

- YP, Harris R, Biemond BJ, Heijnen FG, Levin J, Ten Cate JW. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-111.
- 6) Coller BS, Springer KT, Beer JH, Mohandas N, Scudder LE, Norton KJ, West SM. Thromboerythrocytes. In vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusion. *J Clin Invest* 1992;89:546-555.
 - 7) Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000;1:290-295.
 - 8) Kitaguchi T, Murata M, Iijima K, Kamide K, Imagawa T, Ikeda Y. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α : A potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:784-789.
 - 9) 寺村裕治, 武岡真司, 土田英俊, 池田康夫. 粒子径を制御したアルブミン重合体の合成とGPIIb結合体の機能評価. *人工血液* 2000;8:90-95.
 - 10) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001;2:1192-1197.
 - 11) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H, Kainoh M, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003;306:256-260.
 - 12) Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Targetting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:755-760.
 - 13) Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2002;100:136-142.
 - 14) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y. Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:765-770.
 - 15) Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons S. Platelet receptor recognition domains on the α chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* 1989;28:2909-2914.
 - 16) Kloczewiak M, Timmons S, Hawiger J. Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen γ chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:181-187.
 - 17) Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ chain. *Biochemistry* 1984;23:1767-1774.
 - 18) Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* 1991;65:359-362.
 - 19) Lam SC, Plow EF, Smith MA, Andrieux A, Ryckwaert JJ, Marguerie G, Ginsberg MH. Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and γ chain peptides share a common binding site on platelets. *J Biol Chem* 1987;262:110-115.
 - 20) Hallahan DE, Geng L, Cmelak AJ, Chakravathy AB, Martin W, Scarfone C, Gonzalez A. Targeting drug delivery to radiation-induced neoantigens in tumor microvasculature. *J Control Release* 2001;74:183-191.
 - 21) Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass L. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985;260:11107-11114.
 - 22) Bennett JS, Shattil SJ, Power JW, Gartner TK. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. *J Biol Chem* 1988;263:12948-12953.
 - 23) Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7450-7454.
 - 24) Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1413-1422.

1. 「止血機能を有する微粒子系の設計と機能評価」

早稲田大学 理工学部*

武岡真司, 岡村陽介

要 旨

当研究グループでは慶應義塾大学医学部池田康夫教授と共同し血小板代替物の研究を進めている。当面の目標として、血小板減少症モデルにて出血部位に残存血小板を巻込んで集積し、血小板の止血能を補強する微粒子系を設計する。具体的には、リン脂質二分子膜小胞体（リポソーム）やアルブミン重合体を生体投与可能な微粒子担体の候補とし、認識部位として血小板膜糖蛋白質の遺伝子組換え体（rGPIb α , rGPIa/IIa）や活性化 GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲンのペプチド（H12）を候補とし、これを微粒子に担持した系にて *in vitro* にて認識能を *in vivo* にて止血能を評価している。

はじめに

血小板輸血は、癌・造血器腫瘍などの治療や、外科手術において不可欠な補助治療法として重要な位置を占めており、その需要は増加し続けている。しかし、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、ウイルス感染症をはじめとする輸血副作用発現の危険性を排除できない。現在、不必要な輸血を減少させる努力が払われているものの、赤血球輸血とは異なり自己血輸血の推進は図れない。血小板代替物の開発ならびに臨床応用は、輸血副作用発現の危険性を有する同種血輸血を可及的に回避し得るので、21世紀に於ける医療の目指すべき方向として期待されている。

血小板の止血機能と血小板代替物の設計

止血の重要な初期段階は、血管創傷部位に露出している血管内皮下層への血小板の粘着である（図1(A)）。血小板の表面には、コラーゲン、ラミニン、フィブロネ

クチンなどの血管内皮下層やvWfやフィブリノーゲンなどの血漿蛋白質を認識するレセプター蛋白質があり、これらの相互作用により粘着がおこる。具体的には、高速度下では血小板の糖蛋白質Ib(GPIb)のフォンビルブランド因子(vWf)を介したコラーゲンとの相互作用によって血小板が接着してローリングが起こる¹⁾。続いて低速度下でコラーゲンのレセプター蛋白質である血小板糖蛋白質IIa(GPIIa)とコラーゲンとの直接結合により粘着が起こる²⁾。直ちに血小板表面の糖蛋白質IIb/IIIa(GPIIb/IIIa)が活性化され、フィブリノーゲンやvWfを介した血小板の凝集が惹起されて一次止血となる。同時に、血小板も偽足を出して形態変化して接着し易い構造形態をとり、血小板内の顆粒が血小板膜と融合して血小板活性化因子であるADPなどの放出や接着を補強するセロトニンの発現となる。次に、 α 顆粒がフィブリノーゲン、フィブロネクチン、vWfなどを放出、同時にこれらのレセプターを血小板表面に発現し、血小板間でネットワークを形成して血小板凝集を促す。最終的には凝集した血小板を足場として血漿中の凝固因子による凝固系が活性化されてフィブリノーゲンがフィブリン塊(血餅)となって止血が完了する。

この様に血小板の止血は多段の過程が連動して起こっており、この機能を全て有する人工系の構築は困難である。しかし、粘着、凝集能が欠如した出血性疾患 Bernard-Soulier 症候群や血小板無力症において出血傾向が強く認められることから、血小板の基本的で重要な機能は、損傷部位を特異的に認識した接着と血小板の凝集による一次止血であると考えられる^{3),4)}。従って、血小板代替物はこの過程を代替して、残存している血小板を効率よく凝集場にリクルートするものであれば、その後の血餅に至るまでの過程はリクルートされた血小板の機能により可能と考えられている。筆者が分担研究者として所属している慶應義塾大学医学部池田康夫教授の研究グループでは、血小板の粘着と凝集に関与する蛋白質やポリペプチドを遺伝子組換え法や全合成法によりヒト血液由来を用いないで得ることに成功、これを生体適合性や

* 早稲田大学 理工学部
〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1
TEL & FAX: 03-5286-3217
E-mail: takeoka@waseda.jp

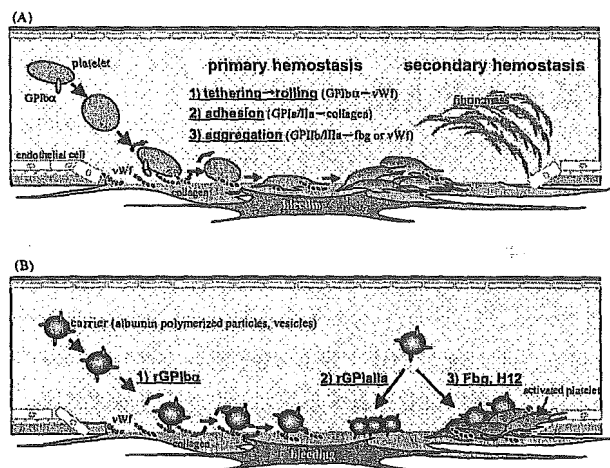


Fig. 1 Mechanism of platelet adhesion or aggregation to the vascular injury (A) and design of platelet substitutes (B).

生分解性の高い担体に結合させた血小板代替物の研究を行っている。

転じて、海外における血小板代替物の研究を眺めてみる^{5)~14)}。Agamら⁵⁾は、フィブリノーゲンを担持したヒト赤血球を調製し、これが血小板の凝集に巻き込まれること、更に血小板減少症モデルラットに投与して出血時間が短縮することを示した。Collerら⁶⁾は、血小板のGPIIb/IIIaを認識するフィブリノーゲンのアミノ酸序列RGDを持つオリゴペプチドAc-CGGRGDFを赤血球に結合させたthromboerythrocyteを提案し、これがADP血小板凝集を特異的に促進することを、抗GPIIb/IIIaモノクローナル抗体の添加による凝集回避から明らかにした。Rybakら⁷⁾は、リポソーム型血小板代替物plateletsomeを提案した。このリポソームは、デオキシコール酸にて血小板膜から可溶化したGPIb, GPIIb/IIIa, GPIVなど15種類以上の血小板膜蛋白質を担持しており、血小板減少症モデルラットに投与して、尻尾切断部位からの出血を有意に短縮させた。また、CplexTM⁸⁾は、期限切れ血小板を凍結融解させて断片化させたもので、4°Cで36ヶ月保存可能であり、動物試験による止血能評価を経て臨床試験が行われた。最近では、Leviら⁹⁾によりアルブミンマイクロカプセルにフィブリノーゲン(fbg)を担持させたSynthocyteTMを血小板減少家兎に投与すると、出血時間の短縮や出血量の軽減が報告されている。しかし、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解決されない。また、上述の一部は欧米での臨床試験が実施されていたが、現在は全て中断されており、血小板代替

物の有効性と安全性に課題を残した。近年国内外においてES細胞¹⁵⁾や造血幹細胞から血小板産生を誘導する実験が開始されているものの、まだ基礎研究段階である。

止血能を有する微粒子系（アルブミン重合体、リン脂質小胞体）の構築と機能評価

我々は、血小板の粘着と凝集に関する分子機構の理解に基づく人工血小板創製を試みている(図1(B))。即ち、血管損傷部位への血小板粘着に必須な膜糖蛋白質GPIb α やGPIIb/IIIaを遺伝子組換え技術を用いて大量に合成し、生体適合性の高いアルブミン重合体やリン脂質二分子膜小胞体(リポソーム)担体に担持して受容体機能を発現させる方法は感染症回避に最も有効である。また、最近ではFbgの活性化血小板認識部位であるペプチドH12を量合成し、残存血小板の誘導機能を持つ人工系構築に成功している^{16)~23)}。

