

199800444A

厚生科学研究
(高度先端医療研究事業・人工血液開発研究分野)

平成10年度
総括・分担研究報告書

人工血小板の開発に関する研究

主任研究者 池田康夫
慶應義塾大学医学部内科 教授

厚生科学研究
(高度先端医療研究事業・人工血液開発研究分野)

人工血小板の開発に関する研究

(課題研究番号：H10-血液-006)

平成10年度
総括・分担研究報告書

平成11年3月

..... 研究組織

(主任研究者)

池田康夫 慶應義塾大学医学部内科学 教授

(分担研究者)

| | |
|------|--|
| 村田満 | 慶應義塾大学医学部内科学 講師 |
| 武岡真司 | 早稲田大学理工学部医工学 助教授 |
| 半田誠 | 慶應義塾大学医学部輸血センター 講師 |
| 末松誠 | 慶應義塾大学医学部医化学 助教授 |
| 山口隆美 | 名古屋工業大学大学院工学研究科生産システム工学専攻 シュミレーション工学講座 教授 |
| 谷下一夫 | 慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科 教授 |
| 高橋恒夫 | 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング部門 教授 |
| 池淵研二 | 北海道赤十字血液センター 副所長 |

目 次

平成10年度

人工血小板の開発に関する研究

総括研究報告書

池田 康夫

Blood Substitutes - Present and Future Perspective

E. Tsushica (Editor) 1998 Elsevier Science S.A.

Chapter 28

“Development and Clinical Implications of Platelet Substitutes”

公開シンポジウムポスター

分担研究報告書

1. GPIIb α -liposome, $\alpha_2\beta_1$ -liposome の作成と
その性状の解析 村田 満
2. 止血能を有する蛋白重合体の開発 武岡 真司
3. フローシステムでの血小板粘着測定法の確立と
その応用に関する研究 半田 誠
4. 人工血小板の微小循環動力学的特性の生体内解析 末松 誠
5. 人工血小板の最適設計に関する計算流体力学的研究 山口 隆美
6. 細胞近傍の微小流動及び微粒子運動の計測と解析 谷下 一夫
7. 血小板の凍結乾燥 高橋 恒夫
8. 細胞培養系を用いた血小板代替物に関する研究 池淵 研二

総括研究報告書

人工血小板の開発に関する研究

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨

悪性腫瘍や造血器疾患に対する根治療法として強力な化学療法や骨髄移植が普及した結果、それらの支持療法として、輸血療法が量、頻度ともに増加し、その重要性が一層認識されるようになってきている。なかでも血小板輸血は欠くことのできない最も重要な位置を占めており、その需要は年々増加の一途をたどっている。しかし、血小板輸血には、緊急時の供給体制、ウイルス感染症をはじめとする輸血副作用の発現など緊急に解決すべき問題がある。人工血小板・血小板代替物は、これらを解決する最善の方法であることは、多くの人々が等しく認める所であるが、国内外において未だ研究の方向性が確立されているとは言い難かった。本研究の目的は、血栓止血学、流体力学の立場から基礎研究を重ね、理想的な人工血小板・血小板代替物を創製するための明瞭な道筋を示すとともに、人工血小板のプロトタイプが実際に止血に貢献することを *in vitro* ならびに *in vivo* で立証することにある。過去2年間の研究期間で血管損傷部位に特異的に集積し、ヒト血小板とも凝集する2種類の粒子の作成が試みられた。遺伝子組み換え血小板膜糖蛋白 GPIb α または遺伝子組み換え血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa を大規模培養系において大量に精製し、それぞれを固相化したリポソームが、ヒト血小板と同様に凝集や粘着機能を明らかに担っており、プロトタイプ的人工血小板として *in vivo* の予備実験においても止血能を示すことから人工血小板開発の今後の方向性が明らかとなった。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

村田満 慶應義塾大学医学部内科学講師
武岡真司 早稲田大学理工学部医工学助教授
半田誠 慶應義塾大学医学部輸血センター講師
末松誠 慶應義塾大学医学部医化学助教授
山口隆美 名古屋工業大学大学院工学研究科生産システム工学専攻シュミレーション工学講座教授
谷下一夫 慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科教授
高橋恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセス部門教授
池淵研二 北海道赤十字血液センター副所長

血小板輸血は、癌・造血器腫瘍などの治療や、外科手術における欠くことの出来ない補助療法として非常に重要な位置を占めており、その使用量が最近では毎年約10%も増加していることや、21世紀に於ける医療の新しい展開を考えると、その重要性が一層増すことが予想される。しかし、血小板輸血には解決すべき2つの大きな課題がある。一つはその需要の増加と血小板の短い保存期間（72時間）の為に起こる供給不足・緊急時供給体制の不備であり、もう一つは他の血液製剤と同様、血小板製剤による輸血後のウイルス感染症をはじめとする輸血副作用発現の危険性である。

緊急時にも使用可能で、かつウイルス感染症などの副作用発現の危険性を回避し得る人工血小板・血小板代替物の開発・臨床応用は21世紀の医療の当然目指すべき方向である。本研究の最終目的は臨床使用可能な人工血小板・血

A. 研究目的

血小板代替物を創製することであり、血小板減少時の出血の治療・予防に対して血小板輸血に代わり得る有効な血小板代替物を作るための道筋を示すことである。

B. 研究方法

本研究班は一つの大きな特徴を有している。それは人工血小板・血小板代替物創製のために2つの基礎研究理論、即ち血栓止血学と流体力学を背景に、理論的デザインと実験による立証が互いにバランスよく計画されていることである。

