

厚生労働科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

人工血小板開発研究

主任研究者 池田 康夫
慶應義塾大学医学部内科学 教授

平成 15(2003)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

人工血小板開発研究

(研究課題番号：H12-血液-001)

平成14年度
総括・分担研究報告書

平成15年3月

・・・・・・・・・・・・・・・・研究組織・・・・・・・・・・・・・・・・

(主任研究者)

池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授

(分担研究者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 助教授

武岡真司 早稲田大学理工学部 助教授

鈴木英紀 (財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 研究員

後藤信哉 東海大学医学部 助教授

末松誠 慶應義塾大学医学部 教授

長澤俊郎 筑波大学臨床医学系 教授

池淵研二 東京医科大学 助教授

谷下一夫 慶應義塾大学理工学部 教授

(研究協力者)

村田満 慶應義塾大学医学部内科 講師

目 次

人工血小板開発研究 平成 14 年度研究報告

I.	総括研究報告書	池田 康夫	7
II.	分担研究報告		
1.	血小板減少時の in vitro 血栓形成モデル系の確立と残存血小板誘導機能を付加した人工血小板の開発	半田 誠	17
	- 残存血小板誘導機能を付加した第 2 世代の血小板代替物スクリーニングの為に in vitro 評価系の確立 -		
2.	止血能を有する蛋白質高分子量体の開発	武岡 真司	26
3.	止血過程における人工血小板の超微構造的解析	鈴木 英紀	31
	- in vitro 及び in vivo における人工血小板の挙動と機能の形態学的解析 -		
4.	高速レーザー共焦点顕微鏡を用いた人工血小板の機能評価	後藤 信哉	38
	- 止血能を有するアルブミン重合体の流動状態下での機能評価 -		
5.	人工血小板の血液流における挙動と側方向の輸送	谷下 一夫	42
	- 人工血小板の側方向輸送のせん断速度依存性 -		
6.	微小循環における人工血小板粒子の挙動解析	末松 誠	47
	- アルブミン重合体の血中滞留動態 -		
7.	in vivo における新規血小板代替物 GPIIb/IIIa-poly albumin の機能評価	長澤 俊郎	52
8.	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	池淵 研二	56
	- 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 -		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表		
IV.	研究成果の刊行物・別冊		
V.	その他		

別添 4

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業：人工血液開発研究班)

総括研究報告書

主任研究者

池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授

分担研究者

半田誠	慶應義塾大学医学部 助教授
武岡真司	早稲田大学理工学部 助教授
鈴木英紀	(財) 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 研究員
後藤信哉	東海大学医学部 助教授
末松誠	慶應義塾大学医学部 教授
長澤俊郎	筑波大学臨床医学系 教授
池淵研二	東京医科大学 助教授
谷下一夫	慶應義塾大学理工学部 教授

... 研究総括 ...

本研究班では、血小板減少時の出血を予防し、十分な止血機能を発揮し得る人工粒子（人工血小板／血小板代替物）の開発を目的として、まずそのデザインの検討が行われた。止血血栓形成における血小板の役割について、分子レベルで解析した研究成果をふまえ、人工血小板／血小板代替物として備える条件として、（１）血管障害部位に特異的粘着し得ること（２）粘着後、その部位で流血中から残存血小板をリクルートして人工粒子／血小板凝集塊を形成出来る。またはその部位で人工粒子同士の凝集塊を形成出来る。いずれかの機能を有すること（３）流血中で決して凝集塊を形成しないこと、を満たす事を初期の目的とした。

止血血栓形成過程において、血小板の持つもう一つの重要な機能である凝固促進作用については、その後の研究課題とした。

人工血小板／血小板代替物のデザインとしては、ハイブリッド型を考えた。即ち、上記の機能を担う血小板膜糖蛋白あるいは粘着性蛋白を人工粒子に結合させるという考えである。人工粒子としては生体適合性に優れ、安全にヒトに投与し得るものとしてliposomeとアルブミン重合体（polyAlb）を選択し、それぞれの粒径の制御法を確立した（武岡真司）。血管障害部位で血小板が標的にして粘着する血管内皮下組織の主要な蛋白はコラゲンとコラゲンに結合する von Willebrand

Factor (vWF)であることから、それぞれの蛋白の血小板膜受容体である GPIa/IIa 複合体 ($\alpha_2\beta_1$ integrin)、GPIb α を遺伝子組み換え体として大量に分離・精製し(池田康夫)、それぞれを単独、または組み合わせて人工粒子に結合させた(池田・武岡)。in vitroの機能解析として、流動状態下におけるこれら人工粒子のコラゲン、vWF基板上での挙動については、蛍光標識した後、蛍光顕微鏡下で観察し、蛍光画像解析装置を用いて解析した。rGPIb α -liposomeとrGPIb α -polyAlbはvWF基板上での挙動を異にした(半田誠・武岡)。rGPIbを結合させた、liposome、polyAlb共に高速度依存性に粘着は増加するが、前者のそれは可逆性であり、vWF基板上を転がるように移動するのに対し、後者は不可逆的にvWF基板上に粘着した。脂質構成の異なるliposomeを調整し、同様の実験を行った結果、膜の流動性、粒子の変形能が粘着挙動に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。即ち、膜流動性の低下しているliposomeの移動速度が早くなった。rGPIa/IIa-liposome、rGPIa/IIa-polyAlbは共に高速度下ではコラゲンに効率よく粘着せず、低速度下でのみ不可逆的に粘着した。rGPIb α 、rGPIa/IIaを結合させたpolyAlbのin vitro機能評価に関して、高速レーザー共焦点顕微鏡を用いたイメージング法により行った。(後藤信哉)。polyAlbを添加するとコラゲン上に形成される血小板血栓は増加したが、高速度下では、rGPIb α -polyAlbの血栓

