

200501/00A

厚生労働科学研究費補助金  
医薬・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17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18（2006）年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
医薬・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：H17-医薬-070)

平成17年度  
総括・分担研究報告書

平成18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 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

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

村田満 慶應義塾大学医学部 教授

梶村真弓 慶應義塾大学医学部 助手

## 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17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
    - 血小板減少ラビットの作製法の確立とフィブリノーゲン $\gamma$ 鎖ドデカペプチド結合ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン重合体の止血効果
  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 $\gamma$ 鎖ドデカペプチド結合(アデノシン5' -二リン酸内包)リン脂質小胞体の *in vitro*, *in vivo* 評価
  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
    - 凝集系における H12 結合 ADP 内包リポソーム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動的機能評価 後藤 信哉
    - アルブミン重合体のサイズ担持蛋白が形成される止血、病的血栓の3次元集積部位の決定におよぼす役割
  5. 高ずり速度下での血栓形成機序解析 村田 満
    - rGPIIb $\alpha$ -liposome、rGPIIb $\alpha$ -polyAlb の効果及び安全性評価の検討
  6. 人工血小板の微小循環動態特性の生体内解析 梶村真弓
    - レーザーアブレーション法による血小板血栓形成モデルを用いて
  7. 人工粒子上でのインテグリン構造の制御 鎌田 徹治
    - $\alpha$ IIb $\beta$ 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

平成 17 年度 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  
総括研究報告書

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

【研究目的】本研究の目的は、血小板の機能を代替し、血小板減少時の止血治療や予防に十分な効果を発揮し得る人工産物（人工血小板／血小板代替物）として開発された人工微粒子（認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体）の安全性と止血機能を評価することである。

【研究方法】人工血小板の候補微粒子として、①フィブリノーゲンの $\gamma$ 鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)を担持させたアルブミン重合体(H12-polyAlb)、②アデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させたリポソーム（小胞体）(H12(ADP)小胞体)、及び③GPIIb $\alpha$ 結合リポソーム・アルブミン重合体(rGPIIb-小胞体・rGPIIb-polyAlb)を検討した。

1. *in vitro* 評価：調整した血小板減少血液等を用いて、件の人工微粒子の、血小板凝集計やフローサイトメトリーによる非流動条件下での血小板凝集、フローチェンバーや全血血小板機能測定装置 PFA-100 用いた流動条件下血小板血栓形成、生化学的検査、凝固学的検査測定値、への影響の検討や、人工微粒子と凝集血小板の相互作用の電子顕微鏡（電顕）を使った超微形態学的解析を行った。また、新規人工血小板開発に資するために、CHO 細胞発現系を用い、血小板接着因子である GPIIb/IIIa 複合体 ( $\alpha$ IIB $\beta$ 3 インテグリン) の活性化の構造分子学的メカニズムを解析した。

2. *in vivo* 評価：血小板減少ラットモデルにおいて、人工微粒子の静脈内投与による出血時間を使った止血効果や、ラット腹部大動脈シャント血栓形成モデルにおける病的血栓形成への影響を検討した。さらに、ウサギを使用した大型動物血小板減少モデルの確立ならびに人工微粒子の効果の評価も行った。また、ラット腸間膜微小循環を用いたレーザーアブレーション(laser ablation)法による微小血栓評価モデルの確立を目的とした基礎検討を行った。

### 【研究結果及び考察】

1. H12-polyAlb の安全性と止血効果：前年度に引き続き、その安全性と *in vivo*

止血効果を確認した。すなわち、血小板減少ラットの出血時間を用量依存性に有意に短縮させ、また、投与動物に明らかな急性毒性を示さなかった。そして今回、ブスルファン投与によるウサギ血小板減少モデルを確立し、大型動物においても *in vivo* 止血効果を確認した。しかし、その効果はラットに比較して弱かった。ウサギでは血小板減少の程度が高く、より高用量の微粒子濃度が必要な可能性が示唆された。また、流動条件下でのコラーゲン表面への *ex vivo* 3次元血栓形成に及ぼす止血効果（血小板凝集増強作用）が確認され、過剰血栓や脆弱血栓の形成は認められなかった。大きさや形状、表面処理の状態、担持分子の密度などのパラメータを用いた微粒子の最適化がさらに必要である。

2. H12(ADP)小胞体の開発と止血効果：血小板減少ラットモデルを用い H12 小胞体が止血効果を有することを前年度に報告した。しかしながら、その作用は H12-polyAlb に比較して弱かった。そこで、機能強化を図る目的で生理な血小板刺激作用を有するアデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた H12(ADP)小胞体を作成した。H12(ADP)小胞体は血小板凝集計においてアゴニスト惹起血小板凝集の増強作用を示し、静止条件下での血小板との共存では血小板活性化作用を認めないことがフローサイトメトリー法で確認された。さらに、血小板減少ラットの出血時間を短縮させ、その効果は H12 小胞体に比べ大幅に増強された。また、電顕による形態的観察により、H12(ADP)小胞体は球形を示し、血小板凝集に際して、血小板間に存在し、活性化した血小板同士の相互作用を仲介することで、その止血増強作用を発揮することが示唆された。ADP などの内包物質の選択により、止血機能を自由に修飾できる可能性が示された。

