

平成 17 年度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
分担報告書

アルブミン重合体のサイズ担持蛋白が、形成される止血、
病的血栓の 3 次元的集積部位の決定におよぼす役割

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

《研究要旨》血小板膜蛋白ないし膜蛋白と結合する血漿蛋白と結合したアルブミン重合体の止血能と血栓性をヒト血液を用いた *ex vivo* 実験により評価した。特に、担体として用いるアルブミン重合体のサイズと血栓性、止血能の関係、機能蛋白の種類の影響を検討した。担体としてのアルブミン重合体のサイズが大きくなると、血小板血栓の 2 次元的成長よりも 3 次元的成長を促進する効果が相対的に強くなり血栓性の亢進が懸念されること、von Willebrand 因子—GPIIb を機能蛋白として選択した場合にも同様の効果が認められることを示した。血栓性を亢進させることなく止血能のみを亢進させるためには小さなサイズのアルブミン重合体にコラーゲン受容体 GPIa/IIa、ないし GPIIb/IIIa と結合する H12 を結合させることが好ましいことを示唆した。

A. 研究目的

人工血小板をヒトに短期間投与して一時的に止血能を亢進させる治療に用いる必要性は、強力な抗血小板薬の開発の進行とともに急速に増加している¹。すなわち、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患の予防のために、強力な抗血小板薬を使用した症例が緊急手術などの出血手技を受

ける時には一過性に止血能を亢進させる必要がある。現状では、このような時に止血能の向上を期待できる治療法としては資源の限られた、かつ感染リスクのある血小板輸血しかない。抗血小板薬の過剰投与による一過性の易出血性は人工血小板のもっとも良い適応の一つであろう。一方、同じ状態は血栓性疾患の発症リ

スクの高い状態であることにも留意する必要がある。止血能を回復させるために投与した人工血小板が心筋梗塞、脳梗塞の再発を惹起することは何としても防ぐ必要がある。

短期的な止血能の回復を目指す人工血小板が、血栓性を亢進させることなく止血能のみを回復させるために、担体としてのアルブミン重合体のサイズの選択およびアルブミン重合体に結合させる機能蛋白を決定する必要がある。各種サイズのアルブミン重合体に各種機能蛋白を結合させた時の血栓性と止血能をヒトの *ex vivo* 血栓モデルを用いて検討した。

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。

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 Willerand 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。アルブミン重合体のサイズを 300 nm から 1,500 nm まで変化させ、血栓性、止血能とにおよぼす効果を 3 次元イメージング法を用いて検討した。また、コラーゲン上の血小板血栓の 2 次元的成長を蛍光顕微鏡により評価した。

将来人工血小板に結合させる蛋白の候補として活性型の GPIIb/IIIa を使用する計画がある。GPIIb/IIIa の活性型への転換の可逆性、血栓の 2 次元的、3 次元的成長とのかかわりについて検討し活性型 GPIIb/IIIa 使用の適否を検討した²。

代表的な血栓性疾患である心筋梗塞を惹起したヒトから、再灌流療法の一環として血栓吸引療法を施行した。採取した冠動脈の閉塞血栓を免疫組織染色して閉塞血栓の形成に関与する血漿蛋白、血小板膜糖蛋白を検討した^{3,4}。

(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した。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。心筋梗塞症例から、冠動脈の閉塞血栓を採取して組織学的に検討する研究については、本研究の倫理性を学内の臨床研究審査委員会にて審査を受け問題のないことを確認した。また研究に参加する症例に対して、書面によるインフォームドコンセントを行い倫理上の問題を惹起しないように配慮した。

C. 研究結果

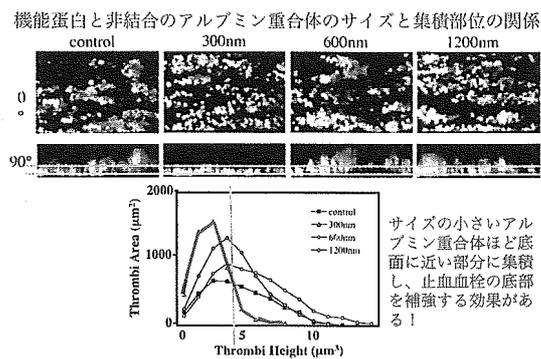


図 1. アルブミン重合体のサイズが血栓の 2 次元的、3 次元的成長におよぼす効果

機能蛋白と結合させていないアルブミン重合体も止血を促進する効果を有した。特に、サイズの小さいアルブミン重合体は血栓の底部を選択的に補強して止血を増強する効果が強いことが示唆された。

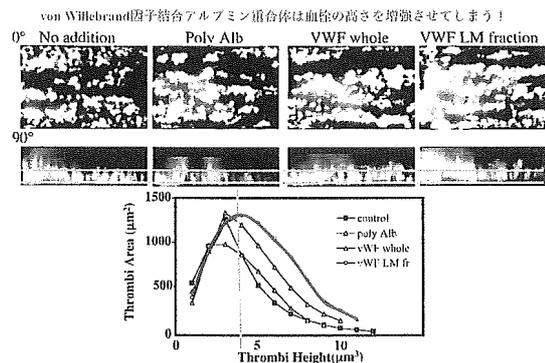


図 2. Von Willebrand 因子結合アルブミン重合体は 3 次元形態を有する血小板血栓の上部に選択的集積する傾向を呈した

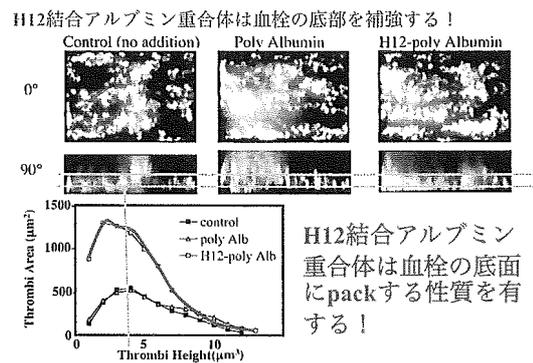


図 3. H12 結合アルブミン重合体はむしろ血栓の底部に集積して止血血栓を安定化させる効果を有した。

機能蛋白として von Willebrand 因子ないしその血小板の受容体である GPIIb/IIIa を結合させた時には止血能より血栓性が相対的に亢進することが示唆された。一方、H12 および GPIIb/IIIa は止血能を選択的に亢進させる効果が強いことが示唆された。

