

- (11) 武岡 真司. 「アミノ酸型脂質からなる pH 応答性リポソームとナノ医療としての可能性開」 第 17 回日本血液代替物学会年次大会 (2010. 10., 熊本)
- (12) 半田 誠: 人工血小板の開発状況、シンポジウム「人工血小板の現状と将来」第 17 回日本血液代替物学会 (2010. 10., 熊本)
- (13) 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、齋藤大蔵、関修司、阪本敏久: 外傷性大量出血時の大量輸血に伴う血小板減少に対して人工血小板 H12 (ADP) liposome を用いた止血制御効果. 第 17 回日本血液代替物学会 2010, 熊本.
- (14) 新井 愛美, 岡村陽介, 勝野峻介, 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 32 回日本バイオマテリアル学会大会 (2010. 11., 広島).
- (15) 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: 人工血小板 H12 (ADP) リポソームを用いた外傷性大量出血に伴う血小板減少時の止血制御に関する研究. 第 25 回日本 shock 学会総会 (2010, 東京)
- (16) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 渡邊 直英, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「膜流動性の異なるドデカペプチド結合 (ADP 内包) リポソームの構築と ADP 放出特性」 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会 (2009. 11., 京都).
- (17) Handa, M. Artificial platelets and platelet substitutes, Novel developments, Plenary lecture, XXth regional congress of International Society of Blood Transfusion, Nagoya (2009. 10., Nagoya).
- (18) 半田 誠. 人工血小板代替物の過去・現在・未来、日本血液代替物学会 第 16 回年次学術総会 特別講演、東京、(2009. 10., 東京).
- (19) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「膜流動性の異なるドデカペプチド結合 (アデノシン 5' -二リン酸) 内包リン脂質小胞体の調製と ADP 放出特性」 第 16 回日本血液代替物学会年次大会 (2009. 10., 東京).
- (20) 武岡 真司, 岡村 陽介, 江藤 薫子, 半田 誠, 池田 康夫. 「放射性同位元素標識ドデカペプチド結合 (アデノシン 5' -二リン酸) 内包リン脂質小胞体の調製とその血中動態・臓器分布」 第 16 回日本血液代替物学会年次大会 (2009. 10., 東京).

G. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」
特願 2007-000296. 登録 US Patent No. 7, 887, 837 “DRUG DELIVERY MATERIAL”
- (2) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 宇都宮 沙織, 後藤 隆宏 「薄膜状高
分子構造体とその調製方法」特願 2006-292688.

添付資料

図1 平成21-23年度厚生労働科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業
 「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)」
 (課題番号:H21-政策創薬-一般-005)

研究代表者: 半田 誠 (慶應大医 輸血・細胞療法センター)	研究期間: H21-H23年度
研究分担者: 池田 康夫 (早大理工学術院)	交付額: H21: 38,998,000 円(間接経費込)
武岡 真司 (早大理工学術院)	H22: 35,000,000 円(間接経費込)
木下 学 (防衛医大侵襲免疫学)	H23: 37,700,000 円(間接経費込)
丸山 徹 (熊本大 薬学部)	
鈴木 克彦 (早大スポーツ科学術院)	
後藤 信哉 (東海大医 循環器病学)	
村田 満 (慶應大医 臨床検査医学)	
鈴木 英紀 (日本医大 形態解析共同研究施設)	
鎌田 徹治 (慶應大医 解剖学)	

本研究の背景

- 人工血小板の必要性

医療: 血小板輸血(期限極短、保存条件厳重)は緊急対応が困難→いつでも使える

政策: 血液の需要増加と献血不足→血液製剤の安定供給の確保(血液法)に資する


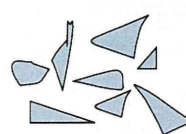
- 人工血小板の開発状況

海外: 90年代より欧米でベンチャー企業が開発(軍事費の支援)、ヒトアルブミン微粒子にヒトフィブリノゲンをコートした薬剤が臨床試験を経たものもあるが未だ実用化されていない。




日本: 97年、厚労科研究班が組織され、前回(H18-20政策創薬/臨床応用可能な人工血小板としてのH12結合微粒子のin vivo評価)の研究で、世界に類を見ない完全型(非生物製剤)の人工血小板としてH12(ADP)リポソームを最終候補とするに至った。

図2 **人工血小板**

■ 血小板由来産物 (凍結乾燥品)

	Lyophilized whole platelets	(Stasix™:Entegrion)	前臨床
	Platelet membrane fragments	Infusible Platelet Membrane (Cyplex™:Cypress Bioscience)	臨床I/II

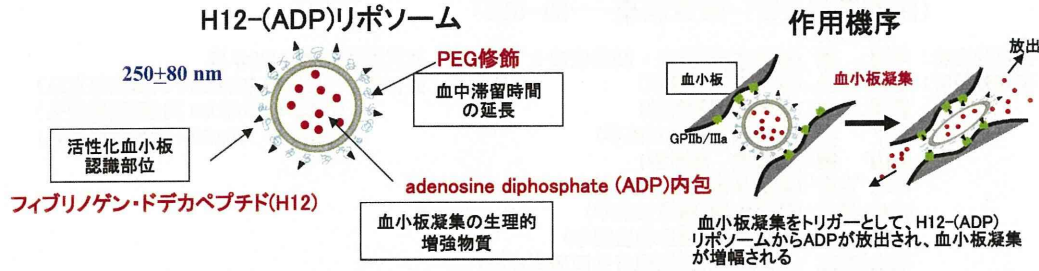
■ 人工血小板: フィブリノゲン・リガンド結合微粒子

	Alb microcapsules	(Synthocytes™:ProFibrix)	臨床I/II
	Alb microspheres	(Simplat™:Advanced Therapeutics)	臨床II/III
		(HaemoPlax™:Haemostatix)	前臨床
Human fibrinogen peptide (H12)	liposomes	(Y Okamura, et al, 2005-2009)	前臨床
	PLGA *	(Bertram JP, et al, 2009)	前臨床
		*ポリ乳酸・グリコール酸	

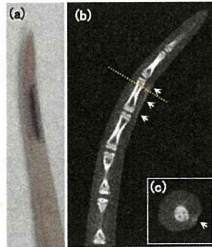
完全型人工物

図3

H12(ADP)リポソームの構造と機能

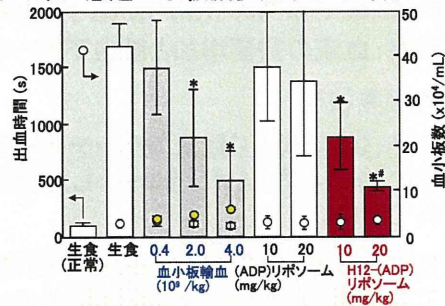


出血部位への特異的集積



(a) ラット尻尾の切創
 (b) 尻尾のCT像
 (c) (b)のCT断層像
 J Thromb Haemost 6:470-7 (2009)

