

Fig. 3 Correlation of ear bleeding time (white bars) with platelet count (○) in the rabbits (N = 3).

### 3. H12-PEG-polyAlb の物性

検体として用いられた H12-PEG-polyAlb (粒径 200 ± 80 nm) の物性を以下に示す(平成 16 年度 分担研究報告書 武岡真司報告分)。

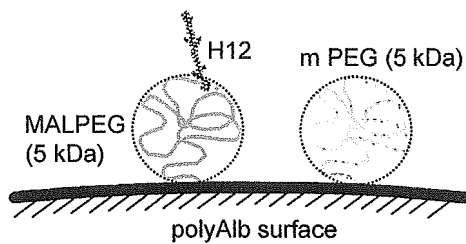


Fig. 4 Modification image of mPEG, MALPEG, and H12 to the surface of polyAlb. Mw of mPEG, and MALPEG: 5.0 kDa.

Table 1 Characterization of H12-PEG-polyAlb

	PEG-polyAlb	H12-PEG-polyAlb
MALPEG (10 <sup>4</sup> /particles)	1.2	1.2
mPEG (10 <sup>4</sup> /particles)	6.1	6.1
H12 (10 <sup>4</sup> /particles)	-	1.0
T <sub>1/2</sub> (min)	210	180

### 4. H12-PEG-polyAlb の止血能評価

H12-PEG-polyAlb を 40、80 mg/kg にて投与し、30 分経過後の出血時間を測定したところ、それぞれ 1495 ± 525、950 ± 262 秒であり、投与量依存的に出血時間が短縮した(Fig. 5)。特

に 80 mg/kg 投与時は生理食塩水群 (1536 ± 364 秒)、と比較して有意な短縮効果が得られた。

以上より、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止血能を有することが確認できた。

今後は、血小板輸血モデルを確立し、この血小板代替物(H12-PEG-polyAlb)を血小板輸血と比較した力価を算出し、臨床試験に向けたステップとしたい。

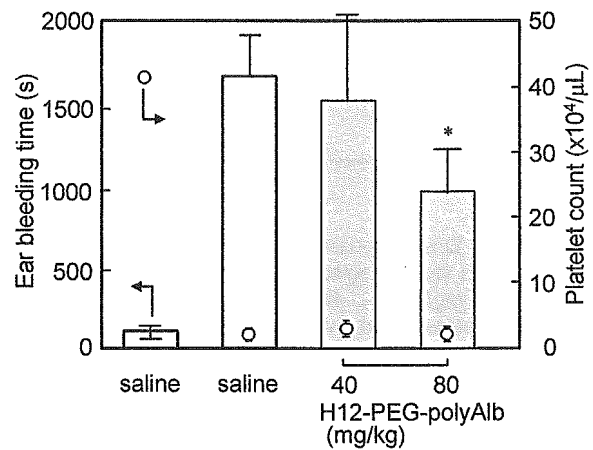


Fig. 5 Effects of the administration of H12-PEG-polyAlb on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEG-polyAlb was 40, 80 mg/kg equivalent of albumin. ○; platelet count in the rats (N = 4-6). \*P < 0.05 for H12-PEG-polyAlb vs. saline group.

1) Sola, M.C. *et al.* The relationship between hematocrit and bleeding time in very low birth weight infants during the first week of life. *J. Perinatol.* **21**, 368-371 (2001).

### D. 結論

1) 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症モデル動物(ラビット)の作製法を確立した。

2) 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効果が確認できた。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 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- $\gamma$  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  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  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).

### 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 Iba 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) 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).

(19) 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).

(20) 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).

(21) 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).

(22) 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).

(1) 武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」特願 2006-001916.

## G. 知的所有権の出願・登録

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

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

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院 教授)  
研究協力者 岡村 陽介 (早稲田大学大学院、日本学術振興会特別研究員)  
前川 一平 (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(血小板代替物)の開発において、活性化血小板の表面に発現される 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)を担持させたラテックスビーズは、血小板減少下でも血小板凝集の促進が確認でき、さらに未活性化血小板とは相互作用しない配列であることが明らかとなった(平成 14 年度)。平成 15、16 年度では、H12 を PEG 鎖末端に担持させたリン脂質小胞体(H12-PEG-小胞体)を新規に構築し、血小板減少状態下でも流動下で血小板粘着を増幅させた。さらに、血小板減少症モデルラットに投与したところ、H12-PEG-小胞体は投与量依存的に出血時間が短縮され、止血能を有することを明らかにした。

平成 17 年度は、さらなる止血能向上のために、血小板凝集惹起剤であるアデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた小胞体(H12-PEG(ADP)小胞体)について、安全性と止血能を評価した。まず、H12-PEG(CF)小胞体は、H12 を担持したときのみ血小板凝集を促進させ、血小板凝集塊中のみで内包物(CF)を漏出させることを初めて明らかにした。次に、CF の代わりに ADP を内包させた H12-PEG(ADP)小胞体は、H12 の多点結合と ADP 放出の相乗効果によって、血小板凝集を著しく増大させ、その機能は 1 mM の ADP の内包により発現されることを確認した。他方、未活性化血小板と H12-PEG(ADP)小胞体を混合したとき、ADP の内包濃度が 10 mM 以下では血小板の活性化を引き起こさないことから、H12-PEG(ADP)小胞体の安全性も立証できた。さらに、血小板減少ラットにて H12-PEG(ADP)小胞体の止血能を評価したところ、ADP 未内包 H12-PEG 小胞体にて短縮効果の確認できた 1/4 の投与量で短縮できることが立証できた。

#### 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

担持させたラテックスビーズは、血小板減少状態の血液中で血小板凝集を促進させることが確認でき、未活性の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)。平成15、16年度では、H12をPEG鎖末端に担持させたリン脂質小胞体(H12-PEG-小胞体)を新規に構築し、流動下で血小板減少状態でも血小板粘着を増幅させた。さらに、血小板減少症モデルラットにて止血能を評価したところ、H12-PEG-小胞体は投与量依存的に出血時間を短縮させた。

本年度は、更なる止血能向上のために、血小板凝集惹起剤であるアデノシン5'-二リン酸(ADP)を小胞体に内包させ(H12-PEG(ADP)小胞体)、その安全性と止血能の亢進についてを評価した。

