

Figure 7. Regulatory role of platelet-derived procoagulant activity on the continuous activation of platelet and thrombus growth. Platelets, once they interact with subendothelial matrix such as collagen or von Willebrand factor (VWF)^{48,49} activated to release ADP-containing dense granules. Next, the released ADP stimulates ADP receptors (P2Y₁ and P2Y₁₂). As previously demonstrated, continuous stimulation of P2Y₁₂ results in a cyclic increase in [Ca²⁺]_i, which activates many Ca²⁺-dependent enzymes, such as phospholipid scramblase. Activation of that enzyme increased the expression of procoagulant negatively charged phospholipid, which supports conversion of prothrombin to thrombin on the surface of the activated platelet. Thrombin generated on the surface of activated platelets further activates the platelet through thrombin receptors.

known that the thrombin receptor, a major possible regulator in humans, is a different moiety in mice. Indeed, protease-activated receptor⁴⁰ which is the most important functional receptor of thrombin in humans, is not expressed on mouse platelets²³. Perhaps the main limitations of our blood perfusion model, however, are the differences in the blood flow conditions and the matrix exposed to the blood stream we used from an *in vivo* setting. Moreover, we had to use at least a minimal amount of anticoagulant to maintain blood fluidity during our experiments, which could influence the generation and function of thrombin. Our experiments cannot assess the clinically relevant, low dose of anticoagulant (not only argatroban, but also unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, etc). Moreover, our method is not applicable for assessing the effects of various antiplatelet agents on platelet-derived procoagulant activity because it requires the formation of large-enough platelet thrombi on collagen fibrils, which is inhibited by antiplatelet agents. Our methodology to detect fibrin monomer is not sensitive enough to detect small changes at various shear rates. We are attempting overcome this limitation by improving imaging tool, but could not provide relevant results in the current report.

Despite these limitations, the thrombi that formed on the collagen fibrils in our experimental model, and comprised both activated platelets and fibrin, were basically the same as the pathological arterial thrombi causing myocardial infarction, although the latter contain a larger amount of insoluble fibrin fibrils^{2,3}. Nevertheless, we believe that our main findings give new insights into the key role of activated platelet-derived procoagulant activity in the growth of thrombi. We propose this begins with activation of the platelets accumulating at a site of endothelial injury under blood flow conditions, followed by the appearance of activated-platelet-derived procoagulant activity⁴¹ and the generation of thrombi on the membrane surface of activated platelets, even under arterial flow conditions, which results in both local fibrin fibril formation and in continuous activation of the platelets forming thrombi by repetitive stimulation of thrombin receptors, causing an increase in [Ca²⁺]_i to activate phospholipid scramblase³⁷ and further enhancing platelet-derived procoagulant activity⁴² as well as maintaining

the stability of platelet thrombi for the development of large arterial occlusive thrombi (Figure 7)²⁶. There is an interesting previous publication showing that mice that are deficient in phospholipid scramblase do not express bleeding problems³⁶. In this context, regulation of phospholipid scramblase might be a possible target of antiplatelet agents with least bleeding complications. Further investigation is awaited.

Nonetheless, our experimental results provide little information regarding the mechanism of induction of the platelet-derived procoagulant activity, the details of which are still to be clarified^{43,44}. Previous reports have demonstrated the importance of the surface expression of negatively charged phospholipids, mostly phosphatidylserine⁴⁵ which can be detected by Annexin V binding¹⁵ and its appearance was confirmed in our study in association with activation of the coagulation cascade on the surface of the activated platelets. It is also known that increased [Ca²⁺]_i, which was shown in our study, especially in the presence of low concentrations of thrombin inhibitor (Figure 6), plays certain important roles in the activation of phospholipid scramblase²⁶ resulting in surface exposure of phosphatidylserine⁴⁶. Accordingly, our results showing an increase in the [Ca²⁺]_i of the platelet forming thrombi not only indicate the activated state of the platelets, but also the induction of procoagulant activity resulting in the appearance of the fibrin monomer complex. Indeed, a previous report demonstrated that factor IXa binding to platelet and generation of activated factor Xa was prevented by the putative Ca²⁺ channel-blocker of lanthanum chloride⁴⁷. Unlike *in vivo* animal experiments^{33,48} or atherothrombosis in humans^{2,3,6} our experiments did not include tissue factor originating from the vascular wall or ruptured atheroma. Thus, tissue factor, if it played a role in the generation of fibrin in our experiments, is limited to a blood-borne one⁴⁸. The limitation to our experiments that a small amount of anticoagulant is required makes it impossible to assess whether the lower amount of fibrin fibril formation we observed is because of a lack of vessel-related tissue factor or represents the effects of antithrombin. The fact that we could detect neither soluble tissue factor nor accumulation of tissue-factor-bearing microparticles around the platelet thrombi in our experiments, despite the significant amount of tissue factor detected on the surface of the monocytes

that were eventually incorporated into the thrombi (data not shown), causes us to speculate that the role of tissue factor may not have been important in the initiation of the activation of the coagulation cascade around the platelet thrombi, at least in our flow chamber system. Nevertheless, some investigators have demonstrated the initiation of the coagulation cascade by phospholipids and Factor XI on erythrocytes, even in the absence of tissue factor,⁴⁹ which may be relevant to our present results. In any case, further investigations are required to elucidate the correct mechanism of the initiation of the activation of the coagulation cascade on the surface of the platelet thrombi under blood flow conditions.

