

与時の体内動態解析を行った。また、希釈性血小板減少症モデルラットに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も検討した。

## B. 研究方法

### 1. 動物

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (6週齢) を九動より購入し、1週間の予備飼育後、7週齢 (200-220 g) 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. 希釈性血小板減少症モデルラットの作製

SDラットをペントバルビタール麻酔下において大腿静脈、大腿動脈にカニューレを挿入し、大腿動脈から脱血を大腿静脈から輸血を行った。脱血した血液は遠心 (4°C、100G、15分) し、PRP (plate rich plasma) を除去して、rHSA 及び生理食塩水でメスアップし、自己血輸血を行った。脱血 (25%) と輸血を1サイクルとしてこれを4回行った。最後にラクトリンゲル液を輸液した。

### 4. 血球パラメータの測定

EDTA 処理した血液を血球計数装置 (KX-21NV、シスメックス) を用い、測定した。

### 5. H12 (ADP) リポソームの単回投与時の体内動態解析

#### 5-1. <sup>3</sup>H ラベル化法

<sup>14</sup>C-H12 (ADP) リポソームもしくは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) リポソームを作製した。また、投与液は標識体を非標識体で希釈して使用した。

#### 5-2. 投与及び採血方法、放射活性の測定・分析

希釈性血小板減少症モデルラットに、エーテル麻酔下で、<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C- H12 (ADP) リポソームを 10 mg lipid/kg で尾静脈内投与した。ヘパリン処理した注射筒で規定時間毎に尾静脈から採血を行い、6000 rpm で5分間遠心分離し、血漿を採取した。得られた血漿 50 μL を、soluene-350/イソプロピルアルコール (1:1) 混合液 500 μL 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 8 mL 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 (1 mL) で可溶化後 (50°C、24時間)、血漿と同様の処理により放射活性を測定した。尿・糞中への排泄については、代謝ゲージに入れたラットより経時的に採尿・採糞を行い、その一部を臓器と同様の処理により放射活性を測定することで評価した。

#### 6. 抗 H12 (ADP) リポソーム IgG・IgM の検出

希釈性血小板減少症モデルラットに、エーテル麻酔下において、非標識 H12 (ADP) リポソームを 10 mg lipid/kg で尾静脈より投与し、規定日に採血後、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 (100,000 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。

## 7. H12 (ADP) リポソームの繰り返し投与時の体内動態解析

希釈性血小板減少症モデルラットに、エーテル麻酔下で、非標識 H12 (ADP) リポソームを 10 mg lipid/kg で投与し、投与後 5 日目に <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C-H12 (ADP) リポソーム (10 mg lipid/kg) を投与した。以後の操作は上述「5. 体内動態解析」に準じて行った。

## 8. 統計解析

実験データは全て平均値±標準偏差で示した。体内動態パラメータは Moment により算出した。

### C. 結果

#### 1. 希釈性血小板減少症モデルラットの作製

まず初めに、H12 (ADP) リポソームの適応疾患の一つである希釈性血小板減少症における体内動態を検討するために、希釈性血小板減少症モデルラットを作製した。Fig. 1には、作製した希釈性血小板減少症モデルラットにおける血球パラメータを示す。一般に、血小板減少症は健常時の25%以下に血小板数が低下した場合を指すが、今回作製したモデルにおいて、血小板数は健常時の約30-40%まで減少していた。しかしながら、これは臨床的には十分濃厚血小板輸血を行うに値する数値であるため、モデルとして妥当であると考え、希釈性血小板減少症モデルラットとした。

#### 2. 希釈性血小板減少症モデルラットにおける体内動態評価 (単回投与)

##### 2-1 血漿中濃度推移

次に、希釈性血小板減少症モデルラットにおける<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C-H12 (ADP) リポソームの血漿中濃度

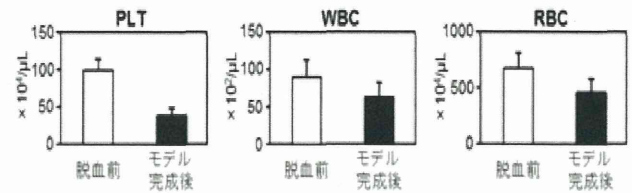


Fig. 1

希釈性血小板減少症モデルラット作成における血球パラメータ

推移について検討した。Fig. 2には、その時の血漿中放射活性推移を示す。その結果、<sup>3</sup>H及び<sup>14</sup>C放射活性は、投与3時間後まではほぼ同様な血漿中濃度推移を示したが、それ以降では両者が若干ながら解離し始め、<sup>3</sup>Hラベル体に対し、<sup>14</sup>Cラベル体の方が比較的速やかに消失する結果となった。従って、H12 (ADP) リポソームは投与3時間後まではADPを内封した状態で血中を滞留することが示唆された。

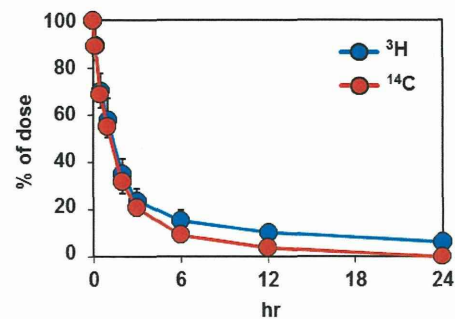
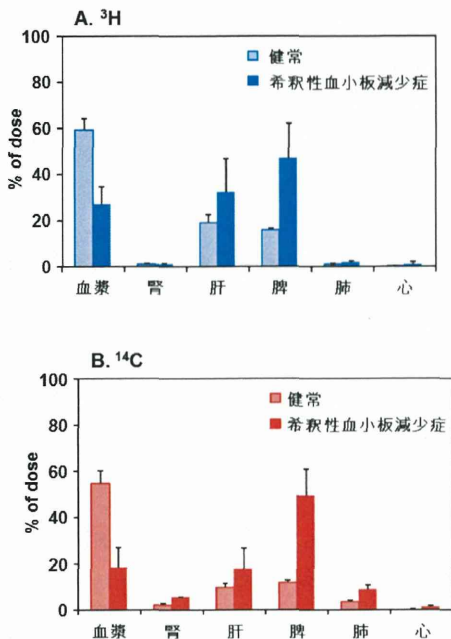


Fig. 2

希釈性血小板減少症モデルラットにおけるH12 (ADP) リポソームの血漿中濃度推移

##### 2-2. 臓器分布

希釈性血小板減少症モデルラットに <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C-H12 (ADP) リポソームを投与した際の体内分布特性について健常ラットと比較した。その結果、両放射活性とも投与 2 時間後において健常ラットと比較して希釈性血小板減少症モデルラットでは肝臓及び脾臓への取り込み増大が観察された (Fig. 3)。肝臓及び脾臓への分布量の増大に対応して、希釈性血小板減少症モデルラットでは血漿中濃度の低下がみられた。



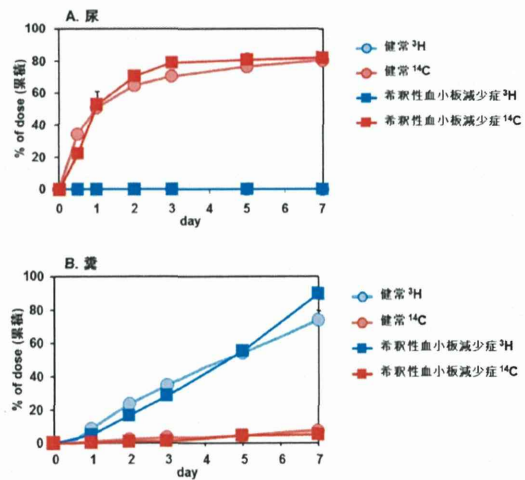
**Fig. 3**  
健常及び希釈性血小板減少症モデルラットにおける H12 (ADP) リポソームの臓器分布

### 2-3. 排泄経路

さらに希釈性血小板減少症モデルラットにおける排泄過程を検討したところ、健常ラットと同様に希釈性血小板減少症モデルラットにおいても <sup>3</sup>H は糞中へ、<sup>14</sup>C は尿中へ排泄されることが判明した。また、H12 (ADP) リポソームは十分な排泄特性を有しており、生体内長期蓄積の可能性は低いと推察された。

