

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

粘着現象における人工血小板の流体力学的挙動
—細胞近傍の微小流動及び微粒子運動の計測と解析—

分担研究者 谷下一夫（慶應義塾大学理工学部）

研究要旨

機能評価の第一段階として血小板止血機構の最初期の粘着現象に着目し、人工血小板粒子（ $r\text{GPIIb}\alpha\text{-AMS}$ 粒子）の流体力学的な挙動を *in vitro* 実験系を用いて評価し、管内流動分布ならびに速度ベクトルを計測した。 $r\text{GPIIb}\alpha\text{-AMS}$ （径 $2\ \mu\text{m}$ ）はせん断速度 1500s^{-1} で壁面近傍での局在が観察された。この挙動は血小板でも観察され血管壁面との相互作用を促進するメカニズムとして知られており、 $r\text{GPIIb}\alpha\text{-AMS}$ が止血に有利なように振舞うことが示された。また障害部位を模擬した vWF 壁面に粘着を生じ、このとき、壁面近傍を流れる粒子の軌跡の流れ方向からの変動が確認された。この挙動は生体内では残存血小板の相互作用を促進するように働くことが予測され、出血傾向を緩和する挙動として働くことが考えられる

A. 研究目的

血小板輸血は血小板減少症に対する唯一の効果的治療方法である。しかし、血小板製剤の保存期間は短く慢性的に供給不足であり、また感染症といった問題も深刻となっている。近年、これらを解決する最も有望な方法として、人工血小板の開発が望まれるようになった。ところが、これまで試作された幾つかの人工血小板は、実際に *in vivo* で出血傾向を緩和することが示されてはいるものの、臨床応用されるまでには至っていない。それは人工血小板の機能評価の指針が未だ明確では無いからである。

従来、血小板は血流中で血管壁近傍に局在することによって障害部位との相互作用を効率的に行っていることが知られている。また、赤血球の存在によって血小板同士、また障害部位との相互作用が促進されている。これらの挙動は血小板の、血流中の粒子としての特性に依存しているのは明らかであり、従って人工血小板をデザインする際にも、その流体力学的な挙動を考慮に入れることは重要である。そこで本研究では、現在試作段階にある

人工血小板 $r\text{GPIIb}\alpha\text{-AMS}$ を用いて、特に人工血小板の機能が問題となる、血管壁が破綻し内皮下組織が露出した場合の人工血小板の粘着現象に着目し、その機能を流体力学的な側面から評価することを試みた。また $r\text{GPIIb}\alpha\text{-AMS}$ は粒径を $200\ \text{nm}$ から $2000\ \text{nm}$ まで制御することが可能であることから、 $200\ \text{nm}$ と $2000\ \text{nm}$ の 2 種類の粒子を用い、その挙動の違いを比較した。

B. 研究方法

本研究では細動脈モデル流路として、Fig. 1 に示す矩形流路を用いた。本流路では、一枚のカバーガラスの端面を $\text{GPIIb}\alpha\text{-AMS}$ に対するリガンド vWF ($100\ \mu\text{g/ml}$) でコーティングすることで、局所的な血管壁の破綻を模擬し、かつ、その壁面へと向かう粒子の挙動を観察することが可能となった。実験系を Figure 2 に示す。流路は倒立顕微鏡 (Diaphoto, Nikon 製) に設置し Image Intensifier (XX1420AA, Delft Electronic Products 製) を介して高速度カメラ (SPEED CAM+, Weinberger 製) を接続した。 $r\text{GPIIb}\alpha\text{-AMS}$ は FITC (励起波長:

495 nm 蛍光波長：520 nm) で標識し Argon-ion laser (ILT5000, Ion Laser Technology 製) で励起した。

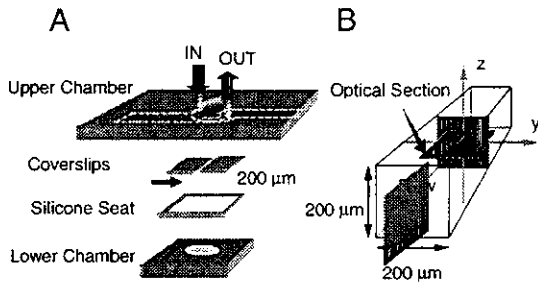


Fig.1 矩形管流路

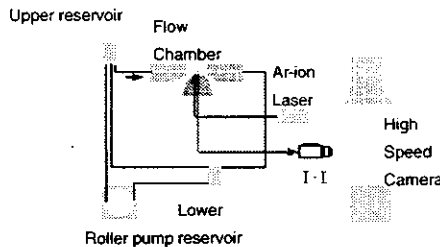


Fig. 2: 実験回路

灌流液は α GPIb \cdot -AMS の蛍光が透過するように赤血球ゴースト溶液 (Hct 40%) を用い、 α GPIb \cdot -AMS を HSA 濃度換算で 5 \cdot g/ml にした。灌流は上下リザーバの静水圧差により行い、せん断速度 190 s^{-1} および 1500 s^{-1} の定常流を負荷した。高速度カメラにより取得した画像は、画像処理ソフト NIH image (U.S. National Institute of Health 製) を用いて、粒子の二値化、重心位置の抽出を行い、管内流動分布を算出した。速度ベクトルは隣接二時刻の画像から、矩形管理論流速により同一粒子を対応づけ、その重心位置から算出した。

(倫理面への配慮)

in vitro 実験であるため、特に倫理面での問題は無いと思われる。

C. 研究結果

α GPIb \cdot -AMS (径 2000 nm) は vWF 壁面に粘着し、BSA 壁面には粘着しなかったことから、リガンド壁面に特異的に粘着することが示された。その管内流動分布はせん断速度 1500 s^{-1} において壁面近傍に局在し、そのピーク値 ($y^*=0.75$) は管中心のおよそ 5 倍に達した (Figure 3)。一方低せん断では、若干壁面近傍に分布は寄るものの、そのピーク値 ($y^*=0.85$) は管中心のおよそ 2.4 倍であった (Figure 3)。vWF 壁面近傍における粒子の速度ベクトルは、時間が経過し、壁面に粘着する粒子が増加するにつれ、不規則さを増していった。そこで、速度ベクトルの主流からのずれ角 Φ とし、BSA 壁面近傍、および vWF 壁面近傍を流れる粒子の速度ベクトルから算出すると BSA 壁近傍では平均で $\Phi = \pm 16.4^\circ$ であったのに対し、vWF 壁近傍では $\Phi = \pm 24.1^\circ$ となった (Figure 4)。本来 α GPIb \cdot -AMS は粘着機能を持つことを狙って作製された人工血小板である。従って、実際に止血血栓を形成させるためには、さらに凝集機能を持つことが必要であると考えられている。しかし、今回の結果からは、壁面に粘着するだけでもその周囲の流れ場が乱れ、粒子同士の相互作用を促進させていることが示唆された。すなわち、血小板減少症患者に輸注した場合、この挙動によって、残存血小板の相互作用を促進し止血傾向を緩和することが期待できると考えられる。