## B. 研究方法

### 1. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成

#### 1.1. Glu2C18 の合成

グルタミン酸(2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物(4.56 g, 24 mmol)をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた(105 °C, 1 hr)。この系にステアリルアルコール(11.9 mg, 44 mmol)を添加し、沸点還流させた(105 °C, 14 hr)。溶媒を減圧除去後、残分をクロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で2回、水 150 mL で2回分液洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧除去した。メタノール再結晶、濾過後乾燥して白色粉末の

グルタミン酸型脂質(Glu2C18; 13.3 g, 収率 85 %)を得た。

#### 1.2. MAL-PEG-Glu2C18 の合成

クロロホルム 5 mL 中に Glu2C18(115.1 mg, 176 μmol)、TEA(24.6 μL, 176 μmol)を加えた後に MAL-PEG-NHS(300 mg, 58.8 μmol)を溶解、攪拌した(r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルから再沈殿精製した後、ベンゼンに溶解させ、凍結乾燥後、白色粉末として MAL-PEG-Glu2C18 (264.8 mg, 収率 64 %)を得た。

#### 1.3. H12-PEG-Glu2C18 の合成

MAL-PEG-Glu2C18(100 mg, 25.4 μmol)と C 末端にシステインを導入した H12 (32.8 mg, 25.4 μmol)を DMF 5 mL に溶解、攪拌した(r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルから再沈殿精製した。水 250 mL を加え不溶分を除去後、凍結乾燥して淡黄色粉末として H12-PEG-Glu2C18(62.8 mg, 収率 47 %)を得た。<sup>1</sup>H-NMR のマレイミド基のピーク( $\delta = 6.70$ )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。

### 2. H12-PEG(ADP) 小胞体、H12-PEG(CF)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) (100 mg, 136 μmol)、cholesterol (52.7 mg, 136 μmol)、1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) (19.0 mg, 13.6 μmol)、PEG-Glu2C18 (4.74 mg, 0.817 μmol)、H12-PEG-Glu2C18 (4.34 mg, 0.817 μmol)をベンゼン 5 mL に溶解し、凍結乾燥した (DPPC/cholesterol/

DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.03/0.03, モル比)。ADP 溶液(0, 1, 2, 10, 25, 100 mM, 8.5 mL)にて水和、押出造粒法にて H12-PEG(ADP)小胞体を調製した(粒径  $220 \pm 70$  nm)。超遠心分離(33000 rpm, 30min, twice)にて未内包 ADP を除去し、PBS 5 mL 中に分散させた。さらに、小胞体分散液をゲルろ過(sephadex G25)し、外水相に微量に残存する ADP を完全に除去した。ADP 内包濃度は、H12-PEG(ADP)小胞体(1 mg/mL)を 2%ラウリルエーテル水溶液(C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>)で可溶化し、高速液体クロマトグラフィー(Ab. 260 nm)を用いて定量した。

同様の方法にて、ADP の代わりに水溶性蛍光分子のカルボキシフルオロセイン(CF)10 mM を内包させて H12-PEG(CF)小胞体とした。

### 3. 血小板凝集計を用いた H12-PEG(CF)小胞体からの CF 放出率測定法

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.)して多血小板血漿(PRP)を得た。H12-PEG(CF)小胞体を PRP([PLT] =  $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, [lipid] = f.c. 0.05 mg/mL)に添加後、ADP (f.c. 2  $\mu$ M)あるいはコラーゲン(f.c. 0.4 mg/mL)により血小板凝集を惹起し、血小板凝集計にて透過度変化を測定した。

測定終了後、遠心分離(1200 rpm, 5 min)にて凝集塊を除去した。このとき、ADP 未添加系において、血小板のみを除去し、2%ラウリルエーテル(C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>)にて小胞体を可溶化した際の蛍光強度(A)の値を 100%と定義した。

この上清中(小胞体分散液)の蛍光強度(B)を測定し、血小板凝集塊への小胞体取込み率を算出した。さらに、この上清を遠心分離(33000 rpm, 45 min)して小胞体を除去し、その上清の蛍光強度(C)を測定し、血小板凝集塊に取込まれた小胞体からの CF 放出率を算出した。

$$\text{小胞体取込み率 (\%)} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100$$

$$\text{CF 放出率 (\%)} = \frac{C}{A - (B - C)} \times 100$$

### 4. フローサイトメトリーを用いた安全性試験

PRP([PLT]= $1.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, 50  $\mu$ L)に ADP 内包濃度の異なる H12-PEG(ADP)小胞体を添加し([lipid]=1 mg/mL, 10  $\mu$ L)、攪拌した(37 °C, 10 min)。血小板活性化マーカーである FITC 標識 PAC-1(20  $\mu$ L)を添加後、振とうし(37 °C, 10 min)、ホルムアルデヒド(f.c. 1 %)にて固定した。ポジティブコントロール群は ADP 刺激時(f.c. 100  $\mu$ M)とし、ネガティブコントロール群は ADP 未内包の PEG 小胞体とした。

### 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(シグマ, 5 mg/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 日目を血小板減少ラット([PLT] =  $19.6 \pm 2.6$  / $\mu$ L)を作成した。セボフラン麻酔

後、H12-PEG(ADP)小胞体を尾静脈から投与した(4 mL/kg)。また、生理食塩水をコントロール群とした。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。

## C. 結果及び考察

### 1. H12-PEG(CF)小胞体からのCF放出率測定

PEG小胞体をPRPに添加し、ADPにて血小板凝集を惹起させたところ、PBS添加系と比較して血小板凝集に何ら影響を与えないことを確認した。PEG小胞体の代わりにH12-PEG小胞体を添加したところ、透過度が増大し、血小板の2次凝集促進効果が確認できた(Fig. 1)。

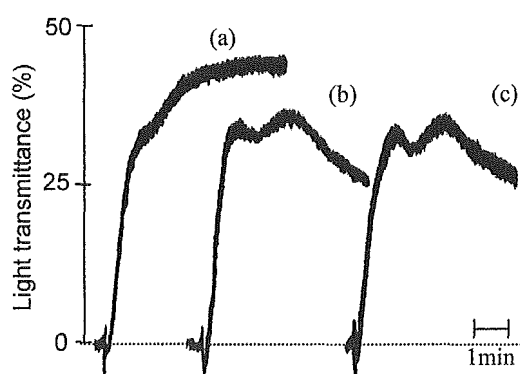


Fig. 1 ADP-induced platelet aggregation enhanced by H12-PEG(CF)vesicle. [ADP]: f.c. 2  $\mu$ M, [platelet]:  $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, [lipid]: f.c. 0.05 mg/mL. (a) H12-PEG(CF)vesicle, (b) PEG(CF)vesicle, and (c) PBS.

