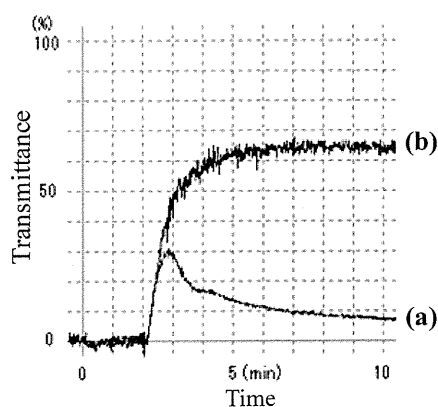


リポソーム**(b)**を添加したところ、二次凝集まで到達し、 $T_{max}$  は約 65%まで増大した(**Figure 7 (b)**)。リポソーム**(b)**は活性化血小板の認識部位である H12 が結合していないにもかかわらず、血小板凝集促進効果が発現したことから、膜構成成分である負電荷脂質 DHSG の含量を増やすことで、リポソームの血小板凝集能を高めることが明らかとなった。



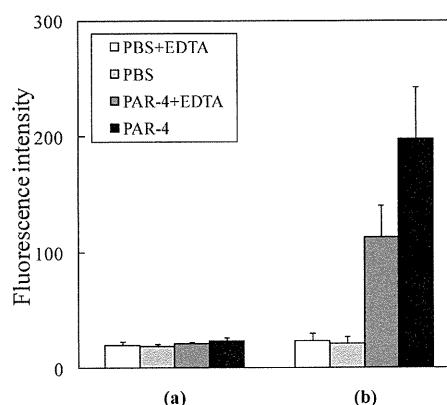
**Figure 7** Enhancement effects of platelet aggregation in the presence of various liposomes. (2 min: ADP stimulation).

#### 4.3. 活性化血小板とリポソームとの結合能評価

非活性化血小板(PBS, PBS + EDTA)に対しては、リポソーム**(a)**、**(b)**のいずれも結合はほとんどみられなかった(**Figure 8**)。一方、活性化血小板(PAR-4 agonist)に対してはリポソーム**(a)**の結合量は変化しなかったが、リポソーム**(b)**では未刺激群の約 8 倍程度の結合がみられた。

さらにリポソーム**(b)**はインテグリンを介した反応を阻害した場合(PAR-4 + EDTA)でも活性化血小板との結合が未刺激群の約 5 倍程度みられた。このことからリポソーム**(b)**は二価陽イオン依存性および非依存性の結合に起因し、活性化血小板と特異的に結合すること

が明らかとなった。



**Figure 8** Binding abilities of various liposomes to the washed platelets measured by flow cytometer.

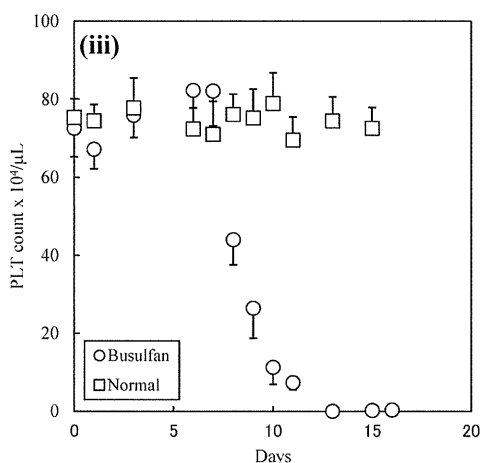
#### 4.4. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

Wistar 系雄性ラット(8 週齢、250-300 g)にブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を 0、3 日目に尾静脈投与(全投与量 20 mg/kg)し、各血球変動を計測した(**Figure 9**)。白血球数は経過日数とともに徐々に減少がみられた(**Figure 9(i)**)。一方、赤血球数は 11 日目まで変動なく、それ以降に急激に低下した(**Figure 9(ii)**)。また血小板数は投与 7 日目より徐々に減少し、10 日目は約 10 万/ $\mu\text{L}$ (正常値の約 1/5-1/15)となった(**Figure 9(iii)**)。そこで投与 10 日目のラットを血小板減少症モデルとし、出血時間の測定に使用した。

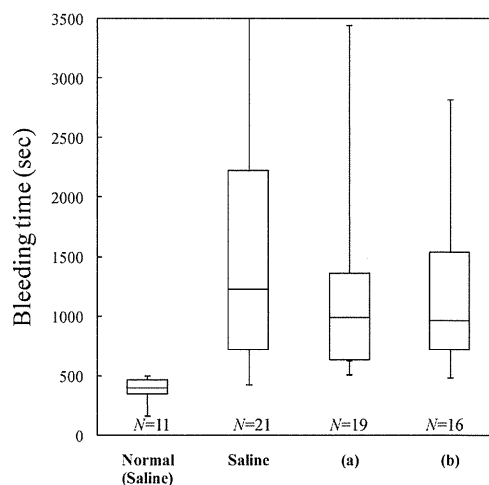
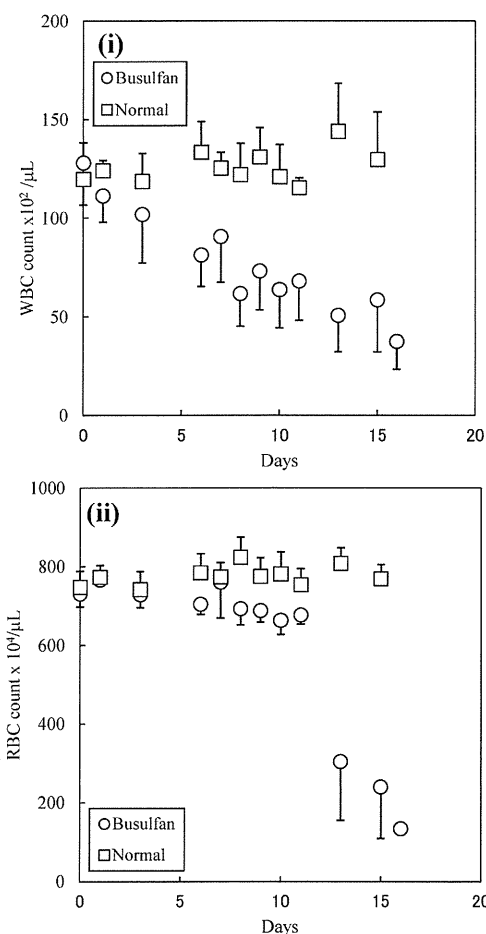
正常血小板数のラット([PLT]= $73 \pm 6.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ )に生理食塩水を投与したところ、出血時間は 400 秒であったが、血小板減少ラット([PLT]= $10 \pm 2.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ )に生理食塩水を投与したところ、出血時間は 1230 秒と約 3 倍に延長した。一方、リポソーム**(a)**、**(b)**を 10 mg/kg にて投与したところ、出血時間はそれぞれ 990 秒([PLT]= $8.7 \pm 2.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ )、960 秒([PLT]=