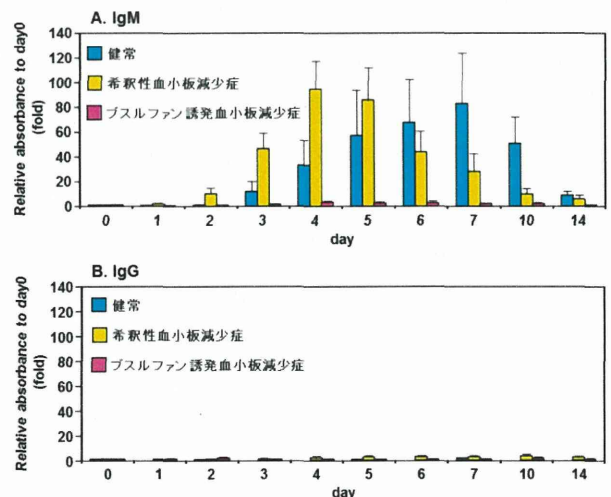
### 3. 希釈性血小板減少症モデルラットにおける抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の検出

希釈性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 産生の確認を行い、健常及びブスルファン誘発血小板減少症モデルラットと比較検討した。その結果、健常及びブスルファン誘発血小板減少症モデルラットに比べ、希釈性血小板減少症モデルラットにおいては、抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の産生は早期 (投与 3 日目より



**Fig. 4**  
健常及び希釈性血小板減少症モデルラットにおける H12 (ADP) リポソーム投与後の尿及び糞中での経時的放射活性

確認され始めた (Fig. 5A)。対照的に、抗 H12 (ADP) リポソーム IgG の産生についてはすべての群で確認されなかった (Fig. 5B)。従って、H12 (ADP) リポソーム 10 mg lipid/kg を希釈性血小板減少症モデルラットに繰り返し投与した場合、ABC 現象が誘導される可能性が示唆された。



**Fig. 5**  
健常、ブスルファン誘発及び希釈性血小板減少症モデルラットにおける抗H12 (ADP) リポソーム IgM及びIgGの産生



#### 4. 希釈性血小板減少症モデルラットにおける 体内動態評価 (繰り返し投与)

最後に、希釈性血小板減少症モデルラットにおいて IgM の産生亢進が観察されたことから、実際に繰り返し投与した際に ABC 現象が誘導されるか否か検討した。希釈性血小板減少症モデルラットに H12 (ADP) リポソームを 10mg/kg で投与後、IgM の産生亢進が見られた 5 日目に放射標識した H12 (ADP) リポソームを同様に投与しその後の放射活性 ( $^3\text{H}$ ) の血漿中濃度推移を観察した。その結果、希釈性血小板減少症モデルラットにおいて初回投与時と比較して、繰り返し投与時においては放射活性の急激な血中からの消失が観察された (Fig. 6)。この結果は、希釈性血小板減少症モデルラットに H12 (ADP) リポソームの繰り返し投与すると ABC 現象が誘発される可能性を示唆しており、また、この ABC 誘導には抗 H12 (ADP) リポソーム IgM が関与していることが示唆された。

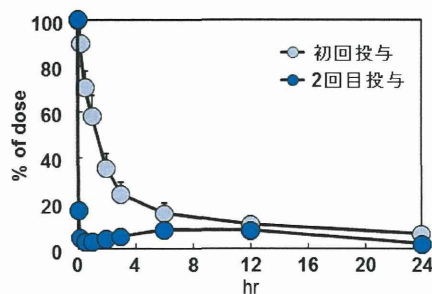


Fig. 6

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 2回目投与時の血漿中濃度推移

#### 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、適応疾患及び頻回投与時の体内動態を把握することは重要である。そこで、今年度は希釈性血小板減少症モデルラットにおいて H12 (ADP) リポソームの単回及び頻回投与時における体内動態に関する検討を行った。その結果、単回投与した場合の血漿中濃度は健

常時と比較して減少し、消失半減期は約3時間であった。しかしながら、外傷などの大量出血に伴う血小板減少状態では消失半減期は数時間程度で問題ないと考えられるため、H12 (ADP) リポソームは希釈性血小板減少症時においても十分に使用できる可能性が示唆された。また、この血中濃度の減少は肝臓及び脾臓への取り込み増大によるものと推察された。希釈性血小板減少症は大量出血時に起こると想定され、その際には臓器の低酸素化及び再酸素化によって活性酸素種やサイトカインが産生されるため、細網内皮系、特にクッパー細胞が活性化されており、さらに食欲活性も上昇していると推察されることから、肝臓及び脾臓への分布が増大したと考えられる。しかしながら、希釈性血小板減少症モデルラットの代謝・排泄経路は健常時と大きく変化せず、生体蓄積性はないことが明らかとなった。

次に、H12 (ADP) リポソーム 投与後における各種抗体の産生誘導について検討したところ、希釈性血小板減少症モデルラットにおいて H12 (ADP) リポソームに対する IgM が産生された。そこで実際に ABC 現象が誘導されるか否かの検討を行ったところ、初回投与時と比較して、2回目投与時には急速な血中からの消失が確認された。ただし、臨床を想定した場合、希釈性血小板減少症においては原則単回投与がもしくは ABC 現象が誘導される以前での繰り返し投与が考えられ、臨床を推定した場合に H12 (ADP) リポソームは十分に使用できる可能性が示された。

以上の結果だけで希釈性血小板減少症時における H12 (ADP) リポソームの有効性・安全性を断言することはできないが、少なくとも体内動態の観点から H12 (ADP) リポソームの有効性、安全性に関する基礎データを提供することができたと考える。

#### E. 健康危険情報

該当なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kadowaki D, Sakaguchi S, Miyamoto Y, Taguchi K, Muraya N, Narita Y, Sato K, Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M, Hirata S. Direct radical scavenging activity of benzbromarone provides beneficial antioxidant properties for hyperuricemia treatment. *Biol Pharm Bull*. 2015 Mar 1;38(3):487-92.
2. Taguchi K, Hashimoto M, Ogaki S, Watanabe H, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, **Maruyama T**. 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. *J Pharm Sci*. 2015 Mar 9. doi: 10.1002/jps.24418.
3. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, Ishima Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Tanaka M, Matsushita K, Mori Y, Kakuta T, Fukagawa M, Otagiri M, **Maruyama T**. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol Res Perspect*. 2015 Feb;3(1):e00092.
4. Taguchi K, Chuang VT, Yamasaki K, Urata Y, Tanaka R, Anraku M, Seo H, Kawai K, **Maruyama T**, Komatsu T, Otagiri M. Cross-linked human serum albumin dimer has the potential for use as a plasma-retaining agent for the fatty acid-conjugated antidiabetic drugs. *J Pharm Pharmacol*. 2015 Feb;67(2):255-63.
5. Ishima Y, Inoue A, Fang J, Kinoshita R, Ikeda M, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, **Maruyama T**. Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy through the generation of nitric oxide. *Cancer Sci*. 2015 Feb;106(2):194-200.
6. Tanaka R, Ishima Y, Enoki Y, Kimachi K, Shirai T, Watanabe H, Chuang VT, **Maruyama T**, Otagiri M. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein on influenza virus-induced lung injury mice. *Front Immunol*. 2014 Nov 5;5:561.
7. Maeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VT, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, Otagiri M, **Maruyama T**. Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68+/CD206+ Kupffer cell-targeted nanoantioxidant for treatment of two acute hepatitis models. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015 Feb;352(2):244-57.
8. Miyazaki Y, Taguchi K, Sou K, Watanabe H, Ishima Y, Miyakawa T, Mitsuya H, Fukagawa M, Otagiri M, **Maruyama T**. Therapeutic impact of erythropoietin-encapsulated liposomes targeted to bone marrow on renal anemia. *Mol Pharm*. 2014 Nov 3;11(11):4238-48.
9. Anraku M, Tanaka M, Hiraga A, Nagumo K, Imafuku T, Maezaki Y, Iohara D, Uekama K, Watanabe H, Hirayama F, **Maruyama T**, Otagiri M. Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients. *Carbohydr Polym*. 2014 Nov 4;112:152-7.
10. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Ishima Y, Otagiri M, **Maruyama T**. Carbon monoxide-bound red blood cell resuscitation ameliorates hepatic injury induced by massive hemorrhage and red blood cell resuscitation via hepatic cytochrome P450 protection in hemorrhagic shock rats. *J Pharm Sci*. 2014 Jul;103(7):2199-206.
11. Ishima Y, Fang J, Kragh-Hansen U, Yin H, Liao L, Katayama N, Watanabe H, Kai T, Suenaga A,

