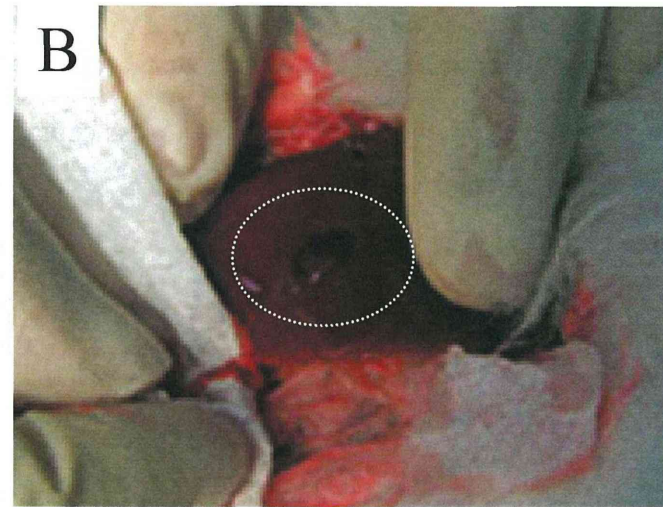


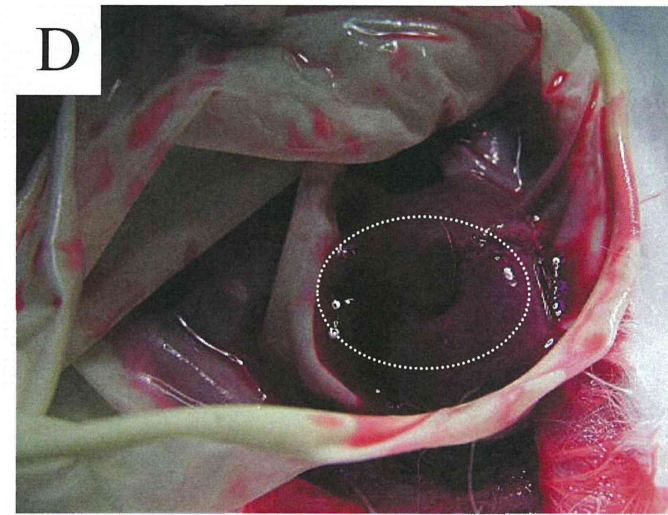
Penetrating liver injury



Liver hemorrhage (immediately after injury)

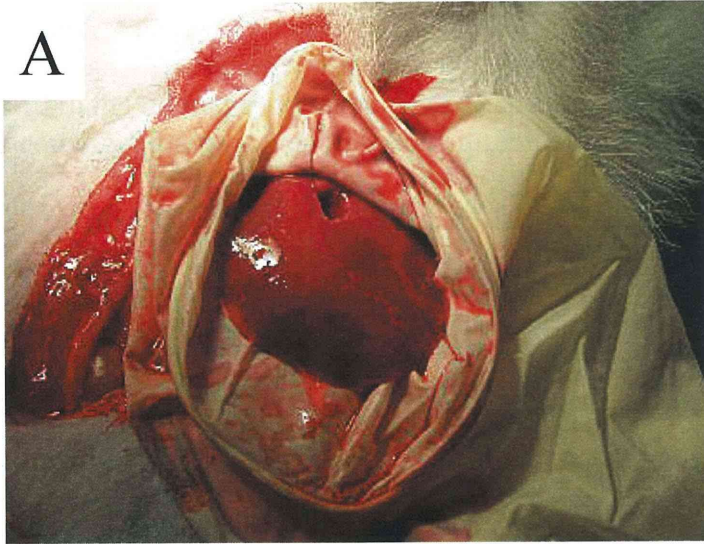


H12-(ADP)-liposomes/PPP (at 10 min)

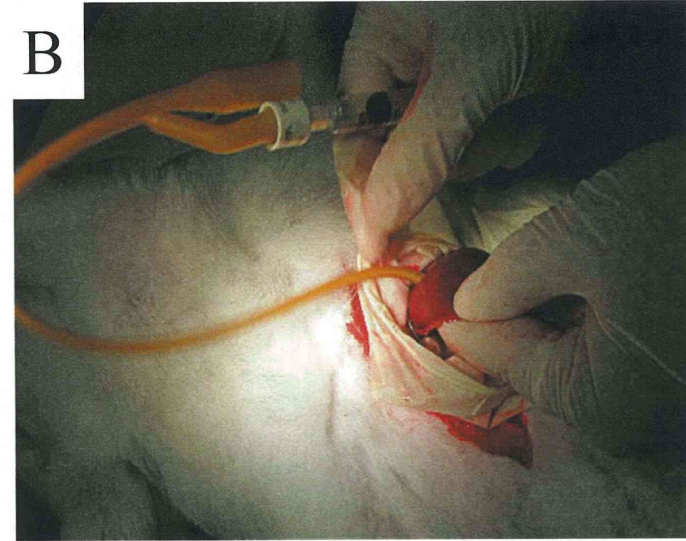


PPP (at 10 min)

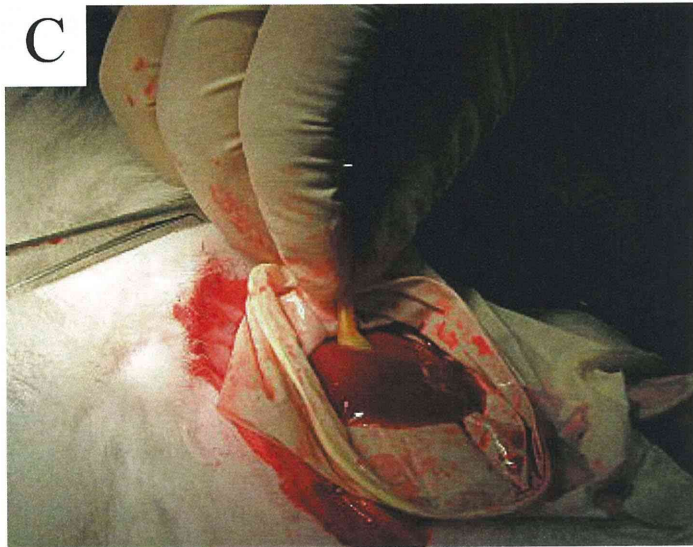
Fig. 4. Non-compressible liver hemorrhage in thrombocytopenic rabbits. (A) Penetrating liver injury using DermaPunch. (B) Liver hemorrhage from the injured site immediately after injury. Liver hemorrhage in the H12-(ADP)-liposomes/PPP-transfused (C) or PPP-transfused (D) rabbits 10 min after injury. Representative data with similar results from ten rabbits in H12-(ADP)-liposomes/PPP or PPP group are shown (C, D).



