

- 久、齋藤大蔵、関 修司：人工血小板 H12(ADP) リポソームを用いた血小板減少病態時の臓器外傷部位における止血制御の有効性（出血後投与による検討）． 第 27 回日本 shock 学会総会 2012, 東京. (日本 Shock 学会雑誌, p76: 27, 2012)
- (23) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川鍊平、土井麻実、武岡真司、齋藤大蔵、関 修司、西田育弘：大量出血後輸液による血小板減少状態下で進行する肝外傷出血に対して H12(ADP) liposome 同時投与は血小板投与と同等の止血および救命効果を有する． 第 19 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-4）2012, 札幌. (人工血液 p19: 20 2012)
- (24) 土井麻実、木下 学、西川可穂子、萩沢康介、柳川鍊平、半田 誠、池田康夫、武岡真司：血小板減少病態時における H12(ADP) liposome の止血能に果たす H12 ドデカペプチドの役割について（出血前投与による検討）． 第 19 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-4）2012, 札幌. (人工血液 p18: 20 2012)
- (25) 木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川鍊平、西山靖将、半田 誠、関 修司：血小板代替物 H12(ADP) liposome 開発の必要性—大規模震災時への対策の 1 つとして—． 第 19 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-4）2012, 札幌. (人工血液 p20: 20 2012)
- (26) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川鍊平、西田育弘、関 修司、齋藤大蔵：人工血小板を用いた重症外傷での止血制御． 第 90 回日本生理学会（シンポジウム 3 重度外傷と免疫・生理学—基礎から臨床まで—． 2013, 東京 (J. Physiol. Sciences. 63; S27, 2013)
- (27) 丸山徹、田口和明、氏平隼人、渡邊博志、新井愛美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹 血小板代替物 H12(ADP) リポソームの体内動態に及ぼす血小板減少症の影響（第 19 日本血液代替物学会年次大会 2012 年 10 月 26 日）
- (28) 鈴木英紀、諸根信弘：ヒト血小板と人工血小板粒子の相互作用の解析 —急速凍結割断レプリカ法による検討—. 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会. 2012. 5. 14-16, つくば.
- (29) Kamata T, Handa M, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Divalent cations define the structural requirement for activation in α IIb β 3 integrin. The 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No. 7, 887, 837 “DRUG DELIVERY MATERIAL”

分担研究報告

平成 24-26 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総合研究事業)
分担研究報告書

H12-(ADP)リポソーム試験物の製造工程・品質管理体制の確立

分担研究者 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 特命教授)
研究協力者 土井 麻実 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
藤山 敦史 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
大植 愛子 (早稲田大学 先進理工学部)
渡邊 麗 (早稲田大学 先進理工学部)
大澤 史佳 (早稲田大学 先進理工学部)
多喜川 真人 (早稲田大学 先進理工学部)
本間 啓太郎 (早稲田大学 先進理工学部)

【研究要旨】

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を表面に結合させ内水相に血小板凝集惹起物質である adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)リポソームは、活性化血小板間を架橋して血小板凝集塊中に取り込まれ ADP の放出によって血小板凝集形成を促進することにより止血能を顕著に向上できる。

本分担研究者は、H12-(ADP)リポソーム試験物の製造と分担研究者への提供を担当しており、平成 24 年度は、配布用に調製した試料(21 ロット分)の諸物性を測定し、暫定的に標準仕様を決定し、試料の保存安定性試験を 1 ヶ月間暫定的に行った。平成 25 年度は、標準仕様にエンドトキシン値を加えるべくその試験法を確立した。また、スケールアップ可能な試験物製造法を開発するために、クロスフロー濾過法と大型エクストルージョン法を検討し、11.5 倍のスケールで従来法と同等の品質のリポソーム試験物が得られることを確認した。平成 24 年度に引続き 1 年間の保存安定性を確認した。平成 26 年度は、本リポソーム試験物の製造工程・品質を GMP 準拠レベルで管理をするための体制を構築し、それを運用しながらその実効性を検討した。具体的には、H12-PEG-Glu2C18 脂質の合成、H12-(ADP)リポソームの調製、諸物性評価、ならびにエンドトキシン試験の標準操作手順書(SOP)とチェックリストを作成し、何度かの改訂を経て完成させた。また、専用のエクセルデータシートを用いて諸物性値の算出ならびにスペック表に反映させるプログラムを作り、クラウド上で管理するシステムを構築した。以上より、暫定標準仕様の H12-(ADP)リポソーム試験物をスケールアップ可能な方法で調製する際、製造工程並びに品質を管理する SOP ならびにチェックリストを完成させた。

A. 研究目的

リポソーム表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド (H12) を導入し、その内水相に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP) を内包させた H12-(ADP) リポソームは、血小板減少病態モデル動物の出血時間を減少させることを報告してきた^{1,2)}。

本分担研究者らは、H12-(ADP) リポソーム試験物の調製と他の分担研究者への提供を担当している。しかし、リポソーム試験物は定められた方法で製造され、品質管理項目(物性値)は標準仕様を満たしていなければならない。平成 24 年度では試験物の製造実績から製造工程ならびに品質管理項目を見直し、標準仕様を暫定的に決定する。平成 25 年度では、品質管理項目の拡充としてエンドトキシン試験法と微生物試験法の確立、および製造工程のスケールアップの検討を行う。また、平成 24、25 年度はリポソーム試験物の長期保存安定性試験(1 年間)を行う。平成 26 年度は、リポソーム製剤の製造工程と品質を管理するための体制の構築を行い、連携企業あるいは GMP 受託製造会社へ技術導入するために、限定した規模ではあるが、GMP 準拠を意識した製造体制を研究室内に整える。

B. 研究方法

1. H12-(ADP) リポソームの作製

各脂質 (DPPC/Cholesterol/DHSG/ PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C₁₈=5/5/1/0.033/0.033 (by mol)) を秤量後、t-ブチルアルコールに溶解させ凍結乾燥 (6 時間) にて混合脂質を得た。この混合脂質粉末に対して 1mM ADP 溶液(in PBS) を 2 wt% の最終濃度になる様に加

えて水和後(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法 (ϕ 0.2 μ m) にて粒径を制御、超遠心分離にて精製した(100,000 g, 30 min, 4°C)。次いで、これを PBS に再分散、ゲル濾過精製し (Sephadex G25)、H12-(ADP) リポソームを得た。

2. H12-(ADP) リポソームの物性評価

2.1. 粒子径、ゼータ電位の測定

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

2.2. 脂質膜組成比の測定

凍結乾燥および真空乾燥後の H12-(ADP) リポソームを重クロロホルム(ca. 1.5 mL)に溶解させ ¹H-NMR 測定を行い、各構成脂質に特徴的な単一ピーク (Table 1) を用いて解析を行った。解析に際しては、Cholesterol にのみ特徴的なスペクトル 5.35 ppm(1H, s, -CCHCH₂-) を積分比の基準とし、各脂質の混合比を算出した。尚、PEG-DSPE と H12-PEG-Glu2C₁₈ は含有量が少ないことから、共通の PEG 繰返しユニットのピークを用いることとし、PEG 比のみでの算出とした。

Table 1 Characteristic spectrum (ppm).

