

特にエンドトキシンの定量に関しては、メーカーマニュアルを大幅に改訂してリポソーム製剤に適用できるものとし、更にクリーンブース・クリーンベンチ内の標準エンドトキシンなどによる汚染を防ぐために、クリーンバッグを用いて通常のベンチ上で測定ができる様に工夫した（図13）。



図13. クリーンバッグを用いたエンドトキシン測定システムの概観

#### 4) SOPの運用やデータ管理の体制

大学の研究室は担当学生の入れ替わりが激しく、また個々の研究テーマには創造的なものが求められる。従って、既に方法が既に確立されている試料の調製プロセスや品質を管理するためには、誰でも実施できる様な分かり易いSOPとチェックリストの構築が必要である。経験値の異なる複数の学生にSOPとチェックリストを使ってもらい、ヒアリングを重ねて誤解の生ずる余地をできるだけ排除し、画像や動画を取り込んだ分かり易いSOPを構築することができた。また、チェックリストも紙媒体から電子媒体へと移行し、クラウドによる管理体制を構築した。あらゆるレベルの失敗を共有し、解決策を確定できたら文書化してSOPやチェックリストを随時バージョンアップ

できる体制を重視した。この様な変更は管理上望ましくないとの考えもあるが、大学の性格上創造的な活動による課題解決と文書による共有化は意義があると考えた。

要点を以下にまとめた。

- ・関係者全員が全てのSOPを実施できる。
- ・各担当者はSOPに従って操作を行ない、チェックリストで確認する。
- ・各装置の生データは専用のエクセルデータシートに転記するか、トランスファーする。
- ・エクセル内で検量線を作成し、定量値が自動計算される。
- ・計算値はそのままスペック表に反映される様にし、転記ミスや改竄を防ぐ。
- ・SOPやスペックに逸脱した場合は全て備考に記録され、責任者に連絡される。
- ・各データは、責任者が確認した後保護されそれ以降は変更できない様にし、修正欄のみ入力できる。
- ・すべてのファイルは関係者共用のクラウドストレージに保存され、関係者はいつでも閲覧できる。

#### D. 結論

H12-(ADP)リポソーム試験物を前臨床・臨床試験にて評価するためには、製造工程や品質の厳密な管理が重要となり、研究室個人に依存する体制から脱却し、組織として管理して記録する体制が必要である。そのために分かり易いSOPやチェックリストの構築による技術の標準化を実現することができた。特にSOPには各プロセスの実施を科学的根拠を持って確認することを重視し、改良を前提とした責任体制を構築した。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kohsuke Hagsawa, Kahoko Nishikawa, Rempei Yanagawa, Manabu Kinoshita, Mami Doi, Hidenori Suzuki, Keiichi Iwaya, Daizoh Saitoh<sup>8</sup>, Shuhji Seki, Shinji Takeoka, Makoto Handa and Yasuhiro Nishida: Treatment with fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, adenosine 5'-diphosphate-encapsulated liposomes as an infusible hemostatic agent against active liver bleeding in rabbits with acute thrombocytopenia. *Transfusion* 55, 314–325 (2015).

2) Kazuaki Taguchi, Mai Hashimoto, Shigeru Ogaki, Hiroshi Watanabe, Shinji Takeoka, Yasuo Ikeda, Makoto Handa, Masaki Otagiri

and Toru Maruyama: Effect of Repeated Injections of Adenosine Diphosphate-Encapsulated Liposomes Coated with a Fibrinogen  $\gamma$ -Chain Dodecapeptide Developed as a Synthetic Platelet Substitute on Accelerated Blood Clearance in a Healthy and an Anticancer Drug-Induced Thrombocytopenia Rat Model, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, in press, (2015), DOI: 10.1002/jps.24418

### 2. 学会発表

(1) 武岡真司, 「人工血小板/H12(ADP)リポソームの製造工程・品質の管理」, 第21回日本血液代替物学会年次大会(2014.12, 東京).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

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、赤血球輸血を併用したより重篤  
な易出血病態での検討—

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）

多喜川真人 （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)リポゾームを前投与しておくこと、出血が制御され、本来の血小板輸血と同等の顕著な止血救命効果が得られることを既に報告している。さらに昨年度までの研究では、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による止血救命効果を検討した。その結果、H12(ADP)リポゾームを事後投与した家兎でも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%に留まっていた。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るため、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が、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、例えば重度の貧血の改善などの必要性も推察された。そこで今年度は貧血を改善させる目的で洗浄赤血球の輸血を H12(ADP)リポゾームの事後投与後に追加し、その予後へ与える効果を目指して検討を行った。その際、血小板減少病態と共に貧血病態をより重篤化させたモデルでの H12(ADP)リポゾームや赤血球輸血の効果を見るため、脱血返血モデルを循環血液量のほぼ2倍となる 200 mL/kg の血液交換とした。このように重篤な貧血を伴う急性血小板減少病態は実臨床での大量出血による出血性ショックでも時に遭遇する病態であるが、このような重度の易出血性病態でも H12(ADP)リポゾームは血小板輸血に匹敵する止血効果が得られた。また、貧血を伴うショック病態では血小板がある程度維持されていても血液凝固が障害される危険性が示唆され、これには赤血球輸血が有効であることが分かった。