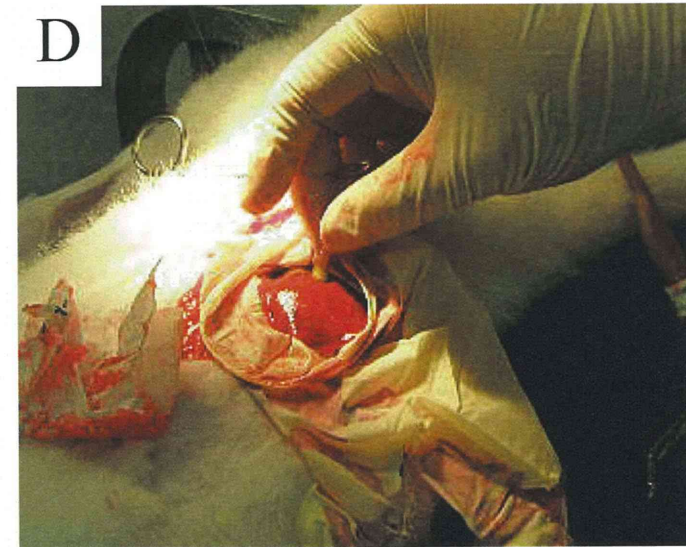
Liver bleeding from the penetrating liver injury



Hemostasis by balloon compression (setting in a lesion)



Hemostasis by balloon compression (balloon clamping)



Hemostasis by balloon compression (balloon declamping)

Fig. 5. Hemostasis by balloon compression. (A) Penetrating liver injury site before hemostasis. (B-D) Hemostasis of penetrating liver injury using balloon compression of indwelling urethral catheter.

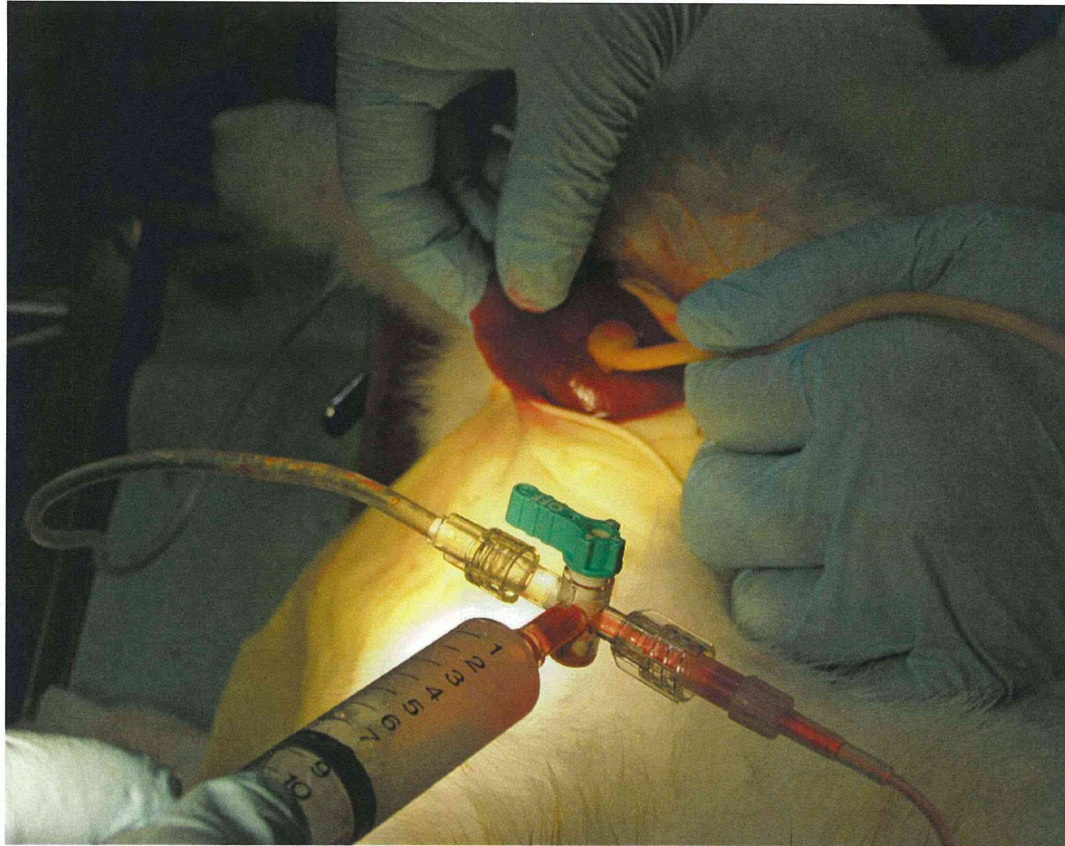


Fig. 6. Supplementation of fibrinogen concentrate following H12-(ADP)-liposome administration

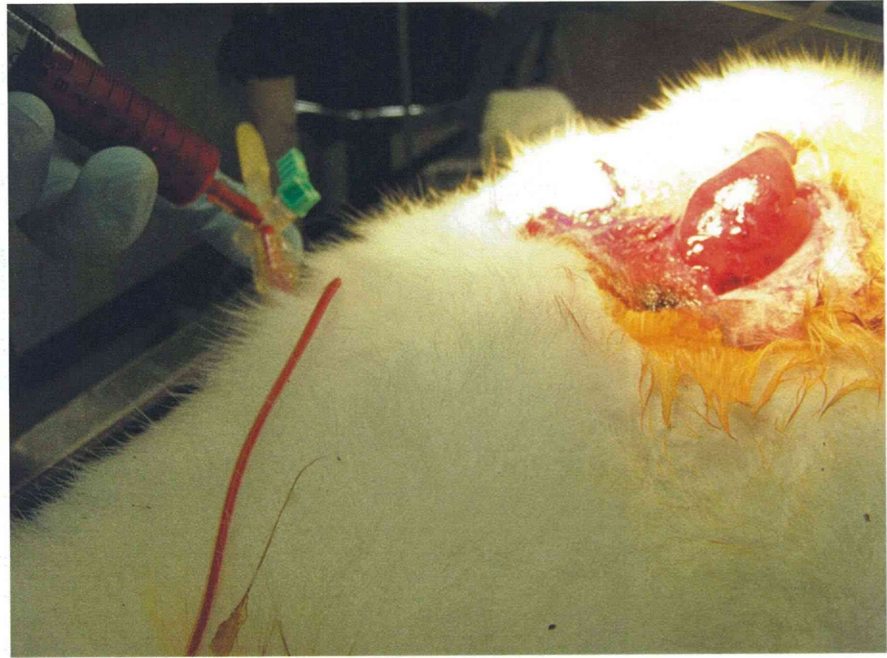
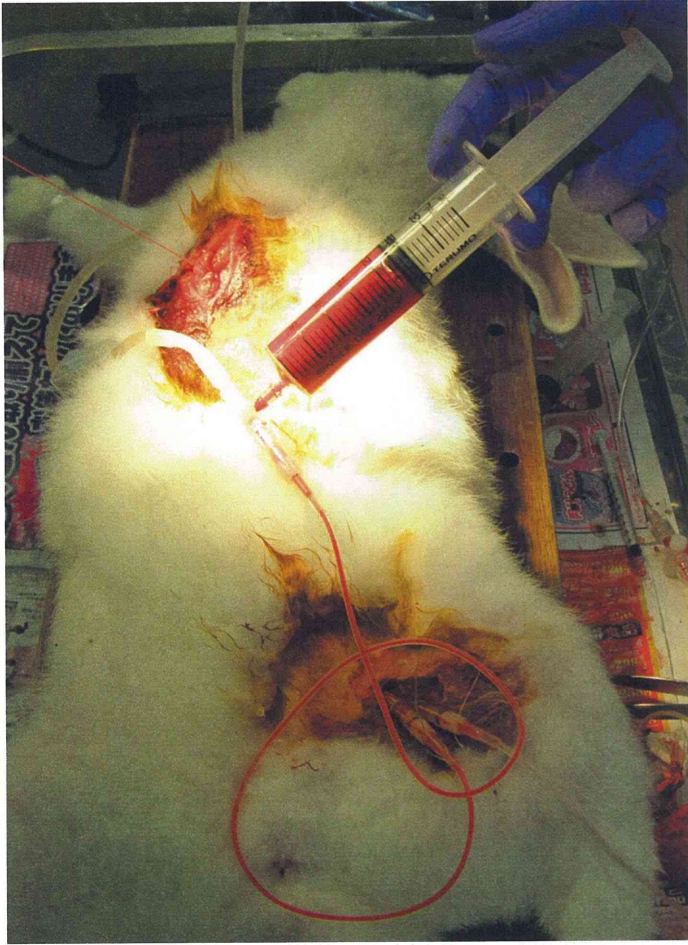


