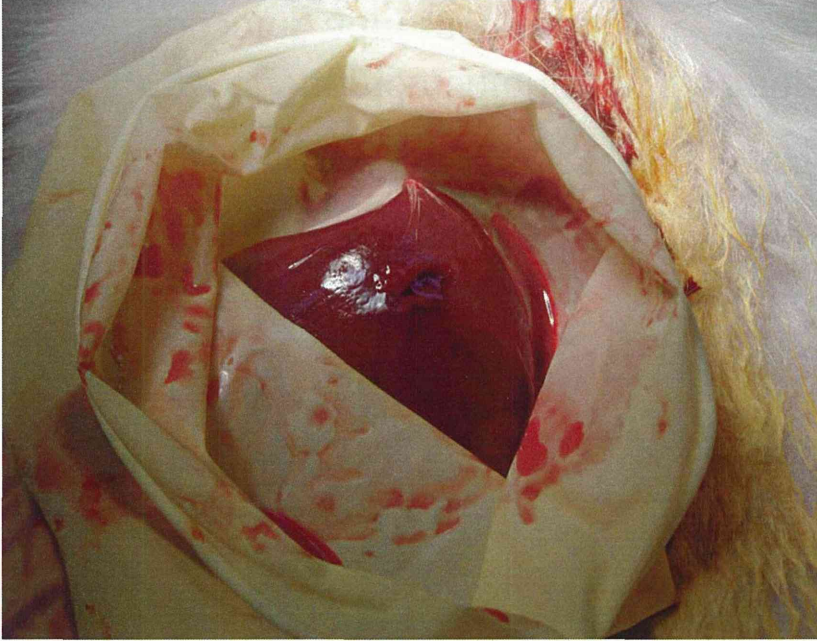


Fig. 2. Preparations of PRP, PPP and washed RBC, and transfusion of washed RBC

A



B

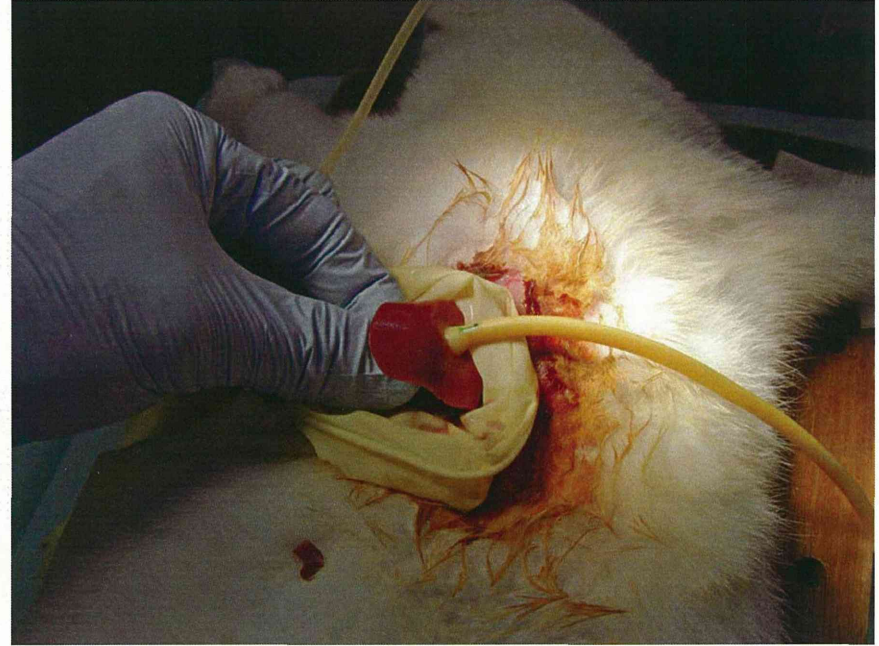


Fig. 3. Penetrating liver injury (A) and balloon compression (B)

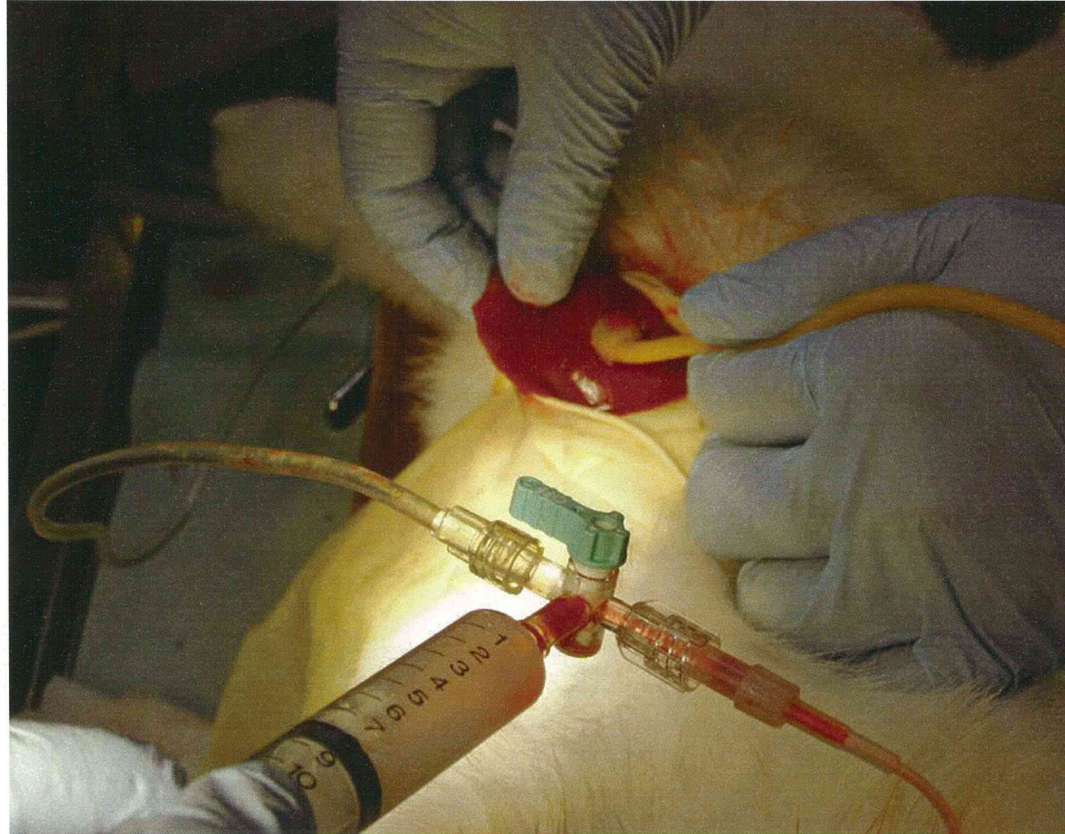


Fig. 4. Supplementation of fibrinogen concentrate following H12-(ADP)-liposome administration

