

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 23 年度までに、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 含量を増やしたリポソーム (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18=5/5/5/0.045/0.045(モル比)) を構築し、*in vitro* 試験および *in vivo* 試験によりその止血能を評価してきた。DHSG 含量を増やしたリポソームは、*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、血小板減少症モデルラットを用いた *in vivo* 試験では、止血能促進を示すことができなかった³⁾。

そこで平成 24 年度は、負電荷脂質 DHSG(**Figure 1 a**)を増やしたリポソームによる活性化血小板との結合能向上のメカニズムを明らかにするため、負電荷脂質 DHSG のアナログ分子(DMSG, **Figure 1 b**)と負電荷ポリマーPAA(**Figure 1 c**)を用いて、それらの阻害効果を *in vitro* 試験で評価した。具体的には、凝集計を用いた血小板凝集試験およびフローサイトメーターを用いた活性化血小板との結合の阻害効果を行った。

1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).

2) 平成 18, 19, 20 年度 政策創薬総合研究事業研究報告書

3) 平成 21, 22, 23 年度政策創薬総合研究事業研究報告書

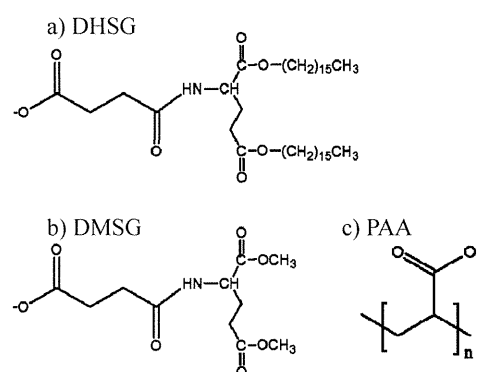


Figure 1 Chemical structures of a) DHSG (1,5-**d**ihexadecyl-N-**s**uccinyl-L-**g**lutamate), b) DMSG (1,5-**d**imethyl-N-**s**uccinyl-L-**g**lutamate) and c) PAA (poly acrylic acid).

B. 研究方法

1. DHSG 含量を増やした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(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 4 種類の 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(Malvern 社製)にて測定した。

Table 1 Formulation and properties of liposomes.

Lipid components	(a) L555	(b) H12-L555
DPPC ¹⁾	5	5
Cholesterol	5	5
DHSG ²⁾	5	5
PEG-DSPE ³⁾	0.045	0.045
H12-PEG-Glu2C18	-	0.045
Diameter (nm)	223.3 \pm 72.84	204.3 \pm 69.08
ζ -potentials (mV)	-17.4 \pm 1.21	-18.9 \pm 1.44

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)

2. DMSG 存在下における、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.}=0.15 mg/mL)分散液および DMSG 溶液 (f.c. = 0.25, 0.50 mg/ml) を PRP ([PLT]= 2.0×10^5 / μ L) に添加後、ADP(f.c. 3.0 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。

3. DMSG 存在下における、活性化血小板とリポソームとの結合能評価

Hepes-Tyrode buffer(HTB) (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)分散液および DMSG 溶液(f.c. = 0.63, 0.82, 0.95 mg/ml)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)で固定した。Hepes-Tyrode buffer (pH 7.4, 120 μ L)にて希釈し、FACS Calibur(Becton Dickinson 社製)を用いて測定を行った。この時 HTB 添加群を未刺激(非活性化)血小板とし、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。

4. PAA 存在下における、リポソームの血小板凝集促進能および、活性化血小板とリポソームとの結合能評価

2. および 3.と同様の方法にて、DMSG の代わりに PAA (f.c. = 0.1, 0.3, 0.5 mM)を用いて、リポソーム**(a)**の血小板凝集促進能および活性化血小板との結合能を評価した。

5. PAA 存在下における、フィブリノーゲンと活性化血小板との結合能評価

PAA による、リポソームと活性化血小板の結

合の阻害の特異性を明らかにするため、3.と同様の方法で、リポソーム**(a)**の代わりに PAA および Alexa Fluor 488-Fibrinogenを用いて、フィブリノーゲンと活性化血小板の結合能を評価した。

C. 研究結果及び考察

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 **(a)**, **(b)**の方が従来組成のリポソーム (approx. -10 mV)より負に帯電した(**Table 1**)。

2. DMSG 存在下における、リポソームの血小板凝集促進能評価

リポソーム**(a)**および**(b)**を PRP に添加し ADP 凝集させると、二次凝集まで到達することが報告されている。本研究で DMSG を添加してリポソーム**(a)**, **(b)**による ADP 凝集を試験したところ、同様に二次凝集を起こしたことから、DMSG はリポソームの血小板凝集を抑制しないことが明らかとなった(data not shown)。

3. DMSG 存在下における、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(HTB, HTB+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が、活性化血小板 (HTB+PAR-4)に対しては両者ともに結合が見られた(**Figure 2**)。しかし、DMSG 添加群において、リポソーム**(a)**, **(b)**の両者で、活性化血小板とリポソームの結合の阻害は認められず、DMSG による阻害作用はないことが示唆された。

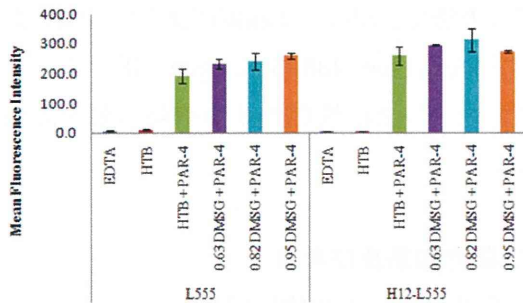


Figure 2 Binding abilities of liposomes (a) L555 and (b) H12-L555 to the washed platelets in the presence of DMSG as analyzed by flow cytometer. (n=3).

4. PAA 存在下における、リポソームの血小板凝集促進能および、活性化血小板とリポソームとの結合能評価

リポソーム(a)と負電荷ポリマーPAA(M_w : 5100, 2100, 1200)をPRPに添加してADP凝集を試験した。PAA非添加群(Figure 3 (i)-(iii) yellow line)では二次凝集を起こしたが、PAA添加群では、PAAの平均分子量依存的またはPAAの濃度依存的に、凝集が阻害された(Figure 3 (i)-(iii) red, blue and green line)。

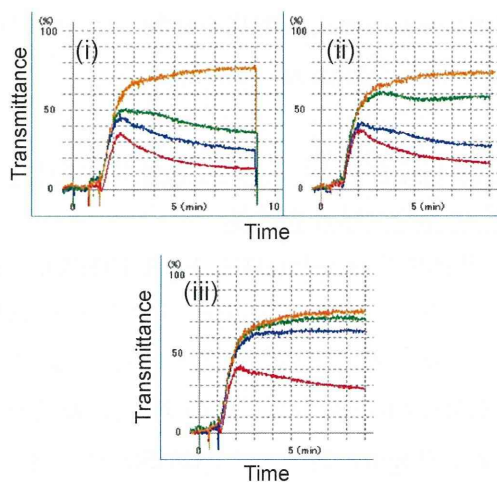


Figure 3 Enhancement effects of platelet aggregation with liposomes (a) L555 and different Mw PAA. Final concentration of PAA is (i) 0.5mM, (ii) 0.3mM and (iii) 0.1mM. The colored line, Red is PAA(M_w 5100); Blue is PAA(M_w 2100); Green is PAA(M_w 1200); while Yellow is PBS.