Fig. 7. RBC transfusion after PRP treatment

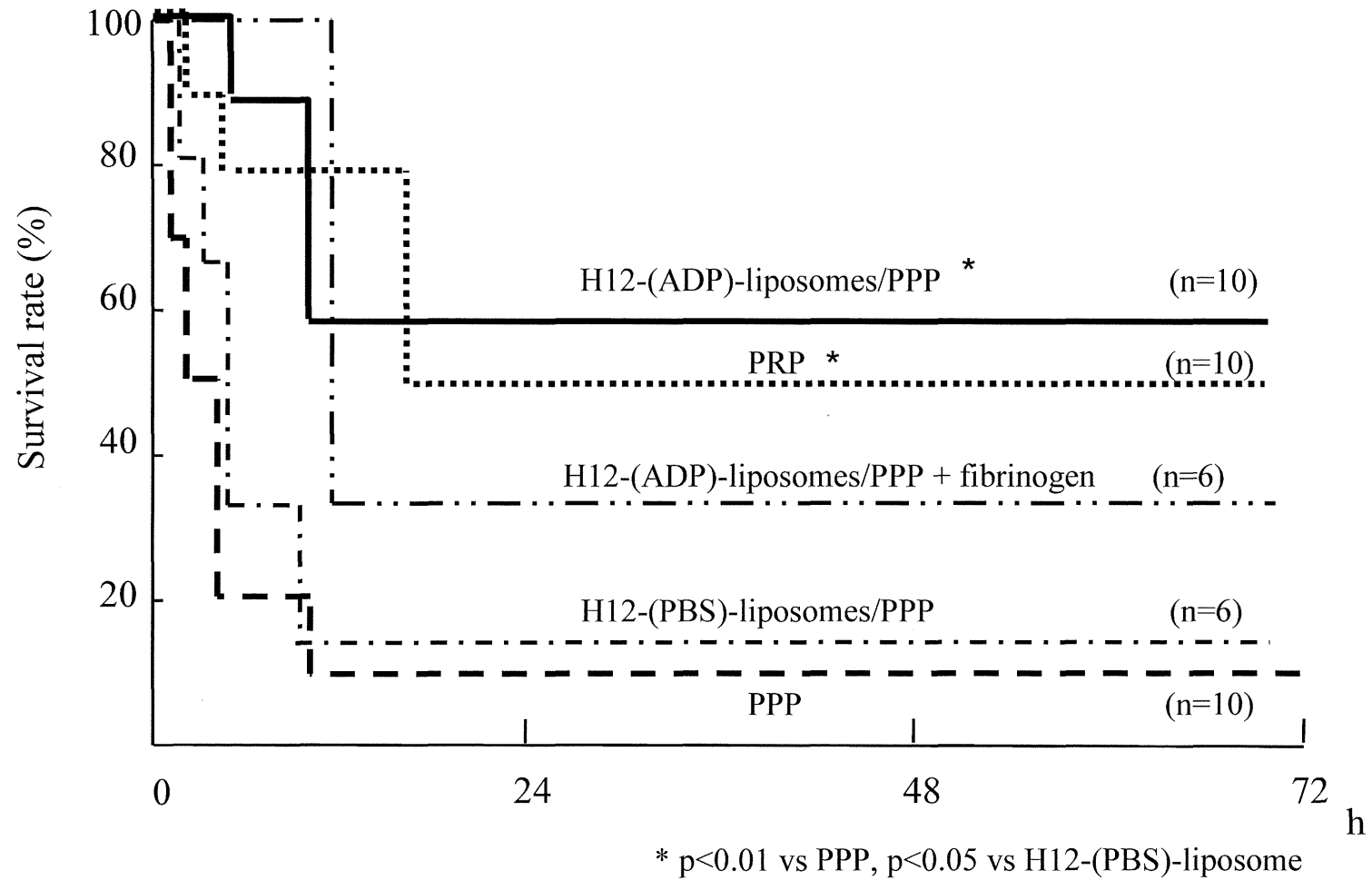


Fig. 8. The effect of additional injection with fibrinogen to H12-(ADP)-liposomes on the survivals in thrombocytopenic rabbits after liver injury

