

我々は、ラテックスビーズの代わりに生体適合性を持つアルブミン重合体や小胞体を用いて、これらの表面にH12を結合させることで、フィブリノーゲンを結合させた場合と同様の血小板凝集促進機能を発現することも確認している^{29,30}。抗がん剤であるブスルファンをWister系雄性ラットに20 mg/kgを2回に分けて投与すると、その副作用によって、投与10日後に血小板数のみが正常の5分の1まで再現性よく減少する。血小板減少症モデルラットの尾先端から1 cmの箇所をクイックヒール[®]にて切傷した後、生理食塩水に浸し、出血が止まるまでの時間(出血時間)を測定したところ、再現性の良い出血時間が 608 ± 152 秒(正常ラット 178 ± 56 秒)が得られた。5分前に予めH12結合アルブミン重合体を投与してから出血時間を測定すると、出血時間が投与量依存的に有意に短縮された(Fig. 7)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、その末端の一部にH12を結合した系では、投与3時間後でもその止血効果が持続することも確認できている。また、ナノ粒を小胞体に置き換えても、同様の止血効果が得られている(Fig. 7)³¹。しかし、この両者を同一粒子数を投与した群同士と比較した場合、アルブミン重合体の方がその効果は勝っているようである。これは、アルブミン重合体は内部が充填されているため、出血部位の充填効果が高いと推測される。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はずであり、現在そのような知見も得られつつある(未発表データ)。

6. 将来展望と今後の課題

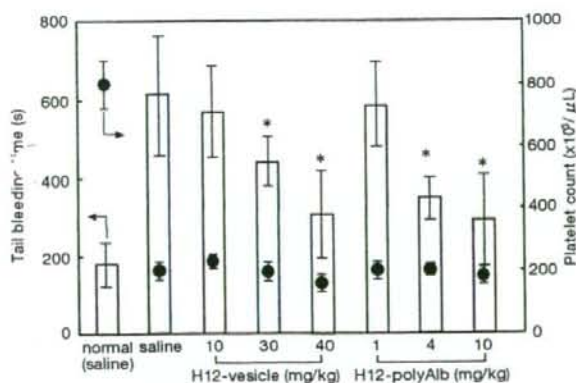


Fig. 7. Effects of the administration of phospholipid vesicles and polymerized albumin particles carrying H12 on tail bleeding time (white columns). The administered amount of phospholipid vesicles carrying H12 were 10, 30, 40 mg/kg equivalent of lipid. The administered amount of polymerized albumin particles carrying H12 were 1, 4, 10 mg/kg equivalent of rHSA concentration. ●: platelet counts in the rats (N = 6-10). *P < 0.05 for H12-vesicles or H12-polyAlb group vs. saline group.

血小板代替物の研究開発を期待するニーズが高いにも関わらず、国際的にも限られた研究グループで研究が細々と進められているだけである。しかし、我々のグループでは、既に述べてきたように、血小板減少動物モデルを用いた止血効果に関する知見も集積されつつあり、我々の血小板代替物の設計方針が妥当であると信じている。今後は、より大型動物を用いた止血能評価やそれら微粒子における安全性試験、具体的には、投与前後における血液生化学試験、特に過剰な血栓形成や凝固系の活性化亢進の有無に関する血液凝固試験を行う予定である。更には、ナノ粒子を巻込んだ止血後の血栓の線溶系に及ぼす影響、反復投与に対する代謝系、細網内皮系、免疫系に及ぼす影響や抗原性の検討を詳細に行い、認識部位や担体の安全性に関する知見を得てゆく計画である。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、同時に遺伝子組換え蛋白質の大量製造や担体の製剤化技術の飛躍が期待できるため、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、これらの成果がDrug Delivery Systemの基盤技術の発展にも貢献することにもなる。