Lipid	Characteristic spectrum
DPPC	5.20 (q, 1H, -CH ₂ CHCH ₂ -)
Cholesterol	5.35 (d, 1H, -CCHCH ₂ -)
DHSG	4.52-4.71 (dd, 1H, -COONHCHCH ₂ -)
PEG-DSPE	3.65 (m, 456H, -OCH ₂ CH ₂ -)
H12-PEG-Glu2C ₁₈	3.65 (m, 312H, -OCH ₂ CH ₂ -)

2.3. 内包 ADP 量の測定

H12-(ADP)リポソームを等量の n-octyl- β -D-glucopyranoside (0.5 M)にて可溶化し、HPLC (TSKGelODS-100V, 1 mL/min, Ab. 260 nm, リン酸 (pH=7.0)/メタノール=97/3(v/v) (TEA 30 mM))にて各濃度の ADP 標準試料と共に測定し、ADP ピーク面積の測定値から ADP 濃度を測定した。また、リン脂質 C-テストワコーにて算出した H12-(ADP)リポソーム濃度をもとに、濃度あたりの ADP 量として算出した。

2.4. H12 脂質担持量の測定

H12-(ADP)リポソーム分散液に n-octyl- β -D-glucopyranoside (0.5 M)を加え、可溶化した後、ホウ酸緩衝液(pH9.0)およびフルオレスカミン溶液(0.1 mg/mL)を添加、攪拌し、蛍光強度を測定し、検量線から濃度を定量した。また、H12-(ADP)リポソーム濃度をもとに、単位濃度あたりの H12 脂質担持量として算出した。

3. 品質管理項目の拡張

3.1. エンドトキシン試験法の確立

日本薬局方に基づき濁度法によるエンドトキシン試験法を検討した。リポソーム膜にはエンドトキシンが共集合しているため界面活性剤 C₁₂E₁₀ 溶液で可溶化した。同時に検量線の作成にも Control Standard Endotoxin (CSE)に C₁₂E₁₀ 溶液を混合して各濃度のエンドトキシン溶液を調製した。これらエンドトキシン溶液における比濁時間 T_g 値から log (log T_g)を算出して検量線を作成し、試料液の T_g からエンドトキシン値を求めた。同時に添加回収率を計算し、本エンドトキシン試験の妥当性を検証した。

3.2. 微生物限度試験法の検討

粉末培地に MilliQ を加え、攪拌し 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。その後、培養皿に分注し、H12-(ADP)リポソーム分散液を塗布し、38°C で 5 日間培養し、コロニー数を計測した。

4. 調製工程のスケールアップの検討

4.1. クロスフロー濾過法による外水相 ADP の除去

クロスフロー濾過装置 (Vivaflow200、sartorius 社製) を **Figure 1** のように組み立て、①に H12-(ADP)リポソーム分散液を加え、60 分間クロスフロー濾過を行った。排出された濾液と等量の DPBS を①に加えながら濾過を行うことで循環液量が常に一定となるようにした。クロスフロー濾過終了後、限外濾過チューブを用いて採取したリポソーム分散液を遠心 (20,000 g, 10 min, 4°C) し、その濾液の ADP 濃度を HPLC (Column; TSKGelODS-100 V Phase; phosphoric acid /methanol = 97/3 (v/v) (TEA 30 mM))で定量し、クロスフロー濾過後の外水相 ADP 濃度を測定した。

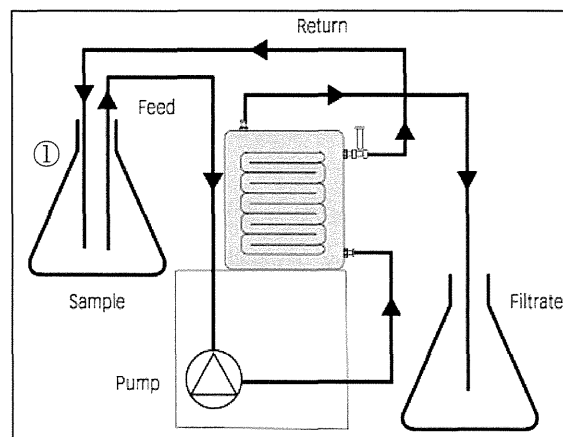


Figure 1 Scheme of Vivaflow 200.

4.2. 大型エクストルーダーを用いた粒子径制御方法の検討

H12-(ADP)リポソームの調製ではエクストルージョン法($\phi 0.45 \mu\text{m} \times 2$, $\phi 0.22 \mu\text{m} \times 3$, $\phi 0.2 \mu\text{m} \times 1$)により粒子径制御を行ってきた。平成 25 年度では、従来用いていた小型エクストルーダー (20 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder; Nothern Lipid Inc.) と大型エクストルーダー (100 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder; Nothern Lipid Inc.) の処理効率を比較するため、圧力を一定にし($\phi 0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでは 1 MPa, $\phi 0.22 \mu\text{m}$, $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターでは 2 MPa)、全量が出切るまでの時間を計測した。

評価用試料として、H12-(ADP)リポソームと類似の組成で H12-PEG-Glu2C18 と ADP を抜いたリポソーム分散液 (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE=5/4/0.9/0.03 [by mol]) を用いて透過速度 (mL/sec) を測定し、単位面積当たりの処理速度 (mL/mm²/sec) を算出した。次いで、H12-(ADP)リポソーム分散液を用いて小型/大型エクストルーダーにてそれぞれ粒子径制御を行い、得られた H12-(ADP)リポソームの物性および脂質ロスを求めて比較した。

