

厚生労働科学研究費補助金
政策創薬総合研究事業

平成19年度 総括・分担研究報告書

臨床応用可能な人工血小板としての
H12結合微粒子の *in vivo* 評価

主任研究者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法部 准教授

平成20(2008)年3月

厚生労働科学研究費補助金
政策創薬総合研究事業

臨床応用可能な人工血小板としての

H12 結合微粒子の *in vivo* 評価

(H18—医薬—一般—026)

平成 19 年度

総括・分担研究報告書

平成 20 年 3 月

・・・・・・・・・・・・・・・・ 研究組織 ・・・・・・・・・・・・・・・・

(主任研究者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 准教授

(分担研究者)

池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授

武岡真司 早稲田大学理工学部 教授

梶村真弓 慶應義塾大学医学部 講師

後藤信哉 東海大学医学部 教授

村田満 慶應義塾大学医学部 教授

鈴木英紀 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 研究員

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

目 次

臨床応用可能な人工血小板としての H12 結合微粒子の *in vivo* 評価

平成 19 年度研究報告

- I. 総括研究報告書 半田 誠
- II. 分担研究報告
1. 血小板減少ウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と
-腹部手術モデルでの止血能評価- 池田 康夫
2. 実験小動物用 *in vivo* CT システムを用いた H12-小胞体の特異的集積性評価 武岡 真司
3. 人工血小板粒子の微小循環動態特性の生体内解析
-H12 結合アルブミン重合体の微小循環挙動- 梶村 真弓
4. 臨床応用可能な人工血小板としての H 1 2 結合微粒子の *in vivo* 評価 後藤 信哉
5. 血小板減少ウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価 村田 満
6. <H 1 2 結合微粒子の止血メカニズム> 形態的観察
-トロンビン刺激による H12-リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討- 鈴木 英紀
7. α IIb β 3 インテグリン活性化機構の解明に関する研究 鎌田 徹治
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表
- IV. 研究成果の刊行物・別冊
- V. その他

総括研究報告書

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業)
臨床応用可能な人工血小板としての H12 結合微粒子の *in vivo* 評価
総括研究報告書

主任研究者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 准教授)

研究要旨

【研究目的】人工血小板／血小板代替物のプロトタイプとして、初年度（平成 18 年度）の研究により絞り込まれた人工微粒子（H12 担持リポソーム）の止血機能、適応方法、安全性を、*in vivo* 実験系を中心に評価した。

【研究方法】フィブリノーゲンのγ鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)をその表面に担持させ、アデノシン 5' -二リン酸(ADP)を内包させたリポソーム(H12(ADP)小胞体)を対象とした。人工微粒子の静脈内投与による止血効果や安全性を、血小板減少ウサギの出血時間の測定に加え、新たに確立した腹部手術モデルで評価し、その適応法を検討した。さらに、標識した人工微粒子の止血部位集積性や体内動態を、ラットを用いて CT スキャンや生体顕微鏡に観察し、また、ヒト血小板との *in vitro* 相互作用を電子顕微鏡により解析した。

【研究結果】血小板減少ウサギにおける H12(ADP)小胞体の止血効果（出血時間短縮）の持続は、その血中濃度に依存して、少なくとも投与後 6 時間まで観察された。また、腹部の手術部位からの出血量に対しても、血小板濃厚液に匹敵して、用量依存的に減少効果を発揮した。造影剤内包小胞体のラット尾静脈や頸静脈の血管傷害部位への特異的な集積が CT スキャン解析により初めて明らかとなった。また、ラット腸間膜微小循環における出血部位のリアルタイム観察で、H12 結合微粒子が血小板血栓と特異的な相互作用を示すことが確認され、さらに、超微形態学的検討でも、ヒトの活性化血小板との特異的な相互反応が観察された。小胞体の静脈投与により、ウサギにおいて血栓傾向などの急性毒性を示さずに、循環血液中での血小板活性化作用は認められなかった。