血栓止血領域における申請者らのこれまでの研究の結果、止血における最も重要な反応は、出血が起こっている血管障害部位で露出している血管内皮下組織に血小板が粘着することである。ここでは二つの機構が働いている。一つはフォン・ビルブランド因子(vWF)を標的にした血小板の粘着であり、この反応には、血小板膜糖蛋白 GPIb/IX 複合体が関与している。他はコラーゲンを標的にした血小板の粘着であり、これには血小板膜糖蛋白 GPIaIIa 複合体が関与している。そこで平成10年度は GPIb α と GPIaIIa 複合体を遺伝子組み換え体として精製し、リポソームに固相化し、その機能評価を行った。また、人工血小板に用いる血小板機能蛋白を担う最適な担体の追求は、有効かつ安全な人工血小板を創製する為には常に考慮しておかなければならない重要なことであり、その意味からリポソームのみならず、アルブミン重合体の担体としての可能性を検討するために、多糖架橋アルブミン高分子量体をデザインし、これに機能蛋白を固相化することを試みた。

一方、作成された人工血小板が流れのある血管内で十分な止血効果を発揮するには、流動状態で人工血小板粒子が効果的に出血部位に集積しなければならない。流体力学理論に基づく人工血小板の最適設計に関して、実験的、理論的研究を行った。ラット腸間膜微小循環系を用いた生体観察系において超高速超感度ビデオ撮像システムを使い、血管内における血小板

動態を観察した。種々の血流・血管表面の状態における血小板の動きに関する理論的研究としては、スーパーコンピュータを用いた計算流体力学的手法により、微小粒子と血液の流れの相互作用の解析を行った。

C. 研究結果

(1) 組み換え蛋白導入人工血小板の機能評価

血管内皮下組織中に存在するコラーゲン、フォン・ビルブランド因子(vWF)を標的として、それぞれに粘着し得る2種類のリポソームを作成し、その *in vitro* ならびに *in vivo* の評価を行った。GPIaIIa 導入リポソームについて流動状態でコラーゲンへの粘着を2つの異なった方法で検討した。即ち、一つは蛍光顕微鏡と連動した連続画像解析装置を用いた観察であり、これによりリポソームはコラーゲン表面と接触すると直ちに粘着することが、画像でとらえられた。また、quartz crystal microbalance (QCM)法による検討では、粘着が振動数変化(ΔF)として捕らえられた。これらの観察は抗 GPIa 抗体(Gi9)で抑制され反応の特異性が確認された。一方、vWFを標的としたリポソームに関しては平成9年度の研究でvWF結合部位を含む遺伝子組み換え GPIb α を組み込んだリポソーム(GPIb α -liposome)がリポソーム同志の凝集を惹起するばかりでなく、ヒト血小板ともvWFを介して凝集し得ることを示したが、平成10年度の研究ではさらに (i) *in vitro* の静止系の粘着実験において、vWFを固相化した microtiter well 表面への³H-GPIb α リポソームの粘着が添加リポソーム濃度に依存して増加すること、流動状態で粘着実験ではvWF固相化表面にrGPIb α リポソームを灌流するとQCM法で ΔF の増加を伴わない一過性の粘着が観察され、その粘着量は固相化vWF濃度に強く依存することが明らかとなり、(ii) *in vivo* 実験においては血管傷害や血栓形成部位への集積性を放射ラベルしたrGPIb α リポソームを用いて検討すると、ラット頸動脈シャ

ントモデルにおいて rGPIb α リボソームはコントロールに比較して有意に血栓への集積性が高いことが示された。また標識 rGPIb α リボソームは動物血管壁ブロックに特異的に粘着することが確認された(池田、村田)。一方、流動状態下でのコラゲンならびに vWF へのヒト血小板粘着機序についての基礎研究が続けられ、QCM ならびに蛍光顕微鏡と連動した連続画像解析装置を用いた詳細な検討の結果、少なくとも GPIb/IX 複合体と GPIaIIa 複合体が存在すれば血小板は粘着機能を十分に発揮できるが、その際、細胞伸展と関連した細胞内刺激伝達系も重要な役割を果たしていることが示された(半田)。一方、リボソームの生体内半減期の短さを考慮し、リボソームの修飾や別の担体の選定の研究も同時に開始された。アルブミンを多糖支持体に結合させ多糖架橋アルブミン高分子量体を作成し、これにポリエチレングリコールを介して rGPIb α を結合させたところ、この粒子は vWF と複合体を形成し凝集することが示された。この粒子は粒径の調節が可能であり今後ポリエチレングリコールや rGPIb α の結合数を制御する方法の確立が必要である(武岡)。

(2) 流体力学理論に基づく人工血小板の最適設計

平成9年度に確立した血小板の体内動態解析系を用い、ラットの腸間膜微小循環系での血管内における血小板密度、対赤血球速度を解析した。ずり速度の高い細動脈側の内皮細胞近傍では、中心部に比べ、血小板密度が高く、細動脈での管壁近傍での血小板密度は局所のずり速度と正の相関を示すことが明らかとなった。この密度分布は抗 vWF 抗体の投与により大きく変化し、細動脈の血管近傍での血小板の密度は大きく低下した。即ち vWF-GPIb 相互反応は、血小板の血管内分布、特に血管壁近傍への血小板分布に重要であり、人工血小板設計に重大なヒントを与えた(末松)。スーパーコンピュータを用いた計算流体力学手法による微小

粒子と血漿の流れの相互作用について、平成10年度は血小板および人工血小板の血管損傷部位の集積を想定して検討した。その結果、生成される血栓の絶対的なサイズより、アスペクト比が血流と血栓相互作用において重要であることが示された(山口)。さらに血管表面近傍の微粒子の運動の計測方法の開発を行った。実際の内皮細胞の形態を測定して拡大モデルをつくり、トレーサ懸濁法で流れ場を可視化した。その結果流れに適応していない内皮細胞では細胞の頂点で剪断応力が最大になり、高い剪断応力の部分が広い範囲に及んでいるが、流れに適応している内皮細胞では剪断応力の大きさが軽減されていることが示された(谷下)。