- Maeda H, Otagiri M, **Maruyama T**. Tuning of poly-S-nitrosated human serum albumin as superior antitumor nanomedicine. *J Pharm Sci*. 2014 Jul;103(7):2184-8.
12. Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, Kobayashi K, Otagiri M, **Maruyama T**. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials*. 2014 Aug;35(24):6553-62.
13. Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Ishima Y, **Maruyama T**, Kragh-Hansen U, Hirayama F, Otagiri M. N-acetyl-l-methionine is a superior protectant of human serum albumin against photo-oxidation and reactive oxygen species compared to N-acetyl-L-tryptophan. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep;1840(9):2806-12.
14. 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 Oct;36(5):553-5.
15. 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 Apr 7;11(4):1228-38.
16. 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 Mar 28;4:4510.
17. 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.
18. 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 Jan 8;9(1):e85216.
19. Watanabe H, Sakaguchi Y, Sugimoto R, Kaneko K, 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*. 2014 Oct;18(5):814-20

## 2. 学会発表

(国際学会)

- Hiroshi Watanabe, Yohei Miyamoto, Yuki Enoki, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri and **Toru Maruyama**. Molecular Pharmacokinetic Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Tissue Damage In Chronic Kidney Disease For Medical Development And Therapeutic Application. (19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA )
- Shigeru Ogaki, Hitoshi Maeda, Kazuaki Taguchi, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri and **Toru Maruyama**. Carbon Monoxide Bound Red

Blood Cells Protect The Function Of Hepatic Cytochrome P450 After Resuscitation From Hemorrhagic Shock Via Suppression Of Toll-Like Receptor-4 Expression On The Kupffer Cells. (19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA )

3. Azusa Kodama, Hiroshi Watanabe, Ryota Tanaka, Yu Ishima, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri and **Toru Maruyama**. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing acute kidney injury. (19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA )
4. Hitoshi Maeda, Shota Ichimizu, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Ayaka Suenaga, Masaki Otagiri and **Toru Maruyama**. Polythiolated- and recombinant mannosylated-albumin as a novel CD68<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> Kupffer cell-targeted nano-antioxidant for the treatment of acute and chronic hepatitis models. (19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA )
5. **Toru Maruyama**, Ryota Tanaka, Hiroshi Watanabe, Azusa Kodama, Yu Ishima, Masaki Otagiri. Genetically engineered albumin-thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidant, ameliorates acute lung injury associated with influenza virus infection. (19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA )
6. Saori Nagao, Kazuaki Taguchi, Ryota Tanaka, Hiromi Sakai, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, **Toru Maruyama**. Development of nanotechnology-based carbon monoxide donor and its therapeutic impact on idiopathic pulmonary fibrosis. (19th North American ISSX

Meeting and 29th JSSX Meeting 2014/10/19-23 San Francisco, California, USA )

(国内学会)

1. 木下 遼、異島 優、成底 徹、小谷 俊介、中島 誠、渡邊 博志、小田切 優樹、**丸山 徹**. ニトロインドキシル硫酸による酸化ストレス産生メカニズムの解析. (第 14 回 日本 NO 学会学術集会 2014/5/16-17)
2. 本田 尚子、異島 優、宮崎 裕理、渡邊 博志、末永 綾香、小田切 優樹、**丸山 徹**. S-ニトロソ化アルブミンは腎性貧血改善と腎保護作用を併せ持つ新規慢性腎臓病治療薬である. (日本薬剤学会 第 29 年会 2014/5/20-22)
3. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、小田切 優樹、**丸山 徹**. 新規 EPR 増強剤の一酸化窒素付加アルブミンダイマーは Doxil<sup>®</sup>の抗腫瘍効果を向上する. (日本薬剤学会 第 29 年会 2014/5/20-22)
4. 橋本 麻衣、田口 和明、大柿 滋、渡邊 博志、藤山 淳史、土井 麻美、武岡 真司、半田 誠、小田切 優樹、**丸山 徹**. 血小板代替物 H12(ADP)リポソームの頻回投与時における体内動態特性(日本薬剤学会 第 29 年会 2014/5/20-22)
5. 西田 健人、大柿 滋、田中 遼大、小玉 あずさ、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、**丸山 徹**. 横紋筋融解症 AKI に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価. (日本薬剤学会 第 29 年会 2014/5/20-22)
6. 異島 優、井上 亜季、小田切 優樹、渡邊 博志、**丸山 徹**. 低酸素誘導オートファジーに対する Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの抑制効果. (日本薬剤学会 第 29 年会 2014/5/20-22)
7. **丸山 徹**、田中 遼大、異島 優、榎木 裕紀、小田切 優樹、渡邊 博志. インフルエ

- ンザ肺炎に対する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有効性評価. (日本薬剤学会 第 29 年会 2014/5/20-22)
8. 渡邊 博志、南雲 恒平、瀬戸山 博子、田中 基彦、佐々木 裕、山田 尚之、異島 裕、小田切 優樹、丸山 徹. 新規肝硬変病態マーカーとしての Cys 付加アルブミンの有用性評価. (日本薬剤学会 第 29 年会 2014/5/20-22)
  9. 丸山 徹、渡辺 佳織、異島 優. 多剤耐性菌に有効性を示す新規抗菌剤 SNO-AGP の創製. (第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014/6/18-20)
  10. 渡辺 佳織、異島 優、丸山 徹. 新規抗菌剤 SNO-AGP の多剤耐性菌に対する克服効果. (第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014/6/18-20)
  11. 今福 匡史、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. 透析患者における新規酸化ストレスマーカーとしてのシステイン付加 Cys34 アルブミンの有用性評価. (第 57 回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6)
  12. 戸田 翔太、渡邊 博志、弥永 直樹、濱崎 慶輔、國安 明彦、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. Renal Drug Delivery System を可能とする腎標的化ペプチドの網羅的探索. (第 57 回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6)
  13. 小玉 あずさ、渡邊 博志、田中 遼大、近藤 真澄、WU Qiong、遠藤 正之、異島 優、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹. アルブミン-チオレドキシシン融合体によるシスプラチン腎症予防効果. (第 57 回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6)
  14. 渡邊 博志、宮本 洋平、榎木 裕紀 (D3)、異島 優、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血管障害作用. (第 57 回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6)
  15. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、小田切 優樹、丸山 徹. 新規 EPR 増強剤の一酸化窒素付加アルブミンダイマーは Doxil の抗腫瘍効果を向上する. (第 30 回 日本 DDS 学会学術集会 2014/7/30-31)
  16. 西田 健人、大柿 滋、田中 遼大、小玉 あずさ、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. 横紋筋融解症 AKI に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価. (第 30 回 日本 DDS 学会学術集会 2014/7/30-31)
  17. 異島 優、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹. PEG 化や 2 量体化により増強する S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの抗腫瘍活性. (第 30 回 日本 DDS 学会学術集会 2014/7/30-31)
  18. 西田 健人、大柿 滋、田中 遼大、小玉 あずさ、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. 横紋筋融解症 AKI に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価. (第 39 回 西日本薬剤学研究会 2014/8/29-30)
  19. 渡邊 博志、宮本 洋平、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による NADPH oxidase 活性化を介した尿細管及び血管障害作用. (第 26 回 腎とフリーラジカル研究会 2014/9/20)
  20. 渡邊 博志、南雲 恒平、田中 遼大、小玉 あずさ、異島 優、山田 尚之、瀬戸山 博子、田中 基彦、佐々木 裕、田中 元子、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹. 酸化ストレス関連疾患とトランスレーショナルリサーチ. (第 8 回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2014/11/15-16)
  21. 永尾 紗理、田口 和明、田中 遼大、酒井 宏水、渡邊 博志、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。(第8回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2014/11/15-16)
22. 皆吉 勇紀、田中 遼大、異島 優、榎木 裕紀、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹. インフルエンザウイルスによる肺障害マウスに対するヒト血清アルブミン-チオレドキシンの治療効果。(第8回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2014/11/15-16)
23. 池田 真由美、異島 優、木下 遼、渡邊 博志、池田 剛、小田切 優樹、丸山 徹. PDE5阻害剤は Poly-S ニトロソ化ヒト血清アルブミンのcGMP誘導性アポトーシスを増強する。(第8回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2014/11/15-16)
24. 丸山 徹、渡辺 佳織、異島 優、小川 和加野、黒田 照夫、小田切 優樹. S-ニトロソ化  $\alpha$ 1-酸性タンパク質による抗生物質の多剤耐性克服と機序解明。(第36回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2014/11/20-21)
25. 異島 優、井上 亜希、方 軍、渡邊 博志、前田 浩、小田切 優樹、丸山 徹. ベバシズマブの抗腫瘍活性に及ぼす Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの併用効果。(第36回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2014/11/20-21)
26. 西田 健人、大柿 滋、田中 遼大、小玉 あずさ、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. 横紋筋融解症 AKI に対するアルブミン-チオレドキシニン融合体の治療効果と機序解明。(第31回 日本薬学会九州支部大会 2014/12/6-7)
27. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹. ナノ EPR 増強剤の NO 付加アルブミンダイマーは高分子抗癌剤の腫瘍移行性と抗腫瘍効果を増強する。(第31回 日本薬学会九州支部大会 2014/12/6-7)
28. 戸田 翔太、渡邊 博志、弥永 直樹、濱崎 慶輔、國安 明彦、長谷川功紀、後藤 久美子、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. Renal DDS を可能とする腎標的化ペプチドの網羅的探索と腎送達能の評価。(第31回 日本薬学会九州支部大会 2014/12/6-7)
29. 池田 真由美、異島 優、木下 遼、渡邊 博志、池田 剛、小田切 優樹、丸山 徹. PDE阻害剤は NO 付加ヒト血清アルブミンの抗癌作用を増強する。(第31回 日本薬学会九州支部大会 2014/12/6-7)
30. 皆吉 勇紀、田中 遼大、異島 優、榎木 裕紀、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹. インフルエンザ誘発急性肺障害に対するアルブミン-チオレドキシニン融合体の有用性評価。(第31回 日本薬学会九州支部大会 2014/12/6-7)
31. 橋本 麻衣、田口 和明、大柿 滋、異島 優、渡邊 博志、西川 可穂子、木下 学、武岡 真司、池田 康夫、半田 誠、小田切 優樹、丸山 徹. 血小板減少状態における血小板代替物 H12 (ADP) リポゾームの体内動態解析。(第21回 日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9)
32. 丸山 徹、前田 仁志、田口 和明、異島 優、渡邊 博志、木下 学、小田切 優樹. CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>クッパー細胞選択的ナノ抗酸化剤のポリチオール付加マンノースアルブミンは急性肝障害を抑制する。(第21回 日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9)
33. 大柿 滋、田口 和明、西田 健人、小玉 あずさ、渡邊 博志、異島 優、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹. 横紋筋融解症誘発急性腎障害に対するアルブミン-チオレドキシニン融合体の治療効果と機序解明。(第21回

日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9)

34. 大柿 滋、西田 健人、小玉 あずさ、渡邊博志、異島 優、小田切 優樹、深川 雅史、丸山 徹. 横紋筋融解症誘発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有用性評価. (第 5 回 腎不全研究会 2014/12/13)
35. 丸山 徹、成底 徹、渡邊 博志、小田切 優樹、深川 雅史、異島 優. 新規尿毒症物質ニトロ化インドキシル硫酸の活性酸素誘導能. (第 5 回 腎不全研究会 2014/12/13)
36. 渡邊 博志、西田 健人、大柿 滋、田中 遼

大、小玉 あずさ、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. 横紋筋融解症 AKI に対するナノ酸化炎症モジュレーターの腎保護効果. (日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28)

37. 丸山 徹、異島 優、成底 徹、小谷 俊介、中島 誠、渡邊 博志、小田切 優樹. 尿毒症物質インドキシル硫酸の酸化修飾体に関する構造特性と生物活性. (日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28)

G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含む)  
該当なし

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業」

『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)』

分担研究報告書

超微細形態解析

分担研究者 鈴木 英紀(日本医科大学・形態解析共同研究施設・准教授)

研究要旨：フィブリノゲン $\gamma$ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合させ、さらに ADP を内包させた H12-(ADP) リポソームは、コラーゲン、ADP により惹起されるヒト血小板凝集を促進させることを電顕的に報告してきた。昨年度は、ウサギを使った *in vivo* の実験で、低血小板肝臓出血モデルで血小板血栓に巻き込まれたリポソームを確認し、H12-(ADP) リポソームが、血小板減少状態の生体の止血に関与することを示唆する結果を得た。今年度は2項目について検討した。すなわち、1) 磁性鉄粒子内包 H12-(ADP) リポソームの電顕的観察を行い、さらに2) 衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微形態的検討を行った。しかし、1) の磁性粒子内包 H12-(ADP) リポソームでは内包の鉄粒子が観察されなかった。一方、2) の H12-(ADP) または (ADP) リポソーム注入後の右肺に対する衝撃波の検討では、右肺では肺出血が著明で、血小板凝集塊が肺胞血管内腔および肺胞に形成され、H12-(ADP) リポソームが巻き込まれていた。しかし、(ADP) リポソームの前投与では致死率が高いこと、凝集塊中への巻き込みも少ないことから、本傷害に対する H12-(ADP) リポソームの前投与が有効であることが示唆された。

#### A. 研究目的

H12 を表面に結合させ、ADP を内包させた H12-(ADP) リポソームは、ヒト血小板浮遊液へのコラーゲンまたは ADP 添加により惹起される血小板凝集を促進させる。すなわち、リポソームはその表面の H12 によって血小板のフィブリノゲン受容体(GPIIb/IIIa)に結合し、血小板相互を架橋する。次いで、内包する ADP が凝集塊中で漏れ出すことによって凝集をさらに促進させると考えられている。

実際 *in vitro* の検討では、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを混ぜ、さらにトロンピンを加えて攪拌すると、血小板は凝集し、この時リポソームは血小板相互間にも多量に存在することを凍結超薄切片法および凍結切断エッチングレプリカ法で観察してきた。

一方、H12-(ADP) リポソームの動物を使った *in*

*in vivo* における実験においても、本リポソームはラットの止血時間を短縮させる効果を得ている。また、前もって急性的に血小板減少状態を生起したウサギに、リポソームを投与し、さらに肝出血させた低血小板肝臓出血モデルにおいても、止血時間を短縮する結果を得ている。この検体を電顕で観察した時、出血部に血小板凝集が形成され、その中にリポソームが見られ、*in vitro* の実験と同様な結果を得てきた。

しかし、リポソームは電顕試料調製過程に分割れる有機溶媒により傷害され、通常の電顕法である超薄切片法では、同定しにくいのも事実である。そこで、今回、磁性鉄粒子内包 H12-(ADP) リポソームを調整し、血小板浮遊液に本リポソームを混ぜ、その後トロンピンを添加し、血小板を活性化、凝集させ、これらを固定後、通常の超薄切片法の試料を作製し、磁性体内包リポ

ソームの可視化への有効性について検討した。

また、爆発などの衝撃波による外傷では、中空臓器である肺損傷から、致死性の肺出血を合併することが多い。本研究班の木下グループではレーザー誘起衝撃波を用いて、ヒトの Blast Lung Injury の病状に近似した致死性肺出血マウスモデルの作製に成功しており、最近 H12-(ADP) リポソーム前投与が本症の救命効果に有効であることが分ってきた。そこで、本症例における有効性解析のために電顕検索を行った。

## B. 研究方法

### 1) 磁性鉄粒子内包 H12-(ADP) リポソームの電顕的観察

① 磁性体内包 H12-(ADP) リポソームの調製：コレステロール、DPPC、DHS、PEG-DSPE、H12-PEG-Glu2C18 をそれぞれ 5/5/1/ 0.033/0.033 の比で混合、凍結乾燥し、250 mg の混合脂質を調製した。次いで、ADP/磁性ナノ粒子溶液 (ADP:1 mM, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (四酸化三鉄、直径 20 nm) 2.5 mg/mL) 5 mL で 6 時間水和した。さらに、エクストルーダー (フィルター径: 0.45 μm x 2, 0.22 μm x 3, 0.20 μm x 1) で粒子径を調節した。最後に、ゲル濾過クロマトグラフィーにて外水相の ADP と磁性ナノ粒子を除去した。調製物の物性評価は粒子径、ゼータ電位、脂質濃度、ADP 濃度、磁性粒子濃度、エンドトキシン量を測定した。最終的に 2.26 mg/ml の磁性体内包 H12-(ADP) リポソームを調製した。内包された磁性体粒子の濃度は 0.23 mg/mL であった。

② ネガティブ染色法による観察：調製したリポソームを生食で 5 倍に希釈し、ホルムバーム膜を張った電顕用グリッドメッシュに 5 μl 載せ、5 分間静置して膜上にリポソームを接着させた。過剰なリポソームを濾紙で吸い取り、2% 酢酸ウラニルを 1 滴載せ、1 分後に過剰な酢酸ウラニルを吸い取り、ネガティブ試料とし、透過型電顕 (日本電子 JEM-1010) で観察した。

③ ヒト血小板と磁性体内包 H12-(ADP) リポソーム混合液へのトロンビン刺激後の観察：

洗浄血小板の調整：健康成人から 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として血液を採血し、これを遠心して多血小板血漿 (PRP) を得た。PRP

に PGE<sub>1</sub> (最終濃度 1 μM) を加えて遠心し、ペレットを 0.35% BSA と 1 μM PGE<sub>1</sub> を含む HEPES-Tyrode 液に浮遊した。37°C で 15 分間静置後、遠心し、ペレットを 0.35% BSA を含む HEPES-Tyrode 液に再浮遊し、血小板数を  $2.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$  に調整した。

この洗浄血小板浮遊液 (0.8 ml) に 2.26 mg/ml の磁性体内包 H12-(ADP) リポソームを 0.1 ml 加えて混合し、さらに 1 分後に 1 U/ml トロンビンを 0.1 ml 添加し、静置または 1 分間攪拌して凝集させた。2% グルタルアルデヒドを等量加えて固定後、試料をエッペンドルフチューブに移し、3,000 rpm で遠心した。試料は常法に従って、洗浄、オスミウム後固定、脱水後、Epon に包埋、熱重合して電顕用試料を作製した。超薄切片を調製後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色し、同様に透過型電顕で観察した。

### 2) 衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微形態的検討

① Blast Lung Injury マウスの作製：レーザー誘起衝撃波装置は波長 694 nm の Q スイッチ・ルビーレーザーをターゲット (天然ゴム + 直径 12 mm, 0.5 mm 厚の亚克力板) に単発照射し、プラズマ現象から 8J の衝撃波を発生するものを自作した。マウスには前もって H12-(ADP) リポソーム、コントロールのための (ADP) リポソーム、PBS リポソームまたは生食を尾静脈から 120 μl (20 mg/kg) 投与した。1 時間後、マウスを剃毛後、腹臥位に固定し、レーザー装置をマウス右側背より密着させた上で、衝撃波を右肺全体に照射し、Blast Lung Injury を作製した。レーザー照射後、気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60 分間呼吸状態などを観察した。

② Blast Lung Injury マウス肺の電顕観察：レーザー照射マウスの右肺、左肺を切り出し、細切して 2% グルタルアルデヒドに浸漬した。次いで、油回転ポンプで肺の空気抜きを行い、沈下させて固定した。以下、上記した超薄切片法の試料作製を行い、同様に透過型電顕で観察した。



## C. 研究結果

### 1) 磁性鉄粒子内包 H12-(ADP) リポソームの電顕的観察

本リポソームをネガティブ染色法で観察すると、約 200~400 nm の大きさで観察された (図 1)。これらの形態はこれまで観察してきた種々のリポソームとほぼ同様であった。しかし、本法では観察される部位は表面に限局されるので、内部の磁性体鉄粒子は見られない。

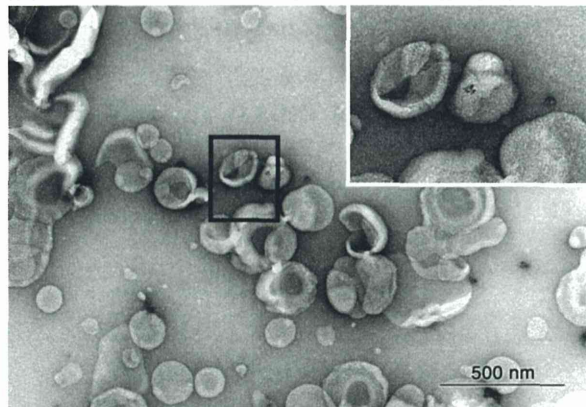


図 1. 磁性体内包 H12-(ADP) リポソームのネガティブ染色像

リポソームほぼ球状に観察される。本法では、内部まで観察されないために、磁性体鉄粒子は観察されない。挿入図は口部の拡大像を示している

一方、ヒト血小板浮遊液に磁性体内包 H12-(ADP) リポソームを混ぜ、さらにトロンビンを加えて攪拌し、その後の血小板とリポソームの相互関係を超薄切片法で観察した (図 2)。トロンビン添加後、凝集像を観察した。

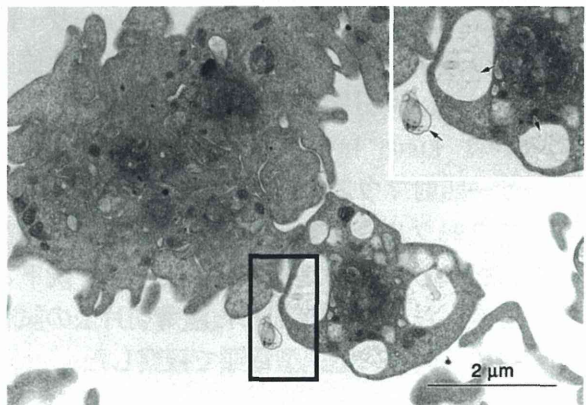


図 2. ヒト血小板と磁性体内包 H12-(ADP) リポソームの相互反応の電顕像

リポソームは凝集した血小板の外側と拡張した開放小管系内に変形して見られる (口部を拡大した挿入図の矢印)。しかし、磁性体粒子は確認されない

リポソームはやや変性した形で凝集塊辺縁部、血小板の拡張した開放小管系中には見られたが、リポソーム内部に磁性鉄粒子は観察されなかった (図 2 挿入図)。

### 2) 衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微形態的検討

マウスの正常肺では空気が充満している肺胞管、肺胞、酸素と二酸化炭素の交換の場である毛細血管が観察される (図 3)。肺胞中に血液細胞および血漿成分が漏れ出すことはない。

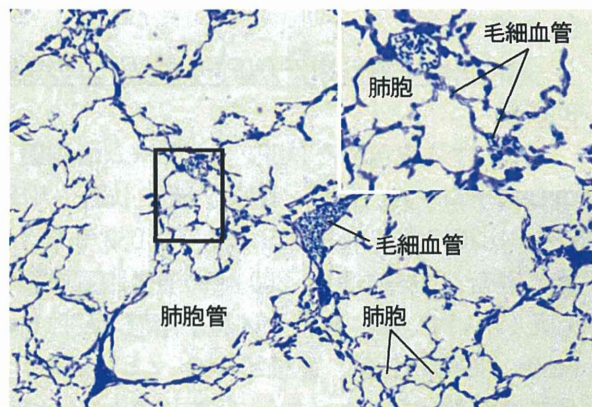


図 3. マウス正常肺のトルイジンブルー染色光顕像  
マウス肺には肺胞管、肺胞、毛細血管が見られる。挿入図は口部の拡大像を示す。この図には気管枝または細気管枝は見られない

電顕で観察すると、肺胞上皮細胞は I 型および高電子密度で界面活性物質を含む層板小体をもつ II 型上皮細胞が見られ、毛細血管中には赤血球が多数見られる (図 4)。

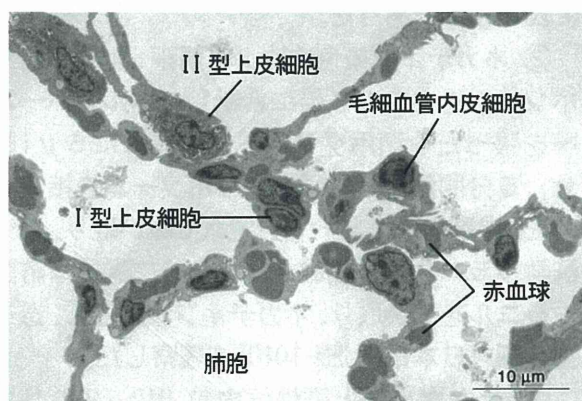


図 4. マウス正常肺の電顕像

肺胞は毛細血管を含む上皮細胞によって小室に区切られている。肺胞上皮は I 型および II 型細胞よりなる。毛細血管中には赤血球が充満している。



一方、前もって H12-(ADP) または (ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺では、特に右肺の肺出血が顕著に見られた (図 5、図 6)。

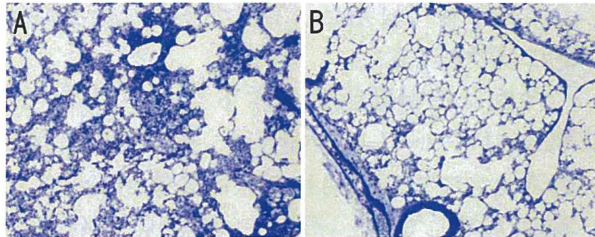


図 5. H12-(ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺の光顕像

A の右肺では肺胞中に出血が見られる。しかし B の左肺では出血はほとんど見られない

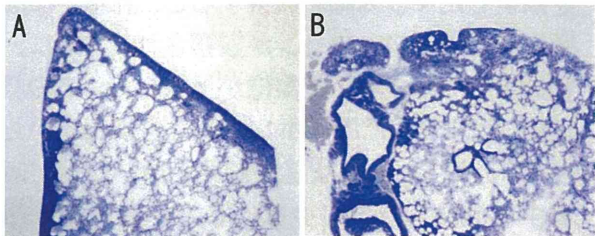


図 6. (ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺の光顕像

A の右肺では肺胸膜以下の肺胞内に出血が目立っている。本マウスでは、B の左肺胞内にも出血が見られる。しかし、全体的には H12-(ADP) リポソーム注入時と同様な所見を示している

H12-(ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺を電顕で観察すると、肺胞中には多数の赤血球とフィブリンが観察された (図 7)。さらに、毛細血管中には血小板が凝集を形成した像が見られた (図 8)。

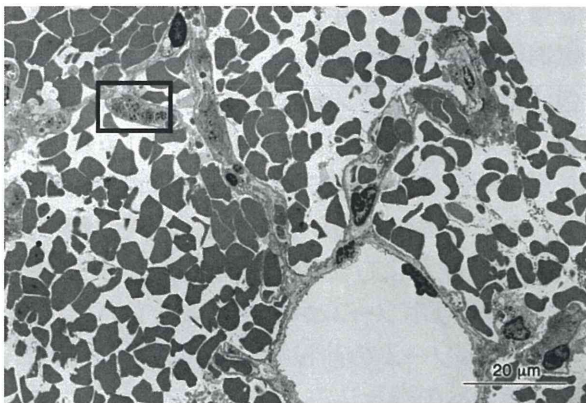


図 7. 衝撃波を照射したマウス右肺の電顕像

ほとんどの肺胞中には、多量の赤血球とフィブリンが見られる。毛細血管中には変形し、凝集した血小板が観察される (□部)

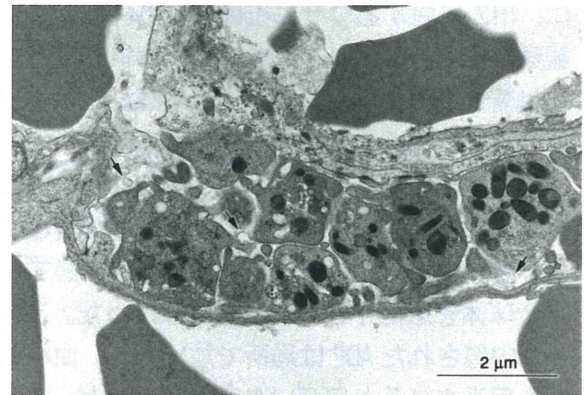


図 8. 衝撃波を照射したマウス右肺の電顕像 (図 6 □部の拡大像)

毛細血管中には変形し、凝集した血小板が観察され、さらにリポソームも見られる (矢印)

また他の部位では、肺胞内にも大きな血小板凝集塊が形成されていた。H12-(ADP) リポソームは多くはないが、凝集塊に巻き込まれていた。さらにその周囲には、フィブリン形成が見られた。左肺では、肺胞への出血は全体的に軽微であった。

(ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺を光顕で観察すると、H12-(ADP) リポソームと同様な所見を得た。すなわち、右肺では肺胸膜直下の肺胞から出血が見られた (図 6A)。一部のマウスでは、左肺でも肺胞出血が見られた (図 6B)。電顕でも肺胞出血、フィブリン形成、毛細血管内および肺胞での血小板凝集塊が H12-(ADP) リポソーム注入後と同様に観察された。しかし、凝集塊に巻き込まれた (ADP) リポソームは少なかった。

#### D. 考察

##### 1) 磁性鉄粒子内包 H12-(ADP) リポソームの電顕的観察

これまで種々のリポソームを超薄切片法、ネガティブ染色法、凍結超薄切片法、および急速凍結レプリカ法で観察してきた。最も一般的な電顕法である超薄切片法では、試料作製過程でエタノール、酸化プロピレンを使うために、リポソームは一部溶解し、変形した所見を示してきた。凍結超薄切片法では上記の有機溶媒を使わないために、リポソームは試料調製過程において溶けることなく二重膜構造をもつ人工膜構造を示した。さら

に、H12 に対するウサギ抗体を使う免疫電顕法で観察すると、リポソームの周囲にコロイド金粒子が付着するために、コントラストのないリポソームの識別性良くなった。しかし、凍結超薄切片法は切片を作製するのが難しく、また $-100^{\circ}\text{C}$ で薄切した切片を室温に戻した時に、切片は折れ曲り、重り合いもあるようで、リポソーム像は必ずしも完全球体を想像させるものではなかった。これまで、内包されたADPは局所で放出され、血小板凝集を促進させるとのデータを得ていたが、その局所ではリポソームがどのような形になるかの検討が分担研究者の命題でもあった。そこで、急速凍結レプリカ法で、まずリポソーム自身は球体であること、血小板凝集塊中に巻き込まれたりリポソームは楕円体に変形することを報告してきた。

今回の検討では、リポソーム内に直径 20 nm の磁性体鉄粒子を内包させたものを観察した。磁性体の内包は、人工血小板としてのリポソームを局所により効率的に導くための一つの方法と考えられる。ネガティブ染色法ではこれまでのリポソームとほぼ同様な形態を示した。しかし本法ではリポソーム内部は観察されないため、磁性体微粒子は観察されなかった。次いで、ヒト血小板と本リポソームを混ぜ、さらにトロンビンを加えてものを超薄切片法で観察した。本実験では、リポソームが凝集塊に巻き込まれることをすでに確認してきた。リポソームは血小板凝集塊辺縁部、血小板開放小管系中に変形したのが見られた。しかし、磁性体粒子そのものは観察されなかった。この結果は、超薄切片法による試料作製過程において、使用する有機溶媒のためにリポソーム膜が破れ、内包されていた磁性体粒子が流失してしまったことを示している。この結果により、凍結超薄切片法による内包磁性体の確認が必要であると考えられる。

## 2) 衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微形態的検討

これまで人工血小板リポソームを使った *in vivo* の動物実験では、ウサギ低血小板肝臓出血モデルを用いて、出血後に自己の血小板、血漿、H12-(ADP) リポソームを投与し、止血時間と 24 時間の生命予後を検討し、本リポソームは低血小板

状態で進行する出血に対して、血小板輸血と同等の止血ならびに救命効果を発揮した。形態的に検討すると、肝損傷部でリポソームを巻き込んだ血栓が観察された。すなわち、H12-(ADP) リポソームは血小板代替物として機能することを形態学的に証明してきた。

今回は分担研究者の木下グループが、H12-(ADP) リポソームの前投与は、衝撃波による致命的肺出血マウスに対して救命効果があることを実験、証明してきた。そこで、本症例における H12-(ADP) リポソームの有効性解析のために電顕検索を行った。H12-(ADP) または (ADP) リポソームをマウス尾静脈に注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺を観察すると、肺胞中には多数の赤血球とフィブリンが観察され、さらに、毛細血管中には血小板凝集像が見られた。この凝集塊中には H12-(ADP) リポソームも含まれていた。(ADP) リポソームでは延命効果がないこと、凝集塊中への巻き込みも少ないことから、本効果は H12-(ADP) リポソームに特有な効果と考えられる。すなわち、H12 を介してリポソームは凝集塊に巻き込まれ、その局所で ADP を放出することが必須と考えられる。ADP は病変部で代謝され、アデノシン作用を示すことによって、延命効果を示すと考えられる。

## E. 結論

今年度は以下の 2 項目について検討した。すなわち、1) 磁性鉄粒子内包 H12-(ADP) リポソームの電顕的観察を行い、さらに 2) 衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微形態的検討を行った。しかし、1) の磁性粒子内包 H12-(ADP) リポソームでは内包の鉄粒子が観察されなかった。一方、2) の H12-(ADP) または (ADP) リポソーム注入後の右肺に対する衝撃波の検討では、右肺では肺出血が著明で、血小板凝集塊が肺胞血管内腔および肺胞に形成され、凝集塊には H12-(ADP) リポソームが巻き込まれていた。しかし、(ADP) リポソームの前投与では致死率が高いこと、凝集塊中への巻き込みも少ないことから、本傷害に対する H12-(ADP) リポソームの前投与有効であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) 萩沢康介, 木下学, 宮脇博基, 佐藤俊一, 鈴木英紀, 土井麻美, 武岡真司, 小野聡, 斎藤大蔵, 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. Shock 29 (2): 1-8, 2014.

