

2. 学会発表

- 1) 「Role for P-selectin in Platelet Thrombus Formation under Flow Conditions」 Handa, M.Okamura, Y. *et al.*, Platelet Biology, The 2nd Asian-Pacific Congress on Thrombosis & Hemostasis, 2002.4.19. (Seoul)
- 2) 「Implication of P-selectin in Platelet-Platelet Interactions under Flow」 Handa, M., The 12nd International Vascular Biology Meeting, 2002.5.14. (Karuizawa)
- 3) 「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」岡村 陽介, 半田 誠 他, 第51回高分子学会年次大会, 2002.5.29. (神奈川)
- 4) 「人工血小板代替物」 半田 誠, 2002年度日本人工臓器学会教育 セミナー, 2002.7 (東京)
- 5) 「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)
- 6) 「人工血小板代替物の開発の現状」半田 誠, 岡村 陽介 他, 第40回人工臓器学会, 2002.10.4. (北海道)
- 7) 「血小板代替物の担体としてのアルブミン重合体」岡村 陽介, 半田 誠 他, 第40回人工臓器学会, 2002.10.4. (北海道)
- 8) 「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」岡村 陽介, 半田 誠 他, 第25回日本血栓止血学会学術集会, 2002.11.15. (兵庫)
- 9) 「Role for P-selectin in Platelet Thrombus Formation under flow」 Okamura, Y., Handa, M. *et al.*, The 44th American Society of Hematology Annual Meeting, 2002.12.7. (philadelphia)
- 10) 「Evaluation of secondly hemostasis for oligopeptide-conjugated latex beads as a model of platelet substitutes」 Okamura, Y., Handa, M. *et al.*, IX International Symposium on Blood Substitutes, 2003.3.3 (Tokyo)
- 11) 「Comparison of platelet substitutes made of polyAlb and vesicles」 Takeoka, S., Okamura, Y., Handa, M. *et al.*, IX International Symposium on Blood Substitutes, 2003.3.4 (Tokyo)
- 12) 「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」岡村 陽介, 半田 誠 他, 第83回春季日本化学会年会, 2003.3.21. (東京)

H. 知的所有権の出願・登録

ドデカペプチド

分担研究報告書

止血能を有する蛋白質高分子量体の開発

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学部)

研究要旨

止血能を有する蛋白質高分子量体の構築を目的として平成13年度では、活性化血小板上に発現するGPIIb/IIIaの受容体であるフィブリノーゲン(fbg)を結合させたアルブミン重合体が、血小板を巻込んだ凝集塊形成に有効であることを明らかにしたものの、fbgの安定性やヒト由来を用いる点に課題を残した。平成14年度では、GPIIb/IIIaの認識部位であるfbgの γ 鎖C末端アミノ酸序列(HHLGGAKQAGDV, H12)に着目し、モデル系として均一粒径のラテックスビーズ(LB)に結合させて、血小板数減少症モデル血液中(血小板数は正常の1/10)におけるコラーゲン基板上での凝集挙動を評価した。蛍光顕微鏡やSEMによる観察から、血小板数減少血液中にH12-LBを存在させることで、血小板を巻き込んだ凝集塊がコラーゲン基板上に形成されることが示唆され、fbgと同等の機能が確認できた。

A. 研究目的

止血能を有する微粒子の開発において、活性化血小板表面に発現されるGPIIb/IIIaを認識するフィブリノーゲン(fbg)を担持させたアルブミン重合体は血小板を巻込んだ凝集塊形成に有効であるものの、fbgの安定性とヒト由来を用いる点が課題であった。fbgの γ 鎖C末端アミノ酸序列(HHLGGAKQAGDV, H12)あるいはアミノ酸序列GCCRGDFを均一粒径のHSA吸着ラテックスビーズ(LB)にジスルフィド結合にて担持させた。これを血小板数が正常の1/10である血小板数減少症モデル血液に添加させて、流動下にて血小板凝集増強効果を評価することを

目的とした。

B. 研究方法

1. H12-LBの調製法

rHSA溶液(50mg/mL, 1.5mL)にLBを混合し、振とうさせた(20°C, 2hr)。遠心分離(13000g, 5min, 4°C, 3times)にて未吸着rHSAを除去後、phosphate-buffered saline (PBS, 500 μ L)にて再分散させた。HSA吸着LB分散液((HSA)LB, 4.0x10⁶particles/ μ L, 500 μ L)に、SPDPエタノール溶液(5mM, 5 μ L)を添加し、振とうさせた(20°C, 30min.)。遠心分離(13000g, 5min, 4°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)を得た。PD-(HSA)LB (4.0×10^6 particles/ μL , $500\mu\text{L}$)に Cys-H12(10mM , $8\mu\text{L}$)を混合し、振とうさせた(20°C , 12hr)。遠心分離(13000g , 5min , 4°C , 3times)にて上清を除去後、H12結合LB(H12-LB, 2.0×10^6 particles/ μL , 1mL)を得た。LB表面のH12結合量は、thiol-disulfide交換反応で生成される2-thiopyridone (2TP) の 343nm の吸収から決定した(HPLC, TSK-GEL G3000SWXL column, $7.8\text{mm o.d.} \times 300\text{mm h}$, $1\text{mL}/\text{min}$, PBS)。

2. 流動下におけるH12-LBの評価法

血小板減少モデル血液は、全血を重力落差で赤血球製剤用白血球除去フィルター(NEO1J, 日本ポール社)を通過させ、多血小板血漿を添加して血小板濃度 $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ となるように調製した(自動血球計測装置K-4500, Sysmex, Kobe)。

血小板減少モデル血液 5mL 中にH12-LB (1.0×10^5 particles/ μL)を添加し静置後(37°C , 10min)、コラーゲン固定化基板上にポンプを用いて流動させ(ずり速度 150s^{-1})、蛍光顕微鏡、CCDカメラを通して観察した。各基板に対する微粒子の粘着占有率は、画像解析装置(Argus-50, 浜松フォトニクス)にて測定した。血小板は、3,3'-dihexyl oxacarbocyanine iodide(DiOC6)を用いて蛍光標識を行なった。

C. 研究結果及び考察

1 血小板凝集計を用いたH12, RGDFの機能評価

血小板ADP凝集では、H12あるいはRGDF添加濃度に依存して血小板凝集の抑制が認められ(図1)、H12やRGDFは活性化血小板に発現したGPIIb/IIIaに結合するアミノ酸配列であり、RGDFはH12よりも抑制効果の大きいことを確認した。