(3) ヒト血小板の凍結乾燥へむけてその最適条件の設定と巨核球系細胞の ex vivo 増殖へのアプローチ

ヒト血小板は、他の血球と比較し凍結感受性が高く、冷却速度は1°C/分以下が機能の維持に必要である。凍結過程で GPIb の低下と P セレクチンの発現増加が観察され、細胞構造での大規模な損傷が推察された。また、細胞浮遊液単独では凍結過程において氷晶形成後、共晶による塩析がみられるが、DMSO を濃度をあげていくことによりこの塩析は抑制された。すなわち DMSO 添加は細胞内塩析抑制効果を示した(高橋)。また、ヒト造血系細胞を培養し、止血機能を有する血小板様粒子が作成出来るかについて基礎検討を行った。巨核球系細胞株(CMK)の分化誘導により、GPIb α 発現増加がみられ、血小板様粒子の産生もみられることを以前に報告したが、平成10年度は臍帯血 CD34+CD38- 細胞を用い、TPO, flt3 リガンド存在下にストロマ細胞単層培養上で培養すると CD34+ CD38- という未熟な形質を留めた細胞が4週間で約1000倍に増加した。同様に CFU-C も著明に増幅された。巨核球系への分化誘導については今後の検討を要する(池淵)。

D. 考察 ならびに E. 結論

平成9年度の研究により GPIb α - liposome が作成され、その性状解析が一部なされたが、平成10年度は、血小板粘着に必要なもう一つの接着分子受容体 GPIaIIa (インテグリン $\alpha 2 \beta 1$) を導入した GPIaIIa- liposome が作成され、これら2種類のリボソームのコラゲンへの粘着機能が詳細に検討され、大きな成果が得られた。即ち、いずれのリボソームもヒト血小板の重要な機能である凝集能や粘着能を有することが示されたことは特筆に値する。これらは、組み換え蛋白を用いているため、血液由来のウイルス感染のリスクがなく、大量供給が可能である。現在、両蛋白とも量産体制が確立しており、月に数十～数百 mg の組み換え蛋白が供給されている。すなわち、人工血小板のプロトタイプが2つ作成され、それらの評価を行うに十分な体制が確立されたといえる。

GPIb α - liposome については *in vitro* において粘着 (静止系、流動下)、凝集、正常血小板との結合、正常血小板凝集の増強作用、*in vivo* においてラット頸動脈シャントモデルでの血栓への集積性、動物血管壁ブロックへの特異的結合が現時点までに確認された。一方 GPIaIIa- liposome についても *in vitro* での流動状態下における粘着が詳細に検討された結果、その挙動が GPIb α - liposome と異なることが明らかとなった。即ち GPIaIIa- liposome はコラゲンへの強固な粘着をひき起こすのに対し、GPIb α - liposome は一過性の粘着を誘発し、リボソームがコラゲン上を rolling することがビデオカメラによる解析で明らかに示された。血管損傷部位において、vWF とコラゲンが内皮下組織において血小板粘着の標的になっていることを考えると我々の作成したリボソームは *in vivo* においても血管損傷部位に集積し、止血機能を示すことが十分に予想される。本研究班で行われたヒト血小板の流動状態下でのコラゲンへの粘着機構解析の基礎研究結果からみて、リボソームに GPIb α と GPIaIIa を同時に固相化することにより、より有効な粘着を惹起する可

能性は大きく、2つの膜糖蛋白を種々の比率で固相化したリボソームの作成に着手している。また GPIb α 変異体 (M239V) は wild type GPIb α と比べ、vWF への結合親和性が強く、その固相化リボソームの作成も同時に進行している。遺伝子組み換え血小板膜糖蛋白を固相化したリボソーム作成の研究は、世界でも類を見ないものであり、人工血小板・血小板代替物創製への明瞭な道を拓くものとして、注目されている。

一方、人工血小板・血小板代替物の臨床応用を考えた時、止血に必要な機能蛋白を担う担体として現在のままのリボソームが最適であるか否かについては、なお議論のあるところであり、リボソームの PEG 化の試みによって血中半減期、生体内分布がどのように変化するか検討されている。また、リボソームの他、生体適合性、安全性も考慮し、多糖架橋アルブミン高分子量体への GPIb α 、GPIaIIa の導入とその性状の解析が計画されている。さらに流体力学における実験的、理論的考察からどのような形状の担体が血管損傷部位に集積しやすいかについて検討することも重要である。平成10年度の検討で得られた事実 (正常血小板の動脈内分布が vWF-GPIb に依存していること) は、人工血小板にも最低 GPIb α が必要であることを明解に示しているが、一般にリボソームに導入した分子が、そのリボソームの体内動態にいかなる影響を与えるかを実験的に検討してゆくことも必要であろう。

人工血小板の開発は、海外においては見るべき進歩がみられておらず、米国では主として保存期限切れの血小板を凍結・融解を繰り返した後、高速遠心によって回収した膜小片を加熱・乾燥したものが、Infusible Platelet Membranes (IPM) として作られ、動物実験を経て臨床試験へと進んだが、その評価は低く、最近その開発は中止された。前述のごとく本研究班において、組み換え蛋白を固相化したリボソームが人工血小板の有力な候補として作成された。血栓止血学と工学理論の基礎研究を基盤

に、生体内で良好な止血機能を発揮する人工血小板・血小板代替物の実用化に向け、着実な前進が見られている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kitaguchi T., Murata M., Ambo H., and Ikeda Y. : Characterization of cDNA encoding full-length mouse platelet glycoprotein IX. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 9 (4) : 381-385, 1998.

Matsumoto Y., Kawai Y., Watanabe K., Sakai K., Murata M., Handa M., Nakamura S., and Ikeda Y. : Fluid shear stress attenuates tumor necrosis factor- α -induced tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Blood* 91 (11) : 4164-4172, 1998.

Goto S., Ikeda Y., Saldivar E., and Ruggeri ZM : Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* 101 (2) : 479-486, 1998.

Murata M., Kawano K., Matsubara Y., Ishikawa K., Watanabe K., and Ikeda Y. : Genetic polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 24 (3) : 245-250, 1998.

