

or coagulation factors in the internal aqueous phase accumulate at the bleeding site, they will be able to contribute effectively to hemostasis by releasing their contents. We also focused on using polymerized albumin particles as effective platelet substitutes and obtained some unique in vitro and in vivo results [18,19].

Conclusions

For red-blood-cell substitutes the present target is the supportive treatment of transfusion therapy in emergency, and nonclinical and clinical studies will be scheduled within 2 years.

On the other hand, the research of platelet substitutes has just started. There is a conflict between the carrier design for the extension of circulation lifetime and the carrier design to show the hemostatic activity by recognizing the bleeding site; therefore, we need to resolve this conflict and to design platelet substitutes for prophylactic or chronic treatments. And we also need a method to confirm that the candidate does not create a thrombus in blood circulation.

Although profitability is important in the development of blood substitutes, one that is based on a long-term view with consideration for human beings is expected first. At present, as many discoveries about the dynamic function of platelets have accumulated in a short period of time with the progress of biotechnology and opto-electronics, and the manufacturing technology of recombinant proteins or carriers is progressing, a usable product is sure to be invented in the near future.

Acknowledgments. The author thanks Drs. E. Tsuchida, H. Sakai, K. Sou, Y. Teramura, and Y. Okamura at Waseda University, and Drs. K. Kobayashi, Y. Ikeda, M. Suematsu, H. Horinouchi, M. Handa, and M. Murata at Keio University for useful discussions and suggestions. This work was supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants (Research on Pharmaceutical and Medical Safety); the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; and Grants-in-Aid from the JSPS, Japan, and 21COE "Practical Nano-Chemistry" from MEXT, Japan.

References

1. Tsuchida E (ed) (1995) Artificial red cells: materials, performances and clinical study as blood substitutes. Wiley, Chichester
2. Tsuchida E (ed) (1998) Blood substitutes: present and future perspectives. Elsevier, Amsterdam

3. Sakai H, Tomiyama K, Sou K, et al (2000) Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* 11:425–432
4. Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al (1997) Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjug Chem* 8:23–30
5. Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, et al (2002) Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol* 283:H1191–H1199
6. Sakai H, Hara H, Yuasa M, et al (2000) Molecular dimensions of Hb-based O-2 carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol* 279: H908–H915
7. Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, et al (1999) Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 277:G1088–G1096
8. Kyokane T, Norimizu S, Taniyai H, et al (2001) Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 120:1227–1240
9. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al (2000) Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 159:1079–1088
10. Agam G, Livne AA (1992) Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 22:105–112
11. Levi M, Friderich P, Ten CW, et al (1999) Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 5:107–111
12. Chao F, Reddick RL, Bode AR, et al (1996) Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* 36:536–542
13. Soslau G, Class R, Morgan DA, et al (2001) Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 276:21173–21183
14. Nishiya T, Murata M, Handa M, et al (2000) Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 270:755–760
15. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, et al (2002) Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 296:765–770
16. Kainoh M, Tanaka T (2002) Production of soluble integrin $\alpha 2\beta 1$ heterodimer complex functionally in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290:305–310
17. Nishiya T, Kainoh M, Murata M, et al (2002) Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 100: 136–142
18. Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, et al (2000) Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib alpha to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 1:290–295
19. Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, et al (2003) Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 306:256–260

人工血液(赤血球, 血小板)の最近の進歩

武岡真司*

1. はじめに

日進月歩の科学技術の進歩によってウイルスの検出感度や不活化度が向上しても、新たなウイルス出現やプリオン問題、そして少子高齢化問題は、献血システムの大きな不安要因になっており、安全な血液代替物に対する期待となっている。血液には血漿成分と血球成分があり、血漿成分の代替は進んでいるものの、血球成分(赤血球, 白血球, 血小板)の代替には機能と安全性を兼ね備えた微粒子系(分子集合体)の開発が必要であるため時間がかかっている。わが国の人工血液の本格的な研究は、平成9年度から厚生科学研究高度先端医療研究事業に『人工血液開発分野』が設置され、人工赤血球, 人工血小板, 人工抗体の三部門にて活発な研究展開が進められ現在に至っている。人工血液は、現行の血液製剤を補完して安全な製剤の安定供給に寄与することから、人工血液の製品化に向けた研究開発の促進が国の基本方針(平成14年7月24日決議)となっている。また、製品化が実現すれば、21世紀医療の進歩に大きな影響を与えうるものと期待される。

筆者の所属する共同研究グループでは、人工赤血球と人工血小板の研究を行っている。前者は酸素分圧に応じて酸素を吸収・脱着する分子(ヘモグロビンなど)を担持し、血中に長く留まって安全かつ安定に酸素運搬機能を発現し続ける担体である。後者は血管損傷部位や活性化血小板のみを認識する分子を担持し、血中に長く留まって血管損傷部位に特異的に粘着して止血機能を発現する担体である。従って、担体には適当な血液適合性や血中滞留性が必要であり、分解性や代謝物の低毒性は当然保証されなければならない。このような観点から、リン脂質分子の集合体(リポソーム)や遺伝子組み換えヒトタンパク質の重合体や架橋体を選択した。

2. 人工赤血球開発の現状とヘモグロビン小胞体の製造

人工赤血球としてパーフルオロカーボン乳剤や修飾ヘモグロビンなどが検討されその一部は臨床使用されてきたが、機能や安全性の観点から満足できるものではなかった。現在われわれが開発を進めている、高濃度ヘモグロビンをリン脂質の二分子膜にて包み込んだ、赤血球と類似構造のヘモグロビン小胞体(図1)は、最も安全度と機能が高い酸素運搬体であろう^{1,2)}。現段階では期限切れの献血血液から精製したヘモグロビンの有効利用が進められているが、将来的には遺伝子組換えヒトヘモグロビンが使用されるであろう。われわれの方法では、赤血球からヘモグロビンを精製する際に、血液型を決める型物質やヘモグロビン以外の蛋白質、ウイルス(もし含まれたとしても)が加熱やフィルター処理にて除去されている。この際、一酸化炭素処理を施してヘモグロビンを安定化していることが特徴である。他方、膜成分である混合リン脂質には分散安定化剤としてポリエチ

