

Silicon Intensified Target (SIT) cameraにより撮像、解析した。

一方血小板の血管内皮細胞への接着メカニズムを詳細に検討する目的で抗ヒト GPIIb/IIIa 単クローン抗体を用いた阻害実験を行った。使用した抗体は GPIIb/IIIa と vWF の接着を阻害する抗体 GUR83/35 と、結合による阻害を示さない WGA3 の 2 種類であり、慶應義塾大学医学部輸血センター半田 誠博士より供与された。またラット P-selectin に対する単クローン抗体 s789G (阻害抗体), s84F (非阻害抗体; ともに JT 医薬研玉谷卓也博士より供与) の効果も併せ検討した。これらの抗体の投与は、ラットの循環血中への投与では 2mg/kg 静脈内へ、また分離血小板への処置ではあらかじめ 25 mg/ml で incubate してから、それぞれ体内に投与し解析に供した。

C 研究結果

1 CFSE 標識による血小板機能の変動の検証

図 1 に CFSE を生体内投与されたラットから採取した分離血小板の位相差透過光線像と青色励起による蛍光像の典型を示す。図に示すように蛍光の負荷された細胞は単一の血小板であることが示された。レーザー散乱血小板凝集計による計測で、CFSE を標識された血小板は、標識されていないものと比して ristocetin や ADP に対する凝集能に差を認めなかった。また CFSE 投与前後で流血中の血小板数にも変化を認めなかった。これらのことから本法は生体内で血小板機能を損なうことなくその挙動を観察するために有用な方法であることが示唆された。

次に腸間膜における微小血管内での血小板挙動を高速度ビデオシステムを用いて検討した。透過光で微小血管を観察し、画像を 1000 frames/sec で記録したのち、30 frame/sec で再生したところ単一の個々の赤血球の流れが観察された。この画像から赤血球速度を算出し、venule での速度を解析すると、中心流の約 60-70% の速度で傍内皮細胞近傍の赤血球が通過することが明らかになった。

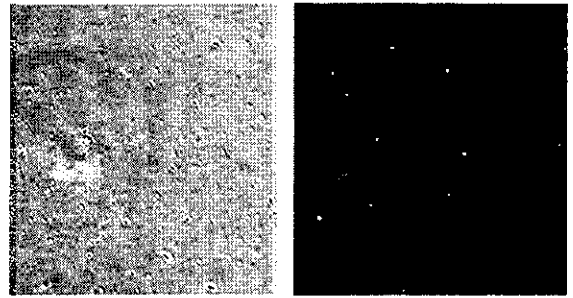


図 1 CFSE で蛍光染色された血小板の透過光線像 (左) と蛍光画像 (右)。

また細動脈では赤血球速度は 1 秒間に 3-4 回の周期で変動しており、この現象は心拍に一致した血流の変動すなわち脈流を反映するものと考えた。次に光源を落射蛍光に変更し 1000 frames/sec の速度でビデオ記録しこれを 30 frames/sec で再生すると単一の血小板が極めて heterogeneous な動きをして内皮細胞と反応することが明らかになった。傍血管内皮細胞周囲の血小板は遅いもので局所赤血球速度の 50% 程度で流れるものが存在し、そのような slow roller の密度は局所の wall shear rate が高くなるほど顕著であった。このような shear rate 依存性の血小板-内皮相互作用はラットに GUR83/35 を前処置すると抑制された (図 2)。一方細静脈では GUR83/35 による抑制効果は認められなかった。

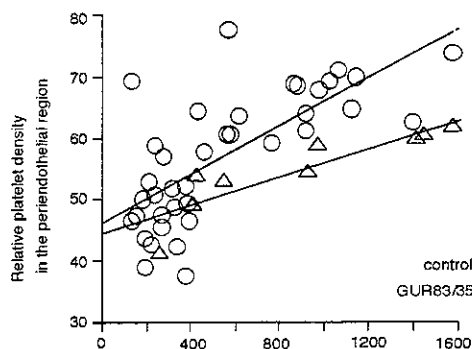


図 2 Wall shear rate 依存性の血小板密度の増加と anti-GPIIb/IIIa MoAb GUR83/35 投与による消失。

2 ラット分離血小板の細静脈内挙動の解析

次にラット及びヒトの分離血小板の生体内挙動を SIT camera による digital micro-fluorography で解析した。図3に示すようにラット分離血小板は一定の頻度で細静脈内皮細胞と一過性の接着反応を起こした。この反応はあらかじめ内毒素 (O111B4) の血管内投与で刺激したラットに分離血小板を投与した場合には有意に頻度が上昇した (図4)。内毒素による血小板の接着反応は、血管内皮細胞側の接着分子の表出によるものと考えP-selectin に対する抗体の効果を検討したところ s789G の投与により完全に反応が抑制された。また抗ヒト GPIba 抗体である GUR83/35 であらかじめ前処置したラット血小板は、内毒素処理ラットに投与しても同様の接着反応を示さなかった。これに対し P-selectin の抗体で前処置した血小板は接着反応を示したことから、内毒素により起こる細静脈での血小板接着反応は内皮の P-selectin と血小板の GPIba の相互作用によるものと考えられた。

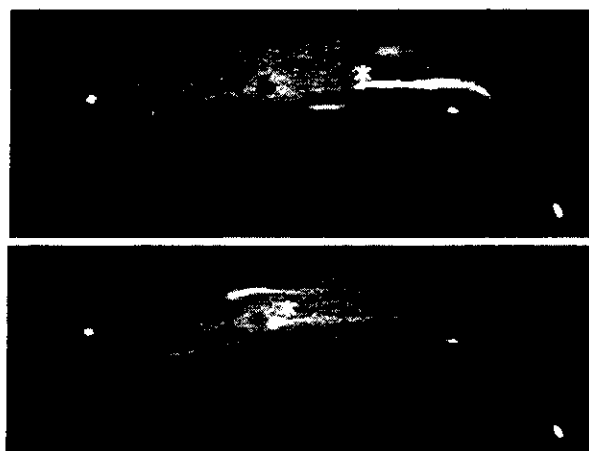


図3 ラット分離血小板の内毒素前処置ラット内投与時の細静脈での一過性接着反応。SIT camera により撮像。CFSE による染色像を示す。ex vivo でラベルした血小板に同じく一部染色された血漿が共存するため血管内が淡く染色され、血管内腔が描出されている。W : rolling を示す白血球。asterisks : CFSE 標識血小板を示す。

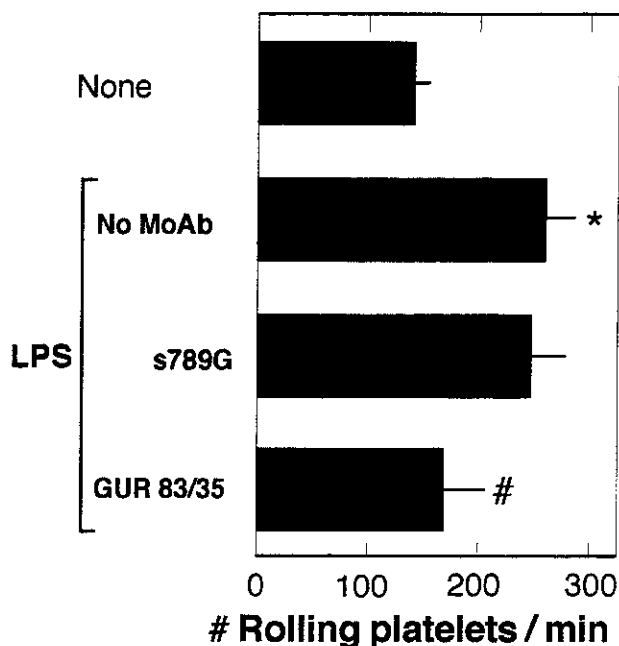


図4 ラット分離血小板の LPS 前処置ラット細静脈への接着反応。抗体はそれぞれ分離血小板に前処置した。

3 ヒト分離血小板の細静脈内挙動の解析

図3に示した結果はヒト GPIba がラットの counter receptor と反応して同様の細胞間相互作用を示しうることを示唆した。そこでヒト血小板を分離し CFSE でラベルしてラットの流血中に投与してその挙動を解析した。ヒト血小板もラットのそれ同様、血管内皮細胞と一過性の接着反応を示した。この反応は GUR83/35 の ex vivo 処置またはラットへの s789G 投与により有意に抑制された。これらの結果からヒト血小板は GPIb を用いてラットの P-selectin を含む counter receptor と反応することが示され、ラットを in vivo test tube としてヒト GPIb の機能が微小血管で解析できることが明らかとなった。

