

一方、平成11年度後半での我々の検討により、現行のGPIb-リポソームに用いられている組み換えGPIb α には分子構造に若干の問題があることが判明した。すなわち、天然の蛋白と比較し、C末端にGPIb α とは無関係のポリペプチド付着しており、この部分にあるシステイン残基による分子間ジスルフィド結合が形成されてGPIb α がdimerとなっている点である(図1)。従って平成12年度当初の研究計画として、(1) 組み換えGPIb α の最適化(最優先課題) (2) 導入膜蛋白を追加することによりliposomeに凝集機能を持たせる。 (3) 凝集能を有するリポソームのアッセイ方法の確立 (4) rGPIb α -liposomeのトロンビン結合能を挙げた。しかし特に(1)に関しては、組み換えGPIb α 分子が変更されるため、純化方法、分子安定性、vWF結合能が変化する可能性がある。よって最適化分子の作成とこの再評価などの基礎データの蒐集が大至急必要と考えた。

B. 研究方法と結果

従来使用していたpCDM8neoベクターを用いて組み換え体を作成すると、C末端停止コドンよりもN末端側の十数アミノ酸の部分で異常スプライシングが起こるため、停止コドンが働かず、スプライスにより新たに結合したベクター由来配列が翻訳され無関係なアミノ酸が付着することが判明した(図1)。これに対処するため、pCDM8neoベクターをpcDNA3.1に変更した。産生されたrGPIb α 蛋白は、Western blotting上、45KDaのmonomerであり、dot blottingでは4種類の抗GPIb α モノクローナル抗体と反応することが示された(図2)。またligand blottingにて、このrGPIb α 蛋白がリストセチン存在下でvWFと反応することが確認された(図3)。

図 2

Analysis of immunologic reactivity of the culture medium containig rGPIb α fragments

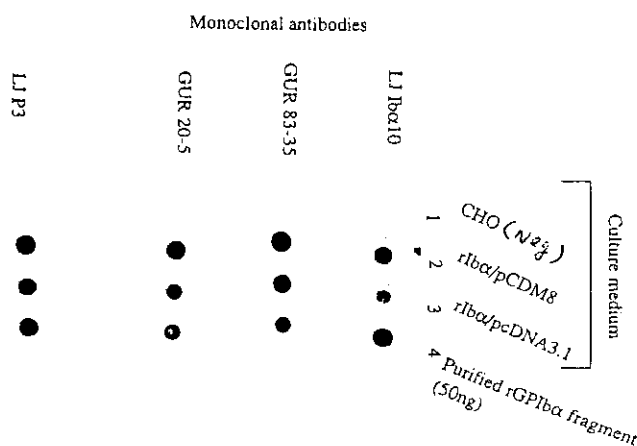
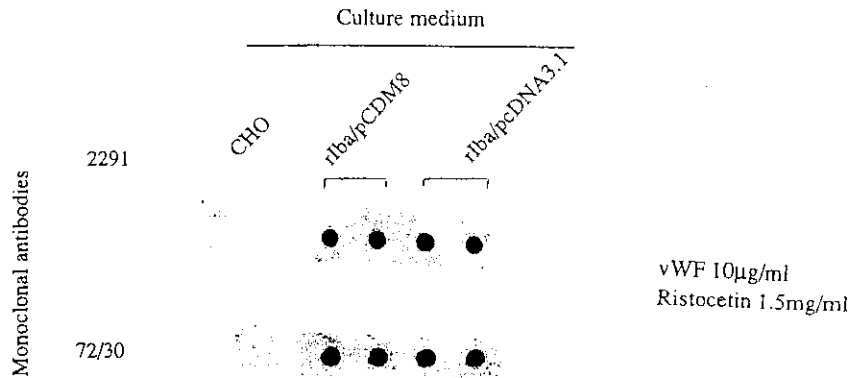


図 3

Binding of vWF to rGPIb α fragment



従ってpcDNA3.1で発現したrGPIb α 蛋白はvWF結合機能を有すると判断されたため、次に(1) pcDNA3.1による蛋白の量産と純化(於ウェルファイド株式会社)、(2) 新株rGPIb α 蛋白の詳細な機能評価、を同時進行で行った。

(1) pcDNA3.1による蛋白(新株)の産生量は、pCDM8neoを用いた蛋白(旧株)に比較し少ないこと、純化効率もかなり劣ることが判明した。この原因としては、DNAの導入効率の問題、産生後の蛋白安定性の問題、あるいは純化による不安定化、失活など考慮しなければならないが、後述のように純化による不安定化の可能性が高い。

(2) 新株rGPIb α 蛋白の機能：未純化の状態、新株rGPIb α 蛋白をメンブレンに固相化し、ブロッキングのあと¹²⁵I-vWFの結合を観察すると、リストセチン存在下、ポトロセチン存在下ともにvWFの結合が見られた。これは抗vWFで抑制されたことか

ら、特異的な反応であると思われた。しかし、新株rGPIb α 蛋白は旧株に比較し、同じ量のrGPIb α を固相化したにもかかわらずvWF結合量が少なかった(図4)。次に純化した新株rGPIb α 蛋白と¹²⁵I-vWFの反応を観察した。純化法は従来の方法と同じである。等量(500ng)のrGPIb α 蛋白をメンブレンに固相化し、新株と旧株を比較すると、新株ではリストセチンによる¹²⁵I-vWF結合が殆ど見られなかった(図5)。この原因は不明であるが、新株の純化段階での失活が疑われた。また、preliminary dataであるが、Marcheseらの方法で純化rGPIb α 蛋白をlatex beadsに固相化し、flow cytometerで表面抗原を検索すると、構造認識性のモノクローナル抗体であるAN51は、旧株には反応したが新株には反応しなかった。同様にlatex beadsのリストセチン凝集は旧株では認められたが、新株では認められなかった。

図 4

未純化rGPIb α へのvWFの結合

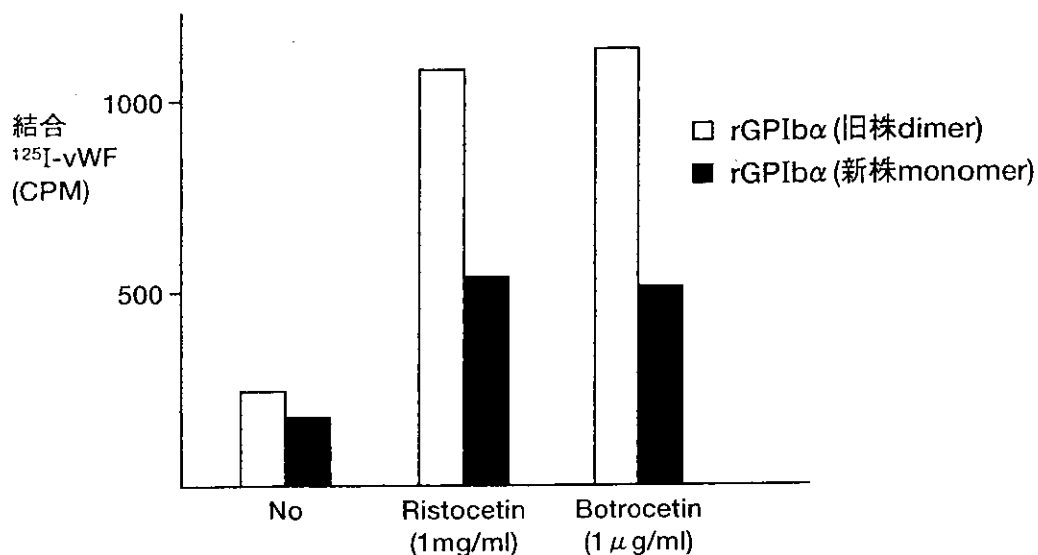
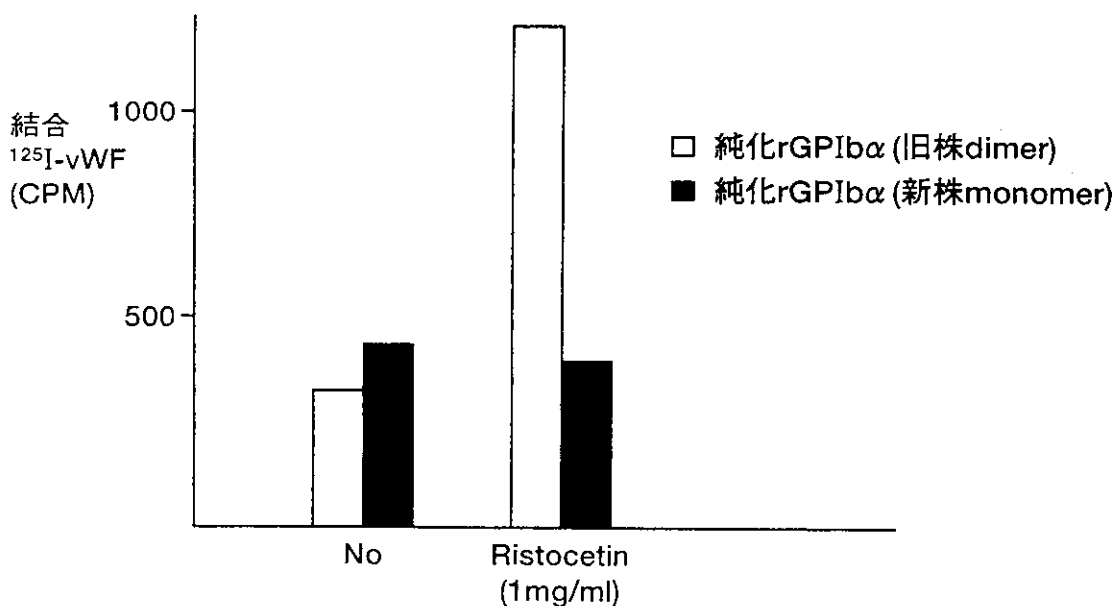