* 早稲田大学理工学部応用化学科

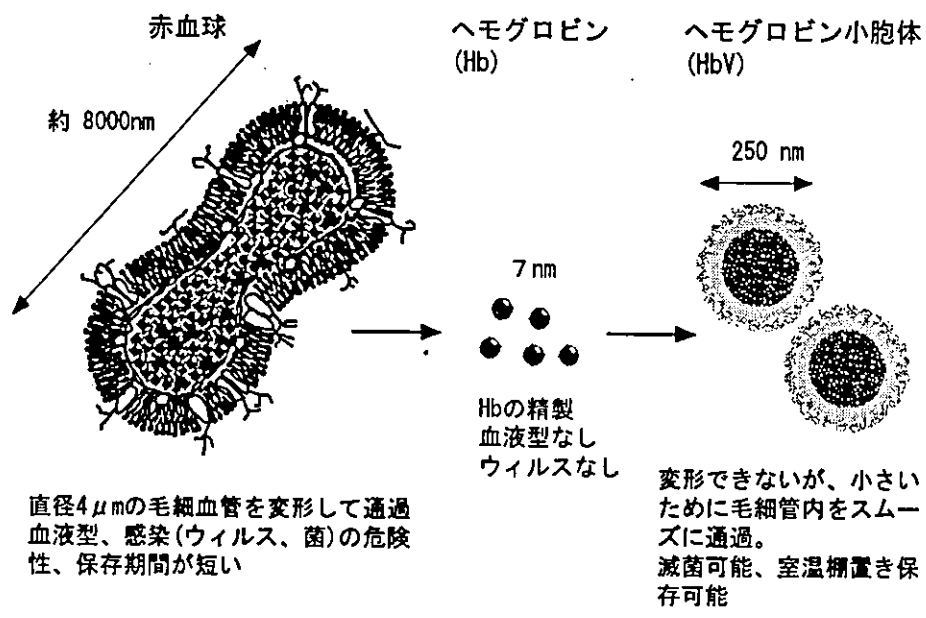


図1 ヘモグロビン小胞体の概念図

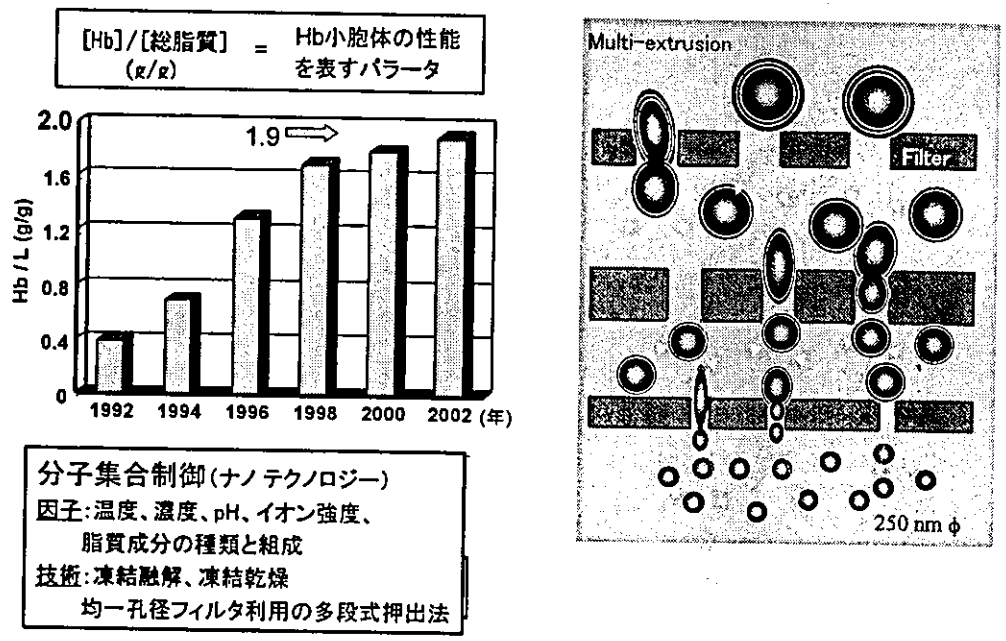


図2 ヘモグロビン小胞体の厳密な粒径制御と高性能化

レングリコール(PEG)結合脂質が含まれており、予め分子集合制御技術によって目的サイズの約2倍の空小胞体とし、これを精製した濃厚ヘモグロビン溶液(40g/dL)に分散、均一な貫通孔を持つメンブランフィルターに高圧透過(エクストルージョン法)させて、目的サイズの小胞体に高濃度ヘモグロビンを内包させたヘモグロビン小胞体が調製される。その際、溶液のpH、イオン強度、温度、圧力、そして孔サイズの組合せが重要なパラメーターであり、その厳密な設定によって内包効率が決まる。この十年、筆者らはパラメーターの調節に専念し、約5倍の内包効率の向上に成功した(図2)。そして、ヘモグロビン小胞体は、未内包ヘモグロビンの限外ろ過処理による除去操作、脱一酸化炭素化処理、脱酸素化処理を経て容器に充填され、室温で2年間の液状保存(赤血球製剤では採血後3週間の冷蔵保存)が保証される。乾燥粉末では更に長期間の保存が可能であるため、これが人工物の大きな長所とされている。現在、製造プラントの設計が最先端の化学工学技術を駆

