

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. 7)

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（バルーン圧迫解除 15 分後）に採血し、測定に供した。

6.3. 凝固線溶系因子の測定

同様に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）、肝損傷作成 20 分後（バルーン圧迫解除 15 分後）に採血し、fibrinogen や Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), antithrombin III (AT III)などの各種凝固線溶系因子を測定した。

6.4. 肝損傷部からの臓器出血量

バルーン圧迫の解除から 5 分間の出血量を測定した。

6.5. 肝損傷部出血の止血までの時間

バルーン圧迫の解除後、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）。

6.6. 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（バルーン圧迫解除 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。

6. 7. 薬物投与後の重要臓器の病理学的所見

薬物投与終了 24 時間後に生存し得た家兔を解剖し、血栓の有無を検索した。さらに肺、肝、腎をホルマリン固定後、H.E. 染色を施行し、微小血栓の有無、病理組織学的所見の有無を検討した。

C. 研究結果

1. H12(ADP)リポゾームの事後投与とフィブリノーゲン補充効果（100 mL/kg の血液交換モデル；H24, 25 年度研究）

1. 1. 肝臓器出血の予後

H12(ADP)リポゾームの事後投与群では生存率は 60%であったが、PRP の事後投与群の生存率は 50%で、事後投与での救命効果は H12(ADP)リポゾームと PRP でほぼ同等であった。一方、PPP の事後投与群は 10%の生存率に留まった。H12(PBS)リポゾームの事後投与でも PPP 事後投与群と同様に生存率は 12%程度であった。H12(ADP)リポゾームの事後投与に fibrinogen を添加投与（事後投与）しても 6 例中 2 例しか救命出来ず生存率は 33%に留まり、fibrinogen 補充による H12(ADP)リポゾーム投与群の予後改善効果は認められなかった(Fig. 8)。

1. 2. 肝臓器出血量

肝損傷作製後に 5 分間のバルーン圧迫

止血を行う間に各種止血用輸血製剤の投与を行ったが、さらにその後の5分間の肝損傷部からの出血量を測定したところ、H12(ADP)リポゾーム事後投与群ではPPP事後投与群やH12(PBS)リポゾーム事後投与群と比べて出血量が有意に少なく、PRP事後投与群と比べてもさらに少ない傾向にあった(Fig. 8)。H12(ADP)リポゾームの事後投与にfibrinogenを添加投与(事後投与)した群でもH12(ADP)リポゾーム投与群と同程度に出血量は少なく抑えられていた(Fig. 9)。

1.3. 肝臓器出血時間

PPP事後投与群ではほとんどの症例で完全な止血が認められなかったが、H12(ADP)リポゾーム事後投与群ではPRP事後投与群と同様に、肝臓器作製から25分前後でほとんどの症例で止血が認められた(Fig. 10, 11)。H12(PBS)リポゾームの事後投与でも過半数以上で30分以内の止血が認められたが、このうち生存例は1例のみであった(Fig. 11)。H12(ADP)リポゾームの事後投与にfibrinogenを添加投与(事後投与)した群では、全例で40分以内に止血が完了し、顕著な止血効果が認められたが、生存したのは止血に30分以上かかった2例で、30分以内に止血が完了した4例は全例死亡しており、止血までの時間と最終的な生存率が相関しなかった(Fig. 11)。

1.4. 動脈圧やヘモグロビン濃度、血小板数

1.4.1. 動脈圧

脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態では血小板数が $45 \pm 2 \times 10^3$ μL と5万以下になったものの、平均動脈血圧は保たれていた(Table 1)。しかし肝臓器出血を作製した20分後では各群共に血圧が低下していた(Table 2)。一方、肝臓器出血後に5分間の圧迫とH12(ADP)リポゾームを投与することで出血20分後の動脈圧低下が改善していた(Table 2)。PRPの事後投与でも同様に血圧低下は回避されており(Table 2)、H12(ADP)リポゾームが血小板と同程度の止血効果を有することから、これにより止血制御がなされ血圧低下が起こらなかったと考えられた。一方、PPPやH12(PBS)リポゾームの投与では動脈圧は顕著に低下しており(Table 2)、止血制御不能による大量出血で血圧が低下したと考えられた。PPP、H12(PBS)リポゾーム投与の両群ではその後も出血が持続し血圧が低下し、ほとんどの家兎が死に至った。H12(ADP)リポゾームにfibrinogenを添加投与した群では、H12(ADP)リポゾームやPRPの事後投与群と同様に血圧低下が抑制されていた(Table 2)。

