

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

平成16年度 総括・分担研究報告書

認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の
安全性と止血効果の評価

主任研究者 池田 康夫
慶應義塾大学医学部内科学 教授

平成17（2005）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価
(研究課題番号：H16-医薬-067)

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17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 教授

(分担研究者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 助教授

武岡真司 早稲田大学理工学部 助教授

鈴木英紀 (財) 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 研究員

後藤信哉 東海大学医学部 助教授

末松誠 慶應義塾大学医学部 教授

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 助手

(研究協力者)

村田満 慶應義塾大学医学部内科 講師

目 次

認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価

平成16年度研究報告

- I. 総括研究報告書 池田 康夫
- II. 分担研究報告
 1. 血小板減少血液を用いた人工血小板機能の in vitro 評価 半田 誠
－フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチドポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の in vitro, in vivo 評価
 2. 担体、認識部位の選択による止血能をもつ微粒子系の精密合成 武岡 真司
－フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド(H12)を結合したポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体、リン脂質小胞体の分子設計
 3. 止血過程における人工血小板の超微細構造解析 鈴木 英紀
－認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の超微構造的解析
凝集系における H12-アルブミン重合体の動態に関する免疫電顕的検討
 4. 高速レーザー共焦点顕微鏡による人工血小板の in vivo 動的機能評価 後藤 信哉
－止血機能の増強と血栓性の亢進におよぼす人工血小板の添加による硬化を ex vivo, in vivo の実験的研究により如何に評価するか？
 5. 人工血小板の微小循環動態特性の生体内解析 末松 誠
－リポソームの微小循環系内挙動
 6. 人工粒子上でのインテグリン構造の制御 鎌田 徹治
－ α IIb β 3 インテグリン活性化機構の解明
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表
- IV. 研究成果の刊行物・別冊
- V. その他

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

総括研究報告書

「認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価」

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授

分担研究者

半田 誠 慶應義塾大学医学部 助教授

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

鈴木英紀 (財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 研究員

後藤信哉 東海大学医学部 助教授

末松 誠 慶應義塾大学医学部 教授

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 助手

研究協力者

村田 満 慶應義塾大学医学部内科 講師

**** 研究要旨 ****

本研究班の目的は、血小板減少時の出血の治療・予防に十分な止血機能を発揮し得る人工粒子（人工血小板／血小板代替物）の開発である。主任研究者らが、永年取り組んで来た止血血栓形成の分子機構に関する研究成果に基づいて、まず止血機能を有する微粒子系をデザインし、その妥当性を検討する為に候補粒子を作成し、その安全性と止血機能を *in vitro*, *in vivo* で評価する手順を採用している。平成 12 年度から 14 年度に亘った研究において、血管損傷部位に特異的に集積し得る微粒子系の作成、更に血管損傷部位において生体内に残存する血小板をリクルートしてヒト血小板と凝集塊を形成し、これを促進させ得る機能を有することを、主に *in vitro* 評価から実証できた。

平成 15 年度に「認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価」として新たに始まった研究班においては、それらの候補人工粒子が生体内で十分な止血機能を有し、しかも流血中で凝集塊・血栓を形成し、臓器障害を惹起しないことを確認する為、止血能と同時に、安全性の評価も行うこととした。特に、血小板凝集機能を補助する微粒子系の候補として、活性化血小板表面に発現される GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン(Fbg) γ 鎖 C 末端アミノ酸配列(H12:HHLGGAKQAGDV)をリポソームやアルブミン重合体に担持させた系を評価してきた。

平成 15 年度は、先ず担体を生体適合性、生分解性を有する微粒子であるアルブミン重合体(polyAlb)として、これに H12 を結合させた H12-polyAlb を調製、流動状態下コラーゲン基板上における *in vitro* 評価を行った。血小板のみの粘着占

有率と比較して、H12-polyAlb 添加により血小板粘着は 1.7 倍増加したことから、H12-polyAlb の血小板凝集促進効果が確認できた。さらに、血小板減少症モデルラットを作製して、*in vivo* における止血能評価法を確立した。H12-polyAlb は、投与量依存的に血小板減少ラットの出血時間を短縮させる微粒子であった。平成 16 年度は、H12-polyAlb の血中滞留時間の延長を図り、ポリエチレングリコール (PEG) を介して H12 を担持させた H12-PEG-polyAlb を調製して、生体内での止血効果の持続について検討した。フローサイトメトリーにより H12-PEG-polyAlb は活性化血小板へ特異的に結合し、その効果は PEG の有無に影響されなかった。従って、H12 の機能が保持されて血中で長く機能が持続する H12-PEG-polyAlb を構築できた (武岡ら)。また、H12-PEG-polyAlb の血中滞留時間は、PEG 未修飾体のそれに比べて約 20 倍も延長した。H12-PEG-polyAlb を血小板減少症モデルラットに投与(40 mg/kg)し、3 時間経過後に止血能を評価したところ、出血時間が有意に短縮した (半田ら)。他方、H12-polyAlb では投与後 5 分経過後には有意な短縮を認めたものの、3 時間経過後では全く効果がなかった。

