

200501100B

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15年度～17年度 総合研究報告書

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15年度～17年度  
総合研究報告書

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  
末松誠 慶應義塾大学医学部 教授 (15～16年度分担)  
梶村真弓 慶應義塾大学医学部 助手 (17年度 末松より引継)  
村田満 慶應義塾大学医学部 教授 (15～16年度協力者/17年度分担)

## 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 15 年度～17 年度 総合研究報告

#### I. 総合研究報告書

(総括研究報告)

池田 康夫

(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
  - 血小板代替物の流動条件下 *in vitro* 血小板血栓形成に及ぼす効果と血小板減少動物を用いた止血能評価
2. 担体、認識部位の選択による止血能をもつ微粒子系の精密合成 武岡 真司
  - フィブリノーゲン $\gamma$ 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リン脂質小胞体の分子設計
3. 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 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
  - ヒトへの投与を前提とした人工血小板の止血能と血栓性の評価に関する研究
5. 人工血小板の微小循環動態特性の生体内解析 末松誠・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
6. 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

#### II. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### III. 研究成果の刊行物・別冊

#### V. その他

## 総括研究報告書

平成 15～17 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  
総合研究報告書

主任研究者 池田 康夫 (慶應義塾大学医学部内科)

## 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）としてデザインされた人工微粒子（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し、その最適化を図ることである。

【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) とリポソーム (小胞体) (H12 小胞体)、②アデノシン 5'-二リン酸 (ADP) を内包させたリポソーム (H12 (ADP) 小胞体)、及び③ GPIIb $\alpha$  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。人工微粒子の形状や性状の最適化（ポリエチレングリコール (PEG) 化など）化学工学的手法により行った。*in vitro* 評価（血小板凝集計、流動条件下血小板血栓解析システム、電子顕微鏡による形態的観察）には、調整した血小板減少血液等を用い、人工微粒子の影響を解析した。新規人工血小板開発に資するために、血小板 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。*in vivo* 評価系として血小板減少ラットモデル、ラット動脈血栓モデル、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を行った。また、ラット腸間膜微小循環を用いた止血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・H12 小胞体の安全性と止血効果：生体適合性や分解性に優れた polyAlb と小胞体を H12 結合担体として選択し、形状や性状の最適化を行った。平成 15 年度は、流動状態下での *in vitro* 評価、血小板減少症モデルラットの作製と止血能 *in vivo* 評価を行い、H12-polyAlb は血小板減少ラットの出血時間を半減できること、また、H12 小胞体も流動状態下において、血小板凝集を補助できる微粒子であることを明らかにした。H12 結合微粒子は、活性化血小板に

特異的に結合し、静止血小板を活性化して血栓形成を促進する作用のないことを *in vitro* 評価にて明らかにした。平成16年度は、微粒子表面のPEG化によって血中滞留時間の大幅な延長に成功し、PEG化したH12-polyAlbやH12小胞体は、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。平成17年度は、ウサギ血小板減少モデルを確立し、H12-polyAlbは大型動物においても止血効果を有することを明らかにした。また、動物モデルでの単回投与による急性毒性は一切観察されず、流動条件下で3次元血栓形成に及ぼす血小板凝集増強作用が確認されが、過剰血栓や飛翔血栓の形成は認められなかった。安全性の観点からも微粒子の形状や性状の最適化がさら押し進める必要がある。

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においてH12小胞体は止血機能を有するが、その作用はH12-polyAlbに比較して弱かった（平成16年度報告）。そこで、平成17年度に、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、*in vitro*で血小板活性化作用を持たずに、アゴニスト惹起血小板凝集補助作用を示し、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。ADPなどの内包物質の選択により、止血機能を自由に操作できる可能性が示された。

3. rGPIb-小胞体・rGPIb-polyAlbの評価：平成15年度までに、rGPIb結合微粒子は高血流存在下でも止血部位へ特異的に集積する機能があるものの、局所に固定されず、したがって血栓形成に関与しない可能性が、*in vitro*評価系で明らかにされた。一方、H12結合微粒子は高血流条件下では血栓増強効果を示さなかった。平成16年度には、両者の欠点を克服する目的で、両認識分子を同時に担持した微粒子とそれぞれが結合する微粒子を混合した場合の機能評価を行ったところ、後者の系でより、高血流条件下での*in vitro*血栓増強作用を示した。平成17年度には、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結合微粒子に関してはより詳細な*in vitro*、*in vivo*評価による止血能の確認が今後の課題である。