1.4.2. ヘモグロビン濃度

脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態ではヘモグロビン濃度も平均で6.3 g/dLと、血小板数と同様に低下していた(Table 1)。肝臓器出血後のヘモグロ

ビン濃度の低下はH12(ADP)リポゾーム事後投与群では PRP 事後投与群と同様に出血量が抑制されたため PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群のような低下は認められなかったが、平均で 5.2 g/dL 程度と肝臓出血前に比べるとさらに低下していた(Table 2)。一方、H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では、ヘモグロビン濃度が 5.8 ± 0.7 g/dL と群間で最も高い値であり、顕著な止血効果が示唆された。

1.4.3. 血小板数

血小板数は脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態作製で $4.5 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$ と顕著に低下した(Table 1)。肝臓器出血 20 分後では PRP 事後投与群でのみ増加に転じて高値を呈していたが、H12(ADP)リポゾーム事後投与群では PPP 事後投与群と同程度に留まっていた(Table 2)。これは H12(ADP)リポゾームが血小板自体を増加させる効果はないものの体内に残った血小板を有効に出血部位に集め、血小板血栓を形成させたことを物語っていると考えられた。H12(PBS)リポゾーム事後投与群では血小板数は低値を示し、有効な止血が出来なかったことを示唆させるが、H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群でも血小板数は $5.0 \pm 0.4 \times 10^4 / \mu\text{L}$ と H12(ADP)リポゾーム事後投与群より低値を呈しており、予後改善効果がなかったことを考える上で示唆に富む所見であった。

1.5. 各種凝固線溶系因子

脱血と赤血球成分の返血による急性血小板減少病態作製後では、fibrinogen 値は測定感度以下にまで低下していた(Table 1)。肝臓器出血後に H12(ADP)リポゾーム、PRP、PPP、H12(PBS)リポゾームのいずれを投与しても fibrinogen 値は測定感度以下のままで極めて低い値で推移した(Table 2)。しかし、H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では 102 ± 20 mg/dL と顕著な改善を認め、凝固因子が効果的に補充されていた。Prothrombin time (PT)も、急性血小板減少病態作製後では測定限度以上に延長していた (Table 1)。肝臓器出血後は H12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群、さらに H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群で測定範囲内にまで低下したがいずれも延長は認められた(Table 2)。APTT は急性血小板減少病態作製後、そして肝臓出血後の各種薬剤投与後でも各群共に計測し得ないほど延長していた。AT III 活性は急性血小板減少病態作製後、顕著に低下していたが(Table 1)、肝臓器出血 20 分後では H12(ADP)リポゾーム事後投与群や PRP 事後投与群で、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群に比し有意に高値を呈していた(Table 2)。H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では AT III 活性が肝臓器出血 20 分後、各群間で最も高値となり線溶活性の改善が示唆された(Table 2)。

1. 6. ソノクロットによる血栓形成能の評価

各群の血栓形成能をソノクロットで解析した。Active clotting time は血液凝固が開始されるまでの時間であり血栓形成能の1つの指標であるが、急性血小板減少病態作製後は顕著に延長していたが(Table 1)、H12(ADP)リポゾーム事後投与群ではPRP 事後投与群と同様に肝臓器出血 20 分後に短縮が認められたのに対し(Table 2)、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群では明らかに延長していた(Table 2)。興味深いことに、H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では最も短縮が認められ、凝固能が改善していたことが示唆された(Table 2)。血栓形成の速度でもある clot rate も急性血小板減少病態作製後は顕著に低下していた(Table 1)。H12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群共に肝臓器出血 20 分後には改善を認めたが、とくに H12(ADP)リポゾーム事後投与群で改善を認めた(Table 2)。一方、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群では低値のままであった(Table 2)。H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群では clot rate の著しい改善を認め、PPP 事後投与群や H12(PBS)リポゾーム事後投与群のみならず、H12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群に比しても顕著な改善を認め注目された(Table 2)。

1. 7. 肺、肝、腎での病理組織学的変化

各種薬剤投与 24 時間後の各臓器での病理学的所見を検討した。PPP 事後投与群では救命例の肺で肺胞中隔の軽度肥厚を、肝で肝細胞の軽度の変性所見を認めたが、H12(ADP)リポゾーム事後投与群、PRP 事後投与群を含むいずれの群でも微小血栓の形成は認められなかった(Fig. 12)。さらに H12(ADP)リポゾームに fibrinogen を添加投与した群でも微小血栓をはじめ、血栓形成は皆無であった(Fig. 12)。

2. H12(ADP)リポゾームの事後投与と赤血球輸血効果 (200 mL/kg の血液交換モデル ; H26 年度研究)

2. 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 3)

