

201108004B

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21～23年度 総合研究報告書

研究代表者 半田 誠  
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法部 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21～23年度 総合研究報告書

研究代表者 半田 誠  
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法部 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21～23年度  
総合研究報告書

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. 総合研究報告書

#### ・総括研究報告書

半田 誠	1
参考資料	17

#### ・分担研究報告

#### 1. H12-(ADP)リポソームの止血能評価および効力評価モデルの検討

池田 康夫	23
-------	----

#### 2. H12-(ADP)リポソームの品質保証体制の構築と内包物・膜組成の最適化検討

武岡 真司	39
-------	----

#### 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

木下 学	53
------	----

#### 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	96
------	----

#### 5. 人工血小板が炎症・免疫系に及ぼす影響からみた安全性評価に関する研究

鈴木 克彦	120
-------	-----

#### 6. マウスモデルを用いた安全性評価

後藤 信哉	127
-------	-----

#### 7. 臨床検査値への影響：血液凝固系、生化学、血栓マーカー、血中濃度代理マーカー

村田 満	133
------	-----

#### 8. 止血血栓への関与の超微細形態学的解析

鈴木 英紀	141
-------	-----

#### 9. $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンと H12 担持リポソームの結合機序に関する研究

鎌田 徹治	151
-------	-----

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表

### III. 研究成果の刊行物・別冊

## I. 総合研究報告

# 総括研究報告

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 21～平成 23 年度 総合研究報告書

主任研究者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

研究要旨

【目的】 H12 (ADP) リポソーム (フィブリノゲン由来合成ペプチド (HHLGGAKQAGDV: H12) を表面に担持させ、アデノシン 5' -二リン酸 (ADP) を内包させた PEG 化リン脂質小胞体) の効力と安全性を検討し、人工血小板としての適格性を評価した。

【方法と結果】 肝臓損傷による出血性ショックで致死性となる大量出血・輸血起因性の希釈性血小板減少症ウサギモデルにおいて、当該リポソーム (以下 LP) は血小板輸血に匹敵する止血効果と高い救命率を示した。RI 標識 LP の健常小動物 (マウス、ラット、ウサギ) 及び薬剤 (ブスルファン) 性血小板減少症動物 (ウサギ) の体内動態の検索で、LP が十分な血中滞留性と低い臓器蓄積性を有し、アニマルスケアアップ予測によりヒトに十分適用できる可能性が示された。LP 単回投与で、脂質検査値の一過性上昇を除いて、健常動物の血液・凝固系や生化学マーカーに影響しなかった。健常ラット及び外傷ウサギモデルで好中球機能 (ルミノール発光反応による活性酸素測定など) を指標とした炎症反応を惹起しなかった。動脈血栓症 (マウス精巣動脈閉塞試験など) や動脈血栓症 (DIC ラット) を誘導あるいは増強しなかった。LP の機能最適化には、内包物質 (5-HT) や脂質膜物性 (表面荷電) の選択が重要であった。品質保証体制の構築に向け LP の物性評価項目 (濃度、サイズ、 $\zeta$  電位、H12 担持量、脂質構成比、ADP 内包量) が設定された。LP は血小板凝集による物理的刺激で脂質流動膜攪乱が起こり、ADP を放出する可能性が電顕で示された。LP の標的となる高親和性の活性型・IIb・3 が作製され、LP の機能検定法として利用できる可能性が検討された。

【考察・結論】 効力と安全性の面から、LP の人工血小板としての適格性を示した。希釈性血小板減少による致死性肝臓損傷モデルにて、LP は血小板輸血に比較しうる出血量抑制効果と救命率向上を示した。一方、医薬品開発に求められる安全かつ有効な体内動態を示し、炎症や血栓症の誘発・促進作用は認めなかった。緊急で時宜を得た血小板輸血の利用が困難な外傷性急性血小板減少症を適応症とした次なる開発ステップへの移行を推奨するデータが提示できた。

## 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（総括報告書、参考資料：図1、2）。

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  $\gamma$ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* 7: 470-477, 2009）（図3）。

本研究（3カ年計画）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効力と、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）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）が確保できる試験物であるかを検討した（図4）。



## B. 研究方法

### 1. H12(ADP) リポソームの調整と物性評価 (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。H12(ADP/5HT) リポソームは、上記以外に構成成分のモル比の異なる 2 種類 (5/5/3/0.039/0.039、5/5/5/0.045/0.045) の微粒子を、ADP/5HT 溶液 (ともに 1 mM) と水和させて製造した。陰性荷電脂質である DHSG の含量を増やした 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 にして製造した。

