

Fig. 1 Okamura et al.

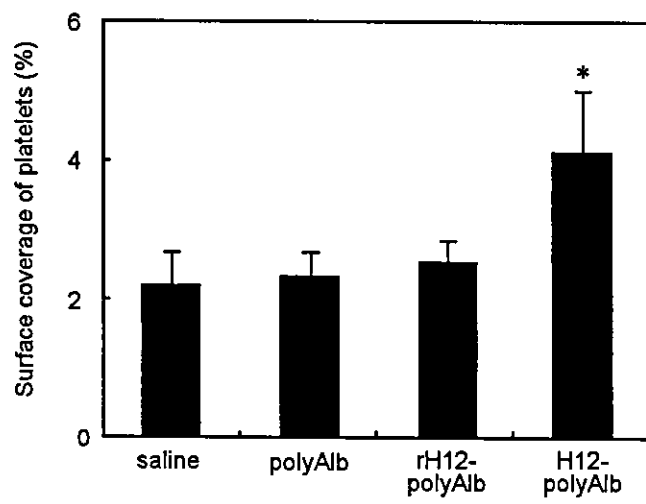


Fig. 2 Okamura et al.

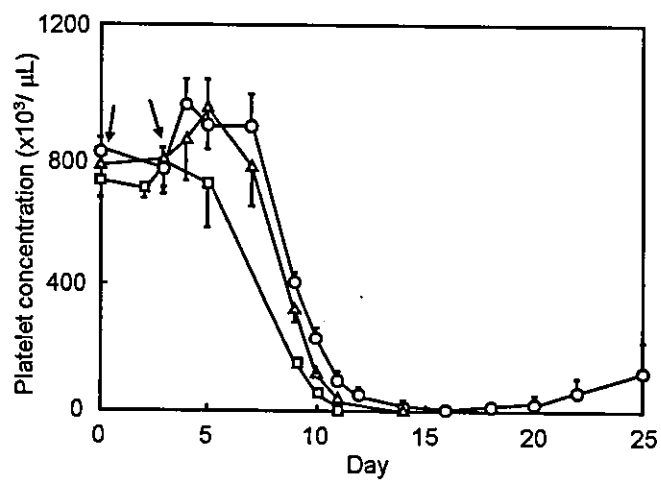


Fig. 3 Okamura et al.

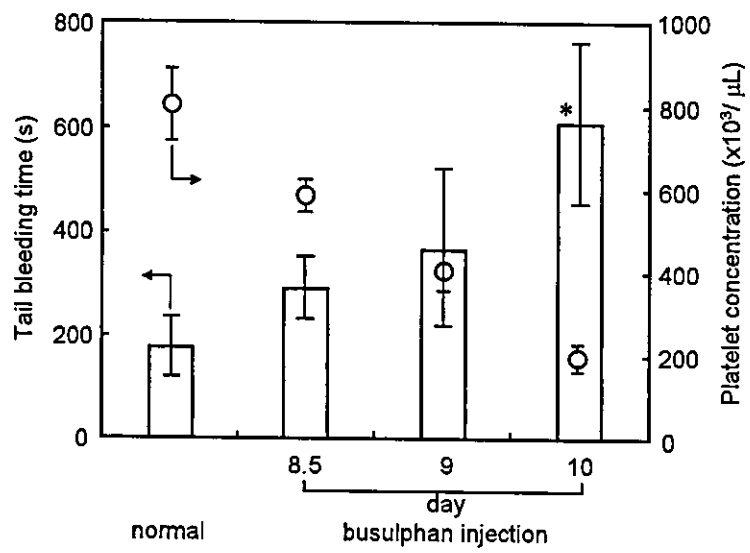


Fig. 4 Okamura et al.

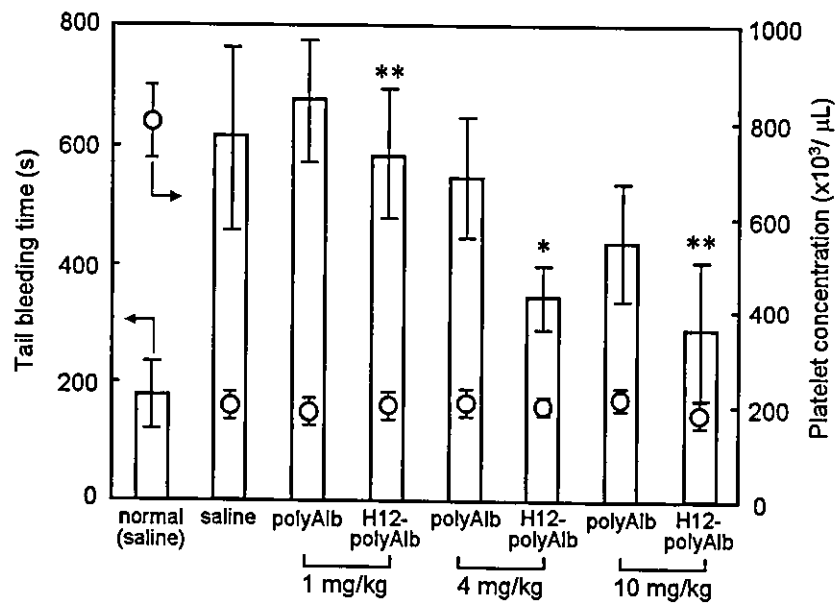


Fig. 5 Okamura et al.