2. 学会発表：

- 1) 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学的検討. 第21回日本血液代替物学会年次大会. 2014. 12. 8-9, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

平成26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

αIIbβ3 インテグリンと H12 担持リポソームの結合解析  
—可溶性αIIbβ3 の作成—

分担研究者 鎌田徹治 (慶應義塾大学医学部 解剖学教室 専任講師)

研究要旨

H12 担持リポソーム (H12V) は、活性化血小板膜表面のαIIbβ3 インテグリンと結合することにより、その止血機能を増強する。したがって、H12V と活性化αIIbβ3 インテグリンの結合を正確に測定することは、その止血作用を予測する上で不可欠であるばかりでなく、製剤の品質を調べる上でも重要である。

これまでの研究から、血小板・αIIbβ3発現細胞を用いた測定法は不確定要素が多く、再現性に欠くことが明らかになった。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によるH12Vと精製αIIbβ3の結合測定法は、細胞を使用せずH12Vの標識も不要なため、きわめて再現性の高い測定法と考えられる。前年度の研究では、αIIbβ3安定発現細胞からアフィニティー精製したαIIbβ3を使用し、SPR法でH12Vの結合を調べた。十分な量のαIIbβ3をセンサーチップに固定化することができたものの、チップへのH12Vの結合は全く測定されなかった。このチップと抗αIIbβ3モノクローナル抗体の結合を調べたところ、これらの抗体の結合も全く測定されなかった。αIIbβ3はI型膜タンパクであり、精製の過程で界面活性剤を使用しなければならない。しかし、界面活性剤はタンパク質を変性させる可能性があり、本件でもαIIbβ3が変性した可能性が示唆された。

本年度の研究では界面活性剤を使用せずにαIIbβ3 を精製する方法の検討を行った。遺伝子組み換えによって、αIIb とβ3 の両鎖の膜貫通ドメイン以降を欠損した可溶性αIIbβ3 の cDNA を作製し動物細胞に導入した。培養上清中に分泌された可溶性αIIbβ3 を解析したところ、目的の分子量をもつタンパクが確認された。αIIbβ3 を活性化する Q595NTT 変異の有無による比較では、Q595NTT 変異をもつ可溶性αIIbβ3 の発現量は少なかったが差は僅かであった。アフィニティーカラムによる精製では、可溶性αIIbβ3 の一部はカラムに結合し精製することができたが、残りのほとんどは結合せず素通りした。今後は、カラムの容量、溶出条件を検討することにより、可溶性αIIbβ3 の精製は十分に可能と考えられる。

A. 研究目的

人工粒子 H12V は、フィブリノーゲンと同様に血小板同士を架橋することによって血栓形成を促進すると考えられる。フィブリノーゲンと異なり、H12V はαIIbβ3 イン

テグリンの結合部位を複数もつために結合の avidity は高く、高濃度のフィブリノーゲンの共存下でも血小板と結合することが可能である。実際に経静脈投与により血小板減少症マウスの出血時間の短縮が認め



られているが、臨床応用を考慮した場合、製剤の機能が安定していなければならない。このためには、H12V の機能を正しく評価できる測定系の確立が不可欠である。H12V の止血機能は、血小板 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンとの結合に依存していると考えられる。したがって、H12V と $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンの結合親和性、結合動態を測定することは、H12V の止血機能の予測に役立つばかりでなく、製剤の安定性を評価する上でも重要である。

これまでの研究では、血小板あるいは培養細胞膜表面の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と H12V の結合を調べてきた。この方法では、1) 細胞の状態が測定結果に大きく影響する、2) H12V を化学標識する必要がある、3) 細胞上の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を活性化させる必要がある、4) 結合親和性以外のパラメータを得るのが困難などの問題があるため、新たな測定法の確立が必要である。SPR 法による $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と H12V の直接結合の測定では、これらの問題を全て排除することが可能なため、最も再現性が高い測定法として期待される。この方法では、センサーチップ側に $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を固定化し、その上に H12V を注入することによって結合をリアルタイムで測定する。ここで最も問題となるのが高純度の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を得ることである。前年度の研究では、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現培養細胞株から界面活性剤を用いて細胞膜を可溶化し、アフィニティークラムを用いて $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を精製する方法を試みた。しかし、この方法で得られた $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は抗 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 モノクローナル抗体との反応性を喪失しており、H12V とも結合しなかった。原因として、精製の過程、特に界面活性剤の使用により $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が変性したことが考えられた。

本年度の研究では、界面活性剤を使用せずに $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を精製する方法を検討した。遺伝子組み換えにより、高活性を有する可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を作製し精製を試みた。

## B. 研究方法

### I. $\alpha$ IIb $\beta$ 3 変異体の作成

$\alpha$ IIb 鎖、 $\beta$ 3 鎖の cDNA は Joseph C. Loftus 博士 (Mayor Clinic. AZ) から供与された。これらを哺乳類発現ベクターである pBJ-1 (Mark Davis 博士 University of California, San Francisco) から供与) にクローニングした。高活性型 $\alpha$ IIb 変異である Q595NTT は site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。膜貫通ドメイン以降のアミノ酸配列を欠損した $\alpha$ IIb-960tr、 $\beta$ 3-691tr は、 $\alpha$ IIb のアミノ酸残基 Glu-960、 $\beta$ 3 のアミノ酸残基 Pro-691 に停止コドン導入することで作製した。C 末端側のアミノ酸残基 Leu-959 と、Pro-688 をそれぞれ Cys 残基に置換した $\alpha$ IIb-959C-960tr、 $\beta$ 3-688C-691tr も site-directed mutagenesis 法により作成した。これらの変異と Q595NTT を組み合わせた $\alpha$ IIb-595N-960tr、 $\alpha$ IIb-595N-959C-960tr は、それぞれ $\alpha$ IIb-960tr、 $\alpha$ IIb-959C-960tr の BamHI 断片を Q595NTT の BamHI 断片と交換することで作成した。

### II. 細胞培養とトランスフェクション

Chinese hamster ovary (CHO-K1) 細胞は 10% fetal calf serum、1% penicillin and streptomycin、1% non-essential amino acids 添加 Dulbecco's modified Eagles medium を用い 37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の incubator で行った。50  $\mu$ g の $\alpha$ IIb cDNA は 50  $\mu$ g の  $\beta$ 3 cDNA と一緒に CHO-K1 細胞へ electroporation 法を用いてトランスフェクトした。24 時間後浮遊細胞を取り除き、培養液を交換して培養を継続した。

### III. Flow Cytometry

トランスフェクションして 48 時間後、接着した細胞を剥離し、1mM Ca<sup>2+</sup>/1mM Mg<sup>2+</sup>加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10 $\mu$ g/ml



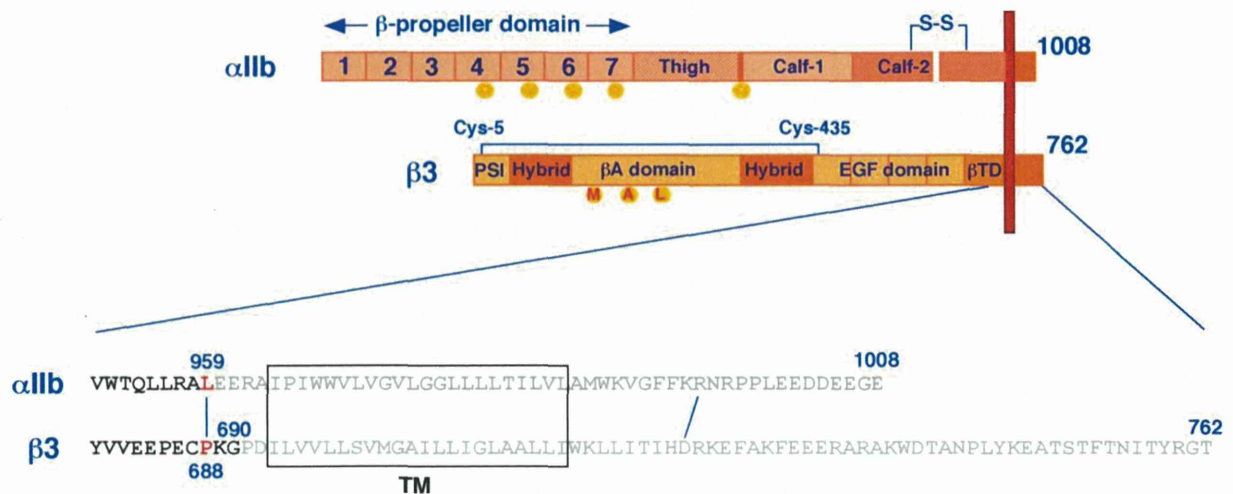


図1. 可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の設計

と混和し氷上で 30 分間反応させた。細胞を遠心洗浄した後、二次抗体として RPE 標識抗マウス IgG と氷上で 30 分間反応させた。遠心洗浄の後細胞を 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ /1mM  $\text{Mg}^{2+}$  加 HEPES-buffered saline (HBS) に再浮遊させ、FACSCalibur を用いて細胞の各モノクローナル抗体による陽性率と蛍光強度を測定した。