図 5

純化rGPIb α へのvWFの結合



C. 考案と結論

pcDNA3.1で発現されたrGPIb α 蛋白はvWF結合機能を有するが、その活性はpCDM8neoで発現された蛋白のそれと比較

して弱いと思われる。さらに純化過程での活性喪失が示唆される。この原因として
(1) dimerのほうが蛋白の安定性がよい、または純化段階での失活にresistantである

(純化にはトロンビンカラムを用いるが、トロンビン結合部位とvWF結合部位は近接している)、(2) C末端のポリペプチドが防御的に働く、等考えられる。しかし生体内投与を考えればC末端のポリペプチドは好ましくないと考えられる。よって天然配列のままのrGPIb α (1-302)を作成しこのC末端にCys導入するか、既知の生体蛋白との融合蛋白として発現し、この既知の生体蛋白の部分でdimerizationを起こさせるような設計を今後の課題としたい。一方、in vitroやin vivoの機能評価には当面の間、旧株のrGPIb α 蛋白を用いるのが望ましいと考えられる。

D. 研究発表

論文発表

村田 満：人工血小板（血小板代替物）— 開発の歴史 血液・免疫・腫瘍 メディカルレビュー 6 (1), 35-39, 2001

村田 満：血小板代替物の種類と製法 土田英俊編 人工血液—現状と展望— 1.血球代替物 医薬ジャーナル社 大阪 (印刷中)

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

平成12年度分担研究報告書

人工血小板の開発に関する研究

フローシステムでの血小板粘着測定法の確立とその応用に関する研究

分担研究者 半田 誠 慶應義塾大学医学部輸血センター助教授

研究要旨 止血機構において、破綻した血管内皮下組織局所への血小板粘着に引き続き、血小板同士が次々と凝集（血小板—血小板接着）して血小板血栓が形成される。そこで今回、*in vitro* 血液還流系を用いて、流動条件下で血小板凝集を測定する系を確立するとともに、粘着血小板を標的としてどのようなメカニズムで血小板が次々と誘導されるのかを検討した。その結果、1) 血流条件下での血小板の凝集あるいは血栓形成には、GPIb/IXが tethering 分子として、また GPIIb/IIIa が非可逆的接着あるいは膠着を仲介する分子として重要であり、2) GPIb/IX ならびに GPIIb/IIIa の主要な標的は粘着血小板上に存在する vWf であり、3) 低血流条件下でも GPIb/IX は tethering 分子として必須であり、その標的は vWf ばかりでなく粘着血小板表面へ表出した P-セレクチンであること。そして両者は、GPIb/IX のリガンドとして相補的に役割を担っているある、ことが示唆された。人工代替物の不可欠な機能として、残存している患者血小板を如何に止血局所に有効に誘導させ、血小板凝集塊を形成させるかである。この血小板人工代替物を設計するに当たり、GPIb/IX と vWf は不可欠であることが明らかとなり、本研究は血小板機能を代替する人工物の創製に重要な情報を与えるものである。

A. 研究目的

平成9、10年度の研究で、血小板の粘着とそれに続く血小板血栓（凝集）の形成など血小板機能を代替する人工物の機能解析には、1) *in vitro* の流動システムが必須であること、2) 我々が独自に開発した微量質量センサーである

水晶振動子を組み込んだ流動系（QCM法）がそれに対応して有用であること、3) 血小板膜受容体の GPIb-IX 複合体がフォンヴィルブランド因子への結合を介した tethering 分子としていかなる血流条件下でも止血局所に血小板を誘導し、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンがコラゲン受容体としてその後の

血小板の非可逆的接着（粘着）を有効に仲介すること、4) $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンが必ずしも細胞の活性化に依存しなくても十分その機能を発揮すること、5) したがって、最低限これら2種類の血小板膜受容体の機能を組み込んだシステムがあれば血小板人工創製物の作製が可能であること、を明らかにしてきた。さらに、平成11年度では、この初期反応（血小板—基質の接着すなわち粘着反応）には、PI-3キナーゼで仲介される脂質リン酸化反応、蛋白リン酸化反応、アクチン再重合などの細胞変形能に関連した細胞内刺激伝達系が重要で、これらの細胞内反応が血流の中で血小板血栓の安定性を保持するのに必須である可能性を示した。止血機構において、破綻した血管内皮下組織局所への血小板粘着に引き続き、血小板同士が次々と凝集（血小板—血小板接着）して血小板血栓が形成される。そこで今回、流動条件下で血小板凝集を測定する系を確立するとともに、粘着血小板を標的としてどのようなメカニズムで血小板が次々と誘導されるのかを検討した。

B. 研究方法

1) 蛍光顕微鏡を使用した流動条件下血小板粘着・凝集連続解析法：前回までと同様、メパクリンもしくは DiO_6

で標識した血小板の粘着を倒立顕微鏡（TE300-2、ニコン）下、37°Cの恒温槽内のフローチェンバー灌流部に組み込んだ。3.5mlの抗凝固剤PPACK加全血を種々の速度で循環させた灌流系を用いて連続観察し、それを画像解析装置（ARUGUS-50/ICCD、浜松フォト）で解析した。

2) 血小板表面への血小板接着：Handaらの報告（Thromb Haemost 73:521-528, 1995）に基づいて、洗浄血小板（20万/ μl ）をコラーゲン（酸可溶性、タイプI）固相化ガラス板と37°C、60分、1 μM MPGE1存在下で孵置して作成した、血小板固相化表面へ、 DiO_6 （終濃度 1 μM ）を加えた全血を還流させ、標識血小板の接着動態を蛍光顕微鏡下で解析した。

3) 抗体：流動条件下での血小板凝集に関与する接着受容体を同定するために以下のマウスモノクローナル抗体を使用した。抗GPIb/IX抗体：GUR83-35、抗GPIIb/IIIa抗体：YM207（山之内製薬より供与）、抗vWf抗体：NMC-4（奈良医科大学、藤村吉博博士より供与）、抗ラットP-セレクチン抗体：S789G（抑制抗体）、S84F（非抑制抗体）、（いずれも、日本たばこ産業より供与）。

C. 研究結果

光学顕微鏡下での形態観察では、作

成した血小板基板は一層の均一な粘着血小板に覆われ、以前の報告に基づいた作成条件等に矛盾はなかった。全血を用いた流動条件下（2、400/s）コラーゲンへの血小板粘着（QCM法、粘着占有率）に及ぼす各種血小板阻害薬の影響を観察した結果（図1）、還流開始後60秒までは鮮明な血小板接着現象が観察できた。そして、十分量の抗 GPIIb/IX 抗体（GUR83-35、20 $\mu\text{g/ml}$ ）、抗 GPIIb/IIIa 抗体（YM207、10 $\mu\text{g/ml}$ ）存在下で、この接着現象は著明に抑制されることがわかった。そして、その程度は血流条件が速くなるほど増大した（図2）。