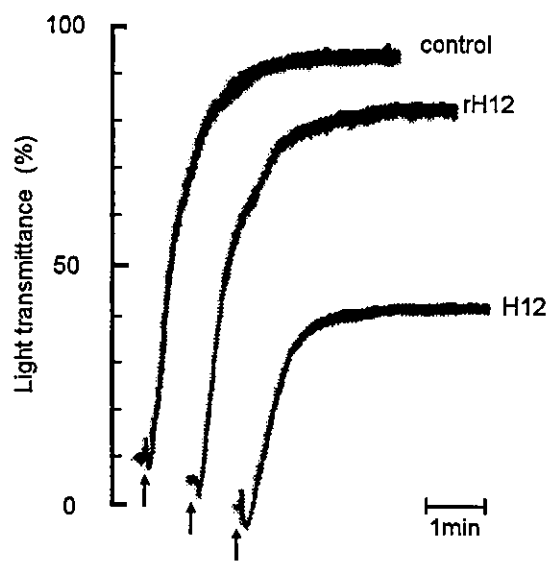


Fig. 1 Okamura et al.

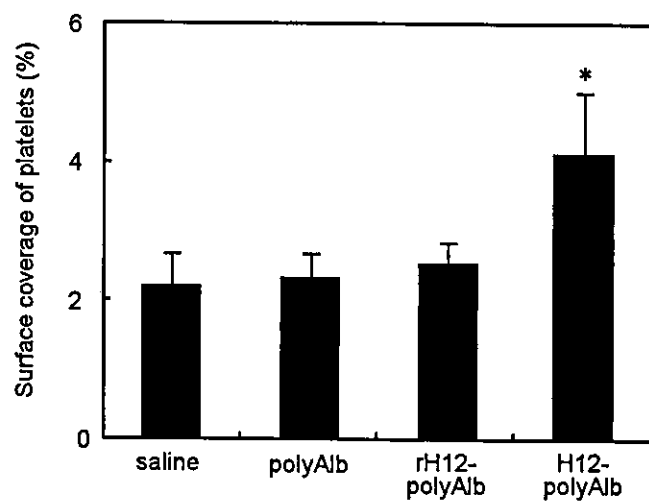


Fig. 2 Okamura et al.

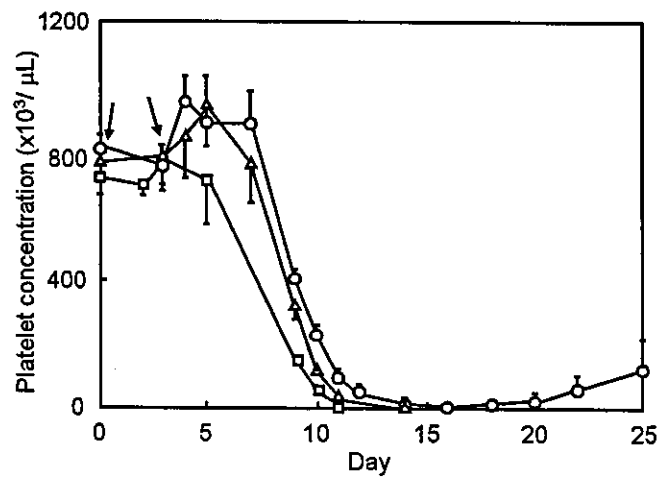


Fig. 3 Okamura et al.

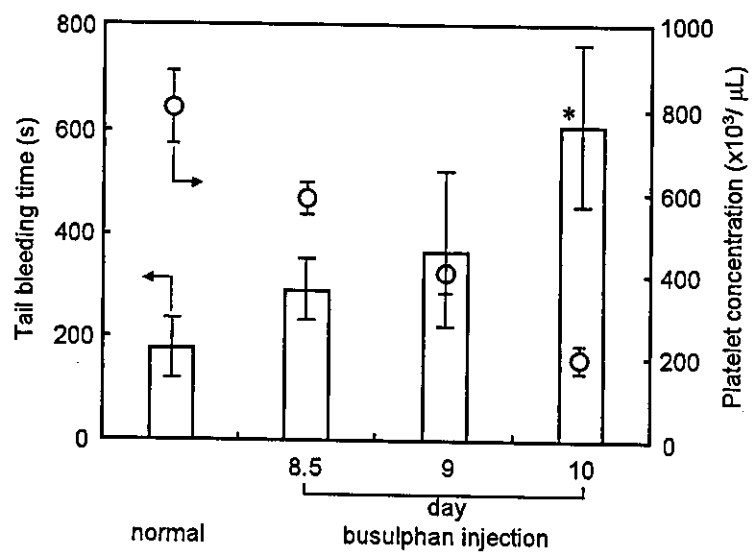


Fig. 4 Okamura et al.

