

## 分担研究報告書

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)  
分担総合研究報告書

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

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】

血小板代替物の *in vitro* 評価系として、血漿成分はそのままで血小板数のみ減少させた系、即ち、血小板減少症をシミュレートした系が理想であり、平成 14 年度では、白血球除去フィルターを用いた血小板減少血液の調製法を確立した。さらに、血小板代替物の開発において、活性化血小板表面上の 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) をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少症状下でも血小板凝集を促進することが確認でき、さらに未活性化血小板と相互作用しにくい配列であることが判明した(平成 14 年度 厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。この機能は低ずり速度下で最大限に発揮され、ずり速度の増大と共に機能が低下した。

平成 15 年度は、高ずり速度下でフォンビルブランド因子(VWF)を認識する血小板膜糖蛋白質のリコンビナント体(rGPIb $\alpha$ )を組合せた系を考案し、流動状態下、種々のずり速度の違いにおける血小板凝集機能を評価した。ひとつの担体に H12 と rGPIb $\alpha$  の両者を担持させた系((H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads)は有効ではなく、H12-latex beads、rGPIb $\alpha$ -latex beads 混合系において、高ずり速度下で両者の協同効果による血小板凝集が発現された。他方、担体形状の最適化を図る目的で、出血部位モデル基板に対する単一血小板の接着挙動を、高速度撮影カメラ(Motion Pro 2000/2G, Redlake MASD 製)、輝度増幅装置(Roper-II 6653, 浜松フォトニクス製)を備え付けた倒立型蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE2000-U, ニコン製)にて観察した。その結果、画像解析・計測ソフト(Image-Pro PLUS, プラネトロン製)にて解析できる流動条件下細胞接着解析システムを構築できた。

平成 16 年度は、ポリ(エチレングリコール)(PEG)修飾によって血中滞留時間の延長に成功した H12-PEG-アルブミン重合体(平成 16 年度 分担研究報告書 武

岡真司報告分)の投与3時間後の止血能評価を行った。その結果、活性化血小板へのH12の特異的認識能はPEG鎖を付加しても影響を受けないことが確認でき、血小板減少ラットの止血能評価より、このPEG修飾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が明らかとなった。

平成17年度は、より大型の動物(ラビット)を用いてH12-PEG-polyAlbの止血能評価を行うために、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を有することが確認できた。

## A. 研究目的

血小板凝集機能を補助する微粒子の開発において、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末端アミノ酸序列(HHLGGAKQAGDV:H12)をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進することが確認でき、さらに未活性化血小板と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年度厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。しかし、その機能は低ずり速度下で最大限に発揮され、ずり速度の増大と共に機能低下が認められた。

平成15年度は、高ずり速度下でフォンビルブランド因子(VWF)を認識する血小板膜糖蛋白質のリコンビナント体(rGPIIb $\alpha$ )を組合せ、血小板減少症モデル血液を用いて、流動状態下、種々のずり速度の違いにおける血小板凝集機能を評価することを目的とした。また、高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システムを構築し、単一血小板の接着挙動を観察した。

平成16年度は、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)の活性化血小板への特異的結合、さらに投与3時間後の止血能評価を目的とした。

平成17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. 認識部位担持微粒子の調製方法

#### 1.1. rGPIIb $\alpha$ -latex beadsの調製

rHSA溶液(50 mg/mL) 1.5 mLにlatex beadsを混合し、振とうさせた(20 °C, 2 hr)。遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4 °C, 3 times)にて未吸着 rHSA を除去後、リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)にて再分散させた。

HSA吸着 latex beads分散液((HSA) latex beads) に N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate(SPDP)エタノール溶液(5 mM) 5  $\mu$ Lを添加し、振とうさせた(20 °C, 30 min)。遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4 °C, 3 times)にて、

未反応 SPDP、副生成物を除去後、pyridyl disulfide 結合(HSA) latex beads (PD-latex beads,  $4.0 \times 10^6$  particles/ $\mu\text{L}$ )を得た。

rGPIb $\alpha$ (66.4 mg/mL) 13  $\mu\text{L}$  を PBS (168  $\mu\text{L}$ )で希釈後、SPDP エタノール溶液(5 mM) 5  $\mu\text{L}$  を添加して振とうさせた(r.t., 20 min)。DTT(1 M) 4  $\mu\text{L}$  を混合後(r.t., 2 min)、GPC にて精製、SH-rGPIb $\alpha$ 溶液を得た(1 mL)。この溶液を PD-latex beads と混合、振とう(r.t., 2hr $\rightarrow$ 4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 hr)させ、rGPIb $\alpha$ -latex beads を得た( $2.0 \times 10^6$  particles / $\mu\text{L}$ , 1 mL)。rGPIb $\alpha$ 結合量は GUR20-5 と HRP 標識 GUR83-35 を用いたサンドイッチ ELISA 法にて定量した。

### 1.2. H12-latex beads の調製

PD-latex beads ( $4.0 \times 10^6$  particles/ $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ )に SH-H12 (10 mM, 8  $\mu\text{L}$ )、あるいは SH-RGD (10 mM, 8  $\mu\text{L}$ )を混合し、振とうさせた(20  $^{\circ}\text{C}$ , 12 hr)。遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 3 times)にて上清を除去した後、H12-latex beads あるいは RGD-latex beads ( $2.0 \times 10^6$  particles/ $\mu\text{L}$ , 1 mL)を得た。latex beads 表面の H12, RGD 結合量は、2-thiopyridone (2TP) の 343nm の吸収から決定した(HPLC, TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub> column, 7.8mm o.d. x 300mm h, 1mL/min, PBS)。

### 1.3. (H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads の調製

(HSA)latex beads( $4.0 \times 10^6$  particles/ $\mu\text{L}$ )に SPDP エタノール溶液(20 mM) 10  $\mu\text{L}$  を添加、振とうさせ(20  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min)、PD-latex beads を得た。SH-H12 (4 mM, 8  $\mu\text{L}$ )を混合、振とう後(20  $^{\circ}\text{C}$ , 12

hr)、遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 3 times)にて精製し、H12-latex beads (H12-latex beads,  $4.0 \times 10^6$  particles/ $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$ )を得た。