5. H12-(ADP)リポソーム分散液の保存安定性試験

H12-(ADP)リポソーム分散液(20 mg/ml)を 4°C、25°C、40°C の条件にて 1 ヶ月間保存し、物性(粒子径、ゼータ電位、ADP 漏出率)について経時的に測定を行った。

粒子径、ゼータ電位については 2.1. に示した方法にて測定した。他方、ADP 漏出率については H12-(ADP)リポソーム分散液を Amicon Ultra-0.5 を用いて限外濾過(20,000 G、

10 min) し、濾液を回収後、2.3. に示した HPLC 測定条件にて ADP 量を測定し、さらに全内包 ADP 量に対する割合を算出し、漏出率とした。

更に H12-(ADP)リポソーム分散液(20 mg/ml)を約一年間 4°C にて保存し、調製から約一年経過後のリポソーム試験物について、H12 担持量および ADP 漏出率の測定を行い、長期保存(冷蔵)安定性を評価した。

6. H12-(ADP)リポソーム分散液の標準操作手順書(SOP)作成

本リポソーム製剤の調製工程は、H12結合 PEG脂質の有機合成、混合脂質の調製、ADP内包リポソームの調製ならびに未内包ADPの除去と濃度の調整、の大きく3工程からなる。スケールアップを鑑みて、大型エクストルーダーと限界ろ過膜によるクロスフロー法を導入した。各工程は標準操作手順書(SOP)として文書化し、更にこれを実施する際のチェックリストを整備した。

本リポソーム製剤の仕様は、粒子径とその分布(動的光散乱法)、ゼータ電位(ゼータサイザー)、脂質組成(NMR)、H12の定量(蛍光)、内包ADP/未内包ADPの定量(HPLC)によって求め暫定仕様として定めた。各測定においてもSOPを定め、チェックリストならびに生データをエクセル上にて管理し、各項目が自動計算によって仕様表に反映される様にした。これらのSOPやチェックリスト、エクセルデータはクラウド上で管理され、複数によるチェックならびに確定するプロセスを整えた。

C. 研究結果及び考察

1. H12-(ADP)リポソームの標準仕様の決定

Table 2 に平成 24 年度は試験物として製造して分担研究者に配布した H12-(ADP)リポソーム標品 21 ロットの諸物性のまとめたものを示す。これより、当研究室で調整された H12-(ADP)リポソームの物性に、大きなばらつきがないことが確認された。

Table 2 Physical properties of H12-(ADP)liposomes

	Diameter (nm)	z-potential (mV)	H12/Lipid(mg/mg)	ADP/Lipid(mmol/g)
Mean	233.56±71.39	-9.28	2.18 x10 ⁻²	0.33 x10 ⁻²
S.D.	13.46±21.90	0.68	0.58 x10 ⁻²	0.05 x10 ⁻²
Lipid ratio analysis				
	DPPC	Cholesterol	DHSG	PEG
Mean	4.89	5.00	0.92	0.028
S.D.	0.17	0.00	0.17	0.0031

Table 2 で示した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(**Table 3**)。

Table 3 Specs of physical properties of H12-(ADP)liposomes.

Items	Range
Diameter	210 ~ 260 nm
Distribution	< 100 nm
z-potential	-7.0 ~ -11.0 mV
Cholesterol	5
DPPC	4.7~5.1
DHSG	0.8~1.2
PEG-lipid	2.5 x10 ⁻² ~ 3.5 x10 ⁻²
H12/Lipid	1.5 x10 ⁻² ~ 3.0 x10 ⁻² mg/mg
ADP/Lipid	0.25 x10 ⁻² ~ 0.45 x10 ⁻² mmol/g

2. エンドトキシン試験法の確立

C₁₂E₁₀ 混入 CSE 溶液から得られた近似直線の R² 値は 0.9998 であり (**Figure 1**)、日本薬局方の基準 (R²>0.980)を満した。また試料測定の際の平均的な添加回収率は 145 % であり、日本薬局方の基準値 (50~200 %)を満した。以上より本方法は、リポソーム試験物のエンドトキシン試験が妥当であることが確認された。

また、本研究室で調製された H12-(ADP)リポソーム試験物分散液 (20 mg/mL)について、エンドトキシン濃度を測定したとこ

ろ、通常のラボ環境で調製した試験物では 13.0 EU/mL であったのに対し、クリーンブース(クラス 1000)内クリーンベンチ(クラス 100)下の無菌環境で調製した試験物のエンドトキシン濃度は検出限界以下であった。

日本薬局方にしたがって、リポソーム試験物のエンドトキシン規格値を算出すると (20 mg/kg の用量でラビットの静脈投与を想定した場合)、20mg/mL 濃度の H12-(ADP)リポソームのエンドトキシン基準値は 5 EU/mL 以下と算出される。したがって、非無菌環境で調製した場合にはエンドトキシン基準値を満さないものの、本研究室の無菌環境での調製でエンドトキシン混入値を基準以下にできることが明らかとなった。

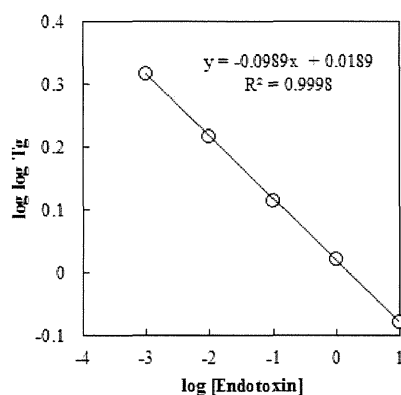


Figure 1 Calibration curve of Control Standard Endotoxin.

3. 微生物限度試験法

非無菌環境で調製された H12-(ADP)リポソーム分散液を塗布した場合のコロニー数は 92 であり(**Figure 2 A**)、細菌数は 1.84 x 10⁵/mL と算出された。他方、無菌環境で調製された H12-(ADP)リポソーム分散液を塗布した場合のコロニー数は 0 であり(**Figure 2 B**)、細菌数も 0/mL であった。以上の微生物限度試験によっても、非無菌環境で調製した H12-(ADP)リポソーム分散液は、日本

薬局方の定める基準 (1000 /mL)を満たさず、無菌環境で調製された H12-(ADP)リポソーム分散液は基準を満たした。

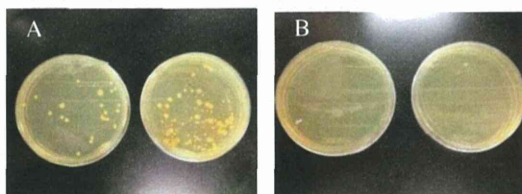


Figure 2 Bacterial colonies in H12-(ADP) liposomes. (A) Bacteria in high endotoxin sample. (B) Bacteria in low endotoxin sample.

