

90 nm)を得た。

1.2. H12-PEG-polyAlb の調製法

polyAlb 分散液([HSA] = 20 mg/mL, 30 mL, 粒径 200±80 nm) に MAL-PEG-NHS DMSO 溶液(10 mM, Mw = 3.4 or 5.0 kDa)を 284 μ L 添加して振とう後(r.t., 20 min)、m-PEG-NHS DMSO 溶液(25 mM, Mw = 5.0 kDa)をそれぞれ 284, 1136, 1704, 2840 μ L 添加した。遠心分離(25000 rpm, 10 min)にて精製後、MALPEG-polyAlb ([HSA]=20 mg/mL, 20 mL)を得た。Cys を N 末端にあらかじめ導入されている H12 (10 mM, 189 μ 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。

1.3. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成

1.3.1. 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)。ステアリルアルコール(11.9 mg, 44 mmol)を添加し、さらに沸点還流させた(105 °C, 14hr)。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; 13.3g, 収率 85 %)を得た。

1.3.2. MAL-PEG-Glu2C18 の合成

クロロホルム 5 mL 中に Glu2C18(115.1 mg, 176 μ mol)、TEA(24.6 μ L, 176 μ mol)を加えた後に MAL-PEG-NHS(300 mg, 58.8 μ mol)を溶解、攪拌させた(r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した。ベンゼンに溶解、凍結乾燥後、白色粉末 MAL-PEG-Glu2C18(264.8 mg, 収率 64 %)を得た。

1.3.3. H12-PEG-Glu2C18 の合成

MAL-PEG-Glu2C18(100 mg, 25.4 μ mol)と C 末端にシステインを導入した H12 (32.8 mg, 25.4 μ mol)を DMF 5 mL に溶解させ、攪拌させた(r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した。水 250 mL を加え不溶成分を除去後、凍結乾燥し、淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18(62.8 mg, 収率 47 %)を得た。¹H-NMR のマレイミド基のピーク(δ = 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。

1.3.4. H12-PEG 小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) (100 mg, 136 μ mol)、cholesterol (52.7 mg, 136 μ mol)、1,5-Dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSGL) (19.0 mg, 13.6 μ mol)、PEG-Glu2C18 (4.74 mg, 0.817 μ mol)、H12-PEG-Glu2C18 (4.34 mg, 0.817 μ mol)をベンゼン 5 mL に溶解し、凍結乾燥した (DPPC/cholesterol/DHSGL/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.03/0-0.06 (モル比))。純水にて水和、押出造粒法を経て H12-PEG 小

胞体を調製した(粒径 約 220-240 nm)。超遠心分離後(33000 rpm, 30 min, twice)、PBS 5 mL 中に分散させた。

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

1.3.4.と同組成にて混合脂質を凍結乾燥した。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 ± 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(C₁₂E₁₀)で可溶化し、高速液体クロマトグラフィー(Ab. 260 nm)にて定量した。

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

2. 流動下における血小板接着評価法

2.1. コラーゲン固定化基板の調製法

コラーゲン(3 mg/mL, TypeI-A (ウシ腱), 新田ゼラチン社)を PBS(pH7.4)にて分散させ(f.c. 30 μ g/mL)、ガラス基板(直径 24 mm, 厚み 0.5 mm)上に浸漬させた(4 °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。

2.2. 血小板固定化基板の調製法

PRP に ACD 溶液(15 % (v/v))を混合

し prostaglandin E₁ (PGE₁, f.c. 1 μ 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 μ M PGE₁)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)中で再分散して洗浄血小板分散液(2.0×10^5 / μ L)を調製した。コラーゲン基板上に洗浄血小板分散液を展開し、37 °C にて 1 時間静置、Hepes-Tyrode 緩衝液で洗浄した後に使用した。

2.3. 洗浄血液の調製法

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, r.t.)して PRP を除去した。10 % (v/v) ACD を混合した生理食塩水で分散させ、同遠心条件で上清を除去した。再分散後、2200g で 10 分間、2 回遠心分離してバフィーコート完全に除去した。得られた洗浄血液のヘマトクリット値(Hct)を 50%に調整して使用した。

2.4. 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 μ M)を重力落差にて通過させ、血球測定装置(K-4500, Sysmex 製)にて各血球数、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, 4.0×10^5 / μ L)をフィルター通過後の血液中に添加して血小板濃度 2.0×10^4 / μ L に調整した血小板減少血液を作製した。

2.5. 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 °C, 10 min)。血小板と検体のどちらか一方を蛍光標識した(血小板:3,3'-dihexyloxacarbocyanine(DiOC₆), 検体: FITC)。

37 °C の恒温槽内のフローチェンバー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, 浜松ホトクス)にて解析した。

3. 血小板凝集計を用いた凝集促進能評価

3.1. H12-PEG-polyAlb の凝集促進能評価

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 ([PLT]= 1.5×10^5 / μ L, 186 μ L)に H12-PEG-polyAlb(f.c.[rHSA] = 4.8 mg/mL, 10 μ L) を添加し攪拌後、ADP(f.c.2.5 μ M, 4 μ L)にて血小板を活性化、凝集させたときの血小板分散液の透過度を測定した。このとき、H12未結合 polyAlb 添加時の透過度との差から H12 の機能を評価した。

