

through the activation of TLR4 signaling 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (東京大学武田先端知ビル, 2010, 11/27-28)

33. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球の肝チトクローム P450 保護効果. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (富山国際会議場, 2010, 11/29-30)

34. 宮本洋平、岩尾康範、渡邊博志、門脇大介、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質 CMPF の生体内レドックス特性 第 27 回臨床フリーラジカル会議 (京都, 烟川, 2010, 12/3-4)

35. 南雲 恒平, 杉森 剛志, 田中 基彦, 佐々木 裕, 異島 優, 渡邊 博志, 窪田 和幸, 山田 尚之, 小田切 優樹, 丸山 徹. 肝疾患時におけるアルブミンの構造及び機能評価. 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)

36. 田中 遼大, 古川 真斗, 異島 優, 田中 健一郎, 水島 徹, 渡邊 博志, 小田切 優樹, 丸山 徹. BLM 誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有用性評価 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)

37. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹., 一酸化炭素を付加した赤血球は大量出血時における肝チトクローム P450 を保護する. 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)

38. 宮本洋平、岩尾康範、米良克美、渡邊博志、門脇大介、異島優、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質 CMPF の酸化ストレス誘発メカ

ニズム 日本薬学会第 131 年会 (ツインメッセ静岡, 2011, 3/28-31)

39. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、門脇大介、小田切優樹、丸山徹 一酸化炭素結合型赤血球による肝 CYP 保護効果. 日本薬学会第 131 年会 (静岡, グランシップ, 2011, 3/28-31)

40. 田中 遼大, 古川 真斗, 異島 優, 田中 健一郎, 水島 徹, 渡邊 博志, 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アルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価 日本薬学会第 131 年会 (静岡, グランシップ, 2011, 3/28-31)

41. 南雲 恒平, 杉森 剛志, 窪田 和幸, 山田 尚之, 異島 優, 渡邊 博志, 田中 基彦, 佐々木 裕, 小田切 優樹, 丸山 徹. MS 解析を用いた慢性肝炎時におけるヒト血清アルブミンのレドックス解析と構造及び機能との関連性 日本薬学会大 131 年会 (静岡, グランシップ, 2011, 3/28-31)

42. 本田大輔、宮本洋平、渡邊博志、門脇大介、丸山徹、小田切優樹 尿毒症物質 p-cresyl sulfate の酸化ストレスに及ぼす影響. 日本薬学会第 131 年会 (ツインメッセ静岡, 2011, 3/28-31)

43. 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

44. 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

45. 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

46. 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

47. 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

48. 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

49. 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

50. 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  $\alpha$ 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

51. 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

52. 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

53. 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

54. 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

55. 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

56. 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

57. 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

58. **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

59. Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kai H, Otagiri M, **Maruyama T**,  $\alpha$ 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

60. 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

61. 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

62. 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oppa-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

63. 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

64. 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 $\beta$ -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

65. 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

66. 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

67. 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

68. 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

69. 小森 久和、渡邊 博志、首藤 剛、甲斐 広文、小田切 優樹、丸山 徹  $\alpha$ 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

70. 異 島優、原 菜梨絵、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

71. 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

72. 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  $\alpha$ 1- 酸性糖タンパク質のヘモグロビン  $\beta$  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

73. 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. Taguchi K, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Otagiri M. Pharmacokinetic profiles of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. XII Symposium on Blood Substitute, Parma, 2009 8/25-29

2. Hirata K, Ishima, Y, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M Mannosylated-Recombinant albumin as a NO traffic protein for the treatment of hepatic ischemia /reperfusion injury XII Symposium on Blood Substitute, Parma, 2009 8/25-29

3. Chuang VTG, Ikuta S, Maruyama T, Otagiri M HUMAN ALBUMIN BASED DRUG DELIVERY: ALBUMIN FUSION OF THIOREDOXIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

4. Mera K, Takeo K, Izumi M, Maruyama T, Nagai R, Otagiri M MODIFICATION WITH REACTIVE ALDEHYDES ALTERS THE STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

5. Taguchi K, Watanabe H, Urata Y, Anraku M, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M. PROPOSED DOSE OF HEMOGLOBIN VESICLES, PEGYLATED LIPOSOMES DEVELOPED AS A RED BLOOD SUBSTITUTE, DOES NOT INDUCE THE ACCELERATED BLOOD CLEARANCE PHENOMENON IN MICE Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

6. Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Taguchi K, Shimoishi K, Suenaga A, Watanabe H, Hirata S, Maruyama T, Otagiri M EVALUATION FOR ANTIOXIDANT AND RENOPROTECTIVE ACTIVITY OF OLMESARTAN USING NEPHRECTOMY RATS Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

7. Anraku M, Fujii T, Kondo Y, Yasufuku T, **Maruyama T**, Otagiri M, Tomida H ANTIOXIDANT PROPERTY OF SEVERAL MOLECULAR WEIGHT CHITOSANS IN IN VITRO AND IN VIVO STUDIES Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18
8. Ishima Y, **Maruyama T**, Akaike T, Sawa T, Suenaga A, Kai T, Otagiri M FATTY ACIDS COULD BE A NOVEL TYPE OF MEDIATOR OF S-DENITROSATION FROM S-NITROSYLATED HUMAN SERUM ALBUMIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18
9. Hirata K, Maeda H, Watanabe H, Nakajou K, Ishima Y, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M GENETICALLY ENGINEERED MANNOSYLATED-HUMAN SERUM ALBUMIN AS A VERSATILE CARRIER FOR LIVER-SELECTIVE THERPEUTICS Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18
10. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M Hepatic uptake of  $\alpha$ -chain-mediated  $\alpha$ -1-acid glycoprotein through hemoglobin  $\beta$  endocytic pathway 9<sup>th</sup> International ISSX meeting, 2010 9/4-8, Istanbul
11. Minomo A, Ishima Y, Suwa Y, Uchida M, **Maruyama T**, Morioka H, Otagiri M Characterization of bilirubin binding site in human serum albumin via construction and bilirubin binding screening of a phage library ISSX 9th International Meeting, 2010 9/4-8 Istanbul
12. Komori H, Uehara  $\alpha$ -chain $\beta$ N, Nishi K, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M Involvement of hemoglobin  $\alpha$ -1-acid glycoprotein into liver The  $\alpha$  on plasma membrane in uptake of human Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, 2010 11/14-18, New Orleans
13. 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 4<sup>th</sup> Asia Pacific ISSX Meeting 2011/4/22-25
14. 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. 4<sup>th</sup> Asia Pacific ISSX Meeting 2011/4/22-25
15. 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 4<sup>th</sup> Asia Pacific ISSX Meeting 2011/4/22-25
16. 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
17. 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  $\alpha$  1-acid glycoprotein is recognized by the hemoglobin  $\beta$ -chain on mouse liver parenchymal cells Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12
18. 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

