹 P32 Poly-SNO-アルブミンによる抗癌剤耐性克服効果 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 2011 年 6 月 9 日-10 日
8. 小田切 優樹、渡邊 佳織、異島 優、末永 綾香、渡邊 博志、甲斐 俊哉、丸山 徹 P49 新規抗菌剤としての S-ニトロソ化 α 1-酸性糖タンパク質の可能性 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 2011 年 6 月 9 日-10 日
9. 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
10. 品川 拓也、異島 優、米重 梓二、末永 綾香、渡邊 博志、丸山 徹、小田切 優樹 臓器移植保存液としての S-ニトロソ化アルブミンの有用性評価 第 18 回日本血液代替物学会年次大会 2011 年 10 月 27 日-28 日
11. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VT, Sato K, Otagiri M, Maruyama T A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate accumulates in proximal tubular cells and induces cell damage through increasing oxidative stress 日本薬物動態学会 第 26 回年会 2011 年 11 月 16 日-18 日
12. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Otagiri M, Maruyama T, Carbon monoxide bound red blood cells prevent pharmacokinetic alteration caused by the degradation of hepatic P450 after resuscitation from hemorrhagic shock 日本薬物動態学会第 26 回年会 2011 年 11 月 16 日-18 日
13. Watanabe K, Ishima Y, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, Otagiri M, Maruyama T ACUTE-PHASE PROTEIN ALPHA1-ACID GLYCOPROTEIN ACQUIRES ANTIBACTERIAL ACTIVITY THROUGH S-NITROSATION BY A NITRIC OXIDE-DEPENDENT MECHANISM. 日本薬物動態学会第 26 回年会 2011 年 11 月 16 日-18 日
14. Fukuda T, Minomo A, Ishima Y, Suenaga A, Watanabe H, Otagiri M, Morioka H and Maruyama T IDENTIFICATION OF AMYLOID BETA PEPTIDE BINDING SITE ON HUMAN SERUM ALBUMIN 第 26 回年会 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16 日-18 日
15. Maeda H, Watanabe H, Ishima Y, Suenaga A, Otagiri M and Maruyama T GENETICALLY

ENGINEERED MANNOSYLATED-ALBUMIN WITH THIOLS, KUPFFER CELL TARGETING ANTIOXIDANT, ATTENUATED CONCAVALIN-A INDUCED HEPATITIS IN MICE. 第26回年会 日本薬物動態学会 2011年11月16日-18日

16. Kodama A, Tanaka R, Watanabe H, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T HUMAN SERUM ALBUMIN-THIOREDOXIN FUSION PROTEIN, A LONG ACTING ANTIOXIDANT, IS EFFECTIVE IN PREVENTING CONTRAST-INDUCED NEPHROPATHY 第26回年会 日本薬物動態学会 2011年11月16日-18日

17. Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kai H, Otagiri M, Maruyama T, α 1-酸性糖タンパク質による hemoglobin scavenger receptor (CD163) 発現誘導機構解析 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011年11月24日 -25日

18. Minomo A, Ishima Y, Narisoko T, Watanabe H, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M フェージディスプレイ法を用いたビリルビン高捕獲型アルブミン変異体の設計と評価 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011年11月24日 -25日

19. 南雲 恒平、杉森 剛志、山田 尚之、窪田 和幸、渡邊 博志、異島 優、田中 元彦、佐々木 裕、小田切 優樹、丸山 徹 ESI-TOF/MSを用いたシステイン付加型ヒト血清アルブミンの検出と機能相関-慢性肝疾患の影響- 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011年11月24日 -25日

20. 前田 仁志、渡邊 博志、異島 優、末永 綾香、小田切 優樹、丸山 徹 マンノース付加

アルブミンによるクッパ-細胞選択的チオール送達—急性肝障害に対する有用性評価- 第28回日本薬学会九州支部大会 2011年12月10日-11日

21. 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

22. 福田 哲也、蓑毛 藍、異島 優、末永 綾香、渡邊 博志、森岡 弘志、小田切 優樹、丸山 徹 フェージディスプレイ法を用いたアミロイド β -ヒト血清アルブミン相互作用の解析 第28回日本薬学会九州支部大会 2011年12月10日-11日

23. 福留 一平、宮本 洋平、本田 大輔、門脇 大介、末永 綾香、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 オルメサルタン・アゼルニジピン配合剤の抗酸化作用が動脈硬化症の進展に及ぼす影響 第28回日本薬学会九州支部大会 2011年12月10日-11日