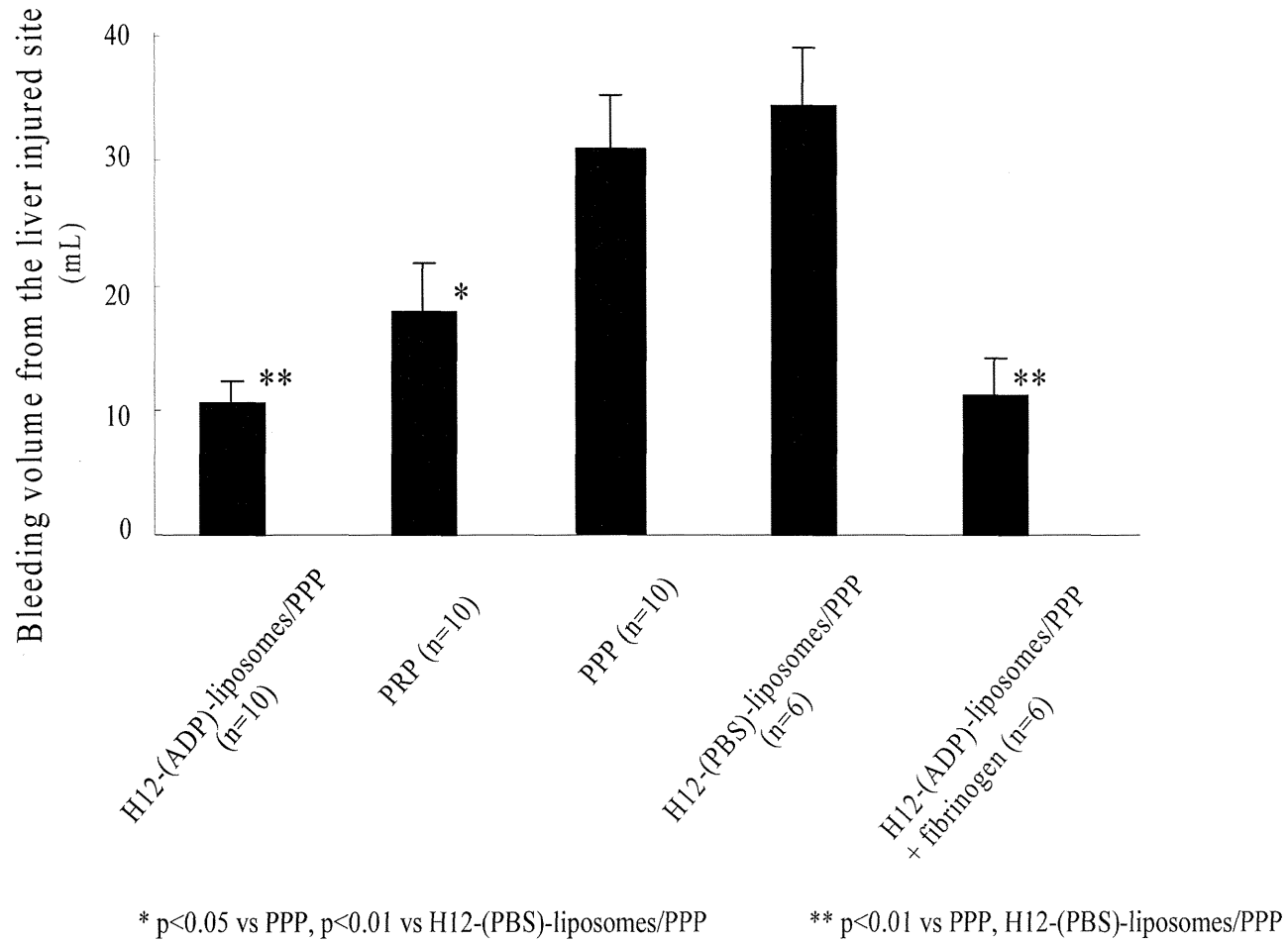


Fig. 9. The effect of additional injection with fibrinogen to H12-(ADP)-liposomes on the bleeding volume from the liver injury site in the thrombocytopenic rabbits

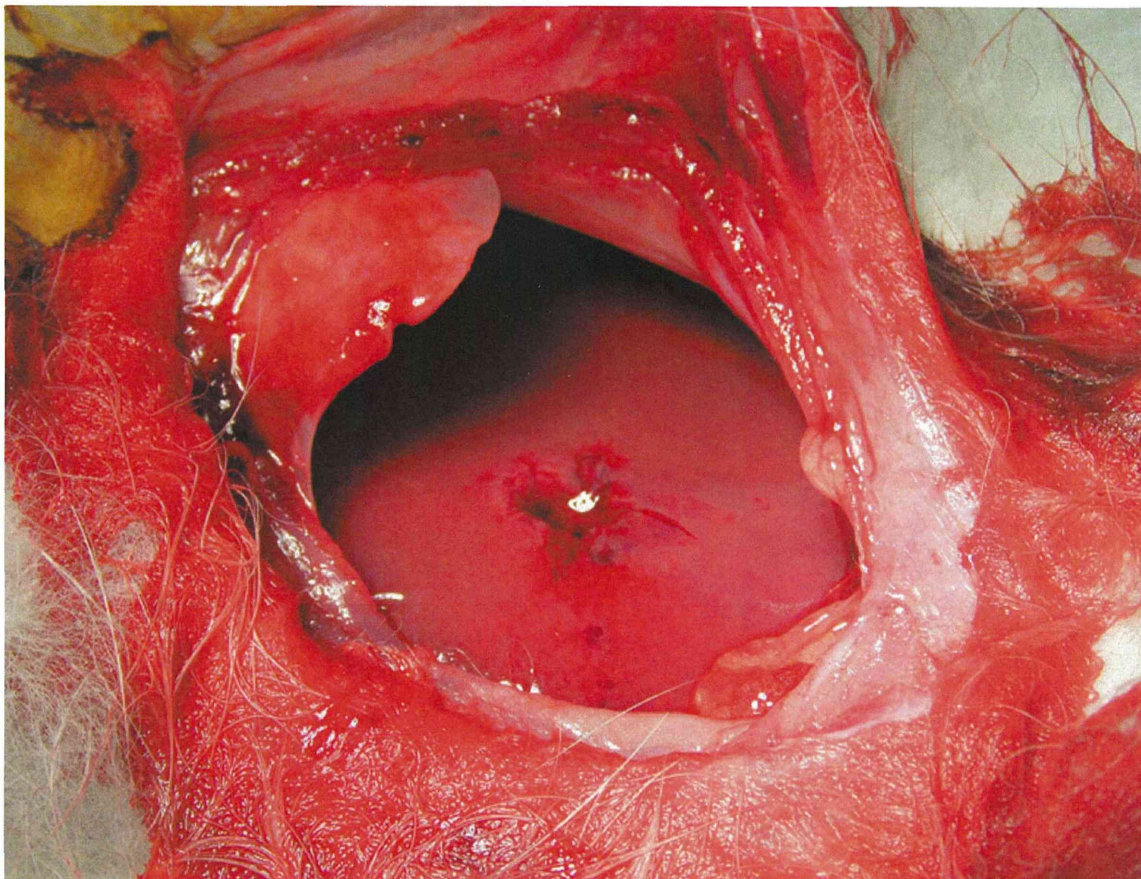


Fig. 10. Hemostasis at the liver injured site after administration with H12-(ADP)-liposomes in the thrombocytopenic rabbits