表1 ヘモグロビン小胞体の物理化学的特徴

	ヘモグロビン小胞体 (20%アルブミン製剤と混合後)	ヒト血液 (赤血球)
粒径 (nm)	220 - 280	(8000)
P_{50} (Torr)	27 - 34*	26 - 28
[Hb] (g/dL)	10 ± 0.5 (8.6 ± 0.4)	12 - 17
[総脂質] (g/dL)	5.3 - 5.9 (4.6 - 5.4)	1.8 - 2.5 ^b
[Hb]/[総脂質] (g/g)	1.6 - 2.1	6.7 ^c
[PEG-脂質] (mol%)	0.3	—
metHb (%)	< 3	< 0.5
粘度 (cP at 230 s ⁻¹)	2 - 3 (3 - 4)	3 - 4
晶質浸透圧 (mOsm)	300	Ca.300
膠質浸透圧 (Torr)	0 (20)	20 - 25
pH (37°C)	7.4	7.2 - 7.4
エンドトキシン (EU/mL)	< 0.1	—
バイロジェン	検出なし	—

*調節可, ^b赤血球膜の全成分, ^cHbと膜成分の重量比

使して行われている。

3. ヘモグロビン小胞体の物性と安全性評価

製造されたヘモグロビン小胞体制剤の性状を表1にまとめた。ヘモグロビン小胞体は生理食塩水に分散され、脱酸素状態で容器に封入されている。製剤のヘモグロビン濃度は10g/dLであり、ヒト血液のそれに近い。また、ヘモグロビン分子がカプセルに封入されているため製剤の膠質(コロイド)浸透圧はほとんどゼロである。従って、膠質浸透圧の調節が必要となる場合にはアルブミンや多糖類などのコロイド製剤と併用となる。溶液粘度は、アルブミンに分散させて膠質浸透圧をヒト血液に揃えるとヒト血液と同等になる。

粒径は250nmに調節されており赤血球の約30分の1程度であるので、梗塞部位の透過など赤血球にはない機能が期待できる。酸素親和度はアロステリック因子、ピリドキサール5'-リン酸の共封入によりヒト血液と同等の値に調節されている。脂質類の成分組成や含量には、ヘモグロビンのカプセル化効率、常温で2年間液状保存できる安定性³⁾、血流中での溶血の回避と適度な血中滞留時間、血小板や補体の活性化の回避など、に対する工夫が施されており、従来の小胞体における課題が解決されている。

4. 動物試験による機能と安全性の評価

ヘモグロビン小胞体に関する評価試験が、筆者の所属する早稲田大学理工学総合研究センター土田英俊名誉教授の研究グループと慶應義塾大学医学部小林紘一教授、末松誠教授のグループとの共同研究にて行われ、その良好な成績から臨床応用の可能性が見えてきた。主にラットやハムスターを用いた試験であるが、基本的な安全性と酸素輸送効果は充分確認できており、現在、企業側の参画も得て霊長類や犬を用いた安全性や効力確認試験が進められている。以下に90%交換試験の結果を紹介する。ラット全血液量の90%をアルブミン単独で交換した場合には70%交換あたりから血圧と腎皮質酸素分圧の低下が顕著となって全例死亡したが、ヘモグロビン小胞体をアルブミン溶

液に分散させた系にて90%交換した場合には血圧、腎皮質酸素分圧ともに維持された⁴⁾。ヘモグロビン小胞体のアルブミン分散液によるハムスター80%交換輸血試験では、非侵襲に測定した皮下微小循環系の組織酸素分圧は交換前の60~70%に低下するものの、対照アルブミン投与群よりも5倍以上の値が維持されていた⁵⁾。安全面では、ヘモグロビン小胞体では修飾ヘモグロビンに認められる抵抗血管の収縮と血圧亢進は全く認めなかった。これは、ヘモグロビン小胞体は血管を透過しない大きさであり、血管内皮由来弛緩因子である一酸化窒素への影響はほとんどないと考えられている⁶⁾。更には、ヘモグロビン小胞体は赤血球と同様に肝臓の類洞血管(数10~200nm程度の孔が血管に開いている)を透過できず、老廃赤血球と同様に肝臓のクッパー細胞や脾臓などの細網内皮系にて代謝される。他方、カプセル化されていないヘモグロビンは、これを容易に透過して内因性COを消去し、ビリルビンの過剰生成と胆汁分泌機能の低下を招来した^{7,8)}。ラット、ラビット、カニクイザルによる血中半減期からヒトでの類推では、半減期は3日程度と見積もられる。また、単回、反復負荷投与による血液生化学試験や病理試験での詳細から、ヘモグロビン小胞体成分である、脂質分解に関わるリパーゼの亢進、コレステロール値の上昇、細網内皮系の肥大が一過性に認められた以外の変動は認められておらず、出血時の緊急対応としての輸血の代替にて十分なる機能を発現するものと期待されている^{9,10)}。

5. 人工血小板の開発の現状とストラテジー

人工血小板(血小板代替物)の開発は、赤血球代替物と比較して歴史が浅く研究例も少ない¹¹⁾。血小板は出血部位に対し特異的粘着、伸展、凝集、放出、血液凝固系の活性化等の複雑な機能を持ち、これらの全てを兼備した血小板代替物の構築は事実上不可能といえよう。しかし、粘着、凝集能が欠如した出血性疾患 Bernard-Soulier 症候群や血小板無力症において出血傾向が強く認められることから、血小板の粘着と凝集機能に着目して、これらの機能を付与させた担体の投与によっても少数残存する血小板の機能を補助できるものと考えられている。これまでにフィブリノーゲンのヒト赤血球担持体¹²⁾やアルブミンマイクロカプセル担持体¹³⁾、ヒト血小板の乾燥粉末¹⁴⁾が臨床試験に供されたものの、作用機序が不明瞭であることも問題点となり、全て中断されている。また、ヒト由来の血液成分に依存している面も解決しなければならない課題であろう。

