

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

目 次

課題番号

61021	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷 統寿 ……	1
61027	循環型社会に対応した有機性廃棄物の資源化処理システムの開発	○田中 勝 ……	9
61100	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 ……	16
61111	膜型人工肺を用いた小児用呼吸循環補助システムの開発（小児用ECMOシステムの開発）	中川 聡 ……	40
61131	セラミックビーズを用いた抗原・抗体捕捉法による簡便な感染症診断技術の開発	田代 真人 ……	45
61245	血液凝固線溶制御因子に関する基礎的研究並びに関連医薬品の有用性確保及び診断技術の確立	○内田恵理子 ……	54
61248	酸性多糖類の医用材料としての応用に関する基礎的研究	○四方田千佳子 ……	64
61268	人工臓器材料の長期間安全性評価に有用な指標に関する基礎的研究	土屋 利江 ……	74

文庫NO
20000994A

20000995A

20000996A

血液凝固線溶制御因子に関する基礎的研究並びに関連 医薬品の有用性確保及び診断技術の確立

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 内田 恵理子

分担研究者 (1) 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 早川堯夫、石井明子
(2) 大阪大学 薬学部 真弓忠範
(3) 三重大学 医学部 鈴木宏治
(4) 明治薬科大学 薬学部 森田隆司
(5) 徳島大学 薬学部 徳村 彰
(6) ウエルファイド(株) 創薬研究所 亀山松寿
(7) ファイザー製薬(株) 中央研究所 山田 弘

要旨

血栓溶解剤の副作用防止に Rho-kinase 阻害剤が有用である可能性、並びに、血小板に新規 LPA 受容体が存在する可能性を示した。また、タンパク質医薬品の有用性をより高める新規修飾用デバイスを開発した。さらに、臨床検体を用いて新規血液凝固能測定法の有用性を示した。

1. 研究目的

血液凝固反応は創傷治癒や細菌等の有害異物の深部への進入を阻止するための重要な生体防御反応であり、その制御は生体の恒常性を維持するために必須の機構である。その破綻により生じる血栓は、脳梗塞、心筋梗塞の様な生命の危険を伴う病態につながることから、血栓症の予防・治療法の確立は基礎から臨床にいたる全ての次元で極めて重要な課題である。本研究では、血液凝固線溶系の制御を細胞及び液性因子の両側面から捉え、医薬品の開発、有用性確保、診断技術の確立を目指した以下の検討を行った。

(1) 血小板ならびに血管壁細胞の機能制御による抗血栓療法の開案

血栓形成の担い手である血小板、血液凝固因子、及び、それらの活性を制御する血管内皮細胞などの血管壁細胞の機能について、血栓形成の防止策を念頭においた基礎的研究を行い、新たな抗血栓療法の手がかりを見出す。

(2) Bioconjugation による血液凝固線溶制御関連医薬品の改良

血液凝固線溶制御に関連する医薬品を bioconjugate (高分子修飾) することにより作用の選択性増加と副作用の軽減をはかり、医薬品としての有用性・安全性を確保するための基盤技術を開発する。

(3) 新規血液凝固能測定法の確立

血栓症治療の向上に必須である抗凝固療法時の血液凝固能モニター法の確立を目指し、従来とは異なる精度の高い血中正常プロトロンビン定量法の開発と臨床応用のための研究を行う。

2. 研究方法

2.1. 血小板ならびに血管壁細胞の機能制御による抗血栓療法の開案

2.1.1 血小板の調製、凝集および形態変化の測定：健常人または動物の血液から、Hepes-Tyrode 液を用いた遠心法により洗浄血小板を調製した。凝集率は、ルミアグリゴメーターを用いて透過光度の増加により測定した。形態変化は、透過光度の低下により測定した。

2.1.2 ラットの肝臓及び腎臓組織切片への AT 及び HCII の結合：パラフィン包埋組織切片を風乾後に脱パラフィン処理し、AT あるいは HCII を室温にて反応させ、酵素標識したそれぞれの抗体と反応させた。これを洗浄後、DAB 処理、ヘマトキシレン処理を経て、封入し、AT 及び HCII の結合部位の観察を行った。Heparitinase I&II あるいは Heparitinase I&II + Chondroitinase B 処理は、脱パラフィン処理後に 37℃ で 2 時間反応させて行った。

2.1.3 気道のリモデリングにおけるトロンビンの影響：培養上皮細胞およびヒト鼻粘膜上皮細胞を種々の濃度のトロンビンあるいは PAR-1 アゴニストペプチドで刺激し、24~48 時間培養後の上清を CM 培養上清 (Conditioned Medium : CM) として用いた。CM 中の増殖因子は、各増殖因子に対する抗体を用いて同定した。

2.2. Bioconjugation による血液凝固線溶制御関連医薬品の改良

DMMA 導入 PVP の作製：コポリマーとして DMMA を用い、ビニルピロリドンモノマーとラジカル共重合した。DMMA 導入 PVP として平均分子量 6000、分子量分布 (Mw/Mn) 1.14~1.16 のものを実験に供した。

DMMA 導入 PVP と LYC の Conjugate における薬物放出性の確認：DMMA 導入 PVP と LYC との Conjugate のフ

ラクシオンを、pH8.5のBorate Bufferに溶かし、0.1 N HClでpH8.5、pH7.0、pH6.0のpHに調製し、37°Cでincubationしながら経時的にサンプリングし、各フラクションの蛍光強度を測定した。

DMMAn 導入 PVP の生体内動態の検討：¹²⁵I ラベル化高分子をマウス尾静脈内投与し、経時的に血液を回収するとともに、一定時間後の組織分布を評価した。

2.3. 新規血液凝固能測定法の確立

抗血小板薬を併用した場合の抗凝固療法患者の血漿プロトロンビン濃度の検討：検体をワーファリン(W)単独群、W+aspirin併用群、W+ticlopidine併用群、W+dipyridamole併用群、W+aspirin+dipyridamole併用群の5群に分けて、CA-1法により正常プロトロンビン濃度を測定した。

高齢者に対するワーファリンによる抗凝固療法の検討：検体をW投与の有無および年齢で分類し、W非投与高齢者群、W非投与若年者群、W投与高齢者群、W投与若年者群の計4群に分けて、CA-1法により正常プロトロンビン濃度を測定した。

CA-1法：BSAを含むTris-buffered Salineで5または10倍に希釈した試料血漿にCaCl₂、Boc-Val-Pro-Arg-p-nitroanilideを加え、37°Cで2分インキュベートした後、carinactivase-1(CA-1)を加えてp-ニトロアニリンの遊離速度を405nmの吸光度で測定し、正常プロトロンビン量を定量した。

3. 研究成果

3.1. 血小板ならびに血管壁細胞の機能制御による抗血栓療法の考案

血小板ならびに血管壁細胞の機能制御による抗血栓療法の考案を目指し、(1)プラスミンによる血小板形態変化の機構、(2)動物種による血小板の反応性の違い、および、(3)血小板LPA受容体のリガンド選択性を解析した。また、(4)アンチトロンビン、ヘパリンコファクターIIの肝臓及び腎臓への結合様式、さらに、(5)気道のリモデリングにおけるトロンビンの影響、を解析した。

