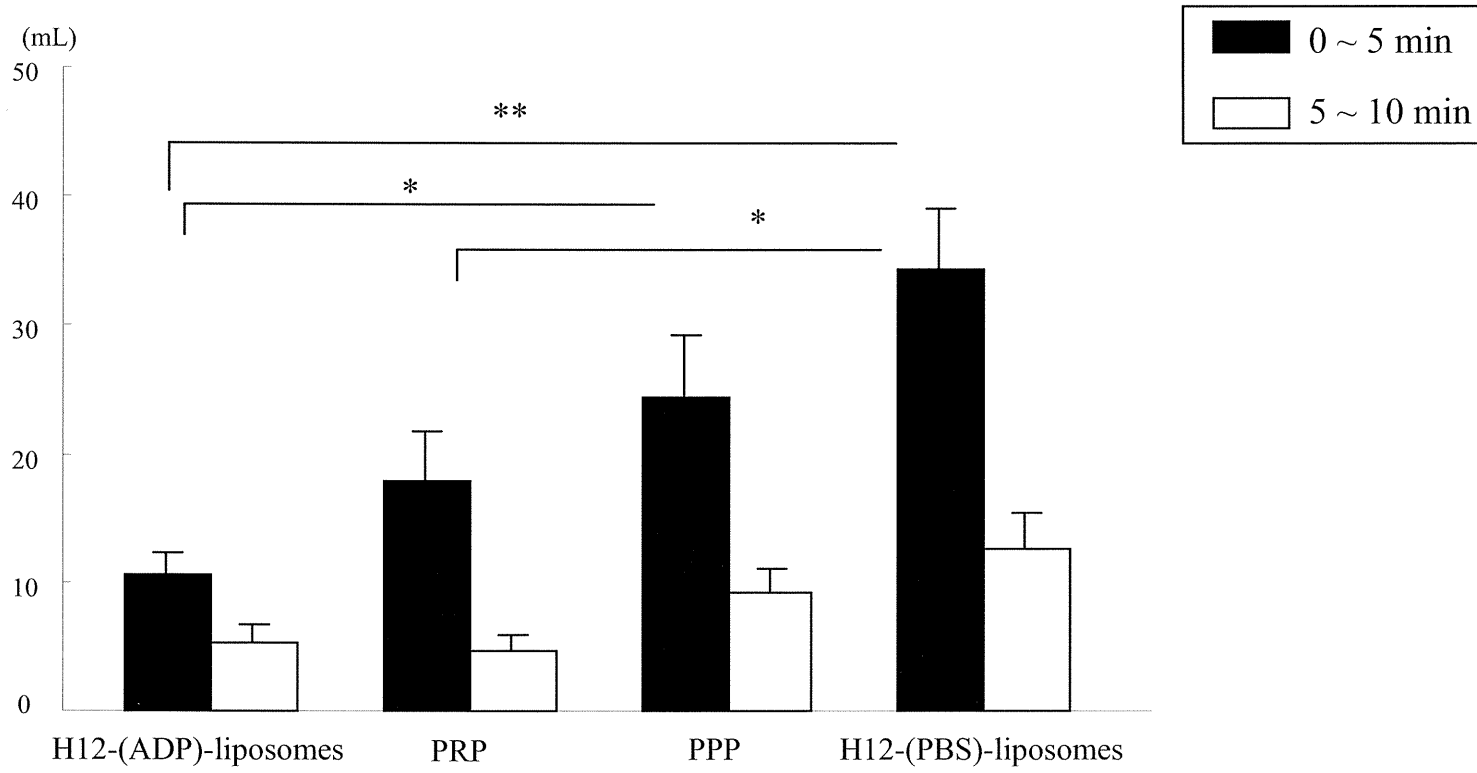
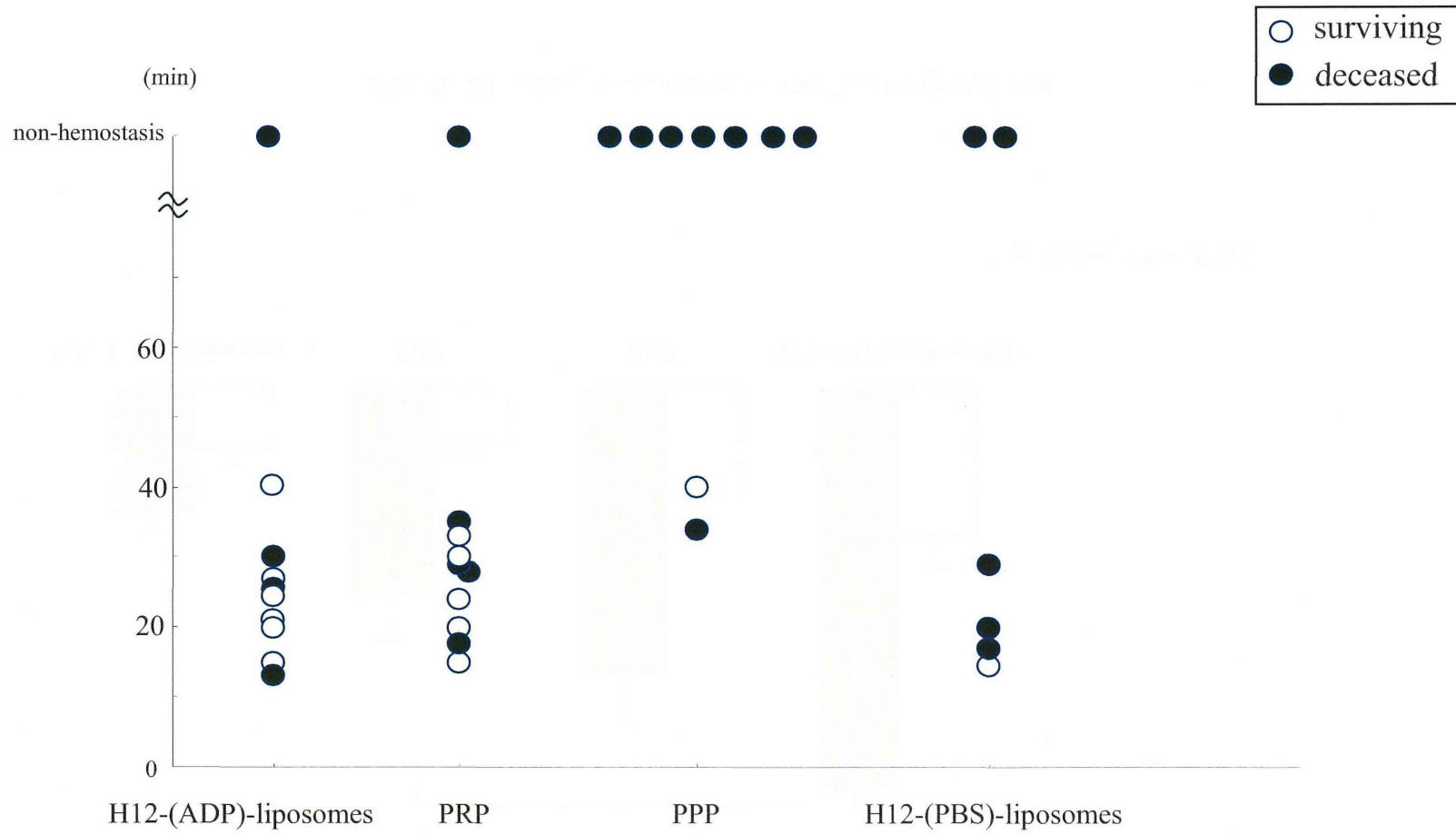


