

がある。いずれにしても vWF 表面の影響が粒子に伝わるので、壁からの距離が約 $1\mu\text{m}$ 弱の領域では、赤血球との衝突が支配的な主流の様子とは異なり、壁による活性化を伴う粒子の振る舞いが支配的になる。それらの様子を概念図にしたものが図 3 である。

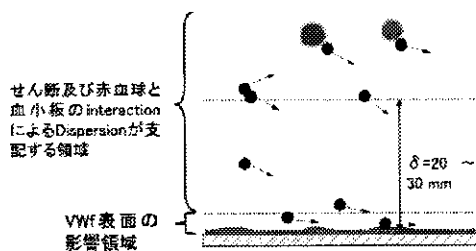


図 3. 人工血小板の vWF 表面への輸送の概念図

E. 結論

人工血小板粒子が血流中から壁表面に輸送されるプロセスは、赤血球存在下でのせん断による輸送促進 (shear induced transport) が中心で、この輸送プロセスはせん断速度の分布、粒子の変形性、粒子の形などによって変化する。VWF 固相化された表面のみへの選択的な輸送を実現する事が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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)

- (2) 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)

2. 学会発表

- (1) Tsuji, T., Tabata, T., Takeoka, S., Ikeda, Y., Tanishita, K., Motion of rGPI α near the vWF surface, VI World Congress of Biomechanics, Calgary (2002)
- (2) 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
- (3) 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)

H. 知的財産権の出願・登録

なし

3. その他

なし

<研究成果の刊行に関する一覧>

「書籍」なし

「雑誌」

- (1) S. Fukushima, T., Deguchi,

M. Kaibara, K. Oka, K. Tanishita,
Microscopic velocimetry with scale-
up model for a flow field over cul-
tured endothelial cells, Trans. ASME,
J. Biomech. Eng.124 (2002) pp.176-
179

- (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 69A (2003) pp.22-29.
- (4) 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)
- (5) 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)

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

「人工血小板」

微小循環における人工血小板粒子の挙動解析
－ アルブミン重合体の血中滞留動態 －

分担研究者 末松 誠 (慶應義塾大学医学部)

要旨

本研究班で作成されたアルブミン重合体 (polyAlb) の人工血小板粒子の担体としての生体適合性を検証する目的で、FITC標識polyAlbをラットに投与し、腸間膜および肝臓における挙動を解析した。polyAlbは血管内投与後、急速に血中濃度が低下し注入後5分でほぼ半減した。このような急速な血液中からの消失は主として肝臓における捕捉であり、蛍光標識体のKupffer cellによる貪食がその原因と考えられた。このような挙動は表面にhuman recombinant GPIb-alphaを結合させた粒子でも同様であった。ヒトに応用可能な血小板粒子としてはpolyAlbは不適であると考察した。

緒言

本年度はvWF抗体 (AJvW2) の微小血管における分布と意義について解析をするとともにバイオミメティクスを体内投与した際に生じる血管内皮細胞の機能変動をin vivoで評価する系としてNOのbioimaging技術の確立を行い、腸間膜における血管内皮細胞由来のNOのリソースについて興味深い知見を得た。vWFには明らかに細動脈と細静脈で分布にheterogeneityが存在した (知的所有権の帰属のため本報告書では成績を示さない。) また、後者についてはこれまでNOのリソースは血管内皮と神経系と考えられてきたが、我々の得た知見は血流中から供給されるリソースの存在を示唆する

ものであった。血小板に存在するNO synthaseからのNOが局所へのNOの供給に関与するかどうかは不明であるが、今後人工血小板の設計を考える上で重要な所見と考える。また人工血小板粒子のvehicleの生体内挙動を評価した。血小板脂質二重膜で構成された粒子だけでなく、アルブミンマイクロスフェアの表面に接着分子を結合させた粒子の生体適合性について生体ビデオ顕微鏡システムを用いて解析を試みた。これらの結果について報告する。