これは、H12-PEG小胞体がH12を介して血小板と多点結合し、血小板凝集を促進したためと考えられる。

血小板凝集塊へのPEG-小胞体、H12-PEG-小胞体の取込み率は、各々 $13 \pm 5\%$ 、 $17 \pm 5\%$ であり、両者ともほぼ同等であった。そこで、取込まれた小胞体からのCF放出率を測定したところ、それぞれ $0.6 \pm 0.5\%$ 、 $10 \pm 1\%$ となった(Table 1)。これは、小胞体表面にH12を担持させたことにより、血小板との結合が強固となり、血小板凝集に巻込まれた際の物理的な刺激に伴ってCF放出率が増大したためと考えられる。従って、H12-PEG小胞体へADP等の生理活性物質を内包することで凝集塊中のみで内包物が漏出し、凝集を促進させる機構を初めて明らかにした。

Table 1 Involvement ratio and CF release ratio of H12-PEG(CF)vesicle

	Involvement ratio (%)	CF release (%)
PEG(CF)vesicle	$13 \pm 5$	$0.6 \pm 0.5$
H12-PEG(CF)vesicle	$17 \pm 5$	$10 \pm 1$

[PLT] =  $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, [ADP] = f.c. 2  $\mu$ M, [lipid] = f.c. 0.05 mg/mL.

### 2. 血小板凝集計でのADP内包濃度の最適化

ADP内包濃度0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 10 mMであるPEG(ADP)小胞体ならびにH12-PEG(ADP)小胞体をPRPに添加し、ADP(f.c. 2  $\mu$ M)にて血小板凝集を惹起させた。このとき、PEG小胞体添加時の透過率との差より判定した。

H12-PEG(ADP)小胞体添加したところ、内包濃度1 mM未満では透過率は約4%増大し、血小板凝集の促進効果が確認できた(Fig. 2)。これは、ADP未内包のH12-PEG小胞体とほぼ同様であったことから、小胞体表面のH12



によって血小板と多点結合し、血小板凝集を促進したためと考えられる。

内包濃度 1 mM 以上では、透過率は約 12% まで著しく増大した。これは、H12 の担持による多点結合と ADP 放出の相乗効果によるものと考えられる (Fig. 2)。他方、PEG(ADP)小胞体添加系ではいずれの内包濃度においてもその効果は確認できなかった (Fig. 2)。

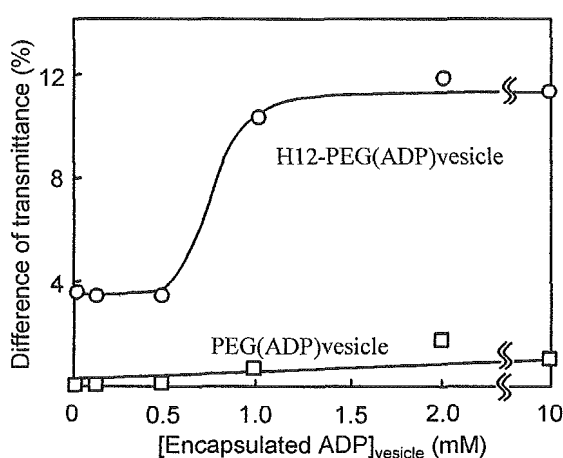


Fig. 2 Enhancement effect of platelet aggregation by H12-PEG(ADP)vesicle. [ADP]: f.c. 2  $\mu$ M, [platelet]:  $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, [lipid]: f.c. 0.05 mg/mL.

さらに、ADP の代わりにコラーゲンにて血小板凝集を惹起させた結果を Fig. 3 に示す。Fig. 2 と同様に (a) PEG 小胞体は、(b) H12-PEG(ADP)小胞体の透過率と比較して高い凝集促進効果が確認できた。

(a) PEG 小胞体ではコラーゲン添加から約 1 分後に、コラーゲン刺激による血小板形態変化に伴う緩やかな透過率の減少が見られる。しかしながら、ADP 内包系(b)では、コラーゲン添加後、直ちに透過率の上昇が見られ、これは ADP 刺激に特有の現象である。従って、血小板凝集に伴って

H12-PEG(ADP)小胞体から ADP の放出が誘起されたことが示唆された。

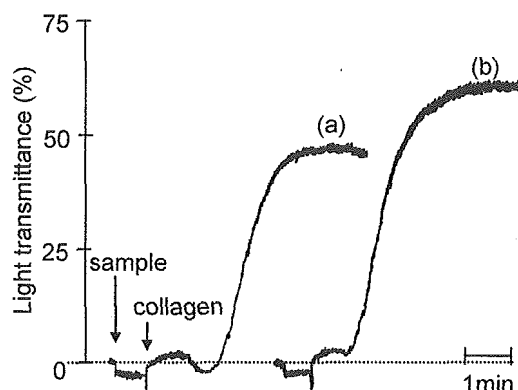


Fig. 3 Collagen-induced platelet aggregation enhanced by H12-PEG(ADP)vesicle. [collagen]: f.c. 0.4 mg/mL, [platelet]:  $2.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, [lipid]: f.c. 0.05 mg/mL. (a) PEGvesicle, (b) H12-PEG(ADP)vesicle.

### 3. フローサイトメトリーを用いた安全性試験

ADP の内包濃度が 10 mM 以下の PEG(ADP) 小胞体あるいは H12-PEG(ADP)小胞体を血小板に添加した系では、ADP 未内包小胞体の添加系と比較して PAC-1 結合率はほぼ同等であり、血小板を活性化させないことを確認した (Fig. 4)。しかし、内包濃度のもっとも高い PEG(ADP)小胞体、H12-PEG(ADP)小胞体 (100 mM) を血小板に添加した系では血小板の活性化を引き起こすことが判明した。これは、内水相と外水相との浸透圧差に伴う ADP の漏出と思われた。

従って、小胞体への最適 ADP 内包濃度は、通常血小板と共存するだけでは、血小板の活性化を引き起こさず、血小板凝集に巻き込まれるのみ ADP 内包効果を示す 1 mM に決定した。

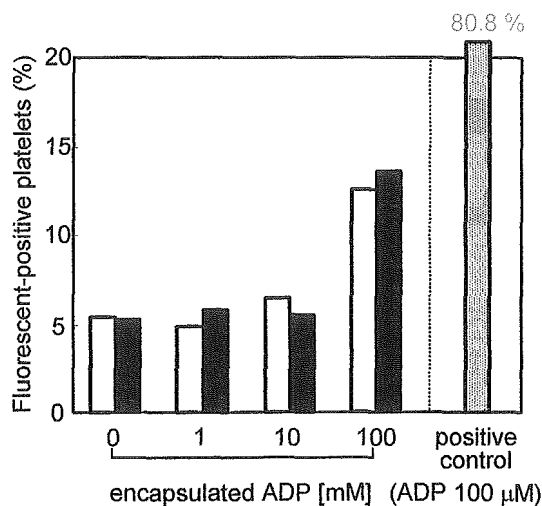


Fig. 4 PAC-1 Binding to the platelets in the presence of H12-PEG(ADP)vesicle (black column) or PEG(ADP)vesicle (white column) with various encapsulated ADP concentration.