24. 村田 道哉、児玉 彬、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質はインドキシル硫酸の生合成を促進する 第28回日本薬学会九州支部大会 2011年12月10日-11日

25. 杉森 剛志、南雲 恒平、渡邊 博志、異島 優、山田 尚之、阿部 高弥、小田切 優樹、丸山 徹 ESI-TOF/MSを用いた透析患者由来ヒト血清アルブミンの翻訳後修飾解析 第28回日本薬学会九州支部大会 2011年12月10日-11日

26. 永尾 紗理、田口 和明、田中 遼大、渡邊 博志、酒井 宏水、堀之内 宏久、小林 紘一、小田 切優樹、丸山 徹 ブレオマイシン誘発肺線維症に対する一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の有用性評価 日本薬学会第132年会2012年3月28日-31日

27. 小森 久和、渡邊 博志、首藤 剛、甲斐 広文、小田切 優樹、丸山 徹 α 1-酸性糖タンパク質によるCD163発現誘導を介した生体防御機構の解明 日本薬学会第132年会2012年3月28日-31日

28. 異 島優、原 茉莉絵、末永 綾香、甲斐 俊哉、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 Poly-SNO-アルブミンによる抗癌剤耐性克服効果と機序解明 日本薬学会第132年会2012年3月28日-31日

29. 渡邊 博志、本田 大輔、宮本 洋平、野口 剛、門脇 大介、異島 優、小谷 俊介、中島 誠、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 尿毒症物質p-クレジル硫酸の酸化ストレス誘導を介した腎障害作用 日本薬学会第132年会2012年3月28日-31日

30. 末永綾香、西弘二、小森久和、菊池真理、上原奈緒、福永直子、松元一明、渡邊博志、中城圭介、丸山徹、小田切優樹 α 1- 酸性糖タンパク質のヘモグロビン β 鎖介在性肝取り込み機構 日本薬学会第132年会2012年3月28日-31日

31. 丸山徹、前田仁志、渡邊博志、異島優、末永綾香、小田切優樹、急性肝障害に対するマンノース付加アルブミンを担体としたクッパー細胞選択的チオール送達の有用性評価 日本薬学会第132年会2012年3月28日-31日

国際学会

1. Tanaka T, Furukawa M, Ishima Y, Suenaga A, Watanabe H, Otagiri M and Maruyama T IMPROVED THERAPEUTIC EFFECT OF THIOREDOXIN BY FUSION TO HUMAN SERUM ALBUMIN AGAINST OVALBUMIN-INDUCED LUNG INJURY 4th Asia Pacific ISSX Meeting 2011/4/22-25

2. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Otagiri M, Maruyama T CARBON MONOXIDE BINDING RED BLOOD CELLS PREVENT CYTOCHROME P450 DEGRADATION IN RESUSCITATION AFTER HEMORRHAGIC SHOCK IN A RAT MODEL. 4th Asia Pacific ISSX Meeting 2011/4/22-25

3. Miyamoto Y, Iwao Y, Tasaki Y, Sato K, Ishima Y, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T and Otagiri M The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions 4th Asia Pacific ISSX Meeting 2011/4/22-25

4. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Sato K, Otagiri M, Maruyama T Uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF) causes renal cell damage *via* oxidative stress induction 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity 2011/5/12-5/14

5. Suenaga T, Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M A peptide moiety of human α 1-acid glycoprotein is

recognized by the hemoglobin β -chain on mouse liver parenchymal cells Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12

6. Watanabe H, Miyamoto Y, Noguchi T, Suenaga A, Kadowaki D, Otagiri M, **Maruyama T** Interaction between p-cresol sulfate and indoxyl sulfate during body disposition can influence their serum free concentrations in chronic kidney disease Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12

7. Nagumo K, Sugimori T, Ymada N, Kubota K, Ishima Y, Watanabe H, Tanaka M, Sasaki Y, **Maruyama T**, Otagiri M Quantitative assessment of cysteinylated human serum albumin using ESI-TOF/MS and its clinical significance in chronic

liver disease Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12

8. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Suenaga A, Otagiri M, **Maruyama T** Carbon monoxide bound red blood cells prevent alteration of hepatic cytochrome p450 activity after hemorrhagic shock and resuscitation Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12

9. Ishima Y, Otagiri M, Fukukawa M, Tanaka R, Chuang VT, Taguchi K, Watanabe H, **Maruyama T** Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12