Ishida A., Handa M., Wakui M., Okamoto S., Kamakura M., and Ikeda Y. : Clinical factors influencing posttransfusion platelet increment in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation - a prospective analysis. *Transfusion* 38: 839-847, 1998.

Ambo H., Kamata T., Handa M., Kawai Y., Oda A., Murata M., Takada Y., and Ikeda Y. : Novel point mutations in the α IIb subunit (Phe289 \rightarrow Ser, Glu324 \rightarrow Lys and Gln747 \rightarrow Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients. *British Journal of Haematology* 102: 829-840, 1998.

Ambo H., Kamata T., Handa M., Taki M., Kuwajima M., Kawai Y., Oda A., Murata M., Takada Y., Watanabe K., and Ikeda Y. : Three novel integrin β 3 subunit missense mutations (H280P, C560F, and G579S) in

thrombasthenia, including one (H280P) prevalent in Japanese patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251 (3) : 763-768, 1998.

Ozaki K., Oda A., Wakao H., Rhodes J., Druker R B, Ishida A, Wakui M, Okamoto S, Morita K, Handa M, Komatsu N, Ohashi H, Miyajima A, Ikeda Y: Thrombopoietin induces association of Crkl with STAT5 but not STAT3 in human platelets. *Blood* 92 (12) : 4652-4662, 1998

Oda A, Ochs HD, Druker BJ, Ozaki K, Watanabe C, Handa M, Miyakawa Y, Ikeda Y: Collagen Induces tyrosine phosphorylation of Wiskott-Aldrich syndrome protein in human platelets. *Blood* 92: 1199-1207, 1998

Ikeda Y & Murata M: Development and clinical implication of platelet substitutes, : *Blood Substitutes - Present and future perspectives*, Chapter 28 : Eishun Tsuchida, Editor, Elsevier Sciences S.A., 373-381, 1998

村田 満, 池田康夫 :
血小板代替物の意義と開発の現状
人工血液 6 (1) : 1-5, 1998.

山口隆美, 小林拓史, 山本康人 :
血流と血管壁の力学的相互作用の計算バイオメカニクス
計算工学 3 (1) : 8-15, 1998

Fukushima S, Deguchi T, Nishida M, Kaibara M, Oka K, Tanishita K:
Determination of microscopic wall shear stress distribution on endothelial cell model,
Advanc. in Bioengineering, BED-39, 109 - 110, 1998

高橋恒夫, 酒居一雄, 仲井邦彦, 藤川清三, 田所憲治, 十字猛夫, 村田満, 池田康夫 :
パラホルムアルデヒド固定による血小板保存の検討
低温生物工学会誌 44 (2) : 83-86, 1999

Ikebuchi I, Yamaguchi M, Niwa, K, Abe H, Fujihara M, Skiguchi S :
Platelet-like particle production from cultured human megakaryocytic cell line:
Art Cells blood Subs and Immob Biotech, 26: 549 - 558, 1998

2. 学会発表

池田康夫 「血小板の止血機構および代替物の可能性」 第5回日本血液代替物学会年次大会
1998年9月

村田満 「人工血小板の開発と課題」 第5回
日本血液代替物学会年次大会 1998年9月

西谷孝子、村田満、池田康夫 「人工血小板開発の現状」 第25回日本低温医学会総会 1998
年7月

T. Nishiya, M Murata, M Handa, Y Ikeda:
Adhesion of liposomes carrying a recombinant
fragment of platelet glycoprotein Ib α or anti-
collagen antibody to collagen surface under flow
conditions. - Approach to platelet substitutes.
40th Annual Meeting of the American Society of
Hematology. December 1998 Miami; Blood 92
(Suppl) abstract, 1998

山縣伯彦、半田誠 他 : 流動状態下での血小板の
コラーゲンへの粘着 - $\alpha 2\beta 1$ インテグリンの関与 - 第2報 第2回日本血栓止血学会
総会 1998年9月

武岡真司 「Molecular assembling system using
polyprotein (IIPf064)」 第47回高分子討論
会 1998年10月

末松誠 「微小循環における血球接着分子と炎症
反応」 第25回日本医学会総会 1999年4
月(予定)

山口隆美、山本康人 「粥状動脈硬化症病変の
分布と動脈の分岐形状に関する計算流体力学
検討」 第3回日本計算工学会 1998年5月

Yamaguchi T, Kobayashi T, Liu H: Fluid-wall
interactions in the collapse and ablation of
atheromatous plaque in coronary arteries. 3rd
World congress of biomech. Aug 1998

平山文也、池淵研二、関口定義 他 「体外造
血系の可能性-血小板代替物を目指した巨核球
の大量培養の試み」 第5回日本血液代替物学
会 1998年9月

CHAPTER 28

Development and Clinical Implications of Platelet Substitutes

Y. Ikeda and M. Murata

*School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan***Introduction**

Platelet transfusion plays an important role as a supportive therapy in the treatment of cancer or hematologic malignancies and during the surgical procedures. Recently, usage of platelet concentrates increased annually by approximately 10%, and it would further expand with the development of medical treatment in coming 21st century. However, there are two important issues to be solved in platelet transfusion [1–3]. One is the increase of demand and the short-term storage of platelet concentrates. The other is the risk of platelet transfusion such as viral infections. In order to solve these problems, some academic societies as centers of excellence are trying to make guidelines for platelet transfusion to decrease the number of unnecessary transfusion. Different from red cell transfusion, autologous platelet transfusion is rarely indicated. In this sense, the development of artificial platelets or platelet substitutes and the exploration of their clinical applications are reasonable ways in the aim of medical treatment of the coming century. Platelets could be stored for several days at room temperature, over that period they lose their hemostatic functions dramatically. In Japan, storage periods for platelet concentrates have been decided to be 72 h after donation, during the periods quick inspection and supply of the adequate type of preparations are necessary. Generally speaking Japan, which has well-equipped national blood programs with a large number of volunteers who are willing to donate blood, is not facing serious problems in supplying platelet concentrates. However, this is not always true in depopulated areas and in cases of emergency. Therefore, the development of artificial platelets or platelet substitutes which are available in any situations would contribute to the effective blood programs against disasters; furthermore, it brings a large impact to completely remove the risk of infection due to transfusion.