図1. 固相化血小板表面への流動条件下血小板粘着と抗血小板膜受容体抗体の影響、蛍光顕微鏡による観察

流動状態下における固相化血小板表面への血小板粘着

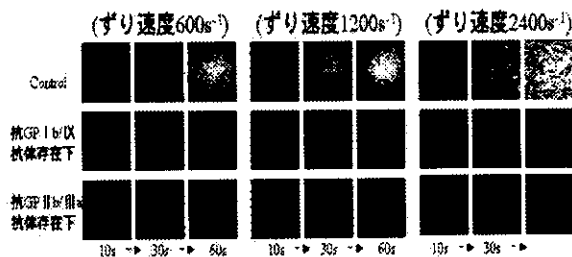
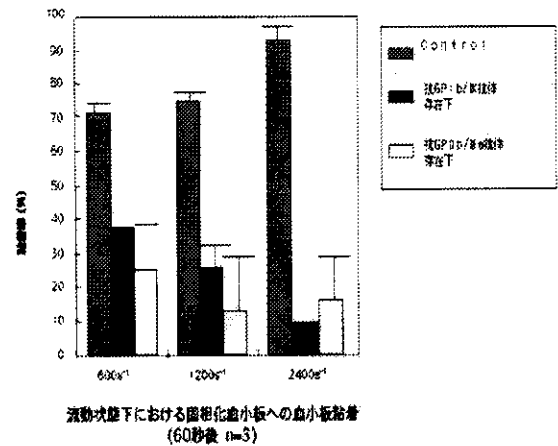


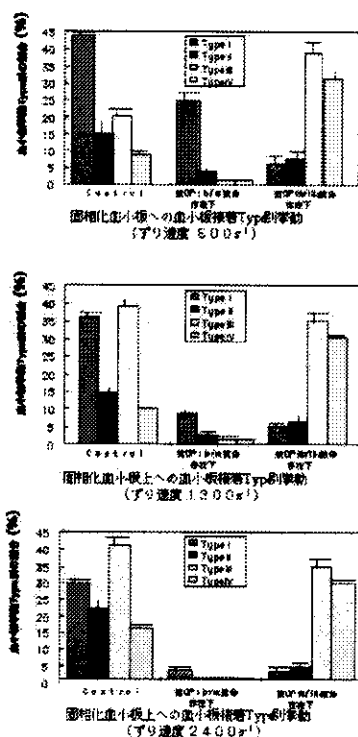
図2. 血小板固相化表面への血小板接着に及ぼす抗血小板膜受容体抗体の影響



血小板の粘着現象は、先行する可逆性の tethering/rolling とその後起こる不可逆的な接着（膠着、firm adhesion）に分けられる。そこで、これらの抗体存在下で、これら2種類の接着現象がどのような割合で起こっているかを検討した（図3）。接着現象を以下のように定義した。タイプI：tetheringの後そのまま膠着するもの、タイプII：rollingの後膠着、タイプIII：一瞬の tethering のあと画面より消失するもの、タイプIV：rollingした後画面より消失するもの。抗 GPIIb/IX 抗体存在下では、強く接着が抑制されたが、タイプIあるいはIIの接着が、とくに低血流条件下では残

存していた。
 一方、抗 GPIIb/ IIIa 抗体存在下では、各血流条件下でもタイプ I あるいは I I の接着が強く抑制されたが、タイプ I I I あるいは I V の接着はむしろコントロールに比して亢進していた。タイプ I あるいは I I の接着の抑制効果は血流速度の増加とともに増大する傾向にあった。

図3. 固相化血小板表面への血小板接着の挙動、抗血小板膜受容体抗体の影響

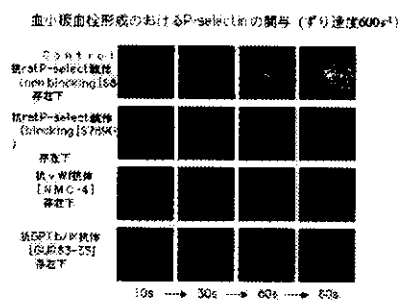


血小板固相下表面への血小板の接着は、

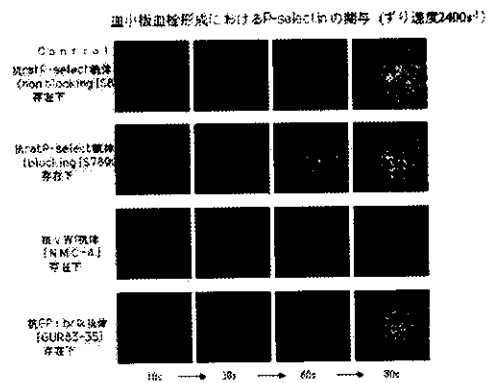
GPIb/ IX が thetering & rolling 分子として、また GPIIb/ IIIa が膠着を誘導する分子として機能することがわかった。すなわち、この血小板血栓の形成は v W f 表面への血小板接着の挙動と極めてよく類似していた。そこで、血小板固相表面のどのような分子を標的としているのかを抗体を使用して解析した (図4)。

図4. 血流条件下血小板表面への血小板の接着に及ぼす抗P-セレクチン、抗vWf抗体の影響、蛍光顕微鏡による観察

1) 低血流条件、600/ s

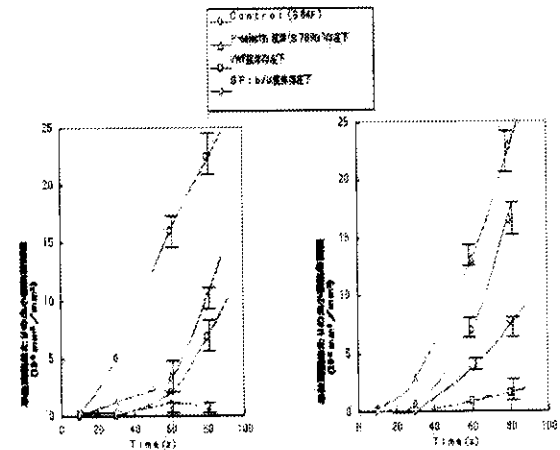


2) 高血流条件、2400/ s



抗 vWf 抗体、NMC-4 はその飽和濃度 (10 $\mu\text{g/l}$) で、血流条件にかかわらず強く血小板接着を抑制したが、その効果は高血流条件でより大きい傾向を示し、抗 GPIIb/IIIa 抗体の抑制効果に類似していた。一方、抗 P-セレクチン抗体、S789G (10 $\mu\text{g/l}$) は、600/s の低血流条件下で、血小板接着を強くはないが有意に抑制した、しかしながら、高血流条件下ではその効果は明瞭では無かった。低血流条件下での S789G ならびに NMC-4 の抑制効果 (60、80 秒後) はともに、GUR83-35 の抑制効果に及ばなかった (図 5)。

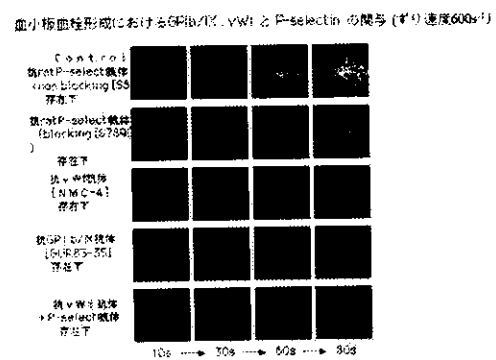
図 5. 血流条件下血小板表面への血小板の接着に及ぼす抗 P-セレクチン、抗 vWf 抗体の影響



P-selectin 阻害による血小板凝集抑制効果 (左図: せんり速度 600 s^{-1} 、右図: せんり速度 2400 s^{-1})