【考察・結論】人工血小板の最終候補である H12(ADP)小胞体は、血小板に匹敵する止血効果を、安全に発揮し、その適応は出血の治療や予防にまで拡大できる可能性が指摘できた。さらに、その作用は活性化血小板との特異的な相互反応で止血局所でのみ発揮されることが確認された。多方面からの安全性評価とともに微粒子の止血機能の最適化を行い、人工血小板の実用化を目指してゆく。

(分担研究者)

池田康夫	慶應義塾大学医学部	教授
武岡真司	早稲田大学理工学部	教授
梶村真弓	慶應義塾大学医学部	講師
後藤信哉	東海大学医学部	教授
村田満	慶應義塾大学医学部	教授
鈴木英紀	(財) 東京都医学研究機構	東京都臨床医学総合研究所 研究員
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部	講師

A. 研究目的

本研究の目的は、血小板の機能を代替し、血小板減少時の止血治療や予防に十分な効果を発揮し得る人工産物（人工血小板／血小板代替物）のプロトタイプとして絞り込まれた人工微粒子（H12 担持アルブミン重合体・リポソーム）の有用性（止血機能、適応法）と安全性を *in vivo* 評価することで、近い将来の創薬化への基礎データを提示することにある。

本年度（平成 19 年度）は、初年度（平成 18 年度）の研究結果から、最も有望な将来の人工産物として検討対象を H12 担持リポソーム（以下 H12(ADP)小胞体）に絞り込み、その止血効果、適応法、安全性について、動物モデルを用いた *in vivo* 評価を中心に行い、あわせて *in vitro* 評価系を用いて人工微粒子の作用機序について基礎的検討を行った。

周知の如く、急速な高齢化社会への移行を背景として、悪性腫瘍などの適応患者の増加や医療の高度化に伴い、そして現在表面化している献血人口の急速な減少により、我が国における血小板製剤の使用量将来予測では、払底化への危惧が強く指摘されている。したがって、その安定供給確保への対策が急務であることは異論のないところである。また、我が国では血小板製剤の医療機関への供給は予約制をひいており、短い保存期間（4 日間）と厳密な保存条件を必要とし、緊急時の供給体制が全く整っていない。さらに、ウイルス感染症などの輸血副作用発現の危険性を排除できず、その危険性を有する同種血輸血を可及的に回避し得る人工血小板の開発ならびに臨床応用は、21 世紀の医療において当然目指すべき方向である。常時使用可能な人工血液の開発促進は平成 15 年度に施行された血液法（安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律）にも明記され、血液事業の効率化のみならず、緊急災害時の備えの観点からも血液行政の最重点課題の一つとされている

一方、世界に目を向けると、人工血小板／血小板代替物の研究は、軍事的な使用目的から 1980 年代に米国で始まった。しかしながら、検討対象は期限切れの血小板を使用した産物（固定血小板、冷凍血小板など）が主体で、1995 年には凍結乾燥させた血小板膜断片（infusible platelet membrane: Cyplex™）が初期臨床試験（フェーズ 2）の段階まで検討されたが、何らかの理由で開発は中止された。人工血小板としてはアルブミンのマイクロカプセル微粒子にヒトフィブリノーゲンを結合させた産物（Synthocyte™）が 1999 年に報告されたが、同様に臨床試験（フェーズ 1）が中止された（Blajchman MA:Substitutes and

alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. J Thromb Haemost 1:1637-41, 2003)。現在、欧米において開発されている人工血小板／血小板代替物は、アルブミン微粒子（マイクロスフェア）にフィブリノーゲンと強力な親和性を有する合成ペプチドをその表面に結合させた人工産物（Haemoplax™）のみ（前臨床の段階）であり、世界的にみても人工血小板の実用化への期待は高いといえる。