増強効果が大きかったが、低速度下ではrGPIb α -rGPIa/IIaを結合させたpolyAlbについての比較では有意の差は認めなかった。rGPIb α 、rGPIa/IIaの両者を結合させたliposomeはヒト血小板と同様、コラゲン基板へ高速度下でも効率よく粘着し、人工血小板/血小板代替物開発の第一ステップである血管障害部位に特異的に集積する人工粒子を作る事が可能となった。

血管障害部位に特異的に集積する性格のみを持つ人工粒子としてのrGPIb α -liposomeの投与により、血小板減少ラットの出血時間が軽度ではあるが、短縮する事が報告された(長澤)。止血血栓形成には血小板凝集塊の形成が必須であることより、平成14年度の課題として、血管壁に粘着した人工粒子に新しい機能を付加させる事を取り上げた。即ち流血中から残存血小板をリクルートして凝集塊を形成し得る機能であるヒト血小板凝集に際し、血小板同志を架橋する粘着性蛋白であるフィブリノゲン (fbg) または血小板フィブリノゲン受容体GPIIb/IIIaとの結合部位としてのRGD peptideまたはフィブリノゲン γ 鎖C末端のdodecapeptide(H12)、HHLGGAKQAGDV、をpolyAlbまたはラテックスビーズに結合させ、その機能解析を行った。GPIb α -polyAlb、rGPIb α -LBについても検討した。白血球除去フィルターを用い、血小板を除去することにより、血小板減少全血を調整した後、人工粒子を加え、流動状態

下コラゲン基板での凝集塊形成を蛍光顕微鏡下で観察し、CCDカメラを通じて連続測定し、画像解析装置で解析した(半田誠)。rGPIb α -polyAlb、-LBは共にずり速度依存性に血小板凝集を増強させる。一方、H12-LBは低ずり速度下では血小板凝集増強作用は著しいが、ずり速度の増大に伴い、その効果は低下した。この際、走査型電顕で凝集塊を観察すると血小板粘着・凝集塊の中にH12-LBが存在している事が明らかであり、一部のH12-LBは血小板の胞体、偽足に被覆されていた(鈴木英紀)。

H12-LBとrGPIb α -LBを共存させた系で観察すると、ずり速度の増大に伴い、計算値よりも高い粘着数を示し、同時に凝集増強作用も増大した。RGD-LBと異なり、流動状態下においてH12-LBは活性化した血小板とのみ反応し、残存する血小板を巻き込んだ凝集塊を形成する事から、H12はフィブリノゲンの代替と成り得る事が明らかとなった。

一方、H12-LBを血小板基板上に流動させた際も、同様H12-LBの基板への粘着

がみられたが、その粘着数は血液ずり速度の増加に伴い減少した。H12-LBそれ自体は、血小板と混合しても血小板の活性化を惹起しない。

高速レーザー共焦点顕微鏡を用いたイメージング法で観察すると、コラゲン上での血栓形成過程において、rGPIb α -polyAlbは高ずり速度下で血栓形成増強効果を示した(後藤信哉)。

これら人工粒子を調整し、生体内挙動を観察する時、poly-Albが速やかに流血中からのぞかれKupffer細胞に貪食されるのが判る(末松誠)。

平成14年度のまとめであるが、傷害血管壁へ特異的に粘着する人工粒子に血小板凝集を惹起し得る機能を付加する為に、dodecapeptide固定LBを作ったが、新しい方向性を示すものである。

いずれの担体を用いても、問題となるのは、非常に短い血中滞留時間であり、それを解決する手段として膜表面のPEG化が試みられている。

... 研究発表 ...

<論文発表>

- Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M & Ikeda Y: Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 100 (12), 136-142, 2002

- Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles on vWf surface under flow conditions with different membrane fluidity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 765-770 (2002).
- 武岡真司、寺村裕治、池田康夫、土田

- 英俊「リポソーム」, 血液・免疫・腫瘍, (2003)印刷中.
- Teramura, Y., Takeoka S., Okamura, Y., Kainoh, M., Tsuchiyama, H., Narumi, H., Handa M., Ikeda Y., Tsuchida, E., Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003)印刷中.
 - Takeoka S., Okamura, Y., Teramura, Y., Tsuchida, E., Suzuki S., Watanabe, N., Handa M., Ikeda Y. Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003)準備中.
 - Watanabe, N., Nakajima H., Suzuki S., Ikeda Y., Handa M. et al., "Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation", *Blood*, submitted.
 - Okamura, Y., Handa M. et al., "Role for P-selectin in platelet thrombus formation under flow", *Blood*, submitted.
 - Yoshida M, Tamura N, Ichikawa N, Handa M., Ikeda Y., Tanabe T, Handa S, and Goto S. Shear-Induced von Willebrand Factor-Mediated Platelet Surface Translocation of the CD40 Ligand. *Thrombosis Research*, in press.
 - Goto S., Tamura N, Eto K, Ikeda Y., and Handa S. Functional significance of adenosine 5' -diphosphate receptor (P2Y₁₂) in platelet activation initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP Ibalpha induced by condition of high shear rate. *Circulation* 2002 105: 2531 - 2536
 - 後藤信哉、田村典子、石田英之、池田康夫、半田俊之介. 血流下損傷血管壁上の血小板血栓を指標とした抗血小板薬薬効評価システムの開発. 成人病と生活習慣病 32: 1366-1368, 2002
 - 後藤信哉、高速レーザー共焦点顕微鏡システムによる血小板血栓のイメージング. 日本バイオレオロジー学会誌 16: 10-18, 2002
 - Takamiya, R., Murakami, M., Goda, N., Makino, N., Kajimura, M., Takamiya, Y., Yamaguchi, T., Ishimura, Y., Hozumi, N., Suematsu, M. Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: an anti-inflammatory role. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H861-H870, 2002.
 - Suematsu, M., Suzuki S., DeLano, F.A., Schmid-Schoenbein, G.W. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension. *Microcirculation* 9, 259-276, 2002.
 - Morisaki, H., Katayama, T., Kotake, Y., Handa M., Ikeda Y., Takeda, J., Ito, M., Suematsu, M. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced microvascular leukocyte adhesion through platelet-dependent mechanisms. *Anesthesiology*. 97, 701-709, 2002.
 - Kajimura, M., Shimoyama, M., Tsuyama, S., Suzuki, T., Ihara, H., Kozaki, S.,