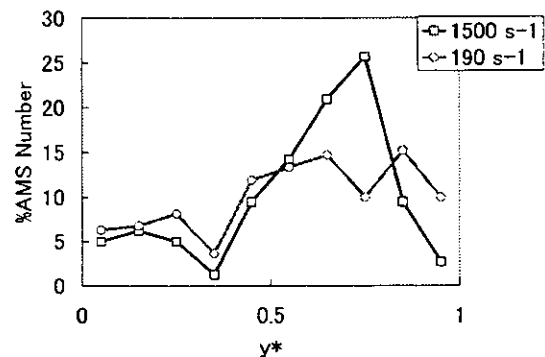


Fig. 3: 矩形管内流動分布 ($y^*=0$: 管軸, $y^*=1$: 管壁)

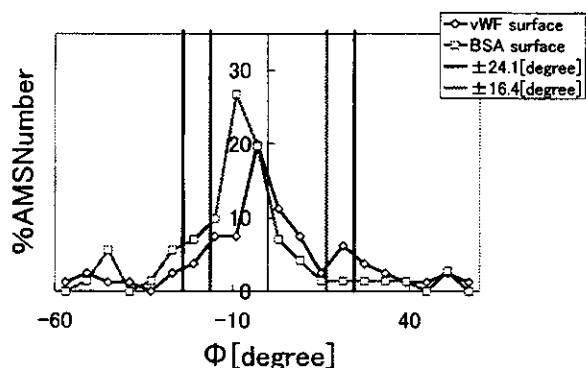


Fig. 4: 壁面近傍を通る粒子の
速度ベクトルのずれ角 Φ の分布

C. 研究結果

r GPIb \cdot -AMS は vWF 壁面に粘着し, BSA 壁面には粘着しなかった. また, コーティングを施さないガラス壁面を用いた場合にも粘着が生じていないことから, レセプター—リガンド特異的な結合が生じていることが明らかであった. (Fig. 3) しかし, 壁面に接触した粒子は必ずしも全てがその場に粘着するわけではなく, リガンドコーティング及び共有結合されたレセプターの密度が影響していることが考えられた.

壁面に粒子が粘着すると, その近傍を通過する粒子の速度ベクトルは壁面に垂直な方向へのずれが生じるのが観察された. (Fig. 4) これは, 壁面に粒子が粘着することによって, 壁面近傍の流れ場に変化が生じ, それに粒子の挙動が影響を受けたのだと考えられる

特に粒子の挙動の観察結果を Fig. 5, 6 に示す. Fig. 5 では, BSA 表面近傍の粒子の運動を観察しているが, 特に粘着の様子が見られない. ところが Fig. 6 では vWF 表面への顕著な粘着の様子が観察されている.

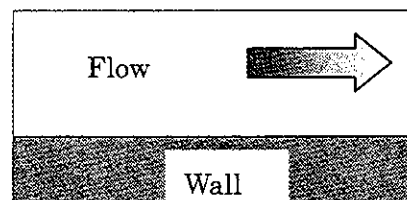
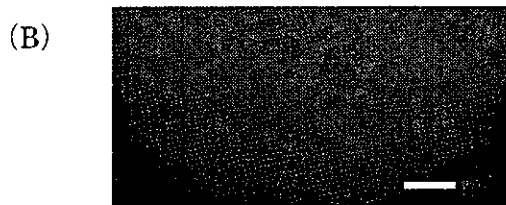
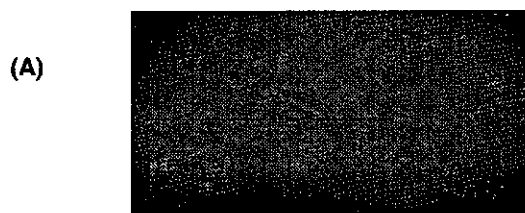


Fig. 5 BSA 表面近傍の r GPIb \cdot -AMS. 特に表面に粘着している様子は見られない。

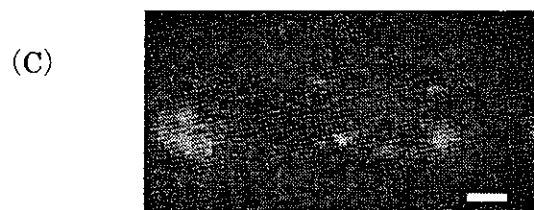
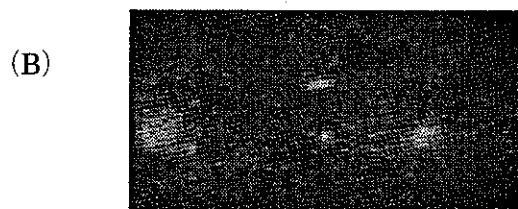
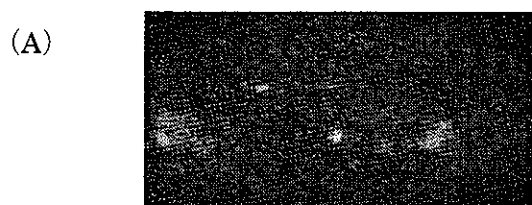


Fig. 6 vWF 表面近傍の r GPIb \cdot -AMS の挙動。

表面に粘着する様子が見られる。

D. 考察

α GPIIb/IIIa-AMS はリガンド壁面に特異的に粘着することから、血管破綻時、障害部位に特異的に粘着することが期待される。本研究において、壁面に人工血小板粒子が粘着した場合、その近傍での流れ場に乱れが生じることから、このとき壁面および粒子同士の衝突が促進されているということが予測される。今回用いた、人工血小板プロトタイプはリガンド壁面との粘着機能のみを持たせることを狙って試作されたものであるため、粒子同士の衝突が生じて凝集塊の形成には繋がらない。しかし、実際に臨床で用いる場合には、血小板が全く存在しない病態というのは考えられず、従って、単体では凝集能を持たない人工血小板であっても、その流体力学的な挙動が、残存する血小板との凝集塊形成に積極的に働き、血小板減少症時に止血機能を増強することが期待される。

E. 結論

人工血小板の壁面近傍の振る舞いを微視的に観察する事が出来、その結果表面の vWF に呼応して特有な粘着プロセスを示す事が解った。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) S. Fukushima, T., Deguchi, M. Kaibara, K. Oka, K. Tanishita, Microscopic velocimetry with scale-up model for a flow field over cultured endothelial cells, Trans. ASME, J. Biomech. Eng., (to appear)
- (2) S. Fukushima, A. Nagatsu, M. Kaibara, K. Oka and K. Tanishita, Measurement of

surface topography of endothelial cell and wall shear stress distribution on the cell, JSME Int. J., Vol.44, No.44 (2001) pp.972-981.