H12-(ADP)リポソームの止血能評価 (N=6-8)
 プスルファン惹起血小板減少症ウサギ耳介出血時間



*P<0.05 vs. 生食群、**P<0.05 vs. (ADP)リポソーム群
 ○: 投与前の血小板数、●: 血小板輸血後の血小板数
 J Thromb Haemost 6:470-7 (2009)

図4

本研究の目的／目標

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集学的なマクロ評価を行い、

- 1) ニーズのある病態モデルでの薬効、2) 血栓症惹起作用等の安全性、を確認して、平行して、3) 試験物性能の最適化を行うことで、人工血小板としてのfeasibilityを評価する。

本研究の成果

効力評価

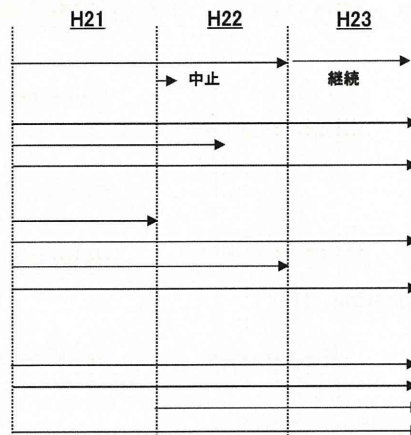
- ・治療的投与モデル (木下)
 - 外傷/大量出血
 - 急性肝不全
- ・予防的投与モデル (池田、武岡、半田)
 - 抗がん剤による血小板減少症
 - 薬剤起因性血小板機能低下症
- ・血栓部位の超微形態学的観察 (鈴木(英))

安全性評価

- ・臨床検査値への影響 (村田、半田)
- ・薬物動態試験 (丸山)
- ・炎症・免疫系への影響 (鈴木(克))
- ・血栓症誘発リスクの検討 (後藤)

最適化

- ・リポソームの規格 (武岡)
- ・適応症/適応法 (池田、半田)
- ・血中濃度検査法の開発 (村田、半田)
- ・H12ペプチド (鎌田)



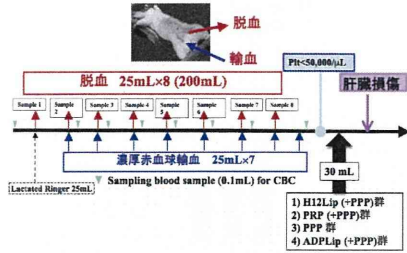
成果: 効力評価

図5

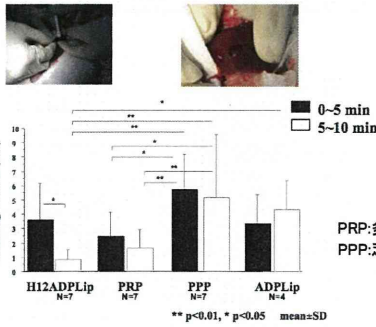
大量出血に伴う稀釈性血小板減少/臓器損傷ウサギモデル:

H12(ADP)リポソームは20 mg/kg において、血小板輸血に匹敵する、有意な出血量低減効果および救命率向上効果を示した(西川可穂子:2011日本ショック学会賞、萩沢康介ら:2011万国外科学会招待演題、Nishikawa K, et al: H12(ADP)-liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. Ann Surg 投稿中)

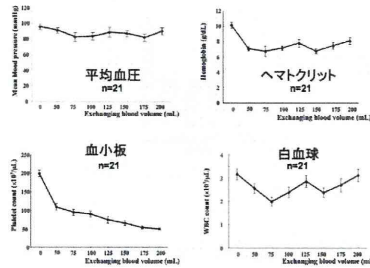
大量出血に伴う稀釈性血小板減少モデル



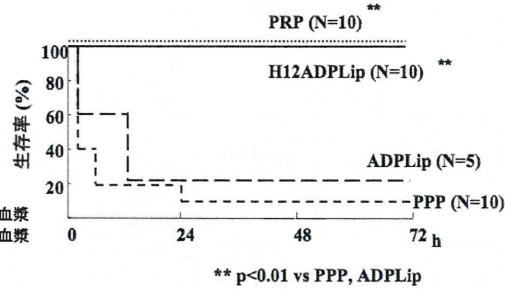
傷害された肝臓からの出血量



血液交換中の各種パラメーターの推移



大量輸血後の肝臓外傷ウサギの予後

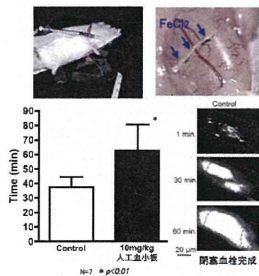


成果: 安全性評価

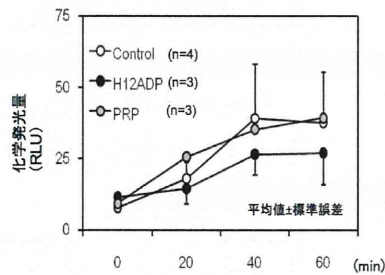
図6

- 血栓症を誘発するか: マウス精巣動脈血栓症モデル、ラットDICモデル
- 異物反応を起こすか: 稀釈性血小板減少ウサギモデル/WBC活性酸素生成能
- 体内動態/体内蓄積性があるか: マウス、ラット、ウサギ薬物動態試験(ヒトへ実装化)

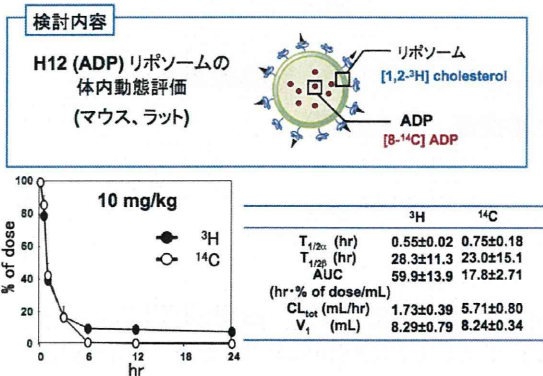
マウス精巣動脈血栓閉塞時間



血小板減少モデルにおける好中球機能評価



血漿中濃度、動態パラメーター (マウス)



臓器分布及び排泄 (10 mg/kg; マウス)

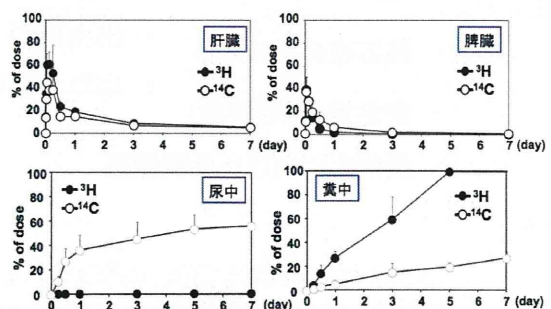
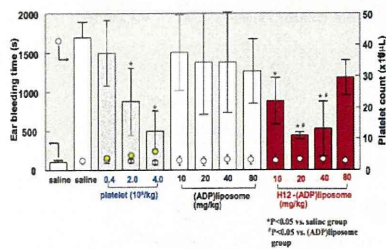