### 2. 血小板減少動物モデルによる効力評価:

1) 薬剤性血小板減少症 (池田、武岡、丸山) : 抗癌剤 (ブスルファン) 惹起血小板減少症ラットおよびウサギモデルにおける試験物の止血効果 (*in vivo* 機能) や体内動態評価は既報の尾切法および耳介法による出血時間で検討した (Okamura Y, *et al*: *J Thromb Haemost* 7: 470, 2009)。

2) 希釈性血小板減少により生じた致死性外傷モデル (木下) : 外傷に伴う大量出血/輸血による致死性の急性血小板減少ウサギモデルを以下のように確立した。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、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 (陰性対照)、多血小板血漿 (PRP) (陽性対照)、PPP 単独 (陰性対照) の投与を行ない、連続して、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 (事前投与プロトコル)。一方、より実地臨床に則して、肝臓の円筒状組織欠損箇所を 5 分間小児用尿道バルーンカテで圧迫する (ダメージコントロール処置) 間に、上記試験物を投与して、その臨床効果を評価した (事後投与プロトコル)。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。

### 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。同様に、ブスルファン惹起血小板減少症モデルラットを使用して、リポソームの体内動態を検討した。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。リポソーム構成成分に対する抗体産生は、リポソームを単回投与したラットの血清について、そこに含まれる結合性 IgG と IgM の抗体価を抗原固相化したプレートを用いた酵素抗体法を使用して経時的に定量した。

2) 血栓症誘発作用の動物モデル評価 (後藤、村田): 塩化鉄でマウス精巣動脈内に誘発した動脈血栓症モデルを用い、リポソームの血栓生成への影響をリアルタイムに定量評価した。また、蛍光標識リポソームの動脈血栓への集積を観察した。また、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)。種々の濃度に稀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) 炎症反応誘発・促進作用の検討 (鈴木克): 致死性外傷ウサギモデルにおいて、試験物の炎症反応への影響を、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。また、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:

1) リポソームの血小板との反応様式の超微細形態的検索 (鈴木英): 免疫法や急速凍結切断レプリカ法を用いて、コラーゲンや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) 血液・生化学検査値への影響 (村田): ラットやウサギの血小板数や血液凝固検査、血液生化学検査の測定した。

3) H12 ペプチドと  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリンの結合に関する検討 (鎌田) : CHO 細胞発現系で site mutagenesis による変異体を用いた血小板  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリンの構造分子学的な解析を行ない、機能測定系に利用する活性型変異体を検索した。リポソームの機能検定法の検討には、当該インテグリン発現 CHO 細胞と蛍光 (DiOC18) 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。

#### (倫理面での配慮)

*in vitro* 実験用血液の採血は、健常人ボランティアからの十分なインフォームドコンセントのもと行った。また、実験動物を使用した *in vivo* 解析は、施設内の実験動物に関する取扱規程の遵守のもと行った。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. H12(ADP) リポソームの効力評価 (木下)

H12(ADP) リポソームの事前 (出血前) 及び事後 (出血後) 投与により、比較した血小板輸血と同等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で生じる致死性外傷動物モデルの救命率の向上が達成された : 試験物の事前投与 (肝臓損傷 10 分前) 及び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) の臨床効果を検討した (木下分担報告、図 1-7)。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、同時に凝固因子も前値の 30% 程度に低下して、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 (図 8)。そこで、常用量の 20 mg/kg の H12(ADP) リポソーム/PPP 浮遊液と比較対照の (ADP) リポソーム (H12 非結合) /PPP 浮遊液、PRP (多血小板血漿) と PPP (乏血小板血漿) の臨床効果を検討した。事前投与プロトコルにおいては、試験物投与 15 分後に損傷を与えられた肝臓からの出血量を比較すると、最初の 5 分間は、陰性対照 (PPP と (ADP) リポソーム) に比較して PRP は有意な減少を示したが、H12(ADP) リポソームの効果は明らかでなかった (図 14)。しかし、それに続く 5 分間では、むしろ

PRP より強力に H12 (ADP) リポソームは出血量を減少させた。そして結果的には、H12 (ADP) リポソームは PRP と比べて全く遜色なく、肝臓からの出血の持続時間を陰性対照の半分以下に短縮させた (図 15)。肝臓損傷後 72 時間までの観察で、PPP (N=10) と (ADP) リポソーム (N=5) を投与された動物の生存率はそれぞれ 10% と 20% であった (図 13)。一方、H12 (ADP) リポソーム (N=10) と PRP 投与群 (N=10) では 100% が生存した。一方、事後投与プロトコルにおいては、PPP 投与群 (N=3) 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 (N=5) 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 (N=5) 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 (H23 木下分担報告、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 19)。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 20)。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 (H23 木下分担報告、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、事前投与に比較して、圧迫止血処置を併用したにもかかわらず、試験物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。