2. 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 3)

2. 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 ± 2 g にもなった。平均動脈圧は 22 ± 7 mmHg まで下がり Hb も 3.9 ± 0.8 g/dL と極度の貧血状態に陥った。一方、血小板数は $4.1 \pm 0.2 \times 10^4$ / μ 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 ± 156 sec、clot rate も 0.2 ± 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 4)。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。

2. 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 ± 4 g と著明に減少した。しかし平均動脈圧は 43 ± 2 mmHg と PPP の事後投与に比べ改善した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 ± 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 $7.0 \pm 0.5 \times 10^4$ / μ 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 ± 31 sec、clot rate も 3.4 ± 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 4)

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 ± 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. 13)。しかし平均動脈圧は 42 ± 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 ± 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、 $3.4 \pm 0.4 \times 10^4$ / μ 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 ± 42 sec、clot rate も 3.2 ± 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 4)

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兎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 事後投与後の家兎に 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 ± 0.4 g/dL と貧血がさらに進み、平均動脈圧も 36 ± 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 $6.5 \pm 0.6 \times 10^4$ / μ L と依然 5×10^4 / μ 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 ± 423 sec、clot rate も 1.8 ± 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 ± 0.7 g/dL まで改善し平均動脈圧も 57 ± 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 $6.2 \pm 0.7 \times 10^4$ / μ 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 ± 184 sec、clot rate も 3.3 ± 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 ± 0.6 g/dL まで改善したが、平均動脈圧は 49 ± 0.3 mmHg であった。血小板数は $3.4 \pm 0.5 \times 10^4$ / μ 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で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 5)

D. 考察

H24 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兎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、H25 年度は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。

脱血と赤血球成分のみの返血で作製した急性血小板減少病態では、1 次血栓(血小板血栓)の形成能を反映する active clotting time の顕著な延長や 2 次血栓(フィブリン血栓)の形成能を反映する clot rate の顕著な低下も認められ、血栓形成能の増悪が示唆されている。凝固因子も血小板同様、著明に低下したことから、本モデルにおける易出血性病態の発現には血小板低下のみならず、凝固因子の低下も関与していることが考えられ、H12(ADP)リポゾーム投与時には凝固因子を含む PPP もあわせて投与した。以前の検討からこれにより凝固因子がある程度改善することが分かっている。しかし、今回の研究では各種薬剤の出血後投与であるため出血後は凝固因子が消費され、fibrinogen 値は H12(ADP)リポゾーム事後投与群や PRP 事後投与群でもいずれも測定限界以下であり、前述のように fibrinogen がある程度補

充されている状態での H12(ADP)リポゾームの事後投与の効果を検討した。Fibrinogen の添加投与により、fibrinogen 値の上昇と AT III 活性の上昇が認められ、clotting rate も上昇し、凝固線溶系の改善と凝固能の促進が推察されたが、予後の改善は認められなかった。各群とも重度の貧血状態であったことから、予後不良の原因は凝固因子の不足だけではなく、貧血など他の因子の関与が推測された。

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。H26 年度の研究で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ば、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、脱血と洗浄赤血球輸血を繰り返すことで、急性の血小板減少性の易出血性病態モデルを作製した。
2. 本モデルを作製後、肝臓に外傷性の臓器損傷を作製したところ、臓器からの出血により死に至る致死性の血小板減少性易出血性病態モデルとなり得ることが確認された。
3. 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、臓器出血に対する止血救命効果が得られたが、救命率は 60%に留まった。
4. 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、PPP を投与するも

fibrinogen は測定限界以下にまで低下していた。そこで fibrinogen を H12 (ADP) リポゾームと共に添加投与したが、凝固因子の上昇は認められたものの予後の改善は認められなかった。

5. このような出血後の止血薬剤投与では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

H24 年度

(原著)

1. Ono S, Kimura A, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Yamamoto J, Hase K, Saitoh D. Removal of increased circulating CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery* 153: 262-271, 2013.
2. Sato A, Nakashima H, Kinoshita M,