図7

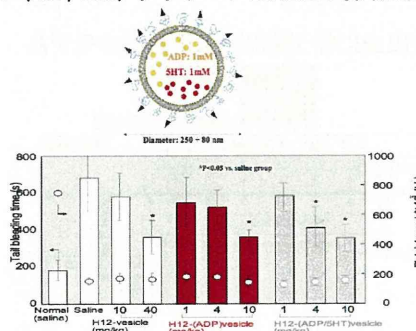
成果:最適化

- 最適濃度 / 抗癌剤血小板減少ウサギ
- セロトニン(5HT)の共封入化 / 抗癌剤血小板減少ラット
- 膜組成(荷電の影響) / 血小板凝集能 (in vitro)

H12-(ADP) リポソーム投与量と出血時間短縮効果



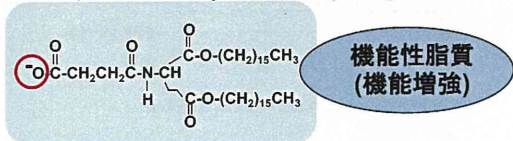
H12-(ADP/5HT) リポソームの出血時間短縮効果



リポソーム脂質膜組成 (by mol)

表面陰性荷電	(a)	<<	(b)
DPPC	5		5
Cholesterol	5		5
DHSG	1		5
PEG-DSPE	0.033		0.045
H12-PEG-Glu2C18	0.033		0.045

DHSG: 1,5-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate



脂質陰性荷電と血小板機能増強作用

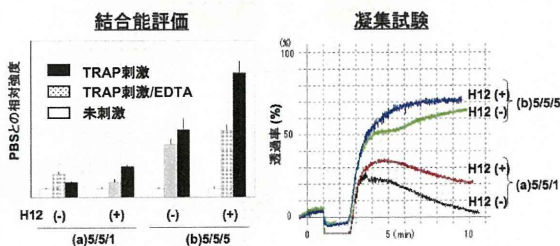


図8

人工血小板としてのH12(ADP)リポソーム

総括

- ニーズのある病態モデルでの効力
 - 大量出血による稀釈性血小板減少症(多発外傷、術中危機的出血 / 単回投与)
 - 抗癌剤惹起血小板減少症(造血器疾患 / 複数回投与)
 - 血栓症惹起作用や炎症誘発作用等の安全性と体内動態
 - 危惧される急性副作用は現在まで認められない
 - 十分な血中滞留性と排泄性を認める(ヒトへ実装化)
 - 試験物の性能最適化
 - 内包化物質(5HT)の選択で機能が增强される
 - 脂質表面荷電(陰性)の操作で機能が增强される
- H12(ADP)リポソームの人工血小板としての開発のfeasibilityを明らかにできた

今後の計画

- 適応症の絞り込み
 - 出血治療(外傷、術中の大量出血、緊急輸血)
 - 出血予防(造血器疾患、悪性腫瘍)
- 安全性(長期作用)
- 製剤化に向けた品質保証

将来目標

基本特許(薬物運搬体: 特願2007-000296 / 欧州、米国、中国、韓国出願)のもとで提携企業(米国国防省?)を捜し、非生物製剤として創薬化へのタイミングを図ってゆく

図9

候補薬物: H12(ADP)リポソーム

想定する薬効: 人工血小板(血小板輸血の人工代替物)

想定する適応症: 外傷や手術に伴う大量出血/危機的出血

● 相談事項

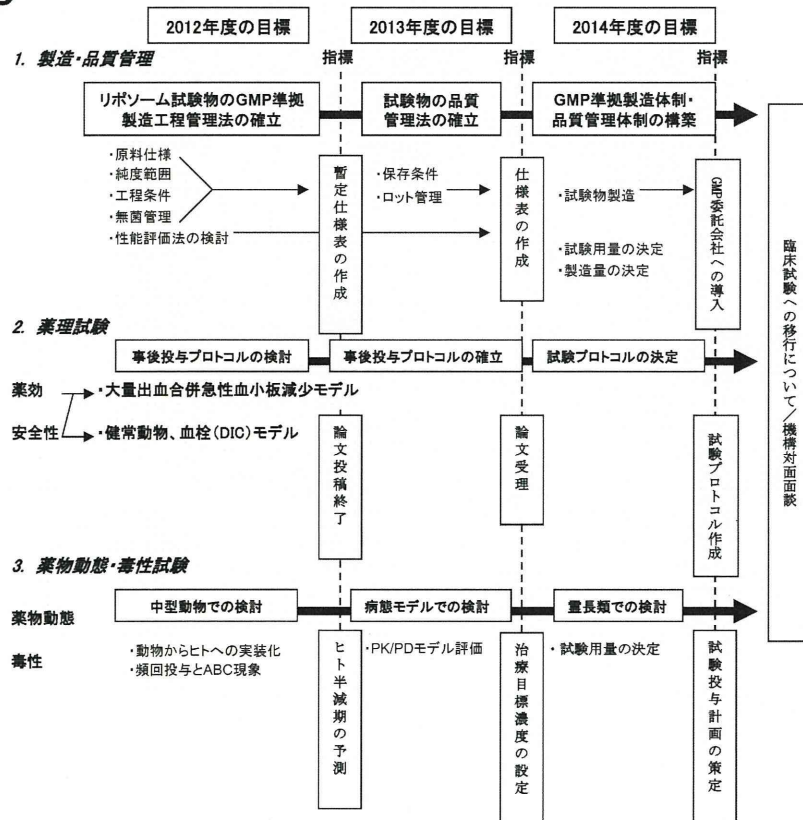
- 1) 非臨床試験で確認すべき項目/3つの異なった役割を有する成分から構成された薬物を考慮して、いかに効率的に試験を施行すべきか?
- 2) 臨床研究への移行について/仮に1)が確認できたとして、その実現性は?

● これまでの非臨床試験成績(概要)

- 1) 薬効試験: 血小板輸血に匹敵する効果を認める
 大量出血惹起稀釈性血小板減少症の損傷肝出血の止血(ウサギ、単回事前投与)
 抗癌剤惹起血小板減少モデルの臓器出血予防(ラット、ウサギ、連続投与)
- 2) 安全試験: 血栓の誘発・増強作用なし
 健常動物(ラット、マウス、ウサギ)への単回、連続投与/マーカー: 血栓、血小板活性化
 病態モデル(マウス精巣動脈血栓症)への単回投与/血栓閉塞時間
 大量出血惹起稀釈性血小板減少症(ウサギ)への単回投与/組織学的検索
- 3) 薬物動態試験: 十分な血中滞留性と排泄性を認める
 健常動物(ラット、マウス、ウサギ)への単回投与/標識: 膜(chol)、ADP
 健常動物(ラット)への連続投与/標識: 膜(chol)/明らかなABC現象なし
- 4) 品質管理試験: 長期保存安定性(8M、4°C、pH6-7; 2M、25°C)
 評価項目/粒子径、ζ電位、ADP純度・定量、脂質成分含量、H12活性(FACS)、
 エンドキシン定量