筆者らが慶應義塾大学医学部池田康夫教授のグループと共同研究している人工血小板では、生体投与可能なりポソームや遺伝子組み換えヒトアルブミン重合体を担体としてその特徴を利用し、血小板膜蛋白質の一部の遺伝子組換え蛋白質や合成オリゴペプチドを担持させて血小板を巻き込んだ出血部位への集積による止血能の発現を期待している。

血小板による止血は、高ずり速度の血流と低ずり速度の血流では機構が異なる。図3に示したように、高ずり速度の出血に対する血小板の止血は、出血部位に露出する血管内皮下組織であるコラーゲンに結合したフォンビルブランド因子(vWf)に対して、血小板が認識して接着して転がることから始まる。*in vitro* 観測にて抗GP IIb/IIIa抗体を添加してGP IIb/IIIaの機能を阻害した血小板では、vWf固定化基板上を流動方向に沿って転がる現象が見られ、この認識能は血小板表面のGPIb/V/IX複合体のGPIb α 部が担っている¹⁵⁾。次に、血小板表面のGPIa IIa($\alpha_2\beta_1$ インテグリン)やGPVIが直接コラーゲンと相互作用して血小板は粘着し、そこで活性化されると血小板は伸展して顆粒を放出するが、最も重要な過程はGP IIb/IIIa($\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリン)が活性体となる現象である。フィブリノーゲンは、この活性化GP IIb/IIIaを認識して、血小板間を架橋し凝集体を形成して一次止血となる。引き続き凝固系の誘導によるフィブリン塊の形成(二次止血)によって止血が完成する。われわれは、患者に残存する血小板や凝固系の有効利用を前提にして、当面目標とする人工血小板としては、高ずり速度の血流下でコラーゲンをvWfを介して認識するGPIb α 、

1次止血(血小板血栓)

- 1) 接着(tethering→rolling) GPIb α - vWf
- 2) 粘着(adhesion) GPIa/IIa - collagen
- 3) 凝集(aggregation) GPIIb/IIIa - fbg or vWf

2次止血(フィブリン血栓)

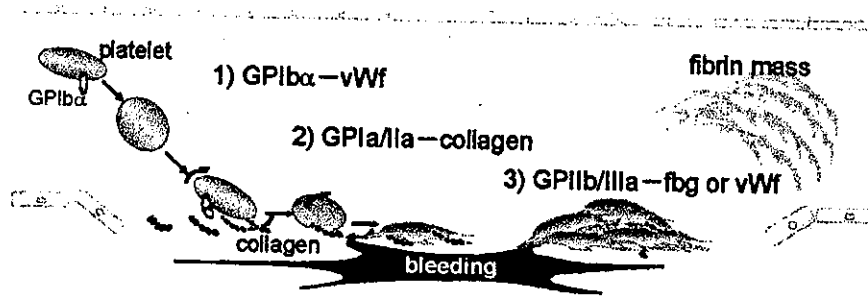


図3 血小板の止血機構

低ずり速度にてコラーゲンを直接認識する GPIaIIa, 活性化血小板上の GPIIb/IIIa を認識して血小板凝集体の形成をサポートするフィブリノーゲンやその認識部位を担持させた担体を開発のターゲットとした。

6. リポソーム(小胞体)利用の血小板代替物

小胞体表面に血小板膜蛋白質の遺伝子組換え体(rGPIb α ¹⁶⁾)を結合させると、血小板止血過程の初期が再現できる。この小胞体の調製方法を図4と図6に示した。エタノールアミン型リン脂質(DPPE)にSPDPを用いてピリジルジスルフィド基を導入し、これをコリン型リン脂質とコレステロールの混合脂質と混合して薄膜を形成、水和・分散体からエクストルージョン法によって小胞体を形成、rGPIb α に導入したメルカプト基とチオール・ジスルフィド交換反応によってrGPIb α を小胞体表面に結合させた。

得られたrGPIb α 担持小胞体は、血小板と同様にvWf基板上を転がる性質を持ち¹⁷⁾、転がる小胞体の数は高ずり速度の方が多くなる、rGPIb α の特徴が確認できた。興味深いことに、その転がり速度は小胞体を構成するリン脂質二分子膜の柔軟性(membrane flexibility)と相関しているようである¹⁸⁾。すなわち、“柔らかい”小胞体では転がり速度は低くなり、“硬い”小胞体では転がり速度は高くなった。これは血流中ではずり応力により“柔らかい”小胞体は変形しやすくvWf基板と小胞体間の接触面積が増大したために、変形しにくい“硬い”小胞体よりも転がり速度が低下したためと考えられた。このように、rGPIb α の担持により小胞体に血小板機能の一部を付与でき、しかもその機能を制御する方法も見出すことができた。

他方、低ずり速度の血流下でコラーゲんに直接結合する血小板膜蛋白質の遺伝子組換え体(rGPIaIIa)を同様に結合させた小胞体では、コラーゲン基板を特異的に認識して粘着(停止)する挙動が西谷らによって確認された^{19,20)}。この系ではずり速度が高くなるにつれ粘着数は減少するが、rGPIb α とrGPIaIIa共に担持させた小胞体では低ずり速度から高ずり速度までコラーゲン基板を粘着する系が構築されている²⁰⁾。更に、小胞体の内水相に血小板の活性化や凝固系を誘導する因子を内包させておいて、出血部位に集積した小胞体がこれらを放出できれば、有効に止血に貢献できるであろう。