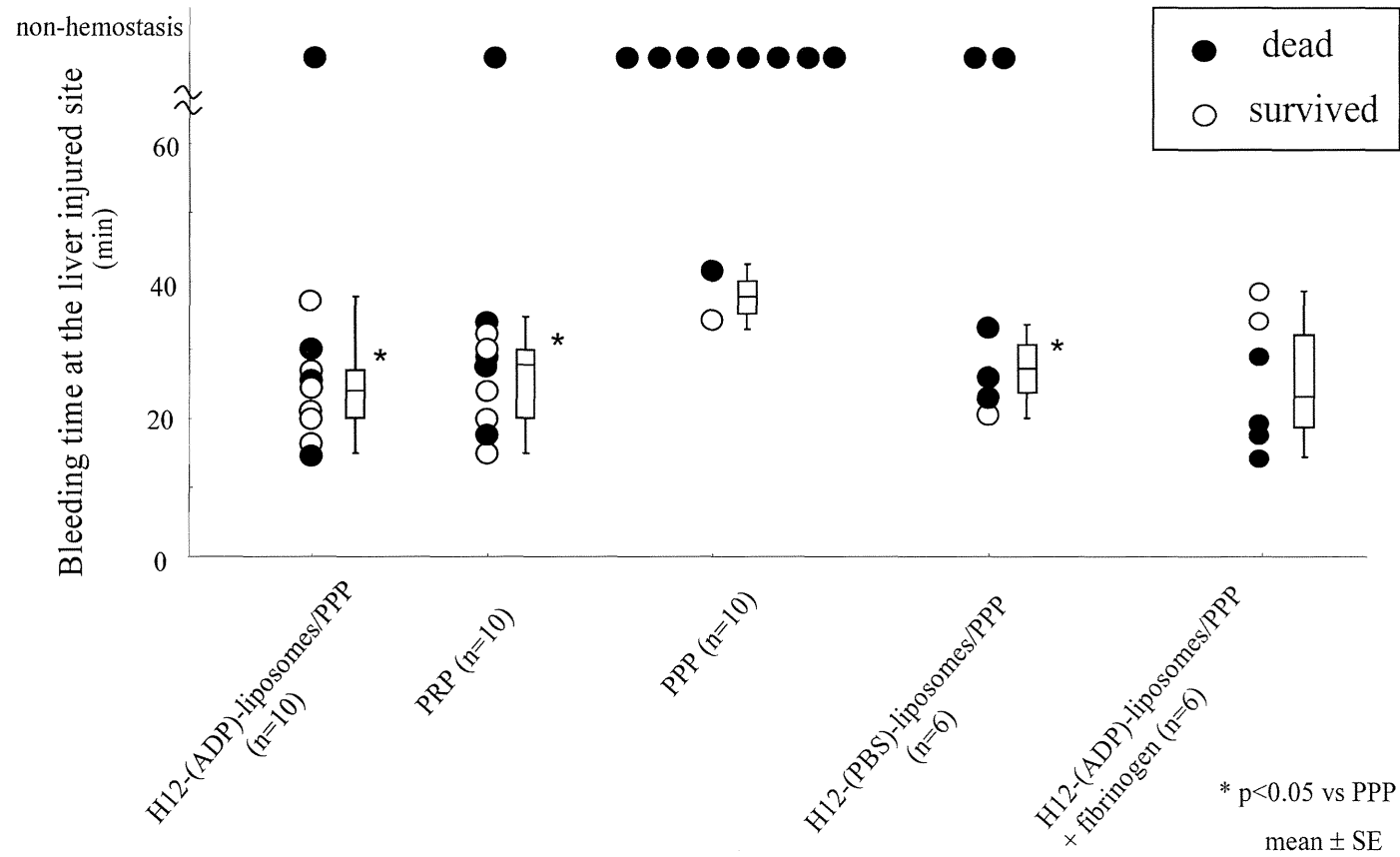


Fig. 11. The effect of additional injection with fibrinogen to H12-(ADP)-liposomes on the bleeding time from the liver injury site in the thrombocytopenic rabbits

Table 1. Changes in the hemotological parameters and coagulation factors in rabbits before and after blood exchange

	Before blood exchange (n=66)	After blood exchange (n=66)
Mean arterial pressure (mmHg)	71 ± 12	67 ± 14
Hemoglobin concentrations (g/dL)	11.3 ± 2.1	6.3 ± 2.3 *
Platelet counts (× 10 ⁴ /μL)	21.7 ± 6.6	4.5 ± 0.8 *
Fibrinogen concentration (mg/dL)	186 ± 38	<55
AT III activity (%)	115 ± 18	35 ± 11 *
PT (sec)	10 ± 1	>30
APTT (sec)	24 ± 8	>75
Clotting time (CT) (sec)	114 ± 16	387 ± 185 *
Clotting rate (CR) (sec)	17 ± 5	2.1 ± 1.3 *

Hematological parameters and coagulation factors were measured in rabbits before and after blood exchange. Data are mean ± SD, * p<0.01 vs before blood exchange.

Table 2. Hemotological parameters and coagulation factors/activities in rabbits 20 min after liver injury

	H12-(ADP)-liposomes/PPP (n=10)	PRP (n=10)	PPP (n=10)	H12-(PBS)-liposomes/PPP (n=6)	H12-(ADP)-liposomes/PPP + fibrinogen (n=5)
Mean blood pressure (mmHg)	59 ± 7	59 ± 4	41 ± 5 **	39 ± 5 †	57 ± 6
Hemoglobin concentrations (g/dL)	5.2 ± 0.7	5.1 ± 0.8	3.1 ± 0.3 *	3.8 ± 0.6	5.8 ± 0.7
Platelet counts (× 10 ⁴ /μL)	5.5 ± 0.4	7.0 ± 0.6 *	5.4 ± 0.3	4.8 ± 0.6	5.0 ± 0.4
Fibrinogen concentration (mg/dL)	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected	102 ± 20
AT III activity (%)	39 ± 3	41 ± 5	24 ± 4 *	24 ± 4 *	46 ± 10
PT (sec)	13 ± 2	14 ± 1	Not detected	Not detected	14 ± 1
Clotting time (CT) (sec)	270 ± 20	306 ± 29	448 ± 46 *	461 ± 80 *	253 ± 53
Clotting rate (CR)	2.9 ± 0.6	2.5 ± 0.5	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.1	5.0 ± 1.5 *

Hematological parameters and coagulation factors were measured in rabbits 20 min after liver injury (followed by administration of H12-(ADP)-liposomes/PPP, PRP, PPP, H12-(PBS)-liposomes/PPP or H12-(ADP)-liposomes/PPP + fibrinogen). Data are mean ± SE, ** p<0.01, *p<0.05 vs H12-(ADP)-liposomes/PPP, PRP or H12-(ADP)-liposomes/PPP + fibrinogen. † p<0.05 vs H12-(ADP)-liposomes/PPP+fibrinogen