3.1.1 プラスミンによる血小板形態変化の機構

血栓溶解剤によるプラスミノゲン活性化に際して生成されるプラスミンは、血栓を溶解するという本来の目的だけでなく、副次的な作用として血小板凝集や内皮細胞傷害を惹起し、これらが血栓溶解後の再閉塞の原因となる可能性が考えられている。本年度は、プラスミンによる血小板活性化の最初の段階である形態変化の機構について解析した。

血小板をプラスミンで刺激すると、細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起こり、その濃度変化の時間的推移が形態変化の進展とよく一致した。EGTAで細胞外Ca²⁺をキレートすると、細胞内Ca²⁺濃度の上昇は50%程度に抑制されたが、形態変化は影響を受けなかった(Fig. 1)。5,5'-dimethyl-BAPTAで細胞内Ca²⁺をキレートすると、細胞内Ca²⁺の濃度上昇は完全に抑制されたが、形態変化は完全には抑制されず、Ca²⁺非依存的な経路により形態変化が引き起こされることが明らかとなった。

細胞収縮などにおけるCa²⁺非依存性の経路においては、低分子量GTP結合タンパク質RhoやRhoにより活性化されるRho-kinaseが働いていることが報告されている。そこで、Rho-kinaseの特異的な阻害剤であるY-27632を用いて、プラスミンによる血小板形態変化へのRho-kinaseの関与を検討した(Fig. 2)。未処理の血小板では、Y-27632により形態変化が阻害されたが、完全には阻害されなかった。一方、5,5'-dimethyl-BAPTA acetoxymethyl esterで細胞内Ca²⁺をキレートした血小板では、Y-27632により形態変化が完全に阻害され、そのIC₅₀は約0.5μMであった。

血小板形態変化においては、Myosin Light Chain (MLC)のリン酸化が重要な役割を果たすとされている。そこで、プラスミンによりMLCのリン酸化がおこることを示すと共に、MLCリン酸化におけるCa²⁺の必要性ならびにRho-kinaseの関与について検討した。プラスミン刺激後、形態変化の進展よりやや速く、添加10秒後にはMLCリン酸化が検出され、形態変化が最大となる60秒後までリン酸化の程度が持続した。このリン酸化は、5,5'-dimethyl-BAPTAまたはY-27632によって部分的に阻害された。5,5'-dimethyl-BAPTAと共にY-27632で前処理することにより、リン酸化は完全に阻害された。

3.1.2 血小板凝集能の動物種差に関する検討

ヒト血小板のモデルとなる動物由来血小板のスクリーニングを目的に、ウサギ、モルモット及びラットの洗浄血小板の反応性を解析した。トロンビン刺激に対する血小板凝集反応性はウサギ>モルモット>ラットの順であり、トロンビン0.6U/mLにおいて、いずれの血小板でも最大凝集反応を示した。トロンビン誘導血小板凝集反応に対するADP分解酵素アピラーゼの影響を検討したところ、いずれの動物血小板においても凝集が抑制されたが、その抑制強度及び抑制パターンには動物種差が認められた。即ち、モルモット血小板ではアピラーゼによる最も強い凝集抑制作用がみられ、凝集惹起に要する時間の延長と共に凝集能の低下が認められた。ラット血小板では最大凝集惹起に要する時間の変化はみられなかったが、最大凝集能が低下し、反応時間の経過と共に凝集塊の溶解現象が認められた。一方、ウサギ血小板ではアピラーゼによる凝集抑制作用が軽度のみであり、最大凝集の惹起に要する時間の変化も認められなかった。

ウサギ、モルモット及びラットの platelet rich plasma に ADP を添加し、ADP に対する凝集反応性を比較した結果、凝集感受強度はモルモット>ラット>ウサギの順であることが示された。さらに、ウサギ、モルモット及びラットの洗浄血小板浮遊液に ADP を添加し、ADP に対する凝集反応性を比較した結果、凝集感受強度はモルモットで高く、ラット及びウサギではわずかに凝集反応がみられるのみであった。

Tissue-Plasminogen Activator (t-PA) 投与後の再開塞には、過剰に産生されたプラスミンが関わっていること、また、プラスミンによる血小板凝集においては ADP が重要な役割を果たすことが知られている。そこで、ADP による血小板凝集に対する t-PA の影響を検証し、プラスミンが関与する血小板活性化の評価に有用な動物血小板の検討を行った。t-PA を PRP に添加し、37°C で 5 分間保温した後、ADP を加えたところ、ウサギ及びラットでは ADP 刺激による血小板凝集に対する弱い抑制作用がみられたのに対し、モルモットでは逆に著明な凝集促進作用が認められた (Fig. 3)。

3.1.3 リゾホスファチジン酸 (LPA) による血小板凝集機構の解明

血小板 LPA 受容体のリガンド認識能を調べるため、ヒト血小板の LPA 応答性を調べたところ、2 名の男性健常者由来の血小板が 16:0-アルキル LPA に応答しないことを見出した (Fig. 4)。1 名の志願者から得た血小板では、16:0-アルキル LPA で凝集がおこらないが、20:5-アシル LPA や 16:0-アシル LPA は濃度依存的に血小板凝集がみられたことから、志願者の血小板には、16:0-アルキル LPA に応答する受容体が欠損していると思われる。また、別の 1 名の志願者から得た血小板は、22:6-LPA への感受性が著しく低かった。

血小板にはアルキル LPA とアシル LPA を認識する 2 種類の LPA 受容体が存在し、それぞれが異なる情報伝達系を持つと考え、その相違点を見出すことを試みた。血小板をホスホリパーゼ A2 阻害剤 ONO-RS-082 で前処理すると、16:0-アルキル LPA による血小板凝集は増強されたが、22:6-アシル LPA 誘導血小板凝集は、逆に阻害された (Fig. 5)。ONO-RS-082 の濃度を増加すると、アルキル LPA 誘導凝集もアシル LPA 誘導凝集も抑制されたが、前者の抑制の程度は後者による抑制の程度より幾分低かった。ONO-RS-082 の濃度を更に上昇すると、2 種の LPA による血小板凝集はどちらも同じ程度阻害された。一方、細胞質ホスホリパーゼ A2 を特異的に阻害するアラキドノイルトリフルオロメチルケトンによる前処理は、どちらの LPA による血小板凝集にも影響を与えなかった。この結果から、非選択的なホスホリパーゼ A2 阻害剤として知られる ONO-RS-082 がアルキル LPA とアシル LPA による血小板凝集に対して異なる効果を示すことが明らかとなった。