活性化のちにADP受容体ないしカルシウム流入を阻害すると
GPIIb/IIIaは非活性化型に戻る！

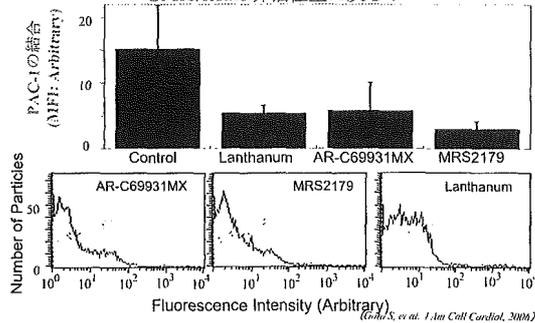
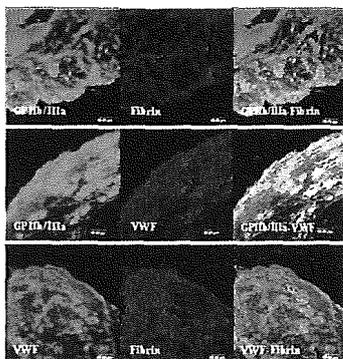


図 4. GPIIb/IIIa の活性化構造の維持における持続的 ADP 受容体刺激とカルシウム流入の必要性

活性化型の GPIIb/IIIa のみに結合し非活性化型に結合しないモノクローン抗体 PAC-1 を用いて ADP+epinephrine, TRAP により活性化させた血小板上の GPIIb/IIIa の活性化型構造への変化の可逆性を検討した。一度活性化型に転換した GPIIb/IIIa も、持続的な ADP 受容体刺激と、引き続く継続的かつ周期的なカルシウム流入が存在しないと活性化構造を維持できないことが示唆された²。



心筋梗塞を惹起する冠動脈の閉塞血栓の形成には von Willebrand 因子-血小板の相互作用が重要な役割を演じる！

図 5. 心筋梗塞症例より血栓吸引療法にて採取した冠動脈閉塞血栓の組織性状^{3,4}

D. 考察

担体として各種サイズのアルブミン重合体を用い、各種機能蛋白と結合させて止血能、血栓性を評価した。Ex vivo 実験では von Willebrand 因子-GPIIb 系を保持するアルブミン重合体による血栓性亢進のリスクが危惧された。実際、冠動脈を閉塞し心筋梗塞を惹起した血栓では von Willebrand 因子と血小板の局在が一致していた。Ex vivo の機能評価が体内での動態を反映している可能性が強く示唆された。

担体として用いるアルブミン重合体としては、サイズの小さいアルブミン重合体が血栓の底部に集積して止血血栓を安定化させる上で有用と考えられた。

将来の機能蛋白の候補として活性化 GPIIb/IIIa をアルブミン重合体に結合させる可能性が考えられているが、われわれの基礎研究成果は native 血小板では、GPIIb/IIIa の活性化型への転換は可逆的現象であることが示唆された。GPIIb/IIIa の可逆性と、血栓の 2 次元的、3 次元的成長について、さらに検討が必要と考えられた。

E. 結論

- 1) ex vivo flow chamber を用いて、コラーゲン上の血栓の 2 次元的、3

次元成長を評価することにより人工血小板の止血能と血栓性を評価するわれわれの方法は一定の妥当性を有することが示唆された。

- 2) 心筋梗塞を惹起した冠動脈の閉塞血栓には von Willebrand 因子が重要な役割を果たすことが示唆された。
- 3) GPIIb/IIIa の活性型への転換は可逆的反応であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表。

1. Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, Mas JL, Goto S, Liao CS, Richard AJ, Rother J, Wilson PW. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *Jama*. 2006; 295:180-189.
2. Goto S, Tamura N, Ishida H, Ruggeri ZM. Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa

activation through adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:155-162.

3. Hoshiya Y, Hatakeyama K, Tanabe T, Asada Y, Goto S. Co-localization of von Willebrand factor with platelet thrombi, tissue factor and platelets with fibrin, and consistent presence of inflammatory cells in coronary thrombi obtained by an aspiration device from patients with acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost*. 2006;4:114-120.
4. Yamashita A, Sumi T, Goto S, Hoshiya Y, Nishihira K, Kawamoto R, Hatakeyama K, Date H, Imamura T, Ogawa H, Asada Y. Detection of von Willebrand factor and tissue factor in platelets-fibrin rich coronary thrombi in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2006;97:26-28.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

1. 特願 2005-254562: 発明人: 広渡祐史、後藤信哉、出願人: 東ソー株式会社、東海大学、題名: 抗凝固活性を有する薬剤の評価方法、2005年9月2日出願
2. 特願 2005-270387: 発明人: 広渡

祐史、岡本奈美、後藤信哉、出願
人：東ソー株式会社、東海大学、
題名：心不全症候群の識別方法、
2005年9月16日出願

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金
(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)
分担研究報告書

rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb の効果及び安全性評価の検討

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 教授
研究協力者 小峰 梨沙 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨 (1) rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb が生化学的検査、凝固学的検査測定系に与える影響をヒト血清及び血漿に各サンプルを添加混和後、検査測定することで検討した。結果、rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb 添加時ともに、生化学的検査、凝固学的検査においてコントロール(生理食塩水添加時)の検査値と同様な値となっていたため、検査測定系には影響を与えていないことが明らかとなった。(2)全血血小板機能測定装置 PFA-100 を用いて rGPIIb α 導入量の異なる rGPIIb α -liposome、2 濃度での rGPIIb α -polyAlb の評価を行った。すなわち、血小板減少再構成血液に各サンプルを添加混和後、PFA-100 で閉塞時間を測定した。検討の結果、liposome に導入した rGPIIb α 量が多い場合には閉塞時間が control liposome 添加時に比べて延長傾向が見られた。また、1wt%の rGPIIb α -polyAlb でも control polyAlb 添加時に比べ延長傾向が認められた。(3)腹大動脈にポリエチレンチューブを挿入した動脈血栓誘発ラットモデルを作成し、rGPIIb α -liposome の効果及び安全性評価の検討を行った。安全性評価においては血小板数正常ラットで動脈血栓モデルを作成し、無投与群、生食投与群、rGPIIb α -liposome 投与群の血栓形成によるチューブ閉塞時間を比較した。閉塞時間に関する予備的な検討では、無投与群、生食投与群に比べ、rGPIIb α -liposome 投与群では短縮傾向が見られたが、今後の詳しい検討が必要である。rGPIIb α -liposome の効果評価では busulfan 投与の血小板減少ラットを用いて動脈血栓形成に与える rGPIIb α -liposome の影響を検討した。しかし予備検討における 2 匹のラットでは血栓形成によるチューブ閉塞は見られず、経過観察中に死亡した。その原因として、ブスルファン投与による汎血球減少が考えられたため、ブスルファン投与量の検討を今後行う予定である。