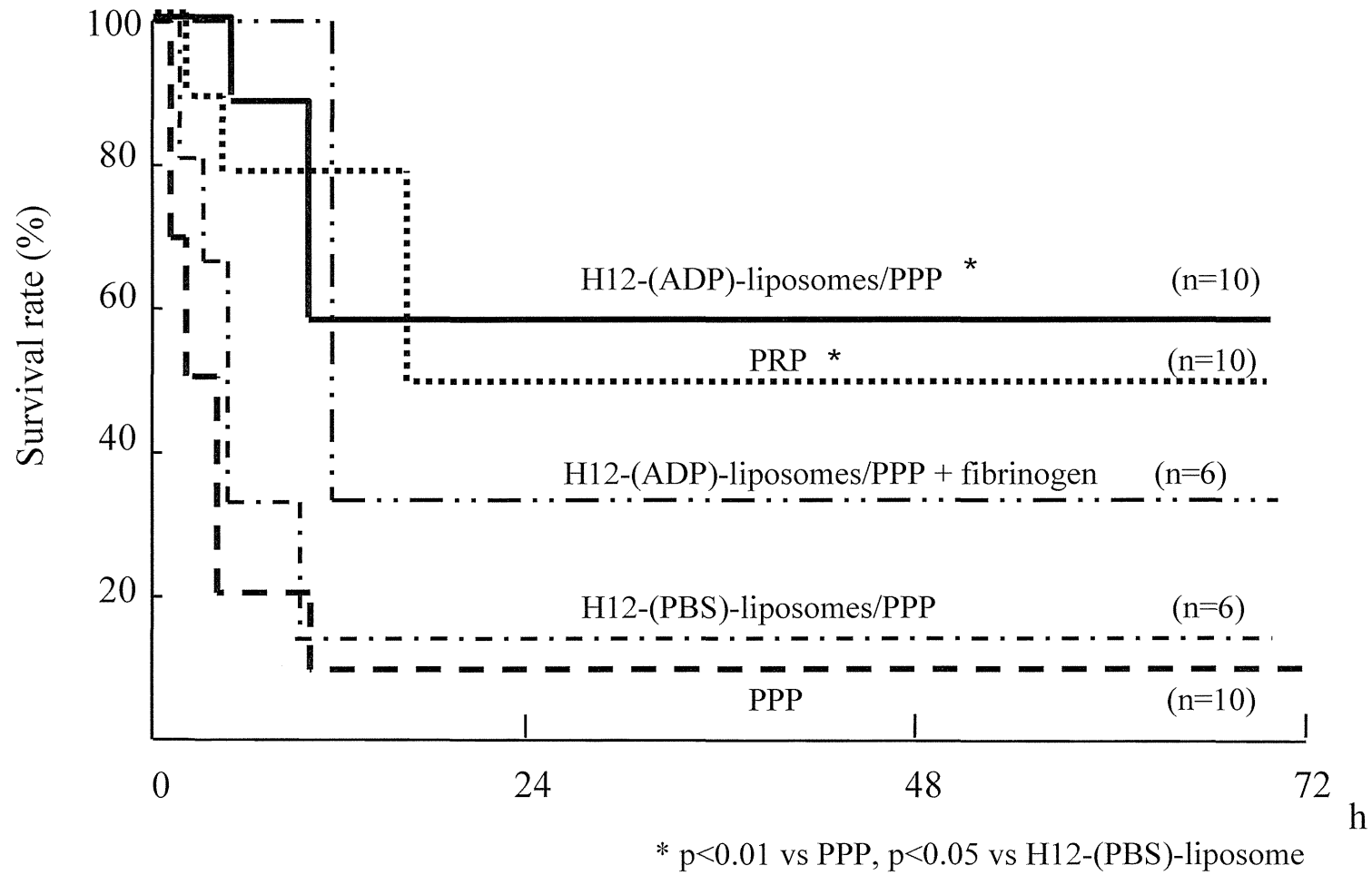


Fig. 5. The effect of additional injection with fibrinogen to H12-(ADP)-liposomes on the survivals in thrombocytopenic rabbits after liver injury

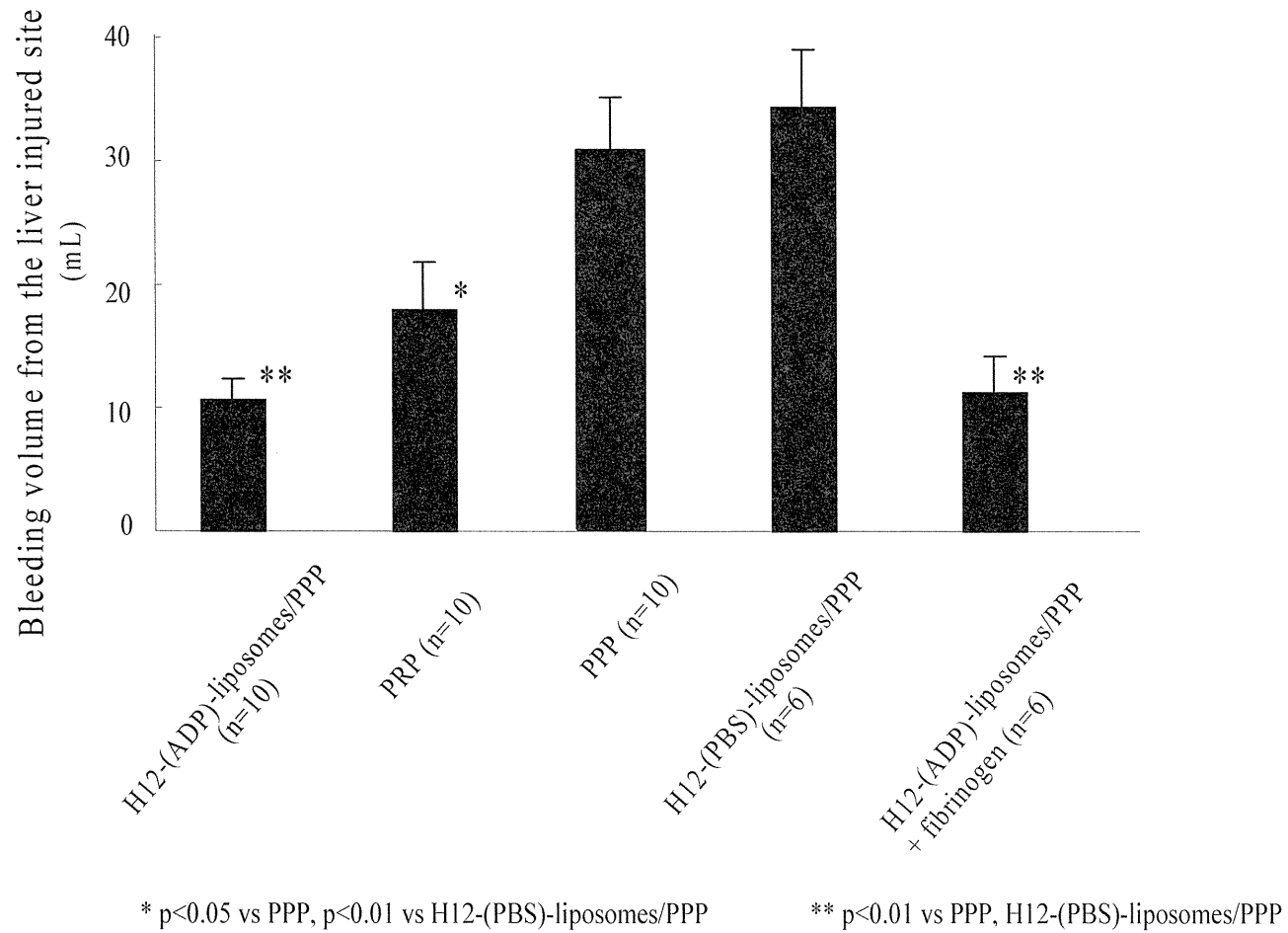


Fig. 6. The effect of additional injection with fibrinogen to H12-(ADP)-liposomes on the bleeding volume from the liver injury site in the thrombocytopenic rabbits