3.1.4 抗凝固因子の血管内皮細胞への作用の解析

血管再開塞の防止に有効であると考えられるアンチトロンビン (AT) およびヘパリンコファクター II (HCII) について、肝臓及び腎臓での組織との結合を解析した。正常ラット肝臓における AT の結合部位を調べたところ、肝の中心静脈壁が陽性であった (Fig. 6)。小葉間結合組織の血管壁ははっきりした反応が認められなかったが、周りの結合組織は陽性であった。これらの陽性部位はヘパリンチナーゼ I & II で処理することにより消失したことから、AT は、これらの部位にヘパリン硫酸を介して結合していることが示唆された。LPS 投与ラットでは、肝臓では中心静脈壁が陽性であったが、正常ラットと比較して陽性の程度が著しく減弱していた。また、小葉間結合組織については弱い反応しか認められなかった。次に、腎臓組織における結合部位について検討を行ったところ、髄質部分及び、腎動脈の内壁が陽性であった。これらの陽性部位はヘパリンチナーゼ I & II で処理することにより消失したことから、これらの部位にヘパリン硫酸が存在し、これを介して AT が結合することが示唆された。LPS を投与したラットにおいても正常ラットとほぼ同様の所見が得られた。正常ラット肝臓における HC II の結合部位を調べたところ、中心静脈壁が陽性であった (Fig. 7)。小葉間結合組織の血管壁ははっきりした反応が認められなかったが、周りの結合組織は陽性であった。これらの陽性部位はヘパリンチナーゼ I & II 処理だけでは減弱せず、コンドロイチナーゼ B で処理することにより消失あるいは減弱したことから、HC II がデルマタン硫酸を介して存在することが示唆された。LPS 投与ラットにおいても正常ラットとほぼ同様の所見が得られた。次に、正常腎臓への結合部位の観察を行ったところ、ボーマン嚢の周辺と小動脈の周りの結合組織が陽性であった。これらの陽性部位はヘパリンチナーゼ I & II 処理だけでは減弱せず、コンドロイチナーゼ B で処理することにより、消失あるいは減弱したことから、ボーマン嚢の周りや小動脈の周りの結合組織にデルマタン硫酸が存在し、HC II の結合に関与していることが示唆された。LPS 投与ラットにおいても正常ラットとほぼ同様の所見が得られた。

3.1.5 気道のリモデリングにおけるトロンビンの影響

肺や気管支などの気道のリモデリングとは、気道の炎症時の傷害とその修復過程、および過剰な修復の結果生じる組織構造と機能の変化を指すものである。気道粘液中のトロンビンが気道上皮細胞からの増殖因子の産生に影響を与えているとの仮定の下、気道上皮細胞からの増殖因子、特に PDGF の産生に及ぼすトロンビンの影響、および気道上皮細胞や繊維芽細胞上のトロンビン受容体 Protease-activated receptor (PAR)-1、3、4 の発現動態について検討を行った。正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) とヒト腺癌由来肺上皮細胞株 (A549) をトロンビンで刺激して調製した CM について、気管支平滑筋細胞と肺線維芽細胞の増殖に及ぼす影響を測定したところ、NHBE 細胞および A549 細胞から得た CM はともに気管支平滑筋細胞と肺線維芽細胞の増殖

を有意に促進した (Fig. 8)。この CM の増殖活性に及ぼす増殖因子抗体の影響を検討したところ、抗 PDGF 抗体が濃度依存性に CM の細胞増殖活性を抑制した。また、トロンピン刺激により NHBE 細胞、BEAS-2B 細胞、A549 細胞および鼻粘膜上皮細胞から分泌される増殖因子を ELISA 法で測定した結果、トロンピンは濃度依存性に、かつ 時間依存性に、全ての細胞での PDGF-AB の産生を有意に促進した (Fig. 9)。さらに、NHBE 細胞の PDGF-A と PDGF-B の mRNA の発現に及ぼすトロンピンの効果を検討したところ、トロンピン刺激 24 時間後、PDGF-A mRNA には変化はみられなかったが、PDGF-B mRNA は約 5 倍に増加した。トロンピン刺激による上皮細胞からの PDGF の分泌がトロンピン受容体を介するものか否かを明らかにするため、NHBE 細胞を用いて PAR-1 アゴニストペプチド刺激時の PDGF-AB の分泌を検討した。その結果、PAR-1 アゴニストペプチドは濃度依存性に PDGF-AB の分泌を促進した。

3.2. Bioconjugation による血液凝固線溶制御関連医薬品の改良

薬物の有効性、安全性、作用の選択分離性に優れた新規バイオコンジュゲーション化 DDS の確立を目的に、標的指向化能と徐放化能を同時に有する修飾高分子の開発を試みた。昨年度までの検討により、ポリビニルピロリドン (PVP) が、新たな官能基を導入しうる高分子として優れた性質を持つことを報告した。一方、アミノ基保護試薬であるジメチル無水マレイン酸 (DMMAAn) は、塩基性側でアミノ基と結合し、酸性側でアミノ基を解離するという pH 応答性を有しており、DMMAAn はその構造中に二重結合を有していることから、ラジカル共重合法により容易に PVP へ導入できるものと考えられた。そこで、DMMAAn を導入した PVP 誘導体を作製できれば、中性 pH 領域でアミノ基を有する薬物を徐放化し得る修飾高分子を作製できるものと考え、DMMAAn 導入 PVP を作製し、その特性を評価した。

まず、DMMAAn のアミノ基徐放化能が PVP に付与されていることを確認するために、モデル薬物としてアミノ基を有する LYC (Lucifer Yellow Cadaverine) を用いて DMMAAn 導入 PVP の pH 応答性について評価した (Fig. 10)。5%、20%DMMAAn 導入 PVP は、pH 依存的に LYC を release していることが確認できた。さらに、DMMAAn の導入率の増加に伴って LYC をより多く release しており、DMMAAn 導入 PVP が DMMAAn の pH 応答性を保持していることが明らかとなった。次に、生理的に近い条件で DMMAAn 導入 PVP の徐放化能と経日的な徐放化パターンを評価するために、pH7.2 の緩衝液中と血清中で 4 日間の徐放化能を検討した。5%、20%DMMAAn 導入 PVP は、pH7.2 の緩衝液中においても血清中においても、ほぼ同様の徐放化パターンを示した。この結果は、実際の生体内においても薬物を有効に徐放化し得ることを示唆している。さらに、5%、20%DMMAAn 導入 PVP の LYC の徐放化率を比較すると、導入率の増加に従い LYC の徐放化速度が高まることが判明した。

次に、20%DMMAAn 導入 PVP の体内動態を調べたところ、カルボキシル基を多数有している 20%DMMAAn 導入 PVP は、高い腎移行性を示すことが判明した (Fig. 11)。この 20%DMMAAn 導入 PVP の腎移行量は投与量の約 40%に達していた。20%DMMAAn 導入 PVP の腎集積部位を特定するために、蛍光物質を結合させた DMMAAn 導入 PVP をマウスに投与して 3 時間後に腎臓を回収し、凍結組織切片を作製した。蛍光顕微鏡で解析したところ、DMMAAn 導入 PVP は投与後 3 時間で腎皮質の近位尿細管上皮細胞に集積し、腎髄質や糸球体などの他の部位には集積しないことが明らかとなった。

DMMAAn 導入 PVP の毒性を評価したところ、高い腎移行性を示す 20%DMMAAn 導入 PVP は、10mg/ml という濃度の条件においても全く細胞傷害性を示さなかった。また、DMMAAn 導入 PVP を 1g/kg でマウスに尾静脈内投与した際でも BUN (blood urea nitrogen) の上昇が見られなかったことから DMMAAn 導入 PVP の高い安全性が示唆された。