また、担体としてリポソーム (vesicle) に着目して、平成 15 年度では H12-PEG-vesicle を調製して *in vitro* 評価試験を行った。H12 の結合量の増加に伴って血小板凝集促進効果が認められ、血小板減少血液に混合させた場合には、コラーゲン基板上への血小板粘着占有率の増加が促進された。活性化した血小板に H12-PEG-vesicle が結合し、更にそれを介して血小板が結合している様子が顕微鏡観察にて確認された。平成 16 年度では、H12 結合 PEG 脂質の導入率を血小板凝集促進能から検討したところ、導入率 0.3mol% 以上が必要であることを明らかにした (武岡ら)。更に血小板減少症モデルラットによる H12-PEG-vesicle の機能評価では、投与量依存的に出血時間が短縮することを確認した。PEG-vesicle と同様の血中滞留性が期待できるので、H12-PEG-polyAlb と同様に止血能が血中で長時間保持された微粒子系になり得る。アルブミン重合体 (H12-PEG-polyAlb) とリポソーム (H12-PEG-vesicle) との厳密な比較は平成 17 年度に予定されているものの、予測では出血部位への充填効果が期待できるアルブミン重合体の方がより少ない投与量で効果が現れると思われる。しかし、リポソームでは内包物放出によって更に血小板凝集を促進させることも可能であるので、これも平成 17 年度に検討したい。

また、平成 15 年から 16 年度にかけて、H12 に対するウサギ抗体を作製し、免疫電顕法にて H12 結合担体による血小板の凝集塊を詳細に解析した (鈴木)。H12-polyAlb では、綿雪状のアルブミン重合体の表面に H12 が存在することが確認され、H12-polyAlb 存在下での血小板の ADP 凝集では、凝集塊の大きさがコントロールの polyAlb 存在下の場合と比較して大きく、凝集塊を構成している血小板の変形度や接着度がより促進されていた。また、コントロールでは凝集塊中の血小

板内の顆粒が放出されていない状態であったが、H12-polyAlb 存在下では顆粒が消失しており、放出反応の所見が見られた。したがって、電顕観察によっても、H12 担持微粒子は血小板間に介在して血小板減少時の血小板凝集を促進させる作用があることが支持された。

スクリーニングのための新しい評価系の確立においては、後藤らにより平成 15 年度にて、高速レーザー共焦点顕微鏡による 3 次元イメージングシステムを用いた微粒子血栓評価系が確立された。これは、微粒子系投与によって 2 次元的血栓形成が促進される場合には止血機能増強効果を示唆し、3 次元的血栓形成が促進される場合には副作用である血栓性増強効果を示唆するものである。平成 15 年度では、H12-vesicle が 2 次元的成長を促進する有効な微粒子であることが明らかとなったが、平成 16 年度では、H12-polyAlb も 2 次元的成長を促進することが明らかとなり、H12 結合担体は、血栓性の増強効果よりも止血増強効果があることが示唆された。他方、von Willebrand 因子、GPIb α 、GPIaIIa 結合アルブミン重合体との比較では、GPIaIIa 結合アルブミン重合体の方がより効率的な人工血小板になり得ることが示唆された。

末松らは、レーザー共焦点顕微鏡とレーザーアブレーションを組合せた血小板血栓形成モデルによるリポソームの微小循環挙動のリアルタイム観測を平成 15 年度にて行い、リポソーム担体が障害血管部位に選択的に集積することを明らかにした。平成 16 年度では、細動脈、細静脈をレーザーアブレーションによって損傷させた場合、あるいはヒスタミン表面灌流によって細静脈の血管透過性を亢進させた場合において、前者では蛍光標識したリポソーム担体が損傷部位に限局して集積すること、後者では内皮細胞 GAP 部に節状に集積することが明らかとなった。更にマウス脳梗塞モデルでもリポソームを前投与すると血漿漏出を抑制する効果が得られた。この様にリポソーム担体自体の血管損傷部位への集積性が明らかになったが、これは血小板減少症モデルラットにてコントロールの PEG-vesicle のみでも出血時間の短縮現象が認められていることを裏付けている。平成 17 年度では、止血機能を持つ微粒子系（例えば、H12-PEG-vesicle）にて同様の実験を行うことによって、人工血小板としての機能評価に踏み込みたい。

鎌田によって GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb} \beta_3$ インテグリン) 活性化機構を解明することによって、活性化作用をもつフィブリノーゲンレセプターとしての認識部位を新たに開発する試みが継続されている。平成 15 年度は、 $\alpha_{IIb} \beta_3$ インテグリンの 2 種類の立体構造 (bent conformer, extended conformer) があり、それぞれのリガンド結合活性を検討した。このインテグリン内に人工的に S-S 結合を導入して bent conformer に固定した変異型では、フィブリノーゲンの親和性は低く、還元処理による S-S 結合の切断によって親和性が増大することから、 $\alpha_{IIb} \beta_3$ インテグリン

の bent から extended に構造変化が活性化機構の主要であることが明らかとなった。平成 16 年度では、キメラの作成を行ってこの構造変化機構に関与する部位が calf-2 と EGF4- β TD のドメイン間であることを特定した。従って、人工的なトロンビン切断部位をここに導入して、トロンビン存在下でのみ活性化し得る新たな人工 $\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリンの作成に関する手がかりを得た。これを微粒子担体に導入できれば、H12 結合微粒子担体と組合せて、より機能的な人工血小板創製が可能となるであろう。