3. rGPIb-小胞体・rGPIb-polyAlb の評価：ヒト血漿や血清に添加しても生化学的検査値や凝固系検査値に影響を及ぼさなかった。血小板減少血液を使い PFA-100 用いた高血流条件下での血小板血栓による閉塞時間は、高濃度の微粒子存在下で延長傾向を示した。一方、正常血小板数のラットにおいて、血栓による大動脈シャントの閉塞時間は短縮傾向を認めた。GPIb $\alpha$ 結合微粒子に関してはより詳細な *in vitro* 評価が今後の課題である。

4. 評価システムの開発と基礎知識の取得：レーザーアブレーションにより微小血管に破綻性出血を作製し、障害部位で形成される血小板血栓周辺での血小板や人工微粒子の挙動をリアルタイムで撮像する imaging 技術が構築された。また、細胞発現系を用いた検討により、血小板活性化に伴い高親和性のフィブリノーゲン受容体機能を発揮する $\alpha$ IIB $\beta$ 3 インテグリンは、複合体分子の細胞膜近

傍の細胞外部分の $\alpha/\beta$ stalk の解離によって活性型への変換することが明らかとなった。 $\alpha/\beta$ stalk を制御することで、本物の血小板に類似した、細胞活性化依存性の機能を備えた人工物の創製への道が開かれるかもしれない。

【結論】止血機能を有する人工微粒子（認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体）の有力な候補として、前年度から検討を加えてきた H12-polyAlb とともに、同等の機能を有する H12(ADP)小胞体が新たに創製された。*in vitro* のみならず *in vivo* においても、過剰な血栓の誘発など安全性への危惧を惹起させる結果は認められなかった。ラットに加え、ウサギ血小板減少モデルが構築され、さらに微小循環での止血血栓の形成をリアルタイムで映像評価できるラットモデルが開発できた。多方面からの安全性評価とともに微粒子の止血機能の最適化を行い、血小板代替物の実用化を目指してゆく。

(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 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

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

村田満 慶應義塾大学医学部 教授

梶村真弓 慶應義塾大学医学部 助手

## A. 研究目的

本研究の目的は、血小板の機能を代替し、血小板減少時の止血治療や予防に十分な効果を発揮し得る人工産物（人工血小板／血小板代替物）として開発された人工微粒子（認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体）の安全性と止血機能を評価することである。

周知のように、血小板濃厚液は癌などの化学療法や外科手術の補助治療

法として不可欠で、輸血用血液製剤（単位）の約半分を占めその供給はプラトーに達している。さらに、血小板献血量の減少と短い保存期間（72 時間）による供給不足に加えて緊急時の供給体制が全く整っていない。さらに、ウイルス感染症などの輸血副作用発現の危険性を排除できず、その危険性を有する同種血輸血を可及的に回避し得る人工血小板の開発ならびに臨床応用は、21 世紀医療において当然目

指すべき方向である。常時使用可能な人工血液の開発促進は平成 15 年度に施行された血液法（安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律）にも明記され、血液事業の効率化のみならず、緊急災害時の備えの観点からも血液行政の最重点課題の一つとされている。

実際、我々は平成 9 年度より厚生科学研究費補助金（当時）の支援を受け、血小板の止血機能を代替した人工産物の創製に向けた基礎研究を開始した。一方、米国では 1980 年代後半より主に軍事的な利用への要求から、血小板代替物の開発が始められていた。しかしながら、いずれもヒト血液成分由来の原料に依存しており、感染症回避の課題は完全には解決されておらず、また、実施された臨床試験は前臨床の段階で全て中断されており、血小板代替物の有効性と安全性に大きな課題を残した。

このような背景のもと、我々はすべてが人工物で構成されたハイブリッド型人工微粒子を着想して、開発するに至った。すなわち、出血部位においてのみ粘着・凝集などの血小板が有する止血機能が発揮される人工代替物（人工血小板）の創製である。微粒子としては生体適合性に優れ、形状変化や表面修飾が可能なリコンビナントのヒトアルブミンを変性させて作成

したアルブミン重合体と脂質小胞体（リポソーム）を、その表面に結合させて止血部位への特異性を規定する認識分子として接着分子受容体とそのリガンド分子（リコンビナント蛋白や人工ペプチド）を選択した。

実際、平成 12 年度～14 年度厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）の支援を受けた研究により、血管損傷部位に特異的に集積し得る人工微粒子（GPIIb/IIIa 結合微粒子、GPIIb/IIIa 結合微粒子）の作成、さらに、血管障害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人工微粒子（フィブリノーゲンの $\gamma$ 鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)を担持させた H12 結合微粒子)の作成に成功した。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厚生労働科学研究（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）において、初年度は、主に *in vitro* の評価系を用いて、血流条件下での血小板機能の発現様式を評価し、さらに血小板減少ラットモデルを確立して、それらの候補微粒子が生体内で止血機能を有することを明らかにした。平成 16 年度には血小板減少ラットモデルを使用した詳細