2 種類の rGPIb $\alpha$ 溶液((a) 1mg, (b) 2mg)に SPDP エタノール溶液(5 mM)をそれぞれ 6、12  $\mu\text{L}$  添加して振とうさせた(r.t., 20 min)。DTT(f.c. 20 mM)を混合後(r.t., 2 min)、GPC にて精製、SH-rGPIb $\alpha$ 溶液を得た。両溶液を H12-latex beads と混合、振とう(r.t., 2 hr $\rightarrow$ 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12 hr)させ、rGPIb $\alpha$ の結合量の異なる 2 種類の(H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads(a)、(b)を得た( $2.0 \times 10^6$  particles / $\mu\text{L}$ , 1 mL)。

### 1.4. H12-PEG-polyAlb の調製法

polyAlb 分散液([HSA] = 20 mg/mL, 30 mL, 粒径 200 $\pm$ 80 nm)に MAL-PEG-NHS DMSO 溶液(10 mM, Mw = 3.4 or 5.0 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, Mw = 5.0 kDa)をそれぞれ 2840  $\mu\text{L}$  添加した。遠心分離(25000 rpm, 10min)にて精製後、MAL-PEG-polyAlb ([HSA]=20 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., 12 hr)、遠心分離 (25000 rpm, 10 min) にて H12-PEG-polyAlb ([HSA]=10 mg/mL, 30 mL)を回収した。

## 2. 認識部位担持微粒子の流動状態下での *in vitro* 評価法

### 2.1. 白血球除去フィルターを用いた血小板減少血液の調製法

赤血球製剤用白血球除去フィルター(NEO1J, 日本ポール社製)に全血(PPACK, f.c. 40  $\mu$ M)を重力落差にて透過させ、血球測定装置(K-4500, Sysmex製)で各血球数、ヘマトクリット(Hct)を計測した。また、全血(1/10(v/v) 3.8%クエン酸ナトリウム)を遠心分離(600 rpm, 15 min, r.t.)し、得られた platelet-rich plasma(PRP,  $4.0 \times 10^5/\mu$ L)をフィルター通過後の血液中に添加することで血小板数  $5.0 \times 10^4/\mu$ L に調整した血小板減少血液を作製した。

## 2.2. コラーゲン基板の調製法

コラーゲン(3 mg/mL, TypeI-A (ウシ腱), 新田ゼラチン社)を PBS(pH7.4)中に分散させ(f.c. 30  $\mu$ g/mL)、ガラス基板(直径 24 mm, 厚み 0.5 mm)上に浸漬させた(4  $^{\circ}$ C, 8 hr)。BSA 溶液(20 mg/mL)にてブロッキングし(r.t., 2 hr)、PBS で洗浄後使用した。

## 2.3. VWF 固定化基板の調製法

VWF(3.4 mg/mL, 三菱ウェルファーマ社より供与)を PBS(pH 7.4)にて希釈し(f.c. 10  $\mu$ g/mL)、ガラス基板(直径 24mm, 厚み 0.12 mm)上に浸漬させた(4  $^{\circ}$ C, 8 hr)。さらに BSA 溶液(20 mg/mL)にてブロッキングし(r.t., 2 hr)、PBS で洗浄後使用した。

## 2.4. 流動下での蛍光顕微鏡観察、解析

血小板減少血液 5 mL に各検体を添加、振とうさせた(37  $^{\circ}$ C, 10 min)。血小板と検体のどちらか一方に蛍光標識した(血小板:3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine(DiOC<sub>6</sub>), 検体: FITC)。

37  $^{\circ}$ C の恒温槽内のフローチャンバ

一灌流部に蛍光顕微鏡(TE300, Nikon)を組み込んだ装置に、血小板減少血液を種々のずり速度にて流動させ、CCD カメラを通じて連続測定し、画像解析装置(Argus 50, 浜松ホニクス)にて解析した。

## 2.5. 高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システム

血小板減少血液 5mL 中の血小板は 3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine(DiOC<sub>6</sub>) にて蛍光標識した。

VWF 基板をフローチャンバー(マルトー製)に組み込み、ペリスタリックポンプ(MINIPULS 3, ギルソン製)を用いて血液(血小板に蛍光標識)を灌流させた。vWf 基板に対する単一血小板の接着挙動を、高速度撮影カメラ(Motion Pro 2000/2G, Redlake MASD 製)、輝度増幅装置(Roper-II 6653, 浜松フォトニクス製)を備え付けた倒立型蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE2000-U, ニコン製)にて観察し、画像解析・計測ソフト(Image-Pro PLUS, プラネトロン製)にて解析した(1 フレーム 1/250 秒)。

## 3. 活性化血小板への H12-PEG-polyAlb の特異的結合能評価

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, r.t.)して多血小板血漿(PRP)を得た。PRP に ACD 溶液(15% (v/v))を混合し prostagrandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>, f.c. 1  $\mu$ M) を添加後遠心分離し(2200g, 7 min)、上清を除去した。RCD 溶液(含 1  $\mu$ M PGE<sub>1</sub>)に再分散させ、同操作を再度行なった後、Hepes-Tyrode 緩衝液(pH 7.4)で再

分散して洗浄血小板分散液( $1.0 \times 10^5$  / $\mu$ L)を調製した。

洗浄血小板 ( $1.0 \times 10^5$  / $\mu$ L, 50  $\mu$ L)に FITC 標識した検体 (PEG-polyAlb, H12-PEG-polyAlb, polyAlb, H12-polyAlb, f.c.[lipid] = 14 mg/mL)を混合し、トロンビン(f.c. 3 U/mL)にて血小板を活性化させ、37°Cにて10分間振とう、ホルムアルデヒド(f.c. 1% (v/v))にて固定した。フローサイトメトリー測定による血小板分画の蛍光陽性率から、血小板への H12-PEG-polyAlb の結合率を測定した。