19. Nagumo K, Sugimori T, Ymada N, Kubota K, Ishima Y, Watanabe H, Tanaka M, Sasaki Y, **Maruyama T**, Otagiri M Quantitated 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

20. 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

21. 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

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）

### 研究要旨

初年度は、まず健常者の末梢血を用いて *in vitro*での安全性評価指標の選定を進め、特に炎症、酸化ストレスを惹起する可能性について好中球の遊走能・活性酸素産生能・脱顆粒能と全血の炎症性サイトカイン産生能を検討した。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するような異常反応は検出されなかったが、ADPを含有しないリポソーム素材において薬理的濃度を上回る高濃度（1 mg/mL）で好中球の活性酸素産生能や脱顆粒能、インターロイキン8（IL-8）の産生が促進され、好中球活性化が安全性評価指標の候補となる可能性が示唆された。

そこで次年度以降は、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、H12-(ADP)リポソームの投与が血中好中球機能に及ぼす影響を *ex vivo*で検討した。その結果、脱血により好中球の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って好中球機能の抑制作用が認められ、リポソーム内に含有されるADPが抗炎症作用を発現する可能性が示唆された。

最終年度は、既存の臨床検査による生体でのより総合的な安全性評価と網内系での炎症反応を解析するために、マウスに各種人工血小板を経静脈的に投与し、ADPの有無と投与量の影響を *in vivo*で評価した。その結果、投与24時間後の血液生化学検査では、脂質代謝、肝胆道系酵素活性、腎機能などに悪影響は認められず、肝臓のtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-1 $\beta$ 、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影響は認められなかった。

以上のように *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*での多面的、重層的評価により、H12-(ADP)リポソームは好中球活性化や臓器傷害、炎症反応を惹起せず、生体適合性の観点からも安全性の高い薬剤と考えられた。

### A. 研究目的

人工血小板の有力候補薬剤である H12-(ADP)リポソームの創薬化への前臨床開発段階において、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。また、素材の最適化に資する評価指標については、特に異物に対する生体反応である炎症関連の各種測定系の有用性が考えられるため、本研究ではまず初年度に健常者の血液を用いて *in vitro*で評価できるように検討することにした。

具体的な測定評価系として、まず好中球活性酸素産生能（ルミノール依存性化学発光）をマイクロプレートによって多検体・多条件同時に比較検討できるハイスループット解析・評価法（以下、マイクロプレート法）を用いて、素材単独の影響のみならず、好中球の刺激物質として頻用される酵母菌体であるザイモザン（zymosan）を用いた刺激応答性の修飾作用まで含め、生じうる作用を多面的にスクリーニングすることにした。すなわち、①直接の好中球刺激作用（炎症惹起作用）、

②活性酸素消去作用（抗酸化作用）については、各種リポソーム素材の濃度段階を設定することによって濃度依存的な変化により評価できる。さらに素材とのプレインキュベーションの作用時間を設定することにより、③プライミング作用（賦活作用）や④down-regulation（抗炎症作用）を評価できる可能性もある。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、高感度測定が可能であるため、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)。

次に、止血局所に人工血小板が集積する状況を想定して、*in vitro* で全血とコラーゲンペプチドを含有するハイドロゲルを接触させる反応系（以下、ハイドロゲル法）に人工血小板素材を添加し、好中球機能への影響を評価した。今回用いた「足場付きハイドロゲル(scaffold thermo sensitive gelation polymer: S-TGP)」は、コラーゲンの分解産物を含有し、組織損傷時に露出した細胞外基質に好中球が接着して組織浸潤する状況を試験管内に設定したもので、重層した全血からハイドロゲル中に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。これにより、生体内により近い条件での評価が可能になると考えられる（鈴木克彦, 好中球機能検査システムおよび好中球機能検査方法. [http://jstore.jst.go.jp/nationalPatentDetail.html?pat\\_id=18174](http://jstore.jst.go.jp/nationalPatentDetail.html?pat_id=18174): 特開 2008-107210)。

さらに、炎症反応や免疫応答などを制御する細胞間情報伝達物質であるサイトカインは、通常は末梢組織において極微量で作用するが、重症感染症や外傷、激運動、熱傷、循環不全など生体に極端な刺激が加わると、血中濃度が上昇して全身に炎症反応が波及し、好中球活性化や血管内皮傷害、循環障害、ひいては多臓器不全を引き起こす原因となる。そこで好中球・単球を活性化する炎症性サイトカインとして、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン (IL) 6、8 (IL-6、IL-8) などの産生量を測定し、実際に好中球の脱顆粒物質の濃度もザイモザンによる刺激応答性まで含めて重層的に評価することにした。

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。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* 測定系により多面的な人工血小板素材のスクリーニングを行うことにした。次年度以降は、ハイドロゲル法による好中球機能評価を *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有効性を検討する際に、リポソーム素材の生体適合性と安全性を評価する検討も行うこととした。最終年度は、炎症反応の *in vivo* 評価として健常マウスに各種人工血小板素材を静脈内投与し、臨床生化学検査と網内系の各種炎症性サイトカインの遺伝子発現から総合的に安全性評価を行うことにした。

## B. 研究方法

### 1. 各種人工血小板素材の炎症系 *in vitro* 評価

各種人工血小板の分散媒にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) を用い、H12-(ADP) リポソーム、H12-(PBS) リポソーム、(ADP) リポソーム、(PBS) リポソームの4種をそれぞれ反応系での最終濃度が 0.01 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL になるように調整した。検体の血液は、特に疾患を有していない健常男性6名よりヘパリン採血管に3 ml 末梢血を採取し、以下の各種測定系による評価に供した。なお、血液学的検査値 (平均値 $\pm$ 標準偏差) については、白血球数は  $5550 \pm 1455$  cells/ $\mu$ L、好中球数は  $3233 \pm 1388$  cells/ $\mu$ L、ヘモグロビン濃度は  $15.5 \pm 0.7$  g/dL、血小板数は  $22.1 \pm 4.7 \times 10^4$  particles/ $\mu$ L であり、すべて正常範囲内であった。