G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし

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

研究分担者 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 川西 範明（早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科）
溝上 翼（早稲田大学 スポーツ科学部）
新原 弘之（早稲田大学 スポーツ科学部）
中山 直哉（早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科）
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）
武岡 真司（早稲田大学 理工学術院、教授）

研究要旨

本研究は、マウスに各種人工血小板素材を経静脈的に投与し、投与量やADPの有無が血液生化学検査値と網内系の異物反応に及ぼす影響を評価することを目的とした。投与24時間後に採血し、血液生化学検査により評価したところ、脂質プロファイルには影響は認められず、肝障害、腎障害も認められなかった。肝臓組織のtumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β 、IL-6、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1などの炎症性サイトカインの遺伝子発現にも有意な影響は認められなかった。以上より、H12-(ADP)リポソームは臓器傷害や炎症反応を惹起せず、生体適合性の観点から安全性の高い薬剤と考えられた。

A. 研究目的

人工血小板の最終候補薬剤である H12-(ADP)リポソームは、ラット、ウサギ等の実験動物に投与しても、血球数、血液生化学検査値、血液凝固検査値に異常がみられないことから、血液適合性がよく安全性の高いナノ粒子であることが証明されている（村田満、H22 報告書）。しかし、すべての構成成分が人工的に合成されており、異物に対する炎症反応や血栓誘発および臓器傷害が惹起される可能性が危惧される。

一般的に、血管内の異物は肝臓などの網内系に取り込まれ代謝・排泄されるが、異物が過量あるいは毒性を有しその処理能力を上回ると、薬剤性肝障害・腎障害の発症時にみられるように肝臓、腎臓の各種生化学検査値に異常が検出されるようになる。肝障害の機序としては、肝臓組織において tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin (IL)-1 β 、IL-6 などのさまざまな炎症性サイトカインが産生され組織傷害が惹起され、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1は血管内より単球を組織浸潤させ、さらに炎症性サイ

トカインの産生を助長する。

H12-(ADP)リポソームの薬物動態を検討した健常マウスの投与実験では、静脈投与によってまず小胞体構造を保持した状態で循環血液中に滞留した後（血中半減期はほぼ1時間）、その大部分は肝臓および脾臓の細網内皮系（マクロファージ）に取り込まれ、投与24時間後にはリポソームはほぼ血中に存在せず、脂質膜成分は主に胆汁排泄により糞中に、ADPは尿中に排泄され、投与7日後にはほぼ臓器に蓄積しないと報告されている（丸山徹、H22 報告書）。よって、標的臓器は肝臓と腎臓であり、網内系において異物処理を担うマクロファージの産生する炎症性サイトカインは生体影響評価の病態機序として重要と考えられる。また、リポソームの主成分はリン脂質とコレステロールであるが、これらの脂質構成成分は投与量依存的に血中濃度が上昇すると報告されており（村田満、H21 報告書）、高脂血症等の脂質代謝異常を起こす可能性があるほか、脂質負荷自体も肝臓の炎症性サイトカイン産生を助長し炎症反応を惹起する可能性がある。

そこで本研究では、健常マウスに H12-(ADP) リポソームを経静脈的に投与し、投与量の違いや ADP の有無が肝機能、腎機能、脂質代謝や網内系での異物反応に及ぼす影響について検討するために、血液生化学検査値と肝臓における炎症性サイトカイン産生により評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 実験動物と飼育条件

実験には 9 週齢の C57BL/6J 雄性マウス (体重 20 g) (紀和実験動物研究所 和歌山)を用いた。マウスは明暗サイクル環境下で飼育した。なお、本研究を実施するに先立ち早稲田大学動物実験審査委員会の承認 (2011-A021) を得て、各種規約を遵守して実験を行った。マウスは PBS コントロール群(n=8)、H12-(PBS)リポソーム(10mg/kg)投与群(n=8)、低用量 H12-(ADP)リポソーム(10mg/kg)投与群(n=8)、高用量 H12-(ADP)リポソーム(40mg/kg)投与群(n=9)に無作為に群分けした。

2. リポソームの投与

H12-(ADP) リポソーム (Lot#:111203-sk) と H12-(PBS)リポソーム (Lot#:111204-sk) を実験に用いた。リポソームの投与群には、イソフルラン麻酔下で低濃度の H12-(ADP)リポソーム(10mg/kg)、高濃度 H12-(ADP)リポソーム(40mg/kg)、H12-PBS リポソーム(10mg/kg)を含んだ PBS を 200 μ l 眼窩静脈叢より投与した。また、コントロール群には、リポソームの分散媒である PBS を 200 μ l 投与した。