また、フローサイトメーターを用いた活性化血小板とリポソームの結合能試験でも、同様に、PAAの平均分子量および添加濃度依存的に、結合が阻害された(Figure 4)。

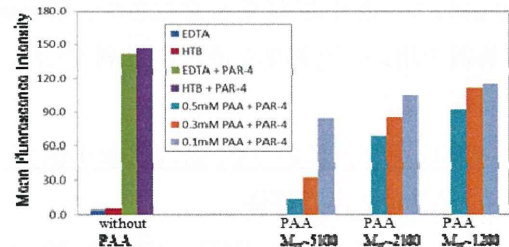


Figure 4 Binding abilities of liposomes (a) L555 to the washed platelets with different Mw PAA as analyzed by flow cytometer.

5. PAA 存在下における、フィブリンノーゲンと活性化血小板との結合能評価

非活性化血小板(HTB, EDTA)に対しては、フィブリンノーゲンの結合はみられなかった(Figure 5)。また、活性化血小板に対しては、結合は見られたが(HTB+PAR-4)、インテグリンを介した結合を阻害した場合(EDTA+PAR-4)には結合は見られなかった。一方、活性化血小板にPAAを添加した群では、PAAの分子量および濃度依存的な結合阻害がみられた。

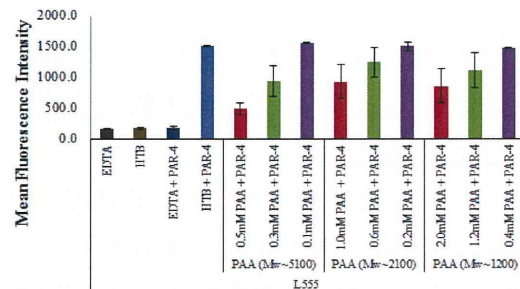


Figure 5 Binding between Alexa Fluor 488 Fibrinogen and the washed platelets with different Mw PAA as analyzed by flow cytometer (n=3).

以上より、DHSGと類似の化学構造をもつDMSGは、DMSG含量を増やしたリポソームと

活性化血小板との結合を阻害しないが、負電荷ポリマーであるPAAは阻害作用をもつことが示された。また、PAAによる阻害は非特異的であることも示唆された。

D. 結論

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、活性化血小板との高い結合能を示した。
2. DHSG アナログ分子 DMSG は、DHSG 含量を増やしたリポソームによる血小板凝集促進能および活性化血小板とリポソームと結合能を阻害しないことが明らかとなった。
3. 負電荷ポリマーPAA は DHSG 含量を増やしたリポソームによる血小板凝集促進、および活性化血小板とリポソームの結合を阻害することが明らかとなった。
4. PAA による阻害は非特異的に起こり、活性化血小板と負電荷リポソームの結合が膜間の相互作用によることが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) Suyun TAN, Manami ARAI, Naohide WATANABE, Makoto HANDA, Yasuo IKEDA, Shinji TAKEOKA, 「Inhibitory study on the binding of high anionic liposome to the activated platelet membrane」, 2nd International Conference on Biomaterial Science (2013. 3., つくば)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）

（分担）研究報告書

大量出血合併急性血小板減少家兎モデルにおける H12(ADP)リポゾームの投与効果
—臓器出血後の damage control surgery と H12(ADP)リポゾーム投与での救命効果—

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）

柳川練平 （防衛医科大学校 防衛医学、助教）

土井麻実 （早稲田大学 先進理工学部）

研究要旨

多発外傷や外科手術に伴う大量出血ではしばしば輸血が行われるが、血小板成分を含んでいない大量輸血では血小板減少が生じ、これが出血傾向をもたらす。これにより止血制御がより困難となるため更なる輸血をせざるを得ず、出血傾向がさらに増悪し結果的に負の連鎖に陥り、最終的には大量失血で死に至ることが時に生じる。H12(ADP)リポゾームは fibrinogen γ 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 を出血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。以前の研究により、大量脱血と赤血球成分の返却を家兎で繰り返すことにより、急性の血小板減少病態を作製することに成功している。さらに本モデルにおいて肝組織に臓器損傷を作製すると致死性の臓器出血モデルを作製することが出来る。本モデルを用いて H12(ADP)リポゾームによる臓器出血に対する止血制御効果をみたところ、臓器出血作製前にあらかじめ H12(ADP)リポゾームを投与した場合であるが、凝固因子と共に H12(ADP)リポゾームを投与しておくことで、臓器出血が止血出来、その結果、家兎の生存率も 100%と、本来の血小板輸血と同等の止血救命効果を得ることが出来た。そこで今年度は、実臨床でも行われている damage control surgery を併用しながらの外傷性大量出血への対処療法を念頭に、急性血小板減少家兎にあらかじめ肝臓器出血を作製し、これを 5 分間圧迫止血しながら H12(ADP)リポゾームを投与することで、その止血救命効果を検討した。その結果、H12(ADP)リポゾームを投与した家兎では本来の血小板

を投与した家兎と同等、もしくはそれ以上の止血救命効果が得られた(生存率; H12(ADP)リポゾーム 60%、血小板 50%)。一方、凝固因子のみの投与となる PPP 投与群では生存率は 10%に留まった。肝臓の損傷部位からの出血量や止血までの時間も H12(ADP)リポゾーム群では顕著な改善が認められ、血小板投与群とほぼ同等であった。このように実臨床に則した実験モデルである、急性血小板減少家兎に対する肝臓器出血時の H12(ADP)リポゾームの後投与でも有効な止血制御効果が得られることが明らかとなり、H12(ADP)リポゾームの血小板代替物としての有用性が強く示唆された。

A. 研究目的

多発外傷や外科手術時の大量出血では輸血により対処せざるを得ない事態に遭遇することが時にある。しかし、血小板を含まない大量輸血は生体に血小板減少を伴う出血傾向をもたらし、これがさらに出血部位からの止血制御を困難なものにする。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するといった負の連鎖に陥り、最終的には大量失血により患者を死に至らしめることが少なくない。

このような血小板減少を伴うような易出血性病態の場合は、血小板輸血が有効であるが、現在その供給状況は必ずしも十分とは言えず、緊急時にはさらに入手困難なものとなる。このため、本来の血小板輸血に代わり得る代替物の開発が急務である。救急医療の現場では、時に血小板の輸血のみが唯一の命を繋ぐ救命手段となることも現実に起こり得ると考える。とくに大規模な震災等では大量出血を伴う多発外傷患者の同時大量発生が容易に想像出来る。このような非常事態では輸血用血小板が、例えこれが唯一の救命手段であっても、全く入

手出来ない事態が広範囲において発生することが危惧される。

そこで本研究の目的は、H12(ADP)リポゾームが外傷時などの緊急大量輸血での急性血小板減少を伴う易出血性病態で、血小板輸血に代わり得る効果があるか否かを研究することである。まず我々は、外傷時の血管破綻などによる大量出血とこれに対する大量輸血により生じる、急性の血小板減少を伴う易出血性病態モデルを家兎において作製し、本モデルを用いて、これに肝臓器損傷を作製し肝臓器出血が H12(ADP)リポゾームの前投与により止血制御出来るかを研究した。この結果、H12(ADP)リポゾームの前投与により顕著な止血制御効果とこれによる救命率改善が認められた。しかし、実際の臨床ではほとんどの症例で臓器出血を来した後の、これに対する止血制御を目的に止血剤が投与されるため、H12(ADP)リポゾームの出血後の投与における臓器出血制御効果を検討する必要があると考えられた。今年度は家兎の急性血小板減少モデルを用いて、肝臓器出血を作製した後に、実臨床と同様に臓器損傷部を圧迫し出血を