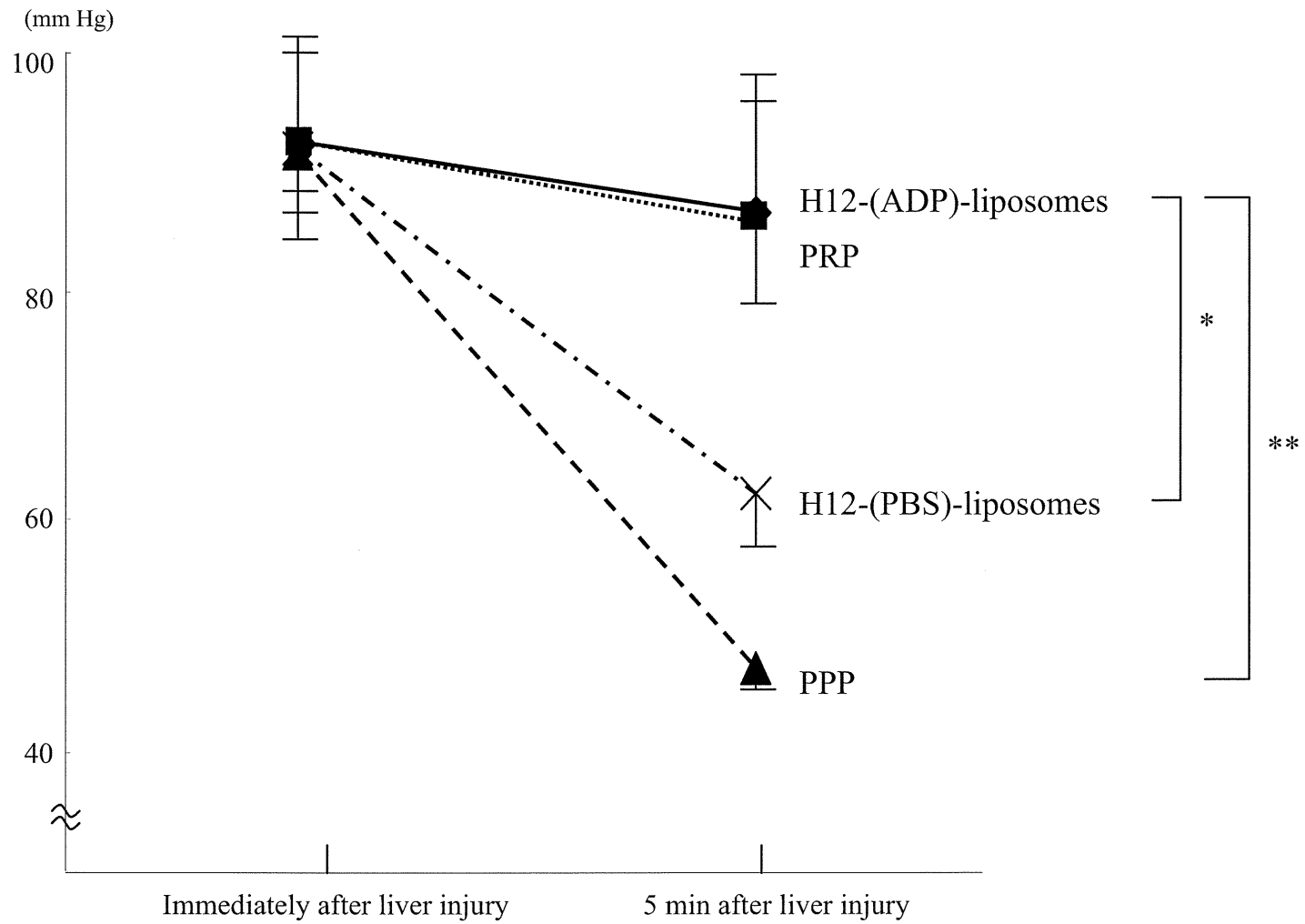
**Fig. 5.** Survivals after penetrating liver injury in acute thrombocytopenic rabbits



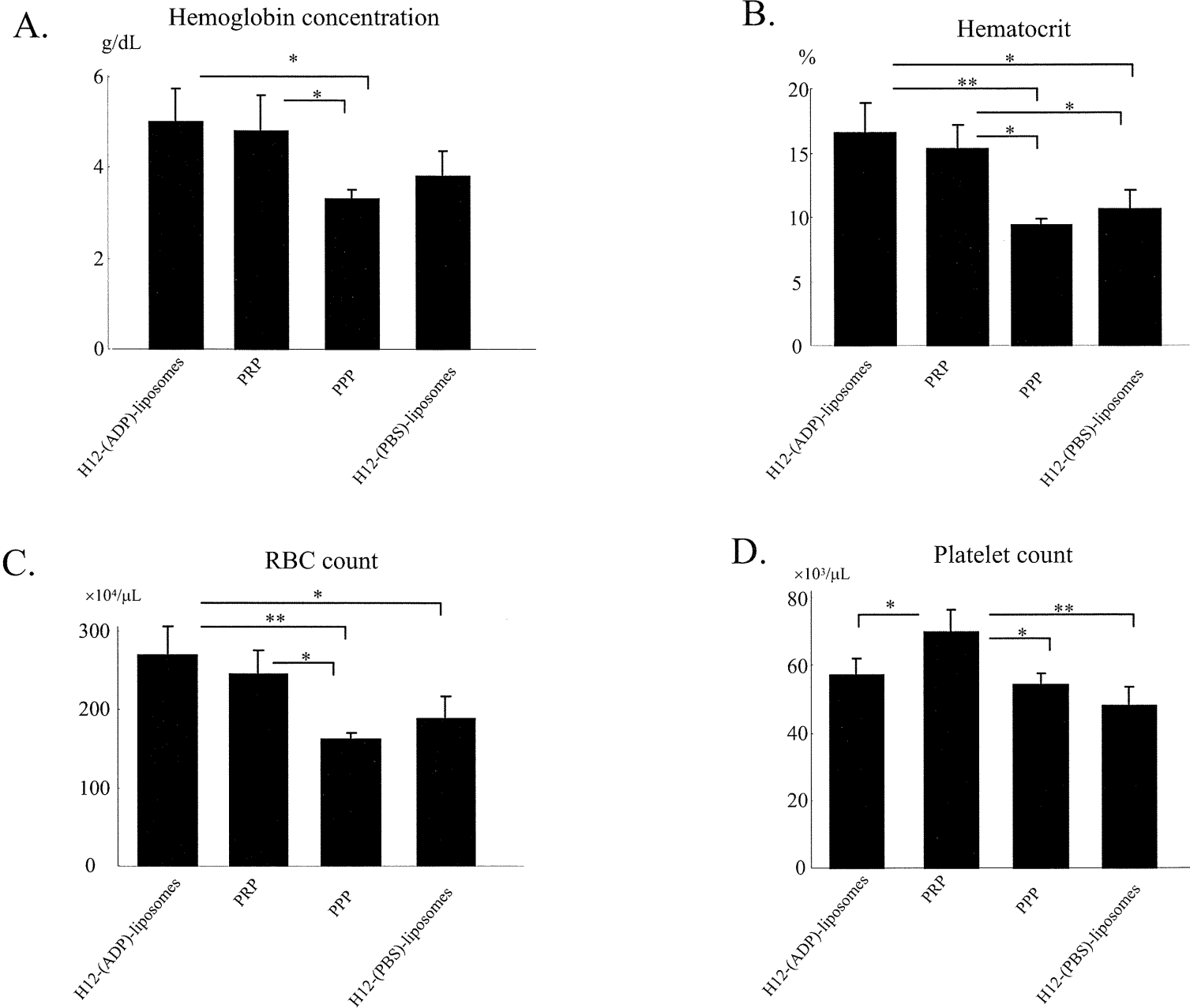
**Fig. 6.** Bleeding volume from the liver injured site