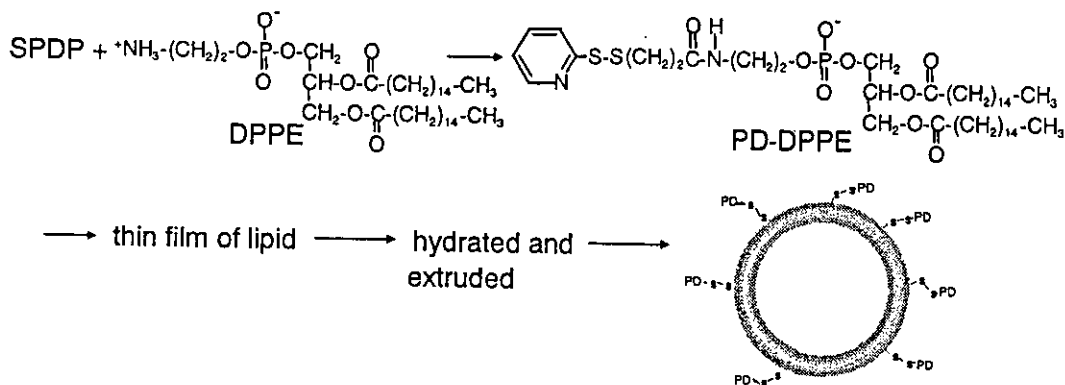


図4 リン脂質小胞体の調製法

7. アルブミン重合体を用いた血小板代替物

ヒト血清アルブミンは血漿蛋白質の中で最も多量(5 g/dL)に存在する蛋白質であり、コロイド浸透圧の調節や栄養物や代謝物などの運搬、などの機能を担っている。これを利用した微粒子は生体適合性・生分解性を有するため、すでに1950年代から静注用製剤としてアルブミン大凝集体が血流動態観測用プローブや血管造影剤などに、噴霧乾燥法によって調製したアルブミンマイクロカプセルは超音波診断増感剤として、アルブミンマイクロスフェアは徐放性の薬物担体として利用されてきた。しかし、アルブミン粒子は、高温や有機溶媒による不可逆的な変性や界面活性剤や架橋剤を用いるため、粒径制御や除去操作が煩雑であった。われわれは図5に示すような、①遺伝子組換えヒト血清アルブミン(rHSA)を単量体として、rHSAをジスルフィド結合にて重合する方法を用いて、②重合度の制御によりナノスケールからマイクロスケールの粒径制御が可能、③水溶液中でのpHと温度の制御にて重合するためクリーンであり、得られた粒子の表面は親水性、④アルブミン変性がほとんどない重合体を得る方法を確立した²¹⁾。そして、得られたアルブミン重合体表面にSPDPを用いてピリジリジスルフィド基を導入し、メルカプト基を導入したレセプタータンパク質と結合させた(図6)。

アルブミン重合体は内部が充填された無定形な綿雪のような形態をとっており、出血部位での充填効果が期待できる。表面にrGPIIb α を結合させたところ、小胞体のようなvWf基板を転がる挙動は全く認められず、高ずり速度下でも粘着する挙動が認められた。ラテックスビーズにrGPIIb α を結合させた系でも粘着することから、担体が重合体である場合と膜構造を持つ場合ではrGPIIb α 機能の発現の仕方が異なることが示唆された。他方、rGPIIaを担持させたアルブミン重合体は低ずり速度下で粘着し、X線照射にて血小板数を正常値の1/5程度に減少させたマウスに投与したところ、コントロール群の出血時間(730 \pm 198秒)と比較して、投与量依存的に出血時間の短縮が認められた(例えば、2.4 \times 10¹¹ particles/kgでは出血時間は337 \pm 46秒)²²⁾。