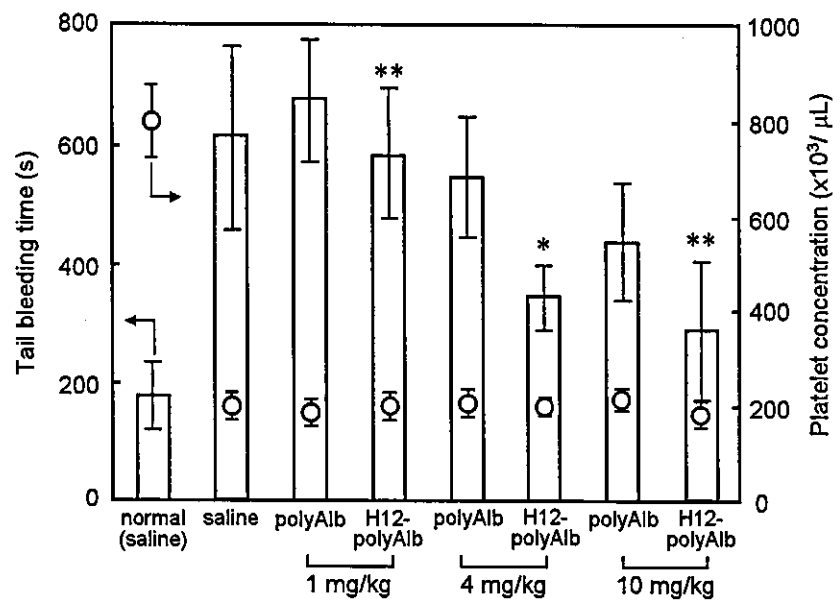


Fig. 5 Okamura et al.

機能性分子素子としての人工赤血球・人工血小板の構築

早稲田大学学術院

助教授 武岡 真司

I. はじめに

我々の研究グループ（厚生労働省科学研究、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，H16-医薬-067，069，071）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、リン脂質の二分子膜小胞体（リポソーム）に酸素を酸素分圧に応じて吸収・脱着する分子（ヘモグロビン）を内包させた機能性分子素子であり、これが血中に長く留まって安全、安定に酸素運搬機能を発現し続ける。後者は、血管損傷部位や活性化した血小板のみを認識する分子をリポソームやアルブミン重合体に担持した機能性分子素子であり、これが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。これらの分子素子には、適当な血液適合性や血中滞留性が求められるが、分解性や代謝物の低毒性も重要な検討項目である。このような観点から、リポソームや遺伝子組み換えヒトタンパク質の複合体や重合体を選択した。

II. ヘモグロビン小胞体の構造

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臨床研究が行われてきたが、機能や安全性の観点から満足できるものではなかった。現在我々のグループで開発を進めている、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ため早期の臨床試験着手が期待されている¹⁾。現段階では期限の切れた献血血液由来の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利用されるであろう。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、ウイルスや菌（もし含まれたとしても）は加熱やフィルター処理にて除去されている。生理活性なヘモグロビンを安定なリン脂質膜で包むことによって、ヘモグロビンに由来する副作用（血管収縮や腎毒性、神経毒など）が回避できる。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密封されているため、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）が保証されており、乾燥粉末では更に長期間の保存が可能である。製剤のヘモグロビン濃度は10g/dLであり、ヒト血液の値（11~15g/dL）と比較して遜色ない。また、ヘモグロビン分子が封入されているため製剤の膠質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

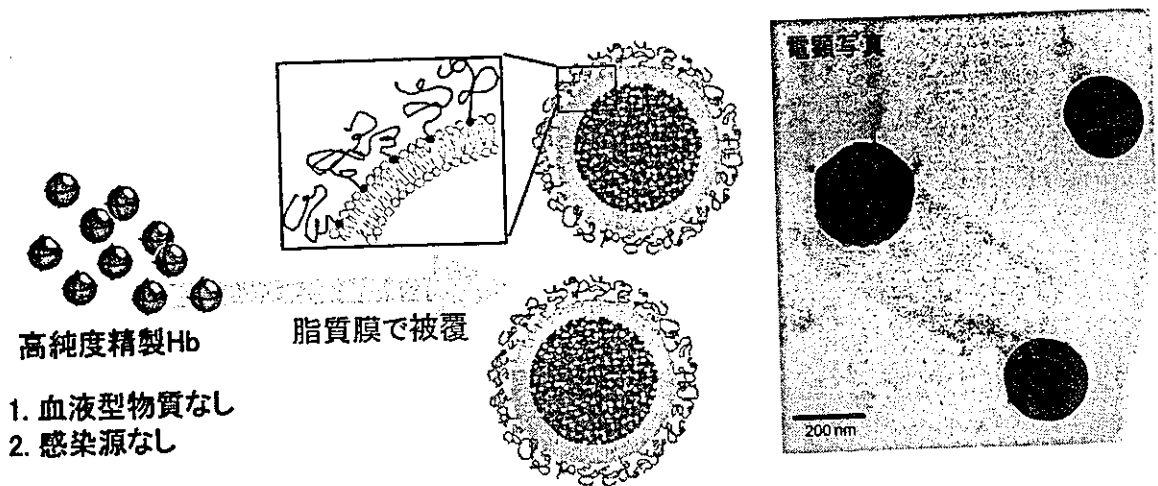
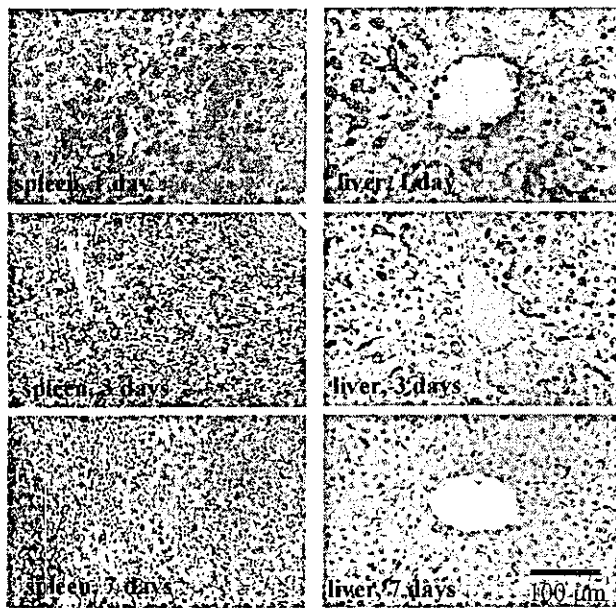