3.2. 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, r.t.)して多血小板血漿(PRP)を得た。H12-PEG(CF)小胞体を PRP([PLT] = 2.0×10^5 / μ L、[lipid] = f.c. 0.05 mg/mL)に添加後、ADP (f.c. 2 μ 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(C₁₂E₁₀)にて小胞体を可溶化した際の蛍光強度(A)を測定し、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]= 1.0×10^5 / μ L, 50 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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

5.1. 血小板減少ラットの調製法

Wistar系雄性ラット(8週齢、230-250g)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、40mg/kg)、体重、各血球変動を計測した(K-4500、Sysmex)。

5.2. 出血時間測定法

ブスルファン投与(20mg/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2.5mm、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。

6. 血中滞留時間測定

血小板減少ラットに対して、FITC標識 H12-PEG-polyAlb を投与し([rHSA] = 40 mg/kg)、経時採血した。遠心分離(12000 rpm, 5 min)にて血球成分を除去後、0.1N NaOH 添加により可溶化させ(r.t., 20 min)、蛍光測定により血中半減期($T_{1/2}$)を算出した。

C. 研究結果及び考察

1. H12-polyAlb の機能評価

1.1. H12 の血小板凝集阻害試験

血小板凝集計を用いて H12 あるいは

cH12 存在下における血小板分散液の透過度を測定した。H12 存在下では、非存在下と比較して透過度は減少したことから、血小板凝集を阻害、即ち活性化血小板と結合し得る配列を確認した。他方、cH12 存在下では変化しなかった。従って、H12 は機能配列であることが確認できた(Fig. 1)。

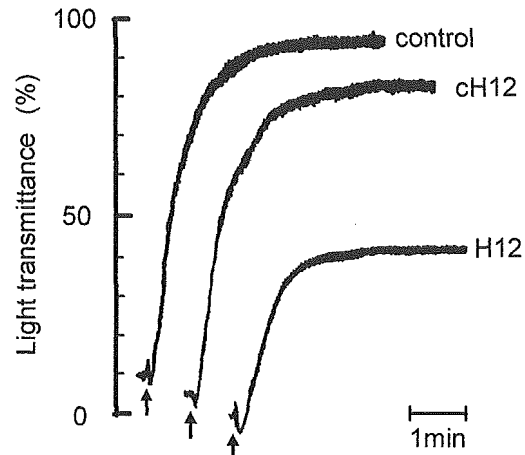


Fig. 1 ADP-induced (20 μ M) platelets aggregation ($2.0 \times 10^5/\mu$ L) was monitored with an aggregometer in the presence of 1 mM H12 or cH12.

1.2. 流動下における機能評価

コラーゲン基板上的血小板粘着占有率(SC)は $2.3 \pm 0.5\%$ であった(Fig. 2)。polyAlb 存在下の SC は $2.1 \pm 0.4\%$ であり、非存在下とほぼ同等であることから、polyAlb のような微粒子を添加しても血小板凝集を阻害しないことが確認できた。

そこで、H12-polyAlb 存在下により血小板粘着は 1.7 倍増加し(SC= $3.9 \pm 1.1\%$)、cH12-polyAlb では増加させないことから(SC= $2.4 \pm 0.4\%$)、流動下 *in vitro* 試験において血小板凝集促進効果が確認できた。

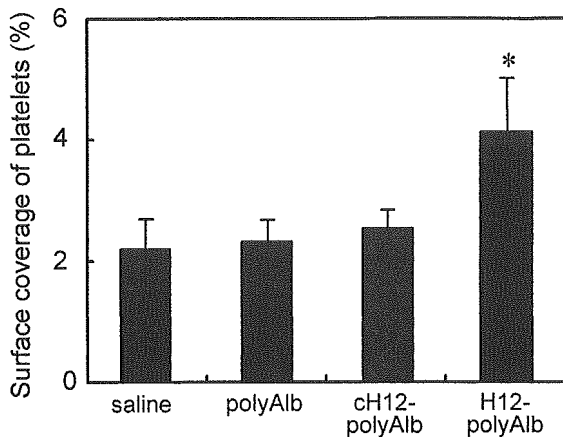


Fig. 2 Comparison of surface coverage of platelets in the thrombocytopenic-imitation blood on the collagen surface after addition of H12-polyAlb, cH12-polyAlb, or polyAlb at a shear rate of 150 s^{-1} ($N = 4$). The amount of surface coverage was recorded after blood was circulated for 210 s. The platelet count was $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$. * $P < 0.05$ for H12-polyAlb group vs. saline group, polyAlb group, and cH12-polyAlb group.

1.3. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

ブスルファンポリエチレングリコール溶液を 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の度合は加速されたが、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が減少し、10 日目で $19.6 \pm 2.6/\mu\text{L}$ (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. 3**)。

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 1**)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 2**)。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、投与後 10 日目を血小板減少症モデルラットとして採用した。

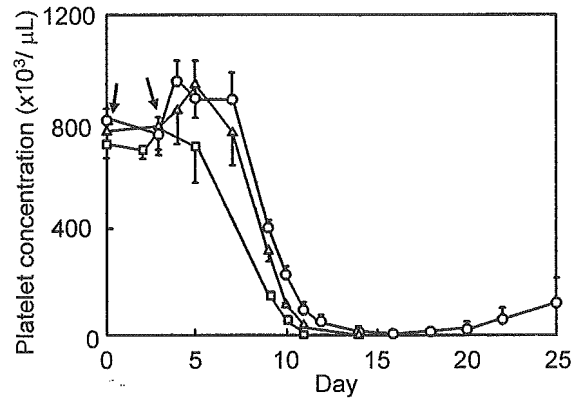


Fig. 3 Dose-response effect of busulphan on rats. Rats were injected with busulphan at a total dose of 20 mg/kg (○), 30 mg/kg (△), or 40 mg/kg (□) as described in Materials and Methods. Tail vein blood was collected at intervals and platelet count measured. Arrows show injection day of busulphan ($N = 5$).