ここでは、先ずアルブミン重合体とリン脂質二分子膜小胞体にGPIb α を結合させた系で得られた知見について紹介する^{16),17)}。アルブミン重合体は、共有結合にて形成されているため比較的硬い安定な構造をとっており、血管損傷部位への充填効果が期待できる。他方、小胞体はリン脂質の疎水性相互作用による分子集合にて形成されているため、力学的な安定度は低いものの二分子膜の流動性や膜透過性などの特徴があり、内水相には有用な水溶性物質を担持できる。両者の調製法を簡単に説明する。

ヒト血清アルブミンは分子量66.5 kDaであり、35個のシステインを持っているが17対が分子内ジスルフィド結合しており、34番目のシステインがフリーとなっている。しかし、これらのシステインは分子内部にあるため、高温アルカリ条件下(pH 10.7, 80°C)でコンフォメーションをN体からB体に可逆的に変化させてこれらを水相に露出させ、チオール・ジスルフィド交換反応によりジスルフィド結合を分子内から分子間に変換させると重合が開始される。さらに溶液pHを酸性側にシフトさせて分子間の電荷反発を緩和し、40°Cで粒子径をゆっくりと成長させ、ヨードアセトアミドにて停止させることにより任意の粒子径のアルブミン重合体を得ることができた。ヘテロ架橋剤にN-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP)を用いて重合体表面のアミノ基にpyridyldithio (PD)基を導入し、他方rGPIb α にも約1分子のPD基を導入してDTTにてSH基に還元、PD導入アルブミン重合体とSH導入rGPIb α をチオール・ジスルフィド交換させて、GPIb α 担持アルブミン重合体を調製した。その後アルブミン重合体

を FITC 蛍光標識した。結合量は、GPIIb α の抗体である GUR20-5 と西洋わさび由来ペルオキシターゼ結合 GUR83-35 を用いて ELISA 法にて定量した。

他方、リン脂質小胞体では、コリン型リン脂質のみ、あるいはこれとコレステロールの当モル混合体に、予め SPDP を用いて PD 基を導入したエタノールアミン型リン脂質 (DPPE) を 0.1 当モル量添加したクロロホルム溶液から混合脂質の薄膜を形成させた。これを 40 mM 蛍光分子カルボキシフルオレセイン (CF) の Hepes 緩衝液 (pH 7.4, 20 mM) に水和分散させ、エクストルーダーにて孔径 0.8 μm のメンブランフィルターまで透過させて粒子径約 1 μm の小胞体を調製、未内包物は遠心分離にて除去した。これに先の SH 導入 rGPIIb α を混合して、小胞体表面の PD 基と反応させて rGPIIb α 担持リン脂質小胞体を得た。二分子膜の流動性はコリン型リン脂質にゲル-液晶相転移温度が -5°C の POPC と 41°C の DPPC を用いて調節し、POPC のみ、POPC/コレステロール (1/1), DPPC/コレステロール (1/1) の順に膜流動性が低くなることを、ジフェニルヘキサトリエン (DPH) を用いた蛍光偏光解消法により確認した。



表 1 に調製した rGPIIb α 担持アルブミン重合体とリン脂質小胞体を比較した。粒子径は約 1 μm で表面の rGPIIb α 担持量は 1 粒子辺り 6,000 分子であり、血小板膜表面の GPIIb α の密度と同じにした。

ずり速度 2400 s^{-1} の流動下、rGPIIb α 担持アルブミン重合体は/vWf/固定化基板上に粘着・集積し、時間の経過と共に接着粒子の数は増大した (図 2)。この挙動は、抗 GPIIb α モノクローナル抗体 GUR83-35 にて抑制されたことから、rGPIIb α と vWf 間の特異的な粘着であるこ

とを確認した。ずり速度を 600 s^{-1} まで順次下げながら同様の測定を行なったところ、低ずり速度になるほど粘着粒子数は低下し、高ずり速度にて機能する rGPIIb α と vWf の特徴的な相互作用が確認された。アルブミン重合体に担持させる rGPIIb α の数を増加させると、粘着数も増大することから、アルブミン重合体の粘着数は粘着と脱着の関係で決まり、担持 rGPIIb α 数の増加により粘着が優勢になることが示唆された。

しかし、メパクリン標識した血小板を抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体共存下で vWf 基板上を 2400 s^{-1} のずり速度にて流動させると、血小板は基板上に粘着せずにローリングし続ける挙動が得られ、その数はずり速度や血小板濃度には依存するものの、これらが一定であれば殆ど変わらない。そこで、CF 内包 rGPIIb α 担持小胞体にて同様の実験を行ったところ、 2400 s^{-1} のずり速度にて血小板と同様ローリング挙動が確認され、その数は殆ど変わらなかった (図 3)。しかしながら、小胞体は脱着しやすいためローリングしている粒子数は血小板よりも少なく、速度は速いことが明らかとなった。両者で表面の rGPIIb α の担持密度を同じにしても、血小板上の rGPIIb α の配向性や他の膜蛋白質の影響や、形状や大きさなどが異なるため、単純な比較考察はできない。そこで、膜流動状態の異なる小胞体に対して比較を行った (表 2)。DPH による蛍光偏光解消では、値が低い系ほど膜流動性が高いことを示しており、POPC > POPC/コレステロール > DPPC/コレステロールの順であることを確認した。これらの系の間で、ローリングしている粒子数はほとんど変わらなかったが、ローリング速度は POPC < POPC/コレステロール < DPPC/コレステロー

Table 1. Characterization of rGPIIb α -polyIb and vesicle

| sample Image |  |  |
|--|---|---|
| carriers | polyAlb | phospholipid vesicle |
| components | rHSA | 1) POPC/DPPE=10/1 (by mol.) 2) POPC/cholesterol/DPPE=5/5/1 3) DPPC/cholesterol/DPPE=5/5/1 |
| assembling force of the components | disulfide bond | hydrophobic interaction |
| diameter (nm) | 1025 \pm 250 | 1) 1140 \pm 210 2) 1120 \pm 250 3) 1160 \pm 120 |
| concentration of conjugated rGPIIb α (molecules/particle) | 6.0 \times 10 ³ | 1) 5.9 \times 10 ³ 2) 6.0 \times 10 ³ 3) 6.2 \times 10 ³ |

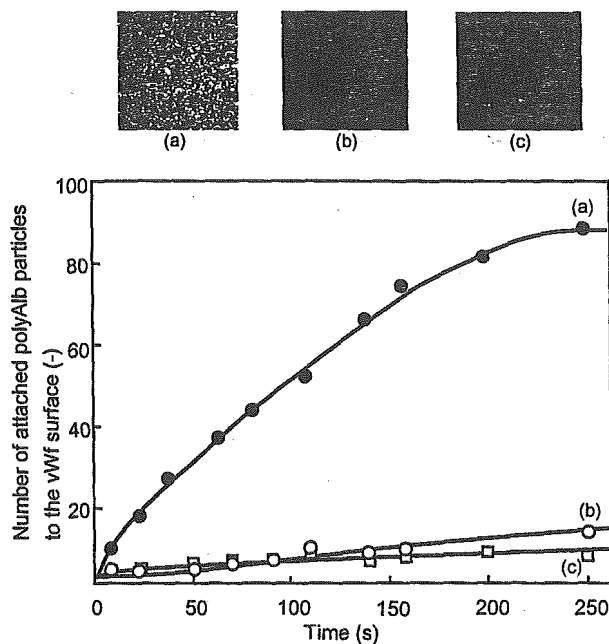


Fig. 2 Observation of adhesion of (a) rGPIIb- α -polymerized albumin particles, (b) rGPIIb- α -polymerized albumin particles in the presence of anti GPIIb- α monoclonal antibody (GUR83-35), and (c) polymerized albumin particles.

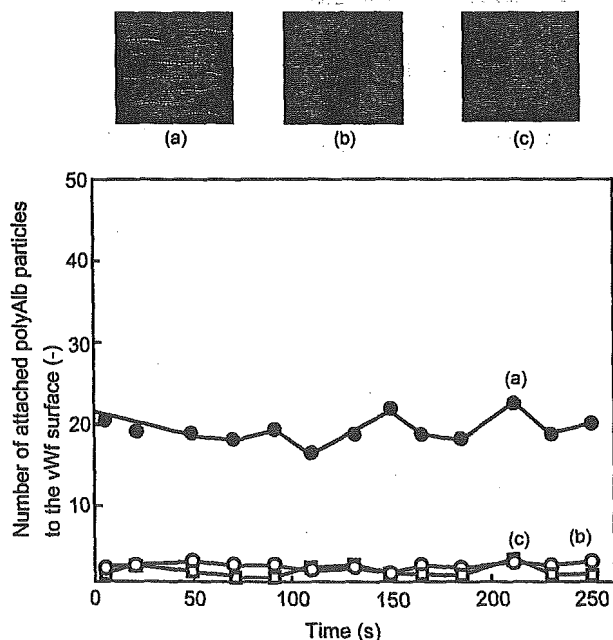


Fig. 3 Observation of rolling of (a) rGPIIb- α -vesicles, (b) rGPIIb- α -vesicles in the presence of anti GPIIb- α monoclonal antibody (GUR83-35), and (c) vesicles.