図1. ヘモグロビン小胞体構造の模式図ならびに透過型電子顕微鏡写真

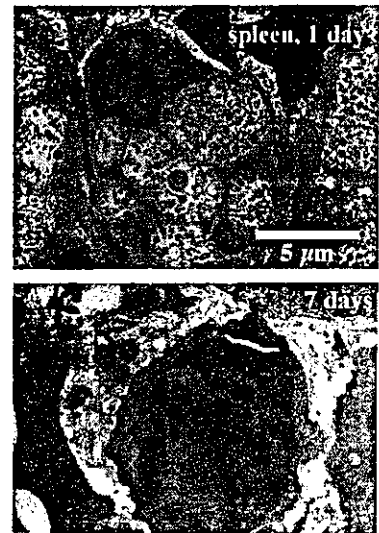
にはアルブミンや多糖類などのコロイド製剤と併用となる。図1の電子顕微鏡写真では、ヘモグロビンの鉄が染色されており、数多くのヘモグロビンが脂質分子膜で包まれた小胞体構造と、粒子径が約250nmに厳密に調節されていることがわかる。これは、赤血球の約30分の1程度であるので、梗塞部位の透過など赤血球にはない機能が期待できる。酸素親和度は、アロステリック因子である、ピリドキサル5'-リン酸の共封入により適当値に調節されている。脂質類の成分組成や含量には、ヘモグロビンのカプセル化効率、常温で2年間液状保存できる安定性、血流中での溶血の回避と適度な血中滞留時間（人では3日程度の半減期予測）、血小板や補体の活性化の回避など、を考慮した工夫が施されており、製造面でも従来の小胞体における課題が解決できている。

III. 動物試験による機能と安全性の評価

現在までに得られているヘモグロビン小胞体に関する評価試験成績を、簡単に紹介する。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いる。また、ビーグル犬を用いた出血性ショックに対する投与効果試験や、霊長類を用いた安全性試験が進行している。酸素運搬効果を確認する試験として、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²⁾。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³⁾。安全面では、血管弛緩因子である一酸化窒素や一酸化炭素が関与して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、ヘモグロビン小胞体では認められなかった。これには、ヘモグロビン小胞体の大きさが寄与してい



HbV由来のヒトHbを抗ヒトHb抗体を使って染色。
赤い部分がHbVの存在部位。7日で殆ど消失。



脾臓マクロファージの電顕写真。投与1日後にファゴソームに捕捉されたHbV粒子が見られるが、7日後に完全消失。

Am. J. Pathol. 159, 1079-1088 (2001)

図2. 脾臓・肝臓に貪食されたヘモグロビン小胞体の挙動

るものと思われる^{4,5)}。ヘモグロビン小胞体の血中滞留時間は、ラット、ラビット、カンクイザルからヒトへ類推すると、3日程度の半減期が見積もられ、緊急時の単回投与では十分とされる。図2の左図では、ラットの脾臓と肝臓の組織標本を抗ヒトヘモグロビン抗体にてヘモグロビン小胞体中のヒトヘモグロビンを免疫染色し、マクロファージに貪食されたヘモグロビン小胞体が消失する様子を表している写真である。血中半減期が1から1.5日であるので、投与1日後には脾臓や肝臓に貪食されていたヘモグロビン小胞体は3日後には激減し、投与7日以内にはほとんど消失していることがわかる。透過型電子顕微鏡観察では、投与1日後にはファゴソーム中に図2の右図のようなヘモグロビン小胞体が多数観察されるが、7日後にはまったく観察されず、代謝されていることがわかる。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、鉄の沈着、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、大量出血時の緊急対応では十分なる機能を発現するものと期待されている⁶⁾。

IV. 人工血小板分子素子の設計

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など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不可能であろう。しかし、血小板の粘着と凝集に着目して、これら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補助ができるものと考えられる。我々は、血小板膜蛋白質の一部の遺伝子組換え体や合成ペプチドを担持させた微粒子を作成し、これらが血小板を巻き込んで出血部位へ集積することによって止血能が発現されることを期待して、研究を進めている。