さらに粘着して活性化した血小板同士を架橋するフィブリノーゲンを結合させた微粒子は減少し

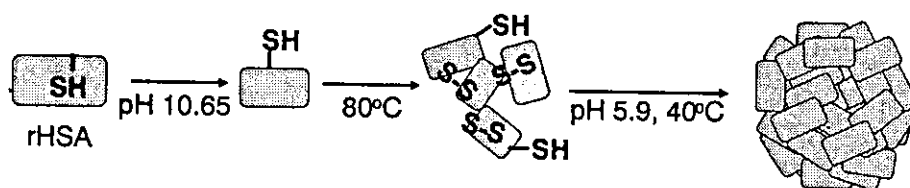


図5 アルブミン重合体の調製法

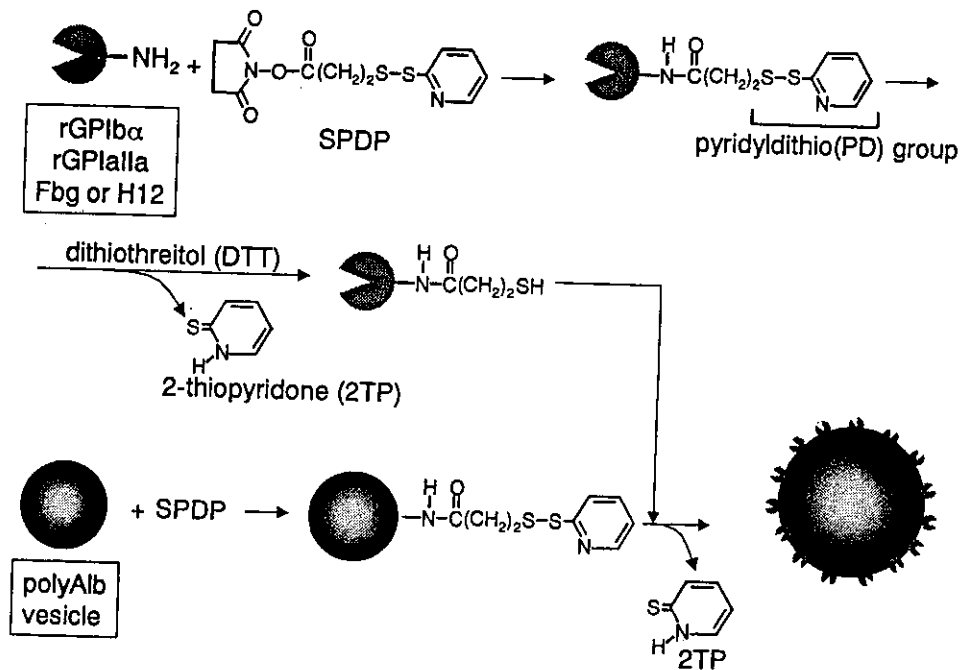


図6 担体への認識部位の担持方法

た残存血小板の凝集を補助として期待できる²³⁾。活性化血小板の固定化基板を作成し、フィブリノーゲン結合アルブミン重合体を流動させたところ基板上に一様に粘着し、抗 GPIIb/IIIa 抗体を添加した系やアルブミン重合体だけの系では粘着は認められなかった。血小板数が正常値の 1/5 程度に調節された血小板減少モデル血液にフィブリノーゲン結合アルブミン重合体を添加すると、その濃度増大と共に流動血小板の粘着数が増大したことから、フィブリノーゲン結合アルブミン重合体は血小板粘着増強効果を有する微粒子であることが示唆された。しかし、フィブリノーゲンは不安定なタンパク質であり、水溶液中では速やかに失活してしまうことが課題となった。われわれはフィブリノーゲンの γ 鎖 C 末端アミノ酸序列 (HHLGGAKQAGDV) を担体に結合させた微粒子はアルブミン重合体でも小胞体でも、フィブリノーゲン機能が安定に発現されることを確かめた²⁴⁾。

抗がん剤であるブスルファンをラットに 20mg/kg を 2 回に分けて投与すると、投与後 10 日後に、血小板数のみが 1/5 まで再現性よく低下する。5 分前あるいは 3 時間前に予め H12 結合アルブミン重合体を投与してから尾静脈からの出血時間を測定すると出血時間が投与濃度依存的に有意に短縮された²⁵⁾。また、アルブミン重合体の表面をポリエチレングリコール鎖にて修飾し、この末端の一部に H12 を結合した系では、3 時間後でもその効果が持続していることが確認された。したがって、フィブリノーゲンの代替をするオリゴペプチドの担持した微粒子でも有意な止血効果を示すことが確認された。

8. まとめ

人工赤血球は救急救命における輸血療法の補完を当面の目標としており、役目が終われば比較的速やかに代謝臓器で代謝され、生合成される自身の赤血球と置き換わるものである。今後、臨床試験に進むために製剤の物性規格や製造方法の確定、非臨床試験、臨床試験のためのガイドラインやプロトコル作成へと進むことになるであろう。他方、人工血小板の開発は国内外共に浅く、まだ緒に就いたばかりの段階である。今後、①血中滞留時間の延長のための担体設計と認識機能発現を高めるための担体設計は一般に相反するので、その工夫が必要となること、②出血部位を認識して止血能を発揮する担体は、血流中で血栓形成が起こらないことを評価する系の確立、③急性時に局

所的な効果を発現する製剤，あるいは慢性的な全身からの出血を予防する製剤設計のための要件の確認など，*in vivo* 評価のフィードバックの段階を踏むことになる。

このような人工赤血球，人工血液の実現は，わが国の医療貢献はもとより，安全な血液が不足している多くの国に対しても大きな国際貢献と成り得る。民間で行うには採算性も重要であるが，まずは長期的そして全人類的な視野に立った開発を期待したい。現在ではバイオテクノロジーやオプトエレクトロニクス of 進歩により血小板の動的な機能に関する多くの情報が短期間に蓄積され，化学工学の進歩によって遺伝子組換え蛋白質の大量製造や担体の製剤化技術が飛躍的に進歩しているため，必ずや実用可能な系が創製されるものと信じている。

引用文献

- 1) 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司他: 酸素輸液(人工赤血球), 医学のあゆみ, 2003 ; 205 : 558-566
- 2) 土田英俊, 宗慶太郎, 酒井宏水他: 酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素供給, 麻酔, 2003 ; 52 : S55-S66
- 3) Sakai H, Tomiyama K, Sou K, *et al.* : Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state, *Bioconjugate Chem.*, 2000 ; 11 : 425-432
- 4) Sakai H, Takeoka S, Park SI, *et al.* : Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem.*, 1997 ; 8 : 23-30
- 5) Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, *et al.* : Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am. J. Physiol.*, 2002 ; 283 : H1191-H1199
- 6) Sakai H, Hara H, Yuasa M, *et al.* : Molecular dimensions of Hb-based O-2 carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am. J. Physiol.*, 2000 ; 279 : H908-H915
- 7) Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, *et al.* : Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am. J. Physiol.*, 1999 ; 277 : G1088-G1096
- 8) Kyokane T, Norimizu S, Tanihara H, *et al.* : Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology*, 2001 ; 120 : 1227-1240
- 9) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, *et al.* : Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers-Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am. J. Pathol.*, 2000 ; 159 : 1079-1088
- 10) 研究代表者 土田英俊, 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究」(H12-医薬-009)平成12年度~14年度, 総括研究報告書
- 11) 村田 満: 人工血小板(血小板代替物). 血液・免疫・腫瘍, 6 : 35-39, 2001
- 12) Agam G, Livne A.A : Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 22 : 105-112, 1992
- 13) Levi M, Friderich P, Ten C.W *et al.* : Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat. Med.*, 5 : 107-111, 1999
- 14) Chao F, Reddick R.L, Bode A.R *et al.* : Infusible platelet membrane microvesicles : a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion*, 36 : 536-542, 1996
- 15) Soslau G, Class R, Morgan D.A, Foster C, Lord S.T, Marchese P, Ruggeri Z.M : Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.*, 276 : 21173-21183, 2001
- 16) Murata M, Ware J, Ruggeri Z.M : Site-directed mutagenesis of a soluble recombinant fragment of platelet glycoprotein Ib α demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding. *J. Biol. Chem.*, 266 : 15474-15480, 1991
- 17) Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y : Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270 : 755-760, 2000
- 18) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y : Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296 : 765-770, 2002
- 19) Kainoh M, Tanaka T : Production of soluble integrin $\alpha_1\beta_1$ heterodimer complex functionally *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290 : 305-310, 2002
- 20) Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M, Ikeda Y : Reconstitution of adhesive properties of human platelets