A. 研究目的

通常、生体内で血液は凝固することなく流動性を保っているが、これは幾つかの生体機能が巧妙に働いて血液凝固/抗凝固のバランスが保たれている結果である。一般に血球や血管内皮細胞には、互いに結合し合う為の接着分子や受容体があり、これらを介して細胞の接着が起こる。血液凝固因子

は通常これらの細胞によって活性化されることはないが、一方では病的状態の細胞や異物表面は血液凝固因子の活性化を引き起こすことが知られている。人工血液代替物を生体に投与する上で血液凝固因子や血球の活性化による血栓形成の可能性は重大な問題である。

本研究は血液代替物の効果及び安全性評価を目的とし、今年度は (1)安全性評価として rGPIb α -liposome、rGPIb α -polyAlb が生化学的検査、凝固学的検査に与える影響、(2)効果評価として全血血小板機能測定装置 PFA-100 を用いた rGPIb α -liposome、rGPIb α -polyAlb の評価、(3)動脈血栓ラットモデルを用いた rGPIb α -liposome の効果及び安全性の検討(なお今年度は効果評価を行う上の予備検討として血小板減少ラットの動脈血栓モデルの確立について)、以上の三項目について検討を行った。

B. 研究方法

(1) rGPIb α -liposome、rGPIb α -polyAlb が生化学的検査、凝固学的検査に与える影響

健康人より真空採血管(ベノジェクトII、テルモ)にて採血後、血液を遠心分離し(3500G, 10min)血清または血漿(3.8%クエン酸ナトリウム入り)を得た。(a)血清または血漿 2ml に対して 0.27ml の生理食塩水、総脂質量として 0.1wt%、0.75wt%の rGPIb α を結合しない liposome(以下 control liposome, Table 1)及び rGPIb α を結合した liposome(rGPIb α -liposome, Table 1,2), (b) 血清または血漿 2ml に対して 0.27ml の PBS、総 rHSA 量として 0.025wt%、1wt%の rGPIb α を結合しない polyAlb(以下 control polyAlb)及び rGPIb α を結合させた polyAlb(rGPIb α -polyAlb, 早大, 武岡教授より供与, Table 3)をそれぞれ添加した(本条件はラット投与量 4mg/kg に相当)。各サンプルを添加混和し凍結させた後、生化学的検査、凝固学的検査を行った(SRL にて測定)。

Table 1 liposome 脂質組成(モル比)

	モル比
DPPC	1
cholesterol	1
PEG ₂₀₀₀ -DSPE-MeO	0.006
PEG ₂₀₀₀ -DSPE-MAL	0.006

Table 2 liposome 諸物性

	control liposome	rGPIb α -liposome
粒径(nm)	307.3 \pm 47.1	281.3 \pm 77.1
rGPIb α (/ μ m ²)	—	1950

Table 3 polyAlb 諸物性

	control polyAlb	rGPIb α -polyAlb
粒径(nm)	270 \pm 90	260 \pm 90
rGPIb α (/ μ m ²)	—	2600

(2) PFA-100 を用いた rGPIb α -liposome、rGPIb α -polyAlb の評価

PFA-100 測定原理: 全血血小板機能検査装置である PFA-100 はコラーゲン+エピネフリン、またはコラーゲン+ADP が固相化されたカセットに 3.8%クエン酸ナトリウム入り全血を通過させる際に形成される血小板血栓により、血流が閉塞するまでの時間を測定する。血小板機能にほぼ依存しており、凝固系の影響は受けない。抗血小板薬服用時や血小板機能異常では閉塞時間は延長し、血小板が活性化されていると短縮する。

血小板減少再構成血液の作製: 健康人より 3.8%クエン酸ナトリウム入り真空採血管(ベノジェクトII、テルモ)にて採血後、血液を遠心分離し(70G, 15min)PRP を得た。PRP

採取後、さらに遠心分離し(1500G, 10min,)PPPを得た。残った Pellet の入った試験管をクエン酸ナトリウムと生理食塩水 1:9 で混合させた溶液にて満たし、遠心分離後(190G,15min)上清を廃棄した。さらに遠心分離(1500G,10min)し Pellet を得た。PRP、PPP、Pellet を混合し血小板数 $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、ヘマトクリット 40% に調製し血小板数減少再構成血液を作製した。

rGPIIb α -liposome 評価方法：血小板減少再構成血液(血小板数= $5.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、ヘマトクリット=41.2%)1ml に対し 62.5 μl の生食、control liposome(Table 4)、liposome 表面 $1\mu\text{m}^2$ 当たり約 1000、2000、4000 分子導入した rGPIIb α - liposome(Table 5)をそれぞれ添加混合した後、PFA-100 にて閉塞時間を測定した。

rGPIIb α -polyAlb 評価方法：血小板減少再構成血液(血小板数= $5.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、ヘマトクリット=41.0%)1ml に対し 62.5 μl の PBS、総 rHSA 量として 0.025wt%、1wt% の control polyAlb、rGPIIb α -polyAlb(Table 6)を添加混合し PFA-100 にて閉塞時間を測定した。

Table 4 liposome 脂質組成(モル比)

	モル比
DPPC	1
cholesterol	1
PEG ₅₂₀₀ -Glu2C18	0.006
Mal-PEG ₃₄₀₀ -Glu2C18	0.05

Table 5 rGPIIb α - liposome sample

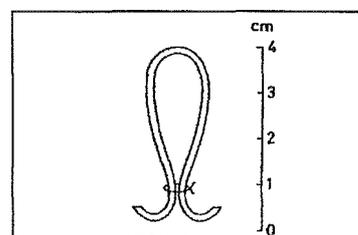
Sample	rGPIIb α (μm^2)	粒子径 (nm)
control	—	273 \pm 90
G1000	820	282 \pm 96
G2000	2020	272 \pm 27
G4000	3800	284 \pm 83

Table 6 polyAlb 諸物性

	control polyAlb	rGPIIb α -polyAlb
粒径(nm)	270 \pm 90	260 \pm 90
rGPIIb α (μm^2)	—	2600

(3) 動脈血栓ラットモデルを用いた効果及び安全性の検討

動脈血栓ラットモデル作製方法(G.Hornstra らの方法(Atherosclerosis,17,369-382,1973)に従った)：Wister 系雄性ラット(体重約 300g)をペントバルビタールナトリウム(ネプタール、大日本製薬)にて麻酔後、腹部正中線を切開し開創器で固定した。腎動脈から総腸骨動脈までを周囲の組織より分離した。腸腰動脈から総腸骨動脈間の血管を単離し、クレンメを用いて動脈血を一時的に閉塞させた。単離した血管に切り込みを入れ、予めヘパリン生食(ノボヘパリン注 1000IU/ml(持田製薬)を生食で 500IU/ml に調製)で満たしたポリエチレンチューブ(Fig.1)を挿入し糸で固定した。クレンメを血管から外し、血流を再開させた。チューブを体外に出し筋層と皮膚をそれぞれ縫合し創部にテラマイシン軟膏(ファイザー製薬)を塗布した。