- (3) 福島修一郎、藤岡秀樹、谷下一夫、流れ負荷による内皮細胞の形態再構築過程における細胞表面のせん断応力分布、日本機械学会論文集（掲載予定）

2. 学会発表

- (1) 辻徹也、和田透、武岡真司、池田康夫、谷下一夫、矩形管モデルにおける人工血小板粒子の壁近傍における挙動、第40回日本ME学会、BME第39巻特別号、p665
- (2) 辻徹也、田端隆、武岡真司、池田康夫、谷下一夫、矩形管モデル流路における人工血小板の粘着の挙動解析、第14回バイオエンジニアリング講演会講演論文集（2002）pp.135-136

H. 知的財産権の出願・登録状態

なし

厚生科学研究費補助金（人工血小板研究事業）
平成 13 年度分担研究報告書

人工血小板代替物 Glycoprotein Iba α -liposome の生体内挙動
—人工血小板の微小流動及び微粒子運動の計測と解析—

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学
研究協力者 柏木 哲 慶應義塾大学医学部産婦人科学

研究要旨 昨年度までの研究で血小板膜上に発現する接着分子である GPIba α は微小血管において血小板が内皮細胞近傍を通過するために必要なメカニズムを担っていることがラット微小循環における生体内解析で明らかになった。ヒト GPIba と交叉反応性を示すラットの微小循環系はヒト組み換え型 GPIba を表出させたリポソーム粒子(Lipo-GPIb)の挙動を解析するのに最適な系であることを利用し、shear stress の高い細動脈における Lipo-GPIb の挙動を詳細に解析した。Lipo-GPIb は血管内投与すると細動脈と一過性の接着反応を示すが血小板凝集や内皮への接着を示さなかった。また GPIb の counter receptor であり Lipo-GPIb の挙動決定因子と考えられる von Willebrand factor (vWF)の分布を蛍光標識抗 vWF 単クローン抗体検討したところ流血液中以外にも細動静脈内皮細胞表面に発現していることが示された。

はじめに

A 研究目的

人工素材から成る vehicle の表面にヒト組み換え型の接着分子を表出させてその生体内機能評価を行う系を確立することは人工血小板の実用化に必須のプロセスである。昨年度までの研究で GPIba α を表出させたリポソーム (Lipo-GPIb) がそのような candidate として作成され、ヒト組み換え型 GPIb がラットの vWF や P-selectin と結合し交叉反応性を持つことが示されヒト GPIb の機能を生体内解析するためにラット微小循環が格好のシ

ステムであることが示された (1)。今年度はそのような生体内評価系をさらに refinement を行い、Lipo-GPIb の血管内分布や移動速度の評価を行える系を確立し、Lipo-GPIb が shear stress の高い細動脈内皮細胞表面を数十ミリ秒間の一過性接着を起こすこと、また本粒子が血管内に均一に分布せず、GPIba α を用いて接着していること、さらに GPIba α の counter receptor である vWF が細動脈内皮細胞表面に優勢に発現し、その一過性接着反応に関与することが示された。これらの成績は血小板減少症における出血傾向で致死性の脳内出血などの動脈性出血の抑

止戦略を考える上で極めて重要なコンセプトであると同時に、vehicle particle を血管内皮細胞近傍にアクセスさせるために GPIIb α が利用できることを示すものである。

また今年度の研究では投与したリポソーム粒子が最終的に代謝されるコンパートメントとしての肝臓微小循環における生体内解析法の確立も行った。肝臓の Kupffer cell は類洞内腔に突出したマクロファージであり網内系の大半を構成している。リポソーム粒子の調整遅延等の影響で年度内に十分な解析が進められなかったものの、新たに構築した共焦点レーザー顕微鏡システムにより、大きさ 0.1-1.0 ミクロン程度の粒子の Kupffer cell への取り込みの解析や、GPIIb α と相互作用しうるとされる Integrin 系の接着分子を有する Kupffer cell あるいは他の免疫担当細胞 (Dendritic cell) との相互作用などが肝臓微小循環で詳細に解析できるようになった。これらの成績報告は別添の論文別刷に示し、本稿では論文未発表の成績を中心に報告する。

B 研究方法

1 蛍光標識 GPIIb α -coated liposome (Lipo-GPIIb)の調整

Nishiya らの既報の方法に従い、ヒト組み替え型 GPIIb α を径約 250nm のリポソーム粒子表面に表出させ、rhodamine による蛍光標識を行った。リポソーム粒子は濃度 1×10^{11} 個/ml に調整した。コントロールとして GPIIb 分子を表出させていないリポソーム粒子、および昨年度同様、Shear を感知しない Gain-of-

function mutant である M239V GPIIb α を同条件で表出させた蛍光標識リポソーム粒子も作成した。Wild-type GPIIb α を有する血小板は必ずり応力依存性の血小板凝集を示すが M239V mutant は必ずり応力に関係なく血小板凝集が亢進することが知られている (3)。したがって両者の生体内挙動を知ることにより lipo-GPIIb の血管壁との相互作用のメカニズムにおける必ずり応力依存性の関与を検討できると考えた。

2 微小血小板粒子の超高速高感度ビデオ観察法

既報の方法を用いて、Wistar 系雄性ラット (300g)腸間膜微小循環において蛍光標識リポソーム粒子の生体内撮像を試みた。これらの解析には通常ビデオ記録速度 (30 frame/sec) ではあるものの検出感度の高い撮像法である Silicon intensified target (SIT) camera を用い、Gain 8, offset 2 の条件を固定して微小血管の撮像を行った。観察は 20-30 ミクロン径の細動脈、細静脈を任意に選択して、蛍光標識粒子の挙動を SVHS video recorder に記録した。リポソーム粒子は 2×10^{10} 個/rat を 1 分かけて大腿静脈カテーテルから投与を行い、投与前および投与後 1 分、5 分、10 分以降 10 分ごとに 40 分までビデオ画像を各 2 分間記録した。この記録時間の間、観察領域を励起波長 530nm で epi-illumination を行い画像を取得し、観察のインターバルには照射を止めて組織の障害を最小限にする工夫を行った。

一方リポソーム粒子の血管内皮細胞

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 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。これらの抗体は、リポソーム標品に ex vivo であらかじめ 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 10 分間 incubate し、洗浄後体内投与に供した。

3 ビデオ解析による Lipo-GPIIb の微小循環における挙動解析法

流血中に投与した蛍光標識粒子は血液とともに流れるためそれ単独では強い蛍光を生じないが、複数が凝集して血管壁に一過性に接着することにより強い蛍光を生じると考えられる。この際粒子数の増大により蛍光強度は増加すると考えられる。したがって微小血管壁近傍に蛍光強度測定用のウィンドウ ($2 \times 2 \mu^2$) を設置し、観察した血管のビデオ画像をランダムに選定して微小凝集粒子の蛍光強度を 8 bit のグレイレベルとして表現し計測を行った。画像解析ソフトとして IP-Lab/NIH Image 1.63 を使用し、ビデオ画像は 10 秒ごとに 10 フレームを静止画像として取得したのち、血管内皮細胞の内腔側にウィンドウを設定して血管の長軸方向に移動させてランダムに 40 箇所/1 画面でグレイレベルを測定した。この測定により凝集塊のない血管内腔には遊離リポソームの存在による弱い蛍光が測定され、凝集塊の存在部位では強い