#### 4. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

##### 4.1. 血小板減少ラットの調製法

Wistar系雄性ラット(8週齢、230-250 g)は日本クレアから購入した。ブスルファンポリエチレングリコール溶液(5mg/mL)を0、3日目に尾静脈投与し(全投与量 20, 30, 40 mg/kg)、体重、各血球変動を計測した(K-4500、Sysmex)。

##### 4.2. 出血時間測定法

ブスルファン投与(20 mg/kg)開始から10日目を血小板減少症ラットとして、セボフラン麻酔後、検体(H12-polyAlb、polyAlb)を尾静脈投与した(4mL/kg)。また、生理食塩水をコントロール群とした。検体投与5、あるいは180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2.5 mm, 深さ1 mm)。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。

#### 5. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

##### 5.1. 血小板減少ラットの作製法

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)-セラクター(2%)溶液(ケタミン/セラクター=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(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)。

##### 5.2. 出血時間測定法

投与開始から15日目の血小板減少症ラビット([PLT] =  $2.6 \pm 0.8 \times 10^4$  / $\mu$ L)にケタミン-セラクター水溶液にて麻酔後、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、耳の血管を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。

#### **C. 研究結果及び考察**

##### 1. H12-latex beads, rGPII $\alpha$ -latex beads 共存系

架橋剤 SPDP にて PD 基を導入した

rGPIb $\alpha$ を DTT にて還元して得られた SH-rGPIb $\alpha$ を H12-latex beads 分散液中 (H12 結合量  $2.0 \times 10^5$  分子/1 粒子)に混合、静置(4 °C, 12 hr)した。その結果、latex beads 1 粒子あたり rGPIb $\alpha$ を(a)  $1.7 \times 10^3$ 、(b)  $5.0 \times 10^3$  分子結合させた (H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads が得られた (ELISA 法)。

血小板凝集計を用いて微粒子担持 H12 の機能を測定したところ、H12-latex beads は latex beads と比較して血小板凝集を促進させた。これは、H12-latex beads が血小板と多点結合して凝集したものと考えられる。他方、(H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads では、Fig. 1 (a)、(b)のように rGPIb $\alpha$ 結合量の増大と共に(H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads による血小板凝集促進能は低下した。これは高分子量(100kDa)の rGPIb $\alpha$ の立体障害により H12 (1.3kDa)の活性化血小板との結合が阻害されたためと考察された。ひとつの担体に rGPIb $\alpha$ と H12の両者の担持は、修飾方法の更なる工夫が必要と判断された。

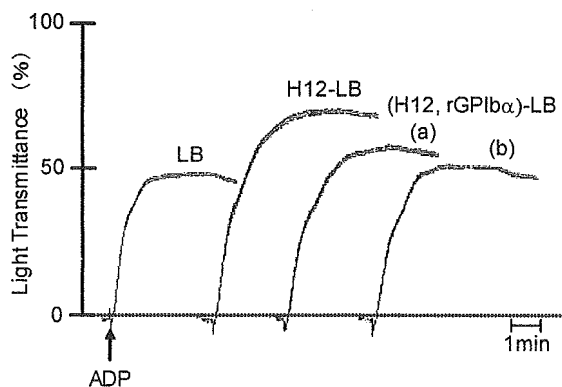


Fig. 1 ADP(3 $\mu$ M)-induced platelet ( $2.0 \times 10^5/\mu$ L) aggregation in the presence of H12- or (H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads (Number of H12 / LB:  $2.0 \times 10^5$ , number of rGPIb $\alpha$  / LB; (a):  $1.7 \times 10^3$ , (b):  $5.0 \times 10^3$ ).

次に、H12-latex beads と rGPIb $\alpha$ -latex beads の混合系を各々の単独系と流動下で比較、検討した。まず(1) H12-latex

beads 単独系の粘着占有率は、低ずり速度で最大となり、ずり速度の増大と共に低下した(Fig. 2 (a)  $\diamond$ )。他方、(2) rGPIb $\alpha$ -latex beads 単独系では逆に高ずり速度の増大と共に上昇した(Fig. 2 (a)  $\triangle$ )。

両者の混合系では、特に高ずり速度時に(1)と(2)の相加平均(Fig. 2 (a)  $\square$ )よりも増大する傾向が得られた(Fig. 2 (a)  $\circ$ )。同実験系を血小板側から観察すると、同様に混合系では高ずり速度時に(1)と(2)の相加平均(Fig. 2 (b)  $\square$ )より増大する傾向が得られた(Fig. 2 (b)  $\circ$ )。

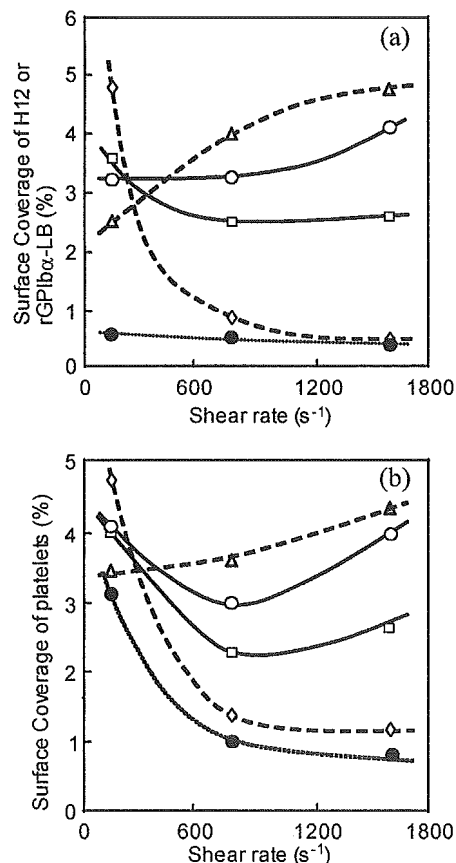


Fig. 2 Surface coverage of latex beads (LBs) (a) and platelets (b) at various shear rates: non-coated ( $\bullet$ ;  $1.0 \times 10^5/\mu$ L), H12- ( $\diamond$ ;  $1.0 \times 10^5/\mu$ L), rGPIb $\alpha$ - ( $\triangle$ ;  $1.0 \times 10^5/\mu$ L), a mixture of ( $\circ$ ) H12- ( $5.0 \times 10^4/\mu$ L) and rGPIb $\alpha$ -LBs ( $5 \times 10^4/\mu$ L).  $\square$ : calculated mean value ( $(\diamond + \triangle) / 2$ ).