なお、薬剤性血小板減少動物でリポソームの止血増強機能には至適用量 (ラット: 10 mg/kg、ウサギ: 20-40 mg/kg) が存在し、それ以上の投与量ではむしろ効果は減弱する可能性が示された (池田、図 1、2)。リポソームの止血機能は残存した血小板の機能を増強することで発揮されると考えられている。しかし

ながら、血小板に対してリポソームの濃度比が至適域を越えて過剰になると、むしろ血小板の凝集を阻害する方向にリポソームが働く可能性が示唆される。当該外傷性モデルの血小板数は5万/・1程度で、内科的予防投与基準の1-2万/・1より高めであり、血小板のリポソームに対する量的比率がより低くなっている可能性がある。今後は高用量（40-80 mg/kg以上）での効果を検討する必要がある。

## 2. 安全性の評価（丸山、鈴木克、村田、後藤）

1) 体内動態解析：H12(ADP)リポソーム（単回投与）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：  
 $^3\text{H}$ -コレステロールおよび/または $^{14}\text{C}$ -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 $^3\text{H}$ と比較して $^{14}\text{C}$ 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、健常動物と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8、9）。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10）。

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。

なお、H12(ADP)リポソームのラットへの単回投与により、脂質膜の構成成分に対する IgM 抗体が惹起された。リポソームを構成する脂質成分に対する抗体が惹起されることで、薬剤の頻回投与により網内系でのクリアランスが加速され、リポソーム製剤の効果が低下する現象 (accelerated blood clearance phenomenon: ABC 現象) が一般に知られている。実際、治療域での投与量 (10 mg/kg から 20mg/kg) で、脂質構成成分の一つである DSPE-PEG に対する IgM 抗体が投与後 5-10 日をピークとして誘発された (図 11、12)。したがって、今後、連続あるいは継続投与スケジュールを想定する場合は、Ig M 抗体がどのように影響するかを、投与量や網内系の処理能力 (capacity) と抗体の関係について体内動態解析を通じて検討してゆく必要がある。

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 (鈴木克分担研究報告、表 1)。肝臓内での炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1b、IL-6、MCP-1) の合成促進 (mRNA) 作用も認められなかった (H23 分担報告、その 1、図 1)。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 (図 4、5)。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（村田分担研究報告、図 1）。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 5）。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。

4) 実験的動脈血栓症マウスモデルにおいて、H12(ADP)リポソームによる動脈血栓の形成を助長する作用は認められなかった：H12(ADP)リポソームは血小板の凝集を促進することで止血機能を発揮するが、血小板が主役である病的な動脈血栓への影響は薬剤の安全性から最も危惧される。そこで、塩化鉄の局所処理によりマウスの精巣動脈に誘発させた血栓へのリポソームの影響を *in vivo* で検討した結果、治療域の投与濃度（10 mg/kg）において、動脈の血栓による閉塞時間は対照と比較して、有意な変化を示さなかった（後藤分担研究報告、図 3、4）。今回の結果は、H12(ADP)リポソームと活性化血小板の結合は、ずり速度の高い条件下では成立しにくいとの知見と一致する。さらに、リポソームの投与でマウスに異常行動が観察された（図 5）。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（図 6）。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を得る必要がある。

5) H12(ADP)リポソームの健常動物への大量投与で安全性を危惧する臨床検査値の変化は認められなかった。H20 年までの検討では、リポソームも単回投与に関して、血小板減少動物（ラット、ウサギ）における臨床検査値を検討し、出血凝固系検査への影響は一切認められなかった。そこで、今回は健常ラットを対象として、リポソームの単回投与による臨床検査値への影響を検討した。その結果、標準量の 2 倍の過剰投与（80 mg/kg）においても、血小板数の変化は起こらなかった（H21 村田分担研究報告、図 1-1、3-1）。一方、コレステロールや中性脂肪などの脂質項目は、投与したリポソームの脂質含量に依存して、一過性に血清値が上昇した（図 3 及び H21 村田分担研究報告、図 1-3、-4）。また、それとともに、主な異化臓器である脾臓での脂質含量が増加した（肝臓では増加せず）（H21 村田分担研究報告、図 2）。

