

見られたが、一年経過後の値は、本研究室で設定した標準仕様の範囲内に収まること
が暫定的に認められた。従って、H12-(ADP)
リポソームは冷蔵 (4°C) で約一年間、安定に
保存できることが示唆された (Table 1)。

Table 1 Stability of H12-(ADP)liposomes in refrigerated storage.

	0 day	372 day
Particle size	223.5 ± 71.23 nm	224.0 ± 72.72 nm
Zeta potential	-8.41 ± 0.68 mV	-7.83 ± 1.04 mV
H12-PEG-Glu2C18	0.434 mg	0.364 mg
ADP encapsulation	30.0 µg	29.3 µg (leakage 2.4%)

D. 結論

(1) H12-(ADP)リポソーム分散液のエンドトキシン測定法を確立した。また、本手法により、無菌環境で調製したリポソーム試験物のエンドトキシン値を測定したところ、基準値以下であることが確かめられた。

(2) 無菌環境で調製したリポソーム試験物について微生物限度試験を行ったところ、日本薬局方の定める基準を下回ることを確認した。

(3) クロスフロー濾過による外水相 ADP の除去による H12-(ADP)リポソームの精製が可能であることから数 100mL 程度のスケールアップの可能性が示唆された。

(4) 大型エクストルーダーを用いて 1 度に 100 mL 規模の H12-(ADP)リポソームを短時間で粒子径制御の可能性が示唆された。

(5) H12-(ADP)リポソームは 4°C にて約一年間、安定に保存でき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) 藤山敦史, 土井麻実, 池田康夫, 武岡真司, 「人工血小板の品質評価に関する検討」, 第 20 回日本血液代替物学会年次大会 (2013.12., 奈良).

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 25 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

第 2 世代 H12-(ADP)リポソームの *in vivo* 止血能評価

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

【研究要旨】

H12-(ADP)リポソームは、H12 を介して活性化血小板間を架橋し血小板活性化惹起物質である ADP を血小板凝集塊中で放出することにより血小板凝集を促進させる機能を持ち、本研究グループでは *in vivo* において止血能を中心に評価してきた^{1,2)}。また、更なる止血能の向上を目標として、リポソーム脂質膜構成成分である負電荷脂質 DHSG 含量を増加させた第 2 世代 H12-(ADP)リポソームを構築し、その高い血小板凝集能ならびに活性化血小板への結合能を *in vitro* 試験にて評価してきた。本研究ではこの第 2 世代 H12-(ADP)リポソームの物性安定性ならびに *in vivo* 止血能を評価した。物性安定性試験は冷蔵保存(4°C)ならびに加速試験として 40°C での保存安定性試験を 1 ヶ月間行い、粒子径、ゼータ電位および ADP 漏出率の変化を調べた。その結果、4°C 保存条件下においてはいずれの項目も大きな値の変化が見られなかったものの、40°C では保存 2 週目以降のデータ電位の緩やかな上昇ならびに ADP の漏出が認められたため、4°C 保存とした。他方、*in vivo* 止血能評価は、ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットを用い、第 1 世代 H12-(ADP)リポソーム、第 2 世代の H12-(ADP)リポソームおよび(ADP)リポソーム、生理食塩水投与群において尾静脈からの出血時間を比較した。その結果、第 2 世代の H12-(ADP)リポソームおよび(ADP)リポソーム、ならびに H12-(ADP)リポソーム投与群での出血時間はいずれも生理食塩水投与群と比較して有意な出血時間の短縮が認められた。特に第 2 世代 H12-(ADP)リポソームについては、DHSG ならびに H12 による相乗的な作用により、従来の H12-(ADP)リポソームよりも高い止血能を有する傾向が見られた。

A. 研究目的

本研究室では、表面に活性化血小板上の GP II b/III a 受容体を認識・結合するフィブリノゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV:H12)を担持させ、さらに内水相に血小板活性化惹起物質のアデノシン 5' - ニリン酸(ADP)を内包させた

H12-(ADP)リポソームを構築した¹⁾。その後、H12-(ADP)リポソームより高い止血能を有するリポソームの構築を目標とした研究が行われ、血小板凝集補助能と損害血管収縮作用を有するセロトニン (5-hydroxytryptamine; 5-HT)を ADP と共に内包させた H12-(ADP/5-HT)リポソームを構

築しされたが、その際 5-HT を安定に内包するために従来の H12-(ADP) リポソーム (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-Glu2C18=5/5/1/0.033/0.033[モル比]) よりも負電荷脂質である DHSG 含量を増加させた膜組成 (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比)) のリポソームを検討した。次いで、この新規膜組成が血小板代替物としての機能にどのような影響を与えるかの研究が行われ、H12 末担持および ADP 未内包の新規膜組成リポソーム(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE= 5/5/5/0.045(モル比))を用いて検討したところ、活性化血小板に対する結合能や血小板凝集促進効果が高まることを明らかにしてきた²⁾。しかし、*in vivo* 評価の結果、血小板減少症モデルラットに投与しても、生食群および従来組成のリポソーム投与時と比較して出血時間を短縮することは認められなかったため、ADP 内包が止血のための要件であることが示唆された²⁾。

本研究では、H12 および DSHG の含有量増加による結合能増強、さらに局所での ADP 放出による血小板凝集促進効果を期待し DHSG 含有量を増加させた H12-(ADP) リポソーム(第 2 世代 H12-(ADP) リポソーム)を構築し、プスルファン誘発血小板減少症モデルラットを用いて同様に止血能評価を行った。第 2 世代 H12-(ADP) リポソーム、生理食塩水、第 1 世代 H12-(ADP) リポソームならびに第二世代(ADP) リポソーム投与群と比較した。さらに第 2 世代 H12-(ADP) リポソーム分散液に関して、4°C と 40°C で 1 ヶ月間保存し、物性安定性を評価した。

1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
2) 平成 23 年度創薬基盤推進総合研究事業 分担研究報告書