そこで、高ずり速度下、H12-latex beads、rGPIb $\alpha$ -latex beads 共存系の流

動後の基板を SEM 観察したところ、血栓への H12-latex beads の結合数は H12-latex beads 単独系と比較して約 5 倍増大した(data not shown)。

また、高ずり速度条件下( $1600s^{-1}$ )、H12-あるいは rGPIb $\alpha$ -latex beads 共存系における血小板血栓の観察により、血流に対して血小板血栓の正面、背面部に H12-latex beads が、側面部で rGPIb $\alpha$ -latex beads が結合する傾向が観察された(Fig. 3)。

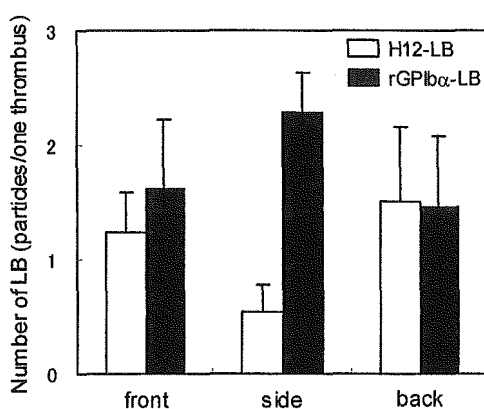


Fig. 3 The number of H12- (opened column) or rGPIb $\alpha$ -LBs (closed column) on the thrombus examined with SEM. Blood was perfused in the presence of H12- and rGPIb $\alpha$ -LBs over the collagen surface at a shear rate of  $1600s^{-1}$ .

これは、高ずり速度下では rGPIb $\alpha$ -latex beads によって血小板凝集が促進され、形成された血栓の正面と背面には乱流が生じ、そこへ H12-latex beads の結合が起こって血小板凝集を促進させたためと考えられた(Fig. 4)。従って血栓形成に両者の共存による協同効果の存在が初めて観察された。

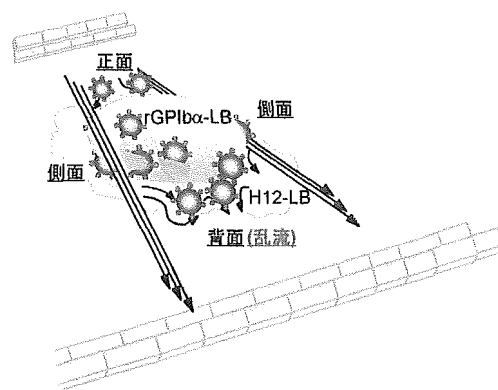


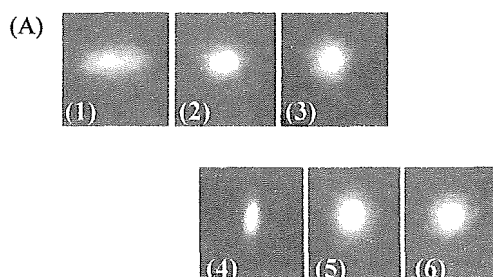
Fig. 4 Platelet thrombus formation in the presence of H12-latex beads and rGPIb $\alpha$ -LBs.

## 2. 高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システム

vWf 基板に対する単一血小板の接着挙動を、高速度撮影カメラ(Motion Pro 2000/2G, Redlake MASD 製)、輝度増幅装置(Roper-II 6653, 浜松フォトニクス製)を備え付けた倒立型蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE2000-U, ニコン製)にて観察し、画像解析・計測ソフト(Image-Pro PLUS, プラネトロン製)にて解析した。

流動血小板(ずり速度  $1600s^{-1}$ ) は、vWf 基板に接着(tether)直後、まず円盤状構造の面の広い部分が vWf 表面に触れるように回転した。徐々に円盤状から球状へと形態変化し、それに伴いローリング速度は低下し粘着した。

血小板接着後の形状を楕円とみなし、楕円長短軸比とローリング速度を経時的解析を行った結果を Fig. 5 に示す。





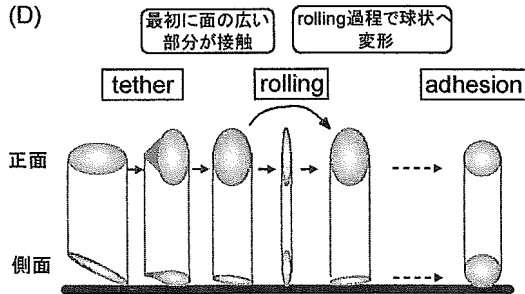
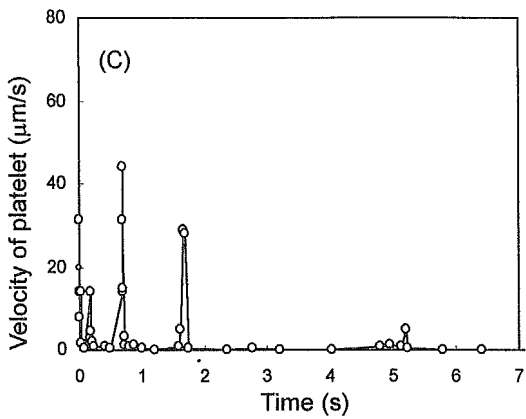
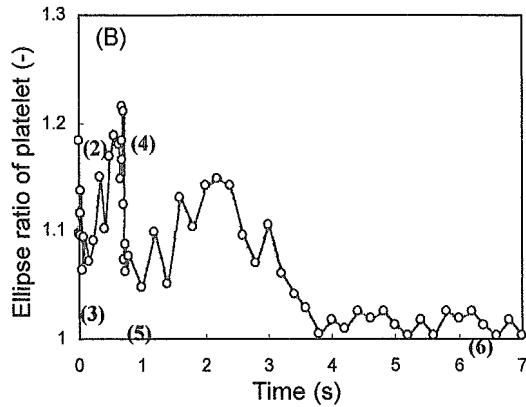


