

## 4. 衝撃波による致死肺出血マウスに対する新規リポソーム製剤 H12-ADP-liposome の肺保護効果

萩沢 康介<sup>1)</sup>, 木下 学<sup>2)</sup>, 宮脇 博基<sup>3)</sup>, 佐藤 俊一<sup>4)</sup>, 鈴木 英紀<sup>5)</sup>  
武岡 真司<sup>6)</sup>, 斎藤 大蔵<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup>防衛医科大学校生理学講座, <sup>2)</sup>同 免疫微生物学講座, <sup>3)</sup>同 救急部

<sup>4)</sup>防衛医科大学校・防衛医学研究センター情報システム研究部門

<sup>5)</sup>日本医科大学形態解析共同研究施設, <sup>6)</sup>早稲田大学先進理工学部

<sup>7)</sup>防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

### はじめに

Blast Lung Injury (衝撃波肺損傷) は爆発事故などにおいて頻発する。肺は鼓膜に次いで爆発・衝撃波による損傷を被りやすい臓器である。それは衝撃圧が肺胞と毛細血管の境界を通過する際に、肺胞壁の破断を生じ、出血、肺挫傷、気胸などを引き起こすためである。現在に至るまで Blast Lung Injury に対する効果的な治療法は確立されておらず、治療ガイドラインは頸椎保護、気道確保、酸素供給、呼吸管理、出血の制御と循環管理を推奨しているに過ぎない<sup>1)</sup>。

Blast Lung Injury の病態生理は、いくつかの急性肺傷害の病態が複合している。肺胞壁の機械的過進展という点では、人工呼吸による肺損傷 (VILI) に類似している。また低酸素症/低血圧の遷延という点では、虚血再灌流傷害モデルに類似している。これらに共通するのは肺胞への出血と滲出液・炎症細胞の浸潤である。その病態制御に、内因性アデノシンの産生とアデノシン受容体の活性化が重要であることがわかってきた。

われわれは人工血小板として H12-ADP-liposome (平均径 210 nm) を開発してきた。これは血小板が凝集するために不可欠な血小板膜糖タンパクの IIb/IIIa 複合体をターゲットに、これと特異的に結合するフィブリノゲンの活性化部位である  $\gamma$  鎖のカルボキシル末端にある 12 個のペプチド (HHLGGAKQAGDV 配列: H12) をリポソーム膜の表面に組み込むとともに、リポソーム内部に血小板活性化作用があるアデノシン 5'-二リン酸 (ADP) を含有させている<sup>2)</sup>。H12-ADP-liposome は活性化血小板が存在する出血部位に H12 部分を使って集まり、そこで血小板同士の凝集を補強するとともに内封 ADP を放出する。H12-ADP-liposome の投与で、致死的な低血小板性の凝固障害を呈した動物の止血凝固能が回復し救命効果が認められている<sup>3)</sup>。さらに内封 ADP は、P2Y 受容体を介した血小板凝集促進作用だけでなく、アデノシンに代謝され臓器保護

に働くことが期待される。

### 1. レーザー衝撃波による Blast Lung Injury

波長 694 nm の Q スイッチ・ルビー・レーザーをマウス右側背に密着させた天然ゴムとアクリル板で合成された円形標的 (直径 12.0 mm・厚さ 0.5 mm) に単発照射し、プラズマ現象による衝撃波を形成すると<sup>4)</sup>、融合性出血が直下の右肺下葉に生じ、びまん性の点状出血が右肺および左肺門部に生じた。照射対側の左肺門病変は衝撃波が気管分岐部を越えて伝播したと考えられる。病理学的には肺胞壁の伸展と毛細血管の破壊に伴う肺胞出血の所見は、Tsokos らによって報告されたヒトの Blast Lung Injury の病理所見<sup>5)</sup>と合致した。レーザー強度による死亡閾値の検討では、8J 以上で鼻出血 (咯血) ありのものはすべて 1 時間以内に死亡した。

### 2. H12-ADP-liposome 投与による救命効果

レーザー照射直前に、H12-ADP-liposome や ADP-liposome, PBS-liposome, H12-PBS-liposome をおのおの 20 mg 静脈内投与したところ、H12-ADP-liposome 投与で有意に生存率が上がった。さらにレーザー照射直後に H12-ADP-liposome を投与しても救命効果が得られた (図 1)。H12-ADP-liposome 投与群でも右肺には融合性の出血が生じたが、左肺では軽度の散在性出血がみられるに過ぎなかった。Yelverton らが提唱している病理学上の重症度分類である Pathological injury スコア<sup>6)</sup>は H12-ADP-liposome 投与群 (35.2±2.3) が H12-PBS-liposome 投与群 (40.0±2.0) と比べて有意に軽減しており、Yelverton らが 36 点以上を重症肺傷害と定義していることとも合致している。さらに、肺胞における好中球集積も、H12-ADP-liposome 投与群で有意に軽減していた。