蛍光が測定されることになる。このような測定データを各群 5-7 匹のラットを用いた実験から集積し、ヒストグラム解析により比較検討した。

4 Multi-pinhole laser confocal microscopy による微小血管内血小板密度の解析

既報の Katayama らの方法に従い、ラットに蛍光色素 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を投与し、血管内の血小板を生体染色し、その挙動を腸間膜微小循環系において Multi-pinhole laser confocal microscopy により観察した。動態画像は C5810 Intensified CCD camera により撮像し、3 に示した digital imaging system により画像を取得した。本システムでは焦点結像位置を Z-axis 方向に 2 ミクロン程度の空間分解能で移動することが可能であるため、これを利用し血管の centerline で scan し、血管長軸方向に見て単位時間あたりに中央線を通過する血小板数 (Dc) と傍血管内皮細胞領域を通過する血小板数 (Dpe) を算出し、両者の比 (Dpe/Dc) をとることにより血小板の偏在分布の指標とした。また本システムでは 720cps の頻度で laser flash が照射されるため動体は鎖線状に像が得られる。この特性を利用して血管内皮細胞と接着して減速した血小板と、接着せず free-flow する血小板の出現頻度が AJ-vW2 や GUR83/35 の投与によりどのように変化するかを解析した。

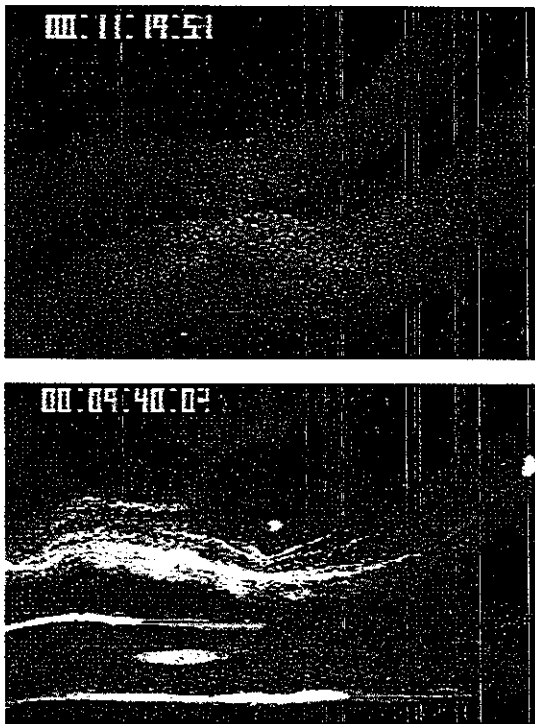


図1 Lipo-GPIIb の腸間膜微小循環における挙動。上段：GPIIb-free liposome の典型像。上の血管が細動脈、下が細静脈を示す。下段：GPIIb-coated liposome の挙動。下が細動脈、上が細静脈を示す。

C 実験結果

1 Lipo-GPIIb の生体内挙動

図1に蛍光標識 Lipo-GPIIb の細動脈における凝集塊形成の典型像を示した。傍内皮細胞領域のグレーレベルを10秒(300 frame)にわたり解析し、Liposome が凝集することによりできる高輝度の粒子の出現頻度をヒストグラム解析したところ、Lipo-GPIIb が shear stress の高い細動脈で小凝集塊を形成することが明らかになった(昨年度報告書に一部データ掲載)。観察した細動脈の

wall shear rate は $800\text{--}1600\text{ sec}^{-1}$ の幅を有したが各群で有意な差を認めなかった。コントロールのリポソーム粒子は微小血管内腔をほぼ均一に分布し、図1の上を示すように低いグレーレベルに留まった。ヒストグラム解析では平均のグレーレベルが80前後を示すほぼ一峰性の分布であり120以上の強度を示す領域は認めなかった。これに対して Lipo-GPIIb を投与した群では血管内腔の染色を認めるものの大部分は明るい小粒子塊を形成して血管内に heterogeneous に分布した(図1下)。粒子の明るさにも著明な不均一性が存在し、グレーレベルは最高で200にも及んだ。同様の条件で Lipo-GPIIb に ex vivo でモノクローナル抗体 GUR83-35 をあらかじめ結合させた標品では明るい粒子の頻度が著明に減少し、ヒストグラムの形状はコントロールのそれに近づいた。一方 GPIIb に結合するもののその接着性を阻害しない抗体である WGA3 の処理群では抗体処理をしない Lipo-GPIIb 粒子と同様のヒストグラムを呈した。また下段に示すようにラット vWF と交叉反応性を示す抗体 AJvW2 の投与(1.5 mg/kg iv)でも粒子の凝集形成が著明に抑制された。このような Lipo-GPIIb 粒子の血管内皮細胞への接着は基本的に一過性であり、1秒を超えて接着する粒子の頻度はまれであった。

このような Lipo-GPIIb 粒子の一過性接着は shear rate が 500-600 程度の細静脈でも認められ、不均一な蛍光強度を持つ粒子の接着として認識できたが、その一部は内皮細胞上を rolling する白血球と一塊を形成して流れていることが明らか

となった。したがってその挙動は rolling する白血球のない細動脈とは様相を異とし、血管内皮と接着したのち白血球に巻き込まれて下流に流れるものやはじめから白血球に接着した状態で rolling するものなどの多様性が認められたため、細動脈側で行ったような解析が困難であった。しかしこれらの所見は体内に投与された Lipo-GPIb の少なくとも一部が白血球表面に接着することを示した。

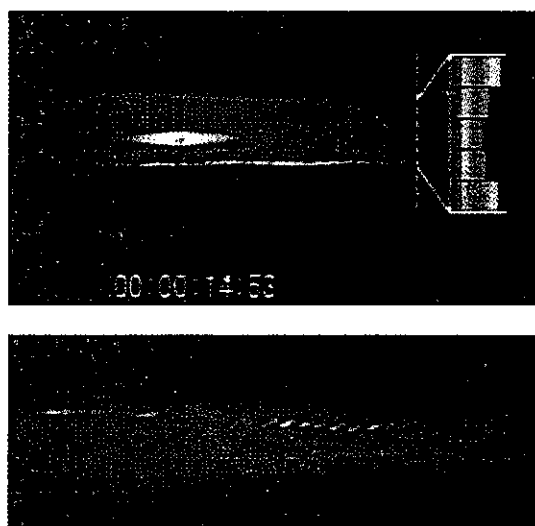


図 2 Multi-pinhole laser confocal microscopy による血管内血小板密度不均等分布の解析。上段は血管径の中央でスライスした典型像であり右側のスリットを通過した血小板の数を計測すると明らかに内皮細胞辺縁を通過する細胞が多いことが判明する。下段は同一血管を傍内皮細胞領域まで focus down した像であり、複数の血小板が heterogenous な速度で内皮細胞と接触していることがわ