Fig. 5 (A) Tether and rolling images of single platelet over the vWf surface. (B) Time course studies for ellipse ratio and (C) velocity of single platelet interacting with the vWf surface at a shear rate of  $1600 \text{ s}^{-1}$ . (D) Schematic representation of tether and rolling of the single platelet.

この解析法を用いることで、単一血小板の接着挙動を形状変化より議論することが可能となると考えられた。

### 3. H12-PEG-polyAlb の投与 3 時間後の止血能評価

#### 3.1. H12-PEG-polyAlb の物性

活性化血小板への認識能が保持さ

れ、血中滞留時間を大幅に延長させるために調製された H12-PEG-polyAlb (粒径  $200 \pm 80 \text{ nm}$ ) の物性を以下に示す。

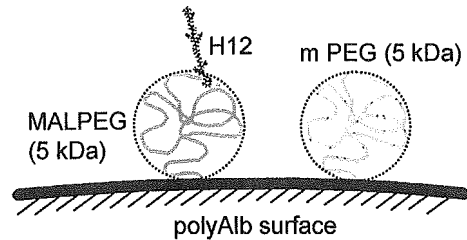


Fig. 6 Modification image of mPEG, MALPEG, and H12 to the surface of polyAlb. Mw of MALPEG: (●) 3.4 kDa, (○) 5.0 kDa.

Table 1 Characterization of H12-PEG-polyAlb

	PEG-polyAlb	H12-PEG-polyAlb
MALPEG ( $10^4$ /particles)	1.2	1.2
mPEG ( $10^4$ /particles)	6.1	6.1
H12 ( $10^4$ /particles)	-	1.0
$T_{1/2}$ (min)	210	180

### 3.2. 活性化血小板への H12-PEG-polyAlb の特異的結合

FITC 標識 H12-PEG-polyAlb 存在下、トロンビン刺激活性化血小板に対する結合率を測定したところ、 $86.8 \pm 2.2 \%$  であり、H12-PEG-polyAlb は活性化血小板へ結合することを確認した (Fig. 7)。また、トロンビン未刺激時 ( $1.1 \pm 0.3 \%$ )、PAC-1 存在下 ( $7.3 \pm 0.9 \%$ ) では結合は抑制され、PEG-polyAlb 存在下 ( $1.4 \pm 0.3 \%$ ) も同様であった。従って、H12-PEG-polyAlb は活性化血小板と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、PEG 未修飾体 (H12-polyAlb) 存在下では  $91.1 \pm 7.9 \%$  となり、H12-PEG-polyAlb とほぼ同等であったことから、PEG を介して H12

を結合させても活性化血小板への結合能が保持されることも確認できた。

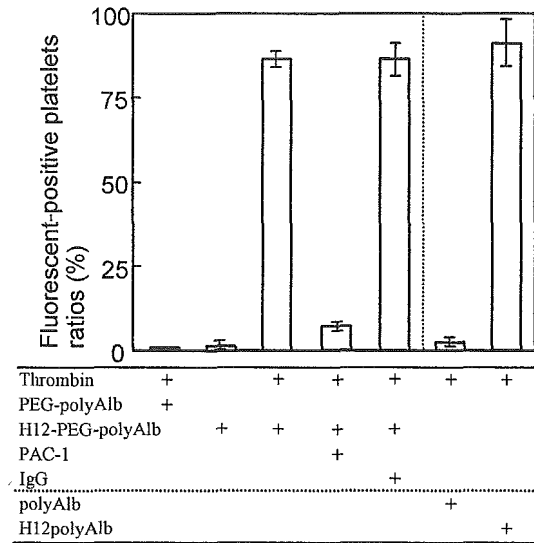


Fig. 7 Specific binding of H12-PEG-polyAlb to activated platelets using a flow cytometry.

### 3.3. 血小板減少ラットの作製

ブスルファンを0、3日目に尾静脈投与したところ(全投与量 20, 30, 40 mg/kg)、投与量依存的に血小板減少速度は増大したが、30, 40 mg/kg 投与群は、それぞれ投与開始 15、11日目に死亡した。20 mg/kg 投与群では再現性よく血小板数が減少し、10日目で  $19.6 \pm 2.6 \times 10^4 / \mu\text{L}$ (正常値の約 1/4~1/5) となり 20日目以降には血小板数の回復が認められた(死亡例なし)(Fig. 8)。

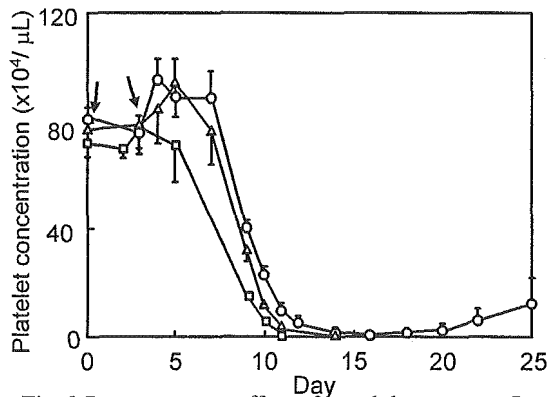


Fig. 8 Dose-response effect of busulphan on rats. Rats were injected with busulphan at a total dose of 20 mg/kg ( $\circ$ ), 30 mg/kg ( $\Delta$ ), or 40 mg/kg ( $\square$ ) as described in Materials and Methods. Tail vein blood was collected at intervals and platelet count measured. Arrows show injection day of busulphan (N = 5).