マイクロプレート法では、96 well マイクロプレートに各種人工血小板素材と対照としての PBS を 20  $\mu$ L ずつ入れ、全血を 1 well 当たり 35  $\mu$ L とし、等量の活性酸素検出試薬 (2.5 mM ルミノール溶液) と混和して 70  $\mu$ L ずつ添加し、5 mg/mL のザイモザン懸濁液 10  $\mu$ L を指定の well に添加し、37°C で 1 well 当たり 1 秒の下方測定を行い、マイクロプレート一巡後に 10 秒間自動攪拌するカイネティック測定を行った。ザイモザンによる刺激は 0 分と 45 分後に行い、無刺激



の条件も含め、各種人工血小板素材の濃度依存性と作用時間依存性について影響を解析・評価した。

ハイドロゲル法では、冷却した S-TGP を各チューブの底に 50  $\mu\text{L}$  塗布して 37°C でゲル化させた後、血液とルミノール溶液を 1 : 1 に混和したものを、150  $\mu\text{L}$  ずつすばやくゲル上に均一に添加し、ルミノメーターにセットして化学発光量 (relative light unit : RLU) を測定した。その後 20 分、40 分、60 分の計 4 回経時的に測定し、化学発光量を記録した。ルミノメーターでの測定終了後、ただちにゲルの上層の血液を 37°C に加温した PBS にて洗浄し取り除き、冷却してゾル化させ等量 (50  $\mu\text{L}$ ) のチュルク液を加え、十分攪拌し、血球計算盤にて細胞数を測定した。

好中球脱顆粒物質とサイトカインの測定は、上記のマイクロプレート法で 90 分間反応させた各 well に 200  $\mu\text{L}$  の PBS を加え、攪拌したあと遠心し、その上清を回収して酵素免疫測定法により定量した。それぞれ、人工血小板素材単独で反応させた条件と、さらにザイモザンを添加して刺激した場合の 2 通りについて測定を行った。TNF- $\alpha$  と IL-6 は Quantikine HS (R&D Systemes, USA)、IL-8 は OptEIA (BD Biosciences, USA)、好中球脱顆粒能についてはミエロペルオキシダーゼ (MPO) とカルプロテクチン (Calprotectin) (Hycult biotechnology, Netherlands) を測定した。

測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。等分散性の検定で正規性が仮定できない場合が多かったため、ノンパラメトリック検定の Freedman test を行い、多重比較には Scheffe' s test を行い、それぞれ危険率 5 % 未満を有意とした。

## 2. ウサギを用いた好中球機能の *ex vivo* 評価

NZW ウサギ (日本 SLC) を用い、急性血小板減少病態モデルにて検討を行った。すなわち、脱血と洗浄赤血球輸血操作を血中血小板数が  $5 \times 10^4$  particles/ $\mu\text{L}$  程度に減少するまで繰り返した。

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 に溶解したもの、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として採取した PRP 及び PPP を 30 mL であり、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、それぞれ採血して上記のハイドロゲル法にて好中球機能を測定した。なお、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  $5 \times 10^4$  particles/ $\mu\text{L}$  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。

本実験は、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、人工血小板である H12-(ADP)リポソーム投与群、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 $\pm$ 標準誤差で示した。

## 3. マウスを用いた生化学・網内系 *in vivo* 評価

本実験には 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、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。イソフルラン麻酔下で各種人工血小板を含んだ PBS、対照群には PBS をそれぞれ 200  $\mu$ l 眼窩静脈叢より投与した。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し、血漿成分を回収した。肝臓組織は液体窒素で急速冷凍し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。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。

肝臓組織での mRNA の発現は、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。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<sup>®</sup> 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  $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間 cDNA を変性させ、1 サイクル  $95^{\circ}\text{C}$  で 15 秒間、 $60^{\circ}\text{C}$  で 1 分間アニーリングの条件で 40 サイクル繰り返した。

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% 未満を有意とした。

## C. 研究結果

### 1. 各種人工血小板素材の炎症系 *in vitro* 評価

まず好中球活性酸素産生能に及ぼす影響についてマイクロプレート法を用いて 4 種類の人工血小板の濃度依存性・作用時間依存性をスクリーニングしたが、有意差は認められなかった。

次にハイドロゲル法により好中球の遊走能と活性酸素産生能について各種人工血小板素材を添加して影響を評価したところ、好中球遊走能に関しては濃度依存性は認められなかったが、活性酸素産生能については H12-(PBS) リポソームと (PBS) リポソームで濃度依存的な増加を認め ( $p < 0.05$ )、それぞれ高濃度の 1 mg/mL で有意な上昇が認められた ( $p < 0.05$ ) (図 1)。

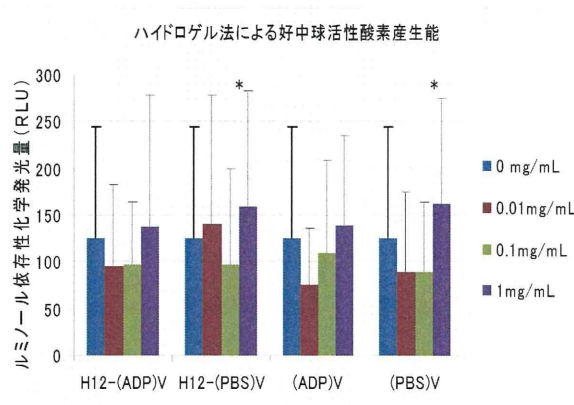


図 1. ハイドロゲル法で評価した各種人工血小板素材の好中球活性酸素産生能に及ぼす影響

好中球の脱顆粒能については、カルプロテクチン、MPO ともにザイモザンによる刺激で促進されたが、特にザイモザン刺激時の MPO 脱顆粒能は、H12-(PBS) リポソームにおいて濃度依存的な有意な上昇を示し、0 と 1 mg/ml との濃度間でも有意差が認められた ( $p < 0.05$ ) (図 2)。