9.2±2.7 x 10<sup>4</sup>/μL)であり(Figure 10)、生食群と比較して有意な出血時間の短縮は見られなかった。またいずれの投与群においても測定前後での血小板数の大きな変動はみられなかった。

以上より、DHSG 含量を増やしたりポソーム(b)は、*in vitro* 試験では活性化血小板を特異的に認識して顕著な血小板凝集促進能を示すものの、止血能は持たないことが *in vivo* 試験から示された。したがって、血小板の活性化を促す ADP の内包が止血のための要件であることが示唆された。



**Figure 9** Preparing of Busulfan -induced rat thrombocytopenia model at a dose of 20 mg/kg. (i): WBC, (ii): RBC, (iii): PLT count.



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

**Figure 10** Hemostatic effects of administration of liposomes on rats' tail bleeding time (N = 11-21). PLT count: means ± SD, Bleeding time: median.

#### D. 結論

平成 21 年度

(A) 血小板減少症モデル動物を用いた止血能評価において、H12-(ADP)小胞体の投与最適濃度の存在が実証された。

(B) (1) 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めされた。

(2) 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で、多血小板血漿にアスピリン(f.c. 10  $\mu$ 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ることが明らかになった。

## 平成 22 年度

$\alpha$ -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- $\omega$ -succinimidyl carboxypentyloxy, polyoxyethylene の代替品として用いた  $\alpha$ -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- $\omega$ -(succinimidyl)carboxy], polyoxyethylene から合成した H12-PEG-Glu2C18 は従来のものと比較して、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 と同程度になり、また  $^1$ H-NMR スペクトルにおいて、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( $\gamma$ =6.70 ppm)の消失も確認できた。

## 平成 23 年度

(1) DHSG 含量を増やしたリポソームは 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た。

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

(3) DHSG 含量を増やしたリポソームを血

小板減少症モデルラットに投与しても、生食群および従来組成のリポソーム投与時と比較して出血時間を短縮することはなかった。そのため血小板の活性化を促す ADP の内包が止血のための要件であると示唆された。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Suzuki, H., Okamura, Y., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M. Ultrastructural analysis of thrombin-induced interaction between human platelets and liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -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) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Release abilities

of adenosine diphosphate from phospholipid vesicles with different membrane flexibilities properties and their hemostatic effects as a platelet substitute. *J. Controlled Release*, **148**(3), 373-379 (2010)

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

(6) 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)

(7) Okamura, Y., Fukui, Y., Kabata, K., Suzuki, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka S. Novel Platelet Substitutes: Disk-Shaped Biodegradable Nanosheets and their Enhanced Effects on Platelet Aggregation. *Bioconjug Chem.*, **20**, 1958-1965 (2009).

(8) Tsuji, T., Takeoka, S., Okamura, Y., Sudo, R., Ikeda, Y., Tanishita, K. Motion of polymerized albumin particles in a model arteriole in the presence of red blood cells. *J. Biorheol.*, **1**, 29-34(2009)

(9) 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)

## 2. 学会発表

(1) 新井 愛美, 渡邊 直英, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司, 「止血能を有する血

小板代替物としてのリポソーム組成の検討 (第2報)」, 第33回日本バイオマテリアル学会 (2011.11., 京都)

(2) 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).

(3) 勝野 峻介, 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).

(4) 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).

(5) 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' -ニリン酸)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).

(6) 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' -ニリン酸)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).

(7) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 江藤 薫子, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「放射性同位元素標識したドデカペプチド結合(ADP内包)リン脂質小胞体からのADP放出特性」

第 89 日本化学会春季年会 (2009.3., 千葉).

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

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総合研究事業)  
分担研究報告書

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

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)  
研究協力者 新井 愛美 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)  
土井 麻実 (早稲田大学 先進理工学部)  
藤山 敦史 (早稲田大学 先進理工学部)  
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)  
池田 康夫 (早稲田大学 理工学術院, 教授)

【研究要旨】

フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を表面に結合させ、血小板凝集惹起物質 adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させたリポソーム(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を促進させると共に血小板凝集塊に取り込まれて局所的に ADP を放出させるので効果的に止血を促進できることを *in vivo* にて証明してきた。

平成21年度は、さらなる止血能を有する H12-リポソームの調製を目指して、ADP の内包に加えて血小板凝集補助能と傷害血管収縮作用を有するセロトニン(5-hydroxytryptamine: 5-HT)を内包させた H12-(ADP/5-HT)リポソームを構築し、その止血能の向上を図った。ADP と5-HT の内包安定性を検討したところ、両者を安定に内包できるリポソームの膜組成は DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub> = 5/5/5/0.045/0.045(モル比)であった。この H12-(ADP/5-HT)リポソームを用いて血小板凝集試験を行ったところ、従来の H12-(ADP)リポソームを上回る血小板の2次凝集促進効果が得られた。そこで、血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価を行ったところ、H12-(ADP/5-HT)リポソームは従来の H12-(ADP)リポソームより低濃度で有意に出血時間を短縮できた。

平成22年度は、さらなる止血能を有する H12-リポソームの創製を目指し、リポソームの膜組成の性質に着目し、従来のリポソーム(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub> = 5/5/1/0.033/0.033(モル比))よりも負電荷脂質である DHSG の含量を増やしたリポソーム組成(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub> = 5/5/5/0.045/0.045(モル

比))について検討を行った。このリポソームを用いて血小板との結合能を評価したところ、従来の組成に比べて顕著に活性化血小板との結合能が格段に高まることが明らかとなった。さらに血小板凝集能を評価したところ、H12未結合リポソームにおいても血小板の二次凝集促進効果が認められた。

平成23年度は、H12-(ADP)リポソームの機能性部位である H12の含有量、脂質構成比および内包 ADP 量を新たな物性評価項目とし、その測定方法を確立することを目的としている。さらに、各工程の標準化のために H12-(ADP)リポソームの調製手順書を作成し、試料の品質保証体制を構築した。H12含有量は、H12に含まれる3個のアミノ基への蛍光標識を用いた蛍光定量法により定量を行った。脂質構成比の解析には NMR を用い、各脂質に特有のピークを基に構成比を算出した。また、内包 ADP 量は、外水相に存在する未内包 ADP を除去した後、HPLC にて定量した。以上の測定方法の確立により、今後のサンプル提供時の基準となる H12-(ADP)リポソームの標準スペックの設定に着手できた。