4. 調製工程のスケールアップの検討

4.1.クロスフロー濾過法による外水相 ADP の除去

クロスフロー濾過前の外水相 ADP 濃度は 0.69 mM であったが、60 分間クロスフロー濾過後にて約 100 分の 1 の 0.88×10^{-3} mM まで減少した(**Figure 3**)。本研究室で調製されている H12-(ADP)リポソームの外水相 ADP 濃度の標準仕様値である 0.003 mM に達するまでに必要なクロスフロー濾過時間は本方法では 30~40 分間であることが明らかになった。

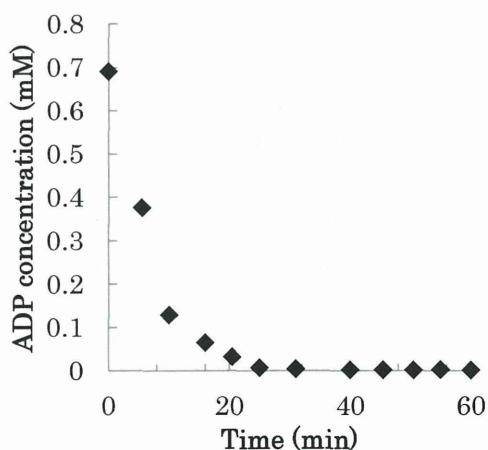


Figure 3 Change of outside ADP concentration in an H12-(ADP) liposome dispersion .

また、クロスフロー濾過法を用いた精製法は、従来の超遠心分離とゲル濾過を用いる精製法と比較して H12-(ADP)リポソームの物性に变化を与えないことが明らかとなった。クロスフロー濾過法にて製造工程をスケールアップできることが示唆された。

4.2. 大型エクストルーダーを用いた粒子径制御方法の検討

H12-(ADP)リポソームと類似した膜組成 (DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG-DSPE = 5/4/0.9/0.03[by mol])の評価用リポソーム試験物の透過速度 (mL/sec)と単位面積当たりの処理速度 (mL/mm²/sec)を算出した。その結果、小型エクストルーダーでは試験物 10mL で総処理時間が 3 分 26 秒、大型エクストルーダーでは試験物 20mL で 2 分 59 秒であった。両速度の比較では大型エクストルーダーの方が高くなり、粒子径制御効率が良かった (**Figure 4, 5**)。

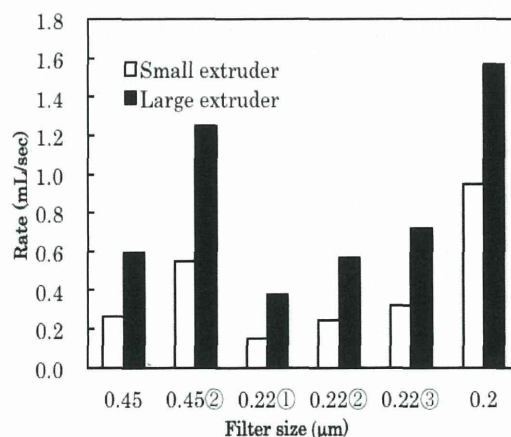


Figure 4 Effect of extruder's size on rate of extrusion.

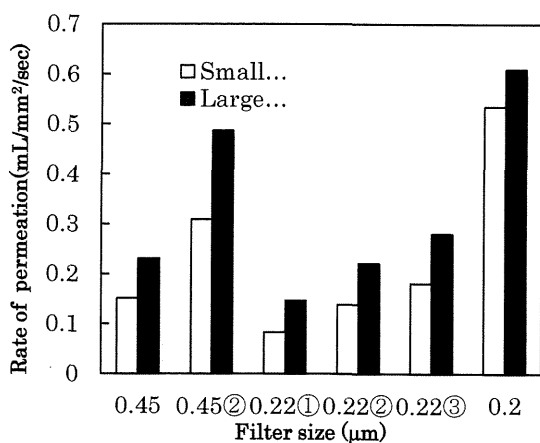


Figure 5 Effect of extruder's size on rate of permeation.

また、大型エクストルーダーにおける全フィルターでの処理時間の合計を小型エクストルーダーと比較したところ、全体の透過速度は約 2.3 倍、単位面積当たりの処理速度は約 1.6 倍となり、1 バッチ当たりの容量が 5 倍の大型エクストルーダーを用いることで粒子径制御作業全体が 11.5 倍効率化されることが示唆された。

小型/大型エクストルーダーの比較では、各フィルター処理後のリポソームの粒子径はほぼ等しい大きさに制御され、諸物性に違いは認められなかった。一方、脂質ロスlipid lossは小型エクストルーダーにおいてほとんど確認されなかったのに対し、大型エクストルーダーでは全脂質量の 23.5 %のロスが確認された。これはリポソーム試験物の使用量に対してフィルターの面積やエクストルーダーの容積が大きくなったため、フィルター上や内壁に残存する脂質量が増加したためと考えられ、使用量のスケールを上げることによってロスは相対的に低下すると思われる。

以上の結果より大型エクストルーダーの最大容量である 100 mL 以上での H12-(ADP) リポソーム分散液の粒子径制御が可能であ

ると思われた。

5. H12-(ADP)リポソームの保存安定性試験

平成 24 年度に H12-(ADP)リポソームを 4 °C、25 °C、40 °C の条件にて 1 ヶ月間保存を行った。その結果、粒子径、ゼータ電位はいずれの条件でも大きな変化はみられなかった。しかし、ADP 漏出率は 40 °C 保存の場合わずかに増加し、1 か月間で 4 %の漏出が確認された。この結果より、6 ヶ月保存では約 24 %の ADP 漏出率が予想され、これは Table 3 にて定めた規格外となる。よって 6 ヶ月間以上の長期の使用期限を設定する場合、冷蔵保存が望ましい。

6. H12-(ADP)リポソーム分散液の保存安定性試験

H12-(ADP)リポソーム分散液を冷蔵 (4°C)で約一年間保存した。まだ充分な試験物の数で確認ができていないものの、一年経過後のリポソームの粒子径およびゼータ電位に大きな変化は見られなかった。また、H12 担持量および ADP 漏出率にやや変化は見られたが、一年経過後の値は、本研究室で設定した標準仕様の範囲内に収まることが暫定的に認められた。従って、H12-(ADP)リポソームは冷蔵 (4°C)で約一年間、安定に保存できることが示唆された (Table 4)。

Table 4 Stability of H12-(ADP)liposomes in refrigerated storage.

