

人工血小板

半田 誠

要 旨：人工血小板は、凍結乾燥させたヒト血小板由来産物と生体適合性に優れたアルブミンなどの微粒子表面にヒトフィブリノゲンもしくはそのペプチドを結合させた人工物がある。人工血小板は残存した血小板の機能を補助することで、血小板輸血に代わって血小板減少症の止血や出血予防を行う。すでに、いくつかの試験物が初期臨床試験に供されているが未だ実用化には至っていない。
(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 333-338)

Key words: artificial platelet, activated platelet, fibrinogen, albumin particle, liposome

はじめに

血小板の量的・質的異常に起因した出血の予防や治療に使用される血小板濃厚液は、有効期限が短くしかも厳密な保存条件が必要のため、緊急時の輸血に対応することは極めて困難である。生きた細胞である血小板濃厚液の欠点を克服し、医療現場で常備できる人工血小板の開発が、主に軍事目的で、米国で始まってからすでに50年以上が経過した^{1,2)}。残念ながら、未だ実用化には至っていないが、いくつかの有望な試験物が報告され、一部は初期臨床試験に供され、将来の製剤化への取組みが継続されている(Fig. 1)³⁾。血小板の止血機能と対比して、人工血小板の開発の現状を概説する。

人工血小板の種類

人工血小板(artificial platelets/ 広義)は二つに大別される(Fig. 1)。第一は血小板由来産物で、凍結乾燥処理した固定化ヒト血小板(fixed, lyophilized platelet, StasixTM)そのものや、あるいはすでに初期臨床研究に供された血小板膜断片(infusible platelet membrane; IPM, CyplexTM)がある。第二は狭義の人工血小板で、生体適合性のある担体(赤血球、アルブミン微粒子、リン脂質小胞体：リポソームなど)を用い、その表面に血小板受容体のリガンドを結合させたもの(リガンド結合微粒子)で、90年代初めにフィブリノゲンやその合成ペプチド(RGD)をコー

トした赤血球(thromboerythrocyte)が先駆けとなり、いくつかの微粒子が開発された¹⁾。まず最初に、ヒトフィブリノゲンを表面固定したアルブミン微粒子(SynthocyteTMやFibrinoplate-STM)が初期臨床研究に供された。これらはフィブリノゲンやアルブミンなどの生物由来物質をそのまま使用した生物製剤(biological products)であり、それに続いて、いわば第二世代といえるすべてが人工物で構成された製剤(synthetic products)が開発されてきた。

人工血小板の機能

止血機構における血小板の機能は、止血部位への特異的な粘着、アデノシンニリン酸(ADP)などの刺激物質の放出と細胞の活性化反応、細胞同士の凝集反応による一次血栓の形成、活性化した細胞上での凝固反応の促進(凝固活性)に分けられる。しかし、血小板のすべての機能を代替することは不可能である。したがって、人工血小板は残存した血小板を介してこれらの機能を増強する。

1) 血小板由来産物

期限切れとなったヒト血小板を破壊した後、加熱して凍結乾燥した血小板断片製剤(IPM)は止血局所を特異的に認識する血小板受容体 GPIIb/IX がインタクトに保存されていることに加えて、凝固活性を発現するフォスファチジルコリン等の陰性荷電リン脂質が豊富に表現されており、その血小板代替機能は主にフィブリン血栓の生成

■ Platelet Products			
	Lyophilized whole platelets	(Stasix™:Entegriion)	preclinical
	Platelet membrane fragments	Infusible Platelet Membrane (Cyxplex™:Cypress Bioscience)	phase 1/2
■ Artificial Platelets : fibrinogen ligand- coated particles			
■ Biological products			
Human Fibrinogen	Alb microcapsules	(Synthocytes™:ProFibrix)	phase 1/2
Human Fibrinogen	Alb microspheres	(Simplat™:Advanced Therapeutics)	phase 2/3
		(HaemoPlax™:Haemostatis)	preclinical
■ Synthetic products			
Human fibrinogen peptide (H12)	Liposomes	(Y Okamura, et al, 2005-2009)	preclinical
Human fibrinogen peptide (RGD)	PLGA	(Bertram JP, et al, 2009)	preclinical

Figure 1 Artificial platelets.

Artificial platelets are classified into platelet products and artificial particles coated with fibrinogen or related peptides. The latter (artificial platelets by narrow definition) are produced using components derived from human or totally synthesized.