Platelet functions necessary to be replaced

Platelets have diverse functions such as adhesion, aggregation, clot retraction, procoagulant activity, etc. It seems difficult to develop platelet substitutes having

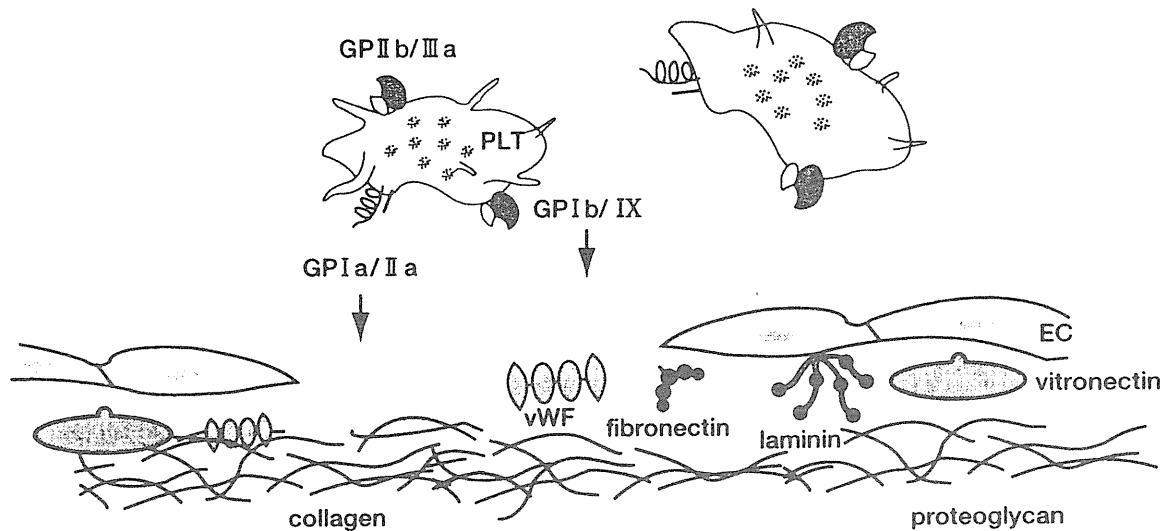


Fig. 1. Major adhesive ligands in subendothelial tissues and their platelet receptors. Glycoprotein (GP) Ia/IIa and GPIb/IX are receptors for collagen and von Willebrand factor (vWF), respectively. GPIIb/IIIa binds to several adhesive proteins including fibrinogen, vWF and fibronectin.

all these functions. The platelet substitutes for the time being is considered to be enough to have the limited functions of adhesion and aggregation appearing at the bleeding site in order to plug up a hole of blood vessels, and to help the functions of remained normal platelets.

The basic and important functions of platelets are adhesion and aggregation for primary hemostasis. This can be easily understood from the observations that congenital platelet membrane defects such as Bernard-Soulier syndrome or Glanzmann's thrombasthenia, which are deficient in platelet adhesion or aggregation show severe bleeding tendency. Therefore, the simplest type of artificial platelets is a particle, of which surface membrane proteins working as receptors are immobilized onto. Points to consider are (1) what kind of particle would be used as a carrier; (2) what kind of proteins would be immobilized in order to exhibit such platelet functions. Requirements of the former point are appropriate size, no sign as a foreign body, and a good carrier to be able to immobilize enough amount of proteins. The latter would be GPIb/IX complex; a receptor of von Willebrand factor (vWF) which is important for adhesion, GPIa/IIa complex; a receptor of collagen, or GPIIb/IIIa complex; a receptor for fibrinogen or vWF, which is necessary for aggregation (Fig. 1).

Current status of development of artificial platelets

Development of artificial platelets or platelets substitutes is still in the premature stage. In 1996, US Army Combat Casualty Care Research Program, Naval Medical Research and Department Command held the first meeting entitled "Frozen Platelets and Platelets Substitutes" cosponsored by FDA, AHA, etc., at Washington DC. In this

meeting, the necessity of platelet substitutes and their evaluation methods were firstly discussed and then present status of up-to-date research works were reviewed. Figure 2 is a list of the materials which have the possibility of being developed as platelet substitutes. Agam et al used normal human red blood cells as a carrier of fibrinogen [4]. The modified red blood cells are incorporated into aggregates when mixed with normal platelets and shorten the bleeding time after being infused into rats with thrombocytopenia. The modified red blood cell has the same structure, osmotic response, hemoglobin concentration and acetylcholine esterase activity as normal red cells.

Coller et al. produced modified red blood cells, so called thromboerythrocyte [5]. The modified erythrocytes have synthetic peptide chains extending from its surface. The peptide has a sequence of Ac-CGGRGDF-NH₂; especially the RGD sequence is the part of amino acid sequence of fibrinogen and relates to its role in binding to GPIIb/IIIa. It was shown that the modified erythrocytes participated in aggregation through specific reaction with platelets having activated GPIIb/IIIa on their surface. The thromboerythrocytes were reported to induce aggregation in the presence of ADP. This was clarified to be specific aggregation via GPIIb/IIIa because aggregation