図10

今後の研究行程表(予定)



分担研究報告

平成 21-23 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業: 政策創薬総合研究事業)
分担研究報告書

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

平成 21 年度 (A) 血小板減少症モデル動物を用いた H12-(ADP)リポソームの止血能評価:
用量依存性について

(B) アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットの作製法および
アスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討

平成 22 年度 代替原料を用いた H12-PEG-Glu2C18 の合成

平成 23 年度 止血能向上を目指した血小板代替物としてのリポソーム組成の検討

分担研究者 池田 康夫 (早稲田大学 理工学術院, 教授)

研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)

勝野 峻介 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)

新井 愛美 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)

丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 技術員)

渡邊 直英 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 助教)

半田 誠 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 教授)

【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)を表面に結合させたリポソームは、活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させると共に、血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包することで(H12-(ADP)リポソーム)、その止血能が向上できることを *in vivo* にて証明してきた。

平成 21 年度は、(A) H12-(ADP)リポソームの用量依存性についての検討、(B) アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットの作製法およびアスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討を行った。

(A)では血小板減少症モデル動物(ラット、ウサギ)に対する H12-(ADP)リポソームの最適投与濃度の存在を明らかにすることを目的とした。血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価では、投与濃度 1、4、10 mg/kg までは投与量依存的に出血時間の短縮効果が得られたが、40、80 mg/kg と投与量が増加すると、10 mg/kg 投与時に比べ、むしろ出血時間短縮効果の減少が見られた。同様に、血小板減少症モデルウサギを用いた止血能評価でも、投与濃度 1、4、10、20 mg/kg までは投与量依存的に出血時間の短縮効果が見られたが、40、80 mg/kg と投与量が増加すると、20 mg/kg 投与時に比べ、その効果は低減する傾向が見られた。これらの動物モデルでの結果から、H12-(ADP)リポソームには止血効果を発揮するた

めの最適投与濃度が存在することが示唆された。

(B)では H12-(ADP)リポソームのさらなる適応対象の可能性を探るため、日常診療で遭遇する血小板機能低下症のモデルとして、抗血小板薬であるアスピリンの投与により顆粒放出障害を惹起させた血小板機能低下症モデルラットの作製法を検討した。同時に、血小板機能低下症モデルにおける H12-(ADP)リポソームの *in vitro* 評価系を確立するため、血小板凝集計を用いアスピリン惹起機能低下症血小板の調製法を検討した。アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットは 2%CMC を溶媒とした溶液(アスピリン: 50 mg/kg 以上かつ溶液量: 10 mL/kg 以上)を経口投与し、少なくとも 1 時間以上経過後に、出血時間を測定することで作製可能であることが示された。アスピリン起因性機能低下血小板は、コラーゲン凝集の測定系において多血小板血漿にアスピリン(f.c. 10 μ M)を添加し、常温にて 30 分反応させることで調製可能であった。

平成 22 年度は、H12-(ADP)リポソームの構成成分の一つである H12-PEG-Glu2C18 の合成方法を検討した。H12-PEG-Glu2C18 は当研究室で合成しているが、その原料である α -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxypentyloxy, polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034HS, 日油株式会社製)の生産が中止されたことから、その代替品である α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034TS, 日油株式会社製)を原料とし、H12-PEG-Glu2C18 の合成方法を検討した。この代替品を原料として合成した H12-PEG-Glu2C18 の収率は約 20%、TLC (固定相: シリカゲル, クロロホルム/メタノール/水=65/25/4(v/v/v))における Rf 値は約 0.20 と、従来のもものと比較して同程度であった。また 1 H-NMR スペクトルより H12 が MAL-PEG-Glu2C18 に結合したことを示す MAL-PEG-Glu2C18 のマレイミド基由来のピーク (γ =6.70 ppm)の消失も確認できた。

平成 23 年度は、従来の H12-(ADP)リポソーム (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.033/0.033(モル比))よりも負電荷脂質である DHSG 含量を増やしたりリポソーム (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比))が、活性化血小板に対する結合能が顕著に高まること、血小板凝集促進効果を発揮することが平成 22 年度に報告されたことを受け、DHSG 含量を増やしたことに起因するリポソーム機能への影響を明らかにするため、H12 未結合かつ ADP 未内包のリポソーム (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比))を調製し、その機能評価を行った。具体的には *in vitro* 評価として血小板凝集促進能および活性化血小板との結合能の評価、血小板減少症モデルラットを用いた止血能を *in vivo* 評価した。*in vitro* 評価の結果、DHSG 含量を増やしたりリポソームは H12 が結合していないにもかかわらず顕著な血小板凝集促進効果を示し、活性化血小板に対して特異的に結合することが分かった。しかしながら、*in vivo* 評価の結果、血小板減少症モデルラットに投与しても、生食群および従来組成のリポソーム投与時と比較して出血時間を短縮することはなかったため血小板の活性化を促す ADP の内包が止血のための要件であると示唆された。

A. 研究目的

リポソーム表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させ、その内水相に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)リポソームは、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成を促進させながら内包物質を放出する機能を有する。現在までに、血小板数を減少させた実験動物に静脈投与して出血時間を測定した場合にその止血能が顕著に向上することが確認されている^{1),2)}。

平成 21 年度は、(A) H12-(ADP)リポソームの用量依存性についての検討、(B) アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットの作製法およびアスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討を行った。

(A)では、血小板減少症モデル動物(ラット、ウサギ)に対する H12-(ADP)リポソームの投与最適濃度の存在を明らかにすることを目的とした。

(B)では、H12-(ADP)リポソームのさらなる適応対象の可能性を探るため、抗血小板薬であるアスピリンの投与により顆粒放出障害を惹起させた血小板機能低下症モデルラットの作製法を検討した。同時に、血小板機能低下症モデルにおける H12-(ADP)リポソームの *in vitro* 評価系を確立するため、血小板凝集計を用いアスピリン惹起機能低下症血小板の調製法を検討した。

平成 22 年度は、H12-(ADP)リポソームの構成成分の一つである H12-PEG-Glu2C18 の原料、 α -[3-(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl]- ω -succinimidyl carboxypentyloxy, polyoxy-ethylene (SUN BRIGHT MA-034HS, 日油株式会社製)の生産が中止されたこと

から、その代替品である α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl]- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034TS, 日油株式会社製)を原料とし、H12-PEG-Glu2C18 の合成方法を検討した。

平成 23 年度は、平成 22 年度に報告された DHSG 含量を増やしたことに起因するリポソーム機能への影響を明らかにするため³⁾、H12 未結合かつ ADP 未内包のリポソームを調製し、その機能評価を行った。具体的には *in vitro* 評価として血小板凝集促進能および活性化血小板との結合能の評価、血小板減少症モデルラットを用いた止血能を *in vivo* 評価した。

- 1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
- 2) 平成 18, 19 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書
- 3) 平成 22 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書