実際、我々は平成9年度より厚生科学研究費補助金（当時）の支援を受け、血小板の止血機能を代替した人工産物の創製に向けた基礎研究を開始し、すべてが人工物で構成されたハイブリッド型人工微粒子を着想して、開発するに至った。すなわち、出血部位においてのみ粘着・凝集などの血小板が有する止血機能が発揮される人工代替物（人工血小板）の創製である。微粒子としては生体適合性に優れ、形状変化や表面修飾が可能なリコンビナントのヒトアルブミンを変性させて作成したアルブミン重合体（polyAlb）と脂質小胞体（リポソーム）を、その表面に結合させて止血部位への特異性を規定する認識分子として接着分子受容体（GPIb α 、GPIa/IIa）とそのリガンド分子（リコンビナント蛋白や人工ペプチド：フィブリノーゲン）を選択した。

平成12年度～17年度厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業、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）の支援を受けた研究により、血管障害部位において生体内に残存する血小板をリクルートしてヒト血小板と凝集塊を形成し、これを促進させ得る機能（止血機能）を有する人工微粒子（フィブリノーゲンの γ 鎖C末端アミノ酸配列に相当する合成ペプチド（HHLGGAKQAGDV：H12）を担持させたH12結合微粒子）が人工血小板のプロトタイプとして最も有望であることが示された。

平成18年度（医薬安全総合研究事業、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）から始まった本研究（平成19年度より、創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業へ移行）によって、いくつかの候補微粒子の中から人工血小板のプロトタイプとして絞り込まれた2種類のH12結合微粒子（H12結合アルブミン重合体：H12-polyAlbと生理的な血小板刺激物質のADPを内包させたH12結合リポソーム：H12(ADP)小胞体）の止血機能と安全性をin vivo評価した。

そして、その研究結果から、今回、人工血小板の最終候補をH12(ADP)小胞体に絞り込み、その有用性と安全性を継続的に検討した。

B. 研究方法

1. **H12(ADP)小胞体の調製**: 従前の方法を用い、GMP 準拠環境において無菌的 (エンドトキシンフリー) に製造した。H12(ADP)小胞体は、凍結乾燥させたポリエチレングリコール被覆化 H12 小胞体を 1 mM の ADP 水溶液にて水和させ、抽出造粒法を用いて H12-(ADP)小胞体 (粒径 250 ± 80 nm) を調製した。小胞体溶液中の残存 ADP はゲル濾過により除去した。体内動態の検討のための標識は、蛍光分子の deca(oxyethylene) dodecyl ether ($C_{12}E_{10}$) を用い、血管傷害部位への特異的集積性の検討には水溶性造影剤の iopamidol (IOP) を内包化して用いた。
2. **血小板減少症ウサギの出血時間測定と腹部手術モデルの作成**: 従前の方法を用い、ブスルファン投与されたニュージーランドホワイトウサギ (雄性、11 週齢、25kg) を用い、耳切法により、出血時間を測定した (池田)。ウサギの腹部手術モデルは、ブスルファン惹起血小板減少動物の前腹壁にメスで一定の切傷 (長さ 5 cm、深さ 0.3 cm) をつけ、ガーゼで吸収された血液の重量を測定し、出血量を算出した (池田)。比較対象として、血小板濃厚液をウサギ全血より遠心法にて作成した。
3. **CT スキャンによる小胞体集積性の検討**: 健常ラットをネンブタール麻酔下、造影剤 (IOP) 標識小胞体を尾静脈に投与し、5 分経過後、尾先端から 1 cm の部位にメスで一定の切傷を作成し、止血するまで尾先端を生理食塩水中に浸した。犠牲死させた後、小動物用 CT スキャンシステム (eXplore Locus™) にて、尾の止血局所や臓器などへの体内分布を観察した (武岡)。
4. **人工微粒子のラット腸間膜微小循環における体内動態の解析**: 従前の方法を用い、レーザーアブレーションにより微小血管に破綻性出血を作製し、障害部位で形成される血小板血栓周辺での標識された血小板や人工微粒子 (今回は、可視化のため粒径を大きくした H12 結合アルブミン重合体を用いた) の挙動を生体顕微鏡下にリアルタイムで撮像し、imaging 技術による評価システムを用いて解析した (梶村)。
5. **その他の *in vitro*/*ex vivo* 実験系**: ①血小板凝集計 (池田、鈴木) やフローサイトメトリー (鈴木、後藤) による非流動条件下での血小板凝集やウサギ末梢循環での活性化血小板の検出 (村田) ②フローチェンバー (後藤) を用いた流動条件下血小板血栓形成、③H12 結合微粒子と凝集血小板の相互作用の電子顕微鏡 (電顕) を使った超微形態学的解析 (鈴木)、を行った。また、④H12 結合微粒子と活性化血小板の特異的相互反応のメカニズムを検討する目的で、