B. 研究方法

1. 第 2 世代 H12-(ADP) リポソームの作製

各脂質(**Table 1**)を秤量後、 τ -ブチルアルコールに溶解させ凍結乾燥 (over 6 hours) にて混合脂質粉末を得た。この粉末を 1mM ADP 溶液(in PBS)にて水和後(3 hr, 1 wt%, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径を制御 (ϕ 0.2 μ m)、超遠心分離にて精製した (100,000 g, 30 min, 4°C)。次いで、これを PBS に再分散、ゲル濾過精製し(Sephadex G25)、第 2 世代 H12-(ADP) リポソーム(a)および第 2 世代(ADP) リポソームを得た。

Table 1 Lipid composition of liposomes

Liposome	(a)	(b)
DPPC ¹⁾	5	5
Cholesterol	5	5
DHSG ²⁾	5	5
PEG-Glu2C18 ³⁾	0.045	0.045
H12-PEG-Glu2C18	0.045	-

1) 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl choline,

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

3) 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanol amine-N-[monomethoxypoly(ethyl-ene glycol)] (5000)

2. 第 2 世代 H12-(ADP) リポソームの保存安定性試験

ガラスチューブに第 2 世代 H12-(ADP) リポソーム(20 mg/ml)を加え 4°C、40°C の条件にて 1 ヶ月間保存し、物性(粒子径、ゼータ電位、ADP 漏出率)について経時的に測定を行った。

粒子径、ゼータ電位については 3.1. に示す方法にて測定した。他方、ADP 漏出率については H12-(ADP) リポソームを Amicon Ultra-0.5 を用いて限外濾過(20,000 G, 10 min)し、濾液を回収後 3.2. に示した HPLC 測定条件にて ADP 量を測定し、さらに全内包 ADP 量に対する割合を算出し、漏出率とした。

3. H12-(ADP)リポソームの物性評価

3.1. 粒子径、ゼータ電位の測定

調製した各リポソーム試験物について、N4 Plus(Beckman Coulter 社)を用いて粒子径を、Zetasizer nano (Malvern 社)を用いてゼータ電位を測定した。

3.2. 内包 ADP 量の測定

H12-(ADP)リポソームを等量の octyl-glucoside (0.5 M)にて可溶化し、HPLC (TSK Gel ODS-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))にてADP検量線サンプル(0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 mM)と共に測定し、可溶化試料のADPのピーク面積と検量線からADP内包量を算出した。

4. 第2世代人工血小板の止血能評価

4.1. 血小板減少症モデルラットの作製

ブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL, 10 mg/kg)を0, 3日目に断続的にWistar系雄性ラット(三協ラボ, 8週齢, 200-250 g)の尾静脈より投与し、各血球成分変動を測定した(pocH[®]-100i, Sysmex)。

投与0, 3日目、いずれもラットは体重測定後、ジエチルエーテル麻酔の後、左向きに寝かせた。25 Gフローマックスを尾静脈に穿刺、採血後、1 mL シリンジにてブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL, 2 mL/kg; Total dosage of Busulfan 10 mg)を投与した。採血は75 µL ずつ行い、採血後同量のACD-A液(ACD-A液:生理食塩水=1:2)と混合、vortex 攪拌後、血球成分の測定を行った。

4.1. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

ブスルファンポリエチレングリコール溶液投与10日目のラットのうち血小板数が $1.5\sim 15 \times 10^3/\mu\text{L}$ の範囲のラットを使用した(n=38)。ラットの体重測定後ジエチルエーテルにて麻酔した。23 G フローマックスおよび2.5 mL シリンジにてソムノペンチル持続麻酔液(4 mL/kg)を腹腔内投与し持続麻酔を行った。ラットを右向きに寝かせ、25 G フローマックスにて採血後、評価用サンプル(生理食塩水、第2世代H12-(ADP)リポソーム、第2世代(ADP)リポソーム、H12-(ADP)リポソーム 10 mg/kg, 4mL/kg)を1 mL シリンジを用いて尾静脈より投与した。投与後キムワイプを用いて圧迫止血を行い、尾の先端から1 cmの尾静脈上に切傷のための印を付けた。クイックヒールを印上に押し当て固定、サンプル投与5分後に切傷し、傷口を生理食塩水に浸して出血時間の測定を行った。また、クイックヒール使用直後を0秒、切傷から1800秒を最大観察時間とし、生理食塩水が血液で濁らなくなるまでの時間を出血時間(出血量測定時間)とした。

C. 研究結果及び考察

1. 第2世代H12-(ADP)リポソームの保存安定性試験

第2世代H12-(ADP)リポソームを4°C, 40°Cの条件で1ヶ月間保存し、粒子径、ゼータ電位、ADP溶出率の変化を調べた(Fig 1)。その結果、粒子径はいずれの条件においても大きな変化は認められなかった。ゼータ電位は40°C保存において緩やかに上昇しADP漏出が示唆された。また、ADP溶出率は40°C保存2週間目以降に急激に上昇した。この結果より、第2世代H12-(ADP)リポソームの保存条件としては、4°C