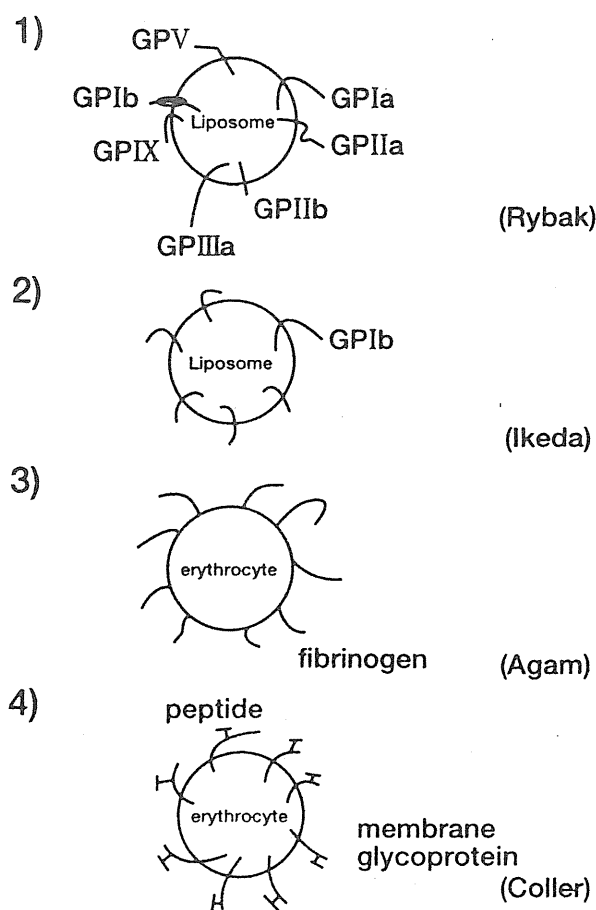


Fig. 2. Substances developed for potential use for platelet substitutes. (1) Plateletsome; (2) rGPIIb α -liposome; (3) Fibrinogen-RBC; (4) Thromboerythrocyte.

was inhibited by anti-GPIIb/IIIa monoclonal antibody, 10E5. Furthermore, because thromboerythrocytes are adhesive against platelets adhered on the collagen surface, it has a possibility to reinforce the platelet plugs at the injured vessels of thrombocytopenic patients. There was no hemolysis during preparation and high resistance against osmotic change. In clinical settings autologous red blood cells from a patient are manipulated outside of the body and then reinfused safely to the patient to control the bleeding tendency.

Recently, Rybak et al. developed liposome-type platelet substitutes, plateletsomes [6]. Liposome, phospholipid vesicle, is used as a carrier to which more than 15 kinds of platelet membrane proteins such as GPIb, GPIIb/IIIa, GPIV etc., were immobilized after dissolving them with deoxycholate from native platelets. Infusion of the plateletsomes into rats with thrombocytopenia induced by irradiation or rats with platelet function abnormality like storage pool deficiency caused significant reduction of blood loss from the cut tail of rats. Because no suppression or enhancement of *in vivo* platelet functions and no severe side effects were recognized, it is noteworthy as one candidate of platelet substitutes.

On the other hand, Cypress in US developed a powder product, Infusible Platelet Membrane (IPM), from human platelets [7,8]. At present, this is named as CyplexTM. The products were prepared from fractions of outdated platelets by freeze-thawing cycles, heat and drying processes. It was reported that they could be stored about 36 months at 4°C. Although there is no report on the detailed description about constitution, main components were reported to be phospholipids and glycoproteins, and their size was about one tenth of normal platelets. In products, the presence of GPIb was confirmed with ELISA, but the other glycoproteins such as GPIIb/IIIa were not detected. This seemed to be due to the loss of antigenic determinants during the preparation procedure. They have procoagulant activity of 170–330 U/mg protein. Activities of the other coagulation factors such V, VIII, IX, and X etc., and HLA antigen were not observed. After the injection (2 mg/kg) of CyplexTM to rabbits with thrombocytopenia induced by busulfan injection, the shortening of bleeding time was recognized. This effect continued for about 6 or 7 h, followed by the return of bleeding time to an initial value. Using several kinds of animals, no significant toxicities were observed by biochemical, histopathological tests. Induction of clot formation was not recognized, and endotoxin-induced DIC was not deteriorated. In experiments examining virus decontamination by heat treatment, the decreases in about 6 log for SV40, HIV, or CMV viruses were confirmed. The Phase I and II data are summarized in Fig. 3. The advantages of CyplexTM are as follows: (1) The low risk of infection because of heat treatment; (2) low antigenicity due to the absence of HLA (class II); (3) long-term storage (36 months); (4) no febrile reaction due to the absence of leucocyte; and (5) possible efficacy in refractory patients against platelet transfusion. The drawback was pointed out that the mechanism of action was unclear. Probably, the adhesion of particles having GPIb antigen to the bleeding site of subendothelial tissues, facilitate the platelet plug formation by remained normal platelets as a result of recruitment of plasma vWF

Cyplex™ Phase I Data

- 6 studies, 74 subjects
- Safety : No dose-limiting toxicity
No side effect
No thrombogenic events
- Immunogenicity : No antibody formation (anti-IPM, anti-PLTs)

Cyplex™ Phase II Pilot Study

- 7 institutions, 31 patients with active bleeding
- Open-labeled, randomized (Cyplex™ : Platelets=5:1)
- ITP, TTP, DIC were excluded
- Single dose Cyplex™ (2, 4, 6 mg/kg) or platelet transfusion
- End-point : Control or bleeding



Positive response for Cyplex™ was seen in
65% (10/14) of patients who were platelet responders
58% (7/12) of patients who were refractory to platelets

Fig. 3. Clinical trials of Cyplex™. Phase II pilot study has been completed by the end of 1997. Phase II will be continued in 1998.

onto the surface of the particles. Or there is a possibility that their activity of clot retraction would be responsible for an effect on hemostasis.