B. 研究方法

1. 代替原料を用いた H12-PEG-Glu2C18 の合成(平成 22 年度)

1.1. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成法(Scheme 1)

1.1.1. Glu2C18 の合成法

グルタミン酸 (2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物 (4.56 g, 24 mmol)をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた (105 °C, 1 hr)。この系にステアリルアルコール (11.9 mg, 44 mmol) を添加して沸点還流させた (105°C, 14 hr)。溶媒を減圧留去後、残渣をクロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で 2 回、水 150 mL で 2 回分液洗浄した。クロロホルム層を回

収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧留去した。これをメタノールから再結晶し濾過回収後、乾燥させて白色粉末 Glu2C18 (13.3 g, 収率 85%)を得た。

1.1.2. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MAL-PEG-Glu2C18)の合成法

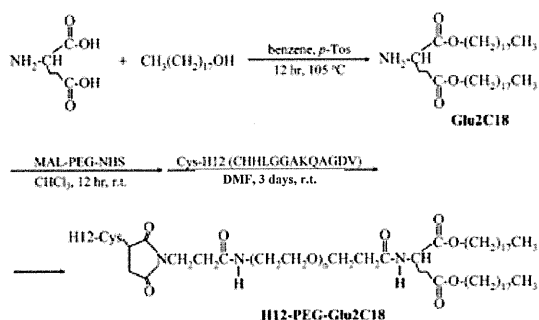
クロロホルム 10 mL 中に得られた Glu2C18 (194.9 mg, 298 μ mol)を溶解させ、MALPEG-NHS を溶解させて、攪拌した (r.t., 12 hr)。MALPEG-NHS は従来原料である (I) α -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxypentyl, polyoxyethylene(SUN BRIGHT MA-034HS(日油株式会社製); Mw: 3363, 500 mg, 149 μ mol)、あるいは代替原料である (II) α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxy-

ethylene (SUN BRIGHT MA-034TS(日油株式会社製); Mw: 3350, 500 mg, 149 μ mol)を使用した。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した後、*t*-ブチルアルコール中から凍結乾燥した。

1.1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成法

1.2.節で合成した MAL-PEG-Glu2C18 (450 mg, 114.2 μ mol)と C 末端にシステインを結合させた H12 (147.6 mg, 114.2 μ mol)を DMF10 mL に溶解、攪拌した(r.t., 72 hr, N₂)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製後、メタノール抽出し、シリカゲルカラムにて精製した (展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水=65/25/4, v/v/v)。真空乾燥後、*t*-ブチルアルコールに溶解させて凍結乾燥した。

Scheme 1 Syntheses of H12-PEG-Glu2C18 (PEG 3.1 kDa, H12 1.3 kDa)



2. H12-(ADP)リポソームの調製法(平成 21-22 年度)

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) (1000 mg, 1.36 mmol)、cholesterol (527 mg, 1.36 mmol)、1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) (190 mg, 136 μ mol)、PEG-DSPE (47.4 mg, 8.17 μ mol)、H12-PEG-Glu2C18 (43.4 mg, 8.17 μ mol)をベンゼンに溶解させ、凍結乾燥させた (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.03/0.03, モル比)。ADP 水溶液(1 mM)にて水和させ、押出造粒法を用いて H12-(ADP)リポソームを調製した(粒径 250 \pm 80 nm)。超遠心分離後 (33000 rpm, 30 min, 4 °C)、PBS に分散させリポソーム分散液とした。さらに、リポソーム分散液をゲルろ過(Sephadex G25)し、外水相に微量に残存する ADP を完全に除去した。

3. 血小板減少症モデル動物を用いた H12-(ADP)リポソームの止血能評価:用量依存性について(平成 21 年度)

3.1. 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(三協ラボ, 8 週齢, 250-270 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 日目に尾静脈投与し(全投与量 20 mg/kg)、投与開始後 10 日目を血小板減少ラット([PLT] = $19.6 \pm 2.6 \times 10^4$ / μ L)とした。セボフラン麻酔後、H12-(ADP)リポソームを尾静脈から投与した(4 mL/kg)。また、生理食塩水を陰性対照群とした。投与 5 分経過後、尾先端から 1 cm の部位にクイックヒール(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて切傷した(長さ 2.5 mm 深さ 1mm)。尾先端を生理食塩水中に浸し出血時間を測定した。

3.2. 血小板減少症モデルウサギを用いた止血能評価

ニュージーランドホワイトウサギ(雄性, 11 週齢, 2.5 kg)は、三協ラボより購入した。ケタミン(60 mg/mL)とセラクター(2%)の混合溶液(ケタミン/セラクター = 3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔後、ブスルファンポリエチレングリコール溶液(10 mg/mL)を 0、3 日目に下腹部皮下投与した(全投与量 30 mg/kg)。投与開始後 15 日目を血小板減少ウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4$ / μ L)とした。ケタミン/セラクター麻酔後、23G 翼状針を装着したシリンジポンプにて検体(H12-(ADP)リポソーム、生理食塩水、PRP([PLT] = 10, 50, 100×10^4 / μ L))を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与開始から 30 分経過後、耳の血管が確認できない部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(長さ 6 mm)。耳の切傷部位を生理食塩水中に浸し出血時間を測定した。

4. アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラット作製法と、アスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討(平成 21 年度)

4.1. アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラット作製法の検討

4.1.1. アスピリンによる血小板機能低下確認試験

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢, 230-280 g)にアスピリン(ASA)-ポリエチレングリコール(PEG、Mw: 400 Da)溶液(2.5、12.5、25 mg/mL)を経口投与した(4 mL/kg)。投与 3 時間後に心臓採血し、全血(1/10 (v/v) 3.13% クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(2500 rpm, 2 min, r.t.)、多血小板血漿(PRP)を得た。PRP([PLT] = 20×10^4 / μ L)に、ADP(f.c. 20 μ M)あるいは collagen(f.c. 20 μ g/mL)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて連続的に透過率の変化を測定した。

4.1.2. 溶媒の検討

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢, 230-280 g)に ASA-PEG 溶液(2.5、12.5、25 mg/mL)を経口投与した(4 mL/kg)。また、PEG 溶液を陰性対照群とした。投与 3 時間後に尾先端から 1 cm の部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(深さ 1 mm x 長さ 10 mm)。尾先端を生理食塩水中に浸し、出血時間を計測した。他方、ASA-2%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液を投与したラットを用い、同様の試験を行った。

4.1.3. 投与量の検討

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢, 230-280 g)に ASA-2%CMC 溶液(2.5、12.5 mg/mL)を経口投与した(4 mL/kg、10

mL/kg)。また、2%CMC 溶液を陰性対照群とした。投与1時間後に尾先端から1 cmの部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(深さ1 mm x 長さ10 mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。

4.1.4. 投与後切傷までの時間の検討

Wistar系雄性ラット(三協ラボサービス, 8週齢, 230-280 g)にASA-0.5%CMC溶液(1, 5 mg/mL)を経口投与した(10 mL/kg)。また、0.5%CMC溶液を陰性対照群とした。投与開始から1, 3時間後に尾先端から1 cmの部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(深さ1 mm x 長さ10 mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。