D 考察

流血中の血小板は wall shear rate の増加により血管壁近傍に集積する傾向があることが明らかにされ GPIb の immunoneutralization のよりこの反応がキャンセルされることが明らかに

なった。またヒト血小板はGPIbを用いてラットの微小循環内皮細胞上をrollingすること、ラット側のcounter receptorのひとつとして血管内皮上のP-selectinが関与することが示された。

E 結論

本研究の結果からヒト組み換え型 GPIba をリポソームに結合させた人工血小板粒子の機能評価をラットを用いて解析できる可能性が開かれた。ラット微小循環系は微小針を用いた点出血モデルや血栓モデルなどが容易にできる系であり、今後ヒト型分子の機能を *in vivo* で評価するために極めて有用なモデルとなる。

F 研究発表

1 論文発表／関連文献

1 Suematsu M, Goda N, Sano T, et al: Carbon monoxide : An endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 96: 2431-2437, 1995

(Digital Microfluorography)

2 Goda N, Suzuki K, Naito M, et al: Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 101(3): 604-612, 1998

(Laser digital microfluorography)

3 Hayashi, S., Takamiya, R., Tamatani, T., Tojo, J.S., Matsumoto, K., Kitajima, M., Ishimura, Y., Suematsu, M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: Role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* 85, 663-671, 1999

(In vivo P-selectin imaging in microvessels)

4 Iizuka, T., Tanaka, T., Suematsu, M., Miura, S., Watanabe, T., Koike, R., Ishimura, Y., Ishii, H., Miyasaka, N., Miyasaka, M. Stage-specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 during

embryogenesis in rats. *J. Immunol.* 164, 2463-2471, 2000.
(In vivo visualization of adhesion molecules on HEV)

5 Katayama, T., Ikeda, Y., Handa, M., Tamatani, T., Sakamoto, S., Ito, M., Ishimura, Y., Suematsu, M. Immunoneutralization of glycoprotein Iba attenuates endotoxin-induced rolling of platelets and leukocytes on rat venular endothelium *in vivo*. *Circ. Res.* In press, 2000.

(GPIb-mediated platelet adhesion visualized at millisecond resolution)

2 学会発表

片山富博 他、超高速生体ビデオ顕微鏡によるラット血小板の微小循環動態の解析 第25回日本微小循環学会 2000 2月

謝辞

抗体を供与していただいた慶應義塾大学医学部 半田 誠先生、池田康夫先生、JT 医薬研の玉谷 卓也先生に深謝いたします。

PEG-修飾リポソームの貪食機構に関する研究

分担研究者 池淵研二 北海道赤十字血液センター 副所長

研究要旨

血小板代替物の候補者として、血小板粘着に必要な膜受容体蛋白を固定化したリポソームが挙げられるが、その生体内半減期は非常に短く、リポソームをPEG-修飾することによってある程度の半減期延長は得られるが、十分ではない。そこで半減期のさらなる延長を考える上での礎とするべく、PEG-修飾リポソームの単球/マクロファージによる貪食機構を検討した。テルモ社のリポソーム型人工赤血球（NRC）をPEG-修飾リポソームとしてヒト末梢血単核球と共に20時間培養すると、単球/マクロファージによるNRCの貪食が見られた。この貪食は抗-CD14抗体の添加で約60%、抗-CD36抗体で約80%、抗-CD51/61抗体で約20%阻害された。2種類の抗体の同時添加による相乗効果は認められなかった。CD14, CD36, CD51/61はいずれもアポトーシスに陥った血球細胞が単球/マクロファージにより貪食される際に重要なレセプターである。今後リポソーム型人工血小板のリポソーム構成脂質の組成や作成されたリポソームの修飾を考える際に、今回の知見が生かされれば幸いである。

A. 研究目的

血小板代替物の有力な候補者の一つとして、血小板粘着に必要な膜受容体蛋白を固定化したリポソームが挙げられるが、リポソームの生体内半減期は非常に短く、半減期延長の工夫が望まれる。リポソームをPEG-修飾することによってある程度の半減期延長は得られるが、十分ではない。そこでさらなる半減期延長を考える上での礎とするべく、今回我々はPEG-修飾リポソームの単球/マクロファージによる貪食機構を検討した。

B. 研究方法

ヒト末梢血単核球は、ヘパリン加全血よりFicoll比重遠心法により分離した。PEG-

修飾リポソームとしては、テルモ社のリポソーム型人工赤血球（ネオレッドセル [NRC]、脂質組成；水添ホスファチジルコリン：コレステロール：ミリスチン酸： α -トコフェロール=7:7:2:0.28）を用いた。単核球 4×10^6 個/mlをPKH67を用いて緑色蛍光標識したNRCあるいは未標識NRC（2.5%（v/v））と共に48穴培養プレート内で20時間培養した（RPMI1640/10%ヒトAB型血清）。単球/マクロファージによる標識NRCの貪食度はフローサイトメーターを用い単球/マクロファージ領域内の細胞の緑色蛍光のmean fluorescence intensityとして評価した。単球/マクロファージ上のNRC認識分子を明らかにする実験では、上記培養系に抗-CD14, CD36, CD51/61抗体あるいはコントロールのIgG1を添加した。

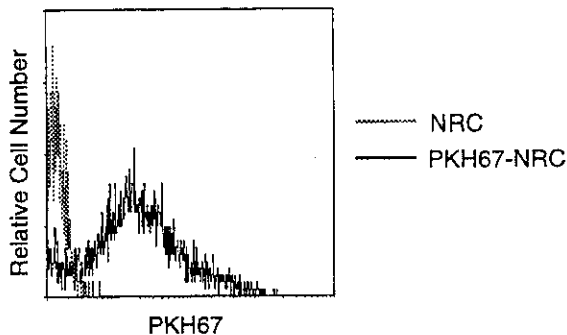


図1 単球/マクロファージによるPKH67-標識および未標識NRCの貪食

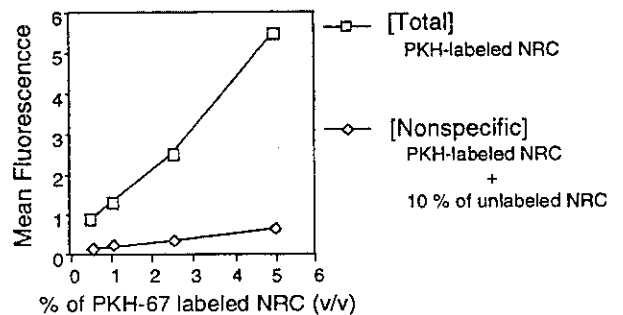


図2 未標識NRCによるPKH67-標識NRC貪食の阻害効果

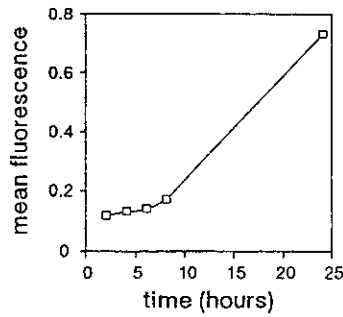


図3 単球/マクロファージによる NRC 貪食の経時的変化

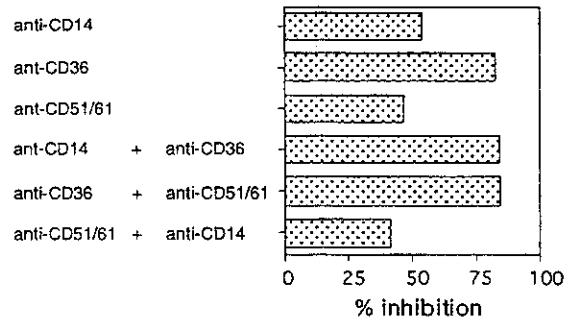


図5 抗-スカベンジャー抗体の組み合わせによる NRC 貪食の阻害効果

C. 結果

1. 単球/マクロファージによる NRC の貪食

単核球 4×10^6 個を PHK67 標識 NRC (2.5%(v/v)) と共に 20 時間培養した後、単球/マクロファージをフローサイトメーターにより解析すると、図 1 のように標識 NRC の単球/マクロファージによる貪食は、緑色蛍光の増大として観察された。このような単球/マクロファージによる標識 NRC の貪食が、NRC を PHK67 で標識したことに起因するものではないことを確認するために、次に未標識 NRC (10%) の存在下に標識 NRC を 0.5, 1, 2.5, 5% 添加し、単球/マクロファージによる標識 NRC の貪食を検討した。そうすると図 2 のように、標識 NRC の貪食は未標識 NRC の添加により著しく抑制された。従って図 1 でみられた標識 NRC の貪食は標識色素ではなく、NRC そのものを単球/マクロファージが認識して起こった現象であると考えられた。図 3 に示すようにこの貪食は培養 8 時間以内には殆ど起こらず、20 時間の培養を必要とする。