In conclusion, in experiments using human blood under artificial blood flow conditions, we have demonstrated, using a 2-color imaging system, the local production of fibrin around the surface of activated platelets (activated platelet-derived procoagulant activity) forming thrombi, even in the presence of specific antithrombin agents in the blood in amounts sufficient to maintain the fluidity of the blood during the experiments. We have shown a positive relationship between the magnitude of the increase in the $[Ca^{2+}]_i$ of the platelets incorporated within thrombi and the amount of fibrin monomer complex generated around them. We have also demonstrated the role of increased $[Ca^{2+}]_i$ of the platelets incorporated within the thrombi in maintaining the stability of the platelet thrombi and, consequently, their 3-D growth. The recognition of these functional links between the activation of the platelets and local activation of the coagulation cascade around them may provide new insight into the crucial role of platelet-derived procoagulant activity in the regulation of arterial thrombus growth. Our results suggest a regulatory role of both the activation of the coagulation cascade on the surface of platelet thrombi and the local generation of thrombin, even under arterial blood flow conditions, not only in the local generation of fibrin fibrils around platelet thrombi but also in maintaining the stability of platelet thrombi and further enhancing procoagulant activity related to the activation of phospholipid scramblase following an increase in the $[Ca^{2+}]_i$ of the platelets forming thrombi. We have thus shown a close functional linkage between the activation of platelets and the coagulation system even under arterial blood flow conditions.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the contribution of the staff of Tokai University Educational and Research Support Center. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research in Japan (15590771, 17590764, 19590871), Tokai University School of Medicine, Project Research 2006, a grant from the Vehicle Racing Commemorative Foundation, a grant for the Leading Project and Next Generation of the Integrated Biological Simulator Developing Program Supported by the Ministry of Education and Science, Sports and Culture, Japan, and a grant for the next-generation supercomputer Research and Development program supported by RIKEN, and a grant for Regulatory Medicine supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, to S.G.

References

- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; **8**: 1227–1234.
- Hoshida Y, Hatakeyama K, Tanabe T, Asada Y, Goto S. Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 114–120.
- Yamashita A, Sumi T, Goto S, Hoshida Y, Nishihira K, Kawamoto R, et al. Detection of von Willebrand factor and tissue factor in platelets-fibrin rich coronary thrombi in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2006; **97**: 26–28.
- Goto S. Understanding the mechanism and prevention of arterial occlusive thrombus formation by anti-platelet agents. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2004; **2**: 149–156.
- Ma YQ, Qin J, Plow EF. Platelet integrin α IIb β 3: Activation mechanisms. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 1345–1352.
- Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1687–1693.
- Gailani D, Renne T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 2507–2513.
- Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002; **8**: 1257–1262.
- Goto S. Propagation of arterial thrombi: Local and remote contributory factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 2207–2208.
- Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; **115**: 3378–3384.
- Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 2131–2137.
- Strukov SM. Role of platelets and serine proteinases in coupling of blood coagulation and inflammation. *Biochemistry (Mosc)* 2004; **69**: 1067–1081.
- Gear AR, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: Linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation* 2003; **10**: 335–350.
- Goto S, Tamura N, Eto K, Ikeda Y, Handa S. Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor (P2Y₁₂) in platelet activation initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP Iba induced by conditions of high shear rate. *Circulation* 2002; **105**: 2531–2536.
- Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Freyssinet JM, Nurden AT. Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: A study using Ca²⁺-ATPase inhibitors. *Biochemistry* 1995; **34**: 11625–11634.
- Tamura N, Yoshida M, Ichikawa N, Handa M, Ikeda Y, Tanabe T, et al. Shear-induced von Willebrand factor-mediated platelet surface translocation of the CD40 ligand. *Thromb Res* 2002; **108**: 311–315.
- Youssef AA, Chang LT, Sheu JJ, Lee FY, Chua S, Yeh KH, et al. Association between circulating level of CD40 ligand and angiographic morphologic features indicating high-burden thrombus formation in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. *Circ J* 2007; **71**: 1857–1861.
- Henn V, Slupsky JR, Graf M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; **391**: 591–594.
- Hagihara M, Higuchi A, Tamura N, Ueda Y, Hirabayashi K, Ikeda Y, et al. Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro. *J Immunol* 2004; **172**: 5297–5303.
- Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996; **88**: 3456–3464.
- Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; **107**: 3537–3545.
- Dorsam RT, Tuluc M, Kunapuli SP. Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 804–812.
- Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; **407**: 258–264.
- Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; **8**: 247–252.
- Goto S, Tamura N, Handa S, Arai M, Kodama K, Takayama H. Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions. *Circulation* 2002; **106**: 266–272.
- Goto S, Tamura N, Ishida H, Ruggeri ZM. Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation through adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 155–162.
- Sakakibara M, Goto S, Eto K, Tamura N, Isshiki T, Handa S. Application of ex vivo flow chamber system for assessment of stent thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 1360–1364.
- Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; **84**: 289–297.
- Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Doppeide SM, Harper IS,