4. 評価システムの構築と基礎知識の取得：ラット腸管膜を使用した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 システムが構築された。また、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現する  $\alpha$ 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】人工血小板の有力候補として、種々の微粒子（認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体）の安全性と止血効果を検討した。その結果、H12-polyAlb と H12(ADP)小胞体がほぼ同等の効果的な止血作用を有することを明らかにした。また、それらは *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急性作用を認めなかった。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された。開発された基盤システムや取得された基礎知識に立脚して、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

末松誠 慶應義塾大学医学部 教授 (15～16年度分担)

村田満 慶應義塾大学医学部 教授 (15～16年度：協力者/17年度分担)

梶村眞弓 慶應義塾大学医学部 助手 (17年度のみ)

## 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）およびその基本方針に明記され、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きた。

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。例えば、1993 年、Rybak らはデオキシコール酸で可溶化したヒト血小板蛋白質を再構成したリポソーム、1992 年、Coller らはヒト赤血球表面にヒト・フィブリノーゲンや RGD ペプチドを固定してヒト血小板との凝集を可能にしたものを血小板代替物として開発した。さらに、1999 年に Levi らによりアルブミンマイ

クロカプセルにヒト・フィブリノーゲンを担持させて血小板減少家兔に投与すると、出血時間の短縮や出血量の軽減が報告された。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。担体とな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。そして、基礎的検討によって候補分子として絞り込まれたのが、止血部位で特異的に認識されるフォンビレブランド因子の血小板受容体である GPIIb/IX 複合体の活性化部位であるリコンビナント GPIIb $\alpha$ 蛋白、コラーゲンの受容



体である GPIa/IIa 複合体のリコンビナント体、そして活性化依存性の受容体  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 インテグリンのリガンドであるフィブリノーゲンの活性化部位である合成ペプチド H12 であった。

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（GPIb $\alpha$  結合微粒子、GPIa/IIa 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、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。平成 17 年度は、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、H12-polyAlb の止血効果を確認した。また、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 ADP を内包させた H12(ADP)小胞体の作成を行い、その *in vitro*、*in vivo* 機能評価を行い、その安全性と増強された止血効果を確認した。さらに、GPIb $\alpha$  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、平成 15 年度より、今後の研究に資する基盤として不可欠な基礎システム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)を内包させたりポソーム(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。人工微粒子の形状や性状の最適化 (PEG 修飾など) 及び人工産物の大量製造は独自に蓄積した化学工学的手法で行った (武岡)。

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、半田、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 (半田、武岡、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 (末松、梶村)。

## C. 研究結果及び考察

1. H12-polyAlb・H12 小胞体の安全性と止血効果 : 生体適合性や分解性に優れた polyAlb と小胞体を H12 結合担体として選択し、形状や性状の最適化を行った。平成 15 年度は、流動状態下での *in vitro* 評価、血小板減少症モデルラットの作製と止血能 *in vivo* 評価を行い、H12-polyAlb は血小板減少ラットの出血時間を半減できること (武岡)、また、H12 小胞体も流動状態下において、血小板凝集を補助できる微粒子であること (半田) を