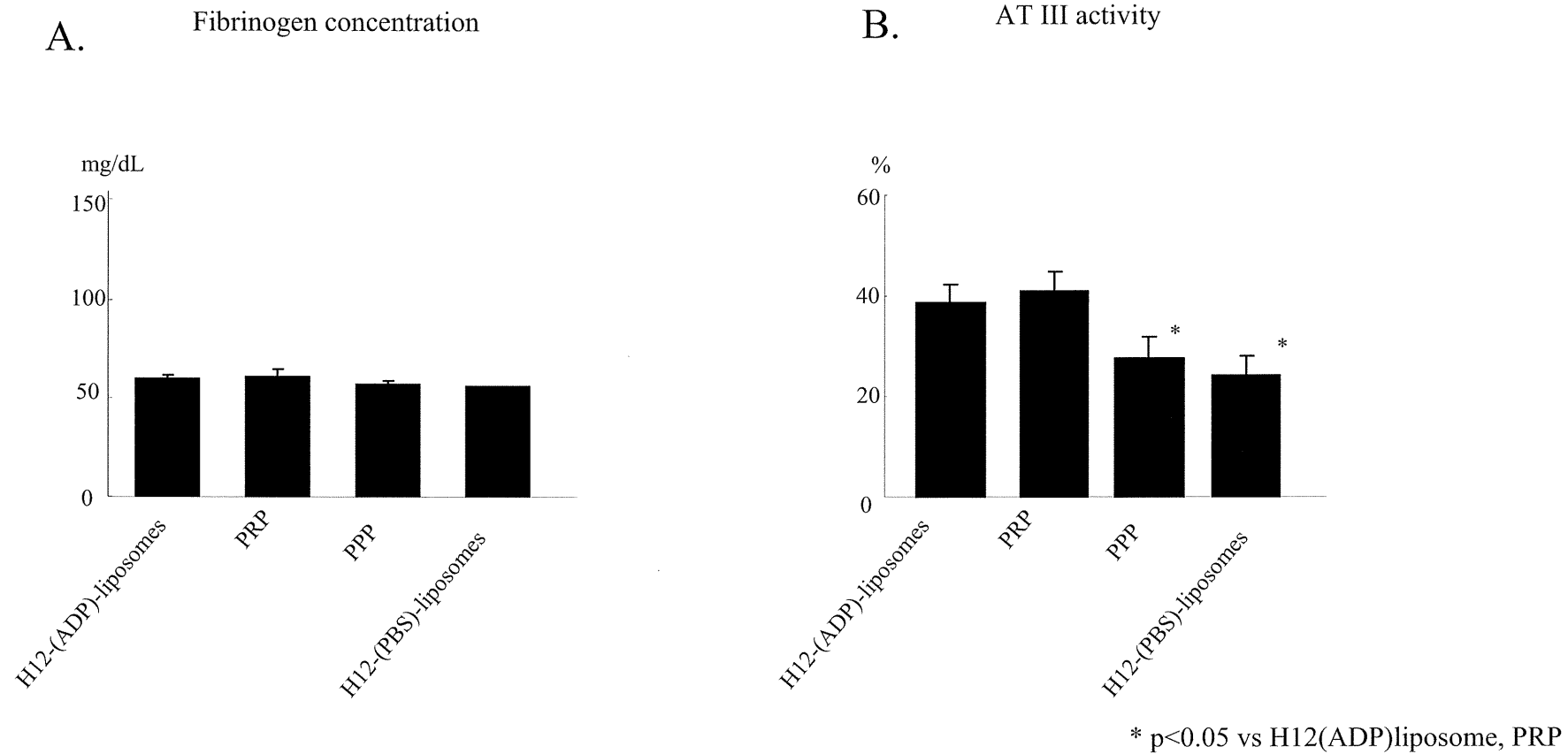
**Fig. 7.** Bleeding time from the liver injured site



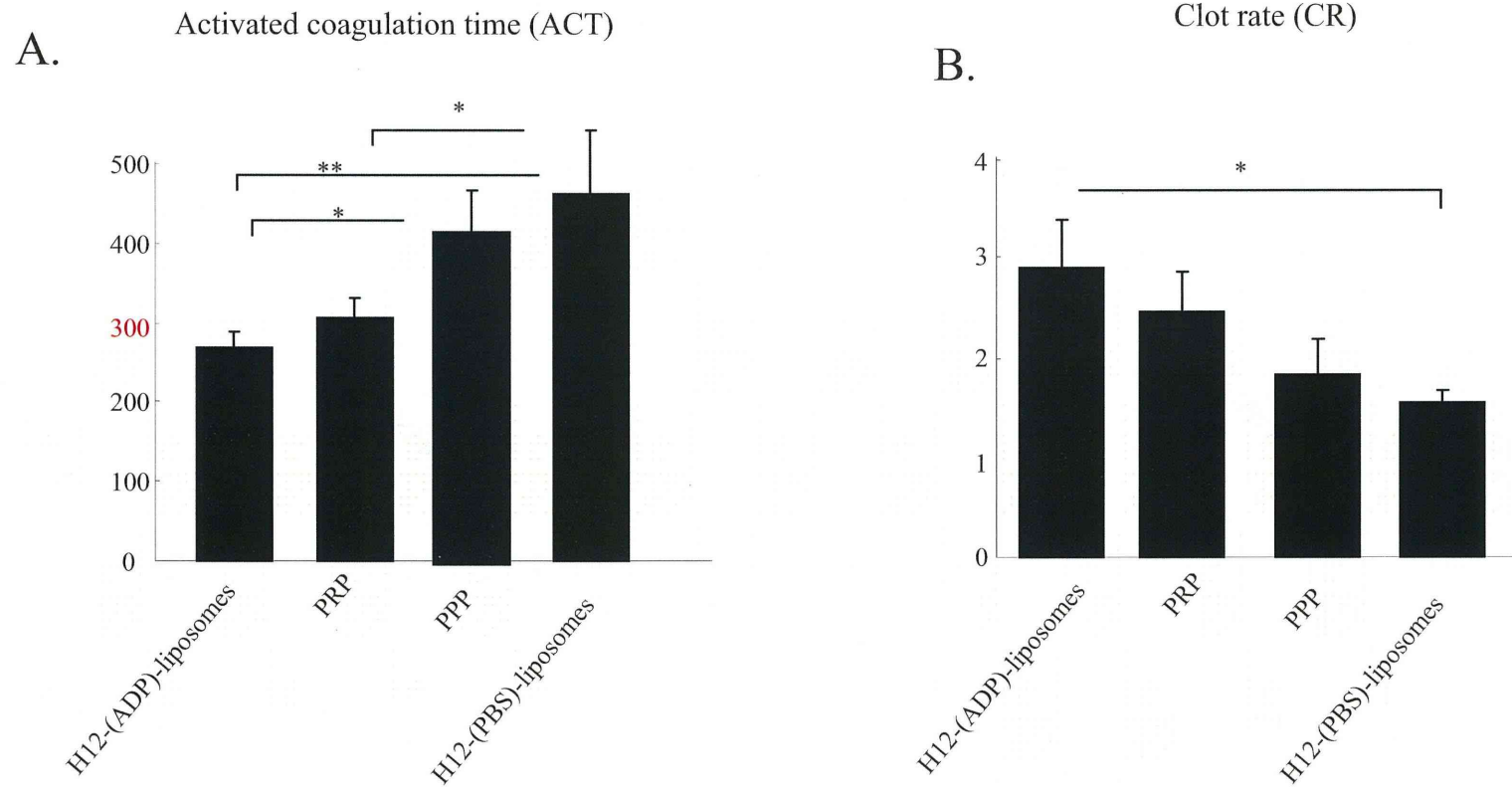
**Fig. 8.** Change in mean arterial blood pressure before and after liver injury