(G.Hornstra らによる)

Fig.1 ポリエチレンチューブ

閉塞時間測定：チューブ挿入時からチューブ内全体が血栓形成により赤色から黒色に

変色するまでを閉塞時間として測定した。

(24時間おきに観察)

安全性評価方法：正常ラットを用いて動脈血栓モデルを作成後、ラットモデルに対して生理食塩水、総脂質量として 0.25wt% control liposome (Table 7)、rGPIIb α - liposome (Table 8)それぞれ 4ml/kg をチューブ挿入後、挿入 48,96 時間後に尾静脈投与し、チューブ閉塞時間、血球変動を測定した。(K-4500、Sysmex)

Table 7 liposome 脂質組成(モル比)

	モル比
DPPC	1
cholesterol	1
PEG ₅₀₀₀ -DSPE	0.006
Mal-PEG ₃₄₀₀ -Glu2C18	0.006

Table 8 liposome 諸物性

	rGPIIb α -liposome
粒径(nm)	262.1 \pm 72.5
rGPIIb α (/ μ m ²)	1800

効果評価方法：ブスルファンポリエチレングリコール溶液(20mg/kg)を 0,3 日目に尾静脈投与し、投与 10 日目の血小板減少ラット(平均血小板数=12.2 \times 10⁴/ μ l)を用いて上記の方法により動脈血栓モデルを作製し、血球変動を測定した。

C. 結果

(1) rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb が生化学的検査、凝固学的検査に与える影響

rGPIIb α -liposome 添加時の影響：生化学的検査では、0.75wt%control liposome、rGPIIb α -liposome 添加時ともに総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型

コレステロール、リン脂質に若干の上昇傾向が見られた(Table 9)。その他の検査また凝固学的検査では生理食塩水添加時と同様な値となり影響は見られなかった(Table 10)。

rGPIIb α -polyAlb 添加時の影響：生化学的検査、凝固学的検査値ともに PBS 添加時の値と同様な結果となり、影響は見られなかった(Table 11,12)。

(2) PFA-100 を用いた rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb の評価

rGPIIb α 導入量の異なる rGPIIb α -liposome が閉塞時間へ与える影響：rGPIIb α を liposome 表面 1 μ m² 当たり約 1000、2000、4000 分子導入した rGPIIb α -liposome をそれぞれ血小板減少再構成血液に添加し PFA-100 閉塞時間の比較を行った(Fig.2)。平均閉塞時間は約 1000 分子(209 \pm 34 秒)より約 4000 分子導入した rGPIIb α -liposome(292 \pm 12 秒)で 83 秒以上延長し、rGPIIb α 導入量が多いほど閉塞時間の延長傾向が認められた。

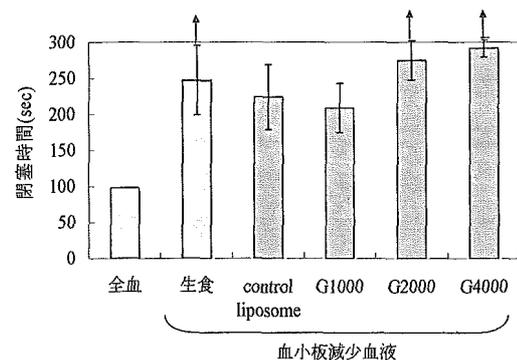


Fig.2 rGPIIb α -liposome が PFA-100 閉塞時間へ与える影響(↑ 300 秒以上の結果含む)(n=3)

Table 9 rGPIIb α -liposome が生化学的検査に与える影響

項目	単位	血清	生食添加	control liposome添加		rGPIIb α -liposome添加	
				0.1wt%	0.75wt%	0.1wt%	0.75wt%
総タンパク	g/dl	7.3	6.4	6.5	6.7	6.6	6.6
アルブミン	g/dl	4.5	3.9	3.9	4.0	4.0	4.0
総ビリルビン	mg/dl	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.4
AST	IU/l	12	10	10	12	11	11
ALT	IU/l	9	7	6	7	8	7
LDH	IU/l	120	106	104	108	114	105
γ GT	IU/l	10	9	9	9	9	9
LAP	IU/l	80	71	72	74	73	74
CPK	IU/l	48	41	43	44	44	44
コリンエステラーゼ	IU/l	308	268	269	279	274	272
総コレステロール	mg/dl	152	132	134	155	137	154
エステル型コレステロール	mg/dl	113	98	98	110	100	109
遊離型コレステロール	mg/dl	39	34	36	45	37	45
HDL-コレステロール	mg/dl	45	40	40	41	40	40
中性脂肪	mg/dl	60	53	53	54	54	54
遊離型脂肪酸	mEq/l	0.26	0.22	0.22	0.21	0.21	0.22
リン脂質	mg/dl	167	147	148	168	152	169
尿酸	mg/dl	3.5	3.0	3.1	3.2	3.1	3.1
尿素窒素	mg/dl	12.2	10.3	10.5	10.7	10.5	10.4
クレアチニン	mg/dl	0.51	0.41	0.43	0.47	0.45	0.44
K ⁺	mEq/l	4.1	3.5	3.5	3.7	3.6	3.6
Ca ²⁺	mg/dl	9.2	7.9	7.9	8.2	8.1	8.1
無機リン	mg/dl	3.3	2.9	2.9	3.3	3.0	3.3
CRP	mg/dl	0.02以下	0.02以下	0.02以下	0.02以下	0.02以下	0.02以下

Table 10 rGPIIb α -liposome が凝固学的検査に与える影響

項目	単位	血漿	生食添加	control liposome添加		rGPIIb α -liposome添加	
				0.1wt%	0.75wt%	0.1wt%	0.75wt%
APTT	秒	41.7	41.3	41.5	40.7	40.5	44.7
PT	秒	11.4	11.9	11.9	11.8	11.9	12.0
フィブリノゲン	mg/dl	292	247	247	250	250	253
AT	%	99	85	85	86	86	84
VWF活性	%	69	60	55	52	57	53
VWF抗原	%	61	52	53	52	53	51
TAT	ng/ml	1.3	1.3	1.2	1.3	1.4	1.2
PAI-1	ng/ml	11	10	11	11	13	11