#### 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  $\gamma$ 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たした後に、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臓器出血制御効果を検討する必要があった。H24年度にまず、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が、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得たが救命率は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も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、例えば重度の貧血の改善などの必要性も推察され、今年度は貧血を改善させる目的で洗浄赤血球の輸血をH12(ADP)リポゾームの事後投与後に追加し、その予後へ与える効果を検討した。その際、血小板減少病態と伴に貧血病態をより重篤化させ、H12(ADP)リポゾームや赤血球輸血の効果をみるため、脱血返血モデルを循環血液量のほぼ2倍となる200 mL/kgの血液交換とした。従来の我々の家兎の急性血小板減少性易出血モデルは100 mL/kgの血液交換であった。このように重篤な貧血を伴う急性血小板減少病態は実臨床での大量出血による出血性ショックでも時に遭遇する病態であると考える。

## 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 25 mL/kg の脱血を行い、対側の大腿静脈より等量(25 mL/kg)の Dextran sulfate 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、25mL/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 25mL/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 回繰り返した。8, 9 回目の脱血は循環動態安定のために 12.5 mL/kg と減らし、これと等量の洗浄赤血球の輸血を行った。これにより計 200 mL/kg の脱血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が、実際には赤血球の遠心分離の際に相当量の赤血球を喪失してしまい、貧血状態となる(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。

## 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 200mL/kg の脱血と等量の洗浄赤血球輸血が終了し、血小板数が  $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$  を下回ったところで、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。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。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。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)リポゾームの投与と PRP、および PPP の事後投与

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)。これの対照として、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, PPP群)。(Fig. 1)

## 5. ドナーからの濃厚赤血球輸血

予め、2,3 日前にドナーの家兎から脱血後、2,3 と同様に赤血球を遠心分離し、赤血球を MAP 液で約 1 週間保存した。輸血時には生食で Hb 16 g/dL となるよう調整し、肝臓からの出血が止血されたのを確認した後にこれを 20 mL 輸血した。(Fig. 2)

## 6. 測定項目

### 6.1. 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。

### 6.2. 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（バルーン圧解除 15 分後）、ドナー赤血球の輸血後に採血し、測定に供した。

### 6.3. 肝損傷部からの臓器出血量

バルーン圧解除から 5 分間の出血量を測定した。

### 6.4. 肝損傷部出血の止血までの時間

バルーン圧解除後、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）。

### 6.5 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

### 1. 200 mL/kg 血液交換モデルにおける循環動態の変化と赤血球数、血小板数の減少

200 mL/kg の血液交換後では平均動脈圧が平均で 41 mmHg と 100 mL/kg の血液交換後の 67 mmHg と比べて血圧がさらに低下しておりショック病態に陥っていた。また、血小板数も 200 mL/kg の血液交換後では  $3.87 \times 10^4 / \mu\text{L}$  と  $4 \times 10^4 / \mu\text{L}$  を下回っており、100 mL/kg の血液交換後の  $4.5 \times 10^4 / \mu\text{L}$  よりさらに低下していた。さらに Hb 値でも 200 mL/kg の血液交換後では平均で 5.7 g/dL と 6 g/dL を下回っており、100 mL/kg の血液交換後の 6.3 g/dL と比べても低下していた。このように 200 mL/kg の血液交換後は、血小板数が極度に低下した貧血状態を伴うショック病態と考えられた。(Table 1)

### 2. 200 mL/kg 血液交換モデルにおけるソノクロットデータ（血液凝固能）

200 mL/kg の血液交換後では clotting time が平均で 971 sec と 100 mL/kg の血液交換後の 387 sec よりさらに極端に延長し、clot rate も 200 mL/kg の血液交換後では 1.0 と 100 mL/kg の血液交換後の 2.1 よりさらに低値となっていた。このようにソノクロットでみた血液凝固能は 200 mL/kg の血

液交換後で顕著に増悪していた。(Table 1)

### 3. 重度の易出血性病態(血液交換 200 mL/kg)での肝臓器出血に対する PPP 事後投与の影響

200 mL/kg の血液交換を行い作製した重篤な易出血性病態において肝臓器損傷による出血を作製した。血小板血栓形成能を持たない PPP を投与したのみでは 10 分間の肝臓からの出血量が  $48 \pm 2$  g にもなった。平均動脈圧は  $22 \pm 7$  mmHg まで下がり Hb も  $3.9 \pm 0.8$  g/dL と極度の貧血状態に陥った。一方、血小板数は  $4.1 \pm 0.2 \times 10^4$  / $\mu$ L とほぼ変化がなかった。ソノクロットでみた血液凝固能は clotting time が  $1645 \pm 156$  sec、clot rate も  $0.2 \pm 0.2$  とほとんど全く凝固しない程度にまで増悪していた (Table 2)。これらの PPP 事後投与例では止血が完了せず、4 例全例が死に至った。