7. 謝辞

H12あるいはRGDの機能評価法に関して御指導、御討論頂きました。慶応義塾大学医学部中央検査部教授 村田 満博士ならびに慶応義塾大学医学部血液内科 横山 健次博士に心から御礼申し上げます。本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)、早稲田大学21COEプログラム「実践的ナノ化学 教育研究拠点」、SCOEF「先端科学と健康医療の融合研究拠点の形成」および日本学術振興会科学研究費(17-0429)の助成より行われた。記して謝意を表する。

8. 文献

1. 日本赤十字社ホームページ <http://www.jrc.or.jp/active/blood/index.html>.
2. 村田 満. 人工血小板(血小板代替物)血液・免疫・腫瘍 2001;6:35-9.
3. 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* 1991;87:1234-40.
4. Santro SA, Zutter MM. The $\alpha 2\beta 1$ integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Hemost* 1995;74:813-21.
5. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 2004;114:221-33.
6. Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002;110:599-611.
7. Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS. Human platelets

- possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem* 1979;254:5357-63.
8. Collier BS. Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen: defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia. *Blood* 1980;55:169-78.
 9. Agam G, Livne AA. Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992;22:105-12.
 10. Collier BS, Springer KT, Beer JH et al. Thromboerythrocyte. In vitro studies of potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 1992;89:546-55.
 11. Levi M, Friderich P, Ten CW et al. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-11.
 12. Chao F, Reddick RL, Bode AR et al. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* 1996;36:536-42.
 13. Bangham AD, Standish MM, Watkins J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238-52.
 14. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990;268:235-7.
 15. Alder-Moore J, Poffitt RT. AmBiosome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:21-30.
 16. Maruyama K. In vivo targeting by liposome. *Biol Pharm Bull* 2000;23:791-9.
 17. Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Bioscience Reports* 2002;22:251-66.
 18. 武岡真司. 人工血液 (人工赤血球) の開発動向. *日本医師会雑誌* 2004;131:907-10. Sakai H, Tomiyama K, Sou K et al. Poly (ethylene glycol) -conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem* 2000;11:425-32.
 19. Gupta PK, Hung CT. Albumin microspheres. I: Physico-chemical characteristics. *J Microencapsulation* 1989;6:427-62.
 20. Kobayashi K, Nakamura N, Sumi A et al. The development of human serum albumin. *Ther Apher* 1998;2:257-62.
 21. Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H et al. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Iba to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000;1:290-5.
 22. Murata M, Ware J, Ruggeri ZM. Site-directed mutagenesis of a soluble recombinant fragment of platelet glycoprotein Iba demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem* 1991;266:15474-80.
 23. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y et al. Rolling properties of rGPIIb-conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:765-70.
 24. Nishiya T, Murata M, Handa M et al. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Iba to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:755-60.
 25. Nishiya T, Kainoh M, Murata M et al. Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia-IIa and Iba₂ under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2002;100:136-42.
 26. Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S et al. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:256-60.
 27. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y et al. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001;2:1192-7.
 28. Wertheimer E, Shapiro B, Fodor-Salomonowicz I. Stability of fibrinogen in normal and pathological plasma. *Brit J Exp Pathol* 1944 ;25:121-5.
 29. Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y et al. Fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:773-9.
 30. 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* 2005;45:1221-8.
 31. Okamura Y, Maekawa I, Teramura Y et al. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide in vitro and in vivo. *Bioconjugate Chem* 2005;16:1589-96.

血小板代替物の開発

Development of Platelet Substitutes

武岡真司^{*1} 岡村陽介^{*2}

血小板は、血液凝固系と連動した巧妙かつ複雑な止血機構を有しており、これらすべてを模倣した人工系の構築は不可能といっても過言ではない。筆者らは、血小板が出血部位を認識して粘着、凝集する機構に関与する分子に着目し、これらの分子を表面に担持させた微粒子を出血部位へ特異的に集積させることにより、出血部位を充填する効果が期待できるとの極めて単純な発想から、慶應義塾大学医学部・池田康夫教授グループの指導を受けながら研究を進めてきた。具体的には、生体投与可能な微粒子（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））を構築し、認識部位の候補として血小板膜糖蛋白質の一部の遺伝子組換え体（rGPIb α , rGPIa/IIa）やフィブリノーゲン γ 鎖C末端アミノ酸配列（HHLGGAKQAGDV；H12）を微粒子表面に結合させて、*in vitro*, *in vivo*にて止血能を評価し、その可能性が具体的に見えてきた。