3. 採血および組織採取

投与 24 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血し、肝臓を摘出した。ヘパリン処理した血液は 2,600xG、10 分間の条件で遠心分離を行った後に、血漿成分を回収した。肝臓組織は液体窒素で急速冷凍した後に、 -80°C で冷凍保存した。

4. 血漿の生化学検査

採取した血漿の各項目の生化学検査はオリエンタル酵母工業株式会社(滋賀)に委託した。

5. quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)

肝臓組織での mRNA の発現を測定するため、real-time PCR 法を用いて検討した。肝臓は Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いてホモジナイズした後に、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) および RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Valencia, California, USA)を用いて、Total RNA を抽出した。RNA 濃度は NanoDrop system (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)を用いて定量した。Total RNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)を用いて、逆転写反応により cDNA を作製した。cDNA は Fast SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)および Fast 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いて PCR を行い、条件は 95°C で 10 分間 cDNA を変性させ、1 サイクル 95°C で 15 秒間、 60°C で 1 分間アニーリングの条件で 40 サイクル繰り返した。構成的に発現する遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA を基準とし、全てのデータはターゲットの遺伝子発現量を $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により定量した。

6. 統計解析

測定結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。4 群間の比較には一元配置分散分析を行い、多重比較検定には Bonferroni の基準による多重比較検定を用い、有意水準は危険率 5%未満とした。

C. 研究結果

表1 マウス血漿中の生化学的指標 平均値±標準誤差

	PBS	PBS liposome 10mg/kg	H12-ADP liposome 10mg/kg	H12-ADP liposome 40mg/kg
尿素窒素 (mg/dL)	30.5±4.1	33.6±5.4	47.6±6.3	30.0±3.9
クレアチニン (mg/dL)	0.15±0.03	0.15±0.03	0.15±0.04	0.14±0.01
アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (IU/L)	40.0±7.1	40.4±7.3	41.6±11.1	40.6±8.6
アラニンアミノ基酵素 (IU/L)	20.44±4.22	18.44±4.22	19.33±4.90	18.88±4.30
アルカリホスファターゼ (IU/L)	483.1±39.1	451.7±72.9	464.0±52.3	469.0±16.9
乳酸脱水素酵素 (IU/L)	312.4±173.0	320.7±193.5	396.7±316.5	339.8±186.3
クレアチンキナーゼ (IU/L)	125.6±83.7	223.3±322.9	234.7±238.0	313.8±643.3
リン脂質 (mg/dL)	174.7±9.3	171.3±11.6	173.1±12.9	177.6±17.0
尿酸 (mg/dL)	0.6±0.4	0.6±0.3	0.6±0.4	0.6±0.3
ロイシンアミノペプチダーゼ (IU/L)	47.3±2.0	48.7±3.3	47.0±2.6	47.4±2.4
遊離コレステロール (mg/dL)	26.3±2.5	26.0±2.1	27.0±3.0	27.3±3.6
エステル型コレステロール (mg/dL)	62.3±5.4	62.7±4.4	61.0±3.4	62.4±7.3
トリグリセリド (mg/dL)	66.0±34.6	52.0±24.7	81±47.8	74.4±28.0
遊離脂肪酸 (μEq/L)	648.0±451.6	420.0±372.4	381.0±254.9	650.7±513.2