かる。

2 Multi-pinhole laser confocal microscopy による血管内血小板密度不均等分布の解析

図 2 に Multi-pinhole laser confocal microscopy で撮像した微小血管（細動脈）での血小板挙動を示す。本システムは 720cps でレーザー点光源照射を多発的に実行し、共焦点画像を結像させることができるため、CFSE で標識された血小板は鎖線状に描出される。Z-axis にそって焦点を移動させると血管の中央と傍内皮細胞領域の血小板動態を別々に撮像することができた。このような手法で鎖線状に描出されない比較的低速度で内皮細胞と接触した血小板の出現頻度 (D_{pe}/D_c) を局所の wall shear rate の関数としてプロットしたものを図 3 に示した。ここに示すように shear の高い部位において D_{pe}/D_c 値が高くなる傾向が示された。すなわち shear の高い細動脈側では血小板密度は内皮細胞近傍においてより高い傾向にあり細静脈側ではこれが逆転することが明らかになった。また AJ-vW2 抗体投与あるいは GUR83/35 の投与群では細動脈側における血小板偏在分布が消失することも示された。双方の抗体を同時投与しても additive な効果が認められないことから両者の相互作用が細動脈における血小板の偏在分布を決定する critical な要因であることが示された。

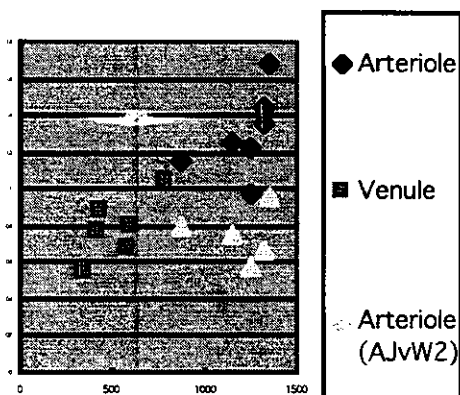


図 3 Multipinhole laser confocal microscopy による血小板の血管内偏在分布の解析。X 軸：wall shear rates (1/sec) Y 軸：Dpe/Dc (>1.0 で下に凸)を示す。Arteriole では血小板が傍内皮細胞域に集積すること、AJ-vW2 (Fab fragment) を 1.5 mg/kg 投与して 20 分後の同一血管での分布を調べたもの (△) ではこの分布が逆転することが示された。

D 考察

高解像度の multipinhole laser microscopy により血小板が high shear の部位で血管壁の近傍を走行すること、そのメカニズムに血管内皮上の vWF が関与する可能性が示唆された。Lipo-GPIb 粒子はこのような血小板の挙動を再現して止血機序に critical な部位である periendothelial space に集積する性質を持つこと、また正常の血管では stationary な接着を起こさずに circulation することが明解に示された。また今年度には liposome 粒子の

肝臓網内系における代謝分解の挙動を解析する方法を確立し、一部は論文として発表した (文献 1、2)。今後このような方法を駆使して、人工血小板粒子の体内挙動をさらに詳細に解析する予定である。

今年度の関連研究業績

1) Kyokane, T., Norimizu, S., Taniai, H., et al. Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 120, 1227-1240, 2001

(リポソーム粒子の肝臓微小循環への取り込み挙動、Kupffer cell の役割について考察。)

2) Tanimoto, A., Oshio, K., Suematsu, M., Pouliquen, D., Stark, D. Relaxation effects of clustered particles. *J. Magnet. Reson. Imag.* 14(1):72-77, 2001.

(網内系のうち肝臓および脾臓への取り込みの決定因子として微小粒子の粒径が重要であることを示した。)

3) Morisaki, H., Katayama, T., Kotake, Y., Ito, M., Ishimura, Y., Takeda, J., Suematsu, M. Roles of carbon monoxide in leukocyte and platelet dynamics in rat mesentery during sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 95, 192-199, 2001.

(血小板接着が内毒素血症などの病態に

において白血球接着の助長を来す因子でありその際血小板が生成する CO が modulator となることを示した。)

4) Suzuki, T., Makino, R., Suematsu, M. Organic phosphates as a new class of soluble guanylate cyclase inhibitors. FEBS Lett. 507, 49-53, 2001
(血小板や血管平滑筋に含まれる soluble guanylate cyclase の内因性阻害物質の検索。)

5) Mine, S., Fujisaki, T., Suematsu, M., Tanaka, Y. Activated platelets and endothelial cell interaction with neutrophils under flow conditions. Intern Med. 2001, 40, 1085-92.

(活性化した血小板が血管内皮細胞における白血球接着を助長することを in vitro の conditional flow chamber を用いて解析した)

6) Uwatoku, R., Suematsu, M., Ezaki, T., Saiki, T., Suganuma, T., Naito, M., Ando, M., Matsuno, K. Kupffer cell-mediated recruitment of rat dendritic cells to the liver: roles of N-acetylgalactosamine receptors. Gastroenterology 121, 1460-1472, 2001.

(肝臓の Kupffer cell が流血中の免疫担当細胞：樹状細胞の接着と組織移行に必要な糖鎖蛋白質を発現していることを見い出した。GPIbなどを発現した粒子が Kupffer cell に捕捉されることを考慮すると、人工血小板粒子の生体内半減期を決定する因子として重要である。)

7) Suematsu, M., Suzuki, H., DeLano, F.A., Schmid-Schoenbein, G.W. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension. Microcirculation in press.

血小板減少モデル動物の作成と人工血小板の *in vivo* での機能評価

分担研究者	長澤 俊郎	筑波大学	血液内科教授
	武岡 真司	早稲田大学	理工学部助教授
研究協力者	長谷川雄一	筑波大学	血液内科講師
	柳 健一	筑波大学	医工学講師
	大島 宣雄	筑波大学	医工学教授

研究要旨

アルブミン重合体に GPIb α , IaIIa を結合させた血小板代替物(alb-Ib, alb-IaIIa) を用い、 γ 線を照射した血小板減少ラットにおける機能評価を試みた。評価法は、1:尾による切創の出血時間、2:吸引圧による紫斑の形成、3:腸間膜の細静脈を用いた光化学反応による血管閉塞を用いた。吸引圧による紫斑形成は、血小板数と形成される紫斑の間に相関はみられず、評価系として不相当であった。血小板数 83000 / μ l 未満において切創の出血は止血しないことが明らかとなったが、alb-Ib は止血効果を示さなかった。腸間膜における血管閉塞系では、血小板数 alb-Ia, alb-IaIIa による血管閉塞が血小板減少状態においても観察された。