### 4. 重度の易出血性病態(血液交換 200 mL/kg)での肝臓器出血に対する PRP 事後投与の効果

一方、血小板を多く含む PRP の事後投与では肝臓からの出血量が  $28 \pm 4$  g と著明に減少した。しかし平均動脈圧は  $43 \pm 2$  mmHg と PPP の事後投与に比べ改善したものものの依然ショック病態を呈しており、肝臓からの出血のためか Hb は  $4.5 \pm 0.3$  g/dL と極度の貧血を呈していた。血小板数は血小板が投与されたことにより、30 g に近い臓器出血を来たした後でも  $7.0 \pm 0.5 \times 10^4$

/ $\mu$ L と顕著に増加し有効な止血能が期待出来た。これと一致してソノクロットでみた血液凝固能も clotting time が  $341 \pm 31$  sec、clot rate も  $3.4 \pm 0.4$  と依然凝固障害を呈しているものの、PPP の事後投与に比べ顕著に改善していた。(Table 2)

### 5. 重度の易出血性病態(血液交換 200 mL/kg)での肝臓器出血に対する H12(ADP)リポゾーム事後投与の効果

肝臓器出血に対して血小板輸血 (PRP) の代わりに H12(ADP) リポゾームを事後投与し、出血量や血液凝固能に関する影響をみた。肝臓からの出血量は  $24 \pm 5$  g と血小板輸血 (PRP) と同程度にまで減少し、重度の易出血性病態下での肝臓器出血に対しても H12(ADP) リポゾームの臓器止血効果が認められた (Fig. 3)。しかし平均動脈圧は  $42 \pm 4$  mmHg と低く、血小板 (PRP) の事後投与時と同様にショック状態を呈していた。Hb も  $5.1 \pm 0.4$  g/dL とやはり依然として低値であり貧血状態であった。血小板数は H12(ADP) リポゾームが血小板としてカウントされないため、 $3.4 \pm 0.4 \times 10^4$  / $\mu$ L と低かったが、ソノクロットでみた血液凝固能は clotting time が  $279 \pm 42$  sec、clot rate も  $3.2 \pm 0.4$  と改善しており、H12(ADP) リポゾームによる血液凝固能の回復が示唆された。(Table 2)

### 6. 止血後の赤血球輸血による外傷後重症低ヘモグロビン血症への救命効果



PRPやH12(ADP)リポゾームの事後投与により肝臓からの出血が制御されたが、いずれも重度の貧血を伴うショック状態に陥っていた。そこで、PRP 事後投与で肝臓からの出血が止血されたことを確認した後、すなわち肝損傷作製よりほぼ1時間後に別のドナー家兔から採取した赤血球をHb 16 g/dLに調整した後に20 mL輸血した。対照としてPRP 事後投与後の家兔に5%アルブミンを20 mL補充した。まずアルブミン補充群ではHbが $3.6 \pm 0.4$  g/dLと貧血がさらに進み、平均動脈圧も $36 \pm 3$  mmHgとショック病態がさらに重篤化した。アルブミン補充後の血小板数は $6.5 \pm 0.6 \times 10^4$  / $\mu$ Lと依然 $5 \times 10^4$  / $\mu$ Lを上回っていたが、低Hb血症の増悪、ショック病態の重篤化のためであろうか、ソノクロットでみた血液凝固能はclotting timeが $996 \pm 423$  sec、clot rateも $1.8 \pm 1.5$ と再び増悪傾向を呈していた。その結果、10羽中1羽のみが生存したに留まり9羽は死に至った。一方、PRP 事後投与の後に赤血球輸血をした群では輸血5分後、Hbは $6.2 \pm 0.7$  g/dLまで改善し平均動脈圧も $57 \pm 3$  mmHgまで改善した。血小板成分を含まない赤血球輸血のため、血小板数は $6.2 \pm 0.7 \times 10^4$  / $\mu$ Lとアルブミン補充の場合とほぼ同程度であったが、ソノクロットでみた血液凝固能はclotting timeが $403 \pm 184$  sec、clot rateも $3.3 \pm 1.2$ とアルブミン補充の場合に比べ障害が軽度で、止血完了直後の血液凝固能を維持する傾向にあった。その結

果、予後に関しては10羽中7羽が生存し得た。H12(ADP)リポゾーム事後投与後に赤血球を輸血した群では輸血5分後、Hbは $6.9 \pm 0.6$  g/dLまで改善したが、平均動脈圧は $49 \pm 0.3$  mmHgであった。血小板数は $3.4 \pm 0.5 \times 10^4$  / $\mu$ Lと変わっていなかった。ソノクロットは測定出来た症例が限られていたが、血液凝固能はPRP 事後投与後の赤血球輸血群と同様に血液凝固能を維持する傾向にあった。予後に関しては8羽中3羽が生存し得た。(Table 3)

