

2.6. 血中滞留時間測定

2.5.の方法で作製した血小板減少ラットに対して、FITC 標識 H12-PEG-polyAlb を投与し([rHSA] = 40 mg/kg)、経時採血した。遠心分離 (12000 rpm, 5 min)にて血球成分を除去後、0.1N NaOH 添加により可溶化させ(rt., 20min)、蛍光測定により血中半減期($T_{1/2}$)を算出した。

3. 研究結果及び考察

3.1. H12-PEG-polyAlb の合成

polyAlb(粒径 200 ± 80 nm)に対する MALPEG、mPEG、H12 導入量は、HPLC より各未導入成分の面積比から逆算した。まず、polyAlb([rHSA]=10 mg/mL, (150 μ M))表面上の rHSA に対して分子量 3.4 kDa の MALPEG-NHS(3.2 倍モル)をそれぞれ添加し、polyAlb1 粒子あたり約 1.2×10^4 分子結合させた。MALPEG-polyAlb([rHSA]=10 mg/mL)表面上に分子量 5.0 kDa の mPEG-NHS(5、20、30、50 倍モル)を添加したところ、mPEG はそれぞれ1 粒子あたり 1.3、5.2、7.8、 11.2×10^4 分子結合した(Fig. 1 ●)。

他方、polyAlb([rHSA]=10 mg/mL)に対して分子量 5.0 kDa の MALPEG-NHS(3.2 倍モル)を添加し、polyAlb1 粒子あたり 1.2×10^4 分子結合させた。MALPEG-polyAlb([rHSA]=10 mg/mL)に mPEG-NHS(5、20、30、50 倍モル)を添加したところ、mPEG はそれぞれ1 粒子あたり 2.6、5.2、6.1、 6.0×10^4 分子結合した計算となり、30 倍モル以上では飽和に達した(Fig. 1 ○)。

これは MALPEG の分子量増大に伴

い、polyAlb 表面上での排除体積も増大したため、後導入する mPEG の導入量が減少したためと考えられる。

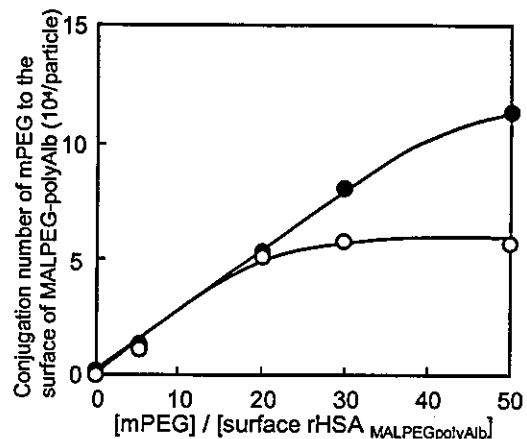


Fig. 1 Conjugation number of mPEG to the MALPEG-polyAlb. Mw of MALPEG; (●) 3.4 kDa, (○) 5.0 kDa.

3.2. 血小板凝集計による H12 の機能保持評価および血中滞留時間測定

MALPEG(Mw: 3.4 kDa)の時、mPEG 修飾量の増大と共に $T_{1/2}$ は増大し、最大修飾時には約 150 min まで延長した。また、 $T_{1/2}$ は PEG 未修飾体(約 10 分)と比較して約 15 倍延長した(Fig. 2 ○)。一方、H12 の血小板凝集促進能は、polyAlb1 粒子あたりの mPEG 修飾量が 5.2×10^4 分子までは保持されたが、さらに修飾量を増大させると急激な機能低下が起こった(Fig. 2 ●)。

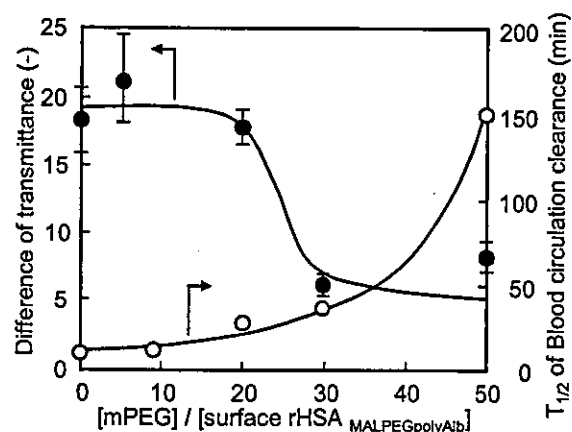


Fig. 2 Blood circulation clearance (○) and enhancement of platelet aggregation (●) of various H12-PEG-polyAlb. Mw of MALPEG: 3.4 kDa.

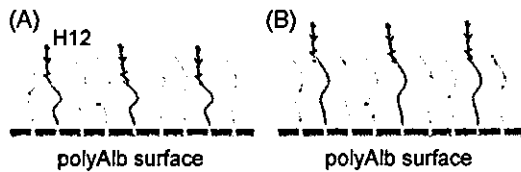


Fig. 3 Schematic images of PEG chains with increasing the number of mPEG: 5.0 kDa. MALPEG: (A) 3.4 kDa, (B) 5.0 kDa.

これは、mPEG 修飾量に伴い PEG 鎖がマッシュルーム構造からブラッシュ構造に遷移し、分子量 3.4 kDa の MALPEG に結合した H12 が埋没したためと考えられる (Fig. 3 (A))。

他方、MALPEG(Mw: 5.0 kDa)の時は、mPEG 最大修飾量でも H12 の機能は維持され(Fig. 3 ●)、そのときの $T_{1/2}$ は約 180 分まで延長した(Fig. 3 ○)。これは、MALPEG と mPEG の鎖長を揃えたため、ブラッシュ構造でも H12 が表出していると考えられる(Fig. 4 (B))。

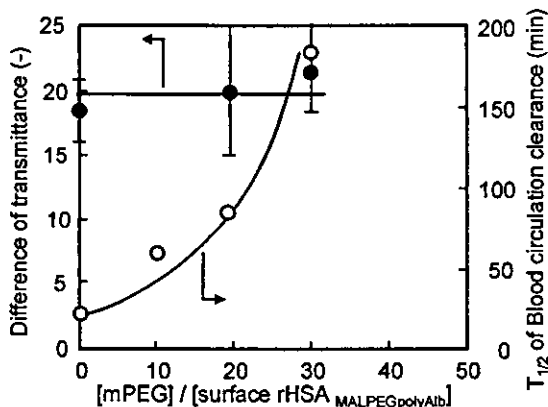


Fig. 4 Blood circulation clearance (○) and enhancement of platelet aggregation (●) of various H12-PEG-polyAlb. Mw of MALPEG: 5.0 kDa.

3.3. 流動下における H12-PEG-vesicle の機能評価

洗浄血液(Hct 50 %, [PLT] = 5×10^3 / μ L) に DiOC₁₈ 標識 H12-PEG-vesicle(f.c.[lipid] = 0.89 M)を添加し、活性化血小板基板上を流動させたところ

(150 s⁻¹)、基板に一様に粘着し、抗 GPIIb/IIIa 抗体(PAC-1)存在下ではその粘着が抑制された。また H12 未結合体では粘着しなかったことから、H12-PEG-vesicle は活性化血小板上の GPIIb/IIIa と特異的に相互作用していることが確認された(Fig. 5)。

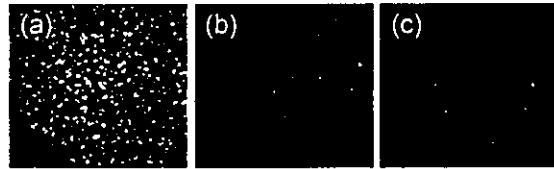


Fig. 5 Specific adhesion of H12-PEG-vesicle in the reconstituted blood (Hct. 50 %, platelet counts = $5.0 \pm 2.0 \times 10^3$ / μ L) to platelets activated on the collagen surface at a shear rate of 150 s⁻¹. (a) H12-PEG-vesicle, (b) H12-PEG-vesicle in the presence of PAC-1, (c) PEG-vesicle. (a)-(c) images were obtained after blood was circulated for 500 s. ([lipid] = 0.89 M).