**Fig. 8.** Hematologic parameters 25 min after liver injury



**Fig. 9.** Analyses of coagulation factors 25 min after liver injury



**Fig. 10.** Analyses of whole blood coagulation activities 25 min after liver injury

分担課題：H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

主任研究者 丸山 徹 熊本大学生命科学研究部 医療薬剤学分野 教授

研究要旨

これまでに、健常マウス、健常ラット及び健常ウサギにおけるH12 (ADP) liposomeの構成成分別の体内動態特性やH12 (ADP) liposomeの適用疾患候補の一つである薬剤誘発血小板減少症における体内動態評価をブスルファン誘発血小板減少症モデルラットにおけるH12 (ADP) liposomeの体内動態特性に明らかにしてきた。しかしながら、これらの検討の体内動態解析結果は解析ソフト「MULTI」を用いた2-コンパートメントモデル解析により報告してきたが、この解析方法では"解析モデルの固定化"などのバイアスがかかるため、non-コンパートメントモデルでの解析が望ましいと考えられる。そこで、本研究では、更なる血小板代替物 H12 (ADP) liposomeの体内動態特性に関する基盤情報を構築すべく、健常マウス、ラット及びウサギにおける体内動態解析結果をnon-コンパートメントモデルにより再解析を行った。加えて、H12 (ADP) liposomeの有力な適用疾患候補の一つである大量出血時の易出血性病態時における体内動態解析を行うために大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製を試み、そのモデル評価も行った。

A. 研究目的

これまでに我々は、以下の3つの項目について明らかにし、H12 (ADP) liposomeの体内動態特性に関する基盤情報を構築してきた。

(i) H12 (ADP) liposomeの脂質膜を構成するコレステロール及び内包されたADPをそれぞれ $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ で標識した $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 標識H12 (ADP) liposomeを用いて、血漿中濃度、分布、代謝及び排泄経路を構成成分別に明らかにした。

(ii) 健常マウス、健常ラット及び健常ウサギにおける体内動態（血漿中濃度）を評価し、アロメトリック式を用いてヒトへの外挿を行い、H12 (ADP) liposomeのヒトでの血中滞留性の予測を行った。

(iii) H12 (ADP) liposomeの適用疾患候補の一つである薬剤誘発血小板減少症における体内動態評価をブスルファン誘発血小板減少症モデルラ

ットに $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposomeを投与し明らかにした。

上記した平成23年度までの体内動態解析結果は解析ソフト「MULTI」を用いた2-コンパートメントモデル解析による報告であった。しかしながら、この解析方法では"解析モデルの固定化"などのバイアスがかかるため、近年の体内動態解析はnon-コンパートメントモデルでの解析が主流となってきている。そこで、より一層H12 (ADP) liposomeの正確な体内動態情報を構築するために、これまでの体内動態結果（血漿中濃度）をnon-コンパートメントモデルで再解析する必要があると考えられる。

同時に、H12 (ADP) liposomeは幅広い血小板減少症に対しての適応が期待されるため、薬剤誘発血小板減少症以外の血小板減少症での体内動態特性の解明も必要と考えられる。これまでに



H12 (ADP) liposomeは大量出血時の易出血性病態時において高い薬理効果を発揮することが報告されている。そこで、H12 (ADP) liposomeの有効な適用疾患候補の一つである大量出血時の易出血性病態時における体内動態解析はH12 (ADP) liposomeの体内動態特性に関する重要な基盤情報になると考えられる。

そこで今年度は、平成23年度に報告を行った健常マウス、ラット及びウサギにおける体内動態をnon-コンパートメントモデルでの再解析を行った。また、適用疾患の一つである大量出血時の易出血性病態におけるH12 (ADP) liposomeの体内動態を行うために大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 動物

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (6週齢、200-220 g) は九動より購入した。すべての動物は1週間の予備飼育後、実験に使用した。

### 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、熊本大学実験動物倫理委員会のもとに、実験を施行した。

### 3. 大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製

#### (方法 1)

SD ラットに非絶食、ペントバルビタール麻酔下で、左右の大腿静脈にポリエチレンチューブ (PE-50) を挿入し、脱血、輸血用とした。まず、全血液量 (56 mL/kg) の 25%の脱血を行い、対側の大腿静脈より同量の 12.5%乳酸リンゲル液を投与した。脱血した血液は 100×g で 15 分間遠心分離し、血小板を分離した。残った血球層を生理食塩水で

メスアップし、赤血球液とした。その後、25%の脱血と赤血球液の静脈内投与を 3 回繰り返した。

#### (方法 2)

SD ラットに非絶食、ペントバルビタール麻酔下で、左右の大腿静脈にポリエチレンチューブ (PE-50) を挿入し、脱血、輸血用とした。まず、全血液量 (56 mL/kg) の 30%の脱血を行い、対側の大腿静脈より同量の 12.5%乳酸リンゲル液を投与した。脱血した血液は 100×g で 15 分間遠心分離し、血小板を分離した。残った血球層を生理食塩水でメスアップし、赤血球液とした。その後、30%の脱血と赤血球液の静脈内投与を 3 回繰り返した。

## 4. 血球パラメータの測定

規定時間に約 500  $\mu$ L 採血を行い、血球計数装置 (KX-21NV, シスメックス) により血球パラメータを測定した。

## 5. 解析

モーメント解析プログラム (Microsoft Excel) を用い、non-コンパートメント解析を行った。また、体内動態実験結果は平成 23 年度報告した結果を用いた。

## C. 結果

### 1. 健常マウス、ラット及びウサギにおける体内動態結果の non-コンパートメントモデルでの再解析

モーメント解析プログラム (Microsoft Excel) を用い、ラットに 10, 20, 40 mg lipid/kg の  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome を投与した際の血漿中濃度推移について non-コンパートメントで再解析を行った。その結果、2-コンパートメント解析時と比較して、すべての投与量で半減期の短縮、クリアランスの上昇が確認された (Table 1)。

同様に、健常マウス及びウサギにおける体内

**Table 1**

**The pharmacokinetic parameters of inner ADP ([8-<sup>14</sup>C]ADP) and outer lipids membranes ([1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol) derived from <sup>3</sup>H and <sup>14</sup>C radiolabeled H12-(ADP)-liposomes after an intravenous injection at a dose of 10, 20 and 40 mg lipids/kg to rats.**

t<sub>1/2</sub>: half-life, MRT: mean residence time, AUC: area under the concentration-time curve, CL: clearance, V<sub>dss</sub>: distribution volume

