

厚生労働科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価
(研究課題番号：H15-医薬-012)

平成 15 年度
総括・分担研究報告書

平成 16 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

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 助手

(研究協力者)

村田満 慶應義塾大学医学部内科 講師

目 次

認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価

平成15年度研究報告

- | | | |
|------|--|-------|
| I. | 総括研究報告書 | 池田 康夫 |
| II. | 分担研究報告 | |
| 1. | 血小板減少血液を用いた人工血小板機能の in vitro 評価
－血小板代替物の流動条件下 in vitro 血小板血栓形成に及ぼす効果 | 半田 誠 |
| 2. | 担体、認識部位の選択による止血能をもつ微粒子系の精密合成
－止血能を有する蛋白質高分子量体の開発 | 武岡 真司 |
| 3. | 止血過程における人工血小板の超微細構造解析
－認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の超微構造的解析：
凝集系における効果と挙動に関する形態学的検討 | 鈴木 英紀 |
| 4. | 高速レーザー共焦点顕微鏡による人工血小板の動的機能評価
－高速レーザー共焦点顕微鏡による3次元医用イメージングシステムを用いた
ex vivo, in vivo の血栓評価系における H12 統合リポソームの止血増強効果 | 後藤 信哉 |
| 5. | 人工血小板の微小循環動態特性の生体内解析
－レーザーアブレーションを用いた血小板血栓形成モデルによる
リポソームの微小循環系内挙動 | 末松 誠 |
| 6. | 人工粒子上でのインテグリン構造の制御
－ α IIb β 3 インテグリン活性化機構の解明 | 鎌田 徹治 |
| 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 | |

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）

総括研究報告書

「認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価」

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

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 助手

研究協力者

村田 満 慶應義塾大学医学部内科 講師

----- 研究要旨 -----

本研究班の目的は、血小板減少時の出血の治療・予防に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）の開発である。主任研究者らが、長年取り組んで来た止血血栓形成の分子機構に関する研究成果に基づき、まず止血機能を担持する人工粒子をデザインし、その妥当性を検討する為に候補人工粒子を作成し、その安全性と止血機能を *in vitro*, *in vivo* で評価する手順を採っている。平成12年から14年度における研究において、血管傷害部位に特異的に集積し得る人工粒子の作成、更に、血管傷害部位において生体内に残存する血小板をリクルートしてヒト血小板と凝集塊を形成し、これを促進させ得る機能を有する人工粒子の作成に成功した。

平成15年に「認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価」として新たに始まった研究班においては、それらの候補人工粒子が生体内で十分な止血機能を有すること、しかし、流血中で凝集塊・血栓を形成

し、臓器障害を惹起しない事を確認する為、止血能と同時に、安全性の評価も行う事とした。止血能の評価には、血小板減少ラットを作成し、その出血時間の短縮を指標とする事とし、再現性良く血小板減少ラットを作成出来るか否かをまず検討した。Wistar 系雄性ラット（8週齢）に Busulphan 20mg/kg を 0,3 日目に尾静脈より投与し、体重、血球数測定を経時的に行ったところ、10日目で血小板数は再現よく投与前値の $1/4 \sim 1/5$ (19.6 ± 2.6 万/ μ l) となった。白血球の減少が若干みられたものの、赤血球、ヘマトクリット値に有意な変化は無く、busulphan 投与後 10日目のラットを血小板減少ラットとして人工血小板の止血能評価の実験に使用する事とした。出血時間はラット尾先端から 1センチの部位にクイックヒールを用いて長さ 2.5ミリ、深さ 1ミリの一定の傷をつけ、尾先端を生理食塩水に浸し、出血時間を測定した。正常ラットの出血時間は、 178 ± 56 秒であったが、血小板減少ラットのそれは、 609 ± 153 秒と著しく延長した。アルブミン重合体 (PolyAlb) 4 mg/kg 投与は、この出血時間に全く影響しない事を確認した後、これにフィブリノゲン γ 鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)を結合させた PolyAlb、H12-polyAlb、を投与したところ、この投与により出血時間は 352 ± 73 秒と著しく短縮した。このポリペプチドを逆配列させた r H12-polyAlb では、出血時間の短縮がみられなかった。H12-PolyAlb 投与 5分前、投与後 30分に採血し、各血球成分の変動を記録したが、血球の変動は変じなかった（武岡ら）。

In vitro でヒト血小板と H12-polyAlb を混じたものに ADP を添加すると、血小板凝集の亢進が血小板凝集計で観察された。これを電顕で観察すると、大きな凝集塊の形成、血小板相互の変形、強固な接着が見られ、血小板内顆粒の残存は殆ど見られなかった（鈴木）。

平成 14年度の報告書において述べたように、H12-polyAlb の流動状態下での凝集塊形成促進作用は低ずり速度下でのみ発揮され、ずり速度が高くなるとその作用は減少した。

その為、半田らは、高ずり速度下での vWF 基板への血小板粘着に血小板膜糖蛋白 GPIb α /vWF の相互反応が重要な役割を演じているという実験結果をもとに vWF を認識する GPIb α のリコンビナント体と H12 を共に担持した人工粒子 (H12; rGPIb α -latex beads) を作成し、種々のずり速度の流動状態下で血小板凝集塊形成促進機能を評価した。

その結果、一つの担体に H12、r GPIb α を担持させると H12 の血小板凝集促進

効果は r GPIIb α の結合量の増大と共に低下した事より、高ずり速度下で有効に基板に粘着し、凝集塊形成を促進させるには、両者の導入方法に新たな工夫が必要であるとの認識に至った。一方、H12-latex beads、r GPIIb α -latex beads をそれぞれ作成したものを混合した実験を行うと、ずり速度の増大に伴い、血小板、ラテックスビーズ共に粘着数は増大し、さらに血小板粘着増強効果も増大した。従って、この両者を混合するのみで、高ずり速度下において、H12 結合人工粒子が粘着出来、両者の共存による協同効果の存在が初めて観察された。H12-polyAlb と共に H12-PEG 小胞体の機能評価を行った。H12-PEG 小胞体は、武岡らが独自の方法を開発し、調整した。H12-PEG 小胞体は、H12-PEG 脂質のモル比 0.002~0.006 を含むいずれにおいても、血小板凝集促進効果を認めたが、小胞体への H12 結合量が増加する程凝集の亢進が顕著であった。H12-PEG 小胞体についての流動状態下での機能評価については、血小板減少血液を用い、流動状態下でのコラーゲン基板への粘着占有率で評価した。H12-PEG 小胞体の添加により、血小板粘着占有率が増大した事より、コラーゲン基板に粘着し、活性化したヒト血小板に H12-PEG 小胞体が結合し、それを介して更に血小板が結合するという反応が想定された。従って、血中滞留性の向上の為に、小胞体表面に PEG 脂質を導入しても、H12 の認識反応は、阻害されない事が明らかとなった。