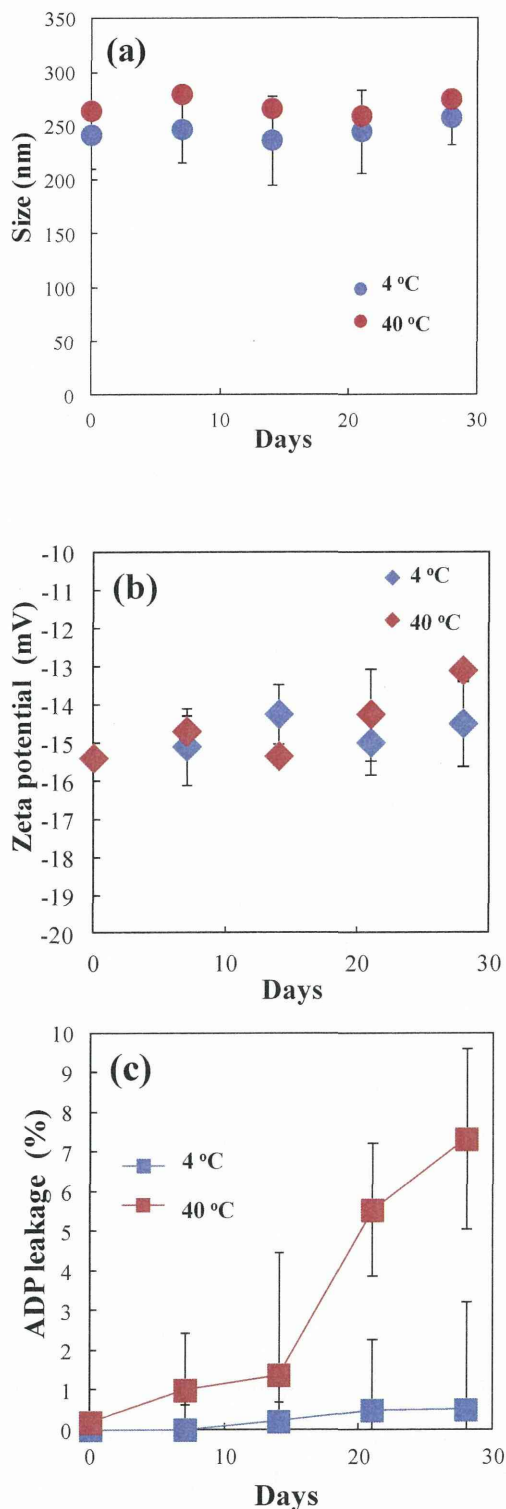


Fig 1 Results of accelerated test. Liposome samples stored at 4 °C and 40 °C. Changes of size(a), zeta potential(b) and ADP leakage(c).

の冷蔵保存が望ましいと判断された。従来 H12-(ADP)リポソームと比較し³⁾、40 °C、1ヶ月保存における ADP 漏出率がやや高い理由として、DHSG 含有量増加に伴い脂質二分子膜が従来の H12-(ADP)リポソームと比較して不安定であることが考えられる。

3) 平成 24 年度 創薬基盤推進総合研究事業 分担研究 報告書

2. 第 2 世代 H12-(ADP)リポソームの止血能評価

2.1. 血小板減少症モデルラットの作製

まず B.3.2. に示した手法に加え、ポリエチレングリコール(PEG)溶液をラットに投与する系にも同時に行い、ブスルファン投与の副作用とともに PEG 溶液単独投与による血液成分の変化を投与開始 13 日目まで計測した(Fig 2)。PEG 溶液投与群の血液学的分析値では血小板(PLT)数、赤血球(RBC)数、ヘモグロビン値ともに有意な変動はみられなかった。白血球(WBC)数については投与 5 日目を境に緩やかな減少傾向が見られた。しかし、投与 10 日目以降の白血球数は正常値に戻っており、PEG 溶液自体の静脈投与によってラットの血液への影響はほぼないと見做した。他方、ブスルファン PEG 溶液投与群の血球成分はいずれの項目も投与 5 日目を境に数値が減少した。具体的には血小板数の減少が最も急激であり、投与 13 日目には投与前の値のおよそ 10 分の 1 以下にまで減少した(PLT; Day 0: $68.16 \pm 2.98 \rightarrow$ Day 13: $2.92 \pm 2.90 \times 10^3 / \mu\text{L}$)。赤血球、白血球数の減少はそれぞれ(RBC; Day 0: $824.67 \pm 22.4 \rightarrow$ Day 13: $506.00 \pm 39.40 \times 10^2 / \mu\text{L}$)、(WBC; Day 0: $117.2 \pm 5.75 \rightarrow$ Day 13: $19.6 \pm 3.42 \times 10^4 / \mu\text{L}$)であり、ヘモグロビン値は赤血球数の減少に伴って減少した(Hg; Day 0: $15.00 \pm 0.39 \rightarrow$ Day 13: $8.78 \pm 0.69 \text{ g/dL}$)。投与 10 日目において血小

板数がおよそ10分の1以下(PLT; Day 10: $6.91 \pm 0.58 \times 10^3/\mu\text{L}$)となったため、投与10日目のラットを血小板減少症モデルとして使用することとした。この投与10日目のラットと正常ラットを用いて尾静脈からの出血時間の測定を行ったところ、有意に出血時間の延長が確認された(Fig 3)。