- in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions : specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood*, 100 : 136-142, 2002
- 21) Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E : Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib alpha to size-controlled albumin microspheres, *Biomacromolecules*, 1, 290-5, 2000
 - 22) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H, Kainoh M, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E : Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306 : 256-260, 2003
 - 23) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E : Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules*, 2 : 1192-1197, 2001
 - 24) Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, Watanabe N, Suzuki H, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y : Fibrinogen γ - chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312 : 773-9, 2003
 - 25) Okamura Y, Takeoka S, Teramura Y, Maruyama H, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y : Hemostatic effects of fibrinogen-gamma chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles *in vitro* and *in vivo*, *Transfusion*, 2004. in press

Hemostatic Effects of Fibrinogen- γ Chain Dodecapeptide-Conjugated

Polymerized Albumin Particles *in vitro* and *in vivo*

Yosuke Okamura^{1), 4)}, Shinji Takeoka^{1)*}, Yuji Teramura¹⁾, Hitomi Maruyama²⁾, Eishun
Tsuchida³⁾, Makoto Handa⁴⁾, and Yasuo Ikeda²⁾

(Received:)

1) Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, 169-8555, Japan.
2) Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, 160-8582,
Japan. 3) Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University,
Tokyo, 169-8555, Japan. 4) Department of Transfusion Medicine & Cell Therapy, School of
Medicine, Keio University, Tokyo, 160-8582, Japan.

* To whom correspondence should be addressed.

e-mail : takeoka@waseda.jp, Tel : +813-5286-3217, Fax : +813-5286-3217

ABSTRACT

BACKGROUND We have studied prototypes of platelet substitutes and focused on a dodecapeptide, HHLGGAKQAGDV (H12), which is a fibrinogen γ -chain carboxy-terminal sequence (γ 400-411) and exists only in fibrinogen domain.

STUDY DESIGN AND METHODS H12 was conjugated to the surface of polymerized albumin particles (polyAlb) as biocompatible and biodegradable particles with average diameter of 260 ± 60 nm, and we evaluated a hemostatic ability of H12-conjugated polyAlb (H12-polyAlb) under flow conditions and thrombocytopenic rats.

RESULTS H12-polyAlb enhanced the *in vitro* thrombus formation of activated platelets on a collagen-immobilized plate when exposed to the flowing thrombocytopenic-imitation blood. Furthermore, the analysis of the tail bleeding time of rats that were made thrombocytopenic by busulphan injection showed that H12-polyAlb had a hemostatic effect. Based on the bleeding time and the amount injected, the hemostatic capacity of twenty H12-polyAlb particles was estimated to correspond to that of one platelet.

CONCLUSION These results were important first steps toward the development of platelet substitutes, and indicated that H12-polyAlb may be a suitable candidate for an alternative to human platelet concentrates transfused into thrombocytopenic patients in the future.

KEY WORDS: platelet substitutes, dodecapeptide (H12), polymerized albumin particles, thrombocytopenic-imitation blood, flow condition, thrombocytopenic rats, tail bleeding time

INTRODUCTION

Platelet transfusion plays an important role in supportive therapy of patients with thrombocytopenia caused by hematologic malignancies or cancer, or during surgical procedures and radiotherapy. However, the shortage of platelets has always been a serious problem because of the short storage life of platelet concentrates (72 hours in Japan). Also, the risk of viral and bacterial infections by transfusion is serious concern. Platelet substitutes such as solubilized platelet membrane protein-conjugated liposomes (Plateletsome)¹, infusible platelet membranes (IPM)², fibrinogen-bonded red blood cells³, fibrinogen-coated albumin microcapsules (Synthocyte)⁴, and arginine-glycine-asparaginic acid (RGD) peptide-bound red blood cells (Thromboerythrocyte)⁵ have been developed to solve these problems. Despite their usefulness in enhancing platelet aggregation and reducing bleeding time *in vivo*, these platelet substitutes consist of materials derived from blood components.

Platelet membrane glycoprotein (GP) Iba and GPIa/IIa are the receptors for von Willebrand factor (vWf) and collagen, respectively⁶⁻⁸. We have focused our studies on recombinant forms of these proteins (rGPIba^{9, 10}, or rGPIa/IIa complex¹¹⁻¹³), and have conjugated them to biocompatible carriers such as polymerized albumin particles (polyAlb)^{11, 14, 15} and phospholipid vesicles (liposomes)^{12, 13, 16}. In particular, we found that

rGPIa/IIa-conjugated polyAlb reduced the bleeding time of thrombocytopenic mice *in vivo* ¹¹.