- Tsubota, K., Oguchi, Y., Suematsu, M. Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in rat retina. FASEB J fj.02-0359fje. 2003.
- Kashiwagi, S., Kajimura, M., Yoshimura, Y., Suematsu, M. Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: Alternative source revealed in vivo by diaminofluoresce in microfluorography. Circ Res 91, e55-e64, 2002.
 - Suematsu, M., and Kashiwagi, S. Visualization of gaseous signal transduction in biological system. Antioxid. Redox Signal. In press, 2003.
 - Murai, M., Yoneyama, H., Ezaki, T., Suematsu, M., Terashima, Y., Harada, A., Hamada, H., Asakura, H., Ishikawa, H., Matsushima, K. Subendothelial dome of gut Peyer's patches is the essential anatomical site in initiating acute graft-versus-host disease. Nat. Immunol. 4, 154-160, 2003.
 - Deguchi, T., Tsuji, T., Ikeda Y., Tanishita K. Behavior of adhesive liposomes in the presence of platelets in a model arteriole, Biorheology (投稿中)
 - Tsuji, T., Takeoka S., Ikeda Y., Tanishita K. Motion of albumin microspheres in the model arteriole in the presence of red blood cells, Biorheology (投稿中)
- <学会発表>
- Ikeda Y.: A Novel approach to development of artificial platelets in Japan, Symposium III "Artificial Platelet" 9th International Symposium on Blood Substitutes, 2003年3月5日 (Tokyo).
 - 池田康夫: 人工血小板・第14回北海道輸血シンポジウム, 2002年10月19日
 - 池田康夫: 人工血小板の開発とその将来展望 第43回日本脈管学会, 2002年11月8日
 - 池田康夫: 「人工血小板の開発の現状と将来展望」特別講演IV・第9回日本血液代替物学会年次大会, 2002年9月3日(熊本).
 - Takeoka S.: "Adhesive properties of rGPIb α conjugated-albumin polymers and phospholipid vesicles on vWf-immobilized surface", Current Issues on Blood Substitutes Research, 2002年6月7日 (Stockholm).
 - 武岡真司: アルブミン重合体を利用した人工血小板の展開, 第40回日本人工臓器学会大会, 2002年10月2日(札幌).
 - 武岡真司: 「血小板代替物としてのアルブミン重合体とリン脂質小胞体の認識反応制御」, 日本化学会第83回春季年会, 2003年3月18日(東京).
 - Takeoka S.: "Comparison between Albumin Polymers and Phospholipid vesicles as Carriers for GPIb α ", The 7th Meeting on Thrombosis and Rheology, 2002年3月16日(東京).
 - 武岡真司: 「人工血小板用担体としてのアルブミン重合体」, 第50回日本輸血学会総会, 2002年5月8日(東京).

- 武岡真司：「人工血小板用担体としてのアルブミン重合体とリン脂質小胞体の比較」, 第51回高分子年次大会, 2002年5月29日(神奈川).
- 武岡真司：「リコンビナント GPIb α 結合担体としてのアルブミン重合体とリン脂質小胞体の機能比較」, 第9回日本血液代替物学会年次大会, 2002年9月3日(熊本).
- 武岡真司：「リコンビナント GPIb α 結合担体の vWf 基板に対する流動状態下接着反応;性質の異なる担体での接着反応」, 第25回日本血栓止血学会学術集会, 2002年11月15日(神戸).
- Takeoka S.: “Evaluation of secondly hemostasis for oligopeptide-conjugated latex beads enhanced effect as platelet substitute”, 9th International Symposium on Blood Substitutes, 2003年3月5日(Tokyo).
- Takeoka S.: “Evaluation of the platelet substitutes using polyAlb and vesicles”, 9th International Symposium on Blood Substitutes, 2003年3月5日(Tokyo).
- 武岡真司：「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」, 日本化学会第83回春季年会, 2003年3月18日(東京).
- Handa M., Okamura, Y. et al., 「Role for P-selectin in Platelet Thrombus Formation under Flow Conditions」 Platelet Biology, The 2nd Asian-Pacific Congress on Thrombosis & Hemostasis, 2002.4.19. (Seoul)
- Handa M., 「Implication of P-selectin in Platelet-Platelet Interactions under Flow」 The 12th International Vascular Biology Meeting, 2002.5.14. (Karuizawa)
- 岡村 陽介, 半田誠 他, 「人工血小板用担体としてのアルブミン重合体とリン脂質小胞体機能比較」第51回高分子学会年次大会, 2002.5.29. (神奈川)
- 半田誠, 「人工血小板代替物」 2002年度日本人工臓器学会教育セミナー, 2002.7 (東京)
- 半田誠, 岡村 陽介 他, 「リコンビナント GPIb α 結合担体としてのアルブミン重合体とリン脂質小胞体の機能比較」岡村 陽介, 半田誠 他, 第9回日本血液代替物学会年次大会, 2002.9.5. (熊本)
- 「人工血小板代替物の開発の現状」第40回人工臓器学会, 2002.10.4. (北海道)
- 岡村 陽介, 半田誠 他, 「血小板代替物の担体としてのアルブミン重合体」第40回人工臓器学会, 2002.10.4. (北海道)
- 岡村 陽介, 半田誠 他, 「リコンビナント GPIb α 結合担体の vWF に対する流動状態下接着反応;性質の異なる担体での接着挙動」第25回日本血栓止血学会学術集会, 2002.11.15. (兵庫)
- Okamura, Y., Handa M., Ikeda Y. et al. 「Role for P-selectin in Platelet Thrombus Formation under flow」, The 44th American Society of Hematology Annual Meeting, 2002.12.7. (Philadelphia)
- Okamura, Y., Handa M., Ikeda Y. et al., 「Evaluation of secondly hemostasis for