## A. 研究目的

フィブリノーゲン $\gamma$ 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)を内包させることで(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、さらなる止血能を有する H12-リポソームの設計と構築を目指し、ADP に加えて血小板凝集補助能と傷害血管収縮作用を有するセロトニン (5-hydroxytryptamine: 5-HT)を同時に内包させた H12-(ADP/5-HT)リポソームを調製し、その止血能を検討することを目的とした。

平成22年度は、さらなる止血能を有する H12-リポソームの設計と構築を目指して、

リポソームの膜由来の性質に着目した検討を行った。リポソームの機能評価として、フローサイトメーターを用いた血小板との結合能評価、及び血小板凝集計を用いた凝集性を評価した。

平成23年度は、H12-(ADP)リポソームの機能性部位である H12の含有量、内包 ADP 量および脂質構成比を新たな物性評価項目とし、その測定方法の確立を目的とした。

- 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

## B. 研究方法

### 1. H12-(ADP/5-HT)リポソームの調製とその止血能評価(平成21年度)

#### 1.1. 5-HT の血小板凝集補助能の確認試験

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。PRP([PLT]= $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L)に関して、ADP 水溶液(f.c. 0-10  $\mu$ M)、あるいは5-HT 水溶液(f.c. 0-10  $\mu$ 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。次いで、[ADP]<sub>f.c.</sub>を3  $\mu$ M に固定し、5-HT 水溶液(f.c. 0-1  $\mu$ M)を同時添加し、同様の血小板凝集試験を行った。

### 1.2. H12-(ADP/5-HT)リポソームの調製

混合脂質(**Table 1**)を ADP/5-HT 溶液(共に f.c. 1  $\mu$ M)にて水和後 (3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径が制御されたリポソームを調製し( $\phi$  0.20  $\mu$ m)、超遠心分離精製した(100,000g, 30 min, 4 °C)。次いで、これを PBS にて再分散、ゲル濾過精製し(Sephadex G25)、H12-(ADP/5HT)リポソーム(A)-(C)を得た。なお、平成18年度に確立した H12-(ADP)リポソームは(A)に示す組成からなるものである。

**Table 1** Lipid components of H12-(ADP/5HT)liposomes.

Components	(A)	(C)	(B)
DPPC	5	5	5
cholesterol	5	5	5
DHSG	1	3	5
PEG-DSPE	0.033	0.039	0.045
H12-PEG-Glu2C18	0.033	0.039	0.045

### 1.3. H12-(ADP/5-HT)リポソームの物性評価

#### 1.3.1. H12-(ADP/5-HT)リポソームの粒径、 $\zeta$ 電位、被覆層数測定法

(A)-(C)の各 H12-(ADP/5-HT)リポソーム分散液を [lipid]<sub>f.c.</sub>が0.05 mM になるよう

PBS(pH 7.4)にて希釈し、粒径を N4 PLUS(BECKMAN COULTER 社製)、 $\zeta$ 電位を Zetasizer Nano(Sysmex 社製)にて測定した。

次いで、(A)-(C)の各 H12-(ADP/5-HT)リポソーム分散液([lipid] = f.c. 9 mg/mL)に PEG 水溶液 ( $M_w = 100$  kDa)を添加 (f.c. 10 mg/mL)、Vortex にて攪拌後、ヘマトクリット管に封入し、遠心分離(12,000 rpm, 30 min, r.t.)させた。沈降したリポソームの体積分率(リポクリット: Lc)を測定し、以下の計算式から被覆層数(N)を算出した。

$$\text{Lamellarity: } N = \frac{P \times C \times V \times 10^{-3}}{2S \times Lc \times 10^{-8}}$$

C: 小胞体濃度 (M)  
Lc: リポクリット (%)  
S: 小胞体1粒子の体積 ( $m^3$ )  
V: 小胞体1粒子の表面積 ( $m^2$ )  
P: 分子占有面積 ( $m^2$ )

#### 1.3.2. ADP および5-HT の内包安定性試験

(A)-(C)の各 H12-(ADP/5-HT)リポソーム分散液([lipid]=10 mg/mL)を振とう後(37 °C)、ゲル濾過(Sephadex G-25)してラウリルエーテルにて可溶化した。HPLC (TSKGel ODS-100V, 1 mL/min, Abs. at 280 nm, リン酸 (pH=7.0)/メタノール = 97/3 (v/v) (TEA 30 mM))にて残存 ADP、5-HT を定量し、脂質濃度(リン脂質テストワコー)で補正することで ADP、5HT 内包率を算出した。

#### 1.4. 血小板凝集計を用いた H12-(ADP/5-HT)リポソーム分散液の血小板凝集促進能評価

PRP([PLT]= $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L) に H12-(ADP/5-

HT)リポソーム分散液(**B**) (f.c. ca.1 x 10<sup>9</sup> particles)を添加、攪拌後、ADP (f.c. 3 μM)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて分散液の透過率を連続的に測定した。

### 1.5. 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(三協ラボサービス, 8週齢、230-280 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)、投与開始から10日目を血小板減少ラット([PLT] = 19.6 ± 2.6 x 10<sup>4</sup> /μL)として使用した。

セボフラン麻酔後、H12-(ADP/5-HT)リポソーム(**B**)を尾静脈投与した(4 mL/kg)。また、生理食塩水、ADP 未内包 H12-リポソームや H12-(ADP)リポソームの分散液を対照群とした。投与5分経過後、尾先端から1cm 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1 mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。

## 2. 膜組成の異なるリポソームの調製と機能評価(平成22年度)

### 2.1. 膜組成の異なるリポソームの調製

混合脂質(**Table 2**)を PBS(pH 7.4)にて水和后(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径が制御されたリポソームを調製し(φ 0.20 μm)、超遠心分離精製した(100,000g, 30 min, 4 °C)。次いで、これを PBS にて再分散、

ゲル濾過精製し(Sephadex G25)、H12未結合リポソーム分散液(**a**), (**b**)及び H12結合リポソーム分散液(**a'**), (**b'**)を得た。なお、平成18年度に確立した H12-(ADP)リポソームは(**a'**)に示す組成からなるものである。各リポソーム(**a**), (**a'**), (**b**), (**b'**)を[lipid]<sub>f.c.</sub> = 0.05 mM になるよう PBS(pH 7.4)にて希釈し、N4PLUS (BECKMAN COULTER 社製)にて粒径を、Zetasizer Nano(Sysmex 社製)にてζ電位を測定した。