#### 4. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

血小板減少ラット ( $[PLT]=2.0 \times 10^5 / \mu L$ ) に生理食塩水 (4 mL/kg) を投与したところ、出血時間は  $618 \pm 51$  秒であり、正常ラット ( $[PLT]=8.1 \times 10^5 / \mu L$ ) のそれ ( $178 \pm 56$  秒) と比較して、約 3.5 倍延長した (Fig. 5)。



Fig. 5 Effects of the administration of H12-PEG(ADP)vesicle on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEG vesicle or H12-PEG(ADP)vesicle was 10, or 40 mg/kg equivalent of lipid.  $\circ$ ; platelet count in the rats ( $N = 6-10$ ).  $*P < 0.05$  or for H12-PEG-vesicle or H12-PEG(ADP)vesicle vs. saline group.

H12-PEG 小胞体を投与したところ、投与量依存的に出血時間を短縮させ、10、40 mg/kg における出血時間は、それぞれ  $573 \pm 127$ 、 $367 \pm 96$  秒であった (Fig. 5)。そこで、H12-PEG(ADP)小胞体を投与濃度 10 mg/kg で投与したところ、出血時間は  $371 \pm 54$  秒となり、H12-PEG 小胞体にて短縮効果の確認できた 1/4 の投与量で同等の短縮効果が得られることが立証できた (Fig. 5)。

#### D. 結論

1) H12-PEG(CF)小胞体は、H12 を担持したときのみ血小板凝集を促進させ、血小板凝集塊中でのみ内包物(CF)を漏出させた。

2) 内水相に 1 mM 以上の濃度の内包 ADP を内包させた H12-PEG(ADP)小胞体は、H12 の多点結合と ADP 放出の相乗効果によって、血小板凝集を著しく増大させた。

3) 未活性化血小板と H12-PEG(ADP)小胞体を混合したとき、ADP の内包濃度が 10 mM 以下では、血小板の活性化を引き起こさないことを確認した。

4) 血小板減少症モデルラットにて H12-PEG(ADP)小胞体の止血能を評価したところ、ADP 未内包 H12-PEG 小胞体にて短縮効果の確認できた 1/4 の投与量で短縮できることが立証できた。

以上より、ADP 内包による H12-PEG 小胞体の止血効果向上が *in vivo* にて確認できた。

#### E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 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- $\gamma$  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) Takeoka, S. Developmental Trend of Artificial Blood (Artificial Red Blood Cells) *JMAJ*, **48**, 1-5 (2005).
- (4) Takeoka, S. Organ Microcirculation, Design and Modification of Nanoparticles for Blood Substitutes. *Springer*, 35-41 (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 Iba-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) 武岡 真司 「薄膜状高分子構造体とその調製方法—ナノ絆創膏への挑戦—」 Technology Link in W.T.L.O. (2006.3., 東京)
- (2) Takeoka, S. “Modulation of Nanoparticles for Blood Substitutes (Red Blood Cell Substitute and Platelet Substitutes)” Journées Nippo-Françaises, 21COE International Symposium "Practical Nano-Chemistry" (2006.2., France).
- (3) Takeoka, S. “Modulation of Nanoparticles for Blood Substitutes (Red Blood Cell Substitute and Platelet Substitutes)” Waseda-Korea Universities' Joint Symposium on "Nanoscience and Nanotechnology" (2006.1., Korea).

- (4) 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).
- (5) 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).
- (6) 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).
- (7) 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).
- (8) 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).
- (9) 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).
- (10) 武岡 真司「分子集合技術を利用した人工血球の構築」生命医科学シンポジウム (2005.9., 東京).
- (11) 武岡 真司「分子集合科学を利用した人工血球の創製とその応用」(2005.9., 軽井沢).
- (12) 武岡 真司「分子集合科学を利用した人工血球の創製とその応用」(2005.9., 八ヶ岳).
- (13) 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).
- (14) Takeoka, S., Okamura, Y., Handa, M., and Ikeda, Y. "Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Recombinant Glycoprotein Iba $\alpha$  as Platelet Substitutes *in vitro* and *in vivo*." Particles 2005 Surface Modification in Particle Technology (2005.8., San Francisco).
- (15) 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).
- (16) Takeoka, S., Okamura, Y., Suzuki, H., Murata, M., Handa, M., and Ikeda, Y. "Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Recombinant Glycoprotein Iba $\alpha$  as Platelet Substitutes *in vitro* and *in vivo*." The International Society of Thrombosis & Haemostasis XXth Congress. (2005.8., Sydney).
- (17) 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).
- (18) 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).
- (19) 武岡 真司「(大会長講演) 分子集合科学を利用した人工血液の創製」(2006.6., 東京).
- (20) 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).
- (21) 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).
- (22) 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).
- (23) 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).
- (24) 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).
- (25) 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).
- (26) 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).
- (27) 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).
- (28) 久保田 恒平, 岡村 陽介, 武岡 真司「ポリエチレングリコール修飾リポソーム表面の認識能のスイッチング」日本膜学会第 27 年会 (2005.5., 東京).
- (29) 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).
- (30) 望月 佑次, 岡村 陽介, 武岡 真

司「ヒト血清アルブミンゲルの合成及び化学修飾による物性制御」第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5., 横浜).

(31) 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).

(32) 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).

(33) 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.