- oligopeptide-conjugated latex beads as a model of platelet substitutes] IX International Symposium on Blood Substitutes, 2003.3.3 (Tokyo)
- Takeoka S., Okamura, Y., Handa M. *et al.*, 「Comparison of platelet substitutes made of polyAlb and vesicles」 IX International Symposium on Blood Substitutes, 2003.3.4 (Tokyo)
 - 岡村 陽介, 半田誠 他, 「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」第83回春季日本化学会年会, 2003.3.21. (東京)
 - Goto S., Tamura N, Ishida, H, Takeoka S and Ikeda Y. Real-Time Visualization of Artificial Platelet Interacting with Immobilized Matrix and Native Platelet Bound on the Matrix Surface under Controlled Blood Flow Conditions. Ninth International Symposium on Blood Substitutes, March, 2003
 - Nagasawa T.: In vivo evaluation of new platelet substitute Glycoprotein Ib α bound on recombinant albumin polymer. In Symposium III, 9th. International Symposium on Blood Substitutes At Tokyo, on 2003/March/3-5
 - Nagasawa T.: Programmed: Synthetic platelet. In pre-congress workshop of American society for artificial organs and International society for artificial organs joint conference. At Washington D.C. on June 18, 2003
 - Tsuji, T., Tabata, T., Takeoka S., Ikeda Y., Tanishita K. Motion of rGPIb α near the vWF surface, VI World Congress of Biomechanics, Calgary (2002)
 - K. Tanishita, H. Fujita, T. Tsuji, T. Tabata, S. Takeoka and Y. Ikeda. Observation of microscopic motion of artificial platelets in the model arteriole, IX International Symposium on Blood Substitutes, Tokyo (2003) March
 - H. Fujita, T. Tsuji, T. Tabata, S. Takeoka, Y. Ikeda and K. Tanishita, Motion of artificial platelet in the model arteriole, Summer Bioengineering Conference (2003) (発表予定)

... 知的財産権の出願・登録 ...

- ペプチド結合体 特願2003-029847. 哉、石田英之 (70%: 30%)、出願人：学校法人 東海大学 (特願2003-39230)
- 題名：血栓生成過程観測装置及び血栓生成過程観測方法：発明者：後藤信

別添 5

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業：人工血液開発研究班)

分担研究報告書

残存血小板誘導機能を付加した第二世代の血小板代替物
スクリーニングのための *in vitro* 評価系の確立

分担研究者 半田 誠 (慶應義塾大学輸血センター 助教授)

研究協力者 岡村陽介 (早稲田大学理工学部・慶應義塾大学医学部研究員特別研究助手)

要旨

これまで、血小板代替物の *in vitro* 評価系として、全血や血小板数を減少させた洗浄血液を用いた系を展開してきた。しかし、より *in vivo*、即ち血小板輸血の適応となる条件に近づけるためには、血漿成分はそのままで、血小板数のみ減少させた系、即ち、血小板減少症をシュミレートした *in vitro* 実験系が理想である。そこで今回、白血球除去フィルターを用いて血小板数を減少させた血液調製法を確立し、rGPIb α 結合ラテックスビーズ、アルブミン重合体や小胞体(rGPIb α -LB, -polyAlb, -vesicle)、さらにフィブリノーゲン γ 鎖C末端アミノ酸序列(H12)結合LB(H12-LB)の血小板代替物としての効果を評価した。その結果、白血球除去フィルターによりほぼ完全に血小板を除去させ、PRP添加によって血小板数を制御できる血液(全血)が調製できた。さらに、その血液を用いて各血小板代替物を評価したところ、rGPIb α -LBは、ずり速度の増大と共に血小板凝集増強効果を有する結果が得られ、さらに、血小板接着部位とほぼ同じ部分に結合することを確認した。

また、担体をpolyAlbに代えて同様の実験を行ったところ、LBの時と同様に血小板凝集増強効果があることを確認できたが、vesicleでは確認できなかった。これは、担体がpolyAlbやLBのような硬い重合体では基板に不可逆的な接着挙動を示し、vesicleなどの集合体では基板に接着しにくい傾向が明らかとなっており(Takeoka, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 765-770 (2002))、血小板代替物の血小板凝集増強効果は、基板への不可逆的接着が関与しているのではないかと示唆された。

H12-LB、rGPIb α -LB共存系では、ずり速度の増大に伴い接着数は増大した(計算値と比較)。さらに血小板接着も増大したことから、両者の混合により2つの利点を引き出せる可能性が示唆された。

以上より、今回我々が確立した系は血小板代替物一次スクリーニング法として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

これまで、血小板代替物の *in vitro* 評価系として、全血や血小板数を減少させた洗浄血液を用いた系を展開してきた。しかし、より *in vivo* 即ち血小板輸血の適応となる条件に近づけるためには、血漿成分はそのままで、血小板数のみ減少させた系、即ち、血小板減少症をシュミレートした *in vitro* 実験系が理想である。

そこで今回、白血球除去フィルターを用いて血小板数を減少させた血液調製法を確立し、rGPIb α 結合ラテックスビーズ、アルブミン重合体や小胞体(rGPIb α -LB, -polyAlb, -vesicle)、さらにフィブリノーゲン γ 鎖C末端アミノ酸序列(H12)結合LB (H12-LB)の血小板代替物としての効果を評価し、この評価系の血小板代替物スクリーニング法としての有用性を検討した。

B. 研究方法

1. rGPIb α -LB, -polyAlb, -vesicle と H12-LB の調製法

1.1 rGPIb α -LB の調製

rHSA 溶液(50mg/mL)1.5mLにLBを混合し、振とうさせた(20度 $^{\circ}$ C, 2hr)。遠心分離(13000rpm, 5min, 4 $^{\circ}$ C, 3times)にて未吸着rHSAを除去後、リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)にて再分散させた。