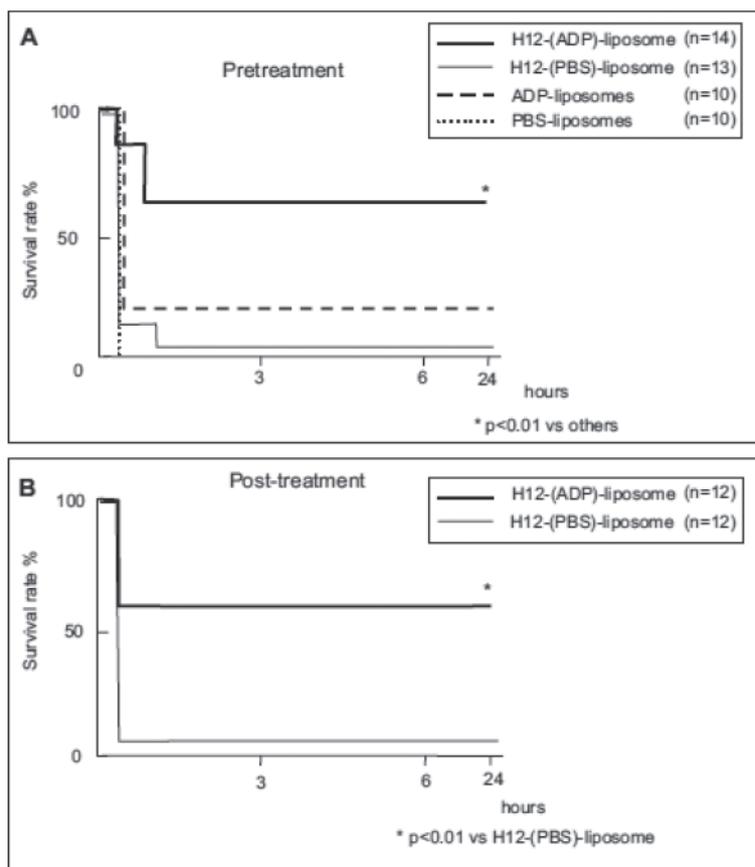


図1 マウスの生存率  
(文献<sup>11</sup>より引用)

### 3. H12-ADP-liposome 投与による臓器保護のメカニズム解明

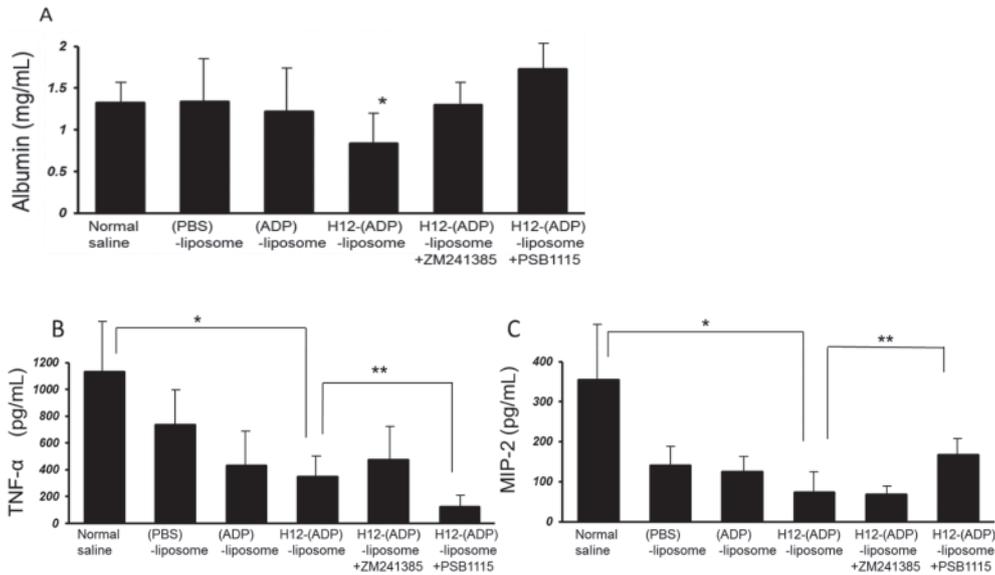
H12-ADP-liposome は出血部位に集まる性質があるので、出血局所で ADP がどのように働くかについて ADP の代謝産物であるアデノシンに着目した。その受容体拮抗薬であるアデノシン A2A 受容体拮抗薬 (ZM241385)、もしくはアデノシン A2B 受容体拮抗薬 (PSB 1115) を衝撃波受傷の 1 時間前に投与し、その後、H12-ADP-liposome や ADP-liposome、PBS-liposome、生理食塩水をおのおの尾静脈から投与しレーザー衝撃波 8J を右肺に照射した。3 時間後にマウスから気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取したところ、BALF 中へのアルブミン漏出は H12-ADP-liposome 投与群においてのみ有意に減少していた (図 2A)。さらに H12-ADP-liposome 投与は、BALF 中の TNF- $\alpha$  および MIP-2 の上昇を有意に抑制していたが、アデノシン A2A 受容体拮抗薬は、H12-ADP-liposome 投与による BALF 中の TNF- $\alpha$  抑制効果を阻害した。また、アデノシン A2B 受容体拮抗薬は H12-ADP-liposome 投与による BALF 中の MIP-2 の減少効果を阻害した (図 2B, C)。すなわち、H12-ADP-liposome は本来の止血作用とともに、局所で放出される ADP が病変部で代謝されアデノシ