Platelets that adhere to the collagen-immobilized surface are activated, and the conformation of GPIIb/IIIa which exists on platelet membrane changes from a silent state to an activated state ¹⁷. This leads to the binding of fibrinogen and vWf ^{18, 19}, followed by platelet aggregation ^{20, 21}. Fibrinogen contains three putative platelet interaction sites, namely a tetrapeptide containing RGD sequences such as RGDF and RGDS at α 95-98 and α 572-575, respectively ²², and a dodecapeptide (HHLGGAKQAGDV, H12) corresponding to a γ -chain carboxy-terminal segment (γ 400-411).

We have also developed fibrinogen-conjugated polyAlb, which was shown to facilitate the accumulation of flowing platelets into polyAlb aggregates after their attachment to an activated platelet-immobilized surface *in vitro* ¹⁴. These findings confirmed that such conjugates could emulate the function of platelets in primary hemostasis. However, fibrinogen from human blood is not stable, and its activity in solution is extremely low ¹⁴.

Recently, we focused on H12, which exists only in fibrinogen domain ²³⁻³⁰. Based on our result obtained from flow cytometric analyses of agglutination, the H12-conjugated latex beads showed minimal interaction with non-activated platelets in comparison with RGD-conjugated latex beads ³¹. Furthermore, H12-conjugated latex beads enhanced the *in*

in vitro platelet thrombus formation on collagen-immobilized plates when exposed to flowing thrombocytopenic- imitation blood ³¹.

In this study, we conjugated H12 to the surface of polymerized albumin particles (polyAlb) to produce biocompatible and biodegradable particles, and evaluated their effect on enhancement of thrombus formation on a collagen-coated surface in the presence of the H12-polyAlb when exposed to flowing thrombocytopenic-imitation blood *in vitro*. We prepared thrombocytopenic rats by busulphan administration, intravenously administered the H12-polyAlb particles into the rats and measured the tail bleeding time for evaluation of the hemostatic properties of the particles.

MATERIALS & METHODS

Reagents

A fibrinogen γ -chain dodecapeptide (C-HHLGGAKQAGDV, H12) or a reverse sequence of H12 (C-VDGAQKAGGLHH, control H12 (cH12)) was synthesized using a solid-phase synthesizer by BEX (Tokyo, Japan). *N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) and an anticoagulant D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone (PPACK) were purchased from Pierce Chemical (Rockford, IL) or Calbiochem (San Diego, CA). 3,3'-Dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆), which is a platelet fluorescent dye, was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Both busulphan and polyethylene glycol (the average molecular weight; 400) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Recombinant human serum albumin (rHSA) was kindly donated by Mitsubishi Pharma (Osaka, Japan).

Preparation of H12-polyAlb or cH12-polyAlb

A solution of rHSA (250 mg/mL) was dialyzed against distilled water for 6 hr at 4 °C to remove stabilizers such as *N*-acetyl D,L-tryptophan and sodium caproate. The rHSA solution (25 mL) was diluted with saline to 10 mg/mL, and the pH was adjusted to 10.7 (at room

temperature [r.t]) by titration with 0.1 N NaOH (800 μ L). The solution was heated to 80 $^{\circ}$ C for 10 min and rapidly cooled in an ice bath and then brought to r.t. The pH was adjusted to 6.1 at r.t by dropwise addition of 0.1 N HCl (900 μ L) and then the solution was stirred at 40 $^{\circ}$ C for 120 min until the turbidity reached 0.4 ± 0.1 . Excess iodoacetamide (25 mg) was added to terminate polymerization and the solution was dialyzed against PBS at 4 $^{\circ}$ C for 24 hr. A 25 mL dispersion of polyAlb ([rHSA] = 9.0 mg/mL, pH 7.4) was thus prepared. Average diameter was determined by a dynamic scattering method (Coulter N4 Plus submicron particle sizer, Beckman-Coulter, Miami). H12 was conjugated to the surface of polyAlb as previously described ¹⁵. A solution of SPDP in ethanol (20 mM, 15 μ L) was added to the polyAlb suspension (18 mg/mL, 10 mL), and the suspension was stirred for 30 min at r.t. The unreacted SPDP and the by-products were separated by repeated centrifugation and washing with saline (30,000g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C, 3 times), and the pyridyl disulfide-bonded polyAlb (PD-polyAlb) was collected. A suspension of PD-polyAlb (15 mg/mL, 10 mL) was mixed with a solution of H12 (100 mM, 20 μ L) and allowed to react at 20 $^{\circ}$ C for 12 hr. The unreacted reagents were removed by repeated centrifugation and washing with saline (30,000g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) to obtain the purified H12-conjugated polyAlb (H12-polyAlb, 10 mg/mL, 10 mL). The concentration of the H12 conjugated on the polyAlb was determined by

the quantification of the 2-thiopyridone (2TP) that was liberated by the thiol-disulfide exchange reaction, using high pressure liquid chromatography (HPLC) on a TSK-GEL G3000SW_{XL} column (7.8 mm o.d. x 300 mm h in PBS at 1 mL/min), by measuring the absorbance of the column effluent at 343 nm. The cH12-conjugated polyAlb particles (cH12-polyAlb) were prepared by the same method as mentioned above.

Platelet aggregation study

Blood withdrawn from healthy volunteers was mixed with 10% volume of 3.8% (w/v) sodium citrate. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation (100g, 15 min, 22 °C), and the platelet concentration of PRP was adjusted to $200 \times 10^3 /\mu\text{L}$ by platelet-poor plasma (PPP) prepared by centrifugation (2200g, 10 min, 22 °C). The platelet concentration was determined using an automated hematology analyzer (K-4500, Sysmex, Kobe, Japan). A 20 μM ADP solution was added to the PRP containing H12 or cH12 solutions adjusted to final concentration of 1 mM, and the light transmittance was measured with an aggregometer (Hema Tracer T-638, Nico Bioscience, Tokyo).

Preparation of a collagen-immobilized surface