血小板減少血液([PLT] = 5.0×10^4 / μ L)に、H12-PEG-vesicle ([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-小胞体添加系や PBS 対照群と比較して血小板粘着占有率が著増した(Fig. 6)。これは、まず血小板がコラーゲン基板に粘着し、活性化した血小板に H12-PEG 小胞体が結合し、これが残存血小板をリクルートして凝集塊形成が促進されたためと考えられる。これにより、小胞体表面へ PEG 鎖を導入しても、H12 の認識反応は阻害せずに血中滞留時間の向上を付与できることが明らかとなった。

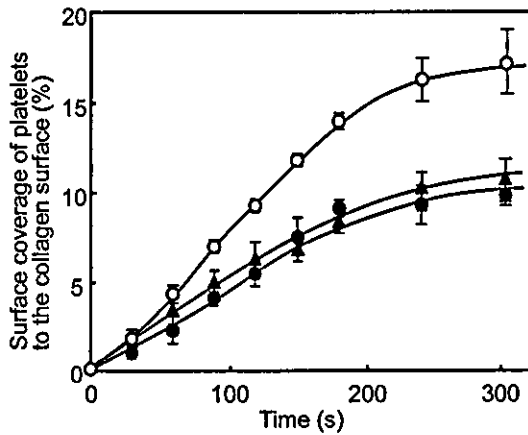


Fig. 6 Time course studies of surface coverage of platelets in the thrombocytopenic-imitation blood to the collagen surface after addition of (○) H12-PEG-vesicle, (●) PEG-vesicle, and (▲) PBS.

そこで、H12 の修飾率の異なる H12-PEG-vesicle を同条件にて基板上を流動させた(Fig. 7)。H12-PEG 脂質導入率が 0.1mol%以下では血小板粘着占有率が PEG-vesicle とほぼ同等であり、修飾率 0.3mol%以上でその効果が顕著であった。これは、コラーゲンにて活性化した血小板への H12-PEG(PEG) 小胞体の粘着数が H12-PEG 脂質の修飾量に伴って増加したためと考えられた。以上より、出血部位において H12-PEG-vesicle は血小板凝集を補強する効果があり、H12-PEG 脂質の導入率が 0.3 mol%で充分であると判断した。

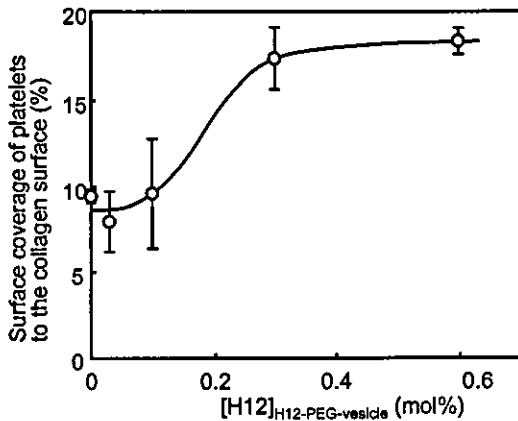


Fig. 7 Comparison between surface coverage of platelets and modification ratio of H12 on the surface of vesicle. (shear rate: 150 s^{-1} , [platelets] = $5.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$, [lipid] = 0.89 M, N = 3). The surface coverage was measured after 300 s.

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 618 ± 56 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. 8)。そこで、H12-PEG-vesicle を 10、30、40 mg/kg の濃度(脂質換算)で投与したところ、出血時間はそれぞれ 573 ± 127 、 441 ± 66 、 335 ± 96 秒であり、投与量依存的に出血時間が短縮し、正常ラットの出血時間に匹敵した。

以上より、H12-PEG-vesicle は止血能を有する微粒子であることが完証できた。

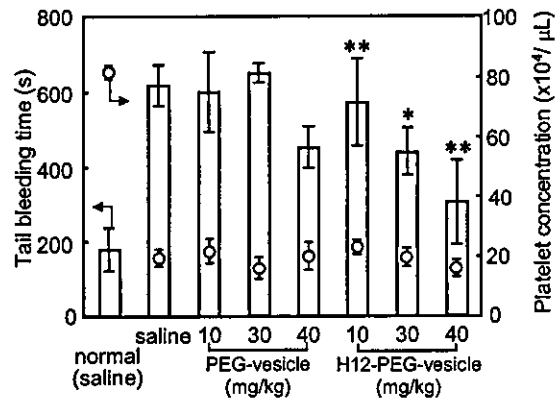


Fig. 8 Effects of the administration of H12-PEG-vesicles on tail bleeding time (white bars). The administered amount of H12-PEG-vesicles was 10, 30, 40 mg/kg equivalent of lipid. ○; platelet concentration in the rats (N = 6-10). *P < 0.05 or **not significant for H12-PEG-vesicles vs. PEG-vesicles group at the same dose.

現在、H12-PEG-polyAlb との比較により担体の相違による止血効果を検討する予定である。

4. 結論

1) 分子量 5.0 kDa の MALPEG 鎖に H12 を結合させた H12-PEG-polyAlb は、mPEG 導入量に依存することなく、血

血小板凝集能を持続した。

2) PEG 修飾型の血中滞留時間は、PEG 未修飾体型に比べて、最大約 20 倍延長した。

3) 流動下において、H12-PEG-vesicle は、活性化血小板に特異的に結合した。

4) H12-PEG-vesicle は、血小板減少状態下でも血小板粘着を増幅させた。その凝集促進能は、H12 表面修飾率が 0.3mol% から 0.6mol% ではほとんど変化なかったことから、0.3mol% の修飾率で充分であることが明らかとなった。

5) 血小板減少症モデルラットにて止血能を評価したところ、H12-PEG-vesicle は投与量依存的に出血時間を短縮させた。

5. 健康危険情報

なし

6. 研究発表

6.1. 論文発表

1) Okamura, Y., Takeoka, S., Teramura, Y., Maruyama, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Hemostatic Effects of Fibrinogen- γ Chain Dodecapeptide-Conjugated Polymerized Albumin Particles *in vitro* and *in vivo*, *Transfusion*, in press (2005).

2) Takeoka, S., Okamura, Y., Suzuki, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Cooperative effects of platelets aggregation of platelet substitutes at a high shear rate; mixed system of fibrinogen γ -chain dodecapeptide- or glycoprotein Ib α -conjugated latex beads under flow conditions, *ASAIO Journal*,

to be submitted (2005).

3) Okamura, Y., Maekawa, I., Takeoka, S., Teramura, Y., Maruyama, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide *in vitro* and *in vivo*, *Thromb. Haemast.* to be submitted (2005).

4) 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」, *日本心臓血管麻酔学会誌*, 8 (1), 35-41 (2004).

5) 武岡真司, 岡村陽介「血小板代替物の展開」, *Molecular Medicine*, 41 (12), 1494-1500 (2004).