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にした様に、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 GPIIb/IIIa 抗体を添加して GPIIb/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 GPIaIIa($\alpha_2\beta_1$ 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 GPIIb/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、この活性体を認識して、血小板間を架橋し凝集体を形成して一次止血を担う。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。我々は、高ずり速度の血流下で vWf を介してコラーゲンを認識する GPIb α 、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 を認識するフィブリノーゲン(Fbg)やその認識部位であるペプチドを候補とした。

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)

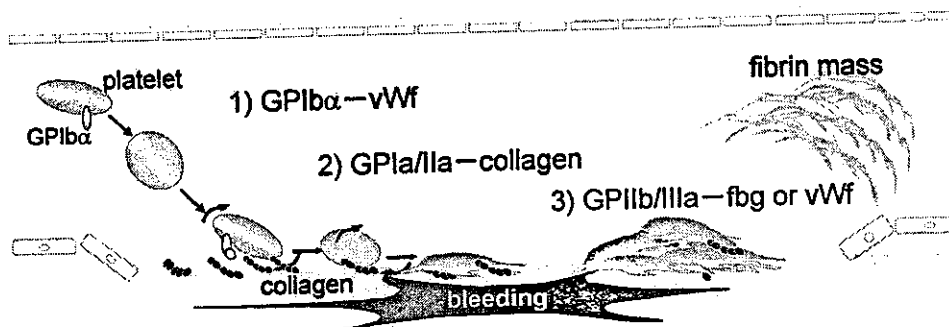


図3. 血小板の止血機構

V. 人工血小板の研究動向

採血液に抗 GPIIb/IIIa 抗体を添加して GPIIb/IIIa を阻害すると、血小板表面の GPIb α との相互作用によって 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る。そして、rGPIb α を担持させたリン脂質小胞体でも血小板と同様に vWf 基板上を転がること が確認された⁷⁾。転がる小胞体の数はずり速度が高くなるほど多くなり、rGPIb α の特性が 確認できた。また、その転がり速度は小胞体を構成する膜の柔軟性と相関した⁸⁾。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。他方、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(図4)、出血部位での充填効果が期待できる。表面に rGPIb 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 rGPIb α を物理吸着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 rGPIb α 機能の発現の仕方が異なること が示唆された。

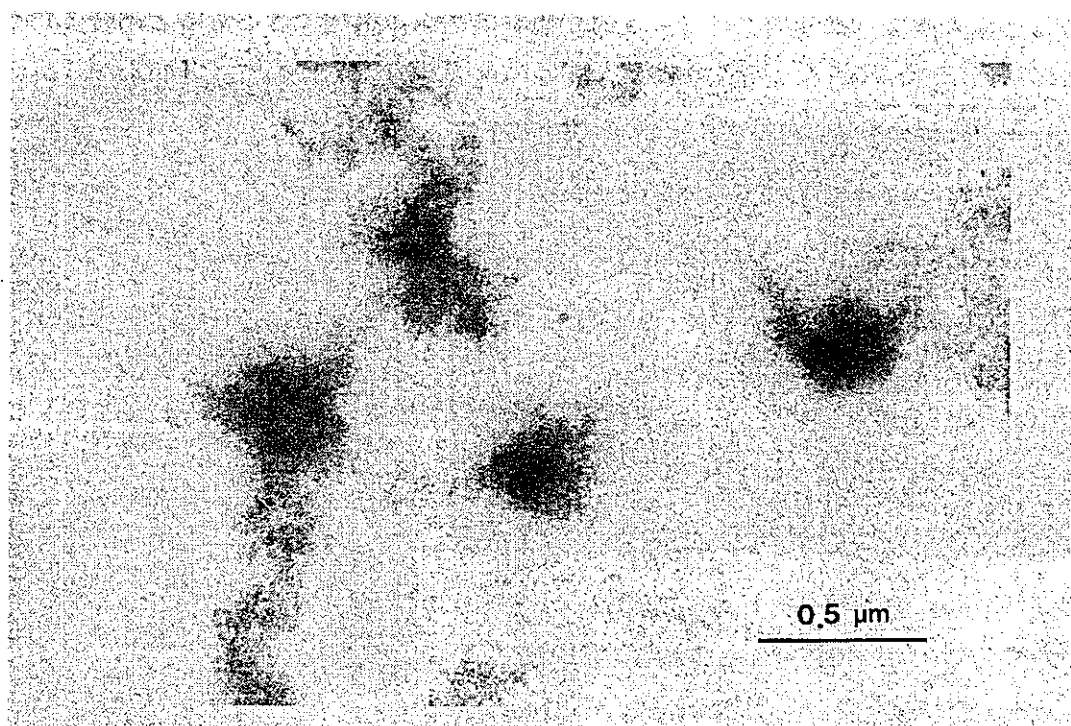


図4. アルブミン重合体 (ヘミン担持による染色) の透過型電子顕微鏡写真

rGPIaIIa を担持させた小胞体やアルブミン重合体は低ずり速度下でコラーゲン表面に粘 着した。また、Fbg の γ 鎖 C 末端アミノ酸序列 (HHLGGAKQAGDV) を結合させた小胞体やアル ブミン重合体は、低ずり速度下で活性化した血小板のみと相互作用して凝集する Fbg の機 能が安定に保持されていることを確認した⁹⁾。