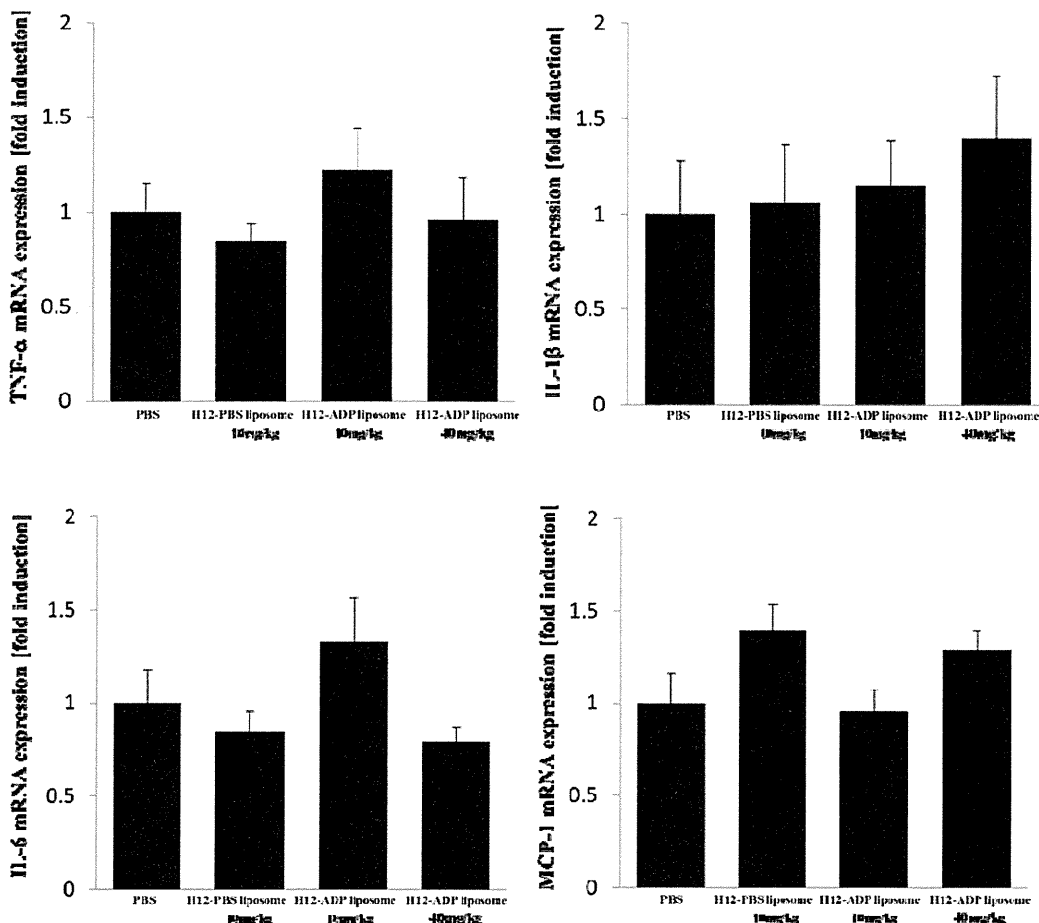


図1 肝臓組織における炎症性サイトカインの遺伝子発現 平均値±標準誤差

表 1 は、投与 24 時間後の血液生化学検査値について 4 群間の比較をしたものである。腎機能、肝・胆道系酵素活性には 4 群間に有意差は認められなかった。クレアチンキナーゼ活性は、平均値を見る限りリポソームの投与量依存的に高値となったが、有意差は認められなかった。脂質プロフィールも 4 群間に有意差は認められなかった。

図 1 は肝臓の炎症性サイトカインの遺伝子発現に関して検討した結果を示している。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 のいずれにおいても 4 群間に有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究ではリポソームの構成因子である各種脂質成分の血中濃度とその肝臓、腎臓への影響を各種生化学検査にて評価したが、すべての検査項目において有意な影響は認められなかった。また肝障害・炎症反応のメカニズムとして肝臓組織の炎症性サイトカインの遺伝子発現を検討したが、有意な影響は認められなかった。

まず血中の脂質関連指標に関しては、リン脂質濃度がリポソームの血中濃度の代理検査となると報告されているが（村田満・H22 報告書）、本研究では投与 24 時間後に既に血中濃度は投与前と同程度であった。先行研究では、マウスにおける 10 mg/kg 投与時の薬物動態は、血中半減期はおよそ 1 時間であり、投与後 1 時間で肝臓と脾臓にはほぼ均等に取込まれ、ほぼ 7 日間で体外に排泄され、体内蓄積性は低いと報告されている（丸山徹・H22 報告書）。よって、本研究では投与 24 時間後には血中に滞留していないためにリン脂質濃度は高値とならなかったものと考えられた。リポソームのもうひとつの主成分であるコレステロールについても、遊離型、エステル型ともに 4 群間に有意差は認められず、投与 24 時間後には血中で高値にならないことが確かめられた。このほか、中性脂肪、遊離脂肪酸にも影響は認められず、投与後血中に脂質成分の上昇が生じて肝臓に長時間にわたり脂質が負荷される可能性は低