な検討により、GPIa/IIa 結合微粒子や H12 結合微粒子が血小板に匹敵した十分な止血能を有することが確認でき、微粒子表面をポリエチレングリコール (PEG) 化することで生体内半減期の大幅な延長が達成された。

本年度は、①前年度に引き続き H12 結合微粒子 (H12-polyAlb) の安全性と *in vivo* 止血効果を、血小板減少ラットモデルで最適化を目的として再確認し、②大形動物モデルとして血小板減少ウサギを用いた出血時間測定系を確立した。また、③H12 結合微粒子としては H12-polyAlb と比較してその止血効果が弱い H12 小胞体の機能強化を図る目的で生理な血小板刺激作用を有するアデノシン 5'-二リン酸 (ADP) を内包させた H12 (ADP) 小胞体の作成を行い、その *in vitro*、*in vivo* 機能評価を行った。さらに、④GPIb $\alpha$  結合微粒子 (rGPIb-小胞体・rGPIb-polyAlb) の安全性を評価する目的で、生化学や血液凝固検査測定値への影響を観察するとともに、病的血栓への影響をみるために、血栓によるラット腹部大動脈シャントの閉塞時間への作用について解析した。そして、⑤今後の研究に資する基盤として不可欠な基礎技術の開発や基礎知識の取得を目的として、ラット腸間膜微小血管の破綻性出血をレーザーアブレーションにより惹起し、形成される止

血血栓をリアルタイムに撮像する imaging システムを構築し、また、血小板活性化に伴い惹起される  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンの高親和性フィブリンノーゲン受容体への変換は、その細胞膜近傍の細胞外部分の  $\alpha/\beta$  stalk の解離によってもたらされることを明らかにした。

## B. 研究方法

人工血小板の候補微粒子として、①フィブリンノーゲンの  $\gamma$ 鎖 C 末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させたアルブミン重合体 (H12-polyAlb)、②アデノシン 5'-二リン酸 (ADP) を内包させたリポソーム (小胞体) (H12 (ADP) 小胞体)、及び③GPIb $\alpha$  結合リポソーム・アルブミン重合体 (rGPIb-小胞体・rGPIb-polyAlb) を検討した。

1. *in vitro* 評価系：調整した血小板減少血液 (ヒト、ラット) 等に人工微粒子を添加して検討した。①血小板凝集計 (武岡、鈴木) やフローサイトメトリー (武岡) による非流動条件下での血小板凝集、②フローチェンバー (後藤) や全血血小板機能測定装置 PFA-100 (村田) を用いた流動条件下血小板血栓形成、③生化学的検査、凝固学的検査測定値 (村田)、への影響の検討や、④人工微粒子と凝集血小板の相互作用の電子顕微鏡 (電顕) を使

った超微形態学的解析を行った（鈴木）。また、⑤新規人工血小板開発に資するために、CHO 細胞発現系を用い、血小板接着因子である GPIIb/IIIa 複合体（ $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリン）の活性化の構造分子学的メカニズムを解析した（鎌田）。

2. *in vivo* 評価系：①血小板減少ラットモデルにおいて、人工微粒子の静脈内投与による出血時間を使った止血効果（半田、武岡）や、②ラット腹部大動脈シャント血栓形成モデルにおける病的血栓形成（村田）への影響を検討した。さらに、③ウサギを使用した大型動物血小板減少モデルの確立ならびに人工微粒子の効果の評価も行った（半田）。また、④ラット腸間膜微小循環を用いたレーザーアブレーション(laser ablation)法による微小血栓評価モデルの確立を目的とした基礎検討を行った（梶村）。

### C. 研究結果及び考察

1. H12-polyAlb の安全性と止血効果(ウサギ血小板減少モデルを使用した解析)：前年度に引き続き、その安全性と *in vivo* 止血効果を確認した。すなわち、血小板減少ラットの出血時間を用量依存性に有意に短縮させ、また、投与動物に明らかな急性毒性を示さなかった(平成16年度報告：半田、武岡)。そして今回、ブスルファン投

与によるウサギ血小板減少モデルを確立し、大型動物においても *in vivo* 止血効果を確認した（半田）。ブスルファン(30 mg/kg)の腹腔内投与により、赤血球や白血球数に影響しないで、単独で再現性よく血小板減少が惹起された。血小板減少がほぼピーク ( $2.6 \pm 0.8 /\mu\text{L}$  : 正常値の約 1/15~1/20) となる投与15日目で、H12-polyAlb と静脈投与して、耳の皮膚にメスで一定の切傷を加えて出血時間を測定した。正常ラビット(血小板数： $41.1 \times 10^4 /\mu\text{L}$ 、出血時間： $112 \pm 24$  秒)と比較して、 $1536 \pm 364$  秒と最も著明に延長した(約14倍)。そこで、H12-PEG-polyAlb を40、80 mg/kg の濃度で投与し、30分経過後の出血時間を測定したところ、それぞれ  $1495 \pm 525$ 、 $950 \pm 262$  秒であり、投与量依存的に出血時間が短縮した。特に80 mg/kg 投与時は生理食塩水群( $1536 \pm 364$  秒)、と比較して有意な短縮効果が得られた。しかしながら、ラットモデルと比較すると、その止血効果は弱かった。すなわち、ラットにおいては、40 mg/kg の投与量で、正常ラットの出血時間(血小板数： $81 \pm 9 \times 10^4 /\mu\text{L}$ 、出血時間： $201 \pm 51$  秒)に匹敵する止血効果(投与群の出血時間： $330 \pm 73$  秒、対照群の出血時間： $723 \pm 78$  秒、血小板数は共に： $20 \pm 3 \times 10^4 /\mu\text{L}$ ) が得られた(平成16年度報告、半田)。止血効果に関する