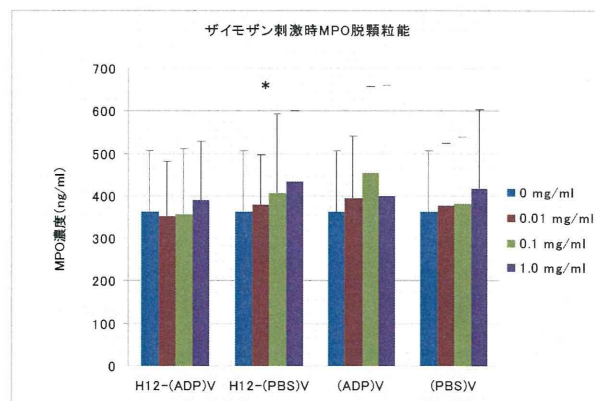


図 2. ザイモザン刺激時の好中球によるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 脱顆粒能

全血のサイトカイン産生能については、IL-8の産生能について H12-(PBS) リポソームにおいて有意な変動が認められ、0.01 mg/mL に対して 1 mg/mL で有意に上昇した ( $p < 0.05$ ) (図 3)。

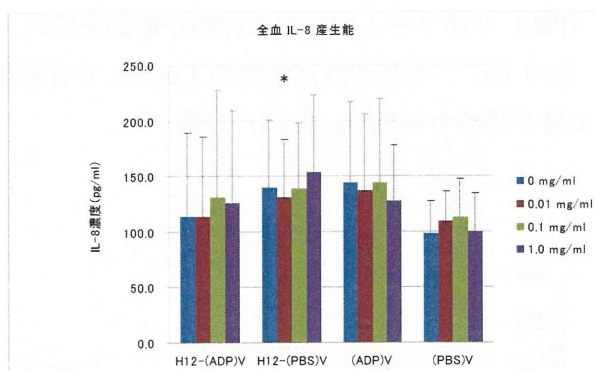


図 3. 全血のザイモザン刺激時 IL-8 産生能

## 2. ウサギを用いた好中球機能の *ex vivo* 評価

好中球遊走能について、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、好中球遊走能の大きな変動はみられなかった (図 4)。

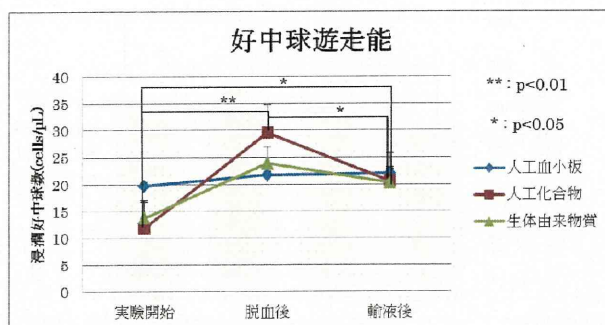


図 4. 血中好中球の遊走能 (ハイドロゲル浸潤細胞数) の推移

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、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。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、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。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 5)。

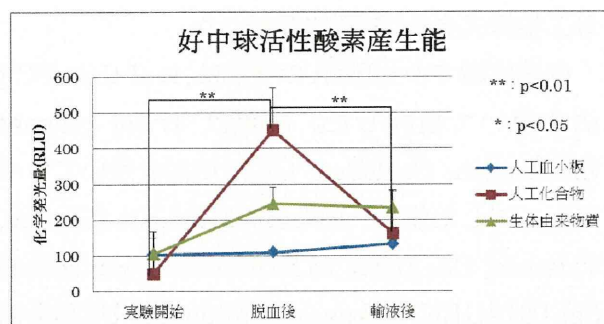


図 5. 全体を通した血中好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光量: RLU) の推移

## 3. マウスを用いた生化学・網内系 *in vivo* 評価

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。なお、肝臓の炎症性サイトカインの遺伝子発現に関しても検討したが、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、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

### 1. 各種人工血小板素材の炎症系 *in vitro* 評価

本研究では、まず好中球活性酸素産生系を用いて各種人工血小板素材を評価した。マイクロプレート法では、各素材に①直接の刺激作用(炎症

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

惹起作用)、②プライミング作用(賦活作用)、③活性酸素消去作用(抗酸化作用)、④down-regulation(抗炎症作用)がないかを濃度依存性・作用時間依存性よりスクリーニングしたが、顕著な影響は認められなかった。ハイドロゲル法による検討でも、H12-(ADP)リポソームは好中球を活性化しなかったが、ADPを含有しない2つの素材では1 mg/mLの高濃度において有意な高値となった。先行研究でアデノシンには好中球機能抑制作用が報告されており(Kumar V and Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* 616: 7-15, 2009)、局所で人工血小板が集積する状況ではADPが存在しないと好中球が活性化される能性が示唆された。

以上の検討で活性酸素の検出に用いたルミノール依存性化学発光は、好中球のアズール顆粒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を中心として、殺菌や組織傷害に直接関与する毒性の高い活性酸素種に選択性が高いが、実際にMPOの脱顆粒能においてもADPを含有しないH12-(PBS)リポソームにおいて有意な亢進が認められ、活性酸素の代謝がMPOの脱顆粒によって促進されるか、あるいはそれが

ADPによって阻止される可能性が示唆された。IL-8は好中球活性化作用があるが、本研究においてH12-(PBS)リポソームがIL-8の産生を有意に亢進させ、好中球機能促進とも対応したことから、ひとつの作用機序として機能した可能性が考えられた。

このように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。

## 2. ウサギを用いた好中球機能の *ex vivo* 評価

本研究では、血小板を減少させる目的で脱血操作を繰り返し行った。生体への影響を小さくするために、脱血検体より得られた赤血球成分の返却(洗浄赤血球輸血)が行われたが、脱血後に好中球の遊走能や好中球活性酸素産生能の有意な亢進が認められたことから、それが大きなストレスとなった個体もあったものと考えられる。しかし、

これらの個体に対し、人工血小板、人工化合物、生体由来物質のいずれを投与した場合においても、輸液後に好中球の遊走能や活性酸素産生能の有意な上昇はみられなかった。一方、人工血小板成分であるADP（アデノシン）には、好中球の機能抑制作用が報告されており（Elzschig HK, et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation. *Blood* 104: 3986-3992, 2004）、H12-(ADP)リポソームは異物反応を示さず、炎症や酸化ストレスを軽減する可能性が示唆された。

### 3. マウスを用いた生化学・網内系 *in vivo* 評価

本研究では、各種人工血小板を経静脈内投与し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ほぼ均等に取り込まれ、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も考えられた。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-リポソームには骨格筋、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等の骨格筋、心筋への血流が増大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。