4.2. アスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討

全血(1/10 (v/v) 3.8 % クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(600 rpm, 15 min, r.t.)、多血小板血漿(PRP)を得た。アスピリン(ASA, f.c. 5, 10, 20 μ M)をPRP([PLT] = 20×10^4 / μ L)に添加後、振とうし(15, 30, 45 min, r.t.)、collagen(f.c. 1 μ g/mL)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて連続的に透過率の変化を測定した。

5. 止血能向上を目指した血小板代替物としてのリポソーム組成の検討(平成23年度)

5.1. 膜組成の異なるリポソームの調製と物性評価

混合脂質(**Table 1**)をPBS(pH 7.4)にて水和後(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径制御し(ϕ ca. 0.20 μ m)、超遠心分離精製した(100,000g, 30 min, 4°C)。次いで、PBSにて再分散、ゲル濾過にて精製し(Sephadex

G25)、膜組成の異なる2種類のH12未結合かつADP未内包のリポソーム(**(a)**, **(b)**)を得た。またこれらの粒径をN4PLUS (BECKMAN COULTER社製)にて、 ζ 電位をZetasizer Nano(Sysmex社製)にて測定した。

Table 1 Composition and properties of liposomes.

Lipid components	(a)	(b)
DPPC ¹⁾	5	5
Cholesterol	5	5
DHSG ²⁾	1	5
PEG-DSPE ³⁾	0.033	0.045
Diameter (nm)	238.6 \pm 98.0	238.6 \pm 98.6
ζ -potential (mV)	-13.4 \pm 1.1	-19.8 \pm 1.6

1)1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine,

2)1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate,

3)1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-[monomethoxy]poly(ethylene glycol) (5000)

5.2. リポソームの血小板凝集促進能評価

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

5.3. 活性化血小板とリポソームとの結合能評価

Hepes-Tyrode buffer(pH 7.4, 30 μ L)中に洗浄血小板([PLT]= 1.0×10^5 / μ L, 5 μ L)を分散させ、各リポソーム(**(a)**, **(b)**)([lipid]_{f.c.}=0.03 mg/mL, 5 μ L)を添加した。PAR-4 agonist (f.c. 1 mM, 5 μ L)にて血小板を活性化、振とう後(10 min, 37°C)、ホルムアルデヒド(4%(v/v), 50 μ L)で固定し、Hepes-Tyrode buffer (pH 7.4, 120 μ L)にて希釈後、FACS Calibur(Becton Dickinson社製)を用いて測定を行った。この時PBS添加群を未刺激(非活性化)血小板と

した。また二価陽イオン依存性の反応を阻害する EDTA を添加した系も同時に検討した。

5.4. 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. 代替原料を用いた H12-PEG-Glu2C18 の合成

1.1. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MAL-PEG-Glu2C18)の合成

再沈殿精製後に *t*-ブチルアルコール中から凍結乾燥して得られた白色粉末 MAL-PEG-Glu2C18(I)は収量 486.4 mg(収率 70 %)、(II)は収量 479.5 mg(収率 69 %)となり、ほぼ同程度であった。また、TLC (固定相: シリカゲル, 展開溶媒: クロロホルム/メタノール=4/1(v/v))を行ったところ、Rf 値は(I)では 0.63、(II)では 0.65 となり、共にモノスポットとして検出された。

1.2. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成法

シリカゲルカラムにて精製し真空乾燥後、*t*-ブチルアルコール中から凍結乾燥して得られた淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18(I)は収量 181.6 mg(収率 30.4 %)、(II)は収量 178.5 mg(収率 29.4 %)となり、ほぼ同程度であった。TLC (固定相: シリカゲル, クロロホルム/メタノール/水=65/25/4(v/v/v))を行ったところ、Rf 値は(I)では 0.17、(II)では 0.20 となり、共にモノスポットとして検出された。また、(I)、(II)の H12-PEG-Glu2C18 の ¹H-NMR スペクトルにおいて、MAL-PEG-Glu2C18 のマレイミド基由来のピーク(γ =6.70 ppm)が消失していた。このことは、C 末端にシステインを結合させた H12 のチオール基が MAL-PEG-Glu2C18 のマレイミド基と結合していることを示すことから、従来の原料 (I) α -(3-[3-Maleimido-1-oxo-propyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxy-pentyloxy, polyoxyethylene と同様に、その代替品である(II) α -N-[(3-Maleimido-1-oxo-propyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxyethylene を使用した場合でも、従来の合成法に従って H12-PEG-Glu2C18 の合成が可能であることを明らかにした。平成 22 年度以降は、この H12-PEG-Glu2C18(II) を用いて H12-(ADP)リポソームを調製し、機能評価を行った。

2. 血小板減少症モデル動物を用いた H12-(ADP)リポソームの止血能評価:用量依存性について

2.1. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

血小板減少ラットに生理食塩水を投与したところ、出血時間は 682 ± 198 秒であり、

正常ラット([血小板]= $80 \times 10^4/\mu\text{L}$)の出血時間(178 ± 56 秒)と比較して、約 3.8 倍延長した(**Figure 1**)。

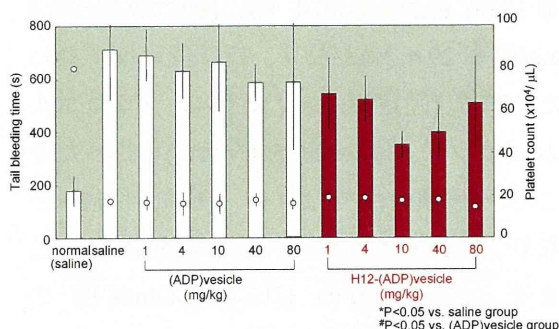


Figure 1 Effects of the administration of (ADP)liposome or H12-(ADP)liposome on tail bleeding time. The administered amount of (ADP)liposome or H12-(ADP)liposome was 1, 4, 10, 40, 80 mg/kg equivalent of lipid. ○; platelet count in the rats (N = 8-12).