いと考えられた。

薬剤性肝障害については、肝・胆道系の各種血中逸脱酵素の活性に群間差は認められず、腎機能障害についてもクレアチニン、尿素窒素、尿酸に影響は認められず、リポソームの代謝、排泄においても血液生化学検査値でみる限り、少なくとも投与 24 時間後には肝臓、腎臓に悪影響は認められなかった。病態機序となる炎症性サイトカインの産生に関しても、いずれの遺伝子発現にも有意な影響は認められなかった。

一方、本研究では健常マウスに血小板活性化を促進する H12-(ADP)リポソームを投与したことから、止血機能が増強し血栓症を誘発する可能性が考えられた（後藤信哉・H22 報告書）。検討した生化学検査項目のなかで、有意な上昇は認められなかったもののクレアチンキナーゼ活性が投与量に依存して高まり、H12-リポソームは骨格筋、心筋等に組織親和性があり筋損傷を招いた可能性が考えられた。今後は筋組織への集積性や運動時や虚血-再灌流等の骨格筋、心筋への血流が変化し血液凝固や炎症も亢進する条件下で検討する必要がある。

E. 結論

以上の結果より、H12-(ADP)リポソームは少なくとも単回投与翌日には異物反応として肝機能、腎機能等の悪影響を起さず、脂質代謝異常や炎症反応も惹起せず、生体適合性が高い薬剤と考えられた。

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。

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

研究分担者 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）
沢田 秀司（東京農工大学・早稲田大学共同大学院 先進健康科学専攻）
神田 和江（東京農工大学・早稲田大学共同大学院 先進健康科学専攻）
溝上 翼（早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科）
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）
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血中の好中球機能に及ぼす影響を検討した。脱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好中球機能の抑制作用が示唆された。これらの結果から、人工血小板が炎症や酸化ストレスを惹起する可能性は低く、その有効性・安全性が示された。

A. 研究目的

好中球は、体内に侵入した微生物に対抗する生体防御の第一線に位置づけられる白血球であり、その機能低下は易感染性をもたらす。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や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である。このように好中球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 (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産生が病態形成に関与するとされており、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生成すると不可逆的な組織傷害や多臓器不全を惹起し、好中球の活性酸素産生能が致死性の予測において有力な指標となる可能性が指摘されている (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、あるいは人工化合物が白血球と相互作用して異物反応を起こし、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。そこで初年度は、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人工血小板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したり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細胞接着因子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、好中球に含まれるミエロペルオキシダーゼ（MPO）を介して生成される次亜塩素酸などの殺菌や組織傷害に直接関与する毒性の高い活性酸素種を検出し、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 *ex vivo* での生体反応の解析に応用し、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

本報告書の本学らの報告のように、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。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 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 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血中血小板数が 5 万/ μ L 程度に減少するまで繰り返し、最終的には最後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。

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にて 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、(ADP)リポソーム、(PBS)リポソーム、PRP、PPP の投与条件

脱血と等量の洗浄赤血球輸血が終了した後に、直径 5 mm の Derma punch を用いて肝臓への組織損傷形成と輸液を行った。輸液の種類は、人工血小板である H12-(ADP)リポソーム 8 mg/kg を PPP で 30 mL に分散させたもの、人工化合物としては H12 が付いていない(ADP)リポソーム 8 mg/kg と (PBS)リポソーム 8 mg/kg（それぞれ PPP で 30 mL に調整）、さらには生体由来物質は採取した PRP 及び PPP を 30 mL とし、各々を静脈内投与した。H12-(ADP)リポソームについては 15 羽、H12 が付いていない(ADP)リポソームについては 5 羽、H12 が付いていない(PBS)リポソーム

については3羽、人工血小板を全く含まないPRP投与については6羽、人工血小板を全く含まないPPP投与については3羽検討し、それぞれ採血して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）、血中血小板数が5万/ μL 程度にまで下がり洗浄赤血球輸血が終了した後（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・浸潤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 (SIGMAALDRICH, 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、さらにハンクス培養液 (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 μL 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 μL 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にて化学発光量を測定した。

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、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。

6. 統計処理

本研究は、人工血小板投与の影響を他の人工化合物や生体由来物質を投与したモデルとの比較によって評価することを目的とした。そのため、測定結果の統計処理においては、人工血小板投与群、人工化合物の(ADP)リポソームおよび(PBS)リポソーム投与群、生体由来物質投与群 (PRP および PPP) の3群に分け、二元配置分散分析(対応あり)によって単純主効果の検定を行い、有意差の認められたものに関しては Bonferroni の基準によって多重比較検定を行った。なお、すべての測定結果は平均値±標準誤差で示した。