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、腎機能等に悪影響を起さず、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。

### E. 結論

以上のように *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* での多面的、重層的検討により、H12-(ADP)リポソームは好中球活性化や臓器傷害、炎症反応を惹起せず、生体適合性の観点からも安全性の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。

### 謝辞

一連の研究の共同研究者の皆様には、各年度報告書に連名とさせていただいておりますが、ご協力に感謝申し上げます。

分担研究報告書

H12 (ADP) リポソームの人工血小板としての前臨床評価に関する研究

分担課題：マウスモデルを用いた安全性評価

研究分担者 後藤 信哉 東海大学医学部 内科学系（循環器内科） 教授

### 研究要旨

H12 (ADP) リポソームは止血機能を増強する。止血機能の過度の増強は心臓、脳など酸素需要の高い組織において臓器灌流血管の閉塞に基づく虚血症状を惹起するリスクがある。また、虚血に敏感な脳組織などでは微小血栓も症候性となるリスクがある。

血小板サイズ、臓器灌流血管のサイズ、臓器灌流血管の血管径と血小板サイズの比、ヒト血小板と H12 リポソームのサイズの比などに種差が大きいことを考慮すると、マウスモデルを用いた実験的研究においてヒトのイベントを予測することは困難とせざるを得ない。しかし、H12 (ADP) リポソームを用いた臨床試験を計画するためには、動物実験の施行は必須である。

心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患は動脈硬化巣破綻という血管内の損傷部位への血小板の集積が発症の契機となる。臓器灌流血管の閉塞モデルとしてマウスの精巣動脈血栓モデルを用いた。塩化鉄を用いて血管内皮細胞を機能的に障害させ、血小板の集積、血小板血栓中への H12 (ADP) リポソームの集積動態、閉塞血栓の形成動態を評価した。また、微小血管閉塞モデルとして脳組織切片内の血小板と H12 (ADP) リポソームの組織学的検討を行なった。

精巣動脈モデルでは閉塞血栓形成までの時間は H12 (ADP) リポソームの添加の有無により影響を受けなかった。H12 (ADP) リポソーム投与後にマウスの行動異常を認めため脳内微小血栓形成が疑われたが、脳組織内の H12 (ADP) リポソームの脳内の集積、H12 (ADP) リポソームの集積は認めなかった。

H12 (ADP) リポソームによる血栓性の亢進を小動物モデルでは明確に示すことはできなかった。微妙な調節系なので最終的には臨床試験による検証が必須である。

### A. 研究目的

止血、血栓のバランスの重要性は高齢化社会において本質的に重要な問題である。加齢とともに血管内皮細胞の機能的障害を伴う動脈硬化性変化は進展し、身体は血栓性となるが、同時高齢者では出血性疾患である悪性腫瘍の有病率、発症率も高くなる。臨床的には、心筋梗塞、脳

梗塞などの血栓性疾患の発症予防のために抗凝固、抗血小板薬を使用する機会が増加している。これらの抗凝固、抗血小板薬使用中に頭蓋内出血などの重篤な出血イベントを起こした場合には血小板輸血などの製剤を使用せざるを得なかった。これらの生物製剤使用時には肝炎などの感染症のリスクを避けることができない。

抗凝固、抗血小板薬使用中の症例に悪性腫瘍が発症し、出血のため抗凝固、抗血小板薬を中止しなければならない事例も増加している。臨床データの蓄積が進むとともに、抗凝固、抗血小板薬中止を余儀なくされた症例では、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓イベントリスクが薬剤非使用例よりも高くなっていることも理解されてきた。すなわち、経験論的には、「出血イベントそのものが血栓イベントリスク」となることが理解されて来た。短期間にて止血コントロールを行なうことは将来の血栓イベントコントロールにも必須である。

小動物を用いた実験はヒトを用いた臨床試験に進むためのデータ集積との点では必須である。小動物とヒトの間には種差が大きい。H12 (ADP) リポソーム投与時の出血反応、止血反応については最終的にはヒトを対象とした臨床試験によらなければ結論を下すことは困難である。本研究はあくまでも探索的研究である。

## B. 研究方法

### 1. 動物

週齢 10-11 週の ICR マウスを用いた。(CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan),

### 2. 倫理面への配慮

動物実験は、動物の生命を尊重するという基本的観点に基づく動物福祉を護持するための配慮を念頭に置き、東海大学実験動物委員会の定める各種規約を遵守して実験を施行した。