CHO 細胞発現系を用い、H12 の結合標的となる血小板 GPIIb/IIIa 複合体 (α IIb β 3 インテグリン) の活性化の構造分子学的メカニズムを解析した (鎌田)。

C. 研究結果及び考察

1. H12 (ADP) 小胞体の止血効果と適応法 (池田)

1) 止血効果は投与後少なくとも6時間以上持続した : H12 (ADP) 小胞体の止血能の効果持続時間と血中濃度との関係を、血小板減少ウサギを用いた出血時間測定計で検討した。抗がん剤のブサルファン投与により血小板数は前値の約 1/15 ~ 1/20 に低下 ($2.6 \pm 0.8 / \mu\text{L}$) し、それに伴い出血時間は 15 倍に延長 (1695 ± 197 秒から 112 ± 24 秒) した。H12 (ADP) 小胞体を 20、40mg/kg の用量で静注し、経時的に出血時間を測定し、生食投与群と比較検討した (池田分担報告、図 2)。その結果、H12-(ADP) 小胞体の 20 mg/kg 投与群ではそれぞれ 1123 ± 467 、 1259 ± 646 、 1517 ± 330 秒、40 mg/kg 投与群ではそれぞれ 674 ± 341 、 858 ± 361 、 1556 ± 337 秒と計測でき、投与 6 時間後までは、生食投与群と比較して有意に出血時間の短縮効果が維持できることが明らかとなった。蛍光標識した H12 (ADP) 小胞体の血中濃度の経時的推移を 20、40mg/kg の用同様のタイムポイントで測定し、出血時間短縮効果との対応を検討した (図 3)。その結果、H12-(ADP) 小胞体の止血効果は、血中濃度推移 (血中半減期 $T_{1/2}$: 522 ± 30 分) と相関しており、血中濃度を約 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を保てば止血機能を維持できると算出された。小胞体の血中滞留時間は、周知のようにその粒径や表面の性状に依存している。本微粒子はポリエチレングリコール分子による表面被覆化により大幅な血中滞留時間延長に成功した。そして、今回の検討により、投与用量を増加させることで少なくとも6時間以上はその効果を体内で持続させうることが明らかとなった。このことは、血小板輸血の代替として本微粒子の臨床応用への道を開くものである。

2) 外科的出血への治療効果が確認された : 血小板減少症患者への血小板輸血の適応の中で、外科的処置時の出血予防や治療は重要な目的である。H12 (ADP) 小胞体の出血予防効果を血小板減少ウサギ手術モデルの腹部切創からの出血量を測定することで評価した (図 4)。実際、出血量は血小板減少により約 4.5 倍増加した。当然のことながら、ウサギ血小板は用量依存性に出血量の減少効果を強力に発揮したが、H12 (ADP) 小胞体も同様に、20 mg/kg、40mg/kg 投与群で、用量依存性に出血量の減少効果を発揮した。しかし、血小板と比較した場合、

H12(ADP)小胞体の出血量減少効果(出血治療効果)は、その出血時間短縮効果(出血予防効果)に比べて、弱いことが明らかとなった。すなわち、20mg/kg 投与での出血時間短縮効果は血小板輸血 4.0×10^9 PLT/kg に匹敵し、40mg/kg 投与での腹部手術出血減少効果は血小板輸血 2.0×10^9 PLT/kg に匹敵した。一般に、出血の治療には予防に要する用量よりはるかに多い血小板の輸血が必要である。H12(ADP)小胞体の治療的適応を検討する上で、重要な問題点が指摘できた。

3) ウサギのデータはヒトへの応用の可能性を高める : H12 ペプチドの一次配列はヒトフィブリノーゲン由来であり、血小板との相互反応における実験動物種差の影響は、そのデータをヒトに適用するためには重要なポイントである。実際、H12 ペプチドの血小板凝集阻害作用をラット、ウサギ、ヒトで比較したところ、その IC_{50} は、それぞれ 1.07、0.69、0.70 mM と算出できた(図5)。したがって、ラットに比較して、ヒトとウサギの血小板に対する H12 の反応性はほぼ同等に良好であり、ウサギでのデータはヒトへの応用の期待を高める可能性が指摘できた。

2. H12(ADP)小胞体の安全性(武岡、梶村、後藤、村田)

今までの検討から、投与後の血小板、凝固・線溶系マーカーの変動はなく、被験動物(ラット、ウサギ)で急性の死亡例は全くみられなかった。安全性への最大の危惧は、H12(ADP)小胞体が止血部位ばかりでなく、体循環の中で非特異的に循環血小板を活性化させたり、あるいはある種の病態で循環する活性化血小板と相互反応をすることで、血栓傾向を惹起させないかということである。

1) 血管障害(止血)部位への特異的集積性が初めて確認された : 水溶性造影剤の iopamidol (IOP) を安定的に内包化することで標識化した H12 小胞体を、ラットに投与して、その生体内での動態を CT スキャンで解析した。IOP の単独投与では、造影剤は速やかに尿中へ排泄されたが、H12(IOP)小胞体は肝臓や脾臓などの網内系で代謝することが確認された(武岡分担報告 図4、5)。そこで、ラット尾静脈に沿った切傷部位への集積性を観察したところ、血管傷害(止血)部位に沿って、造影剤の特異的集積像が確認された。一方、対照実験では、集積部位は認められなかった。同様の止血部位特異性は、塩化鉄による頸静脈傷害部位でも観察され(図9、10)、H12(ADP)小胞体が、流血中ではなく止血部位に特異的に、その止血効果を発揮することが強く示唆された。

2) H12 微粒子は血管傷害部位で血小板血栓との相互反応により集積する : レー

ザーアブレーションによる血管傷害部位における H12 微粒子の動態を検討する目的で、ラット腸間膜微小循環を生体蛍光顕微鏡下でリアルタイムに観察した（梶村分担報告 図 1）。可視化の目的のため、H12(ADP)小胞体の代わりに、粒径を大きくした H12 アルブミン重合体を特別に用いた。陰性対照として用いた H12 非結合微粒子の動態と比較したところ、H12 微粒子は、血管傷害部位で形成させる血小板血栓と特異的に結合し、流血中の血小板とは反応しないことが強く示唆された（図 3、4）。このことは、CT スキャンでの H12 小胞体の止血部位特異性の観察結果と矛盾せず、本人工微粒子の安全性を示唆するものである。

3) H12(ADP)小胞体は流血中の血小板を活性化させない：血小板の α 顆粒に含まれる ADP は強力な血小板活性化作用を有し、血小板血栓形成を安定化させることで一次止血を導く。昨年の研究成果により、H12(ADP)小胞体に高濃度（mM レベル）で内包化された ADP は、種々の *in vitro* 物理的条件下でも安定的に内包化され、血小板凝集に伴って放出されることが示唆されていた。しかしながら、非生理的な高濃度 ADP の体循環への放出による過剰な血小板血栓形成への危惧が、人工血小板としての本微粒子の安全性への課題であることは疑いようがない。しかし、実際、ヒト全血を使用して、*in vitro* 流動条件下でのコラーゲン表面への血小板血栓形成能への ADP 添加（終濃度：0.2 μ M, 1 μ M）の影響を観察したところ、むしろ添加濃度に依存して血小板血栓形成は著しく抑制された（後藤分担報告 図 3）。生体内には即時型のアデニンヌクレオチド代謝系（赤血球 ADP 受容体や血漿アピラーゼ/フォスファターゼ）が存在し、全血中へ添加された外因性の ADP は直ちに抗血小板作用を有する ATP やアデノシンに変換された可能性が示唆された。そこで、ウサギを使用して、H12(ADP)小胞（20 mg/kg）や高濃度 ADP（100 μ M）の直接投与が血小板の活性化（P-セレクチンの表面発現をフローサイトメータで *ex vivo* 解析）を引き起こすかどうか検討した。実際、投与後 60 分までの経時的解析で、いずれの群でも血小板の活性化は検出されなかった（村田分担報告 図 1）。以上の結果から、H12(ADP)小胞体の有する血小板血栓増強作用（H12 と ADP）は、血管損傷部位でのみ有効に働き、その止血機能を発揮する可能性を示唆するものであり、今迄の検討の範囲内では過剰な血小板血栓を誘発する可能性は指摘できなかった。しかしながら、H12 や ADP は抗血小板に働く可能性があることから、種々の条件下で H12(ADP)小胞体の止血機構への影響を今後も精密に解析する必要性が改めて認識できた。