1. vWFの微小循環における分布

平成13年度までの研究により、血管壁を通過する血小板の速度は局所の赤血

球速度の比較で、約40%から100%までと大きな分散を有する分布を持っている。これがvWFやGPIbの機能阻害によりほぼ平均で80-90%程度まで速度が上昇することから、血小板と血管内皮細胞には相当の接着力が介在し、vWFが接着に重要な役割を果たしていることが示唆された。vWFは血中に重合体として存在するばかりでなく、血管内皮細胞のWeibel Palade小体から分泌されるため、正常でも血管壁の内皮細胞表面に接着しているものも存在すると考えられ、それが一過性の血小板接着の原因となっている可能性がある。これを検証するために使用した抗体をFITC標識し、蛍光の分布を共焦点レーザー顕微鏡で撮像し確認した。図1にその典型を示す。写真

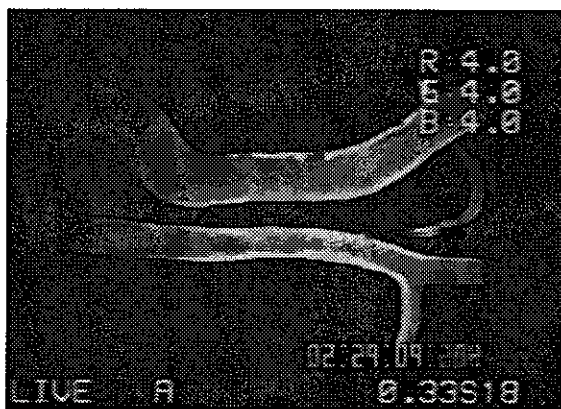


図1 抗vWF抗体AJvW2抗体の微小血管系における分布のリアルタイム解析

に示すように細動脈、細静脈ともに血管内皮細胞表面に抗体が結合、分布していることが確認された。これらの成績からおそらくvWFは血管表面から分泌されようとしているfractionが血小板上のGPIbと相互作用して一過性の接着が起きることが強く示唆された。以上のこと

から血管壁近傍のvWFは血小板が血管壁に沿って接着反応を起こすために極めて重要な示唆を与えるものと考えられる。

2. 共焦点レーザー顕微鏡による臓器微小循環のoptical slicingと血管内皮細胞機能・血小板挙動解析

人工血小板粒子を体内に投与する場合に接着分子の担体の選択は大きな問題であった。平成13-14年度にはここで示したレーザー共焦点顕微鏡によりliposomeを担体とした場合の主要な代謝部位となりうる肝臓のKupffer cell周辺あるいは異物認識やdendritic cellによる抗原提示の主要なコンパートメントであるPeyer's patchなどにおける細胞挙動やナノスケール粒子の詳細な生体画像計測系を確立した(文献)。これらの系の確立によりリポソームがKupffer cellに直接摂取される状況や部位、量についての情報がin vivoで取得できるようになった。

一方、GPIbを介した血小板挙動は病態により大きく修飾されることも明らかになった。特に内毒素血症では血管内皮細胞でのP-selectinの活性化に伴い血小板でのGPIbを介した白血球接着が活性化されること、また麻酔薬的作用によっても同様の相互作用が惹起されることが明らかになった(文献)。これらはGPIbを担体としたバイオミメティクスを体内に投与した際に考慮されるべき問題である。

将来的に人工血小板粒子を体内に投与

した際に問題になる点として、微小循環の恒常性に及ぼす影響、特に細動脈の wall shear stress の変化による血流や血管のトーンスの評価の問題がある。平成14年度には微小循環レベルでのNOのバイオイメージングを行い炎症反応の程度により血管壁近傍のNO量がどのように変化するかを評価するシステムの構築に成功した(文献20-22)。これまでは体内にバイオミメティクスを投与した際に perturbation の指標として用いられてきたのは白血球などの接着や血管透過性などであり、本事業によりようやく血小板自身の流体力学的評価が可能となった。この系は血管内皮細胞の機能評価をリアルタイムに可能にした点が非常に重要であると考えている。今後、次世代の人工血小板粒子の安全性評価を展開していく過程でこれらの技術応用は重要であると考ええる。



図2 DAF-2DAによる微小血管内皮細胞におけるNOのバイオイメージング。(文献21より引用)上の血管が細動脈、下が細静脈。間質の陽性細胞は多くが肥満細胞でこれらには neural NOS が発現している。