そこで、S789G ならびに NMC-4 を同時に添加すると、その抑制効果は相加的となり、GUR83-35 の抑制効果に匹敵するようになった (図 6)。

図 6. 低血流条件下での血小板固相化表面への血小板の接着における P-セレクチンの関与、蛍光顕微鏡での観察



D. 考察

血小板はコラーゲンなどの露出した止血局所に集中して、その場に粘着し、

さらに仲間同士が次々と凝集して、血小板血栓を形成し、止血反応の進行を促す。血小板凝集に関しては、液相では、アゴニスト惹起血小板凝集やズリ応力惹起血小板凝集を観察することで成されてきた。しかしながら、実際の生体内での止血局所では、粘着して固相化した血小板を標的とした凝集現象が基本と考えられる。そこで、このような生体内の環境をシュミレートすべき、血流条件下で血小板固相化表面への血小板の接着すなわち凝集を解析する実験系を確立した。この現象は、血流速度の増加に依存して、抗 GPIb/IX ならびに抗 GPIIb/IIIa 抗体で著明に抑制されたことから、従来の血小板粘着（血小板と基質の接着）における GPIb/IX ならびに GPIIb/IIIa 分子の果たす役割と極めて類似していることがわかった。そして、少なくともそれらの接着分子受容体の標的は、おそらく血小板表面に存在する vWf と考えられた。さらに興味有ることに、たとえ血流速度が遅くとも、GPIb/IX は主要な tethering 分子であることである。通常の vWf 表面への血小板粘着で、同様の低血流条件下では、GPIb/IX のような tethering 分子の助けが無くとも GPIIb/IIIa を介した非可逆的接着は起こる。その理由として、粘着血小板表面の空間的構造が vwf 分子を介した血小

板の接触に tethering 分子の助けを必要とするのかもしれない。

GPIb/IX の標的として、vWf 以外に活性化血小板上に表出する P-セレクチンが近年新たに同定された。さらに、P-セレクチンがアゴニスト惹起性の血小板凝集に少なからず関与している可能性が報告された。そこで、抗体を用いて血流条件下での血小板凝集へのこの分子の関与を検討した。その結果、低血流条件下で、P-セレクチンが血小板の凝集に関与している可能性が明らかとなった。そして、その役割は、GPIb/IX のリガンドとして、vWf と相補的に存在することが考えられた。

人工代替物の不可欠な機能として、残存している患者血小板を如何に止血局所に有効に誘導させ、血小板凝集塊を形成させるかである。この血小板人工代替物を設計するに当たり、GPIb/IX と vWf は不可欠であることが明らかとなった。

E. 結論

1. 血流条件下での血小板の凝集あるいは血栓形成には、GPIb/IX が tethering 分子として、また GPIIb/IIIa が非可逆的接着あるいは膠着を仲介する分子として重要である。

2. GPIb/IX ならびに GPIIb/IIIa の主要な標的は粘着血小板上に存在する

vWf である。

3. 低血流条件下でも GPIb/IX は tethering 分子として必須であり、その標的は vWf ばかりでなく粘着血小板表面へ表出した P-セレクチンである。そして両者は、GPIb/IX のリガンドとして相補的に役割を担っている。

F. 研究発表

<論文>

1) Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y, Suematsu M: Immunoneutralization of glycoprotein Ib α attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ Res* 86:1031-1037、2000

2) Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y: Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 270: 755-760,2000

研究要旨

pH と温度の変化からリコンビナントアルブミンを分子間でジスルフィド結合させてアルブミン重合体を調製した。重合反応中のアルブミン溶液の濁度変化を利用した制御により、アルブミン重合体の粒径を数十 nm から数十 μm まで調製可能であった。N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) を用いて、血小板膜蛋白質のリコンビナント体である rGPIIaIIa 複合体や fibrinogen(fbg)をアルブミン重合体に結合させた。rGPIIaIIa-アルブミン重合体は流動下においてコラーゲンを特異的に認識し、また fbg-アルブミン重合体は活性化血小板に発現した GPIIb/IIIa を認識し、残存血小板を巻込んだ凝集塊を形成することを確認した。

A. 目的

本研究では蛋白質高分子量体としてアルブミン重合体を対象とし、粒径が数十 nm から数十 μm のアルブミン重合体の調製法を確立する。血小板膜蛋白質のリコンビナント体である rGPIIaIIa 複合体または血液凝固関連蛋白質である fibrinogen(fbg)を最小限の修飾により結合させた重合体の流動下における機能評価を行い、血小板代替物としての検討を行なう。

B. 方法

1. アルブミン重合体の調製と粒径制御

250mg/mL リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA、ウェルファイド社製)を純水に対して 24 時間透析し、保存剤を除去した。生食にて希釈した 10mg/mL rHSA 溶液 25mL に対して 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液を 800 μL 加えて、10 分間攪拌して pH10.65(23 $^{\circ}\text{C}$)とした。80 $^{\circ}\text{C}$ にて 10 分間加熱後、3 $^{\circ}\text{C}$ の氷浴中にて 10 分間冷却した。これに 0.1M 塩酸水溶液 1mL を滴下して pH6.02(23 $^{\circ}\text{C}$)とした後、40 $^{\circ}\text{C}$ で攪拌した。過剰のヨードアセトアミドを 20mg 加えリン酸緩衝液(PBS、pH7.4)に対して透析を行いアルブミン重合体を調製した。40 $^{\circ}\text{C}$ での分散液の攪拌によるアルブミン重合体の成長を 700nm の吸光度($\Delta\text{O.D.}$)の増大として検出し動的散乱法による粒径分布の測定結果との相関を求めた。

2. rGPIIaIIa-、fbg-アルブミン重合体の調製

アルブミン重合体分散液 ([HSA]=16mg/mL、pH7.4) 5.0mL に対して 10.9mM N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)

propionate (SPDP)エタノール溶液を 50 μL 加え、22 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間攪拌した。ゲルろ過 (Sephadex G-25、10mm ϕ x 700mmh)にて未反応 SPDP と副生成物を除去して、11mL のピリジルジスルフィド-アルブミン重合体 (PD-アルブミン重合体、[HSA]=9.0mg/mL) を得た。

rGPIIaIIa または fbg を PBS(pH7.4)に溶解させ、仕込比で 1.5 倍モルとなる様に SPDP を加えて、22 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間振とうした。続けて 1M DTT 溶液を終濃度で 20mM となる様に加えて 22 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間振とう後、ゲルろ過にてチオール基導入 rGPIIaIIa、fbg を分離した。これを PD-アルブミン重合体分散液と混合し、25 $^{\circ}\text{C}$ にて振とうを行ない rGPIIaIIa-または fbg-アルブミン重合体を合成した。rGPIIaIIa、fbg の結合量は、ELISA 法により決定した。

3. 再構成血液の調製方法

血液を 2.2g/dL クエン酸ナトリウム、0.8g/dL クエン酸と 2.2g/dL グルコースから構成される酸-クエン酸-デキストロース溶液(ACD 溶液)と体積比 10:1 で混合、100g で 15 分間遠心分離して、platelet-rich plasma(PRP)を除去し、同量の ACD 混合生理食塩水(10g/dL、ACD-saline)に分散させた。同操作を再度行なった後、2200g で 10 分間遠心し、ACD-saline に再分散後、同操作を行ないパフィーコートを完全に除去した。Hct70.7%、血小板数 $1.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ の再構成血液を調製した。循環用再構成血液は Hct40%に調整して使用した。

4. コラーゲン基板の調製方法

コラーゲン I-A(3.0mg/mL、Cellmatrix™、新田ゼラチン)を5°CのPBS(pH7.3)に分散させ、30μg/mL コラーゲン分散液を調製し、ガラス板(直径 25mm)を5°Cにて8時間浸漬後、室温にて2g/dLBSA 溶液中で2時間静置し、PBSで洗浄後使用した。

5. 血小板固定化基板の調製法

PRP に ACD 溶液を混合し prostaglandin E₁(PGE₁、終濃度 1mM)を添加後、2200g で7分間遠心し、上清を除去後、RCD 溶液(1mM PGE₁)で再分散させた。同操作を再度行なった後、H-T buffer で再分散し血小板数 $2.0 \times 10^5/\mu\text{L}$ の洗浄血小板溶液を調製した。上記の方法で調製したコラーゲン基板上に洗浄血小板溶液を展開し、37°C、1時間静置し、H-T buffer で洗浄後使用した。