#### 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兔にあらかじめ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が、顕著な救命率の改善を認めなかつ

た。

このような外傷性出血による急性血小板減少病態が誘導する易出血性病態では臓器出血が重症化し易いが、同時に極めて重篤な低ヘモグロビン血症、すなわち貧血状態に陥ってしまうことが多い。当然ながら、このような生体の状態では血圧が維持出来ず、ショック病態を呈して来る。今回の家兎の循環血液量の2倍にもなる量の血液交換モデルでは臨床で時に遭遇するこの種の難治性病態が再現されているのではないかと考える。PRPの事後投与で一旦、止血制御が出来た家兎でも重度の低ヘモグロビン血症を伴うショック病態が持続すると、例え血小板数が $5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ を上回っていてもソノクロットの解析データで示されたような血液凝固障害が惹起されてくる。実臨床でも、止血制御に難渋する外傷性出血性ショック患者では血小板輸血により血小板数のみを一時的に改善しても、他の因子を制御改善することが出来なければ最終的には易出血性の再燃から死に至ることが少なくない。今年度の研究成果から示されたように、H12(ADP)リポゾームがこのような重篤な血小板減少性易出血病態でも十分に止血機能を発揮することは特筆に値することは言うまでもないが、H12(ADP)リポゾームにより一旦、止血制御が出来たなら、速やかに貧血を改善するため赤血球成分を輸血することも集中治療の現場ではやはり重要であろう。最近、致死性の大量出血

性ショック患者の救命には血小板、赤血球、凝固因子をバランスよく1:1:1で輸血することの重要性が指摘されているが、今後はこのようなバランス輸血でのH12(ADP)リポゾームの投与に研究が進むのではないかと思われる。

#### D. 結論

1. 家兎において、総量200 mL/kgの脱血と洗浄赤血球輸血を繰り返すことで、極めて重篤な急性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、血小板輸血と同様な臓器出血に対する止血効果が得られた。
3. 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、止血が完了しても重度の貧血を伴うショック病態に陥っていた。血小板やH12(ADP)リポゾームのみの投与では低ヘモグロビン状態とショック病態が回避出来ず、止血制御で一旦改善した血液凝固能は再度増悪した。これには赤血球成分の輸血が有効であり、血小板やH12(ADP)リポゾームの投与のみならず赤血球や凝固因子をバランスよく補充することが重篤な易出血性病態の制御に重要であることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

(原著)

1. Ito K, Saito A, Fujie T, Miyazaki H, Kinoshita M, Saitoh D, Ohtsubo S, Takeoka S. Development of a ubiquitously transferrable silver-nanoparticles-loaded polymer nanosheet as an antimicrobial coating. *J. Biomed. Mater. Res. Part B.* (in press) IF= 2.328
2. Nishikawa K, Iwaya K, Kinoshita M, Fujiwara Y, Akao M, Sonoda M, Thiruppathi S, Suzuki T, Hiroi S, Seki S, Sakamoto T. Resveratrol increases CD68<sup>+</sup> Kupffer cells co-localized with adipose differentiation-related protein (ADFP) and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* (in press) IF= 4.909
3. Sato T, Kinoshita M, Yamamoto T, Ito M, Nishida T, Takeuchi M, Saitoh D, Seki S, Mukai Y. Treatment of irradiated mice with high-dose ascorbic acid reduced lethality. *PLoS ONE* 10: e0117020, 2015. IF= 3.534, doi: 10.1371/journal.pone.0117020.
4. Maeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VTG, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T. Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> Kupffer cell-targeted nano-antioxidant for the treatment of two acute hepatitis models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 352; 244-257, 2015. IF=3.855, doi: 10.1124/jpet.114.219493.
5. Hagiwara K, Nishikawa K, Yanagawa R, Kinoshita M, Doi M, Suzuki H, Iwaya K, Saitoh D, Seki S, Takeoka S, Handa M, Nishida Y. Treatment with fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes as an infusible haemostatic agent against active liver bleeding in acute thrombocytopenic rabbits. *Transfusion* 55; 314-325, 2015. IF=3.526
6. 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 CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury. *PLoS ONE* 9: e92515, 2014 IF= 3.534
7. 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, 2014. IF=2.464

(総説)

1. 藤枝俊宣, 木下 学. 高分子ナノシートの柔軟性と密着性を利用した「ナノ絆創膏」の開発と医療応用ー外科手術の大幅な時間短縮, 低侵襲な手術の実現ー, 生体模倣技術と新材料・新製品開発への応用, 文部科学省科学研究費新学術領域「生物規範工学」, 高分子学会バイオミメティクス研究会, エアロアクアバイオメカニズム学会, 技術情報協会, 2014,