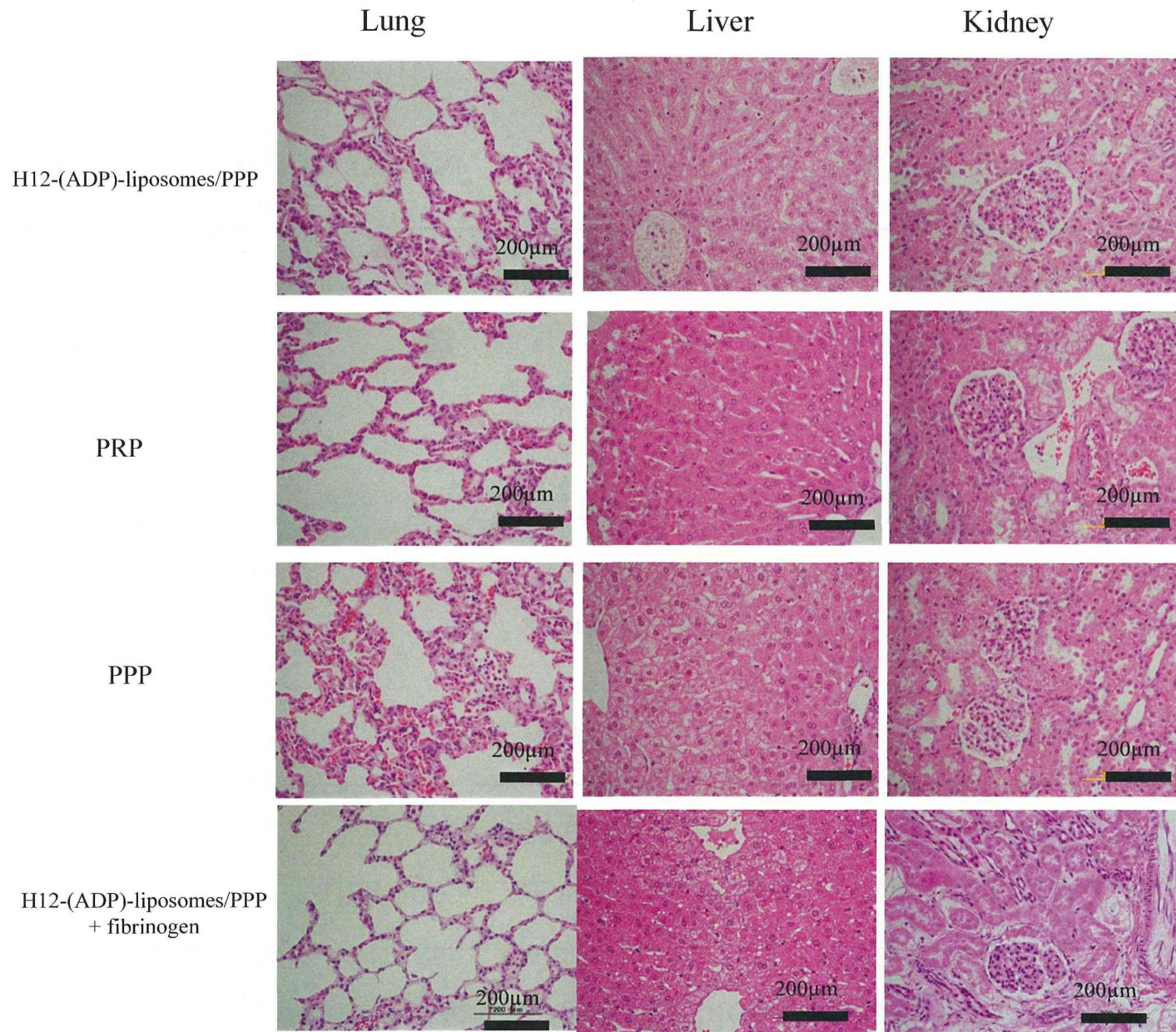


Fig. 12. Pathological findings of the lung, liver and kidney in the thrombocytopenic rabbits

Table 3. Comparison of hematological parameters and coagulation activity between 200 mL/kg and 100 mL/kg blood exchanges in rabbits

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

Data are shown as an average.

Table 4. Bleeding volume, hematological parameters, and coagulation activity after penetrating liver injury

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

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



Fig. 13. hemostasis at the liver bleeding site after H12(ADP)liposome treatment

Table 5. RBC transfusion after PRP/H12(ADP)liposome treatment

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

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

分担課題：H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

主任研究者 丸山 徹 熊本大学大学院薬学教育部 薬剤学研究室 教授

研究要旨

H12 (ADP) リポソームは膜表面をデカペプチド ($^{400}\text{HHLGGAKQAGDV}^{411}$: H12) で修飾した直径約 250 nm の均一な粒径リン脂質二分子膜より構成される小胞体構造を有する人工血小板代替物であり、実用化が期待されている。平成 21-23 年度では健常マウス、ラット、ウサギ及び抗ガン剤（ブスルファン）誘発血小板減少モデルラットにおける H12 (ADP) リポソームの体内動態特性を明らかにしてきた。しかしながら、近年、脂質膜表面を PEG 修飾した製剤において、2 回目に投与した同一 OEG 製剤のクリアランスが 1 回目投与時と比べて著しく増大する Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC 現象) が報告されている。人工血小板である H12 (ADP) リポソームも PEG 製剤であるため、頻回投与時に ABC 現象の誘導が懸念される。また、H12 (ADP) リポソームは大量出血時に伴う希釈性血小板減少症時においても投与が想定される。そこで、H12 (ADP) リポソームのさらなる体内動態特性に関する基盤情報の構築を目的に、平成 24-26 年度は、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健常ラット及び抗ガン剤（ブスルファン）誘発血小板減少モデルラットにおいて検討した。加えて、希釈性血小板減少症モデルラットにおける H12 (ADP) リポソーム単回及び頻回投与時の体内動態解析を行った。

A. 研究目的

H12 (ADP) リポソームは血小板輸血にとって替わる血小板代替物として期待され、実用化に向けて様々な分野での前臨床試験が進められている。様々な前臨床試験において、動態学的な観点から H12 (ADP) リポソームの安全性及び有効性を評価することは、臨床試験に向けた投与設計などに有用な基礎情報になる。加えて、現在上市されているリポソーム製剤の抗真菌薬 AmBisome (amphotericin B 内封リポソーム製剤) では、健常時と病態時で体内動態が異なることが見出されているため、H12 (ADP) リポソームについても適用疾患時における体内動態を把握することは、臨床開発上、非常に意義深い。