6. 流動下での蛍光顕微鏡観察

再構成血液 5mL にローダミンまたは FITC 標識 rGPIIb/IIIa-、fbg-アルブミン重合体を混合後([HSA]=0.02g/dL)、37°Cにて10分間静置し、蛍光顕微鏡を用いて CCD カメラを通して観察した。再構成血液の流動中、チャンバー内の温度は37°Cに保持した。

C. 結果

1. アルブミン重合体の粒径制御

アルブミン溶液の40°Cでの攪拌により濁度上昇が観察され、アルブミン重合体の粒径成長が確認できた(図1)。 $\Delta O.D.$ が 0.1 ± 0.03 となった分散液の粒子径は $62 \pm 20\text{nm}$ であり、 $\Delta O.D.$ が 0.4 ± 0.1 となった分散液を PBS に対して透析後、12000rpm にて5分間遠心分離した上清の粒径分布は $310 \pm 50\text{nm}$ であった。 $\Delta O.D.$ が 1.8 ± 0.2 となった分散液を PBS に対して透析後、2000rpm にて5分間遠心分離した上清を更に6000rpm にて5分間遠心分離した沈殿を PBS に再分散させて得られる粒径分布は $1800 \pm 200\text{nm}$ であった。また、この上清を更に9000rpm にて5分間遠心分離した沈殿を PBS に再分散させると、 $800 \pm 250\text{nm}$ のアルブミン重合体が得られた(図2)。

2. rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体の機能評価

流動下において rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体はコラーゲン基板に不可逆的に粘着し、

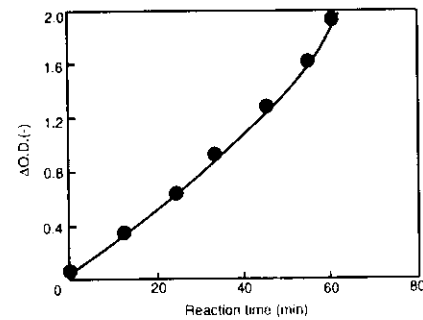


図1 40°Cにおけるアルブミン溶液の濁度変化

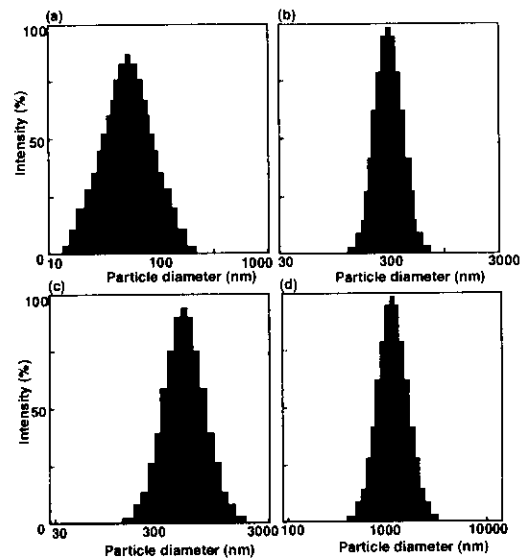


図2 アルブミン重合体の粒径分布 (a) $62 \pm 20\text{nm}$, (b) $315 \pm 50\text{nm}$, (c) $800 \pm 250\text{nm}$, (d) $1800 \pm 200\text{nm}$

抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体の添加により rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体の粘着が抑制されたことから rGPIIb/IIIa-コラーゲン間の特異的相互作用であることを確認した(図3)。また、ずり速度を変化させて同様の観察を行なったところ、ずり速度が大きくなるにつれて、rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体の粘着数は減少し、ずり速度 2400s^{-1} ではほとんど粘着しなかった(図4)。さらに、rGPIIb/IIIa の結合量を変化させた rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体についても同様の観察を行なったところ、結合量の増大とともにコラーゲン基板への結合数は増加した(図5)。

また、アルブミン重合体と rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体の血小板凝集に与える影響を調べたところ、アルブミン重合体ではコラーゲン添加による血小板凝集を阻害しない

が、rGPIIa-アルブミン重合体では血小板凝集を阻害することが明らかとなった。これは、添加したコラーゲンと rGPIIa-アルブミン重合体の結合により血小板同士の凝集が抑制されたためと考えられる (図6)。

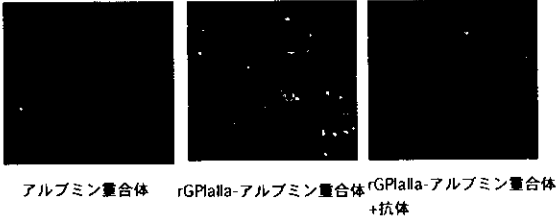


図3 rGPIIa-アルブミン重合体とコラーゲンとの特異的相互作用(ずり速度350s⁻¹)

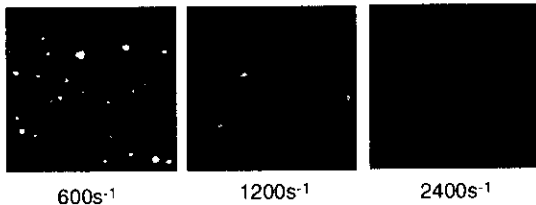


図4 各ずり速度におけるrGPIIa-アルブミン重合体とコラーゲンの相互作用の相違

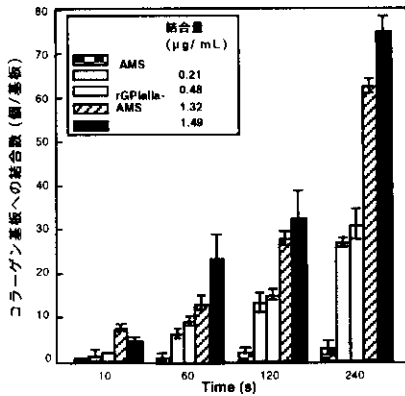


図5 結合量の異なるrGPIIa-アルブミン重合体のコラーゲン基板への結合数評価

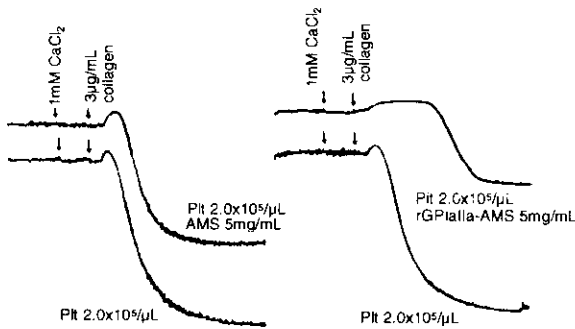


図6 アルブミン重合体のヒト血小板凝集能に及ぼす影響

3. fbg-アルブミン重合体の機能評価

流動下(ずり速度 350s⁻¹)においてアルブミン重合体は血小板固定化基板にほとんど粘着せず、fbg-アルブミン重合体では血小板固定化基板に不可逆的に粘着した。抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体の添加により fbg-アルブミン重合体の粘着は抑制され(図7)、さらに Ca²⁺(2mM)の存在下のみ血小板固定化基板へ粘着したことから(図8)、活性化血小板上に発現する GPIIb/IIIa への特異的な粘着であることを確認した。また、ずり速度の増大と共に fbg-アルブミン重合体の粘着数が減少し、高ずり速度下では血小板固定化基板に対して粘着しにくいことを確認した(図9)。

次に fbg-アルブミン重合体存在下における残存血小板挙動を観察した。血小板数 5.0x10⁴/μL では残存血小板は血小板固定化基板上にほとんど粘着せず、fbg-アルブミン重合体の添加により残存血小板の粘着誘導が確認された。更に fbg-アルブミン重合体濃度の増大により、粘着 fbg-アルブミン重合体数が増大し、固定化血小板基板への血小板の粘着数が増大したことが明らかになった (図10)。