1. はじめに

医療の目覚ましい進歩に伴い、がん・造血管腫瘍などの化学治療や放射線治療が年々増大する一方、その副作用によって血小板減少患者が増大しているのが現状である。血小板輸血は、化学治療や放射線治療や、外科手術において不可欠な補助治療法として非常に重要な位置を占めており、その供給量は年々増加し続け、平成11年以降は一定推移を保っている¹⁾。しかし、血小板製剤の保存期間は室温で72時間と非常に短いため、供給不足に加えて緊急時の供給体制は整っていない。さらには、核酸増幅検査（NAT）の導入により血液製剤の安全性は著しく向上したものの、未だにウ

イルス感染などのリスクは完全には払拭されていない。不必要な輸血をなるべく行わない様にする努力がなされているものの、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得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²⁾。

2. 止血のメカニズムと血小板代替物の設計

止血の初期段階は、血管損傷部位に露出している血管内皮下組織への血小板の粘着と凝集である。血小板の膜表面には、コラーゲンなどの血管内皮下組織やそこに結合したフォンビレブランド因子（VWF）を認識する受容体蛋白質があり、これ

^{*1}Shinji Takeoka 早稲田大学 理工学術院 応用化学科 教授

^{*2}Yosuke Okamura 日本学術振興会特別研究員；早稲田大学 理工学総合研究センター 客員研究員

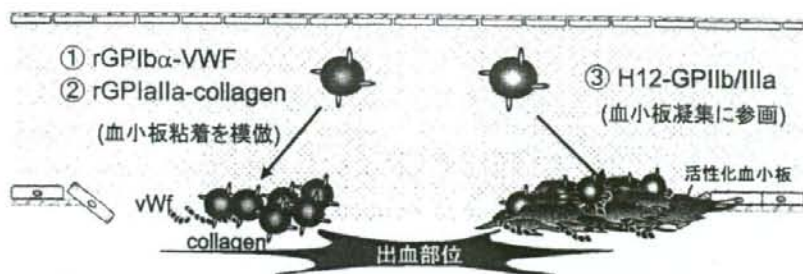


図1 血小板代替物の概念図

らの相互作用により接着や粘着がおこる。具体的には、高血流条件下では、血小板膜糖蛋白質 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³⁾。続いて、低血流状態でコラーゲンの受容体蛋白質である GPIIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ インテグリン) や GPVI がコラーゲンと直接結合して強固な粘着が起こる^{4, 5)}。接着、粘着の刺激が細胞内に伝わり、複雑なシグナル伝達機構を経て血小板膜糖蛋白質 GP II b/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリン) の高次構造が変化し (活性化)、血漿蛋白質である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⁶⁾。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易い形態となり、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アデノシン 5'-二リン酸 (ADP), Ca^{2+} , セロトニンが放出される。次に、 α 顆粒がフィブリノーゲン、フィブロンectin, VWF, P-セレクトリンなどを放出、同時にこれらの受容体蛋白質を血小板表面に発現し、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、ここまで一次止血) を促す⁷⁾。最後に強力な凝固系因子であるトロンボキサン A_2 の放出や血小板表面が凝固系の活性に必要な場 (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、血小板の接着、

粘着、凝集、変形や顆粒の放出など、非常に巧妙に制御された多段階の反応がダイナミックに連動しているため、この機能を全て模倣した人工系の構築は不可能といつてよい。そこで、慶應義塾大学医学部・池田康夫教授、慶應義塾大学医学部輸血細胞療法部・半田誠助教授の研究グループでは、血小板が出血部位を認識して粘着、凝集する分子機構に着目し、血管損傷部位や血小板表面を認識できる分子を微粒子表面に担持できれば、出血部位へ特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積した微粒子が出血部位を充填する効果が期待できるとの発想から、極めて単純な血小板代替物の設計に結びつけ、筆者らと共同研究を進めてきた (図1)。

