

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17734

研究課題名(和文) 心臓血管外科術後出血の制御を目的とした血小板代替物投与の臨床応用

研究課題名(英文) clinical application of platelet substitutes for control of post-cardiopulmonary bypass coagulopathy

研究代表者

石田 治 (Ishida, Osamu)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院 外科・講師)

研究者番号：20365266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心臓血管外科術後出血制御を目的とした人工血小板製剤H12-(ADP)-リポソーム投与の臨床応用にむけ、本研究ではH12-(ADP)-リポソーム治験実施のための事前検討を行った。人工心肺を用いた心臓血管外科手術患者を対象に周術期の血液検体を用いて、生体外でH12-ADP-リポソームが凝固障害に与える影響の検討を行った。その結果H12-(ADP)-リポソームは過剰な血小板活性化や過凝固状態などは引き起こさず、一定の安全性を示すことが分かった。H12-(ADP)-リポソームは人工心肺使用心臓血管外科手術患者に安全に使用でき、重大な副作用を引き起こすことなく出血部位の止血に貢献できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では近い将来少子高齢化のため、献血に依存する血液製剤の不足が予想されるが、人工血液製剤は有効な代替物として期待される。人工血小板製剤H12-(ADP)-リポソーム投与は、心臓血管外科手術患者に重大な副作用を引き起こすことなく安全に使用できることが示唆された。本研究は、来る世界初の人工血小板製剤の臨床応用に向けた有益な成果をもたらした。

研究成果の概要(英文)：In order to prepare for the clinical application of H12-(ADP)-liposome administration, this study was conducted as a preliminary study for the clinical trial of H12-(ADP)-liposomes. The effect of H12-(ADP)-liposomes on coagulative function was investigated in vitro using perioperative blood samples from cardiovascular surgery patients with artificial heart-lungs. The results showed that H12-(ADP)-liposomes did not cause excessive platelet activation or hypercoagulable states and showed a certain degree of safety. The study has yielded useful results for the forthcoming clinical application of the world's first artificial platelet substitutes.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：血小板 人工血液 心臓血管外科 凝固障害 止血

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### ■心臓血管外科手術後の大量出血

心臓血管外科手術後に大量出血が生じ、再開胸止血術や輸血製剤の多量な投与を要することがしばしば経験される。この事態は術後合併症発生率や術後死亡率を悪化させ、また医療費負担の増大をもたらしている。背景には高度な手術侵襲、抗凝固剤の使用等に加え、人工心肺使用に伴う人工心肺後凝固障害が要因としてあることが知られている。

人工心肺装置は心臓血管外科手術中の生命維持のため、心臓、肺の機能を代行する装置である。血液が生体にとって異物である人工心肺回路に接触することに起因して、血小板の活性化、補体系の活性化、内因性・外因性凝固因子系の活性化、血管内皮細胞の活性化等が生じる。その結果、血小板機能は脱顆粒や表面抗原の脱落により失われ(血小板機能障害)、これに消費性凝固障害、線溶系の亢進等が複雑に関与する病態が人工心肺後凝固障害である。

#### ■心臓血管外科手術後の大量出血対策の現状

心臓血管外科手術では、人工心肺使用が長時間になるほど、人工心肺後凝固障害のため術後大量出血を生じる可能性が高まる。これまで人工心肺後凝固障害の制御を目的に人工心肺回路の血液接触面のコーティングの工夫や種々の薬剤投与などが試みられてきたが、臨床的に有効性を示すには至っていない。そのため心臓血管外科手術後の大量出血には輸血を行うしか治療法がなく、濃厚赤血球はもとより凝固機能を改善し止血を得るための濃厚血小板や新鮮凍結血漿等の輸血製剤の使用量が必然的に多くなる現状にある。我が国は少子高齢化社会の進展に伴う医療費の増加に歯止めをかける必要があることや、2027年頃には献血による血液製剤供給量が不足する見通しにあることから、輸血製剤使用量の低減は差し迫った社会的な要請である。

#### ■血小板代替物 H12-[アデノシン 2 リン酸 (ADP)]-リポソーム

研究協力者らが開発した H12-(ADP)-リポソームは、リポソーム表面にフィブリノーゲンの活性化部位である  $\gamma$ カルボキシル末端にある HHLGGAKQAGDV 配列の 12 個のペプチド(H12)を組み込むとともに、リポソーム膜内部にアデノシン 2 リン酸(ADP)を含有させている(Okamura Y, et al. J Thromb Haemost. 2009)。これにより活性化血小板に発現するフィブリン受容体である GP IIb/IIIa を介して血小板凝集を起こし、さらに内包された ADP が放出され血小板活性化をもたらすことから血小板血栓化を促進させる機構をもつ。