HSA吸着LB分散液((HSA)LB)に、N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate(SPDP)エタノール溶液(5mM) 5 μ Lを添加し、振とうさせた(20 $^{\circ}$ C, 30min.)。遠心分離(13000rpm, 5min, 4 $^{\circ}$ C, 3times)に

て、未反応SPDP、副生成物を除去後、pyridyl disulfide結合(HSA)LB (PD-(HSA)LB, 4.0x10⁶particles/ μ L)を得た。

rGPIb α (85.6mg/mL) 10 μ LをPBS (171 μ L)で希釈後、SPDPエタノール溶液(5mM) 5 μ Lを添加して振とうさせた(r.t., 20min)。DTT(1M) 4 μ Lを混合後(r.t., 2min)、ゲル濾過にてSH-rGPIb α 溶液を得た(1mL)。この溶液をPD-(HSA)LBと混合、振とう(r.t., 2h \rightarrow 4 $^{\circ}$ C, 12h)させ、rGPIb α -LBを得た(2.0x10⁶ particles/ μ L, 1mL)。

rGPIb α 結合量はGUR20-5とHRP標識GUR83-35を用いたサンドイッチELISA法にて定量した。

1.2 rGPIb α -polyAlb の調製

polyAlb分散液([HSA]=18mg/mL, pH 7.4) 3mLにSPDPエタノール溶液(5mM) 5 μ Lを添加して振とう後(r.t., 20min)、遠心分離(8000rpm, 5min, 3times)にて精製した(PD-polyAlb)。PD-polyAlb分散液([HSA]=16mg/mL)にSH-rGPIb α 溶液を混合して振とう後(r.t., 2h \rightarrow 4 $^{\circ}$ C, 12h)、遠心分離(6000rpm, 5min, 3times)にてrGPIb α -polyAlbを精製した。

1.3 rGPIb α -vesicle の調製

1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine(DPPC)/cholesterol/1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine(DPPE)から構成される小胞体を調製した。まず、クロロホルム/メタノール混合溶液(8/1 (v/v))にて

DPPE (14.3 μ mol)とSPDP(21.5 μ mol)を反応させた後(r.t., 2h)、上記の脂質類を混合して薄膜乾燥させ、10mM calboxy-fluoresceinを溶解させたHepes緩衝液(10mM, pH7.4)にて水和させた。押し出し法にてフィルター(FM-120, 孔径1.2 μ m)を透過させ、遠心分離(12000rpm, 10min)にてPD-vesicle分散液を得た(粒径980 \pm 180nm)。PD-vesicle分散液(1mL, [lipid]=56mM)にSH-rGPIb α 溶液を混合して振とう後(r.t., 2h \rightarrow 4 $^{\circ}$ C, 12h)、遠心分離(12000rpm, 5min)にてrGPIb α -vesicleを精製した。

1.4 H12-LBの調製

PD-(HSA)LB(4.0 \times 10⁶particles/ μ L, 500 μ L)にCys-H12(10mM, 8 μ L)を混合し、振とうさせた(20 $^{\circ}$ C, 12hr)。遠心分離(13000rpm, 5min, 4 $^{\circ}$ C, 3times)にて上清除去後、H12-LB(H12-LB, 2.0 \times 10⁶particles/ μ L, 1mL)を得た。LB表面のH12結合量は、2-thiopyridone (2TP)の343nmの吸収から決定した(HPLC, TSK-GEL G3000SWXL column, 7.8mm o.d. x 300mm h, 1mL/min, PBS)。

2. 流動状態下血小板接着評価法

2.1 白血球除去フィルターを用いた血小板減少血液の調製法

赤血球製剤用白血球除去フィルター(NEO1J, 日本ポール社製)に全血(PPACK, f.c. 40 μ M)を重力落差にて通過させ、血球測定装置(K-4500, Sysmex製)にて各血球数、ヘマトクリット(Hct)を計測した。

また、全血(1/10 (v/v) 3.8%クエン酸ナトリウム)を遠心分離(600rpm, 15min, r.t.)し、得られたplatelet-rich plasma(PRP, 4.0 \times 10⁵/ μ L)をフィルター通過後の血液中に添加することで血小板濃度2.0 \times 10⁴/ μ Lに調整した血小板減少血液を作成した。

2.2 コラーゲン固定化基板の調製法

コラーゲン(3mg/mL, TypeI-A (ウシ腱), 新田ゼラチン社)をPBS (pH7.4)にて分散させ(f.c. 30 μ g/mL)、ガラス基板(直径24mm, 厚み 0.5mm)上に浸漬させた(4 $^{\circ}$ C, 8h)。さらにBSA溶液(20mg/ mL)にてブロッッキングし(r.t., 2h)、PBSで洗浄後使用した。

2.3 流動下での蛍光顕微鏡観察、解析

血小板減少血液5mLに各検体(1.0 \times 10⁵/ μ L)を添加、振とうさせた(37 $^{\circ}$ C, 10min)。血小板と検体のどちらか一方に蛍光標識した(血小板：3,3'-dihexylox-acarboxyanine(DiOC6), 検体：FITC)。

37 $^{\circ}$ Cの恒温槽内のフローチェンバー灌流部に蛍光顕微鏡(TE300, Nikon)を組み込んだ装置に、血小板減少血液を種々の速度にて流動させ、CCDカメラを通じて連続測定し、画像解析装置(Argus 50, 浜松ホトニクス)にて解析した。

C. 研究結果

1. 血小板減少血液と全血の血小板接着挙動の比較

全血50mLを重力落差にて白血球除去

フィルターを通過させ、血液を 37 ± 1 mL回収した(回収率 $76 \pm 2\%$)。その血球数を計測したところ、フィルター通過前(各血球数、Hctを100%とする)と比較して赤血球数、Hctは変化しなかったが、白血球(0%)、血小板($4.2 \pm 0.2\%$)はほぼ完全に除去できた(Fig. 1)。そこで、PRP