Table 2. Rolling velocity of vesicles (1), (2), and (3) to the vWf surface

| vesicles | fluorescence anisotropy (37°C) | rolling velocity ($\mu\text{m/s}$) |
|----------|--------------------------------|--------------------------------------|
| (1) | 0.08 | 15 \pm 2 |
| (2) | 0.19 | 28 \pm 4 |
| (3) | 0.25 | 65 \pm 2 |

(1) POPC/DPPE = 10/1 (by mol), (2) POPC/cholesterol/DPPE = 5/5/1, (3) DPPC/cholesterol/DPPE = 5/5/1

ルの順で、膜流動性が高い、すなわち柔らかい小胞体ほど小さくなることが明らかとなった。これは柔らかい小胞体の方がつぶれやすく、基板との接触面積が大きくなるためと考察される。その後の実験から流動性のある膜に rGPIIb- α が担持されている血小板や小胞体はローリングし、rGPIIb- α が担体に固定されているアルブミン重合体やラテックスビーズ、OsO₄ 固定の血小板では粘着する知見となっている。

他方、rGPIaIIa 担持小胞体やアルブミン重合体では、低ずり速度 (350 s⁻¹) 下で共にコラーゲン基板を転がらずに粘着し、高ずり速度では脱着が優先する様になった^{18),19)}。ところが、rGPIaIIa と rGPIIb- α の両方を担持させた小胞体では、vWf 存在下低ずり速度から高ずり速度までの幅広い領域でコラーゲン基板を粘着し、両者の協同効果が認められた²⁰⁾。ガンマー線照射によって作成した血小板減少症ラットに試料溶液を投与した後、尻尾先端を切断して出血時間を測定したところ、rGPIaIIa 結合アルブミン重合体では出血時間の有意な短縮が認められた²¹⁾。以上より、血小板と同様に損傷部位に露出しているコラーゲンを特異的に認識して集積する機能は、血小板表面の糖蛋白質の遺伝子組換え体を担体に結合させることにより再現できた。

次に、活性化した血小板を認識する微粒子として、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) を担持させたアルブミン重合体 (fbg-polyAlb) を検討した。カルシウムイオン共存下で固定化血小板基板を特異的に認識して粘着し、さらに流動している血小板を巻込んだ凝集塊を形成することを確認した (図 4)²²⁾。しかし、fbg の活性は室温 20 時間で半減し不安定であり、ヒト血液由来のため感染などの課題が残る。我々は、fbg の γ 鎖 C 末端アミノ酸序列 (HHLGGAKQAGDV, H12) を均一粒径の HSA 吸着ラテックスビーズ (LB) にジスルフィド結合にて担持させ²³⁾、これ (H12-LB) を血小板数が正常の 1/10 であ

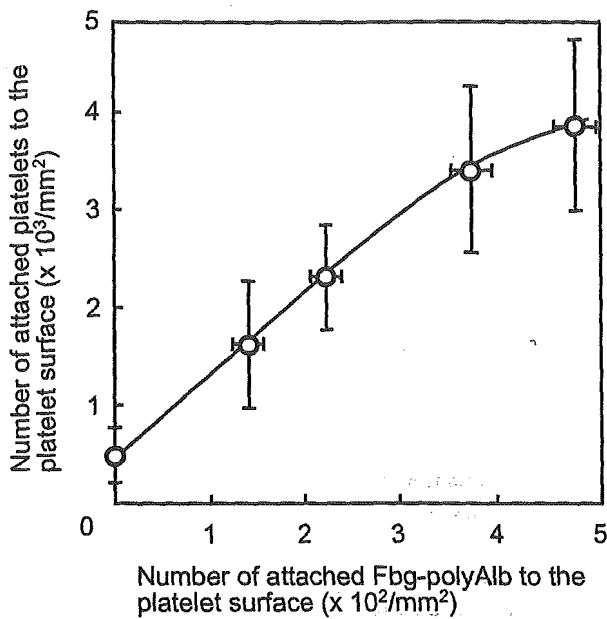


Fig. 4 Requirment of remaining platelets to the platelet-immobilized surface by the addition of fbg-polyAlb. The concentrations of fbg-polyAlb are 0, 1.0×10^{-2} , 2.1×10^{-2} , 3.6×10^{-2} , and 4.7×10^{-2} g/dL.

る血小板数減少症モデル血液に添加させて、流動下にて血小板凝集増強効果を評価した。

まず、血小板ADP凝集では、H12添加濃度に依存して血小板凝集の抑制が認められ(図5)、H12は活性化血小板に発現したGPIIb/IIIaに結合するアミノ酸配列であることを確認した。次に、再構成血液([PLT] = $4.0 \times 10^3/\mu\text{L}$, 5 mL)にH12-LBを添加し、血小板固定化基板上に流動させたところ(ずり速度 150 s^{-1})、固定化した血小板へのH12-LBの粘着が認められ、H12の共存下では粘着は抑制された。従ってH12-LBの粘着は、活性化血小板に発現したGPIIb/IIIaとH12との特異的な相互作用による粘着であることを確認した。また、血小板固定化基板に対するH12-LBの結合数は、血液ずり速度の増加に伴い減少した。

ずり速度 150 s^{-1} におけるコラーゲン基板上へDiOC6にて血小板を蛍光標識した再構成血液([PLT] = $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$)を流動させると、血小板のコラーゲン基板への粘着が認められ、粘着占有率は時間経過と共に増大し、180 s後では $3.0 \pm 0.6\%$ に達した(図6●)。LBを添加した場合でも血小板の粘着占有率に変化を認めず、LBのみでは血小板粘着の阻害も促進も起こさないことを確認した ($3.1 \pm 0.4\%$, 図6□)。他方、H12-

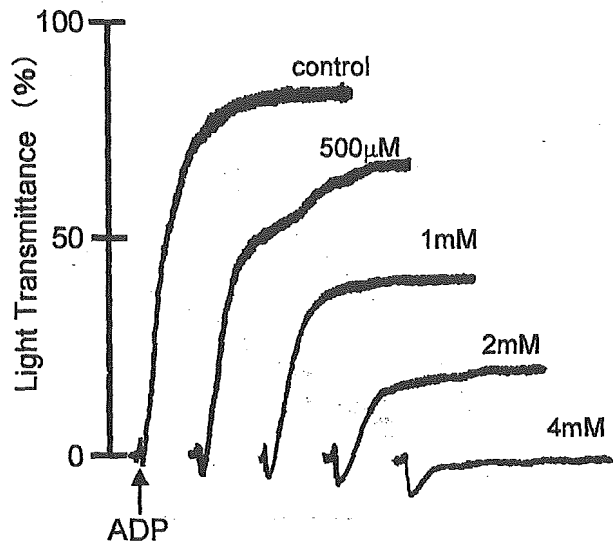


Fig. 5 ADP-induced ($20 \mu\text{M}$) aggregation of PRP ($2.0 \times 10^5/\mu\text{L}$) in the presence of H12.

LBの添加系では、流動血小板の粘着数が著しく増加し、180 s後では粘着占有率が $5.1 \pm 0.3\%$ となり、H12-LBを添加していない場合と比較して約1.7倍増大した(図6○)。他方、同条件におけるFITC標識H12-LBの粘着は30 s後まではほとんど認められなかったが、H12-LBの粘着は血小板粘着数の増加に伴い、徐々に増大した(図7○)。これは、コラーゲン基板にまず血小板が粘着し、流動しているH12-LBが活性化した血小板に発現されるGPIIb/IIIaを認識して粘着し、さらに残存血小板を巻込んだ凝集塊を形成したためと考えられた。従って、H12-LBは、コラーゲン基板に粘着した血小板と凝集塊を形成し、流動している血小板を巻込んだ凝集塊を形成して、フィブリンノーゲンと同様の効果を示すことが確認できた。

まとめ

最小限の修飾により、認識蛋白質(rGPIIb, rGPIaIIa, Fbg, H12)をアルブミン重合体あるいは小胞体表面に担持した。これらは、vWf, コラーゲン, あるいは活性化血小板に対して特異的な認識能を持っていることを確認した。現在、これらの担体を血小板減少症モデルの動物に投与して止血時間の短縮をみる試験を行っており、興味深い知見が得られているところであるが、血中滞留時間や反復投与なども鑑みた粒子系の設計なども進めている。

引用文献

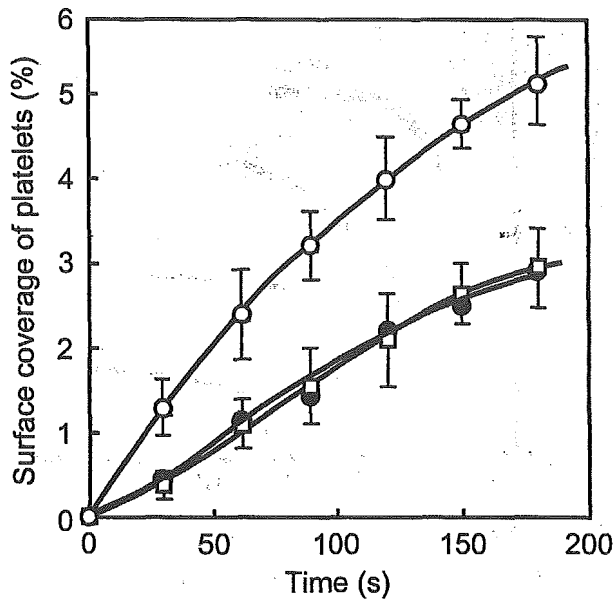


Fig. 6 Time course studies of the surface coverage of platelets in the thrombocytopenic-imitation blood after addition of H12-latex beads (○), latex beads (□), and PBS (●), at a shear rate of 150 s^{-1} . The concentrations of platelets and latex beads were $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ and $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$, respectively.