**Table 2** Lipid components of various liposomes.

liposome	(a)	(a')	(b)	(b')
DPPC	5	5	5	5
Cholesterol	5	5	5	5
DHSG	1	1	5	5
PEG-DSPE	0.033	0.033	0.045	0.045
H12-PEG-Glu2C18	-	0.033	-	0.045

### 2.2. フローサイトメーターを用いたリポソームの血小板との結合能評価

洗浄血小板 ([PLT]=1.0 x 10<sup>5</sup>/μL, 5μL)に DiOC18標識した各リポソーム(**a**), (**b**), (**a'**), (**b'**) (f.c. 0.03 mg/ml)を混合し、PAR-4 agonist (f.c. 1 mM)にて血小板を活性化させて振とう(37 °C, 10 min)し、ホルムアルデヒド(f.c. 2.0 %)で固定した。フローサイトメーターを用いて血小板の蛍光陽性強度を測定した。

### 2.3. 血小板凝集計を用いたリポソームの血小板凝集能評価

PRP ([PLT]=2.0 x 10<sup>5</sup>/μL)に各リポソーム (f.c. 0.05 mg/ml)を添加、攪拌後 ADP (f.c.

2.5  $\mu\text{M}$ )にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて分散液の透過率を連続的に測定した。

### 3. H12-(ADP)リポソームの品質保証体制の構築(平成23年度)

#### 3.1 蛍光定量法による H12含有量の定量法の検討

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

各脂質溶液(DPPC, cholesterol, DHSG, PEG-DSPE, H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub>)、ADP 溶液(1mM)および PBS に、等量の n-octyl glucoside (1 M) を加え、可溶化した後、ホウ酸緩衝液(pH 9.0, 150  $\mu\text{L}$ )およびフルオレスカミン溶液(0.1 mg/mL, 50  $\mu\text{L}$ )を加え、蛍光強度(ex/em=400/480 nm)を測定した。

次いで、異なる濃度の H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub> 溶液(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL)に、同様の方法にて蛍光標識、蛍光強度の測定を行い、検量線を作成した。

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

#### 3.2 NMR を用いた H12-(ADP)リポソームの脂質組成比定量

H12-(ADP)リポソーム(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub>=5/5/1/0.033/0.033 (by mol))の各構成脂質を重クロロホルムに溶解させ(f.c. 5 mM)、<sup>1</sup>H-NMR 測定により特徴的なスペクトルを探索した(Table 3)。次いで、凍結乾燥後の H12-(ADP)リポソームおよび混合脂質(20 mg)を重クロロホルム(ca. 1.5 mL)に溶解させ<sup>1</sup>H-NMR 測定を行った。解析に際しては、cholesterol にのみ特徴的なスペクトル5.35 ppm(1H, s, -CCHCH<sub>2</sub>-)を基準として積分比を求め、各脂質の混合比を算出した。なお PEG-DSPE と H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub>は含有量が少ないことから、共通の PEG 繰返しユニットのピークを用いることとし、PEG 比のみでの算出とした。

Table 3 Characteristic spectrum.

Lipid	Characteristic spectrum
DPPC	5.20 (q, 1H, -CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -)
Cholesterol	5.35 (d, 1H, -CCHCH <sub>2</sub> -)
DHSG	4.52-4.71 (dd, 1H, -COONHCHCH <sub>2</sub> -)
PEG-DSPE	3.65 (m, 456H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -)
H12-PEG-Glu2C <sub>18</sub>	3.65 (m, 312H, -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -)

#### 3.3. HPLC を用いた ADP 内包量測定

H12-(ADP)リポソーム調製の最終工程であるゲルろ過精製において、リポソームに内包されていない ADP の除去を確認するため、HPLC(TSKGelODS-100V, 1 mL/min, Ab. 260 nm, リン酸(pH=7.0)/メタノール=97/3(v/v) (TEA 30 mM))を用いた解析法を確立した。

外水相に ADP 溶液が混在している遠心分離、再分散後のリポソーム溶液(1 mL)を Sephadex G25にてゲルろ過し、ポイド容量から0.4 mL ずつ合計14 mL 回収した。ゲルろ過後のリポソームを等量の n-octyl glucoside (1 M)にて可溶化し、HPLC で ADP のピーク面積を測定した。また、同様の操作にて調製された H12-(ADP)リポソーム外水相の ADP は完全に除去されていることを確認した。

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

### C. 研究結果及び考察

#### 1. H12-(ADP/5-HT)リポソームの調製とその止血能評価(平成21年度)

##### 1.1. 5-HT の血小板凝集補助能の確認試験

血小板凝集計を用いて、PRP([PLT]= $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ )を ADP 水溶液(f.c. 0-10  $\mu\text{M}$ )に血小板凝集を惹起させたところ、ADP 添加濃度の増加に伴い最大透過率( $T_{\text{max}}$ )は増大し、ADP 最終濃度6  $\mu\text{M}$  以上で飽和に達した(Figure 1、 $T_{\text{max}}$ : 約80%)。他方、5-HT 水溶液(f.c. 0-10  $\mu\text{M}$ )にて血小板凝集の惹起を検討したが、5-HT 水溶液単独では血小板凝集が起こらなかった(Figure 1)。

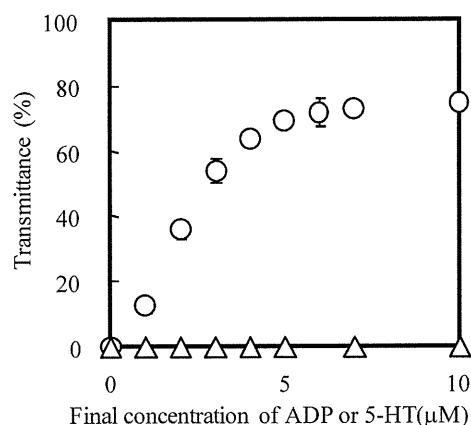


Figure 1 Platelet aggregation induced by ADP (○) or 5-HT (△). [PLT]:  $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ .

そこで、 $[\text{ADP}]_{\text{f.c.}}$ を3  $\mu\text{M}$ に固定して5-HT 水溶液(f.c. 0-1  $\mu\text{M}$ )を加えて調製した混合溶液にて血小板凝集を惹起させたところ、5-HT 添加濃度の増加に伴い、 $T_{\text{max}}$ は顕著に増加した(Figure 2、 $T_{\text{max}}$ : 約80%)。5-HT は単独では血小板凝集を惹起しないが、ADP 凝集を促進する補助機能を有することが確認できた。

従って、ADP と5-HT をリポソームに同時に内包することで、更に止血能が向上することが示唆された。

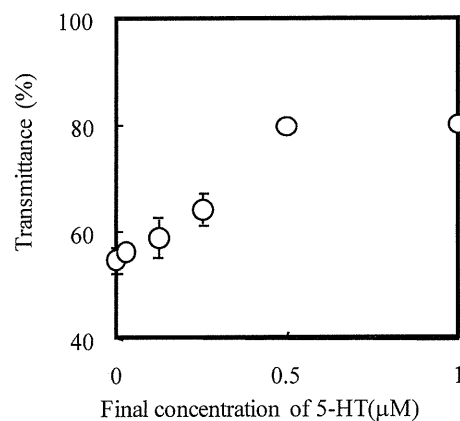


Figure 2 Enhanced effects of ADP(f.c. 3  $\mu\text{M}$ )-induced platelet aggregation induced by 5-HT. [PLT]:  $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ .

## 1.2. H12-(ADP/5-HT)リポソームの物性評価

### 1.2.1. H12-(ADP/5-HT)リポソームの粒径、被覆層数、 $\zeta$ 電位

(A)-(C)の各 H12-(ADP/5-HT) リポソームの粒径を測定したところ、それぞれ $242 \pm 52$ 、 $241 \pm 58$ 、 $244 \pm 45$  nm となり、ほぼ同一の粒径に制御できた(**Table 2**)。次いで、各リポソーム(A)-(C)の体積分率 ( $L_C$ )から被覆層数を算出したところ、それぞれ $1.16 \pm 0.16$ 、 $1.31 \pm 0.04$ 、 $1.33 \pm 0.04$ 枚となり、粒径と同様にほぼ同一の被覆層数に制御できた(**Table 4**)。通常被覆層数は膜中に負電荷を導入した方が低下する傾向にあるが、既に(A)のリポソームではほぼ一枚膜であるので、(B)や(C)も一枚であったと考察できる。さらに、各リポソーム(A)-(C)の $\zeta$ 電位を測定したところ、それぞれ $-8.4 \pm 1.1$ 、 $-13.4 \pm 1.1$ 、 $-15.9 \pm 2.3$  mV となり、負電荷脂質 DHSG の組成比の大きいリポソーム膜であったが(**Table 2**)、導入率に比例して値が増大している訳ではなかった。

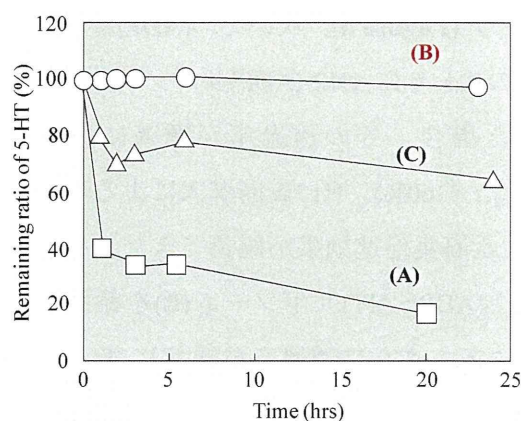
**Table 4** Properties of H12-(ADP/5HT)liposome.

liposome	Diameter(nm)	Lamellality(-)	$\zeta$ -potential(mV)
(A)	$258.5 \pm 74.4$	$1.16 \pm 0.16$	$-8.4 \pm 1.1$
(C)	$253.8 \pm 46.6$	$1.31 \pm 0.04$	$-13.4 \pm 1.1$
(B)	$256.1 \pm 67.6$	$1.33 \pm 0.04$	$-15.9 \pm 2.3$

### 1.2.2. ADP および5-HT の内包安定性

(A)-(C)の各 H12-(ADP/5-HT)リポソーム分散液([lipid] = 10 mg/mL)を $37^\circ\text{C}$ で振とうさせたところ(**Figure 3**)、この加速試験下において ADP は1日後も安定に内包されて

いた(未発表データ)。他方、5-HT を H12-リポソーム(A)、(C)に内包させた場合、1時間後に保持率がそれぞれ40%、80%、1日後にはそれぞれ20%、70%に低下した(**Figure 3**)。H12-リポソーム(A)、(C)は5-HT を安定に保持できないリポソーム膜と判断された。そこで、H12-リポソーム(B)に5-HT を内包させたところ、5-HT は1日後も安定に保持されていた。



**Figure 3** Stability of 5-HT encapsulated into the H12-liposome (A)-(C) at the temperature of  $4^\circ\text{C}$ .

これは、リポソームの膜電荷に相関する性質と思われ、電荷をもつ5-HT とリポソーム膜との静電的反発により5-HT を安定に内水相に保持させるためには、従来のH12-リポソーム(A)より負電荷度の高いリポソーム(B)にする必要がある。

従って、ADP、5-HT 共に安定に内包できるリポソーム膜の組成は、(B) DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu $2C_{18}$  = 5/5/5/0.045/0.045(モル比)であることが明らかになった。

### 1.3. H12-(ADP/5-HT)リポソームの血小板凝集促進能評価

以降の実験は、5-HT を安定内包可能な組成(B)に固定して H12-(ADP/5HT)リポソームの調製を行った。

PRP ([PLT] =  $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L)に(ADP)リポソーム (f.c. ca.  $1 \times 10^9$  particles)分散液を添加し、ADPにて血小板凝集を惹起させたところ、最大透過率( $T_{max}$ )は約50%の増加に留まった(Figure 4)。次いで、(ADP)リポソームの代わりに H12-(ADP)リポソームを添加した場合、その透過率が顕著に増大し( $T_{max}$ : 約60%)、H12表面導入による血小板の2次凝集促進効果が確認できた。そこで、H12-(ADP/5-HT)リポソーム(B)を添加したところ、さらに透過率が増大し  $T_{max}$  は約70%に達した。これは、Figure 2で認められた、ADP に加え5-HT を内包させたことによる血小板凝集促進効果と考えられ、ADP と5-HT の共封入は止血能増幅効果につながる可能性が示唆された。

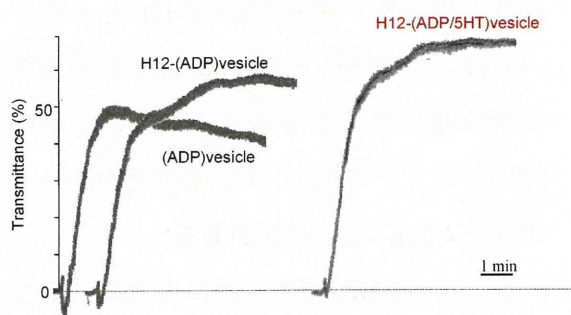


Figure 4 ADP-induced platelet aggregation in the presence of (ADP)liposome, H12-(ADP)liposome and H12-(ADP/5HT)liposome.