- Nakashima M, Ogawa Y, Shono S, Ikarashi M, Seki S: The effect of synthetic C-reactive protein on the in vitro immune response of human PBMCs stimulated with bacterial reagents. *Inflammation* (in press)
3. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin M. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis. *Photochem. Photobiol.* (in press)
 4. Nakashima H, Ogawa Y, Shono S, Kinoshita M, Nakashima M, Sato A, Ikarashi M, Seki S: Activation of CD11b⁺ Kupffer cells/macrophages as a common cause for exacerbation of TNF/Fas-ligand-dependent hepatitis in hypercholesterolemic mice. *PLoS ONE*
 5. Okamura, Y., Kabata, K., Kinoshita, M., Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Ohtsubo S, Saitoh, D., and Takeoka, S. Fragmentation of Poly(lactic acid) Nanosheets and Their Patchwork Treatment for Burn Wounds. *Adv. Mater.* (in press)
 6. Yano H, Kinoshita M, Fujino K, Nakashima M, Yamamoto Y, Miyazaki H, Hamada K, Iwaya K, Saitoh D, Seki S, Tanaka Y. Insulin treatment directly restores neutrophil phagocytosis and bactericidal activity in diabetic mice, thereby improving surgical site infection with *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 80; 4409-4416, 2012.
 7. Aoki S, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Iwaya K, Takeoka S, Saitoh D. Application of poly-L-lactic acid nanosheet as a material for wound dressing. *Plast Reconstr Surg* (in press)
 8. Otani N, Kinoshita M, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Saitoh D, Haggisawa K, Nawashiro H, Shima K. Novel therapeutic usage of polysaccharide nanosheets for aracinoid plasty and reinforcement of venous tensile strength in rat microneurosurgery. *J. Clin. Neurosci.* 20; 301-305, 2013.
 9. Nishikawa K, Haggisawa 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; 2137-2148, 2012.
 10. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Nemoto K, Shinomiya N, Seki S, Hamblin M. Photodynamic therapy can induce a protective innate immune response against murine bacterial arthritis *via* neutrophil accumulation. *PLoS One*
 11. Nogami, Y., Takase, B., Kinoshita, M., Shono, S., Kaneda, S., Tanaka, Y., Kishimoto, S., Hattori, H., Ishihara, M. Liposome-encapsulated hemoglobin attenuates cardiac dysfunction and

- sympathetic activity during hypohemoglobinemic shock. *Shock* 38; 159-164, 2012.
12. Saito A, Miyazaki H, Fujie T, Ohtsubo S, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S. Therapeutic efficacy of an antibiotic-loaded nanosheet in a murine burn-wound infection model. *Acta Biomater* 8; 2932-2940, 2012.
 13. Miyazaki H, Kinoshita M, Saito A, Fujie T, Kabata K, Hara E, Ono S, Takeoka S, Saitoh D. An ultra-thin poly(L-lactic acid) nanosheet as a burn-wound dressing for protection against bacterial infection. *Wound Repair Regen* 20; 573-579, 2012.
 14. Kimura A, Ono S, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Miyazaki H, Kinoshita M, Hatsuse K, Saitoh D, Hase K, Yamamoto J. The postoperative serum interleukin-15 concentration correlates with organ dysfunction and the prognosis of septic patients following emergency gastrointestinal surgery. *J Surg Res* 175; e83-e88, 2012.
 15. Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, Tsujimoto H, Takahata, R., Miyazaki H., Saitoh D, Seki S, Hase K. Neutralization of IL-10 restores the down-regulation of IL-18 receptor on NK cells and IFN- γ production in septic mice, thus leading to an improved survival. *Shock* 37; 177-82, 2012.
 16. Nakashima M, Kinoshita M, Nakashima H, Habu Y, Miyazaki H, Hiroi S, Nakanishi K, Seki S. Characterization of mouse liver phagocytic B cells in innate immunity. *J. Leukocyte. Biol.* 91; 537-546, 2012.
 17. Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata, R., Miyazaki H., Saitoh D, Hase K. Neutralization of interleukin-10 or tumor growing factor-beta decreases the percentages of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thus leading to an improved survival. *Surgery* 151; 313-22, 2012.
 18. Maemura T, Kinoshita M, Shin M, Miyazaki H, Tsujimoto H, Ono S, Hase K, Saitoh D. Assessment of a Tissue-Engineered Gastric Wall Patch in a Rat Model. *Artif. Organs* 36; 409-17, 2012.
 19. Tanaka M, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin M, Dai T, Huang L, Morimoto Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem. Photobiol.* 88; 227-32, 2012.
 20. 矢野秀和、藤野啓一、木下 学、山崎民大、小林裕幸、曾根原亘、田中祐司。メッシュを用いた鼠径ヘルニア手術に予防的抗菌薬投与は必要か。防衛医科大学校雑誌 37;280-286, 2012.
- (総説)
1. Maemura T, Shin M, Kinoshita M: Tissue Engineering of the Stomach. *J Surg Res* (in press)
 2. Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Seki S: Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection

- in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J. Leukocyte. Biol.* (in press)
3. Seki S, Nakashima H, Kinoshita M: The Liver as a Pivotal Innate Immune Organ. *Immuno-gastroenterology* 1; 76-89, 2012.
 4. 木下 学: プロカルシトニン. *外科と代謝・栄養* 46: 15-18, 2012.
 5. 田中優砂光、吉原愛雄、守本祐司、木下 学、Hamblin MR、根本孝一. 光線力学療法(PDT)を用いた骨関節手術後感染の予防戦略. *整形災害外科* 55;75-79, 2012.
 6. 木下 学、野上弥志郎、庄野聡、西川可穂子、萩沢康介、高瀬凡平. 人工血小板や人工赤血球を用いた出血性ショック治療. *侵襲と免疫*. 21; 48-52, 2012.
 7. 田中優砂光、守本祐司、木下 学、吉原愛雄、四ノ宮成祥、関 修司、齋藤大蔵、宮崎裕美、Hamblin MR、根本孝一. 光線力学療法(PDT)の局所感染症への応用—化膿性関節炎モデルを用いた実験的研究—. 防衛医科大学校学術集会賞受賞記念論文. *防衛医科大学校雑誌* 37;243-256, 2012.
 8. 田中優砂光、木下 学、吉原愛雄、四ノ宮成祥、関 修司、根本孝一、守本祐司. 光線力学療法(PDT)の生体防御能賦活効果—局所細菌感染症の治療への応用—. *光クライアンス*. 5; 42-45, 2012.
 9. 西山靖将、木下 学、染田英利、柳川 錬平、萩沢康介、妻鳥元太郎. 危機管理の視点からみた輸血用血液準備の重要性と人工血液の開発. *人工血液* 20; 58-64, 2012.
 10. 佐藤厚志、木下 学、中島弘幸、中島正裕、五十嵐正巳、関 修司. 合成CRPのヒト末梢血単核球に対する炎症性サイトカイン産生抑制効果と抗腫瘍活性増強効果. *外科と代謝・栄養* 47; 31-39, 2013.
 11. 小野 聡、平木修一、辻本広紀、木下 学、齋藤大蔵. 外科侵襲によるimmunoparalysisとその制御. *侵襲と免疫*. 22; 7-18, 2013.
- H25 年度
(原著)
21. 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 CCl₄-induced acute hepatic injury. *PLoS ONE* 2014.
 22. 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, 2013.
 23. Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Sato A, Nakashima M, Miyazaki H, Nishiyama K, Yamamoto J, Seki S. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer

- cells/macrophages. *J. Leukocyte. Biol.* 94; 1325-36, 2013.
24. Takigawa T, Miyazaki H, Kinoshita M, Kawarabayashi N, Nishiyama K, Hatsuse K, Ono S, Saitoh D, Seki S, Yamamoto J. Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid on liver lymphocytes in mice. *Am J Physiol-Gastr L* 305; G427-38, 2013.
25. Hagisawa K, Saito A, Kinoshita M, Fujie T, Otani N, Shono S, Park YK, Takeoka S: Effective control of massive venous bleeding by “multi-overlapping therapy” using polysaccharide nanosheets in rabbit inferior vena cava injury model. *J. Vasc. Surg: Venous and Lymphatic Disorders.* 1; 289-297, 2013.
26. Maemura T, Shin M, Kinoshita M: Tissue Engineering of the Stomach. *J Surg Res* 183; 285-295, 2013.
27. Sato A, Nakashima H, Kinoshita M, Nakashima M, Ogawa Y, Shono S, Ikarashi M, Seki S: The effect of synthetic C-reactive protein on the in vitro immune response of human PBMCs stimulated with bacterial reagents. *Inflammation* 36; 781-792, 2013.
28. Tanaka M, Mroz P, Dai T, Huang L, Morimoto Y, Kinoshita M, Yoshihara Y, Shinomiya N, Seki S, Nemoto K, Hamblin M. Linezolid and vancomycin decrease the therapeutic effect of methylene blue-photodynamic therapy in a mouse model of MRSA bacterial arthritis. *Photochem. Photobiol.* 89;679-682, 2013.
29. Ono S, Kimura A, Hiraki S, Takahata R, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Yamamoto J, Hase K, Saitoh D. Removal of increased circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery* 153: 262-271, 2013.
30. Aoki S, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Iwaya K, Takeoka S, Saitoh D. Application of poly-L-lactic acid nanosheet as a material for wound dressing. *Plast Reconstr Surg.* 131; 236-240, 2013.
31. Nakashima H, Ogawa Y, Shono S, Kinoshita M, Nakashima M, Sato A, Ikarashi M, Seki S: Activation of CD11b⁺ Kupffer cells/macrophages as a common cause for exacerbation of TNF/Fas-ligand-dependent hepatitis in hypercholesterolemic mice. *PLoS ONE* 2013.
32. Okamura, Y., Kabata, K., Kinoshita, M., Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Ohtsubo S, Saitoh, D., and Takeoka, S. Fragmentation of Poly(lactic acid) Nanosheets and Their Patchwork Treatment for Burn Wounds. *Adv. Mater.* 25; 545-551, 2013.
33. Otani N, Kinoshita M, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Saitoh D, Hagisawa K, Nawashiro H, Shima K. Novel therapeutic usage of polysaccharide nanosheets for aracinoid plasty and