A.研究目的

alb-Ib, al-IaIIa の生体内での有効性を明らかとすることを目的とした。併せて、血小板減少状態での止血効果を評価する系の確立を図った。

B 1. 評価方法

- (1) 出血時間の測定: 出血時間(BT)は、ラットの尾の端から 3cm の部分にシンプレートを用いて長さ 1cm, 深さ 1mm の切創をつくり、30 秒毎に濾紙で出血塊を吸い、血液の付着が無くなるまでの時間とした。
- (2) 吸引による紫斑の形成: 直径 9 mm の吸引カップを除毛したラットの腹壁に当て、0.08Mpascal の吸引圧で吸引した。1 または、2 分間の吸引を複数回行って形成される紫斑の数を計測した。
- (3) 光化学反応による血栓形成: 1.25% Fluorescent-Na 200 μ l/100gBW をラット静脈内に投与する。直径

40 μ m の腸間膜静脈を選び、600-700nm の波長の光を照射した。Fluorescent -Na は、光化学反応により single molecule oxygen を放出し血管内皮を障害する。これにより形成される血栓を観察し、血流の完全停止までの時間を測定した。

2. 実験動物

人の血小板糖蛋白と相同性の高い F344 近交系ラット を使用。9-12 週齢、100-250g の固体を用いた。血小板産生は 7Gy の γ 線照射で抑制した。

実験は、全てペントバルビタールによる麻酔下で行い、不可逆的な処置を加えたラットは、実験終了後速やかに安楽死処置を施した。

3. 血小板代替物

アルブミン重合体に血小板糖蛋白 Ib α , IaIIa を結合させたものを使用した(alb-Ib, alb-IaII)

alb-Ib, aib-IaIIa は、各々Ib, IaIIa を 11.4, 34.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する。各実験において、血小板代替物を 750 $\mu\text{l}/100\text{gBW}$ 頸静脈から輸注し、その5分後から実験を開始した。

C. 結果

1. 出血時間による評価

出血時間は、血小板数が 83000/ μl 未満の場合、止血が観察されなかった。血小板数 44500, 45000, 103000/ μl において alb-Ib による止血を試みたが、各々が止血をもたらすことが出来なかった。

2. 吸引による紫斑の形成

以下の図に示すように血小板数と紫斑の数の間には、相関を見出すことが出来なかった。

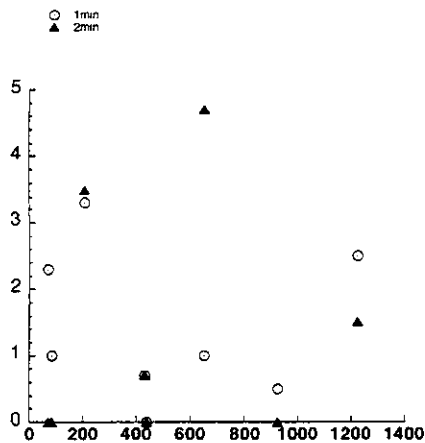


図1；血小板数と吸引圧による紫斑
axis X; plt, Y; petechia
open circle; suctioned 1 min, and
filled triangle; 2min.

3. 光化学反応による血栓形成

光化学反応による刺激を加えても血小板数 53000/ μl 以下の条件では、血管の閉塞は生じなかった。Alb.重合体を加えた場合も血管の完全閉塞は生じなかった。

しかし、alb-Ib, alb-IaIIa を加えた場合、各々血小板数 35500, 40000/ μl においても血管の閉塞が観察された。

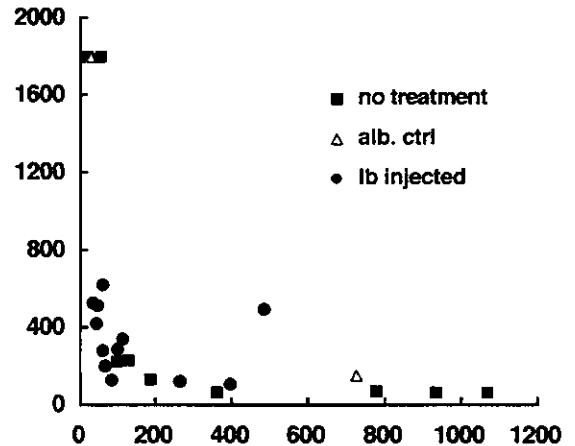


図2；alb-Ib 静注後の光化学反応による血栓形成までの時間

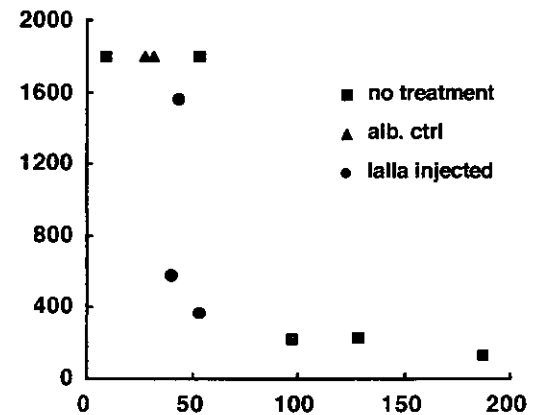


図3；alb-IaIIa 静注後の光化学反応による血栓形成までの時間

図2, 3とも

y 軸：血管閉塞までの時間 (秒)

x 軸：血小板数(x10³/ μl)

filled square: 無処置

open triangle: alb.重合体

filled circle: alb-Ib 打ち込み

D. 考察

今回、光化学反応による血栓形成を観察する系を導入したことで、これまで

切創による出血時間が唯一の評価法であった *in vivo* での血小板機能評価に多面的な評価が可能となった。出血時間は、いわば大きな血管破綻に相当し、光化学反応による血栓形成は小血管の障害による血栓形成のモデルと考えることが出来る。alb-Ib, alb-IaIIa は、光化学反応による血栓形成を血小板減少下においてもたらし、これらの血小板代替物の限局した部位における働きが明らかとなった。

E. 今後の研究計画

- ・ alb-Ib, alb-IaIIa の輸注後生じた血栓の微細構造を検討し、alb-Ib, alb-IaIIa が血栓形成にどのように関与しているか、明らかにする。
- ・ 凝固線溶系に与える影響を検討する。

F. 学会発表

(1) 培養骨髄巨核球から産生された血小板の形態と機能

日本血液代替物学会

第8回年次大会シンポジウム

(2) Morphology and function of *in vitro* induced-platelets (IVIP) derived from murine hematopoietic stem cells.