制御しながら H12(ADP)リポゾームの投与を行い、臓器止血制御効果を検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

NZW ウサギ（日本 SLC, 2.0-2.2 kg）を用いて実験を行った。

2. 急性血小板減少モデルの作製

2.1. 脱血および輸血用ルートの確保

ネンブタールとキシラジンの麻酔下に、一方の大腿動脈に 21G サフロー針にてカニューレーションを行いルート確保し、脱血用と動脈圧測定用とした。次に対側の大腿静脈に 21G サフロー針にて同様にカニューレーションを行いルート確保し、輸液および輸血、薬物投与用とした。

2.2. 脱血および洗浄赤血球輸血

まず、大腿動脈より 12.5 mL/kg の脱血を行い、対側の大腿静脈より等量(12.5 mL/kg)の Lactated Ringer を投与した。脱血した血液を用いて、2.3.に示すように PRP 成分と PPP 成分を分離した後、残った赤血球成分より洗浄赤血球を作製した。続いて、12.5 mL/kg の脱血を大腿動脈より同様に行い、さらに作製した洗浄赤血球を Lactated Ringer (5% albumin)で 12.5 mL/kg に調整した後、静脈内投与を行った。以後、この脱血と洗浄赤血球輸血操作を計 7 回繰り返し、最後は 8 回目の脱血血液から作製した洗浄赤血球の輸血のみを行った。これにより計 8 回の脱血(合計 100 mL/kg)とこれら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）が行われたことになる(Fig. 1)。

2.3. 洗浄赤血球および platelet-rich

plasma(PRP)、platelet-poor plasma (PPP)の採取と作製

大腿動脈より脱血した動脈血を 100×g で 15 分間遠心分離し、上清を PRP として採取した。その後、さらに 500×g で 10 分間遠心分離を行い、上清を PPP として採取した。残った赤血球を含む血球成分を生理食塩水で洗浄し(500×g, 10 分間)、洗浄赤血球として用いた(Fig. 2)。

3. 外傷性臓器損傷による肝臓器出血の作成と損傷部圧迫による出血制御

計 100mL/kg の脱血と等量の洗浄赤血球輸血が終了し、血小板数が $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 程度になったところで、下記の各種検査項目の採血を行った後に開腹し肝臓に直径 5mm の Derma punch を用いて組織損傷を作製した(Fig. 3A, B)。手術用手袋に開けた穴に肝葉をくぐらせ、出血が腹腔内に漏れずに手袋内に貯まるようにした後に Derma punch にて肝損傷を作製した(Fig. 3C, D)。損傷部圧迫止血は、くり抜いた肝損傷部を小児用尿道カテーテルを用いて 5 分間圧迫することで止血した (Fig. 4)。しかしながら、本モデルのような急性血小板減少状態（血小板数が $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 以下）では 5 分間の圧迫による止血効果は全く認められないことをあらかじめ確認している。

4. H12(ADP)リポゾームの投与および PRP、PPP、H12(PBS)リポゾームの投与

肝損傷作成後の臓器出血を確認した後に、バルーンによる損傷部圧迫を5分間行い、この間に H12(ADP)リポゾーム 20 mg/kg を PPP で 15 mL/kg に溶解したものを静脈内投与した (H12(ADP)リポゾーム群, n=10)。対照として、採取した PRP を 15 mL/kg、PPP を 15 mL/kg をそれぞれ H12(ADP)リポゾーム群と同様に投与した群を作製した (PRP 群 n=10, PPP 群 n=10)。また、リポゾームに ADP を内包していない H12(PBS)リポゾームの投与も同様に行った (n=6)。

5. 測定項目

5.1. 動脈圧

大腿動脈に挿入したルートより動脈圧を圧測定装置にて経時的に測定した。

5.2. 血小板数、ヘモグロビン濃度、赤血球数

大腿動脈ルートより、脱血前、50mL 脱血後、75、100、125、150、175、200mL 脱血後、さらに肝損傷作成 20 分後 (バルーン圧迫解除 15 分後) に 0.1 mL 採血し、測定に供した。

5.3. 凝固因子の測定

同様に大腿動脈ルートより、脱血前、血液交換終了後 (肝損傷作製前)、肝損傷作成 20 分後 (バルーン圧迫解除 15 分後) に 0.8 mL を採血し、fibrinogen や Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), antithrombin III (AT III) などの各種凝固因子を測定した。

5.4. 肝損傷部からの臓器出血量

バルーン圧迫の解除から 5 分間と、それに

続く 5 分間の損傷部からの出血量を測定した。

5.5. 肝損傷部出血の止血までの時間

バルーン圧迫の解除後、損傷部からの出血が止血するまでに要した時間を測定した。最低 1 時間までは止血が可能か観察を行い、これを越えた場合は止血不能として閉腹した。

5.6. ソノクロットによる血栓形成能

脱血前と血液交換終了後、肝損傷作成 20 分後 (バルーン圧迫解除 15 分後) に採血し、血栓形成能をソノクロット (Sienco 社, Morrison, CO) を用いて解析した。

C. 研究結果

急性血小板減少家兎での肝臓器出血に対する H12(ADP)リポゾームや PRP、PPP の出血作製後投与の効果

1. 肝損傷部からの臓器出血後の予後

H12(ADP)リポゾームの後投与により 10 例中 6 例を救命し得た (60% survival)。一方、PRP の後投与では 10 例中 5 例を救命し得たに留まり (50% survival)、救命効果はほぼ同等であった。肝出血後に PPP を後投与しても 10 例中 1 例が生存したのみであった (Fig. 5)。また、H12(PBS)リポゾームの投与でも PPP 投与群と同様に 6 例中 1 例が生存したのみであった。

2. 肝損傷部からの臓器出血量

H12(ADP)リポゾーム投与群では肝臓からの臓器出血が PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群と比べて少なく、とくに肝損傷作製から 5 分以内で、その止血効果が顕

著であった(Fig. 6)。肝損傷作製から 5~10 分後の出血量は各群共に減少していたが PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群ではこの間の出血による血圧低下が著しく (Fig. 8)、血圧低下が臓器出血量の減少に影響を及ぼしていると考えられた。

3. 肝損傷部からの臓器出血時間

PPP 投与群ではほとんどの症例で完全な止血が認められなかったが、H12(ADP)リポゾーム投与群では PRP 投与群と同様に、肝損傷作製から 25 分前後でほとんどの症例で止血が認められた(Fig. 7)。H12(PBS)リポゾームの投与でも過半数以上で 30 分以内の止血が認められたが、このうち生存例は 1 例のみであった(Fig. 7)。

4. 動脈圧やヘモグロビン濃度、血小板数、赤血球数

肝臓器出血後に 5 分間の圧迫と H12(ADP)リポゾームを投与することで出血 20 分後の動脈圧低下が回避された(Fig. 7)。PRP の投与でも同様に血圧低下は回避されており、H12(ADP)リポゾームが血小板と同程度の止血効果を有することから、これにより止血制御がなされ血圧低下が起こらなかったと考えられた。一方、PPP や H12(PBS)リポゾームの投与では動脈圧は顕著に低下しており(Fig. 7)、止血制御不能による大量出血で血圧が低下したと考えられた。PPP、H12(PBS)リポゾーム投与の両群ではその後も出血が持続し血圧が低下し、ほとんどの家兔が死に至った。