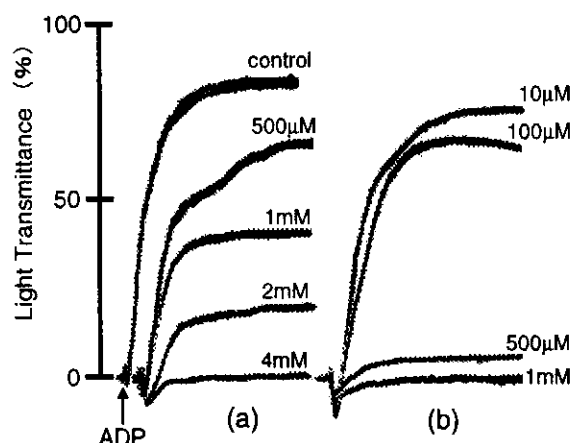


Fig. 1 Inhibition of platelet aggregation by H12 (a) or RGDF (b). Concentration of platelets and ADP were $2.0 \times 10^5/\text{haL}$ and $20\mu\text{M}$, respectively.

2 流動下におけるH12-LBの評価

再構成血液($[\text{PLT}] = 4.0 \times 10^3/\mu\text{L}$, 5mL)にH12-LBを添加し、血小板固定化基板上に流動させたところ(ずり速度 150s^{-1})、固定化した血小板へのH12-LBの粘着が認められ、RGDSの共存下では粘着は抑制された。従ってH12-LBの粘着は、活性化血小板に発現したGPIIb/IIIaとH12との特異的な相互作用による粘着であることを確認した。また、血小板固定化基板に対するH12-LBの結合数は、血液ずり速度の増加に伴い減少を確認した(図2)。

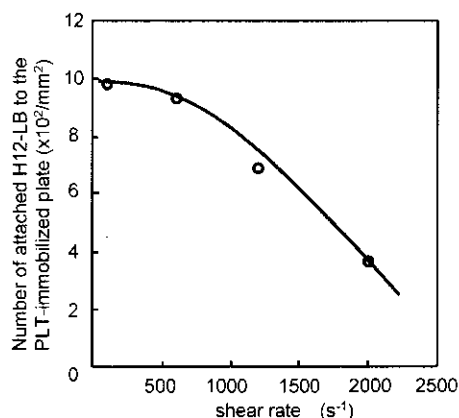


Fig. 2 Attachment of H12-LB to the platelet-immobilized surface under the various shear rate.

3. 血小板数減少血液中におけるH12-LBの機能評価

ずり速度 150s^{-1} における血液流動下 ($[\text{PLT}] = 2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$) では、流動している血小板のコラーゲン基板への粘着が認められ、粘着占有率は時間経過と共に増大し、180s 後では $3.0 \pm 0.6\%$ に達した (図3●)。

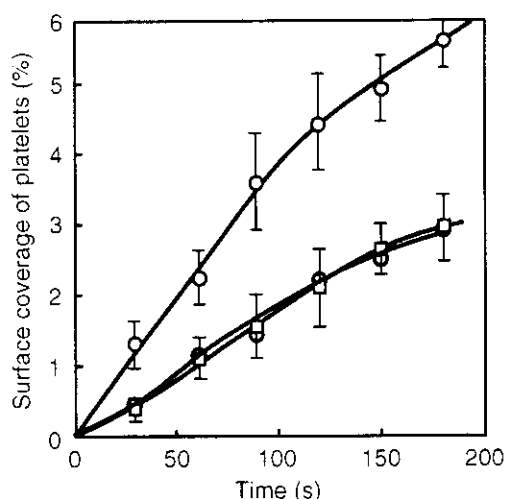


Fig. 3 The time course studies of surface coverage by platelets in the thrombocytopenic blood containing H12-LB (○) and LB (□) at the shear rate of 150s^{-1} . The control is thrombocytopenic blood (●). The concentration of platelets and LB were $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ and $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$, respectively.

LBを添加した場合でも、血小板の粘着占有率に変化を認めず、LBのみでは血小板粘着の阻害も促進も起こさないことを確認した ($3.1 \pm 0.4\%$, 図3□)。他方、H12-LBの添加系では、流動血小板の粘着数が著しく増加し、180s後では粘着占有率が $5.1 \pm 2.8\%$ となり、H12-LBを添加していない場合と比較して、およそ1.7倍増大した (図3○)。また、同条件におけるH12-LBの粘着は30s後まではほとんど認められなかったが (図4△)、H12-LBの粘着は血小板粘着数の増加に伴い、徐々に増大した。これは、コラーゲン基板にまず血小板が粘着し、流動しているH12-LBが活性化した血小板に発現される GPIIb/IIIa を認識して粘着したためと考えられ、さらに残存血小板を巻込んだ凝集塊を形成したためと考えられ

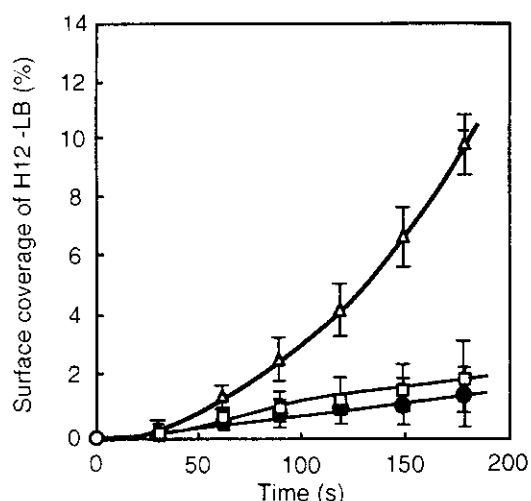


Fig. 4 The time course studies of surface coverage of latex beads in the thrombocytopenic blood containing H12-LB (△) and LB (□), at the shear rate of 150s^{-1} . The control is thrombocytopenic blood (●). The concentration of platelets and LB were $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$, $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$, respectively.

た(図4)。従って、H12-LBは、コラーゲン基板に粘着した血小板と凝集塊を形成し、流動している血小板を巻込んだ凝集塊を形成して、フィブリノーゲンと同様の効果を示すことが確認できた。

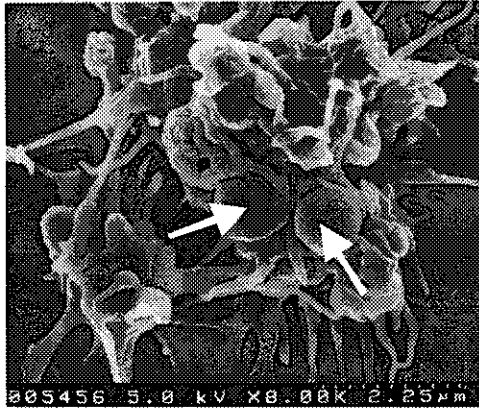


Fig. 5 SEM image after platelets and H12-LB (arrow) were flowed to the collagen-immobilized surface.