3.3. 新規血液凝固能測定法の確立

血栓症の予防もしくは治療のために、抗凝固薬ワーファリンが広く用いられているが、血液凝固能の厳密なモニタリングによって用量を決定しているにもかかわらず、患者の中には血栓や出血を併発する場合があることが知られている。そのため、異なる原理を用いた、より正確に生理的な凝固能を測定できるモニタリング法の確立が必要とされている。そこで、カルシウム依存性プロトロンビン活性化酵素 carinactivase-1 を用いた正常プロトロンビンの定量法 (CA-1 法) を確立し、臨床検体を用いてその有用性を検討した。

(1) 正常人の血漿プロトロンビン濃度の測定

CA-1 法を用いて、正常人 42 名のヒト血漿プロトロンビン濃度を測定した結果、Gauss 分布が得られ、正常人のヒト血漿プロトロンビン濃度は 70~140 $\mu\text{g/ml}$ の広い範囲にあり、平均値が 112.8 $\mu\text{g/ml}$ であることがわかった (Fig. 12)。

(2) 抗血小板薬を併用した場合の抗凝固療法患者のプロトロンビン濃度の検討

抗凝固療法においてワーファリンと抗血小板薬の併用がしばしば行われる。そこでワーファリン単独治療患者とワーファリンと抗血小板薬併用患者について血漿プロトロンビン濃度を測定して、血小板薬のプロトロンビンに与える影響について検討を行った。対象は、心臓弁置換術後の抗凝固療法を施行中の患者血漿 126 検体とした。血漿プロトロンビン濃度は、ワーファリン単独治療群で 49.6 $\mu\text{g/ml}$ 、aspirin との併用群で 57.1 $\mu\text{g/ml}$ 、aspirin と dipyridamole との併用群で 49.9 $\mu\text{g/ml}$ 、dipyridamole との併用群で 51.1 $\mu\text{g/ml}$ 、ticlopidine との併用群で 51.7 $\mu\text{g/ml}$ であり、5 群間で有意差は認められなかった。またワーファリン平均

内服量も5群間で有意差はなかった。

(3) 高齢者に対するワーファリンによる抗凝固療法における血漿プロトロンビン濃度の追跡

ワーファリン内服中の患者に対し、CA-1法を用いて血漿プロトロンビン濃度を測定し、加齢に伴うワーファリン使用量との変化について検討した。非投与95検体、ワーファリン投与132検体の計227検体をさらに高齢者群(70歳以上)と若年者群に分け、ワーファリン非投与高齢者群、ワーファリン非投与若年者群、ワーファリン投与高齢者群、ワーファリン投与若年者群の計4群に分けて解析した。

ワーファリン非投与群では、血漿プロトロンビン濃度は、高齢者116.5 μ g/ml、若年者116.7 μ g/mlで有意差はなく、ワーファリン投与群でも、高齢者50.1 μ g/ml、若年者52.3 μ g/mlで有意差はなかった。ワーファリン投与量は、高齢者2.2mg/日、若年者2.9mg/日と高齢者で低下しており、ワーファリン投与量と年齢には、 $R=0.221$ 、 $P=0.0154$ と弱い相関が認められた。以上より、高齢者と若年者では濃度プロトロンビン濃度に違いはなく、高齢者のワーファリンの作用増強の原因として、吸収と代謝の低下が考えられた。

(4) ワーファリン減量にて血漿プロトロンビン値(CA-1値)上昇し脳梗塞を来した1例

(症例) 51歳、男性、1989/3/13、僧帽弁置換術(MVR)施行後、外来にて抗凝固療法を行っており、トロンボテスト(TT)値で10-20%を目標に管理が行われていた。1998/7/21にワーファリン2mg/dayにてトロンボテスト(TT)値8%、血漿プロトロンビン値(CA-1値)44.6 μ g/mlに低下しワーファリンを1.75mg/dayに減量した。10/27のトロンボテストが15%だったのが血漿プロトロンビン値(CA-1値)は70.4 μ g/mlと上昇し、12/7に左脳基底核皮殻梗塞を発症した。発症時、左房内血栓を認めた。

4. 考察

4.1. 血小板ならびに血管壁細胞の機能制御による抗血栓療法の考案

4.1.1 プラスミンによる血小板形態変化の機構

プラスミンにより惹起される細胞内情報伝達経路としては、これまでに Ca^{2+} に関連した経路が知られており、プラスミンは、Gqの活性化を介して血小板活性化を起こすと考えられてきた。今回の我々の検討により、プラスミンによる血小板活性化の最初のステップである形態変化において、 Ca^{2+} 非依存性の経路が存在することが初めて明らかとなった。また、 Ca^{2+} 非依存性経路においては、Rho-kinaseが働いていることが明らかとなり、プラスミンが低分子量Gタンパク質のRhoの活性化を起こす可能性が示唆された。Rhoの活性化に必要なRhoGEFは、G12/G13によって活性化されることが報告されていること、血小板にはG12/G13が存在することから、プラスミンはGqの他にG12/G13を活性化する可能性が考えられた。また、plasminogen activatorによる血栓溶解剤投与後の再閉塞を防止するために、Rho-kinase阻害剤が有効である可能性が示唆された。

4.1.2 血小板凝集能の動物種差に関する検討

医薬品の開発において一般的に用いられている動物種としてウサギ、ラット、モルモットを選択し、凝集惹起物質に対する各種動物血小板の感受性を比較し、動物種差が見られる原因としてADPの関与を検討した。トロンピンが誘導する各種動物血小板の凝集反応における細胞内ADPの役割を調べるために、アピラーゼの効果を調べたところ、アピラーゼの血小板凝集抑制強度はモルモット>ラット>ウサギの順であり、特にモルモット血小板ではトロンピンにより誘導される凝集反応に対する著しい抑制作用がみられた。また、アピラーゼによる抑制強度及び抑制パターンに興味深い動物種差の所見が認められた。これらの結果は、モルモットでは血小板内ADPの放出が血小板凝集反応において重要な役割を果たしていることを示すものであり、血小板内ADPが関与する凝集機構の差異が動物種差の一因になりうることを示すものと考えられた。

PRPにt-PAを添加することによりプラスミノゲンからプラスミンを産生させる実験系を用いて検討を行ったところ、ウサギ及びラットのPRPではADPで惹起した凝集がt-PAによりやや抑制されたのに対し、モルモットでは著明な凝集促進作用が認められた。これらの結果から、プラスミンが関与する血小板凝集に対する安全性評価において、モルモット血小板がヒトの血小板の代替になり得る可能性が示唆された。

4.1.3 LPAによる血小板凝集機構の解明

ヒト血小板のLPA応答性には個人差があり、アルキルLPAに不応答の血小板の存在が発見された。この成果は、ヒト血小板にはアルキルLPAに特異的な受容体が存在することを強く示唆している。最近、アシルLPAよりもアルキルLPAの方が20-30倍低い濃度でヒト巨核球系細胞株MEG-01細胞やCMK細胞内のカルシウム濃度を高めることが報告された。この構造活性相関の結果は、本研究で得られた結果と一致している。これまでに構造が明らかにされたLPA受容体はアルキルLPAよりアシルLPAの方に強く反応するので、アルキルLPAに特異的な受容体は新規なタイプであると考えられた。