3. 血小板代替物の研究動向

血小板代替物は、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 B. S. Coller ら⁸⁾ 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⁹⁾ やその一部のアミノ酸配列 RGD¹⁰⁾ 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事例となった。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) が血小板減少ラビットの出血時間を短縮した例¹¹⁾ 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、M. Levi ら¹²⁾

により、フィブリノーゲンを吸着させた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。

他方、わが国における血小板代替物の開発は、生体投与可能な遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) の重合体やリン脂質小胞体 (リポソーム) を微粒子として利用し、出血部位を認識させるために血小板膜糖蛋白質の一部の遺伝子組換え蛋白質 (rGPIb α , rGPIa/IIa) やフィブリノーゲン γ 鎖C末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV; H12) 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。

4. 微粒子の製造方法

ヒト血清アルブミンは血漿蛋白質の中で最も多い (5 g/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、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、既に1950年代から静注用製剤として臨床使用 (血管造影剤、超音波診断用増感剤、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粒子は、高温や有機溶媒による不可逆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¹³⁾。筆者らは、①遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA)¹⁴⁾ を単量体として rHSA をジスルフィド結合にて

重合させる方法を用いて、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であるため、得られた粒子の表面を親水性であり、④アルブミン変性がほとんどない重合体を得る方法として確立している¹⁵⁾。アルブミン重合体は内部が充填された無定形なボタン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 (写真1(a))。

他方、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) が構築される¹⁶⁾。これを孔径の異なるメンブレンに順次透過させると、粒子径と層数の制御と同時に様々な水溶性物質を内包できる。また、小胞体にしてから表面に認識部位を担持させることもできる (写真1(b))。薬物運搬体として小胞体には以下に挙げる長所がある。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水溶性高分子を封入できる、③粒径や脂質組成や表面修飾などにより血中滞留時間や体内動態を調節できる¹⁷⁾、④小胞体表面へ種々の蛋白質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^{18~20)}。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持ち²¹⁾、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²²⁾。