United Kingdom-Japan platelet conference

G. 論文発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

人工血小板開発研究の動向調査とその臨床応用に関する研究 －血小板輸血の動向調査と人工血小板の臨床応用に関する研究－

分担研究者 池淵 研二 東京医科大学生化学助教授
研究協力者 池田 久實 北海道赤十字血液センター所長
東 寛、藤原 満博、阿部 英樹、山田 淑子
北海道赤十字血液センター研究部

研究要旨

現在開発中の血小板代替物の生体内投与の際の安全性に関して検討を試みた。血小板糖タンパク GPIb 固相化アルブミン重合体およびフィブリノーゲン固相化アルブミン重合体を正常血清 10%添加する系を用い、補体の活性化を CH50 および C5b-9 複合体を指標にアッセイした。CH50 を正常人血清 (n=3) で検討したところ、最大 8%の低下を認めたが、陽性コントロールのザイモザンのように検出限界以下になるような低下ではなかった。C5b-9 複合体を正常人血清 (n=4) で検討したところ、1.4~4.1ug/ml のレベルを示し陰性コントロールの PBS と差がなかった。また陽性コントロールのザイモザンでは 150ug/ml と著明な増加を示した。産生された活性化補体が生理的に機能するか否か好中球の遊走能への影響としてアッセイしたところ (n=3)、陰性コントロールの PBS の示す遊走活性に対し 98~140%の活性を示すのみで、陽性コントロールのザイモザン (1200%)、fMLP (700%) に比べ軽微な変化であった。

A. 研究目的

これまで人工血小板製剤として血小板糖タンパクやフィブリノーゲンをリポソームに固相化した製剤を扱ってきた。リポソーム製剤の投与は時にアナフィラキシーショックやアレルギー反応を惹起することが報告されている。一方輸血学の領域では、成分採血中の回路内に活性化補体が産生されるが、その回路内の血液を返血してもドナーに生体反応が惹起されることはほぼ無いと考えられている（カルシウムレベルの減少による神経過敏症状はあるが）。血小板代替物は輸血製剤と同等あるいはより以上の安全性が担保されている必要があると考え、補体の活性化の視点か

ら検討を行った。昨年まで検討ではある種のリポソームは数倍程度の補体の活性化（C5b-9 の産生）を惹起する可能性が示された。今年度は血小板糖タンパクおよびフィブリノーゲンをアルブミン重合体に固相化した製剤を用いて、補体の活性化を CH50 と C5b-9 でアッセイし、また活性化補体が生理活性を有するかどうかを好中球遊走活性を指標に検討した。

B. 研究方法

1) CH50 アッセイ

日本凍結乾燥研究所製 New ワンポイント IT-10 キットを用いた。正常人血清に 10%

になるようにアルブミン重合体、GPIb 固相化アルブミン重合体、フィブリノーゲン固相化アルブミン重合体を添加した。反応上清を 14,500rpm、15 分間遠心しアルブミン重合体を沈澱させた。コントロールとして PBS (陰性コントロール) とザイモザン (5mg/ml) を用いた。

2) C5b-9 複合体アッセイ

QUIDEL 社製 SC5b-9(TCC)キットを用いた。検体の調整は1)と同様に行った。

3) 好中球遊走活性

ヘパリン化注射器にて正常人から末梢血を採取した。ハイドロキシエチルスターチ (HES) を 1/1 容添加し、20 分間静置後、血漿とパフィーコート層を回収した。パフィーコート層を Lymphoprep に重層し 400g で 20 分間遠心し、単核球と好中球を分離した。好中球分画に含まれる赤血球は蒸留水で溶血後 1.6% 食塩水を加え処理し、好中球を回収した。

5 ミクロンのポアサイズを持つ 24 ウェル用クラボウ社製ケモタキセルに好中球を 2.5×10^5 個/0.2ml で添加した。下の 24 ウェルに 1) で採取した上清を 0.5ml 添加した。1 時間 37°C で炭酸ガス培養器で反応させた後、下のウェルに遊走した好中球をプロピディウムイオダイド (PI) を用いて核染色し、フローサイトメトリーで細胞数をカウントした。これを遊走能として評価した。

陽性コントロールとして fMLP 0、1、10、100nM 添加 PBS、0.8% ザイモザン活性化血清添加 PBS を用いた。

C. 結果

1) 補体の活性化

図 1 に CH50 の成績を示す。キットのコントロール血清では 40U/ml、ザイモザンと反応させた血清では 5.3U/ml 以下の CH50 値が得られた。一方 3 ドナー血清ではコントロールの PBS に比べ最大 8% の低下を示すのみであり軽微な変化と予想された。

みであり軽微な変化と予想された。

図 2 に C5b-9 複合体の成績を示す。4 ドナー血清では PBS コントロールに比べ最大で 138%、レベルでは 4ug/ml 程度の増加があったが、陽性コントロールのザイモザンで 118~200ug/ml と著明に増加することを考えあわせると、軽微な変化と予想された。

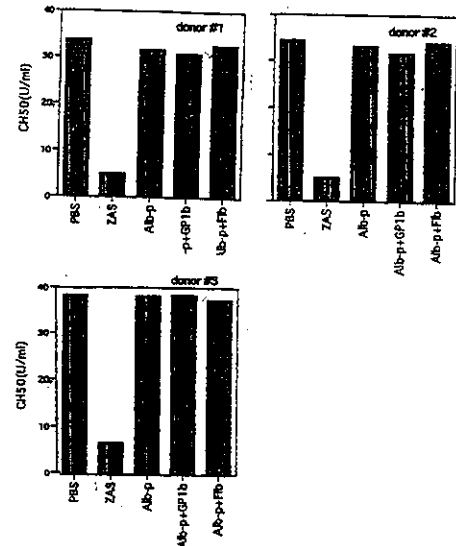


図1.アルブミン重合体による補体活性化 (CH50)

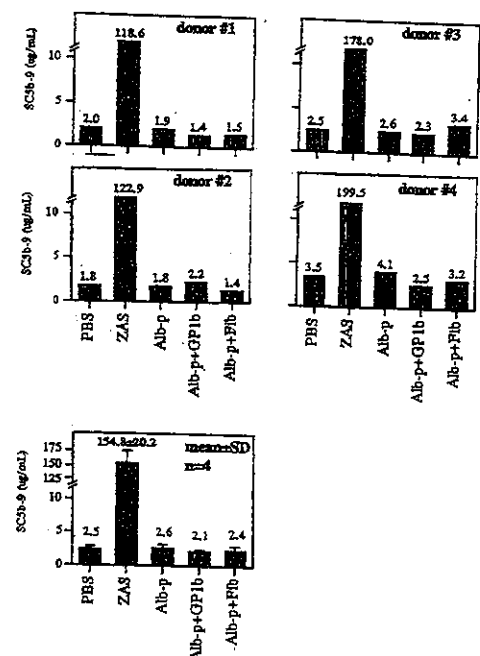


図2.アルブミン重合体による補体活性化 (C5b-9)

2) 好中球遊走活性

上の検討で軽微な増加を示した活性化補体に生理活性があるか否か、純化したヒト好中球 (n=1) を用い 3 ドナー血清の遊走活性として検討した。図 3 に示したように、ゼイモザンと反応させた血清を添加した PBS および fMLP を添加した PBS では、コントロールに対し 12 倍、7 倍の遊走活性があったが、3 種類のアルブミン重合体と反応させた血清には顕著な遊走活性を認めなかった。