rGPIb α -liposome as a novel platelet substitute

Platelet glycoprotein (GP) Ib/IX complex is a receptor for von Willebrand factor (vWF), which plays a crucial role in primary hemostasis. We have previously expressed in CHO cell a domain of GPIb α (residues 1–302) retaining a vWF-binding site and have purified with affinity column chromatography [9]. Based upon a hypothesis that liposomes capable of participating in the hemostatic process may become possible platelet substitutes, we have attempted to construct liposomes carrying vWF-binding domain of platelet GPIb α . First, GPIb α was conjugated with *N*-glutaryl-phosphatidyl ethanolamine (NGPE) to synthesize GPIb α -lipid for the incorporation of this recombinant fragment (GPIb α) into the surface of liposome [10]. rGPIb α -lipid was introduced onto the surface of the liposome, which was consisted of egg-yolk lechitin/cholesterol/phosphatidylglycerol (10:5:2 by mol.). A final lipid concentration was about 1.4 mg/ml, while GPIb α protein concentration 1 mg/ml. The average diameter of liposome was approximately 330 nm. rGPIb α on the liposome surface was detectable by flow cytometry using FITC-labeled anti-GPIb α monoclonal antibody, GUR20-5. To study the agglutination of the rGPIb α -liposomes in the presence of vWF as a ligand of GPIb α , vWF was added to an aqueous solution of rGPIb α -liposomes at a final concentration of 50 μ g/ml, and agglutination of rGPIb α -liposomes was monitored by an aggregometer PA-100

(Kowa, Japan), that measures changes in light scattering. It was confirmed that the agglutination of rGPIb α -liposomes was demonstrated in the presence of vWF only when 1 mg/ml ristocetin was added to the system. Furthermore, such agglutination was completely blocked in the presence of 50 μ g/ml of anti-vWF monoclonal antibody, NMC-4 (a generous gift by Dr A. Yoshioka, Nara Prefectural Medical School), [11] suggesting the specific agglutination. We also confirmed this morphologically using the rhodamine-labelled rGPIb α -liposomes under the fluorescent microscopy. Rhodamine-labeled rGPIb α -liposomes supplemented with FITC-labeled vWF was agglutinated by ristocetin. Rhodamine was detected in all conditions, but FITC was detected only under conditions of which both vWF and ristocetin were added. This agglutination was also inhibited by GUR20-5 and NMC-4, indicating the specific binding between rGPIb α and vWF. Next, we studied to clarify whether heterologous aggregation, i.e. attachment of liposomes to platelets, would occur or not. 3 H-labeled rGPIb α -liposomes were first mixed with platelet rich plasma, then ristocetin was added to the mixture to induce platelet aggregation. After centrifugation, pellets were counted for radioactivity. Involvement of rGPIb α -liposomes to platelet aggregates was evident. This was inhibited by monoclonal anti-vWF antibody NMC-4, suggesting that the reaction is specific. The specific inclusion of rGPIb α -liposomes was clearly demonstrated dose-dependently.

The findings that rGPIb α worked as a receptor on the surface of the liposome and required ristocetin to react with soluble vWF strongly suggest the similar behaviour to native platelets. In other words, these preparations would not cause aggregation in blood stream when infused and could adhere to structurally modified vWF, e.g. vWF immobilized on the subendothelial tissues. Furthermore, rGPIb α -liposomes were incorporated into platelet aggregates and enhanced platelet aggregation. It could be speculated that rGPIb α -liposomes may bind vWF and accumulate on exposed subendothelial tissue *in vivo*, serving as platelet substitutes supporting hemostasis in thrombocytopenic individuals.

Perspectives of artificial platelets

Ideal properties of artificial platelets

In clinical applications of platelet substitutes, important points are which platelet functions they are expected to substitute and to what degree they are expected to substitute. So far various artificial organs or tissues have been developed; however, there seems to be several factors which would determine their possibility. Namely, they are the number of functions of objective organs or tissues and their degree of complexity, constant or occasional appearance of the functions (the control of function), partial or complete substitution of the functions, temporal or permanent substitution etc. Usually, artificial organs can be divided into a hybrid type (coexistence of natural and artificial parts) and a totally artificial type. In the case of platelet substitutes, improvement of a cell fusion technique or genetic engineering,

and combination of natural tissues or cells with artificial products, materialization of platelet substitutes having the functions closer to natural platelets would be developed. It is considered to be impossible to realize the hemostatic function of platelets with artificial products only. A hybrid type should be more realistic in order to have the complex modulation function of normal platelets such as effective plug formation at the bleeding site only and dissolution of the plugs after restoration.

No risk of infection by transfusion is one of the primary requisites. Beside this, long-term preservation would be also extremely important in depopulated areas. They should be easy to use in a case of emergency. Their efficiency should be maintained after repeated infusions not to make antibody and not to cause serious allergic reactions. More important requisite is that infused platelet substitutes should not function in blood stream to make plugs. This is specific to platelet substitutes and different from artificial red cells or the other transplanted organs. In other words, a major promise is to switch-on their functions at the wounded site of the vessel only. Membrane glycoproteins are receptors, which are important for platelets to play their hemostatic roles. Usually, they are inactive states, and become active at the wounded sites where subendothelial tissues are exposed to make platelet plugs. Ideal platelet substitutes should have this modulation mechanism, and the plugs formed by the platelet substitutes should be dissolved and absorbed in the body after completion of hemostasis and restoration of the tissues. Furthermore, the platelet substitutes should not suppress the normal platelet functions, and the production of normal platelets should not be inhibited by a feedback mechanism. The platelet functions are complex such as adhesion, aggregation, secretion and procoagulant activity, and they should occur whenever and wherever they are requested to work. The artificial platelets having all these functions are too difficult to be developed. However, clinical purpose would be satisfied if one could give some hemostatic abilities to artificial particles, which could facilitate the physiological functions of remaining platelets or coagulation factors.