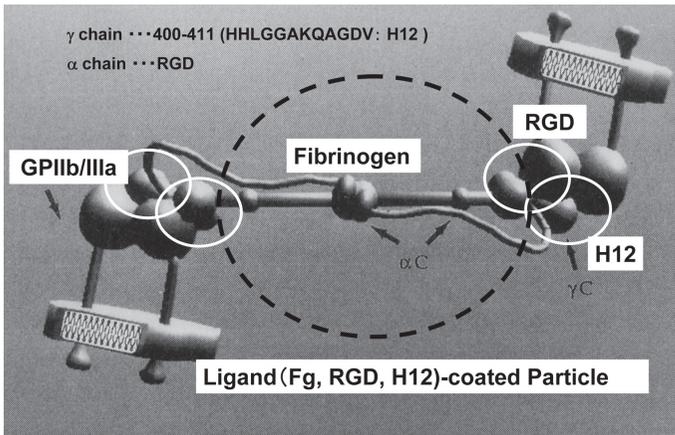


Figure 2 Platelet aggregation and artificial platelets.

Platelet aggregation is induced by bridging adjacent platelets with binding of plasma fibrinogen to activated GPIIb-IIIa complex on the cell surface.⁵⁾ The binding sites on the ligand for the receptor are localized at sequence of H12 or RGD. Fibrinogen or the synthetic peptide-coated particles reinforce platelet aggregation by receptor-ligand interactions being more multivalent than fibrinogen itself.

補助に起因するとされる⁴⁾。一方、ヒト血小板を intact のままマイルドに固定化し、その後凍結乾燥して粉末状にし、使用時に再水溶化できる製剤(Stasix™)が開発されてきた²⁾。本製剤は長い改良の歴史を持ち、特徴は止血局所集積性を体现する GPIb/IX とともにフィブリノゲンの受容体である GPIIb/IIIa の機能も一部保持されており、IPM と類似の凝固活性を発揮することに加えて、血小板凝集を補助する作用を有すると報告されている。

2)人工血小板(狭義)

血小板凝集は、活性化した血小板膜 GPIIb/IIIa 複合体(受容体)への結合を介して、血漿中のフィブリノゲン(リガンド)が細胞同士の架橋となって引き起こされる

(Fig. 2)⁵⁾。フィブリノゲン分子の GPIIb/IIIa 複合体との結合部位は、3カ所あり、そのうち2カ所はαサブユニット上の RGD 配列に、後の1カ所はγサブユニットのカルボキシ末端を構成する12個のアミノ酸(400HHLGGAKQAGDV⁴¹¹: H12)に限定される。人工血小板は、フィブリノゲンもしくはその合成ペプチドを表面にコートさせた生体適合性を有する微粒子(アルブミン、リポソーム、乳酸・グリコール酸ポリマー)として、フィブリノゲンに代わり残存した血小板の凝集反応を増強するとされる。人工血小板は、その表面にリガンドを高密度に固相化することにより、血漿中のフィブリノゲンでは実現できない多点結合を介した血小板凝集を引き起こ

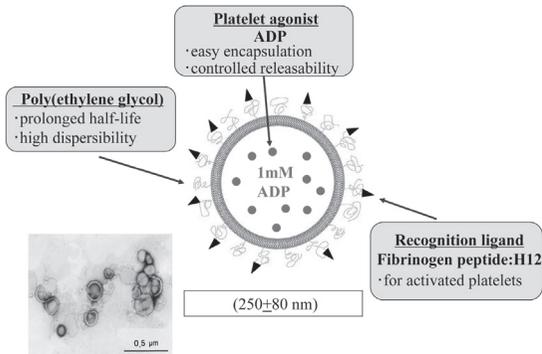


Figure 3 H12-(ADP) liposome.

H12-(ADP) liposome, one of the developing artificial platelets is surface-coated with polyethylene glycol to ensure its blood compatibility and dispersibility. H12 peptide is covalently conjugated to the tip of polyethylene glycol moiety as a target molecule of activated platelets. ADP, a physiologically important platelet agonist stored in platelet alpha granules is stably encapsulated into the inner space of the liposome.