	10 mg lipid/kg		20 mg lipid/kg		40 mg lipid/kg	
	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C	<sup>3</sup> H	<sup>14</sup> C
t <sub>1/2</sub> (hr)	8.18 ± 0.77	8.21 ± 1.01	7.48 ± 0.56	7.63 ± 0.82	6.34 ± 0.53	7.94 ± 1.10
MRT (hr)	10.2 ± 1.18	10.4 ± 1.46	9.20 ± 0.51	10.1 ± 1.00	7.65 ± 0.27	10.7 ± 0.97
AUC (hr · % of dose/mL)	58.4 ± 6.45	54.2 ± 10.1	54.0 ± 1.97	67.8 ± 3.86	56.0 ± 1.94	84.4 ± 5.68
CL (mL/hr)	1.73 ± 0.18	1.89 ± 0.32	1.85 ± 0.07	1.48 ± 0.08	1.79 ± 0.06	1.19 ± 0.07
V <sub>dss</sub> (mL)	17.7 ± 3.49	19.5 ± 3.61	17.0 ± 0.58	14.8 ± 0.64	13.7 ± 0.58	12.6 ± 0.98

動態を non-コンパートメントモデルでの再解析を行ったが、ラットの再解析時とは異なり、2-コンパートメントモデル解析時と non-コンパートメント解析時の値に大きな違いは認められなかった。

また、そこで、再解析したマウス、ラット、ウサギにおける H12 (ADP) liposome の体内動態の結果から、アロメトリック式を用い、ヒトに H12 (ADP) liposome を 10 mg lipid/kg で投与した場合の分布容積及びクリアランスを外挿した。次いで、これらの値を用いてヒトにおける半減期を予測したところ、約 96 時間と見積もられ、H12 (ADP) liposome のヒトにおける半減期は約 4 日程度と予測された。

## 2. 大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製

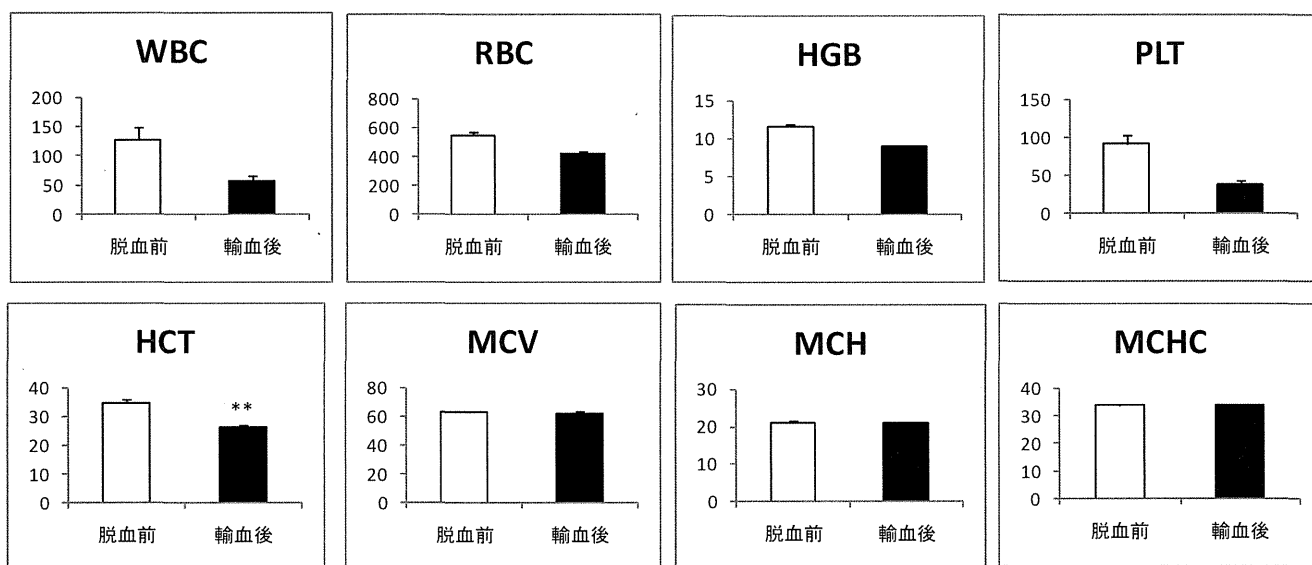
まず、25%の脱血と 12.5%乳酸リンゲル液または赤血球液の静脈内投与を繰り返した実験条件での作製を試みた。その結果、血小板値は脱血前には  $90.8 \pm 12.5 \times 10^5 / \mu\text{L}$  を示していたが、脱血後には約 60%減少し、 $38.5 \pm 4.2 \times 10^5 / \mu\text{L}$  となった (Figure 1)。同様に、白血球、赤血球値 (とその関連

パラメータ)も減少または減少傾向を示していた (Figure 1)。しかしながら、理論的には本モデルでは、赤血球値、白血球値は変動しないと考えられる。また、理論値では血小板値は約 70%減少するものの、60%程度の減少では大量出血時の易出血性病態モデルラットとしては不十分と考えられる。

そこで次に、さらに厳しい条件下での作製を試みるために、「B. 研究方法」"3. 大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製"の方法 2 の条件下でモデルの作製を行った。その結果、血小板値は脱血前には  $97.2 \pm 13.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$  を示していたが、脱血後には約 70%減少し、 $29.7 \pm 3.7 \times 10^5 / \mu\text{L}$  となった (Figure 2)。しかしながら、白血球、赤血球値 (とその関連パラメータ)も減少または減少傾向を示していたも前述した作製 モデル比較すると軽微であった。理論的には本作製方法では、血小板値は約 75%減少すると算出される。今回、70%減少しており、理論値と大きな差はなかった。

Figure 1

Changes in hematological parameters by blood exchanges (method 1: 25% of total blood volume × 4).