### G. 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」特願 2006-001916.

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

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 結合 ADP 内包リポソームの動態に関する免疫電顕的検討-

分担研究者 鈴木英紀 (東京都臨床医学総合研究所 研究員)

研究要旨：本研究では人工血小板の *in vitro* での機能を把握するために、電子顕微鏡（電顕）を使った超微形態学的解析を行った。すなわち、新規に作製されたフィブリノゲン $\gamma$ 鎖 C 末端のドデカペプチド (H12) 結合 ADP 内包リポソームの超微形態を凍結割断レプリカ法、ネガティブ染色法および凍結超薄切片法で観察した。さらに、本リポソームの凝集系における挙動について検討した。凍結割断レプリカ法で観察すると、本リポソームは直径 150-300 nm の球状として同定された。一方、ネガティブ染色法では、レプリカ法と比べると、リポソームはやや大きく観察され、直径 200-400 nm の球状を示した。血小板減少症の状態に調整したヒト多血小板血漿に H12 結合 ADP 内包リポソームを添加し、さらにコラーゲンまたは ADP で刺激すると、コントロールのリポソームに比較して凝集が促進された。これらの凝集塊はコントロールに比して大きく、その中における血小板は変形度および相互の接着度が強く、さらに放出反応を示す所見が見られた。一部の凝集塊表面および血小板間には本リポソームが検出された。以上の結果より、H12 結合 ADP 内包リポソームの一部は血小板間に介在し、血小板減少時の凝集を促進させる能力を持つことが明らかになった。

A. 研究目的

本研究では、新規に作製された H12 結合 ADP 内包リポソームの超微形態を凍結割断レプリカ法、ネガティブ染色法、さらに凍結超薄切片法で観察した。さらに、止血効果を知る一環として、本リポソームを前もってヒト多血小板血漿 (PRP) に混合し、次いでコラーゲンまたは ADP を添加して惹起、促進される凝集を電顕で観察し、その効果を微細形態的に把握することによって最適な人工血小板作製の理論的根拠を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1) H12 結合 ADP 内包リポソームの電顕観察

新規に調製された直径約 200 nm の H12 結合 ADP 内包リポソームを、凍結割断レプリカ法、ネガティブ染色法および凍結超薄切片法で観察した。凍結割断レプリカ法では、H12 非結合の ADP 内包リポソーム液に氷晶防止剤として 1/3 量のグリセロールを加え、その 1 滴を凍結用試料ピン

に載せ、液体窒素を真空ポンプで排気して得られる固体窒素中 (-210°C) で凍結した。この試料を日本電子凍結試料作製装置 JFD-9010 にセットし、-170°C で試料をカミソリで割断した。その後、同装置内で割断面に白金、さらにカーボンに蒸着した。試料を大気中に戻し、漂白剤のハイター液の上に浮かべてリポソーム部を溶解した。得られたレプリカ膜は蒸留水で水洗後、電顕用グリッドメッシュに回収し、透過型電顕で観察した。

ネガティブ染色法では、H12 結合 ADP 内包リポソームの PEG の末端の一部をビオチン標識したものを使用した。すなわち、リポソームの浮遊液 5 ml を電顕用膜メッシュに載せ、過剰なりポソームを濾紙で吸い取って乾燥後、PBS 上に浮遊させた。0.5% BSA を含む PBS 上で 15 分間ブロッキングした後、リポソーム上のビオチンを検出するために家兎抗ビオチン抗体で 4°C、16 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、コロイド金粒子 (15 nm) 標識山羊抗家兎 IgG でさらに室温、1 時間インキュベートした。PBS、蒸留水

で水洗、1%酢酸ウランを載せて染色し、過剰な酢酸ウランを吸い取って乾燥させた後、透過型電顕で観察した。

一方、凍結超薄切片法では本リポソームを約30℃に暖めた10%ゼラチン液と等量に混合し、これをパラフィン板上に滴下し、4℃で冷却、凝固させた。リポソームを含むゼラチン塊をパラフィン板上から回収し、以下4℃、PBSで洗浄、1Mショ糖液中で1時間、さらに2.3Mショ糖液中に一昼夜浸漬した。この試料を液体窒素中で凍結後、超ミクロトームで凍結超薄切片を作製し、この切片を酢酸ウランで染色して透過型電顕で観察した。

### 2) H12結合ADP内包リポソームのコラーゲン凝集に対する効果の電顕的解析

3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として健康人の肘静脈から採血し、これを遠心して多血小板血漿 (PRP) を得た。20×10<sup>4</sup>個/μlに調製したPRPを凝集計にセットし、そこにH12結合ADP内包リポソームまたはコントロールのリポソーム0.05 mg/mlを添加し、さらに1分後にコラーゲン0.4 μg/mlを加えて凝集曲線を観察した。5分後、凝集計のキュベット内に0.2%グルタルアルデヒドを等量加えて試料を固定した。遠心後、ペレットを洗浄し、さらに1%四酸化オスミウムで後固定した。以下常法に従って試料作製を行い、超薄切片を得て、これを酢酸ウランおよびクエン酸鉛で二重染色して透過型電顕で観察した。

### 3) H12結合ADP内包リポソームのADP凝集に対する効果の電顕的解析

PRPに、前もってビオチン標識したH12結合ADP内包リポソームまたはコントロールのリポソーム2 mg/mlを添加後、凝集計にセットした。1分後、最終濃度3.5 μMのADPを加えて凝集曲線を観察しつつ、さらに5分後に8%パラホルムアルデヒド-0.2%グルタルアルデヒド混合液をキュベット内に等量加え、4℃で30分間試料を固定した。遠心後、ペレットをPBSで洗浄し、1Mショ糖液中で1時間、さらに2.3Mショ糖液中に一昼夜浸漬した。この試料を凍結用試料ピンに載せて液体窒素中で凍結後、超ミクロトームで凍結超薄切片を作製した。切片は0.5% BSAを

含むPBSでブロッキングし、さらにリポソーム上のビオチンを検出するために、上記1)のネガティブ染色法の免疫反応と同様に家兎抗ビオチン抗体、さらにコロイド金(15 nm)標識山羊抗家兎IgGでインキュベイトした。以下、常法に従って酢酸ウランで電子染色し、透過型電顕で観察した。

## C. 研究結果

### 1) H12結合ADP内包リポソームの電顕観察

凍結切断レプリカ法で観察すると、H12非結合ADP内包リポソームはまばらにしか存在しなかったが、直径150~300 nmの球状として同定された(図1)。リポソームは二重膜の外側のE面(extracellular face)を示す凹像と細胞質側のP面(protoplasmic face)を示す凸像の2種類が観察された。両面ともにその表面は比較的スムーズで、膜内粒子は観察されなかった。