肝臓器出血後のヘモグロビン濃度の低下も H12(ADP)リポゾーム投与群では PRP 投

与群と同様に出血量が抑制されたため PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群のような低下は認められなかった(Fig. 8A)。ヘマトクリット値もヘモグロビン濃度と同様に H12(ADP)リポゾーム投与群や PRP 投与群では止血制御と共に低下が抑制され、PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群では止血が不能となり大量出血により低下が顕著となった(Fig. 8B)。赤血球数もヘマトクリット値やヘモグロビン濃度と同様で、H12(ADP)リポゾーム投与群や PRP 投与群では止血制御と共に低下が抑制され、PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群では大量出血から重度の低下(貧血)となった (Fig. 8C)。

血小板数は PRP 投与群でのみ高値を呈しており、H12(ADP)リポゾーム投与群では PPP 投与群と同程度に留まっていた(Fig. 8D)。これは H12(ADP)リポゾームが血小板自体を増加させる効果はないものの体内に残った血小板を有効に出血部位に集め、血小板血栓を形成させたことを物語っていると考えられた。

5. 各種凝固因子

肝臓器出血後に H12(ADP)リポゾーム、PRP、PPP、H12(PBS)リポゾームのいずれを投与しても fibrinogen 値は 50 mg/dL 前後と改善(上昇)は認められなかった(Fig. 9A)。Prothrombin time (PT)も、肝臓器出血後の各種薬物投与では明らかな改善を認めず、計測し得ないほど延長していた。APTT も各群共に計測し得ないほど延長していた。AT III 活性は H12(ADP)リポゾーム投与群や

PRP 投与群で、PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群に比し有意に高値であった (Fig. 9B)。

6. H12(ADP)リポゾームの投与が血栓形成能に与える影響

各群の血栓形成能をソノクロットで解析した。Active clotting time は血液凝固が開始されるまでの時間であり血栓形成能の1つの指標であるが、H12(ADP)リポゾーム投与群では PPP 投与群と同様に短縮が認められたのに対し、PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群では明らかに延長していた (Fig. 10A)。血栓形成の速度でもある clot rate も、H12(ADP)リポゾーム投与群でとくに亢進していたが、PPP 投与群や H12(PBS)リポゾーム投与群では低値のままであった (Fig. 10B)。

D. 考察

以前の研究では外傷性の血管破綻による大量出血とこれに対する大量輸血の際に発生する急性の血小板減少を伴う易出血性病態を家兎において作製し、本モデルにおいて肝臓器出血を作製、H12(ADP)リポゾームの出血前投与による止血制御効果を血小板成分を多く含む PRP 投与群や血小板成分を含まない PPP 投与群と比較検討した。その結果、H12(ADP)リポゾームは血小板と同程度の極めて有効な止血効果を有することが明らかになった。今回はさらに実臨床での使用を念頭に、あらかじめ本モデルにおいて肝臓器出血を作製し、この出血に対して damage control surgery を想定した圧迫止血

と共に H12(ADP)リポゾームを投与することで止血制御効果が得られるかを検討した。

今回用いた脱血と洗浄赤血球輸血により作製した家兎の急性血小板減少モデルでは、体重 1.8-2.0 kg の家兎の循環血液量にほぼ相当する 200mL の脱血と、脱血検体から得られた赤血球成分のみを返却輸血することで、血小板のみが $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ と顕著に低下するがヘモグロビン濃度は 7~8 g/dL に留まるモデルが作製出来た。1次血栓(血小板血栓)の形成能を反映する active clotting time の顕著な延長や2次血栓(フィブリン血栓)の形成能を反映する clot rate の顕著な低下も認められ、血栓形成能の増悪が示唆されている。本モデルでは凝固因子も血小板同様、著明に低下したことから、本モデルにおける易出血性病態の発現には血小板低下のみならず、凝固因子の低下も関与していることが考えられた。そこで、H12(ADP)リポゾーム投与時には凝固因子を含む PPP もあわせて投与した。以前の検討からこれにより凝固因子がある程度改善することが分かっている。しかし、今回は各種薬剤の出血後投与であるため、出血後は凝固因子が消費されるため、fibrinogen, PT, APTT, AT III の各因子の改善はいずれの群でも認められなかった (Fig. 9)。

本実験中に採取した PRP は従来の検討から十分な止血制御機能を有していることを確認しており、これら PRP を投与することで、有効な血小板輸血が行われたと考えることが出来る。また、本モデルでは洗浄赤血球のみの輸血としたが、救急医療の現場

では多くの場合、新鮮凍結血漿の大量投与により、凝固成分の補充が通常は行われている。採取した PPP を投与することで、このような凝固成分の補充も可能であり、臨床に即したモデルが作製し得たと考えられる。PPP には血小板成分が含まれていないことを確認している。

このような外科的な急性の血小板減少による易出血性病態モデルにおいて、肝臓に外傷性の臓器損傷を作製したところ、血小板成分を含まない PPP の出血後投与では臓器出血が止血制御出来ずにほとんどが死亡した。これは PPP 投与によりある程度の凝固因子を補充しても、血小板の補充がなければ止血制御が出来ず、救命出来なかったことを示唆させる。本モデルにおいて、PRP として血小板を輸血投与することで臓器出血後の投与であっても、50%の救命率が得られた。PRP の前投与では全例が救命出来ていたが、50%の救命に留まったのは、いかに血小板減少状態での大量臓器出血の制御が困難かを物語っているとも言え、我々の臨床経験とも一致する印象を受ける。注目すべきは H12(ADP)リポゾームを出血後に投与することでも血小板輸血と同等、もしくはそれ以上の止血制御効果が得られたことである。とくに救命率は 60%と PRP 投与群の 50%を凌ぐ救命効果が認められた。また、肝臓器出血後の投与であるにもかかわらず、H12(ADP)リポゾームの投与によりソノクロットで評価した血液凝固能が改善したことは(Fig. 10A, B)、今後想定される臨床現場での H12(ADP)リポゾームの止血制

御効果を考える上で非常に興味深い。PPP 投与のように例え凝固因子を投与して fibrinogen や AT III 濃度を上げて、血小板がなければ 1 次血栓が形成されないため、引き続き起こる fibrin による 2 次血栓も形成されないことは、血小板減少時の止血制御を考える上で示唆に富む所見である。すなわち実際の臨床現場において、血小板低下を伴う易出血性病態を呈する症例に対し、いくら凝固因子を新鮮凍結血漿などで補充しても血小板を輸血しなければ効果的な止血制御が出来ないことを示唆させる。

しかし、H12(ADP)リポゾームや血小板投与による救命効果は 50-60%にしか満たず、我々としては決して満足の行く効果ではない。これらの症例での死因の 1 つとしてヘモグロビン量やヘマトクリット、赤血球数からみても重度の貧血が挙げられる。赤血球輸血をさらに積極的に行った上で H12(ADP)リポゾームを投与すると、救命効果がさらに高まる可能性が考えられ、来年度以降にこれを検討したい。

東日本大震災では広範な地域が被災したため交通網の寸断は深刻なものとなり、医療用機材や医薬品の供給に多大な支障を来した。一方、このような大規模震災では救助を求める傷病者が同時大量発生することも現実のものとなり、かつ傷病者の救助は寸断され麻痺した交通網の中で一刻を争うものであった。また、人口集中地帯における首都直下地震や東海地震は、発生の有無を問うのではなく今や発生時期が問題となっている段階で (if ではなく when)、その