ンとなり組織保護効果を発揮したと考えられた。一般的に、生理学的濃度でアデノシンは A1, A2A および A3 受容体を活性化する。対照的に、アデノシン A2B 受容体は高濃度アデノシンで作用すると考えられている<sup>7)</sup>。とくに低酸素病態を伴う場合にアデノシン A2B 受容体作用が活性化することが報告されている<sup>8)</sup>。

#### おわりに

Blast Lung Injury の病態に近似した致死性のマウス肺出血モデルをレーザー衝撃波で作製したが、H12-ADP-liposome の投与で Blast Lung Injury の低減・救命効果が得られた。アデノシン受容体拮抗薬を使った薬理的検討では、Blast Lung Injury による好中球誘導性ケモカインである MIP-2 放出亢進と好中球の遊走浸潤を H12-ADP-liposome 投与が A2B 受容体を介して抑制し、急性期の予後改善につながっていたことが示唆された。

この Blast Lung Injury モデルと成因や病理像が類似している以下の病態についていくつかの報告がある。すなわち、VILI に関しては Eckle らが肺胞・毛細血管バリアの欠損が肺の A2B 受容体を介して減じられると報告した<sup>9)</sup>。さらに、彼らは A2B 受容体を介して VILI による毛細血管から肺胞への vascular leak の軽減が得



\* p<0.05 vs. Normal Saline, \*\* p<0.05 vs. H12-(ADP)-liposomes + PSB 1115

図 2 気管支肺胞洗浄液の解析結果  
(文献<sup>11)</sup>より改変し引用)

られること、A2B 受容体作動薬がある種の「肺利尿」効果を示し、肺胞クリアランスが改善して臓器保護につながる」と述べている<sup>9)</sup>。低酸素換気モデルで生じる肺胞への好中球の遊走浸潤が A2B 受容体を介して抑制されることも報告している<sup>8)</sup>。Haskó らは、A2A 受容体を介するアデノシンの外傷/出血性ショック軽減効果を報告している<sup>10)</sup>。このほか、A2A 受容体を介したアデノシンの抗炎症効果の報告は多数認められる。しかしながら、衝撃波により誘起された臓器傷害病態におけるアデノシン A2A 受容体の役割は不明な点が多い。血漿中のアデノシンの半減期が非常に短い(1~2 秒)ことが、外因性に投与したアデノシンの実験結果の解釈を難しくしており今後さらなる検討が必要と考える。

#### 謝 辞

本研究は JSPS 科研費 25462843 の助成を受けたものです。

#### 文 献

- Horrocks CL : Blast injuries : biophysics, pathophysiology and management principles. J R Army Med Corps 147 : 28-40, 2001
- Okamura Y, Takeoka S, Eto K, et al. : Development of fibrinogen gamma-chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. J Thromb Haemost 7 : 470-477, 2009
- Nishikawa K, Hagsisawa K, Kinoshita M, et al. : Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. J Thromb Haemost

10 : 2137-2148, 2012

- Satoh Y, Sato S, Saitoh D, et al. : Pulmonary blast injury in mice : a novel model for studying blast injury in the laboratory using laser-induced stress waves. Lasers Surg Med 42 : 313-318, 2010
- Tsokos M, Paulsen F, Petri S, et al. : Histologic, immunohistochemical, and ultrastructural findings in human blast lung injury. Am J Respir Crit Care Med 168 : 549-555, 2003
- Yelverton JT : Pathology scoring system for blast injuries. J Trauma 40 (3 Suppl) : S111-115, 1996
- Fredholm BB : Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Cell Death Differ 14 : 1315-1323, 2007
- Eckle T, Faigle M, Grenz A, et al. : A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. Blood 111 : 2024-2035, 2008
- Eckle T, Grenz A, Laucher S, et al. : A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. J Clin Invest 118 : 3301-3315, 2008
- Haskó G, Xu DZ, Lu Q, et al. : Adenosine A2A receptor activation reduces lung injury in trauma/hemorrhagic shock. Crit Care Med 34 : 1119-1125, 2006
- Hagsisawa K, Kinoshita M, Miyawaki H, et al. : Fibrinogen  $\gamma$ -Chain Peptide-Coated Adenosine 5' Diphosphate-Encapsulated Liposomes Rescue Mice from Lethal Blast Lung Injury via Adenosine Signaling. Crit Care Med 44 : e827-837, 2016