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

7. 試験物の製造手順書(SOP)

平成 24 年度は、H12-(ADP)リポソーム試験物を 21 ロット製造する間のプロセスの文書化を進め製造手順書を作成した。本手順書は、1) H12-(ADP)リポソームの概要、2) H12-(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、4) H12-(ADP)リポソーム製造の詳細な標準手順、5) H12-(ADP)リポソーム物理化学的評価の詳細な標準手順からなる。以上より、各製造工程の標準化を行った。

7.1 H12結合PEG脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成に関するSOP、チェックリストの作成

Figures 6,7,8に合成SOPの目次、本文の抜粋、合成スキームをそれぞれ示す。スキームにある様にH12-PEG-Glu2C18の合成は、グルタミン酸の2個のカルボキシル基にオクタデシルアルコールを結合させてGlu2C18を合成するプロセス1、Glu2C18にMAL-PEG-NHSを結合してMAL-PEG-Glu2C18を合成するプロセス2、そしてMAL-PEG-Glu2C18にH12-Cysを結合してH12-PEG-Glu2C18を合成するプロセス3からなる。これらのSOPに基づいた合成の状況であるが、既に、Glu2C18は大量に当研究室に保有されており、類縁体であるGlu2C16はある試薬会社に技術移転し大量製造されているので、プロセス1に関するSOPの実用性は証明されていると考えている。プロセス2ではほぼ80~90%程度の収率で得られているが、原料のMAL-PEG-NHSが不安定なために購入時ならびに保管使用時の¹H-NMRによるマレイミド基のチェックが必要である。プロセス3における原料であるH12-Cysは、ペプチド受託合成会社にて大量合成済みであり、

プロセス2で合成したMAL-PEG-Glu2C18と結合させるだけであるので操作は簡単である。しかし、精製においてはMAL-PEG-Glu2C18、H12-PEG-Glu2C18、H12は全て分子量が大きいためにテーリングする傾向にあり、生成物H12-PEG-Glu2C18は、両原料の中間の極性を有するために困難であり、更にカラムに吸着する傾向があるために収率は15~20%程度とかなり低い。今後は、H12を水洗で除去する、あるいは逆相クロマトグラフィーにて精製するなどの工夫が必要と思われる、それに対応したSOPにする必要もある。合成物の同定は、MS、¹H-NMR、FT-IRにて行われ、5回の合成実績により再現性も確認された。本検討の中でH12-PEG-Glu2C18の合成SOPならびにチェックリストを作成、4度の改訂を経て完成した。特に、TLCによる合成、精製過程のチェックは厳密に行い、写真の添付により履歴を残すこととした(Figure 9)。同様に同定に用いたMS、NMR、FT-IRについてもスペクトルの番号管理ならびに添付により参照できるようにした。

H12 結合脂質	
H12-PEG-Glu2C18 の合成手順	
1 概要	1
2 目的	1
3 責任	1
4 関係する SOP	2
5 定義	2
6 手順	2
7 図表	5
8 不測の事態	8
9 改訂履歴	8

Figure 6 The index part of SOP for synthesis.

H12-PEG-Glu2C18の合成SOPの抜粋	
6.3	MAL-PEG-Glu2C18の合成
6.3.1	MAL-PEG-NHSの購入日とMALが失活していないことをNMRにて確認する。
6.3.2	30 mLナスフラスコにスターターペアー (14 mm)を入れ、クロロホルム(精製)を10 mL添加し、6.2で合成したGlu2C18を401.0 mg (368.9 μ mol)秤量し、30 mLナスフラスコに徐々に加える。
6.3.3	10 mLバイアルにMAL-PEG-NHSを1029.8 mg (307.4 μ mol)秤量し、6.3.1のナスフラスコに添加していく。
6.3.4	添加後、温度を25°Cにし、フラスコ内を室温で置換し、撹拌する(12 h, N ₂ , 25°C)。
6.3.5	12時間経過後、TLC(展開溶媒:クロロホルム/メタノール=3/1)により反応の進行具合を確認し、Rf=0.6のスポットが確認できなければ、反応を続ける。
6.3.6	反応の進行を確認できたら、反応液を300 mLのエーテル溶液中に滴下し、15分間撹拌する。
6.3.7	撹拌後、白濁したエーテル溶液をガラスフィルターに注ぎ、自然減圧ポンプで吸引はしないように沈殿物を得る。
6.3.8	ガラスフィルター上の沈殿物をクロロホルムに溶解させ、抽出液を100 mLナスフラスコに回収する。TLCにてスポットを確認する。
6.3.9	6.3.8の抽出液をエバポレーターで減圧蒸留した後、真空乾燥機で、2時間乾燥させる。
6.3.10	乾燥した生成物をエタノール (v=99.5%)で再結晶精製する(結晶4°Cで冷却する)。
6.3.11	再結晶で析出した固体を、ガラスフィルターを用いて、ろ過回収する。
6.3.12	ガラスフィルター上の結晶を血小瓶専用クロロホルムに溶解して、50 mLナスフラスコに回収し、エバポレーターにて乾燥させる。
6.3.13	乾燥後、2時間真空乾燥し、白色固体としてMAL-PEG-Glu2C18が得られる。
6.3.14	白色粉末の秤量する。
6.3.15	Glu2C18のTLCを測定すると共に、MS, ¹ H-NMR, IRにて同定を行う。

Figure 7 The text part of SOP for synthesis.