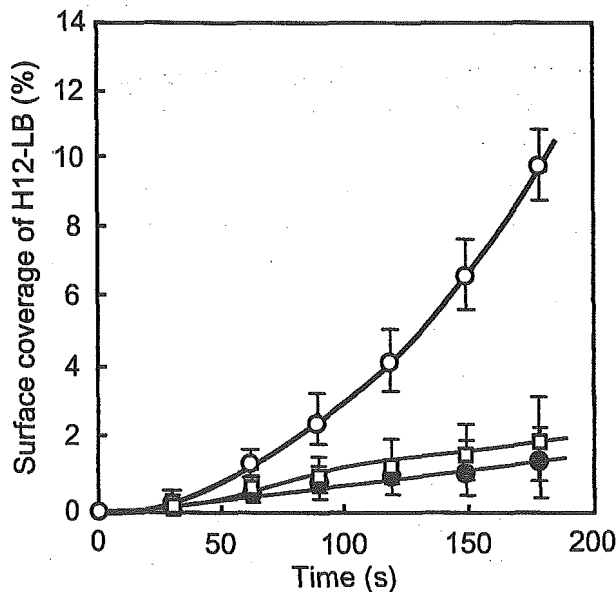


Fig. 7 Time course studies of the surface coverage of latex beads in the thrombocytopenic-imitation blood after addition of H12-latex beads (○) and latex beads (□), with a platelet concentration of $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ at a shear rate of 150 s^{-1} . (●) shows the surface coverage of H12-latex beads when the concentration of platelets was $(6.0 \pm 2.0) \times 10^3/\mu\text{L}$.

- 1) Marchese, P., Saldivar, E., Ware, J., and Ruggeri, Z. M. Adhesive properties of the isolated amino-terminal domain of platelet glycoprotein Ib α in a flow field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96** (1999), 7837-42.
- 2) Santro, S. A., and Zutter, M. M. The $\alpha 2\beta 1$ integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb. Hemost.*, **74** (1995), 813-821.
- 3) 村田 満: 人工血小板 (血小板代替物). 血液・免疫・腫瘍 **6**: 35-39, 2001.
- 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. 日本血栓止血学会誌. 印刷中.
- 5) Agam, G., Livne, A. A. Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22** (1992) 105-112.
- 6) Collier, B. S., Springer, K. T., Beer, J. H., Mohandas, N., Scudder, L. E., Norton, K. J., and West, S. M. Thromboerythrocytes. *In vitro* studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusion. *J. Clin. Invest.*, **89** (1992), 546-555.
- 7) Rybak, M., and Renzulli L. A. A liposome based platelet substitutes, the plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.*, **21** (1993), 108-118.
- 8) Chao, F., Reddick, R. L., Bode, A. R. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* **36** (1996), 536-542.
- 9) Levi, M., Friedrich, P. W., Middleton, S., De Groot, P. G., Wu, Y. P., Harris, R., Biemond, B. J., Heijnen, F. G., Levin, J., and Ten-Cate, J. W. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat. Med.*, **5** (1999), 107-111.
- 10) Collier, B. S. Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen: defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia. *Blood*, **55** (1980), 169-178.
- 11) Agam, G., Livne, A. A. Passive participation of fixed platelets in aggregation facilitated by covalently bound fibrinogen. *Blood*, **61** (1983), 186-191.
- 12) Parise, L. V., Phillips, D. R. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex incorporated into phospholipid vesicles: preparation and morphology. *J. Biol. Chem.* **260** (1985), 1750-1756.
- 13) Chao, F., Reddick, R. L., Bode, A. R. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* **36** (1996), 536-542.
- 14) Yen, R. C. K. A novel approach to correcting the bleeding associated with thrombocytopenia. *Transfusion* **35** (1995), 41s.
- 15) Fujimoto, T. T., Kohata, S., Suzuki, H., Miyazaki, H.,

- Fujimura, K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells *in vitro*. *Blood* **102** (2003), 4044-51.
- 16) Takeoka, S., Teramura, Y., Ohkawa, H., Ikeda, Y., and Tsuchida, E. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules*, **1** (2000), 290-295.
 - 17) Takeoka, S., Teramura, Y., Okamura, Y., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296** (2002), 765-770.
 - 18) Nishiya, T., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270** (2000), 755-760.
 - 19) Kainoh, M., Tanaka, T. Production of soluble integrin α 2 β 1 heterodimer complex functionally *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290** (2002), 305-310.
 - 20) Nishiya, T., Kainoh, M., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y. Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* **100** (2002), 136-142.
 - 21) Teramura, Y., Okamura, Y., Takeoka, S., Tsuchiyama, H., Narumi, H., Kainoh, M., Handa, M., Ikeda, Y., Tsuchida, E. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306** (2003), 256-260.
 - 22) Takeoka, S., Teramura, Y., Okamura, Y., Handa, M., Ikeda, Y., and Tsuchida, E. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules*, **2** (2001), 1192-1197.
 - 23) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Watanabe, N., Suzuki, H., Tsuchida, E., Handa, M., Ikeda, Y. Fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312** (2003), 773-779.

“Design and Preparation of Nanoparticles with Hemostatic Ability and Evaluation of their Functions”

Shinji Takeoka, Yosuke Okamura

Waseda University, School of Science and Engineering

Receptor glycoproteins of platelet membrane responsible to subendothelium recognition or synthetic oligopeptide relating to platelet aggregation were conjugated to the nanoparticles. The recombinant fragment of the platelet membrane glycoprotein, rGPIb α , was conjugated to phospholipid vesicles or polymerized albumin particles (polyAlb) with the average diameter of ca. 1 μ m. Under the flow condition, the vesicles and polyAlb rolled and adhered, respectively, on the von Willebrand factor (vWf)-immobilized surface. The rolling velocity of the rGPIb α -vesicles decreased with the increasing membrane flexibility. We also conjugated rGPIa/IIa to the polyAlb and injected to thrombocytopenic mice

([platelet] = $2.1 \pm 0.3 \times 10^5$ particles/ μ L). From significantly reduced their bleeding time, we confirmed that rGPIa/IIa-polyAlb had a recognition ability against collagen and could contribute to the hemostasis in the thrombocytopenic mice. On the other hand, the particles bound to activated platelets were prepared using oligopeptide-conjugated to latex beads. The oligopeptide was CHHLGGAKQAGDV (H12), fibrinogen γ -chain carboxy-terminal sequence (g400-411). H12-conjugated latex beads enhanced the *in vitro* thrombus formation of activated platelets on the collagen-immobilized surface under flowing thrombocytopenic-imitation blood.

Key Words: platelet substitutes, polymerized albumin particles, phospholipids vesicles, *in vitro* and *in vivo* evaluation, thrombocytopenic models

血小板研究の新展開

血小板代替物の展開

武岡真司, 岡村陽介

早稲田大学理工学部高分子化学研究室

血小板は、血液凝固系と連動した実に巧妙で安全な止血機構をもち、これを人工系で模倣することは不可能とあってよい。筆者は慶應義塾大学医学部池田康夫教授の研究室と共同して、一次止血にかかわる機能を代替する微粒子系の開発を行っている。具体的には、リン脂質二分子膜小胞体（リポソーム）やアルブミン重合体を担体の候補とし、認識部位の候補として血小板膜タンパク質の遺伝子組換え体（rGPIb α 、rGPIa/IIa）やフィブリノーゲンのヘプチド（H12）を結合させて、*in vitro*、*in vivo*にて止血能を評価しており、その可能性が具体的に見えてきた。

Key words platelet substitute, liposome, albumin, GPIb α , fibrinogen, hemostasis

血小板輸血は、癌・造血器腫瘍などの治療や、外科手術において不可欠な補助治療法としての重要な位置を占めており、その需要は年々増加している。しかし、献血血小板量の減少と短い保存期間（72時間）のため、供給不足に加えて緊急時の供給体制が不完全な状況にある。さらには、ウイルスや細菌などの感染症に対する対策も進んできたものの、そのリスクを完全に排除できない。不必要な輸血を減少させる努力が払われているものの、赤血球輸血とは異なり自己血輸血の推進は図れず、同種血輸血を可及的に回避しうる血小板代替物の開発ならびに臨床応用は、21世紀における医療において当然目指すべき方向であろう¹⁾。

●止血のメカニズムと血小板代替物

止血の重要な初期段階は、血管創傷部位に露出している血管内皮下層への血小板の接着・粘着である。血小板の表面には、コラーゲンなどの血管内皮下層や von Willebrand 因子 (vWF) やフィブリノーゲンなどの血漿タンパク質を認識するレセプタータンパク質があり、これらの相互作用により接着、粘着が起こる。具体的には、高血流条件下では、血小板の糖タンパク質 Ib (GPIb) がvWFを介したコラーゲンとの相互作用によって血小板の接着（ローリング）が起こる²⁾。続いて、低ずり速度の状態ではコラーゲンのレセプタータンパク質である GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ インテグリン) やGPIIb/IIIa とコラーゲンとの直接結合により血小板の粘着が起こる^{3,4)}。これらの刺激が細

Development of platelet substitutes

Shinji Takeoka Yosuke Okamura

たけおか・しんじ 1991年早稲田大学大学院理工学研究科応用化学専攻博士課程修了（工学博士）。早稲田大学理工学部助手、専任講師を経て96年同助教授（現在に至る）、98～99年 University of Pennsylvania 客員研究員。現在の専門は、高分子化学、分子集合科学、人工血液。