D. 結論

流動下において、H12-LBは活性化した血小板のみと粘着して、残存している血小板を巻込んだ凝集塊を形成することから、H12はフィブリノーゲンの代替として血小板2次凝集に利用できる認識部位であることが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Rolling properties of rGPI α -conjugated phospholipid vesicles on vWf surface under flow conditions with different membrane fluidity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 765-770 (2002).
- 2) 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、印刷中 (2003).

- 3) 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 rGPI α /IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 印刷中.
- 4) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Tsuchida, E., Suzuki, H., 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.

2. 学会発表

- 1) "Adhesive properties of rGPI α conjugated-albumin polymers and phospholipid vesicles on vWf-immobilized surface", Current Issues on Blood Substitutes Research, 2002年6月7日 (Stockholm).
- 2) 「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).
- 3) 「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春季年会, 2003年3月18日(東京).
- 4) Comparison between Albumin Polymers and Phospholipid vesicles as Carriers for GPI $\beta\alpha$ ", The 7th Meeting on Thrombosis and Rheology, 2002年3

月16日(東京).

- 5) 「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).
- 6) 「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).
- 7) 「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).
- 8) 「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).
- 9) "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).
- 10) "Evaluation of the platelet substitutes using polyAlb and vesicles", 9th International Symposium on Blood Substitutes, 2003年3月5日(Tokyo).
- 11) 「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春季年会, 2003年3月18日(東京).

F. 知的財産権の出願・登録

- 1) ペプチド結合体 特願2003-029847.

分担研究報告書

止血過程における人工血小板の超微構造的解析
— in vitro および in vivo における人工血小板の挙動と機能の形態学的解析—

分担研究者 鈴木英紀 研究員 (東京都臨床医学総合研究所)

研究要旨

本研究では、人工血小板作製の最適な理論的根拠を得るための一環として、本血小板の in vitro および in vivo の実験系における挙動について電子顕微鏡（電顕）を使った超微形態学的検討を行ってきた。今回、フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)を結合させたラテックスビーズを含む再構成血液をコラーゲン固相化カバースリップに流動させた後、走査型電顕で観察した。一方、rGPIb α を標識したアルブミン重合体 (GPIb-Alb) の in vivo における挙動について詳細に検討した。すなわち、 γ 線照射によって血小板を減少させたラットを使い、その腸間膜の静脈にレーザー照射によって形成される光血栓 (photochemically induced thrombus) の連続切片を作製し、GPIb-Alb の挙動を透過型電顕で解析した。

A. 研究目的

本研究では、人工血小板の担体としてのラテックスビーズにフィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)を結合させ、またはアルブミン重合体に GPIb を結合させたもの (GPIb-Alb) を使い、これらの in vitro および in vivo の実験系に対する粘着、凝集さらに血栓形成時の挙動を電子顕微鏡（電顕）的に把握し、最適な人工血小板作製の理論的根拠を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) H12 結合ラテックスビーズの流動下におけるコラーゲンに対する粘着の観察

血小板減少状態の再構成血液 (ヘマトクリット値：39%、血小板数： 2×10^4 個/ μ l を HEPES-Tyrode buffer に浮遊) 5 ml に H12 結合ラテックスビーズ (25 μ l, 1×10^4 / μ l) を添加して 37°C で 10 分間静置後、コラーゲン固相化カバースリップ上を $150S^{-1}$ のずり速度で流動させた。コントロールとしては RGD を含む合成ペプチド CGGRGDF 結合ラテックスおよび無標識ラテックスを同様に流動した。これらのラテックスビーズの粘着挙動は蛍光顕微鏡で観察しつつ、10 分後にコラーゲン固相化カバースリップを回収、HEPES-Tyrode buffer で洗浄後、1%グルタルアルデヒドで室温、15 分間固定し

た。以下、常法に従って1%四酸化オスミウム後固定、エタノールで脱水、t-ブチルアルコールに置換、凍結乾燥、金属コーティングして走査型電顕(日立S4500)で観察した。

2) photochemically induced thrombus 形成時における GPIIb-IIIa の挙動の検討

F344 ラット(♀、11~13週齢、体重200~230g) 6匹を使用した。血小板減少処理法としては7Gyの γ 線を1回照射し、10日後に実験に供した。バルビタール筋肉内注射による麻酔後、気管切開し、挿管して気道を確保するとともに、総頸静脈および動脈にカニューレーションを実施した。腹部を切開後、プラスチック製の観察箱に入れて腸管を引き出し、光学顕微鏡下に腸間膜に存在する直径約40 μ mの静脈を探し、これを上下からガラスではさんで固定した。120mWのエネルギーを有するレーザー光を血管に照射し、10秒後に体重100g当たり2mgのGPIIb-IIIaを注入した。1分後、体重100g当たり1.25% fluorescent Naを200 μ l注入した。3分後、追加の2mgのGPIIb-IIIaを注入し、以降3分毎にGPIIb-IIIaを同様に追加注入した。コントロールとしては、生理食塩水または無標識Albを注入した。血栓が形成される過程をモニターで確認しつつ、完全に閉塞するまでの時間を測定した。

血栓が形成された血管を含む腸間膜を採取し、0.1%グルタルアルデヒド-4%パラホルムアルデヒド混合液で前固定し

た。0.1Mリン酸緩衝液で水洗後、常法に従って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、同樹脂に包埋して重合した。本血栓形成のメカニズムを解明するために、この試料から血栓形成部位の始部から終部までの連続切片を得た。すなわち、血栓近傍まで面出し、その部位からまず光顕用切片を薄切してトリジンブルー染色した。次いで、20~30枚の超薄切片を作製した。この光顕用および超薄切片の作製を繰り返し、光顕用切片は30枚以上、超薄切片は1,000枚以上調製した。超薄切片は酢酸ウランおよびクエン酸鉛で電子染色して透過型電顕(日本電子JEM1200)で観察した。

C. 研究結果

1) H12結合ラテックスの流動下におけるコラーゲンに対する粘着の観察

コントロールの無標識ラテックスビーズを含む再構成血液(血小板数 2×10^4 個/ μ l)の流動でも、血小板はコラーゲン上に粘着し、これに他の血小板が接着して直径10 μ m前後の凝集塊を形成した。凝集塊の底部の血小板は特に偽足を伸長させていた。しかし、この凝集塊の中にラテックスビーズは観察されなかった(図1)。