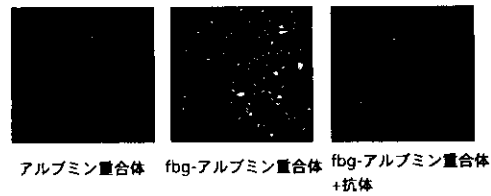


図7 fbg-アルブミン重合体の血小板固定化基板との相互作用

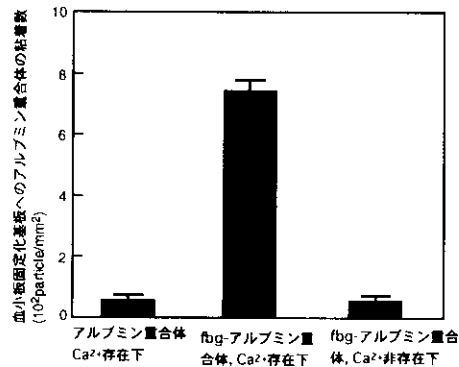


図8 Ca²⁺有無によるfbg-アルブミン重合体の粘着能

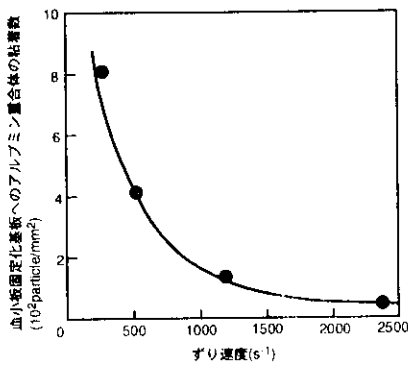


図9 各々のずり速度における fbg-アルブミン重合体の粘着数

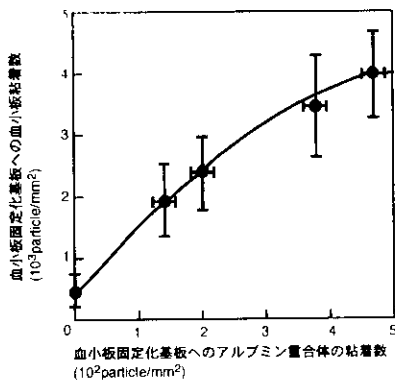


図10 fbg-アルブミン重合体による残存血小板の誘導粘着数。アルブミン重合体濃度は左のプロットから 0, 1.0×10⁻², 2.1×10⁻², 3.6×10⁻², 4.7×10⁻² g/dL である。

D. 考察

pH 変化と温度制御により、アルブミンを分子間ジスルフィド結合させて、アルブミン重合体を調製した。80℃にて加熱後のアルブミン溶液を pH6.0、40℃にて反応させることで、アルブミンの重合反応が進行する。この状態におけるアルブミン溶液の濁度変化の観察により、濁度を指標とした粒径制御が可能であり、数十 nm から数十 μm のアルブミン重合体が調製可能となった。

rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体は、流動下においてコラーゲン固定化基板に対して特異的に認識し、ずり速度が大きくなるにつれて粘着能が低下することが確認された。これは血小板と同等の機能であり、出血部位に露出したコラーゲンを認識して粘着することができ、血小板の一次止血を補助することが期待できる。また、fbg-アルブミン重合体は流動下において血小板固定化基板に特異的に粘着し、添加濃度の増加に伴い粘着

数が増加することを確認した。さらに、fbg-アルブミン重合体の添加により残存血小板が誘導され巻込まれて粘着することから、fbg-アルブミン重合体は出血部位にて粘着した血小板を認識した後に、残存血小板をリクルートして凝集塊形成を補助するものと考えられ、出血時間の短縮が期待できる。

E. 結論

アルブミン重合体の粒径は、溶液の濁度変化観察から容易に制御することが可能であり、数十 nm から数十 μm の範囲で調製可能である。rGPIIb/IIIa-アルブミン重合体は、生体内における出血部位での血小板の一次止血を補助することが期待でき、fbg-アルブミン重合体では出血部位において血小板の二次止血を補助することが期待できる。従って、rGPIIb/IIIa-、fbg-アルブミン重合体は血小板減少下における止血の補助が期待でき、血小板代替物として有効であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) "Synthesis of Multiacyl Poly(ethylene glycol) for the Conjugation of Cytochrome c to Phospholipid Vesicle", *Bioconjugate Chem.*, **11**, 815-821 (2000).

2) "Conjugation of von Willebrand Factor-Binding Domain of Platelet Glycoprotein Iba to Size-Controlled Albumin Microspheres", *Biomacromolecules*, **1**, 290-295 (2000).

3) 「粒子径を制御したアルブミン重合体の合成と GPIIb/IIIa 結合体の評価」, *人工血液*, **8**, 90-95 (2000).

4) 「止血能を有するアルブミン重合体の開発」, *血液・免疫・腫瘍*, **6**, 46-50 (2001).

5) "Fibrinogen-conjugated Albumin Polymers and their Interaction with Platelet under Flow Conditions. *Bioconjugate Chem.*, **12** (2001) submitted.

2. 学会発表

1) 「アルブミンマイクロスフェア利用の血小板代替物モデル(2) (V-11)」, 第7回日本

血液代替物学会年次大会、2000年9月8日(札幌).

2) 「人工血小板として機能する微粒子の設計と機能評価 (IIU04)」、第49回高分子討論会、2000年9月28日(仙台).

3) “Characterization of Albumin Microspheres Conjugated with von Willebrand Factor-Binding Domain of Platelet Glycoprotein I α (PO-38)”, 8th International Symposium on Blood Substitutes, 2000年11月9日 (San Diego).

4) 「フィブリノーゲン結合アルブミン重合体の血小板代替物としての機能評価(III Pb158)」、第50回高分子学会年次大会、2001年5月25日(大阪).

5) 「アルブミン重合体とリン脂質小胞体を担体とした血小板膜糖蛋白質 rGPI α 結合体の機能比較(III Pa157)」、第50回高分子学会年次大会、2001年5月25日(大阪).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

1) 「アルブミン重合体、その製造法および血小板代替物」特願 2000-274508 号

2) “Albumin Polymer Composition, Production Process Therefor and Use Thereof” 09/641,217

止血過程における人工血小板の超微構造的解析

分担研究者 鈴木英紀 東京都臨床医学総合研究所

研究要旨：人工血小板の GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームは、コラーゲン添加時に血小板とともに凝集塊を形成し、また流動下においてコラーゲンに対して血小板とともに粘着することを電顕下に観察した。さらに、フィブリノゲン標識アルブミン重合体はADP刺激時において血小板を相互に接着させる能力を持ち、流動下においてコラーゲンに粘着している活性化血小板の上に接着することを超微形態学的に明らかにした。すなわち、これらの人工血小板は血小板の代替物として有効であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、GPIb, GPIa/IIa を標識したリポソーム、またはフィブリノゲンを標識したアルブミン重合体から成る人工血小板の超微構造を電子顕微鏡レベルで解析する。さらに、これらの *in vitro* の凝集および流動下の粘着の実験系における関与、挙動を電子顕微鏡的に把握することによって、最適な人工血小板作成の理論的根拠を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) 血小板凝集における GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームの同定と観察

健康成人ボランティアから採血した血液から血小板を洗浄し、最終的に 1×10^5 または 1×10^4 個/ μl を調整した。これらを凝集測定用のキュベットに入れ、GPIb, GPIa/IIa 標識リポソーム (4×10^5 個/ μl) を混合した後、攪拌しつつ最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコラーゲンを添加した。凝集曲線を確認しつつ、3分後に2%グルタルアルデヒドを等量加えて固定した。遠心して得たペレットを四酸化オスミウム後固定、エタノール脱水、酸化プロピレン置換、エポキシ樹脂を浸透させ、同樹脂に包埋、重合した。超薄切片を調製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で電子染色、カーボン蒸着後、透過型電子顕微鏡で観察した。

2) 固相化コラーゲンに対する GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームの粘着像の観察

方法1)で調製した血小板浮遊液に GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームを混合し、これを von Willebrand 因

子($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)および洗浄赤血球存在下、コラーゲン固相化カバースリップ上に 37°C で $2,400$ または 600 s^{-1} で流動させた。10分後に1%グルタルアルデヒドで固定し、以下四酸化オスミウム後固定、エタノール脱水、t-ブタノール置換、凍結乾燥、金属コーティングして走査型電子顕微鏡で観察した。