以上に述べてきた通り、平成 15 年度、16 年度では、H12 結合微粒子担体による ex vivo, in vivo 評価系によって止血機能が確認され、その効果の持続も可能となり、作用機序も明らかにされてきた。平成 17 年度では、GPIb α 、GPIaIIa との組合せによる微粒子系の機能評価を進めると共に、血小板減少症モデルのウサギを作製し、安全性に関するより詳細な検討を進めたい。最先端技術を用いた血小板代替物の評価系が確立されたことによって、より少量の投与で、より止血機能が高く、より長時間持続する微粒子担体の構築が加速されるであろう。

**** 研究業績 ****

主たる研究発表

Okamura, Y, Takeoka S, Teramura Y, Maruyama H, Tsuchida E, Handa M & Ikeda Y: Hemostatic effects of fibrinogen- γ chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles in vitro and in vivo. *Transfusion*, in press 2005

Takeoka S, Okamura Y, Suzuki H, Tsuchida E, Handa M and Ikeda Y: Cooperative effects of platelets aggregation of platelet substitutes at a high shear rate: mixed system of fibrinogen γ -chain dodecapeptide- or glycoprotein 1b α -conjugated latex beads under flow conditions, *ASAIO Journal*, to be submitted, 2005

Okamura Y, Maekawa I, Takeoka S, Teramura Y, Maruyama H, Tsuchida E, Handa M & Ikeda Y: Hemostatic effects of phospholipids vesicles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide in vitro and in vivo, *Thromb. Haemost.* To be submitted, 2005.

Sugiura Y, Kashiba M, Maruyama K, Hoshikawa K, Sasaki R, Suematsu M et al: Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxid Redox Signaling*, in press 2005

Tomita k, Azuma T, Kitamura N, Suematsu M, Ishii H et al: Pioglitazone prevents alcohol-induced fatty liver in rats through upregulation of c-Met. *Gastroenterology*, 126, 873-885, 2004

Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Majima M et al: Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology*, 39, 139-150, 2004

Goto S: Understanding the mechanism and prevention of arterial occlusive thrombus formation by anti-platelet agents. *Curr. Med. Chem* -2, 149-156, 2004

Goto S: Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effects of new antiplatelet agents. *Current Vascul Pharmacol.* 2, 23-32, 2004

Goto S, Tamura N, Ishida H: Ability of anti-glycoprotein IIb/IIIa agents to dissolve platelet thrombi formed on a collagen surface under blood flow conditions. *J of Am Colledge of Cardiol.* 44(2). 316-323, 2004

Hagihara M, Higuchi A, Tamura N, Ueda Y, Hirabayashi K, Ikeda Y, Kato S, Sakamoto S, Hotta T, Handa S & Goto S: Platelets, after exposure to a high shear stress, induce II10-producing mature dendritic cells in vitro. *J of Immunol.* 172, 5297-5303, 2004

Goto S: Propagation of arterial thrombi local & remote contributory factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 2207-2208, 2004

主たる学会発表

Okamura Y, Takeoka S, Watanabe N, Suzuki H, Handa M & Ikeda Y: Hemostatic Effects of Fibrinogen- γ chain dodecapeptide-conjugates in vitro and in vivo. 6th UK Platelet Meeting & 2nd UK-Japan Platelet Conference 2004, 3rd Sep, @Oxford, UK, 2004

Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, Tsuchida E, Handa M & Ikeda Y: Recognition properties of polymerized albumin particles of phospholipid vesicles bearing recognition proteins. 6th UK Platelet Meeting & 2nd UK-Japan Platelet Conference 2004, 3rd Sep, @Oxford, UK, 2004.

岡村陽介、寺村祐治、武岡真司、土田英俊、半田誠、池田康夫：高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果、第53回高分子学会年次大会@神戸 5月26日2004

岡村陽介、武岡真司、土田英俊、半田誠、池田康夫：高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果、第11回日本血液代替物学会年次大会@札幌 7月14日2004

岡村陽介、武岡真司、土田英俊、半田誠、池田康夫：フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド結合体の in vitro, in vivo 評価 第27回日本血栓止血学会学術集会@奈良 11月19日2004

前川一平、岡村陽介、寺村祐治、武岡真司、土田英俊、半田誠、池田康夫：ドデカペプチド(H12)結合小胞体による血小板凝集作用 第27回日本血栓止血学会学術集会@奈良 11月19日2004

末松誠：メタボローム：網羅的代謝解析技術によるガス分子を解した新しい臓器機能制御機構の解明、第3回生体機能研究会@箱根 7月23日2004

Suematsu M: Erythrocytes as an oxygen-sending regulator of glycolysis and adenosine metabolism: evidence from high-throughput metabolome analysis, 2nd UK-Japan Platelet Conference. @Oxford UK, 2nd Sept 2004

末松誠： 網羅的代謝解析法による CO の新しい標的分子の検索とその病態整理学的意義 第1回 HemeOxygenase 研究フォーラム @京都 9月4日 2004

末松誠： メタボローム解析技術による新規代謝制御系の探索、BioJapan2004 @東京 9月30日 2004

梶村真弓、末松誠： Visualization of gaseous signalings in vivo. 慶應 Medical Award Symposium @東京 11月30日 2004

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得

特願 2003-39230: 発明人：後藤信哉、石田英之、出願人：東海大学、題名：血栓生成過程観測装置及び血栓生成過程観測方法、2003年2月20日出願

特願 2003-122251：発明人：後藤信哉、出願人：東海大学、課題：心筋梗塞、脳梗塞などの発生を予防するのに有効な血清コレステロール低下剤の提供、2003年4月25日申請