この動物種間の差違の原因の一つとして、ラットに比してウサギモデルでは血小板減少の程度が高度である（正常値の約 1/4 と約 1/15～1/20）ことが考えられた。ラットでは投与 3 時間後でも H12-PEG-polyAlb は有意な止血効果を保持している（平成 16 年度報告、武岡）。しかし、人工微粒子のウサギにおける生体内キネティクスは明らかでなく、今後、最適化を図る必要があるかもしれない。今回の血小板減少症ウサギの確立により、人工血小板の臨床応用の対象となる種々の病態モデルの作成への道が開けた。また、流動条件下でのコラーゲン表面への *ex vivo* 3 次元血栓形成に及ぼす止血効果（血小板凝集増強作用）が確認され、副作用として危惧される過剰血栓や脆弱血栓の形成は認められなかった（後藤）。大きさや形状、表面処理の状態、担持分子の密度などのパラメータを用いた微粒子の工学的最適化がさらに必要であり、フローチェンバーを用いた *in vitro* 血栓形成定量システムの有用性が期待された。

## 2. H12(ADP)小胞体の開発と止血

**効果:** 血小板減少ラットモデルを用い H12 小胞体が止血効果を有すことを前年度に報告した。しかしながら、その作用は H12-polyAlb に比較して弱かった（平成 16 年度報告、武岡）。そこで、機能強化を図る目的で生理な血小

板刺激物質であるアデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた H12(ADP)小胞体を作成した（武岡）。H12(ADP)小胞体は血小板凝集計においてアゴニスト惹起血小板凝集の増強作用を示し、静止条件下での血小板との共存では血小板活性化作用を認めないことがフローサイトメトリー法で確認された。凝集計の攪拌条件下では小胞体からの内包 ADP（内包濃度 10mM 以下）の非特異的（機械的）漏出は起こらず、H12 を介した血小板との特異的な結合により、凝集依存性に ADP が放出される可能性が強く示唆された。ADP の最適内包濃度を 1mM と定め、血小板減少ラットの出血時間への効果を検討した。投与濃度 10 mg/kg で H12(ADP)小胞体を静注したところ、出血時間は  $618 \pm 51$  秒から  $371 \pm 54$  秒へと短縮した。一方、対照の H12 小胞体は投与濃度が 10、40 mg/kg で、出血時間はそれぞれ  $573 \pm 127$ 、 $367 \pm 96$  秒となった。H12 小胞体の止血効果は ADP を内包することで対照に比べ濃度比で 4 倍程度と大幅に増強された。また、ネガティブ染色法や凍結割断レプリカ法を用いた電顕による形態的観察により、H12(ADP)小胞体は球状を示した。さらに、ビオチン標識した小胞体を抗ビオチン抗体で検出する手法を用いて、凝集血小板との関係を検討した。H12(ADP)小胞体は血小板凝集塊中で

血小板間に存在し、活性化した血小板同士の相互作用を仲介することで、その止血増強作用を発揮する可能性が改めて確認できた（鈴木）。ADPなどの内包物質の選択により、止血機能を自由に修飾できる可能性が示された。さらに、止血部位を標的とする薬物運搬システム（DDS）として H12 小胞体の利用法の拡大が期待される。

**3. rGPIb-小胞体・rGPIb-polyAlb の評価：**rGPIb-polyAlb はヒト血漿や血清に添加しても生化学的検査値や凝固系検査値に影響を及ぼさなかった。一方、rGPIb-小胞体の添加で、小胞体に含まれる脂質成分による検体中のコレステロール値の上昇が確認され、臨床応用の際は注意する必要があることがわかった（村田）。また、血小板減少再構成血液（血小板数： $5 \times 10^4/l$ 、ヘマトクリット：40%）を使い PFA-100 用いた高血流条件下での血小板血栓による閉塞時間は、高濃度の微粒子存在下で延長傾向を示した。閉塞時間を規定するのが血中のフォンビレブランド因子（VWF）と血小板上の GPIb/IX 複合体の結合である。したがって、rGPIb 結合微粒子は VWF と GPIb/IX 複合体の結合を抑制する可能性が示唆された。一方、まだ予備的なデータであるものの、正常血小板数のラットにおいて血栓による大動脈シャントの閉塞時間は短縮傾向を認