Table 11 rGPIb α -polyAlb が生化学的検査に与える影響

項目	単位	血清	PBS添加	control polyAlb添加		rGPIb α -polyAlb添加	
				0.025wt%	1wt%	0.025wt%	1wt%
総タンパク	g/dl	7.3	6.3	6.3	6.4	6.2	6.4
アルブミン	g/dl	4.8	4.2	4.2	4.3	4.1	4.3
総ビリルビン	mg/dl	1.0	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
AST	IU/l	20	18	18	17	18	18
ALT	IU/l	13	12	11	11	11	12
LDH	IU/l	167	140	145	143	136	147
γ GT	IU/l	21	18	18	18	17	18
LAP	IU/l	105	92	93	92	91	95
CPK	IU/l	670	582	583	580	568	588
コリンエステラーゼ	IU/l	346	298	301	299	292	302
総コレステロール	mg/dl	143	125	124	122	121	125
エステル型コレステロール	mg/dl	108	94	93	91	91	94
遊離型コレステロール	mg/dl	0.11	0.09	0.10	0.08	0.08	0.08
HDL-コレステロール	mg/dl	71	61	62	61	60	63
中性脂肪	mg/dl	69	60	60	59	59	61
遊離型脂肪酸	mEQ/l	0.11	0.09	0.10	0.08	0.08	0.08
リン脂質	mg/dl	180	158	157	155	152	158
尿酸	mg/dl	6.6	5.7	5.7	5.6	5.6	5.8
尿素窒素	mg/dl	8.3	7.0	6.7	7.0	6.6	7.0
クレアチニン	mg/dl	0.81	0.68	0.69	0.72	0.71	0.70
K ⁺	mEQ/l	3.9	4.1	4.2	4.1	4.0	4.2
Ca ²⁺	mg/dl	9.7	8.4	8.3	8.2	8.2	8.5
無機リン	mg/dl	3.5	8.1	7.8	8.0	8.0	7.8
CRP	mg/dl	2.78	2.45	2.45	2.47	2.34	2.47

Table 12 rGPIb α -polyAlb が凝固学的検査に与える影響

項目	単位	血漿	PBS添加	control polyAlb添加		rGPIb α -polyAlb添加	
				0.025wt%	1wt%	0.025wt%	1wt%
APTT	秒	41	41.6	41.1	42.2	40.8	43.4
PT	秒	12.2	12.7	12.5	12.4	12.5	12.7
フィブリノゲン	mg/dl	275	223	221	223	226	214
AT	%	108	91	91	90	91	90
VWF活性	%	55	49	53	55	54	44
VWF抗原	%	80	68	68	67	68	63
TAT	ng/ml	6.6	5.9	6.6	7.4	7.1	6.0
PAI-1	ng/ml	20	21	21	15	23	13

rGPIIb α -polyAlb が閉塞時間へ与える影響 :

0.025wt% control polyAlb(186 \pm 26 秒)、rGPIIb α -polyAlb(188 \pm 38 秒)添加時ともにPBS添加時(176 \pm 21 秒)と閉塞時間の差は見られなかった。1wt% control polyAlb(297 \pm 7 秒)、rGPIIb α -polyAlb(296 \pm 6 秒)添加時では閉塞時間の延長傾向が見られ、PBS添加時と比較しともに 120 秒の延長が認められた(Fig.3)。

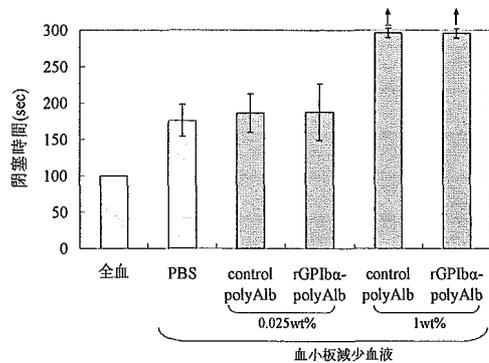


Fig.3 rGPIIb α -polyAlb が PFA-100 閉塞時間へ与える影響(\uparrow 300 秒以上の結果含む) (n=3)

(3) 動脈血栓ラットモデルを用いた効果及び安全性の検討

安全性の検討(正常ラット動脈血栓モデル) : rGPIIb α -liposome 投与群(72 時間)では生食投与群(128 \pm 77 時間)に比べ閉塞時間の短縮傾向が見られた(Fig.4)。血球変動においては各投与条件のラットで白血球数がチューブ挿入後から閉塞時にかけて上昇傾向が観察された(Fig.5)。その他、赤血球数(Fig.6)、ヘマトクリット値(Fig.7)、血小板数(Fig.8)では各投与条件で変動は生じていないと思われた。

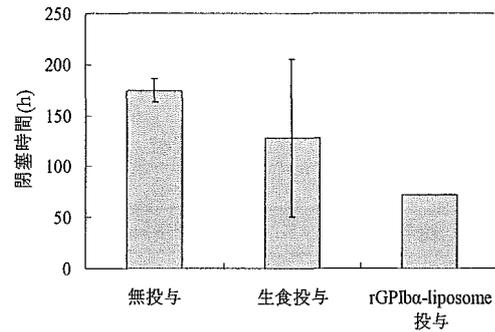


Fig.4 rGPIIb α -liposome がポリエチレンチューブ閉塞時間に与える影響(無投与 n=3, 生食投与 n=3, rGPIIb α -liposome n=2)

血小板減少ラットを用いた動脈血栓ラット

モデルの作製 : 2 匹の血小板減少ラット(平均血小板数 = $12.2 \times 10^4/\mu\text{l}$)で動脈血栓モデルラットを作製した。2 匹ともにチューブ挿入 72 時間、96 時間で死亡した。その際、チューブの閉塞は認められなかった。白血球数(Fig.9)はチューブ挿入 24 時間後に低下し、血小板数(Fig.12)も同様にチューブ挿入 24 時間後より低下し続け死亡時までには $0.2 \times 10^4/\mu\text{l}$ まで達した。赤血球数(Fig.10)、ヘマトクリット値(Fig.11)死亡時まで低下傾向が認められた。