明らかにした。H12 結合微粒子は、活性化血小板に特異的に結合し、静止血小板を活性化して血栓形成を促進する作用のないことを *in vitro* 評価にて明らかにした (武岡、鈴木)。平成 16 年度は、微粒子表面の PEG 化によって血中滞留時間の大幅な延長に成功し、PEG 化した H12-polyAlb や H12 小胞体は、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 (武岡、半田)。平成 17 年度は、ブスルファンによるウサギ血小板減少モデルを確立し、H12-polyAlb は大型動物においても止血効果を有することを明らかにした (半田)。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 ± 51 秒) に匹敵する止血効果 (投与群の出血時間：330 ± 73 秒、対照群の出血時間：723 ± 78 秒、血小板数は共に： $20 \pm 3 \times 10^4 / \mu$ ) が得られた (平成 16 年度、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、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、動物モデルでの単回投与による急性毒性は一切観察されなかった。さらに、流動条件下で 3 次元血栓形成に及ぼす血小板凝集増強作用が確認されが、過剰血栓や飛翔血栓の形成は認められなかった (後藤)。安全性の観点からも微粒子の形状や性状の最適化がさら押し進める必要があり、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平成 16 年度に報告した (武岡)。しかしながら、その作用は H12-polyAlb に比較して弱かった。そこで平成 17 年度では、機能強化を図る目的で生理的な血小板刺激物質である ADP を内包させた H12 (ADP) 小胞体を作成して、基礎的検討を行った (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（鈴木）。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。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）としても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：平成15年度までに、rGPIb結合微粒子は高血流存在下でも止血部位へ特異的に集積する機能があるものの、止血血栓形成に関与しない可能性が、*in vitro*評価系で明らかにされた。一方、H12結合微粒子は高血流条件下では血栓増強効果を示さなかった。平成15年度には、両者の欠点を克服する目的で、両認識分子を同時に担持した微粒子とそれぞれが結合する微粒子を混合した場合の機能評価を行ったところ、後者の系でより、高血流条件下での*in vitro*血栓増強作用を示した（半田）。平成16年度には、動脈血栓症を増長する可能性が*in vitro*流動系で示された（後藤）。平成17年度には、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（村田）。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結合微粒子が病的な動脈血

栓形成を促進する可能性が示唆された。いうまでもなく、VWFと GPIIb/IIIa 複合体の結合は生理的な一次止血に不可欠であり、rGPIIb 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。止血機能の促進効果と動脈血栓の促進作用は表裏一体である可能性がある。

rGPIIb 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 技術による評価システムが構築された(末松、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に有用な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

人工血小板の有力な候補微粒子として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を検討した。その結果、H12-polyAlb と H12(ADP) 小胞体が動物モデルで効果的な止血機能を有することが明らかとなった。*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急性毒性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。

人工血小板の集学的な研究開発は、世界的に見て、当該プロジェクトが唯一である。今までに取得・蓄積した知識と基盤技術に立脚して、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、世界をリードして、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) Teramura, Y., Okamura, Y., Takeoka, S., Kainoh, M., Tsuchiyama, H., Narumi, H., Handa, M., Ikeda, Y. and Tsuchida, E. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 256-260 (2003).
- 2) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Watanabe, N., Suzuki, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Function of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 773-779 (2003).
- 3) Okamura, Y., Teramura, Y., Takeoka, S., Tsuchida, E., Suzuki, H., Watanabe, N., Handa, M., and Ikeda, Y. Development of fibrinogen  $\gamma$  chain dodecapeptide-conjugated particles, *Artificial Blood* **11**, 205-210 (2003).
- 4) 武岡真司, 岡村陽介, 土田英俊, 池田康夫 「血小板代替物の担体設計から Drug Local Delivery の可能性」, *血栓止血誌*, **15** (1), 21-26 (2004).
- 5) 武岡真司, 岡村陽介 「止血機能を有する微粒子系の設計と機能評価」, *日本心臓血管麻酔学会誌*, **8** (1), 35-41 (2004).
- 6) 武岡真司, 岡村陽介 「血小板代替物の展開」, *Molecular Medicine*, **41** (12), 1494-1500 (2004).
- 7) 武岡真司 「人工血液(赤血球, 血小板)の最近の進歩」, *化学工学56会誌*, 49-57 (2004).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) Takeoka, S. Developmental Trend of Artificial Blood (Artificial Red Blood Cells) *JMAJ*, **48**, 1-5 (2005).
- 11) Takeoka, S. Organ Microcirculation, Design and Modification of Nanoparticles for Blood Substitutes. *Springer*, 35-41 (2005).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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 $\alpha$ -conjugated latex beads under flow conditions. *J. Artif. Organs* (in press).

(15) 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).

(16) 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).

(17) 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).