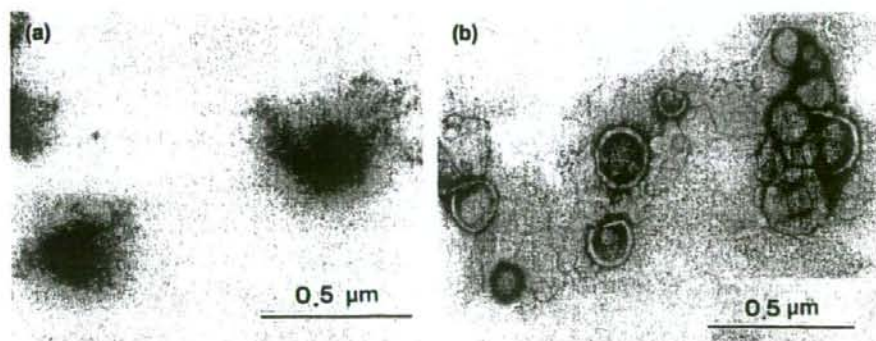


写真1 (a)アルブミン重合体と(b)リン脂質小胞体の透過型電子顕微鏡像

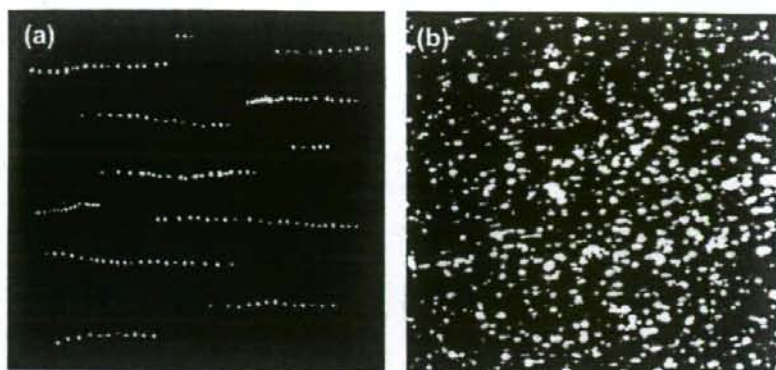


写真2 (a)rGPIIb/IIIa結合小胞体と(b)rGPIIb/IIIa結合アルブミン重合体のVWF基板に対する接着挙動
(ずり速度; $2,400\text{s}^{-1}$, 1/6秒ごと3秒間, 計15枚のフレームを積算)

5. 血小板代替物の機能評価

小胞体表面に rGPIIb/IIIa²³⁾ を結合させると, 血小板の接着現象が再現できる。高血流条件下での血小板による止血は, コラーゲンに結合した VWF を血小板表面の GPIIb/IIIa が認識して血小板が接着することから始まる。実際, *in vitro* 観測にて抗 GP II b/III a 抗体を添加して GP II b/III a 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観察される。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 (写真2(a)²⁴⁾。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²⁰⁾, 粒子径, rGPIIb/IIIa の表面結合密度を統一して柔軟性のみ異なる小胞体を比較した。“柔らかい”小胞体ではローリング速度は低下し, “硬い”小胞体では上昇した。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る。ところが, アルブミン重合体 VWF では表面をローリングせず粘着する (写真2(b))。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, 微粒子にローリングする性質を持たせるには流動性のある膜構造を持つことが必要条件と思われた。現在, 微粒子の異な

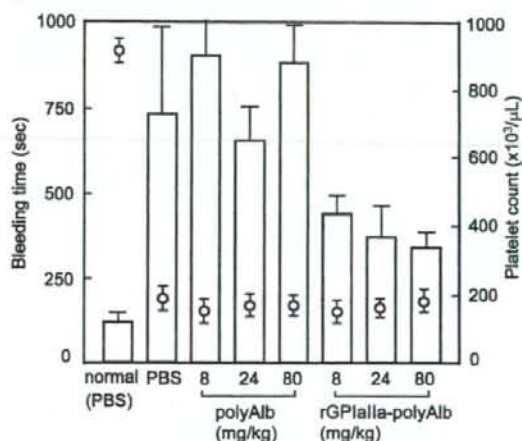


図2 rGPIIa/IIa 結合アルブミン重合体の投与による血小板減少モデルマウスの出血時間短縮効果 (○: マウスの血小板数)

る性質が及ぼす止血能評価を検討している。

rGPIIa/IIa を結合させた小胞体では, 低ずり速度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明らかにされた²⁵⁾。ずり速度の増大と共に粘着数は減少するが, rGPIIb/IIIa と rGPIIa/IIa 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²⁶⁾。筆者らは, GPIIa/IIa 担持アルブミン重合体でも同様の性質を有することを確認した。これを X 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、コントロール群の出血時間(730±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±46秒)(図2)²⁷⁾。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積する微粒子系を構築することができている。

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補助剤として期待できる²⁸⁾。実際、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フィブリノーゲン結合アルブミン重合体を添加すると、添加量の増大と共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を増強する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4°Cで保存すると凝集する非常に扱いにくい蛋白質であり²⁹⁾、水溶液中では速やかに失活する²⁸⁾。

筆者らは、活性化したGP IIb/IIIaとの結合サイトであるフィブリノーゲンのγ鎖C末端アミノ酸配列(H12)を担体に結合させた微粒子(アルブミン重合体、小胞体)を構築し、フィブリノー