Table 1 Change of weight and blood cells for normal rats ($N=6$).

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

Table 2 Change of weight and blood cells before and after busulphan injection ($N=6$).

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

生理食塩水を投与した血小板減少症モデルラット群([血小板]= $19.8 \pm 2.8/\mu\text{L}$)の出血時間は 609 ± 153 秒であり、正常ラット群([血小板]= $80.9 \pm 8.6/\mu\text{L}$)の出血時間(178 ± 56 秒)と比較して約 3.4 倍延長した(**Fig. 4**)。また polyAlb を 40 mg/kg 投与したところ、出血時間は著しく短縮し(184 ± 69 秒)、投与量の減少に伴いその効果は減少

した。従って polyAlb 自体でも止血効果を有することが示唆された。今回は、出血時間に影響しない polyAlb の投与量(4 mg/kg)にて H12-polyAlb の止血能を検討した。

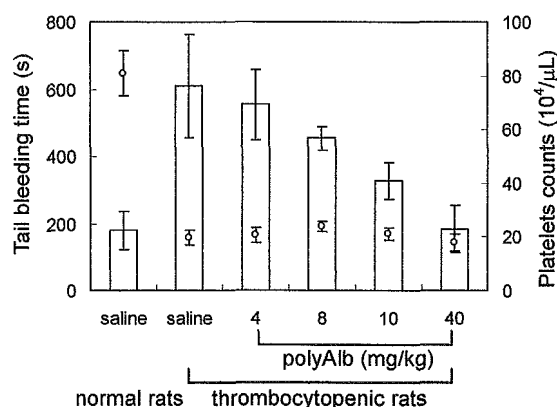


Fig. 4 Effects of the administration of polyAlb on the tail bleeding time.

血小板減少ラットに H12-polyAlb を投与したところ(1, 4, 10 mg/kg)、出血時間はそれぞれ 581±110、342±73、288±120 秒となり、投与量依存的に出血時間を短縮させた。特に 4 mg/kg 投与時では、生食(609±153 秒)、polyAlb 投与群(553±104 秒)のそれと比較して有意に出血時間を短縮させた(Fig. 5)。従って、*in vivo* 試験においても H12-polyAlb は止血能を有する微粒子であることが確認できた。

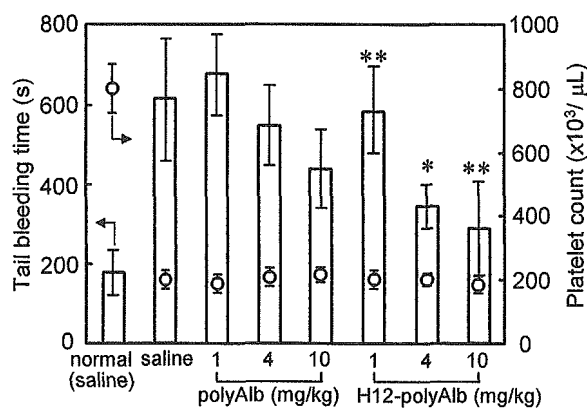


Fig. 5 Effects of the administration of H12-polyAlb on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-polyAlb was 1, 4, 10 mg/kg equivalent of albumin. ○; platelet count in the rats (N = 6-10). *P < 0.05 or **not significant for H12-polyAlb vs. polyAlb group at the same dose.

さらに、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ところ、各検体投与前後における血球変動は生じていないことから、H12-polyAlb(4 mg/kg)は血液適合性の高い微粒子系と思われた(Table 3)。

Table 3 Platelets, white blood cells, and red blood cells counts before and after sample injection.

Platelets	sample injection (x10 ⁴ /μL)	
	before	after
saline	80.9 ± 8.6	78.5 ± 14.2
saline	19.8 ± 2.8	19.6 ± 1.9
polyAlb	20.7 ± 2.8	20.3 ± 2.5
H12-polyAlb	19.8 ± 2.1	20.0 ± 4.2

WBC	sample injection (x10 ² /μL)	
	before	after
saline	115.3 ± 25.3	100.0 ± 14.0
saline	53.6 ± 12.1	48.4 ± 11.8
polyAlb	60.7 ± 10.2	50.1 ± 9.3
H12-polyAlb	64.9 ± 11.4	54.4 ± 11.0

RBC	sample injection (x10 ⁴ /μL)	
	before	after
saline	605.0 ± 47.4	613.7 ± 47.7
saline	665.2 ± 39.3	662.0 ± 93.0
polyAlb	663.5 ± 12.7	677.0 ± 25.1
H12-polyAlb	689.5 ± 23.5	676.2 ± 41.1

2. H12-PEG-polyAlb の機能評価

2.1. H12-PEG-polyAlb の合成

polyAlb(粒径 200±80 nm)に対する MALPEG、mPEG、H12 導入量は、HPLC より各未導入成分の面積比から逆算した。まず、polyAlb([rHSA]=10 mg/mL, (150 μM)表面上の rHSA に対して分子量 3.4 kDa の MALPEG-NHS(3.2 倍モル)をそれぞれ添加し、polyAlb1 粒子あたり約 1.2×10⁴ 分子結合させた。MALPEG-polyAlb([rHSA]=10 mg/mL)表面上に分子量 5.0 kDa の

mPEG-NHS(5、20、30、50 倍モル)を添加したところ、mPEG はそれぞれ1 粒子あたり 1.3、5.2、7.8、 11.2×10^4 分子結合した(Fig. 6 ●)。