2. H12 (ADP) 小胞体の作用機序に関する基礎的知識 (鈴木、鎌田)

1) H12 小胞体は活性化血小板上の α IIb β 3 インテグリンと特異的な相互反応を惹起する：活性化した血小板と H12 小胞体の相互反応を電子顕微鏡下で形態的に解析した (鈴木分担報告)。昨年までの検討により、H12 小胞体は活性型の α IIb β 3 インテグリンに選択的に結合することで血小板活性化に特異的にその機能を発揮すると推測されてきた。すなわち、H12 小胞体は、静止状態の血小板には反応せず、止血部位において活性化を受けた血小板とのみ特異的に相互反応を惹起し、その結果止血血栓の形成を増強する働きがあるものと考えられた。今回は、H12 に特異的に反応するポリクローナル抗体を作製し、血小板との相互反応において H12 小胞体の局在を形態的に同定した (鈴木分担報告 図5)。興味あることに、この人工微粒子は、活性型の α IIb β 3 インテグリンに選択的に結合することで、脱顆粒した活性化血小板の開放小管系に局在することが明らかとなった (図6、7)。あらためて、H12 小胞体の止血増強作用は活性化血小板との特異的な結合により発揮される可能性が強く示唆された

2) α IIb β 3 インテグリンの受容体機能はアロステリックに調節されている：
 α IIb β 3 インテグリンは、屈曲型 (bent conformer) から伸展型 (extended conformer) への変換に伴いフィブリノーゲン (H12 ドメインを介して) の低親和性受容体から高親和性受容体に転換することが知られている (鎌田分担報告 図1)。そこで今回は、CHO 細胞を用い α v / α IIb β 3 インテグリンのキメラ分子を発現させ、 α v 抗体 (3 種類、それぞれ、非機能、機能阻害、機能誘導性抗体) のエピトープマッピングを行った (表3)。その結果、 β 鎖の頭部に存在する H12 結合活性は、 α 鎖の折れ曲がり部位 (genu) を中心とした脚部の屈曲/進展により制御されていることが明らかとなった (図5)。H12 (低分子のため) は非活性型 α IIb β 3 インテグリンにも結合し、フィブリノーゲンとの結合を阻害する。一方、小胞体上に固定化された H12 は、その立体的な位置関係から、十分な細胞活性化により構造変化 (屈曲型から伸展型への変換) が起こったインテグリンにのみ結合すると考えられる。その結果、この相互反応は血小板の活性化による細胞反応 (凝集や放出反応など) を増強すると考えられる。したがって、この H12 が有する相反した特性は、人工血小板としての H12 (ADP) 小胞体の開発を進める場合の重要なポイントとなるであろう。