脂質濃度を 0.25、1、2.5、10、20 mg/mL に調整した(ADP)リポソーム分散液を投与したところ、投与量依存な出血時間の短縮傾向は見られず、1、4、10、40、80 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ 690 ± 97 、 631 ± 103 、 665 ± 184 、 586 ± 70 、 586 ± 257 秒とほぼ同等であった。そこで、脂質濃度 0.25、1、2.5 mg/mL に調整した H12-(ADP)リポソーム分散液を投与したところ(4 mL/kg)、1、4、10 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ 543 ± 134 、 521 ± 88 、 349 ± 49 秒となり、投与量依存的に出血時間の短縮効果が得られることが立証できた。しかし、10、20 mg/mL に調整した H12-(ADP)リポソーム分散液を投与したところ(4 mL/kg)、40、80 mg/kg(脂質量換算)における出血時間は、それぞれ 397 ± 102 、 508 ± 175 秒となり、10 mg/kg 投与時に比べ、むしろ出血時間延長傾向が見られた。この結果から、血小板減少症モデルラット([PLT]

= $19.6 \pm 2.6 \times 10^4/\mu\text{L}$)には H12-(ADP)リポソームの投与最適濃度があることが実証された。投与リポソーム濃度が増大し、投与リポソーム数が増大することで、血小板凝集阻害が起こっている可能性が考えられた。

2.2. 血小板減少症モデルウサギを用いた止血能評価

血小板減少症モデルウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4/\mu\text{L}$)に生理食塩水を投与したところ(4 mL/kg)、出血時間は 1695 ± 197 秒であり、正常ウサギ([PLT] = $41 \times 10^4/\mu\text{L}$)のそれ(112 ± 24 秒)と比較して約 15 倍延長した(**Figure 2**)。陽性対照群としてウサギ血小板を 0.4×10^9 、 2.0×10^9 、 4.0×10^9 PLT/kg (1.0×10^9 、 5.0×10^9 、 1.0×10^{10} PLT に相当)で投与したところ、投与血小板数依存的に出血時間を短縮させた(それぞれ 1505 ± 410 、 863 ± 440 、 505 ± 257 秒)。そこで、H12-(ADP)リポソームをそれぞれ 10、20 mg/kg (脂質量換算、約 2.5×10^{13} 、 5.0×10^{13} 粒子に相当)で投与したところ、出血時間はそれぞれ 881 ± 303 、 428 ± 44 秒であり、生理食塩水群(1696 ± 197 秒)あるいは(ADP)リポソーム群(10、20、40、80 mg/kg で 1429 ± 643 、 1375 ± 663 、 1371 ± 639 、 1257 ± 412 秒)と比較して、投与量依存的に有意に出血時間を短縮させ、血小板投与群のそれに匹敵した。従って、H12-(ADP)リポソームは血小板減少ウサギの出血時間を効率よく短縮させる微粒子であることが確認できた。しかし、40、80 mg/kg (脂質量換算、約 1.0×10^{14} 、 2.0×10^{14} 粒子に相当)で投与したところ、出血時間はそれぞれ 518 ± 350 、 1176 ± 223 秒であり、20 mg/kg 投与時に比べ、むしろ出血時間延長傾向が見られた。これは血小板減少症モデルラットと同

様に、血小板減少症モデルウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$)にも H12-(ADP)リポソームの投与最適濃度が存在することが実証された。

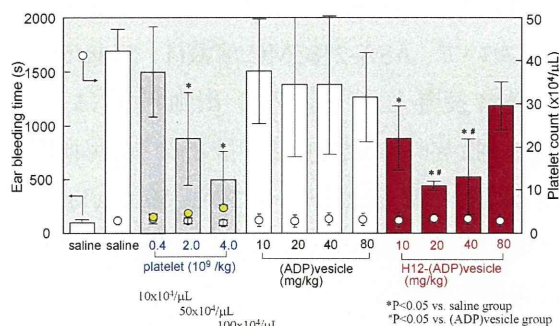


Figure 2 Effects of the administration of H12-(ADP)liposome and PRP on ear bleeding time. The administered amount of H12-(ADP)liposome was 10, 20, 40, 80 mg/kg, and PRP was 0.4, 2.0, $4.0 \times 10^9 / \text{kg}$. ○; platelet count in the rabbits (N = 6). *P<0.05 vs. saline groups, and #P<0.05 vs. (ADP)liposome group at the same dose.

3. アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットも作製法と、アスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討

3.1. アスピリン起因性血小板機能低下症モデルラットの止血能評価

3.1.1. アスピリンによる血小板機能低下確認試験

アスピリン(ASA)ポリエチレングリコール(PEG, Mw: 400 Da)溶液を投与したラットの多血小板血漿(PRP)を ADP(f.c. 20 μM)にて血小板凝集を惹起させたところ、ASA 投与濃度によらず、透過率はほぼ同程度であった(**Table 2**)。他方、collagen(f.c. 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)にて血小板凝集を惹起させたところ、ASA 投与濃度依存的に透過率は減少し、ASA 投与濃度 50 mg/kg 以上では血小板凝集が見られなかった。これは、ASA の血小板に対する作用機序を支持する結果であった。すな

わち、ASA が選択的にシクロオキシゲナーゼのセリン基をアセチル化することで不可逆的にその作用を阻害し、顆粒放出依存性である collagen 凝集を抑制していることを確認できた。

Table 2 Effects of ASA on platelet aggregation induced by ADP and collagen in PRP derived from rats (N=4-6).

Treatment	collagen (f.c. 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	ADP (f.c. 20 μM)
Control	72.5 \pm 3.5 %	56.7 \pm 5.8 %
ASA 10 mg/kg	37.2 \pm 15.6 %	60.6 \pm 1.0 %
50 mg/kg	< 0	55.8 \pm 1.2 %
100 mg/kg	< 0	57.1 \pm 3.5 %

3.1.2. 溶媒の検討

Wistar 系雄性ラットに PEG 溶液を経口投与し(4 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 402 ± 72 秒であった(**Figure 3**)。一方、ASA-PEG 溶液(2.5、12.5 mg/mL)を経口投与したところ(4 mL/kg)、出血時間の延長はほとんど見られなかった(10、50 mg/kg における出血時間はそれぞれ 507 ± 207 、 578 ± 117 秒)。

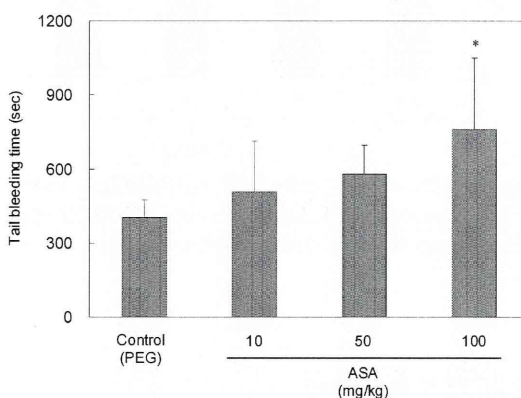


Figure 3 Prolonged effects of tail bleeding time by administration of ASA into rats. *P<0.05 for ASA group vs. PEG solution group. (N = 5-18).