め、rGPIb 結合微粒子が病的血栓を促進する可能性が示唆された。いうまでもなく、VWF と GPIb/IX 複合体の結合は生理的な一次止血に不可欠であり、rGPIb 結合微粒子の人工血小板としての利用に関して問題点が今回改めて明らかとなった。rGPIb 結合微粒子に関してはより詳細な *in vitro* 評価が今後の課題である。

**4. 基礎技術の開発と基礎知識の取得：**レーザーアブレーションにより微小血管に破綻性出血を作製し、障害部位で形成される血小板血栓周辺での血小板や人工微粒子の挙動をリアルタイムで撮像する imaging 技術による評価システムが構築された（梶村）。ラット腸間膜微小循環での止血血栓の形成・崩壊プロセスを数値化し、生体染色で可視化した血小板とローダミン標識した小胞体の動態が観察された。人工微粒子の最適化を図るための基盤システムとなるであろう。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンは、屈曲型（bent conformer）から伸展型（extended conformer）への変換に伴いフィブリノーゲンの低親和性受容体から高親和性受容体へ転換することが知られている。今回、CHO 細胞発現系を用いた検討により、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンは、血小板活性化に伴い複合体分子の細胞膜近傍の細胞外部分の  $\alpha/\beta$  stalk の解離によって活性型へ変換す

ることが明らかとなった(鎌田)。 $\alpha$ / $\beta$  stalk を制御することで、本物の血小板に類似した、細胞活性化依存性の機能を備えた人工物の創製への道が開かれるかもしれない。

#### D. 結論

止血機能を有する人工微粒子(認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体)の有力な候補として、前年度から検討を加えてきたH12-polyAlbとともに、同等の機能を有するH12(ADP)小胞体が新たに創製された。*in vitro*のみならず*in vivo*においても、過剰な血栓の誘発など安全性への危惧を惹起させる結果は認められなかった。ラットに加え、ウサギ血小板減少モデルが構築され、さらに微小循環での止血血栓の形成をリアルタイムで撮像評価できるラットモデルが開発できた。多方面からの安全性評価とともに微粒子の止血機能の最適化を行い、血小板代替物の実用化を目指してゆく。

#### E. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

(原著)

1) Okamura, Y., Takeoka, S., Teramura, Y., Maruyama, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Hemostatic effects of

fibrinogen- $\gamma$  chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles *in vitro* and *in vivo*. *Transfusion* **45**, 1221-1228 (2005).

(2) Okamura, Y., Maekawa, Y., Teramura, Y., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- $\gamma$  chain dodecapeptide *in vitro* and *in vivo*, *Bioconjugate Chem.* **16**, 1589-1596 (2005).

(3) Kamata, T., Handa, M., Sato, Y., Ikeda, Y., Aiso, S. Membrane-proximal  $\{\alpha\}/\{\beta\}$  stalk interactions differentially regulate integrin activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 24775-24783 (2005).

(4) Kamata, T., Ambo, H., Puzon-McLaughlin, W., Tieu, K.K., Handa, M., Ikeda, Y., Takada, Y. Critical Cys residues for regulation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 are clustered in the EGF domains of the  $\beta$ 3 subunit. *Biochem. J.* **378**, 1079-1082 (2005).

(5) Okamura, Y., Handa, M., Suzuki, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Cooperative effects of platelets aggregation of platelet substitutes at a high shear rate; mixed system of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide- or glycoprotein Ib $\alpha$ -conjugated latex beads under flow conditions. *J. Artif. Organs (in press)*.

(6) Okamura, Y., Fujie, T., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying

fibrinogen- $\gamma$  chain dodecapeptide, *Transfusion* (to be submitted).

(総説)

(1) 武岡真司. 人工赤血球・人工血小板の開発の現状, *臨床麻酔*, **29**, 721-726 (2005).

(著書)

(1) Takeoka, S. Design and modification of nanoparticles for blood substitutes. *Organ Microcirculation (A gateway to Diagnostic and Therapeutic Interventions)* (Ishii, H, Suematsu, M, Tanishita, K, and Suzuki, H (Eds.)), **13**, 35-41 (2005).

(2) 武岡真司. 図解 高分子新素材のすべて 人工赤血球の仕組み、国武豊喜監修、工業調査会, p98-101 (2005).

## 2. 学会発表

(1) 岡村陽介, 藤枝俊宣, 半田誠, 池田康夫, 武岡真司 「ドデカペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の血小板代替物としての評価」第43回日本人工臓器学会大会 (2005.12., 東京).

(2) 武岡真司, 岡村陽介, 前川一平, 半田誠, 池田康夫 「ドデカペプチド結合ポリエチレングリコール修飾リン脂質小胞体の血小板代替物としての評価」第43回日本人工臓器学会大会 (2005.12., 東京).

(3) 藤枝俊宣, 岡村陽介, 武岡真司, 半田誠, 池田康夫 「H12 ペプチド結合アルブミン重合体の PEG 修飾と止血能評価」第28回日本血栓止血学会学術集会 (2005.11., 福岡).