平成15年度は、既に述べた候補人工血小板粒子の *in vitro*、*in vivo* における機能評価の他、新たな研究として、生体内での血栓形成能に関する新しい評価系構築の試み、ヒト血小板において凝集機序の鍵を握る膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 複合体 (α IIb β 3 インテグリン) 活性化の分子機構の解明に成果が得られた。血管損傷部位での人工粒子の挙動を解析する為、末松らはチッソ色素レーザーを用いた血管傷害モデルを構築した。この系を用い、ラット腸間膜微小血管に血小板血栓を形成し、その周辺での rhodamine 標識ーリポソーム及び carboxyfluorescein diacetate succinimyl ester (CFSE) で生体染色したラット血小板の挙動を confocal microscopy によりリアルタイムで撮像した。これらの蛍光像を 8-bit digital 化し解析した結果、血小板血栓内には、ラット血小板のみの集積が認められ、一方、リポソームは基底膜の部分と思われる血管壁の内皮下腔非常に高濃度に充填され、しかも長軸方向には障害部位から左右 50 μ m 以内で収束している事が判明した。つまりこれらのリポソームは活性化したラット

血小板に集積する事無く、ラット血小板の分布とは完全に分離して振る舞い、かつ障害血管部位に選択的に集積し、正常血管壁と相互作用しない事が確認された。末松等が開発した血管障害モデルは in vivo での人工血小板機能評価に有用な実験系として今後、本研究班で用いられるが、一方、半田等は、人工血小板をデザインする際、担体の最適な形状をどのように決定すべきかについて考察する為、出血部位モデル基板に対する単一人工粒子の接着挙動を観察し得る系の確立に取り組んだ。高速度撮影カメラ、輝度増幅装置を備え付けた倒立型蛍光顕微鏡を用いて人工粒子の挙動を観察する事により、画像解析、計測ソフトにて解析出来る流動状態下細胞接着解析システムの構築が可能となった。また、後藤等は、候補人工血小板粒子の血栓形成促進効果を評価する為に高速レーザー共焦点顕微鏡を用いて、血栓を3次元構造物として上から下までスキャンし、そのイメージ像を得るシステムを構築し、H12-PEG 結合小胞体の機能評価を行った。血小板減少（血小板 10,000/ μ l）になるように調整した再構成血液に H12-PEG 結合小胞体を混じり、コラゲン基板に灌流した所、血小板同志の結合が H12-PEG 小胞体により増強され、血小板血栓の3次元成長が認められた。鎌田は、新しい試みとして、 α IIb β 3 インテグリンの立体構造の異なる2つの conformer (bent conformer, extended conformer) についてそれぞれのリガンド結合活性を検討した。 α IIb β 3 分子内に人工的に S-S 結合を導入して bent conformer に固定した変異 α IIb β 3 を動物細胞に発現させ、フィブリノゲンの結合を調べた結果、この変異型は低親和性であり、還元剤で処理して分子内 S-S 結合を切断しない限り、いかなる活性化刺激にも反応しない事が明らかになった。活性化依存性抗体を用いた検討では、この分子は抗体エピトープの発現が wild type と比べて低い。人工血小板上に α IIb β 3 を発現させ、人工粒子に凝集機能を付加する事を目指すには止血部位において何らかの方法で bent conformer から extended conformer に変換させるメカニズムを持たせる工夫が必要である事より、それ自身が凝集機能を担持し得る人工粒子の開発にはなお研究の積み重ねが必要である。

----- 業 績 -----

- Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, Watanabe N, Suzuki H, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y. : Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun.* 312. 773-779, 2003
- Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H, Kainoh M, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E: Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 306, 256-260, 2003
- Goto S: Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Current Vascul Pharmacol*, 2, 23-32, 2004
- Hagihara M, Higuchi A, Tamura N, Ueda Y, Hirabayashi K, Ikeda Y, Kato S, Sakamoto S, Hotta T, Handa S and Goto S: Platelets after exposure to a high shear stress. induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro. *J Immunol*, In press, 2004
- Goto S, Tamura N, Ishida H: Ability of anti-GP IIb/IIIa agents to dissolve platelet thrombi formed on a collagen surface under blood flow conditions. *J Am College of Cardiol.* In press, 2004
- Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematu M, Yamashita S, Murata T, Narumiya s, Kakita A, and Majima M: Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology*, 39, 139-150, 2004
- Suematu M: Forum Editorial: Quartet signal transducers in gas biology, Antioxidants & redox signaling. 5, 435-437, 2003
- Suematu M, Suganuma K, and Kashiwagi S: Forum Review: Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxidants & redox signaling*, 5, 485-492, 2003
- 岡村陽介、寺村裕治、武岡真司、土田英俊、鈴木英紀、渡辺直英、半田誠、池田

康夫: フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド結合粒子の血小板代替物の展開. 人工血液 (日本血液代替物学会誌), 11 (4), 205-210, 2003

- 武岡真司、岡村陽介、土田英俊、池田康夫: 血小板代替物の担体設計から Drug Local Delivery の可能性, 日本血栓止血学会誌, 15 (1), 21-26, 2004
- 武岡真司、岡村陽介: 止血機能を有する微粒子系の設計と機能評価. 第8回日本心臓血管麻酔学会抄録集, In press, 2004
- 末松誠: ガスバイオロジー研究の新展開, Molecular Medicine, 40(2), 132-145, 2003

分担研究報告書

血小板代替物の流動条件下 *in vitro* 血小板血栓形成に及ぼす効果

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（慶應義塾大学輸血センター，早稲田大学大学院 理工学
研究科 博士課程）
武岡真司（早稲田大学 理工学部 助教授）
鈴木英紀（東京都臨床医学総合研究所 研究員）