走査型電子顕微鏡でのリポソームやアルブミン重合体の観察は困難であるので、rGPIb

α や H12 を各々担持させた 2 種類のラテックスビーズ ($5 \times 10^4 / \mu\text{L}$ ずつ) を血小板減少血液 ($[\text{PLT}] = 2.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$, 正常値の 1/10) に添加し静置後 (37°C , 10min)、コラーゲン基板上を流動させ (ずり速度 1600s^{-1}) た。この基板を HEPES buffer (pH 7.4) にて洗浄後、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウムにて固定した。エタノール置換、*t*-ブタノール置換を経て、凍結乾燥させた。オスミウムプラズマコーターにて処理後、走査型電子顕微鏡観察した。図 5 に典型的な血小板血栓を示すが、抗 GPIIb/IIIa 抗体の金コロイドが付着している粒子が rGPIIb/IIIa 担持体で、付着していない粒子が H12 担持体である。血流の高ずり応力がかかる血栓の側面には rGPIIb/IIIa 担持体が、低ずり応力がかかる正面や背面には H12 担持体が集中して結合している様子が観測され、両方の担持体が協同的に働いて血栓の増強に寄与していることが示唆された。

現在、rGPIIb/IIIa、rGPIIb/IIIa、H12 を担持したアルブミン重合体を、血小板減少モデルラットに投与して、尻尾からの出血時間の測定からその効果を評価しているが、どれも有意な止血効果を示している。さらに、リポソーム系の評価やこれらの混合系の評価などを進めることによって、より効果的な人工血小板システムが構築できるものと期待される。

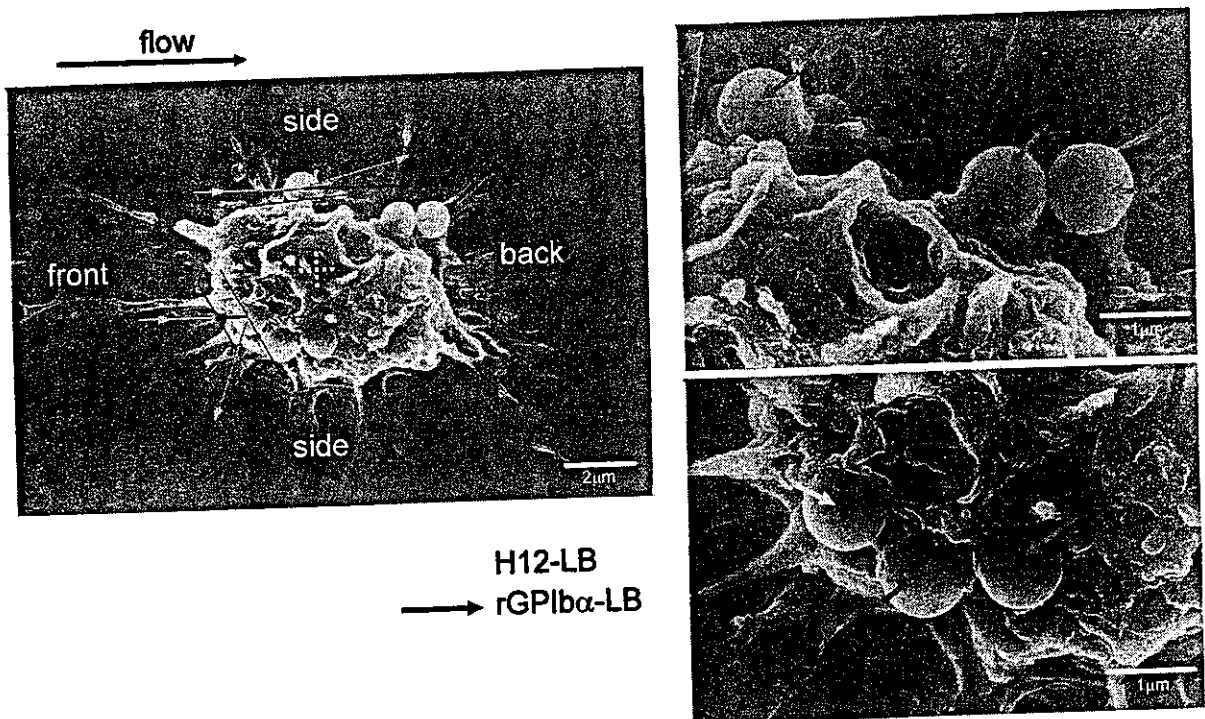


図 5. コラーゲン基板上に rGPIIb/IIIa 結合ラテックスビーズと H12 結合ラテックスビーズを混合した血小板減少血液を高ずり速度で流動させた時の、血栓状態の走査型電子顕微鏡観測 (東京都臨床医学総合研究所 鈴木英紀博士の協力による)

VI. おわりに

人工赤血球や人工血液の実現は、バイオロジクス領域における分子素子の開発の具体的

な成果として、我が国の近未来医療への貢献はもとより、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。採算性も重要であるが、安全性評価のための多角的、長期的な評価、そして全人類的な視野に立った開発が重要であろう。