2. その他の微小循環における血小板挙動解析から得られた知見について

人工血小板粒子を体内に投与する場合に接着分子の担体の選択は大きな問題であった。平成13-14年度にはここで示したレーザー共焦点顕微鏡により liposome を担体とした場合の主要な代謝部位となりうる肝臓の Kupffer cell 周辺あるいは異物認識や dendritic cell による抗原提示の主要なコンパートメントである Peyer's patch などにおける細胞挙動やナノスケール粒子の詳細な生体画像計測系を確立した。これらの系の確立によりリポソームが Kupffer cell に直接摂取される状況や部位、量についての情報が in vivo で取得できるようになった。表1は実験

表1 実際に使用した PAIb のスペック
(早稲田大学理工学部 武岡助教授より供与)

	rGPIIaIIa-PAIb (020602-se)	rGPIIbα-PAIb (020601-se)	PAIb (020603-se)
Diameter(nm)	1030+/-	1120+/-	1100+/-
HAS conc(mg/mL)	200	200	280
Buffer	10	10	10
Fluorescence	PBS FITC	PBS FITC	PBS FITC
LPS(EU/mL)			
GP conc(mg/mL)	0.12	0.12	0.07

に用いた vehicle である albumin microsphere のスペックを示すが、これをラット体内に投与すると図3に示すような経過で急速に血液中の蛍光濃度が減少した。この decay には表面に GPIIaIIa をコートした場合とそうでない場合に根本的な差は認めなかった。また粒子の大半は急速に肝臓に集積した。特に albumin microsphere 自身は Kupffer cell に急速に取り込まれ、Kupffer cell 自身が大きな蛍光標識クラスタを形成した。これに対し GPIIaIIa をコートした群では Kupffer cell

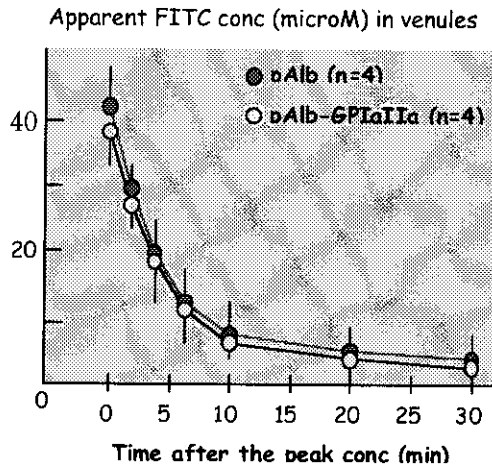


図3 ラットにおける pAlb および GPIIaIIa-pAlb の FITC 標識体の血管内濃度の減衰。半減期は 3-4 分程度と思われる。

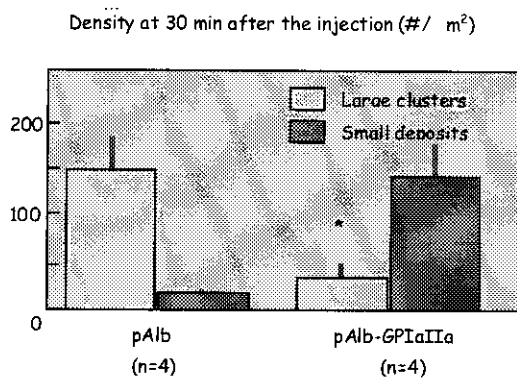


図4 FITC 標識 pAlb の肝臓微小循環への取り込み。縦軸は門脈域を中心とした半径 300 mm 径の視野内に認められた pAlb 集積のクラスタ数を示す。

以外にも類洞に沿った small particle の取り込みの割合が多く認められた。これは Disse 腔から逸脱した粒子が局所に少量存在する collagen と反応したものを検出した可能性があるが、詳細は不明である。

将来的に人工血小板粒子を体内に投与した際に問題になる点として、微小循環の恒常性に及ぼす影響、特に細動脈の wall shear stress の変化による血流や血管のトーンスの評価の問題がある。平成

14 年度には微小循環レベルでの NO のバイオイメージングを行い炎症反応の程度により血管壁近傍の NO 量がどのように変化するかを評価するシステムの構築に成功した。これまでは体内にバイオミメティクスを投与した際に perturbation の指標として用いられてきたのは白血球などの接着や血管透過性などであり、本事業によりようやく血小板自身の流体力学的評価が可能となった。この系は血管内皮細胞の機能評価をリアルタイムに可能にした点が非常に重要であると考えている。今後、次世代の人工血小板粒子の安全性評価を展開していく過程でこれらの技術応用は重要であると考えている。