### 1.4. 止血能評価

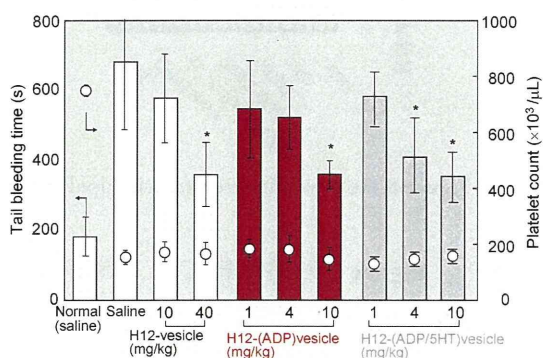
血小板減少症モデルラット([PLT]= $(1.9 \pm 0.2) \times 10^5$  / $\mu$ L)に生理食塩水を投与したところ、出血時間は $682 \pm 198$  秒であり、正常ラット([PLT]=  $8.1 \pm 0.8 \times 10^5$  / $\mu$ L)の出血時間( $178 \pm 56$  秒)と比較して、約3.8倍延長した(Figure 5)。ADP未内包 H12-リポソームを投与したところ、投与量依存的に出血時間は短縮した(10、40 mg/kg における出血時間は、それぞれ $573 \pm 127$ 、 $335 \pm 96$ 秒)。また、H12未結合体では短縮効果が確認できなかったことから、H12-リポソームは止血能を有するナノ粒子であることを確認した。

次いで、H12-(ADP)リポソームを投与したところ、1、4、10 mg/kg における出血時間はそれぞれ $543 \pm 134$ 、 $521 \pm 88$ 、 $349 \pm 49$  秒となり、H12-リポソームにて短縮効果の確認できた1/4の投与量で同等の短縮効果が得られた。

そこで、1.3.の *in vitro* 試験で最も高い最大透過率となった H12-(ADP/5-HT)リポソーム(B)を投与したところ、1、4、10 mg/kg における出血時間はそれぞれ $566 \pm 73$ 、 $397 \pm 102$ 、 $343 \pm 70$ 秒となり、H12-(ADP)リポソームより低い投与濃度(4 mg/kg)で有意に出血時間を短縮できることを初めて実証した。

従って、血小板凝集惹起物質(ADP、5-HT)を安定に内包でき、かつ血小板凝集塊中で特異的に内包 ADP、5HT を放出する

機構を持つリポソームを投与すれば、止血能が向上できることを *in vivo* にて示すことができた。



**Figure 5** Hemostatic effects of administration of liposomes on rat tail bleeding time. ○, platelet count in rats (n=6-10). \*P<0.05 for H12-(ADP)liposomes or H12-vesicles group vs. saline group.

## 2. 膜組成の異なるリポソームの調製と機能評価(平成22年度)

### 2.1. 各リポソームの物性評価

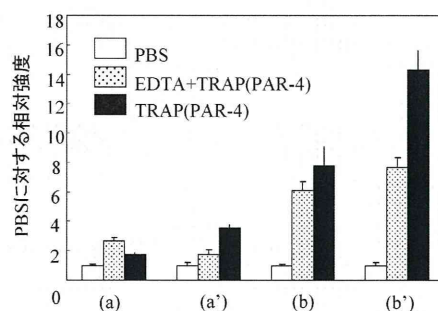
各リポソームの粒径を測定したところ、250 nm 前後のほぼ同一の粒径に制御できた (Table 5)。次いで、ζ電位を測定したところ、負電荷脂質 DHSG 含量を増やしたリポソーム(b), (b')では、負電荷の増加によりζ電位は負に増加していた。

**Table 5** Properties of various liposomes.

liposome	diameter (nm)	z-potential (mV)
(a)	249 ± 79	-12.6 ± 1.4
(a')	242 ± 52	-8.4 ± 1.1
(b)	267 ± 109	-17.4 ± 1.2
(b')	244 ± 45	-15.9 ± 2.3

### 2.2. フローサイトメーターを用いたリポソームと血小板との結合能評価

各リポソームと血小板との結合能を評価したところ、PBS を添加しただけの活性化していない血小板へのリポソームの結合は見られなかった (Figure 6)。一方、PAR-4 agonist である TRAP にて活性化した血小板に対しては、H12-結合リポソーム(a'), (b')の結合が見られ、負電荷脂質 DHSG の含量を増やしたリポソーム(b')は、従来のリポソーム(a')の約7倍の結合能を示した。また、H12未結合のリポソームにおいても約4倍の結合能を示した。このことから、負電荷脂質 DHSG の含量を増やすことで、活性化血小板との結合能が高まり、血小板代替物としての機能が高まる可能性が示唆された。



**Figure 6** Binding abilities of various liposomes toward the PAR-4 agonist-stimulated platelets.

### 2.3. 各リポソームの血小板凝集促進能評価

PRP ([PLT] = 2.0 x 10<sup>5</sup> /μL)に H12未結合リポソーム(a)を添加し、ADP にて血小板凝集を惹起させたところ、最大透過率 (T<sub>max</sub>)は約20%であった。 (Figure 7)。一方、

H12-リポソーム(a')を添加した場合、その透過率は約30%に増加した。次に、負電荷脂質 DHSG の含量を増やしたリポソーム(b), (b')にて検討したところ、(b')の方が(b)よりも上回っており、透過率は大幅に増大して  $T_{max}$  は約70%に達した。これは、フローサイトメーターの結果を支持しており、今後 *in vivo* による止血能評価試験を行い、従来のリポソームとの効果を比較する計画である。

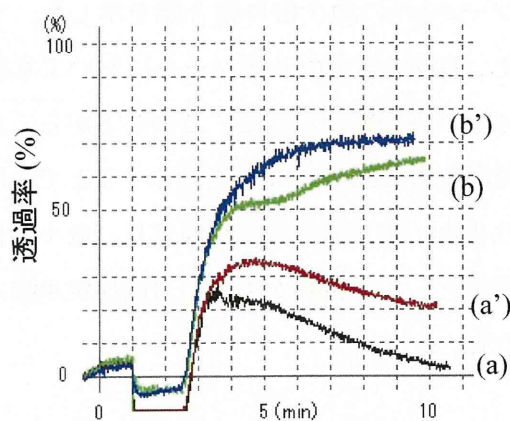


Figure 7 ADP-induced platelet aggregation in the presence of various liposomes.