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
平成 16 年度 分担研究報告書

フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチドポリエチレングリコール修飾アルブミン
重合体の *in vitro*, *in vivo* 評価

分担研究者 半田 誠 (慶應義塾大学輸血・細胞療法部 助教授)
研究協力者 岡村陽介 (慶應義塾大学輸血・細胞療法部, 早稲田大学
大学院 理工学研究科 博士課程)
武岡真司 (早稲田大学 理工学部 助教授)

【研究要旨】

血小板凝集機能を補助する微粒子として、活性化血小板表面に発現される GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少状態下でも血小板凝集の促進が確認でき、さらに未活性血小板とは相互作用しないことを明らかにしてきた(平成 14 年度 分担研究報告書)。平成 15 年度では、H12 結合アルブミン重合体(H12-polyAlb)は、血小板減少ラットの出血時間の短縮効果を確認した。しかし、その血中滞留時間が短いため長期的な機能発現を期待できない。そこで本年度は、PEG 修飾によって血中滞留時間の延長に成功した H12-PEG-polyAlb(平成 16 年度 分担研究報告書 武岡真司報告分)の投与 3 時間後の止血能評価を行った。その結果、活性化血小板への H12 の特異的認識能は PEG 鎖の付加で影響されないことが確認でき、血小板減少ラットの止血能評価より、この PEG 修飾 polyAlb(40 mg/kg)は投与後 3 時間経過しても止血能を保持していることが明らかとなった。

1. 研究目的

血小板止血機能を補助する微粒子系の開発において、活性化血小板表面に発現される GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン(Fbg)の γ 鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少下でも血小板凝集を促進させることが確認でき、さらに未活

性血小板とは相互作用しにくい配列であることが明らかとなった(平成 14 年度)。さらに平成 15 年度では、H12 結合アルブミン重合体(H12-polyAlb)は、血小板減少ラットの出血時間の短縮効果を確認した。しかし、その血中滞留時間が短いため長期的な機能発現を期待できない。

そこで本年度は、PEG 修飾によって

血中滞留時間の延長に成功した H12-PEG-polyAlb(平成16年度 分担研究報告書 武岡真司報告分)の活性化血小板への特異的結合、さらに投与3時間後の止血能評価を行った。

2. 研究方法

2.1. H12-PEG-polyAlb の調製法

polyAlb 分散液([HSA] = 20 mg/mL, 30 mL, 粒径 200±80 nm) に MAL-PEG-NHS DMSO 溶液(10 mM, Mn = 3.4 or 5.0 kDa)を 284 µL 添加して振とう後(r.t., 20 min)、引き続き、m-PEG-NHS DMSO 溶液(25 mM, Mn = 5.0 kDa)をそれぞれ 284, 1136, 1704, 2840 µL 添加した。遠心分離(25000 rpm, 10min)にて精製後、MALPEG-polyAlb ([HSA]=20 mg/mL, 20 mL)を得た。Cys をあらかじめ導入した H12 (10 mM, 189 µL)を混合して振とう後(r.t., 12hr)、遠心分離(25000 rpm, 10 min)にて H12-PEG-polyAlb ([HSA]=10 mg/mL, 30 mL)を回収した。

2.2. 活性化血小板への H12-PEG-polyAlb の特異的結合能評価

全血(1/10 (v/v)、3.8 % (w/v)クエン酸ナトリウム)を遠心分離(100g, 15 min, r.t.)して多血小板血漿(PRP)を得た。PRP に ACD 溶液(15 % (v/v))を混合し prostagrandin E₁ (PGE₁, f.c. 1 µM) を添加後遠心分離し(2200g, 7 min)、上清を除去した。RCD 溶液(含 1 µM PGE₁) に再分散させ、同操作を再度行なった

後、Hepes-Tyrode 緩衝液(pH 7.4)で再分散して洗浄血小板分散液(1.0×10^5 /µL)を調製した。

洗浄血小板 (1.0×10^5 /µL, 50 µL)に FITC 標識した検体 (PEG-polyAlb, H12-PEG-polyAlb, polyAlb, H12-polyAlb, f.c.[lipid] = 14 mg/mL)を混合し、トロンビン(f.c. 3 U/mL)にて血小板を活性化させ、37°C にて 10 分間振とう、ホルムアルデヒド(f.c. 1 % (v/v)) にて固定した。血小板分画の蛍光陽性率から、血小板への H12-PEG-polyAlb の結合率を測定した。

2.3. 血小板減少ラットを用いた出血時間による止血能評価

Wistar 系雄性ラット(日本クレア, 8 週齢、230-250 g)にブスルファンポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を 0, 3 日目に尾静脈投与し(全投与量 20, 30, 40 mg/kg)、体重、各血球変動を計測した(K-4500、Sysmex)。

投与開始から 10 日目を血小板減少症ラット([PLT] = 19.6 ± 2.6 /µL)を作製した。セボフラン麻酔後、検体(H12-PEG-polyAlb, PEG-polyAlb)を尾静脈投与した(4mL/kg)。また、生理食塩水をコントロール群とした。検体投与 5 分あるいは 180 分経過後、尾先端から 1cm の部位にクイックヒール(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて切傷をつけた(長さ 2.5mm, 深さ 1mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、止血するまでの時間(出血時間)を計測した。また、検体投与前後に採血し、