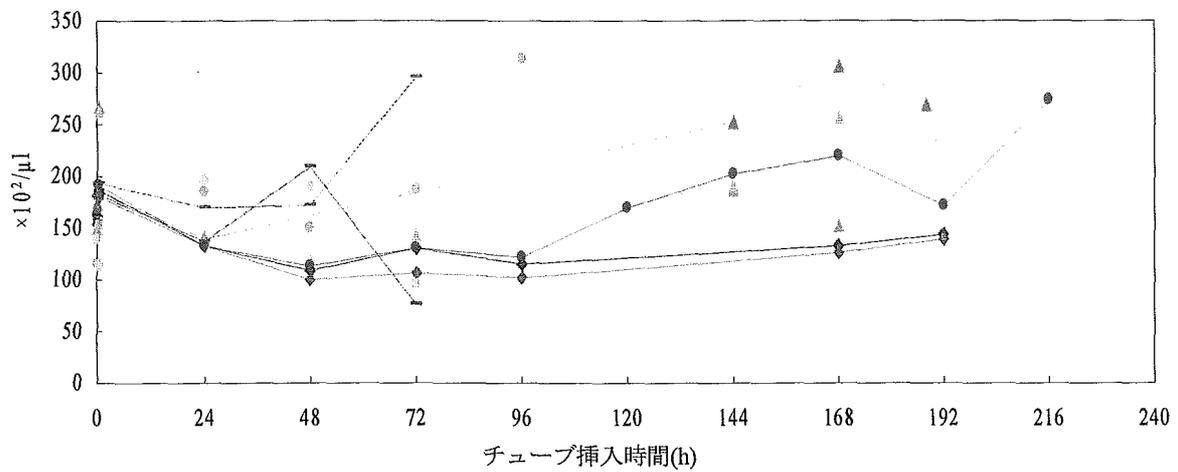


Fig.5 正常ラット動脈血栓モデルのサンプル投与時の白血球数の推移(◇, ◆ sham、▲, ▲, ▲ 無投与、●, ●, ● 生食投与、■, ■ rGPIIb/IIIa-liposome 投与)

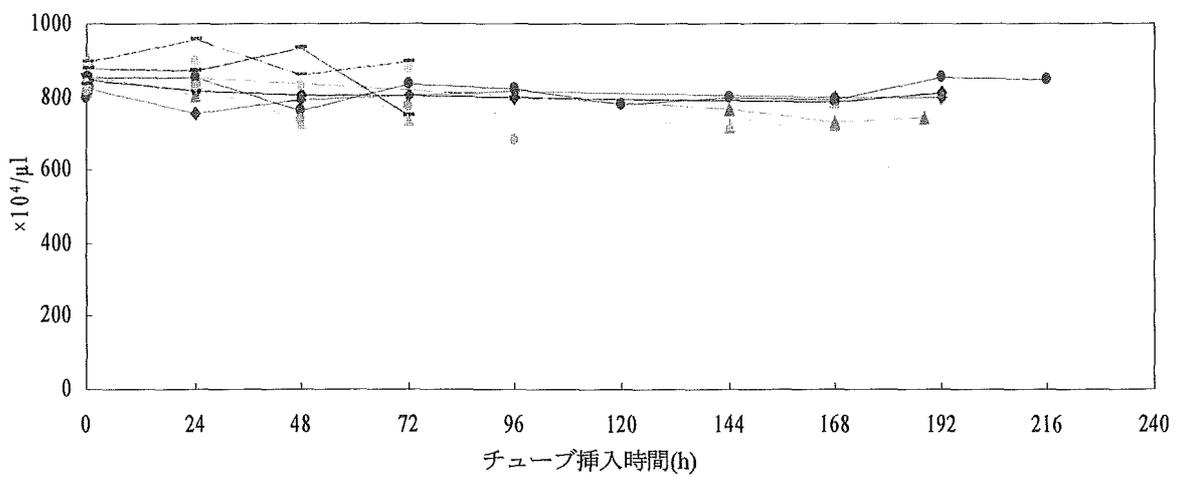


Fig.6 正常ラット動脈血栓モデルのサンプル投与時の赤血球数の推移(◇, ◆ sham、▲, ▲, ▲ 無投与、●, ●, ● 生食投与、■, ■ rGPIIb/IIIa-liposome 投与)

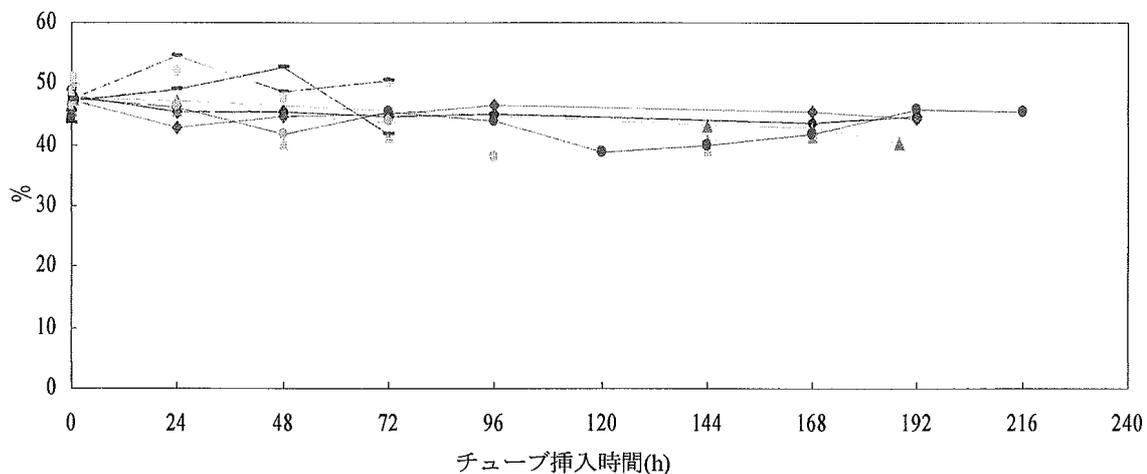


Fig.7 正常ラット動脈血栓モデルのサンプル投与時のヘマトクリット値の推移(◆, ◆ sham、▲, ▲, ▲無投与、●, ●, ●生食投与、■, ■rGPIIb/IIIa-liposome 投与)

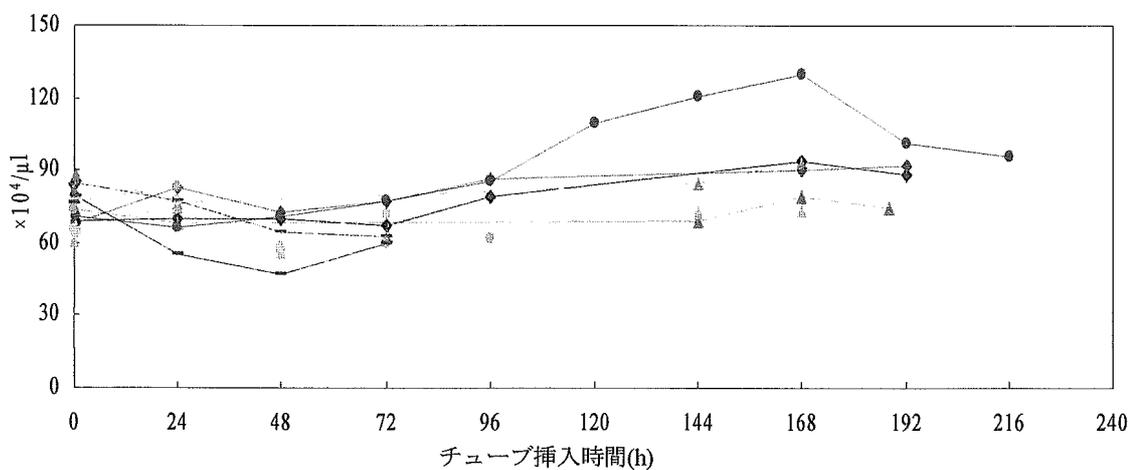


Fig.8 正常ラット動脈血栓モデルのサンプル投与時の血小板数の推移(◆, ◆ sham、▲, ▲, ▲無投与、●, ●, ●生食投与、■, ■rGPIIb/IIIa-liposome 投与)