(4) 前川一平, 岡村陽介, 武岡真司, 半田誠, 池田康夫 「H12 ペプチド結合小胞体の血小板代替機能評価」第28回日本血栓止血学会学術集会 (2005.11., 福岡).

(5) 岡村陽介, 半田誠, 武岡真司, 鈴木英紀, 村田満, 池田康夫 「接着分子を標的とした血小板代替物の創製」第28回日本血栓止血学会学術集会 (2005.11., 福岡).

(6) 岡村陽介, 藤枝俊宣, 半田誠, 池田康夫, 武岡真司 「フィブリノーゲン由来ドデカペプチド結合アルブミン重合体の血小板代替物としての止血効果」第54回高分子討論会 (2005.9., 山形).

(7) Okamura, Y., Takeoka, S., Handa, M., and Ikeda, Y. "Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen- $\gamma$  chain dodecapeptide as platelet substitutes *in vitro* and *in vivo*." *Particles 2005 Surface Modification in Particle Technology* (2005.8., San Francisco).

(8) Takeoka, S., Okamura, Y., Handa, M., and Ikeda, Y. "Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Recombinant Glycoprotein Iba as Platelet Substitutes *in vitro* and *in vivo*." *Particles 2005 Surface Modification in Particle Technology* (2005.8., San Francisco).

(9) Okamura, Y., Takeoka, S., Suzuki, H., Murata, M., Handa, M., and Ikeda, Y. "Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Fibrinogen- $\gamma$

Chain Dodecapeptide as Platelet Substitutes *in vitro* and *in vivo*.” The International Society of Thrombosis & Haemostasis XXth Congress. (2005.8., Sydney).

(10) Takeoka, S., Okamura, Y., Suzuki, H., Murata, M., Handa, M., and Ikeda, Y. “Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Recombinant Glycoprotein Ib $\alpha$  as Platelet Substitutes *in vitro* and *in vivo*.” The International Society of Thrombosis & Haemostasis XXth Congress. (2005.8., Sydney).

(11) Okamura, Y., Takeoka, S., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. “Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Fibrinogen- $\gamma$  Chain Dodecapeptide as Platelet Substitutes *in vitro* and *in vivo*.” Xth International Symposium on Blood Substitutes. (2005.6., Providence).

(12) Takeoka, S., Okamura, Y., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. “Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Fibrinogen- $\gamma$  Chain Dodecapeptide as Platelet Substitutes *in vitro* and *in vivo*.” Xth International Symposium on Blood Substitutes. (2005.6., Providence).

(13) 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 武岡 真司, 土田 英俊, 半田 誠, 池田 康夫 「フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖C末端ドデカペプチド結合担体の止血効果」第12回日本血液代替物学会年次大会 (2005.6., 東京).

(14) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真

司, 半田 誠, 池田 康夫 「PEG 修飾アルブミン重合体への H12 ペプチド結合と止血能評価」第12回日本血液代替物学会年次大会 (2005.6., 東京).

(15) 前川 一平, 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫 「H12 結合リン脂質小胞体の止血能評価」第12回日本血液代替物学会年次大会 (2005.6., 東京).

(16) 半田 誠, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫 「フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖C末端ドデカペプチド結合微粒子の *in vitro*, *in vivo* 評価」第12回日本血液代替物学会年次大会 (2005.6., 東京).

(17) 齊藤 浩, 是永 真規, 野田 宗宏, 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田 英俊, 半田 誠, 村田 満, 横山 健次, 梶村 眞弓, 末松 誠, 池田 康夫 「rGPIb $\alpha$  リポソームの機能評価」第12回日本血液代替物学会年次大会 (2005.6., 東京).

(18) 田村 典子, 後藤 信哉, 石田 英之, 武岡 真司, 岡村 陽介, 池田 康夫 「人工血小板の止血機能増強、血栓性に及ぼす von Willebrand 因子-GPIb $\alpha$  及びコラーゲン受容体の作用の差異」第12回日本血液代替物学会年次大会 (2005.6., 東京).

(19) 鈴木 英紀, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫 「人工血小板 H12 結合アルブミン重合体の血小板凝集系における分布-免疫電顕的検討-」第12回日本血液代替物学会年次大会 (2005.6., 東京).

(20) 岡村 陽介, 前川 一平, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫 「フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド結合

リン脂質小胞体の止血効果」日本膜学会第 27 年会 (2005.5., 東京). 特願 2006-001916.

(21) 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「フィブリノーゲン $\gamma$ 鎖 C 末端ドデカペプチド結合担体の止血効果」第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5., 横浜).

(22) 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「血小板代替物用認識部位としての H12 ペプチドと担体の選定」第 85 回日本化学会春季年会 (2005.3., 横浜).

(23) 前川 一平, 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫「H12 結合リン脂質小胞体の止血能評価」第 85 回日本化学会春季年会 (2005.3., 横浜).