3) 血小板凝集に対するフィブリノゲン標識アルブミン重合体の関与の検討

洗浄血小板 (4×10^5 個/ μl) を凝集測定用のキュベットに入れ、 37°C で攪拌しつつ、1/10 容のフィブリノゲン標識または無標識アルブミン重合体を添加し、1分後さらに最終濃度 $20 \mu\text{M}$ のADPを加えた。凝集曲線を確認しつつ、3分後に2%グルタルアルデヒドまたは0.2%グルタルアルデヒド-8%パラホルムアルデヒド混合液を等量加えて固定した。グルタルアルデヒドのみで固定したサンプルは、方法1)に従って透過型電子顕微鏡の試料を作製した。一方、混合液で固定したサンプルは、フィブリノゲンを検出するためにPBSで洗浄し、2.3Mショ糖に浸漬後、液体窒素で凍結した。次いで、凍結超薄切片を調製し、これを家兎抗フィブリノゲン抗血清、さらに金粒子標識ヤギ抗家兎IgGでインキュベイトし、酢酸ウランで電子染色後、観察した。

4) 血小板粘着基板に対するフィブリノゲン標識アルブミン重合体の挙動の観察

前もって、血小板をコラーゲン固相化カバースリップに粘着させた基板を調製し、これにフィブリノゲン標識アルブミン重合体を方法2)に従って流動し、

30 分後にグルタルアルデヒドで固定した。以下、方法2)に従って走査型電子顕微鏡試料を作製した。

C. 研究結果

1) 血小板凝集における GPIb, GPIa/IIa 標識リボソームの同定と観察

本リボソームを含む血小板浮遊液にコラーゲンを添加すると、血小板は変形するとともに相互に接着して大きな凝集塊を形成した。凝集塊の血小板の顆粒はほとんど観察されず、放出反応も惹起された。GPIb, GPIa/IIa 標識リボソームは空胞状に観察された。 1×10^5 個/ μl の血小板のコラーゲン凝集では、多くの血小板に巻き込まれつつ、主に凝集塊の表面からやや遠い部に存在した(図 1)。一方、 1×10^4 個/ μl の血小板の凝集では、リボソームは数個の血小板と接触しつつ集積していた(図 2)。また、血小板との接触なしに単独で集積するリボソームも存在した。

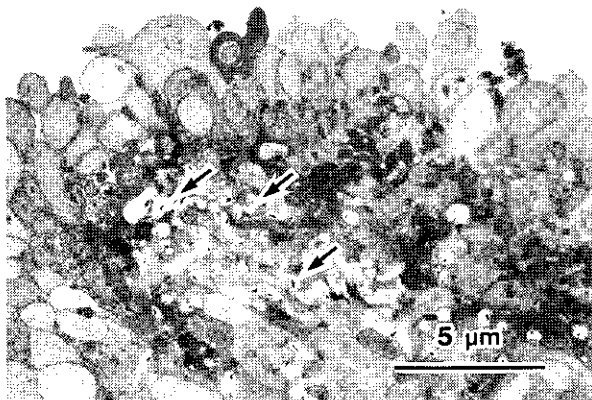


図 1. 高濃度血小板とリボソームのコラーゲン凝集
リボソーム(矢印)は凝集塊の中央部に存在する

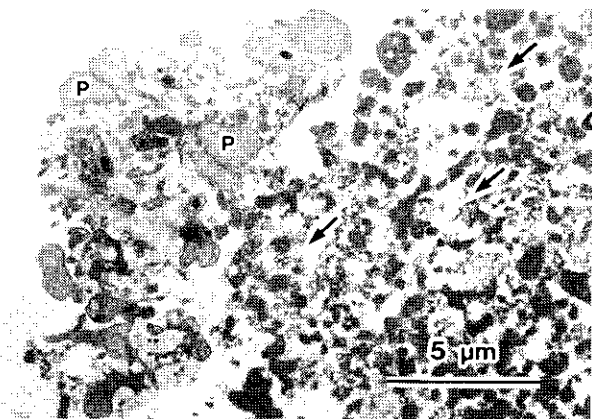


図 2. 低濃度血小板とリボソームのコラーゲン凝集
リボソーム(矢印)は血小板(P)の周囲で凝集する

2) 固相化コラーゲンに対する GPIb, GPIa/IIa 標識リボソームの粘着の観察

1×10^5 個/ μl の血小板と GPIb, GPIa/IIa 標識リボソームを $2,400 \text{ s}^{-1}$ で流動させた時、形態変化した血小板は編み目状に密に粘着していた(図 3)。

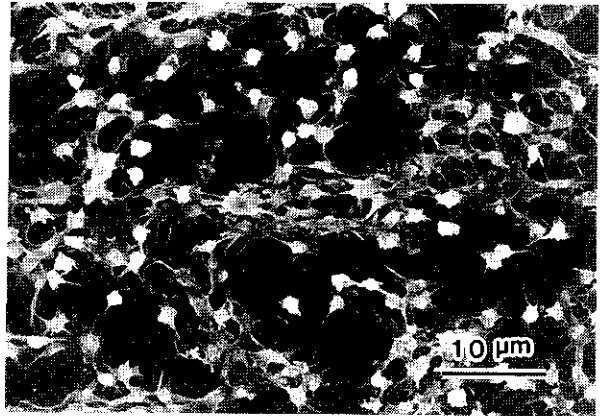


図 3. 高ずり下の高濃度血小板とリボソームの粘着
網目状の血小板の粘着が主に観察される

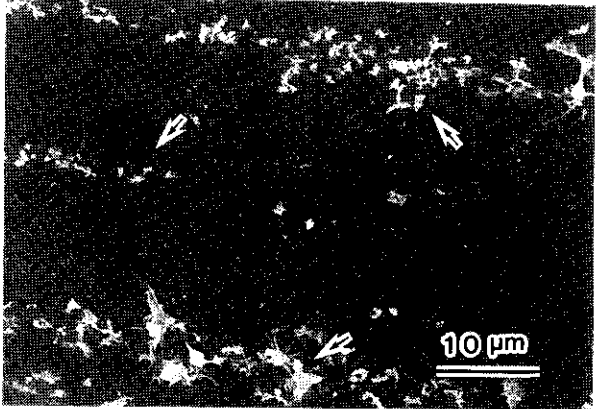


図 4. 高ずり下の低濃度血小板とリボソームの粘着
血小板とリボソームは筋状に粘着している(矢印)

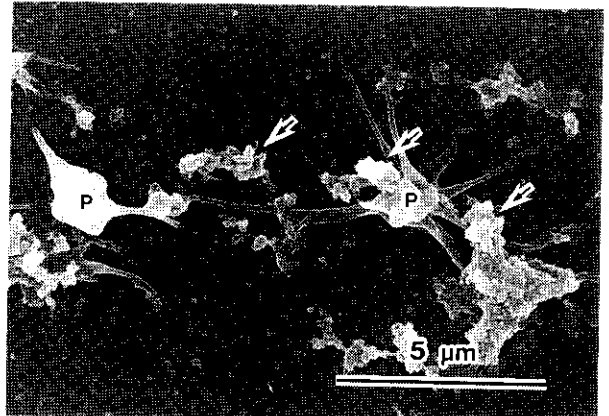


図 5. 高ずり下の低濃度血小板とリボソームの粘着
高倍では血小板(P)とリボソームの接着が観察される(矢印)

しかし、GPIb, GPIa/IIa 標識リボソームは多くの血小板の陰に隠れているためか、ほとんど識別されなかった。 1×10^4 個/ μl の血小板とリボソームの混合

では、 $2,400\text{s}^{-1}$ で流動させ、低倍で観察した時、流れに沿ったと思われる筋状の粘着物が観察された(図4)。この粘着物は、血小板と直径約 100nm の小粒子の集合体から形成されていた(図5)。この小粒子はリポソームと考えられる。 600s^{-1} の流動では血小板と小粒子から成る筋状の粘着を示さず、両者は相互に接着しつつ散在した(図6)。

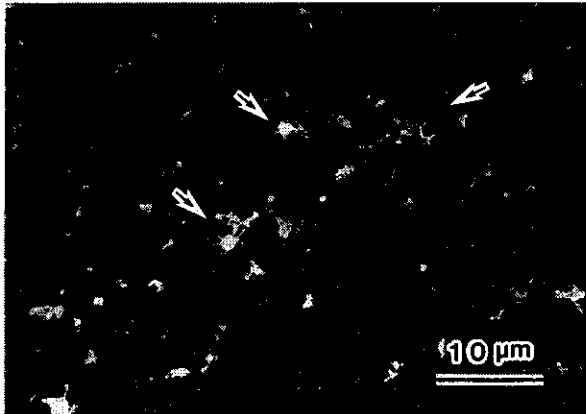


図6. 低ずり下の低濃度血小板とリポソームの粘着
リポソームと血小板は接着しつつ、散在して存在する(矢印)