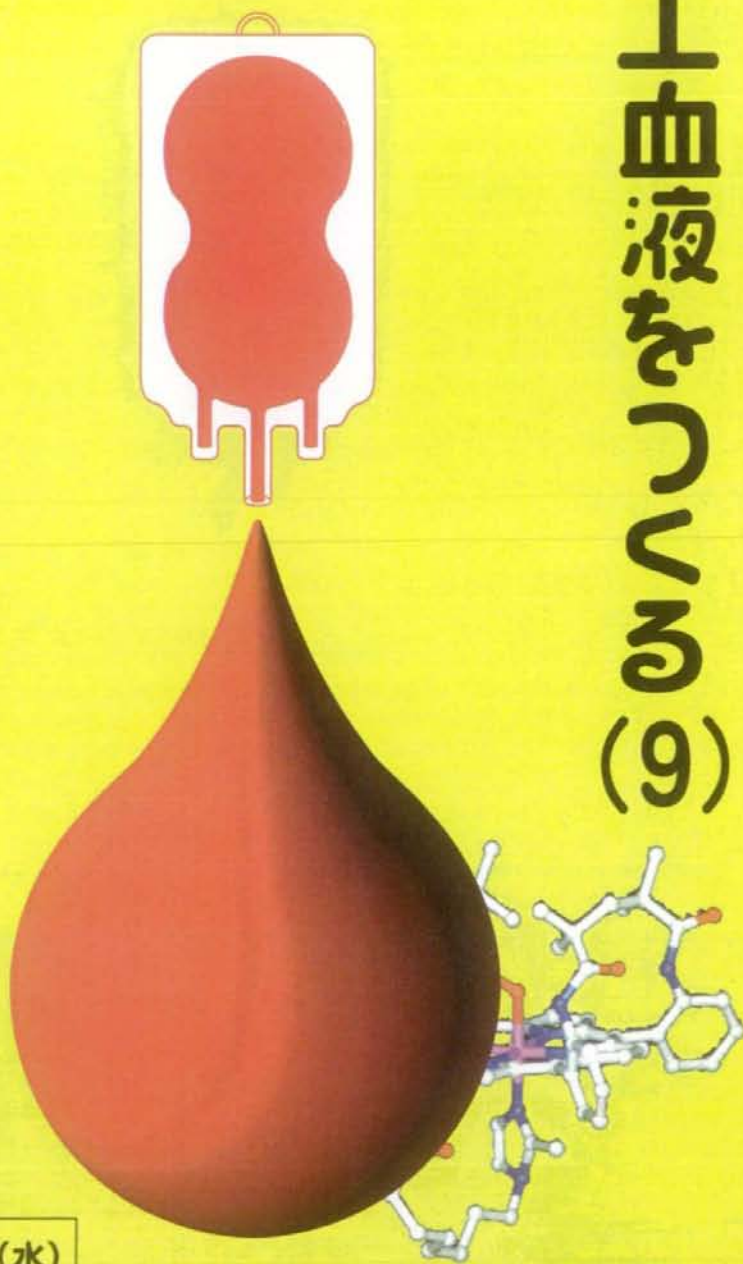
- Jackson SP. Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *J Cell Biol* 2003; **160**: 1151–1161.
30. Goto S, Tamura N, Ishida H. Ability of anti-glycoprotein IIb/IIIa agents to dissolve platelet thrombi formed on a collagen surface under blood flow conditions. *J Am Coll Cardiol* 2004; **44**: 316–323.
 31. Genka C, Ishida H, Ichimori K, Hirota Y, Tanaami T, Nakazawa H. Visualization of biphasic Ca^{2+} diffusion from cytosol to nucleus in contracting adult rat cardiac myocytes with an ultra-fast confocal imaging system. *Cell Calcium* 1999; **25**: 199–208.
 32. Hamano A, Tanaka S, Takeda Y, Umeda M, Sakata Y. A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin for the detection of soluble fibrin in plasma. *Clin Chim Acta* 2002; **318**: 25–32.
 33. Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* 2002; **8**: 1175–1181.
 34. Merritt JE, McCarthy SA, Davies MP, Moores KE. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca^{2+} . *Biochem J* 1990; **269**: 513–519.
 35. Friedman H, Meir S, Rosenberger I, Halevy AH, Kaufman PB, Philosoph-Hadas S. Inhibition of the gravitropic response of snapdragon spikes by the calcium-channel blocker lanthanum chloride. *Plant Physiol* 1998; **118**: 483–492.
 36. Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* 2002; **99**: 4030–4038.
 37. Zhou Q, Zhao J, Stout JG, Luhm RA, Wiedmer T, Sims PJ. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 1997; **272**: 18240–18244.
 38. Goto S. Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; **2**: 23–32.
 39. Goto S, Salomon DR, Ikeda Y, Ruggeri ZM. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23352–23361.
 40. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; **64**: 1057–1068.
 41. Goto S, Tamura N, Li M, Handa M, Ikeda Y, Handa S, et al. Different effects of various anti-GPIIb-IIIa agents on shear-induced platelet activation and expression of procoagulant activity. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 2022–2030.
 42. Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11189–11193.
 43. Bahou WF, Scudder L, Rubenstein D, Jesty J. A shear-restricted pathway of platelet procoagulant activity is regulated by IQGAP1. *J Biol Chem* 2004; **279**: 22571–22577.
 44. Goto S. Factor XIa as a possible new target of antithrombotic therapy. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 1494–1495.
 45. Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 266–275.
 46. Keuren JF, Wielders SJ, Ulrichs H, Hackeng T, Heemskerk JW, Deckmyn H, et al. Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 1499–1505.
 47. London FS, Marcinkiewicz M, Walsh PN. PAR-1-stimulated factor IXa binding to a small platelet subpopulation requires a pronounced and sustained increase of cytoplasmic calcium. *Biochemistry* 2006; **45**: 7289–7298.
 48. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; **197**: 1585–1598.
 49. Iwata H, Kaibara M. Activation of factor IX by erythrocyte membranes causes intrinsic coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; **13**: 489–496.