胞内に伝わり、複雑なシグナル伝達機構を経てさらに GPIa/IIa が構造変化してコラゲンとより安定に結合し、GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリン) が活性化されてフィブリノーゲンや vWF を介した血小板凝集 (一次凝集) が起こる⁵⁾。同時に、細胞内シグナル伝達によって血小板の形態が変化して偽足を出してより粘着しやすい形態となり、血小板内の濃染顆粒が解放小管系の膜と融合して血小板活性化因子である ADP (ATP)、カルシウムイオン (Ca^{2+}) の放出や凝集を補強するセロトニンが発現される。次に、 α 顆粒がフィブリノーゲン、フィブロネクチン、vWF、P-セレクチンなどを放出し、同時にこれらのレセプターを血小板表面に発現あるいは表出し、血小板間、あるいは白血球をも巻き込んだネットワークを形成して血小板凝集 (二次凝集、ここまでが一次止血) を促す⁶⁾。最後に、強力な凝固系因子であるトロンボキサン₂ の放出や血小板表面が凝固系の活性化に必要な場 (ホスファチジルセリン) が提供され、血漿中の凝固因子によって凝固系が活性化されて、最終的にはフィブリノーゲンがフィブリン塊 (血餅) となって止血 (二次止血) が完了する。

このように血小板による止血は、血小板内外の多段階の反応過程が連動し血小板の変形や顆粒の放出などのダイナミズムによって起こっているため、この機能をすべて模倣した人工系の構築は不可能といえる。血小板の基本的で重要な機能は、損傷部位を特異的に認識した接着・粘着と凝集である。血小板代替物によってまずこの過程を代替して、血小板減少患者に残存している血小板を効率よくこの凝集の場にリクルートできれば、後の血餅に至るまでの過程 (二次凝集、二次止血) は通常の血小板の機能と凝固系により可能と考え、当研究室では慶應義塾大学医学部池田康夫教授の研究室と共同研究を進めている。

●血小板代替物の研究動向

血小板代替物の研究は、フィブリノーゲン結合ラテックスビーズが ADP 刺激による活性化血小板と迅速に反応することを Coller ら⁷⁾ が 1980 年に報告

したことに始まる。その後、担体として正常ヒト赤血球にフィブリノーゲン⁸⁾ やその一部のアミノ酸配列 RGD⁹⁾ を固相化した例が報告され、血小板の凝集反応を媒介するリガンドの固相化により残存血小板の凝集能を増強する実例となった。さらに、ヒト血小板を凍結・融解にて破壊後加熱処理した粉末製剤 (infusible platelet membrane ; IPM) が血小板減少ウサギの出血時間を短縮した例¹⁰⁾ から臨床試験が開始されたものの、作用機序が不明瞭であることなどが問題となり、臨床試験は中断されている。最近では、Levi ら¹¹⁾ により、フィブリノーゲン結合アルブミンマイクロカプセルを投与した *in vivo* 系にて出血時間の短縮が詳細に報告された。しかし、上述の例は、すべてヒト血液由来の成分を使用している。

他方、わが国における血小板代替物の開発は、生体投与可能なリン脂質小胞体 (リポソーム) や遺伝子組換えヒト血清アルブミンの重合体を担体として利用し、出血部位を認識させるために、血小板膜タンパク質の一部の遺伝子組換えレセプター (rGPIb α , rGPIa/IIa) や合成オリゴペプチドをリガンドとして担持させて、血小板を巻き込んだ出血部位への集積による止血能の発現を期待している。

●担体の選択

リン脂質を水中に分散させると、自発的に集合して多重層の二分子膜小胞体 (リポソーム) を構築する¹²⁾。これを孔径の異なるメンブランフィルターに順次透過させると、粒子径と層数の制御と同時にさまざまな水溶性物質を内包できるようになる。また、小胞体を作ってから表面に認識部位を担持させることもできる。薬物運搬体として小胞体には次の長所がある。①膜成分であるリン脂質やコレステロールは生体適合性、生分解性に優れる、②水溶性や脂溶性の低分子薬物、タンパク質や遺伝子などの高分子を封入できる、③粒径や脂質組成により血中滞留時間や体内動態を調節できる¹³⁾、④表面へ抗体などのリガンドを担持させることにより特定部位への指向性、集積性 (ターゲティング) が期待できる^{14~16)}。

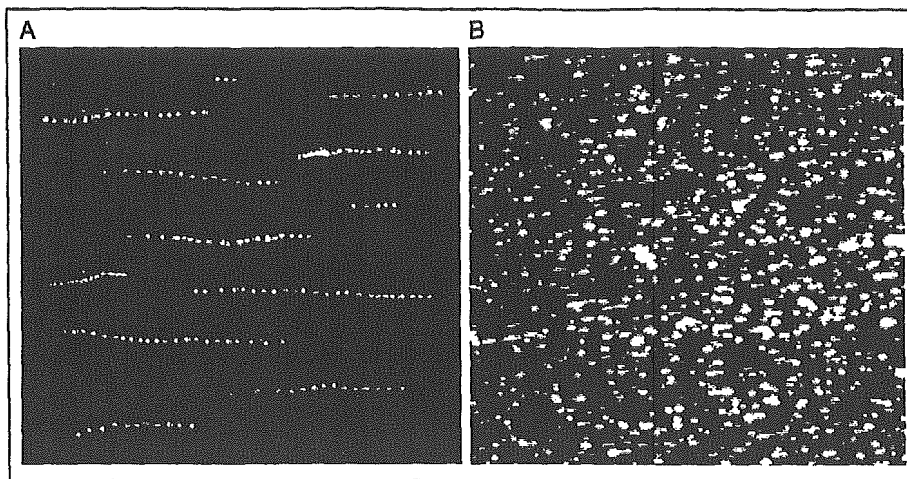


図1 vWF基板におけるrGPIIb/IIIa結合小胞体(A)とrGPIIb/IIIa結合アルブミン重合体(B)の粘着挙動の比較

ずり速度: $2,400 \text{ sec}^{-1}$, 1/6秒ごとに6秒間, 計30枚のフレームを積算。

小胞体の内水相に高濃度ヘモグロビン(Hb)を内包させて, その表面をポリエチレングリコール修飾した酸素運搬体は, 高い酸素運搬効果と長い血中滞留性や保存安定性をもち^{17,18)}, 霊長類や中動物を用いた効果と安全性の確認が進んでいる。

他方, ヒト血清アルブミンは血漿タンパク質のなかで最も多い(5 g/dl)タンパク質であり, コロイド浸透圧の調節や栄養物や代謝物などの運搬を担っている。これを利用した微粒子(たとえば, アルブミン大凝集体, アルブミンマイクロカプセル, アルブミンマイクロスフェアなど)は生体適合性・生分解性を有するため, すでに1950年代から静注用製剤として臨床使用(血管造影剤, 超音波診断増感剤, 徐放性薬物担体など)されている。しかし, これらのアルブミン微粒子は, 高温や有機溶媒による不可逆的な変性や界面活性剤や架橋剤を用いるため, 粒径制御や除去操作が煩雑であった¹⁹⁾。

筆者らは, ①遺伝子組換えヒト血清アルブミン(rHSA)²⁰⁾を単量体としてrHSAをジスルフィド結合にて重合する方法を用いて, ②重合度の制御によりナノスケールからマイクロスケールの粒径制御を可能とし, ③水溶液中でのpHと温度の制御にて重合するクリーンな方法により, 得られた粒子の表面を親水性とし, ④アルブミン変性がほとんどない重合体を得る方法を確立している²¹⁾。アルブミン重合体は内部が充填された無定形な綿雪のような形態をとっており, たとえば出血部位での充填効果が期待

できる。

ほかに, 有望な担体としては生分解性ポリエステル微粒子や両親媒性高分子を集合させた高分子ミセルや小胞体などがある。

●血小板代替物の展開

二分子膜小胞体表面に血小板膜タンパク質の遺伝子組換え体(rGPIIb/IIIa²²⁾)を結合させると, 血小板接着現象が再現できる。高ずり速度下での血小板による止血は, コラゲンに結合したvWFを血小板表面のGPIIb/IIIaが認識して血小板が粘着することから始まる。実際, *in vitro*観測にて, 抗GPIIb/IIIa抗体を添加してGPIIb/IIIaの機能を阻害した血小板では, vWF固定化基板上を流動方向に沿ってローリングする現象がみられる。興味深いことに, rGPIIb/IIIa担持小胞体でも同様にvWF基板上をローリングすることが確認された(図1A)²³⁾。小胞体のローリング数は高ずり速度のほうが多くなり, rGPIIb/IIIaの特徴が確認できた。また, そのローリング速度は小胞体を構成するリン脂質二分子膜の柔軟性(membrane flexibility)と相関しており, 粒子径, GPIIb/IIIaの表面結合密度を統一して柔軟性のみの異なる小胞体とアルブミン重合体を比較した。柔らかい小胞体ではローリング速度は低くなり, 硬い小胞体では高くなった。これは, 柔らかい小胞体は変形しやすくvWF基板と小胞体間の接触面積が増大したために, ローリング速度が低下したためと考えられた。ところが,