2. 学会発表

(1) 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「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」, 第 84 回日本化学会春季年会, 2004.3.27. (神戸)

(2) 前川 一平, 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 西出 宏之, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「ドデカペプチド (H12) 結合小胞体による血小板凝集作用」, 第 84 回日本化学会春季年会, 2004.3.27. (神戸)

(3) 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「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」, 第 53 回高分子学会年次大会, 2004.5.26. (神戸)

(4) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「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」, 第 11 回日本血液代替物学会年次大会, 2004.7.14. (札幌)

(5) Okamura, Y., Takeoka, S., Watanabe, N., Suzuki, H., Handa, M., and Ikeda, Y. "Hemostatic Effects of Fibrinogen- γ Chain Dodecapeptide-Conjugates *in vitro* and *in vivo*", Incorporating the 6th UK Platelet Meeting and the 2nd UK/Japanese Platelet Conference, 2004. 9.3. (Oxford)

(6) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. "Recognition Properties of Polymerized Albumin Particles and Phospholipid Vesicles Bearing Recognition Proteins", Incorporating the 6th UK Platelet Meeting and the 2nd UK/Japanese Platelet Conference, 2004. 9.2. (Oxford)

(7) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「ドデカペプチド結合アルブミン重合体の血小板凝集促進効果」, 第 53 回高分子討論会, 2004.9.16. (札幌)

(8) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド担持アルブミン重合体の *in vitro*, *in vivo* 評価」, 第 42 回日本人工臓器学会大会, 2004.10.6. (東京)

(9) 岡村 陽介, 武岡 真司, 土田英俊, 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体の *in vitro*, *in vivo* 評価」, 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 2004.11.19. (奈良)

(10) 前川 一平, 岡村 陽介, 寺村 裕治, 武岡 真司, 土田英俊, 半田 誠, 池田 康夫「ドデカペプチド(H12)結合

小胞体による血小板凝集作用」, 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 2004.11.19. (奈良)

(12) 武岡 真司「機能性分子素子としての人工赤血球・人工血小板の構築」, 第##回顕微鏡学会, 2005.3.5. (東京)

7. 知的所有権の出願・登録なし

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 H12-アルブミン重合体の動態に関する免疫電顕的検討-

分担研究者 鈴木英紀（東京都臨床医学総合研究所 研究員）

研究要旨：本研究では人工血小板の in vitro での機能を把握するために、電子顕微鏡（電顕）を使った超微形態学的解析を行った。すなわち、フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)に対するウサギ抗体を使う免疫電顕法で、H12 結合アルブミン重合体または同ラテックス粒子上の H12 の結合を確認するとともに、これらの凝集系における挙動について検討した。H12-アルブミンは 0.2-0.4 μm の粒子として観察され、免疫電顕法ではその一部に H12 の存在を示す金粒子が分布した。血小板減少症の状態に調整したヒト多血小板血漿に H12-アルブミンまたは同ラテックスを添加し、さらに ADP で刺激すると、コントロールに比較して凝集が促進された。これらの凝集塊はコントロールに比して大きく、その中における血小板は変形度および相互の接着度が強く、さらに放出反応を示す所見が見られた。一部の凝集塊表面および血小板間には H12-アルブミンまたはラテックスが検出された。以上の結果より、これらの人工血小板の一部は血小板間に介在して血小板減少時の凝集を促進させることが示唆された。

A. 研究目的

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)に対する抗体を使う免疫電顕法で H12 結合アルブミン重合体またはラテックス粒子上の H12 の結合を確認し、さらに H12-アルブミン重合体の凝集系における挙動を微細形態的に把握することによって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した。

B. 研究方法

1) ウサギ抗フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)抗体による H12 結合アルブミン重合体およびラテックス粒子の電顕観察

フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)を抗原としてウサギで作製した抗 H12 抗体は、ELISA および Blotting 法により H12 に対して特異性が有り、単一のバンドを形成する結果を得た。また、本抗体はフローサイトメトリー法によりトロンピン刺激血小板に対するフィブリノゲンの結合を抑制しないことを確認した。

本抗体を使って、H12 結合アルブミン重合体

(以下 H12-アルブミン、rHSA 重量 10mg/ml) および H12 結合ラテックス粒子(直径 1 μm)における H12 の分布を免疫電顕法で観察した。すなわち、H12-アルブミンは約 30℃に暖めた 10%ゼラチンと等量に混合し、これらをパラフィン板上に滴下し、4℃で冷却した。アルブミンを含む凝固したゼラチン塊をパラフィン板上から回収し、以下 4℃で PBS で洗浄、1 M ショ糖液中で 1 時間、さらに 2.3 M ショ糖中に一昼夜浸漬した。この試料を液体窒素中で凍結、超マイクロームで凍結超薄切片を作製し、この切片をウサギ抗 H12 抗体で 4℃、16 時間インキュベートし、PBS で洗浄後、さらに金粒子 (10nm) 標識ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベートした。最終的に酢酸ウランで染色して透過型電顕で観察した。また、H12-アルブミンを膜メッシュ上に滴下、余剰分を濾紙で吸い取り、乾燥後、同様に免疫染色し、最終的に 1%酢酸ウランでネガティブ染色して観察した。一方、H12-ラテックスはエッペルフ遠心管中で一次抗体反応後、遠心、PBS 洗浄、さらに金粒子(15nm)標識二次抗体でインキュベ

イトし、蒸留水で遠心洗浄、カバースリップ上に接着させて風乾した。以下、試料に四酸化オスミウムをコーティングし、走査型電顕で観察した。

2) H12-アルブミンまたはH12-ラテックス粒子のADP凝集に対する効果と分布の検討

3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として健康人の肘静脈から採血し、これを遠心して多血小板血漿 (PRP) を得た。 10^5 個/ μl に調製したPRPを凝集計にセットし、そこにH12-アルブミンまたはH12-ラテックス(直径 200 nm)を 0.2 mg/ml を添加し、さらに 5 μM ADP を加えて凝集曲線を観察した。5分後、凝集計のキュベット内に0.2%グルタルアルデヒド-8%パラホルムアルデヒド混合液を等量加えて試料を固定した。遠心後、ペレットをPBSで洗浄し、以下1)と同様に凍結超薄切片用の試料作りをし、切片を抗H12抗体、さらに金粒子(10nm)標識二次抗体でインキュベートして透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

1) ウサギ抗フィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)抗体によるH12結合アルブミン重合体およびラテックス粒子の電顕観察

凍結超薄切片法で観察したH12-アルブミンの大部分は、繊維成分から成る直径0.2~0.4 μm の塊状に観察された(図1)。H12の存在を示す金粒子は、決して多くはないが、アルブミン重合体を形成する繊維上に分布した。



図1. 凍結超薄切片法によるH12-アルブミンにおけるH12の分布

アルブミンは糸くず状に観察される。H12の存在を示す金粒子はアルブミン重合体の一部に分布する(矢印)。

ネガティブ染色法で観察したH12-アルブミンは、凍結超薄切片法のものと同様な形態を示したが、細繊維から成る構造はより鮮明に観察された(図2)。H12は繊維成分の一部で検出された。しかし、このH12-アルブミンをウサギ抗フィブリノゲン抗体でインキュベートした時、金粒子は全く分布しなかった。

2



図2. ネガティブ染色法によるH12-アルブミンにおけるH12の分布

アルブミンの繊維構造は白く抜け、バックが高コントラストに観察される。繊維構造の一部にH12の金粒子が分布する(矢印)。

一方、H12-ラテックス上は直径ほぼ1 μm の粒子として観察され、その表面は滑らかなであった(図3)。H12はその密度は高くないものの、ラテックス表面でほぼ均等に分布していた。