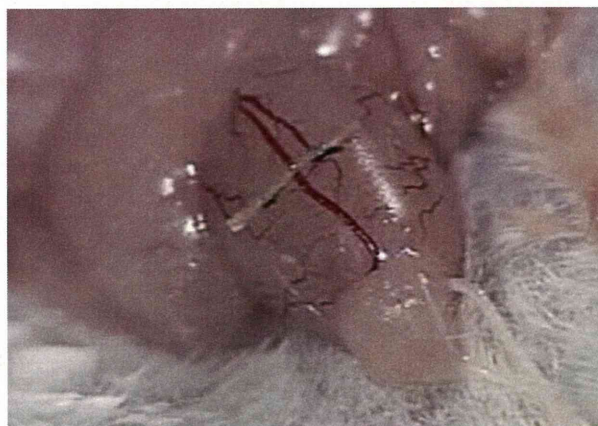
### 3. H12 (ADP) リポソームの投与

ケタミンによる前麻酔ののち、ネンブタールにより深麻酔を行った。尾静脈より 10 mg/kg にて H12 (ADP) リポソームを投与した。

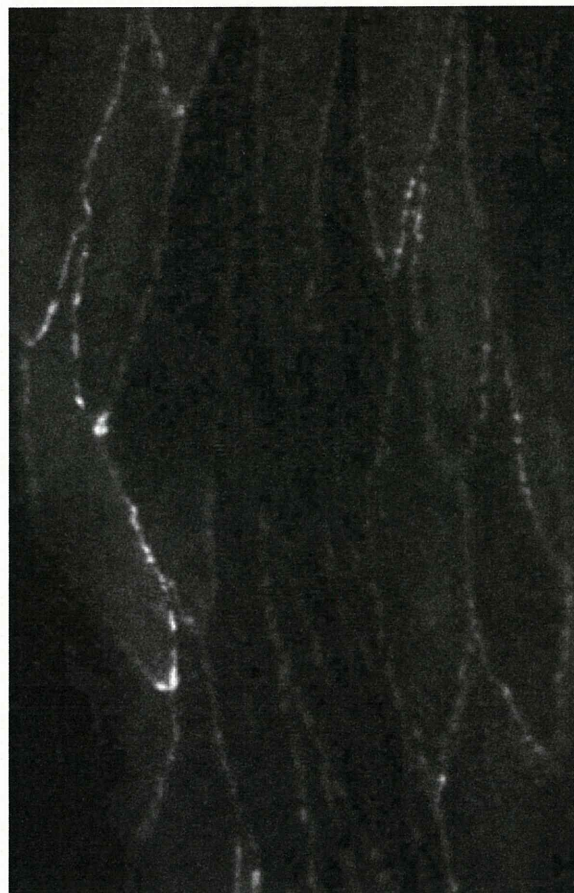
### 4. 精巣動脈血栓モデルの作成

マウスの精巣動脈を顕微鏡下に分離した。図

に示すように血管外膜面より塩化鉄を含む糸を  
おいて、塩化鉄を血管の外から血管壁を通して  
精巣動脈に浸透させた (次ページ上段の図)。

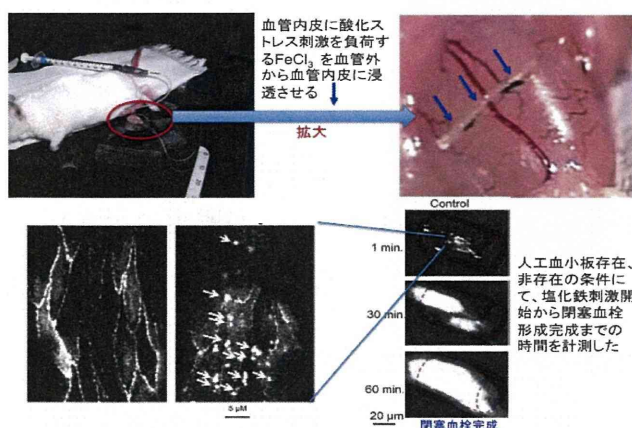


塩化鉄刺激前の健常血管内皮細胞は下図に示すように敷石状に結果を被覆しており、このような内皮細胞の存在下では血小板、白血球などが接着することはない。



塩化鉄による刺激後には血管内皮上に血小板

の集積が始まる。本動物モデルは既に確立されている（下図）。



## 5. マウスの行動異常の観察

ケージ内のマウスの行動をビデオカメラにて H12 (ADP) リポソーム投与前後に経時的に観察した。

## 6. 脳組織中切片中の H12 (ADP) リポソームを中心とする微小血栓の有無の組織学的検討

5. に示したマウス行動異常の観察実験から H12 (ADP) 投与後のマウスにおいて行動異常を認めた。脳内微小血栓が危惧されたため脳組織の組織学的検討を行なった。マウスを麻酔下に苦痛を除去して致死とした。マウスの脳を正中にて右/左の半分に分けて脳サンプルを作成した。作成したサンプルを未固定凍結ブロックとした。このブロックを 600 μm 間隔にて薄片として、1つのブロックサンプルから 5つの薄片サンプルを作成した。マウスの血小板の脳内の局在を FITC 標識抗マウス CD41 抗体を用いて蛍光顕微鏡にて観察した。マウス血小板形状と比較して、H12 (ADP) リポソームのけは形態から弁別できる。Native 血小板と添加した H12 (ADP) リポソームの関係を検討した。リポソーム濃度は 10 mg/kg と 40 mg/kg を用いた。

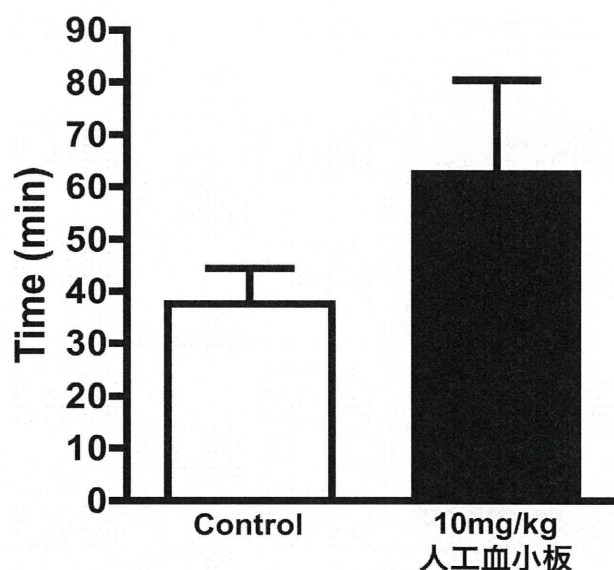
## C. 結果

### 1. H12 (ADP) リポソーム投与後のマウス精巣

### 動脈閉塞血栓形成時間

経口標識した H12 (ADP) リポソームを投与すると、血管内を流動する H12 (ADP) リポソームの認識は可能であった。しかし、H12 (ADP) リポソームは塊を作ることなく、血液中に均等に存在した。塩化鉄刺激を行なっても H12 (ADP) リポソームの血管内皮への集積を認めることはなかった。

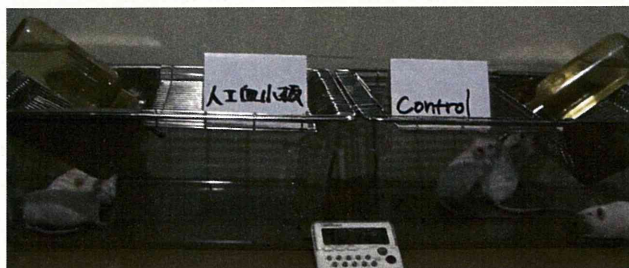
H12 (ADP) リポソーム投与前後にて、直径 200 μm 程度の精巣動脈を対象として、塩化鉄刺激開始から血栓性閉塞完成までの時間を計測した。H12 (ADP) リポソーム投与群と非投与群の間には閉塞血栓形成までの時間に差異を認めなかった。