V. その他

平成20年度厚生労働省科学研究費補助金
政策創薬総合研究推進事業 研究成果等普及啓発事業

平成20年度 研究成果発表会

人工血液をつくる (9)



平成21年2月11日(水)

時間:9:00~17:10

慶應義塾大学信濃町キャンパス

医学情報センター 北里講堂

定員:250名

主催:財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

後援:日本血液代替物学会



発表概要と演者紹介

1 人工血液開発の将来展望

慶應義塾大学 医学部 名誉教授 小林 紘一

生命を維持するために血液は大切な役割を果たしていますが、医工学や応用化学の進歩により血球成分や血漿成分を人工的に作成することが可能になってきました。このうち酸素運搬をつかさどる人工赤血球と出血をコントロールする人工血小板に関しては製造方法もほぼ確立され、安全性や効用についての基礎的な検討も進んでいます。

今後少子高齢化社会を迎える日本では血液の提供者が減少することが危惧され、緊急の事態に備え、人工酸素運搬体や人工血小板の開発は重要であると考えられます。

今年度の人工血液をつくる(9)では人工血液開発の現状と今後の見込みについて報告します。

紹介 こばやし こういち、昭和42年卒、医学博士
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 kobayash@sc.itc.keio.ac.jp

2 人工赤血球の出血性ショックへの応用

慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 准教授 堀之内 宏久

我々の開発している人工赤血球は期限切れの献血血液を廃棄せずに、酸素運搬蛋白であるヘモグロビンを分離精製して脂質で被覆し、250ナノメートルという微小粒子にしたものでヘモグロビン小胞体と呼んでいます。輸血の代わりに使用することを目的に作られました。外傷や疾患、手術などで出血をきたし、血圧が低下した時に使用すると血圧を上昇させ、生存時間を延長、救命することができることが動物を用いた検討で明らかとなりました。

疾患モデルに対して使用した際の全身状態、臓器機能の変化を検討しており、その研究成果について報告いたします。

紹介 ほりのうち ひろひさ、昭和57年卒、医学博士
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 horinouc@sc.itc.keio.ac.jp

3 重症呼吸器疾患における人工血液の役割

慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 助教 泉 陽太郎

当グループでは人工血液の集中治療室における使用に関する基礎的な研究を行っております。集中治療室(英語ではIntensive Care Unit(ICU))とは呼吸、循環、代謝などに関する様々な病気が原因で病状が急に悪化した患者さんの容態を24時間体制で管理し、より効果的な治療を施すことを目的とする病院内の施設です。今回は特に呼吸状態が悪化した場合を想定して行った基礎的実験の一端をご紹介します。

紹介 いずみ ようたろう、平成2年卒、博士(医学)
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 yotarouizumi@a2.keio.jp

4 赤血球構造の生理的意義とヘモグロビン小胞体

早稲田大学 理工学研究所 酸素輸液プロジェクト 准教授 酒井 宏水

両凹円盤状の赤血球は、自身よりも細い毛細管内を、変形しながら流動し、管壁とすれすれの流動によって、ガス交換が促進されると言われている。他方、物理化学的計測から、赤血球は裸のHb溶液に比較して、酸素の吸着と解離は極めて遅く、効率が悪いことがわかっている。なぜ生体は、Hbを血漿の成分とせず、敢えて赤血球の中に封じ込めた複雑な構造を選んだのか。面白いことに、赤血球構造の生理的意義のいくつかは、人工酸素運搬体(ヘモグロビン小胞体)の研究を通して明らかにされてきた。

紹介 さかい ひろみ、平成6年卒、博士(工学)、博士(医学)
〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 hiromi@waseda.jp

5 虚血性脳血管疾患あるいは出血性ショック時の人工酸素運搬体投与の効果について

慶應義塾大学 医学部 神経内科・脳血管予防医学講座 助教 富田 裕

虚血性脳血管疾患あるいは出血性ショックによる脳循環の乏血現象に対する治療法は限られており、後遺障害を可能な限り軽減する目的で、人工酸素運搬体投与の効果を検討しています。血流を途絶させた脳血管においてもわずかな隙間を通して人工酸素運搬体が虚血巣を灌流し脳の機能を維持する可能性が示されつつあります。

紹介

とみた ゆたか、平成5年卒、博士(医学)
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 yutakacnrs@aol.com

6 人工赤血球の体内動態について

熊本大学大学院 医学薬学研究部 薬物動態学 教授 小田切 優樹

我々が開発を進めているヘモグロビン小胞体は脂質膜の中に精製されたヘモグロビン分子が充てんされています。構成成分は蛋白質と脂質であり、それぞれ代謝経路が異なります。アイトープを用いた研究から、ヘモグロビンは肝臓で分解されて尿へ、脂質成分は肝臓で代謝されて糞便中へ排泄されることが明らかとなりました。蓄積性は少なく、正常な代謝経路に組み込まれて体外へ排泄されるので、安全に使用できると考えられています。

紹介

おたぎり まさき、昭和50年卒、薬学博士
〒862-0973 熊本市大江本町5-1 otagirim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

7 人工血液使用時の免疫の変調について

北海道赤十字血液センター 研究部長 東 寛

血液を輸血すると、受血者の免疫応答が何らかの変調をきたすことが指摘されている。人工血液を輸血しても同様に生体の免疫反応に変調をきたす可能性がある。このことを調べるために、ラットに人工赤血球を投与したのちに、免疫応答が行われる臓器の一つである脾臓をとりだし、その細胞の免疫応答の変化を詳細に検討した。その結果、ラットに人工赤血球を投与すると脾細胞の免疫応答能が一時的に低下することが示唆されました。

紹介

あずま ひろし、昭和55年卒、医学博士
〒063-0002 北海道札幌市西区山の手2-2 azuma@hokkaido.bc.jrc.or.jp

8 遺伝子組換え人血清アルブミン製剤の誕生から承認まで

田辺三菱製薬株式会社 研究本部 先端医療研究所 先端医療研究部 精製工学グループ グループマネージャー 大谷 渡

2007年10月に世界初の治療用遺伝子組換え人血清アルブミン(rHSA)製剤が、日本で承認された。弊社がrHSA製剤の研究開発に着手したのは1981年からであるが、当時は微量投与の遺伝子組換え医薬品が初めて登場した時代であり、大量投与製剤となるrHSA製剤を開発することは夢物語であった。その夢を実現するために多くの困難な技術的ハードルを次々に克服し、世界で初めてその開発に成功した。その経緯について紹介する。