- 540-547
2. 木下 学. 人工赤血球, 人工血小板の臨床応用, 2014, Anet, 18: 14-17
  3. 木下 学. 放射線被曝時の Intestinal Failure とその対策, 2014, 消化と吸収, 36: 341-347
  4. 西山靖将, 木下 学, 染田英利. 軍事史に学ぶ輸血用血液の重要性と人工血液への期待, 2014, 防衛衛生, 61: 45-56
  5. Seki S, Ikarashi M, Kinoshita M. New Findings about Liver Kupffer cells/Macrophages, B cells and their functions., 2014, J. Hepat Res. 1: 1-3,
  6. 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, 小野聡, 齋藤大蔵, 西田育弘. 衝撃波による致死的肺出血マウスに対する人工血小板(H12(ADP)liposome)の救命効果, 2014, Shock, 29, 1-8.
  7. 田中優砂光, 守本祐司, 木下 学, Hamblin M. 光線力学療法(PDT)による生体防御能の活性化と抗生物質併用の影響, 2015, 光アライアンス, 3; 15-18.
  8. 宮崎裕美, 木下 学, 齋藤大蔵. 超薄膜ナノシートを応用した熱傷基礎研究, 2015, 防衛医科大学校雑誌, 40; 1-9.
- G. 学会発表
1. 木下 学, (特別講演) 超極薄膜ナノシートの外科手術用創傷被覆剤としての応用, 2014. 1, 第 1 回結核予防会新山手病院定期講演会
  2. 木下 学, 萩沢康介, 西川可穂子. (パネルディスカッション) 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, 2014. 4, 第 113 回日本外科学会定期学術集会
  3. 小野 聡, 辻本広紀, 平木修一, 木下学. (シンポジウム) 外科侵襲後の免疫応答の病態解析とその対策に関する研究, 2014. 4, 第 113 回日本外科学会定期学術集会
  4. 木下 学, 高瀬凡平, 田中良弘. (シンポジウム) 人工赤血球製剤による救命救急の可能性, 2014. 4, 第 62 回日本輸血・細胞治療学会
  5. 木下 学. (特別講演) メンタルストレスなどの非運動性ストレスが運動パフォーマンスに与える影響と免疫応答, 2014. 5, 筑波大学 チーム「ニッポン」マルチサポート事業講演会
  6. 宮崎裕美, 木下 学, 小野 聡. (パネルディスカッション) 超薄膜ナノシートを応用した熱傷治療, 2014. 6, 第 40 回日本熱傷学会総会
  7. 萩沢康介, 木下 学, 西川可穂子, 柳川錬平, 多喜川真人, 土井麻実, 武岡真司, 半田誠, 齋藤大蔵, 関修司, 西田育弘: 出血性ショック時の蘇生輸血(赤血球:血小板:血漿の1:1:1輸血)と血液代替物使用の可能性. 第 21 回日

本血液代替物学会(シンポジウム3)2014,  
東京.

8. 鈴木英紀, 萩沢康介, 木下 学, 武岡  
真司, 半田誠. 人工血小板/H12(ADP)  
リポゾームの超微形態的検討—in vitro  
および in vivo における人工血小板の挙  
動に関する電顕的観察—第21回日本  
血液代替物学会(シンポジウム 3)2014,  
東京.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