ゲンを結合させたときと同様の機能を発現することを見出した³⁰⁻³²⁾。

抗がん剤であるブスルファンをWister系雄性ラットに20mg/kgを2回に分けて投与すると、その副作用によって、投与後10日後に血小板数のみが1/5まで再現性良く低下する。血小板減少症モデルラットの尾の先端から1cmの箇所をクイックヒール®にて切傷した後、生理食塩水に浸して出血が止まるまでの時間(出血時間)を測定したところ、再現性の良い出血時間が608±152秒(正常ラット178±56秒)が得られる。5分前に予めH12結合アルブミン重合体を投与してから出血時間を測定すると、出血時間が投与量依存的に有意に短縮された(図3)³¹⁾。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、その末端の一部にH12を結合した系では、投与3時間後でもその止血効果が持続することを明らかにしている。また、微粒子を小胞体に置き換えても、同様の止血効果が得られている(図3)³²⁾。しかし、この両者を同一粒子数にて投与した群同士で比較した場合、アルブミン重合体の方がその効果は勝っているようである。これは、アルブミン重合体は内部が充填されてい

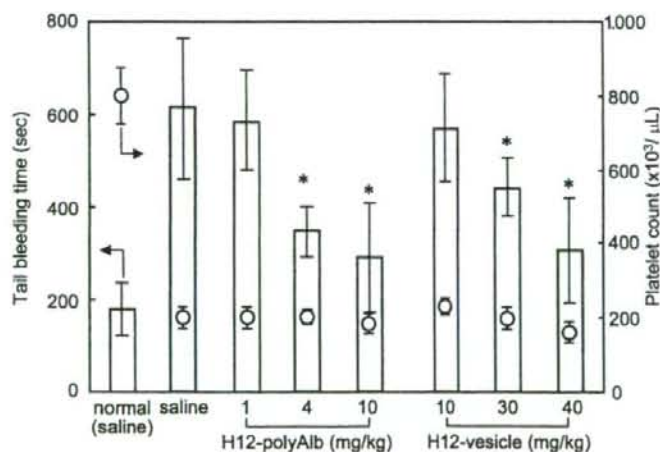


図3 H12結合アルブミン重合体あるいは小胞体の投与による血小板減少モデルラットの出血時間短縮効果 (○:ラットの血小板数, *P<0.05: H12結合アルブミン重合体群あるいは小胞体群 vs. 生理食塩水群)

るため、出血部位での充填効果が高いためと推測される。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はずであり、現在そのような効果も得られつつある（未発表データ）。

6. 今後の展開と課題

血小板代替物の研究は国内外共に浅く、まだ緒に就いたばかりであるが、血小板減少動物モデル（ラット、家兎）を用いた止血効果に関する知見も次々に集積され、筆者らの血小板代替物の設計方針が間違っていないことが確認できた。今後は、より高い止血効果を有する微粒子の構築を複数の認識部位や内包物の放出を組合せて構築することやそれら微粒子における安全性試験、具体的には、投与前後における血液生化学試験、特に過剰な血栓形成や凝固系の活性化亢進の有無に関する血液凝固試験を行う必要がある。さらには、微粒子を巻込んだ止血後の血栓の線溶系に及ぼす影響、反復投与に対する代謝系、細網内皮系、免疫系に及ぼす影響や抗原性の検討も詳細に行う計画となっている。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、今後、遺伝子組換え蛋白質の大量製造や担体の製剤化技術の飛躍的な進展に伴い、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、この様な研究成果の蓄積が Drug Delivery System の基盤技術に貢献することにもなる。