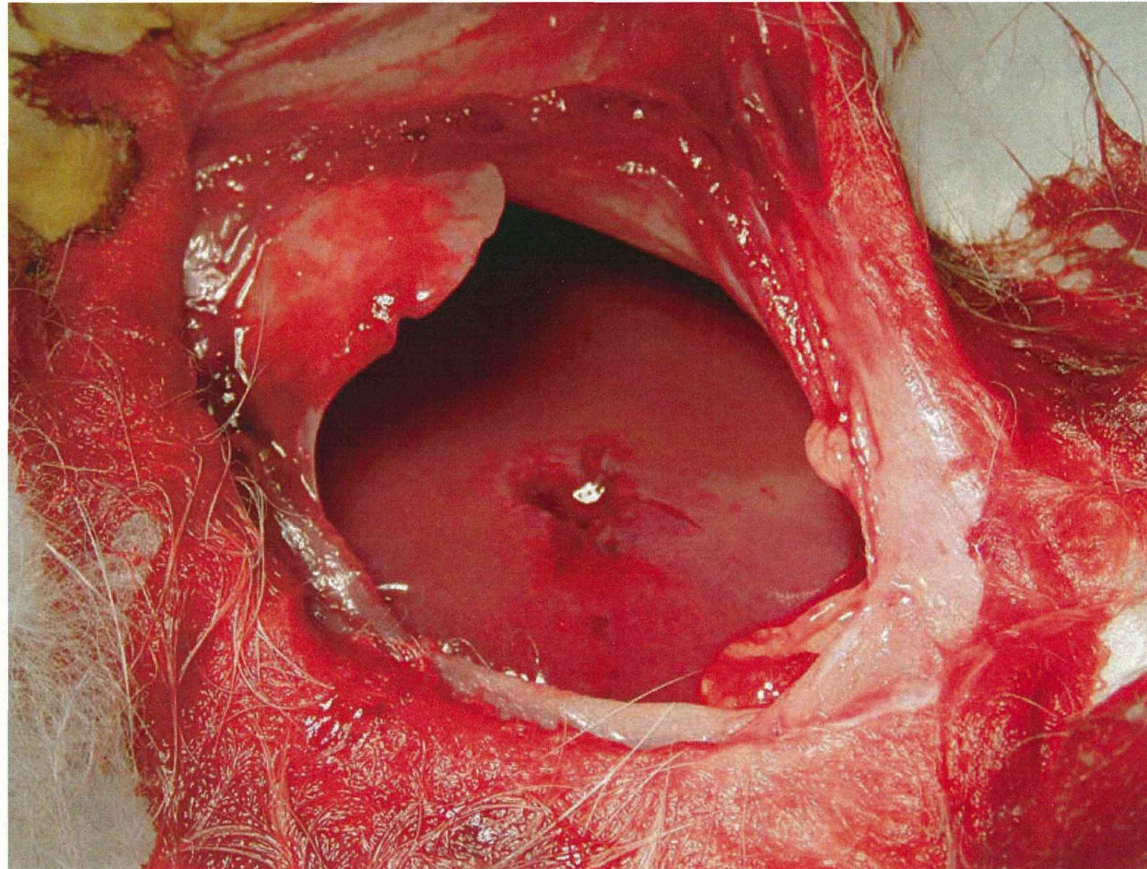


Fig. 7. Hemostasis at the liver injured site after administration with H12-(ADP)-liposomes in the thrombocytopenic rabbits

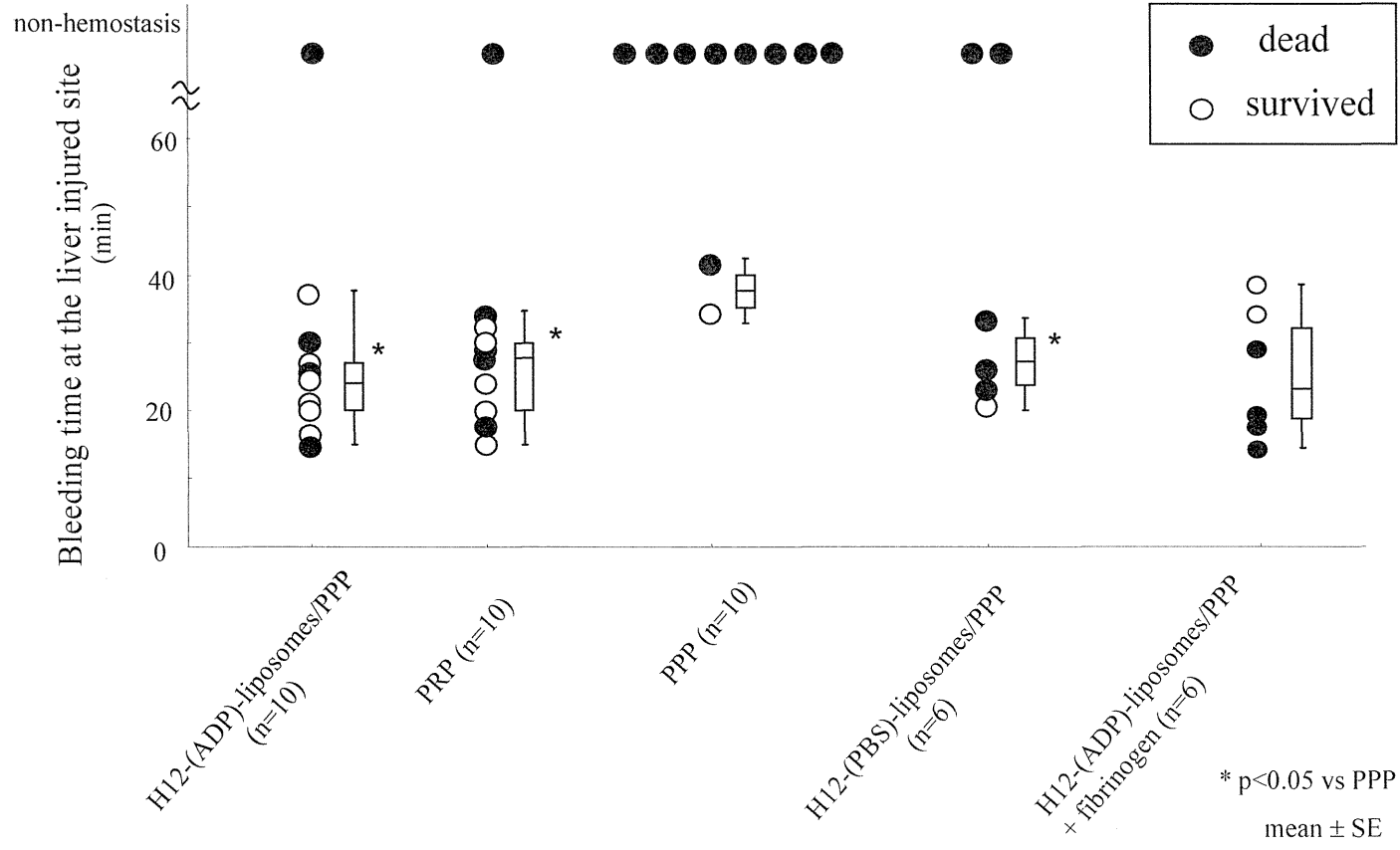


Fig. 8. The effect of additional injection with fibrinogen to H12-(ADP)-liposomes on the bleeding time from the liver injury site in the thrombocytopenic rabbits

Table 1. Changes in the hemotological parameters and coagulation factors in rabbits before and after blood exchange

	Before blood exchange (n=42)	After blood exchange (n=42)
Mean arterial pressure (mmHg)	95 ± 5	93 ± 3
Hemoglobin concentrations (g/dL)	10.0 ± 0.5	6.4 ± 0.4 *
Platelet counts (× 10 <sup>3</sup> /μL)	201 ± 12	45 ± 2 *
Fibrinogen concentration (mg/dL)	186 ± 6	Not detected
AT III activity (%)	114 ± 2	34 ± 2 *
PT (sec)	10 ± 1	Not detected
APTT (sec)	24 ± 2	Not detected
Clotting time (CT) (sec)	116 ± 2	360 ± 29 *
Clotting rate (CR) (sec)	18 ± 1	2.0 ± 0.2 *

Hematological parameters and coagulation factors were measured in rabbits before and after blood exchange. Data are mean ± SE, \* p<0.01 vs before blood exchange.