す。さらに、リポソーム製剤では、内水相に加えたADPの血小板凝集に伴う放出機能を付与させた(**Fig. 3**)。

人工血小板の開発状況

1) 血小板由来産物

IPMは初期臨床試験に供され、1995年の米国でのフェーズ1臨床研究では、健康人22名への単回投与では急性毒性や免疫原性は認められず、8例の血小板減少患者(血小板数5万/mm³以下)のうち6例(75%)において、出血時間の有意な短縮効果が認められた⁶⁾。1997年の出血症状を有する40例の血小板減少症患者を対象としたフェーズ2試験では、27例(65%)において症状の改善や止血効果等の有効性が示された⁷⁾。しかしながら、その後、理由が明らかにされないまま開発は中止された。

一方、固定化凍結乾燥血小板であるStasixは、その強い凝固活性と極めて短い血中滞留性(半減期:約10分)を活かして、戦場や災害時の緊急避難的な止血剤としての利用が、米国国防省の援助のもと模索されている⁸⁾(**Fig. 4**)。

2) 人工血小板/アルブミン微粒子

1995年に、平均径が1.2ミクロンのアルブミン・マイクロソフェア(Fibrinoplate-STM)が、1999年には、より大型の平均径3.5~4.5ミクロンのアルブミン・マイクロカプセル(SynthocyteTM)が報告され、前者はフェーズIII、後者は少なくともフェーズIIまでの臨床試験が行われ

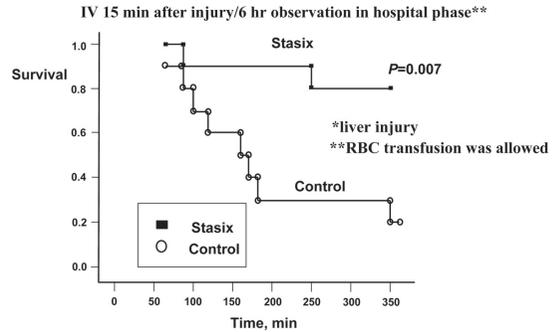


Figure 4 Evaluation of lyophilized fixed platelets (Stasix[®]) as an infusible hemostatic agent in experimental non-compressible hemorrhages* in swine.⁸⁾

Using a non-compressible liver hemorrhage swine model, the effect of lyophilized fixed platelets (Stasix[®]) on survival was compared with normal saline. As a result, the survival rate in the Stasix group (80%) was significantly higher than that in the control (20%).

た。Fibrinoplate-Sは、63,214人の白血病や再生不良性貧血等の血小板減少患者(血小板数3万/mm³以下)への二重盲検比較対照試験で、出血時間の短縮効果が投与後24時間後でも有意に持続することが報告された(4th Asian Pacific Congress on Thrombosis & Haemostasis, 2006; Advanced Therapeutics社のホームページ)。一方、Synthocyteは、抗がん剤により惹起された血小板減少ウサギに投与することで耳介出血時間の短縮や腹部手術モデルでも術創からの出血量の減少効果が一定時間(3時間)持続し、止血局所への集積も形態的に証明され、有望な前臨床試験結果が公表された⁹⁾。しかしながら、いずれもその後の経過の詳細は公表されておらず、未だ実用化に至っていない。さらに、第3の有望な人工物(HaemoPlaxTM)が開発されている。このHaemoPlaxTMは、アルブミン・マイクロソフェアの表面に、ヒトフィブリノゲンと高い親和性を有する合成ペプチドが固相化されたもので、血中に投与すると、その表面にフィブリノゲンが速やかに吸着されることで、上記の人工物と同様の血小板代替機能を発揮する。前臨床試験はすでに終了して、早期の臨床試験への移行を表明しているが、詳細は明らかでない(Haemostatix社ホームページ)。

3) 人工血小板/リポソーム

フィブリノゲンのGPIIb/IIIaへの結合部位はそのγ鎖のカルボキシ末端を構成する12個のアミノ酸配列(⁴⁰⁰HHLGGAKQAGDV⁴¹¹:H12)である(**Fig. 2**)。そこ

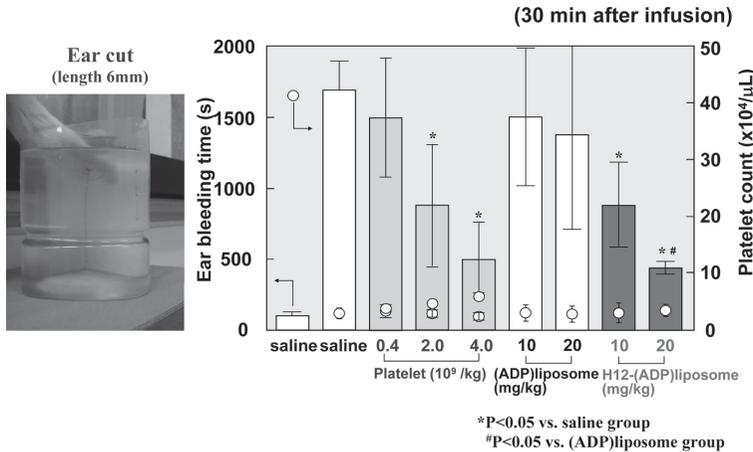


Figure 5 Comparison of hemostatic effects of H12-(ADP) liposomes with those of platelet-rich plasma in severely thrombocytopenic rabbits.⁹⁾