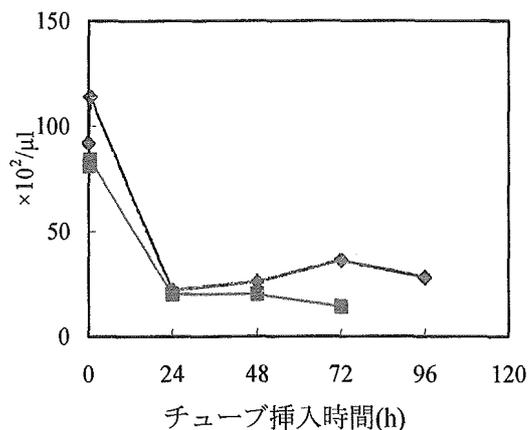


Fig.9 血小板減少ラットを用いた動脈血栓モデルの白血球数の推移(◆ rat1, ■ rat2)

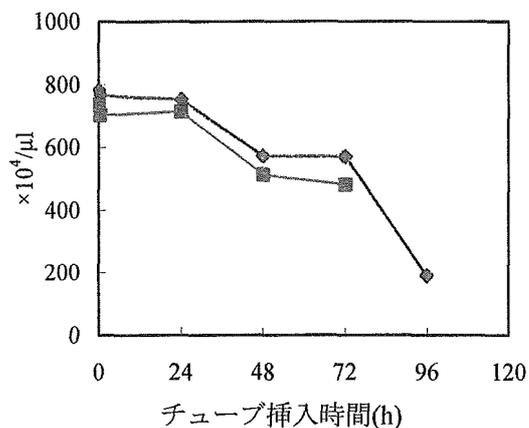


Fig.10 血小板減少ラットを用いた動脈血栓モデルの赤血球数の推移(◆ rat1, ■ rat2)

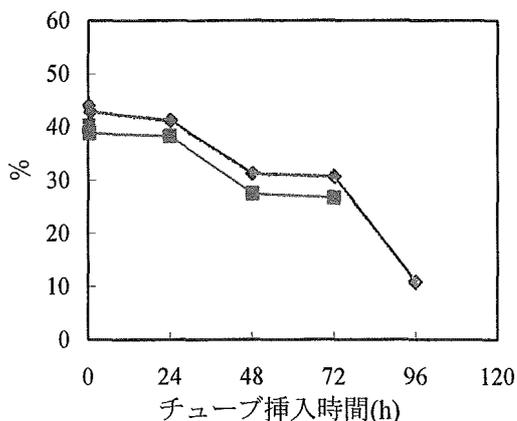


Fig.11 血小板減少ラットを用いた動脈血栓モデルのヘマトクリット値の推移

(◆ rat1, ■ rat2)

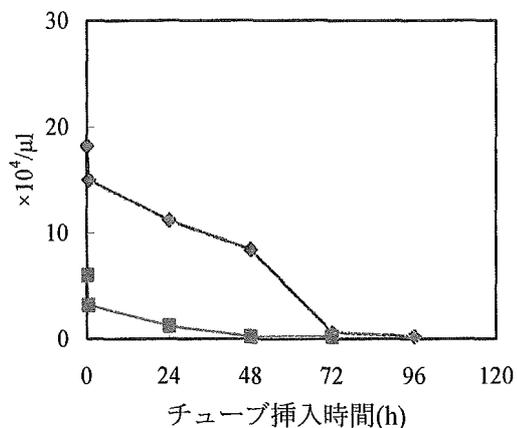


Fig.12 血小板減少ラットを用いた動脈血栓モデルの血小板数の推移(◆ rat1, ■ rat2)

D. 考察

(1) rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb が生化学的検査、凝固学的検査に与える影響

0.75wt% rGPIIb α -liposome 添加時に総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質の上昇は control liposome 添加時においても認められた。小胞体の組成から考えるとこれらの上昇は小胞体成分に起因することが考えられる。その他の生化学的検査、凝固学的検査値 0.1wt% rGPIIb α -liposome、0.025, 1wt% rGPIIb α -polyAlb 添加時では検査測定系に影響を与えていないと思われる。

(2) PFA-100 を用いた rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb の評価

liposome に導入する rGPIIb α が多いほど PFA-100 閉塞時間が延長した。また rGPIIb α -polyAlb でも添加濃度が高いほど PFA-100 閉塞時間が延長した。これは血中の GPIIb α と liposome または polyAlb に導入された rGPIIb α が競合的に血中 VWF を奪い

合うために本来の血小板機能が低下したためと考えられる。従って、rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb は抗血栓性に作用する可能性がある。

(3) 動脈血栓モデルラットを用いた効果及び安全性の検討

安全性評価を目的として正常ラット動脈血栓モデルに、rGPIIb α -liposome を投与した際に閉塞時間の短縮傾向が見られた。しかし、今回の検討では control liposome 投与時の閉塞時間は測定されておらず、生食投与群の閉塞時間もばらつきが見られた。今後さらに n 数を増やし、傾向を見極める必要がある。rGPIIb α -liposome の効果評価を行うための予備検討として血小板減少ラットを用いて動脈血栓モデルを作製した。2 匹のラットともに血栓形成によるチューブ閉塞は見られず、経過観察中に死亡した。死亡時では汎血球減少が見られていた。この原因としてプスルファン投与の副作用が考えられた。今後プスルファン投与時の副作用の程度を調査し、血小板減少ラットでのモデルを作製する上での最適なプスルファン投与濃度を検討する。

E. 結論

安全性評価の検討においては rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb とともに検査測定系には大きな影響を与えていないことが明らかとなった。効果評価では血小板機能測定装置を用いて検討した結果、rGPIIb α -liposome、rGPIIb α -polyAlb は rGPIIb α を担持していることで血小板機能を抑制する可能性が示唆された。また、今後動脈血栓ラットモデルでの評価系をさらに詳細に