他方、polyAlb([rHSA]=10 mg/mL)に対して分子量 5.0 kDa の MALPEG-NHS(3.2 倍モル)を添加し、polyAlb1 粒子あたり 1.2×10^4 分子結合させた。MALPEG-polyAlb([rHSA]=10 mg/mL)に mPEG-NHS(5、20、30、50 等量)を添加したところ、mPEG はそれぞれ1 粒子あたり 2.6、5.2、6.1、 6.0×10^4 分子結合した計算となり、30 倍モル以上では飽和に達した(Fig. 6 ○)。

これは MALPEG の分子量増大に伴い、polyAlb 表面上での排除体積も増大したため、後導入する mPEG の導入量が減少したためと考えられる。

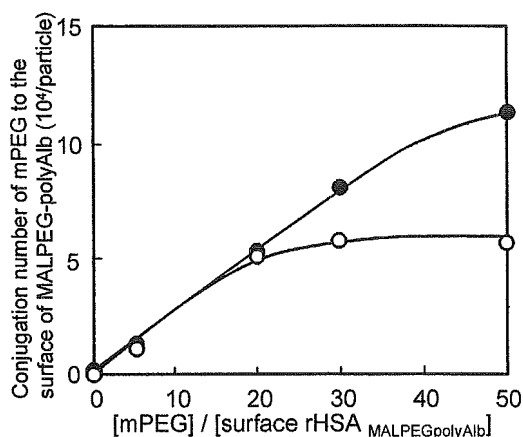


Fig. 6 Conjugation number of mPEG to the surface of MALPEG-polyAlb. Mw of MALPEG; (●) 3.4 kDa, (○) 5.0 kDa.

2.2. 血小板凝集計による H12 の機能保持評価および血中滞留時間測定

MALPEG(Mw: 3.4 kDa)の時、mPEG 修飾量の増大と共に $T_{1/2}$ は増大し、最大修飾時には約 150 min まで延長した。また、 $T_{1/2}$ は PEG 未修飾体(約 10 分)と比較して約 15 倍延長した(Fig. 7 ○)。一方、H12 の血小板凝集促進能

は、polyAlb 1 粒子あたりの mPEG 修飾量が 5.2×10^4 分子までは保持されたが、さらに修飾量を増大させると急激な機能低下が起こった(Fig. 7 ●)。

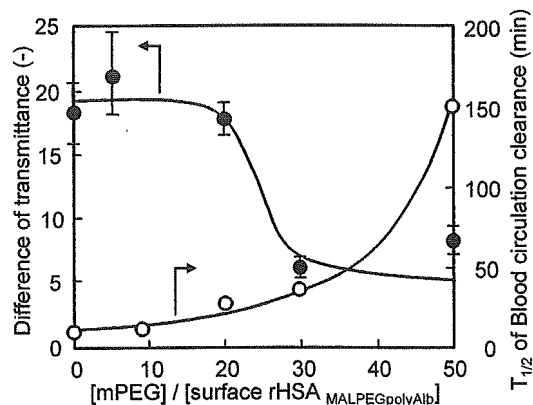


Fig. 7 Blood circulation clearance (○) and enhancement of platelet aggregation (●) of various H12-PEG-polyAlb. Mw of MALPEG: 3.4 kDa.

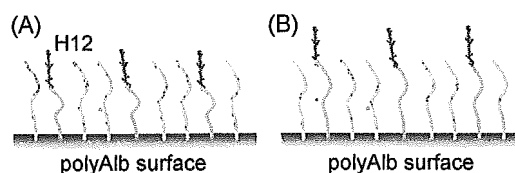


Fig. 8 Schematic images of PEG chains with increasing the number of mPEG: 5.0 kDa. MALPEG: (A) 3.4 kDa, (B) 5.0 kDa.

これは、mPEG 修飾量に伴い PEG 鎖がマッシュルーム構造からブラッシュ構造に遷移し、分子量 3.4 kDa の MALPEG に結合した H12 が埋没したためと考えられる (Fig. 8 (A))。

他方、MALPEG(Mw: 5.0 kDa)の時は、mPEG 最大修飾量でも H12 の機能は維持され(Fig. 9 ●)、そのときの $T_{1/2}$ は約 180 分まで延長した(Fig. 9 ○)。これは、MALPEG と mPEG の鎖長を揃えたため、ブラッシュ構造でも H12 が表出していると考えられる(Fig. 8 (B))。

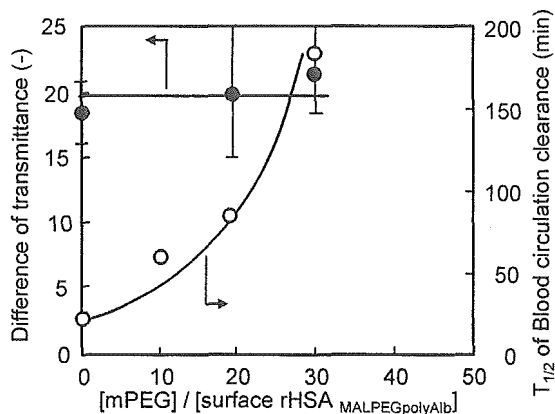


Fig. 9 Blood circulation clearance (○) and enhancement of platelet aggregation (●) of various H12-PEG-polyAlb. Mw of MALPEG: 5.0 kDa.