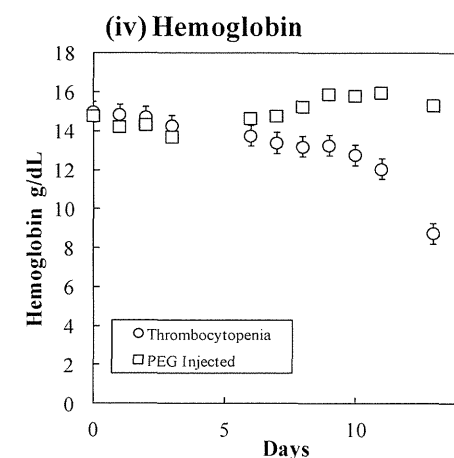
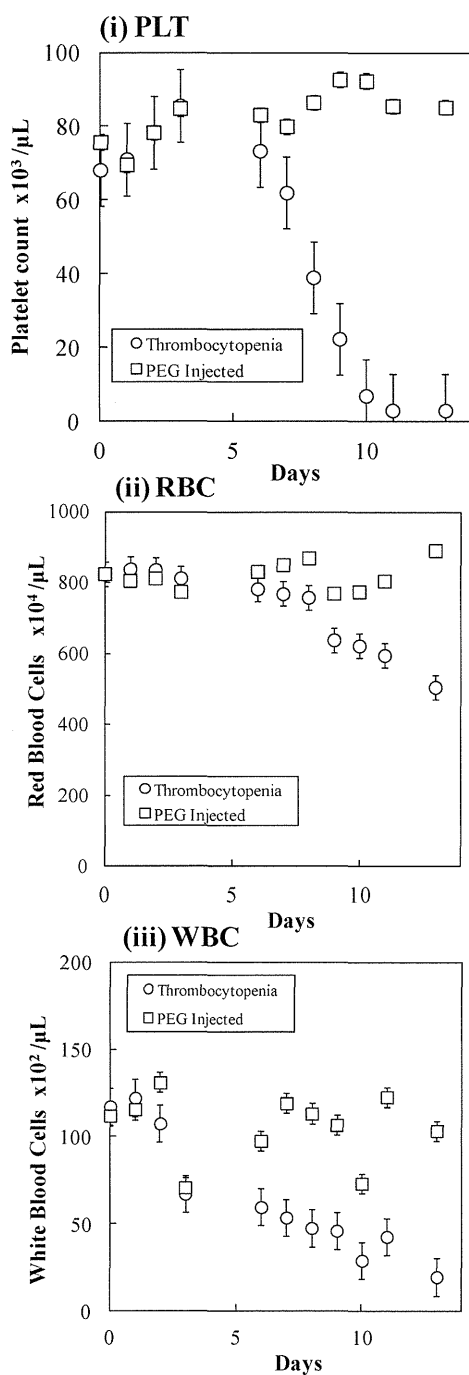
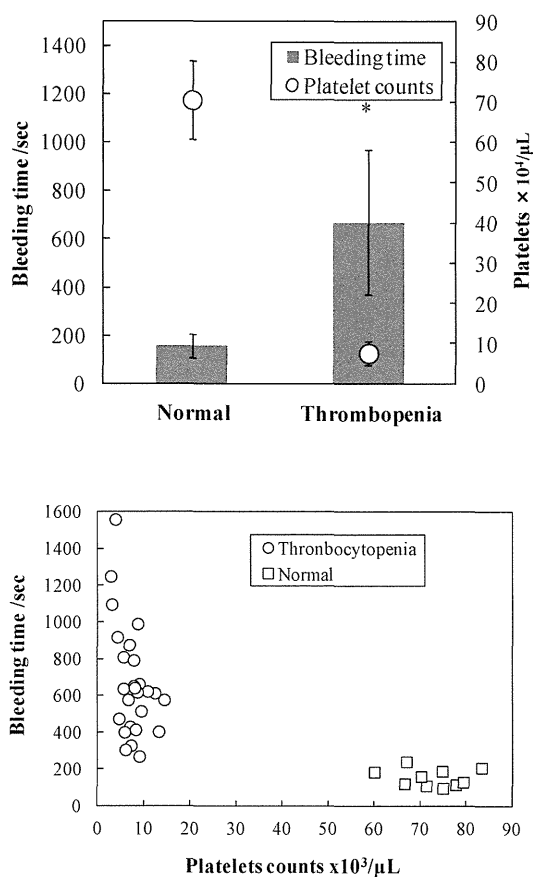


Fig. 2 Hematologic measurements of rats injected with busulfan with a total dose of 20 mg/kg and PEG solution. (i)PLT, (ii)RBC, (iii)WBC, (iv)Hemoglobin ○:Thrombocytopenia (N=27), □: PEG injection(N=9)



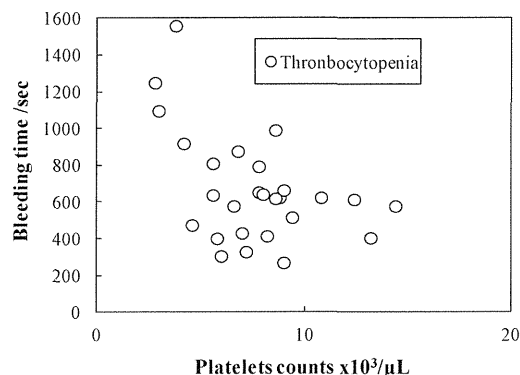


Fig. 3 (i)-(iii) The relationship between tail bleeding time and platelets count in the thrombocytopenic and normal rats. Thrombocytopenia ($N=27$), Normal ($N=9$)
* $P<0.01$ for Thrombocytopenic group vs Normal group.

2.2. 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)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(10 mg/kg each)し、投与 10 日目に血小板減少症モデル(血小板数が $1.5 - 15 \times 10^3/\mu\text{L}$)ラットを得、止血能評価に使用した($N=38$)。本モデルラットに生理食塩水、第 2 世代(ADP)リポソーム、第 2 世代 H12-(ADP)リポソームならびに H12-(ADP)リポソームを投与し([Liposomes]=10 mg/kg)、出血時間を測定した。またリポソーム投与濃度は 10 mg/kg に固定して評価した。

その結果第 2 世代(ADP)リポソーム、第 2 世代 H12-(ADP)リポソーム、H12-(ADP)リポソーム投与群での出血時間はそれぞれ 628.5 秒、397 秒、500 秒であり、いずれにおいても生理食塩水投与群(669 秒)と比較して有意な出血時間の短縮が認められた。DHSG 含有量を増やした第二世代の 2 群において特に顕著な出血時間の短縮が確認された(**Fig 4**)。特に第 2 世代 H12-(ADP)リポ

ソームに関しては、DHSG ならびに H12 による相乗的な効果により、従来の H12-(ADP)リポソームよりもより高い止血能を有することが示唆された。

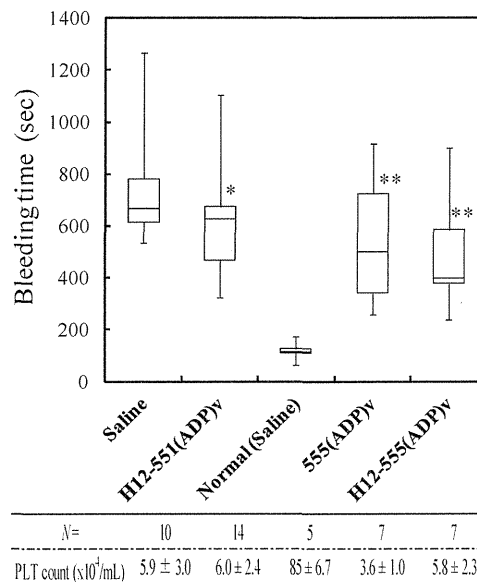


Fig. 4 Haemostatic effects of liposome samples on rat tail bleeding time ($N=5-14$). PLT counts: mean \pm SD, Bleeding time: median.