各血球数の変動を観察した。

3. 研究結果及び考察

3.1. H12-PEG-polyAlb の物性

活性化血小板への認識能が保持され、血中滞留時間が大幅に延長する H12-PEG-polyAlb (粒径 200 ± 80 nm) の物性を以下に示す。

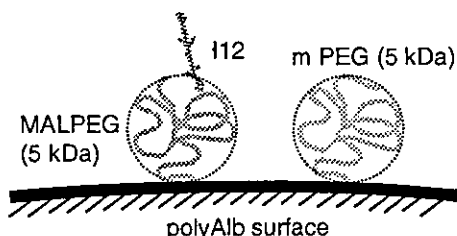


Fig. 1 Modification image of mPEG, MALPEG, and H12 to the surface of polyAlb. Mw of MALPEG: (●) 3.4 kDa, (○) 5.0 kDa.

Table 1 Characterization of H12-PEG-polyAlb

	PEG-polyAlb	H12-PEG-polyAlb
MALPEG (10^4 /particles)	1.2	1.2
mPEG (10^4 /particles)	6.1	6.1
H12 (10^4 /particles)	-	1.0
$T_{1/2}$ (min)	210	180

3.2. 活性化血小板への H12-PEG-polyAlb の特異的結合

FITC 標識 H12-PEG-polyAlb 存在下、トロンビン刺激活性化血小板に対する結合率を測定したところ、 86.8 ± 2.2 % であり、H12-PEG-polyAlb は活性化血小板へ結合することを確認した (Fig. 2)。また、トロンビン未刺激時 (1.1 ± 0.3 %)、PAC-1 存在下 (7.3 ± 0.9 %) では結合は抑制され、PEG-polyAlb 存在下 (1.4 ± 0.3 %) も同様であった。従って、H12-PEG-polyAlb は活性化血小板と特異的に結合することが明らかと

なった。さらに、PEG 未修飾体 (H12-polyAlb) 存在下では 91.1 ± 7.9 % となり、H12-PEG-polyAlb とほぼ同等であったことから、PEG を介して H12 を結合させても活性化血小板への結合能が保持されることも確認できた。

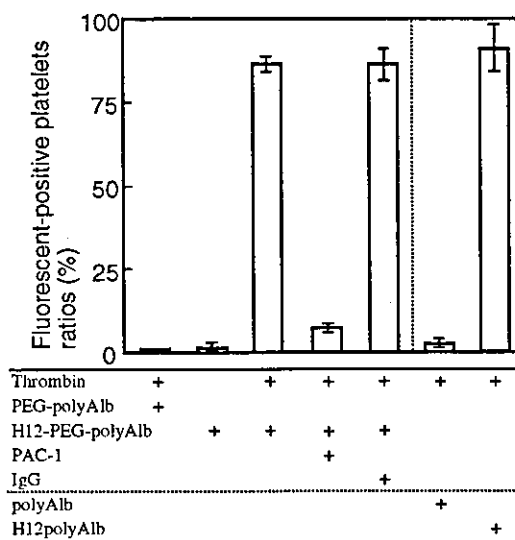


Fig. 2 Specific binding of H12-PEG-polyAlb to activated platelets as demonstrated by flow cytometer.

3.3. 血小板減少ラットの作製

ブスルファンを 0, 3 日目に尾静脈投与したところ (全投与量 20, 30, 40 mg/kg)、投与量依存的に血小板減少速度は増大したが、30, 40 mg/kg 投与群は、それぞれ投与開始 15, 11 日目に死亡した。20 mg/kg 投与群では再現性よく血小板数が減少し、10 日目で $19.6 \pm 2.6 \times 10^4$ / μ L (正常値の約 1/4~1/5) となり 20 日目以降には血小板数の回復が認められた (死亡例なし) (Fig. 3)。

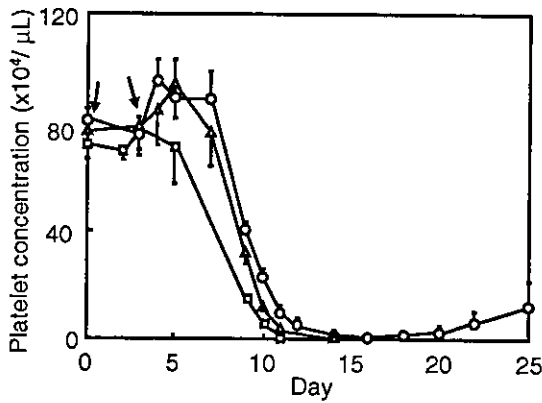


Fig. 3 Dose-response effect of busulfan on rats. Rats were injected with busulfan at a total dose of 20 mg/kg (□), 30 mg/kg (△), or 40 mg/kg (○) as described in Materials and Methods. Tail vein blood was collected at intervals and platelet concentration was measured. Arrows show injection day of busulfan (N = 5).

また、ブスルファン投与10日目では、ブスルファン未投与群(Table 2)と比較して白血球の減少が若干見られたものの、体重は増加し、赤血球、ヘマトクリット(HCT)は維持されていた(Table 3)。しかし、11日目以降より赤血球数も減少し始めた。従って、ブスルファン投与量 20 mg/kg が最適であると判断し、10日目以前を血小板減少ラットとして採用した。

Table 2 Changes of body weight and blood cell count in untreated rats (N=6).