2. 抗体による NRC 貪食に対する抑制効果

単核球と PHK67 標識 NRC を培養する際に各種抗体を添加すると、図 4 に示すようにいずれの抗体を用いても濃度依存的に標

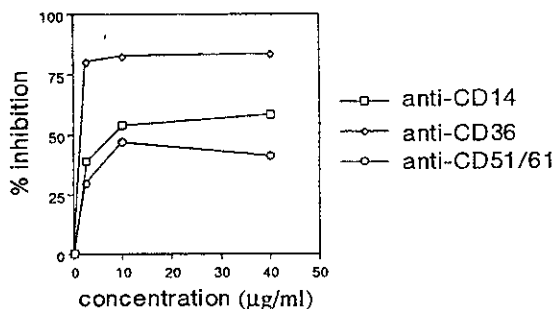


図4 抗-スカベンジャー抗体による NRC 貪食の阻害効果

識 NRC の貪食が阻害された。阻害率は抗-CD14 抗体で約 60%、抗-CD36 抗体で約 80%、抗-CD51/61 抗体で約 20% と、抗-CD36 抗体で最も著名な抑制が観察された。図 5 に各抗体 (抗体濃度: 10µg/ml) を組み合わせた場合の阻害率を示したが、2 種類の抗体による相乗効果は認められなかった。

D. 考察, 結論

PEG-修飾リポソームの単球/マクロファージによる貪食を定量する *in vitro* のアッセイ系が確立された。この系を用いて、PEG-修飾リポソームが単球/マクロファージに貪食される際に用いられるスカベンジャーレセプターの同定を試みたところ、CD36 の関与が最も大きく、次いで CD14, CD51/61 の関与が明らかとなった。いずれの分子もアポトーシスに陥った血球細胞が単球/マクロファージによる貪食される際に重要なレセプターである。今後リポソーム型人工血小板のリポソーム構成脂質の組成や作成されたりポソームの修飾を考える際に、今回の知見が生かされれば幸いである。

E. 謝辞

この研究は、池田久實 (北海道赤十字血液センター所長), 平山文也 (同研究課長), 藤原収子 (同研究員) の協力を得て行われた。記して謝意を表す。

F. 研究発表

a. 学会発表

藤原収子, 平山文也, 池淵研二, 池田久實: 単球/マクロファージによるリポソーム内包型ヘモグロビンの貪食機構. 第 61 回日本血液学会

厚生省科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

人工血小板粒子のモデル細動脈内における分布及び運動の計測

分担研究者 谷下 一夫 慶応義塾大学理工学部教授

研究要旨 人工血小板として実用化が有望視されている rGPIb α リポソーム粒子の運動や凝集塊を形成する過程を *in vitro* 実験にて観測し、人工血小板としての機能を評価した。人工血小板は凝集する毎に大きくなるが、その凝集塊の大きさに着目し、流路内分布、運動とともに変化する粒子の大きさを顕微鏡下で観測した。とくに粒径 1 μm より小さい粒子、10 μm より大きい粒子の管径方向分布を、Control-liposome, rGPIb α -liposome について示す計測した。どちらのリポソームも大きな凝集塊が管壁付近に偏在するのに対し、小さな粒子は分布のピークが管軸に寄っている。従って、大きな粒子が壁付近にも近づく現象は、人工血小板としての機能に見通しを与えるものである。さらに、コラーゲンを被覆した面を流れに露出させると、表面で凝集塊が粘着する様子が観測され、止血効果の一端を確認出来た。

A. 研究目的

本研究ではまず、人工血小板の粘着機能を *in vitro* の系で評価するために、生体内において血小板止血機能がもっとも効果的に働く細動脈をモデルとした流路を作成した。評価の対象とされた人工血小板は本プロジェクトのリーダーである慶応大学医学部の池田康夫教授らのグループにより開発された rGPIb α -liposome（遺伝子組み替え GPIb α を liposome に固相化したもので、本プロジェクトで詳細に報告されているので説明は省略する）である。

そこで本研究は、人工血小板粘着機能を血管内流動分布の変化というミクロな視点から検討し、更にその時の粒子個々の挙動を観察することによって実際の粘着機能について評価する。しかし個々の粒子を追跡し流速ベクトルを測定するというのは、高い時間分解能、および空間分解能が必要なのでこれまで血小板（約 2 μm ）でも行われていなかった。血小板の、約 10 分の 1 の大きさをもつ liposome についても同様である。そこで、本研究は流動中の人工血小板の粒子を直接追跡できる測定系を開発し、人工血小板の流体力学的な挙動を明らかにすることによって粘着凝集機能にどのような影響が与えられるのか評価すること

を目的とする。またその時、粒子の挙動として流速ベクトルの壁へ向う成分に着目し、それを元に血小板の粘着機能について検討を行う。

B. 研究方法

B-1. 実験手順

本実験では、細動脈を模擬した矩形流路を共焦点レーザー走査型顕微鏡に設置、人口血小板プロトタイプを懸濁した灌流液を流し挙動を観察した（図 1）。まず、rGPIb α -liposome の凝集能を調べるために、壁面をコラーゲンでコーティングし、その壁面での凝集の様子を観察した（せん断速度 330 s^{-1} ）。次に、流動状態を評価するため、コーティングせずに rGPIb α -liposome または、control-liposome 灌流液を灌流し、そこで得られた画像から粒子を抽出、壁面からの距離に応じた流動分布、及び壁面近傍での流速を算出しその挙動を検討した。

せん断速度は、330 s^{-1} および 780 s^{-1} の二通りで行った。その際の実験条件は以下の通りである。

- ① control-liposome を懸濁した灌流液

を用いた場合.

- ② rGPIIb α -liposome を懸濁した灌流液を用いた場合.
- ③ ①, ②それぞれに PRP を加えた場合.
- ④ のとき, Ca²⁺で血小板を活性化させた場合.

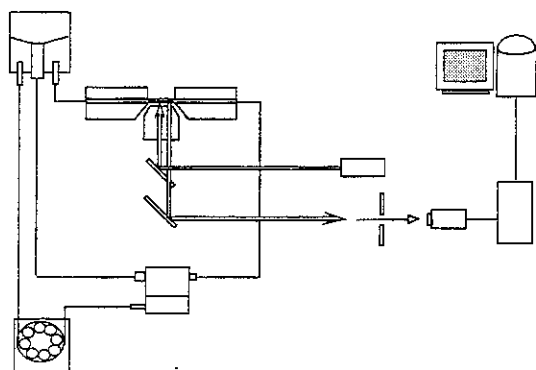


図1. 実験回路図

B-2. 灌流液の調製

本実験では, 人工血小板を生理食塩水 (0.9 wt% NaCl 溶液) に懸濁させたものを灌流液とし, control, rGPIIb α -liposome とともにその濃度は $2.5 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ とした. さらに rGPIIb α を導入していない liposome (control-liposome) をコントロールとして用いた. 更に今回は, liposome のリン脂質二重膜をローダミン (N-(lissamine Rhodamine B sulfonyl)-phosphatidylethanolamine, 蛍光波長: 550nm, 励起波長: 590nm) で蛍光標識して計測に用いた.

B-3. 血小板多血漿: PRP

PRP とは全血から赤血球を分離したものであり, 血漿中に血小板が多く含まれたものである. その調製法は上田ら[40]に準じ, 採血は実験開始4時間前までに行った.

健康な成人男子から新鮮血 9ml を採血し, 3.8 wt%クエン酸ナトリウム水溶液 1ml (抗凝固剤, カルシウムイオンをキレート化し, 血小板の活性化を抑制する) を添加する. これを 800 rpm で 15 分間遠心分離し, 上澄みとなってでる PRP (約 2 ml) を採取した. 従って, この PRP に含まれてい

る血小板は活性化が抑制されたものであり, そのため活性化した血小板との反応を観察する際には, 灌流液に 1 mol / l CaCl₂ 水溶液を 1 μl 加え, あらためて血小板を活性化させた.