【研究要旨】

血小板代替物の *in vitro* 評価系として、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系が理想であり、平成 14 年度では、白血球除去フィルターを用いた血小板減少血液調製法を確立できた。さらに、血小板代替物の開発において、活性化血小板表面上の GPIIb/IIIa を認識するフィブリノーゲン (Fbg) の γ 鎖 C 末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV:H12) をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進することが確認でき、さらに未活性化血小板と相互作用しにくい配列であることを明らかにした (平成 14 年度 厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。しかし、その機能は低ずり速度下で最大限に発揮され、ずり速度の増大と共に機能が低下した。

平成 15 年度は、高ずり速度下でフォンビルブランド因子 (vWf) を認識する血小板膜糖蛋白質のリコンビナント体 (rGPIIb α) を組合せた系を考案し、流動状態下、種々のずり速度の違いにおける血小板凝集機能を評価した。ひとつの担体に H12 と rGPIIb α の両者を担持させた系 ((H12, rGPIIb α)-latex beads) は有効ではなく、H12-latex beads、rGPIIb α -latex beads 混合系において、両者の協同効果により血小板凝集が高ずり速度下で発現された。

さらに、担体形状の最適化を図る目的で、出血部位モデル基板に対する単一血小板の接着挙動を、高速度撮影カメラ (Motion Pro 2000/2G, Redlake MASD 製)、輝度増幅装置 (Roper-II 6653, 浜松フォトニクス製) を備え付けた倒立型蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U, ニコン製) にて観察した。その結果、画像解析・計測ソフト (Image-Pro PLUS, プラネトロン製) にて解析できる流動条件下細胞接着解析システムを構築できた。

A. 研究目的

血小板凝集機能を補助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) の γ 鎖 C 末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV:H12) をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進することが確認でき、さらに未活性化血小板と相互作用しにくい配列であることが明らかとなった (平成 14 年度 厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。しかし、その機能は低ずり速度下で最大限に発揮され、ず

り速度の増大と共に機能低下が認められた。

そこで平成 15 年度は、高ずり速度下でフォンビルブランド因子 (vWf) を認識する血小板膜糖蛋白質のリコンビナント体 (rGPIIb α) を組合せ、血小板減少症モデル血液を用いて、流動状態下、種々のずり速度の違いにおける血小板凝集機能を評価することを目的とした。また、高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システムを構築し、単一血小板の接着挙動を観察する。

B. 研究方法

1. 認識部位担持微粒子¹の調製と解析法

1.1. rGPIb α -latex beads の調製

rHSA 溶液(50 mg/mL) 1.5 mL に latex beads を混合し、振とうさせた(20 °C, 2 hr)。遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4 °C, 3 times)にて未吸着 rHSA を除去後、リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)にて再分散させた。

HSA 吸着 latex beads 分散液((HSA) latex beads)に N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate(SPDP)エタノール溶液(5 mM) 5 μ L を添加し、振とうさせた(20 °C, 30 min)。遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4 °C, 3 times)にて、未反応 SPDP、副生成物を除去後、pyridyl disulfide 結合(HSA) latex beads (PD-latex beads, 4.0×10^6 particles/ μ L)を得た。

rGPIb α (66.4 mg/mL) 13 μ L を PBS (168 μ L)で希釈後、SPDP エタノール溶液(5 mM) 5 μ L を添加して振とうさせた(r.t., 20 min)。DTT(1 M) 4 μ L を混合後(r.t., 2 min)、GPC にて精製、SH-rGPIb α 溶液を得た(1 mL)。この溶液を PD-latex beads と混合、振とう(r.t., 2hr \rightarrow 4 °C, 12 hr)させ、rGPIb α -latex beads を得た(2.0×10^6 particles/ μ L, 1 mL)。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. H12-latex beads の調製

PD-latex beads (4.0×10^6 particles/ μ L, 500 μ L)に SH-H12 (10 mM, 8 μ L)、あるいは SH-RGD (10 mM, 8 μ L)を混合し、振とうさせた(20 °C, 12 hr)。遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4 °C, 3 times)にて上清除去後、H12-latex beads あるいは RGD-latex beads (2.0×10^6 particles/ μ L, 1 mL)を得た。latex beads 表面の H12, RGD 結合量は、2-thiopyridone (2TP) の 343nm の吸収から決定した(HPLC, TSK-GEL G3000SW_{XL} column, 7.8mm o.d. x 300mm h, 1mL/min, PBS)。

1.3. (H12, rGPIb α)-latex beads の調製

(HSA)latex beads(4.0×10^6 particles/ μ L)に SPDP エタノール溶液(20 mM) 10 μ L を添加、振とうさせ(20 °C, 30 min)、PD-latex beads を得た。SH-H12 (4 mM, 8 μ L)を混合、

振とう後(20 °C, 12 hr)、遠心分離(13000 rpm, 5 min, 4 °C, 3 times)にて精製し、H12-latex beads (H12-latex beads, 4.0×10^6 particles/ μ L, 500 μ L)を得た。

2 種類の rGPIb α 溶液((a) 1mg, (b) 2mg)に SPDP エタノール溶液(5 mM)をそれぞれ 6、12 μ L 添加して振とうさせた(r.t., 20 min)。DTT(f.c. 20 mM)を混合後(r.t., 2 min)、GPC にて精製、SH-rGPIb α 溶液を得た。両溶液を H12-latex beads と混合、振とう(r.t., 2hr \rightarrow 4°C, 12 hr)させ、rGPIb α の結合量の異なる 2 種類の(H12, rGPIb α)-latex beads(a)、(b)を得た(2.0×10^6 particles/ μ L, 1 mL)。

1.4. 流動状態下血小板接着評価法

1.4.1. 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)で各血球数、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(600 rpm, 15 min, r.t.)し、得られた platelet-rich plasma(PRP, 4.0×10^5 / 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 5.0×10^4 / μ L に調整した血小板減少血液を作製した。

1.4.2. コラーゲン基板の調製法

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

1.4.3. 流動下での蛍光顕微鏡観察、解析

血小板減少血液 5 mL に各検体を添加、振とうさせた(37 °C, 10 min)。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'-dihexyloxacarbocyanine(DiOC₆), 検体: FITC)。