4.1.4 抗凝固因子の血管内皮細胞への作用の解析

肝臓ではATとHCⅡがほぼ同じ部位に結合したのに対して、腎臓では、ATは腎臓髄質に、HCⅡではボーマン嚢周辺にと、異なった部位に結合し、臓器によっては抗凝固因子の結合部位の違いが認められた。血管周辺での結合部位だけでなく、臓器での結合部位の違いは興味深く、血液凝固の制御以外の生理的な作用を担

っている可能性も考えられる。AT あるいは HC II の結合はそれぞれヘパリチナーゼ I&II やコンドロイチナーゼ B で減弱することから、それぞれのコファクター (AT はヘパリン様物質、HC II はデルマタン硫酸など) を介して結合しているものと考えられる。

次に抗凝固因子の結合に対する LPS の影響を検討したが、肝臓中心静脈や腎動脈の血管壁に結合する AT は、LPS により顕著に低下することから、LPS が血管内皮細胞へ直接作用し、剥離あるいはヘパリン様物質の低下をもたらしているものと推測された。これに対して、HC II の結合は LPS によって受ける影響は少なく、LPS により傷害された血管では AT の抗凝固作用より HC II の抗凝固作用が重要であり、その後の血栓形成にも大きな影響を及ぼすものと考えられる。一方、組織内においては、肝臓の小葉間結合組織における AT 結合が LPS により減弱したが、腎臓髄質の AT 結合はほとんど変化が認められなかった。これは、LPS の作用が血管或いは血管周囲にとどまり、組織までに及んでいないためと推察される。なお、HC II においては、血管周囲、組織内のいずれにおいても LPS の影響はほとんど認められなかった。LPS 刺激等による血管損傷では、内皮細胞の剥離やヘパリン様物質の低下が AT 結合を顕著に低下させていると考えられるが、HC II のデルマタン硫酸などへの結合は低下しておらず、これらのコファクターにより増強された HC II の抗凝固作用が血流の維持やその後の血栓形成や予後に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

4.1.5 気道のリモデリングにおけるトロンビンの影響

我々はこれまで、肺線維症患者の気管支肺胞洗浄液や気管支喘息患者の誘発喀痰中には正常者に比較して高濃度のトロンビンが存在し、そのトロンビンが気道のリモデリングに重要な役割を果たすこと示唆してきた。肺や気管支の上皮細胞あるいは周囲の血管内皮細胞の障害時には、組織因子/VIIa 因子複合体が形成されて外因系凝固が活性化され、最終的にトロンビンが生成される。トロンビンは、血管の透過性亢進や種々のプロテアーゼ前駆体の活性化、細胞外マトリックスの産生と限定分解による活性化、線維芽細胞や平滑筋細胞の遊走・接着・増殖等を促し、組織修復反応を促進すると考えられている。これまでもトロンビンは、線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、マクロファージ等からの PDGF や TGF β の産生を促進することが報告されている。今回の検討により、トロンビン刺激した肺胞や気管支の上皮細胞から肺線維芽細胞と気管支平滑筋細胞に対する増殖促進因子が産生され、この増殖活性はトロンビンの直接作用ではなく、上皮細胞に由来する PDGF-AB であることが明らかとなったが、このトロンビンによる PDGF 産生の促進は肺胞・気管支の株化上皮細胞だけでなく気管支上皮細胞と鼻粘膜上皮細胞の初代培養細胞でもみられたことから、生体においても炎症局所の上皮細胞から同様の機序で PDGF の産生が生じている可能性が示唆された。PDGF の主な作用には、線維芽細胞や平滑筋細胞に対する強力な増殖・遊走促進作用、血管新生促進作用、他の増殖因子の産生刺激作用、細胞外マトリックスの産生増加作用等があり、これらはいずれも組織リモデリングにつながる作用である。組織リモデリングにおける PDGF の関与は、これまでも創傷治癒、動脈硬化、肺線維症、強皮症、関節炎などの線維組織の増生を伴う疾患で報告されている。本研究で、トロンビンによる気道上皮細胞からの PDGF-B の発現増加を証明できたことは、トロンビンが気道の組織線維化を中心とするリモデリングに重要な役割を果たすことを強く示唆するものである。

4.2. Bioconjugation による血液凝固線溶制御関連医薬品の改良

PVP は日本薬局方収載品であり、安全性の確立された高分子であるうえ、ラジカル重合により簡便に合成でき、種々の分子量に合成可能である。また、ラジカル共重合により、種々の側鎖を持つ PVP 誘導体を合成することで、反応性の官能基の導入や、修飾分子の物理化学特性、官能基特性の制御が可能となり、その結果、薬物の種類や目的に適した生体内動態制御が達成できると考えられる。一方、無水マレイン酸 (MAN) の構造を有する環無水物は 1967 年 Butler らによって pH 依存的にアミノ基と結合、解離するアミノ基保護試薬として提示され、これまでにこの環無水物はアミノ基を他の官能基へ誘導する際の試薬などとして応用されてきた。我々はこれまで、IL-6 などのサイトカインのバイオコンジュゲーションにおいても、これらの環無水物の一つである DMMA の pH 応答性アミノ基保護作用を利用することで、従来のバイオコンジュゲーション法よりも同修飾率で比活性が大幅に改善されることを明らかにしている。本研究ではこの DMMA の特性を幹修飾高分子である PVP に導入することで新規機能性修飾高分子の作製を試みた。DMMA は、同構造を有する環無水物化合物の中で生理的 pH 付近で最も徐放化能を有していたことから PVP へ導入することで薬物の生体内動態を時間的に制御し得る徐放化能を PVP に付与できるものと考えられた。さらに我々のこれまでの研究から、カルボキシル基を有するアクリル酸導入 PVP が高い腎移行量を示すという知見が得られており、開環 DMMA が同様にカルボキシル基を有していることを考えると、DMMA を PVP へ導入することによって腎 targeting 能をも付与できるものと考えられた。つまり、薬物の空間的制御能と時間的制御能を同時に有した、理想的な第二世代のバイオコンジュゲート化 DDS を充たすインテリジェントな修飾高分子が創出できると推測し、DMMA 導入 PVP を作製したところ、予想通りの機能を持つことが判明した。

DMMA 導入 PVP は、*in vitro* において生理的に近い条件下で薬物を徐放することが明らかとなり、さらに、導入する環無水物の種類や導入量を変えることにより実際の生体内において薬物の放出性を任意に制御することも示唆された。この DMMA の導入率増加に伴った徐放化率の増加の原因に関しては未だ不明である。

しかしながら、この DMMA_n の PVP への導入率を制御することにより徐放化パターンを任意に制御できる事が示唆された。また、DMMA_n 導入 PVP の生体内動態の点に関しては、最適条件で投与した際には、投与後速やかに腎臓の近位尿細管上皮細胞へ移行し、少なくとも 4 日間以上は薬物を徐放化し得る修飾高分子であることが推測される。さらに、DMMA_n 導入 PVP は、in vitro、in vivo の両方の系で、高い安全性が示されている PVP と同様、全く細胞傷害性を示さなかったことから安全性が高いことが示され、bioconjugation 用の新規デバイスとして非常に有用であると考えられた。

4.3. 新規血液凝固能測定法の確立

(1) 今回、初めてヒト血漿中のプロトロンビン濃度を測定することができ、動脈硬化進展のリスクや肝機能のマーカーとしてのプロトロンビン値の測定に CA-1 法が有用であることが示唆された。