Table 2. Hemotological parameters and coagulation factors/activities in rabbits 20 min after liver injury

	H12-(ADP)-liposomes/PPP (n=10)	PRP (n=10)	PPP (n=10)	H12-(PBS)-liposomes/PPP (n=6)	H12-(ADP)-liposomes/PPP + fibrinogen (n=5)
Mean blood pressure (mmHg)	59 ± 7	59 ± 4	41 ± 5 **	39 ± 5 †	57 ± 6
Hemoglobin concentrations (g/dL)	5.2 ± 0.7	5.1 ± 0.8	3.1 ± 0.3 *	3.8 ± 0.6	5.8 ± 0.7
Platelet counts (× 10 <sup>3</sup> /μL)	55 ± 4	70 ± 6 *	54 ± 3	48 ± 6	50 ± 4
Fibrinogen concentration (mg/dL)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	102 ± 20
AT III activity (%)	39 ± 3	41 ± 5	24 ± 4 *	24 ± 4 *	46 ± 10
PT (sec)	13 ± 2	14 ± 1	Not detected	Not detected	14 ± 1
Clotting time (CT) (sec)	270 ± 20	306 ± 29	448 ± 46 *	461 ± 80 *	253 ± 53
Clotting rate (CR)	2.9 ± 0.6	2.5 ± 0.5	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.1	5.0 ± 1.5 *

Hematological parameters and coagulation factors were measured in rabbits 20 min after liver injury (followed by administration of H12-(ADP)-liposomes/PPP, PRP, PPP, H12-(PBS)-liposomes/PPP or H12-(ADP)-liposomes/PPP + fibrinogen). Data are mean ± SE, \*\* p<0.01, \*p<0.05 vs H12-(ADP)-liposomes/PPP, PRP or H12-(ADP)-liposomes/PPP + fibrinogen. † p<0.05 vs H12-(ADP)-liposomes/PPP+fibrinogen

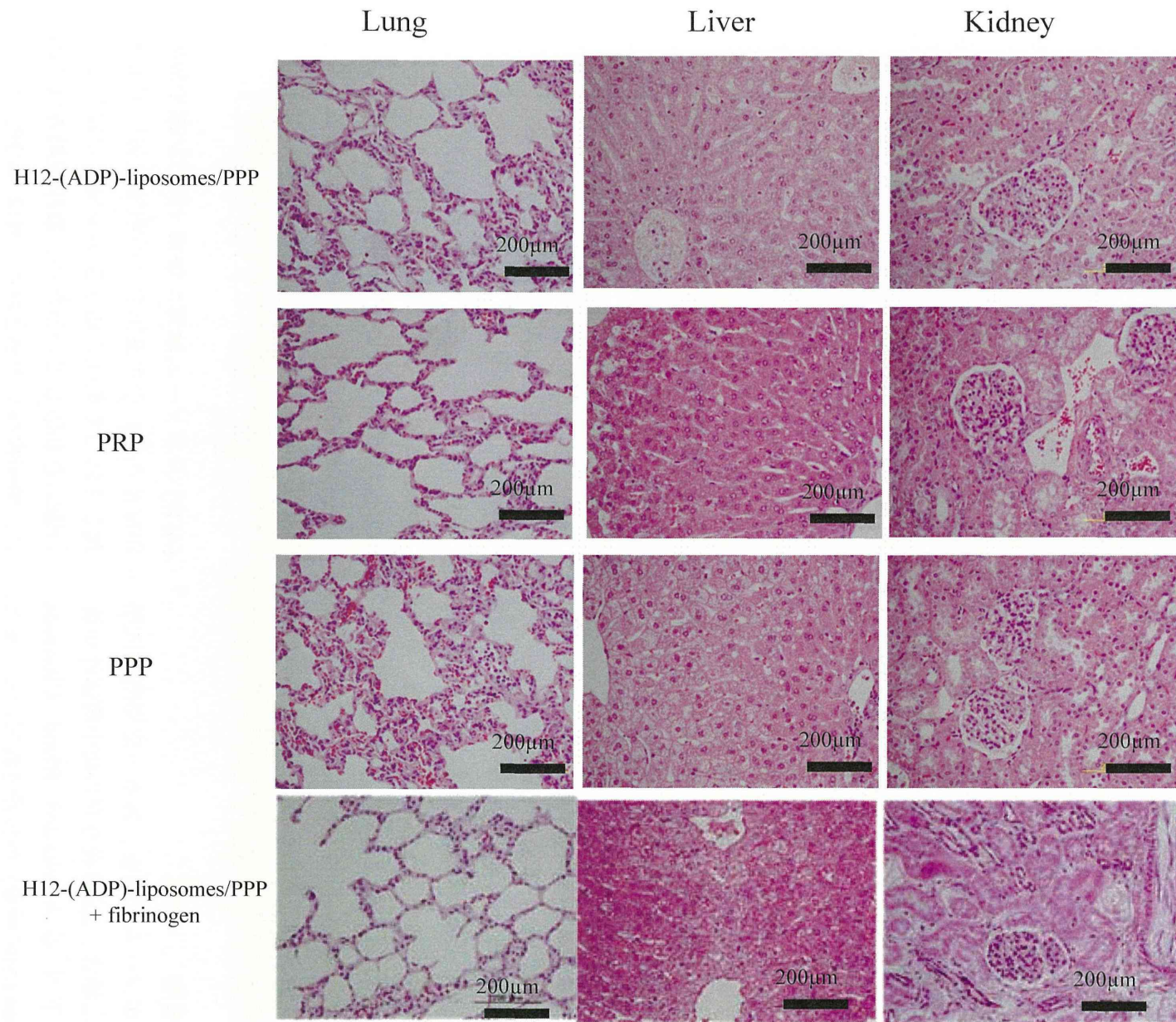


Fig. 9. Pathological findings of the lung, liver and kidney in the thrombocytopenic rabbits

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

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（熊本大学大学院薬学教育部 薬剤学研究室 教授）

**研究要旨**

近年、脂質膜表面を PEG 修飾したリポソームにおいて、2 回目に投与した同一リポソームのクリアランスが 1 回目投与時と比べて著しく増大する Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC 現象) が報告されている。人工血小板である H12 (ADP) リポソームも PEG リポソームであるため、頻回投与時に ABC 現象の誘導が懸念される。H12 (ADP) リポソームはガン治療に伴う血小板減少症に対する適応の際は、頻回投与が予想されるため、頻回投与時における体内動態の評価は必要不可欠である。そこで本研究では、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時の ABC 現象誘導の可能性について健常ラット及びブスルファン誘発血小板減少モデルラットにおいて検討した。その結果、H12 (ADP) リポソームを健常ラットに 10 mg lipid/kg 投与した際には、ABC 現象の誘導に関与する抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の産生が確認され、さらに体内動態評価においても ABC 現象が確認された。一方、ブスルファン誘発血小板減少モデルラットにおいては、抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の産生はほとんど確認されず、それに伴い体内動態評価においても ABC 現象は確認されなかった。今回得られた知見より、健常人に H12 (ADP) リポソーム頻回投与した場合には ABC 現象が誘導される可能性が示唆されたが、臨床現場において実際に頻回投与が想定される抗がん剤治療に伴う血小板減少時には ABC 現象は誘導されないと考えられた。ただし、H12 (ADP) リポソームは抗ガン剤に起因する血小板減少症以外にも大量出血後の輸血により引き起こされる希釈性の血小板減少症においても臨床適応される可能性は高いため、様々な血小板減少モデル動物における知見を蓄積していく必要であると考えられる。