37 °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。

2. 高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システム

2.1. vWf 固定化基板の調製法

vWf(3.4 mg/mL, 三菱ウェルファーマ社より供与)を PBS(pH 7.4)にて希釈し(f.c. 10 μ g/mL)、ガラス基板(直径 24mm, 厚み 0.12 mm)上に浸漬させた(4 $^{\circ}$ C, 8 h)。さらに BSA 溶液(20 mg/mL)にてブロッキングし(r.t., 2 h)、PBS で洗浄後使用した。

2.1. 流動下での蛍光顕微鏡観察、解析

血小板減少血液 5mL 中の血小板は 3,3'-dihexyloxacarbocyanine(DiOC₆)にて蛍光標識した。

vWf 基板をフローチャンバー(マルチ一製)に組み込み、ペリスタリックポンプ(MINIPULS 3, ギルソン製)を用いて血液(血小板に蛍光標識)を灌流させた。vWf 基板に対する単一血小板の接着挙動を、高速度撮影カメラ(Motion Pro 2000/2G, Redlake MASD 製)、輝度増幅装置(Roper-II 6653, 浜松フォトニクス製)を備え付けた倒立型蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE2000-U, ニコン製)にて観察し、画像解析・計測ソフト(Image-Pro PLUS, プラネトロン製)にて解析した(1 フレーム 1/250 秒)。

C. 研究結果及び考察

1. H12-latex beads, rGPIb α -latex beads 共存系

架橋剤 SPDP にて PD 基を導入した rGPIb α を DTT にて還元して得られた SH-rGPIb α を H12-latex beads 分散液中(H12 結合量 2.0 \times 10⁵分子/1 粒子)に混合、静置(4 $^{\circ}$ C, 12h)した。その結果、latex beads 1 粒子あたり rGPIb α を(a) 1.7 \times 10³, (b) 5.0 \times 10³ 分子結合させた(H12, rGPIb α)-latex beads が得られた(ELISA 法)。

血小板凝集計を用いて微粒子担持 H12 の機能を測定したところ、H12-latex beads は latex beads と比較して血小板凝集を促進させた。これは、H12-latex beads が血小板と多点結合して凝集したものと考えられる。他方、(H12, rGPIb α)-latex beads

では、Fig. 1 (a)、(b)のように rGPIb α 結合量の増大と共に(H12, rGPIb α)-latex beads による血小板凝集促進能は低下した。これは高分子量(100kDa)の rGPIb α の立体障害により H12 (1.3kDa)の活性化血小板との結合が阻害されたためと考察された。ひとつの担体に rGPIb α と H12 の両者の担持は、修飾方法を工夫しない限り有効ではないと判断された。

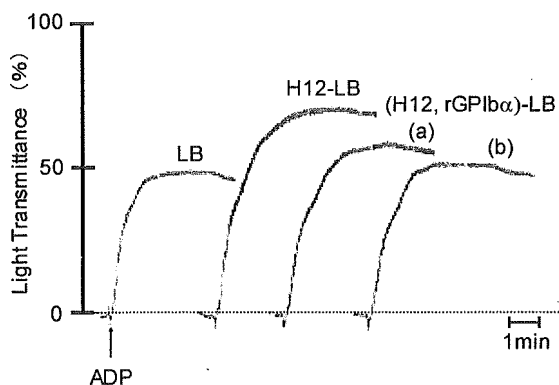


Fig. 1 ADP(3 μ M)-induced platelet (2.0 \times 10⁵/ μ L) aggregation in the presence of H12- or (H12, rGPIb α)-latex beads (Number of H12 / LB: 2.0 \times 10⁵, number of rGPIb α / LB; (a): 1.7 \times 10³, (b): 5.0 \times 10³).

次に、H12-latex beads と rGPIb α -latex beads の混合系を各々の単独系と流動下で比較、検討した。まず(1) H12-latex beads 単独系の粘着占有率は、低ずり速度で最大となり、ずり速度の増大と共に低下した(Fig. 2 (a) \diamond)。他方、(2) rGPIb α -latex beads 単独系では逆に高ずり速度で最大となり、ずり速度の低下と共に低下した(Fig. 2 (a) \triangle)。

両者の混合系では、特に高ずり速度時に(1),(2)の相加平均(Fig. 2 (a) \square)よりも増大する傾向が得られた(Fig. 2 (a) \circ)。同実験系を血小板側から観察すると、同様に混合系では高ずり速度時に(1),(2)の相加平均(Fig. 2 (b) \square)より増大する傾向が得られた(Fig. 2 (b) \circ)。

そこで、高ずり速度下、H12-latex beads、rGPIb α -latex beads 共存系の流動後の基板を SEM 観察したところ、血栓への H12-latex beads の結合数は H12-latex beads 単独系と比較して約 5 倍増大した(data not shown)。

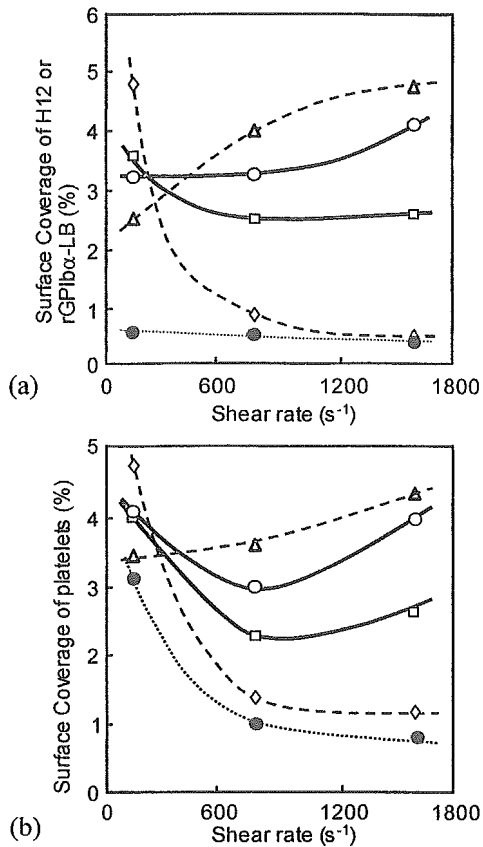


Fig. 2 Surface coverage of latex beads (LBs) (a) and platelets (b) at various shear rates: non-coated (●; $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$), H12- (◇; $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$), rGPIb α - (△; $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$), a mixture of (○) H12- ($5.0 \times 10^4/\mu\text{L}$) and rGPIb α -LBs ($5 \times 10^4/\mu\text{L}$). □: calculated mean value (◇+△/2).