* $P<0.05$ Saline vs H12-551(ADP)v

** $P<0.01$ Saline vs H12-555(ADP)v, 555(ADP)v

D. 結論

(1) DSHG の含有量を増やした第 2 世代人工血小板 H12-(ADP)リポソームは 1 ヶ月間の保存安定性試験において 4°C 保存下では物性的変化は認められなかったが、 40°C 保存下では ADP 溶出率の増加が見られた。従って、 4°C での冷蔵を保存とした。

(2) DSHG の含有量を増やした第 2 世代人工血小板は、DHSG ならびに H12 による相乗的な効果が高まり、従来の H12-(ADP)リポソームよりもより高い止血能を有す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) 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠 「人工血小板: H12-(ADP)リポソームの設計」, 第 20 回日本血液代替物学会年次大会 (2013.12., 奈良)

(2) 藤山 敦史, 土井 麻実, 池田 康夫, 武岡 真司「血小板代替物 H12-(ADP)リポソームの物理化学的評価法の確立」, 第 20 回日本血液代替物学会年次大会 (2013.12., 奈良)

(3) 土井 麻実, 木下 学, 萩沢 康介, 西川 可穂子, 柳川 鍊平, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司「人工血小板 H12-(ADP)リポソームの止血能評価(臓器損傷後投与による検討)」, 第 20 回日本血液代替物学会年次大会 (2013.12, 奈良)

(4) Suyun Tan, Manami Arai, Naohide Watanabe, Makoto Handa, Yasuo Ikeda and Shinji Takeoka “Inhibitory Study on the binding of high anionic liposomes to activated platelet membrane” International Symposium on Integration of Chemistry and Bioscience (January 2014., Tokyo)

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

H25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（分担）研究報告書

人工血小板/H12(ADP)リポゾーム：臨床研究への移行を目指した品質管理と薬物試験

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 H12(ADP)リポゾーム事後投与の救命効果と fibrinogen 補充の影響—

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 萩沢 康介 （防衛医科大学校 生理学、助教）

西川 可穂子 （防衛医科大学校 救急部、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

家兎に脱血と赤血球成分のみの返血を繰り返すことで急性の血小板減少病態を作製し、これに肝損傷を加えることで致死性の臓器出血モデルが作製出来る。本モデルにおいて肝損傷前にあらかじめ凝固因子と共に H12(ADP)リポゾームを投与しておくこと、出血が制御され生存率も 100%と、本来の血小板輸血と同等の顕著な止血救命効果を得ることが出来た。昨年度は、実臨床でも行われている damage control surgery 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)リポゾームを事後投与することで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。しかしながら生存率は H12(ADP)リポゾーム事後投与で 60%、血小板(PRP)事後投与で 50%に留まった。これら 2 群は凝固因子のみの投与となる PPP 事後投与群の生存率 10%よりは有意に高かったが、H12(ADP)リポゾーム投与による救命効果が事後投与では事前投与に比し減弱している傾向が認められた。その一因として、肝出血後に治療を行う本病態では極めて重篤な出血病態となり、凝固因子である fibrinogen が各群のいずれの症例でも測定限界以下であったことなどが挙げられる。そこで、生存率を向上させるために、凝固因子の補充を目的に fibrinogen を H12(ADP)リポゾームの事後投与と合わせて行い、予後や臓器出血への効果を検討した。Fibrinogen を damage control 中に投与することで血中の fibrinogen 値は臓器出血後にもかかわらず 102 ± 20 mg/dL と顕著な上昇を認めた。また、肝臓の損傷部位からの出血量や止血までの時間も改善したが救命率は 30%に留まり、fibrinogen 添加投与による予後改善効果は得られなかった。このように急性血小板減少家兎に対する肝臓器出血

時の H12(ADP)リポゾームの事後投与では止血救命効果がある程度得られたが、さらなる予後の改善には fibrinogen 以外の因子である、例えば重度の貧血病態の改善などの必要性も推察された。

A. 研究目的

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の減少を来し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、この結果、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事態が時に発生する。本病態は血小板の著しい減少が根底にあり、これに対する根本的治療としては血小板もしくは血小板の代替物を輸血し、出血部位に速やかに血栓を形成させるのが肝要である。本来、血小板減少を伴うような易出血性病態に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い難く、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血小板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が、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。一方、血小板代替物である H12(ADP)リポゾームは fibrinogen の活性化部位である γ 鎖 C 末端(H12)を担持させたりポゾームで、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 を出血局所で放出することで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。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、これに肝臓器損傷を作製、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に、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止血効果を検討する必要があった。昨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。しかし、H12(ADP)リポゾームの出血後の投与では、救命率が60%に留まっていた。肝臓出血後に治療を行う本モデルは極めて重篤な出血病態モデルであり、凝固因子のfibrinogenが各群のいずれの症例でも測定限界以下であった。H12(ADP)リポゾームの投与により血小板血栓は形成されたものの凝固因子の極端な欠乏によりうまく止血制御機構が働かなかった可能性もあり、これを解明するためにもfibrinogenを補充した上で、H12(ADP)リポゾームの事後投与効果を検討した。

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Dextran sulfate 12.5 mL/kg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生理食塩水(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、各種検査項目の採血を