対策は急務である。阪神淡路大震災で遭遇したような建物倒壊や事故などによる外傷患者のより深刻な大量発生が懸念される。中でも外傷性の大量出血を来たした患者には迅速な輸血が必要となってくるが、前述のように保存血輸血のみでは血小板がないため出血は制御出来ず、止血救命には外科処置と共に血小板輸血が必要となってくる。しかし、輸血用血小板は保存期限が1週間程度と短く大量保存が不可能なため、大震災時には輸血用血小板の極端な不足が懸念される。H12(ADP)リポソームは生体由来の材料を全く用いず作製出来るため、血液型をあわせる必要がなく、さらにエイズや肝炎など血液感染症の危険もなく、また本来の血小板のように振とうしながら厳重な温度管理をして保存する必要もなく静置だけで血小板のほぼ25倍の6カ月間は保存出来、大量生産も可能である。H12(ADP)リポソームは、出血部位に付着した活性化血小板に結合し、そこで血中にわずかに残った血小板を集めて血栓を効率よく形成し止血するため、出血部位以外では血栓を作らず、血栓症の副作用はないと考えられる。このような顕著な止血効果を持つH12(ADP)リポソームは大震災などの際に大量に発生であろう大出血を来たした患者に対する止血救命治療に大いに役立つと期待され、国民の安心・安全のために寄与出来るものと考えている。

D. 結論

1. 家兎において、脱血と洗浄赤血球輸血を

繰り返すことで、急性の血小板減少性の易出血性病態モデルを作製した。

2. 本モデルを作製後、肝臓に外傷性の臓器損傷を作製したところ、臓器からの出血により死に至る致死性の血小板減少性易出血性病態モデルとなり得ることが確認された。

3. 本モデルにおいて肝臓に外傷性臓器損傷による臓器出血を作製後に圧迫止血と共にH12(ADP)リポソームを投与すると、臓器出血に対する止血救命効果が得られた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

(原著)

1. Ono S, Kimura A, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Yamamoto J, Hase K, Saitoh D. Removal of increased circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery* 153: 262-271, 2013.
2. Sato A, Nakashima H, Kinoshita M, Nakashima M, Ogawa Y, Shono S, Ikarashi M, Seki S: The effect of synthetic C-reactive protein on the in vitro immune response of human PBMCs stimulated with bacterial reagents. *Inflammation* (in press)
3. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L,

- Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin M. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis. *Photochem. Photobiol.* (in press)
4. Nakashima H, Ogawa Y, Shono S, Kinoshita M, Nakashima M, Sato A, Ikarashi M, Seki S: Activation of CD11b⁺ Kupffer cells/macrophages as a common cause for exacerbation of TNF/Fas-ligand-dependent hepatitis in hypercholesterolemic mice. *PLoS ONE*
 5. Okamura, Y., Kabata, K., Kinoshita, M., Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Ohtsubo S, Saitoh, D., and Takeoka, S. Fragmentation of Poly(lactic acid) Nanosheets and Their Patchwork Treatment for Burn Wounds. *Adv. Mater.* (in press)
 6. Yano H, Kinoshita M, Fujino K, Nakashima M, Yamamoto Y, Miyazaki H, Hamada K, Iwaya K, Saitoh D, Seki S, Tanaka Y. Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice, thereby improving surgical site infection with *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 80; 4409-4416, 2012.
 7. Aoki S, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Iwaya K, Takeoka S, Saitoh D. Application of poly-L-lactic acid nanosheet as a material for wound dressing. *Plast Reconstr Surg* (in press)
 8. Otani N, Kinoshita M, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Saitoh D, Hagsawa K, Nawashiro H, Shima K. Novel therapeutic usage of polysaccharide nanosheets for aracinoid plasty and reinforcement of venous tensile strength in rat microneurosurgery. *J. Clin. Neurosci.* 20; 301-305, 2013.
 9. Nishikawa K, Hagsawa K, Kinoshita M, Shono S, Katsuno S, Doi M, Yanagawa R, Suzuki H, Iwaya K, Saitoh H, Sakamoto T, Seki S, Takeoka S, Handa M. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. *J Thromb Haemost* 10; 2137-2148, 2012.
 10. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Nemoto K, Shinomiya N, Seki S, Hamblin M. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis *via* neutrophil accumulation. *PLoS One*
 11. Nogami, Y., Takase, B., Kinoshita, M., Shono, S., Kaneda, S., Tanaka, Y., Kishimoto, S., Hattori, H., Ishihara, M. Liposome-encapsulated hemoglobin attenuates cardiac dysfunction and sympathetic activity during

- hypohemoglobinemic shock. *Shock* 38; 159-164, 2012.
12. Saito A, Miyazaki H, Fujie T, Ohtsubo S, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S. Therapeutic efficacy of an antibiotic-loaded nanosheet in a murine burn-wound infection model. *Acta Biomater* 8; 2932-2940, 2012.
 13. Miyazaki H, Kinoshita M, Saito A, Fujie T, Kabata K, Hara E, Ono S, Takeoka S, Saitoh D. An ultra-thin poly(L-lactic acid) nanosheet as a burn-wound dressing for protection against bacterial infection. *Wound Repair Regen* 20; 573-579, 2012.
 14. Kimura A, Ono S, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Miyazaki H, Kinoshita M, Hatsuse K, Saitoh D, Hase K, Yamamoto J. The postoperative serum interleukin-15 concentration correlates with organ dysfunction and the prognosis of septic patients following emergency gastrointestinal surgery. *J Surg Res* 175; e83-e88, 2012.
 15. Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, Tsujimoto H, Takahata, R., Miyazaki H., Saitoh D, Seki S, Hase K. Neutralization of IL-10 restores the down-regulation of IL-18 receptor on NK cells and IFN- γ production in septic mice, thus leading to an improved survival. *Shock* 37; 177-82, 2012.
 16. Nakashima M, Kinoshita M, Nakashima H, Habu Y, Miyazaki H, Hiroi S, Nakanishi K, Seki S. Characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity. *J. Leukocyte. Biol.* 91; 537-546, 2012.
 17. Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata, R., Miyazaki H., Saitoh D, Hase K. Neutralization of interleukin-10 or tumor growing factor-beta decreases the percentages of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thus leading to an improved survival. *Surgery* 151; 313-22, 2012.
 18. Maemura T, Kinoshita M, Shin M, Miyazaki H, Tsujimoto H, Ono S, Hase K, Saitoh D. Assessment of a Tissue-Engineered Gastric Wall Patch in a Rat Model. *Artif. Organs* 36; 409-17, 2012.
 19. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin M, Dai T, Huang L, Morimoto Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem. Photobiol.* 88; 227-32, 2012.
 20. 矢野秀和、藤野啓一、木下 学、山崎民大、小林裕幸、曾根原亘、田中祐司。メッシュを用いた鼠径ヘルニア手術に予防的抗菌薬投与は必要か。防衛医科大学校雑誌 37;280-286, 2012.
- (総説)
1. Maemura T, Shin M, Kinoshita M: Tissue Engineering of the Stomach. *J Surg Res*