### 3. H12-(ADP)リポソームの品質保証体制の構築(平成23年度)

#### 3.1 蛍光定量法による H12含有量の定量法の検討

蛍光標識を施した各脂質の蛍光強度を測定したところ、H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub>以外の構成脂質および ADP の蛍光強度は、陰性対照群(PBS)と同程度であることから、フルオレスカミンによる蛍光標識は H12-PEG-Glu2C<sub>18</sub>にのみ施されることが確認された (Figure 8)。

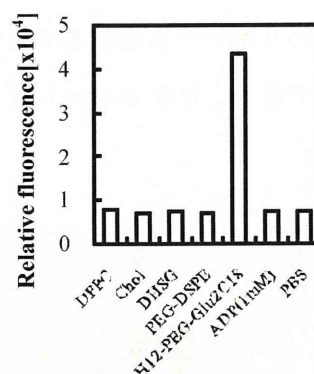
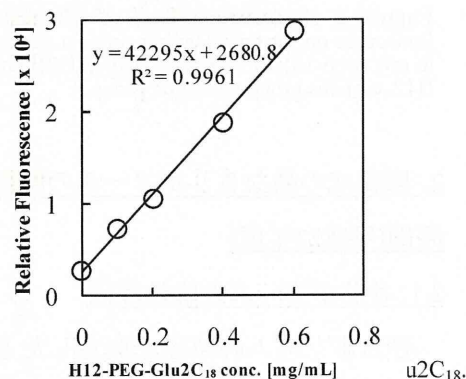


Figure 8 Relative fluorescence with lipid and ADP.

また、Figure 9の検量線では、良好な直線性が得られ( $R^2=0.9961$ )、本方法による定量が可能であることが示された。



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

#### 3.2 NMR を用いた H12-(ADP)リポソームの脂質組成比定量

平成23年度に提供したリポソームの内、5ロットのリポソームおよび原料として用いた混合脂質の脂質組成比を測定した結果、

原料である混合脂質とリポソームで比較した場合、脂質混合比に大きな差は見られず、リポソームおよび混合脂質ともに設定値に近い値となった(**Table 6**)。また異なるロットの混合脂質間およびリポソーム間で比較をすると、**Table 6**で示した混合比に落ち着いており、設定値より大きく外れた値を示したものはなかった。このことより当研究室で調製された H12-(ADP)リポソームは全て同発の膜組成であることが確認された。

**Table 6** Analysis of lipid ratio.

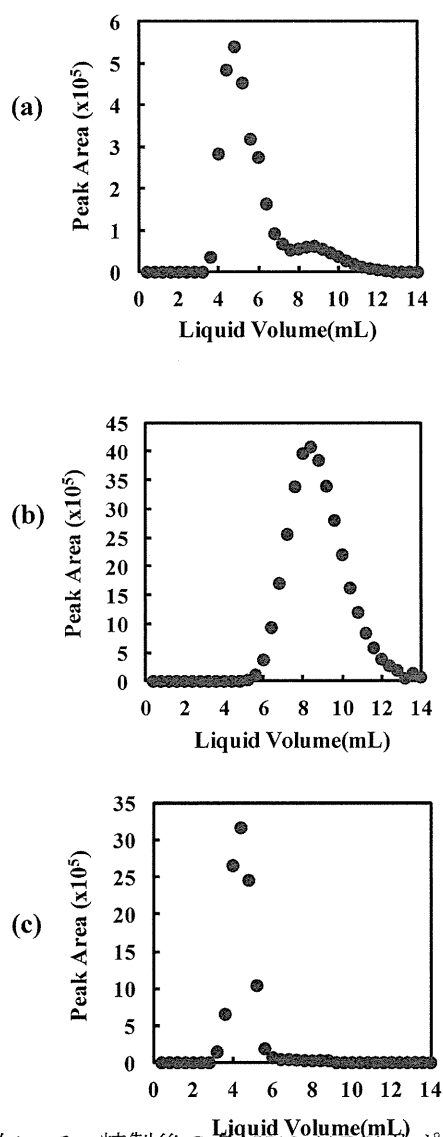
Lot.	DPPC	cholesterol	DHSG	PEG Ratios
Set values	5	5	1	0.033
Mixed Lipid 110905	4.85	5	0.90	0.030
Liposome 110901-k	4.87	5	1.09	0.029
Liposome 110902-k	4.83	5	1.01	0.031
Mixed Lipid 111005	5.11	5	0.89	0.029
Liposome 111001-k	5.12	5	0.84	0.025
Mixed Lipid 111013	4.91	5	1.01	0.028
Liposome 111002-k	4.93	5	0.90	0.026
Mixed Lipid 111102	4.98	5	0.88	0.027
Liposome 111101-k	5.02	5	0.84	0.027
*Mixed Lipid	4.96 ± 0.11	5	0.93 ± 0.06	0.029 ± 1.4x10
*Liposome	4.94 ± 0.12	5	0.96 ± 0.11	0.028 ± 2.4x10

※Means ± S.D.

### 3.3. HPLC を用いた ADP 内包量測定

H12-(ADP)リポソームの外水相に ADP が存在している溶液をゲル濾過し、HPLC 測定したところ、ボイド容量約 3.6 mL で ADP を内包したリポソームが溶出され、その後のフラクションに外水相の ADP が溶出されることが示唆された(**Figure 10 (a)**)。そこで、ADP 水溶液(1 mM, 1 mL)で同様の操作を行い、**Figure 10 (a)**の後方(ボイド容量 8.4 mL)のピークが外水相に存在する ADP 水溶液由来のものであることを確認した(**Figure 10(b)**)。これより、ADP 水溶液は

ボイド容量 5.6 mL から溶出され始めることがわかり、またゲル濾過精製の際、3 mL のボイド容量から約 1.3 mL リポソーム溶液を回収できることから、Sephadex G25を用いたゲルろ過精製によって H12-(ADP)リポソームと分離可能であることが確認できた(回収率 83%)。また、**Figure 10(c)**より、この手法により精製された H12-(ADP)リポソームの外水相には ADP が存在しないことが確認できた。



次いで、精製後の各 H12-(ADP)リポソーム  
**Figure 10** HPLC profiles of (a) a liposome dispersion with ADP, (b) an ADP solution and (c) H12-(ADP) liposome dispersion.