また、高ずり速度条件下 (1600s^{-1})、H12-あるいはrGPIb α -latex beads 共存系における血小板血栓の観察により、血流に対して血小板血栓の正面、背面部に H12-latex beads が、側面部に rGPIb α -latex beads が結合する傾向が観察された (Fig. 3)。

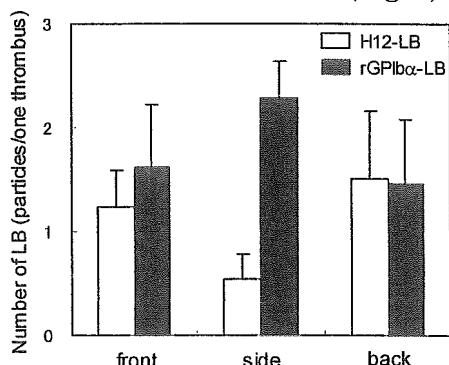


Fig. 3 The number of H12- (opened column) or rGPIb α -LBs (closed column) on the thrombus examined with SEM. Blood was perfused in the presence of H12- and rGPIb α -LBs over the collagen surface at a shear rate of 1600s^{-1} .

これは、高ずり速度下では rGPIb α -latex beads によって血小板凝集が促進され、形成された血栓の正面と背面には乱流が生

じ、そこへ H12-latex beads の結合が起こって血小板凝集を促進させたためと考えられた (Fig. 4)。従って血栓形成に両者の共存による協同効果の存在が初めて観察された。

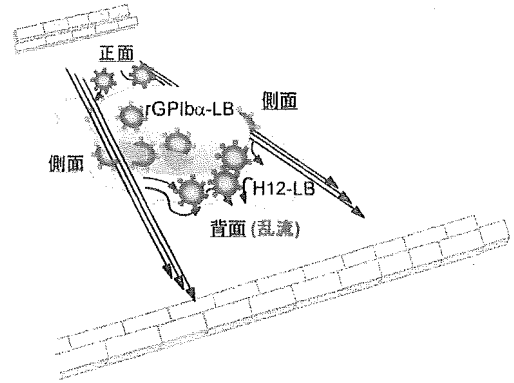


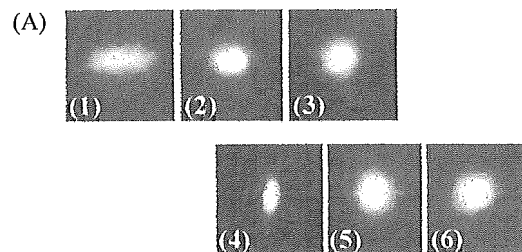
Fig. 4 Platelet thrombus formation in the presence of H12-latex beads and rGPIb α -LBs.

2. 高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システム

vWf 基板に対する単一血小板の接着挙動を、高速度撮影カメラ (Motion Pro 2000/2G, Redlake MASD 製)、輝度増幅装置 (Roper-II 6653, 浜松フォトニクス製) を備え付けた倒立型蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U, ニコン製) にて観察し、画像解析・計測ソフト (Image-Pro PLUS, プラネトロン製) にて解析した。

流動血小板 (ずり速度 1600s^{-1}) は、vWf 基板に接着 (tether) 直後、まず円盤状構造の面の広い部分が vWf 表面に触れるように回転した。徐々に円盤状から球状へと形態変化し、それに伴いローリング速度は低下し粘着した。

血小板接着後の形状を楕円とみなし、楕円長短軸比とローリング速度を経時的解析を行った結果を Fig. 5 に示す。



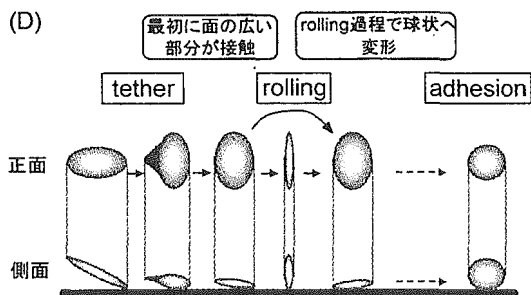
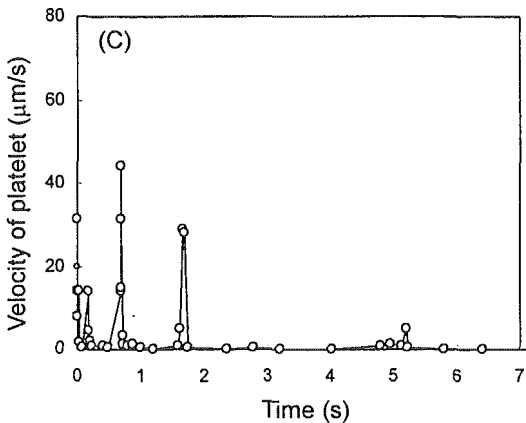
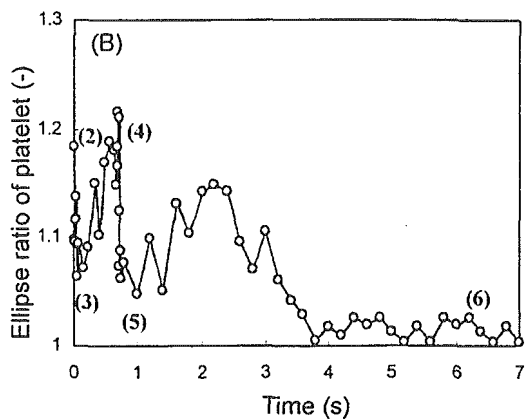


Fig. 5 (A) Tether and rolling images of single platelet over the vWf surface. (B) Time course studies for ellipse ratio and (C) velocity of single platelet interacting with the vWf surface at a shear rate of 1600 s^{-1} . (D) Schematic representation of tether and rolling of the single platelet.