紹介

おたに わたる、昭和59年卒、薬学博士
〒532-8505 大阪市淀川区加島3-16-89 Otani,Wataru@md.mt-pharma.co.jp

9 人工血小板の開発現状

慶應義塾大学 医学部 輸血細胞療法部 教授 半田 誠

血小板は人の血管が破たんした際に修復に働く血球成分の一つです。大きさは大変小さい[2ミクロン程度]なのですが、循環系の恒常性の維持にはなくてはならない構成成分です。血液の疾患などで、血小板が極端に減ったり、機能不全が起きたりした際には血小板輸血を行います。保存期間が短く厳密な管理が必要な血小板輸血に代わっていつでもどこでも使える血小板代替物を開発しています。生理的な刺激成分を含み、特殊なペプチドでリポソーム表面を修飾した物質で、血小板減少症での機能補助に有効である結果が得られています。

紹介

はんだ まこと、昭和51年卒、博士(医学)
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 mhanda@sc.itc.keio.ac.jp



プログラム

総司会	慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 准教授	堀之内宏久
10:10~10:20	「御挨拶」 厚生労働省 医政局 研究開発振興課	
10:20~10:30	「御挨拶」 日本赤十字社 輸血事業本部 経営会議委員、 中央血液研究所 所長	田所 憲治
座 長	川崎医科大学 名誉教授、 東宝塚さとう病院 名誉院長	高折 益彦
10:30~10:50	「人工血液開発の将来展望」 (演者) 慶應義塾大学 医学部 名誉教授	小林 絃一
10:50~11:20	「人工赤血球の出血性ショックへの応用」 (演者) 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科	堀之内宏久
11:20~11:50	「重症呼吸器疾患における人工血液の役割」 (演者) 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科	泉 陽太郎
11:50~12:50	昼休み	
座 長	慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 准教授	堀之内宏久
12:50~13:20	「赤血球構造の生理的意義とヘモグロビン小胞体」 (演者) 早稲田大学 理工学術院 理工学研究所	酒井 宏水
13:20~13:50	「虚血性脳血管疾患あるいは出血性ショック時の 人工酸素運搬体投与の効果について」 (演者) 慶應義塾大学 医学部 神経内科	富田 裕
座 長	慶應義塾大学 医学部 名誉教授	小林 絃一
13:50~14:20	「人工赤血球の体内動態について」 (演者) 熊本大学大学院 医学薬学研究部 薬物動態学	小田切優樹
14:20~14:50	「人工血液使用時の免疫の変調について」 (演者) 北海道赤十字血液センター 研究部	東 寛
14:50~15:00	休憩	
座 長	早稲田大学 理工学術院 理工学研究所 准教授	酒井 宏水
15:00~15:30	「遺伝子組換え人血清アルブミン製剤の誕生から承認まで」 (演者) 田辺三菱製薬株式会社 研究本部 先端医療研究所 先端医療研究部 精製工学グループ	大谷 渡
15:30~16:00	「人工血小板の開発現状」 (演者) 慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法部	半田 誠
16:00~16:10	「閉会のご挨拶」 慶應義塾大学 医学部 血液内科 教授	池田 康夫

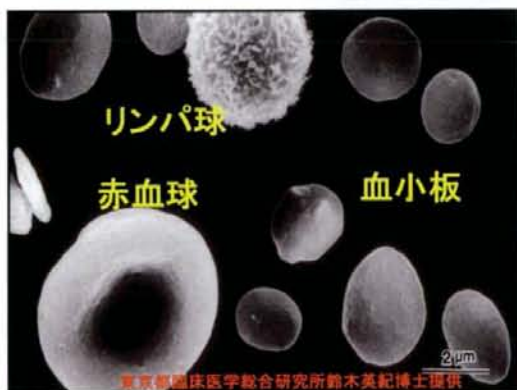
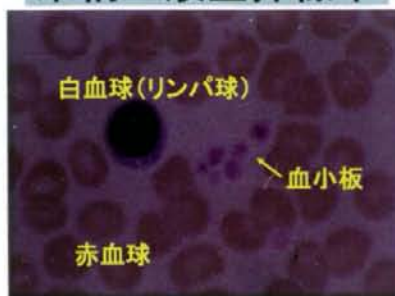
人工血液をつくる(9)

人工血小板の開発現状

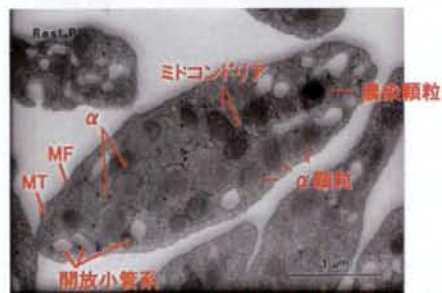
慶應義塾大学 血液・細胞療法部 平田誠

- 背景と開発経緯
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 将来展望

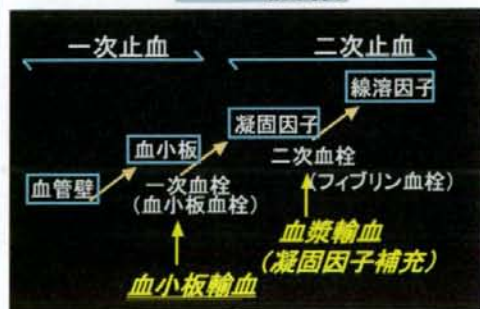
末梢血液塗抹標本



静止血小板の透過型電子顕微鏡像



止血機構



血小板減少による皮下出血

血小板数: $5,000/\mu\text{l}$



血小板輸血



濃厚血小板



出血治療
出血予防

輸血用血小板製剤の問題点

- 1) 保存期間、保存条件（緊急対応不可）
短い：4日間、厳重：室温・振盪、予約制
- 2) 輸血感染症
細菌感染：要スクリーニング（欧米）
- 3) 急性副反応
アレルギー・アナフィラキシー反応など
- 4) 輸血不応
抗HLA同種抗体、抗HPA同種抗体
- 5) コスト
濃厚血小板10U：¥ 76,812
（赤血球濃厚液2U：¥ 16,338）