また、ブスルファン投与 10日目では、ブスルファン未投与群(Table 2)と比較して白血球の減少が若干見られたものの、体重は増加し、赤血球、ヘマトクリット(HCT)は維持されていた(Table 3)。しかし、11日目以降より赤血球数も減少し始めた。従って、ブスルファン投与量 20 mg/kg が最適であると判断し、10日目以前を血小板減少ラットとして採用した。

Table 2 Change of weight and blood cells for normal rats (N=6).

	Day	
	0	10
Weight (g)	$251 \pm 8$	$304 \pm 15$
RBC ( $10^4 / \mu\text{L}$ )	$702 \pm 12$	$716 \pm 30$
WBC ( $10^2 / \mu\text{L}$ )	$156 \pm 24$	$127 \pm 28$
HCT (%)	$42.8 \pm 1.6$	$43.0 \pm 2.1$

Table 3 Change of weight and blood cells before and after busulphan injection (N=6).

	Day	
	0	10
Weight (g)	$258 \pm 10$	$288 \pm 12$
RBC ( $10^4 / \mu\text{L}$ )	$728 \pm 15$	$700 \pm 23$
WBC ( $10^2 / \mu\text{L}$ )	$127 \pm 15$	$73 \pm 8$
HCT (%)	$47.6 \pm 1.5$	$45.2 \pm 2.3$

### 3.4. 出血時間測定

ブスルファン投与開始より 8.5、9、10日目のラットの血小板数は、それぞれ  $57 \pm 4 \times 10^4$ 、 $41 \pm 3 \times 10^4$ 、 $20 \pm 3 \times 10^4 / \mu\text{L}$ であった。そこで、出血時間を測定したところ、それぞれ  $288 \pm 56$ 、 $366 \pm 153$ 、 $712 \pm 131$ 秒であり、血小板数の減少に伴い出血時間が延長した。特に10日目の血小板減少ラットの出血時間は、正常ラット([血小板] =  $81 \pm 9 \times 10^4 / \mu\text{L}$ )のそれ( $201 \pm 51$ 秒)と比較して、有意に約4倍延長した(Fig.

9)。従って、ブスルファン投与開始 10 日目の血小板減少ラットを採用し、各検体の止血能評価を行った。

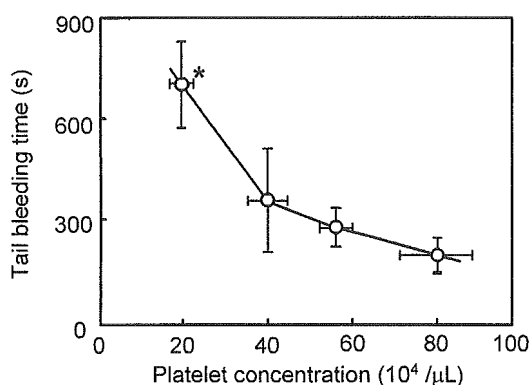


Fig. 9 Correlation of tail bleeding time with platelet count in the rat (N = 5). \*P < 0.05 for Day 10 group vs. normal group.

H12-PEG-polyAlb を 4、20、40 mg/kg 投与し 3 時間経過後の出血時間を測定したところ、それぞれ  $626 \pm 158$ 、 $594 \pm 84$ 、 $330 \pm 73$  秒であり、投与量依存的に出血時間が短縮した(Fig. 10)。特に 40 mg/kg 投与時は生理食塩水群 ( $712 \pm 131$  秒)、PEG-polyAlb 群 ( $723 \pm 78$  秒)と比較して有意に短縮する結果が得られ、正常対照ラットの出血時間に匹敵した。

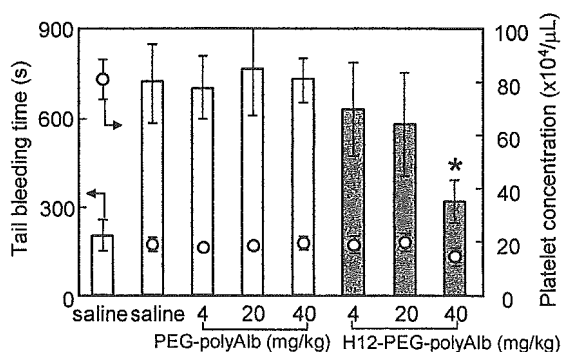


Fig. 10 Effects of the administration of H12-PEG-polyAlb on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEG-polyAlb was 4, 20, 40 mg/kg equivalent of albumin.  $\circ$ ; platelet count in the rats (N = 6-10). \*P < 0.05 for H12-PEG-polyAlb vs. PEG-polyAlb group at the same dose.

以上より、H12-PEG-polyAlb は投与

3 時間経過後でも止血能を有する微粒子であることが証明できた。

#### 4. 血小板減少ラビットの作製法の確立と H12-PEG-polyAlb の止血能評価

##### 4.1. 血小板減少ラビットの作製

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. 11)。しかし、40、50 mg/kg 投与時では、ヘマトクリット値(HCT)や白血球数も、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. 12 (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. 12 (A))。HCT の減少は、出血時間の延長を引き起こすため、ブスルファン投与量は 30 mg/kg に決定した。

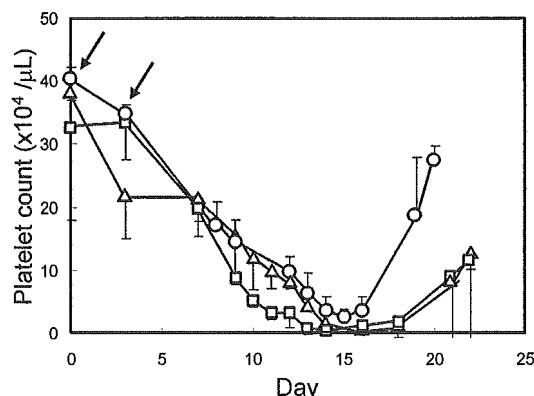


Fig. 11 Dose-response effect of busulphan on rabbits. rabbits were injected with busulphan at a total dose of 30 mg/kg ( $\circ$ ), 40 mg/kg ( $\Delta$ ), or 50 mg/kg ( $\square$ ). Ear vein blood was collected at intervals and platelet count measured. Arrows show injection day of busulphan (N = 3).

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

降より血小板数の回復が認められた(死亡例なし)(Fig. 11)。

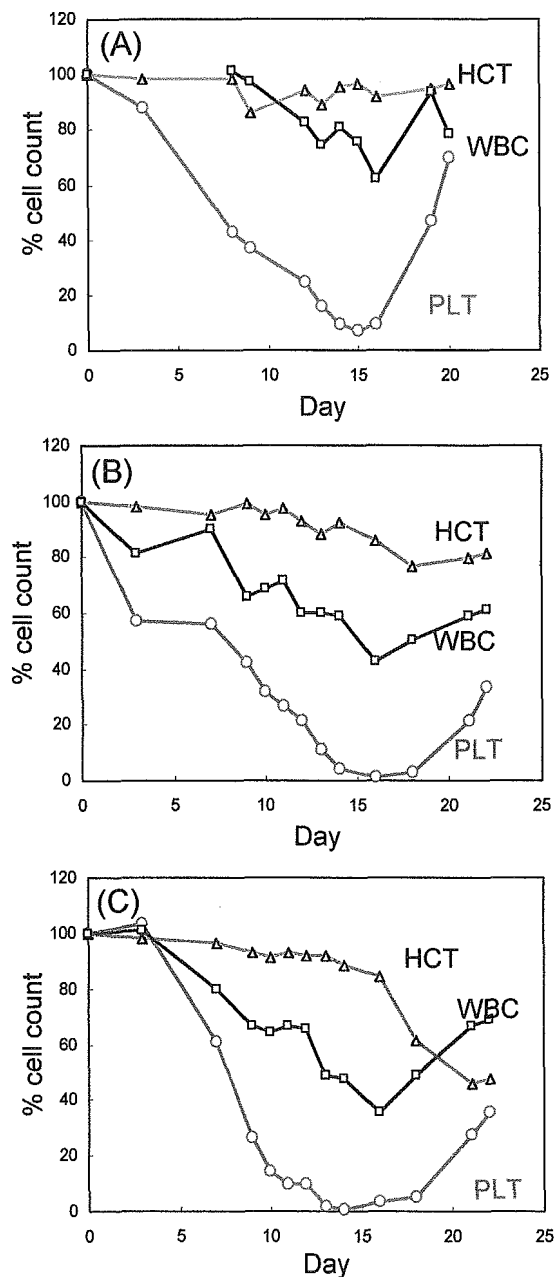


Fig. 12 Hematological parameters before and after busulphan injection at a dose of (A) 30, (B) 40, (C) 50 mg/kg.

#### 4.2. 出血時間測定

ブスルファン投与開始より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、それぞれ  $647 \pm 46$ 、 $1170 \pm 161$ 、 $1536 \pm 364$  秒であり、血小板数の減少に伴い出血

時間は延長した。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、に約14倍延長した(Fig. 13)。従って、より重篤な血小板減少動物モデルとして15日目のラビットを採用し、H12-PEG-polyAlbの止血能評価を行った。

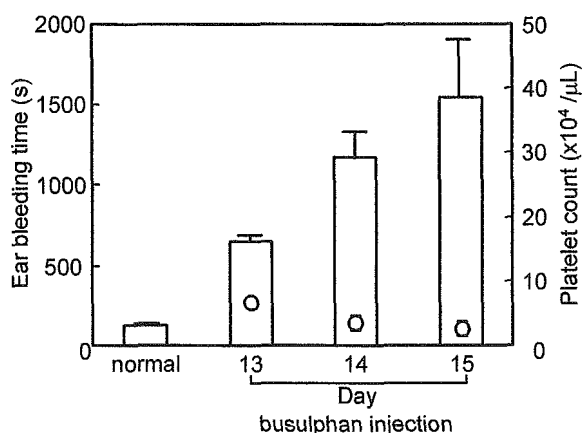


Fig. 13 Correlation of ear bleeding time (white bars) with platelet count (○) in the rabbits (N = 3).

#### 4.4. 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  $1495 \pm 525$ 、 $950 \pm 262$  秒であり、投与量依存的に出血時間が短縮した(Fig. 14)。特に80 mg/kg投与時は生理食塩水群( $1536 \pm 364$  秒)、と比較して有意に短縮する結果が得られた。

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、臨床試験に向けた次なるステップとしたい。

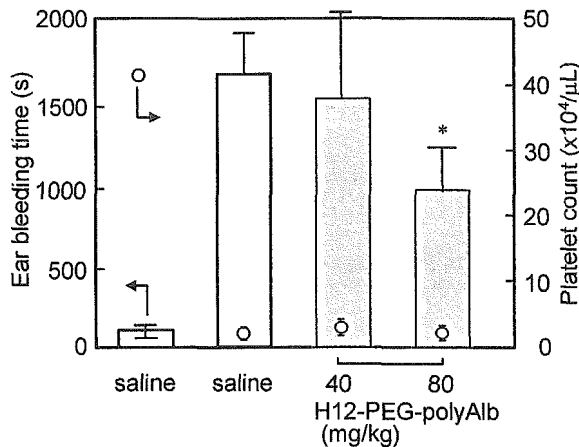


Fig. 14 Effects of the administration of H12-PEG-polyAlb on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEG-polyAlb was 40, 80 mg/kg equivalent of albumin. ○; platelet count in the rats (N = 4-6). \*P < 0.05 for H12-PEG-polyAlb vs. saline group.