文 献

- 1) 日本赤十字社ホームページ <http://www.jrc.or.jp/active/blood/index.html>
- 2) 村田満. 人工血小板（血小板代替物）. 血液・免疫・腫瘍, 6, 35-39 (2001)
- 3) 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, 1234-1240 (1991)
- 4) Santro, S. A., and Zutter, M. M., The $\alpha 2\beta 1$ integrin: A collagen receptor on platelets and other cells, *Thromb. Hemost.*, 74, 813-821 (1995)
- 5) Moroi, M., Jung, S. M., Platelet glycoprotein IV: its structure and function, *Thromb. Res.*, 114, 221-233 (2004)
- 6) Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T., Springer, T. A., Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling, *Cell*, 110, 599-611 (2002)
- 7) Marguerie, G. A., Plow, E. F., Edgington, T. S., Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen, *J. Biol. Chem.*, 254, 5357-5363 (1979)
- 8) Collier, B. S., Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen: defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia, *Blood*, 55, 169-178 (1980)
- 9) Agam, G., Livne, A. A., Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia, *Eur. J. Clin. Invest.*, 22, 105-112 (1992)
- 10) Collier, B. S., Springer, K. T., Beer, J. H. *et al.*, Thromboerythrocyte. *In vitro* studies of potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions, *J. Clin. Invest.*, 89, 546-555 (1992)
- 11) Chao, F., Reddick, R. L., Bode, A. R. *et al.*, Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet, *Transfusion*, 36, 536-542 (1996)
- 12) Levi, M., Friderich, P., Ten, C. W. *et al.*, Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits, *Nat. Med.*, 5, 107-111 (1999)
- 13) Gupta, P. K., Hung, C. T., Albumin microspheres I: Physico-chemical characteristics, *J. Microencapsulation*, 6, 427-462 (1989)
- 14) Kobayashi, K., Nakamura, N., Sumi, A. *et al.*,

- The development of human serum albumin, *Ther. Apher.*, **2**, 257-262 (1998)
- 15) Takeoka, S., Teramura, Y., Ohkawa, H. *et al.*, Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Iba to size-controlled albumin microspheres, *Biomacromolecules*, **1**, 427-462 (2000)
 - 16) Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252 (1965)
 - 17) Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P., Huang, L., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Lett.*, **268**, 235-237 (1990)
 - 18) Alder-Moore, J., Poffitt, R. T., AmBiosome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience, *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**, 21-30 (2002)
 - 19) Maruyama, K., *In vivo* targeting by liposome, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 791-799 (2000)
 - 20) Maruyama, K., PEG-immunoliposome, *Bioscience Reports*, **22**, 251-266 (2002)
 - 21) 武岡真司, 人工血液 (人工赤血球) の開発動向, 日本医師会雑誌, **131**, 907-910 (2004); Sakai, H., Tomiyama, K., Sou, K. *et al.*, Poly (ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in liquid state, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 425-432 (2000)
 - 22) 樹オキシジェニクスホームページ <http://www.oxy-genix.com>
 - 23) Murata, M., Ware, J., Ruggeri, Z. M., Site-directed mutagenesis of a soluble recombinant fragment of platelet glycoprotein Iba demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding, *J. Biol. Chem.*, **266**, 15474-15480 (1991)
 - 24) Takeoka, S., Teramura, Y., Okamura, Y. *et al.*, Rolling properties of rGPIba-conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 765-770 (2002)
 - 25) Nishiya, T., Murata, M., Handa, M. *et al.*, Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Iba to immobilized von Willebrand factor under flow conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 755-760 (2000)
 - 26) Nishiya, T., Kainoh, M., Murata, M. *et al.*, Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Iba under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions, *Blood*, **100**, 136-142 (2002)
 - 27) 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**, 256-260 (2003)
 - 28) Takeoka, S., Teramura, Y., Okamura, Y. *et al.*, Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions, *Biomacromolecules*, **2**, 1192-1197 (2001)
 - 29) Wertheimer, E., Shapiro, B., Fodor-Salomonowicz, I., Stability of fibrinogen in normal and pathological plasma, *Brit. J. Exp. Pathol.*, **25**, 121-125 (1944)
 - 30) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y. *et al.*, Fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 773-779 (2003)
 - 31) 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*, **45**, 1221-1228 (2005)
 - 32) Okamura, Y., Maekawa, I., Teramura, Y. *et al.*, Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide *in vitro* and *in vivo*, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1589-1596 (2005)