血小板製剤：室温、震盪



人工血小板の利点

- 1) 緊急時の輸血対応が容易
- 2) 輸血感染症のリスクがない
- 3) 安定した血液行政が可能

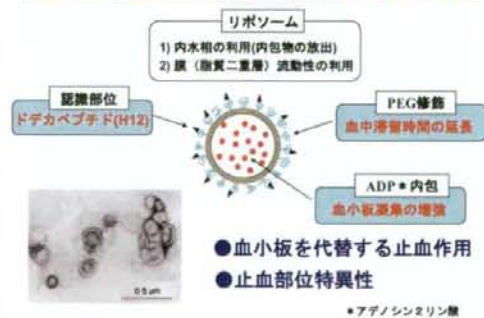
我々の人工血小板

設計戦略：

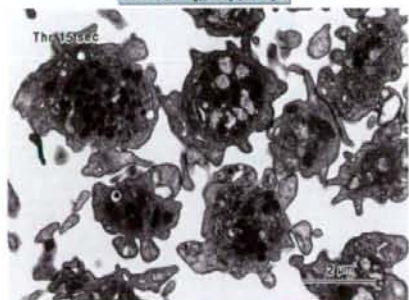
- #1 認識分子：血小板接着受容体とリガ
- #2 担体：アルブミン重合体、リポソーム
- #3 材料：遺伝子組換え体、合成物質（ヒト由来産物は使用せず）

完全な人工産物

人工血小板プロトタイプの絞込み

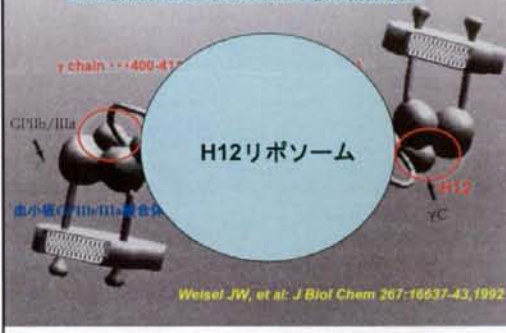


血小板凝集



東京都臨床医学総合研究所鈴木英紀博士提供

血小板凝集：フィブリノゲンと血小板の結合部位

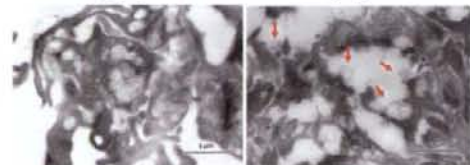


トロンピン刺激血小板とH12リボソームの相互反応、形態的観察



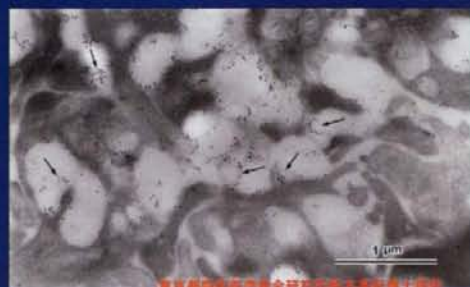
リボソーム

H12 リボソーム



東京都臨床医学総合研究所鈴木英紀博士提供

免疫電顕法による凝集時のH12リボソームの分布

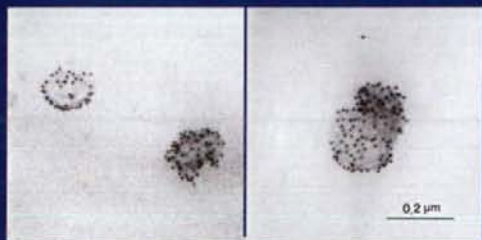


東京都臨床医学総合研究所鈴木英紀博士提供

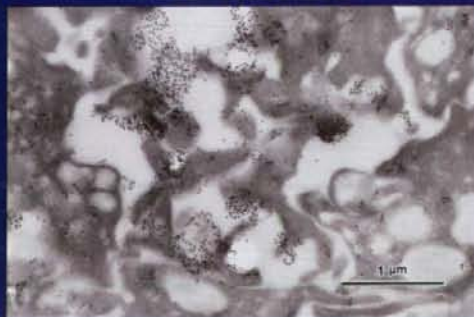
室温または60°Cで造粒したDPPCの凍結超薄切片像 (ウサギ抗H12抗体による免疫染色)

室温造粒DPPC

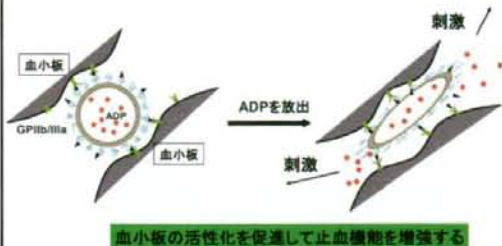
60°C造粒DPPC



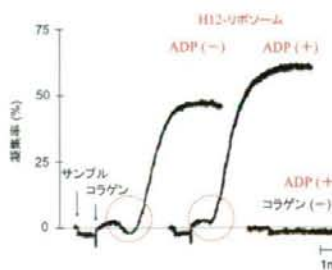
PRPのADP凝集 5分時の単層DPPCの分布 (ウサギ抗H12抗体による免疫染色)



H12-(ADP)リポソームの in vivo止血能評価



H12(ADP)リポソームの血小板凝集促進効果



人工血液をつくる (8)

臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価

慶應義塾大学輸血・細胞療法部 平田 誠

- 我々のプロトタイプ人工血小板
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 展望

H12-(ADP)リポソームの止血機能： 血小板減少ウサギでの検討

- (1) 耳介出血時間の短縮
- (2) 腹部術創出血量の減少

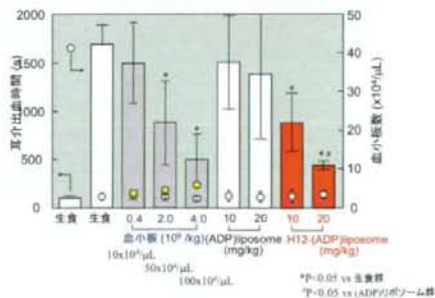
血小板減少ラビットを用いた 出血時間測定法

- ①採血
 - ②H12(ADP)V (23 G翼状針, 0.5 mL/min, 4 mL/kg)
 - ③メス (耳, 6 mm 長さ)
 - ④測定(生理食塩水中に浸す)
 - ⑤採血
- Time (min)
- 30 0



止血までの時間を計測

H12-(ADP)リポソームの止血効果 血小板減少ウサギの出血時間



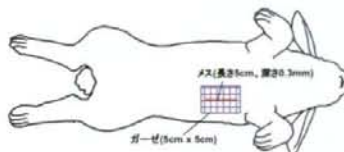
H12-(ADP)リポソームの止血機能: 血小板減少ウサギでの検討

- (1) 耳介出血時間の短縮
- (2) 腹部術創出血量の減少

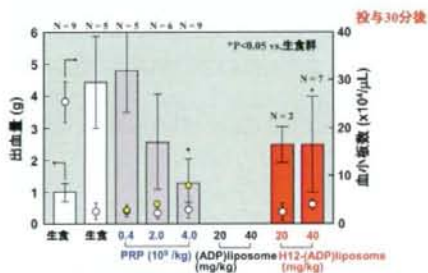
腹部手術モデルを用いたH12-(ADP)リポソームの止血効果

出血量(blood loss)の測定法

- 1) 前腹壁(anterior abdominal wall)に、切創(長さ5 cm, 深さ0.3 cm)する。
- 2) あらかじめ重量を測定したガーゼ(5 x 5 cm)を傷口に置き、5分間血液を吸収させる。
- 3) ガーゼの重量測定(出血量)



腹部手術モデルを用いたH12-(ADP)リポソームの止血効果



H12-(ADP)リポソームの止血効果 血小板と比較

ウサギ

ヒト

血小板

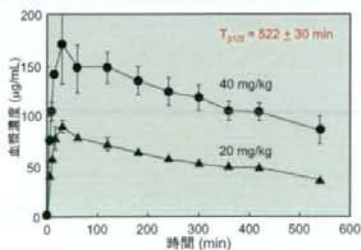
2-3 μm 4.0×10^9 個/kg \rightarrow 4.0×10^9 個/kg
 $(8.2 \times 10^{10} \mu\text{m}^3 / \text{kg})$ (10単位、 2.0×10^{11} 個 \leq)
 4.0×10^4 個/μlの増加 4.0×10^4 個/μlの増加

H12(ADP)リポソーム

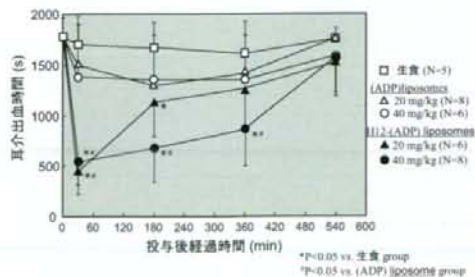
250-80 nm 2.0×10^{13} 個/kg \rightarrow 血小板に匹敵する止血効果が期待される
 $(4.1 \times 10^{11} \mu\text{m}^3 / \text{kg})$

H12(ADP)リポソームの血中濃度推移 (N=3) 正常ウサギ

H12(ADP)リポソーム (DWC₅₀: 20.40 mg/kg) \rightarrow 採血 (200 μL) \rightarrow centrifugation (12000rpm, 5 min) \rightarrow 上清を希釈後 (1% C₁₂E₆) \rightarrow Fluorescent Intensity (E: 466 nm, E_s: 510 nm)



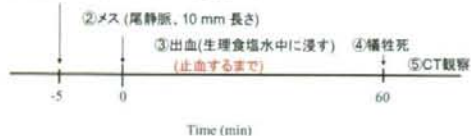
H12-(ADP)リポソームの止血能持続効果



CT観察の流れ

動物: Wistar雄性ラット (250-300 g)

① H12-(iopamidol)小胞体 (130 mg/kg, i.v.)



H12- (iopamidol)リボソームの出血部位への特異的集積

ラット尾切創 縦断面 横断面 3次元イメージ



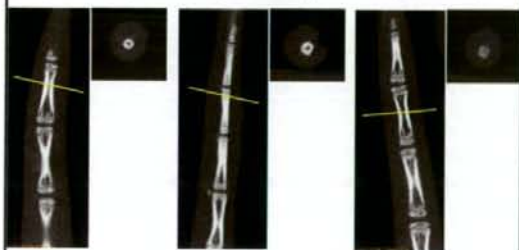
H12- (iopamidol)リボソームの出血部位への特異的集積

(対照試験)

生食

造影剤

(造影剤)リボソーム



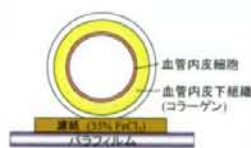
H12- (ADP)リボソームの止血部位集積性

- ラット尾静脈切創の出血部位
- ラット頸静脈の塩化鉄傷害血栓部位

塩化鉄傷害血栓モデル

Kutz, K.D. *et al. Thrombo. Res.* 60, 269-280 (1990)