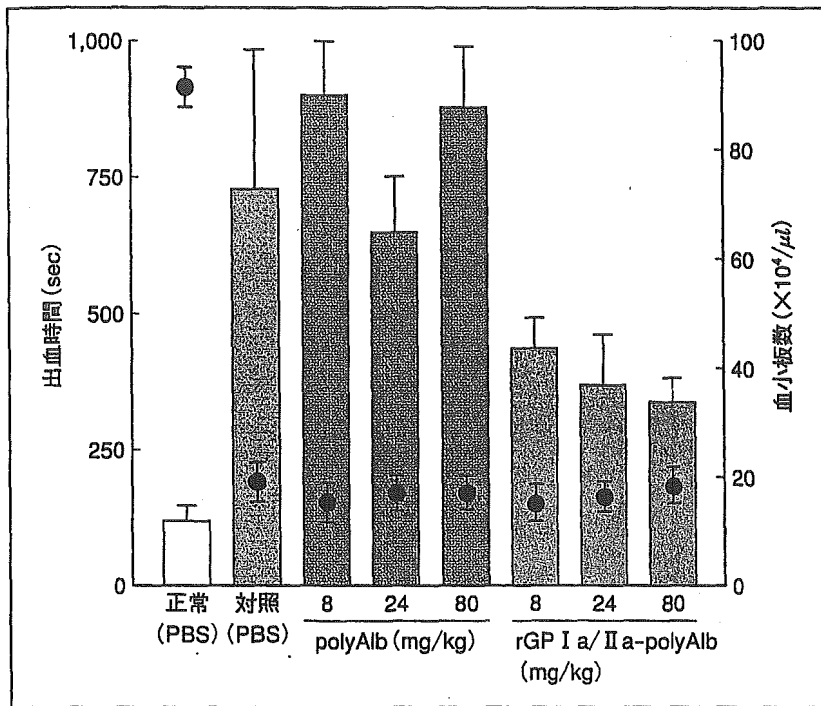


図2 rGPIIb/IIIa結合アルブミン重合体投与による血小板減少モデルマウスの出血時間短縮効果
● マウスの血小板数, PBS: phosphate buffered saline, polyAlb: アルブミン重合体

アルブミン重合体ではコラーゲン表面をローリングせずに粘着する (図1B)。同様の挙動は、ラテックスビーズや固定化血小板でも認められたことから、ローリングする性質は流動性のある膜構造をもつことが必要条件であろう。

次に、遺伝子組換え体 (rGPIIb/IIIa)²⁴⁾ を結合させた小胞体では、低ずり速度の血流下でコラーゲン基板を特異的に認識して粘着する挙動が西谷らによって確認された。ずり速度が高くなるにつれ粘着数は減少するが、rGPIIb α とrGPIIb/IIIaをとともに担持させた小胞体では、低ずり速度から高ずり速度までコラーゲン基板に粘着する²⁵⁾。筆者らは、GPIIb/IIIa担持アルブミン重合体でも同様のGPIIb/IIIaの性質を確認した。この粒子を γ 線照射にて血小板数を正常値の1/5程度に減少させたマウスに投与して、尾先端を切断して出血時間の測定を行ったところ、図2に示すように対照群 (PBS) の出血時間 (730 \pm 198秒)と比較して、投与量依存的に出血時間の短縮が認められた (たとえば、80 mg/kgでは出血時間は337 \pm 46秒)²⁶⁾。このように、低ずり速度から高ずり速度までの幅広い血流下でコラーゲンを認識して集まる微粒子系の構築に成功した。現在、GPIIb α 担持微粒子の *in vivo* 評価を検討している。

さらに、粘着して活性化した血小板同士を架橋するフィブリノーゲンを結合させた微粒子は、減少した残存血小板の凝集の補助として期待できる²⁷⁾。活性化血小板の固定化基板を作成し、フィブリノーゲン結合アルブミン重合体を流動させたところ基板上に一樣に粘着したが、抗GPIIb/IIIa抗体を添加した系やアルブミン重合体だけの系では粘着は認められなかった。さらに、血小板数が正常値の1/5程度に調節された血小板減少モデル血液に対するフィブリノーゲン結合アルブミン重合体の添加濃度の増大とともに、流動血小板の粘着数が増大したことから、フィブリノーゲン結合アルブミン重合体は血小板凝集増強効果を有する微粒子であることが示唆された。しかし、フィブリノーゲンは不安定なタンパク質であり、水溶液中ではすみやかに失活する。筆者らは、フィブリノーゲンの γ 鎖C末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV) を担体に結合させた微粒子は、アルブミン重合体でも小胞体でも、フィブリノーゲン機能が安定に発現されることを確かめた²⁸⁾。

抗癌剤であるブスルファン 20 mg/kgを2回に分けてラットに投与すると、投与後10日後に、血小板数のみが1/5まで再現性よく低下する。ラットの尾の先端から1 cmの箇所をクイックヒール[®]にて切

傷をつけると、再現性よく出血時間 608 ± 152 秒（正常ラット 178 ± 56 秒）が得られる。5分前にあらかじめ H12 結合アルブミン重合体を投与してから尾静脈からの出血時間を測定すると、出血時間が投与濃度依存的に有意に短縮された（図3）²⁹。また、アルブミン重合体の表面をポリエチレングリコール鎖にて修飾し、この末端の一部に H12 を結合した系では、3 時間後でもその効果が持続していた。したがって、フィブリノーゲンの代替をするオリゴペプチドを担持させた微粒子でも止血効果を示すことが確認された。

現在は小胞体の系でも同様の実験で評価しているが、アルブミン重合体よりも効果は劣っているようである。しかし、小胞体ならば内水相に血小板の活性化や凝固系を誘導する因子を内包させておき、出血部位に集積した小胞体がこれらを放出できれば、止血に有効に貢献できるであろう。

血小板代替物の研究は国内外ともに浅く、まだ緒に就いたばかりである。血小板減少動物モデルへの投与効果に関する知見も集積されてきた。たとえば、rGPIIb/IIIa 担持小胞体は主として血管壁側に分布して流れており、出血部位の凝集塊に取り込まれている様子も観測されている（未発表データ）。今後、出血部位を認識して止血能を発揮する担体は、血流中で血栓形成が起こらないことを評価する系の確立や、急性時に局所的な止血効果を発現する製剤、あるいは慢性的な全身からの内出血を予防する製剤を

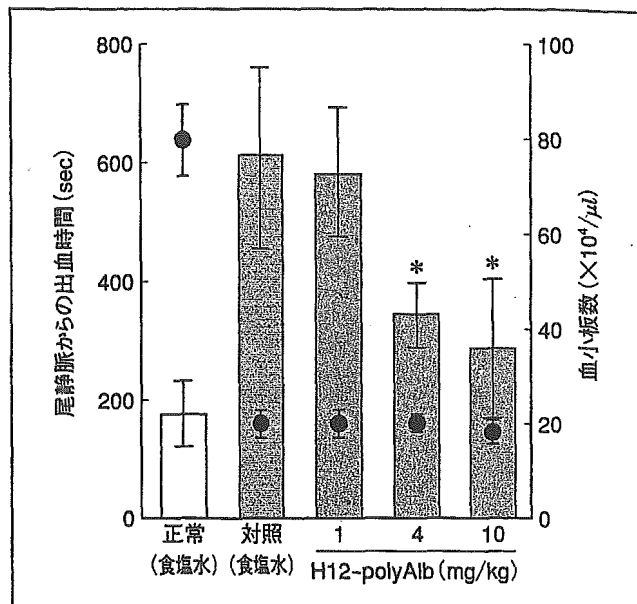


図3 H12 結合アルブミン重合体投与による血小板減少モデルラットの出血時間短縮効果

● ラットの血小板数, * $p < 0.05$ (H12 結合アルブミン重合体群 vs. 生理食塩水群)

設計するための要件など、*in vivo* 評価のフィードバックの段階を踏むことになる。現在では、バイオテクノロジーやオプトエレクトロニクスの進歩により血小板の動的な機能に関する多くの情報が短期間に蓄積され、遺伝子組換えタンパク質の大量製造や担体の製剤化技術が飛躍的に進展しているため、近い将来に実用可能な血小板代替物が創製されるであろうし、同時に drug delivery system の基盤技術に貢献することにもなる。

文献

- 1) 村田 満. 人工血小板(血小板代替物). 血・免疫・腫瘍 6, 35-9 (2001)
- 2) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 87, 1234-40 (1991)
- 3) Santro SA & Zutter MM. The $\alpha 2\beta 1$ integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Hemost* 74, 813-21 (1995)
- 4) Moroi M & Jung SM. Platelet glycoprotein VI: Its structure and function. *Thromb Res* 114, 221-33 (2004)
- 5) Takagi J, Petre BM, Walz T & Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599-611 (2002)
- 6) Marguerie GA, Plow EF & Edgington TS. Human platelets possess an inducible and saturable

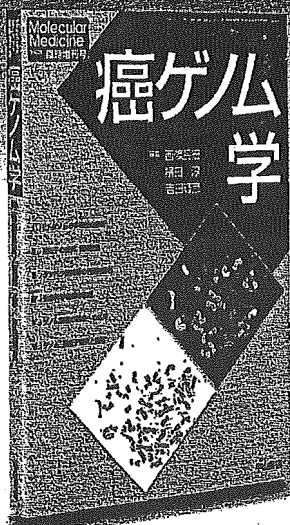
- receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem* **254**, 5357-63 (1979)
- 7) Collar BS. Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen : Defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia. *Blood* **55**, 169-78 (1980)
 - 8) Agam G & Livne AA. Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* **22**, 105-12 (1992)
 - 9) Collar BS, Springer KT, Beer JH, et al. Thromboerythrocyte. *In vitro* studies of potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* **89**, 546-55 (1992)
 - 10) Chao F, Reddick RL, Bode AR, et al. Infusible platelet membrane microvesicles : A potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* **36**, 536-42 (1996)
 - 11) Levi M, Friderich P, Ten CW, et al. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* **5**, 107-11 (1999).
 - 12) Bangham AD, Standish MM & Watkins J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13**, 238-52 (1965)
 - 13) Klivanov AL, Maruyama K, Torchilin VP & Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* **268**, 235-7 (1990)
 - 14) Alder-Moore J & Poffitt RT. AmBiosome : Liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother* **49**, 21-30 (2002)
 - 15) Maruyama K. *In vivo* targeting by liposome. *Biol Pharm Bull* **23**, 791-9 (2000)
 - 16) Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Biosci Rep* **22**, 251-66 (2002)
 - 17) 武岡真司. 人工血液 (人工赤血球) の開発動向. 日医師会誌. **131**, 907-10 (2004)
 - 18) Sakai H, Tomiyama K, Sou K, Takeoka S & Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* **11**, 425-32 (2000)
 - 19) Gupta PK & Hung CT. Albumin microspheres. I : Physico-chemical characteristics. *J Microencapsul* **6**, 427-62 (1989)
 - 20) Kobayashi K, Nakamura N, Sumi A, Ohmura T & Yokoyama K. The development of recombinant human serum albumin. *Ther Apher* **2**, 257-62 (1998)
 - 21) Takeoka S, Teramura Y, Tsuchida E, et al. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* **1**, 427-62 (2000)
 - 22) Murata M, Ware J & Ruggeri ZM. Site-directed mutagenesis of a soluble recombinant fragment of platelet glycoprotein Ib α demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem* **266**, 15474-80 (1991)
 - 23) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, et al. Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 765-70 (2002)
 - 24) Kainoh M & Tanaka T. Production of soluble integrin $\alpha 2 \beta 1$ heterodimer complex functionally *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 305-10 (2002)
 - 25) Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M & Ikeda Y. Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions : Specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* **100**, 136-42 (2002)
 - 26) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, et al. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 256-60 (2003)
 - 27) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, et al. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* **2**, 1192-7 (2001)