3) 血小板凝集に対するフィブリノゲン標識アルブミン重合体の関与の検討

本重合体を走査型電子顕微鏡で観察すると、直径 100nm 前後の微粒子が塊状になり、 $1\mu\text{m}$ 以上の不定形の構造を示した(図7)。抗フィブリノゲン抗体を使う免疫電子顕微鏡法では、本重合体にフィブリノゲンが検出された(図8)。

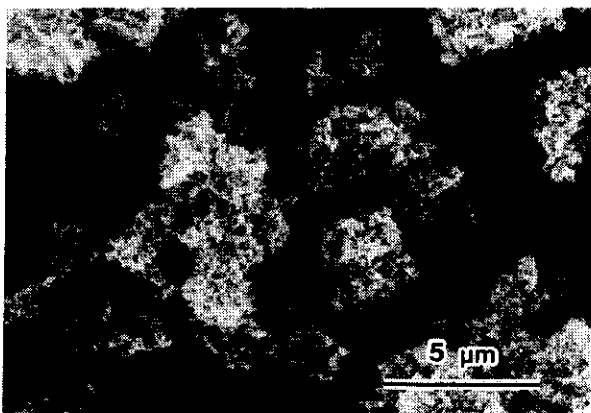


図7. フィブリノゲン標識アルブミン重合体の構造
本重合体は微粒子から形成され、不定形を示す

凝集計内で洗浄血小板にフィブリノゲン標識アルブミン重合体を加え、さらに ADP を添加すると凝集が惹起された。このサンプルを電子顕微鏡で観察す

ると、コントロールの可溶性フィブリノゲンを加えた場合に比較して塊は小さいものの、凝集が確認された。すなわち、血小板相互の接触面およびその周囲には不定形の物質が存在し、これは抗フィブリノゲン抗体を使った免疫電子顕微鏡法で、フィブリノゲンと同定された(図9)。しかし、無標識アルブミン重合体の添加では、ADP 凝集は起こらなかった。電子顕微鏡下でも、ADP の刺激で形態変化した血小板が単独に存在するのみで凝集は観察されなかった。さらに、血小板の周囲には不定形物質がほとんど存在しなかった。

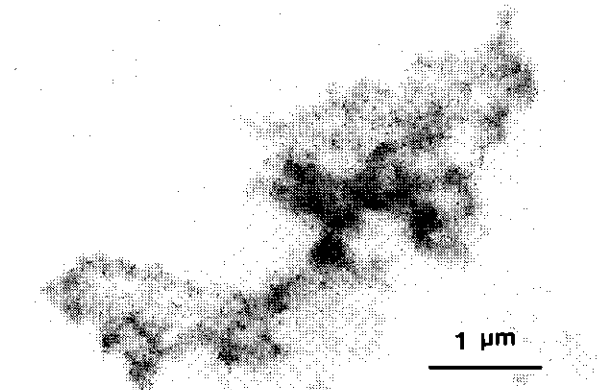


図8. フィブリノゲン標識アルブミン重合体におけるフィブリノゲンの分布

フィブリノゲンの存在を示す金粒子は、コントラストの高い本重合体上に一致して分布する

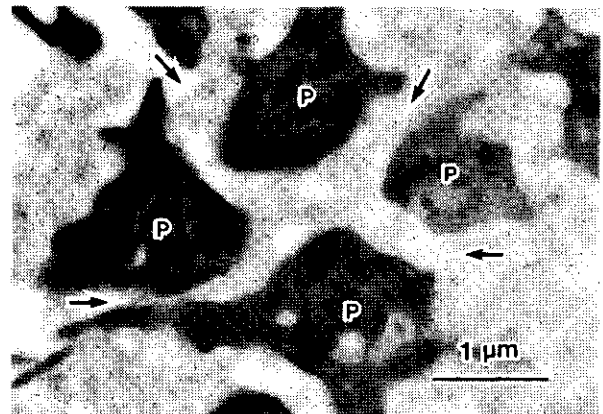


図9. フィブリノゲン標識アルブミン重合体存在時のADP凝集

本重合体存在下の血小板浮遊液に ADP を添加すると凝集が惹起され、血小板(P)間にはフィブリノゲンが染色された本重合体が存在する(矢印)

4) 血小板粘着基板に対するフィブリノゲン標識アルブミン重合体の挙動の観察

血小板粘着基板にフィブリノゲン標識アルブミン重合体を洗浄赤血球存在下に流動させると、モニタ

一上では粘着血小板に対する本重合体の多くの集積が見られた。走査型電子顕微鏡で観察すると、粘着している血小板上には、まず多数の赤血球が存在した。本重合体は糸くず状の塊を形成し、これらが赤血球を巻き込みながら血小板上に散在した(図10)。

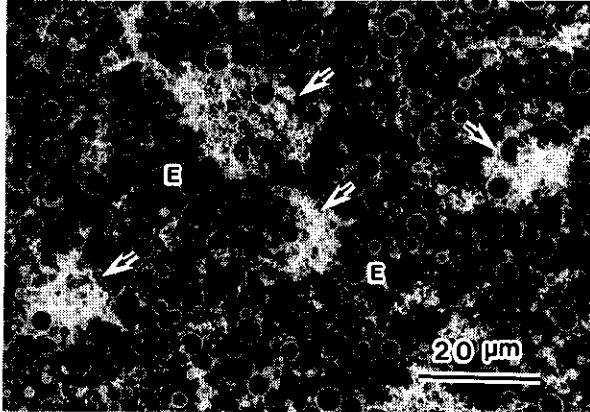


図10. 流動下におけるフィブリノゲン標識アルブミン重合体の粘着

本重合体は粘着している血小板上で大きな塊を形成して散在する(矢印)。E: 赤血球

D. 考察

凝集および流動下の粘着実験系で、GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームおよびフィブリノゲン標識アルブミン重合体を電子顕微鏡で観察すると、これらはやや変形した像を示した。しかし本研究では、GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームはコラーゲン凝集およびコラーゲンに対する粘着において、血小板と同様に挙動することを電子顕微鏡的に明らかにした。すなわち、コラーゲン凝集においてリポソームは、血小板から成る凝集塊に巻き込まれ、さらにリポソーム同士による凝集塊も形成した。リポソーム相互の凝集は、血小板 α 顆粒から放出されてきたvon Willebrand 因子がリポソーム上の GPIb に結合し、その架橋によるものと考えられる。流動下においてもリポソームは血小板とともにコラーゲン上に粘着し、さらに血小板にも接着したが、これらの現象は前者がリポソーム上に標識されている GPIa/IIa に起因し、後者は von Willebrand 因子を介する GPIb の反応によるものと考えられる。

一方、フィブリノゲン標識アルブミン重合体は、ADP 刺激時の架橋剤として血小板を相互に接着させるフィブリノゲンとしての機能を持つことを明らかにした。すなわち、本重合体は血小板間に分布するようになり、血小板を相互に接着させる架橋剤とし

て凝集塊の形成を促進することを形態学的に証明した。さらに、本重合体は流動下において、粘着している血小板上に集積して接着することを観察した。重合体の集積物中には赤血球も巻き込まれていることから、生体中で観察させる赤色血栓に類似した血小板血栓を形成するとも考えられる。

E. 結論

人工血小板の GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームは、コラーゲン添加時に血小板とともに凝集塊を形成し、また流動下においてコラーゲンに対して血小板とともに粘着することを電子顕微鏡下に観察した。さらに、フィブリノゲン標識アルブミン重合体は ADP 刺激時において血小板を相互に接着させる能力を持ち、流動下においてコラーゲンに粘着している活性化血小板の上に接着することを超微形態学的に明らかにした。すなわち、GPIb, GPIa/IIa 標識リポソームおよびフィブリノゲン標識アルブミン重合体から成る人工血小板は、実際の血小板と同様に挙動し、血小板の代潜物として有効であることが示唆された。

一方、これらの人工血小板は電子顕微鏡下でやや変形した像を示した。今後、両人工血小板の微細構造を変形させることなく、それらの形態を良く保存する試料調製法を考えたい。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

無し

H. 知的財産権の「出願・登録状況

無し