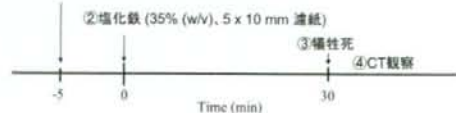
- 動物: SD rat
- 薬剤: 35%塩化鉄 (FeCl_3)を濾紙に浸し、経時的に血栓形成過程を観察
- 麻酔: ネブタールを筋注



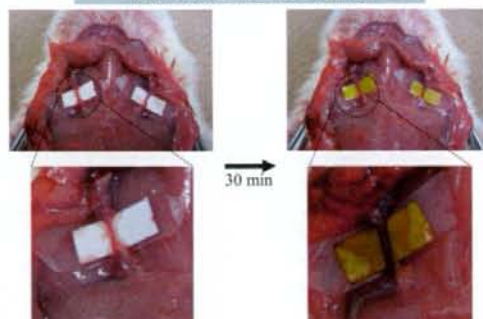
CT観察の流れ

動物: Wistar雄性ラット (250-300 g)

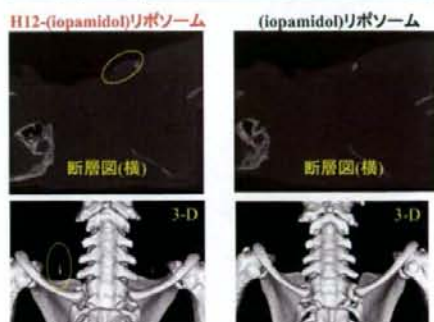
① H12-(iopamidol)小胞体 (130 mg/kg, i.v.)



塩化鉄傷害前後の頸静脈



H12- (iopamidol)リポソームの出血部位への特異的集積



人工血液をつくる (8)

臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価

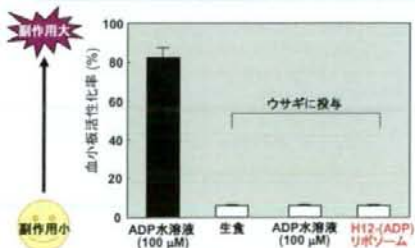
慶應義塾大学 輸血・細胞療法部 平田 誠

- 我々のプロトタイプ人工血小板
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 展望

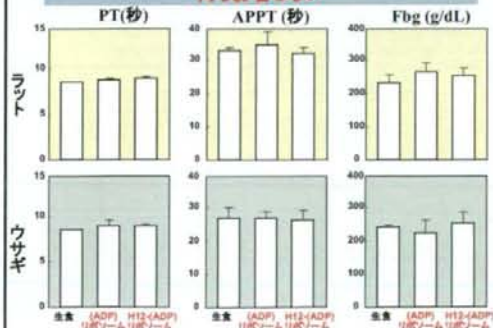
H12- (ADP)リポソームの安全性

- (1) 流血中で血小板を刺激するか否か
- (2) 凝固系を刺激するか否か

H12-(ADP)リポソームは通常血流中では、正常血小板を活性化させない (in vivo実験)



H12-(ADP)リポソームは血液凝固系には何ら影響しない



人工血液をつくる(8)

臨床応用可能な人工血小板の性能と安全性の評価

慶應義塾大学 血液・細胞療法部 平田 誠

- 我々のプロトタイプ人工血小板
- 人工血小板の性能
- 人工血小板の安全性
- 展望

現在までの研究成果

Biomacromolecules 2:1192-1197 (2001), Biochem Biophys Res Commun 296:765-770 (2002), ibid 306:256-260 (2003), ibid 312:773-779 (2003), Transfusion 45: 1221-1228 (2005), Transfusion 47: 1254-1262 (2007).

- 血小板輸血に匹敵する止血効果(血小板減少動物)を示す人工微粒子(人工血小板: H12-(ADP)リポソーム)が創製された。
- 人工血小板は十分な血中滞留性を保持し、生体内での血小板の活性化や血液凝固系への影響は認められなかった。

人工血小板の条件

- 1) 血小板機能をすべて兼ね備える必要は無いが、止血に必要な最小限の機能を有し、残存血小板機能を補強、増幅し得る。
- 2) 血流中で血栓を形成しない。
- 3) 正常血小板の産生を抑制しない。
- 4) その他: 長期保存可能で常時使用可能
反復投与が可能
副作用がない
低コストである

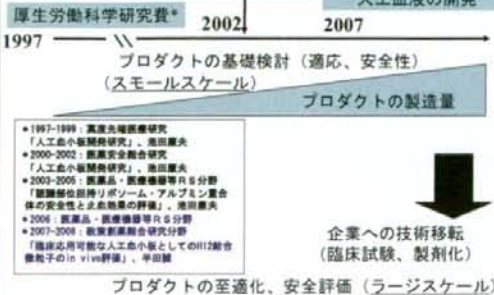
これからの課題

- 止血機能の最適化
 - 出血時間以外の動物評価系の確立
 - 血中滞留時間の延長
- 安全性の評価
 - 血栓性(病的血栓誘発)
 - 抗原性(単回投与と反復投与)

人工血小板/血小板代替物の開発

血液法制定: 人工血液開発促進

イノベーション25
人工血液の開発



平成19年度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

- (主任研究者) 平田 誠(慶應義塾大学医学部)
 (分担研究者) 池田康夫(慶應義塾大学医学部)
 武岡真司(早稲田大学理工学部)
 梶村真弓(慶應義塾大学医学部)
 後藤信敏(東海大学医学部)
 鈴木英紀(東京都臨床医学総合研究所)
 村田 満(慶應義塾大学医学部)
 (研究協力者) 岡村隆介(早稲田大学理工学部)