- 28) Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, et al. Fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 773-9 (2003)
- 29) Okamura Y, Takeoka S, Teramura Y, et al. Hemostatic effects of fibrinogen- γ chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles *in vitro* and *in vivo*. *Transfusion*, in press

癌研究は遺伝子からゲノムへ!!

Molecular
Medicine
Vol.39 臨時増刊号

癌ゲノム学



編集

西條長宏

(国立がんセンター中央病院薬物療法部)

横田 淳

(国立がんセンター研究所生物学部)

吉田輝彦

(国立がんセンター研究所腫瘍ゲノム解析・情報研究部)

大好評
発売中

B5判/並製/336頁/写・図・表約200点

定価 **9,800** 円 (本体9,333円)

—ゲノム的アプローチは、すべての癌が完全に克服されるまで、今後の癌研究のなかで不可欠の方法論として、ますますその重要性を増していこう。癌研究に有用もしくは有望なゲノム的アプローチにはどのようなものがあり、それぞれ何が可能で何ができないのか、どのような開発・応用段階にあるのか、ほかのゲノム的・非ゲノム的アプローチとどのように連結するのか、などについて、state of the artを全体像として把握しておくことが、現在の癌研究者にとって必須である。— (概論より)

中山書店

〒113-8666 東京都文京区白山1-25-14
<http://www.nakayamashoten.co.jp/>

TEL : 03-3813-1100
FAX : 03-3816-1015

血小板代替物の担体設計から Drug Local Delivery の可能性

武岡真司^{*1}, 岡村陽介^{*1}, 土田英俊^{*1}, 池田康夫^{*2}

Possibility of Platelet Substitutes and Drug Local Delivery by Design of Carriers

Shinji TAKEOKA^{*1}, Yosuke OKAMURA^{*1}, Eishun TSUCHIDA^{*1}, Yasuo IKEDA^{*2}

Key words: platelet substitute, liposome, polymerized albumin particle, rGPIb α , rGPIIb/IIIa, fibrinogen

1. はじめに

薬物を経口にて服用する場合、その薬物は通常錠剤やカプセルの中に封入されていて飲み易くなっている。これらの担体は胃腸で溶解され薬物は血中へと吸収され、血流と共に全身に行き渡り、肝臓や腎臓にて速やかに代謝・排泄される。注射製剤はもっと直接的であるが、謂わば垂れ流しのような状態で大量の薬物を全身投与しているので、副作用や無駄に繋がる。それに対し、血中でも薬物が微小のカプセルに封入あるいは微小の担体に担持された状態で、必要などころで必要な量が（必要なときに）放出されるような薬物送達システム（Drug Delivery System, DDS, あるいは局所への送達を意識した Drug Local Delivery System）が実現できれば、副作用や無駄を大幅に低減できるとの考えから、この領域の研究が盛んに行われてきた。既に、幾つかの DDS 製剤が臨床使用されているが、この開発は、担体の開発そのものといっても過言ではない。担体に必要な要件は、

① 血液適合性が高い、② 血中滞留時間が適当に長い、③ 薬物を必要としている箇所への集積性が高い、④ 適当な速度の生分解性を持つ、⑤ 分解物、代謝物による毒性が低い、⑥ 反復投与する薬物の担体であれば抗原性が極めて低くなければならない、とされている。

著者らは、血液代替物（赤血球代替物と血小板代替物）の研究展開をしており、前者では血中に長く留まって酸素運搬能を発現し、後者では血中に長く留まって血管損傷部位を特異的に認識して止血能を発現することが要求されるため、適当な担体の開発が必要となる。

2. 血小板代替物の開発の現状

血小板代替物の開発は、赤血球代替物と比較して歴史が浅く研究例も少ない¹⁾。血小板は出血部位に対し特異的に粘着し、伸展、凝集、放出、血液凝固系の活性化等の複雑な機能を持ち、これらの全てを兼ね備えた血小板代替物は事実上不可能といえよう。しかし、粘着、凝集能が欠如した出血性疾患 Bernard-Soulier 症候

*1 早稲田大学理工学総合研究センター〔〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1〕

Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University. {3-4-1 Ohkubo, Shinjyuku-ku, Tokyo, 169-8555, Japan.}

Tel: 03-5286-3217, Fax: 03-5286-3217

*2 慶應義塾大学医学部内科〔〒160-8582 東京都新宿区信濃町35〕

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University. {35 Shinanomachi, Shinjyuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan.}

Tel: 03-5363-3784, Fax: 03-3226-6623

群や血小板無力症において出血傾向が強く認められることから、血小板の粘着と凝集能に着目して、それらを付与させた担体では血小板減少患者に僅かに残存する血小板の機能を補助できるものと考えられる。血小板代替物開発の歴史を簡単に紹介すると、まずフィブリノーゲンを結合させたラテックスビーズはADP刺激による活性化血小板と迅速に反応することを1980年にCollerら²⁾が報告し、血小板代替物開発の皮切りとなった。その後、正常ヒト赤血球を担体としてフィブリノーゲン³⁾やその一部のアミノ酸配列RGD⁴⁾を固定化した例が報告され、血小板の凝集反応を媒介するリガンドの固定化により残存血小板の凝集能を増強する事例となった。さらに、ヒト血小板を凍結融解にて破壊させ、加熱処理した粉末製剤 (Infusible Platelet Membrane, IPM) によって血小板減少ラビットの出血時間が短縮した結果⁵⁾から臨床試験が開始されたものの、作用機序が不明瞭であることなどが問題となり、臨床試験は中断されている。最近では、Leviら⁶⁾により、フィブリノーゲン結合アルブミンマイクロカプセルを投与した *in vivo* 系にて出血時間の短縮が詳細に報告された。しかし、上述の例は、全てヒト血液由来の成分を使用しているため、感染に対するリスクを完全に排除できない。

他方、わが国における血小板代替物の開発は、生体投与可能なリポソームや遺伝子組換えアルブミン重合体を担体として利用し、出血部位を認識させるために血小板膜蛋白質の一部の遺伝子組換え蛋白質や合成オリゴペプチドを担持させて、血小板を巻き込んだ出血部位への集積による止血能の発現を期待している。そこで、本稿ではリポソームやアルブミン重合体の担体としての特徴を紹介すると共に、それらを用いた血小板代替物への展開や出血部位や活性化した血小板を標的にした Drug Local Delivery の一端を紹介する。

3. リポソーム (小胞体) を利用した血小板代替物の展開

リン脂質を水中に分散させると自発的に集合して二分子膜小胞体 (リポソーム) を構築する⁷⁾。リン脂質は親水部と疎水部を併せ持つ両親媒性分子であり、疎水部の2本のアシル鎖長や、不飽和度、親水部のリン酸残基を含む極性頭部の大きさ、イオン性基の種類により分類され、その分子集合体は、脂質分子構造のみならず温度やpH、イオン強度、そして分散エネルギーなどに応じて、小胞体以外にもミセルやヘキサゴナル相、キュービック相など多様な形態をとることが知られている⁸⁾。薬物運搬体として小胞体には次の長所がある。①膜成分であるリン脂質やコレステロールは生体適合性、生分解性に優れる、②水溶性や脂溶性の低分子薬物、蛋白質や遺伝子などの高分子を封入できる、③粒径や脂質組成により血中滞留時間や体内動態を調節できる⁹⁾、④表面へ抗体などのリガンドを担持させて特定部位への指向性、集積性 (ターゲティング) が期待できる^{10~12)}。我々も小胞体の内水相にヘモグロビン (Hb) を内包させたヘモグロビン小胞体の開発を20年以上続けており、その表面をポリエチレングリコール修飾して保存安定性や血中滞留性の向上に成功し¹³⁾、既に霊長類を用いた効果と安全性を確認している。

また、小胞体表面に血小板膜蛋白質の遺伝子組換え体 (rGPIIb¹⁴⁾) を結合させると、血小板止血過程の一部の再現が可能となる。高ずり速度の血流下での血小板による止血は、血管内の出血部位に露出するコラーゲンに結合したフォンビルブランド因子 (vWf) に対して、血小板が認識して結合することから始まる。この認識作用は血小板表面のGPIIbを含むGPIIb/V/IX複合体が発現している¹⁵⁾。実際、*in vitro* 観測にて抗GPIIb/IIIa抗体を添加してGPIIb/IIIaの機能を阻害した血小板では、vWf固定化基板上を流動方向に沿って転がる現象が見られる。こ