(2) 抗血小板薬を併用した場合の抗凝固療法患者のプロトロンビン濃度の検討

ワーファリンは、様々な薬剤と相互作用を有する薬剤であるが、今回の検討では、ワーファリン単独使用群に比し、抗血小板薬併用群の血漿プロトロンビン濃度の低下は認められず、また、ワーファリン使用量の減少も認められなかった。従って、抗血小板薬は血漿プロトロンビン濃度に与えず、ワーファリンと抗血小板薬の併用による相互作用の増強は、ワーファリンの血液凝固因子に対する抗凝固作用と抗血小板薬の抗凝血作用が各々働くことにより、もたらされるものと考えられた。

(3) 一般的にワーファリンの使用量については、一定しておらず患者によって常用量は異なることが知られている。モニタリングとして PT-INR、トロンボテストなどにより投与量が規定されているが、高齢者においては若年者に比してワーファリン投与量は少ないとの報告もなされている。その理由として加齢に伴う肝臓での凝固因子生産能の低下、加齢に伴うワーファリン感受性の上昇、または体内薬物血行動態の低下（ワーファリンの血中半減期の延長）などが指摘されている。血漿プロトロンビン濃度を CA-1 法にて定量する事により、肝臓での凝固因子生産能について検討を行ったが、結果としてはワーファリン非投与群において、血漿プロトロンビン値は高齢者と若年者において差は認められず、肝における凝固因子生産能に違いは無いものと思われた。しかしながら、ワーファリン投与群においては、プロトロンビン時間（PT-INR）、トロンボテスト、血漿プロトロンビン値（CA-1 値）が若年者と高齢者が同様のコントロール域にあるにもかかわらず、ワーファリン投与量は高齢者にて加齢により徐々に減少していくという相関関係が認められた。以上よりワーファリンの投与量の加齢による減少は、肝臓の生産能の変化よりはワーファリンの吸収、代謝、排泄などが深く関与しているものと考えられた。

(4) ワーファリン減量にて血漿プロトロンビン値（CA-1 値）上昇し脳梗塞を来した 1 例では、トロンボテストは治療域に維持されていたものの血漿プロトロンビン値（CA-1 値）はほぼ定常域まで戻っており、合併症を発症したものと考えられる。従って、CA-1 値はトロンボテストより鋭敏に反応していると考えられ、ワーファリン投与量の増減には、血漿プロトロンビン値（CA-1 値）による管理の方が有効と考えられた。

5. 結論

(1) プラスミンによる血小板形態変化には、Ca²⁺依存性の経路と非依存性の経路があり、後者には Rho-kinase が関与していることが明らかとなった。ADP 及びプラスミンが関与する血小板凝集機構の評価においては、モルモット血小板がヒトの血小板の代替になり得る可能性が示された。

血小板の LPA 応答性には個体差があり、アルキル LPA に不応答の血小板を持つ人が存在することが分かった。また、アルキル LPA とアシル LPA が送達するシグナルが部分的に異なることが明らかとなった。

肝臓では、AT と HC II はいずれも中心静脈及び小葉間結合組織に結合していた。腎臓では、AT は腎臓髄質、HC II ではボーマン嚢周辺と、異なった部位に結合した。これらの結合はヘパリン様物質やデルマタン硫酸の存在に依存していた。AT 結合は血管障害により顕著に低下するのに対して、HC II の結合はその影響を受けにくいことも明らかとなった。

気道のリモデリングにおいては、気道粘液中に増加するトロンピンが気道上皮からの PDGF の分泌を促進し、それによって基底膜下の線維芽細胞や平滑筋細胞の増殖が促進されることが明らかになった。

(2) Bioconjugation 用デバイス DMMA_n 導入 PVP が、生理的条件下で薬物を徐放する機能（release 能）を有しているとともに、高い腎移行性（腎 targeting 能）を有すること、細胞傷害性を示さないことが明らかになり、新規デバイスとしての有用性が示された。

(3) ヒト血漿プロトロンビン濃度を測定し、平均値 112.8 μg/ml であることを明らかにした。また、抗血小板薬を併用した場合の抗凝固療法患者の血漿プロトロンビン濃度、高齢者に対するワーファリンによる抗凝固療法での血漿プロトロンビン濃度を CA-1 法で測定した結果、いずれの場合の抗凝固療法で管理されている患者由来の血漿でもプロトロンビン濃度を正確に測定できることが明らかとなり、本法の臨床上の有効性が非常に高いことが示された。

6. 研究発表

1. Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Muzuguchi, H., Hayakawa, T. : On the Mechanism of Plasmin-Induced Platelet Aggregation: Implications of the Dual Role of Granule ADP. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1345-1355 (2000)
2. Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Muzuguchi, H., Hayakawa, T. : Involvement of a calcium-independent pathway in plasmin-induced platelet shape change. *Life Sciences*, in press
3. Tokumura, A., Yamano, S., Aono, T. & Fukuzawa, K. Lysophosphatidic acids produced by lysophospholipase D in mammalian serum and body fluid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 905, 347-350 (2000)
4. 徳村 彰、第 I 部 8.4 リゾホスファチジン酸、pp91-95, 基礎生化学実験法第 5 巻 脂質・糖質・複合糖質、日本脂質生化学会編、東京化学同人 (2000)
5. Tokumura, A., Shinomiya, J., Tanaka, T., Kogure, K., Satouchi, K. & Fukuzawa, K. Human platelets respond differentially to lysophosphatidic acids having a highly unsaturated fatty acyl group and alkyl-ether-linked lysophosphatidic acids. submitted
6. Shimizu, S., Gabazza, E.C., Hayashi, T., Ido, M., Adachi, Y. and Suzuki, K. (2000) Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 279: L503-L510.
7. Oka, S., Gabazza, E.C., Taguchi, U., Yamaguchi, M., Nakashima, S., Suzuki, K., Adachi, Y., and Imoto, I. (2000) Role of activated protein C in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect. Immun.* 68: 2863-2869.
8. Watanabe, R., Wada, H., Mori, Y., Nakasaki, T., Sawa, H., Gabazza, E.C., Hayashi, T., Nishioka, J., Suzuki, K., Shiku, H. and Nobori, T. (2000) Plasma levels of activated protein C-protein C inhibitor complex in patients with hypercoagulable state. *Am. J. Hematol.* 65: 35-40.
9. Tsuneyoshi, N., Fukudome, K., Ye, X., Horiguchi, S., Matsuzaki, M., Sano, M., Suzuki, K. and Kimoto, M. (2001) Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb. Haemost.* 85: 356-361.
10. Kamada H., Mayumi T. et al.: In Vitro Remodeling of Tumor Vascular Endothelial Cells Using Conditioned Medium from Various Tumor Cells and Their Sensitivity to TNF- α ., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 268 : 809-813, 2000.
11. Hojo K., Mayumi T. et al.: Facile Synthesis of a Chitosan Hybrid of a Laminin-related Peptide and Its Antimetastatic Effect in Mice., *J. Pharm. Pharmacol.*, 52: 67-73, 2000.
12. Nishiyama Y., Mayumi T. et al.: Conjugation of a Laminin-Related Antimetastatic Peptide with Chitosan. (Part 3), *The Japanese Peptide Society.*, 247-250, 2000.
13. Kamada H., Mayumi T. et al.: Antitumor activity of tumor necrosis factor- α conjugated with polyvinylpyrrolidone on solid tumors in mice, *Cancer Res.*, 60, 6416-20, 2000.
14. Tsunoda S., Mayumi T. et al.: Molecular design of PVP-conjugated interleukin-6 for enhancement of in vivo thrombopoietic activity in mice., *J Control Release.*, 68, 335-41, 2000.
15. Tsunoda S., Mayumi T. et al.: Selective enhancement of thrombopoietic activity of PEGylated interleukin-6 by a simple procedure using a reversible amino-protective reagent., *Br. J. Haematology.*, in press
16. Iwahashi, H., Kimura, M., Nakajima, N., Yamada, D. & Morita, T. : The determination of plasma prothrombin level by Ca²⁺-dependent prothrombin activator (CA-1) during warfarin anticoagulation. *J. Heart Valve Dis.*, in press
17. 森田隆司：ワルファリンの薬理，抗凝固薬の適正な使い方。櫻川信男，青崎正彦，上塚芳郎，和田英夫編，医歯薬出版株式会社，6-18 (2000)
18. 森田隆司：新しい血液凝固の仕組み。循環制御 21(4)，482-484 (2000)
19. Inoue-Suzuki, K., Ozaki, Y., Kainoh, M., Shin, Y., Wu, Y., Yatomi, Y., Ohmori, T., Tanaka, T., Satoh, K. & Morita, T. : Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin $\alpha 2 \beta 1$): involvement of GPIa/IIa-associated Src and protein tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 276, 1643-1652 (2001)
20. Shin, Y., Okuyama, I., Hasegawa, J. & Morita, T. : Molecular cloning of glycoprotein Ib-binding protein, flavocetin-A, which inhibits platelet aggregation. *Thrombosis Res.*, 99, 239-247 (2000)
21. Okuda, D., Nozaki, C., Sekiya, F. & Morita, T. : Comparative biochemistry of disintegrins isolated from snake venom: Consideration of the taxonomy and geographical distribution of the snakes in the genus *Echis*. *J. Biochem.* in press