	Day	
	0	10
Weight (g)	251 ± 8	304 ± 15
RBC (10 ⁴ /μL)	702 ± 12	716 ± 30
WBC (10 ³ /μL)	156 ± 24	127 ± 28
HCT (%)	42.8 ± 1.6	43.0 ± 2.1

Table 3 Changes of body weight and blood cell count before and after busulfan injection (N=6).

	Day	
	0	10
Weight (g)	258 ± 10	288 ± 12
RBC (10 ⁴ /μL)	728 ± 15	700 ± 23
WBC (10 ³ /μL)	127 ± 15	73 ± 8
HCT (%)	47.6 ± 1.5	45.2 ± 2.3

3.4. 出血時間測定

ブスルファン投与開始より 8.5、9、10 日目のラットの血小板数は、それぞれ $57 \pm 4 \times 10^4$ 、 $41 \pm 3 \times 10^4$ 、 $20 \pm 3 / \mu\text{L}$ であった。そこで、出血時間を測定したところ、それぞれ 288 ± 56 、 366 ± 153 、 712 ± 131 秒であり、血小板数の減少に伴い出血時間が延長した。特に10日目の血小板減少ラットの出血時間は、正常ラット([血小板] = $81 \pm 9 / \mu\text{L}$)のそれ(201 ± 51 秒)と比較して、有意に約4倍延長した(Fig. 4)。従って、10日目の血小板減少ラットを採用し、各検体の止血能評価を行った。

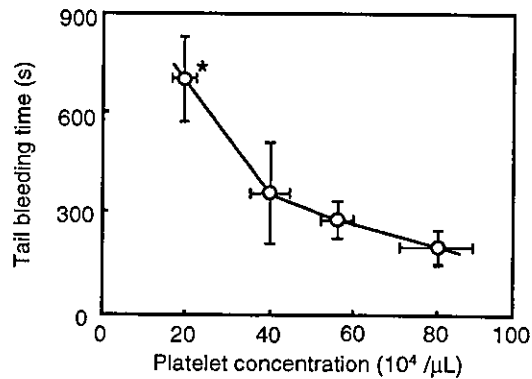


Fig. 4 Correlation of tail bleeding time with platelet concentration in the rat (N = 5). *P < 0.05 for Day 10 group vs. Day 0 group.

H12-PEG-polyAlb を 4、20、40 mg/kg 投与し 3 時間経過後の出血時間を測定したところ、それぞれ 626 ± 158 、 594 ± 84 、 330 ± 73 秒であり、投与量依存的に出血時間が短縮した(Fig. 5)。特に 40 mg/kg 投与時は生理食塩水群 (712 ± 131 秒)、PEG-polyAlb 群 (723 ± 78 秒)と比較して有意に短縮する結果が得られ、正常対照ラットの出血時間に匹敵した。

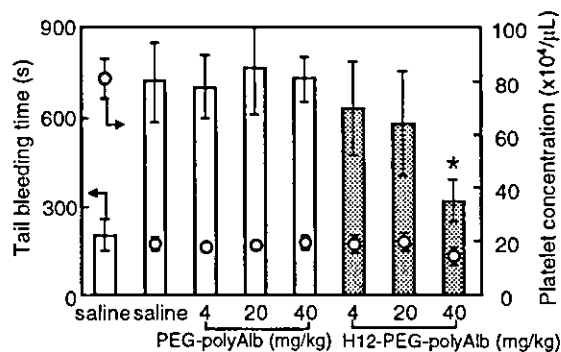


Fig. 5 Effects of the administration of H12-PEG-polyAlb on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEG-polyAlb was 4, 20, 40 mg/kg equivalent of albumin. ; (O) platelet concentration in the rats (N = 6-10). *P < 0.05 for H12-PEG-polyAlb vs. PEG-polyAlb group at the same dose.

以上より、H12-PEG-polyAlb は投与3時間経過後でも止血能を有する微粒子であることが証明できた。

今後は、より大型の動物（ウサギやイヌ）を使った血小板減少・血小板輸血モデルを作製し、この人工血小板代替物（H12-PEG-polyAlb）の止血能評価を行い、臨床試験に向けた次なるステップとしたい。

4. 結論

1) H12 担持微粒子の活性化血小板への特異的認識能は PEG 鎖の表面修飾に影響を受けず、この人工血小板代替物（PEG 修飾 H12-polyAlb）の血中滞留時間を大幅に延長させることに成功した。

2) 血小板減少ラットの止血能評価より、PEG 修飾 H12-polyAlb (40 mg/kg) は投与後 3 時間経過しても止血能を保持していることがわかった。

5. 健康危険情報

なし

6. 研究発表

6.1. 論文発表

1) Okamura, Y., Takeoka, S., Teramura, Y., Maruyama, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Hemostatic Effects of Fibrinogen-γ Chain Dodecapeptide-Conjugated Polymerized Albumin Particles *in vitro* and *in vivo*, *Transfusion*, in press (2005).