### 2. H12 (ADP) リポソーム投与後のマウスの挙動

投与前において、両ケージ内のマウスともに活発に行動していた。投与開始 15 分後において、両群には大きな差異を認めなかった。しかし、投与開始 30 分後よりのちにおいては、H12 (ADP) リポソーム投与マウスにおいて、行動の活力が低下しマウスはケージの隅に居るようになった。この経口は投与開始 70 分後まで持続した（次ページ左上図、右：生理食塩水投与マウス、左：H12 (ADP) リポソーム投与マウス）

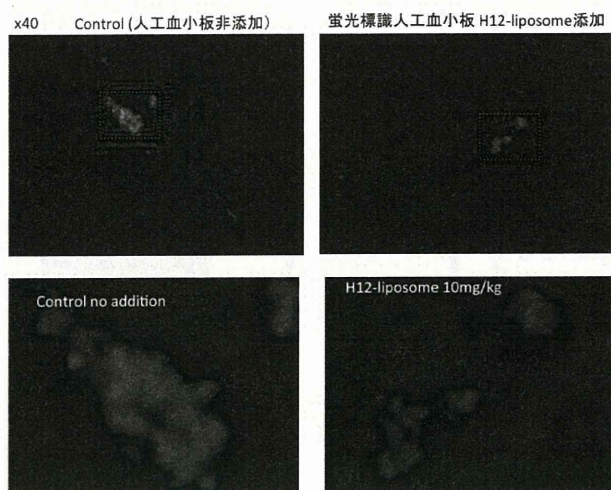




同様の挙動異常は H12(ADP)リポソームを 10 mg/kg 以上投与した時にのみ認められた。

### 3. 脳組織切片における H12(ADP)リポソームと血小板血栓の検討

H12 (ADP)リポソーム非添加のコントロール群にても、脳内には一部血小板の集積を認めた。マウス血小板はサイズが小さいため、顕微鏡の倍率として10倍、40倍拡大では個別の血小板形態まで確認することはできなかった。一方、脳組織の一部に血小板塊が存在することは確認でき



た。

同一の実験条件にてH12 (ADP)リポソームを 10 mg/kgの濃度にて添加した結果を上図に示す。Native血小板集積部位にH12 ADP (リポソーム)と思われる球状小粒子を認めるが、コントロールとの顕著な差は見られない。俯瞰的に見ても、H12 (ADP)リポソーム投与下において、脳組織内の血小板の集積が多いことも、個々の血小板集積か塊のサイズが大きいことも認めなかった。

H12 (ADP) リポソーム投与下にて行動異常を認めたマウスでも脳組織内の微小血栓の集積に増加は明らかではなかった。

### D. 考察

H12 (ADP) リポソームは過去の動物実験において止血機能を増強することが明確に示されている。止血機能亢進の反面としての血栓性の亢進が危惧された。しかし、塩化鉄によるマウス血管血栓モデルでは直径数百  $\mu\text{m}$ の血管閉塞に対するH12 (ADP)リポソームの血栓促進効果を認めなかった、しかし、高濃度のH12 (ADP) リポソーム投与後においてマウスの行動異常を認めたため、脳内微小血管内血栓が危惧された。しかし、最終年度の脳組織切片を用いた研究にてH12 (ADP) を投与していないマウスでも脳組織内には血小板の集積を認め、また脳組織内の血小板の集積にサイズ、数いずれもH12 (ADP) リポソーム投与の有無において明らかな差異を認めなかった。行動異常の原因を微小血栓による脳内の虚血とすることは困難である。

近年の臨床研究成果は、出血と血栓の関係が投与想定した以上に複雑であることを示唆している。血栓性の高い症例は出血イベントリスクの高い症例でもある。また、血栓イベントリスクの高い症例に対して抗血栓薬を投与すると血栓イベントリスクを一時的に低減させることは可能であるが、抗血小板薬により出血イベントを起こした症例では、逆に血栓イベントリスクが増加することも明らかにされた。出血、血栓のバランスは血管損傷部位局所における単純なバランスではなく、未知の部分を多く含む全身性の反応と考えざるを得ない。

in vitroの研究、小動物を用いた短期間の研究ではH12 (ADP) リポソーム投与時における止血機能の増強は確実に検証されている。懸念される安全性の問題としての血栓性の亢進については、小動物を用いた精巣動脈血栓モデル、脳組織の

検討では明確な以上を示すことはできなかった。止血／血栓の全身的な精妙さを考えると、安全性に関する懸念については最終的にはヒトの臨床試験まで未知の部分が残るとして検討を勧めざるを得ない。