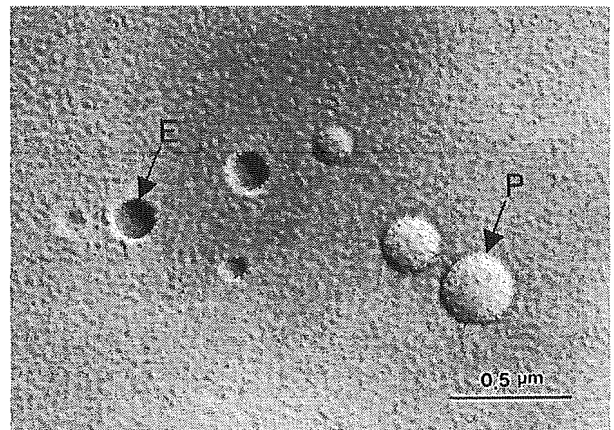


図1. 凍結切断レプリカ法によるADP内包リポソームの形態

大部分のリポソームは直径150~300 nmの球状として観察される。E面を露出している凹像とP面を露出している凸像が観察される。両面ともにその表面は比較的スムーズである。

一方、ネガティブ染色法では、レプリカ法と比べると、リポソームはやや大きく観察され、直径200~400 nmの球状を示した(図2)。その表面にはビオチンの存在を示すコロイド金粒子が多数分布した。しかし、ネガティブ染色法は試料を自然乾燥で作製することから、球状の形態が崩れて皺が多くなった像も観察された。またそのような所見の周囲では、コロイド金粒子が非特異的に散在する像も少なからず観察された。



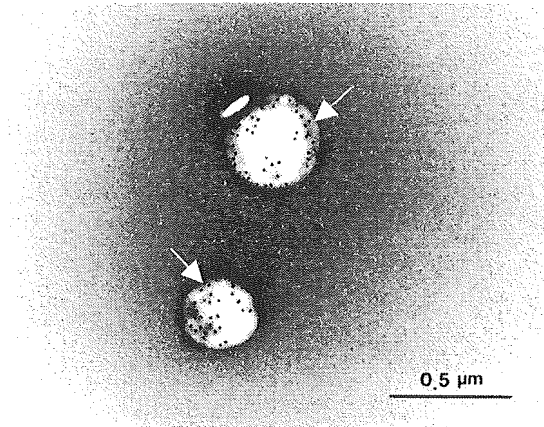


図2. ネガティブ染色法によるビオチン標識H12結合ADP内包リポソームの形態

リポソームは球状を保った小胞として観察されるが、やや大きく200~400 nmの直径を示している。リポソームの表面にはビオチンの存在を示すコロイド金粒子が分布している(矢印)。

凍結超薄切片法でH12結合ADP非内包リポソームを観察すると、ネガティブ染色法と同様に直径200~400 nmの球状またはやや扁平状に観察され、膜は二重膜を形成していた(図3A)。その内容はほぼ均一に観察された。ADP内包したリポソームもほぼ同様に観察されたが(図3B)、内容の違いは見い出せなかった。

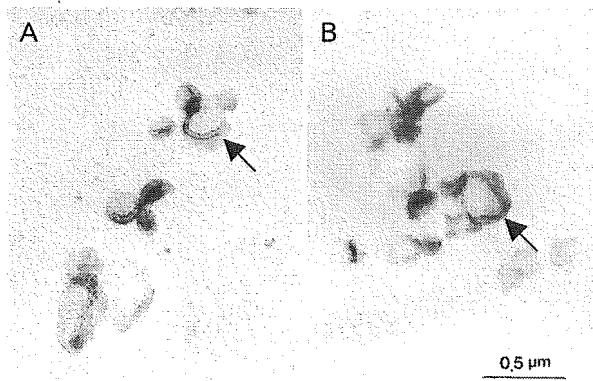


図3. 凍結超薄切片法によるADP非内包リポソーム(A)とADP内包リポソーム(B)の観察

(A)リポソームは直径200~400 nmの粒子状または扁平状に観察され、膜は二重膜構造を示す(矢印)。(B)ADP内包リポソームも同様な構造を示し、特にその内容の違いは見られない。

## 2) H12結合ADP内包リポソームの凝集に対する効果の電顕的解析

ヒトPRPにコントロールのPBSまたは各種リポソームを加え、1分後に0.4 μg/ml コラー

ゲンを添加すると、PBSでは1分以上のラグタイム、ゆっくりとした形態変化の後に約35%の透過度の上昇が見られ、さらに凝集の解離が観察された(図4a)。一方、PEG-リポソーム(図4e)、H12結合-PEG-リポソーム(図4d)、ADP内包PEG-リポソーム(図4c)を加えた凝集は、ラグタイムが順次短くなり、透過度もPBSコントロールより上昇した。特に、ADP内包-PEG-リポソーム(図4c)およびH12結合ADP内包-PEG-リポソーム(図4b)では、形態変化が迅速に起こるのが特徴であり、本リポソームでは最高の透過度の上昇を示し、解離も見られなかった。

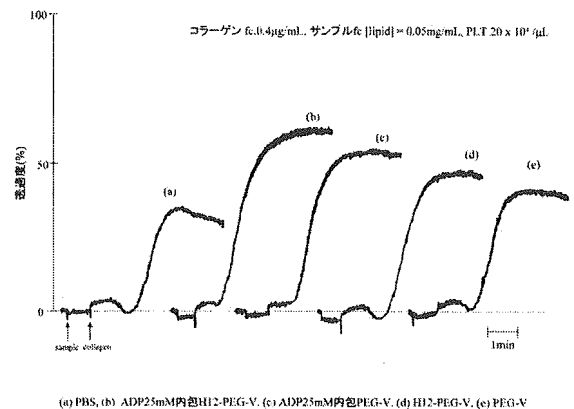


図4. 各種リポソームのコラーゲン凝集に対する効果

PRPにコントロールのPBSまたは各種リポソームを加え、1分後に0.4 μg/ml コラーゲンを添加すると、PBSでは1分以上のラグタイム、ゆっくりとした形態変化の後に約35%の透過度の上昇が見られる(a)。一方、PEG-リポソーム(e)、H12-PEG-リポソーム(d)、ADP内包PEG-リポソーム(c)を加えた凝集は、ラグタイムが順次短くなり、透過度もPBSコントロールより上昇する。H12-ADP内包-PEG-リポソーム(b)では最高の透過度の上昇を示し、解離も見られない。