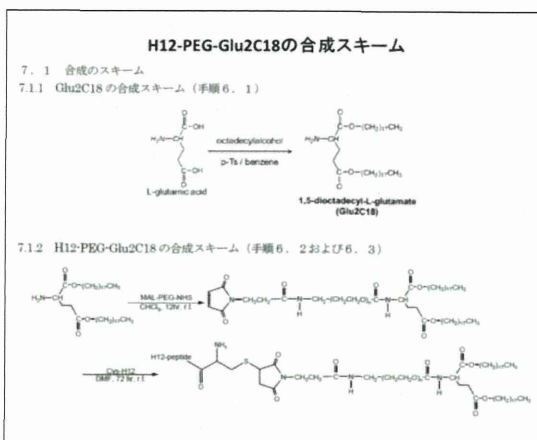


Figure 8 The scheme part of SOP for synthesis.

番号	項目	確認内容
1	合成開始日	月 日 時
2	操作/3ステップの準備	試薬/試薬/試薬
3	原料の秤量およびTLC	MAL-PEG-Glu2C18 (201 mg) Glu H12 (240 mg) (3240.0 mg)
4	溶媒の量およびTLC	DMF (10 mL, Et ₃ N) その他 (mL, Et ₃ N)
5	反応液の色	黄色(その他)
6	反応開始時刻	月 日 時
7	反応終了時刻	月 日 時
8	反応条件	1. 温度 25°C 2. 攪拌機
9	反応終了後のTLCにおける生成物H12-PEG-Glu2C18の検出	生成物H12-PEG-Glu2C18の検出
10	継続反応の検出	1. 反応の終了 2. 反応を継続
11	継続反応の検出時刻	月 日 時
12	継続反応の検出時刻	月 日 時
13	継続反応終了後のTLCにおける生成物H12-PEG-Glu2C18の検出	生成物H12-PEG-Glu2C18の検出
14	エーテル中に滴下して15分間撹拌	1. 白濁 2. 濁
15	ガラスフィルターに濾過した結晶のエーテル洗浄	1. 操作 2. その他

Figure 9 The part of check list for SOP for synthesis.

2) H12-(ADP)リポソームの調製に関するSOP、チェックリストの作成

リポソーム調製に関するSOPをFigures 10,11,12に示す。Figure 10は目次、Figure 11はSOPの抜粋、Figure 12は写真による説明の抜粋である。H12-(ADP)リポソームの調製は、混合脂質粉末を調製するプロセス1、混合脂質粉末をADP水溶液中で水和して、エクストルージョン法にて造粒するプロセス2、未内包のADPを除去して濃度調整するプロセス3から構成される。特に、プロセス1では秤量した各脂質を混合するが、秤量誤差が最も大きいので、混合脂質溶液をサンプリングして¹H-NMRにて測定し、規格から外れる場合には足りない脂質を追加することによって微調整を行った後に凍結乾燥粉末を得ることを特徴としている。プロセス2においては、エクストルージョンにおいて孔径の異なるフィルターと通過回数をコントロールすることによって得られる粒子径を規格内に収めている。また、定圧条件でエクストルージョンするよりは定速条件でエクストルージョンを行う方法を採用している。プロセス3においては、従前の超遠心分離・ゲルろ過法の組み合わせではスケールアップは困難であることから、限外ろ過を原理とするクロスフロー法にて未内包ADPを除去して濃縮し、濃度定量の後に所定濃度に濃度調整する方法を用いることによってスケールアップを可能とした。クロスフロー法の洗浄不十分によるコンタミやADPの除去不十分や内包ADP濃度が不安定となる課題を克服することができ、調製SOPならびにチェックリストの作成(Figure 13)、5度の改訂を経て完成することができた。特

に装置を用いる操作が多いので、写真や図を用いて操作を分かりやすく掲載した。

人工血小板
H12-(ADP)リボソームの調製SOP

1 H12(ADP)リボソームの概観	
1-1 オートクレーブ	4
1-2 水和	6
1-3 エクストルーダー	9
1-4 クロスフロー	12
1-5 濃度の決定	15
2 H12(ADP)リボソームの物性化学的評価	
2-1 粒子径測定	18
2-2 ゼータ電位測定	22
2-3 ADP内包量測定	27
2-4 外水相ADP濃度測定	33
2-5 脂質組成比の測定	37
2-6 H12ペプチドの定量	40
2-7 Endotoxinの定量	43

Figure 10 The index part of SOP for preparation.

H12-(ADP)リボソームの調製SOPの抜粋

6.4.14	使用器具をADP 溶液で洗う。
6.4.15	$\Phi=0.2\mu\text{m}$ フィルターをピンセットを用いてセットし、エクストルーダーを組み立てる。
6.4.16	6.4.6から6.4.9の操作を行う。
6.4.17	時間に余裕があれば、次の6.5.3の作業まで一気に進めると、すぐに超遠心を始めることができる。
6.5	クロスフローによる洗浄
6.5.1	500mL 三角フラスコ1個と1000mL ビーカー3個を中性洗剤で洗浄し、オートクレーブする。
6.5.2	リボソーム溶液を50 mL チューブに入れる。
6.5.3	Vivaflow200と1000 mLのビーカー2個を図7.2.3のように接続する。(2本のチューブがつながるビーカーを①、1本のチューブがつながるビーカーを②とする。)なお、ビーカー等とチューブを接続する際は、接続口が露出しないようアルミホイルでふたをする。(これは以降の全ての操作に共通する。)
6.5.4	1000 mLの純水を①の1000 mL ビーカーに入れた後、ダイヤル1に合わせ装置を稼働させ、200-400 mL/minの速度で②のビーカーに400 mL 溜まるまで流す。
6.5.5	6.5.4と同様にして50mL チューブに50mLのDPBSを入れ、25-50 mLのDPBSを流し出し、Vivaflow200の流路をDPBSで置換する。
6.5.6	①のビーカーをリボソームサンプルが入っている50 mL チューブに変更する。
6.5.7	ダイヤルを2に合わせ、リボソーム溶液の運送を行う。
6.5.8	①の50mL チューブ内のリボソーム溶液が10mL 減少した時、新たに10mLのDPBSを加える。

Figure 11 The text part of SOP for preparation.

7.2.2 エクストルーダーと窒素ボンベ接続



Figure 12 The picture part of SOP for preparation.