行い、その後に開腹し肝臓に径 5mm の Derma punch を用いて組織損傷を作製した。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肝損傷を作製した(Fig. 3A)。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. 3B)。本モデルの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 分間の圧迫では全く止血されないことをあらかじめ確認している。

4. H12(ADP)リポゾームの投与と PRP、PPP、H12(PBS)リポゾームの投与、および H12(ADP)リポゾームへの fibrinogen 製剤の添加投与

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)。さらに fibrinogen の補充を目的に fibrinogen 製剤 (Haemocompletan, CSL Behring, Marburg) を 70 mg/kg で H12(ADP)リポゾーム投与に続いて行った群を作製した (n=6, Fig. 4)。

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

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)、さらに肝損傷作成 20 分後 (バルーン圧迫解除 15 分後) に採血し、測定に供した。

5.3. 凝固線溶系因子の測定

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) に採血し、fibrinogen や Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), antithrombin III (AT III) などの各種凝固線溶系因子を測定した。

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 (これらは全例死亡した)。

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。

5.7. 薬物投与後の重要臓器の病理学的所見

薬物投与終了 24 時間後に家兎を解剖し、血栓の有無を検索した。さらに肺、肝、腎をホルマリン固定後、H.E.染色を施行し、微小血栓の有無、病理組織学的所見の有無を検討した。

C. 研究結果

1. 肝臓器出血の予後

H12(ADP)リポゾームの事後投与群では生存率は 60%であったが、PRP の事後投与群の生存率は 50%で、事後投与での救命効果は H12(ADP)リポゾームと PRP でほぼ同等であった。一方、PPP の事後投与群は 10%の生存率に留まった。H12(PBS)リポゾームの事後投与でも PPP 事後投与群と同様に生存率は 12%程度であった。H12(ADP)リポゾームの事後投与に fibrinogen を添加投与（事後投与）しても 6 例中 2 例しか救命出来ず生存率は 33%に留まり、fibrinogen 補充による H12(ADP)リポゾーム投与群の予後改善効果は認められなかった(Fig. 5)。

2. 肝臓器出血量

肝臓器作製後に 5 分間のバルーン圧迫止血を行う間に各種止血用輸血製剤の投与を行ったが、さらにその後の 5 分間の肝臓器作製部からの出血量を測定したところ、H12(ADP)リポゾーム事後投与群では PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群と比べて出血量が有意に少なく、PRP 事後投与群と比べてもさらに少ない傾向

にあった(Fig. 4)。H12(ADP)リポゾームの事後投与に fibrinogen を添加投与（事後投与）した群でも H12(ADP)リポゾーム投与群と同程度に出血量は少なく抑えられていた(Fig. 6)。

3. 肝臓器出血時間

PPP 事後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)リポゾーム事後投与群では PRP 事後投与群と同様に、肝臓器作製から 25 分前後でほとんどの症例で止血が認められた(Fig. 7, 8)。H12(PBS)リポゾームの事後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. 8)。H12(ADP)リポゾームの事後投与に fibrinogen を添加投与（事後投与）した群では、全例で 40 分以内に止血が完了し顕著な止血効果が認められたが、生存したのは止血に 30 分以上かかった 2 例で、30 分以内に止血が完了した 4 例は全例死亡しており、止血までの時間と最終的な生存率が相関しなかった(Fig. 8)。

4. 動脈圧やヘモグロビン濃度、血小板数

4.1. 動脈圧

脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態では血小板数が $45 \pm 2 \times 10^3 / \mu\text{L}$ と 5 万以下になったものの、平均動脈圧は保たれていた(Table 1)。しかし肝臓器出血を作製した 20 分後では各群共に血圧が低下していた(Table 2)。一方、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改善していた(Table 2)。PRPの事後投与でも同様に血圧低下は回避されており(Table 2)、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(Table 2)、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て血圧が低下し、ほとんどの家兎が死に至った。H12(ADP)リポゾームにfibrinogenを添加投与した群では、H12(ADP)リポゾームやPRPの事後投与群と同様に血圧低下が抑制されていた(Table 2)。

4.2. ヘモグロビン濃度

脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態ではヘモグロビン濃度も 6.4 ± 0.4 g/dLと、血小板数と同様に低下していた(Table 1)。肝臓器出血後のヘモグロビン濃度の低下はH12(ADP)リポゾーム事後投与群ではPRP事後投与群と同様に出血量が抑制されたためPPP事後投与群やH12(PBS)リポゾーム事後投与群のような低下は認められなかったが、平均で5.2 g/dL程度と肝臓器出血前に比べるとさらに低下していた(Table 2)。一方、H12(ADP)リポゾームにfibrinogenを添加投与した群では、ヘモグロビン濃度が 5.8 ± 0.7 g/dL

と群間で最も高い値であり、顕著な止血効果が示唆された。

4.3. 血小板数

血小板数は脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態作製で $45 \pm 2 \times 10^3 / \mu\text{L}$ と顕著に低下した(Table 1)。肝臓器出血20分後ではPRP事後投与群でのみ増加に転じて高値を呈していたが、H12(ADP)リポゾーム事後投与群ではPPP事後投与群と同程度に留まっていた(Table 2)。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。H12(PBS)リポゾーム事後投与群では血小板数は低値を示し、有効な止血が出来なかったことを示唆させるが、H12(ADP)リポゾームにfibrinogenを添加投与した群でも血小板数は 5.0 ± 4 g/dLとH12(ADP)リポゾーム事後投与群より低値を呈しており、予後改善効果がなかったことを考える上で示唆に富む所見であった。

5. 各種凝固線溶系因子

脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態作製後では、fibrinogen値は測定感度以下にまで低下していた(Table 1)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値は測定感度以下のままで極めて低い値で推移した(Table