3. H12-PEG 小胞体の機能評価

3.1. 流動下における H12-PEG-小胞体の特異的相互作用

洗浄血液(Hct 50 %, [PLT] = 5×10^3 / μ L)に DiOC₁₈ 標識 H12-PEG-小胞体 (f.c.[lipid] = 0.89 M)を添加し、活性化血小板基板上を流動させたところ(150 s⁻¹)、基板に一様に粘着し、抗 GPIIb/IIIa 抗体(PAC-1)存在下ではその粘着が抑制された。また H12 未結合体では粘着しなかったことから、H12-PEG-小胞体は活性化血小板上の GPIIb/IIIa と特異的に相互作用していることが確認された(Fig. 10)。

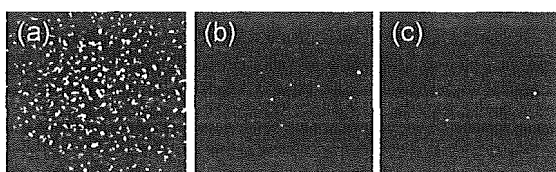


Fig. 10 Specific adhesion of H12-PEG-vesicle in the reconstituted blood (Hct. 50 %, platelet counts = $5.0 \pm 2.0 \times 10^3$ / μ L) to platelets activated on the collagen surface at a shear rate of 150 s⁻¹. (a) H12-PEG-vesicle, (b) H12-PEG-vesicle in the presence of PAC-1, (c) PEG-vesicle. (a)-(c) images were obtained after blood was circulated for 500 s. ([lipid] = 0.89 M).

3.2. 流動下における H12-PEG-小胞体の血小板粘着増強効果

血小板減少血液([PLT] = 5.0×10^4

/ μ L)に、H12-PEG-小胞体([H12-PEG 脂質] = 0.3mol%)を添加しコラーゲン基板上に流動させたところ、H12-PEG 小胞体添加系は PEG-小胞体添加系や PBS 対照群と比較して血小板粘着占有率が著増した(Fig. 11)。これは、まず血小板がコラーゲン基板に粘着し、活性化した血小板に H12-PEG-小胞体が結合し、これが残存血小板をリクルートして凝集塊形成が促進されたためと考えられる。これにより、小胞体表面へ PEG 鎖を導入しても、H12 の認識反応は阻害せずに血中滞留時間の向上を付与できることが明らかとなった。

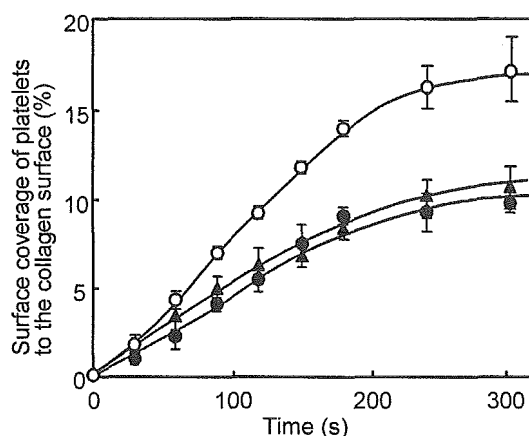


Fig. 11 Time course studies of surface coverage of platelets in the thrombocytopenic-imitation blood to the collagen surface after addition of (○) H12-PEG-vesicle, (●) PEG-vesicle, and (▲) PBS.

そこで、H12 の修飾率の異なる H12-PEG-小胞体を同条件にて基板上を流動させた(Fig. 12)。H12-PEG 脂質導入率が 0.1mol%以下では血小板粘着占有率が PEG-vesicle とほぼ同等であり、修飾率 0.3mol%以上でその効果が顕著であった。これは、コラーゲンにて活性化した血小板への H12-PEG-小胞体の粘着数が H12-PEG 脂質の修飾量に伴って増加したためと考えられた。以上より、出血部位において

H12-PEG-小胞体は血小板凝集を補強する効果があり、H12-PEG 脂質の導入率が 0.3 mol%で充分であると判断した。

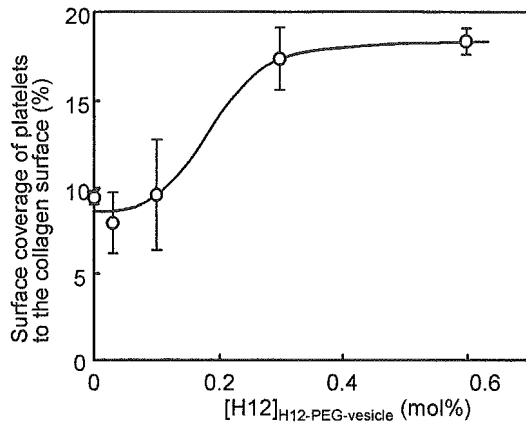


Fig. 12 Comparison between surface coverage of platelets and modification ratio of H12 on the surface of vesicle. (shear rate: 150 s^{-1} , [platelets] = $5.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$, [lipid] = 0.89 M , $N = 3$). The surface coverage was measured after 300 s.