H12-(ADP)リボソームの調製チェックリストの抜粋

Extrusion (担当:)		日付: ()	
順番	項目	確認内容	結果
1	Extruder使用前確認	Test ADP溶液を準備 (各自)	○
2	フィルターの取替確認	Test ADP溶液を準備 (各自)	○
3	装置の圧力の確認	圧力は正常範囲で確認	○
4	温度の確認	室温	○
5	チューブの接続の確認	正常	○
6	分岐チューブの接続の確認	正常	○

Crossflow (担当:)		日付: ()	
順番	項目	確認内容	結果
1	装置の組み立て	確認済	○
2	洗浄	確認済	○
3	温度	室温	○
4	サンプル、10 mL チューブの準備	1. サンプルのリボソーム溶液を準備 (各自) 2. チューブの接続の確認 (各自)	○
5	操作開始	正常	○
6	濃度の決定	正常	○
7	脂質組成比の測定	正常	○
8	Endotoxinの測定	正常	○
9	保存	正常	○
10	終了	正常	○

Figure 13 The part of check list for SOP for preparation.

7.3. H12-(ADP)リボソームの物性評価に関するSOP、チェックリストの作成

物性評価の項目は、粒径、ゼータ電位、ADP内包量とADP漏出量、H12担持量とH12漏出量、脂質組成比、エンドトキシン値であり、分子集合体の製剤 (リポソーム製剤) ならではの項目が殆どである。Figure 14にこれらのSOPの抜粋をFigure 15にチェックリストの抜粋を示した。特に、リポソームに内包、担持されている物質はリポソームと共に分離できるが、そこからの物質の定量においてはリポソームを界面活性剤と加熱によって完全に可溶化することが必要である。また、可溶化剤添加が測定値に及ぼす影響も考慮しなければならない。エンドトキシンもリポソーム膜に取り込まれるので可溶化操作ならびに影響考慮が必要である。機器分析が殆どであるために、測定データは装置に接続されたPCに取り込まれ、エクセルファイルとして取り出せる場合、専用のソフトで処理され接続PC内あるいはプリントアウトしないと取り出せない場合がある。前者は画面コピーし、後者はプリントアウトされたものをスキャナーで取り込む作業

が必要である。これらのデータを専用の Figure 16の様にエクセルデータシートに取り込み、数値データを入力すると自動的に検量線を描いたり、定量値を算出してスペックシート(Figure 17)に反映されるプログラムを構築した。そして、そこに入力するサンプル名、ファイル名の付け方も明確なルール付けを行った。この様に測定データをきちんと記録した上で、スペック表を作成することで遡及可能なシステムとした。スペックから外れた場合には赤字で示され、全ての研究者にも共有されると共に、チェックリストよりSOPからの逸脱があったのか、SOP自体に問題があったのかを検討する。

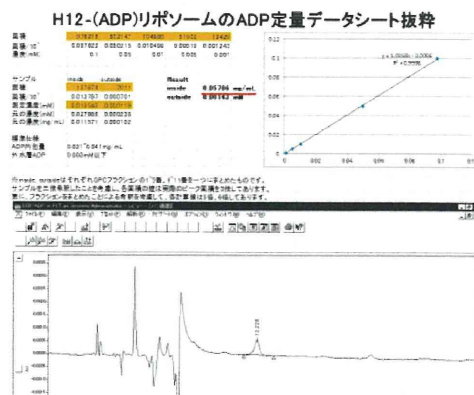


Figure 16 The part of excel data sheet for SOP for evaluation.

H12-(ADP)リポソームの物性評価SOP

6. 3 ADP 内包量と外水用 ADP 量の測定

6.3.1 ゲル透過クロマトグラフィーのカラムを4回5mLのDPBSで洗浄する。

6.3.2 H12(ADP)リポソーム1mLをカラムに注入し、1mL DPBSが漏出するのを確認する。

6.3.3 DPBSをカラムに注入し続け、1mLごとにフラクションに分けて分離する。1-4番フラクションをリポソーム分離、5-11番フラクションを外水相ADP分離とする。

6.3.4 使用するメスリンダー、1Lビーカー、3Lガロン瓶、シリンジ、50mLバイエル瓶、ガラス瓶は中性洗剤を用いて洗浄し、純水に煮沸して完全に乾燥させる。

6.3.5 ガラス瓶にメスリンダーを用いて純水270mLとメタノール30mLを入れる。

6.3.6 1Lビーカーに、リン酸水素二ナトリウム12水 21.305g、リン酸二水素ナトリウム4.536gを秤量し、入れる。

6.3.7 1Lビーカーにスターラーと蒸留水を970mL入れる。

6.3.8 ドラフボードでシリンジを用い、トリエチルアミン4.13mLずつを1Lビーカーに入れる。

6.3.9 アルコホールで1Lビーカーにふたをし、試薬が完全に溶解するまで攪拌する。

6.3.10 薬量透過フィルター(φ=0.45μm)を縦にポンプにつなぎ、6.3.6の溶液をすべて濾過させ、洗浄、乾燥後の3Lガロン瓶に移す。また、50mLバイエル瓶にアセトン30mL程度入れる。

6.3.11 HPLCカラム(TSKgel ODS-100V 5μm, 4.6mmφ×25.0cm)を装置し、HPLCとUVランプの電源を入れる。次に、接続されたPCを立ち上げ、解析ソフトMillennium 32を起動する。

6.3.12 溶液Aに純水メタノール9:1の混合溶液をセットし、HPLCのStatus画面から「Direct Function」、「Dry Prime」を選択し、実行する。

6.3.13 HPLCのStatus画面から「Direct Function」、「Wet Prime」を選択する。条件は「7.5min、2min」で実行する。

H12-(ADP)リポソームの測定データシート抜粋

Sample Lot#	Diameter (nm)	DPotential (mV)	Lipid composition (mg/mL) DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG Lipids	ADP conc.	H12 conc.	Endotoxin conc.
				(mg/mL)	(mg/mL)	(EU/mL)
F-HOK	2014/9/22	2014/9/22	2014/9/25	2014/10/16	2014/9/24	2014/9/2
14917	224.6 ± 67.4	8.49 ± 1.16	11.33/5.74/2.27/1.02	0.058	0.6	2.66

Figure 17 The spec list of excel data sheet for SOP for evaluation.

Figure 14 The text part of SOP for evaluation.