2. 学会発表

(1) 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果」, 第 84 回日本化学会春季年会, 2004.3.27. (神戸)

(2) 前川 一平, 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 西出 宏之, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「ドデカペプチド (H12) 結合小胞体による血小板凝集作用」, 第 84 回日本化学会春季年会, 2004.3.27. (神戸)

(3) 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果」, 第 53 回高分子学会年次大会, 2004.5.26. (神戸)

(4) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝

集協同効果」, 第 11 回日本血液代替物学会年次大会, 2004.7.14. (札幌)

(5) Okamura, Y., Takeoka, S., Watanabe, N., Suzuki, H., Handa, M., and Ikeda, Y. "Hemostatic Effects of Fibrinogen- γ Chain Dodecapeptide-Conjugates *in vitro* and *in vivo*", Incorporating the 6th UK Platelet Meeting and the 2nd UK/Japanese Platelet Conference, 2004. 9.3. (Oxford)

(6) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. "Recognition Properties of Polymerized Albumin Particles and Phospholipid Vesicles Bearing Recognition Proteins", Incorporating the 6th UK Platelet Meeting and the 2nd UK/Japanese Platelet Conference, 2004. 9.2. (Oxford)

(7) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「ドデカペプチド結合アルブミン重合体の血小板凝集促進効果」, 第 53 回高分子討論会, 2004.9.16. (札幌)

(8) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド担持アルブミン重合体の *in vitro*, *in vivo* 評価」, 第 42 回日本人工臓器学会大会, 2004.10.6. (東京)

(9) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド結合体の *in vitro*, *in vivo* 評価」, 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 2004.11.19. (奈良)

(10) 前川 一平, 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「ドデカペプチド(H12)結合小胞体による血小板凝集作用」, 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 2004.11.19. (奈良)

7. 知的所有権の出願・登録
なし

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
平成 16 年度 分担研究報告書

フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド(H12)を結合したポリエチレングリコール
修飾アルブミン重合体、リン脂質小胞体の分子設計

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院 助教授)
研究協力者 岡村 陽介 (早稲田大学大学院 理工学研究科)
前川 一平 (早稲田大学大学院 理工学研究科)
藤枝 俊宣 (早稲田大学 理工学部)
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 血液内科)

【研究要旨】

血小板凝集機能を補助する微粒子として、活性化血小板表面に発現される GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12)をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少状態下でも血小板凝集の促進が確認でき、さらに未活性血小板とは相互作用しないことを明らかにしてきた(平成 14 年度 分担研究報告書)。平成 15 年度では、H12 結合アルブミン重合体(H12-polyAlb)は、血小板減少ラットの出血時間の短縮効果を示すことを確認した。しかし、その血中滞留時間が短いため長期的な機能発現が期待できない。平成 16 年度は、H12-polyAlb の血中滞留時間の延長を目的とし、ポリエチレングリコール(PEG)を介して H12 を担持させた H12-PEG-polyAlb を調製した。分子量 5.0 kDa の PEG 鎖に H12 を結合させた H12-PEG-polyAlb では血小板凝集能が持続され、PEG 修飾型の血中滞留時間は、PEG 未修飾体型に比べて約 20 倍延長できること明らかとなった。他方、H12-PEG-vesicle は、流動下において活性化血小板のみと特異的に結合し、血小板減少状態下でも血小板の凝集度を増幅させた。その凝集促進能は、H12 導入率が 0.3mol%から 0.6mol%まではほとんど変わらなかったことから、0.3mol%の導入率で充分であった。さらに H12-PEG-vesicle は、用量依存的に出血時間を短縮させたことから止血能を有する微粒子であることが確認できた。

1. 研究目的

血小板止血機能を補助する微粒子系の開発において、活性化血小板表面に発現される GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン(Fbg)の γ 鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)を

ラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少下でも血小板凝集を促進させることが確認でき、さらに未活性血小板とは相互作用しにくい配列であることが明らかとなった(平成 14 年度)。さらに平成 15 年度では、H12

結合アルブミン重合体(H12-polyAlb)は、血小板減少ラットの出血時間の短縮効果を示すことを明らかにした。しかし、その血中滞留時間が短いため長期的な機能発現を期待できない。

そこで平成16年度は、H12-polyAlbの血中滞留時間の延長を目的とし、分子量の異なるポリエチレングリコールを介してH12を担持させた2種類のH12-PEG-polyAlbを調製し、その血小板凝集能、血中滞留時間値から有用なPEGを選択し、さらに止血効果の持続について検討した。同様に、担体をリン脂質小胞体(H12-PEG-vesicle)にして検討した。

2. 研究方法

2.1. H12-PEG-polyAlbの調製法

polyAlb分散液([HSA] = 20 mg/mL, 30 mL, 粒径 200±80 nm)にMAL-PEG-NHS DMSO溶液(10 mM, Mn = 3.4 or 5.0 kDa)を284 µL添加して振とう後(rt., 20 min)、m-PEG-NHS DMSO溶液(25 mM, Mn = 5.0 kDa)をそれぞれ284, 1136, 1704, 2840 µL添加した。遠心分離(25000 rpm, 10min)にて精製後、MALPEG-polyAlb([HSA]=20 mg/mL, 20 mL)を得た。CysをN末端にあらかじめ導入されているH12(10 mM, 189 µL)を混合して振とう後(rt., 12hr)、遠心分離(25000 rpm, 10 min)にてH12-PEG-polyAlb([HSA]=10 mg/mL, 30 mL)を回収した。