3.3. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

生理食塩水を投与した血小板減少症モデルラット群([血小板]= $19.8 \pm 2.8 / \mu\text{L}$)の出血時間は 618 ± 56 秒であり、正常ラット群([血小板]= $80.9 \pm 8.6 / \mu\text{L}$)の出血時間(178 ± 56 秒)と比較して約 3.4 倍延長した(Fig. 13)。

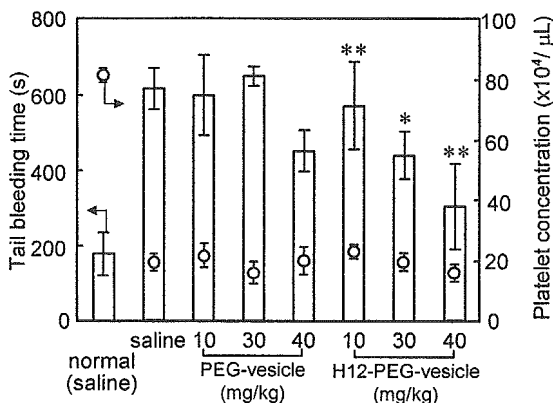


Fig. 13 Effects of the administration of H12-PEG-vesicles on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEG-vesicles was 10, 30, 40 mg/kg equivalent of lipid. \circ ; platelet count in the rats ($N = 6-10$). * $P < 0.05$ or **not significant for H12-PEG-vesicles vs. PEG-vesicles group at the same dose.

そこで、H12-PEG-小胞体を 10、30、40 mg/kg の濃度(脂質換算)で投与したところ、出血時間はそれぞれ 573 ± 127 、 441 ± 66 、 335 ± 96 秒であり、投与量依存的に出血時間が短縮し、正常ラットの出血時間に匹敵した。以上より、H12-PEG-小胞体は、アルブミン重合体と同様、止血能を有する微粒子であることが証明できた。

4. H12-PEG(ADP)小胞体の機能評価

4.1. H12-PEG(CF)小胞体からの CF 放出率測定

PRP に PEG 小胞体を添加し、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、2 次凝集が亢進し、透過度が増大し血小板凝集促進効果が確認できた(Fig. 14)。

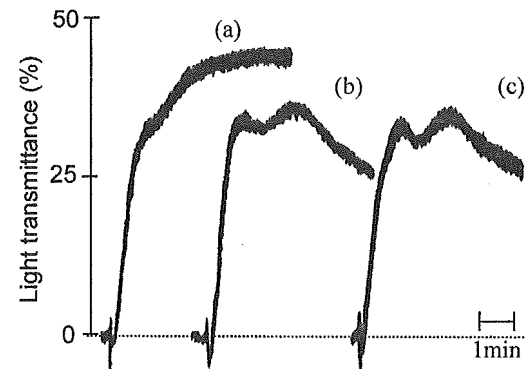


Fig. 14 ADP-induced platelet aggregation enhanced by H12-PEG(CF)vesicle. [ADP]: f.c. $2 \mu\text{M}$, [platelet]: $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$, [lipid]: f.c. 0.05 mg/mL . (a) H12-PEG(CF)vesicle, (b) PEG(CF)vesicle, and (c) PBS.

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、それぞれ $13 \pm 5\%$ 、 $17 \pm 5\%$ 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 4)。これは、小胞体に 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漏出し、凝集を促進させる機構を初めて明らかにした。

Table 4 Involvement ratio and CF release ratio of H12-PEG(CF)vesicle

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

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

4.2. 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. $2 \mu\text{M}$) 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)小胞体を添加したところ、内包濃度 1 mM 未満では透過率は約 4% 増大し、血小板凝集促進効果が確認できた (Fig. 15)。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 を担持させたことによる多点結合と ADP 放出の相乗効果によるものと考えられる (Fig. 15)。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. 15)。

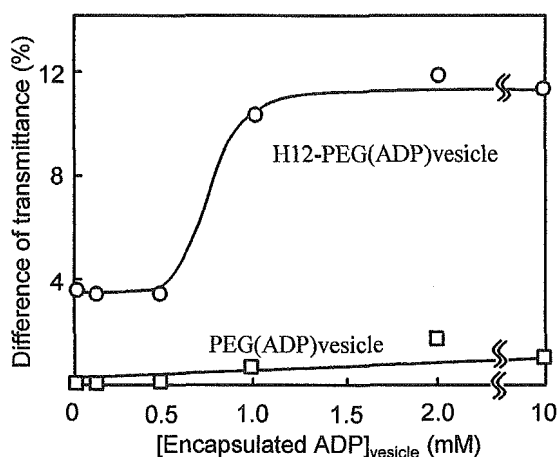


Fig. 15 Enhancement effect of platelet aggregation by H12-PEG(ADP)vesicle. [ADP]: f.c. $2 \mu\text{M}$, [platelet]: $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$, [lipid]: f.c. 0.05 mg/mL .

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. 16 に示す。Fig. 15 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)の添加系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を示唆する重要

な結果であった。

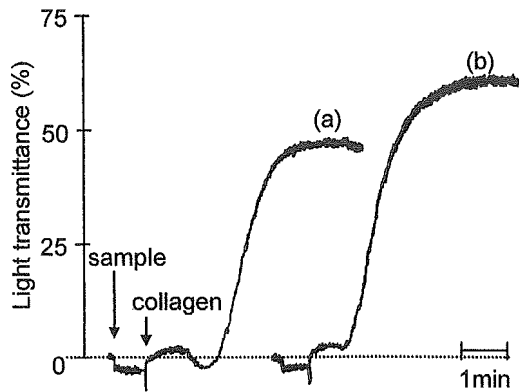


Fig. 16 Collagen-induced platelet aggregation enhanced by H12-PEG(ADP)vesicle. [collagen]: f.c. 0.4 mg/mL, [platelet]: $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$, [lipid]: f.c. 0.05 mg/mL. (a) PEGvesicle, (b) H12-PEG(ADP)vesicle.