一方、同様のPRPにADPのみを添加すると、最終濃度20 μMでは添加直後に形態変化の下降曲線が見られ、その後直ぐに直線的に上昇するパターンを示し、約75%の透過度でほぼ平衡になった(図5A)。同じく3.5 μMのADPの添加では、約35%の透過度の上昇が見られた後、凝集の解離が観察された(図5A)。H12結合ADP内包リポソームのADP凝集に対する効果を知るために、3.5 μMのADP濃度で検討した。前も

ってPRPとH12結合ADP内包リポソームを混和したものに3.5 $\mu$ M ADPを添加すると、ADPのみの時と同様にいったん下降し、その後約50%の透光度の上昇が見られた(図5B)。この時、凝集の解離は見られなかった。一方、コントロールのリポソームを加えたPRPは、約30%の透光度の上昇が見られた後、凝集が解離した(図5B)。

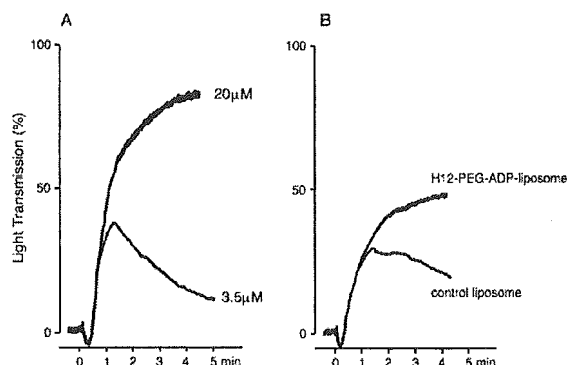


図5. H12結合ADP内包リポソームのADP凝集に対する効果

(A)  $20 \times 10^4$ 個/ $\mu$ lに調製したPRPにADPを添加すると、最終濃度20 $\mu$ Mでは直線的な透光度の上昇が見られ、約75%で平衡に達する。3.5 $\mu$ MのADPの添加では、約35%の透光度の上昇が見られた後、凝集が解離する。(B) 前もってPRPとH12結合ADP内包リポソームを混和し、さらに3.5 $\mu$ M ADPを添加すると、約50%の透光度の上昇が見られ、平衡に達する。一方、コントロールのリポソームを加えたPRPは、約30%の透光度の上昇が見られた後、凝集が解離する。

コントロールのリポソームまたはH12結合ADP内包リポソームをPRPに混ぜ、さらにADPを加え、5分後の凝集を電顕で観察した。コントロールのリポソームによる凝集では、血小板は偽足を出して変形し、相互に接着して小さな凝集塊を形成していた(図6)。しかし、血小板相互の接着度は弱く、ほとんどの血小板では $\alpha$ 顆粒、濃染顆粒が残存していた。一方、H12結合ADP内包リポソームによる凝集は、コントロールに比して凝集塊が大きく、さらにそれぞれの血小板の変形度および相互の接着度も強かった。血小板内顆粒はまだ残存している血小板が少なくなかったが、一部の血小板では消失し、放出反応を示す所見が見られた(図7)。

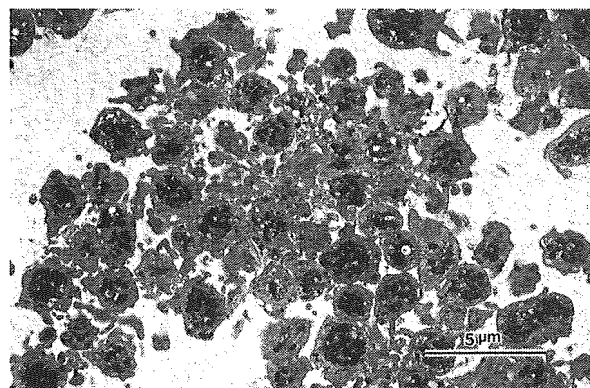


図6. コントロールリポソーム混和によるPRPのADP凝集5分後の像

血小板は偽足を出して変形し、相互に接着して小さな凝集塊を形成している。しかし、血小板相互の接着度は弱く、ほとんどの血小板では顆粒が残存している。

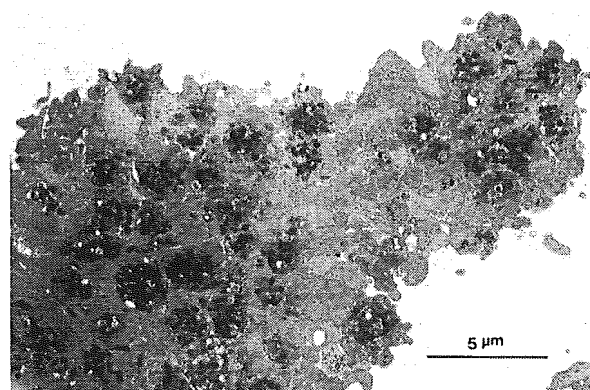


図7. H12結合ADP内包リポソーム混和によるPRPのADP凝集5分後の像

コントロールに比して凝集塊が大きく、それぞれの血小板の変形度および相互の接着度も強い。血小板内顆粒はまだ残存している血小板が少なくないが、一部の血小板では顆粒が消失し、放出反応を示す所見が見られる。

H12結合ADP内包リポソームのADP凝集に対する関与を知るために、凍結超薄切片用の凝集実験には本リポソームをピオチン標識したものを使用した。すなわち、PRPとH12結合ADP内包リポソームを混和後、さらにADPを加えて5分後に固定し、以下、凍結、超薄切片の作製後、抗ピオチン抗体を使う免疫電顕法で検討した。ADPを加えない無刺激のPRPでは、血小板は偽足を伸張しているものも観察されたが、全体的に円盤状を示した(図8)。顆粒はほとんどの血小板で保持されていた。ピオチンの存在を示すコロイド金粒子は、バックグラウンドレベルにしか分布しなかった。

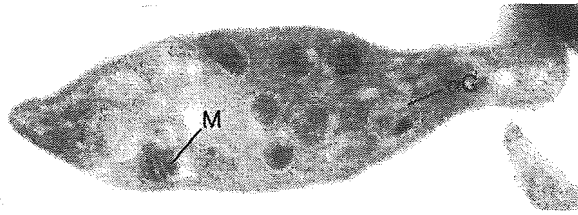


図 8. 多血小板血漿(PRP)中の血小板におけるビオチンの分布

PRP 中の血小板は一部で偽足形成が見られるものの、その大部分は円盤状を示す。ビオチンの存在を示すコロイド金粒子はほとんど分布しない。αG: α顆粒, M: ミトコンドリア