### 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) 物性の最適化、内包物質の選択と脂質膜表面荷電の影響 : ADP に加えて、血小板に存在する生理的アゴニストの 5HT (セロトニン) を追加で内包することで、薬剤性血小板減少症ラットでの検討で H12(ADP)リポソームの止血機能を増強することがわかった(武岡分担研究報告、図 5)。

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(図 6, 7)。そこで、その *in vivo* 機能を確認するために、薬剤性血小板減少症ラットにおいて、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、全く認められなかった(池田分担研究報告、図 10)。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。

2) 品質保証体制構築に向けた物性評価基準項目の確立 : 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(武岡分担研究報告、図 8、9)、NMR による脂質構成比(表 6)、そしてゲル濾過/HPLC による内包化 ADP の含量(図 10、表 7)が追加された。上記 6 項目によるリポソーム試験物の物性を評価し、ロット間での高い再現性が確認された。

3) H12(ADP)リポソームのアゴニスト惹起血小板凝集増強作用の形態的解析 : リポソームの内包物質(ADP)による血小板凝集促進作用について、透過型電子顕微鏡による形態的観察により、リポソームが低濃度コラーゲンで活性化した血小板を架橋して、その内容物である ADP を放出して、凝集塊の密度やサイズを増加させていることを示唆する結果が示された(鈴木英分担研究報告、図 2-6)。急速凍結切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(図 11)、一方、血小板凝集に巻き込まれたリポソームは楕円形に変形して、一部ではその表面に小孔様の穴が観察された(図 15、16)。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、凝集に伴う物理的变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 ペプチドと  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリンの結合に関する検討:  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリンの活性型への高次構造変化を種々の変異体を用いて解析し、恒常的に活性型構造をとる変異体 (Q595NTT) を同定した (鎌田分担研究報告、図 1)。個人差の多いヒト血小板を用いずに、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、H12 結合リポソームの機能の標準化を検定できる品質保証体制の構築には不可欠である。野生型および変異体 (Q595NTT) の  $\alpha$  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、活性型インテグリン (抗体惹起及び変異体) に依存性の特異的結合が測定でき、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。(図 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 8)。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、受容体発現量が不安定な細胞を使用することや調製困難なリガンドの蛍光標識が必要であることを含めて再現性などの点で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表面プラスモン共鳴等による固相化した変異体 (Q595NTT) 蛋白へのリポソームの結合が測定可能な無細胞系の構築が求められる (図 15)。

#### 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 (まとめ: 総括報告添付資料、図 7、8)。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薬剤開発の次なるステップへの方向性が示された (図 9、10)。

#### E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(原著)

- (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)
- (5) 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**:484-489 (2011)
- (6) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Maruyama, H, Handa, M., Ikeda, Y. and Takeoka, S. Release abilities of adenosine diphosphate from phospholipid vesicles with different membrane properties and their hemostatic effects as a platelet substitute. *J. Controlled Release*, **148**,

373-379 (2010)

(7) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Visualization of Liposomes Carrying Fibrinogen  $\cdot$ -Chain Dodecapeptide Accumulated to Sites of Vascular Injury Using Computed Tomography *Nanomedicine*, 6, 391-396 (2010)

(8) Nogami, Y., Takase, B., Kinoshita, M., Shono, S., Kaneda, S., Ishihara, M., Kikuchi, M., Maehara, T. Characteristic changes in heart rate variability induces during hemorrhagic shock, and effect of liposome-encapsulated hemoglobin in rats. *J Arrhythmia* 26: 189-198 (2010)

(9) Kamata T, Handa M, Ito S, Sato Y, Ohtani T, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S. Structural requirements for activation in alphaIIb beta3 integrin. *J Biol Chem* 285(49):38428-38437 (2010)

(10) Wada, T., Okamura, Y., Takeoka, S., Sudo, R., Ikeda, Y., Tanishita, K. Deformability and adhesive force of artificial platelets measured by atomic force microscopy. *J. Biorheol.*, 1, 35-40(2009)

(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 回日本血液代替物学会 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、勝野俊介、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  $\gamma$ -chain dodecapeptide-modified liposomes as a synthetic platelet substitute. XXIIIInd 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. XXIIIInd Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011. 7. 24-28. Kyoto

(10) 勝野 俊介, 岡村 陽介, 鈴木 英紀, 渡邊 直英, 池田 康夫, 武岡 真司, 半田 誠. 「膜流動性の異なるドデカペプチド結合 (ADP 内包) リポソームの ADP 放出特性とその止血能評価」第 33 回日本血栓止血学会学術集会 (2010. 4., 鹿児島).