#### ■H12-(ADP)-リポソームのウサギ人工心肺モデルにおける有用性

平成 30 年度若手研究で御採択頂いた「血小板代替物による人工心肺後凝固障害の制御(18K16407)」において、ウサギ人工心肺モデルを用いて H12-(ADP)-リポソームの人工心肺後凝固障害に対する治療効果を検討した(図 2)。NZW ウサギ(3kg)を用いて人工心肺モデルを作成し、60 分間の人工心肺終了後、Platelet rich plasma 単独投与群(PRP 群、濃厚血小板液投与に相当、n=8)と PRP と H12-(ADP)-リポソームの同時投与群(PRP+H12-(ADP)-リポソーム群、n=8)の 2 群を比較した。出血時間検査においては PRP+H12-(ADP)-リポソーム群が PRP 群を有意に上回る改善を示す結果を得た(PRP+H12-(ADP)-リポソーム群:263±111 vs PRP 群:441±108 sec, p<0.001)。また止血血栓の電子顕微鏡観察で、H12-(ADP)-リポソームが組織損傷部位において血小板凝集を促進し、血栓形成時間を短縮するべく作用したことが示唆された。これらの結果から、H12-(ADP)-リポソームの投与が血小板凝集を促進し止血能を向上させることで人工心肺後凝固障害状態を改善し、実臨床において心臓血管外科術後出血を抑制し輸血必要量を低減させる可能性があることを前臨床段階実験において示した。

### 2. 研究の目的

血小板代替物 H12-(ADP)-リポソーム投与は実臨床における心臓血管外科術後出血の制御に有効であると期待されるが、H12-(ADP)-リポソーム投与の臨床応用の実現に向けた検討を本研究では行う。

### 3. 研究の方法

人工心肺を使用した心臓血管外科手術患者 10 症例を対象に、①人工心肺前②人工心肺後③血小板輸血後、の 3 点で全血検体を採取した。H12-ADP-リポソーム(H12 群)または PBS(コントロール群)を加え反応させて後、血液凝固能、血小板機能、血小板活性化、および血小板-白血球凝集

体(PLA)形成について評価した。

#### 4. 研究成果

H12 群の患者血液は、どの時点においても、血液凝固能(TEG; CK-R, CRT-MA)、血小板機能(TEG; AA-MA)、血小板活性化の程度(FACS; CD62P/CD61)、PLA 形成(FACS; CD45/CD41a) に関してコントロール群と差がなかった。H12-ADP-リポソームは異常凝固、血小板活性化、PLA 形成を引き起こさなかったことから、人工心肺使用心臓血管外科手術患者に安全に使用でき、重大な副作用を引き起こすことなく出血部位の止血に貢献できることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hagisawa K, Kinoshita M, Takeoka S, Ishida O, Ichiki Y, Saitoh D, Hotta M, Takikawa M, Torres Filho IP, Morimoto Y.	4. 巻 15;6(2)
2. 論文標題 H12-(ADP)-liposomes for hemorrhagic shock in thrombocytopenia: Mesenteric artery injury model in rabbits.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Res Pract Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 e12659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rth2.12659.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morimura F, Hamamoto K, Edo H, Ishida O, Tsustsumi K, Tamada S, Kuwamura H, Enjoji Y, Suyama Y, Sugiura H, Watanabe S, Ozaki I, Shinmoto H.	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 Treatment of massive hemoptysis after thoracic aortic aneurysm repair.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CVIR Endovasc.	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s42155-022-00293-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi K, Ishida O, Yamanaka N, Hayashi K, Hashizume K.	4. 巻 33(4)
2. 論文標題 Total aortic arch replacement using the J-graft open stent graft for distal aortic arch aneurysm: report from two centres in Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Interact Cardiovasc Thorac Surg.	6. 最初と最後の頁 614-621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/icvts/ivab114.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Osamu, Hagisawa Kohsuke, Yamanaka Nozomu, Tsutsumi Koji, Suzuki Hidenori, Takikawa Masato, Takeoka Shinji, Kinoshita Manabu	4. 巻 10
2. 論文標題 Therapeutic potential of fibrinogen -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes as a haemostatic adjuvant for post-cardiopulmonary bypass coagulopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68307-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Yukako, Hagsawa Kohsuke, Kinoshita Manabu, Ishibashi Hiroki, Kaneko Kouki, Ishida Osamu, Saitoh Daizoh, Sakai Hiromi, Terui Katsuo	4. 巻 224
2. 論文標題 Efficacy of resuscitative infusion with hemoglobin vesicles in rabbits with massive obstetric hemorrhage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 398.e1 ~ 398.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajog.2020.09.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Osamu, Hagsawa Kohsuke, Yamanaka Nozomu, Nakashima Hiroyuki, Kearney Bradley M., Tsutsumi Koji, Takeoka Shinji, Kinoshita Manabu	4. 巻 in press
2. 論文標題 In vitro study on the effect of fibrinogen $\alpha$ -chain peptide-coated ADP-encapsulated liposomes on post-cardiopulmonary bypass coagulopathy using patient blood	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtha.2023.03.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石田治、萩沢康介、山中望、堤浩二、木下学
2. 発表標題 Therapeutic potential of H12-ADP-liposomes, as a synthetic platelet substitute, for post-cardiopulmonary bypass coagulopathy
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 治、萩沢康介、木下 学、武岡真司
2. 発表標題 人工血小板H12-(ADP)-リポソーム臨床試験の実現にむけて
3. 学会等名 血液代替物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------