(24) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫「PEG 修飾アルブミン重合体への H12 ペプチド結合と止血能評価」第 85 回日本化学会春季年会 (2005.3., 横浜).

### **3. 新聞発表**

(1) 日刊工業新聞「7 時間使える人工血小板」2005.9.5.

(2) 日経産業新聞「寿命 10 倍の人工血小板」2006.2.16.

### **F. 知的所有権の出願・登録**

(1)武岡 真司, 岡村 陽介, 金澤 秀雄, 久本 秀治, 久保田 恒平, 小幡 洋輔. 「薬物運搬体」特願 2005-75663.

(2)武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」



## 分担研究報告書

平成 17 年度 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)  
分担研究報告書

血小板減少ラビットの作製法の確立とフィブリノーゲン $\gamma$ 鎖ドデカペプチド  
結合ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン重合体の止血効果

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、  
日本学術振興会特別研究員)  
武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院 教授)  
藤枝 俊宣 (早稲田大学大学院 理工学研究科)  
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 血液内科)

### 【研究要旨】

血小板止血機能を補助する微粒子系の開発において、活性化血小板の表面に発現する GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン(Fbg)の $\gamma$ 鎖 C 末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12)を担持させたアルブミン重合体は(H12-polyAlb)、血小板減少ラットの出血時間を短縮させる効果が確認できた (平成 15 年度 分担研究報告書)。さらに、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)は、活性化血小板への H12 の特異的認識能は PEG 鎖の付加によっても影響されないことを確認でき、血小板減少症モデルラットの止血能評価から、この H12-PEG-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を明らかにした。そこで、本年度は、H12-PEG-polyAlb をより大型の動物(ラビット)を用いて止血能評価を行うために、血小板減少モデルラビットの作製法を確立し、止血能評価を行うことを目的とした。抗がん剤(ブスルファン)の副作用を利用して、正常値の 1/15~1/20 まで血小板数が減少した重篤な血小板減少モデル動物(ラビット)の作製法を確立した。さらに、H12-PEG-polyAlb は、より重篤な血小板減少モデルでかつ種差を変更しても 80 mg/kg の投与により、有意な止血能が確認された。

#### A. 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 $\gamma$ 鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)をアルブミン重合体に担持させたところ(H12-polyAlb)、血小板減少症モデル

ラットの出血時間を有意に短縮させる効果を確認した(平成15年度 分担研究報告書)。さらに、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)では、活性化血小板への H12 の特異的認識能は PEG 鎖の付加によっても影響を受けないことを確認した。血小板減少症モデルラットの止血能評価より、H12-PEG-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を明らかにした。

本年度は、H12-PEG-polyAlb をより大型の動物(ラビット)を用いて止血能評価を行うために、血小板減少症モデルの作製法を確立し、止血能評価を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 血小板減少ラビットの作製法

ニュージーランドホワイトラビット(雄性、11週齢、2.5 kg)は、三共ラボより購入した。ケタミン(60 mg/mL)-セラクタル(2%)溶液(ケタミン/セラクタル=3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔後、ブスルファンポリエチレングリコール溶液(10 mg/mL)を0、3日目に下腹部皮下投与した(全投与量30, 40, 50 mg/kg)。耳静脈より23G注射針で経時的に採血し、各血球を計測した(K-4500、Sysmex)。

### 2. 出血時間測定方法

投与開始から15日目の血小板減少

症ラビット( $[PLT] = 2.6 \pm 0.8 \times 10^4 /\mu\text{L}$ )にケタミン-セラクタル水溶液にて麻酔後、23G翼状針にて検体(生理食塩水、H12-PEG-polyAlb)を耳静脈投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。検体投与30分経過後、耳の血管が観察できない部位に外科用メス(No. 11)を用いて傷をつけた(長さ6 mm)。生理食塩水に浸し、出血時間を計測した。また、検体投与前後に採血し、各血球変動を観察した。

### 3. H12-PEG-polyAlb の調製法

polyAlb分散液( $[HSA] = 20 \text{ mg/mL}$ , 30 mL, 粒径  $200 \pm 80 \text{ nm}$ )に MAL-PEG-NHS DMSO 溶液(10 mM,  $M_w = 3.4 \text{ or } 5.0 \text{ kDa}$ )を284  $\mu\text{L}$  添加して振とう後(r.t., 20 min)、引き続き、m-PEG-NHS DMSO 溶液(25 mM,  $M_w = 5.0 \text{ kDa}$ )を2840  $\mu\text{L}$  添加した。遠心分離(25000 rpm, 10min)にて精製後 PEG-polyAlb ( $[HSA]=20 \text{ mg/mL}$ , 20 mL)を得た。Cys をあらかじめ導入した H12 (10 mM, 189  $\mu\text{L}$ )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 ( $[HSA]=10 \text{ mg/mL}$ , 30 mL)を回収した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 血小板減少症ラビットの作製

ブスルファンを0、3日目に下腹部皮下投与したところ(全投与量30, 40, 50 mg/kg)、各群とも再現性よく血小板数が減少し、減少速度は投与量依存的に増大した(Fig. 1)。しかし、40, 50 mg/kg