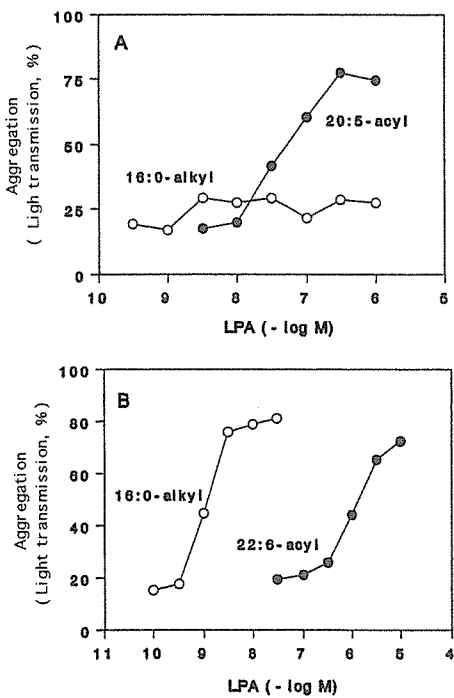
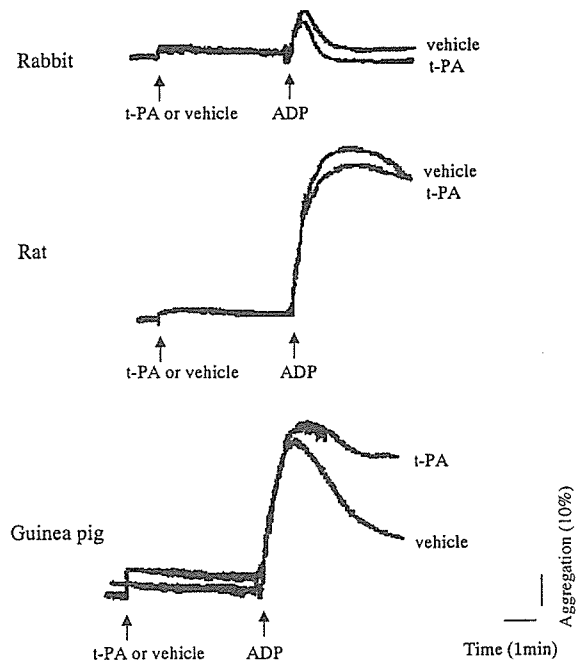
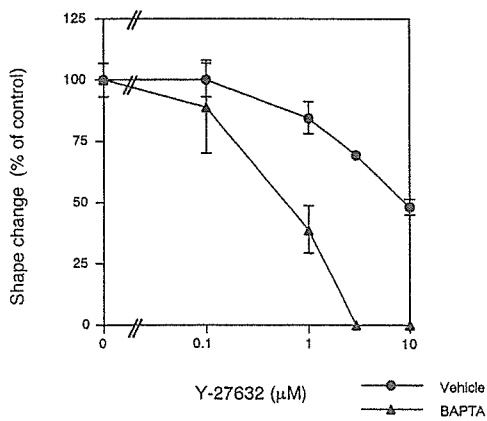
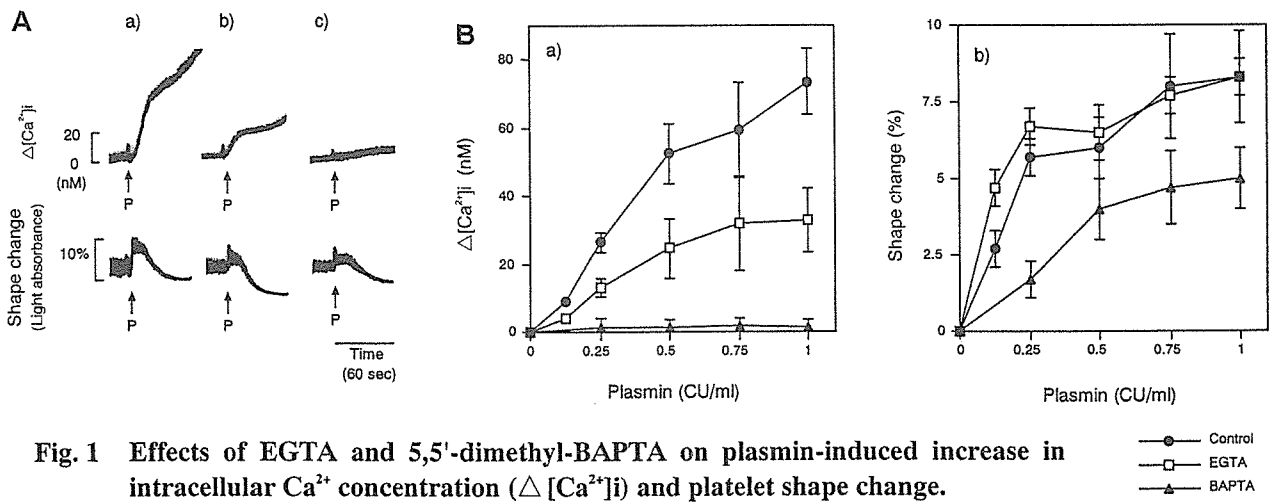


Fig. 3 Effect of t-PA on ADP-induced aggregation in rabbit, rat, and guinea pig platelets.