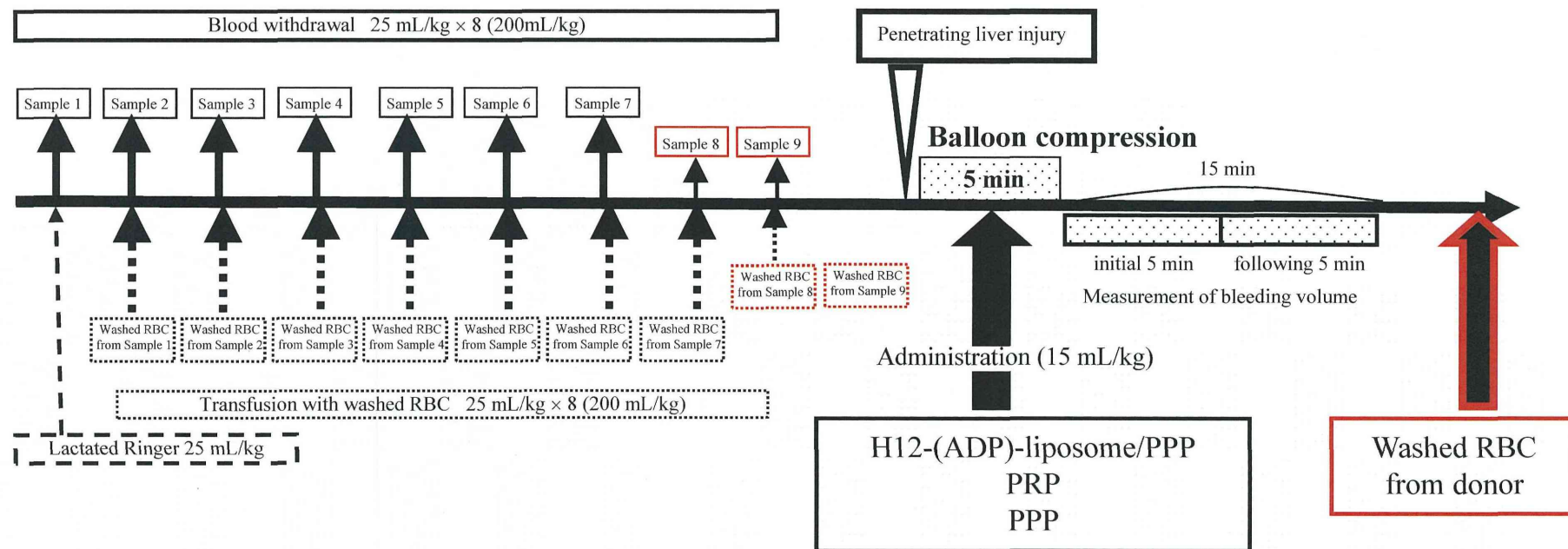


Fig. 1. Experimental design (200 mL/kg blood exchange model)

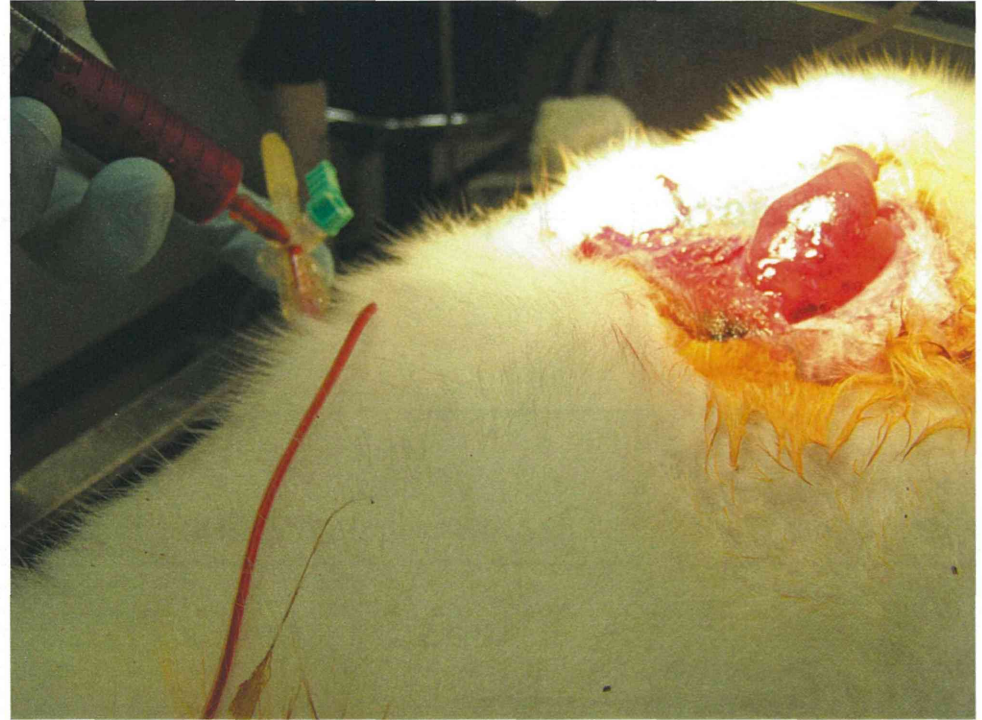
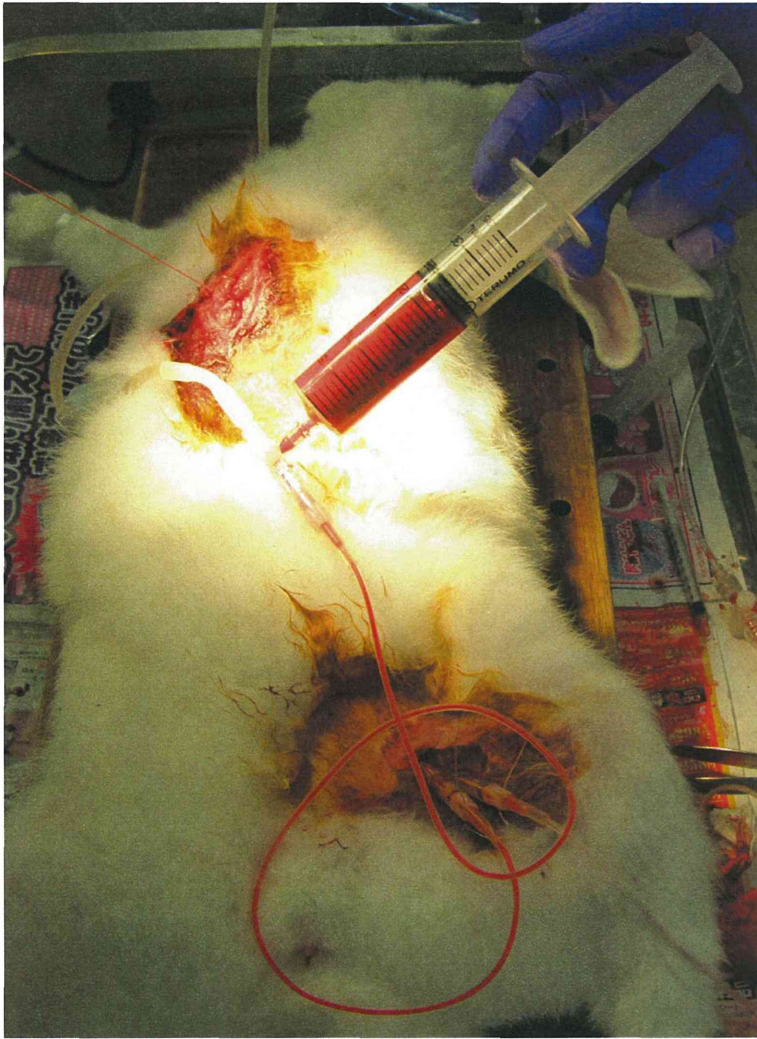