B-4 実験流路

本実験では, 生体内において血小板止血機能が最もよく働く細動脈 (径 15-500 μm) をモデルとして流路を作成した. 図2のように Lower Chamber に配置したカバーガラスを顕微鏡下で近づけ, その間隔が 200 μm となったところで, Upper Chamber で固定, ここでできる 1 辺 200 μm の正方形断面を持つ四角柱の隙間を流路として用いた (両 Chamber ともアクリル製. ただし流路内腔部はガラス). この流路内で矩形管流路内腔部は全長 10mm, また助走区間は 0.1 mm 以下であり (せん断速度 1300 s^{-1} の場合, Boussinesq 理論による δ が 0.098 mm), 測定領域である内腔中央部において流れは充分発達しているといえる.

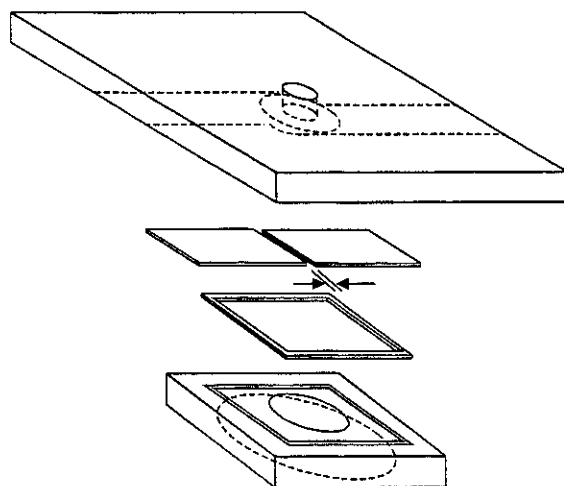


図2. 流路構成図

以上のように細動脈のモデルとしては, 円管ではなく矩形管を用いることになるが, 測定領域 ($z=0$ 近傍) において流れ場は充分, 円管流路内ポアズイユに近似できる (誤差 5% 程度) ため細動脈を模擬した濃度分布測定としても問題はなく (図3), また,

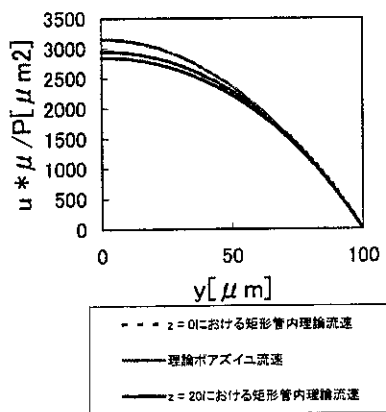


図3. 矩形管内理論流速分布と円管内ポアズイユ流速分布の比較。

流路幅 $200 \mu\text{m}$ に対して、人工血小板の大きさは 1000 分の 1 、実際の血小板でも 100 分の 1 であるので、壁面における曲率も十分に無視でき壁近傍の挙動解析も可能である。また、矩形管を用いることにより、円管と異なり、顕微鏡で管内を観察する際に屈折率など考慮する必要がなくなり、高い空間分解能での観察が可能となった。なお、流路内の座標は、主流方向（管軸方向）に x 軸、高さ方向に z 軸、管軸中心を原点とした。

灌流は水頭圧により行う。流路の上流と下流にリザーバを設けその高低差を変化させることによって流量を変化させる。この時水頭差を変化させたとき、流量を測定した結果を図4に示す。これより流量から流れ方向の圧力勾配を求め、それを矩形管流速の理論式に代入して壁せん断速度をもとめこれをパラメータとする。

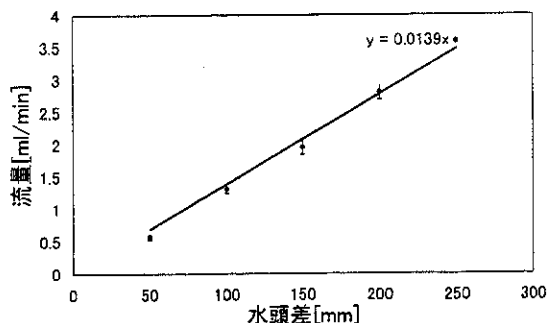


図4. リザーバとの圧力差と流量の関係

B-5. 人工血小板の可視化

rGPIb α -liposome, 及び control-liposome は、あらかじめローダミンが標識してある。これを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Oz with INTERVISION, NORAN 製。但し顕微鏡本体は TE200, Nikon 製) で対物レンズ倍率 $20\times$ 、開口数 0.45 として蛍光観察した。光源は Ar レーザであり、波長 568 nm で励起、 590 nm 以上の蛍光を拾い蛍光像を得る。

共焦点レーザー走査型顕微鏡のスリット幅は、 z 方向分解能が最も高くなるように設定した。(スリット幅 $15 \mu\text{m}$) このときの FWHM (full width at half maximum) を測定したところ $4.95 \mu\text{m}$ であった (図5)。

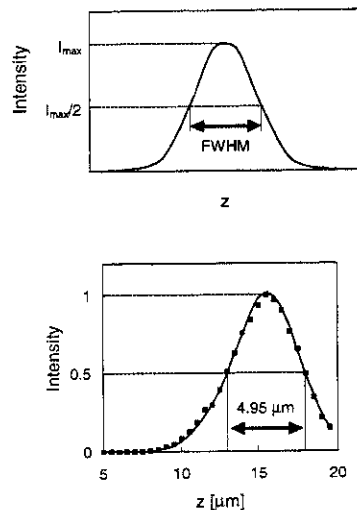


図5. スリット幅 $15 \mu\text{m}$ のときの FWHM (full width at half maximum) の測定

測定試料は DMSO (dimethylsulfoxide) に DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine) を溶かし濃度 10 mg/ml とした溶液を用いたもので、この溶液をカバーガラス上に垂らしスライドガラスで液層の厚さが無視できるくらいに押し広げ、これを共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

ここで FWHM とは一般的に用いられる共焦点レーザー走査型顕微鏡の高さ分解能として定義されるものである。任意の $x y$ 平面が光っているとき、その面を共焦点レーザー走査型顕微鏡で距離を変えながら観測し検知

する。そこで得られる光の強度の分布で強度が $1/2$ 以上となる z 軸の範囲を FWHM と定義する。

B-6. 画像処理

得られた画像は画像処理ソフトウェア NIH-Image (U.S. National Institute of Health 製) で処理し, liposome 粒子の抽出を行った。その手順を簡単に述べると, 得られた画像のコントラストを上げ粒子の輪郭を抽出し, 二値化してバックグラウンドを取り除く (図 6)。そうして得られた粒子像からその重心位置, および粒子径 (ピクセル数) を算出した。また, 得られた連続画像を全て重ね合わせ, その平均を取ると, 流路内腔部分は明るく, 壁部分は暗くなるので, これを二値化することによって, 壁面の座標を読み取った。

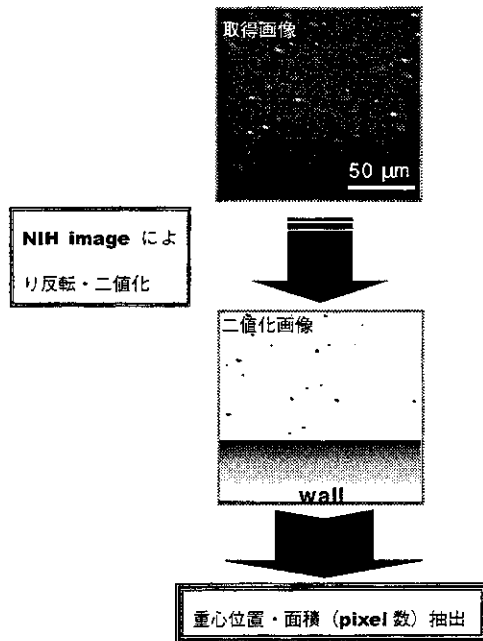


図 6. 画像上での粒子抽出

B-7. 測定

今回提供された, 人工血小板プロトタイプは保存中に一部の liposome の間でリン脂質膜が融合し凝集塊を形成してしまっており, 灌流液中の liposome の, 粒子径の

分布は不明であった。そこで, 蛍光像によって求められる粒子径を評価するため, 動的散乱装置 (SUB-MICRON PARTICLE ANALYZER MODEL N4SD, COOLTER 社製) によって, 直接粒子径を計測しその結果と比較した。

濃度分布測定は以下のような方法によって行った。画像処理によって全ての画像から粒子が抽出され, その重心位置が求められる。そこで, 粒子を壁面からの距離に応じて分類しその個数分布を求めこれを濃度分布とした。各実験では 200 枚の連続画像を取得しそれらを全て集計した。