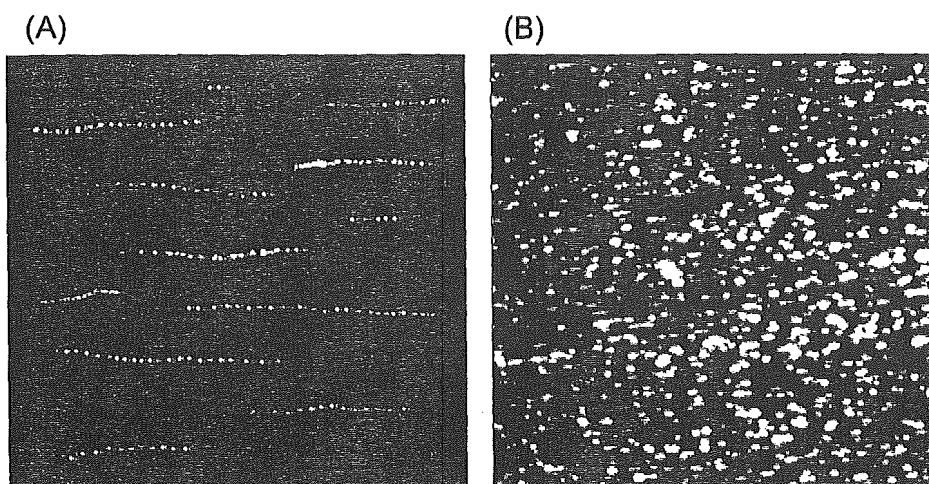


Fig. 1 Observation of (A) rGPIIb- α -vesicles and (B) rGPIIb- α -polymerized albumin particles (polyAlb) to the vWf-immobilized surface at the shear rate of 2400s^{-1} . (A) and (B) were superimposed pictures for 3s taken at every $1/6\text{s}$.

これは、血小板表面の GPIIb α と固定化 vWf との相互作用によるものと説明されるが、興味深いことに、rGPIIb α 担持小胞体でも血小板と同様に vWf 基板上を転がることを確認された (図 1 (A))¹⁶⁾。転がる小胞体の数は高ずり速度の方が多くなり、rGPIIb α の特徴が確認できた。また、その転がり速度は小胞体を構成するリン脂質二分子膜の柔軟性 (membrane flexibility) と相関した¹⁷⁾。すなわち、“柔らかい”小胞体では転がり速度は低くなり、“硬い”小胞体では転がり速度は高くなった。これは血流中ではずり応力により“柔らかい”小胞体は変形しやすく vWf 基板と小胞体間の接触面積が増大したために、変形しにくい“硬い”小胞体よりも転がり速度が低下したためと考えられた。このように、rGPIIb α の担持により小胞体に血小板機能の一部を付与でき、しかもその機能を制御する方法を見出すことができた。ただし、rGPIIb α 担持小胞体は、血小板のように vWf 基板上を転がり続けるのではなく、ある程度転がると脱着する傾向が見られ、これは“柔らかい”小胞体ほど顕著であった。測定前後での小胞体表面の rGPIIb α 担持量から、小胞体が vWf 基板を転がっている間に rGPIIb α 結合脂質が二分子膜から脱離することが示唆され、脱離し難い rGPIIb

α 結合脂質を合成して評価を進めている。

他方、低ずり速度の血流下でコラーゲンに直接結合する血小板膜蛋白質の遺伝子組換え体 (rGPIIaIIa)¹⁸⁾ を結合させた小胞体では、コラーゲン基板を特異的に認識して粘着 (停止) する挙動が西谷らによって確認された¹⁹⁾。この系ではずり速度が高くなるにつれ粘着数は減少するが、rGPIIb α と rGPIIaIIa を共に担持させた小胞体では低ずり速度から高ずり速度までコラーゲン基板を粘着する¹⁹⁾。更に、小胞体の内水相に血小板の活性化や凝固系を誘導する因子を内包させておき、出血部位に集積した小胞体がこれらを放出できれば、止血に有効に貢献できるであろう。

4. アルブミン重合体を用いた展開

ヒト血清アルブミンは血漿蛋白質の中で最も多い (5g/dL) 蛋白質であり、コロイド浸透圧の調節や栄養物や代謝物などの運搬を担っている。これを利用した微粒子 (例えば、アルブミン大凝集体) は生体適合性・生分解性を有するため、既に 1950 年代から静注用製剤として臨床使用されている。数から数十ミクロンの放射化ラベルしたアルブミン大凝集体は、心肺、

脳, 肝臓等の血流動態観測用プローブや血管造影剤などに²⁰⁾, 噴霧乾燥法によって調製したアルブミンマイクロカプセルは超音波診断用増感剤として²¹⁾, アルブミンマイクロスフェアは徐放性の薬物担体として²²⁾, 利用されている. しかし, これらのアルブミン微粒子は, 高温や有機溶媒による不可逆的な変性や界面活性剤や架橋剤を用いるため, 粒径制御や除去操作が煩雑であった²³⁾.

我々は, ①遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA)²⁴⁾ を単量体としてジスルフィド結合にて重合する方法を用いて, ②重合度の制御によりナノスケールからマイクロスケールの粒径制御を可能とし, ③水溶液中での pH と温度の制御にて重合するクリーンな方法により, 得られた粒子の表面を親水性とし, ④アルブミン変性がほとんどない重合体を得る方法を確立している²⁵⁾.

アルブミン重合体は内部が充填された無定形な綿雪のような形態をとっており, 例えば出血部位での充填効果が期待できる. 表面に rGPIIb α を結合させたところ, 小胞体のような vWf 基板を転がる挙動は全く認められず, 高ずり速度下でも粘着した (図 1(B)). ラテックスビーズに rGPIIb α を結合させた系でも同様に粘着することから, 担体が重合体である場合と膜構造を持つ小胞体の場合では rGPIIb α の機能発現の仕方が異なることが示唆された. 他方, γ 線照射にて血小板数を正常値の 1/5 程度に減少させたマウスに rGPIIIa を担持させたアルブミン重合体を投与したところ, 図 2 に示すようにコントロール群の出血時間 (730 \pm 198 秒) と比較して, 投与量依存的に出血時間の短縮が認められた (例えば, 2.4×10^{11} particles/kg では出血時間は 337 \pm 46 秒)²⁶⁾.

さらに減少した残存血小板の凝集を補助するために, 粘着して活性化した血小板同士を架橋するフィブリノーゲンを結合させたアルブミン重合体も検討している²⁷⁾. 活性化血小板の固定化基板を作成し, フィブリノーゲン結合アルブ

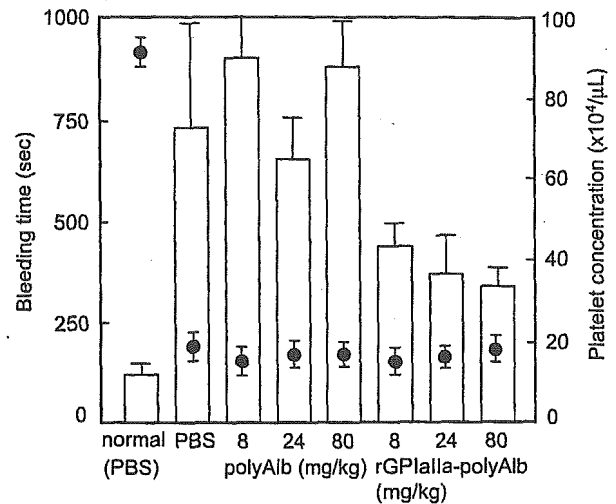


Fig. 2 Effect of the administration of rGPIIIa-polyAlb on the tail bleeding time (white bar). The administration concentration of rGPIIIa-polyAlb is 8, 24, and 80 mg/kg respectively, which are values in terms of albumin concentration. ●: platelet concentration in the mouse.

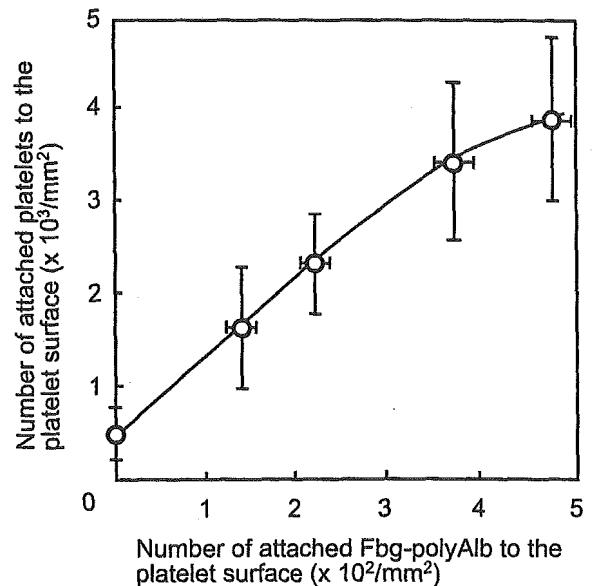


Fig. 3 Effects on the attachment of remaining platelets to the platelet-immobilized surface by the addition of Fbg-polyAlb. The concentrations of Fbg-polyAlb are 0, 1.0×10^{-2} , 2.1×10^{-2} , 3.6×10^{-2} , and 4.7×10^{-2} g/dL.

ミン重合体を流動させたところ基板上に一様に粘着し, 抗 GPIIb/IIIa 抗体を添加した系やアルブミン重合体だけの系では粘着は認められなかった. 更に, 血小板数が正常値の 1/5 程度に調節された血小板減少モデル血液に, 添加するフィブリノーゲン結合アルブミン重合体の濃度を増大させると流動血小板の粘着数が増大した