**A. 研究目的**

近年、リポソーム製剤を、ある一定期間内に頻回投与した場合、2回目投与時の血中滞留性が著しく低下する Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC現象) が報告されている。また、このABC現象の誘導には初回リポソーム投与後に脾臓より産生される、抗リポソーム IgMが強く関与していることが明らかとなっている。H12

(ADP) リポソームはガン治療（抗ガン剤や放射線療法など）や大量出血後の輸液において引き起こされる希釈性の血小板減少症などに対しての適応を目指しているため、臨床使用された場合、頻回投与が予想される。H12 (ADP) リポソーム頻回投与時にH12 (ADP) リポソームの体内動態が変動することにより、H12 (ADP) リポソームの薬理作用の変動や予期せぬ副作用の原因

になり得るため、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時における体内動態の詳細な把握は、臨床試験に向けた重要な基盤情報となる。

そこで本研究では、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時のABC現象誘導の可能性について明らかにすることを目的とし、健常ラット及びブスルファン誘発血小板減少モデルラットにおいて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 動物

SD系雄性ラット (6週齢、180~200 g) は九動より購入し、1週間の予備飼育後、7週齢で実験に使用した。

### 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. ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットの作成

SD ラットに PEG (分子量 400) に溶解したブスルファンを 10 mg/kg の投与量で投与 0 日目及び 3 日目に合計 20 mg/kg 腹腔内投与し、10 日間飼育することでブスルファン誘発血小板減少モデルラットを作成した。

### 4. 抗 H12 (ADP) リポソーム IgG 及び IgM の検出

SD系雄性ラットまたはブスルファン誘発血小板減少モデルラットに、エーテル麻酔下において、H12 (ADP) リポソームを 10 mg lipid/kg で尾静脈より投与し、投与後 1~7、10、14 日後にヘパリン処理したシリンジで尾静脈から採血後、3000 rpm で遠心分離を行い、血漿を得た。残存 H12 (ADP) リポソームを除去するために超遠心

処理 (100000 g、40 分)を行い、その上清を血漿サンプルとした。96 well プレートに H12 (ADP) リポソームを固定化し、アルブミン溶液で blocking 後、希釈した血漿サンプルを添加し、37°C、1 時間インキュベートした。wash 後、Horseradish peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG または peroxidase-labeled affinity purified antibody to mouse IgM を添加し 37°C、1 時間インキュベートした。o-phenylene diamine で発光後、490 nm の吸光度で評価した。

### 5. <sup>3</sup>H ラベル化法

<sup>14</sup>C- H12 (ADP) リポソーム 1 mL と Cholesterol, [1,2-<sup>3</sup>H(N)]- 10 μL を混合し、12 時間室温で放置することにより標識を行い、<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C- H12 (ADP) リポソームもしくは <sup>3</sup>H-H12 (ADP) リポソームを作成した。また、投与液は <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C 標識体を非標識体で希釈して調製した。

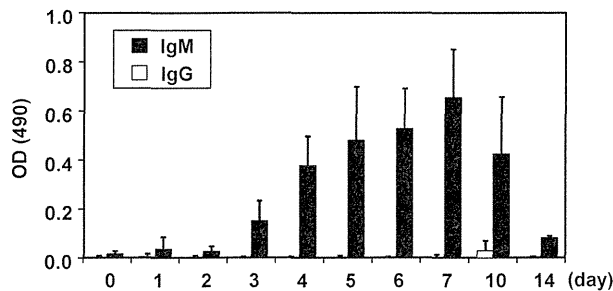
### 6. 体内動態実験

SD系雄性ラットまたはブスルファン誘発血小板減少モデルラットに非標識 H12 (ADP) リポソーム (10 mg lipid/kg) を投与した。投与 5 日後に <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C- H12 (ADP) リポソームを 10 mg lipid/kg の用量で尾静脈内投与した。規定時間毎に尾静脈から採血を行い、遠心分離により血漿を採取した。得られた血液、血漿を、soluene-350 / イソプロピルアルコール (1 : 1) 混合液で可溶化後 (50°C、24 時間)、過酸化水素で脱色し、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) を加え、放射活性を測定した (LSC-5121、アロカ)。摘出した臓器は、秤量した後、その一部を soluene-350 で可溶化後 (50°C、24 時間)、血液と同様の処理により放射活性を測定した。

## C. 結果

### 1. 健常ラットにおける抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の検出

SD系雄性ラットに、H12 (ADP) リポソームを10 mg lipid/kgで尾静脈より投与後1~7、10、14日目に抗H12 (ADP) リポソーム IgG及びIgM産生の確認を行った。その結果、抗H12 (ADP) リポソーム IgGの産生は確認されず、抗H12 (ADP) リポソーム IgMの産生が確認された (Fig. 1)。



**Fig.1**  
Production of IgG and IgM against H12 (ADP) liposome in healthy rats after H12 (ADP) liposome injection at a dose of 10 mg lipid/kg.

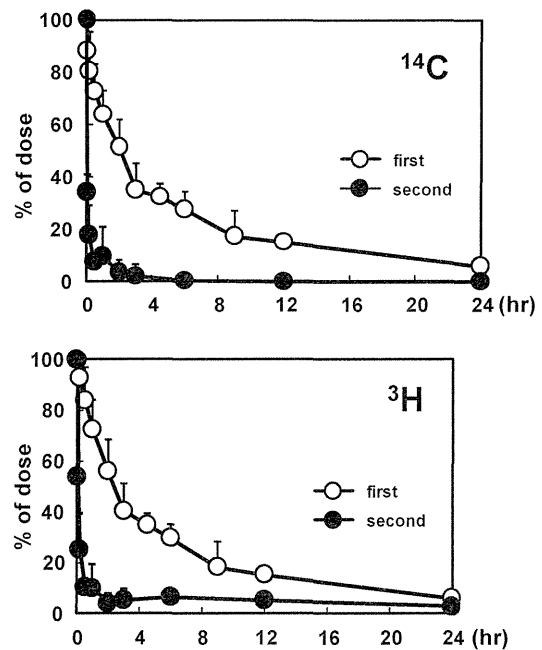
### 2. 健常ラットにおける体内動態評価

次に、抗H12 (ADP) リポソーム IgMの上昇が確認された初回投与から5日目における体内動態を検討した。その結果、<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>Cともに初回投与時と比較して2回目投与時では著しい血中濃度の低下が確認された (Fig. 2)。また、投与後2時間による各臓器分布を比較検討したところ、2回目投与時ではH12 (ADP) リポソームの主要分布臓器である肝臓への高い集積が確認された (Fig. 3)。これらの結果は、これまで報告されているABC現象の特徴を良く反映していた。以上の結果より、健常ラットにおいてABC現象が誘導されることが明らかとなった。