4.3. 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. 17)。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 の漏出と示唆される。

従って、小胞体への ADP の最適内包濃度は、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、血小板凝集に巻込まれてのみ ADP 内包効果を示す 1 mM に決定した。

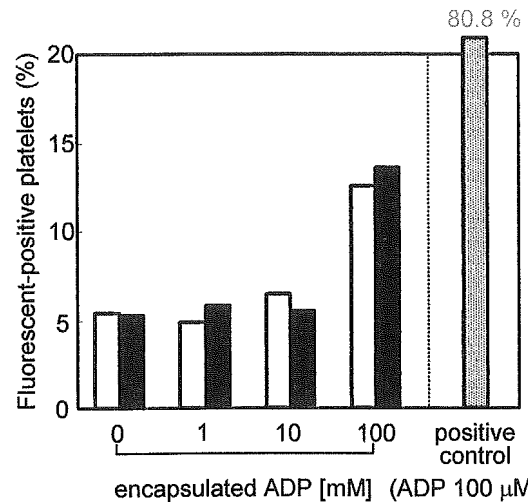


Fig. 17 PAC-1 Binding to the platelets in the presence of H12-PEG(ADP)vesicle (black column) or PEG(ADP)vesicle (white column) with various encapsulated ADP concentration.

4.4. 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 ($[\text{PLT}] = 2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$) に生理食塩水 (4 mL/kg) を投与したところ、出血時間は 618 ± 51 秒であり、正常ラット ($[\text{PLT}] = 8.1 \times 10^5 / \mu\text{L}$) のそれ (178 ± 56 秒) と比較して、約 3.5 倍延長した(Fig. 18)。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 ± 127 、 367 ± 96 秒であった(Fig. 18)。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 ± 54 秒となり、H12-PEG 小胞体にて短縮効果の確認できた 1/4 の投与量で短縮できることが判明した(Fig. 18)。

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。

今後、より大型の動物(ラビット)を用いて止血能評価を行う予定である。

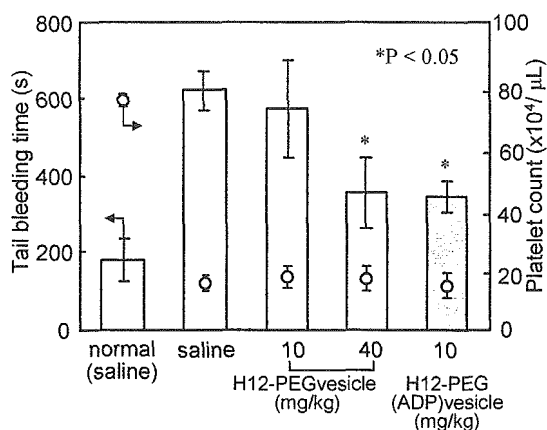


Fig. 18 Effects of the administration of H12-PEG(ADP)vesicle on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEGvesicle or H12-PEG(ADP)vesicle was 10, or 40 mg/kg equivalent of lipid. ○; platelet count in the rats (N = 6-10). *P < 0.05 or for H12-PEG-vesicle or H12-PEG(ADP)vesicle vs. saline group.

D. 結論

1) H12-polyAlb は、血小板凝集を促進させる微粒子であることを流動下にて確認した。さらに、血小板減少ラットに投与したところ、尾先端切断部位からの出血時間を短縮させることを明らかにした。

2) 分子量 5.0 kDa の MALPEG 鎖に H12 を結合させた H12-PEG-polyAlb は、mPEG 導入量に依存することなく、血小板凝集能を持続し、その血中滞留時間は、PEG 未修飾体型に比べて、最大約 20 倍延長させることに成功した。

3) 流動下において、H12-PEG-小胞体は、活性化血小板に特異的に結合し、H12-PEG-小胞体は、血小板減少状態下でも血小板粘着を増幅させた。その凝集促進能は、H12 表面修飾率が 0.3mol% から 0.6mol% ではほとんど変化なかったことから、0.3mol% の修飾率で充分であることが明らかとなった。さらに、血小板減少ラットにて止血能を評価したところ、H12-PEG-小胞体でも投与量依存的に出血時間を

短縮させた。

4) 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、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、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。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明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 γ -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 γ 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- γ 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- γ 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 γ -chain dodecapeptide- or glycoprotein Ib α -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- γ chain dodecapeptide, *Transfusion* (to be submitted).
- (著書)
- (1) Takeoka, S. Design and modification of nanoparticles for blood substitutes. *Organ Microcirculation (A gateway to Florida)*.
- (2) 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).

(3) *Diagnostic and Therapeutic Interventions*) (Ishii, H, Suematsu, M, Tanishita, K, and Suzuki, H (Eds.)), 13, 35-41 (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- γ 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 γ 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 γ 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- γ 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 α 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- γ 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 α 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- γ 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- γ 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 γ 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-GPIIb α 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 γ 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 「rGPIIb α 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 γ 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 γ 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).