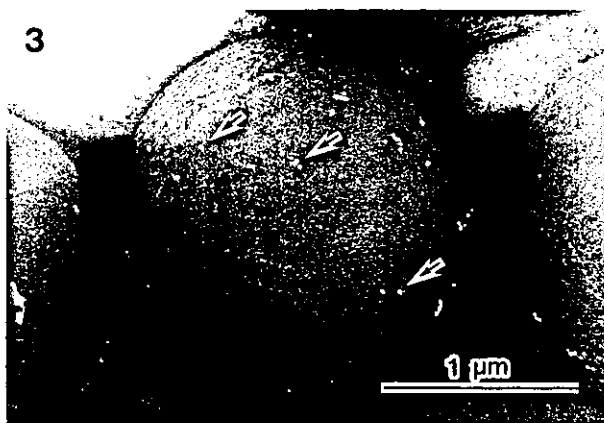


図3. H12-ラテックスにおけるH12の分布

直径約1 μm のラテックス粒子は滑らかな表面を示す。H12の存在を示す金粒子がラテックス表面に分布する(矢印)。

2) H12-アルブミンまたはH12-ラテックスのADP凝集に対する効果と分布の検討

コントロールのアルブミンまたはラテックスの添加では、ADP 添加1分以降に凝集が解離する曲線を示した。ADP 添加5分後の試料を電顕で観察すると、血小板は変形しているものの、血小板相互の接着は粗で小凝集塊が形成されているに過ぎなかった(図4)。これらの血小板のほとんどの細胞質には顆粒が残存していた。

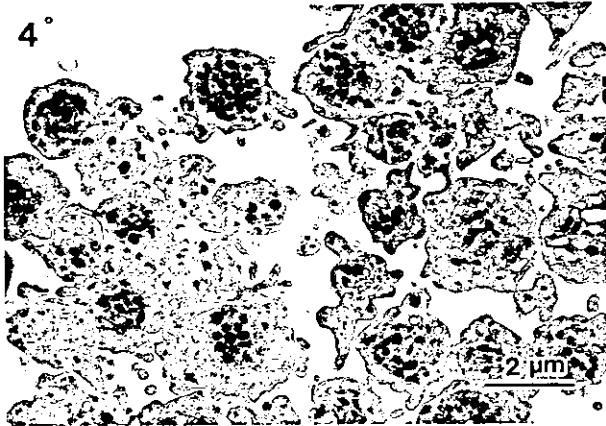


図4. Control-アルブミン添加時のADP凝集像
PRPにControl-アルブミンを加え、さらにADPを添加して5分後に固定した。血小板相互の接着は粗で、血小板顆粒が残存している。

一方、H12-アルブミンまたは同ラテックス粒子を添加したADP凝集は、約2分で平衡に達して解離の無い曲線を描き、凝集を促進させた。電顕で観察すると、ADP凝集像はコントロールに比してその塊が大きく、血小板の変形度および相互の接着度が強く、さらに顆粒が消失して放出反応を示す所見が見られた(図5)。



図5. H12-アルブミン添加時のADP凝集像
PRPにH12-アルブミンを加え、さらにADPを添加し、5分後に固定した。大きな凝集塊が形成され、血小板相互の変形、接着度は強く、顆粒はほとんど消失している。

抗H12抗体を使う免疫電顕法では、まず無刺激血小板でH12の分布を確認したところ、H12の存在を示す金粒子は α 顆粒膜上および開放小管系の膜上に僅かに検出された(図6)。しかし、コントロールとして抗フィブリノゲン抗体を使用した結果と比較すると、 α 顆粒中におけるH12の分布は決して多くはなかった。

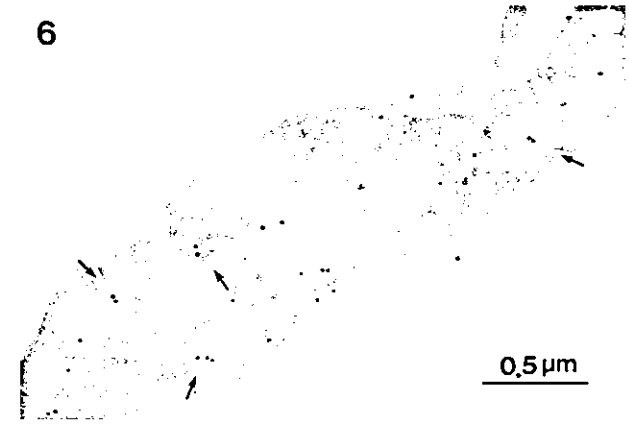


図6. 無刺激血小板におけるH12の分布
H12の存在を示す金粒子は円盤状血小板の α 顆粒膜上および開放小管系の膜上に分布する(矢印)。

H12-アルブミンを添加したADP凝集時のH12の分布を免疫電顕法で観察すると、一部の凝集塊表面および血小板間に存在し、電子密度のある不定形物質に一致して検出された(図7)。この分布はほとんどの血小板間で検出されるフィブリノゲンとは異なっていた。

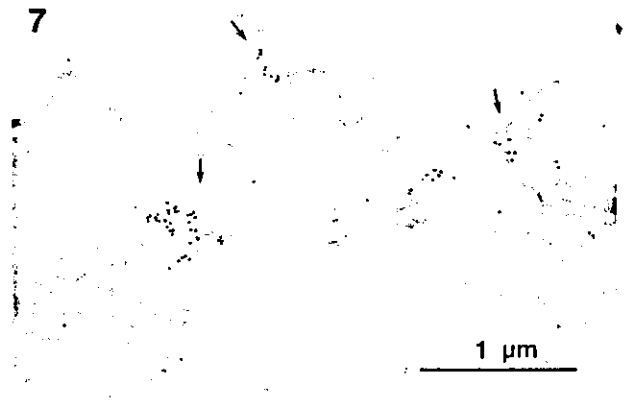


図7. H12-アルブミンを添加したADP凝集時のH12の分布を示す免疫電顕像
H12の存在を示す金粒子は、一部の凝集塊表面および血小板間に分布している(矢印)。

一方、H12-ラテックス添加時のADP凝集を

免疫電顕法で観察すると、いくつかのラテックス粒子が凝集している血小板間に観察された。さらに、そのラテックスの表面には H12 の金粒子が分布していた (図 8)。

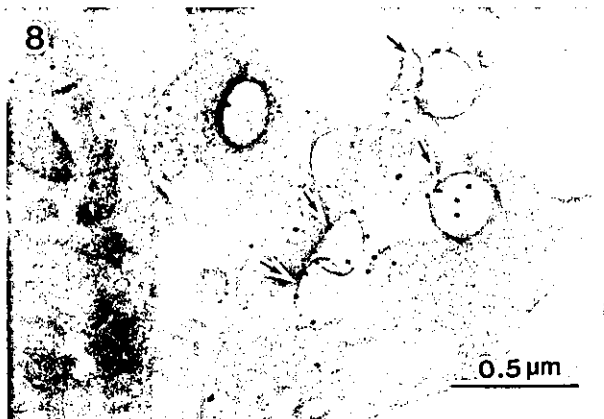


図 8. H12-ラテックスを添加した ADP 凝集時の H12 の分布を示す免疫電顕像

直径 200 nm のラテックス粒子は血小板間に数個存在している(矢印)。ラテックスの表面には H12 の存在を示す金粒子が検出される。

D. 考察

血小板凝集機能を補助する人工血小板の開発において、活性化血小板の表面に発現している GPIIb/IIIa を認識するフィブリノゲン鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)を結合させた担体は、血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進させることを形態学的にも確認した(平成 15 年度厚生科学研究費補助金 分担研究報告書)。H12 結合担体は活性化血小板の GPIIb/IIIa に結合し、血小板相互を接着させることによって凝集を促進させると予想される。しかし、H12 を識別できるツールが無かったために、そのメカニズムは必ずしも明らかではない。そこで、H12 に対するウサギ抗体を作製し、本抗体を使う免疫電顕法で H12 結合担体の凝集における挙動を検討した。