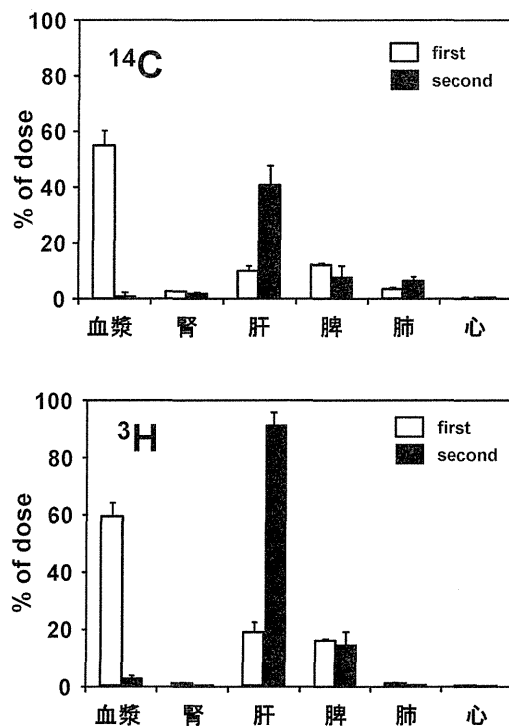
### 3. ブスルファン誘発血小板減少モデルラットにおける抗H12 (ADP) リポソーム IgMの検出

ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットに、H12 (ADP) リポソームを10 mg lipid/kgで尾静脈投与後1~7、10、14日目の抗H12 (ADP) リポソーム IgG及びIgM産生の確認を行った。その結果、健常ラットとは異なり、抗H12 (ADP) リポソ-

ーム IgG及びIgMの産生はほとんど確認されなかった (Fig. 4)。



**Fig. 2.**  
Plasma concentration curve of <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C labeled H12 (ADP) liposome after the first injection or the second injection of <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C labeled H12 (ADP) liposome to healthy rats at a dose of 10 mg lipid/kg.



**Fig. 3**

Tissue distributions of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  labeled H12 (ADP) liposome at 2 h after administration to healthy rats at a dose of 10 mg lipid/kg.

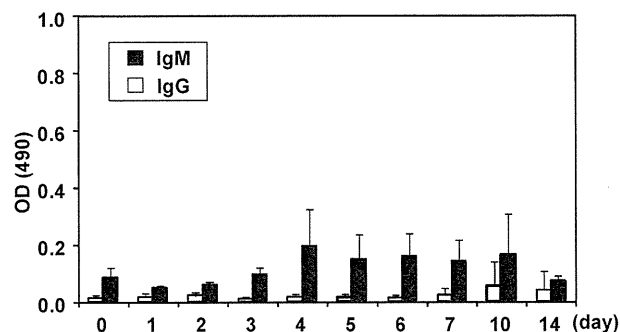


Fig.4 Production of IgG and IgM against H12 (ADP) liposome in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model after H12 (ADP) liposome injection at a dose of 10 mg lipid/kg.

#### 4. ブスルファン誘発血小板減少モデルラットにおける体内動態評価

最後に、健常ラットと同様に血小板減少モデルラットにおいて、非標識H12 (ADP) リポソーム初回投与から5日目に $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ - H12 (ADP) リポソームを投与し、体内動態を検討した。その結果、抗H12 (ADP) リポソームIgMの上昇がほとんど確認されなかったことを反映し、2回目投与時においても $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ともに初回投与時と同等の血中濃度推移が確認された (Fig. 5)。また、投与2時間後に初回投与時と2回目投与時の肝臓への集積量に大きな変化はなかった (Fig. 6)。以上の結果より、抗ガン剤投与に由来する血小板減少モデルラットにおいてはABC現象が誘導されないことが明らかとなった。

#### D. 考察

人工血小板であるH12 (ADP) リポソームの臨床使用を考えた場合、頻回投与の可能性は十分に想定されるため、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時の体内動態を把握することは重要であるが、これまでに検討した報告はない。そこで、今年度は健常ラット及びブスルファン誘発血小板減少モデルラットにおいてH12 (ADP) リポソーム

頻回投与時におけるABC現象誘導に関する検討

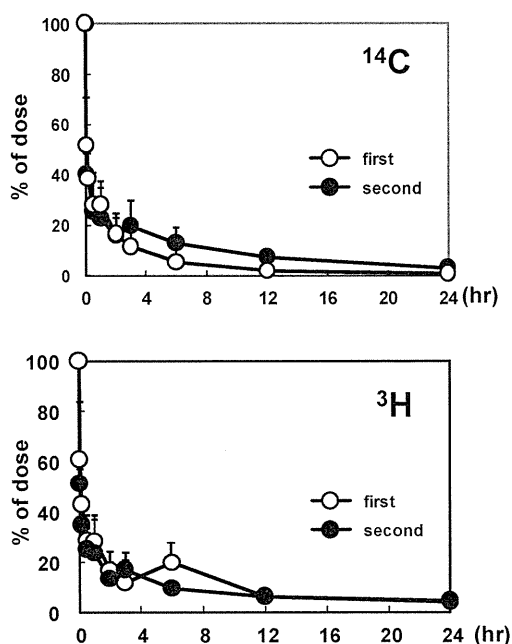


Fig. 5 Plasma concentration curve of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  labeled H12 (ADP) liposome after the first injection or the second injection of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  labeled H12 (ADP) liposome to anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model at a dose of 10 mg lipid/kg.

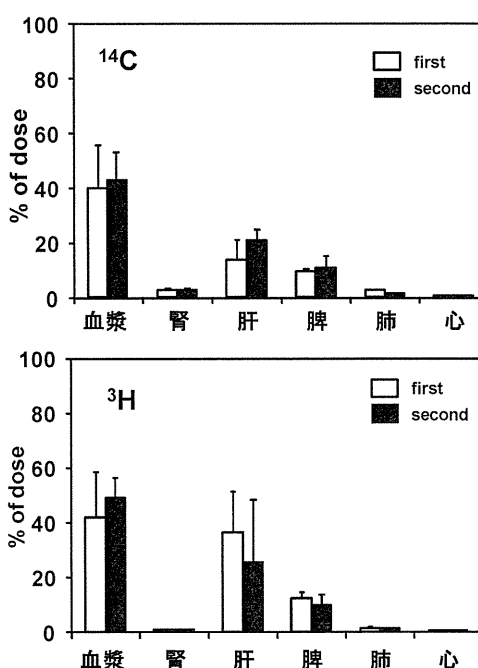


Fig. 6 Tissue distributions of  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  labeled H12 (ADP) liposome at 2 h after administration to anticancer drug-induced thrombocytopenia rat at a dose of