文献

1. 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.
2. Suematsu, M., Suzuki, H., DeLano, F.A., Schmid-Schoenbein, G.W. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension. *Micro-circulation* 9, 259-276, 2002.
3. 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.
4. 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.
 5. 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 diaminofluorescein microfluorography. *Circ Res* 91, e55-e64, 2002.
 6. Suematsu, M., and Kashiwagi, S. Visualization of gaseous signal transduction in biological system. *Antioxid. Redox Signal*. In press, 2003.
 7. 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.

分担研究報告書

in vivoにおける新規血小板代替物GPIb α -poly albuminの機能評価

分担研究者 長澤俊郎 (筑波大学臨床医学系)

研究要旨

GPIb α -poly albuminの血漿半減期を測定した。3.7分で半減することが明らかとなった。GPIb α -poly albuminを3分ごとに継続して投与する系を用いてGPIb α -poly albuminの機能を評価した。その結果、血小板数1万以上10万未満の範囲においてこの新規血小板代替物は、有意にphotochemically induced venous occlusion timeを短縮することが明らかとなった。その働きは、荷電に依存していないことも確かめられた。

A. 研究目的

- ① GPIb α poly albuminの機能を評価するにあたり、その血中半減時間を明らかにする。
- ② それを踏まえた、実験系において機能評価を行う。
- ③ 組織学的な検討から正常血管閉塞の可能性を探る。

B. 研究方法

実験に使用する動物：F344 male rat
動物に対する倫理性の確保：実験は全てペントバルビタールの筋肉内注射による麻酔下で行った。不可逆的な損傷を動物に与えた場合、速やかに安楽死処置を麻酔の作用下で行った。

血中半減期の測定：¹²⁵IをGPIb α -poly

albuminに結合させ、経静脈投与後、経時的に採血を行い測定した。

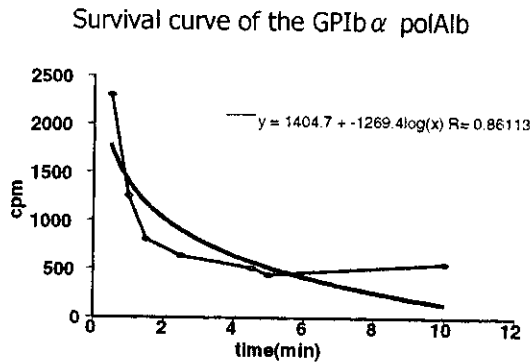
止血機能の評価：photochemically induced venous occlusion timeと尾を用いたSinplate bleeding timeをもって評価した。

止血能の発現に関する検討：flow cytometryを用いて陰性荷電量を比較した。cationized ferritinにN-hydroxy succinimide-biotin esterを結合させる。その後、未結合物をPD-10カラムで除去する。Cationized ferritin-biotinに評価対象となるGPIb α -poly albumin, poly albumin, control beadsを反応させた後、FITC-avidinを用いて蛍光標識しこれをFACS caliber, FACSortで解析した。

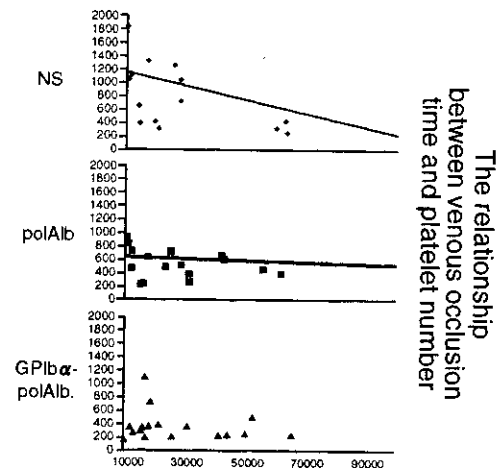
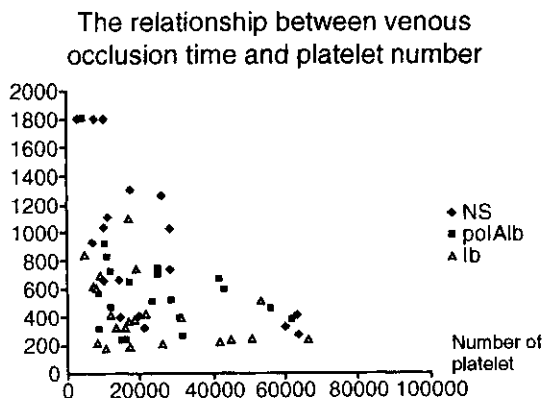
C. 研究結果