PRP と H12 結合 ADP 内包リポソームを混和後、さらに ADP を加えて 5 分後の血小板は、変形して比較的大きな凝集塊を形成していた(図9)。凝集塊における血小板相互の接着は、中心部では密着しており、辺縁部では粗な部分も観察された。円状に分布した多数のコロイド金粒子を持つ H12 結合 ADP 内包リポソームは多くは観察されなかったが、一部の血小板間に分布していた(図9 矢印)。

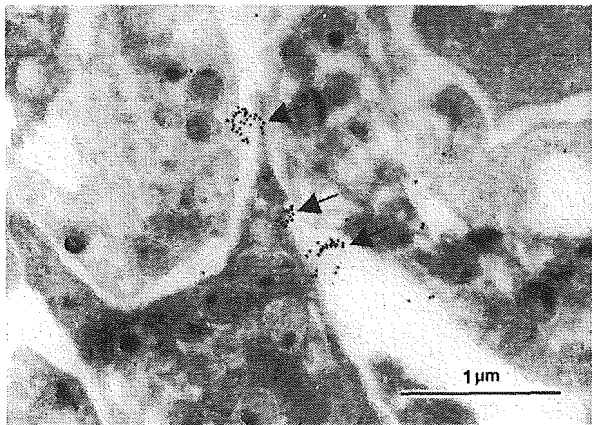


図 9. PRP に H12 結合 ADP 内包リポソームを混ぜ、さらに ADP を添加した凝集 5 分のビオチンの分布

血小板は凝集しているが、一部の顆粒は細胞質内に残存している。ビオチン標識したリポソームは、比較的疎な血小板間で多数のコロイド金粒子から成るが円状のクラスターとして検出される(矢印)。

#### D. 考察

血小板凝集機能を補助する人工血小板の開発において、活性化血小板の表面に発現している GPIIb/IIIa を認識するフィブリノゲンγ鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)を結合させた担体は、血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進させることを形態学的にも確認した(平成 15 年

度厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。H12 結合担体は活性化血小板の GPIIb/IIIa に結合し、血小板相互を接着させることによって凝集を促進させると予想される。しかし、H12 を識別できるツールが無かったために、そのメカニズムは必ずしも明らかではない。そこで、昨年度 H12 に対するウサギ抗体を作製し、本抗体を使う免疫電顕法で H12 結合担体の凝集における挙動を検討した。しかし、抗体の力価および特異性が必ずしも十分でなかったために、凝集血小板間の H12 結合リポソームは十分に検出されなかった。さらに今年度は、新規に調製された H12 結合 ADP 内包リポソームの PEG の末端にビオチンを標識することによって、凝集血小板間に分布すると予想される本リポソームを市販の抗ビオチン抗体で検出することを試みた。

ビオチン標識した H12 結合 ADP 内包リポソームを抗ビオチン抗体によるネガティブ染色法で観察すると、本リポソームは直径 200~400 nm の球状を示し、その表面にはビオチンの存在を示すコロイド金粒子が多数分布した。この結果より、ビオチン標識は凝集時に血小板間に存在すると予想される H12 結合 ADP 内包リポソームを形態学的に識別しうる有効なツールになることが示唆された。

ところで今回、ネガティブ染色法に加えて、H12 非結合 ADP 内包リポソームを凍結切断レプリカ法で観察した。ネガティブ染色法は試料を膜メッシュ上で風乾するために、水が乾燥する時に生じる表面張力によって試料のアーティファクトが生じることが考えられる。約 200 nm に調製されたリポソームであるが、やや大きく観察されたのはそこに起因していると考えられた。一方、凍結切断レプリカ法は試料に氷晶が生成しないように急速凍結し、レプリカ膜を作製するまで凍結状態で行う。従って、試料形態の保存は優れていると考えられる。また、試料は白金で影付けによって陰影を持つ三次元像を示し、ネガティブ染色法より立体的に観察できること、さらに膜内粒子をも観察できることの特徴をもつ。今回の検討では、リポソームはネガティブ染色法の結果よりやや小さい

直径 150~300 nm の球状を保った小胞として観察された。この結果は凍結割断レプリカ法が、よりアーティファクトのない正確な形態を示す方法と考えられた。さらに、リポソームは二重膜の外側の E 面 (extracellular face) を示す凹像と細胞質側の P 面 (protoplasmic face) を示す凸像の 2 種類が観察され、両面ともにその表面は比較的スムーズであった。膜内粒子は観察されなかった。以上の結果より、凍結割断レプリカ法はリポソームの形態および性状検索に有効な手段と考えられた。

次いで、ビオチン標識した H12 結合 ADP 内包リポソームの ADP 凝集における関与を検討するために、抗ビオチン抗体を使う凍結超薄切片法を実施した。H12 結合 ADP 内包リポソームを添加した ADP 凝集では、コントロールのリポソームを添加して形成される凝集が解離するのに対して、凝集が促進され、より大きな凝集塊が形成された。その中の血小板は変形度および相互の接着度が強く、さらに放出反応を示す所見が見られた。一部の凝集塊表面および血小板間には決して多くはないが、H12 結合 ADP 内包リポソームが検出された。一方、コントロール実験でのフィブリノゲンは ADP 凝集塊の全ての血小板間に存在した。すなわち、血小板を相互に接着させる H12 の能力はフィブリノゲン程ではないと考えられるが、少なくとも人工血小板としての H12 結合 ADP 内包リポソームの一部は、血小板間に介在して血小板減少時の凝集を促進させることが示唆された。

#### E. 結論

H12 を結合させたりポソームは、血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進させ、血小板の代潜物として有効に機能すること示してきた。さらに H12 結合リポソームを PEG 化、ADP の内包によって、血小板凝集促進作用はさらに向上することを明らかにした。今回の検討ではそのメカニズムを明らかにするために、ビオチン標識 H12 結合 ADP 内包リポソームの分布を市販の抗ビオチン抗体を使う免疫電顕法を実施した。H12 結合 ADP 内包リポソームは ADP 凝集塊の一部の表面および血小板間に検出されたこ

とから、本リポソームは血小板減少時でも血小板間に介在して、凝集を促進させる能力を持つことが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Watanabe, N., Suzuki, H., Tsuchida, E., Handa, M., Ikeda, Y.: Function of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312: 773-779, 2003.
2. 岡村陽介, 寺村裕治, 武岡真司, 土田英俊, 鈴木英紀, 渡辺直英, 半田誠, 池田康夫: フィブリノーゲン  $\gamma$  鎖ドデカペプチド結合粒子の血小板代潜物の展開. *人工血液*, 11: 205-210, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし