

201407017B

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

平成24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成27(2015)年3月

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

平成24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成27(2015)年3月

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)

平成24～26年度
総括・分担研究報告書

平成27年3月

・・・・・・・・・・・・・・・・研究組織・・・・・・・・・・・・・・・・

(研究代表者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

池田康夫 早稲田大学理工学術院 教授

木下学 防衛医科大学校 准教授

丸山徹 熊本大学薬学部 教授

鈴木英紀 日本医科大学 准教授

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

目 次

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

平成 24～26 年度総合研究報告

I. 総合研究報告書

・総括研究報告書

半田 誠…………… 1

・分担研究報告

1. H12-(ADP)リポソーム試験物の製造工程・品質管理体制の確立

武岡 真司…………… 17

2. 大量出血合併急性血小板減少家兎モデルにおける H12(ADP)リポソームの投与効果

木下 学…………… 30

3. H12(ADP)リポソームの体内動態の解析に関する検討

丸山 徹…………… 70

4. 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

半田 誠…………… 93

5. H12(ADP)リポソーム超微細形態解析

鈴木 英紀…………… 99

5. $\alpha\Pi\beta\beta3$ インテグリンと H12 担持リポソームの結合解析

鎌田 徹治…………… 108

II. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 127

III. 研究成果の刊行物・別冊

I. 総合研究報告

総括研究報告

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

平成 24～平成 26 年度 総合研究報告書

主任研究者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

研究要旨

【目的】人工血小板／H12 (ADP) リポソーム (LP) の臨床研究への移行を目指して、本試験物の施設内製造・品質管理体制を確立し、薬物試験 (薬理試験、薬物動態試験等) について非臨床データの集積を行い、その適格性を評価する。

【方法と結果】試験物の暫定仕様に基づき、集積されたロットデータを検証して、製造工程・品質管理に係る標準手順書やチェックリストを整備した。4℃の保存条件下で少なくとも一年間は、試験物として長期保存が可能であった。LP の想定適応症である大量出血・輸血に伴う希釈性血小板減少症のウサギモデルで、致死性出血性ショックに対して、実臨床に即した投与プロトコルで血小板輸血に匹敵する効果 (出血量の抑制や救命) を認めた。超微形態観察で肝臓損傷部位での LP の集積が確認された。健常及びモデルラットを用いて RI 標識 LP の体内動態及び抗体による ABC 現象の発現を検討し、希釈性血小板減少モデルでの LP (単回投与) の体内動態は健常動物と変わりなかったが、抗 LP 抗体 (IgM) が惹起され、ABC 現象により追加投与の LP は速やかに血中から消失した。2 種類の DIC ラットモデルで、LP 投与による血栓及び臓器障害マーカーに変動なく、血栓の促進傾向は認められなかった。表面プラズモン共鳴法による LP の機能評価系に用いる可溶性活性型 α IIb β 3 蛋白を培養動物細胞上清より精製した。

【考察・結論】臨床研究への移行を目標として、ラボスケールにて、品質保証、製造体制の確立へのステップを順調に踏み、長期保存安定性などの、LP の人工血小板としての適格性を示唆するデータが集積できた。薬理試験により、血栓の誘発や増強の危惧なく、外傷や手術に伴う大量出血／危機的出血を適応症とすることを強く支持する成果が示された。薬物動態試験では、LP の安全性 (組織蓄積性がなく) や良好な血中滞留性を示すデータが集積され、想定される用法・用量が単回投与であることから、リポソーム製剤に共通して備わる欠点である ABC 現象は、考慮に入れる必要はないことが示唆された。

A. 研究目的

人工血液の開発は、医療の高度化と患者の高齢化に伴う需要の増加および少子化による献血人口の減少に対応した血液製剤の安定供給の確保等に関する法律（血液法）に基づき、官民学が取り組むべき重要な課題とされてきた。とりわけ、保存期間が短く、厳密な保存条件を要し、緊急使用が困難なヒト血小板（献血製剤や iPS 細胞大量培養由来物）に代わる人工物の開発は、欧米においても精力的に行われてきたが、未だに実用化はされていない。我々は、平成9年度より現在まで、厚労科研費の支援及び大学・企業の連携プログラムの協力を得て人工血小板の開発研究を継続し、多くの候補ナノ粒子の中から絞り込まれた H12(ADP) リポソームが、その効力と安全性の面からの前臨床評価により、創薬化が十分可能であると判断するに至った。