- ① 血中半減時間：指数関数的な減少を

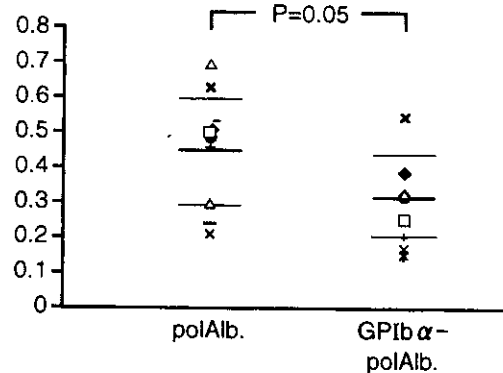
示し、血流中では3.7分で半減した。
(図1)



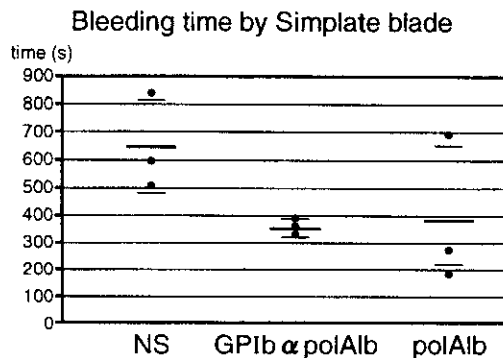
② 3分ごとに経静脈的に GPIb α -poly albumin を投与し続ける系を用いて photochemically venous occlusion time を測定した。生理食塩水を投与した場合、残存血小板数と血管閉塞時間においては、負の相関関係が認められたが、poly albumin, GPIb α -poly albumin では相関が認められなかった。残存血小板数 1 万未満と 10 万以上においては、生理食塩水、poly albumin、GPIb α -poly albumin に差は認めないが、その間における血小板数では、有意差をもって GPIb α -poly albumin は、poly albumin よりも血管閉塞時間を短縮した (生理食塩水を基準として比較)。図2、3、4



Photochemically induced venous occlusion time, expressed ratio to NS.

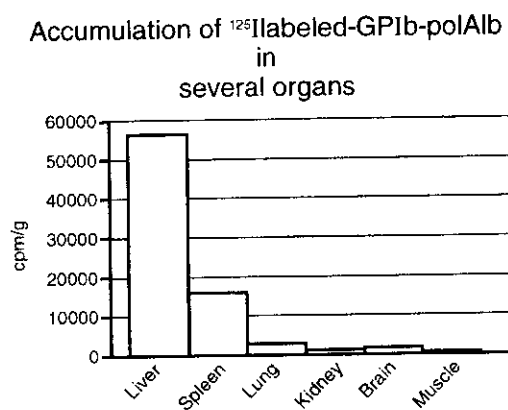


③ 出血時間を Simplate を用いて評価した。生理食塩水に比較して、poly albumin, GPIb α -poly albumin は出血時間を短縮したが、poly albumin, GPIb α -poly albumin の間に差は認められなかった。図5



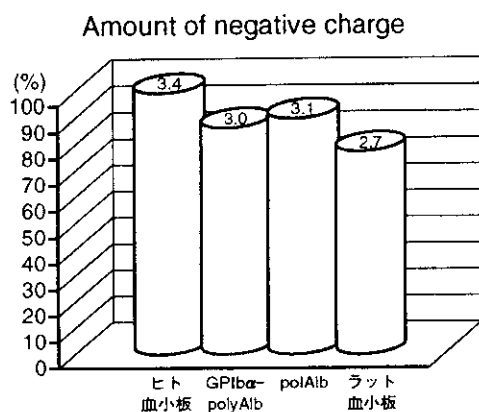
- ④ GPIb α -poly albuminの集積臓器を¹²⁵Iを用いて検討した。肝・脾がその主な集積臓器であることが明らかとなった(肝は肺の約22倍、脾は約6倍)。