各実験において連続画像を 500 枚取得した。すると画像処理によって各画像で粒子が抽出される。そこで隣接する 2 時刻の画像から対応する粒子を探し出し, これらをベクトルの始点と終点とすることによって流速ベクトルを求めた。具体的な手順は, まず最初の時刻において抽出された粒子の重心位置から, その位置での理論流速を求める。すると次の画像での移動場所が予想されるので, その予想地点を中心とした円内で抽出された粒子を全て候補とし, 中でも大きさが一致する粒子を同一粒子と対応付けた。(図 7)

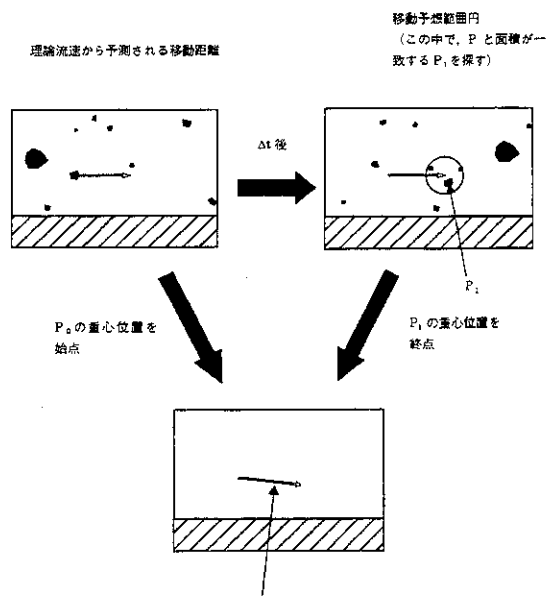


図 7. 流速ベクトルの決定方法

C. 研究結果

C-1. rGPIb α -liposome 凝集塊の形成

流路内腔壁面をコラーゲンでコーティングし、vWF (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 溶液 50 μl を加えた rGPIb α -liposome 灌流液を灌流させたところ、約一時間後、コーティングした壁面に凝集塊が形成された。一方、コーティングしていない壁面では、凝集塊は形成されなかった (図 8)。血小板膜糖蛋白 GPIb α はコラーゲンへの結合能を持たない。実際の血小板が GPIb α によってコラーゲン壁面へ粘着する場合、まず血中の vWF がコラーゲン壁面に粘着し、この vWF に GPIb α が結合することにより粘着する。従って、rGPIb α -liposome のコラーゲン壁面への粘着も vWF を介したものであり、凝集塊の形成がコラーゲン壁面で選択的であるのは、vWF のコラーゲンへの結合能のためだと考えられる。

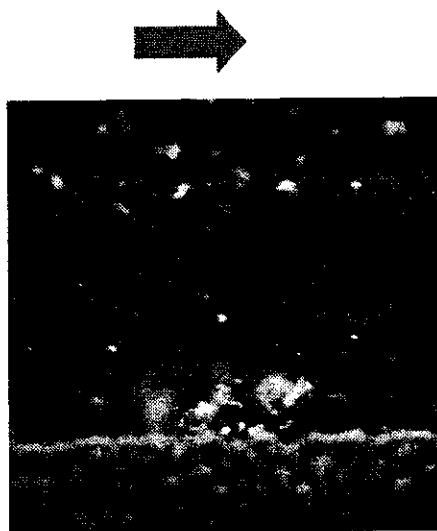


図 8. コラーゲン被覆された表面に粘着した rGPIb α -liposome の凝集塊

C-2. control-liposome の粒径分布

control-liposome の粒径分布を動的散乱により測定した結果、500 nm 付近に分布していた。また、その分布は 3 μm 付近まで続いていた。蛍光画像から抽出した分布はこれと同様の傾向を示した (図 9)。しかし、画像上で測定された分布はその時々の実験状態や、粒子抽出の際の、二値化の閾値により変化するため、実際の粒径

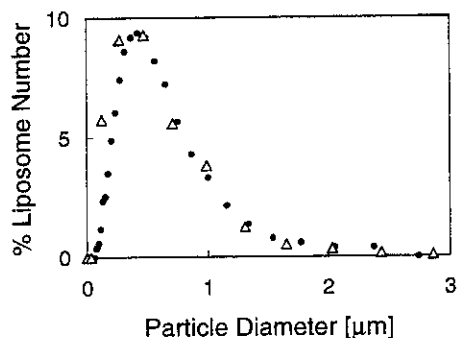


図 9. control-liposome の粒径分布

の値に変換することが出来なかった。けれども、分布の様子はほぼ一致していたことから蛍光画像の粒径分布は実際の分布を反映していると判断した。

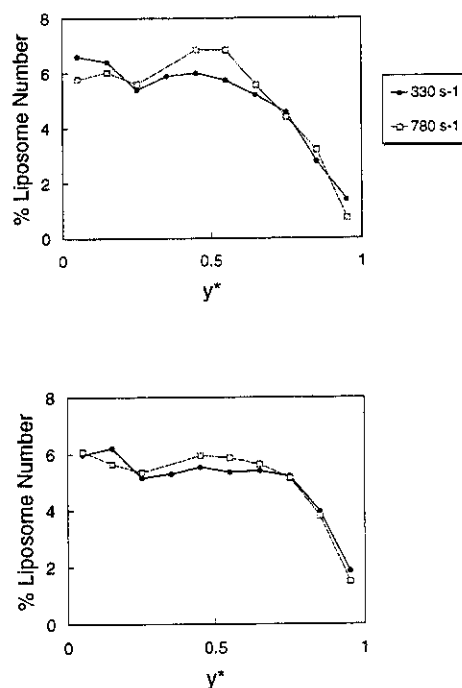


図 10. control-liposome (上図) と rGPIb α -liposome (下図) の粒子濃度分布

C-3. 流動中の粒子濃度分布測定

(1) 流動分布のせん断速度依存性

せん断速度 330 s^{-1} 及び 780 s^{-1} における流動分布の結果を図 10 に示す。横軸の y^* は、管軸からの距離 y を壁面間の距離で

規格化したものであり、 $y^*=0$ が管軸、 $y^*=1$ が管壁を表す。流動分布は $y^* = 0.5$ 付近でピークが見られるが、せん断速度が 780 s^{-1} の場合でその傾向が顕著であった。従来、Poiseuille 流中の剛体球では、管軸から $0.6R$ ($R =$ 管半径) の位置で平衡状態となることが知られている (Segré-Silberberg 効果) [32]。liposome はリン脂質膜であり剛体球とは異なるが、ここでも同様の現象が確認された。せん断速度が 330 s^{-1} で、この傾向が弱まるのは、本来リン脂質膜である liposome の動きは不規則であり、せん断速度が低いとその強くなるためだと考えられる。

(2) 血小板との相互作用

PRP を加えた場合の壁近傍における rGPIb α -liposome 及び control-liposome の流動分布を図 1 1 に示す。せん断速度は細動脈に合わせて 780 s^{-1} とした (細動脈では約 800 s^{-1})。Ca $^{2+}$ を加え血小板を活性化させた時を $t = 0$ として流動分布の経時的变化を測定したところ、control-liposome は $t = 0$ においてピークが $y^* = 0.85$ 付近であったのが $t = 10 \text{ min}$ にお

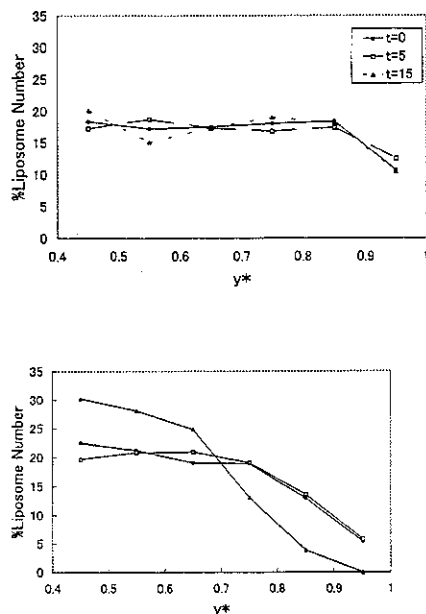


図 1 1. 活性化血小板と混合した時の control-liposome (上図) と rGPIb α -liposome (下図) の粒子濃度分布

いて $y^* = 0.75$ 付近に移動した。またその時、 $y^*=0.55$ 付近では分布が減り、逆に $y^* = 0.45$ 付近で増加した。一方、rGPIb α -liposome の流動分布は $t = 0$ から $t = 5 \text{ min}$ では殆ど変化が無かったのに対し、 $t = 5 \text{ min}$ から $t = 10 \text{ min}$ の間で急激に管軸方向に偏っていった。この分布を粒径により分類すると図 1 2 及び 1 3 の通りになった。rGPIb α -liposome において (図 1 2), $t=0$ では small (粒径約 $<500 \text{ nm}$) は $y^* = 0.75$ 付近でピークをもっていたが、large (粒径 $>500 \text{ nm}$) は $y^* = 0.45$ から、 $y^* = 1$ までなだらかに減少していた。これら、異なる分布をしていた両者は $t = 5 \text{ min}$ でその分布がほぼ等しくなり、 $t = 10 \text{ min}$ で壁近傍の分布がどちらも無くなった。