2) しかし、H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では 102 ± 20 mg/dL と顕著な改善を認め、凝固因子が効果的に補充されていた。Prothrombin time (PT)も、急性血小板減少病態作製後では測定限度以上に延長していた (Table 1)。肝臓器出血後はH12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群、さらに H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群で測定範囲内にまで低下改善したがいずれも延長は認められた (Table 2)。APTT は急性血小板減少病態作製後、そして肝臓器出血後の各種薬剤投与後でも各群共に計測し得ないほど延長していた。AT III 活性は急性血小板減少病態作製後、顕著に低下していたが (Table 1)、肝臓器出血 20 分後では H12(ADP)リポゾーム事後投与群や PRP 事後投与群で、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群に比し有意に高値を呈していた (Table 2)。H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では AT III 活性が肝臓器出血 20 分後、各群間で最も高値となり線溶活性の改善も示唆された (Table 2)。

6. ソノクロットによる血栓形成能の評価

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、急性血小板減少病態作製後は顕著に延長していた (Table 1)。H12(ADP)リポゾーム事後投与群では PRP

事後投与群と同様に肝臓器出血 20 分後に短縮が認められたのに対し (Table 2)、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群では明らかに延長していた (Table 2)。興味深いことに、H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では最も短縮が認められ、凝固能が改善していたことが示唆された (Table 2)。血栓形成の速度でもある clot rate も急性血小板減少病態作製後は顕著に低下していた (Table 1)。H12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群共に肝臓器出血 20 分後には改善を認めたが、とくに H12(ADP)リポゾーム事後投与群で改善を認めた (Table 2)。一方、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群では低値のままであった (Table 2)。H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では clot rate の著しい改善を認め、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群のみならず、H12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群に比しても顕著な改善を認め注目された (Table 2)。

7. 肺、肝、腎での病理組織学的変化

各種薬剤投与 24 時間後の各臓器での病理学的所見を検討した。PPP 事後投与群では救命例の肺で肺泡中隔の軽度肥厚を、肝で肝細胞の軽度の変性所見を認めたが、H12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群を含むいずれの群でも微小血栓の形成は認められなかった (Fig. 9)。さらに

H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群でも微小血栓をはじめ、血栓形成は皆無であった(Fig. 9)。

D. 考察

昨年度は実臨床での使用を念頭に、急性血小板減少病態を作製した家兎にあらかじめ肝臓器出血を作製し、この出血に対して圧迫止血と共に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が、H12(ADP)リポゾームの事後投与では PRP 事後投与と同程度の救命効果が得られたものの救命率は 60%に留まり、事前投与時の 100%より下がっていた。凝固因子である fibrinogen が各群いずれも測定限界以下であったことから、事後投与では肝臓器出血が先行するため、出血病態がより重篤化してしまうことが一因と考えられた。そこで、生存率を向上させるために、凝固因子の補充を目的に fibrinogen を H12(ADP)リポゾームの事後投与と合わせて行い、予後や臓器出血への効果を検討した。

脱血と赤血球成分のみの返血で作製した急性血小板減少病態では、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。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、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、fibrinogen 値は H12(ADP)リポゾーム事後投与群や PRP 事後投与群でも測定限界以下であり、前述のように fibrinogen がある程度補充されている状態での H12(ADP)リポゾームの事後投与の効果を検討した。Fibrinogen の添加投与により、fibrinogen 値の上昇と AT III 活性の上昇が認められ、clotting rate も上昇し、凝固線溶系の改善と凝固能の促進が推察されたが、予後の改善は認められなかった。各群とも重度の貧血状態であったことから、予後不良の原因は凝固因子の不足だけではなく、貧血など他の因子の関与が推測された。

E. 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)リポゾームを投与すると、臓器出血に対する止血救命効果が得られたが、救命率は60%に留まった。

4. 本研究では出血後の止血薬剤投与となるため出血病態が重篤化しており、PPPを投与するも fibrinogen は測定限界以下にまで低下していた。そこで fibrinogen を H12 (ADP) リポソームと共に添加投与したが、凝固因子の上昇は認められたものの予後の改善は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

1. Sato A, Nakashima H, Nakashima M, Ikarashi M, Nishiyama K, Kinoshita M, Seki S: Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/macrophages in CCl₄-induced acute hepatic injury. PLoS ONE 2014.
2. Ito Y, Kinoshita M, Yamamoto T, Sato T, Obara T, Saitoh D, Seki S, Takahashi Y. A combination of pre- and post-exposure ascorbic acid rescues mice from radiation-induced lethal gastrointestinal damage. Int. J. Mol. Sci. 14; 19618-35, 2013.
3. Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Sato A, Nakashima M, Miyazaki H, Nishiyama K, Yamamoto J, Seki S.

Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. J. Leukocyte. Biol. 94; 1325-36, 2013.

4. Takigawa T, Miyazaki H, Kinoshita M, Kawarabayashi N, Nishiyama K, Hatsuse K, Ono S, Saitoh D, Seki S, Yamamoto J. Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid on liver lymphocytes in mice. Am J Physiol-Gastr L 305; G427-38, 2013.
5. Hagisawa K, Saito A, Kinoshita M, Fujie T, Otani N, Shono S, Park YK, Takeoka S: Effective control of massive venous bleeding by “multi-overlapping therapy” using polysaccharide nanosheets in rabbit inferior vena cava injury model. J. Vasc. Surg: Venous and Lymphatic Disorders. 1; 289-297, 2013.
6. Maemura T, Shin M, Kinoshita M: Tissue Engineering of the Stomach. J Surg Res 183; 285-295, 2013.
7. 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 36; 781-792, 2013.
8. 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.* 89;679-682, 2013.
9. 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.
 10. 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.* 131; 236-240, 2013.
 11. 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* 2013.
 12. 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.* 25; 545-551, 2013.
 13. Otani N, Kinoshita M, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Saitoh D, Hagiwara K, Nawashiro H, Shima K. Novel therapeutic usage of polysaccharide nanosheets for arachnoid plasty and reinforcement of venous tensile strength in rat microneurosurgery. *J. Clin. Neurosci.* 20; 301-305, 2013.
- (総説)
1. 木下 学: 人工血液、人工血小板の臨床応用. *A net.* 18 ; 14-17, 2013.
 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.* 93; 689-698, 2013.
 3. 西川可穂子、萩沢康介、柳川錬平、土井麻実、鈴木英紀、齋藤大蔵、阪本敏久、武岡真司、半田誠、木下 学: 人工血小板 H12(ADP)リポソームを用いた急性血小板減少病態への止血・救命対策. *人工血液* 21: 60-67, 2013.
 4. 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.
 5. 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・影響.* 47; 31-39, 2013.
2. 学会発表
1. Hagiwara K, Kinoshita M, Nishikawa K, Nishida Y. Treatment with Fibrinogen γ -chain Peptide-coated, Adenosine