図6



- ⑤ 組織切片を用いて血管内に閉塞がないか肝・脾で検索したが認められなかった。

- ⑥ control beadsから計算したGPIb α -poly albumin, poly albuminのnegative charge量は、各々0.55 Meq COO⁻/gm, 0.57 Meq COO⁻/gmでありラット血小板では、0.49 Meq COO⁻/gmであった。図7



D. 考察

生理食塩水を投与した場合、残存血小板数と血管閉塞時間においては、負の相関関係が認められた。poly albumin, GPIb α -poly albuminでは相関が認められなかった。このことは、poly albumin, GPIb α -poly albuminが血小板数の減少した場合、血管閉塞促進効果を示すことを意味すると考えられる。poly albumin, GPIb α -poly albumin間には、その基底となる血管閉塞時間に差がある。実験間の条件を補正するために、生理食塩水を基準として比較すると、残存血小板数1万未満と10万以上においては、poly albumin, GPIb α -poly albuminに差は認めないが、その間の血小板数における血小板数では、有意差をもってGPIb α -poly albuminは、poly albuminよりも血管閉塞時間を短縮し、新規血小板代替物GPIb α -poly albuminが有効である可能性を示唆した。さらに、GPIb α -poly albuminは正常血管において閉塞を示さず、安全性においても優れているものと考えられる。GPIb α -poly albuminの血管閉塞機序を解明するために、その陰性荷電量を測定したが、コントロールとなるpoly albuminと比較して差が認められず、今後さらなる解析が必要であると考えられた。

E. 結論

GPIb α -poly albuminは、極端に血小板が減少した状況下では、その止血作用が明らかではないが、血小板数の減少が高度でない場合、血管内で血栓を形成する

能力があるものと考えられる。しかし、血中半減時間が短いために、今後その血中滞留時間を延長させる試みが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

In vivo evaluation of new platelet substitute Glycoprotein Iba bound on recombinant albumin polymer.

In Symposium III , 9th. International Symposium on Blood Substitutes At Tokyo, on 2003/March/3-5

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

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

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
—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—

分担研究者 池淵研二 (東京医科大学生化学)

研究要旨

人工血小板の生体適合性を1) ラット投与系での血球数変化、補体価、2) ヒト自家リンパ球混合試験、を用いて検討した。ラットに試料を250 μ l/100g 静脈投与した際、投与1時間後に血小板が減少する試料が存在した。しかし同時に測定した補体値(CH50)は不変であった。ヒト末梢血単核球と人工血小板を反応させ、自家リンパ球混合試験(抗原性の有無)を実施したところ、同種リンパ球(アロ刺激)、牛血清アルブミンなど明らかな非自己に対するものと同じ程度に、人工血小板試料に対する反応が認められた。試料の一部には直接リンパ球の増殖を刺激する活性を示した。ただし今回検討したリンパ球の反応は全体的に強かったため、試料にわずかに含まれているエンドトキシンの関与が否定しきれなかった。試料の精製を進めた上で被験者数を増やし再現性を確認する必要がある。

A. 研究目的

これまで主にヒトの血球細胞および血漿、血清を用いて、人工血小板製剤の生体適合性を検討してきた。今回はできるだけ臨床応用を想定し、生体を用いた系での安全性確認を目的に検討を試みる。生体防御系、特に補体系がヒトと類似したラットを被験動物に用い、製剤投与が血球数、特に血小板数に及ぼす影響と、血清補体価に及ぼす影響を検討する。また人工血小板試料が抗原性を持つか否かを明らかにするため、ヒト末梢血単核球との培養系を用いて自家リンパ球混合試験を行う。

B. 研究方法

1. ラット in vivo 投与と血球、補体の変化

Wistar系ラット(メス、体重200~230g)を対象にした。ネンブタール(0.4ml/kg)を用いて麻酔した後、尾静脈から試料の投与を行なった。試料としてGPIb固相化重合アルブミン、GPIaIIa固相化重合アルブミン、重合アルブミン、リポソーム、PBSの5種類を用いた。検体となる血液は心腔採血で得た血液を用いた。検体は投与前、投与後1時間、2時間、一部の実験では48時間後に採取し検討した。白血球数はテュルク氏液にて希釈、