Research and development of platelets substitutes in Japan

Research on artificial platelets or platelet substitutes has just started, and, in order to produce clinically applicable artificial platelets or platelet substitutes, it is necessary to accumulate basic researches step by step. In 1997, a big research group on the development of artificial platelets was awarded Health Sciences Research Grants (Artificial Blood Project) from the Ministry of Health and Welfare, Japan. The characteristic features of this research group are first to establish basic theories about fluid mechanics and hemostatic thrombus formations to make ideal artificial platelets or platelet substitutes and appropriate evaluation methods for ideal clinical applications of the products. The main objective in 1997 was to make particles which accumulate specifically at the injured sites of the blood vessel. The targets for adhesion are collagen within subendothelial tissues or vWF, and the liposomes having the ability to bind them have been prepared. rGPIb α as a receptor of vWF

was prepared in large quantities by a recombinant technique. The rGPIb α -liposomes showed an adhesive ability and coaggregation with human normal platelets. The *in vivo* evaluation is planning. A system for continuous measurement of human platelet adhesion to collagen under the flow conditions is established and the importance of platelet adhesion through the $\alpha_2\beta_1$ integrin of platelet membrane was clarified. $\alpha_2\beta_1$ integrin was produced as a water-soluble protein complex by a recombinant technique, and its introduction to the liposome to prepare $\alpha_2\beta_1$ -liposome is now being planned to evaluate its function as well as rGPIb α -liposome.

On the other hand, there are some problems such as the short half-life in blood circulation, or phagocytosis by monocytes in liposome-using systems. The development of the supplementing method and the experiments using polymers made of proteins as carriers other than liposomes are planning. Different from artificial red cells, the development of artificial platelets or platelet substitutes has just started. However, after fundamental data to create artificial platelets having hemostatic activity are established and the entire figure of the prototype artificial platelets is clarified through the animal experiment, the further improvement is needed in order to afford the advanced platelet substitutes in its shape and physicochemical properties. Toward this purpose, it is important to arrange the knowledge of human platelet behavior under the flow conditions based on the fluid mechanics and model experiments. The other important approaches are to understand the molecular mechanism of platelet adhesion for the effective accumulation to the wounded site of the vessel and reinforcement of fragile vascular wall in thrombocytopenic states. The research of matrix protein existing on the vascular wall or collagen at the wound site of vessels and corresponding receptor of platelet membrane protein should be proceeded simultaneously.

References

- [1] J.N. George, Changes in platelet membrane glycoproteins during blood bank storage. *Blood Cells*, 18 (1992) 501–511.
- [2] L.A. Eaton, M.S. Read, K.M. Brinkhous, Glycoprotein Ib assays. Activity levels in Bernard-Soulier syndrome and in stored blood bank platelets. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 115 (1991) 488–493.
- [3] T.S. Kickler, Improving the quality of stored platelets. *Transfusion*, 31 (1991) 1–3.
- [4] G. Agam, A.A. Livine, Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 22 (1992) 105–112.
- [5] B.S. Collier, K.T. Springer, J.H. Beer, N. Mohandas, J.E. Scudder, K.J. Norton, S.M. West, Thromboerythrocyte. *In vivo* studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J. Clin. Invest.* 89 (1992) 546–555.
- [6] M. Rybak, L.A. Renzulli, A liposome based platelet substitute, the Plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomat. Artif. Cells Immob. Biotechnol.*, 21 (1993) 101–118.

- [7] L.T. Goodnough et al., A phase I study of safety and efficacy for Infusible Platelet Membrane in patients. *Blood* 86 (1995) 610a.
- [8] E. Seigliano et al., Infusible platelet membrane for control of bleeding in thrombocytopenic patients. *Frozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicine*, 1996, p. 29, (meeting abstract).
- [9] M. Murata, J. Ware, Z.M. Ruggeri, Site-directed mutagenesis of a soluble fragment of platelet glycoprotein Ib α demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 15474–15480.
- [10] T. Kitaguchi et al., Liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α enhance ristocetin-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemostas.*, 77 (Suppl) (1997) 181 (Abstract).
- [11] H. Mohri, Y. Fujimura, M. Shima, A. Yoshioka, R.A. Houghten, Z.M. Ruggeri, T.S. Zimmerman, Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 17901–17904.

厚生科学研究 高度先端医療研究事業：人工血液開発研究分野 公開シンポジウム

標記の研究成果に関する公開シンポジウムを開催致します。
多数のご参加をお待ちしております。

日時：平成11年2月10日(水) 9:30～17:00(終日)

会場：虎ノ門 ニッショーホール(東京都港区虎ノ門2-9-16 Tel:03-3503-1486)

●主旨●

緊急時、災害時などの輸血の実施、ヒト血液による未知の感染症の伝播の可能性などを回避する為に、人工血液の開発は非常に重要である。世界に先駆けて人工血液開発研究の大型プロジェクトが厚生科学研究として平成9年より開始された。止血能、酸素運搬能をそれぞれ担う人工血小板、人工赤血球の研究のこれまでの成果を報告し、今後の展望について討論する。

プログラム

9:30～ 9:40 開会あいさつ——池田 康夫(慶應義塾大学医学部)

9:40～10:10 厚生科学研究のねらいと期待——中島 正治(厚生省医薬安全局血液対策課)

10:10～10:50 「人工血小板研究展開の現状」——池田 康夫(慶應義塾大学医学部)

10:50～11:20 「リポソームを用いた人工血小板の創製」—村田 満(慶應義塾大学医学部)

11:20～11:50 「蛋白質重合体を用いた人工血小板の創製」—武岡 真司(早稲田大学理工学部)

11:50～12:30 「人工血液の微小循環系観測による評価法」—末松 誠(慶應義塾大学医学部)

12:30～14:00 (昼食)

14:00～14:40 「新しい酸素輸液の研究展開の現状」——土田 英俊(早稲田大学理工学部)

14:40～15:10 「人工酸素運搬体の適応症例」——小林 紘一(慶應義塾大学医学部)

15:10～15:40 「酸素輸液の重要性と医療への応用」——関口 定美(北海道赤十字血液センター)

15:40～16:20 「酸素輸液の臨床応用」——北島 顕(北海道大学医学部)

16:20～ 閉会あいさつ——土田 英俊(早稲田大学理工学部)

参加無料

問い合わせ先：慶應義塾大学医学部内科 池田康夫 Tel:03-3353-1211 Fax:03-3226-6623