H12結合ラテックスを含む再構成血液(血小板数 2×10^4 個/ μ l)の流動では、同様に血小板の粘着、やや大きな凝集が観察され、この凝集塊の中に2~3個のラ

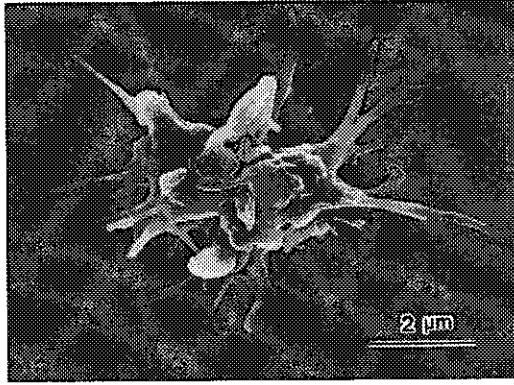


図1. コントロールラテックスビーズの流動下におけるコラーゲンへの接着と凝集

血小板は粘着、伸展し、さらにその上に小凝集塊が形成される。しかし、ラテックスビーズは存在しない。

ラテックスビーズが存在した。ラテックスビーズは表面が比較的滑らかで、直径1 μm前後の球形として走査型電顕下で観察されるために、識別は容易であった。一部のラテックスビーズは血小板の胞体または偽足に被覆されていた。しかし、すべての凝集塊にラテックスビーズが存在する訳ではなかった(図2)。

一方、RGDを含むCGGRGDF結合ラ

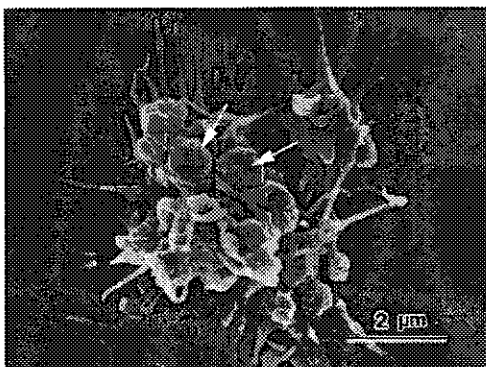


図2. H12結合ラテックスビーズの流動下におけるコラーゲンへの接着と凝集

血小板は粘着して伸展している。さらにコントロールのものよりやや大きな凝集塊が形成される。凝集塊中に2個のラテックスビーズが存在する(矢印)。

ラテックスビーズを含む再構成血液(血小板数 $2 \times 10^4/\mu\text{l}$)の流動では、同様に粘着、

凝集が観察された。H12のものと同様に2~3個のラテックスビーズが凝集塊中に存在した(図3)。

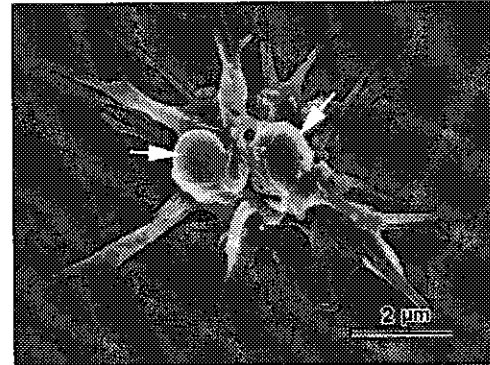


図3. RGD結合ラテックスビーズの流動下におけるコラーゲンへの接着と凝集

血小板は粘着し、さらに小凝集塊を形成している。凝集塊中に2個のラテックスビーズが存在する(矢印)。

他方、通常の数(血小板 23×10^4 個/ μl)を含むwhole bloodにH12結合ラテックスビーズを混ぜたものを流動すると、直径15 μm以上の大凝集塊が形成された。凝集塊中の血小板の形態変化は著明であった。ラテックスビーズは凝集塊中深くに存在し、または血小板の胞体に被覆さ

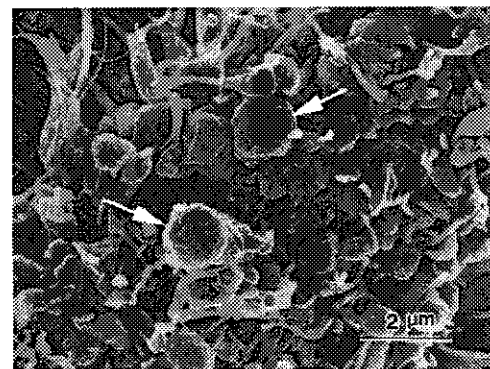


図4. H12結合ラテックスビーズのwhole bloodの流動下におけるコラーゲンへの接着と凝集

粘着した血小板は大凝集塊を形成している。凝集塊中に2個のラテックスビーズが存在する(矢印)、血小板の胞体に被覆されており、識別し難い。

れる場合が多いため、その識別には困難を伴った(図4)。

2) 光血栓 (photochemically induced thrombus) 形成時における GPIb-AIb の挙動の検討

ラット腸間膜は、厚さ 50 μm 前後で、この厚さの中に直径 10~40 μm の血管が存在した。静脈は 1 または 2 層の平滑筋細胞、内皮下組織および 1 層の内皮細胞から構成されている。コントロールとして生理食塩水を注入し、さらにレーザー光を照射して形成される光血栓は 100 μm 前後の厚さであった。血管内には血小板が充満し、内皮細胞に接着している血小板も多数存在したが、血小板の形態変化は強くはなかった(図5)。

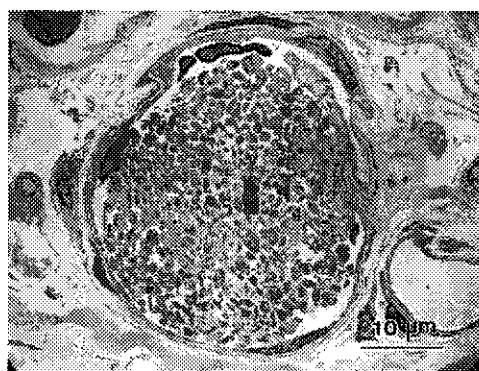


図5. 光血栓 (photochemically induced thrombus) の電顕像

血管内腔には血小板が充満している。内皮細胞に接着している血小板も多数存在する。しかし、血小板の形態変化は強くはない。

今回の検討では、光血栓を形成させつつ GPIb-AIb を注入し、形成される血栓の始部から終部までの間で光顕用と電顕用の連続切片を繰り返して作製し、特に内皮細胞の変化に注目して観察した。血

栓形成部位からやや遠い血管内では、赤血球が充満し、白血球も存在したが、血小板はほとんど観察されなかった。また、内皮細胞も健常であり、剥離またはそれに伴う内皮下組織の露出などは観察されなかった。しかし、血栓の形成始部では細胞膜が傷害された内皮細胞が観察された。その部位には血小板が存在した(図6、矢印)。

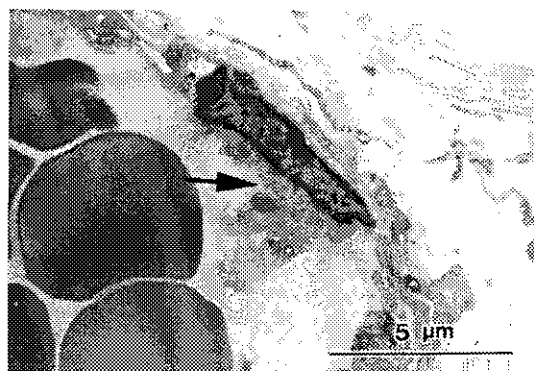


図6. GPIb-AIb を注入した光血栓始部における血管内皮細胞像

内皮細胞の細胞膜が傷害され、細胞内小器官が露出している。そこに血小板が接着している(矢印)。

血栓形成始部より中央部に近い部分の血管内腔では赤血球が減少するとともに、血小板が多く存在した。また電子密度が高い不定形の GPIb-AIb が血小板の



図7. 光血栓の始部よりやや中央側における血管内皮細胞像 (GPIb-AIb を注入)

血管内には血小板および GPIb-AIb が存在する。電子密度の高い物質に被覆された内皮細胞の一部は浮腫性変化を示している(矢印)。

周囲または付着して存在した。内皮細胞表面も厚さ0.2~0.4 μm の層のGPIb-Albに被覆されていた。一部の内皮細胞の細胞質では浮腫性の変化が観察された(図7、矢印)。

血栓中央部では、赤血球が僅かになる一方、血小板とGPIb-Albの存在が著明になった。特にGPIb-Albは管腔内に充満していた。内皮細胞の傷害は必ずしも観察されなかったが、健常に見える細胞でも、その表面に血小板とGPIb-Albと思われる層が付着していた(図8、矢印)。

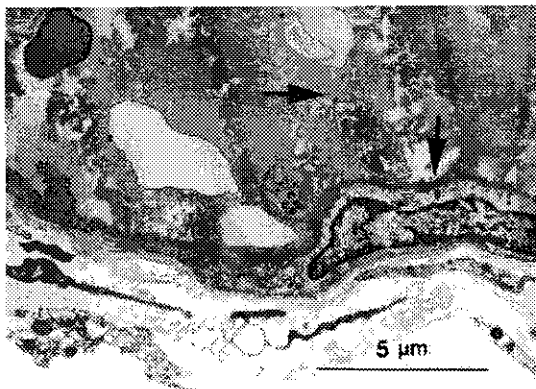


図8. 光血栓の中央部における血管内皮細胞膜像 (GPIb-Albを注入)

健常に見える内皮細胞の表面には血小板とGPIb-Albが付着している(矢印)。

血栓中央部から終末部では、赤血球が増加するとともに、血小板とGPIb-Albが減少した。浮腫性の変化を示す内皮細胞が時折観察され、その表面にはGPIb-Albが付着していた(図9、矢印)。尚、GPIb-Albを注入した電顕の連続切片像は、図10として最終ページに添付した。

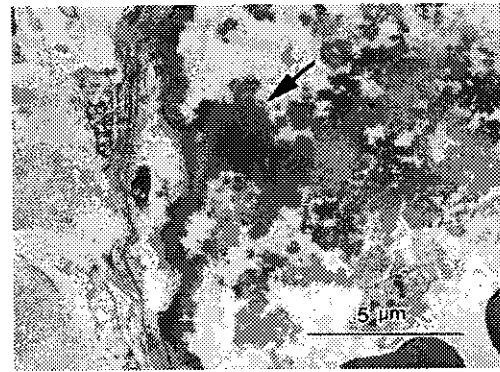


図9. 光血栓終末部における血管内皮細胞像 (GPIb-Albを注入)

浮腫性変化を示す内皮細胞の表面にはGPIb-Albが付着している(矢印)。

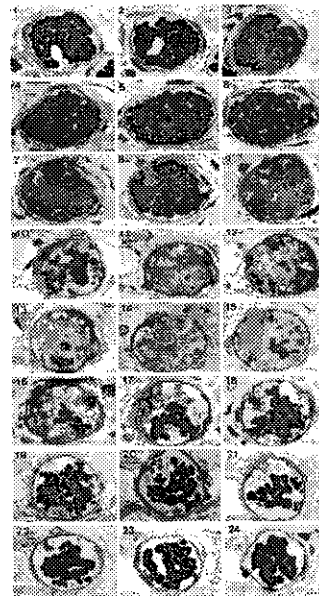


図10. 光血栓の連続切片像 (GPIb-Albを注入)

血栓辺縁部(1~6)では赤血球が多いが、血栓始部(7~9)にかけて血小板およびGPIb-Albが増加する。血栓中央部(10~16)では血小板とGPIb-Albが著明に存在する。血栓終部(17~24)にかけて血小板およびGPIb-Albが減少する一方、赤血球が増加する。

D. 考察

人工血小板は血管傷害部位に対する認識能をもつことが必要である。さらにその効果を向上させるために、傷害部位で

の凝集能も必要となる。血小板凝集を担う血小板膜糖蛋白質 GPIIb/IIIa へのリガンドであるフィブリノゲンは、原料調達や高次構造の不安定さがあるために、その利用は困難になっている。そこでフィブリノゲンの GPIIb/IIIa 結合部位である γ 鎖の H12 および α 鎖の RGD を選択した。これらはペプチドの合成によって容易に入手可能である。今回の検討では、両ペプチドを結合させたラテックスビーズは、コラーゲンへの血小板粘着および凝集に巻き込まれて、凝集塊中に存在した。すなわち、両者ともに凝集に関与することが明らかになったが、両者の違いはほとんど観察されなかった。ただし、H12 は未活性血小板への非特異的膠着率が非常に少ないことから、RGD のものよりも有望と考えられた。