本微粒子は、粒子径が 250nm でポリエチレングリコール鎖による表面修飾により十分な血中滞留性と体内排泄性を備え、かつ認識分子としてヒトフィブリノゲンペプチド（H12）を表面に担持させることで止血局所（活性化血小板）特異性を有し、内包化したアデノシン 5' - ニリン酸（ADP）を血小板凝集依存性に止血局所で放出すること、が特徴である。実際、3つの異なった機能を有する有機分子（脂質類、合成ペプチド H12、リボヌクレオチド ADP）で構成された今迄に世界に類を見ない独創的な薬剤であり、かつ本来の人工血液の趣旨に即して生体材料を一切用いないことが特長である（基礎特許：薬物運搬体）。

当該 3 カ年研究では、民間企業あるいは大型開発研究費による公的機関との連携を促すとともに、外傷等による大量出血での使用を対象とした臨床研究への移行を目標として、本試験物の製造工程・品質管理と薬物試験（薬理試験、薬物動態試験等）についてデータの集積を行い、その適格性を検証する。

B. 研究方法

1. H12(ADP) リポソームの製造および品質管理 (武岡、池田) :

1) H12-(ADP) リポソームの作製

DPPC、cholesterol、DHSG、PEG-DSPE、H12-PEG-Glu2C18 を、モル比 5/5/1/0.033/0.033 で t-ブチルアルコールに溶解後に凍結乾燥させ、ADP 水溶液 (1 mM) と水和させ、押出 (エクストルージョン) 造粒法 (孔径 2 μ m) を用いて粒径を制御し、H12(ADP) リポソーム (粒径 250 \pm 80 nm) を製造し、超遠心分離後 PBS に分散させ、ゲルろ過 (Sephadex G25) にてリポソーム分散液を調製した。

2) H12-(ADP) リポソームの物性評価と仕様の決定

製造物の諸物性 (粒子径、ゼータ電位、脂質膜組成比、ADP 内包量、H12 脂質担持量) をロット毎に測定して、暫定的な物性仕様表を作成した。製造工程の標準化を目的に標準製造手順書(SOP)を整備した。

3) 品質管理 (無菌試験) の標準化

大学施設におけるラボスケールでの製造環境のもとで、日本薬局方に基づいた比濁法 (トキシノメータ) によるエンドトキシン試験を、標準標品による検量線を用いて施行するとともに、細菌培養試験を行い、製造環境を評価した

4) 製造工程のスケールアップ

ゲルろ過超遠心分離法に代わり負荷量スケールアップが可能なクロスフローろ過法 (Vivaflow 200、Sartorius社製) を用いて、未内包ADPの除去効果を測定するとともに、(20 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder; Nothern Lipid Inc.) よりも大型のエクストルーダー (100 mL LIPEX™) による粒子径制御効率を、品質標準仕様表に照らして評価した。各工程は標準操作手順書(SOP)として文書化し、実施する際のチェックリストを整備した。

5) H12-(ADP) リポソーム分散液の保存安定性試験

リポソームの長期保存安定性について、粒子径、ゼータ電位、ADP 漏出率を各温度条件下 (4°C、25°C、40°C) で、最長約一年間評価した。

2. 薬効薬理試験及び形態的観察 (木下、鈴木) :

1) H12-(ADP) リポソームの臨床効果

H12-(ADP) リポソームの人工血小板としての機能評価するために、想定する適応症である大量出血/輸血に合併する希釈性血小板減少症のウサギモデルを使用した薬効試験を行った。麻酔した NZW ウサギ (日本 SLC, 2.0-2.2 kg) の大腿動・静脈から 25 ml の脱血と自己洗浄赤血球/アルブミン溶液の輸血を 8 回繰

返すことで最終的に総循環血液量相当の用量交換を行って、大量出血／輸血に合併する希釈性血小板減少症(5 万/ μ l>)モデルを作成した (Nishikawa K et al: J Thromb Haemost 10: 2137, 2012). 続いて動物を開腹して肝臓に Derma punch で直径 5mm の損傷を作成し、組織欠損箇所を 5 分間小児用尿道カテバルーンで圧迫し、その間に乏血小板血漿 (PPP) に浮遊させた H12(ADP) リポソームやその対照物: PPP に浮遊させた(ADP)リポソーム、多血小板血漿 (PRP)、PPP 単独を投与し、創部からの持続的な出血を定量的に解析した後、循環容量補正なしにそのまま閉腹して飲水のみで予後を観察した。血算や血液凝固パラメータ、耳介出血時間、Sonoclot を用いた全血凝固能を脱血前、血液交換後、薬剤投与後に適宜測定した。

2) 血液製剤の併用効果

出血性ショックにより致死性となる当該ウサギモデルにおいて、H12-(ADP) リポソームの救命効果を改善するために、実臨床に即してフィブリノゲン製剤 (Haemocompletan、CSL ベーリング、70mg/kg ボーラス投与) の輸注及び赤血球輸血 (洗浄赤血球) の併用効果を検討した。

3) 超微形態観察による H12-(ADP) リポソームの止血効果の検討 (鈴木)

リポソームと血小板の *in vitro* (ロンビン惹起血小板凝集) 及び *in vivo* (希釈性血小板減少症ウサギモデル及び衝撃波惹起肺損傷マウスモデル) における相互反応を、急速凍結切断エッチングレプリカ法などを駆使して透過型電子顕微鏡で観察した。

3. 薬物動態試験 (丸山)

1) 体内動態の評価

脂質コレステロール及び内包 ADP をそれぞれ ^3H と ^{14}C で標識したリポソームを健常マウス、ラット及びウサギに投与してその血中濃度、臓器移行、糞や尿への排泄の動態を解析した。得られた動物の実測パラメータをモーメント解析プログラム (Microsoft Excel) を用いて解析し、測定値をアロメトリック式にて評価した。

2) ABC 現象の検討

健常ラットに、H12(ADP) リポソーム (10 mg/kg) を投与し、14 日まで経時的に、ラット血漿中のリポソーム結合性 IgG 及び IgM を、リポソーム固相化プレートを用いて測定した。脂質コレステロール及び内包 ADP をそれぞれ ^3H と ^{14}C で標識したリポソームを初回投与後 5 日目に追加投与し、その体内動態を測定し

て、ABC 現象 (Accelerated Blood Clearance Phenomenon) を評価した。

3) 血小板減少症モデル動物での検討

ブスルファン惹起血小板減少ラットは既報 (Okamura Y ら: J Thromb Haemost 7:470, 2009) に従って作成した。希釈性血小板減少症ラットモデルは既報 (Nishikawa K ら: J Thromb Haemost 10: 2137, 2012) のウサギモデルに準じて新たに確立した。標識リポソームの体内動態 (血中滞留時間、臓器蓄積性、排泄性、抗リポソーム抗体発現及び ABC 現象) を健常動物と比較検討した。

4. 安全薬理試験 (半田):

H12(ADP)リポソームの血栓症の誘発・促進作用を評価するために、血栓準備状態としてより鋭敏に血栓症誘発作用を評価できる 2 種類のラット DIC モデル (出血優位型: トロンボプラスチン誘発性と血栓優位型: エンドトキシン誘発性) を作成して、当該リポソーム (常用量および高用量、ボラス投与) の作用を対照リポソーム (H12 非結合 ADP 未内包リポソーム) と比較して、血栓 (アンチトロンビンや D-ダイマー等の血液凝固パラメータ) 及び臓器障害マーカー (ALT とクレアチニン) を用いて検討した。

5. リポソームの機能検定法の確立 (鎌田):

リポソームと活性化血小板 (α IIb β 3 インテグリン) との結合を、細胞系及び無細胞系の環境下で、LigandTracer 及び表面プラズモン共鳴法 (Biacore 2000) を用いて検討した。リポソームの標的は、インテグリンの組換え遺伝子を導入した培養細胞や細胞由来の可溶化 (あるいは可溶型) 複合体タンパクを用いた。

(倫理面での配慮)

in vitro 実験用血液の採血は、健常人ボランティアからの十分なインフォームドコンセントのもと行った。また、実験動物を使用した *in vivo* 解析は、施設内の実験動物に関する取扱規程の遵守のもと行った。

C. 研究結果及び考察

1. H12(ADP) リポソームの製造および品質管理 (武岡、池田):

1) 品質管理の標準化

平成 24 年度に製造した H12-(ADP) リポソーム標品 21 ロットの諸物性より作られた暫定仕様に基づき、その後の製造ロットの各諸物性を信頼区間 95 %にて統計処理し、H12-(ADP) リポソームの標準物性仕様を決定した (武岡分担研究報

告、Table 3). 日本薬局方に定める製造物の無菌性は、施設内で確立した標準試験(エンドトキシン試験及び微生物限度試験)により基準を満たしていることが確認された。物性評価の SOP 及びチェックリストを作成した (Fig. 14 - 17).

2) 製造工程の標準化

製造のラージスケール化(クロスフロー濾過法と大型(100ml)エクストルージョン法の採用)に伴い、以下の各工程:①H12-(ADP)リポソームの概要、②H12-(ADP)リポソームの製造工程の全体の流れ、③各製造工程フローチャート、④H12-(ADP)リポソーム製造の詳細な標準手順、⑤H12-(ADP)リポソーム物理化学的評価の SOP を改定して、チェックリストを作成して、製造工程の標準化を行った (Fig. 10 - 13). 実際に、11.5 倍のスケールで従来法(遠心・ゲルろ過法及び小型(20ml)エクストルージョン法)と同等の品質のリポソーム試験物が得られることが確認された。

3) 長期保存安定性の検討

パイロットとしてまず、H12-(ADP)リポソームの保存安定性を暫定仕様表に基づいて1ヶ月間評価したところ、4℃、25℃の保存条件では粒子径、ゼータ電位およびADP漏出率について大きな変化はみられなかったが、40℃保存においては、ゆるやかなADP漏出率増加がみられた。そこで、4℃、およそ一年間の保存期間での物性を評価し、品質が保たれていることが確認された (Table 4).

4) 考察

以上、大学施設での、当該試験物の製造工程及び品質管理の標準化が達成されたものとする。しかし、研究の最終年度では、製造工程のラージスケール化に伴い、フィルターによる製造物の無菌化処理工程の不備などが原因で、暫定仕様(粒径、ADP内包量など)からの逸脱状態が長期間持続した。かねてより指摘されてきた研究室レベルでの試験物の製造の限界が顕在化したと思われる。これらの成果は、当該試験物の臨床試験へのステップアップを目指して、基礎資料として製造体制のGMP準拠施設への移行に十分資するものであろう。

2. 薬効薬理試験 (木下):

1) 致死性急性血小板減少症ウサギモデルでの救命効果

血小板減少に伴う肝臓損傷後の大量出血によりモデル動物は24時間以内に出血性ショックにより死亡する。実際にPPPを投与した陰性対照動物の90%(10匹のうち9匹)が死亡したのに対して、PRPを使用した血小板輸血により半数の動物(10匹のうち5匹)が救命された。そして、H12(ADP)リポソーム(20 mg/kg)

／PPP 浮遊液の投与によっても 60% (10 匹のうち 6 匹) の動物が救命され、当該試験物の人工血小板としての効果が確認された (木下分担研究報告、Fig. 8). 大変興味あることに、ADP を内包していない H12 (APBS) リポソームは PPP と同様に臨床効果は認めなかった. このことは、内包化された ADP が観察された止血効果に重要であることを示唆する. 当該試験物の臨床効果は、輸血により補充した血小板と同様に、血小板依存性凝固能 (ソノクロット) の改善と出血量の抑制によってもたらされることが示唆された (Table 4). 当該動物モデルは血小板減少とともに、強度のフィブリノゲンを含む凝固因子の低下及び貧血が併存する (Table 1). そこで、より実臨床に即した治療として、フィブリノゲンの輸注及び赤血球輸血の併用効果を検討した. しかしながら、フィブリノゲンを加えても救命率は改善せず (6 匹のうち 2 匹) (Fig. 8)、赤血球輸血の追加の効果は明らかでなかった (Table 5).

2) 考察

当該試験物の想定している適応は、外傷や手術に伴う大量出血・大量輸血に合併する急性血小板減少症である. 今回、血液希釈による急性血小板減少症ウサギモデルにおいて、肝臓損傷による致死性出血性ショックに対応して、H12 (ADP) リポソームが血小板輸血に匹敵する救命効果を来すことを明らかにした (Hagisawa K et al: Transfusion 55: 314, 2015). しかしながら、その救命率は 50%程度と十分とはいえなかった. モデルの重症度や治療プロトコルを変更することで、より実臨床に即した試験プロトコルの作成につながるとして、フィブリノゲンの補充や赤血球輸血を追加したが、救命率の改善には至らなかった. 実臨床では、外傷による出血性ショックの効果的な補充療法として、赤血球: 血漿: 血小板の 1: 1: 1 (単位) の輸血が用いられている. 今回の検討により、H12 (ADP) リポソームは、現場での供給が事実上不可能な血小板の代替として、外傷等の救急事例において人工血小板としての役割を果たすことが大いに期待される.

3. 形態的観察 (鈴木):

トロンビン刺激血小板とリポソームの相互反応を、未固定標本を使用して急速凍結割断エッチングレプリカ法で観察したところ、血小板凝集に巻き込まれたリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示し、表面には固定試料の結果と同様に小孔が見られ、この穴から ADP が漏れ出る可能性を示した (鈴木分担報告、図 5). ウサギモデルの肝臓損傷部位の観察によって、血小板血栓の形成局所に当該リポソームが集積していることが観察され (図 9)、衝撃波肺

損傷マウスにおいても肺出血局所の血小板凝集塊にリポソームが巻き込まれていることが観察された (図 15)。当該試験物が止血局所 (活性化血小板) に特異的に集積して血小板補助機能を発揮する可能性を示唆する結果であった。

4. 薬物動態試験 (丸山)

1) ブスルファン惹起血小板減少症ラットモデルでの検討

健常のマウスにおいては、リポソーム投与後 7 日をピークに IgM 抗体の出現をみた (丸山分担研究報告、Fig 1A)。一方、血小板減少動物においては、抗体の出現は大幅に抑制された (Fig 1B)。未標識リポソーム投与後 5 日目に投与した標識リポソームの体内動態試験では、健常動物において、ABC 現象が観察され、肝臓でのトラップが明らかとなった (Fig 2、3)。一方、血小板減少動物においては、ABC 現象は認められなかった。抗がん剤 (ブスルファン) による免疫抑制効果が作用していると考えられる。

2) 希釈性血小板減少症ラットモデルでの検討

血小板減少動物において、標識リポソームは投与 3 時間後までは ADP を内包した状態で血中を滞留すること、健常ラットに比して肝臓と脾臓への早期 (投与 2 時間後) 集積が起こること、そして通常の良い体外排泄性を示すことがわかった (Fig 7、8)。当該ラットモデルでの抗リポソーム抗体のリポソーム投与後の経時的検討で、IgM 抗体が投与後 2 日で検出され、4 日をピークとして 10 日程度まで持続した (Fig. 10)。一方、IgG 抗体は検出されなかった。初回投与 5 日後の追加投与では、標識リポソームは速やかに血中から消失し、ABC 現象が示唆された (Fig. 11)。

3) 考察

リポソームを構成する脂質成分に対する抗体が惹起されることで、薬剤の頻回投与により網内系でのクリアランスが加速され、リポソーム製剤の効果が低下する ABC 現象が一般に知られている。当該試験物についても ABC 現象が惹起されることが確かめられた。しかしながら、想定している適応症が急性の希釈性血小板減少症であることから、用法・用量は単回投与であり、当該試験物においては ABC 現象を考慮に入れる必要性はない可能性が示唆された。

5. 安全薬理試験 (半田)

1) 組織因子誘発性 DIC ラットモデル (凝固優位型) での検討

常用量 (20mg/kg) と高用量 (40mg/kg) 投与による血小板数と血栓症パラメータ (アンチトロンビンと D-ダイマー) の時間経過による変動は、陰性対照 (生

食群)と比較して差がなかった。一方、大量用量(80mg/kg)群においては、投与後30分で一過性のD-ダイマーの上昇傾向が認められた(半田分担研究報告、Fig. 3)。さらに、H12未修飾・ADP未内包リポソーム投与群(80mg/kg)でも同様の傾向が認められた。

2) エンドトキシン誘発性ラットDICモデル(血栓優位型)での検討

LPSの4時間持続投与によって、PAI-1濃度の著明な増加が誘発され、血小板やフィブリノゲンは減少し、その他のマーカーはDICを示唆する変動をきたした。一方、血栓症による肝臓及び腎臓の障害が出現し、少なくとも24時間後まで持続した。いずれのマーカーにおいても、またいずれの時点においても、その変動は、3群間で有意な差(t検定)は認めなかった(Fig 4)。当該リポソームの血栓誘発・増強作用は少なくとも80 mg/kgまでの投与量の範囲内では起こらない可能性が示唆された。

3) 考察

当該製造物は、ヒト血小板製剤の代替物として、大量出血・輸血で誘発された急性血小板減少症への投与によって、止血を促進して患者の救命に資する目的で開発が進められている。このような緊急の条件下ではしばしばDICが併発して、出血と血栓が共存する複雑な病態を呈することが稀ではない。したがって、今回の検討結果は、当該製造物の開発を進めるうえにおいて、その安全性を示唆する点において有意義であると考えられる。しかしながら、今回は極めて限られた用量でのみの検討に終わった。今後は、安全性試験として、投与量をエスカレーション(最大で100倍量)して、その影響を確認することが必要である。

6. リポソームの機能検定法の確立(鎌田)

リポソームの結合標的としてヒト血小板や培養細胞を選択する細胞測定系のfeasibilityが検証されたが、細胞の標準化は事実上不可能であることから、無細胞測定系が検討された(鎌田分担研究報告、図1)。Biacoreセンサー表面へのリポソーム結合を測定するための固相上の標的となる可溶性活性型複合体を遺伝子組み替体を導入した培養細胞から可溶化剤を用いて分離した(図9)。しかし、精製過程での変性などにより、リポソームの標的とならないことがわかった(図12)。そこで、両鎖の膜貫通ドメイン以降を欠損した可溶性活性型複合体のcDNAを作製し動物細胞に導入し、培養上清中に分泌された可溶性タンパクを、アフィニティーカラムを用いて精製することに成功した(図20)。無細胞系による機能

評価系の確立は、本製造物の臨床試験ステップへの移行に不可欠の要件であることは疑いようがない。今回の検討により、可溶性タンパクを固相化した表面プラズモン共鳴法への道が開けたと考えられる。

D. 結論

臨床研究への移行を目標として、ラボスケールにて、品質保証、製造体制の確立へのステップを順調に踏み、H12(ADP)リポソームの人工血小板としての適格性を示唆するデータが集積できた。薬効薬理試験により、外傷や手術に伴う大量出血／危機的出血を適応症とすることを強く支持する成果が示された。薬物動態試験では、当該試験物の安全性（組織蓄積性がなく）や良好な血中滞留性を示すデータが集積され、想定される用法・用量が単回投与であることから、リポソーム製剤に共通して備わる欠点である ABC 現象は、考慮に入れる必要はないことが示唆された。

今回の3年間の検討により、当該製造物の開発研究を次のステップに引き上げるのに十分な成果が得られたと考える。しかしながら、更なる開発ステップへの移行の前提となるのが GMP 準拠体制での試験物の製造であり、我々のように大学等の研究施設での検討は今回で限界に達した。当該試験物は災害や有事に緊急避難的に使用することを想定しているため、営利を目的とする企業を巻き込んだ産業化は大変困難である。抗がん剤による造血障害を対象とした場合は、短い血中半減期（8時間程度）やABC現象のため、適応は困難である。人工血液の開発研究の推進は血液法の基本方針に盛り込まれているため、国家的なリスク管理の観点から、行政への働きかけは妥当性がある。今後も、オールジャパンでの医薬品創出を目的としたプロジェクトのなかで、防衛省関連事業やAMED等へ、当該人工血小板創薬に対して大型の研究開発費を盛り込むような働きかけを行ってゆく。

E. 健康危険情報

なしチェックリスト

F. 研究発表

1. 論文発表

（原著）

- (1) 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 γ -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 (in press).
- (2) Hagisawa 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 γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes as an infusible haemostatic agent against active liver bleeding in acute thrombocytopenic rabbits. *Transfusion* 55: 314-25, 2015
- (3) 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 γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. *J Pharm Sci* 102:3852-9, 2013
- (4) 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 γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Dispos* 41:1584-91, 2013
- (5) Kamata T, Handa M, Takakuwa S, Sato Y, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for $\alpha V \beta 3$ integrin. *PLoS One* 8:e66096, 2013
- (6) Nishikawa K, Hagisawa K, Kinoshita M, Shono S, Katsuno S, Doi M, Yanagawa R, Suzuki H, Iwaya K, Saitoh H, Sakamoto T, Seki S, Takeoka S, Handa M. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. *J Thromb Haemost* 10:2137-48, 2012
- (7) Tokutomi, K, Tagawa, K, Korenaga, M, Chiba, M, Asai, T, Watanabe, N, Takeoka, S, Handa, M, Ikeda, Y, Oku, N: Ability of fibrinogen γ -derived

dodecapeptides with different sequences to bind to rat platelets. *Int J Pharm* 438: 296-301, 2012

(総説)

- (1) 木下 学, 人工赤血球、人工血小板の臨床応用, 2014, *Anet*, 18: 14-17
- (2) 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
- (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, 小野 聡, 齋藤大蔵, 西田育弘, 衝撃波による致死性の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.
- (4) 半田 誠:人工血小板開発の現状と今後の展望. 日病薬誌. (2013) 49(9):949-53.
- (5) 木下 学: 人工血液:人工血小板の臨床応用. *A Net*. (2013) 18:14-7.
- (6) 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* (2013) 21: 60-7.
- (7) 岡村陽介、半田 誠: ナノ粒子と血小板の相互作用/完全人工系血小板代替物への応用を目指して. *Int Rev Thromb* 8:34-41 (2013)

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).
- (2) 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)
- (3) 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) リポソ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)
- (4) 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)

(5) 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)

(6) 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

(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)リポソ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.

(9) 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)

(10) 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)

(11) 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)

(12) 土井麻実, 木下 学, 萩沢康介, 西川可穂子, 柳川錬平, 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)

(13) 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).

- (14) Hagisawa 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
- (15) 木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川錬平、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)
- (16) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、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) リポ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
- (17) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、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
- (18) 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
- (19) 鈴木英紀、諸根信弘、武岡真司、池田康夫、半田 誠：ヒト血小板と人工血小板 (H12-(ADP) リポソーム) の相互作用の形態解析. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会. 2013. 5. 30-6. 1, 山形市.
- (20) Tan M, Arai M, Watanabe N, Handa M, Ikeda Y, Takeoka T : 「Inhibitory study on the binding of high anionic liposome to the activated platelet membrane」, 2nd International Conference on Biomaterial Science (2013. 3., つくば)
- (21) 藤山 敦史, 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 19 回日本血液代替物学会年次大会 (2012. 10., 北海道)
- (22) 西川可穂子、木下 学、萩沢康介、土井麻実、宮崎裕美、小野 聡、阪本敏