Fig. 2. RBC transfusion after PRP treatment



Table 1. Comparison of hematological parameters and coagulation activity between 200 mL/kg and 100 mL/kg blood exchanges in rabbits

Variable	After 200 mL/kg blood exchange (n=35)	After 100 mL/kg blood exchange (n=68)
Mean arterial pressure	41 mmHg	67 mmHg
Platelet counts	$3.87 \times 10^4 /\mu\text{L}$	$4.5 \times 10^4 /\mu\text{L}$
Hb levels	5.7 g/dL	6.3 g/dL
Clotting time	971 sec	387 sec
Clot rate	1.0	2.1

Data are shown as an average.



Table 2. Bleeding volume, hematological parameters, and coagulation activity after penetrating liver injury

Variable	Before penetrating liver injury (n=35)	PPP (n=4)	PRP (n=20)	H12(ADP)liposomes (n=8)
Bleeding volume from the liver injury site (mL)		48 ± 2 *	28 ± 4	24 ± 5
Mean arterial pressure (mmHg)	41 ± 2	22 ± 7 **	43 ± 2	42 ± 4
Platelet counts (× 10 <sup>4</sup> /μL)	3.9 ± 0.1	4.1 ± 0.3	7.0 ± 0.5 **	3.4 ± 0.4
Hb levels (g/dL)	5.7 ± 0.3 †	3.9 ± 0.8	4.5 ± 0.3	5.1 ± 0.4
Clotting time (sec)	971 ± 122 **	1645 ± 156 **	341 ± 31	279 ± 42
Clot rate	1.0 ± 0.2 ‡	0.2 ± 0.2 ‡	3.4 ± 0.4	3.2 ± 0.4

Data are mean ± SE. \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs others, † p<0.01 vs PRP, p<0.05 vs PPP, ‡ p<0.01 vs PRP, H12(ADP)liposomes