## 10 mg lipid/kg.

を行った。その結果、健常ラットにおいてはH12 (ADP) リポソーム投与後、ABC現象誘導の原因とされている抗H12 (ADP) リポソーム IgMの産生が確認された。また、これを反映するように初回投与5日後に再度H12 (ADP) リポソームを投与すると、急激な血漿中濃度の低下及び肝臓への高い集積が起り、ABC現象が誘導された。一方、ブスルファン誘発血小板減少モデルラットでは、抗H12 (ADP) リポソームIgMの産生はほとんど確認されず、実際にブスルファン誘発血小板減少モデルラットに初回投与5日後に繰り返し投与した場合においてもABC現象は誘導されなかった。これまでに、ドキシソルビシン封入リポソームを頻回投与した場合、ドキシソルビシンの細胞毒性により脾臓中の抗体産生細胞が傷害されることで、IgMが産生されなくなる結果、ABC現象が誘導されないことが報告されている。そのため、本研究で用いたブスルファン誘発血小板減少モデルにおいてABC現象が誘導されなかったのは、抗ガン剤であるブスルファンが脾臓中の抗体産生細胞が傷害されたためと考えられる。今回得られた知見は、頻回投与が想定される抗がん剤誘発の血小板減少症時においてH12 (ADP) リポソームを頻回投与してもABC現象は誘導されない可能性を提示しており、このような患者においてはH12 (ADP) リポソームの頻回投与は薬物動態学的には安全に使用できると考えられる。ただし、H12 (ADP) リポソームは抗ガン剤に起因する血小板減少症以外にも大量出血後の輸血により引き起こされる希釈性の血小板減少症においても臨床適応される可能性は十分に考えられる。そのため、来年度は今年度に引き続き、H12 (ADP) リポソーム頻回投与時の体内動態を希釈性血小板減少モデルラットにおいて明らかにするとともに、ABC現象誘導時におけるPK/PDモデリングを行い、その詳細について評価していく予定である。

## E. 健康危険情報

該当なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tanaka K, Kurotsu S, Asano T, Yamakawa N, Kobayashi D, Yamashita Y, Yamazaki H, Ishihara T, Watanabe H, **Maruyama T**, Suzuki H, Mizushima T. Superiority of pulmonary administration of mepenzolate bromide over other routes as treatment for chronic obstructive pulmonary disease, *Sci Rep*. (2014) In press

2. Hirata K, Saruwatari J, Enoki Y, Iwata K, Urata Y, Aizawa K, Ueda K, Shirouzono T, Imamura M, Moriuchi H, Ishima Y, Kadowaki D, Watanabe H, Hirata S, **Maruyama T**, Fukunaga E. Possible false-negative results on therapeutic drug monitoring of phenytoin using a particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay in a patient with a high level of IgM. *Ther Drug Monit*. (2014) In press

3. Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, Chuang VT, Otagiri M, **Maruyama T**. Albumin Fusion Prolongs the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Thioredoxin in Mice with Acetaminophen-Induced Hepatitis. *Mol Pharm*. (2014) In press

4. Sato H, Chuang VT, Yamasaki K, Yamaotsu N, Watanabe H, Nagumo K, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Hirono S, Otagiri M, **Maruyama T**. Differential effects of methoxy group on the interaction of curcuminoids with two major ligand binding sites of human serum albumin. *PLoS One*. (2014) Feb 3;9(2):e87919.

5. Ishima Y, Kragh-Hansen U, **Maruyama T**, Otagiri M. Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Biomed Res Int*. (2013) 353892.

6. Ishitsuka Y, Fukumoto Y, Kondo Y, Irikura M, Kadowaki D, Narita Y, Hirata S, Moriuchi H, **Maruyama T**, Hamasaki N, Irie T. Comparative Effects of Phosphoenolpyruvate, a Glycolytic Intermediate, as an Organ Preservation Agent with Glucose and N-Acetylcysteine against Organ Damage during Cold Storage of Mouse Liver and Kidney. *ISRN Pharmacol*. (2013) 375825.

7. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, **Maruyama T**. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. (2014) 9(1):e85216.
8. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Kondo M, Chuang VT, Wu Q, Endo M, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, **Maruyama T**. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. (2014) 1840(3):1152-62.
9. Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M, **Maruyama T**, Ando Y, Otagiri M. Effect of albumin on transthyretin and amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. *Life Sci*. (2013) 93(25-26):1017-22.
10. Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, Kaneko KI, Iwata H, Kotani S, Nakajima M, Ishima Y, Otagiri M, **Maruyama T**. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p-cresyl sulfate, a uremic toxin. *Clin Exp Nephrol*. In press
11. Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, **Maruyama T**. Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. *J Pharm Sci*. (2013) 102(10):3852-9.
12. Nishijima M, Kato H, Fukuhara G, Yang C, Mori T, **Maruyama T**, Otagiri M, Inoue Y. Photochirogenesis with mutant human serum albumins: enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate. *Chem Commun (Camb)*. (2013) 28;49(67):7433-5.
13. Tanaka H, Iwasaki Y, Yamato H, Mori Y, Komaba H, Watanabe H, **Maruyama T**, Fukagawa M. p-Cresyl sulfate induces osteoblast dysfunction through activating JNK and p38 MAPK pathways. *Bone*. (2013) 56(2):347-54.
14. Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Okamura Y, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, **Maruyama T**. Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Dispos*. (2013) 41(8):1584-91.
15. Yamasaki K, Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta*. (2013) 1830(12):5435-43.
16. Anraku M, Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M. Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. (2013) 1830(12):5465-72.
17. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, Otagiri M, **Maruyama T**. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther*. (2013) 345(2):271-83.
18. 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*. (2013) 30:36-42.
19. 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*. (2013) 65(3):390-401.
20. 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*. (2013) 1830(4):2917-23.



21. 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.* (2013) 83(4):582-92.
22. 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.* (2013) 83(3):446-54.
23. 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.* (2013) 41(1):141-8.
24. 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*, (2013) 27: 391-8.
2. 学会発表
- 榎木裕紀、渡邊博志、異島優、小田切優樹、**丸山徹** 尿毒素の酸化ストレス誘導を介したマウス骨格筋細胞障害作用 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8
  - 杉本龍星、渡邊博志、坂口義明、宮本洋平、異島優、金子健一、岩田宏、小田切優樹、**丸山徹** ヒト有機アニオントランスポーターは尿毒症物質p-クレジル硫酸の高容量性トランスポーターとして機能する 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8
  - 石井宏志、中村照也、小野知実、和泉実代子、渡邊博志、小田切優樹、山縣ゆり子、**丸山徹** Alpha1-酸性糖タンパク質バリエーション間のリガンド結合選択性機序解明 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8
  - 永尾紗理、田口和明、田中遼大、渡邊博志、酒井宏水、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 第30回日本薬学会九州支部大会 2013/12/7-8
  - 橋本麻衣、大柿滋、氏平隼人、田口和明、渡邊博志、藤山淳史、土井麻美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹、**丸山徹** 健常及び病態時における血小板代替物H12(ADP)リポソームの頻回投与が体内動態に及ぼす影響 第20回日本血液代替物学会年次大会 2013/12/6-7
  - 田口和明、永尾紗理、**丸山徹**、小田切優樹 一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症治療薬としての創製 第20回日本血液代替物学会年次大会 2013/12/6-7
  - 丸山徹**、大柿滋、田口和明、前田仁志、異島優、渡邊博志、小田切優樹 出血性ショック輸血後の肝障害に対する一酸化炭素付加赤血球の保護メカニズム 第20回日本血液代替物学会年次大会 2013/12/6-7
  - 小玉あずさ、渡邊博志、田中遼大、田中寿絵、異島優、深川雅史、小田切優樹、**丸山徹** アルブミン-チオレドキシシン誘導体による薬剤性急性腎障害の発症予防と機序解明 第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2013/11/21-22
  - 前田仁志、平田憲史郎、渡邊博志、異島優、末永綾香、小田切優樹、**丸山徹** 遺伝子組換え型糖鎖付加アルブミンによるクッパー細胞選択的チオール送達は急性肝障害を改善する 第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2013/11/21-22
  - 異島優、原茉莉絵、甲斐俊哉、渡邊博志、末永綾香、小田切優樹、**丸山徹** 一酸化窒素付加型アルブミンによる抗癌剤耐性克服効果とその機序解明 第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2013/11/21-22
  - Kaori Watanabe, Yu Ishima, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** S-nitrosated  $\alpha$ -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013 (Jeju, Korea)* 2013/11/21-22
  - Ryota Tanaka, Hitoshi Maeda, Azusa Kodama,

- Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, **Toru Maruyama**, Masaki Otagiri Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidative and anti-inflammatory modulator, against acetaminophen-induced acute liver failure. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013 (Jeju, Korea) 2013/11/21-22
13. Shigeru Ogaki, Kazuaki Taguchi, Hitoshi Maeda, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** Carbon monoxide bound red blood cells protect the expression of hepatic cytochrome P450 after resuscitation from hemorrhagic shock via inactivation of Kupffer cells. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013 (Jeju, Korea) 2013/11/21-22
14. Kohei Nagumo, Tadashi Imafuku, Naoyuki Yamada, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** Mechanism of enhanced cysteinylolation of Cys34 in human serum albumin in chronic liver disease. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013 (Jeju, Korea) 2013/11/21-22
15. Hiroshi Watanabe, Azusa Kodama, Ryota Tanaka, Hisae Tanaka, Victor Tuan Giam Chuang, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013 (Jeju, Korea) 2013/11/21-22
16. Ryota Tanaka, Hitoshi Maeda, Azusa Kodama, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** THERAPEUTIC IMPACT OF HUMAN SERUM ALBUMIN-THIOREDOXIN FUSION PROTEIN, LONG-ACTING ANTI-OXIDATIVE AND ANTI-INFLAMMATORY MODULATOR, AGAINST ACETAMINOPHEN-INDUCED ACUTE LIVER FAILURE. 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11
17. Kaori Watanabe, Yu Ishim, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** S-NITROSATED  $\alpha$ -1-ACID GLYCOPROTEIN KILLS DRUG-RESISTANT BACTERIA AND AIDS SURVIVAL IN SEPSIS. 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11
18. Kazuaki Taguchi, Hiroshi Watanabe, Hiromi Sakai, **Toru Maruyama**, Masaki Otagiri PRECLINICAL STUDIES OF HEMOGLOBIN-VESICLES AS AN ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER IN NON-HUMAN PRIMATE. 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11
19. Shigeru Ogaki, Hitoshi Maeda, Kazuaki Taguchi, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** CARBON MONOXIDE BOUND RED BLOOD CELLS PROTECT THE EXPRESSION OF HEPATIC CYTOCHROME P450 AFTER RESUSCITATION FROM HEMORRHAGIC SHOCK VIA INACTIVATION OF KUPFFER CELLS. 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11
20. Kohei Nagumo, Tsuyosi Sugimori, Naoyuki Yamada, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** MECHANISM OF ENHANCED CYSTEINYLOLATION OF Cys34 IN HUMAN SERUM ALBUMIN IN CHRONIC LIVER DISEASE. 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11
21. Hiroshi Watanabe, Yoshiaki Sakaguchi, Ryusei Sugimoto, Yu Ishima, Ken-ichi Kaneko, Hiroshi Iwata, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** TRANSPORT OF P-CRESYL SULFATE, A UREMIC TOXIN, VIA HUMAN ORGANIC ANION TRANSPORTER. 日本薬物動態学会 第28回年会 2013/10/9-11
22. Yu Ishima, Marie Hara, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** Poly-S-nitrosated Human Serum Albumin inhibits the Expression of P-glycoprotein Transporter in Human Multidrug-resistant Tumor. The 5th Asian Arden conference 2013/8/6-7
23. **Toru Maruyama**, Yu Ishima, Ai Minomo, Toru Narisoko, Hiroshi Morioka, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. The 5th Asian

Arden conference 2013/8/6-7

24. Azusa Kodama, Hiroshi Watanabe, Ryota Tanaka, Hisae Tanaka, Victor Tuan Giam Chuang, Yohei Miyamoto, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. The 5th Asian Arden conference 2013/8/6-7
  25. Ryota Tanaka, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. The 5th Asian Arden conference 2013/8/6-7
  26. Hitoshi Maeda, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama** Kupffer cell selective delivery of thiols by genetically engineered mannosylated-albumin as a new therapeutic strategy for hepatitis. The 5th Asian Arden conference 2013/8/6-7
  27. 異島優、方軍、前田浩 渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹** 高分子抗癌剤の腫瘍集積性を高めるS-ニトロソ化アルブミンダイマーのEPR効果増強作用 第13回日本NO学会学術集会 2013/6/28-29
  28. 成底徹、異島優、小谷俊介、中島誠、渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹** 尿毒症物質インドキシル硫酸の生物活性に及ぼす活性化窒素種の影響 第13回日本NO学会学術集会 2013/6/28-29
  29. 渡邊博志、宮本洋平、田中寿絵、異島優、田中元子、松下和孝、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尿細管障害作用 第58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23
  30. 南雲恒平、杉森剛志、阿部貴弥、申曾洙、渡邊博志、山田尚之、田中元子、松下和孝、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58回日本透析医学会学術集会総会 2013/6/21-23
  31. 前田仁志、平田憲史郎、渡邊博志、異島優、末永綾香、小田切優樹、**丸山徹** クッパー細胞選択的チオール送達によるアセトアミノフェン肝障害治療法の開発 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25
  32. 小玉あずさ、田中遼大、渡邊博志、異島優、深川雅史、小田切優樹、**丸山徹** アルブミン-チオレドキシニン融合体によるシスプラチン腎症予防効果 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25
  33. 異島優、方軍、前田浩、渡邊博志、小田切優樹、**丸山徹** 高分子抗癌剤の腫瘍集積性を高めるS-ニトロソ化アルブミンダイマーのEPR効果増強作用 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25
  34. 佐藤弘樹、異島優、渡邊博志、山崎啓之、安楽誠、小田切優樹、**丸山徹** クルクミンと血清アルブミンの相互作用と抗酸化活性への影響 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25
  35. 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有効性評価 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25
  36. 坂口義明、渡邊博志、宮本洋平、異島優、金子健一、岩田宏、小田切優樹、**丸山徹** 尿毒症物質p-クレジル硫酸の腎排泄過程におけるhOATsの関与 日本薬剤学会第28年会 2013/5/23-5/25
  37. 渡邊博志、小玉あずさ、田中遼大、田中寿絵、異島優、深川雅史、小田切優樹、**丸山徹** アルブミン-チオレドキシニン融合蛋白質はヨード造影剤腎症の発症を予防する 第56回日本腎臓学会学術総会 2013/5/10-5/12
  38. **丸山徹**、宮崎裕理、田口和明、渡邊博志、宗慶太郎、田中元子、松下和孝、深川雅史、小田切優樹 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56回日本腎臓学会学術総会 2013/5/10-5/12
- G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）  
該当なし

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

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。前年度に引き続き、DICによる静脈血栓症ラット(エンドトキシン誘発性、血栓優位型)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と肝・腎臓障害マーカの変動を経時的に投与後 24 時間まで測定して、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(超高用量: 80 mg/kg)で各種マーカの変動に推計学的に有意な影響を及ぼさなかった。H12-(ADP)小胞体は、最大投与量 80 mg/kg(常用量は 10 - 20 mg/kg)までの範囲内で、2種類の実験的 DIC ラットモデル(出血優位型及び血栓優位型)において、危惧される血栓症誘発・増強作用を示さなかった。本研究の最終年度においては、投与量をさらにエスカレート(1,000 mg/kg まで)させ、当該試験物の安全性を確認する必要がある。

A. 研究目的

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。本試験物の血栓症誘発、増強作用について、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