この解析法を用いることで、単一血小板の接着挙動を形状変化より議論することが可能となると考えられた。

D. 結論

1) (H12, rGPIb α)-latex beads では rGPIb α 結合量の増大と共に H12 による血小板凝集促進効果は低下したことから、ひとつの担体に rGPIb α と H12 の両者の担持は有効ではないと判断した。他方、H12-latex beads、rGPIb α -latex beads 混合

系では、ずり速度の増大に伴い粘着した血小板や微粒子の数は増大し、両者の協同効果が認められた。さらに、血小板粘着増強効果も増大させた。

2) 高速度撮影カメラを搭載した流動条件下細胞接着解析システムを構築し、単一血小板の接着挙動を形状変化より議論することが可能となり、人工血小板担体の形状の最適化に資する可能性が明らかになった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y., and Handa, M. "Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation", *Blood*, **102**, 541-548 (2003).

2) Teramura, Y., Okamura, Y., Takeoka, S., Kainoh, M., Tsuchiyama, H., Narumi, H., Handa, M., Ikeda, Y. and Tsuchida, E. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 256-260 (2003).

3) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Watanabe, N., Suzuki, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 773-779 (2003).

4) Okamura, Y., Teramura, Y., Takeoka, S., Tsuchida, E., Suzuki, H., Watanabe, N., Handa, M., and Ikeda, Y. Development of fibrinogen γ chain dodecapeptide-conjugated particles, *Artificial Blood* **11**, 205-210 (2003).

5) Okamura, Y., Handa, M. *et al.*, "Role for P-selectin in platelet thrombus formation under flow", *Blood*, to be submitted.

2. 学会発表

(1) 「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 52 回高分子学会年次大会, 2003 年 5 月 30 日 (名古屋).

(2) 「血小板代替物の研究展開:2 ずり速度の違いに対応できる微粒子系の設計」, 岡村 陽介, 半田 誠 他, 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月 26 日 (山口).

(3) 「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 41 回日本人工臓器学会大会, 2003 年 10 月 31 日 (仙台).

(4) 「血小板代替物の設計と *in vitro*, *in vivo* 評価」, 岡村 陽介, 半田 誠 他, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003 年 11 月

1 日 (仙台).

(4) 「血小板代替物の設計と *in vitro*, *in vivo* 評価」, 岡村 陽介, 半田 誠 他, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003 年 11 月 1 日 (仙台).

(5) 「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 26 回日本血栓止血学会学術集会, 2003 年 11 月 29 日 (東京).

(6) 「高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果」, 岡村 陽介, 半田 誠 他, 第 84 回日本化学会春季年会, 2004 年 3 月 27 日 (神戸).

H. 知的所有権の出願・登録

ペプチド結合体 特願 2003-029847.

「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 助教授）
研究協力者 寺村 裕治（早稲田大学大学院 日本学術振興会特別研究員）
岡村 陽介（早稲田大学大学院 理工学研究科 博士課程）

【研究要旨】

血小板による止血には、破綻した血管内皮下組織局所への血小板の粘着に引き続き、血小板同士が次々と凝集（血小板—血小板接着）して血栓が形成されることが必要である。血小板凝集機能を補助する微粒子として、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ンノーゲン(Fbg)の γ 鎖 C 末端アミノ酸序列(HHLGGAKQAGDV:H12)をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少状態下でも血小板凝集の促進が確認でき、さらに未活性血小板とは相互作用しないことを明らかにしてきた(平成14年度 厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。平成15年度は、担体を生体適合性、生分解性を有する微粒子であるアルブミン重合体(polyAlb)とリン脂質小胞体を用いてこれに H12 を結合させ、流動状態下での *in vitro* 評価、血小板減少症モデルラットの作製と止血能 *in vivo* 評価を行った。H12 結合 polyAlb は、血小板減少ラットの出血時間を半減できる微粒子であった。また、H12 結合小胞体も流動状態下において、血小板凝集を補助できる微粒子であった(*in vivo* 試験は現在検討中)。

A. 研究目的

血小板止血機能を補助する微粒子系の開発において、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ンノーゲン(Fbg)の γ 鎖 C 末端アミノ酸序列(HHLGGAKQAGDV:H12)をラテックスビーズに担持させたところ、血小板減少下でも血小板凝集を促進させることが確認でき、さらに未活性血小板とは相互作用しにくい配列であることが明らかとなった(平成 14 年度 厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。

平成 15 年度は、担体を生体適合性、生分解性を有する微粒子としてアルブミン重合体(polyAlb)やリン脂質小胞体を用い、これに H12 を結合させ、流動状態下での *in vitro* 評価を行った。さらに、ブスルファン投与による血小板減少症モデルラットの作製条件の検討(busulphan 投与量の決定、出血時間測定法の確立)し、止血能評価(*in vivo*)を行った。

B. 研究方法

1. 認識部位担持微粒子の調製法

1.1. H12-polyAlb の調製

polyAlb 分散液([HSA]=20 mg/mL, 260 ± 80 nm, pH 7.4) 30 mL に SPDP エタノール溶液(20 mM) 100 μ L を添加して振とう後(r.t., 20 min)、遠心分離(25000 rpm, 10min)にて精製した(PD-polyAlb)。PD-polyAlb 分散液([HSA]=22 mg/mL)に SH-H12(100 mM, 150 μ L)を混合して振とう後(r.t., 12hr)、遠心分離(25000 rpm, 10 min)にて H12-polyAlb([HSA]=10 mg/mL, 280 ± 90 nm)を得た。

1.2. H12-PEG(PEG)小胞体の調製

グルタミン酸とステアリルアルコールから合成したグルタミン酸型脂質(Glu2C18)に、DCC 法にて片末端カルボン酸 PEG を反応させ、エーテル再沈後、PEG-Glu2C18 を得た(収率 83%)。他方、片末端マレイミド基ともう片末端スクシンイミジル基を有する PEG を Glu2C18 と反応させ、エーテル再沈後、

MAL-PEG-Glu2C18 を得た(収率 64%)。SH-H12 と MAL-PEG-Glu2C18 を DMF 中で反応させ、エーテル再沈、水で抽出後、H12-PEG-Glu2C18 を得た(収率 47%)。¹H-NMR のマレイミドのピーク($\delta=6.70$)の消失より、チオール基とマレイミド基の結合を確認した。DPPC : cholesterol = 1 : 1 に対し Table 1 に示すモル比で PEG-Glu2C18、H12-PEG-Glu2C18 を混合し、水和・押出法にて小胞体を調製した(粒径 220-240 nm)。