また、近年、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾製剤を、ある一定期間内に頻回投与した場合、初回投与後に脾臓より産生される、抗リポソーム IgM により 2 回目投与時の半減期が著しく低下する Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC 現象) が報告されている。H12 (ADP) リポソームは血小板減少状態における予防的投与と、出血時の血小板代替補充療法が想定されているため、臨床使用された場合、頻回投与が予想される。医薬品の体内動態が変動すると薬理作用の変動や予期せぬ副作用の原因になり得る可能性は否定できないため、PEG 製剤の頻回投与時における体内動態の詳細な把握は、臨床試験の投与スケジュールを考慮する上での

基盤情報となるのは基より、臨床使用に向けた有用な基礎的情報になることが期待される。

そこで平成24-26年度では、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健常ラット及び抗ガン剤 (ブスルファン) 誘発血小板減少症モデルラットにおいて検討した。加えて、大量出血時に伴う血小板減少症モデルである希釈性血小板減少症モデルラットを作製し、H12 (ADP) リポソーム単回及び頻回投与時の体内動態解析を行った。

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. ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットの作製

SD ラットに PEG (分子量 400) に溶解したブスルファンを 10 mg/kg の投与量で投与 0 日目及び 3 日目に合計 20 mg/kg 腹腔内投与し、10 日間飼育することでブスルファン誘発血小板減少症モデルラットを作製した。

4. 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。

5. 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。

6. 抗 H12 (ADP) リポソーム IgG・IgM の検出

SD 系雄性ラット、ブスルファン誘発及び希釈性血小板減少モデルラットに、エーテル麻酔下において、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. 体内動態実験

7-1. ³H ラベル化法

¹⁴C- H12 (ADP) リポソーム 1 mL と Cholesterol, [1,2-³H(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、³H, ¹⁴C- H12 (ADP) リポソームを作成した。また、投与液は ³H, ¹⁴C 標識体を非標識体で希釈して調製した。

7-2. 健常及びブスルファン誘発血小板減少モデルラットにおける体内動態実験 (頻回投与)

健常ラットまたはブスルファン誘発血小板減少モデルラットに非標識 H12 (ADP) リポソーム (10 mg lipid/kg) を投与した。投与 5 日後に ³H,

^{14}C -H12 (ADP) リポソームを 10 mg lipid/kg の用量で尾静脈内投与した。規定時間毎に尾静脈から採血を行い、遠心分離により血漿を採取した。得られた血液、血漿を、soluene-350 / イソプロピルアルコール (1 : 1) 混合液で可溶化後 (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 (Hionic-Fluor) 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 で可溶化後 (50°C、24 時間)、血液と同様の処理により放射活性を測定した。

7-3. 希釈性血小板減少モデルラットにおける体内動態実験 (単回投与)

希釈性血小板減少症モデルラットに、エーテル麻酔下で、 ^3H , ^{14}C -H12 (ADP) リポソームを 10 mg lipid/kg で尾静脈内投与した。以後の操作は上述 7-2 に準じて行った。

7-4. 希釈性血小板減少モデルラットにおける体内動態実験 (頻回投与)

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 で尾静脈内投与後、5 日目に ^3H , ^{14}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 7-2 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。また、健常及びブスルファン誘発血小板減少モデルラットの単回投与時における体内動態の結果は以下の論文 (平成 21-23 年度の研究成果) より引用した。

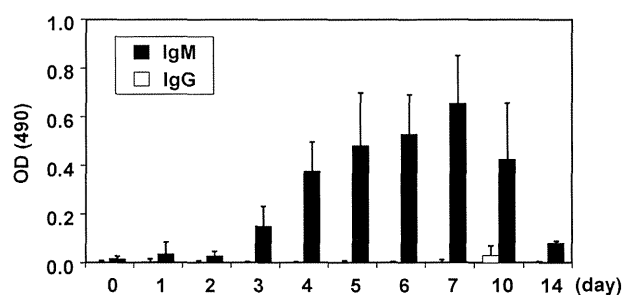
- *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(8):1584-91.
- *J Pharm Sci.* (2013) 102(10):3852-9.

C. 結果

1. 健常ラット及びブスルファン誘発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・IgG の検出

健常ラットまたはブスルファン誘発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 で尾静脈より投与後 1~7、10、14 日目に抗 H12 (ADP) リポソーム IgG 及び IgM 産生の確認を行った。その結果、抗 H12 (ADP) リポソーム IgG の産生は確認されず、抗 H12 (ADP) リポソーム IgM の産生が確認された (Fig. 1A)。一方、ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットは、抗 H12 (ADP) リポソーム IgG 及び IgM の産生はほとんど確認されなかった (Fig. 1B)。

(A)



(B)

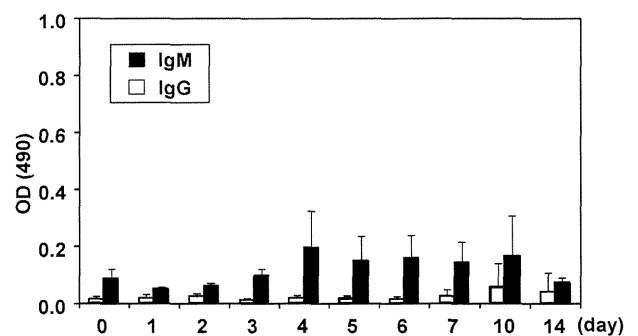


Fig. 1

Determination of IgM and IgG against H12 (ADP) liposomes after a single intravenous injection of H12-(ADP)-liposomes at a dose of 10 mg lipid/kg in (A) healthy rats and (B) busulfan-induced thrombocytopenic model rats. Each bar represents the mean ± SD (n=4).

2. 健常ラットにおける体内動態評価

(頻回投与)

次に、抗H12 (ADP) リポソーム IgMの上昇が確認された初回投与から5日目における体内動態を検討した。その結果、 ^3H , ^{14}C ともに初回投与時と比較して2回目投与時では著しい血中濃度の低下が確認された (Fig. 2)。また、投与後2時間による各臓器分布を比較検討したところ、2回目投与時ではH12 (ADP) リポソームの主要分布臓器である肝臓への高い集積が確認された (Fig. 3)。これらの結果は、これまで報告されているABC現象の特徴を良く反映していた。以上の結果より、H12 (ADP) リポソームは健常時においてABC現象が誘導される可能性があることが明らかとなった。