D. 結論

人工血小板の最終候補として絞り込まれた H12(ADP)小胞体の有用性（止血機能や適応法）や安全性を in vivo 実験系を中心に継続的に評価した。我々の人工微粒子は、血小板減少動物において出血予防ばかりでなく出血治療（出血量の削減）にも有用性を示し、血小板輸血に匹敵する止血効果をもたらした。また、この人工微粒子は、活性化血小板との特異的な相互作用により止血局所でのみその効果（血小板血栓増強作用）を発揮することが確認され、流血中での過剰な血小板血栓の形成は認められなかった。人工血小板創薬に向け、H12(ADP)小胞体の可能性がさらに高まった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

（原著）

- (1) 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* **47**, 1254-1262 (2007).
- (2) Fujie, T., Okamura, Y., and Takeoka, S. Ubiquitous transference of free-standing polysaccharide nanosheet in the development of a nano-adhesive plaster. *Adv. Mater.* **19**, 3549-3553 (2007).
- (3) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* (2008) *in press*.
- (4) Okamura, Y., Utsunomiya, S., Suzuki, H., Niwa, D., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of freestanding nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using sacrificial films. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2008) *in press*.
- (5) Okamura, Y., Goto, T., Niwa, D., Fukui, Y., Otsuka, M., Motohashi, N., Osaka, T.,

and Takeoka, S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having hetero-surface. *J. Biomed. Mater. Res. A* (2008) *in press*.

(6) Okamura, Y., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M. Development of H12 (fibrinogen γ -chain dodecapeptide)-coated, ADP (adenosine 5'-diphosphate) -incorporated liposomes as a synthetic platelet substitute . *in submission*

(7) Morikawa T., Kajimura M., Ichikawa M., and Suematsu M. Three-dimensional imaging of growing thrombus *in vivo*. *Microvascular Reviews and Communications* (2008) *in press*.

(8) Origasa H, Goto S, Uchiyama S, Shimada K, Ikeda Y, and J-TRACE Investigators. The Japan Thrombosis Registry for Atrial fibrillation, Coronary or Cerebrovascular Events (J-TRACE): A nation-wide, prospective large cohort study; The study design. *Circulation Journal*, *in press*

(9) Roether J, Alberts MJ, Touzéc E, Mas JL, Hill MD, Michele P, Bhatt DL, Aichner FT, Goto S, Matsumoto M, Ohman EM, Okada Y, Uchiyama S, D'Agostino R, Hirsch AT, Wilson PWF, Steg PG, on behalf of the REACH Registry Investigators. Risk Factor Profile and Management of Cerebrovascular Patients in the REACH Registry. *Cerebrovascular Disease*, *in press*

(10) Liu CL, Xie LX, Duralrajan SSK, Li M, Goto S, Huang JD, Salvianolic acid B inhibit hydrogen peroxide-induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/Akt signaling. *Plos One* 2 (12), e1321

(11) Li M, Zhao MQ, Kumar SS, Xie LX, Zhang HX, Kum WF, Goto S, and Liao FL. Protective effect of tetramethylpyrazine and salvianolic acid B on apoptosis of rat cerebral microvascular endothelial cell under high shear stress. *Clin Hemorl Microcirc* 38:177-187, 2008

(12) Goto S. Are Japanese patients more prone to gastro-duodenal mucosal injury and bleeding with the use of antiplatelet agents? *Thromb Res.* 2007;120(4):463-4.

(13) Chung, J., Suzuki, H., Tabuchi, N., Sato, K., Shibamiya, A., Koyama, T.: Identification of tissue factor and platelet-derived particles on leukocytes during cardiopulmonary bypass by flow cytometry and immunoelectron microscopy. *Thromb. Haemost.* 98: 368-74, 2007.

(14) Kozuma, Y., Kojima, H., Yuki, S., Suzuki, H., Nagasawa, T.: Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated

by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. *J. Thromb. Haemost.* 5: 1274-82, 2007.

(総説)

(1) 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫. 「人工血小板の開発」 *Medical Science Digest*, 34 (4) (2008), 印刷中.

(2) 武岡 真司, 岡村 陽介. 「血液の仕組みと人工血液(血液代替物)へのアプローチ」 *化学と教育 ~ヘッドライン~* (2008), 印刷中.