Table 1 Molar ratio of lipids

	PEG-Glu2C18	H12-PEG-Glu2C18
(1)	0.006	0~0.02
(2)	0	0.006
(3)	0.006	0.006

(1) H12-PEG(PEG)小胞体, (2)H12-PEG小胞体
(3) PEG小胞体

2. 流動下における血小板接着評価法

2.1. コラーゲン固定化基板の調製法

コラーゲン(3 mg/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 24 mm, 厚み 0.5 mm)上に浸漬させた(4 $^{\circ}$ C, 8 hr)。BSA 溶液(20 mg/mL)にてブロッキングし(r.t., 2 hr)、PBS で洗浄後使用した。

2.2. 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して血小板濃度 2.0 \times 10⁴/ μ L に調整した血小板減少血液を作製した。

2.3. 流動下での蛍光顕微鏡観察、解析

血小板減少血液 5 mL に各検体を添加、振とうさせた(37 $^{\circ}$ C, 10 min)。血小板と検体のどちらか一方を蛍光標識した(血小板:3,3'-dihexyloxycarbocyanine(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。

3. 血小板減少ラットを用いた止血能評価

3.1. 血小板減少ラットの調製法

Wistar 系雄性ラット(8 週齢、230-250 g)は日本クレアから購入した。ブスルファンポリエチレングリコール溶液(5mg/mL)を 0, 3 日目に尾静脈投与し(全投与量 20, 30, 40 mg/kg)、体重、各血球変動を計測した(K-4500, Sysmex)。

3.2. 出血時間測定法

ブスルファン投与(20mg/kg)開始から 10 日目を血小板減少症ラットとして、セボフラン麻酔後、検体(H12-polyAlb、polyAlb)を尾静脈投与した(4mL/kg)。また、生理食塩水をコントロール群とした。検体投与 5 分経過後、尾先端から 1cm の部位にクイックヒール(ベクトン・ディッキンソン社製)を用いて傷をつけた(長さ 2.5mm, 深さ 1mm)。尾先端を生理食塩水に浸し、止血時間を計測した。また、検体投与 5 分前、投与 30 分後に採血し、各血球変動を観察した。

C. 研究結果及び考察

1. H12-polyAlb の機能評価

1.1. 流動下における機能評価

血小板減少血液([血小板]=2.0 \times 10⁴/ μ L)に polyAlb ([rHSA]=0.2mg/mL)を添加しコラーゲン基板上に流動させたところ、流動開始から 210 秒後の血小板粘着占有率は 2.1 \pm 0.4 %であり、polyAlb を添加しない系(2.3 \pm 0.5 %)と同等であったことから、polyAlb 添加によって血小板粘着は阻害されないことを確認した(Fig. 1)。H12-polyAlb 添加系では血小板粘着占有率は 3.9 \pm 1.1 %となり、約 2 倍増幅されたことから H12-polyAlb は血小板凝集を補強する効果があると考えられた。

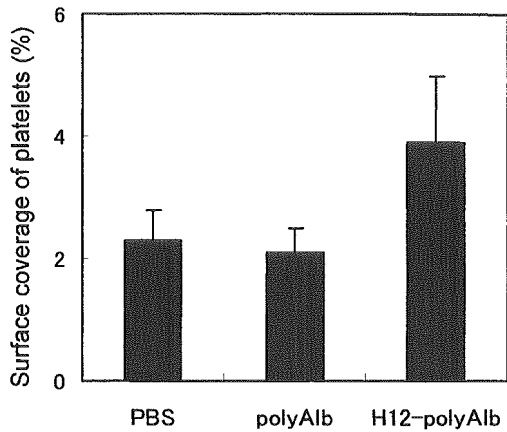


Fig. 1 Surface coverage of platelets in the presence of H12-polyAlb at a shear rate of 150 s^{-1} . (210s)

1.2. 血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価

ブスルファンポリエチレングリコール溶液を0、3日目に尾静脈投与したところ(全投与量20、30、40 mg/kg)、投与量依存的に血小板減少の度合は加速されたが、30、40 mg/kg 投与群は、それぞれ投与開始15、11日目に死亡した。20 mg/kg 投与群では再現性よく血小板が減少し、10日目で $19.6 \pm 2.6/\mu\text{L}$ (正常値の約1/4~1/5)となり20日目以降には血小板数の回復が認められた(死亡例なし)(Fig. 2)。

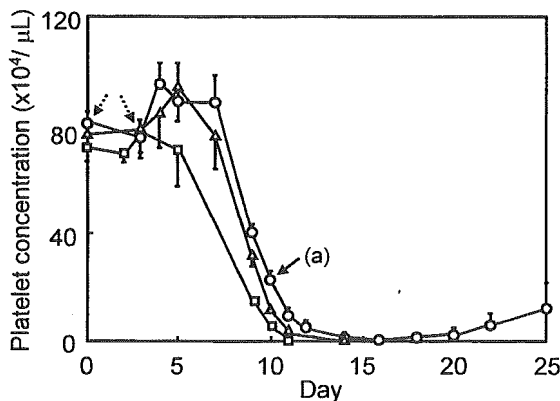


Fig. 2 Effects of busulphan on rats. Rats (230-230g) were injected with busulphan at a total dose of 20 mg/kg (○), 30mg/kg(△), 40mg/kg (□). Arrows were injection points of busulphan.

また、ブスルファン投与10日目では、ブスルファン未投与群(Table 2)と比較して白血球の減少が若干見られたものの、体重は増加し、赤血球、ヘマトクリット(HCT)は維持されていた(Table 3)。従って、ブスルファン投与量20 mg/kgが最適であると判断し、投与後10日目を血小板減少

症モデルラットとして採用した。

Table 2 Change of weight and blood cells for normal rats (N=6).

	Day	
	0	10
Weight (g)	251 ± 8	304 ± 15
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	702 ± 12	716 ± 30
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	156 ± 24	127 ± 28
HCT (%)	42.8 ± 1.6	43.0 ± 2.1

Table 3 Change of weight and blood cells before and after busulphan injection (N=6).