さらに、ASA-PEG 溶液(25 mg/mL)を経口投与したところ、出血時間は有意に延長し、

100 mg/kg 投与時における出血時間は 761 ± 289 秒になった。

そこで、Wistar 系雄性ラットに 2%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液を経口投与したところ(4 mL/kg)、出血時間は 368 ± 6 秒であった(Figure 4)。ASA-2%CMC 溶液(2.5、12.5、25mg/mL)を経口投与したところ(4 mL/kg)、PEG 溶液時と同程度の出血時間となった(10、50、100 mg/kg における出血時間はそれぞれ 398 ± 177 、 353 ± 36 、 813 ± 265 秒)。したがって、溶媒の相違による ASA の吸収の差は見られなかった。

そこで以後の実験では、CMC を溶媒として採用することにした。次いで、より低容量の ASA で出血時間延長を図るべく、投与後切傷までの時間の検討と、投与量の検討を行った。

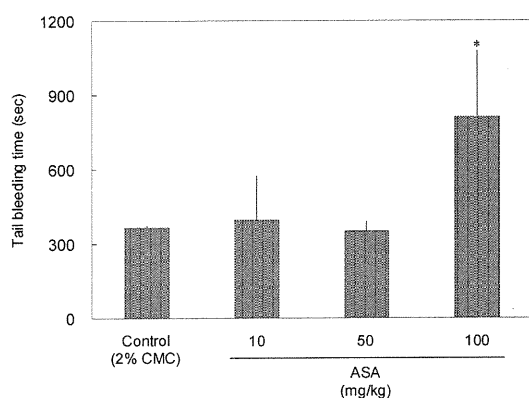


Figure 4 Prolonged effects of tail bleeding time by administration of ASA into rats. * $P < 0.05$ for ASA group vs. 2% CMC solution group. (N = 3-4).

3.1.3. 投与量の検討

Wistar 系雄性ラットに 2%CMC 溶液を経口投与し(4 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷した結果は、3.1.2.に示したように 4 mL/kg 投与時の出血時間の延長は見られなかった(Figure 5)。

他方、2%CMC 溶液を経口投与し(10 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 342 ± 126 秒となり、陰性対照群における投与量に起因する出血時間の差はほとんど見られなかった(Figure 5)。次いで、ASA-2%CMC 溶液(1、5 mg/mL)を経口投与したところ、出血時間は 10 mg/kg 投与時に 450 ± 233 秒となり、出血時間の延長は見られなかったが、50 mg/kg 投与時に 953 ± 76 秒となり、出血時間は有意に延長した。

したがって、以後の実験では、投与濃度の増加につれ、出血時間の延長が見られる 10 mL/kg(2.5 mL)投与を採用することにした。

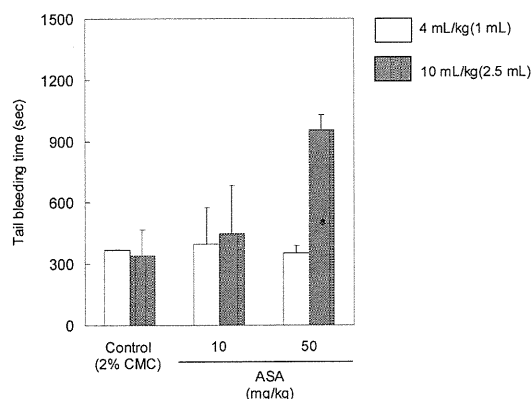


Figure 5 Prolonged effects of tail bleeding time by administration(4 mL/kg or 10 mL/kg) of ASA into rats. * $P < 0.05$ for ASA group vs. 2% CMC solution group. (N = 3-4).

3.1.4. 投与後切傷までの時間の検討

Wistar 系雄性ラットに 0.5%CMC 溶液を経口投与し(10 mL/kg)、投与 3 時間後に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 260 ± 22 秒であった(Figure 6)。次いで、ASA-0.5%CMC 溶液(1、5 mg/mL)を経口投与したところ(10 mL/kg)、出血時間は 10 mg/kg 投与時に 382 ± 10 秒となり、出血時

間の延長は見られなかったが、50 mg/kg 投与時に 996 ± 437 秒となり、出血時間は有意に延長した。

他方、0.5%CMC 溶液を経口投与 1 時間後に尾静脈を切傷したところ、出血時間は 352 ± 104 秒となり、陰性対照群における投与後の時間差に起因する出血時間の差はほとんど見られなかった (Figure 6)。ASA-0.5%CMC 溶液(1, 5 mg/mL)を経口投与したところ(10 mL/kg)、出血時間は 10 mg/kg 投与時に 450 ± 233 秒、50 mg/kg 投与時に 887 ± 147 秒となり、時間差による出血時間の違いは見られなかった。

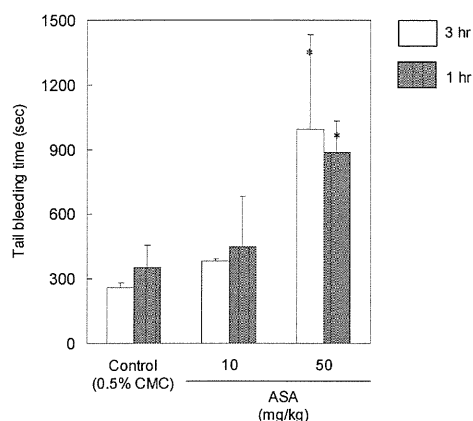


Figure 6 Prolonged effects of tail bleeding time by 1 hour or 3 hours after administration of ASA into rats. * $P < 0.05$ for ASA group vs. 0.5% CMC solution group. (N = 3-5).

以上から、ASA 起因性血小板機能低下症モデルラットは2%CMC 溶液(50 mg/kg 以上かつ 10 mL/kg 以上)の経口投与し、少なくとも 1 時間以上経過後に出血時間を計測することで作製できることが明らかとなった。

3.2. アスピリン起因性機能低下血小板の調製法の検討

アスピリン(ASA)を PRP([PLT] = 20×10^4 / μ L)に添加後、振とうし(15, 30, 45 min, r.t.)、

collagen(f.c. 1 μ g/mL)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて連続的に透過率の変化を測定したところ、ASA 添加濃度が濃く、反応時間が長いほど、透過率は減少した(Table 3)。また、collagen(f.c. 1 μ g/mL)刺激下において、透過率が約 15%にまで低下した時が酵素反応(シクロオキシゲナーゼ阻害反応)の終点、すなわち collagen 凝集機能低下をきたした血小板となることが明らかになった。しかし、反応時間が進むほど、ASA 未添加 PRP においても透過率がわずかに低下してしまうことから、これからの実験では、ASA(f.c. 10 μ M)を添加し、常温にて 30 分反応させた血小板を ASA 起因性機能低下症血小板として採用することにした。

Table 3 Effects of ASA on platelet aggregation induced by collagen (f.c. 1 mg/mL) in PRP derived from human (N = 3-4).

Treatment	15 min	30 min	45 min
Control	$72.3 \pm 4.8 \%$	$70.0 \pm 0.6 \%$	$62.0 \pm 5.1 \%$
ASA 5 μ M	$62.0 \pm 9.8 \%$	$48.0 \pm 11.5 \%$	$29.5 \pm 0.7 \%$
10 μ M	$37.8 \pm 6.2 \%$	$19.9 \pm 3.8 \%$	$16.5 \pm 0.6 \%$
20 μ M	$23.3 \pm 8.5 \%$	$16.7 \pm 2.1 \%$	$14.8 \pm 1.5 \%$

4. 止血能向上を目指した血小板代替物としてのリポソーム組成の検討

4.1. 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)。

4.2. 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 7 (a))。一方、