reinforcement of venous tensile strength in rat microneurosurgery. *J. Clin. Neurosci.* 20; 301-305, 2013.

(総説)

12. 木下 学: 人工血液、人工血小板の臨床応用. *A net.* 18 ; 14-17, 2013.
13. Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Seki S: Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J. Leukocyte. Biol.* 93; 689-698, 2013.
14. 西川可穂子、萩沢康介、柳川鍊平、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* 21: 60-67, 2013.
15. 小野 聡、平木修一、辻本広紀、木下学、齋藤大蔵. 外科侵襲による immunoparalysis とその制御. *侵襲と免疫* 22; 7-18, 2013.
16. 佐藤 厚志、木下学、中島弘幸、中島正裕、五十嵐正巳、関 修司. 合成 CRP のヒト末梢血単核球に対する炎症性サイトカイン産生抑制効果と抗腫瘍活性増強効果. *外科と代謝・影響.* 47; 31-39, 2013.

H26 年度

(原著)

34. 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

35. 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⁺ 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
36. 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.
37. 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⁺/CD206⁺ 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.
38. 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 γ -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
39. 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 CCl₄-induced acute hepatic injury. *PLoS ONE* 9: e92515, 2014 IF= 3.534
40. 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)
17. 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
18. 木下 学, 人工赤血球、人工血小板の臨床応用, 2014, *Anet*, 18: 14-17
19. 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
20. 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
21. 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,
22. 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.
23. 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.
24. 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
- H24 年度
1. 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)
2. 木下 学、小野 聡、宮崎裕美、中島正裕、中島弘幸、齋藤大蔵、関 修司：外科侵襲後の複合免疫不全による易感染病態と IL-18 を用いた免疫賦活化対策. 第 27 回日本 shock 学会総会 (シンポジウム II-5) 2012, 東京.(日本 Shock 学会雑誌, p39: 27, 2012)
 3. 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：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)
 4. 土井麻実、木下 学、西川可穂子、萩沢康介、柳川錬平、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)
 5. 木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川錬平、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)
 6. 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)
 7. 木下 学、関 修司：重度外傷や熱傷に続発する複合免疫不全とその対策. 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)
- H25 年度
1. Hagiwara 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**
 2. 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)
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、齋藤大蔵、西田育弘：H12(ADP)liposome の新たな適応：衝撃波による肺出血に対する H12(ADP)liposome の救命効果. 第 20 回日本血液代替物学会（シンポジウム 2-5）2013, 奈良. (人工血液 p25: 21, 2013)
 4. 土井麻実、木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川鍊平、半田 誠、池田康夫、武岡真司：人工血小板 H12(ADP)liposome 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（シンポジウム 2-3）2013, 奈良. (人工血液 p23: 21 2013)
 5. 高瀬凡平、東村悠子、田中良弘、木下学：出血性ショック心臓における致死性不整脈発生機序及び人工酸素運搬体による治療効果に関する検討. 第 20 回日本血液代替物学会 2013, 奈良. (人工血液 p28: 21 2013)
 6. 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、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
- H26 年度
1. 木下 学, (特別講演) 超極薄膜ナノシート of 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, 柳川鍊平, 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