投与時では、ヘマトクリット(HCT)値や、白血球も、血小板と同様に14日目以降から徐々に減少する傾向が判明した(Fig. 2 (B) (C))。他方、30 mg/kg 投与時では、その影響は認められなかった(Fig. 2 (A))。HCTの減少は、出血時間の延長を引き起こすため<sup>1)</sup>、ブスルファン投与量は30 mg/kgに決定した。

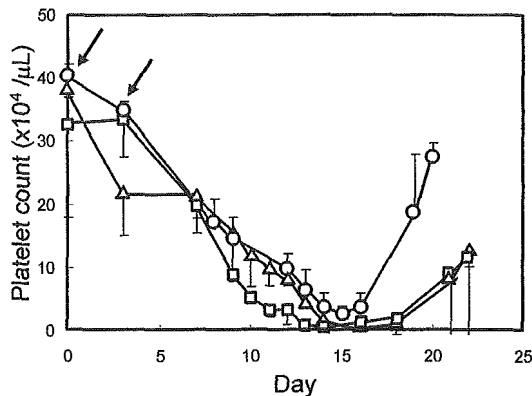


Fig. 1 Dose-response effect of busulphan on rabbits. rabbits were injected with busulphan at a total dose of 30 mg/kg (○), 40 mg/kg (△), or 50 mg/kg (□). Ear vein blood was collected at intervals and platelet count measured. Arrows show injection day of busulphan (N = 3).

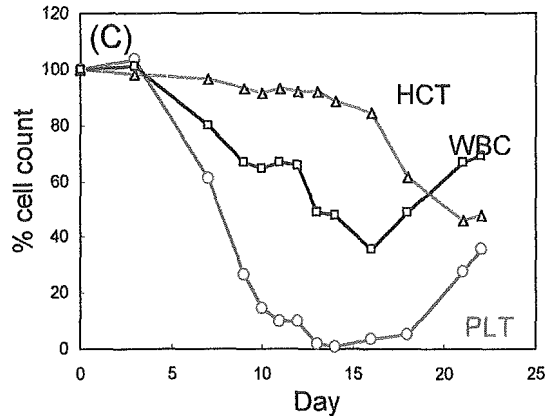
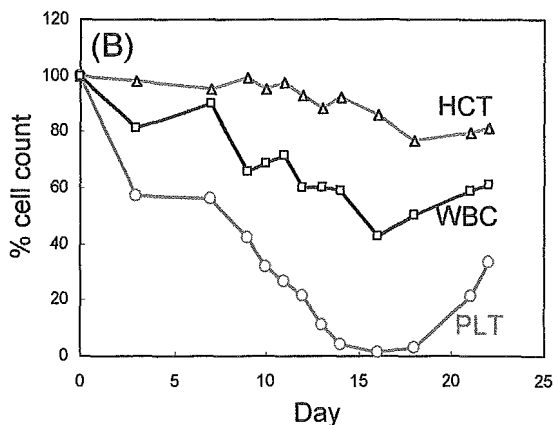
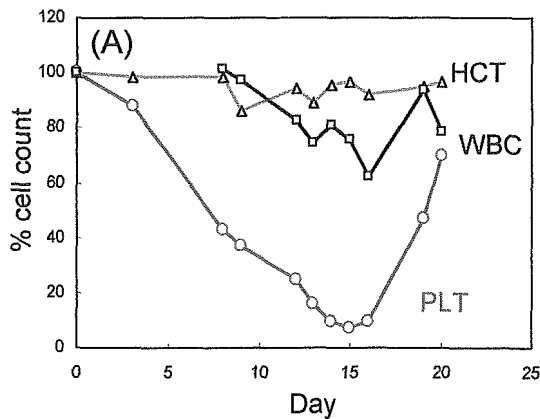


Fig. 2 Hematological parameters before and after busulphan injection at a dose of (A) 30, (B) 40, (C) 50 mg/kg.

30 mg/kg 投与時、投与開始から13、14、15日目の血小板数は、それぞれ  $6.9 \pm 0.1$ 、 $3.5 \pm 1.0$ 、 $2.6 \pm 0.8 / \mu\text{L}$  (正常値の約 1/15~1/20) であり、16日目以降から血小板数の回復が認められた(死亡例なし)(Fig. 1)。

## 2. 出血時間測定

ブスルファン投与開始から13、14、15日目のラビットの出血時間を、方法2に従って測定したところ、各々  $647 \pm 46$ 、 $1170 \pm 161$ 、 $1536 \pm 364$  秒であり、血小板数の減少に伴って出血時間は著しく延長した。特に15日目の血小板減少ラビットの出血時間は、正常ラビット([血小板] =  $41.1 \times 10^4 / \mu\text{L}$ ) のそれ( $112 \pm 24$  秒)と比較して、最も有意に延長し、約14倍の延長であった(Fig. 3)。従って、より重篤な血小板減少症動物モデルとして15日目のラビットを採用し、以下のH12-PEG-polyAlbの止血能評価を行った。