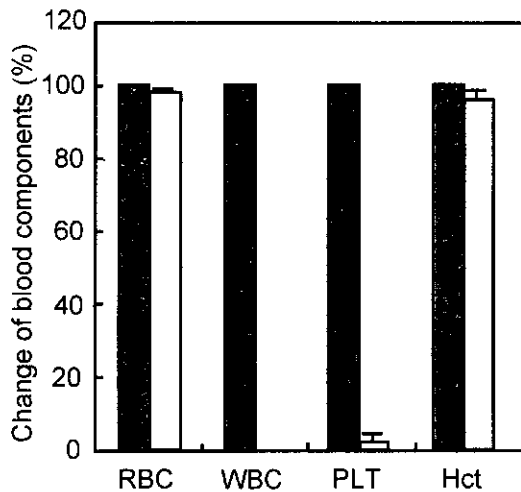


Fig. 1 Change of blood components after filtration. Black column: before filtration (100%), white column: after filtration (N=4).

を添加して血小板減少血液([PLT]= $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$)とした。

まず、全血をコラーゲン基板上に流動させたところ、基板に一様に粘着し、ず

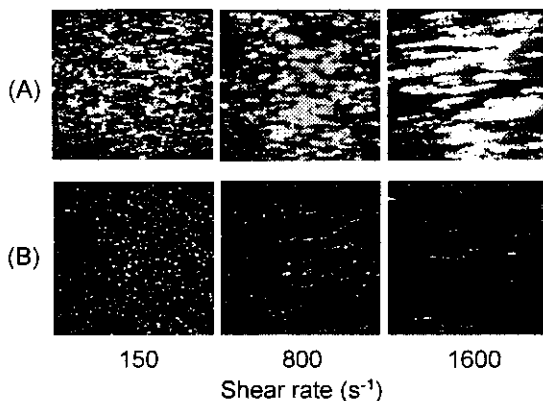


Fig. 2 Platelet adhesion to the collagen-immobilized surface using whole blood (A) or thrombocytopenic blood (B) at various shear rates. (180s after the start of flow)

り速度の増大と共に基板への粘着占有率(SC)は増大し、さらに血栓の高さ方向への増大が確認できた(Fig. 2(A))。他方、血小板減少血液では、SCは激減し、ずり速度の増大に伴って減少する傾向が観察できた(Fig. 2(B))。

2. rGPIb α -LBの血小板凝集増強効果

血小板減少血液中の血小板をDiOC6標識し、未結合LBを添加して基板上を流動させたところ(ずり速度 150s^{-1})、流動開始から180秒後のSCは3.3%となり、ずり速度の増大に伴いSCは減少した(800s^{-1} : SC=0.9%, 1600s^{-1} : SC=0.7%) (Fig. 3(a) ○)。これは、未結合LB添加しない系、即ち血小板のみの系とほぼ同等であった(150s^{-1} ; SC=3.3%, 800s^{-1} : SC=1.1%, 1600s^{-1} : SC=0.5%) (Fig. 3(a) ●)。そこで、rGPIb α -LBを添加したところ、低ずり速度時(150s^{-1})のSCは

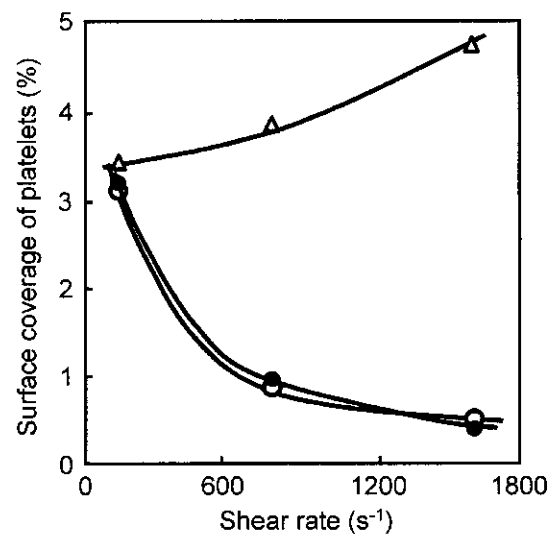


Fig. 3 (a) Enhancing effect of rGPIb α -LB (△) on platelet adhesion to the collagen-immobilized surface at various shear rates. (○); bare LB, (●); PBS (180s after the start of flow)

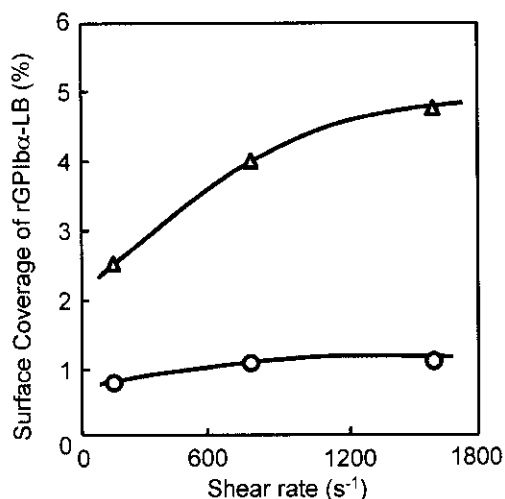


Fig. 3 (b) Attachment of rGPIb α -LB (Δ) and bare LB (\circ) to the collagen-immobilized surface at various shear rates. (180s after the start of flow)

3.4%であり、血小板のみ、あるいは未結合LB添加系とほぼ同一であったが、ずり速度の増大と共にSCは増大した(800s⁻¹: SC=3.9%, 1600s⁻¹: SC=4.8%) (Fig. 3(a) Δ)。