	Day	
	0	10
Weight (g)	258 ± 10	288 ± 12
RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	728 ± 15	700 ± 23
WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	127 ± 15	73 ± 8
HCT (%)	47.6 ± 1.5	45.2 ± 2.3

生理食塩水を投与した血小板減少症モデルラット群([血小板]= $19.8 \pm 2.8/\mu\text{L}$)の出血時間は 609 ± 153 秒であり、正常ラット群([血小板]= $80.9 \pm 8.6/\mu\text{L}$)の出血時間(178 ± 56 秒)と比較して約3.4倍延長した(Fig. 3)。また polyAlb を40 mg/kg 投与したところ、出血時間は著しく短縮し(184 ± 69 秒)、投与量の減少に伴いその効果は減少した。従って polyAlb 自体でも止血効果を有することが示唆された。今回は、出血時間に影響しない polyAlb の投与量(4 mg/kg)にて H12-polyAlb の止血能を検討した。

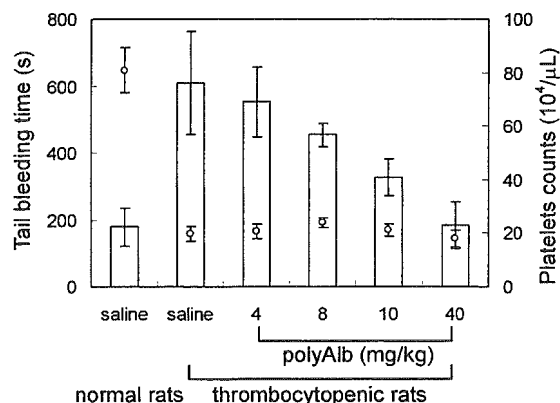


Fig. 3 Effects of the administration of polyAlb on the tail bleeding time.

H12-polyAlb の投与では、出血時間 352 ± 73 秒となり出血時間は半分に短縮した(Fig. 4)。逆配列 H12 を結合させた

polyAlb(rH12-polyAlb)では出血時間を短縮させないことも確認できた。以上、H12-polyAlb は H12 による止血能を有する微粒子であることが証明できた。

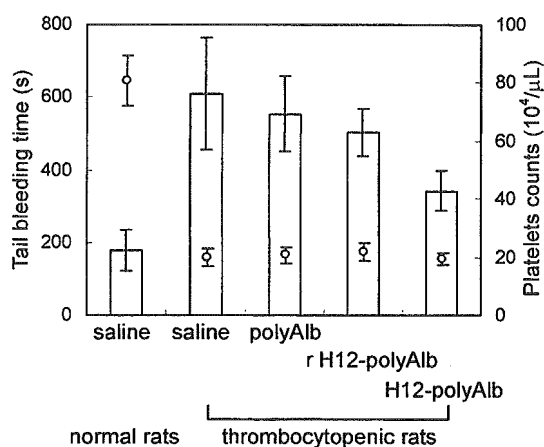


Fig. 4 Effects of the administration of H12-polyAlb on the tail bleeding time.

さらに、検体投与 5 分前、投与 30 分後に採血し、各血球変動を観察したところ、各検体投与前後における血球変動は生じていないことから、H12-polyAlb は血液適合性の高い微粒子系と思われた (Table 4)。

Table 4 Platelets, white blood cells, and red blood cells counts before and after sample injection.

Platelets	sample injection (x10 ⁴ /μL)	
	before	after
saline	80.9 ± 8.6	78.5 ± 14.2
saline	19.8 ± 2.8	19.6 ± 1.9
polyAlb	20.7 ± 2.8	20.3 ± 2.5
H12-polyAlb	19.8 ± 2.1	20.0 ± 4.2

WBC	sample injection (x10 ² /μL)	
	before	after
saline	115.3 ± 25.3	100.0 ± 14.0
saline	53.6 ± 12.1	48.4 ± 11.8
polyAlb	60.7 ± 10.2	50.1 ± 9.3
H12-polyAlb	64.9 ± 11.4	54.4 ± 11.0

RBC	sample injection (x10 ⁴ /μL)	
	before	after
saline	605.0 ± 47.4	613.7 ± 47.7
saline	665.2 ± 39.3	662.0 ± 93.0
polyAlb	663.5 ± 12.7	677.0 ± 25.1
H12-polyAlb	689.5 ± 23.5	676.2 ± 41.1

2. H12-PEG(PEG)小胞体の機能評価

2.1. 凝集計による機能評価

PEG 小胞体を添加した場合と比較して、同濃度の H12-PEG(PEG)小胞体を添加した場合の透過度の差を測定した。H12-PEG 脂質がモル比 0.002, 0.004, 0.006 (0.1mol%, 0.2mol%, 0.3mol%)を含む小胞体いずれにおいても血小板凝集の促進が認められ、小胞体への H12 結合量が増加するほど凝集を促進していた (Fig. 5)。これは表面上で H12-PEG 脂質修飾量の多いほうが、血小板結合部位との接触点が多いためと考えられる。

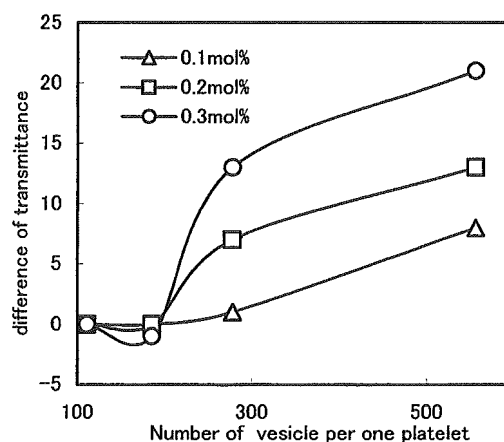


Fig. 5 Enhancement of platelet aggregation by H12-PEG(PEG)vesicles.

2.2. 流動下における機能評価

血小板減少血液 ([血小板]=5.0×10⁴/μL) に、H12-PEG 小胞体 ([H12-PEG 脂質]=0.3mol%) を添加しコラーゲン基板上に流動させたところ、H12-PEG 小胞体添加系は PEG-小胞体添加系と比較して血小板粘着占有率が增大した (Table 5)。これは、まず血小板がコラーゲン基板上に粘着し、活性化した血小板に H12-PEG 小胞体が結合してそれを介してさらに血小板が結合したためと考えられる。次に、H12-PEG(PEG)小胞体について、同条件にて基板上を流動させたところ、同様に血小板粘着占有率の増大が認められた (Table 5)。これにより、血中滞留性向上のために小胞体表面へ PEG 鎖を導入しても、H12 の認識反応は阻害されないことが明らかとなった。