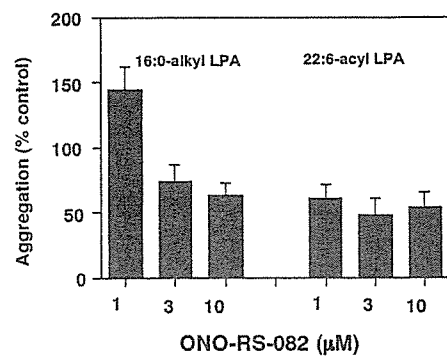


Fig. 4 Alkyl or acyl type LPA-induced human platelet aggregation.

Fig. 5 Effect of ONO-RS-082 on alkyl or acyl type LPA-induced platelet aggregation.

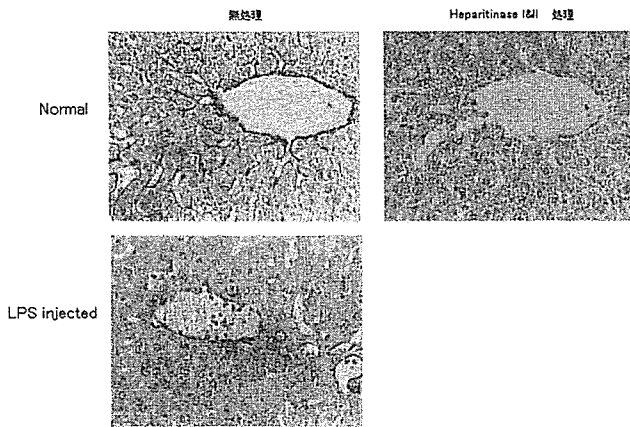


Fig. 6 Binding of Antithrombin to hepatic central vein.

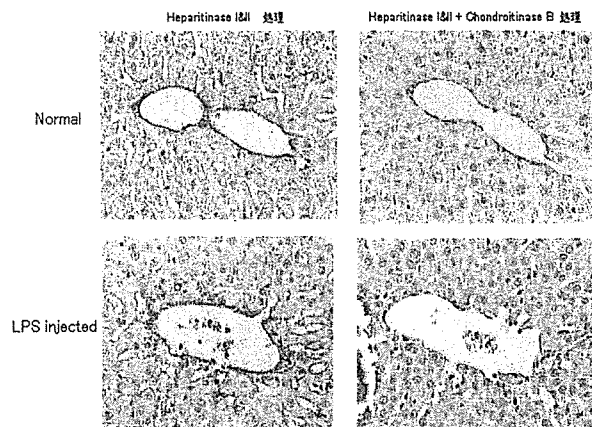


Fig. 7 Binding of Heparin cofactor II to hepatic central vein.

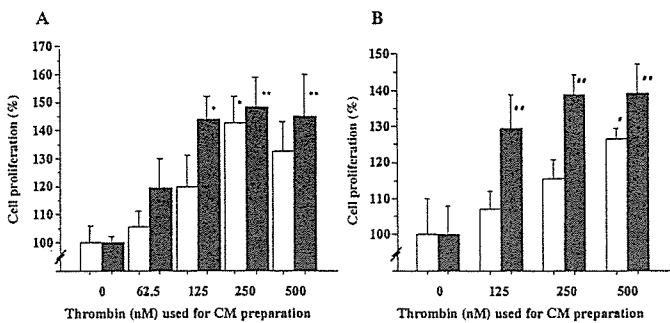


Fig. 8 Effect of conditioned medium (CM) from normal alveolar epithelial cells (A) and bronchial epithelial cells (B) treated with various concentrations of thrombin on proliferation of lung fibroblast cells (□) and bronchial smooth muscle cells (■). (* p<0.05, ** p<0.01, # p<0.05, ## p<0.03)

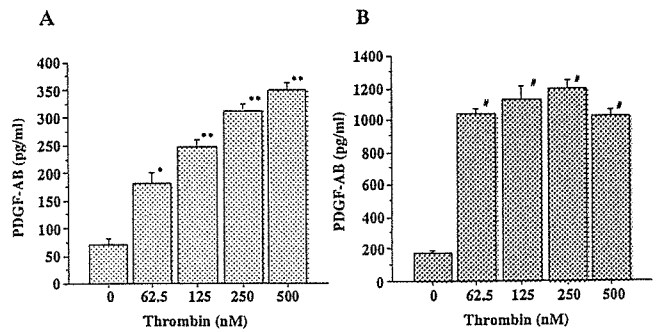


Fig. 9 Effect of various concentration of thrombin on production of PDGF-AB from BEAS-2B (A) and A549 (B) epithelial cell lines. (* p<0.01, ** p<0.0001, # p<0.0001)

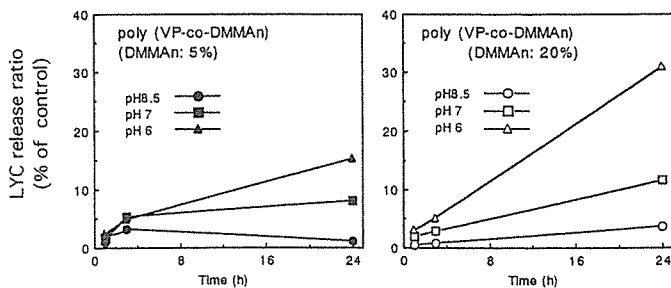


Fig. 10 Release of LYC from poly (VP-co-DMMAAn) under various pH conditions

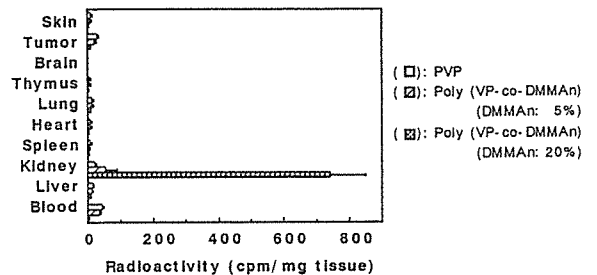


Fig. 11 Tissue distribution of PVP and PVP derivatives at 3h after i.v. injection in mice.

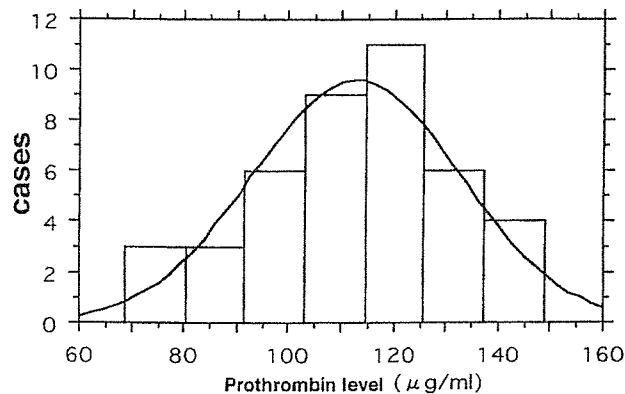


Fig. 12 Plasma prothrombin level using CA-1 method in 42 patients without warfarin.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社