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) (H12, rGPIb $\alpha$ )-latex beads では rGPIb $\alpha$ 結合量の増大と共に H12 による血小板凝集促進効果は低下したことから、ひとつの担体に rGPIb $\alpha$ と H12 の両者の担持は有効ではないと判断した。他方、H12-latex beads、rGPIb $\alpha$ -latex beads 混合系では、ずり速度の増大に伴い粘着した血小板や微粒子の数は増大し、両者の協同効果が認められた。さらに、血小板粘着増強効果も増大させた。

2) 高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システムを構築し、単一血小板の接着挙動を形状変化より議論することが可能となり、人工血小板担体の形状の最適化に資する

可能性が明らかになった。

3) H12 を PEG 鎖末端に結合させることにより、活性化血小板への特異的認識能は維持された。血小板減少ラットの止血能評価より、H12-PEG-polyAlb の投与(40 mg/kg)後 3 時間経過しても止血能を保持した微粒子が得られた。

4) 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。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 投与にて有意な止血能を有する微粒子であることが確認できた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y., and Handa, M. "Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 $\alpha$  null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation", *Blood*, **102**, 541-548 (2003).

2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- (6) 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).
- (7) 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).
- (8) 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).
- (9) 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)*.
- (10) 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, 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) 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).
- (3) 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).
- (4) 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).

(5) 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).

(6) 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).

(7) 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).

(8) 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).

(9) 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)

(10) 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)

(11) 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)

(12) 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)

(13) 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)

(14) 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)

(15) 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)

(16) 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)
- (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)
- (18) 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)
- (19) 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).
- (20) 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).
- (21) 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).
- (22) 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).
- (23) 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).
- (24) 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).
- (25) 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).
- (26) 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).
- (27) 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).
- (28) 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).

(29) 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).

(30) 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).

(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「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).

(32) 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).

(33) 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).

(34) 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).

(35) 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 真弓, 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).

(36) 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).

(37) 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).

(38) 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).

(39) 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).

(40) 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).

#### H. 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, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」特願 2006-001916.

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)  
分担総合研究報告書

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

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学部 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)  
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】**

血小板凝集機能を補助する微粒子として、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)をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少状態下でも血小板凝集の促進が確認でき、さらに未活性血小板とは相互作用しないことを明らかにしてきた(平成 14 年度 厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。

平成 15 年度は、担体を生体適合性、生分解性を有する微粒子であるアルブミン重合体(polyAlb)とリン脂質小胞体を用いてこれに H12 を結合させ、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* 評価を行った。H12-polyAlb は、血小板減少ラットの出血時間を半減できる微粒子であった。また、H12 結合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った。

平成 16 年度は、H12-polyAlb の血中滞留時間の延長を目的とし、ポリエチレングリコール(PEG)を介して H12 を担持させた H12-PEG-polyAlb を調製した。分子量 5.0 kDa の PEG 鎖に H12 を結合させた H12-PEG-polyAlb では血小板凝集能が持続され、PEG 修飾型の血中滞留時間は、PEG 未修飾体型に比べて約 20 倍延長できること明らかとなった。他方、H12-PEG-小胞体は、流動下において活性化血小板のみと特異的に結合し、血小板減少状態下でも血小板の凝集度を増幅させた。その凝集促進能は、H12 導入率が 0.3mol%から 0.6mol%まではほとんど変わらなかったことから、0.3mol%の導入率で充分であった。さらに H12-PEG-小胞体も H12-polyAlb と同様に、用量依存的に出血時間を短縮させた。

平成 17 年度は、H12-PEG-小胞体の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)を小胞体に内包させ (H12-PEG(ADP)小胞体)、その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)を漏出させる機構を初めて明らかにした。そこで、CFの代わりに内水相に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内包することで発揮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も確認でき、H12-PEG(ADP)小胞体の安全性も立証できた。さらに、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を立証した。

## 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)をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少下でも血小板凝集を促進させることが確認でき、さらに未活性化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年度厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。

平成15年度は、担体を生体適合性、生分解性を有する微粒子としてアルブミン重合体(polyAlb)やリン脂質小胞体を用い、これにH12を結合させ、流動状態下での*in vitro*評価を行った。さらに、ブスルファン投与による血小板減少ラットの作製条件の検討(ブスルファン投与量の決定、出血時間測定法の確立)し、止血能評価(*in vivo*)を行った。

平成16年度は、H12-polyAlbの血中滞留時間の延長を目的とし、分子量の異なるポリエチレングリコール(PEG)を介してH12を担持させた2種類の

H12-PEG-polyAlbを調製し、その血小板凝集能、血中滞留時間値から有用なPEGを選択し、さらに止血効果の持続について検討した。同様に、担体をリン脂質小胞体(H12-PEG-小胞体)にして検討した。

平成17年度は、H12-PEG-小胞体の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)を小胞体に内包させ(H12-PEG(ADP)小胞体)、その安全性と止血能を評価した。

## B. 研究方法

### 1. H12担持微粒子の調製法

#### 1.1. H12-polyAlbの調製

polyAlb分散液([HSA]=20 mg/mL,  $260 \pm 80$  nm, pH 7.4) 30 mLにSPDPエタノール溶液(20 mM) 100  $\mu$ Lを添加して振とう後(r.t., 20 min)、遠心分離(25000 rpm, 10 min)にて精製した(PD-polyAlb)。PD-polyAlb分散液([HSA]=22 mg/mL)に、SH-H12あるいは逆配列H12(SH-cH12) (100 mM, 150  $\mu$ L)を混合して振とう後(r.t., 12 hr)、遠心分離(25000 rpm, 10 min)にてH12-polyAlb([HSA]=10 mg/mL,  $280 \pm$