- (in press)
2. Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Seki S: Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J. Leukocyte. Biol.* (in press)
 3. Seki S, Nakashima H, Kinoshita M: The Liver as a Pivotal Innate Immune Organ. *Immuno-gastroenterology* 1; 76-89, 2012.
 4. 木下 学: プロカルシトニン. *外科と代謝・栄養* 46: 15-18, 2012.
 5. 田中優砂光、吉原愛雄、守本祐司、木下学、Hamblin MR、根本孝一. 光線力学療法(PDT)を用いた骨関節手術後感染の予防戦略. *整形災害外科* 55;75-79, 2012.
 6. 木下 学、野上弥志郎、庄野聡、西川可穂子、萩沢康介、高瀬凡平. 人工血小板や人工赤血球を用いた出血性ショック治療. *侵襲と免疫*. 21; 48-52, 2012.
 7. 田中優砂光、守本祐司、木下 学、吉原愛雄、四ノ宮成祥、関 修司、齋藤大蔵、宮崎裕美、Hamblin MR、根本孝一. 光線力学療法(PDT)の局所感染症への応用—化膿性関節炎モデルを用いた実験的研究—. *防衛医科大学校学術集会賞受賞記念論文. 防衛医科大学校雑誌* 37;243-256, 2012.
 8. 田中優砂光、木下 学、吉原愛雄、四ノ宮成祥、関 修司、根本孝一、守本祐司. 光線力学療法(PDT)の生体防御能賦活効果—局所細菌感染症の治療への応用—. *光クライアランス*. 5; 42-45, 2012.
 9. 西山靖将、木下 学、染田英利、柳川鍊平、萩沢康介、妻鳥元太郎. 危機管理の視点からみた輸血用血液準備の重要性と人工血液の開発. *人工血液* 20; 58-64, 2012.
 10. 佐藤厚志、木下 学、中島弘幸、中島正裕、五十嵐正巳、関 修司. 合成 CRP のヒト末梢血単核球に対する炎症性サイトカイン産生抑制効果と抗腫瘍活性増強効果. *外科と代謝・栄養* 47; 31-39, 2013.
 11. 小野 聡、平木修一、辻本広紀、木下 学、齋藤大蔵. 外科侵襲による immunoparalysis とその制御. *侵襲と免疫*. 22; 7-18, 2013.
- G.学会発表
1. 西川可穂子、木下 学、萩沢康介、土井麻実、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血小板減少病態時の臓器外傷部位における止血制御の有効性(出血後投与による検討). 第 27 回日本 shock 学会総会 2012, 東京.(日本 Shock 学会雑誌, p76: 27, 2012)
 2. 木下 学、小野 聡、宮崎裕美、中島正裕、中島弘幸、齋藤大蔵、関 修司：外科侵襲後の複合免疫不全による易感染病態と IL-18 を用いた免疫賦活化対策. 第 27 回日本 shock 学会総会 (シンポジ

- ウム II-5) 2012, 東京.(日本 Shock 学会雑誌, p39: 27, 2012)
3. 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、土井麻実、武岡真司、齋藤大蔵、関 修司、西田育弘：大量出血後輸液による血小板減少状態下で進行する肝外傷出血に対して H12(ADP)liposome 同時投与は血小板投与と同等の止血および救命効果を有する。第 19 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-4）2012, 札幌.(人工血液 p19: 20 2012)
 4. 土井麻実、木下 学、西川可穂子、萩沢康介、柳川錬平、半田 誠、池田康夫、武岡真司：血小板減少病態時における H12(ADP)liposome の止血能に果たす H12 ドデカペプチドの役割について(出血前投与による検討) . 第 19 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-4）2012, 札幌.(人工血液 p18: 20 2012)
 5. 木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川錬平、西山靖将、半田 誠、関 修司：血小板代替物 H12(ADP)liposome 開発の必要性—大規模震災時への対策の 1 つとして—。第 19 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-4）2012, 札幌.(人工血液 p20: 20 2012)
 6. 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、西田育弘、関 修司、齋藤大蔵：人工血小板を用いた重症外傷での止血制御。第 90 回日本生理学会（シンポジウム 3 重度外傷と免疫・生理学—基礎から臨床まで—。2013, 東京（J. Physiol. Sciences. 63; S27, 2013）
 7. 木下 学、関 修司：重度外傷や熱傷に続発する複合免疫不全とその対策。第 90 回日本生理学会（シンポジウム 3 重度外傷と免疫・生理学—基礎から臨床まで—。2013, 東京（J. Physiol. Sciences. 63; S27, 2013）
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

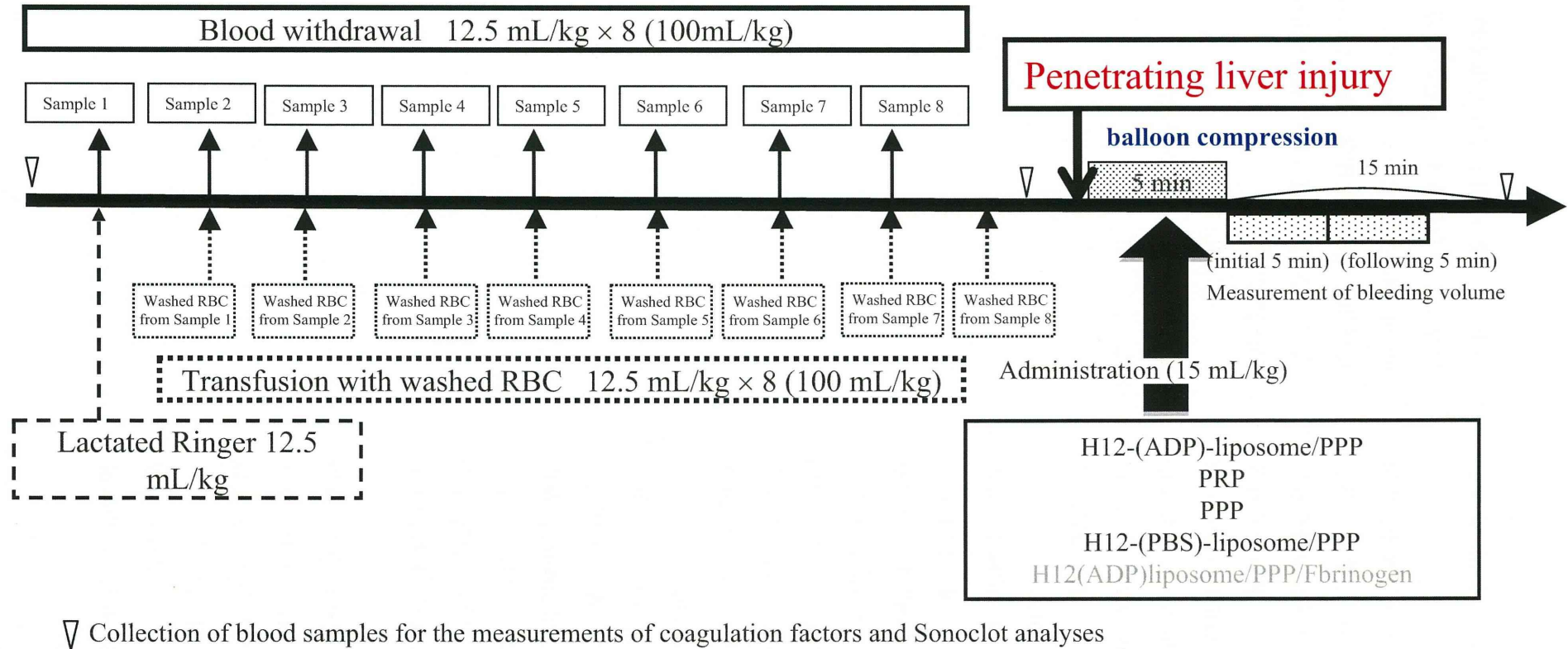


Fig. 1. Experimental design of blood withdrawal/transfusion followed by transfusion of H12-(ADP)-liposome after liver injury.