(18) 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) Takoeka, S. Design and modification of nanoparticles for blood substitutes. *Organ Microcirculation (A gateway to Florida)*.

(2) Takoeka, 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).

(3) *Diagnostic and Therapeutic Interventions*) (Ishii, H, Suematsu, M., Tanishita, K, and Suzuki, H (Eds.)), **13**, 35-41 (2005).

(4) 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, 寺村 裕治, 武岡真司, 半田 誠, 池田 康夫, 土田英俊「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」, 第 52 回高分子学会年次大会, 2003.5.30. (名古屋).

(2) Teramura, Y., Okamura, Y., Takeoka, S., Handa, M., Ikeda, Y. and Tsuchida, E. "Recognition properties of polymerized albumin particles and phospholipids vesicles bearing recognition proteins", 7th International Symposium on Polymer for Advanced Technologies, 2003.9.23. (Florida).

(3) 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡真司, 半田 誠, 池田 康夫, 土田英俊「血小板代替物の研究展開:2 ずり速度の違いに対応できる微粒子系の設計」, 第 52 回高分子討論会, 2003.9.26.日 (山口).

(4) 寺村 裕治, 岡村 陽介, 武岡真司, 半田 誠, 池田 康夫, 土田英俊「血小板代替物の研究展開:1 分子集合系と重合系の粒子による機能の相違」, 第 52 回高分子討論会, 2003.9.26. (山口).

(5) 武岡真司, 岡村 陽介, 寺村 裕治, 半田 誠, 池田 康夫, 土田英俊「止血

能を有する微粒子系の設計と機能評価」, 第 8 回日本心臓血管麻酔学会学術集会, 2003.9.27. (奈良).

(6) 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫, 土田英俊「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003.10.31. (仙台).

(7) 寺村 裕治, 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫, 土田英俊「ドデカペプチド担持リン脂質小胞体の血小板認識能評価」, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003.10.31. (仙台).

(8) 武岡 真司, 岡村 陽介, 寺村 裕治, 半田 誠, 池田 康夫, 土田英俊「血小板代替物の設計と *in vitro*, *in vivo* 評価」, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003.11.1. (仙台).

(9) 岡村 陽介, 渡邊 直英, 鈴木 英紀, 武岡 真司, 村田 満, 池田 康夫, 半田 誠「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」, 第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 2003.11.29. (東京).

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

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

(12) 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真

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

(13) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果」, 第 11 回日本血液代替物学会年次大会, 2004.7.14. (札幌)

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

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

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

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



(東京)

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

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

(20) 武岡 真司「人工血液」, 最近の化学工学 56 講習会・「先端医療における化学工学」, 2004.12.9. (東京)

(21) 武岡 真司「機能性分子素子としての人工赤血球・人工血小板の構築」, 第 29 回日本顕微鏡学会, 2005.3.5. (東京)

(22) 武岡 真司「止血機能を持つナノ微粒子系(人工血小板)の創成」, バイオテクノロジー産学コラボレーション研究会「第 1 回技術セミナー」, 2005.3.11. (東京)

(23) 武岡 真司「薄膜状高分子構造体とその調製方法ーナノ絆創膏への挑戦ー」 Technology Link in W.T.L.O. (2006.3., 東京)

(24) 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).

(25) 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).

(26) 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).

(27) 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).

(28) 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).

(29) 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).

(30) 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).

(31) 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).
- (32) 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).
- (33) 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).
- (34) 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).
- (35) 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).
- (36) 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).
- (37) 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).
- (38) 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).
- (39) 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).
- (40) 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).
- (41) 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).
- (42) 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).
- (43) 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).

(44) 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).

(45) 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).

(46) 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).

(47) 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).

(48) 斉藤 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).

(49) 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).

(50) 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).

(51) 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).

(52) 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).

(53) 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).

(54) 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).

(55) 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).

(56) 半田 誠: 人工血小板、シンポジウム「生体機能模倣: 生体置換の新しい展開」、化学工学会関東支部 50 周年記念大会 2005.8., 東京)

### 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) 池田 康夫, 半田 誠, 武岡 真司.  
ペプチド結合体 特願 2003-029847.

(2) 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.

(3) 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.