γ 線照射し、血小板を減少させたラットの腸間膜静脈にレーザー照射によって形成される光血栓 (photochemically induced thrombus) は、血小板が減少しているものの、約 10,000 個/ μ l は残存するために、この残存血小板が血栓形成に関与している。すなわち、コントロールとして生理食塩水を注入した血管では、時間がかかるものの血栓が形成され、管腔内には血小板が充満した。一方、GPIIb-AIb の注入は血栓の形成時間を短縮させることから、人工血小板として有効と考えられる。しかし、レーザー光によって惹起される本血栓は、著明な内皮細胞の剥離と内皮下組織の露出が無いとされる。それにもかかわらず血栓が形成され

るが、そのメカニズムについては不明である。そこで、特に内皮細胞の変化に注意して、血栓形成始部から終部までの連続切片を作製して検討した。その結果、内皮細胞の剥離、それに伴う内皮下組織の露出は観察されなかった。しかし、内皮細胞膜の破裂、細胞質の浮腫等の致死的变化は観察され、そこに血小板または不定形な GPIIb-AIb が付着した。不定形物質が GPIIb-AIb であるとの直接的な証明はない。しかし、血小板、GPIIb-AIb および von Willebrand 因子存在下にリストセチンを添加して惹起される凝集を、抗 GPIIb 抗体を使う免疫電顕法で観察すると、GPIIb は血小板表面ばかりでなく、血小板と接触している不定形物質にも検出された。さらに、不定形物質は生理食塩水を注入し、残存血小板だけで形成される血栓中には見られないこと、また GPIIb-AIb を注入してもレーザーを照射していないために血栓が形成されていない他の血管内では見られないこと、さらに血栓中央部で特に高密度に見られる不定形物質はリストセチン凝集のものと酷似していることから、不定形物質が GPIIb-AIb と考えている。レーザー照射された内皮細胞では、剥離、内皮下組織の露出は無いものの、上記した傷害が生じ、その部位に残存血小板および GPIIb-AIb が粘着、凝集して血栓が形成されたと考えられる。しかし、崩壊しつつある内皮細胞と血小板または GPIIb-AIb との付着のメカニズムについては不明である。

E. 結論

本研究では、フィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合させたラテックスビーズを含む再構成血液をコラーゲン固相化カバースリップに流動させた後、走査型電顕で観察した。その結果、本ビーズが血小板凝集中に存在し、フィブリノゲンとしての機能を有して凝集に関与することを明らかにした。

一方、rGPIb α を標識したアルブミン重合体(GPIb-Alb)のin vivoにおける挙動について詳細に検討した。 γ 線照射によって血小板を減少させたラットを使い、その腸間膜の静脈にレーザー照射によって形成される血栓(photochemically induced thrombus)は、内皮細胞の剥離と内皮下組織の露出は無いことを確認した。しかし、内皮細胞の傷害は生じ、その部位に血小板およびGPIb-Albが粘着、凝集して血栓が形成されると推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

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
—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—

人工血小板開発研究班
分担研究者 後藤信哉 (東海大学医学部)

研究要旨

創傷などにより血管壁が損傷すると、血管内皮損傷部位に血小板が集積し一次止血に関与する。一次止血における人工血小板の機能を *ex vivo* あるいは *in vitro* で評価するためには、血管内皮の損傷部位に、血流の存在下で惹起される血小板の集積を評価する必要がある。血管内皮損傷部位での血小板の接着に必須の役割を果たす膜糖蛋白である GP Iba, GP Ia/IIa と結合したアルブミン重合体の止血能を、血管壁損傷部位で血流に曝露される血栓性成分であるコラーゲン、von Willebrand 因子などのマトリックス上に、動脈血流条件下における血小板血栓を指標として評価した。高速レーザー共焦点顕微鏡を用いたイメージング法を用いることにより、血流条件下の血栓形成を、血小板とマトリックスの相互作用、血小板同士の相互作用に分けて評価した。

A. 研究目的

血小板は血管壁の損傷部位に集積することにより一次止血に関与する。人工血小板の止血能を評価するためには、血管壁損傷部位に曝露されるマトリックス表面への集積を血流条件下で評価する必要がある。さらに、人工血小板は、自身が血管壁損傷部位に集積するのみならず、native 血小板と相互作用することにより native 血小板の集積に影響を与える効果も期待できる。われわれは、血管壁損傷部位で血流に曝露されるマトリックスであるコラーゲンを固相化した表面上に、GP Iba, GP Ia/IIa などの接着蛋白と結合

したアルブミン重合体と血液の混合物を、さまざまな壁すり速度の条件で灌流することにより、人工血小板の止血能を評価した。高速レーザー共焦点顕微鏡を用いたイメージング法を用いることにより、人工血小板とマトリックスの相互作用、人工血小板同士あるいは人工血小板と native 血小板の相互作用を別個に評価した。

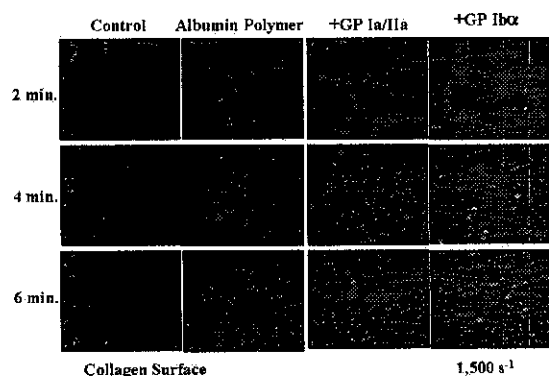
B. 研究方法

健常成人より血液を採取し、選択的抗トロンビン薬であるアルガトロバンにより抗凝固処理を行った。倫理上の問題を

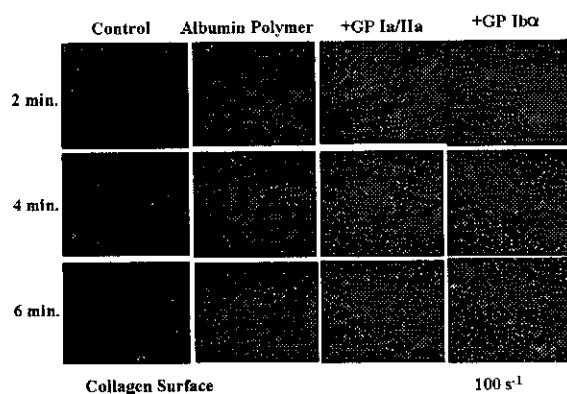
惹起しないため、供血者から書面によるインフォームドコンセントを行った。採取した血液から多血小板血漿を分離した。血小板を分離した血漿を戻して、血小板が減少した再構成血液を作成した。再構成液中に、蛍光標識した各種アルブミン重合体を添加してコラーゲン表面、von Willebrand 因子表面上を灌流した。人工血小板を添加したことによる止血能の向上を、マトリックス表面に単位時間血液を灌流したのちの surface area coverage で評価した。さらに、レーザー共焦点顕微鏡イメージングシステムにより、個別の人工血小板のマトリックスとの相互作用、人工血小板同士、人工血小板と native 血小板の相互作用の動的イメージングを行った。