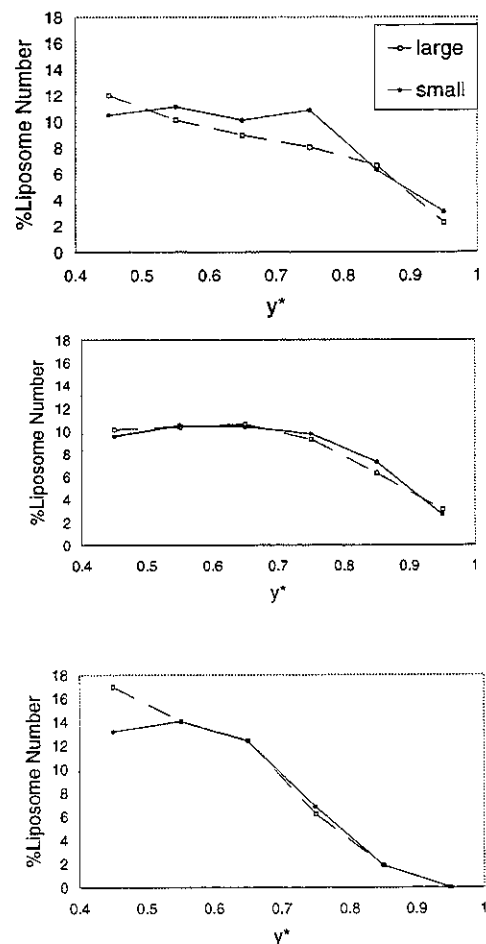


図 1 2. 粒径による rGPIb α -liposome 粒子濃度分布の変化、上から $t=0, 5 \text{ min}, 10 \text{ min}$

一方, control-liposome では (図13), small は時間的には僅かに変動したが, $t = 0$ と $t = 15 \text{ min}$ では同じ分布であった. large は時間的に変動は僅かであったが, $t = 15 \text{ min}$ で $y^* = 0.55$ 付近の分布が減少し, $y^* = 0.45$ 付近で増加した. したがって, control-liposome の流動分布の変化は large の分布の変化によるものであった. PRP を加えたことによって, 灌流液中には血小板と liposome という二つの粒子が存在する. control-liposome, rGPIb α -liposome 共に, $t = 0$ の分布において明確なピーク位置を持たないのは, 二つの粒子が混在しているためだと考えられる. しかし, 血小板を活性化させた場合, control-liposome と rGPIb α -liposome でその分布が異なるのは, rGPIb α -liposome が血小板膜糖蛋白を持っているために, 血中の vWF を介して活性化血小板と粘着を起こし, その影響で分布が管軸寄りになっているということが考えられる. また,

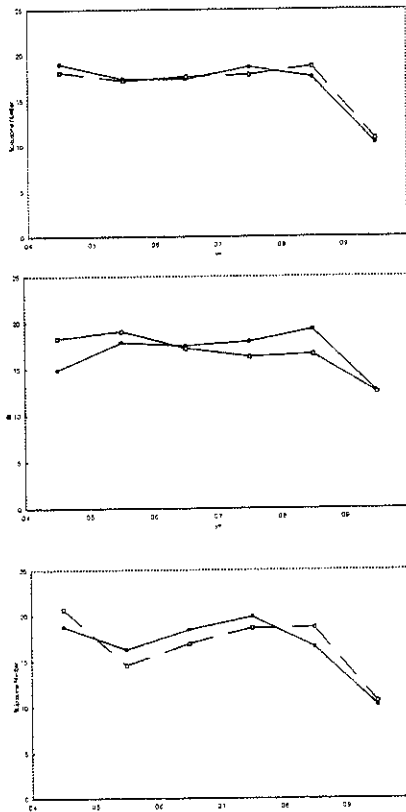
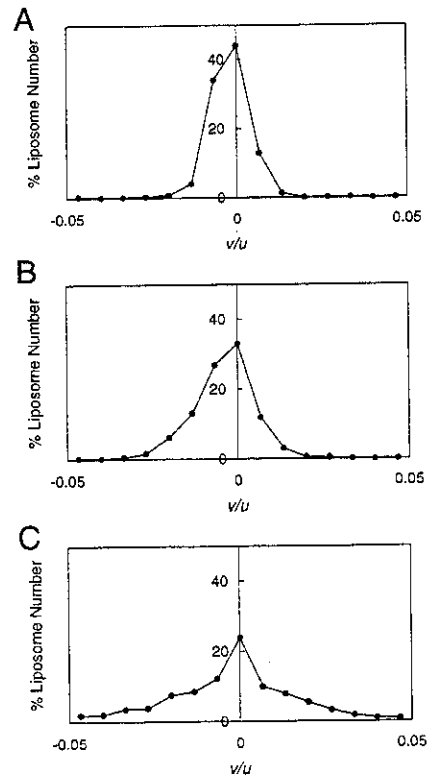


図13. 粒径による control-liposome 粒子濃度分布の変化、上から $t=0, 5 \text{ min}, 10 \text{ min}$

control-liposome の分布も僅かに変化しているというのは, 活性化によって血小板の形態が変化することや, 血小板同士が凝集塊を形成しその大きさが変わるために, 流れ場において血小板が受ける力が変化し, その分布が変化するため, liposome の分布も変化するのだと考えられる.

(3) 壁近傍におけるドリフト速度: v/u

ドリフト速度とは, 流速ベクトルの壁へ向かう方向の成分 v を主流方向成分 u で規格化したものであり, その粒子の主流方向からずれる角度を示している. - 方向が管壁へ, + 方向が管軸へ向かうベクトルである. せん断速度 330 s^{-1} において, control-liposome のドリフト速度を測定した結果を図14に示す. 図14で A, B, C と壁へ近づくとつれ, ピーク位置が低くなり, ドリフト速度が大きい, すなわち主流方向からずれるベクトルが多くなった.



A: $0.4 < y^* < 0.6$, B: $0.6 < y^* < 0.8$, C: $0.8 < y^* < 1$ それぞれにおけるドリフト成分 (粒子流速の主流方向成分 u に対するドリフト速度 v の割合) を示す.

図14. control-liposome 粒子のドリフト速度

図14でA及びBでは僅かに-方向の壁面へ向かうベクトルが多いが、ピーク位置は $v/u = 0$ にあり、Fig.16.のグラフはほぼ左右対称であると言える。すなわち、この時それぞれの測定領域における粒子の流入が等しい事から流動分布が定常であることがわかる。活性化血小板と混合させた rGPIb α -liposome の、壁近傍におけるドリフト速度を図15に示す。図15でAでは