抗 H12 抗体は H12 結合担体の H12 を認識するか否か確認するために、H12-アルブミンの凍結超薄切片またはネガティブ染色用の試料を本抗体でインキュベートしたところ、アルブミンの糸くず状構造の一部に H12 の存在を示す金粒子が分布した(図 1, 2)。また、H12 を結合させたラテックス粒子でも H12 の金粒子が検出された(図 3)。これらの結果から、抗

H12 抗体は H12 結合担体の H12 部分を認識することを確認した。

次いで、本抗体を用いて凝集における H12 結合担体の挙動を検討した。すなわち、血小板減少症を想定し、10 万個/μl に調整したヒト多血小板血漿(PRP)に H12-アルブミンまたは同ラテックスを添加し、さらに ADP を加えて惹起される凝集での H12 の分布を抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で検討した。H12 結合担体を添加した ADP 凝集では、コントロールに比較して凝集が促進され、大きな凝集塊が形成された。その中の血小板は変形度および相互の接着度が強く、さらに放出反応を示す所見が見られた。一部の凝集塊表面および血小板間には H12-アルブミンまたはラテックスが検出された。一方、コントロール実験でのフィブリノゲンは ADP 凝集塊の全ての血小板間に存在した。すなわち、血小板を相互に接着させる H12 の能力はフィブリノゲン程ではないと考えられるが、少なくとも人工血小板としての H12 結合担体の一部は、血小板間に介在して血小板減少時の凝集を促進させることが示唆された。

E. 結論

H12 を結合させたアルブミンまたはラテックスは、血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進させ、血小板の代潜物として有効に機能すること示してきた。今回の検討ではそのメカニズムを抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で検討した。H12-アルブミンまたは同ラテックスは ADP 凝集塊の一部の表面および血小板間には検出されたことから、これらの人工血小板は血小板減少時でも血小板間に介在して、凝集を促進させることが示唆された。

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

厚生労働省科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

「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」班

2004 年度分担研究報告書

「止血機能の増強と血栓性の亢進におよぼす人工血小板の添加による効果を、*ex vivo, in vitro* の実験的研究により如何に評価するか？」

分担研究者 後藤信哉 (東海大学医学部内科学系助教授)
研究協力者 石田英之 (東海大学医学部基礎医学系助教授)
田村典子 (東海大学医学部内科学系特定研究員)

《研究要旨》血管の損傷部位における止血のメカニズムと、動脈硬化巣の破綻部位における病的血栓の形成メカニズムは酷似している。Native 血小板の量的、質的異常による止血機能の障害を回復させることを目的として人工血小板を投与した場合であっても、止血機能の回復とともに病的血栓の形成が促進されるおそれがある。本来、止血機能、血栓リスクは人体に投与したのちの出血、血栓症の発症におよぼす効果により臨床的に評価すべきであるが、臨床的評価は費用と時間の点から人工血小板開発段階のスクリーング法としては適当でない。また、出血時間、各種血小板、凝固止血機能検査も臨床的な出血、血栓リスクの評価における限界が指摘されている。われわれは、止血血栓と病的血栓の質的相違に着目して人工血小板の止血機能に及ぼす効果、血栓性合併症発症リスクの増加に及ぼす効果を別個に調べる *ex vivo* の評価系を開発した。本法を用いて認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体による止血能増強効果、血栓性合併症発症増加効果を検討した。止血能を選択的に増強させるためにはコラーゲン受容体担持アルブミン重合体の意義が大であることを示した。von Willebrand 因子を担持させた場合には multimer サイズの小さいものが有用となることを示した。

1. 研究目的

血管の損傷部位における止血のメカニズムと、動脈硬化巣の破綻部位に

おける病的血栓の形成メカニズムは酷似している。止血機能の増強の目的で投与した人工血小板が病的血栓の

形成を促進させる可能性は高い。費用と時間のかかる動物実験、臨床試験を施行する前に人工血小板による止血機能の増強と病的血栓形成促進をスクリーニングするシステムが必須である。

血管内腔を閉塞する、あるいは多数の末梢血栓を惹起することにより臓器虚血を惹起することが病的血栓の病的であるゆえんであると考えれば、血管内腔方向への3次元成長の促進は病的血栓の発症につながる。一方、損傷部位を単層の血小板で覆うことにより一時的な止血が可能であることから血管壁損傷部位を広く覆う血栓の2次元成長は止血に好ましいと想定される。血小板数を減少させた再構成血液に人工血小板の候補を加えてコラーゲン上を灌流し、コラーゲン上の血小板血栓の2次元成長を計測することにより人工血小板の止血機能を、血小板数を減少させない血液に人工血小板候補を加えてコラーゲン上を灌流した時にコラーゲン上に形成される血栓の3次元成長を評価することにより人工血小板による血栓性の亢進を評価する方法を考案した。本法により血小板膜蛋白、血小板膜蛋白と結合する血漿リガンド蛋白を結合させたアルブミン重合体の止血能、血栓性亢進機能を推定した。

2. 研究方法。

健康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。再構成血液中の血小板数は $10,000/\mu\text{l}$ 以下となるように調整した。また、一部の血液サンプルは抗凝固処理をしたのち血小板数を減少させずにそのまま使用した。

再構成血液、全血中の血小板をメパクリンにて蛍光標識した。赤血球の存在下でも血栓の蛍光イメージングを可能とした。人工血小板の候補として、1) von Willebrand 因子結合アルブミン重合体、2) GPIIb/IIIa 結合アルブミン重合体、3) GPIIb/IIIa 結合アルブミン重合体、4) fibrinogen dodecapeptide (H12) 結合アルブミン重合体、を用いた。 $1,500\text{ s}^{-1}$ のずり速度の条件で6分間灌流した。コラーゲン上の血小板血栓の2次元成長を蛍光顕微鏡により評価した。また、血栓の3次元成長を、高速レーザー共焦点顕微鏡を用いた3次元イメージング法により検討した。

von Willebrand 因子の止血と血栓性におよぼす multimer の役割を評価す

るために、von Willebrand 因子 multimer を分解する作用を有する ADAMTS13 (図 1) の効果を見当した。

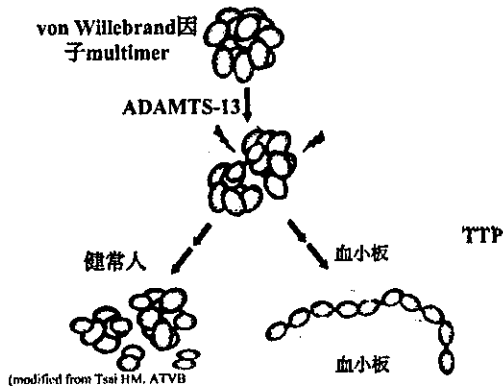


図 1. ADAMTS13 による von Willebrand 因子の分解

ADAMTS13 を作用させ multimer サイズを小さくした von Willebrand 因子の存在下における血小板血栓の 2 次元、3 次元成長を蛍光顕微鏡、レーザー共焦点顕微鏡 3 次元投影法で評価した。