C. 研究結果

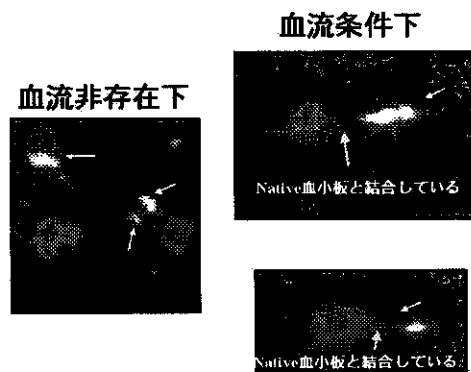
アルブミン重合体を添加することにより、コラーゲン上に単位時間内に血液を灌流した時にコラーゲン上に形成される血小板血栓は増加した。高い速度の条件 ($1,500 \text{ s}^{-1}$) で灌流した時には GP Ib α と結合したアルブミン重合体による血栓増強効果が大きかったが (図) 1、



低い速度の条件 (100 s^{-1}) では GP Ib α と GP Ia/IIa を結合したアルブミン重合体の差を認めなかった (図2)。



GP Ia/IIa と結合したアルブミン重合体は低い速度の条件下でコラーゲン表面に強固に固着した。一方、GP Ib α と結合したアルブミン重合体とコラーゲンの結合は transient であった。すでにコラーゲン表面と結合した native 血小板とは、GP Ib α と結合したアルブミン重合体が結合した。もともと不定形で存在するアルブミン重合体は、血流条件下で native 血小板と結合すると細長く引き延ばされた (図3)。



D. 考察

GP Ib α , GP Ia/IIaと結合したアルブミン重合体は、血小板の減少した症例におけるマトリックス表面上の血小板の集積を増強させる効果を有した。人工血小板による血栓増強効果は、高い速度の条件下ではGP Ib α と結合したアルブミン重合体でより顕著であった。低い速度の条件ではGP Ib α 結合アルブミン重合体とGP Ia/IIa結合アルブミン重合体に差を認めなかった。血流量が多く高い速度に曝露された領域での血管損傷による出血量がより大であることから生体内ではGP Ib α 結合アルブミン重合体の止血能がより高いと想定された。

止血に関するメカニズムもGP Ib α 結合アルブミン重合体とGP Ia/IIa結合アルブミン重合体では異なった。前者は、血管壁損傷部位に結合した血小板と結合して止血に関与したのに対して、後者ではコラーゲンに直接結合して止血能を発揮した。GP Ib α , GP Ia/IIaの両者を結合させることも、良好な抗血栓療法に役立つと想定された。

E. 結論

GP Ib α , GP Ia/IIaと結合したアルブミン重合体はいずれも止血能を有した。前者は血小板との相互作用により、後者はマトリックスとの相互作用による止血能の発現に関与した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究と記載あり)
2. 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 (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究との記載なし)
3. 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 (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究との記載なし)
4. 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 (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究との記載なし)

2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記載)

1. 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

H. 知的財産権の出願・登録 (予定を含む)

1. 特許取得

- 1) 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：後藤信哉、石田英之 (70%: 30%)、出願人：学校法人 東海大学 (特願 2003-39230)

2. 実用案新案登録

3. その他

<研究成果の刊行に関する一覧>

「書籍」

- 1) 後藤信哉：循環器領域の血栓症と抗血栓療法. 半田俊之介監修、メジカルセンス、東京、2002、pp 1-pp311
- 2) 半田俊之介、後藤信哉: III 冠動脈、静脈疾患. 冠動脈血栓症. In 別冊日本臨床領域別症候群シリーズ12. 循環器症候群I, 日本臨床社、東京、2002 pp 601-603,

「雑誌」

- 1) 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* (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究と記載あり)
- 2) 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 Iba1 induced by condition of high shear rate. *Circulation* 2002 105: 2531 - 2536 (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究との記載なし)
- 3) 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 (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究との記載なし)
- 4) 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 (厚生労働科研費補助金医薬安全総合研究事業の助成研究との記載なし)

分担研究報告書

人工血小板の血液流における挙動と側方向の輸送
—人工血小板の側方向輸送のせん断速度依存性—

分担研究者 谷下一夫 (慶應義塾大学理工学部)

研究要旨

血小板止血機構において、血液中に懸濁している人工血小板が赤血球との相互作用の結果、壁表面に対流と拡散によって輸送され、活性化された壁表面での粘着現象に預かるプロセスを解析して、人工血小板の流体力学的な特徴を評価して、実用化に最適な条件を明らかにする事を目的として in vitro 実験を行った。アルブミンを被覆したラテックス粒子の表面に rGPIb α を結合させた人工血小板を用い、200 μ m 矩形管流路において、管内での粒子のランダムな変動速度を高速度ビデオシステムで捉え、速度変動のデータから側方向（管軸と直角な方向）における dispersion coefficient を求めた。その結果、著しい dispersion coefficient のせん断速度依存性が明らかになり、さらに壁表面において dispersion coefficient が最大となり、粒子の輸送の割合をよく反映しており、実用化の可能性を表現する重要な評価基準になる事が明らかになった。

A. 研究目的

人工血小板の実用化の見通しをつけるためには、血流中における挙動、特に血管の損傷部位を検知して、選択的特異的に血流中を移動して凝集する機能があるかどうかを予め確認できる事が必要である。そこで、赤血球ゴーストによって模擬した血流中にアルブミンを被覆させたラテックス粒子の表面に rGPIb α を結合させた粒子（以後ラテックス粒子と言う）を懸濁させ、ラテックス粒子の動きを高速度ビデオによって追跡し、1500 sec⁻¹、と 200 sec⁻¹ のせん断速度にて粒子の微視的な運動を観測した。