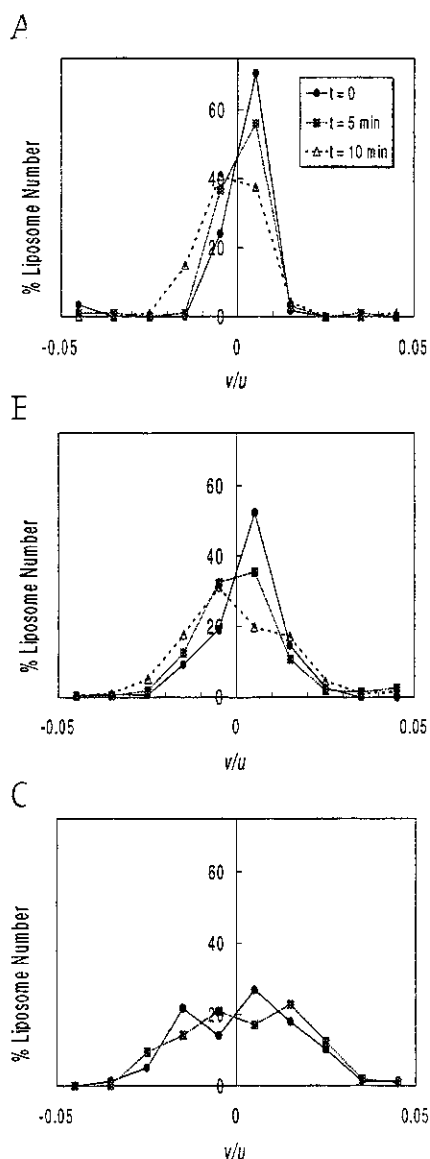


図15. 活性化血小板と混合させた rGPIb α -liposome の、壁近傍におけるドリフト速度のヒストグラム

ドリフト速度の小さいベクトルの割合が多いのに対し、B, Cと壁面に近づくにつれ、ドリフト速度の大きいものが増えていった。図15A, Bでは $t = 0$ で、+方向のベクトルが多かったのが $t = 5$ min, 10 minと-方向のベクトルが増加していた。また同時にドリフト速度のピーク値は $v/u = 0$ 近傍にあったのが、時間経過と伴になだらかになり、ドリフト速度の大きいベクトルが増加していった。図15Cでは、時間経過と伴に僅かに-方向のベクトルが増加したが、依然+方向のベクトルが多かった。Fig.17Cにおいて、 $t = 10$ minが無いのは、この時抽出できたベクトルが極端に少なかったためである。図15Cにおけるドリフト速度を流動分布測定時と同様に粒径で分類すると、 $t = 0$ では large (粒径 > 500 nm)は、+方向のベクトルが多く、ドリフト速度の小さいベクトルが多かったのに対して、 $t = 5$ minでは-方向方向のベクトルが増加し、また、ドリフト速度の大きいベクトルが多くなった。一方、smallは $t = 0$ では、管軸、管壁どちらに向かうベクトルもほぼ等しかったのが、 $t = 5$ minでは、largeとは逆に、+方向へ向かうベクトルが多くなった。

D. 考察 (rGPIb α -liposome の人工血小板としての有用性)

rGPIb α -liposome の流動分布は活性化血小板と共存したときに壁近傍で薄くなった。control-liposome では、この現象は見られなかったことから、liposome 膜上に血小板膜糖蛋白 GPIb α を固相化させたために生じた現象であると考えられる。血小板機能は血管壁で働くものであるから、その流動分布が壁から遠ざかるというのは有利な条件では無い。しかしながら rGPIb α -liposome は、流動化、可溶 vWF 存在中でコラゲンに選択的に凝集し、GPIb α があることによって血小板機能を果たすことができることを確認している。また、活性化血小板との相互作用も人工血小板の機能として重要な要因であるため、欠かすことが出来ない。従って、人工血小板 rGPIb α -liposome としては、活性化血小板との共存下で流動分布が壁から遠ざかるという現

象は避け得ないものである。本実験は、赤血球や壁面の影響を無くした条件下であり、更にこれらの影響を考慮した実験が必要となる。

rGPIb α -liposome の壁近傍における挙動は、粒子のドリフト速度によって評価した。ドリフト速度の大きい粒子の割合が多くなれば、それだけ粒子が様々な方向に移動していると言うことであり、人工血小板が人工血小板同士、または、血小板と多く相互作用を持ち止血機能を発揮できるということになる。活性化血小板と混在下での壁近傍における rGPIb α -liposome のドリフト速度は、その粒子径が大きい方が、壁面へ向かい主流方向からずれる粒子の割合も多かった。従って、人工血小板は、大きな凝集塊を形成するようにすれば、壁面との相互作用が頻繁に行われることになることが考えられる。

E. 結論

Liposome という微粒子のモデル細動脈内での微視的運動を観測する系を開発し、粘着性の糖蛋白 rGPIb α が表面に結合している liposome と結合していない liposome の微視的運動を観測した。rGPIb α -liposome 粒子は壁付近で、ドリフト速度が広い速度範囲で変動していることから、活性化された壁表面との強い相互作用が予想され、コラーゲン被覆した表面には凝集塊が粘着する様子を確認できた。これらの結果より rGPIb α -liposome は血小板機能を代替できる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表：準備中
2. 学会発表

(1) Tanishita, K. et al. , Wall shear stress distribution on the surface of realistic endothelial cell model, BED-Vol.43, 1999, Advances in Bioengineering, ASME, pp.39-40.

(2) Tanishita, K., Arterial blood flow and transport near the endothelial cells, Special lecture, Proceedings of the 4th Asia Pacific Conference on Medical and Biological Engineering, 1999, pp22-25.

(3) 谷下一夫ほか、人工血小板の運動の計

測、日本機械学会第12回バイオエンジニアリング講演会、講演論文集、(2000) pp.193-194.

(4) Tanishita, K. et al., Motion of artificial platlet in the model small artery, ICTAM 2000, (2000) (to appear)

G. 知的所有権の取得状況
特になし

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

人工血小板の最適設計に関する計算流体力学的研究

分担研究者 山口隆美 名古屋工業大学生産システム工学専攻教授

研究要旨 本年度の研究においては、これまで、血液などにおける、細胞成分と固体壁、あるいは、血流との相互作用の解析において応用された例がない離散要素法(Discrete Element Method)シミュレーションを、von Willebrand 因子を介する血小板形成および崩壊の過程の解析に応用することを試みた。この結果、血小板の血流中における局在などの力学的解析が可能となり、血小板の寸法および形状などと、血流の相互作用の関係を設計することが可能となった。

A.研究目的

血小板輸血の需要は急速に増加しており、人工血小板の開発は、わが国医療において緊急の課題である。開発される人工血小板は、血流中において血管壁の損傷箇所、出血部位に選択的に到達して止血の効果をあげることが必要とされているが、そのための最適な形状など設計のためのパラメタは不明である。本研究は、計算生体力学 (Computational Biomechanics) の手法により、人工血小板として使用する微小粒子と血流の相互作用を解析し、その形状、寸法などについての最適設計を行うための方法を開発し、これを実際の人工血小板の開発に応用することを目的として実施する。

B. 研究方法

これまでの血栓などに関する計算力学的解析では、血液を一様な Newton

流体あるいは非 Newton 流体、また、血管壁などのような生体固体要素を一様な弾塑性体、すなわち、連続体としてモデリングする連続体力学の手法によっている。連続体力学においては、解析される対象は、その物理的な性質の連続性を仮定する。しかし、実際の血液は、 μm のスケールで見るときには、赤血球をはじめとする細胞成分が浮遊する懸濁液であり、血管壁も、細胞、細胞間質、線維などが複雑に入り組んだ構造物である。

本年度の研究では、このような対象解析のために土木工学や粉体工学の分野で発達してきた離散要素法による取り扱いを von Willebrand 因子 (vWF) を介する血小板の粘着・凝集過程のシミュレーションに応用し、人工血小板の最適設計のための手法を開発することを目標とした。

離散要素法とは、たとえば、粉体工学などで典型的に見られるように、解析対象を、あえて、連続体と仮定

せず、相互作用する微小な粒子からなると考え、その振る舞いをシミュレーションする手法である。この方法は、粉体や土質など考案された本来の領域ばかりでなく、固体構造物における大きな変形や破壊などのシミュレーションにも応用されて大きな成功を収めてきた。

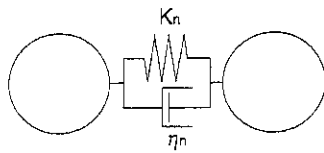


図 1(a)

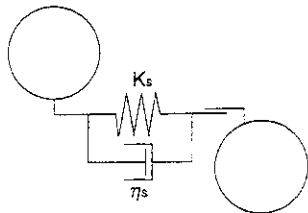


図 1(b)

本研究では、図 1 に示すように、血小板を離散的な要素、すなわち剛体要素でモデルし、血小板相互間の法線方向(a) および接線方向(b)の直接的力学作用として、衝突と摩擦を考えた。また、図 2 に示すように、血小板と血管壁においても同様に直接的力学作用を考えた。

粉体などにおける離散要素法では、離散要素相互の接触がない場合には力学的相互作用を仮定しないが、土壌などでは、ある程度接近した場合には相互作用が働くとする方が現実を反映するとされており、拡張離散要素法と呼ばれる方法が提案されているので、本研究でもこのような考え方を採用する。

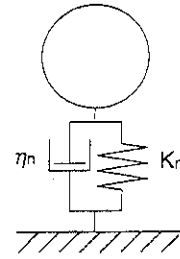


図 2(a)