#### D. 考察

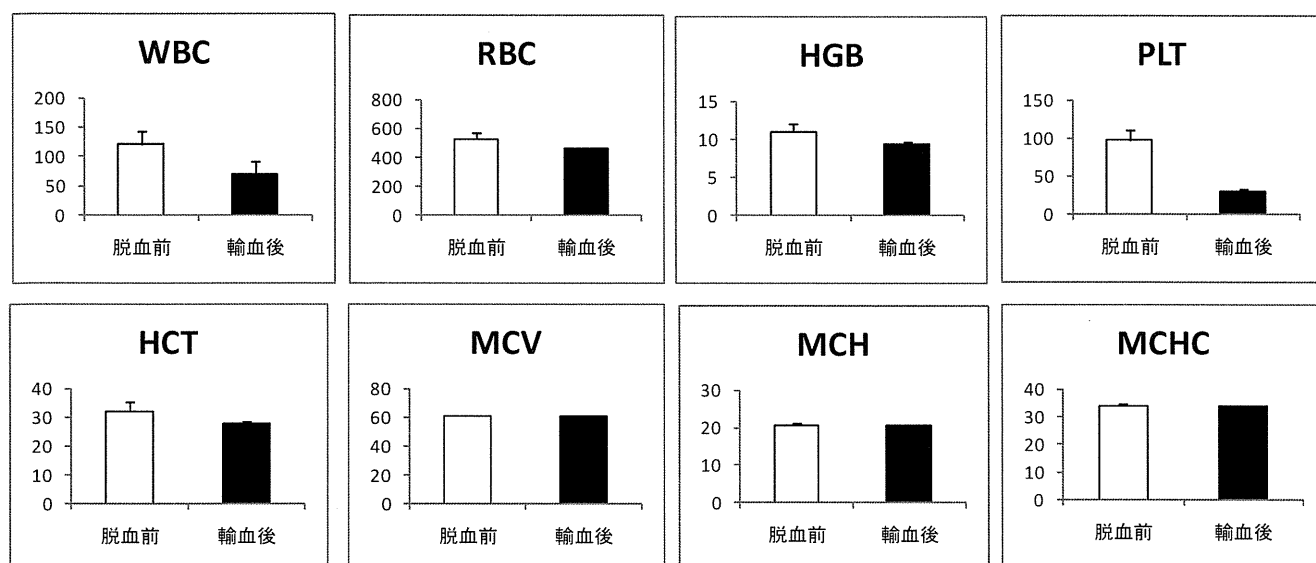
本研究では、モーメント解析プログラム (Microsoft Excel) を用い、健常マウス、ラット、ウサギに  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ -H12 (ADP) liposome を投与した際の血漿中濃度推移について non-コンパートメントモデルで再解析を行った。その結果、ラットでは 2-コンパートメント解析時と比較して、すべての投与量で薬物動態パラメータの変化が確認された (Table 1)。一方、健常マウス及びウサギにおける non-コンパートメントモデルでの体内動態再解析結果は 2-コンパートメントモデル解析時と大きな変化は確認されなかった。種差による再解析結果の違いは明確にわからないが、今回の再解析により H12 (ADP) liposome の正確な体内動態情報を構築することができたと考えられる。現在、再解析結果を含め、健常マウス、ラット及びウサギの体内動態結果は国際誌に論文投稿中である (*Drug Metab Disp*)。

また、今回、2つの条件下で大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製を行った。25%の脱血と 12.5%乳酸リンゲル液または赤血球液の静脈内投与を繰り返した実験条件下では、理論値と実

測値に大きな差があり、目標値 (約 70%の血小板減少) までの低下は起こらなかった。一方、30%の脱血と 12.5%乳酸リンゲル液または赤血球液の静脈内投与を繰り返した実験条件下では、約 70%の血小板減少が確認され、モデルの作製に成功したと考えられる。しかしながら、今回は例数が少なく (N=2)、本実験結果のみでは判断できない。今後、例数を増やし、より安定したモデルの作製を行っていくとともに、尾静脈からの出血時間の変化などを確認することで大量出血時の易出血性病態モデルラットの作製を行っていく必要があると考えられる。また、モデル作製が確立し次第、H12 (ADP) liposome の体内動態実験を行い、健常時及び薬剤誘発血小板減少症 (ブスルファン誘発血小板減少症モデルラット) との比較検討を行っていくつもりである。

Figure 2

Changes in hematological parameters by blood exchanges (method 2: 30% of total blood volume  $\times$  4).



#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka KI, Mizushima T, Otagiri M, **Maruyama T**. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther*. In press (2013).
2. Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, Otagiri M, **Maruyama T**. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. *Nitric Oxide*. In press (2013).
3. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, **Maruyama T**, Otagiri M. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta*. In press (2013).
4. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, **Maruyama T**. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int*. in press (2013).
5. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, **Maruyama T**. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int*. in press (2013).
6. Kondo Y, Ishitsuka Y, Kadowaki D, Fukumoto Y, Miyamoto Y, Irikura M, Hirata S, Sato K, **Maruyama T**, Hamasaki N, Irie T. Phosphoenolpyruvate, a glycolytic intermediate,

- as a cytoprotectant and antioxidant in ex-vivo cold-preserved mouse liver: a potential application for organ preservation. *J Pharm Pharmacol*. In press (2013).
7. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Otagiri M, **Maruyama T**. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos*. in press (2013).
  8. Watanabe K, Ishima Y, Akaike T, Sawa T, Kuroda T, Ogawa W, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, Otagiri M, **Maruyama T**. S-nitrosated  $\alpha$ -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J*. 27:391-8 (2013).
  9. Kadowaki D, Sumikawa S, Arimizu K, Taguchi K, Kitamura K, Ishitsuka Y, Narita Y, Irie T, Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M, Hirata S. Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine induced renal failure model rats. *Life Sci*. 91:1304-8 (2012).
  10. Ishima Y, Hara M, Kragh-Hansen U, Inoue A, Suenaga A, Kai T, Watanabe H, Otagiri M, **Maruyama T**. Elucidation of the therapeutic enhancer mechanism of poly-S-nitrosated human serum albumin against multidrug-resistant tumor in animal models. *J Control Release*. 164:1-7 (2012).
  11. 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 induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. *Biochem Pharmacol*. 84:1207-14 (2012).
  12. Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kodama A, Maeda H, Watanabe K, Kai H, Otagiri M, **Maruyama T**.  $\alpha$ (1)-Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress. *J Biol Chem*. 287:30688-700 (2012).
  13. Kaneko K, Chuang VT, Ito T, Suenaga A, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M. Arginine 485 of human serum albumin interacts with the benzophenone moiety of ketoprofen in the binding pocket of subdomain III A and III B. *Pharmazie*. 67:414-8 (2012).
  14. Taguchi K, Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M. Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications. *J Pharm Sci*. 101:3033-46 (2012).
  15. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, Otagiri M, **Maruyama T**. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metab Dispos*. 40:1423-8 (2012).
  16. Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-Hansen U, Kai T, Watanabe H, **Maruyama T**, Otagiri M. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci*. 101:3222-9 (2012).
  17. Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life*. 64:450-4 (2012).

18. Komori H, Nishi K, Uehara N, Watanabe H, Shuto T, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Characterization of hepatic cellular uptake of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP), part 2: involvement of hemoglobin  $\beta$ -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* 101:1607-15 (2012).
19. Ishima Y, Chen D, Fang J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Kai T, **Maruyama T**, Otagiri M. S-Nitrosated human serum albumin dimer is not only a novel anti-tumor drug but also a potentiator for anti-tumor drugs with augmented EPR effects. *Bioconjug Chem.* 23:264-71 (2012).
20. Yamakawa N, Suemasu S, Watanabe H, Tahara K, Tanaka KI, Okamoto Y, Ohtsuka M, **Maruyama T**, Mizushima T. Comparison of pharmacokinetics between loxoprofen and its derivative with lower ulcerogenic activity, fluoro-loxoprofen. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2012) in press
21. Taguchi K, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, **Maruyama T**, Otagiri M. A fourteen-day observation and pharmacokinetic evaluation after a massive intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) in cynomolgus monkeys. *J Drug Metab Toxicol.*, 3, 1000128 (2012)
22. Taguchi K, Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M. Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications. *J Pharm Sci.* 101:3033-46 (2012).
23. Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Misumi S, Suenaga A, **Maruyama T**, Otagiri M. Characterization of the hepatic cellular uptake of  $\alpha$ (1) -acid glycoprotein (AGP), part 1: a peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin  $\beta$ -chain on mouse liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* 101:1599-606 (2012).
2. 学会発表  
(国際学会)
1. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VTG, 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. 49th ERA-EDTA Congress 2012 (Paris, France, 2012, 5/24-5/27)
  2. Watanabe H, Honda D, Miyamoto Y, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Tanaka M, Tanaka H, Fukagawa M, Otagiri M, **Maruyama T**. *p*-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase. 49th ERA-EDTA Congress 2012 (Paris, France, 2012, 5/24-5/27)
- (国内学会)
1. 田中遼大, 小玉あずさ, 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タンパク質の有用性評価 (日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24-26 日)
  2. 西村知晃, 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尿毒症物質 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan (CMPF) 高親和性アルブミン変異体の設計 (日本薬剤学会 27 年会 2012 年 5 月 24 日-5 月 26 日)
  3. 弥永直樹, 渡邊博志, 濱崎慶輔, 國安明彦, 異島優, 小田切優樹, **丸山徹**. *In vivo* フェージディスプレイ法を用いた新規腎送達ペプ