C. 研究結果

1. 血中好中球の接着・遊走能の推移

好中球の接着・遊走能について、単純主効果の検定によって人工化合物投与群で有意差が認められた ($p<0.05$)。多重比較検定を行った結果、人工化合物投与群における好中球の接着・遊走能は、脱血後に有意に上昇した ($p<0.01$)。また、生体由来物質投与群においても、脱血後には上昇する傾向がみられた。その後、人工化合物投与群では、輸液後に好中球の接着・遊走能の有意な抑制がみられた ($p<0.05$)。その他の2群については輸液前後で有意な変化はみられなかったが、3群ともに輸液後の値は一定の水準に近似した。人工血小板投与群に関しては、実験開始から輸液後に至るまで、好中球の接着・遊走能の大きな変動はみられなかった (図1)。

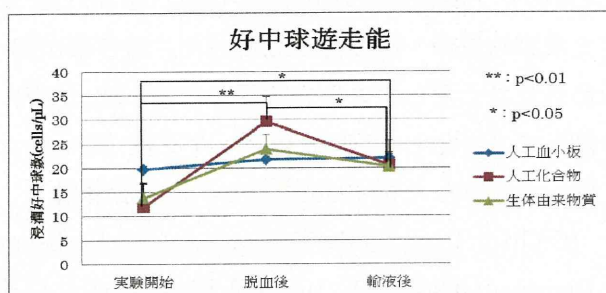


図1. 血中好中球の接着・遊走能 (ハイドロゲル回収細胞数/μL) の推移

2. 血中好中球の活性酸素産生能の推移

実験開始時の好中球活性酸素産生能は、概ね低い値であったが、統計解析の結果、人工血小板投与群と生体由来物質投与群において、有意な上昇がみられた (図2)。一方、脱血後においては、好中球の活性酸素産生能の顕著な上昇例が認められ、人工化合物投与群では有意な変動がみられた (図3)。しかし、輸液後には生体由来物質投与群において有意な上昇が認められるものの (図4)、脱血後に生じた人工化合物投与群における上昇は有意に抑制されていた (図5)。また、人工血小板投与群に関しては、いずれの段階においても有意な変動はみられなかった。

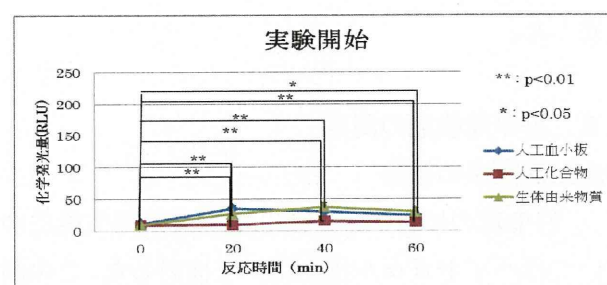


図2. 実験開始時における、血中好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光量: RLU) の推移

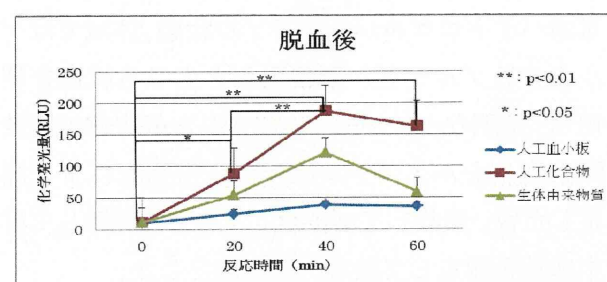


図3. 脱血後における血中好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光量: RLU) の推移

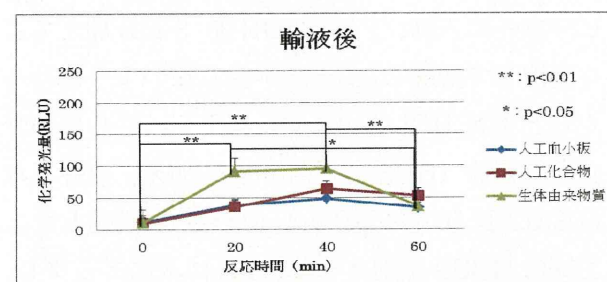


図4. 輸液後における血中好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光量: RLU) の推移