B. 実験方法

アクリル板とカバーガラスを用いて 200 μ m の矩形管流路を作り、矩形管の 1 面には、血小板膜糖タンパクである Glycoprotein rGPIb α と粘着反応を起こす von Willebrand factor(vWf) をコーティングした。その流路にヘマトクリット 40% の赤血球ゴーストと人工血小板である粒径 1 μ m の rGPIb α Albumin Micro sphere Latex beads(rGPIb α -AMS Latex beads) をせん断速度 1500 s⁻¹（高せん断）および 200 s⁻¹（低せん断）で還流した。観察時は、流路にレーザーを照射し、FITC 蛍光標識した人工血小板の挙動を Image

Intensifierを介した高速度カメラで観察した。本年度は、明るさと解像度の改善をさらに行い、粒子挙動解析が容易に行えるようにした。得られた画像から、主流軸と直角の方向である矩形管内の半径方向への移動距離 ΔR と移動時間 Δt を求め、ブラウン運動からのアナロジーでDispersion coefficient(D値)を次式のように定義し、半径方向への移動の割合を定量化した。

$$D = \frac{\Delta R^2}{\Delta t}$$

さらに、実際の血管では内皮細胞との相互作用が粘着凝集するプロセスで重要になるため、培養内皮細胞を被覆した流路で、同様な実験を行った。しかし、200 μm の面に内皮細胞を培養する事が困難で、局所的な培養方法に関して検討中である。内皮細胞表面近傍の粒子の運動を本研究のような手法で観察できると、in vivo実験より明確に粘着現象を捉える可能性があり、今後重要な手法になるであろう。

(倫理面への配慮)

本研究では赤血球ゴーストを作成する際、健常人ボランティアから採血し、さらにラットの血液の使用をも試みている。健常人ボランティアからの採血は大学保健管理センターで行っている。

C. 研究結果

血液中の人工血小板粒子がv WFが固相化された壁表面にどのように到達する

までのプロセスには複雑な現象が関わっている。血小板が凝集粘着するためには、赤血球と血小板同士の衝突などの相互作用が不可欠で、その相互作用によって、血管壁近傍に血小板の濃度の最大値が現われるというNear Wall Excessが必要だという事が知られている。人工血小板の場合も全く同様で、本グループでは赤血球ゴーストの流動中における人工血小板の振る舞いを観測した結果、特に高せん断速度(1500 sec^{-1})の場合、壁近傍に人工血小板の最大が現われた。200 μm の矩形管では、壁から20 μm の部位に最大値が生じた。最大値が壁近傍に偏る現象の力学的メカニズムは不明であるが、明白な事は、赤血球との衝突によって、次第に壁の方向に移動している点である。一方、壁近傍における粒子の挙動に関しては、慶應大学医学部の半田グループと東海大学の後藤グループがin vitro実験によって凝集粘着の様子が詳細に観測されている。両グループでは、カバーガラスを通して、壁の反対側から観測されている。本グループの実験で粒子の振る舞いを観測して、壁近傍の粒子の振る舞いが両グループの結果に対応する事を確かめた。図1はv WF表面に次第に粒子が粘着している様子を示しており、灌流開始5分後にはv WF表面のみに粒子が粘着し、その後粘着粒子の凝集はほぼ一定な様子を示した。

赤血球ゴースト流動中の人工血小板の振る舞いは、v WF表面近傍と表面の影響が無い主流における領域とで分けて

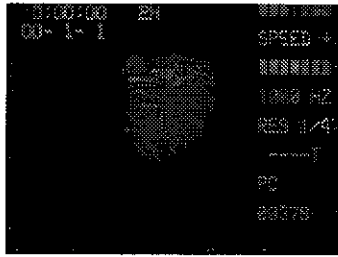


図1. 人工血小板の流動状態。vWF表面に既に粘着しており、壁表面に沿って粒子が移動している。1 μ m、高せん断速度=1500sec⁻¹、環流後 15分45秒

考える事が妥当である。まず主流における粒子の振る舞いであるが、本実験のような in vitro 実験である限り、一つの物理的な力学現象と捉えることが可能である。即ち、赤血球との衝突と粒子同士の衝突の結果、運動量交換を行いながら、半径方向に移動して行く。衝突を繰り返しながら移動するために、極めてランダムな動きを伴うために、分子運動に相似な考え方が成り立ち、拡散プロセスと見なして、有効拡散係数で評価する試みもある。ただ、分子拡散とは本質的に異なり、分子同士が衝突を繰り返して、次第に移動（拡散）して行く際の平均自由行程よりは、はるかに大きなマクロなスケールの移動であり、さらに流動中にある粒子の衝突を伴うために、流れの対流効果が影響を持ち、前述の dispersion coefficient として表現する事が妥当である。

そこで、本研究において実測した側方向の移動距離から計算してみると、図2のような結果となった。

低せん断速度では、10⁻⁷のオーダーで、Goldsmithらの見積もりより大きい。高せん断速度では著しく増加し、10⁻⁵とな

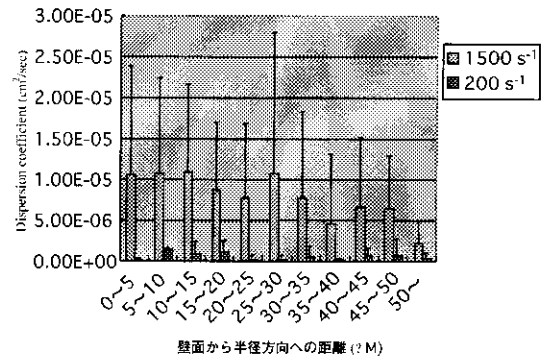


図2. Dispersion coefficientの半径方向の分布に、著しいせん断速度依存性が見られている。高せん断速度では、壁付近と25 μ m付近が高くなっている。

っている。血小板の大きさを考慮した分子拡散係数を求めると10⁻⁹のオーダーとなり、赤血球との衝突を繰り返しながら移動する早さは分子拡散よりも圧倒的に速い事がわかる。さらに興味深い点は、dispersion coefficientが壁と中心の間で最大となり、さらに壁に近づくにつれて、増加する傾向である。壁に近づくにつれて、せん断速度が増加し、流体の回転角速度も増加するので、流れの回転による dispersion が促進されている。このようなプロセスから次第に人工血小板は壁の方向に輸送される。

D. 考察

v WFを被覆した表面の影響に関しては、固相化されたv WFの表面性状が重要で、特にせん断速度依存性が本質的である。v WFがせん断速度が大きい場合、分子を延伸させて主流方向に長い手を伸ばして、NEWからランダムに投入された粒子表面のrGPIbと相互作用を行い、粘着して、表面でそのまま粘着するものと強く粘着しないでローリングするもの