- チドの探索 (日本薬剤学会 27 年会 2012 年 5 月 24 日-5 月 26 日)
4. 濱崎慶輔、渡邊博志、弥永直樹、國安明彦、異島優、小田切優樹、丸山徹 アルギニンペプチドを利用した細胞膜透過型アルブミンの設計と評価 (日本薬剤学会 27 年会 2012 年 5 月 24 日-5 月 26 日)
  5. 宮崎裕理、田口和明、宗慶太郎、小田切優樹、丸山徹 骨髄指向性を有する新規エリスロポエチン製剤の開発 (日本薬剤学会 27 年会 2012 年 5 月 24 日-5 月 26 日)
  6. 井上亜希、異島優、方軍、前田浩、小田切優樹、渡邊博志、丸山徹 S-ニトロソ化アルブミンダイマーは EPR 効果を増強する (日本薬剤学会 27 年会 2012 年 5 月 24 日-5 月 26 日)
  7. 渡辺佳織、異島優、赤池孝章、澤智裕、黒田照夫、小川和加野、渡邊博志、甲斐俊哉、小田切優樹、丸山徹 S-ニトロソ化に伴う $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質(AGP)の抗菌機能獲得と感染症治療への応用 (第 12 回日本 NO 学会 学術集会 2012 年 6 月 29 日-30 日)
  8. 異島優、品川拓也、米重梓二、甲斐俊哉、赤池孝章、小田切優樹、丸山徹 S-ニトロソ化アルブミンにより抗アポトーシス効果を付与した改良型臓器保存液の開発 (第 12 回日本 NO 学会学術集会 2012 年 6 月 29 日-30 日)
  9. 田口和明、酒井宏水、堀之内宏久、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 細胞型人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体のカニクイザルへの大量投与の結果からみた実効性 (第 19 日本血液代替物学会年次大会 2012 年 10 月 25 日-26 日)
  10. 丸山徹、田口和明、氏平隼人、渡邊博志、新井愛美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹 血小板代替物 H12(ADP)リポソームの体内動態に及ぼす血小板減少症の影響 (第 19 日本血液代替物学会年次大会 2012 年 10 月 25 日-26 日)
  11. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、丸山徹、小田切優樹 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素付加型赤血球の肝チトクローム P450 保護効果 (第 19 日本血液代替物学会年次大会 2012 年 10 月 25 日-26 日)
  12. 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、丸山徹、小田切優樹 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-慢性肝疾患への応用 (第 19 日本血液代替物学会年次大会 2012 年 10 月 25 日-26 日)
  13. 渡辺佳織、異島優、赤池孝章、澤智裕、黒田照夫、小川和加野、渡邊博志、甲斐俊哉、小田切優樹、丸山徹 S-ニトロソ化に伴う $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質(AGP)の抗菌機能獲得と感染症治療への応用 (第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012 年 11 月 15 日-16 日)
  14. 宮本洋平、渡邊博志、本田大輔、門脇大介、異島優、深川雅史、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質パラクレジル硫酸のレドックス特性と腎障害、心血管疾患発症機序解明 (第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012 年 11 月 15 日-16 日)
  15. 大柿滋、田口和明、前田仁志、異島優、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 一酸化炭素付加赤血球によるクッパー細胞の不活化は輸血誘発肝チトクローム P450 の機能障害を保護する (第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012 年 11 月 15 日-16 日)
  16. 丸山徹、石井宏、中村照也、渡邊博志、異島優、末永綾香、山縣ゆり子、小田切優樹 ヒト $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質バリエーション A 体と F1\*S 体に対する薬物結合選択性の分子機序解明 (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)

17. 前田仁志、渡邊博志、異島優、末永綾香、小田切優樹、丸山徹 遺伝子組換え型マンノースアルブミンによるクッパー細胞選択的なチオール送達はコンカナバリン誘発肝炎を軽減する (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)
18. 小玉あずさ、田中遼大、渡邊博志、異島優、小田切優樹、丸山徹 ヒト血清アルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質は抗酸化作用によりシスプラチン誘発腎障害を抑制する (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)
19. 田中遼大、小玉あずさ、渡邊博志、異島優、田中健一郎、水島徹、小田切優樹、丸山徹 ヒト血清アルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の持続的な抗酸化・抗炎症作用によるブレオマイシン誘発肺線維症に対する治療効果 (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)
20. 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 一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体は抗炎症・抗酸化作用を介してブレオマイシン誘発肺線維症を抑制する (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)
21. 末永綾香、異島優、井上亜希、方軍、前田浩、甲斐俊哉、小田切優樹、丸山徹 S-ニトロソ化ヒト血清アルブミン二量体は、新規抗癌剤だけでなく EPR 効果増強剤としても機能する (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)
22. 渡邊博志、宮本洋平、本田大輔、田中寿絵、深川雅史、異島優、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質 p-クレジル硫酸は OATs を介して近位尿細管上皮、血管内皮及び血管平滑筋細胞に取り込まれ酸化ストレス障害を誘発する (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)
23. 小森久和、渡邊博志、首藤剛、小玉あずさ、甲斐広文、小田切優樹、玉井郁巳、丸山徹  $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質は CD163 の誘導を介して溶血に起因する酸化ストレスを抑制する (日本薬物動態学会第 27 年回千葉 2012 年 11 月 20 日-22 日)
24. 渡辺佳織、異島優、黒田照夫、小川和加野、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 S-ニトロソ化に伴う  $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質の抗菌機能獲得と感染症治療への応用 (日本動物実験代替法学会第 25 回 2012 年 12 月 7 日-9 日)
25. 宮崎裕理、田口和明、渡邊博志、宗慶太郎、小田切優樹、丸山徹 骨髄標的化エリスロポエチンの製剤設計と腎性貧血治療への応用 (第 29 回日本薬学会九州支部大会 2012 年 12 月 8 日 - 12 月 9 日)
26. 濱崎慶輔、渡邊博志、弥永直樹、國安明彦、異島優、小田切優樹、丸山徹 ポリアルギニンペプチドを用いた腫瘍細胞内アルブミンデリバリーシステムの構築 (第 29 回日本薬学会九州支部大会 2012 年 12 月 8 日 - 12 月 9 日)
27. 小玉あずさ、田中遼大、渡邊博志、田中寿絵、異島優、深川雅史、小田切優樹、丸山徹 急性腎障害に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の治療効果と機序解明 (第 29 回日本薬学会九州支部大会 2012 年 12 月 8 日 - 12 月 9 日)
28. 榎木裕紀、田中遼大、宮本洋平、異島優、渡邊博志、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 インフルエンザ肺障害に対するニューキノロン系抗菌薬の抗酸化能評価 (第 29 回日本薬学会九州支部大会 2012 年 12 月 8 日 - 12 月 9 日)
- G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含む)  
該当なし



平成 24 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

人工血小板/H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を目指した品質管理と  
薬物試験 (H24-創薬総合-一般-008)