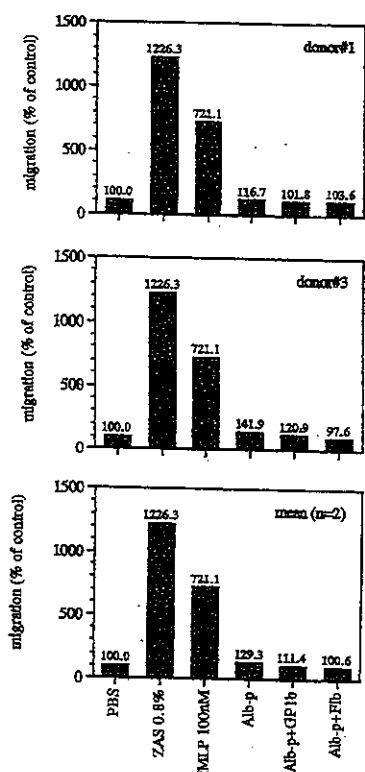


図3.補体活性化と好中球遊走活性

D. 考察

人工血小板製剤の生体適合性は重要な研究テーマであり、製剤の血管内滞留時間を左右するとともに生体にとって副作用のない安全な製剤であることを保証する項目でもある。

Alving らはヒトには抗コレステロール自然抗体が存在し、これが脂質代謝に役割を演じていると主張している。それは脂質表面に結合した免疫グロブリンが補体を活性化し、産生された C3b が赤血球膜上の補体受容体 1 (CR1) に結合することで運搬されると考えられている。マクロファージ上には C3b と免疫グロブリンの Fc に対する受容体が存在するため、ここで脂質が貪食されて代謝されるという仮説である。彼らは正常人の血清と脂質で構成されたリポソームとを反応させると C5b-9 の産生が見られ、補体の活性化があると報告している。

また抗ガン剤や抗真菌剤をリポソーム内に封入し、徐放性製剤の開発が進められているが、一方でその臨床試験中にアナフィラキシーやアレルギー反応など予期せぬ副作用の発生が報告されている。これは補体の活性化と関連がある可能性がある。

しかし血液センターで日常的に実施されている血小板や血漿成分のアフェレンシスでは回路内で補体の活性化が生じ、C3a や C5a が数倍~10 倍程度増加することが一般的である。しかしドナーにはクエン酸中毒、低カルシウム血症による神経過敏、迷走神経反射などの副作用の報告はあるものの、活性化補体が原因と考えられるような副作用は殆ど知られていない。

そこで今年度の検討として、血小板代替物として開発中のリポソーム製剤とアルブミン重合体製剤とを正常人血清と反応させ、補体の活性化があるか、また産生された活性化補体には生理活性があるかを検討した。試料の関係で今年度はアルブミン重合体に血小板糖タンパク GPIb およびフィブリノーゲンを固相化した製剤に限定して検討した。昨年度までの検討ではリポソーム製剤 (dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG)、1,5-dipalmitoyl -L-glutamate- N-succinic acid(DPEA)、phosphatidylcholine で構成)

を正常人血清と濃度比 20~28%で反応させると、C5b-9 複合体が数倍程度、最高20ug/ml 程度まで増加する例があった。今回の検討では CH50、C5b-9 のレベルは陰性コントロールの PBS と大差なく、活性化はあってもごく軽微なものと予想された。また活性化補体に好中球遊走活性があるかどうかケモタキセルチャンバーを用いて検討したが、この系でも軽微な変化にとどまった。

今後対象例を増やし、血清と混ぜる製剤比率を高め検討して行きたい。また正常人以外に、血小板輸血の対象となる疾患の血清を用いた検討も継続する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Shibuya-Fujiwara N, Hirayama F, Ogata Y, Matsuda A, Sekiguchi S, Ikeda H, Ikebuchi K:

Liposome-encapsulated superoxide dismutase suppresses liposome-mediated augmentation of TNF- α production from peripheral blood leukocytes.

Life Science 69:2007-2015,2001

2) Shibuya-Fujiwara N, Hirayama F, Ogata Y, Ikeda H, Ikebuchi K:

Phagocytosis in vitro of polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin by human peripheral blood monocytes plus macrophages through scavenger receptors.

Life Sciences 70:291-300,2001

3) Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K:

Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro.

Art Cells Blood Subs Immob Biotech 29(3):191-201,2001

4) Abe H, Ikebuchi K, Niwa K, Inanami O, Kuwabara M, Fujihara M, Hirayama J, Ikeda H:

Superoxide generation from human

polymorphonuclear leukocytes by liposome-encapsulated hemoglobin.

Art Cells Blood Subs Immob Biotech 29(4):275-283,2001

2. 学会発表

なし

3. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Handa M, et al	CrkL is an adaptor for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk.	Blood	97	2633-9	2001
Tanishita, K. et al.	Microscopic velocimetry with scale-up model for a flow field over cultured endothelial cells	Trans. ASME, J. Biomech. Eng., (to appear)			2002
Tanishita, K et al.	Measurement of surface topography of endothelial cell and wall shear stress distribution on the cell	JSME Int. J.	Vol.44	pp.972-981	2001
Kawashima Y, Nagasawa T, Ninomiya H	Contribution of ecto-5' -nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells	Blood	96 No.6	2157-2162	2000
Kojima H, Nagasawa T et al.	Role of phosphatidylinositol-3 kinase and its association with Gab1 in thrombopoietin-mediated up-regulation of platelet function	Experimental Hematology	29	616-622	2001
Shinji Takeoka, Yuji Teramura, Yosuke Okamura, Makoto Handa, Yasuo Ikeda, Eishun Tsuchida	Fibrinogen-Conjugated Albumin Polymers and Their Interaction with Platelets under Flow Conditions	Biomacromolecules	2	1192-1197	2001
Goto S, Tamura N, Sakakibara M, Ikeda Y, Handa S	Effects of ticlopidine on von Willebrand factor-mediated shear-induced platelet activation and aggregation	Platelets.	12	406-414	2001
Eto K, Goto S, Shimazaki T, Yoshida M, Sakakibara M, Isshiki T, and Handa S	Two distinct mechanisms are involved in stent thrombosis under flow conditions.	Platele	12	228-235	2001
Eto K, Ochiai M, Isshiki T, Takshita S, Terakura M, Sato T, Ikeda Y, Handa S, and Goto S:	Platelet aggregability under shear is enhanced in patients with unstable angina pectoris who developed acute myocardial infarction.	Jpn Cir J	65	279-282	2001
Kyokane, T., Suematsu M, et al.	Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver.	Gastroenterology	120	1227-1240	2001
Tanimoto, A., Suematsu M, et al.	Relaxation effects of clustered particles	J. Magnet. Reson. Imag.	14(1)	72-77	2001.
Morisaki, H., Suematsu M et al.	Roles of carbon monoxide in leukocyte and platelet dynamics in rat mesentery during sevoflurane anesthesia.	Anesthesiology	95	192-199	2001
Suzuki, T., Suematsu M, Makino R.	Organic phosphates as a new class of soluble guanylate cyclase inhibitors.	FEBS Lett.	507	49-53	2001