(倫理面への配慮)

本研究では、健常人より採取した血液サンプルを実験に利用する。倫理的問題を惹起させないために、採血対象者には、採血に伴う合併症の可能性を含めて、事前に十分な説明を行い書面によるインフォームドコンセントを取得した。本研究への参加を拒絶しても何らの不利益を被らないこと、一度、研究参加に同視しても、その後いつでも同意の取り消しが可能であること、

なども含めて説明し倫理面に配慮した。

3. 研究結果

FITC にて蛍光標識した von Willebrand 因子結合アルブミン重合体を、非標識血小板を含む全血に混入してコラーゲン上を灌流した時の結果を図 2 に示した。時間経過とともにコラーゲン上に不均一に集積することがわかる。

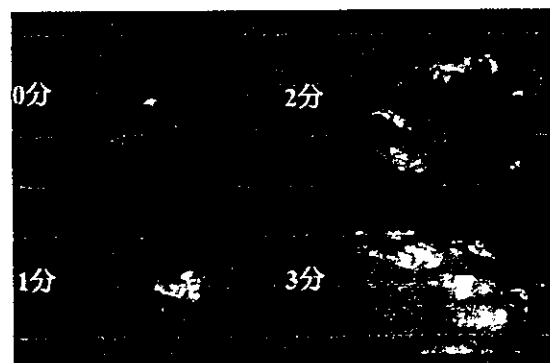


図 2. Von Willebrand 因子結合アルブミン重合体の集積 ($1,500 \text{ s}^{-1}$)

レーザー共焦点顕微鏡 3 次元投影法を用いると、von Willebrand 因子結合アルブミンは、血小板血栓の 2 次元成長よりも、血管内腔方向への 3 次元成長をより選択的に促進させることがわかる (図 3)。

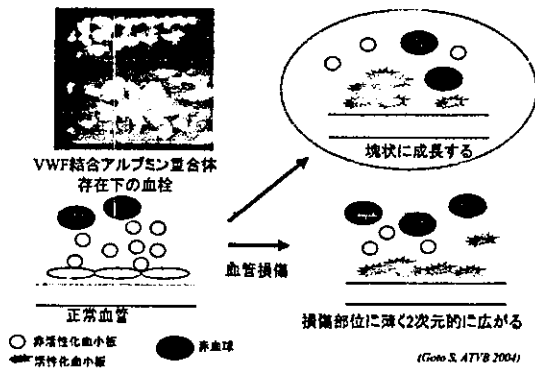
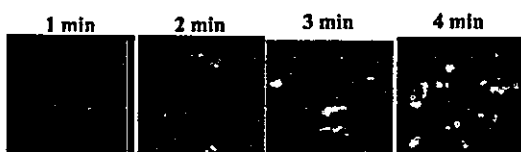


図 3. 血管壁損傷部位における血小板血栓の2次元成長と3次元成長

ADAMTS13 を作用させ、von Willebrand 因子の multimer サイズを小さくすると血栓の3次元成長は阻害され、2次元成長はむしろ促進された。von Willebrand 因子を止血増強に使用する時には multimer サイズの小さな分子を選択することにより血栓性合併症を増加させないことが示唆された。

無添加



ADAMTS13添加後1時間反

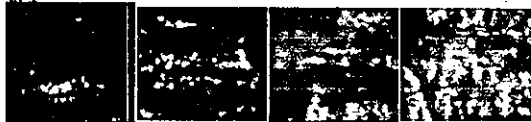


図 4. ADAMTS13 を作用させた前後の血小板血栓の2次元成長様式

サイズの異なるアルブミン重合体に GPIb α , GPIIb/IIIa を結合させ、再構成

血に混和してコラーゲン上に灌流した時の血小板血栓によるコラーゲン被覆率を図5に示した。コラーゲン受容体である GPIa/IIa を結合したアルブミン重合体が最も効率的に血栓の2次元成長を促進させることが示唆された。

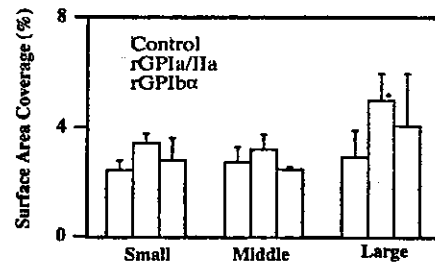


図 5. GPIb α , GPIIb/IIIa 結合アルブミン重合体によるコラーゲン被覆率の差異

4. 考察

各種血小板膜蛋白、血漿リガンドを結合させたアルブミン重合体を人工血小板候補として、コラーゲン上の血栓の2次元成長、血管内腔方向への3次元成長に及ぼす効果を比較検討した。von Willebrand 因子を結合させたアルブミン重合体は局所に集積して血栓の高さ方向の成長を促進効果が強かった。von Willebrand 因子を人工血小板として使用するには multimer サイズを小さくする必要があると思われた。

血小板膜蛋白としては GPIb α 結合

アルブミン重合体は von Willebrand 因子結合アルブミン重合体同様血栓の 3 次元的成長を促進する効果が強かった。コラーゲン受容体である GPIa/IIa を結合させたアルブミン重合体の方が血栓性合併症の発症は少ないと想定された。H12 結合アルブミン重合体も血栓の 2 次元的成長を促進させ人工血小板としては好ましいと思われた。

5. 結論

- 1) 止血増強効果と血栓性増強効果を別個に評価する *ex vivo* 評価システムを開発した。
- 2) 本評価システムを用いる限り、von Willebrand 因子アルブミン重合体は止血機能の増強効果よりも血栓性増加効果が大きいことが示唆された。H12 結合アルブミンは血栓の 2 次元的成長を促進する効果が強く人工血小板に適すると思われた。
- 3) 血小板膜糖蛋白としては von Willebrand 因子受容体である GPIb α を結合させたアルブミン重合体よりも、コラーゲン受容体である GPIa/IIa を結合させたアルブミン重合体の方が効率的な人工血小板となり得ることが示唆された。

6. 健康危険情報

特になし。

7. 研究発表

1. 論文発表。
 1. Goto S. Understanding the mechanism and prevention of arterial occlusive thrombus formation by anti-platelet agents. *Current Medicinal Chemistry* 2004;2:149-156
 2. Goto S. Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Current Vascular Pharmacology* 2003;2:23-32
 3. Hagiwara 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. *Journal of Immunology* 172: 5297-5303, 2004.
 4. Goto S, Tamura N, and Ishida H. Ability of Anti-GP IIb/IIIa Agents to Dissolve Platelet Thrombi Formed on a Collagen Surface under Blood Flow Conditions. *J Am Coll Cardiol*,44:316-323, 2004
 5. Goto S. Propagation of Arterial Thrombi Local and Remote Contributory Factors Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2004;24:2207-2208

2. 論文発表

H. 知的財産権の出願、登録

1. 特許取得

1. 特願 2003-39230: 発明人: 後藤信哉、石田英之 (70%: 30%)、出願人: 東海大学: 題名: 血栓生成過程観測装置及び血栓生成過程観測方法. 2003年2月20日出願
2. 特願 2003-122251: 発明人: 後藤信哉、出願人: 東海大学、題名: 抗血栓薬、課題: 心筋梗塞、脳梗塞などの発生を予防するのに有効な血清コレステロール低下剤の提供. 2003年4月25日出願