血小板数はシュウ酸アンモニウムにて希釈後、血算盤にて算定した。

補体価は市販のワンポイントCH50キットを用いて測定した。ラット採血後血清分離し、その8あるいは10 μ lをキット反応液に添加し、抗原感作赤血球を1滴添加した。37 $^{\circ}$ C 1時間反応後、遠心にて上清を回収し、波長541 nmの吸光度を測定し、CH50値を求めた。

2. リンパ球混合試験

健康人ドナーから末梢血を採取し、フィコールパック比重液に重層後遠心し単核球を採取した。ヒトAB血清20%添加RPMI1640培地に浮遊させ、 1×10^5 個/40 μ lに試料あるいはPBSを10 μ lを添加し、オーバーナイトで自家反応させた。30Gy放射線照射した後、自家および同種単核球 1×10^5 個/50 μ lを添加し5日間、37 $^{\circ}$ Cにて炭酸ガス培養器にて培養した。1 μ Ciのトリチウムチミジン/10 μ lを添加しオーバーナイトで反応させ、翌日各ウェルの放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。一部の試験では単核球に抗原提示させる過程をスキップし、試料が直接リンパ球増殖を惹起するか否か検討した。

C. 研究結果

1. ラット in vivo 投与と血球、補体の変化

平成14年12月製造分の試料投与ではGPIbPolyAlb群で投与1時間後に著明な血小板減少が惹起され、それらは48時

間後には元の値に復帰していた (PBS投与群では48時間後に死亡例があったため、投与、採血操作に問題があった可能性がある)。補体価には著明な変化がなく40~50u/mlの間を推移した。48時間後には60u/mlに増加していた (これは麻酔、投与、採血などの処置に対する変化の可能性もある)。

(図1、図2)

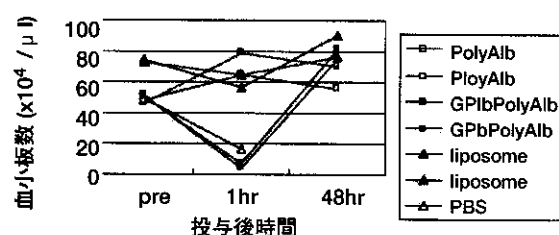


図1 人工血小板投与と血小板の推移

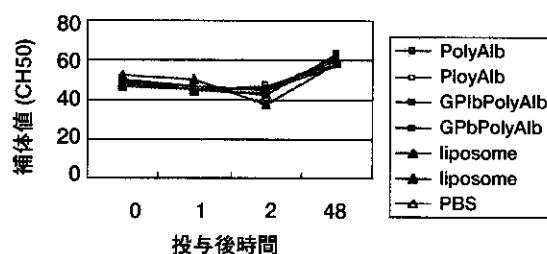


図2 人工血小板投与と補体値の推移

2. リンパ球混合試験

PBSを添加し、次いで自家単核球と反応させたコントロール群に対し、同種単核球やウシ血清アルブミンなど明らかに異物と反応させた群では放射活性が約6~7倍増加し、系として有効であることが確認された。試料添加群でもGPIb固相化重合アルブミン、GPIaIIa固相化重合アルブミン、重合アルブミン、GPIb、リポソーム群とも増加を示した。この自

自家リンパ球混合試験の成績の解釈は、コントロールに比べ10%以上の増加を有意と解釈するのが一般的だが、今回は放射活性の増加が強く2倍以上を有意と考えたところ、いずれの試料も反応が陽性であると解釈された。また抗原提示過程をスキップして直接刺激作用があるか否か検討したところ、GPIbとリポソームに強い活性が認められた。

今回調整された試料のデータによればエンドトキシンが0.02~0.2EU/ml含まれているため、これ自体がリンパ球培養系に影響を与えたことも否定できない。

(図3、図4)