LB側を蛍光標識して同実験を行ったところ、未結合LBの基板への結合は見られなかったが(Fig. 3(b) \circ)、rGPIb α -LBはずり速度の増大と共に増大したことから(Fig. 3(b) Δ)、特に高ずり速度時にrGPIb α -LBの血小板凝集増強効果があることを確認できた。

さらに、血小板をDiOC₆標識、LBをローダミン標識して同実験を行い、流動後の基板を蛍光顕微鏡にて観察したところ、一部のLBは血小板が接着していない部位に結合しているが、大部分は、接着血小板とほぼ同じ位置に結合していることが観察できた(Fig. 4)。

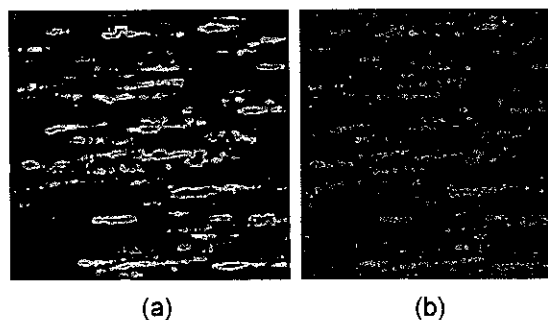


Fig. 4 Concomitant interactions of platelet (DiOC₆-labeled (a)) and rGPIb α -LB (rhodamine-labeled (b)) with collagen-immobilized surface as observed with fluorescent microscopy.

3. rGPIb α -polyAlb, vesicleの血小板凝集増強効果

血小板減少血液中の血小板をDiOC₆標識し、rGPIb α -polyAlb、-vesicleを添加して基板上を流動させたところ(ずり速度1600s⁻¹)、前者では未結合polyAlb添加時のSCと比較して約2倍増大し、担体がLBの時と同様に血小板凝集増強効果があることを確認した。しかしながら後者では未結合vesicle添加時のSCとほぼ変わらない結果が得られた(Fig. 5)。

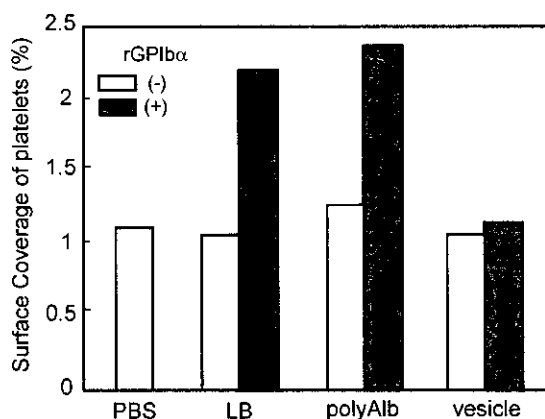


Fig. 5 Surface coverage of adhered platelet on the collagen-immobilized surface from thrombocytopenic blood in the presence of rGPIb α -conjugated particles such as LB, polyAlb, and vesicle. (N=1)

4. H12-LB, rGPIb α -LB 共存系

rGPIb α -LBは、主に高ずり速度で、またH12-LBは低ずり速度で血小板凝集増強効果があること(分担研究者 武岡真司 助教授が報告)が確認できた。そこで、両者の利点を生かす、即ちずり速度に依存せず止血能を出すためには、ひとつの担体に2つの機能を持たせることもできるが、結合量の最適化の検討や、結合できたとしても分子量の違いで短いH12が埋もれてしまい、その機能を保てるかどうかということが懸念される。そこで、我々は両者を混合することで2つの利点を生かせるのではないかと考え、この系を用いて評価した。

まずLB側を観察したところ、H12-LB単独($1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$)のSCは、低ずり速度で最大となり(150s^{-1} : SC=5.8%)、ずり速度の増大共に低下した(800s^{-1} : SC=0.9%, 1600s^{-1} : SC=0.4%)(Fig. 6 (左) \diamond)。また、rGPIb α -LB単独($1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$)では逆に高ずり速度で最大となり(1600s^{-1} : SC=5.1%)、ずり速度の低下と共に低下した(800s^{-1} : SC=4.0%, 150s^{-1} : SC= 2.2%) (Fig. 6 (左)

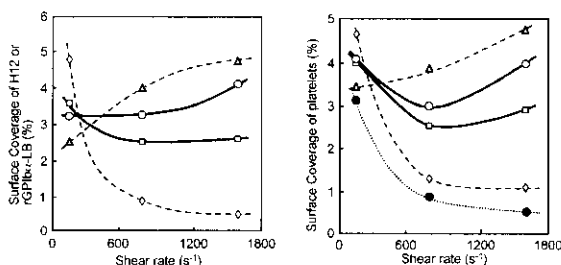


Fig. 6 Surface coverage of LBs (left) and platelet (right) with bare LBs(●; $10 \times 10^4/\text{mL}$), H12-LBs(\diamond ; $10 \times 10^4/\mu\text{L}$), rGPIb α -LBs(\triangle ; $10 \times 10^4/\mu\text{L}$), a mixture of(\circ) coexisted H12-LBs ($5 \times 10^4/\text{mL}$) and rGPIb α -LBs ($5 \times 10^4/\mu\text{L}$), and calculation value of ($\diamond + \triangle/2$) at various shear rates.