- Diphosphate-encapsulated Liposomes as An Infusible Haemostatic Agent for Dilutional Coagulopathy. American Heart Association 2013. Resuscitation Science Symposium, (Young Investigator Award 受賞) Dallas final program p153 2013; 128: A357
2. 木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川鍊平、小野 聡、齋藤大蔵、高瀬凡平、酒井宏水、半田誠、武岡真司、関修司：人工赤血球や人工血小板などの血液代替物の開発とその将来展望. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 (パネルディスカッション 1-3) 2014, 京都.(日本外科学会雑誌, p168: 115, 2014)
 3. 萩沢康介、木下 学、宮脇博基、佐藤俊一、鈴木英紀、土井麻実、武岡真司、齋藤大蔵、西田育弘：H12(ADP)liposome の新たな適応：衝撃波による肺出血に対する H12(ADP)liposome の救命効果. 第 20 回日本血液代替物学会 (シンポジウム 2-5) 2013, 奈良. (人工血液 p25: 21, 2013)
 4. 土井麻実、木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川鍊平、半田 誠、池田康夫、武岡真司：人工血小板 H12(ADP)liposome の止血能評価 (臓器損傷後投与による検討) . 第 20 回日本血液代替物学会 (シンポジウム 2-3) 2013, 奈良. (人工血液 p23: 21 2013)
 5. 高瀬凡平、東村悠子、田中良弘、木下学：出血性ショック心臓における致死性不整脈発生機序及び人工酸素運搬体による治療効果に関する検討. 第 20 回日本血液代替物学会 2013, 奈良. (人工血液 p28: 21 2013)
 6. 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川鍊平、土井麻実、武岡真司、齋藤大蔵、関 修司、西田育弘、半田 誠：大量出血後の血小板減少状態下での肝外傷出血に対する H12(ADP)リボソーム投与の止血救命効果. 日本血栓止血学会第 85 回学術集会、山形
 7. 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川鍊平、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)
 8. 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

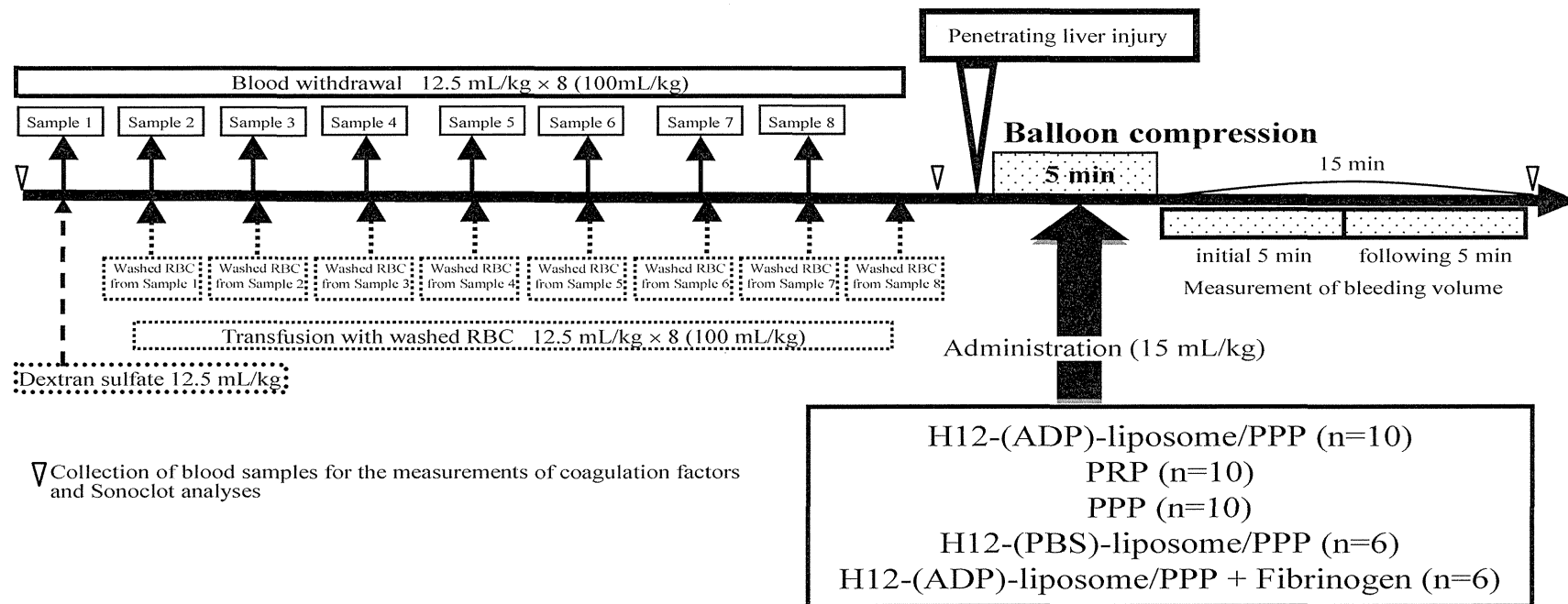


Fig. 1. Experimental design for acute thrombocytopenia and subsequent non-compressible liver hemorrhage in rabbits