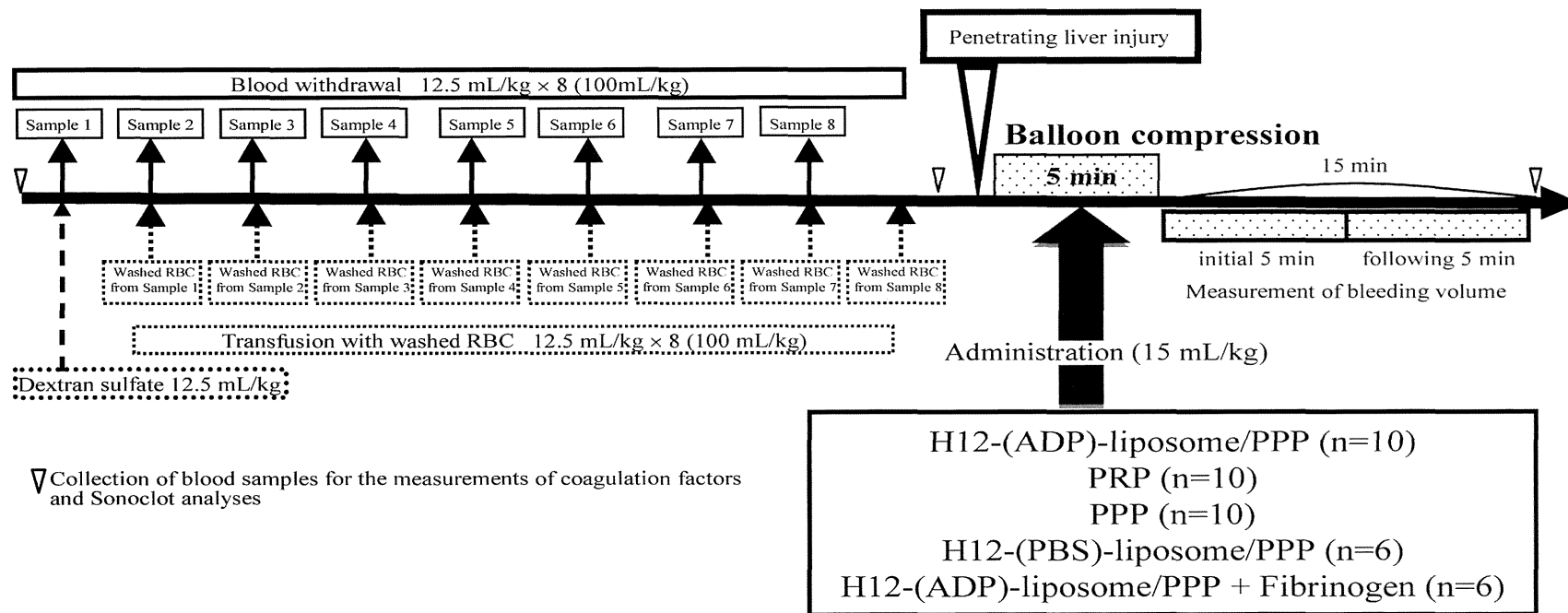


Fig. 1. Experimental design for acute thrombocytopenia and subsequent non-compressible liver hemorrhage in rabbits (200 mL/kg blood exchange model)