\triangle)。一方、両者が全く独立して機能した場合、即ち、両者のSCの1/2の足し合わせると(計算値)、Fig. 6 (左) \square のようになった(150s^{-1} : SC=3.7%, 800s^{-1} : SC=2.4%, 1600s^{-1} : SC=2.6%)。そこで、実際に両者を $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ ずつ共存させると、高ずり速度時に計算値よりも増大する結果が得られた(150s^{-1} : SC=3.2%, 800s^{-1} : SC=3.2%, 1600s^{-1} : SC=4.1% (Fig. 6 (左) \circ)。

他方、血小板側から観察すると、やはり高ずり速度時に計算値(Fig. 6 (右) \square)より増大する結果が得られた(Fig. 6 (右) \circ)。

D. 考察

これまで、血小板代替物の *in vitro* 評価系として、全血や血小板数を減少させた洗浄血液を用いた系を展開してきたが、より *in vivo* に近づけるためには、血漿成分はそのまま、血小板数のみ減少させた系、即ち、血小板減少症をシミュレートした *in vitro* 実験系が理想である。そこで今回、白血球除去フィルターを用いて血小板数を減少させ、PRP添加という簡便な手法で血小板数を制御できる血小板減少血液を調製できた。血液回収率は $76 \pm 2\%$ であったが、フィルターによるデッドボリュームが約12mLであるため、通過血液量を増大すれば回収率も増大すると考えられた。まず、血小板数 $2 \times 10^4/\mu\text{L}$ に調製した血小板減少血液と全血の血小板粘着挙動を比較検討した。

全血をコラーゲン基板上に流動させた

ところ、ずり速度が増大に伴いSCは増大する傾向が見られ、これはコラーゲンに粘着した血小板上を標的とする頻度が高いためと考えられる。しかし、血小板減少血液では、SCは激減し、ずり速度の増大に伴って減少する傾向が観察できた。今回のような血小板減少状態の場合は、コラーゲンに接触する頻度が減少したためにこのような結果が得られたと示唆され、血小板減少症をシュミレートしている可能性が考えられた。

そこで、この系にrGPIb α -LBを添加したところ、特に高ずり速度時にrGPIb α -LBの血小板凝集増強効果があることを確認できた。また、血小板をDiOC6標識、LBをローダミン標識して同実験を行い、流動後の基板を蛍光顕微鏡にて観察したところ、一部のLBは血小板が接着していない部位に結合しているが、大部分は、接着血小板とほぼ同じ位置に結合していることが観察できたことから、rGPIb α -LBの血小板凝集増強効果は、先に局所に接着した血小板との相互作用により、惹起される可能性が示唆された。また、コラーゲンに結合したvWfよりも、接着血小板に発現したvWfの方が結合しやすいという可能性も示唆された。

担体をpolyAlbに代えて同様の実験を行ったところ、LBの時と同様に血小板凝集増強効果があることを確認できたが、vesicleでは確認できなかった。これは、担体がpolyAlbやLBのような硬い重合体では基板に不可逆的な接着挙動を示し、vesicleなどの集合体では基板に接着

しにくい傾向が明らかとなっており (Takeoka, S. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 765-770 (2002))、血小板代替物の血小板凝集増強効果は、基板への不可逆的接着が関与しているのではないかということが示唆された。polyAlb、vesicle側の接着挙動を観察し、より詳細な検討(rGPIb α 結合量による相違等)を加えることが重要である。

また、担体LBを用いてH12-LB、rGPIb α -LB共存系での評価を行った。H12-LB、rGPIb α -LBに両者を $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ ずつ共存させると、特に高ずり速度時に計算値よりも増大する結果が得られた。これは、高ずり速度時では、rGPIb α -LBによって血小板凝集が促進され血栓体積が高さ方向に増強し、よどみが生じて、流れの緩やか箇所ができる。そこへH12-LBの結合が起こり、さらにH12-LBの血小板凝集が促進されたためと考えられ、両者を共存させたことによる協同効果が発現した可能性が示唆された(Fig. 7)。

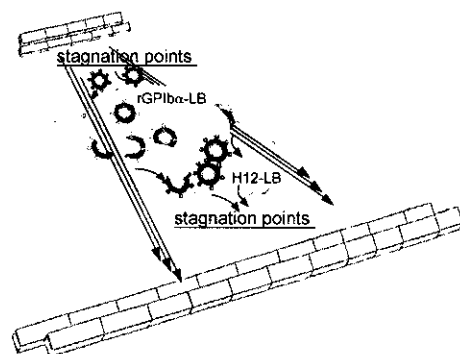


Fig. 7 Platelet thrombus formation in the presence of H12-LBs or rGPIb α -LBs.

一方、低ずり速度では、血栓の高さ方向

への増強が小さいために効果はあまり発現しないと考えられた。

今後、*in vivo*評価系での評価は興味あるところである。

rGPIb α 結合血小板代替物のスクリーニング		
	血小板代替効果	
	<i>in vitro</i> (血小板粘着面積)	<i>in vivo</i> (出血時間)
LB	+	n.t.
polyAlb	n.t.	+(血中滞留時間が非常に短い)
liposome	n.t.	n.t.
n.t.: not tested		

E. 結論

- 1) 白血球除去フィルターによりほぼ完全に血小板を除去させ、PRP添加によって血小板数を制御できる血液(血小板減少全血)が調製できた。
- 2) rGPIb α -LBは、血小板接着部位とほぼ同じ部分に結合することで、ずり速度の増大と共に血小板凝集を増強させる作用があることが分かった。
- 3) rGPIb α -polyAlbは、rGPIb α -LBと同様に血小板凝集増強効果が確認できたが、rGPIb α -vesicleでは確認できなかった。
- 4) H12-LBは、低ずり速度時に血小板凝集増強効果が最大となり、ずり速度の増大に伴いその効果は低下した。
- 5) H12-LB、rGPIb α -LB共存系では、ずり速度の増大に伴い接着数は増大した(計算値と比較)。さらに、血小板凝集増強効果も増大した。
- 6) この系は血小板代替物一次スクリー

ニング法として有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeoka, S., Handa, M. *et al.*, "Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on the vWf surface under flow conditions", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 765-770 (2002)
- 2) Watanabe, N., Handa, M. *et al.*, "Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation", *Blood*, pre-published online March 20, 2003.
- 3) Okamura, Y., Handa, M. *et al.*, "Role for P-selectin in platelet thrombus formation under flow", *Blood*, submitted.
- 4) Takeoka, S., Handa, M., *et al.*, "Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, submitted.
- 5) Teramura, Y., Handa, M. *et al.*, "Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenia mice" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, submitted.