リポソームの微小循環系内挙動

分担研究者 末松 誠 (慶應義塾大学・医学部・医化学教室教授)
研究協力者 梶村 眞弓 (慶應義塾大学・医学部・医化学教室助手)

研究要旨

本研究班で作製された polyethyleneglycol (PEG) modified liposome (net surface charge; negative, particle size; 260 nm) の担体としての生体適合性及び有用性を検証した。特に、血管損傷部位での本粒子の挙動を解析するため、3種類の血管障害モデルを構築した。一つ目のモデルとして、nitrogen-dye-laserを用いた focal ablationによりラット腸間膜微小血管に破綻性出血を作製した。この障害部位で形成される血小板血栓周辺での rhodamine 標識-liposome 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 liposome の漏れは基底膜の部分と思われる血管壁に非常に近い外側で、しかも長軸方向には障害部位から左右 50 μm 以内で収束していることが判明した。つまりこれらの liposome は、活性化したラット血小板に集積することなく、ラット血小板の分布とは完全に分離していることが示された。二つ目のモデルとしては、histamine 表面灌流により非出血性・炎症性の障害を誘発した。Histamine 表面灌流により、liposome は血管外に漏出し、約3分後にはピークに達した。この現象は、histamine によって細静脈血管内皮細胞に惹起される gap 形成の time course と一致するものと考えられた。コントロールとして用いた cationic liposome が、非特異的に血管内皮に接着したのに対し、anionic liposome は障害部位に非常に限局して集積することが判明した。三つ目の実験系としてマウス脳梗塞モデルを構築した。脳梗塞を惹起したマウスに anionic liposome を前投与すると、血管内より脳組織に漏出する albumin の量が減少し、liposome 前投与することにより blood brain barrier の dysfunction の度合いを軽減することが示唆された。

A. 研究目的

リポソームは、生体膜の構成成分であるリン脂質を水中に比較的低濃度で分散させた時に形成されるナノサイズの閉鎖小胞体である。本粒子の生体膜類似性ゆえ血液適合性が高く、粒子表面に血小板凝集関連蛋白質を担持させた人工血小板の構築、及び drug

delivery system としての利用を目指した研究が盛んに行われている。しかしながら、本粒子自体の微小循環系内の挙動については不明な点が多い。そこで、部位特異的しかも障害サイズを制御可能な実験系として窒素色素レーザーを用いた障害モデルを構築した。コラーゲン露出型の微小血管障害

を惹起した際に形成される血小板血栓近傍でのポリエチレングリコール鎖修飾型リポソーム (表面負電荷型)

B. 研究方法

B-1. 生体顕微鏡システムと微小循環観察記録システム

Suematsuらの方法に従い (Suematsu M, et al. Lab Invest 1994)、腸間膜微小循環を intravital microscope で観察した。Wistar 系雄性ラット (200

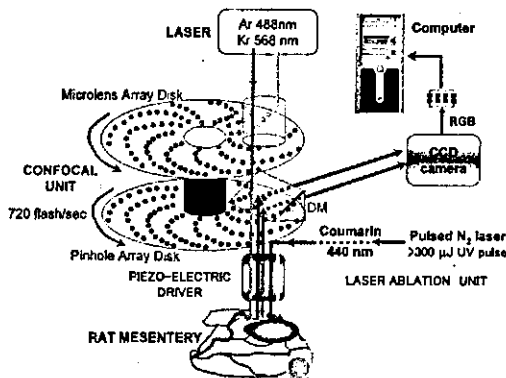


図1. 生体顕微鏡システム

– 250 g) を pentobarbital sodium 50mg/kg 筋肉注射で麻酔し、大腿静脈にカテーテルを挿入し、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) を 1 mg/kg 投与し、体内の血小板を生体染色した。図1にシステムの概要を示す。回盲部腸間膜を腹腔外に展開し、微小循環系を正立型レーザー共焦点顕微鏡 (BX51WI; Olympus, CSU21; Hamamatsu Photonics) で観察した。対物レンズは 40 倍 (LUMPlanFI/IR, NA 0.8) 及び 60 倍水浸 (LUMFL, NA 1.1)

の挙動を *in vivo* で解析することを試みた。

を使用した。三次元構築を目的とし z 軸方向に focal plane を制御するために、対物レンズに piezo actuator (P-721, Physik Instrumente) を装着し LVPZT position servo-controller (PZ73E E-662, Physik Instrumente) により 20 ms 毎に 0.1 micron の精度での制御を可能にした。顕微鏡光路には CFSE 蛍光を画像化する 488nm の argon laser、および rhodamine B を画像化する 568 nm の laser 出力が可能であり、前者の緑色蛍光のみ、あるいは後者の赤色蛍光のみ、さらには両者を同時に撮像し、merge を画像化するフィルターを実装し、自由に切り替えを行った。フィルターなしの状態での透過光線像の取得も可能とした。また、出力を自由に定量的に制御できる nitrogen-dye-laser (Micropoint 社) が実装され、微小血管の任意の場所を顕微鏡画面中央に設置することにより、1 micron の光束で細胞障害を起こすことを可能にした。出力エネルギーを可変することにより、破綻出血を伴う出血 (すなわち基底膜損傷を伴うコラーゲン露出型の微小血管障害) の作成から、数個の赤血球漏出のみで、血小板の一次凝集塊形成を伴わない、junctional leakage のみの血管内皮細胞障害までを作成することができた。

CFSE 標識の血小板および rhodamine

B 標識の liposome の画像を取得するために顕微鏡光路に高感度 3CCD カメラ (JK-TU52H 東芝製) を装着した。CCD カメラからの composite signal を RGB 変換し Meteor II ボードを介してすべて digital 画像として 24-bit の color digital 保存を行った。

Liposome は既報の方法で作成された平均径 263 nm のものを用い、コントロールの微小循環像を記録したのち、liposome suspension を 250 μL / 100 g rat (volume ratio of liposome in the dispersion = 35 %, \therefore サンプル中の liposome 数 (推定) = 4.8×10^{12} 個 mL^{-1}) を注入し、laser ablation 施行前、および施行後 30 分にわたり解析した。

B-2. マウス脳梗塞モデル

Blood brain barrier および neural dysfunction を総括的に評価するため、C57Black/6 マウスを用い脳梗塞モデルを構築した。脳梗塞を惹起するため以下の protocol を施行した。8-11 週齢の雄性 C57Black/6 マウスは alpha-chloralose (60 mg/kg) と urethane (600 mg/kg) で麻酔 (i. p.) し、両側の総頸動脈 (BCCA) を 1 時間 occlusion し脳虚血にした。再灌流開始後すぐに、liposome (5 μL /mg body weight) を静脈より注入した。続いて Evans blue を静脈より注入した。組織での plasma leakage を測定するために modified Miles assay を施行した。Evans blue は血中内で albumin と結合し、free の色素は極僅かにしか存在しない (1 % 以下) ことから

plasma protein marker として使用した。4 時間後、脳、肝臓、腎臓、肺の各組織を摘出し組織中に漏出した albumin-bound Evans blue (macromolecule leakage) 測定し、blood brain barrier および neural dysfunction の指標とした。

B-3. 血管障害部位および血栓の三次元構築

三次元構築を目的とした実験は、リアルタイムで PC のハードディスクに非圧縮記録が可能である high-speed image acquisition software、StreamPix (NorPix 社) を用い data を取得した。取り込んだ画像は、StreamPix、IPLab (Scanalytics, Inc)、VoxBlast (VayTek, Inc) の 3 種の software を併用し三次元構築した。血管障害部位の面積および血栓の体積は、二次元画像の解析データを積算することによって求めた。