VII. 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) 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.
- 3) 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.
- 4) Sakai H, Hara H, Yuasa M, *et al*: Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol* 2000;279:H908-H915.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

人工赤血球・人工血小板の 開発の現状

武岡真司

早稲田大学理工学術院

はじめに

筆者の所属する研究グループ（早稲田大学理工学総合研究センター）は、慶應義塾大学医学部と共同して厚生労働省科学研究、医薬品・医療機器などレギュラトリーサイエンス総合研究事業、H16-医薬-067, 069, 071により人工赤血球と人工血小板の研究を推進している。人工血液全体の現状に関しては、厚生労働省科学研究の研究代表者小林絃一教授による本誌「講座」に詳しい¹⁾。本「講座」では、これらの厚生労働省科学研究の成果の一部も含めて報告する。人工赤血球は、リン脂質の二分子膜小胞体（リポソーム）に酸素を酸素分圧に応じて吸・脱着する分子（ヘモグロビン）を内包させた酸素運搬体であり、これが血中に長く留まって安全、安定に酸素運搬機能を発現し続ける。それに対して人工血小板は、血管損傷部位や活性化した血小板のみを認識する分子をリポソームやアルブミン重合体に担持した微粒子であり、これが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。筆者らは理工学の立場から人工赤血球や血小板の材料となる担体の設計、製造、物性評価を行ってきた。担体には、適当な血液適合性や血中滞留性が求められ

キーワード：人工赤血球，人工血小板，
ヘモグロビン

Seminar

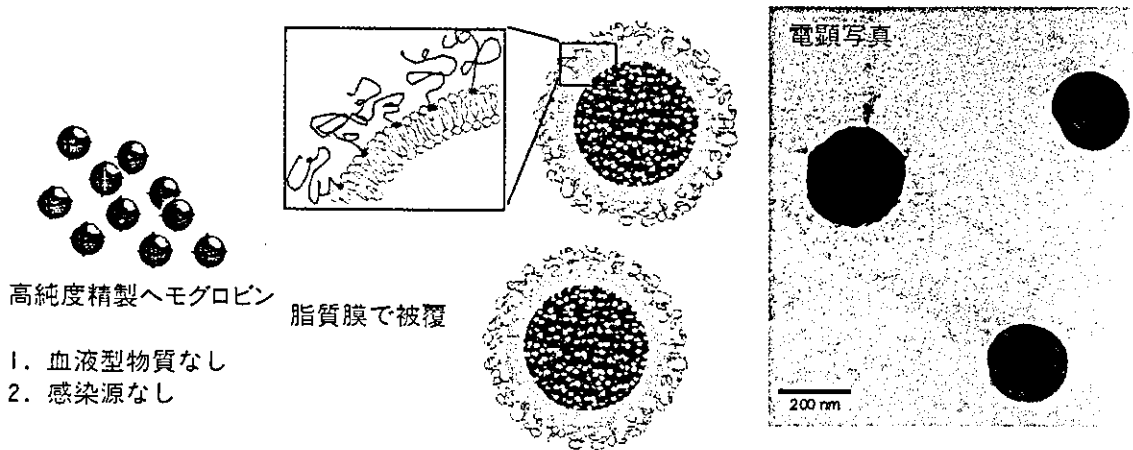
Current Development of Artificial Red Blood Cells and Artificial Platelets
Shinji Takeoka (Waseda University, Faculty of Science and Engineering)

〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1
早稲田大学理工学術院；教授

るが、分解性や代謝物の低毒性も重要な検討項目である。現在担体として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複合体や重合体を選択して用いている。

1. ヘモグロビン小胞体の構造

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。筆者の所属するグループで開発を進めている、高濃度ヘモグロビンをリポソームの内水相に内包させた、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ため早期の臨床試験着手が期待されている²⁾。現段階では期限の切れた献血血液由来の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み換えヒトヘモグロビンが利用されるであろう。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タンパク質、ウイルスや菌（もし含まれたとしても）を加熱やフィルター処理で除去されている。生理活性なヘモグロビンを安定なリン脂質膜で包むことによって、ヘモグロビンに由来する副作用（血管収縮や腎毒性、神経毒など）を回避できる。ヘモグロビン小胞体は生理食塩液に分散され、脱酸素状態で容器に密封されているため、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）が保証されており、乾燥粉末ではさらに長期間の保存が可能である。製剤のヘモグロビン濃度



図① ヘモグロビン小胞体の構造と模式図ならびに透過型電子顕微鏡写真。

は 10 g/dl であり、ヒト血液の値 (11~15 g/dl) と比較して遜色ない。また、ヘモグロビン分子が封入されているため製剤の膠質浸透圧はほとんどゼロである。したがって、膠質浸透圧の調節が必要となる場合にはアルブミン (リコンビナント) や多糖類などのコロイド製剤と併用となる。図①の電子顕微鏡写真では、ヘモグロビンの鉄が染色されており、数多くのヘモグロビンが脂質分子膜で包まれた小胞体構造であることと、粒子径が約 250 nm に厳密に調節されていることがわかる。これは、赤血球の約 1/30 程度の粒子径であるので、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、ピリドキサル 5'-リン酸の共封入により適当値に調節されている。脂質類の成分組成には、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、血流中での溶血の回避と適度な血中滞留時間 (人では 3 日程度の半減期予測)、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いる。製造面でも分子集合技術を利用した粒子径の厳密な制御と高濃度ヘモグロビンの内包など、従来の小胞体における課題が解決できている³⁾。