H12-(ADP)小胞体の安全性評価：血栓誘発性の検討/DIC ラットモデルでの検討

研究分担者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部輸血・細胞療法センター教授)  
研究協力者 丸山 仁美 (同 技術員)  
渡邊 直英 (同 助教)

研究要旨

H12-(ADP)小胞体は、残存血小板の機能を介して止血血栓の形成を促進し、血小板輸血に匹敵する効果を発揮することが血小板減少症動物モデルで示されてきた。しかしながら、止血血栓の促進作用の程度によっては、病的血栓の誘発作用の危惧が必ず伴う。そこで今回、DICによる静脈血栓症ラット（トロンボプラスチン誘発性）に当該小胞体を投与して、生体内での過凝固および二次線溶マーカー（血小板数、アンチトロンビン、D-ダイマーなど）の変動を経時的に測定して、静脈血栓症の誘発性や促進性について検討を加えた。その結果、陰性対照小胞体（H12 未修飾、ADP 未内包 PBS 内包小胞体）と比較して、H12-(ADP)小胞体は、検討した投与量の範囲内（常用量：20 mg/kg、高用量：40 mg/kg、超高用量：80 mg/kg）でDICマウス（トロンボプラスチン投与量を最適化：8倍稀釈、することで血栓準備状態に準じた条件に設定）の生体内を反映する血栓症マーカーに統計学的に有意な影響を及ぼさなかった。ただし、超高用量においては、一過性に（投与後30分）D-ダイマーが上昇する傾向が認められ、この現象は陰性対照小胞体でも同程度に認められた。非特異的な現象の可能性が強いが、小胞体自体の線溶亢進作用についてさらに検討を加える必要性が示唆された。

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)の表面修飾及び血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)の内包化を施した

リン脂質小胞体(H12-(ADP)小胞体)は、止血局所で、残存した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ADPを放出して、血小板輸血に匹敵した止血能を発揮することを、血

血小板減少動物モデルを対象に *in vivo* にて証明してきた。当該薬物の副作用として最も危惧されるのが、血栓症の誘発、増強作用である。いままで種々の *in vitro*、*in vivo* の検討を行ってきたが、1) 薬物自体に、血小板を活性化させる作用 (P-セレクチンの発現や血小板凝集の惹起作用など) は認められず、2) ラット動脈血栓症モデル (精巣動脈血栓症) での血栓症誘発・促進作用を認めず、3) 種々の薬効モデル (マウス、ラット、ウサギ) で血栓症を示唆する副作用 (組織学的検討を含む) を認めなかった。そこで、さらに鋭敏な系での血栓誘発・促進作用を検討すべく血栓準備状態を含んだラット DIC モデルを前年度の研究で確立し、かつプレリミナリーな評価を行ってきた。そして、今回の血栓症マーカーを用いた詳細な検討の結果、当該薬物による血栓症 (静脈系) 誘発・促進作用を明らかに示唆する知見は得られなかった。しかし、過量投与 (80mg/kg、常用量: 10-20mg/kg) では、D-ダイマーの一過性の上昇作用 (推計学的に有意ではない) が認められ、かつその作用は陰性対照として用いた mock リポソーム (H12 未修飾、ADP 未内包) でも同等に認められた。リポソーム自体に大量投与では線溶促進作用を有する可能性が示唆された。

## B. 研究方法

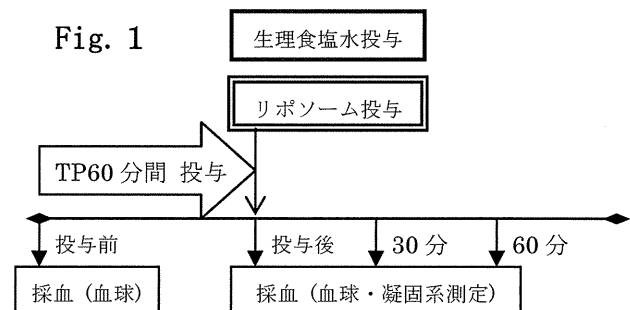
Wistar 系雄性ラット (三共ラボ、7 週齢、200-220g) は、一晚 (最低 16 時間) 絶食した後、以下の実験に用いた。ラットは、拘束衣にて固定し尾静

脈より小胞体およびトロンボプラスチンを投与され、その後、腹部大動脈より 3.13% クエン酸ナトリウム入真空採血管を用いて採血された。この血液検体は、遠心分離 (2,200g, 10 min) し、血液凝固検査用血漿を回収した。血液凝固検査は、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン抗原量 (Fng)、アンチトロンビン活性 (ATIII)、D-ダイマーの 5 項目を測定 (三菱化学メディエンスに委託) した。血球数は、自動血球計算計 (K-4500, Sysmex) にて測定した。

### <血栓誘発モデルラットの作製>

ラットは拘束衣にて固定し尾静脈に留置針を設置した。8 倍に生食で希釈したトロンボプラスチン (TP) (トロンボチェック PT プラス、Sysmex、ウサギ脳由来トロンボプラスチン+乳酸カルシウム) (2 ml) を 1 時間かけて、留置針よりシリンジポンプ (Apparatus pump198, Harvard) を用いて持続投与した。そして、終了直後に H12(ADP) 小胞体 (20mg/kg、40mg/kg、80

mg/kg 相当量を 1mL の PBS に懸濁) を投与した。生理食塩水および mock 小胞体 (80mg/kg) を陰性対照とした。TP 投与終了直後、30 分後、60 分後に採血を行い、血小板数、凝固検査、血栓症マーカーの測定を行った (Fig. 1)。



### C. 研究結果及び考察

本ラットDICモデルは、8倍希釈した低用量のトロンボプラスチンを1時間かけて持続投与することでovert DICを誘発せずに、被検薬剤の血栓誘発・促進効果を評価する目的で確立した。

H12(ADP)小胞体 (20mg/kg、40mg/kg、そして80mg/kg) の投与による血栓マーカーの変動を検討した。血小板数の減少やフィブリノゲンの低下(データ未提示)、アンチトロンビンの低下に関して、陰性対照(生食群とmock小胞体: 80mg/kg)と同様に、H12(ADP)小胞体の投与による影響は認めなかった。一方、D-ダイマー値は80mg/kg投与群においてのみ、投与30分後に統計学的(t検定)に有意でないが一過性の上昇傾向が認められた。同程度のD-ダイマー一過性上昇作用がmock小胞体でも認められた(Fig. 2)。実際、健常動物への投与(80mg/kg)後、20分、60分後のマーカーの変動を検討した以前の結果では、D-ダイマーの上昇は全く認められなかった。D-ダイマー測定系への多量の小胞体による非特異的な影響の可能性が高いが、小胞体自体が*in vivo*で線溶系(二次/一次線溶ではない)に影響する可能性も否定できないため、さらなる検討が必要である。

### D. 結論

陰性対照(生食、mock小胞体)と比較して、H12-(ADP)小胞体(20mg、40mg、

80mg/kg)の投与で、有意な血栓症マーカー(血小板数、D-dimer、AT)の変動(投与直後、30分、60分)は認めなかった。しかし、高用量(80mg/kg)においては、mock小胞体およびH12-(ADP)小胞体のいずれでも、投与後30分で一過性のD-ダイマーの上昇傾向が認められた。非特異的反応の可能性が高いが、小胞体自体に大量では二次線溶誘発作用を有する可能性は否定できなかった。

### 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  
なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 2 Effect of H12(ADP) liposomes on thrombotic markers in rat DIC model