## E. 健康危険情報

該当なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Chan FK, Goto S, Wu MS, Abola MTB, Yeoh KG, Sutrisna B, Chua SS, Mahachai M, Turajane T, Wu B, Zeng QY, Sugano K. Burden of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Anti-platelet Drug use in Asia: A Multi-disciplinary Working Party Report. **Clinical Gastroenterology & Hepatology**, in press.
2. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, Burton P, Cohen M, Cook-Bruns N, Fox KA, Goto S, Murphy SA, Plotnikov AN, Schneider D, Sun X, Verheugt FW, Gibson CM; the ATLAS ACS 2-TIMI 51 Investigators. Rivaroxaban in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. **N Engl J Med**. 2011 Nov 13. *N Engl J Med*.366 (1):9-19
3. Kakkar AK, Mueller I, Bassand JP, Fitzmaurice DA, Goldhaber SZ, **Goto S**, Haas S, Hacke W, Lip GYH, Mantovani LG, Verheugt FWA, Jamal W, Misselwith F, Rushton-Smith S, Turpie AGG: International Longitudinal registry of patients with atrial fibrillation at risk of stroke: Global Anticoagulant Registry in the FIELD (GARFIELD). **Am Heart J** 163(1):13-19 e11, (2011)
4. Kawai T, Takagi Y, Fukuzawa M, Yamagishi T, Goto S: The role of trefoil factor family in apparently healthy subjects administered gastroprotective agents for the primary prevention of gastrointestinal injuries from low-dose acetylsalicylic acid: a preliminary study. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition** 49: 136-140,2011
5. Meadows T.A., Bhatt D.L., Cannon C.P., Gersh B.J., Rother J, Goto S, Liau C, Wilson P.W.F., Salette G, Smith S.C., Steg G, for the REACH Registry Investigators: Ethnic Differences in Cardiovascular Risks and Mortality in Atherothrombotic Disease: Insights From the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. **Mayo Clinic Proceedings** 86(10): 960-967,2011
6. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, Al-Khalidi HR, Ansell J, Atar D, Avezum A, Bahit MC, Diaz R, Easton JD, Ezekowitz JA, Flaker G, Garcia D, Geraldes M, Gersh BJ, Golitsyn S, Goto S, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Horowitz J, Mohan P, Jansky P, Lewis BS, Lopez-Sendon JL, Pais P, Parkhomenko A, Verheugt FW, Zhu J, Wallentin L; the ARISTOTLE Committees and Investigators. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. **N Engl J Med**. 365: 981-992, 2011
7. Origasa H, Goto S, Shimada K, Uchiyama S, Okada Y, Sugano K, Hiraishi H, Uemura N, Ikeda Y, on behalf of the MAGIC Investigators: Prospective Cohort Study of Gastrointestinal Complications and Vascular Diseases in Patients Taking Aspirin: Rationale and Design of the MAGIC Study. **Cardiovasc Drugs Ther** 25: 551-560, 2011 (DOI: 10.1007/s10557-011-6328-2)
8. Goto S, Ikeda Y, Shimada K, Uchiyama S, Origasa H, Kobayashi H; The J-TRACE Investigators. One-Year Cardiovascular Event Rates in Japanese Outpatients With Myocardial Infarction, Stroke, and Atrial Fibrillation. **Circ J**. 2011 Aug 20. 75(11):2598-2604
9. Wiviott SD, Flather MD, O'Donoghue ML, Goto S, Fitzgerald DJ, Cura F, Aylward P, Guetta V, Dudek D, Contant CF, Angiolillo DJ, Bhatt DL, on behalf of the LANCELOT-CAD Investigators. Randomized Trial of Atopaxar in the Treatment of Patients With Coronary Artery Disease. **Circulation** 123; 1854-63, 2011
10. O'Donoghue ML, Bhatt DL, Wiviott SD, Goodman SD, Fitzgerald DJ, Angiolillo DJ, Goto S, Montalescot G, Zeymer U, Aylward PE, Guetta V, Dudek D, Ziecina R, Contant CF, Flather MD, on behalf of the LANCELOT-ACS Investigators. Safety and Tolerability of Atopaxar in the Treatment of Patients With Acute Coronary Syndromes. **Circulation**, 123: 1843-53, 2011
11. Gibson CM, Mega JL, Burton P, Goto S, Verheugt F, Bode C, Plotnikov A, Sun X, Bruns NC, and Braunwald E: Rationale and design of the Anti-Xa therapy to Lower cardiovascular events in Addition to standard therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome-Thrombolysis in Myocardial Infarction 51(ATLAS-ACS 2 TIMI 51) trial: A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of rivaroxaban in subjects with acute coronary syndrome. **American Heart Journal** 161: 815-821 e6 (2011)

(総説、著書など)

1. Goto S: Monitoring of the Effects of New-Generation Oral Anticoagulants –What Does It Mean? -. **Circulation Journal** in press, Feb.2012
2. Goto S: Role of Platelet in Cardiovascular Events with Coronary Intervention. **Proceedings**

- in **Korean Society of Interventional Cardiology** 2(1): 65-68, 2011
3. Goto S, Serebruany V: VORAPAXAR.PAR1 receptor antagonist, Antiplatelet therapy. **Drugs of the Future** 2011 36(2): 101-113.2011
  4. Goto S. PAR1 Inhibitors in ACS. **Acute Coronary Syndrome** 10(3): 103-108
  5. Kawai T, Lanas A, and Goto S. European physician don't like cytoprotective agents? **J Clin Biochem Nutr** 49: 67, 2011
  6. Goto S. Use of statins and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation or electrical cardioversion: An old question revisited. **Thromb Haemost**, in press (2011)
  7. Goto S, Serebruany V. Vorapaxar: PAR1 receptor antagonist, antiplatelet therapy. **Drugs Fut** 2011, 36(2): 101-108
- G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）  
該当なし

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) リポソームの人工血小板としての前臨床評価 (効力と安全性)

H12-(ADP) 小胞体の安全性評価

臨床検査値への影響：血液凝固系、生化学、血栓マーカ、血中濃度代理マーカ

研究分担者 村田 満 (慶應義塾大学医学部 臨床検査医学 教授)

研究協力者 丸山 仁美 (同 輸血・細胞療法センター 技術員)

渡邊 直英 (同 輸血・細胞療法センター 助教)

半田 誠 (同 輸血・細胞療法センター 教授)

研究要旨

血液適合性の観点から H12-(ADP) 小胞体の安全性評価を行うことを目的として、実験動物としてラットとウサギを使用して、平成 21 年度は：血液凝固系および一般生化学検査値への小胞体静脈投与の影響を 1 週間後まで経時的に評価し、平成 22 年度は：試験物の血中濃度を反映する代理マーカとしてその構成成分であるコレステロールやリン脂質の測定が有用である可能性を検討した。平成 23 年度は、最も危惧される試験物の血栓誘発性を、過凝固状態を反映した DIC ラットモデル (トロンボプラスチンで惹起) で、鋭敏な血栓マーカ (アンチトロンビンと D-ダイマー) を用いて検討した。その結果、H12-(ADP) 小胞体はその常用量 (20 - 40 mg/kg) や高用量 (80 mg/kg) のラットへの単回投与では、血小板数を含む血算値、APTT、PT、フィブリノゲンの凝固検査値、ALT、アルブミン、クレアチニンなどの肝・腎機能には意義のある影響を及ぼさなかった。一方、脂質関連検査値 (コレステロール、リン脂質、LDL コレステロール) は、小胞体の血中濃度を反映して、一過性に、その投与量依存性に増加した。しかし、測定キットの相対的な低感度により、ラット (ex vivo) ばかりでなくヒト (in vitro) においても血中のリン脂質濃度が小胞体の血中代理マーカとはなり得ないことがわかった。そして、DIC ラットモデルでの検討では、血小板数やフィブリノゲンとともにアンチトロンビンと D-ダイマーの値は有意な変動を示さず、投与量の範囲内では危惧される血栓誘発・増強作用は認めなかった。H12-(ADP) 小胞体は血液適合性の観点から人工血小板として安全であることが示唆された。

A. 研究目的

フィブリノゲン $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド (H12) を結合させたリン脂質小胞体 (H12-(ADP) 小胞体) 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の血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate (ADP) を放出して、その血小板輸血に匹敵した止血能を発揮することを、