C. 研究結果及び考察

C-1. 正常微小循環における liposome 挙動

本実験で用いた CFSE 標識プロトコールは過去の我々の報告にあるように、循環血液中の約 80% の血小板を染色した。Rhodamine B 標識 liposome を注入すると一過性に蛍光が観察視野を通過し、その一部はわずかに細静脈内皮細胞の junction と思われる部位を染色するものの、大部分は血液空間に分布した。この際、CFSE で染色された血小板の色調に変化はなく、緑色に認識できるため、投与した Rhodamine B 標識 liposome は血小板内に取り込

まれる可能性は低いものと考えられた。また Rhodamine B 標識 liposome 投与後に血小板の血管内皮細胞への一過性接着反応に大きな変化は認めなかった。これらの成績は liposome の投与が血小板の挙動に影響を与えないことを示す証左となった。

C-2. Micropoint laser ablation に伴う liposome の挙動

一定のレーザーエネルギー (4-nsec energy pulse の laser を 5 Hz で約 5 秒間照射) により laser ablation を細動脈、細静脈 (径 20-40 μm) において施行した。

図 2 は細動脈における ablation 後の rhodamine B 標識 liposome と CFSE-血小板の挙動を示す。Ablation 後数秒のうちに liposome の血管内からの漏出が確認され、同時に数個の血小板凝集塊が形成された。図 2 で示される Rhodamine 標識蛍光像で明らかに示されるように、liposome は障害近傍の血管内皮の junction から漏出し、拡散せずに基底膜と内皮細胞の境界 (内皮下腔) にとどまり、しかも血管長軸方向に拡散せずに局所に充満し、限局性の蓄積を見せた。これらの所見は本研究で用いた liposome が血管内皮細胞障害部位において特異的に集積し、内皮下腔を充填する可能性を示唆している。

一方血小板は障害点を基点として小凝集塊を形成したが、merge 像に示すように liposome とのオーバーラップはわずかであり、双方の蛍光の重な

りはわずかであった。これは本実験で用いた anionic liposome が血小板との相互作用に依存せずに障害局所に集積したことを示している。同様の Rhodamine B 標識 liposome の挙動は、細静脈における血管内皮細胞を障害

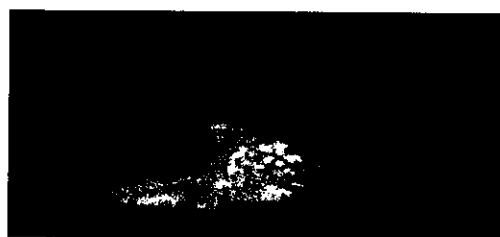


図 2. Laser ablation 後の細動脈内・近傍での liposome・血小板の挙動 Rhodamine 標識 liposome、CFSE 標識血小板。

した場合にも同様であった。ただし、細静脈では血管壁近傍をローリングする白血球に血小板が接着している場合、あるいは liposome が白血球を巻き込んだ血小板凝集塊のなかに一部取り込まれるなどの所見を散見した。

C-3. 血管障害部位および血栓の三次元構築

図 3 にラット腸間膜細静脈壁を laser ablation により障害した際の rhodamine で標識された liposome の集積の三次元構築の結果を示した。2.5 microm の optical sectioning で取得した画像を gray scale に変換し一定の threshold 以上の point を表示した (Panel 1-17)。これらの point の pixel 数を積算し、total injury area を数値化することが可能となった。

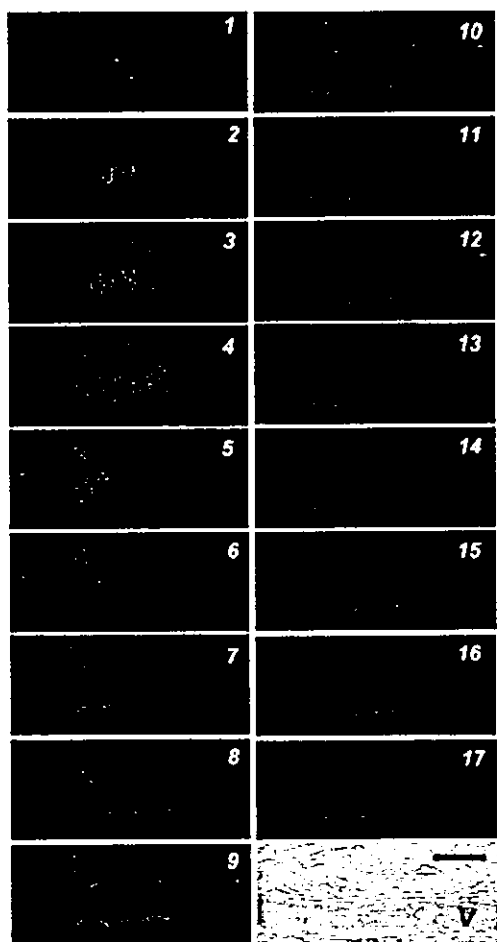


図 3. liposome にコートした rhodamine の蛍光強度を指標とした血管障害部位の三次元構築。Gray level 60 を閾値とし、それ以上の蛍光強度の point を緑でハイライトした (Panel 1-17, optical section の厚さは 2.5 micron)。これらを積算し、total injury area, $6600 \mu\text{m}^2$ を算定した。Scale, 30 micron.

図 4 にラット腸間膜細静脈壁で laser ablation を施行し破綻性出血を起こした後形成された血小板血栓

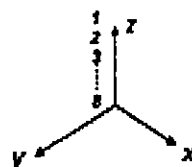
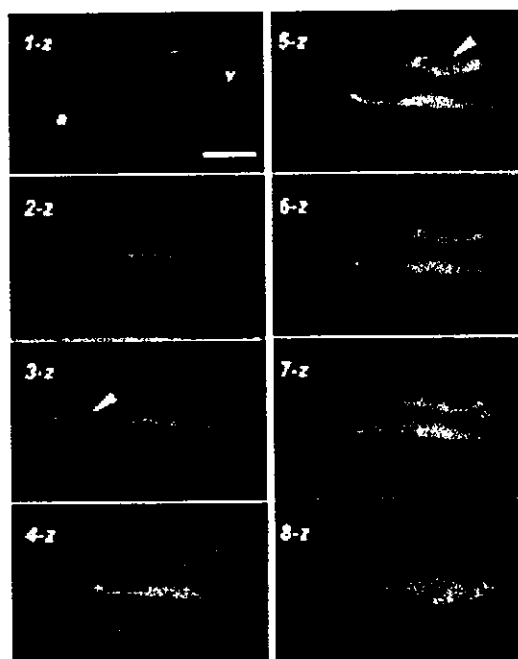


図 4. Laser ablation による破綻性出血により形成された血小板血栓の三次元構築。Panel 1-z から 8-z は z 軸方向の slicing。矢頭、血栓内に trap された leukocyte。Scale, 20 micron.

の三次元構築の結果を示した。1 micron の optical sectioning で取得した画像を三次元構築し、z 軸 (Panel 1z-8z) 方向に 2.8 micron 毎に slice した画像を表示した。三次元構築により liposome が leukocyte を巻き込み血小板凝集塊のなかに一部取り込まれていることが明白に示された。

C-4. Histamine 表面灌流による非出血性障害部位での liposome の血管外漏出

Inflammatory mediator である