2.2. H12-PEG-vesicleの調製法

MAL-PEG-NHS(Mn:3.4 kDa)をGlu2C18と反応させ、エーテル再沈殿精製後、MAL-PEG-Glu2C18を得た(収

率 64%)。SH-H12とMAL-PEG-Glu2C18をDMF中で反応させ、エーテル再沈、水抽出後、H12-PEG-Glu2C18を得た(収率47%)。¹H-NMRのマレイミドのピーク($\delta = 6.70$)の消失より、チオール基とマレイミド基の結合を確認した。DPPC/cholesterol/DPEA/PEG-DSPE=5/5/1/0.03(モル比)の混合脂質に対し、H12-PEG-Glu2C18を0.03~0.6 mol%となるようにt-ブタノール溶液中にて溶解、薄膜乾燥後、水和、押出造粒法にてH12-PEG-vesicleを調製した(粒径220 ± 70 nm)。

2.3. 血小板凝集計を用いたH12-PEG-polyAlbの凝集促進能評価

全血(1/10 (v/v)、3.8% (w/v)クエン酸ナトリウム)を遠心分離(100g, 15 min, rt.)して多血小板血漿(PRP)を得た。PRP ([PLT]= 1.5×10^5 /µL, 186 µL)にH12-PEG-polyAlb(f.c.[rHSA] = 4.8 mg/mL, 10 µL)を添加し攪拌後、ADP(f.c.2.5 µM, 4 µL)にて血小板を活性化、凝集させたときの血小板分散液の透過度を測定した。このとき、H12未結合polyAlb添加時の透過度との差からH12の機能を評価した。

2.4. 流動下におけるH12-PEG-vesicleの結合、血小板接着評価法

2.4.1. コラーゲン固定化基板の調製法

コラーゲン(3 mg/mL, TypeI-A (ウシ臍)、新田ゼラチン社)をPBS(pH 7.4)にて分散させ(f.c. 30 µg/mL)、ガラス基板(直径24 mm, 厚み0.5 mm)上に浸漬させた(4 °C, 8 hr)。BSA溶液(20

mg/mL)にてブロッキングし(rt., 2 hr)、PBS で洗浄後使用した。

2.4.2. 血小板固定化基板の調製法

PRP に ACD 溶液(15 % (v/v))を混合し prostaglandin E₁ (PGE₁, f.c. 1 μM) を添加後遠心分離し(2200g, 7 min)、上清を除去した。RCD 溶液(含 1 μM PGE₁)に再分散させ、同操作を再度行なった後、Hepes-Tyrode 緩衝液(pH 7.4)中で再分散して洗浄血小板分散液(2.0×10⁵ /μL)を調製した。コラーゲン基板上に洗浄血小板分散液を展開し、37 °C にて 1 時間静置、Hepes-Tyrode 緩衝液で洗浄した後に使用した。

2.4.3. 洗浄血液の調製法

全血(1/10 (v/v)、3.8 % (w/v)クエン酸ナトリウム)を遠心分離(100g, 15 min, rt.)して PRP を除去した。10 % (v/v) ACD を混合した生理食塩水で分散させ、同遠心条件で上清を除去した。再分散後、2200g で 10 分間、2 回遠心分離してパフィーコートを完全に除去した。得られた洗浄血液のヘマトクリット値(Hct)を 50%に調整して使用した。

2.4.4. 血小板減少血液の調製法

赤血球製剤用白血球除去フィルター(NEO1J, 日本ポール社製)に全血(PPACK, f.c. 40 μM)を重力落差にて通過させ、血球測定装置(K-4500, Sysmex 製)にて各血球数、Hct を計測した。また、全血(1/10 (v/v) 3.8 %クエン酸ナトリウム)を遠心分離(600 rpm, 15 min, rt.)し、得られた PRP(4.0×10⁵ /μL)をフィルター通過後の血液中に添加して

血小板濃度 5.0×10⁴ /μL に調整した血小板減少血液を作製した。

2.4.5. 流動下での蛍光顕微鏡観察、解析

洗浄血液あるいは血小板減少血液 5 mL に各検体を添加、振とうさせた(37 °C, 10 min)。血小板あるいは検体のどちらか一方を蛍光標識した(血小板: DiOC₆, 検体: DiOC₁₈)。

37 °C の恒温槽内のフローチェンバー灌流部に蛍光顕微鏡(TE300, Nikon)を組み込んだ装置に、血小板減少血液を種々のずり速度で流動させ、CCD カメラにて連続測定し、画像解析装置(Argus 50, 浜松ホトニクス)を用いて解析した。

2.5. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

Wistar 系雄性ラット(日本クレア, 8 週齢、230-250 g)にブスルファンポリエチレングリコール溶液(5mg/mL)を 0、3 日目に尾静脈投与し(全投与量 20 mg/kg)、投与開始から 10 日目を血小板減少症ラット([PLT] = 19.6 ± 2.6 /μL)を作製した。セボフラン麻酔後、検体(H12-PEG- vesicle, PEG-vesicle)を尾静脈投与した(4mL/kg)。また、生理食塩水をコントロール群とした。検体投与 5 分経過後、尾先端から 1cm の部位にクイックヒール(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて傷をつけた(長さ 2.5mm, 深さ 1mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、止血時間を計測した。また、検体投与 5 分前、投与 30 分後に採血し、各血球変動を観察した。