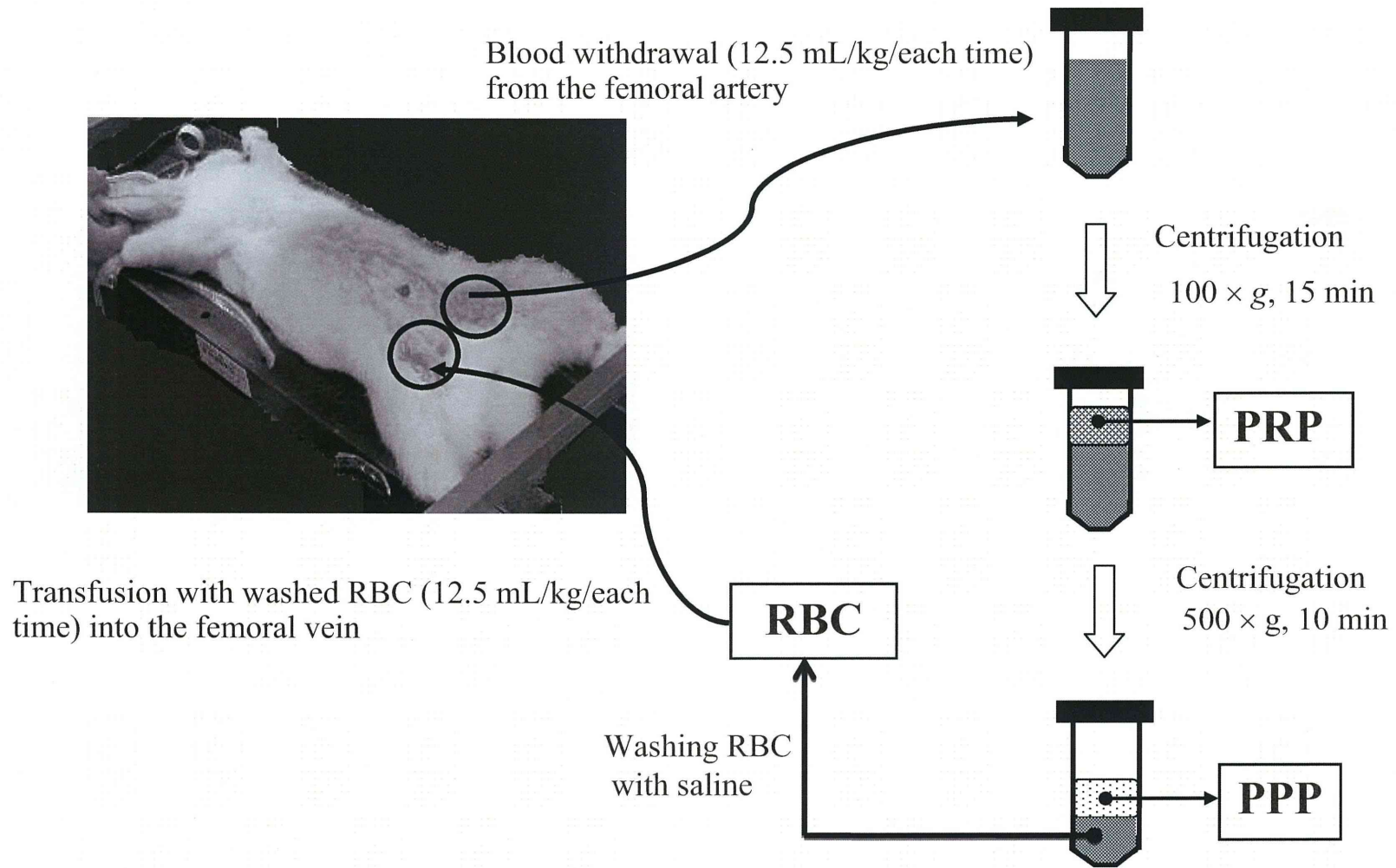
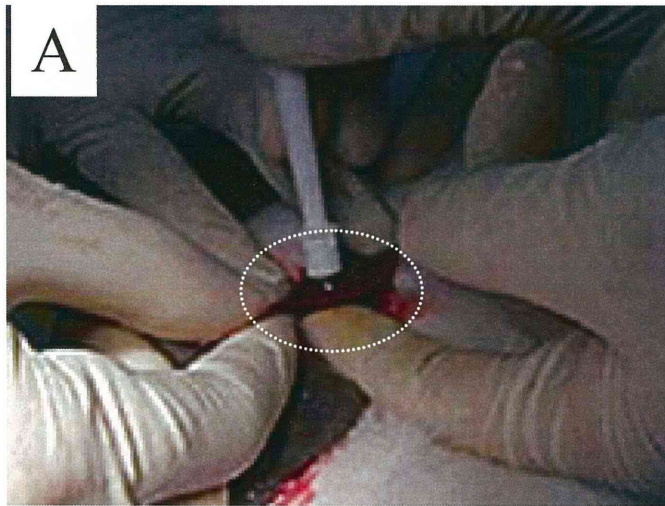
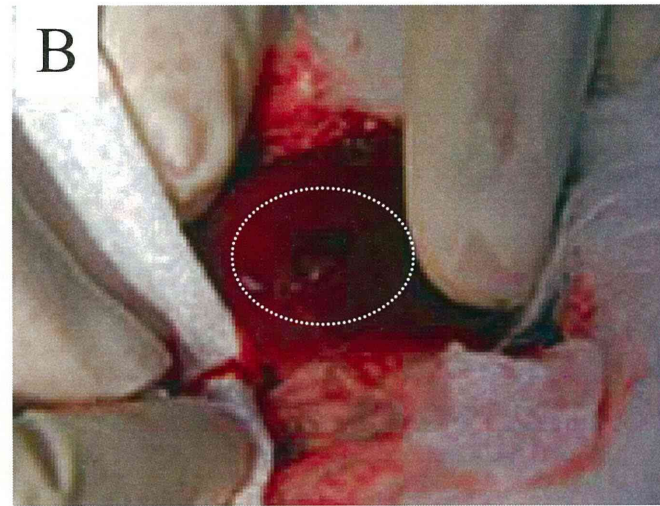


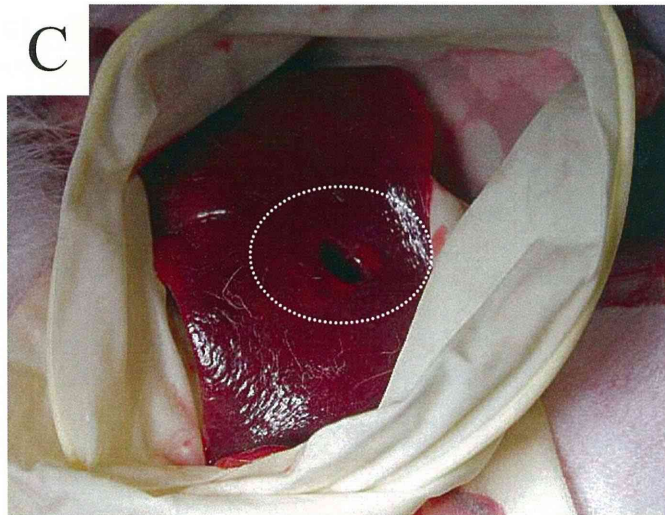
Fig. 2. Scheme of blood withdrawal from rabbits; preparations of PRP, PPP, and washed RBC, and transfusion of washed RBC into rabbits.