2. 動物試験による機能と安全性の評価

現在までに結果が得られているヘモグロビン小

胞体に関する評価試験成績を簡単に紹介する。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十分確認できている。また、現在霊長類を用いた安全性試験が進行している。酸素運搬効果を確認する試験として、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で 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⁾。さらに NZW 兎を用いた検討では、人工呼吸下、脱血し平均血圧を 30~35 mmHg に低下させた後、ヘモグロビン小胞体分散液を投与し、組織酸素分圧の多点測定を実施、とくに脳と腎臓でヘモグロビン小胞体が有意な回復効果を発揮することを明らかにしている⁶⁾。中型動物を用いた実験としてビーグル犬 (約 7 kg) を用い人工呼吸下、脾臓摘出後アルブミンで 75% 血液希釈後さらに 30% 脱血し、30 分経過後に人工赤血球を投与し、循環動態、血液ガス組成、組織酸素分圧、組織酸素化度、心拍出量、血中酸素濃度の回復が確認されている⁷⁾。

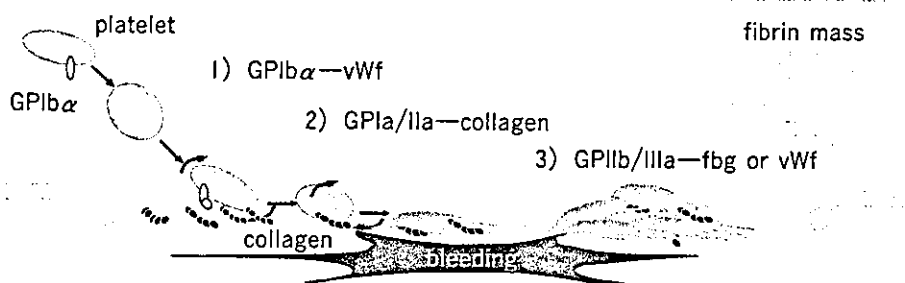
安全面では、血管弛緩因子である一酸化窒素や一酸化炭素が関与してヘモグロビンに認められる抵抗血管の収縮と血圧亢進は、ヘモグロビン小胞体では認められなかった^{8,9)}。これは、ヘモグロビン小胞体の大きさが寄与しているものと思われる。ヘモグロビン小胞体の血中滞留時間は、ラット、ラビット、カニクイザルからヒトへ類推すると、3日間程度の半減期として見積もられ、緊急時の単回投与では十分とされる。ラットでは、血中半減期が1~1.5日間であるので、脾臓や肝臓の病理組織学的所見では、投与1日後には脾臓や肝臓に貪食されていたヘモグロビン小胞体は3日後には激減し、投与7日以内にはほとんど消失していた¹⁰⁾。また、ラットでの単回交換投与(循環血液量の40%交換)、反復負荷投与(10 ml/kg/day, 14日間)による血液生化学試験(30項目)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、鉄の沈着、細網内皮系の肥大が一過性に認められた以外に変動を認めていない¹¹⁾。その他免疫系、凝固系への影響も認められておらず、大量出血時の緊急対応では十分な機能を発現するものと期待されている。

上述のような効果と安全性の高い人工酸素運搬体では、輸血の代替以外にさまざまな適応が検討されている。たとえば体外循環回路補充液として

の利用の検討では、ラット体外循環モデルの作成のため小型人工心肺を試作し、ヘモグロビン小胞体分散液を充填液として使用、血液交換率が50%以上になる条件で灌流させた後、灌流回路中のヘモグロビン小胞体を分離除去して赤血球を回収して投与し、長期生存できることを確認している¹²⁾。虚血性疾患の治療への利用においても、虚血再灌流実験などで小粒径のヘモグロビン小胞体の効果を実証する *in vivo* 実験が進められている。*in vitro* では、微小血管モデル内を流動するヘモグロビン小胞体の酸素放出挙動の解析から、虚血領域酸素化の機序解明を進められている^{13,14)}。人工酸素運搬体は、腫瘍組織酸素化にも有効であることを実証し、新しい適応の可能性を提示された¹⁵⁾。

3. 人工血小板の開発の考え方

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などの複雑な機能を持ち、これらのすべてを兼備した血小板代替物の構築は事実上不可能であろう。しかし、血小板の粘着と凝集に着目して、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補助ができるものと考えられる。筆者らは慶應義塾大学医学部内科 池田康夫教授のグループ



図② 血小板の止血機構。
 一次止血(血小板血栓)
 1) 接着(tethering → rolling) GPIb α -vWf
 2) 粘着(adhesion) GPIIb/IIIa-collagen
 3) 凝集(aggregation) GPIIb/IIIa-fbg or vWf
 二次止血(フィブリン血栓)