検討する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金
(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)
分担研究報告書

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法による血小板血栓形成モデルを用いて—

分担研究者 梶村 眞弓 慶應義塾大学医学部医化学教室 助手
研究協力者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学教室 教授

研究要旨

止血や病的血栓形成のメカニズムを解明するには、流体下での血流動態を評価できる実験系を構築し、形成・崩壊過程下の血栓と血流中の単一血小板あるいは他の血球との相互作用を解析する必要がある。本研究ではラット腸間膜微小循環を用いた *in vivo* の実験系で、微小血管における止血血栓形成・崩壊プロセスを数値化することを試みた。ラット血小板を生体内染色し可視化し、laser ablation 技術により微小血管の任意の場所に血栓を作製した。形成過程にある一次血栓近傍での血球の動態、および形成と崩壊の過程を記録し、オフラインで解析した。血栓の大きさやその形状、血管損傷部位の大きさの経時的変化を、一定の criteria のもとに定量化した。このシステムを用い、抗血小板薬として広く使用されている cyclooxygenase 阻害剤 (aspirin) や phosphodiesterase 阻害剤などの抗血栓効果の差別化を試みた。その結果、血流中の単一血小板の血栓への“touch-and-go”には、3 群間で差を認めなかったが、比較的大きな凝集塊の剥離する回数は、phosphodiesterase 阻害剤、aspirin 投与によって有意に減少した。Control と aspirin 群では、顕著な赤血球の血管外漏出が認められるのに対し、phosphodiesterase 阻害剤投与後は、ablation 後も、ほとんど赤血球の漏出が認められず、明らかにこの群で bleeding index が減少していることが判明した。これにより、人工血小板粒子の病巣集積性および血小板接着・支持作用の生体内評価系が確立できた。

A. 研究目的

本分担研究では、人工血小板の実用化に必須のプロセスである人工血小板粒子の生体内挙動の評価系を確立するため詳細な検討を展開してきた。

前年度までに構築した新規 imaging 技術を用い、これまで詳細が不明であった血栓形成部位での血小板の接着現象や局所での hemodynamics の変動をリアルタ

イムで解析し、人工血小板粒子の病巣集積性及び血小板接着・凝集支持作用の定量評価系を確立することを目標とした。また血栓形成・崩壊過程を評価する上で勘案する必要のあるいくつかのパラメータとして、血管障害の度合い、血栓サイズ、飛翔血栓のサイズ、および発生頻度を *in vivo* で測定し、並行して研究開発を進めている止血血栓形成シミュレーショ

ンのアルゴリズムやパラメータの妥当性を評価することも目指した。

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)、腸間膜微小循環を生体顕微鏡システムを用いて観察した。Wistar 系雄性ラット (200–250 g) を sodium-pentobarbital (i.m., 50 mg/kg) 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。

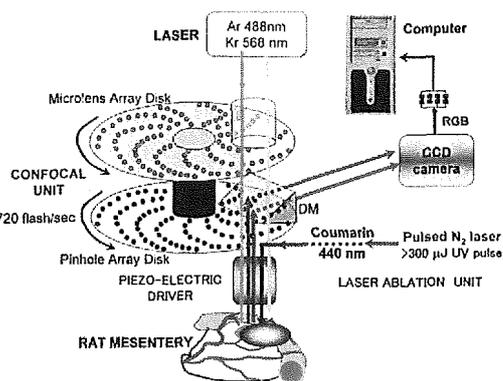


図 1. 生体顕微鏡システム

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) を使用した。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。

B-2. Animal preparation

Phosphodiesterase 阻害剤 (100 mg/kg) 及び aspirin (Sigma A-2093, 10mg/kg) は、0.5% carboxymethyl cellulose 溶液に分散させ 4 時間前に経口投与した。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 microL/100 g rat (volume ratio of liposome in the dispersion= 35 %, ∴ 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 10 分にわたり解析した。

B-3. Laser ablation による微小血管上への血栓形成

Laser ablation のための nitrogen-dye Laser (Micropoint 社) の出力は、常に frequency, 3Hz, filter transmission, 50-60 % で行った。Laser の組織上での出力は、dye や laser 管の decay に依存することから、laser 管出口での energy level を計測するのみでは不十分である。そこで、実験を始める前に APS coat の slide glass を標的として laser を照射し、glass 上に一定の傷が得られる transmission を決定することにより internal consistency を維持した。照射を行う微小血管は、feeding artery や collecting vein で三角州のように構成されている腸間膜の triangle panel の中心部にあるもののみを選択した。これは、anatomical location を限定することにより、laser が通過する mesothelium の厚みをできる限り一定に保ち、血管壁に到達する laser energy を一定レベルに保つためである。

Laser の照射を行うにあたっては、蛍光と透過光両方を用い、赤血球が血管外に漏出し、破綻出血を伴う出血がおきたことを確認後、蛍光のみの画像取得に切り替え、障害部位での血栓形成と崩壊の過程を 10 分間記録した。Focal plane は血栓が最大に見える位置で固定した。実験の最後に rhodamine 蛍光画像に切り替え、focal plane を手動で z-axis 上に 2.5 micron ずつ移動させ、liposome の漏出部位を三次元で構築するための画像を取得した。形成・崩壊過程下の血栓と血流中の単一血小板あるいは他の血球との相互作用を観察するため、二次元の画像取得に focus

を絞ったため、血栓の経時的な三次元画像の取得は行わなかった。

B-4. 血栓と血流中の血小板との相互作用の解析

取得した画像を offline で三分の一の速度で再生し、血栓と血流中の血小板との相互作用を解析した。形成された血栓に接着し再び剥離する血小板の数を 1 分毎の interval で計測した。その際、剥離する血小板を凝集塊の大きさにより次の 5 群に分類した。①単一血小板、②2-5 個の凝集塊、③6-10 個の凝集塊、④11-15 個の凝集塊、⑤15 個以上の凝集塊、の 5 群である。血流速度は、free flow の CFSE 標識-血小板の center line velocity を測定した。

B-5. 止血プロセスの評価

血栓形成プロセスのみならず laser ablation 後の止血プロセスの評価を試みた。記録した透過光画像をもとに、障害部位より血管外に漏出した赤血球が占める面積を control、phosphodiesterase 阻害剤、aspirin 投与の三群で測定し比較した。

C. 研究結果及び考察

C-1. Liposome の血管内皮下腔への集積を指標とした血管障害の評価

図 2 にラット腸間膜細静脈壁を laser ablation により傷害した際の rhodamine で標識された liposome の集積の結果を示した。2.5- μm 厚 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 として数値化し、これをもって血管障害のサイズの指標とした。