ムを n-octyl glucoside (1 M)にて可溶化し、HPLCにて ADP のピーク面積を測定し、リポソーム濃度に対する ADP 内包量を求めた(Table 7)。リポソーム濃度あたりの ADP 内包量はロット間でほぼ同量であった。今後はこの手法により調製した全サンプルの内包 ADP 量を測定し、ADP 内包量の標準値を決定する。

**Table 7** Amount of ADP per lipid concentration.

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

#### D. 結論

##### 平成21年度

- (1) H12-(ADP)リポソームにさらに血小板凝集補助能を有する5-HT を同時に内包させた H12-(ADP/5-HT)リポソームを構築した。
- (2) H12-(ADP/5-HT)リポソームは平成18年度に確立した H12-(ADP)リポソームよりも低濃度で血小板減少症モデルラットに対して出血時間短縮傾向を示し、*in vivo* 評価からより高い止血能を有するものと思われた。

##### 平成22年度

- (1) より止血能の高い H12-(ADP)リポソームの創製を目指し、従来の H12-(ADP)リポソームよりも負電荷脂質である DHSG 含量を増やしたりポソームを構築した。
- (2) この高 DHSG 含量 H12-(ADP)リポソーム

ムは、従来の H12-(ADP)リポソームよりも活性化血小板に対する結合能が顕著に高まり、血小板凝集促進効果が見られた。

- (3) 今後は高 DHSG 含量 H12-(ADP)リポソームを用いて *in vivo* による止血能評価試験を行い、従来の H12-(ADP)リポソームと比較する計画である。

##### 平成23年度

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

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Suzuki, H., Okamura, Y., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M. Ultrastructural analysis of thrombin-induced interaction between human platelets and liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -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) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Release abilities of adenosine diphosphate from phospholipid vesicles with different membrane flexibilities properties and their hemostatic effects as a platelet substitute. *J. Controlled Release*, **148**, 373-379 (2010).
- (4) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Visualization of Liposomes Carrying Fibrinogen  $\gamma$ -Chain Dodecapeptide Accumulated to Sites of Vascular Injury Using Computed Tomography *Nanomedicine*, **6**, 391-396 (2010).
- (5) Okamura, Y., Fukui, Y., Kabata, K., Suzuki, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka S. Novel Platelet Substitutes: Disk-Shaped Biodegradable Nanosheets and their Enhanced Effects on Platelet Aggregation. *Bioconju Chem*, **20**, 1958-1965 (2009).
- (6) Okamura, Y., Goto, T., Niwa, D., Fukui, Y., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having heterosurfaces, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **89A**, 233-241(2009).
- (7) Tsuji, T., Takeoka, S., Okamura, Y., Sudo, R., Ikeda, Y., and Tanishita, K. Motion of polymerized albumin particles in a model arteriole in the presence of red blood cells. *J. Biorheol.*, **1**, 29-34(2009).
- (8) Wada, T., Okamura, Y., Takeoka, S., Sudo, R., Ikeda, Y., and Tanishita, K. Deformability and adhesive force of artificial platelets measured by atomic force microscopy. *J. Biorheol.*, **1**, 35-40(2009).
- (9) Okamura, Y., Takeoka, S., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., and Handa, M., Development of fibrinogen gamma-chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute, *J. Thrombosis Haemostasis*, **7**, 470-477 (2009).
2. 学会発表
- (1) 新井 愛美, 渡邊 直英, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司, 「止血能を有する血小板代替物としてのリポソーム組成の検討(第2報)」, 第33回日本バイオマテリアル学会 (2011.11., 京都)
- (2) 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

ル学会大会(2010.11., 広島).

(3) 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)

(4) 勝野 峻介, 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).

(5) 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).

(6) 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).

(7) 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).

(8) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 江藤 薫子, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「放射性同位元素標識したドデカペプチド結合(ADP 内包)リン脂

質小胞体からのADP放出特性」第89日本化学会春季年会 (2009.3., 千葉).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

外傷性大量出血時の急性易出血性病態に対する H12(ADP)リポゾームの止血制御効果

分担研究者	木下 学	（防衛医科大学校 免疫微生物学、准教授）
研究協力者	西川可穂子	（防衛医科大学校 救急部、助教）
	萩沢康介	（防衛医科大学校 生理学、助教）
	庄野 聡	（防衛医科大学校 免疫微生物学、助教）
	柳川練平	（防衛医科大学校 防衛医学、助教）
	宮崎裕美	（防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門、助教）
	小野 聡	（防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門、准教授）
	阪本敏久	（防衛医科大学校 救急部、教授）
	斎藤大蔵	（防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門、教授）
	関 修司	（防衛医科大学校 免疫微生物学、教授）

研究要旨

多発外傷や外科手術時の大量出血には輸血が行われることが多いが、大量輸血は生体に血小板減少を伴う出血傾向をもたらす、これが出血部位からの止血制御をより困難なものにする。この結果、更なる輸血をせざるを得ず、出血傾向がさらに増悪し負の連鎖に陥り、最終的には大量失血により死に至ることが少なくない。H12(ADP)リポゾームは fibrinogen  $\gamma$  鎖 C 末端(H12)を担持させたリポゾームで、出血部位に存在する活性化血小板同士を架橋して血小板凝集形成を促進し、かつ内包した ADP を局所で放出し血小板凝集をさらに促進する止血効果が期待されている。

平成 21 年度はまず、外傷性大量出血と大量輸血に伴う血小板減少モデルを作製し、これが H12(ADP)リポゾームによる止血制御の解析に適したモデルであるか否かを検討した。この急性血小板減少状態は、外科的な血管損傷による出血と輸血を念頭に置き作製した。すなわち、家兎の大腿動静脈にカニューレーションを行い、1 回 25mL の動脈血を脱血すると共に洗浄赤血球を輸血する動作を計 8 回繰り返すことで作製した。本モデルでは、大量出血(脱血)とこれに対する大量赤血球輸血により、血小板数が  $5 \times 10^4/\mu\text{L}$  にまで低下し、耳介出血時間も 20 分以上(正常約 2 分)と著しく延長した。ソノクロットで解析した血栓形成能も、本