H12-(ADP)リポソームの電位とADP定量のチェックリスト

電位の測定 (指図書)		日付:	測定者:
1	電位の測定		
2	電位の測定		
3	電位の測定		
4	電位の測定		
5	電位の測定		
6	電位の測定		
7	電位の測定		
8	電位の測定		
9	電位の測定		
10	電位の測定		
11	電位の測定		
12	電位の測定		
13	電位の測定		
14	電位の測定		
15	電位の測定		
16	電位の測定		
17	電位の測定		
18	電位の測定		
19	電位の測定		
20	電位の測定		

Figure 15 The part of check list for SOP for evaluation



Figure 18 Endotoxin measurement system by using clean bag.

7.4. 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

- (1) H12-(ADP)リポソームの物性(粒子径、ゼータ電位、脂質膜組成比、内包 ADP 量および H12 脂質担持量)について標準仕様を暫定的に決定した。
- (2) H12-(ADP)リポソーム分散液のエンドトキシン測定法を確立した。また、本手法により、無菌環境で調製したりポソーム試験物のエンドトキシン値を測定したところ、基準値以下であることが確かめられた。
- (3) 無菌環境で調製したりポソーム試験物について微生物限度試験を行ったところ、日本薬局方の定める基準を下回ることを確認した。
- (4) クロスフロー濾過による外水相 ADP の除去による H12-(ADP)リポソームの精製が可能であることから数 100mL 程度のスケールアップの可能性が示唆された。
- (5) 大型エクストルーダーを用いて1度に 100 mL 規模の H12-(ADP)リポソームを短時間で粒子径制御の可能性が示唆された。
- (6) H12-(ADP)リポソームの保存安定性を1ヶ月間評価したところ、4 °C、25 °C 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 °C 保存においては、ゆるやかな ADP 漏出率増加がみられた。
- (7) H12-(ADP)リポソームは 4°C にて約一年間、安定に保存できることが示めされた。
- (8) H12-(ADP)リポソーム試験物の暫定仕様を満たすために、脂質類の合成手順書、リポ

ソーム試験物の製造手順書、品質管理項目(物性)評価手順書ならびにチェックリストを作成した。また、製造工程・品質を管理するためのシステムも作成した。そしてこれらを実際に運用し改良を行った。

1) Okamura, Y. *et al.* *J. Thromb. Haemost.* **7**, 470-477 (2009).

2) 平成 18, 19, 20 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書

3) 平成 23 年度 創薬基盤推進総合研究事業 分担研究報告書

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 藤山 敦史, 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)

(2) 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).

(3)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

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前回の H21-23 年度の研究成果として既に報告している。

今回の H24-26 年度の研究では、脱血と赤血球成分のみの返血による総量 100 mL/kg の血液交換を行って急性血小板減少家兎を作製し、これに実臨床でも行われている damage control surgery を念頭にあらかじめ肝臓器出血を作製し、出血部位を 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まず検討した。その結果、H24 年度の研究成果として、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、H25 年度の研究として、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。その結果、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自体は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 H26 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。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傷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 γ 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前回のH21-23年度の研究として行った。これは、家兎に脱血と赤血球成分のみの返血による総量100 mL/kgの血液交換を行うことで作製した急性血小板減少モデルである。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年度はまず、従来の家兎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H25年度に検討したが、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、H26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

ネンプター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

2.2.1. 100 mL/kg の血液交換モデル(H24, 25 年度研究)

まず、大腿動脈より 12.5 mL/kg の脱血を行い、対側の大腿静脈より等量(12.5 mL/kg)の Dextran sulfate 12.5 mL/kg を投与した。脱血した血液を用いて、2.3.に示すように PRP 成分と PPP 成分を分離した後、残った赤血球成分より洗浄赤血球を作製した。続いて、12.5 mL/kg の脱血を大腿動脈より同様にを行い、さらに作製した洗浄赤血球を生理食塩水 (5% albumin) で 12.5 mL/kg に調整した後、静脈内投与を行った。以後、この脱血と洗浄赤血球輸血操作を計 7 回繰り返し、最後は 8 回目の脱血血液から作製した洗浄赤血球の輸血のみを行っ

た。これにより計 8 回の脱血(合計 100 mL/kg)とこれら脱血検体より得られた赤血球成分の返却(洗浄赤血球輸血)が行われたことになる(Fig. 1)。

2.2.2. 200 mL/kg の血液交換モデル(H26 年度研究)

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を行い、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. 2)。

2.3. 洗浄赤血球および platelet-rich plasma (PRP)、platelet-poor plasma (PPP) の採取と作製

大腿動脈より脱血した動脈血を 100×g で 15 分間遠心分離し、上清を PRP として採取した。その後、さらに 500×g で 10 分間遠心分離を行い、上清を PPP として採

取した。残った赤血球を含む血球成分を生理食塩水で洗浄し(500×g, 10 分間)、洗浄赤血球として用いた(Fig. 3)。

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 100 mL/kg もしくは 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(Fig. 4)。損傷部圧迫止血は、くり抜いた肝損傷部を小児用尿道カテーテルを用いて 5 分間圧迫することで止血した(Fig. 5)。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、PPP、H12(PBS)リポゾームの投与、および H12(ADP)リポゾームへの fibrinogen 製剤の添加投与

4.1. 100 mL/kg の血液交換モデル(H24, 25 年度研究)

肝損傷作成後の臓器出血を確認した後に、バルーンによる損傷部圧迫を 5 分間行い、この間に H12(ADP)リポゾーム 20

mg/kg を PPP で 15 mL/kg に溶解したものを静脈内投与した(H12(ADP)リポゾーム群, n=10)。対照として、採取した PRP を 15 mL/kg、PPP を 15 mL/kg をそれぞれ H12(ADP)リポゾーム群と同様に投与した群を作製した(PRP 群 n=10, PPP 群 n=10)。また、リポゾームに ADP を内包していない H12(PBS)リポゾームの投与も同様に行った(n=6)。さらに fibrinogen の補充を目的に fibrinogen 製剤(Haemocompletan, CSL Behring, Marburg)を 70 mg/kg で H12(ADP)リポゾーム投与に続いて行った群を作製した(n=6, Fig. 6)。

4.2. 200 mL/kg の血液交換モデル(H26 年度研究)

100 mL/kg の血液交換モデルと同様に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)。

5. ドナーからの濃厚赤血球輸血 (200 mL/kg の血液交換モデル ; H26 年度研究)

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