G. 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.

凝集系における H12 結合アルブミン重合体または
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、フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド（H12）を結合させたアルブミン重合体、ラテックスまたはリポソームの超微形態をネガティブ染色法、凍結超薄切片法および凍結切断レプリカ法で観察した。さらに、これらの H12 結合担体の凝集系における挙動について検討した。H12 結合アルブミンは 200～400 nm の糸くず状に観察され、免疫電顕法ではその一部に H12 の存在を示す金粒子を確認した。一方、リポソームは凍結切断レプリカ法で観察すると、直径 150～300 nm の球状として同定された。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 結合アルブミン、同ラテックスまたは同 ADP 内包リポソームを混和し、さらに ADP で刺激すると、コントロール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 H12 結合アルブミン、同ラテックスまたは同 ADP 内包リポソームが検出された。以上の結果より、H12 結合担体は、ADP で惹起された凝集の一部の血小板間に介在して血小板減少時の凝集を促進させ、本担体は血小板の代潜物としての能力を持つことを明らかにした。

A. 研究目的

本研究では、フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド（H12）を結合させたアルブミン重合体、ラテックスまたはリポソームの超微形態をネガティブ染色法、凍結超薄切片法および凍結切断レプリカ法で観察した。さらに、これらの H12 結合担体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 結合担体の電顕観察

1) ネガティブ染色法：H12 結合アルブミン重合体および同 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、これらの担体の浮遊液 5 μ l を電顕用膜メッシュに載せ、過剰なリ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、H12 結合アルブミンの H12 を検出するためにウサギ抗 H12 抗体で、また H12 結合 ADP 内包リポソーム上のビオチンを検出するためには、市販のウサギ抗ビオチン抗体でそれぞれ 4 $^{\circ}$ C、16 時間インキュベイトした。以下、ともに PBS で洗浄後、コロイド金粒子（10 または 15 nm）標識ヤギ抗ウサギ IgG さらに室温、1 時間インキュベイトした。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。尚、ウサギ抗 H12 抗体は H12 をウサギに免疫して作製した。本抗体は ELISA および Blotting 法によ

り H12 に対して特異性が有り、単一のバンドを形成する結果を得た。また、本抗体はフローサイトメトリー法でトロンビン刺激血小板に対するフィブリノゲンの結合を抑制しないことを確認した。

2) 凍結超薄切片法：H12 結合アルブミン重合体および同 ADP 内包リポソームを本法で観察した。すなわち、これらの H12 結合担体を約 30°C に暖めた 10%ゼラチンと等量に混合してパラフィン板上に滴下し、4°C で冷却して凝固させた。アルブミン、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°C で PBS で洗浄、1 M ショ糖液中で 1 時間、さらに 2.3 M ショ糖中に一昼夜浸漬した。この試料を液体窒素中で凍結、超マイクロトームで凍結超薄切片を作製し、ウラン染色後、透過型電顕で観察した。H12 結合アルブミンの超薄切片の一部は、H12 の結合を確認するために、上記のネガティブ染色法と同様に免疫電顕法を実施した。すなわち、切片をウサギ抗 H12 抗体でインキュベート、PBS で洗浄後、さらに金粒子 (10nm) 標識ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベートした。最終的に酢酸ウランで染色して透過型電顕で観察した。

3) 免疫走査型電顕法：H12 結合ラテックスはエッペル管遠心管中で、上記同様にウサギ抗 H12 抗体で反応後、遠心、PBS 洗浄、さらに金粒子 (15nm) 標識ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベートし、蒸留水で遠心洗浄、カバースリップ上に接着させて風乾した。以下、試料に四酸化オスミウムをコーティングし、走査型電顕で観察した。

4) 凍結切断レプリカ法：ADP 内包リポソームを本法で観察した。すなわち、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) で急速凍結した。この試料をすばやく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切断した。その後、同装置内で切断面に白金、さらにカーボン蒸着した。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、そのま

ま透過型電顕で観察した。

2. H12 結合担体の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 X 10⁴ 個/μl に調製した PRP を凝集計にセットし、そこに H12 結合担体またはコントロール担体 0.05~2 mg/ml を添加し、さらに 1 分後にコラーゲン 0.4 μg/ml または ADP 3~5 μM 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 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等量加えて試料を固定した。遠心後、形態観察用にはペレットをリン酸緩衝液で洗浄し、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。また、免疫電顕用にはペレットを PBS で洗浄し、上記と同様に 1 M ショ糖液、さらに 2.3 M ショ糖液中浸漬し、液体窒素で凍結、超薄切片を作製した。以下、ウサギ抗 H12 抗体または同抗ビオチン抗体を使う免疫電顕法を実施し、透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

1. H12 結合担体の電顕観察

ネガティブ染色法で観察した H12 結合アルブミンは、糸くず状の繊維成分から成る直径 200~400 nm の塊状に観察された(図 1A)。H12 の存在を示す金粒子は、決して多くはないが、アルブミン重合体を形成する繊維上に分布した。しかし、この H12-アルブミンをウサギ抗フィブリノゲン抗体でインキュベートした時、金粒子は全く分布しなかった。凍結超薄切片法で観察した H12-アルブミンもネガティブ染色法のものと同様に繊維成分から成る直径 200~400 nm の塊状に観察されたが、やや不明瞭であった(図 1B)。H12 の存在を示す金粒子は、同様にアルブミン重合体を形成する繊維上に分布した。

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 2A)。そ