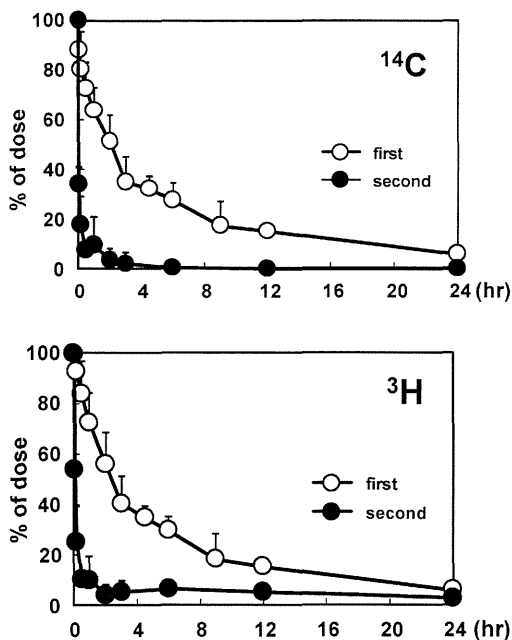


Fig. 2
Plasma concentration curve for ^{14}C and ^3H radiolabeled H12 (ADP) liposomes after the first injection or the second injection of ^3H , ^{14}C radiolabeled H12 (ADP) liposome at a dose of 10 mg lipid/kg to healthy rats. Each point represents the mean \pm S.D. ($n=4$).

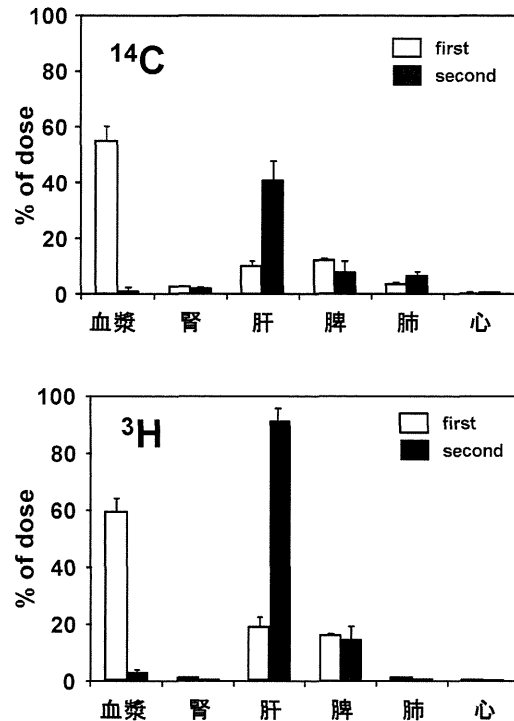


Fig. 3
The tissue distribution of ^{14}C and ^3H radioactivity at 2 hours after the first injection or the second injection of ^3H , ^{14}C radiolabeled H12 (ADP) liposome at a dose of 10 mg lipid/kg to healthy rats. Each point represents the mean \pm S.D. ($n=4$).

3. プスルファン誘発血小板減少モデルラットにおける体内動態評価 (頻回投与)

健常ラットと同様にプスルファン誘発血小板減少症モデルラットにおいて、非標識H12 (ADP) リポソーム初回投与から5日目に ^3H , ^{14}C - H12 (ADP) リポソームを投与し、体内動態を検討した。その結果、抗H12 (ADP) リポソームIgMの上昇がほとんど確認されなかったことを反映し、2回目投与時においても ^3H , ^{14}C ともに初回投与時と同等の血中濃度推移が確認された (Fig. 4)。また、投与2時間後に初回投与時と2回目投与時の肝臓への集積量に大きな変化はなかった (Fig. 5)。以上の結果より、抗ガン剤投与に由来する血小板減少モデルラットにおいてはABC現象が誘導されないことが明らかとなった。

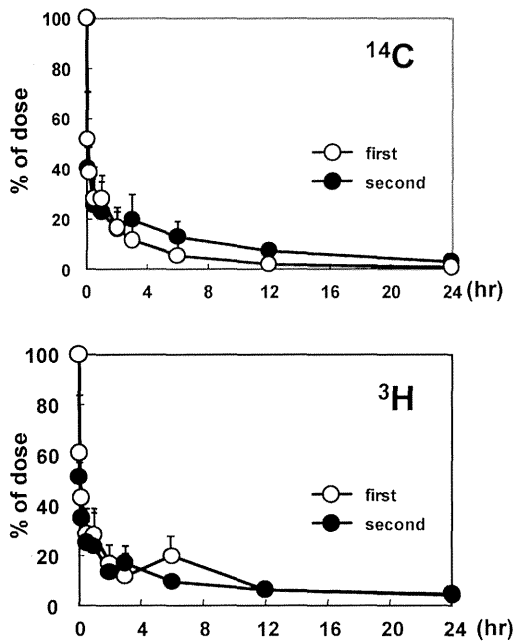


Fig. 4
Plasma concentration curve of ^{14}C and ^3H radiolabeled H12 (ADP) liposome after the first injection or the second injection of ^3H , ^{14}C radiolabeled H12 (ADP) liposome at a dose of 10 mg lipid/kg to busulphan-induced thrombocytopenic model rats. Each point represents the mean \pm S.D. ($n=4$).

4. 希釈性血小板減少症モデルラットの作製

次に、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. 6 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、体内動態実験には、この希釈性血小板減少症モデルラットを用いた。

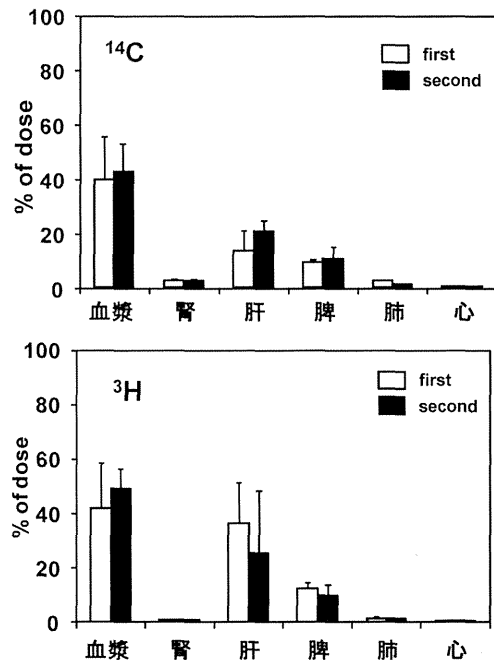


Fig. 5
The tissue distribution of ^{14}C and ^3H radioactivity at 2 hours after the first injection or the second injection of ^3H , ^{14}C radiolabeled H12 (ADP) liposome at a dose of 10 mg lipid/kg to busulphan-induced thrombocytopenic model rats. Each point represents the mean \pm S.D. ($n=4$).

5. 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)

5-1. 血漿中濃度推移

希釈性血小板減少症モデルラットにおける ^3H , ^{14}C -H12 (ADP) リポソームの血漿中濃度推移について検討した。Fig. 7には、その時の血漿中放射活性推移を示す。その結果、 ^3H 及び ^{14}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、 ^3H ラベル体に対し、 ^{14}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。