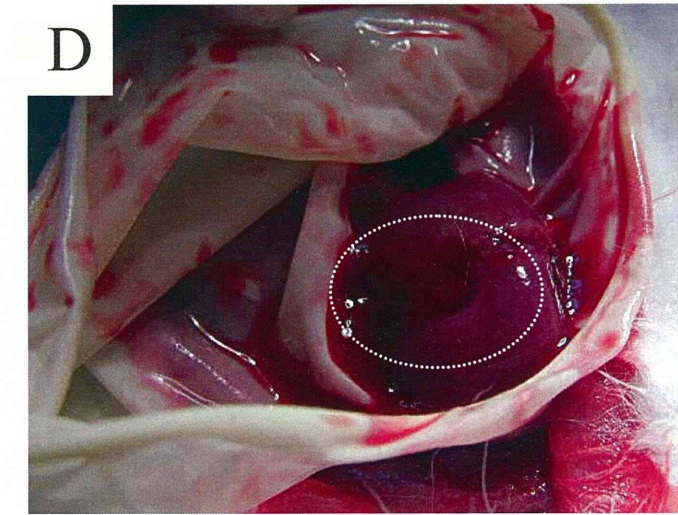
Penetrating liver injury



Liver hemorrhage (immediately after injury)

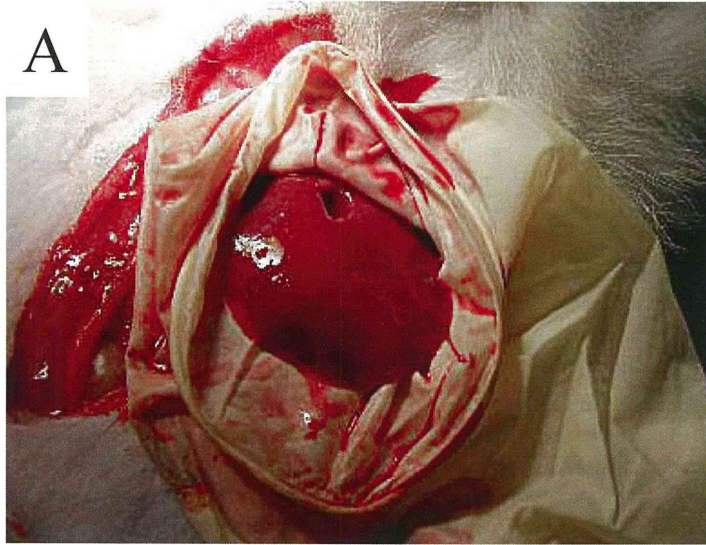


H12-(ADP)-liposomes/PPP (at 10 min)

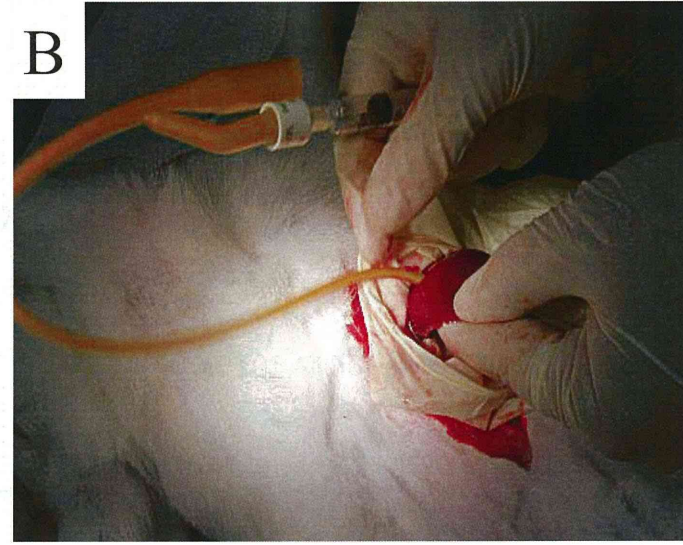


PPP (at 10 min)

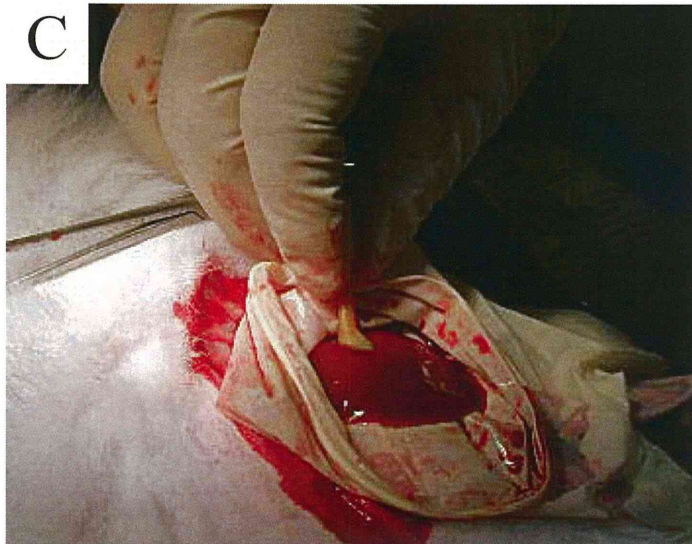
Fig. 3. Non-compressible liver hemorrhage in thrombocytopenic rabbits. (A) Penetrating liver injury using DermaPunch. (B) Liver hemorrhage from the injured site immediately after injury. Liver hemorrhage in the H12-(ADP)-liposomes/PPP-transfused (C) or PPP-transfused (D) rabbits 10 min after injury. Representative data with similar results from ten rabbits in H12-(ADP)-liposomes/PPP or PPP group are shown (C, D).



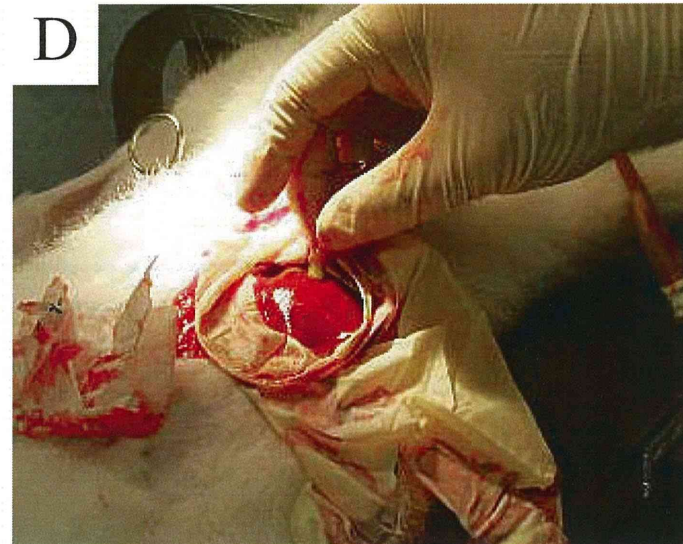
Liver bleeding from the penetrating liver injury



Hemostasis by balloon compression (setting in a lesion)



Hemostasis by balloon compression (balloon clamping)



Hemostasis by balloon compression (balloon declamping)

Fig. 4. Hemostasis by balloon compression. (A) Penetrating liver injury site before hemostasis. (B-D) Hemostasis of penetrating liver injury using balloon compression of indwelling urethral catheter.