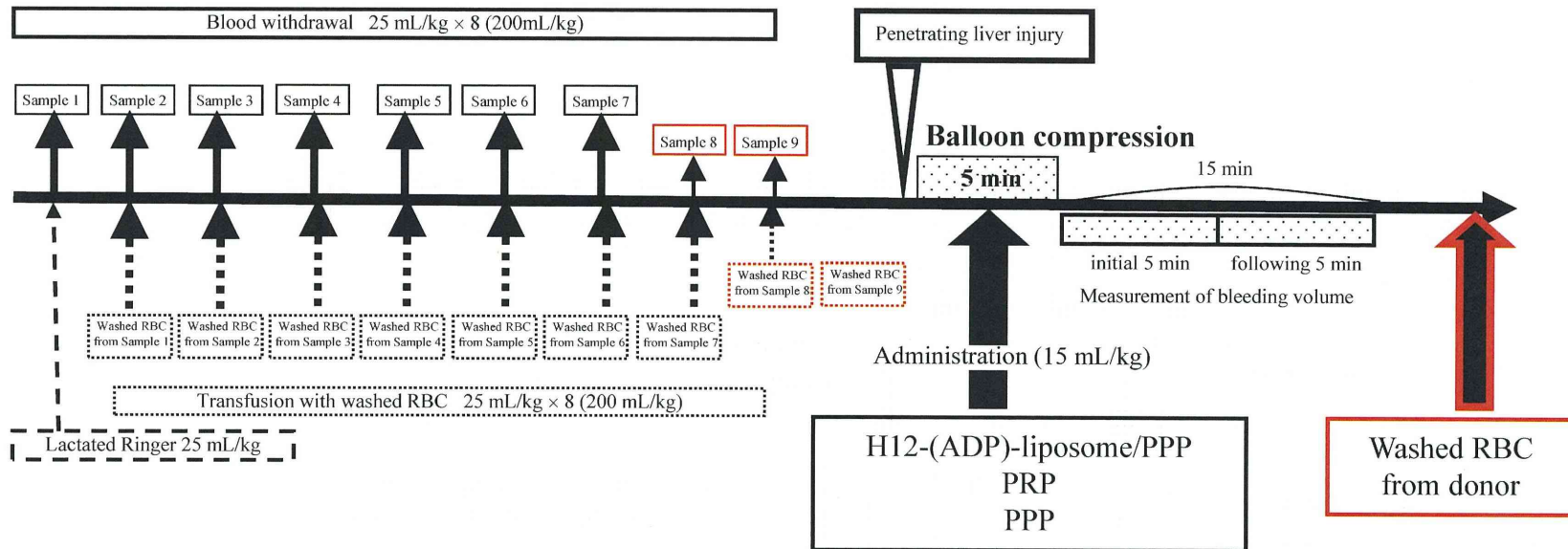


Fig. 2. Experimental design (200 mL/kg blood exchange model)

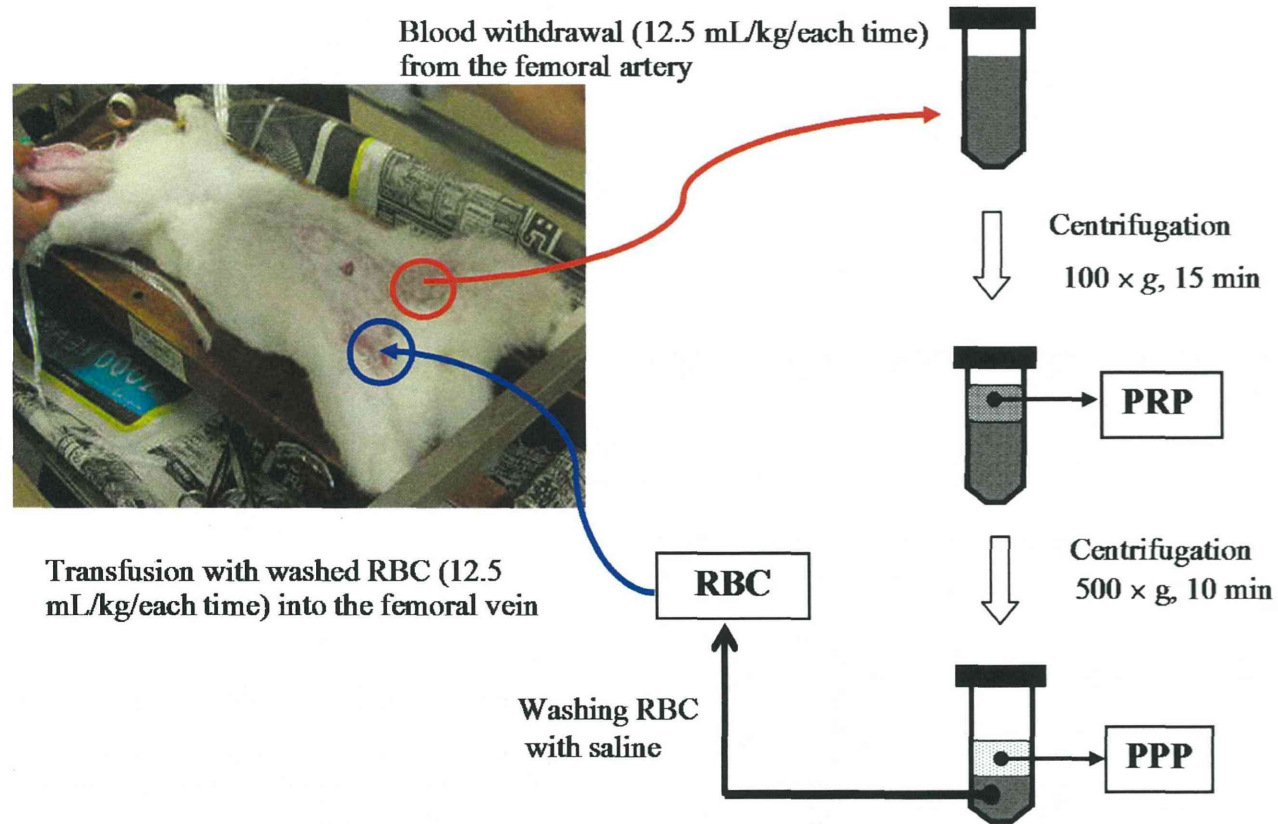


Fig. 3. Preparations of PRP, PPP and washed RBC, and transfusion of washed RBC