#### IV. ウェスタンブロッディング

可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 cDNA ( $\alpha$ IIb-960tr/ $\beta$ 3-691tr、 $\alpha$ IIb-595N-960tr/ $\beta$ 3-691tr、 $\alpha$ IIb-959C-960tr/ $\beta$ 3-688C-691tr、 $\alpha$ IIb-595N-959C-960tr/ $\beta$ 3-688C-691tr) を CHO 細胞にトランスフェクトした。一定時間培養した後培養液を回収し、4000rpm で 15 分遠心した。培養上清 10 $\mu$ l を等量のサンプルバッファーと混合した後 96 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し、7.5% SDS-PAGE で泳動した。泳動したタンパクは PVDF 膜に転写した後、anti- $\beta$ 3 mAb の VNR5-2 と反応させた。PVDF 膜を洗浄したのち HRP 標識抗マウス IgG と反応させた。抗体と結合したタンパクは SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate を用いて発光させ、フィルムに露光したのち現像した。

#### V. 可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のアフィニティー精製

可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の精製は RGD カラムを使用して行った。製造元の方法に従い、NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) に GRGDS ペプチドを固定化した。遠心した後、可溶性画分を作製した RGD-Sepharose Beads と 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。RGD-Sepharose Beads を洗浄・遠心したのち、結合した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を 5mM EDTA を含むバッファーにて溶出した。精製した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は SDS-PAGE にて展開し、ウェスタンブロット法にて分子量の確認を行った。

#### C. 研究結果

##### I. 可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 cDNA の作成

$\alpha$ IIb と  $\beta$ 3 はともに細胞膜を一回貫通する I 型膜タンパク質である。N 末端側に大きな細胞外ドメインをもち、これに一個の膜貫通ドメイン、C 末端側の短い細胞内ドメインが続く。可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を作製するために、まず膜貫通ドメイン以降を欠損した変異体の cDNA を作成した。図 1 に示したように、 $\alpha$ IIb、 $\beta$ 3 膜貫通ドメインの N 末端側のアミノ酸残基に部位指定変異法を用いて停止コドン導入した。具体的には、野生型 $\alpha$ IIb cDNA のアミノ酸残基 Glu-960

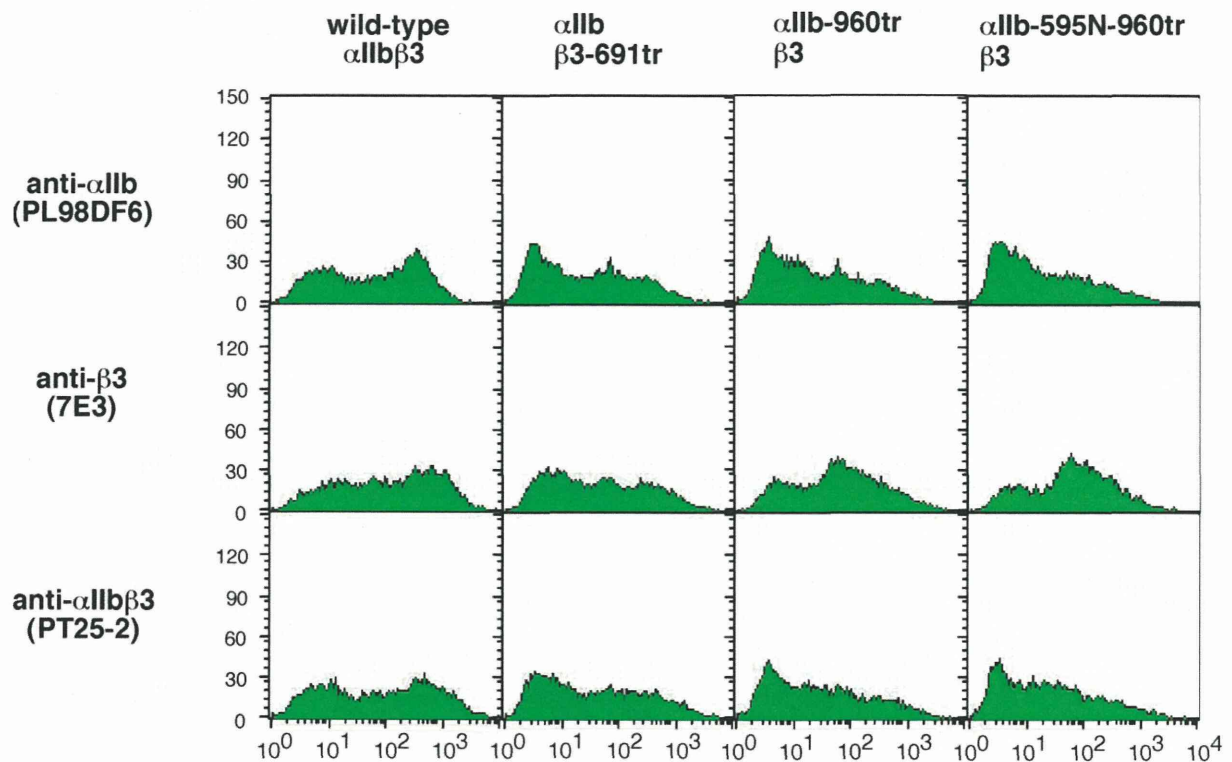


図2. 膜貫通ドメイン欠損が $\alpha$ IIb $\beta$ 3発現に与える影響

( $\alpha$ IIb-960tr)、野生型 $\beta$ 3 cDNA のアミノ酸残基 Pro-691 に停止コドン導入した ( $\beta$ 3-691tr)。同様の変異を高活性型 $\alpha$ IIb 変異体 (Q595NTT) にも導入した ( $\alpha$ IIb-595N-960tr)。さらに、これらのミノ酸残基Pro-688をそれぞれCys残基に置換したcDNAを作成した ( $\alpha$ IIb-959C-960tr、 $\alpha$ IIb-595N-959C-960tr、 $\beta$ 3-688C-691tr)。この変異により、 $\alpha$ IIb と $\beta$ 3 の間にジスルフィド結合が形成される。

## II. FACSによる発現確認

Iで作成したcDNAをCHO細胞に導入し、発現確認を行った。これらの $\alpha$ IIb $\beta$ 3は複数箇所に変異をもつため、発現が障害される可能性が十分に考えられる。膜貫通ドメインをもたない可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3は細胞膜に留まることができないため、従来のFACSによる発現量測定は困難である。そこで、変異 $\alpha$ IIbと野生型 $\beta$ 3、野生型 $\alpha$ IIbと変異 $\beta$ 3をそれぞれ動物細胞に共発現さ

せた。この場合、 $\alpha$ IIbと $\beta$ 3のどちらかが膜貫通ドメインをもつため細胞膜に留まり、FACSによる細胞表面での発現量測定が可能となる。一次抗体としてPL98DF6 (anti- $\alpha$ IIb)、7E3 (anti- $\beta$ 3)、PT25-2 (anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3複合体)を、二次抗体としてRPE標識抗マウスIgGを用い、FACSにて蛍光量を測定した。図2は各発現細胞の蛍光強度をヒストグラムで表したものである。その結果、野生型 $\alpha$ IIb $\beta$ 3の発現に比べ、 $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3-691trの発現は若干減少していた。 $\alpha$ IIb-960tr/ $\beta$ 3と $\alpha$ IIb-595N-960tr/ $\beta$ 3の発現も有意に低かった。一方、 $\beta$ 3鎖のC末端にCys変異を有する $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3-688C-691trの発現は野生型に比べ大きな差はなかった。しかし、 $\alpha$ IIb鎖のC末端にCys変異を有する $\alpha$ IIb-959C-960tr/ $\beta$ 3の発現は明らかに低く、 $\alpha$ IIb-595N-959C-960tr/ $\beta$ 3の発現は野生型に比べ著明に減少していた(図3)。