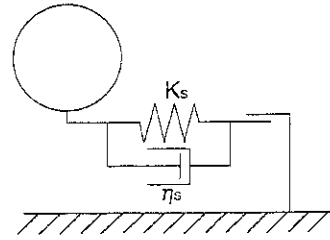


図 2(b)

したがって、このような比較的遠隔の相互作用を仲介する物質として、vWF を考え、これは、図 3 (a)(血小板および血管壁間)、(b) (血小板間) に示したように、張力のみを発生し、ある範囲の距離でのみ力学的相互作用を発揮すると考える。

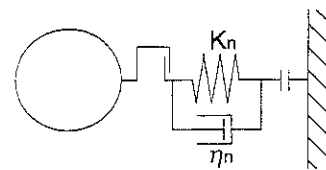


図 3(a)

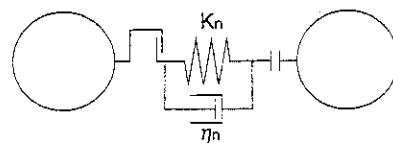


図 3(b)

さらに、流れと血小板の相互作用としては、流れのレイノルズ数が非常に小さいことを仮定して、流れ場におかれた円柱に働く力に関する Ossen の近似解を用いた。

これらの力を各粒子ごとに計算して、表面の法線方向と、剪断方向について総和をとり平行移動と回転の加速度を計算した。以後、順次、これを時間について陽に積分して、速度、位置を求め、粒子の配置を時間進行法で計算した。

C. 研究結果

図 4 は、vWF による遠隔の相互作用を考慮に入れない場合の血小板の粘着と凝集の仮定を模擬した結果の一例であり、図 5 には、vWF の効果を考慮にいれた場合の結果の一部を示す。前者では、血小板は、単独で凝集塊から分離して、血流によって押し流されていくが、後者では、血小板が単独ではなく、数個からなる小凝集塊を作って流れていることが示されており、本シミュレーションを用いることにより血流中の血小板血栓の形成過程と血流の相互作用を詳細に検討することが可能であることが示された。

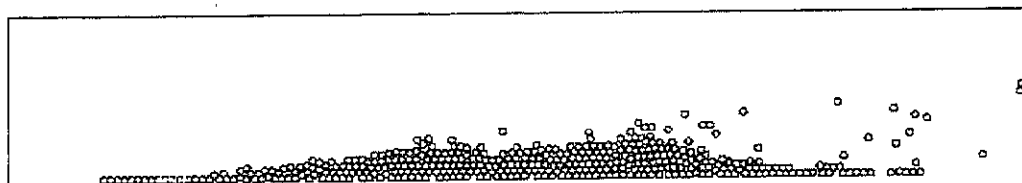


図 4 vWF の作用を考慮に入れない場合のシミュレーション結果

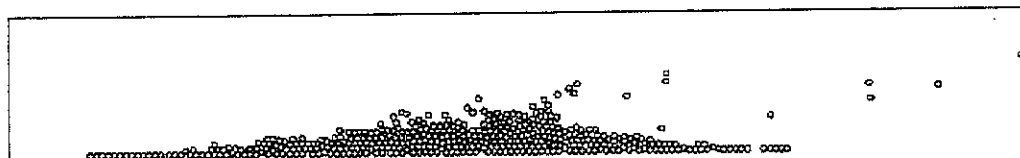


図 5 vWF の作用を考慮に入れた場合のシミュレーション結果

D. 考察

すでに、一昨年度および昨年度の報告書において再々指摘したように、

人工血小板がその機能を果たすためには、生理学および流体力学的には次のような条件が必要であると考えられる；

- (1) 人工血小板粒子が流血中において破壊されずに所定の生存期間中機能を発揮できる状態にあること。
- (2) 出血あるいは血管壁の損傷部位に集中して活性化状態に移行すること。
- (3) 必要とされる部位において、他の凝固因子と協同して、必要な寸法の血栓を形成し、止血を行うこと。
- (4) 非損傷部位などの血流中においては、安定で不必要な活性化を起こさないこと。
- (5) 設計寿命が尽きた場合、生体に害をなすことなく吸収あるいは排泄されること。

もとより、これらの条件の大部分は、生体組織としての血小板において、いかなる機構を通じて実現されているのか不明な点も多く、このような機構の解明と人工血小板の設計は平行して実施されねばならない。

本研究においては、設計された人工血小板粒子が血流中においてどのような力学的挙動を示すかを解析することを通じて逆に、生体由来の血小板の挙動の機構に対する理解もすすめようとするものであり、従来このような研究は実施されたことがない。従って、これまで知られていることから結果を積み上げる研究が必要であり、この意味で、一昨年度は、内皮細胞のモデリング、微小粒子のモデリングなどを行い、昨年度は、生成される血小板血栓に対する血行力学的影響を見積もることができた。本年度においては、血流の存在下に、粘着、凝集する血小板の力学シミュレーションを行うことが可能となり、今後の、人工血小板の最適設計のための計算力学的手法の開発において、準備が完了したと言える。

E. 結論

本年度の研究においては、拡張離散要素法(Extended Discrete Element Method)シミュレーションを、von Willebrand 因子を介する血小板形成および崩壊の過程の解析に応用した結果、血小板の血流中における局在などの力学的解析が可能となり、血小板の寸法および形状などと、血流の相互作用の関係を設計することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

① T. Yamaguchi, Y. Yamamoto, and H. Liu, "Computational Mechanical Model Studies on the Spontaneous Emergent Morphogenesis on the Cultured Endothelial Cells," *J. Biomechanics* 33(1) 115-126, 1999

② H. Miyazaki, H. Liu, and T. Yamaguchi, "Simulation of platelet adhesion using a discrete element method," *In Clinical Application of Computational Mechanics to the Cardiovascular System*, T. Yamaguchi (Ed.) Springer-Verlag, Tokyo, 2000, in print.

2. 学会発表

① 宮崎寿子、劉浩、山口隆美、"離散要素法を用いた血小板粘着のシミュレーション"、日本機械学会第12回バイオエンジニアリング講演会、2000.1.11-12、金沢市(日本機械学会講演論文集 No. 99-37, pp195-196, 2000)

業 績

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍または雑誌名（雑誌の時は、雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress; Role of bilirubin generated by the enzyme. <i>Circ. Res.</i> 85, 663-671	1999	Lippincott williams & wilkins printed	Hayashi S, Suematsu M et al:
Stage-specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 during embryogenesis in rats. <i>J Immunol.</i> 164, 2463-2471	2000	Am Associ of Immunol	Iizuka T, Suematsu M et al
Computational mechanical model studies on the spontaneous emergent morphogenesis on the cultured endothelial cells. <i>J Biomech.</i> 33(1) 115-126	1999	Elsevier Science Ltd	Yamaguchi T., et al
拡散要素法(DEM)を用いた血小板粘着のシミュレーション: Simulation of platelet adhesion using a discrete element method 第12回バイオエンジニアリング講演会論文集	2000	日本機械学会	宮崎寿子・山口隆美他
Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α -A potential substitute for platelet transfusion. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 261: 784-788	1999	Academic Press	Kitaguchi T, Murata M, Iijima K et al:
A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the β 3 subunit activates integrins α IIb β 3 and α v β 3. <i>Blood</i> 93 (8): 2559-2568	1999	Am Soc. Of Hematol.	Kashiwagi H, Handa M, et al:
Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Btk/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD23 crosslinking. <i>Blood</i> 95(5): 1663-1670	2000	Am Soc. Of Hematol.	Oda A, Ikeda Y, Handa M et al
Shear-dependent platelet response. <i>New Frontier in Vascul Biol. Thromb. Hemost.</i> 189-197	2000	Eibun Press.	Ikeda Y, Handa M, Murata M, Goto S
Total inhibition of high shear stress induced platelet aggregation by homodimeric von Willebrand factor A1-loop fragments. <i>Br. J Haemost.</i> 105, 1092-1100	1999	Blackwell Science Ltd	S Miura, Ikeda Y et al
Association between platelet glycoprotein Ib α genotype and ischemic cerebrovascular disease. <i>Stroke.</i> 30, 493-497	2000	Am Heart Associat Inc.	Sonoda A, Murata M, Ikeda Y et al
Association between diabetic retinopathy and genetic variations in α 2 β 1 integrin, a platelet receptor for collagen. <i>Blood</i> 95, 1560-1564	2000	Am Soc. Hematol.	Matsubara Y, Murata M, Handa M, Ikeda Y et al