The hemostatic effect of H12-(ADP) liposome was compared with that of platelet rich plasma in severely thrombocytopenic rabbit models induced by busulphan. Ear bleeding time of busulphan-induced thrombocytopenic rabbits was measured 30 min after infusion of platelet preparation or the liposome. Indeed, platelet transfusion effectively corrected the prolonged bleeding time in a dose-dependent fashion. Similar correcting effect was also observed with H12-(ADP)-liposomes in a dose-dependent fashion. The extent of correction by the liposome was just comparable to that obtained by platelet transfusion, indicating that H12-(ADP)-liposome exhibits *in vivo* hemostatic ability as efficiently as platelet transfusion.

で、表面結合リガンドとしてヒトフィブリノゲンの代わりに H12 合成ペプチドを、担体として血液適合性に優れかつすでに臨床応用がなされているリポソームを使用した平均直径 250 ナノメートルの(H12(ADP)リポソーム)が開発された。この微粒子の特徴は、止血作用を強化する目的で ADP を内包化させたことである (Fig. 3)¹⁰⁾。血小板凝集を増強するとともに、凝集依存性に内包化された ADP を放出することで、血小板に匹敵する止血効果(出血時間短縮効果)を発揮することが抗がん剤惹起ウサギ血小板減少症モデルで報告された (Fig. 5)。H12(ADP)リポソームの利点は、その表面をポリエチレングリコールで修飾することでその血中滞留時間を長く(平均 6 時間)できることである。したがって、血小板輸血を代替して出血の予防投与への適応が期待されている。

4)人工血小板 / 乳酸・グリコール酸ポリマー

H12(ADP)リポソームと同様に完全合成型の人工血小板である。フィブリノゲンの GPIIb/IIIa への結合部位は、血小板に特異的な H12 以外に、受容体ファミリーに非特異的に認識される RGD がある α 鎖に局在する (Fig. 2)。この人工物は、生体吸収性に優れて多方面の医療材料

に利用されている乳酸/グリコール酸共重合体 (poly(lactic-co-glycolic acid) : PLGA) を担体として用い、その表面を PEG で修飾し、その先端に RGD 配列を含んだペプチド (GRGDS) を結合させた、粒径およそ 150 ナノメートルの微粒子である。本微粒子は、活性化した血小板にのみ結合して血小板の凝集を増強し、健常ラットの大腿動脈からの出血を陰性対照物に比して有意により短時間で止める機能がある (Fig. 6)¹⁰⁾。しかし、投与量を多くすると血栓傾向が増強されるとされ、また血中半減期も短いことから、止血剤としての適応を目的としているようである。すくなくとも、緊急避難的に止血剤として欧米では標準的に使用されているリコンビナント活性化凝固第 VII 因子 (NovosevenTM) をはるかに凌駕する止血効果を示した。

人工血小板の課題

1) 適応

人工血小板の適応は、内科的な出血予防を目的とした持続的な使用と外科的な止血を目的とした急性使用に分けられる。予防薬として必須の要件は、効果の持続性で

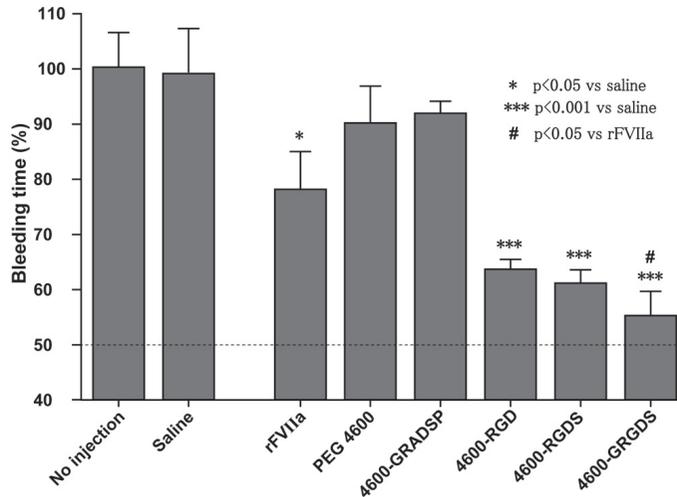


Figure 6 Effect of RGD-PLGA particles on bleeding time in rat femoral artery injury model.¹⁰⁾

Using a rat femoral artery injury model, the effect of RGD peptide-coated PLGA particles (4600-RGD, 4600-RGDS and 4600-GRGDS) on bleeding time was evaluated by comparison with control treatments (Normal saline: Saline, recombinant coagulation factor VIIa: rFVIIa, RGD-uncoated particles; PEG 4600 and RGD reverse peptide-coated particles: 4600-GRADSP). The hemostatic ability of these RGD-PLGA particles was found to be significant as compared with saline control. In addition, the effect of RGD-PLGA particles was significantly higher than a clinically useful hemostatic agent rFVIIa.