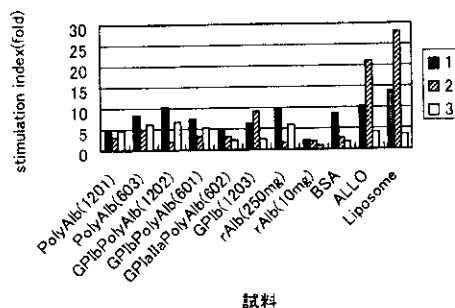


図3 重合アルブミンと自家混合リンパ球反応

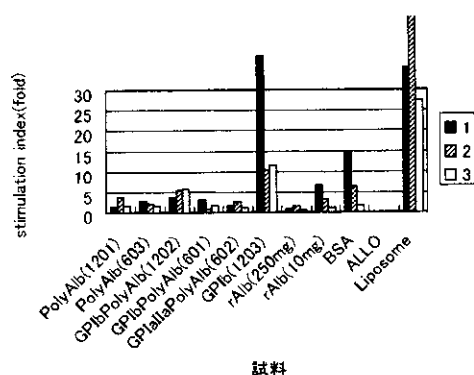


図4 アルブミン体重重合とリンパ球の直接反応

D. 考察

これまでヒトの血球および血清・血漿を用いて、人工血小板モデル製剤を反応

させ、白血球の遊走能、貪食能、抗原提示能、血小板凝集能、血小板活性化(RANTES放出を指標)に及ぼす影響を検討してきた。また血漿成分、特に凝固因子、補体活性に及ぼす影響も検討してきた。今回はラットを用いて実際に試料を投与し、血球数および補体に対する影響を検討したところ、GPIbPolyAlb群で一過性に血小板減少が認められた(48時間後は前値に回復)。補体値には大きな変動を認めなかった。自家リンパ球混合試験および直接リンパ球刺激試験ではアロ刺激に近いレベルでリンパ球反応が惹起する試料があった。しかし重合しない前の遺伝子組換えヒトアルブミン自体でも濃度を高くすると反応性が認められたため、今回採用した系の信頼性も含め慎重に再検討する必要があると感じている。

今回使用した試料には微量ながらエンドトキシンが含まれているため、抗原提示系および直接刺激系の両方で認めた陽性反応は、このエンドトキシンによって惹起された非特異的な反応である可能性もある。試料の精製を進め再検討することが必要であると考えている。

E. 結論

人体に応用する人工物の生体適合性を可能な限り臨床試験前に検討しておくことは重要なテーマと考えている。ラットへの試料投与実験は数を重ね、ヒトリンパ球混合試験は試料中のエンドトキシンの影響が出ないレベルまで試料の精製を

進め、ドナー数も増やし再検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実案新案登録 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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ

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
Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M & Ikeda Y.	Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/Ia and Ib α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions	Blood	100(12)	136-142	2002
Watanabe N, Nakajima H, Suzuki H., Koyasu S, Ikeda Y & Handa M	Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation	Blood	Prepublished March 20.		2003
Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E.	Rolling properties of rGPIIb-conjugated phospholipid vesicles on vWf surface under flow conditions with different membrane fluidity	Biochem. Biophys. Res. Commun	296,	765-770	2002
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	2153 published	1-5	2003
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
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効評価システムの開発.	成人病と生活習慣病	32	1366-1368	2002
Murai, M., Yoneyama, H., Ishikawa, H., Suematsu M. Matsushima, K et al	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
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 diaminofluorescein microfluorography.	Circ Res	91	e55-e64,	2002
Kajimura, M., Shimoyama, M., Suematsu, M. et al	Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in rat retina.	FASEB J.	1096	fj.02-0359fje	2003

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hori R, Kashiba M, Suematsu M et al:	Gene Transfection of H2SA mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity	J Biol Chem	277 (12)	10712-10718	2002
Takamiya, R., Murakami, M., Hozumi, N., Suematsu, M et al	Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: an anti-inflammatory role.	Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol..	283,	H861-H870,	2002
Teramura, Y., Takeoka, S., Okamura, Y., Kainoh, M., Handa, M., Ikeda, Y. et al	Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice.	Biochem. Biophys. Res. Commun	投稿中		2003
武岡真司、寺村裕治、池田康夫、土田英俊	リボソーム	血液・免疫・腫瘍	投稿中		2003
Fukushima S, Deguchi T, Kaibara M, Oka K, Tanishita K	Microscopic velocimetry with a scaled-up model for evaluating a flow field over cultured endothelial cells	Transactions of the ASME	124	176--179	2002
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	69 (677)	22-29	2003

20021043

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.63－P.64の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

その他