2. 学会発表

(1) 半田 誠. 「人工血小板」、シンポジウム：人工血液の将来展望、第14回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(2) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(3) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., and Ikeda, Y. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(4) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(5) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. American Chemical Society 234th National Meeting & Exposition (2007.8., Boston).

(6) Takeoka, S., Fujie, T., Okamura, Y. Modification of free-standing polysaccharide nanosheets and their application on a nano-adhesive plaster. American Chemical Society 234th National Meeting & Exposition (2007.8., Boston).

(7) Fujie, T., Okamura, Y., Takeoka, S. Fabrication of free-standing polysaccharide nanosheet in application of "nano-adhesive plaster". 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes (MMC-12) (2007.8., Fukuoka).

- (8) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y... Hemostatic effects of liposomes bearing fibrinogen γ -chain dodecapeptide amplified by encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitutes. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (2007.10.)
- (9) 岡村 陽介, 宇都宮 沙織, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いた微粒子融合シートの構築と表裏へのヘテロ修飾」 第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).
- (10) 福井 慶仁, 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親 - 疎水性マイクロパターン基板を用いたポリ乳酸ナノ粒子シートの調製と表裏ヘテロ修飾」 第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).
- (11) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「交互積層法による多糖ナノシートの構築とナノ絆創膏としての応用」 第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).
- (12) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合 ADP 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」 第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).
- (13) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」 第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).
- (14) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「重篤な血小板減少モデル動物を用いた H12 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止血能評価」 第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).
- (15) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 福井 慶仁. 「新しいバイオマテリアルとしてのフリースタンディングな高分子ナノシートー血小板代替物からナノ絆創膏までの医用展開ー」 第 56 回高分子討論会 (2007.9., 富山)
- (16) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「止血増幅機能を発現する人工血小板ー血小板凝集をトリガーとして血小板凝集惹起物質を放出するリン脂質小胞体の構築ー」 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).
- (17) 福井 慶仁, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ポリ乳酸ナノシートによる活性化血小板認識評価」 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).

- (18) 岡村 陽介, 武岡 真司, 鈴木 英紀, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-ニリン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」 第30回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).
- (19) 鈴木 英紀, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「トロンビン刺激によるH12結合リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討」 第30回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).
- (20) 第28回日本炎症・再生医学会 Differing effects of cilostazol and aspirin on thrombus formation and microvascular permeability、森川 隆之、梶村 真弓、市川美緒、星野利津子、末松 誠、2007年8月3日 (東京)
- (21) The 8th World Congress for Microcirculation, (Invited speaker) Interactions of multiple-gas transducing systems in the brain. Kajimura M. Ishikawa M., and Suematsu M. 2007年8月16日 (Milwaukee, USA)
- (22) The 80th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society,. Distinct effects of cilostazol and aspirin on thromboembolic reation and microvascular permeability, Morikawa T. Kajimura M., Ichikawa M., Hoshino R., Suematsu M. 2007年12月12日 (Yokohama, Japan).
- (23) Moriki, T., Maruyama, I.N., Yamaguchi, Y., Igari, A., Ikeda, Y., Murata, M. Identification of ADAMTS13 epitopes required for binding to von Willebrand Factor using lambda phage surface display. The American Society of Hematology, the 49th ASH annual meeting and exposition (2007.12., Atlanta).
- (24) 森木 隆典, 丸山 一郎, 池田 康夫, 村田 満. ADAMTS13分子内におけるフォンビルブランド因子結合エピートープ配列. 第30回日本血栓止血学会学術集会. (2007.11., 三重)
- (25) Kamata T., Handa M., Ikeda Y., Aiso S: Separation of the Extracellular Tails Activates α IIb β 3 Integrin. 第59回日本細胞生物学会大会、福岡県福岡市、2007年5月28-30日
- (26) 松本 淳、鎌田徹治、高木淳一、岩崎憲治、 由良 敬 :Elastic Network modelの基準振動解析によるインテグリンの構造変化の解析。第45回日本生物物理学会年会、神奈川県横浜市、2007年12月21-23日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」特願
2007-000296.

分担研究報告書