ある。現在開発中の微粒子は血中半減期を延ばすためにその表面をポリエチレングリコールで処理している⁹⁻¹¹⁾。しかしながら、血小板に匹敵する体内寿命を獲得することは現在の技術では不可能であり、せいぜい一日2~3回投与が限界である。さらに、生体の異物排除機構が働いて微粒子に対する抗体が惹起されることが危惧される。一方、緊急性の高い止血薬への適応は大いに有望である^{8, 11)}。血小板数の補正が生死を分ける状況下での緊急使用は意義の高いものである。そして、単回使用のため血中半減期は短くても構わないし、抗体の惹起は気にする必要がない。

2) 副作用

人工血小板の働きは残存した血小板を介するものとそのものが血小板の代わりとなる場合がある。いずれの場合も、血栓症が最も危惧される副作用である。実際、Stasixを使用したブタモデルでの検討では心内膜や肺動脈の血栓が1例で観察されており、PLGA微粒子でも高用量の投与で血栓症と思われる心肺症状が高頻度に出現した^{8, 11)}。いずれの場合でも、血小板数の低下は明らかで

なく、試験薬が血小板輸血の代替としての使用でないことを注意すべきである。あくまでも血小板減少症を対象とした人工血小板としての役割を評価すべきであろう。

おわりに

薬剤としての人工血小板は未だに実現されていない。長い歴史があるにもかかわらず、欧米を中心にその開発はベンチャー企業を主体に継続されているためデータがほとんど公表されていない。そのため、本稿では限られた情報に基づいた推測を多く取り混ぜた。実用化に向け、薬剤の開発目的を止血治療に限定するのか、あるいは適応範囲が広く採算性も高い出血予防に拡大するかが今後の鍵となる。

文 献

- 1) Blajchman MA: Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1637-1641
- 2) Bode AP, Fischer TH: Lyophilized platelets: fifty years in

- the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; **35**: 125–133
- 3) 半田 誠 : 血小板代替物(特集 : 血小板をつくろう). *血栓止血学会誌* 2008; **19**: 774–778
 - 4) Graham SS, Gonchoroff NJ, Miller JL: Infusible platelet membranes retain partial functionality of the platelet GPIb/IX/V receptor complex. *Am J Clin Pathol* 2001; **115**: 144–151
 - 5) Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, et al: Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16637–16643
 - 6) Goodnough LT, Kolodziej M, Ehlenbeck: A phase I study of safety and efficacy for infusible platelet membrane in patients (abstract). *Blood* 1995; **86** (Suppl 1): 610a
 - 7) Scigliano E, Enright H, Telen M: Infusible platelet membrane (IPM) for control of bleeding in thrombocytopenic patients (abstract). *Blood* 1997; **90** (Suppl 1): 267a
 - 8) Hawksworth JS, Elster EA, Fryer D, et al: Evaluation of lyophilized platelets as an infusible hemostatic agent in experimental non-compressible hemorrhage in swine. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 1663–1671
 - 9) Levi M, Friederich PW, Middleton S, et al: Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999; **5**: 107–111
 - 10) Okamura Y, Takeoka S, Eto K, et al: Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 470–477
 - 11) Bertram JP, Williams CA, Robinson R, et al: Intravenous hemostat: nanotechnology to halt bleeding. *Sci Transl Med* 2009; **1**: 1–8

Artificial Platelets

Makoto Handa

Center for Transfusion Medicine & Cell Therapy, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

Key words: artificial platelet, activated platelet, fibrinogen, albumin particle, liposome

Artificial platelets are classified into lyophilized products derived from human platelets and fibrinogen or related peptide-coated microparticles made from blood-compatible materials such as albumin. The artificial platelets are substituted for platelets in transfusions for treatment or prevention of bleeding in patients with thrombocytopenia; they reinforce the hemostatic abilities of residual platelets. Although some of the products have been tested in early phase clinical trials, none of them have yet been approved for clinical use.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2011, **51**: 333–338)