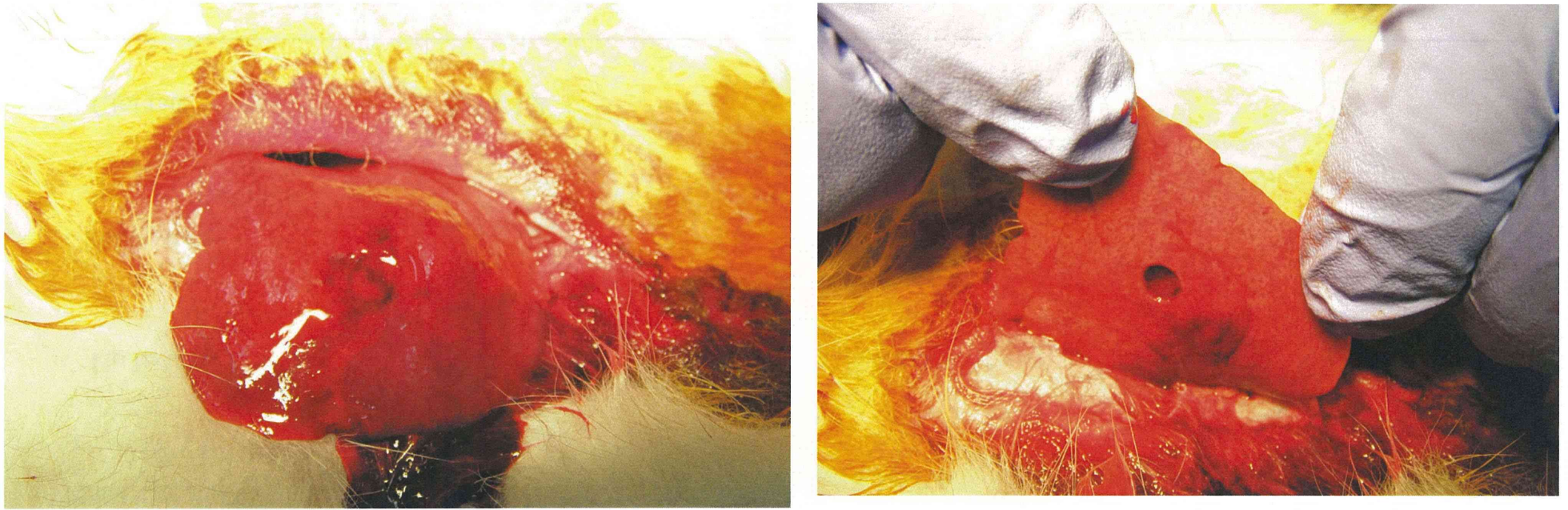


Fig. 3. hemostasis at the liver bleeding site after H12(ADP)liposome treatment

Table 3. RBC transfusion after PRP/H12(ADP)liposome treatment

Variable	PRP + RBC transfusion (n=10)	PRP + 5% albumin transfusion (n=10)	H12(ADP)liposomes + RBC transfusion (n=3)
Mean arterial pressure (mmHg)	57 ± 3	36 ± 3 **	49 ± 0.3
Platelet counts ( × 10 <sup>4</sup> /μL)	6.2 ± 0.7	6.5 ± 0.6	3.4 ± 0.5 **
Hb levels (g/dL)	6.4 ± 0.5	3.6 ± 0.5 **	6.9 ± 0.6
Clotting time (sec)	403 ± 184	996 ± 423	364 ± 58
Clot rate	3.3 ± 1.2	1.8 ± 1.5	4.8

Data are mean ± SE. \*\* p<0.01 vs others

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

癌化学療法や大量出血に伴い引き起こされる血小板減少症には濃縮ヒト血小板による輸血治療が施行されている。しかしながら、ウイルス感染の危険性が否定できない上、保存期間が短いなど、解決すべき課題が残されている。この課題を解決すべく人工血小板代替物としてH12 (ADP) リポソームが開発された。H12 (ADP) リポソームは、リン脂質二重膜表面にフィブリノーゲン $\gamma$ 鎖C末端 (H12) を担持し、内部にADPを内包した製剤であり、ヒト血小板に匹敵する止血効果を発揮することから、血小板代替物としての臨床応用が期待されている。我々はこれまでの研究成果として健常及び抗ガン剤（ブスルファン）誘発血小板減少症時のラットの体内動態特性を明らかにしたが、本製剤の適応症である大量出血時に伴う希釈性血小板減少症モデルにおいても体内動態解析を行う必要がある。そこで今年度の研究では、まず希釈性血小板減少症モデルラットにおけるH12 (ADP) リポソーム単回投与時の体内動態解析を行った。次いで、希釈性血小板減少症モデルラットを用いて、H12 (ADP) リポソームを繰り返し投与した際のIgM産生及び体内動態の変動を解析し、ABC現象との関連性について検討した。

### A. 研究目的

H12 (ADP) リポソームは血小板輸血にとって代わる血小板代替物として期待され、実用化に向けて様々な分野での研究が進められているが、医薬品開発の前臨床試験段階において必須な体内動態特性に関する検討は行われていない。様々な前臨床試験の中で、動態学的な観点からH12 (ADP) リポソームの安全性及び有効性を評価することは、臨床試験に向けた投与設計などに有用な基礎情報になる。

このような背景の下、我々は、血小板代替物H12 (ADP) リポソームの体内動態特性に関する基礎情報を構築すべく、健常マウス、ラット及びウサギにおける血漿中濃度推移、分布、代謝及び排泄特性を検討し、次いで、適応疾患の一つである抗ガン剤（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) リポソームの体内動態解析を行ってきた。抗がん剤誘発血小板減少症に加え、希釈性血小板減少症はH12 (ADP) リポソームの適応症の一つと考えられる。また、PEG修飾リポソーム製剤の場合、同一動物に繰り返し投与した時、2回目投与されたPEG修飾リポソームのクリアランスが著しく増大する、いわゆるaccelerated blood clearance (ABC) 現象が誘導され、血中濃度の減少を招くことがPEG製剤の臨床開発における課題の一つとなっている。従って、H12 (ADP) リポソームについても、繰り返し投与時の体内動態を予測するための基盤情報として、ABC現象の可能性について言及することが重要となる。

そこで本研究では、希釈性血小板減少症モデルラットにおけるH12 (ADP) リポソーム単回投