

の内容はほぼ均一に観察された。ADP 内包したリポソームは非含有のものと同様に観察された(図 2B)。これらに内容の違いは見い出せなかった。

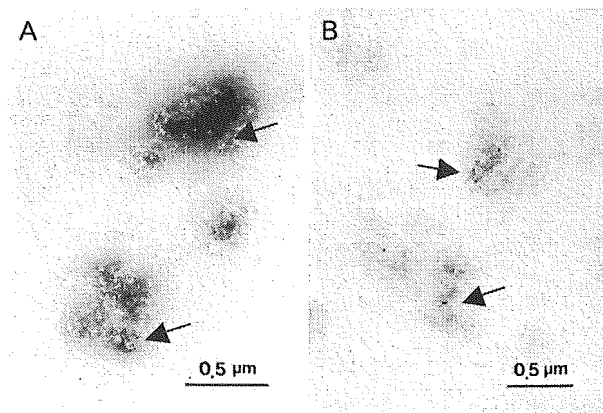


図 1. H12 結合アルブミンのネガティブ染色像(A)と凍結切片像(B)

(A) H12 結合アルブミンは、糸くず状の繊維成分から成る直径 0.2~0.4 μm の塊状に観察される。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する(矢印)。(B) やや不明瞭であるが、繊維成分から成る直径 0.2~0.4 μm の塊状に観察される。H12 の存在を示す金粒子は、同様にアルブミン重合体を形成する繊維上に分布する(矢印)

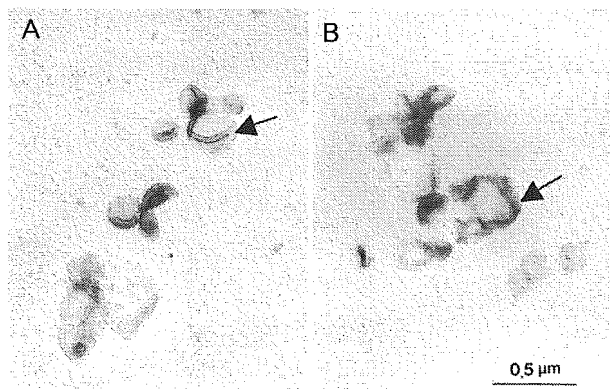


図 2. 凍結超薄切片法による ADP 非内包リポソーム(A)と ADP 内包リポソーム(B)の観察

(A) リポソームは直径 200~400 nm の粒子状または扁平状に観察され、膜は二重膜構造を示す(矢印)。(B) ADP 内包リポソームも同様な構造を示し、特にその内容の違いは見られない。

一方、H12 結合ラテックスを走査型電顕で観察すると、ラテックスは直径ほぼ 2 μm の球状粒子として観察され、その表面は比較的滑らかであった(図 3)。ラテックス表面には H12 の存在を示す金粒子が数は多くはないものの、ほぼ均等に分布した。

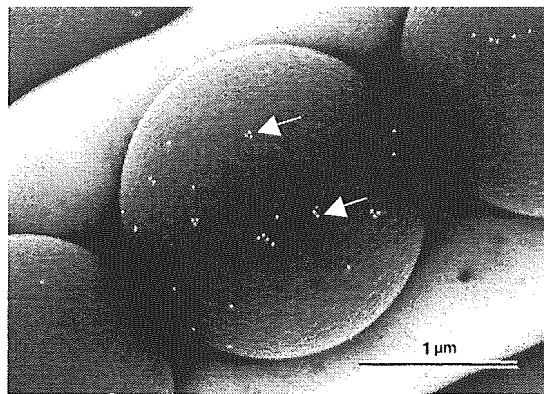


図 3. H12 結合ラテックスにおける H12 の分布
直径約 2 μm のラテックス粒子は滑らかな表面を示す。H12 の存在を示す金粒子がラテックス表面にほぼ均等に分布する(矢印)。

H12 結合 ADP 内包リポソームをネガティブ染色法で観察すると、リポソームは直径 200~400 nm の球状を示した(図 4)。その表面にはビオチンの存在を示すコロイド金粒子が多数分布した。しかし、球状の形態が崩れ、金粒子が非特異的に散在する像も少なからず観察された。

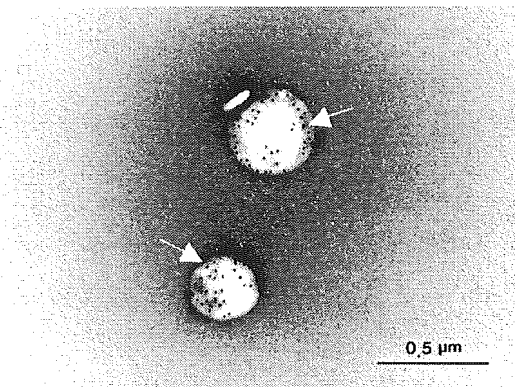


図 4. ネガティブ染色法によるビオチン標識 H12 結合 ADP 内包リポソームの形態

リポソームは球状の小胞として観察されるが、やや大きく 200~400 nm の直径を示している。リポソームの表面にはビオチンの存在を示すコロイド金粒子が分布している(矢印)。

凍結切断レプリカ法で H12 非結合 ADP 内包リポソーム観察すると、本リポソームはネガティブ染色法のそれよりやや小さく、直径 150~300 nm の球状として同定された(図 4)。リポソームは二重膜の外側の E 面 (extracellular face) を示す凹像と細胞質側の P 面 (protoplasmic face) を示す凸像の 2 種類が観察された。両面と

もにその表面は比較的スムーズで、膜内粒子は特に観察されなかった。

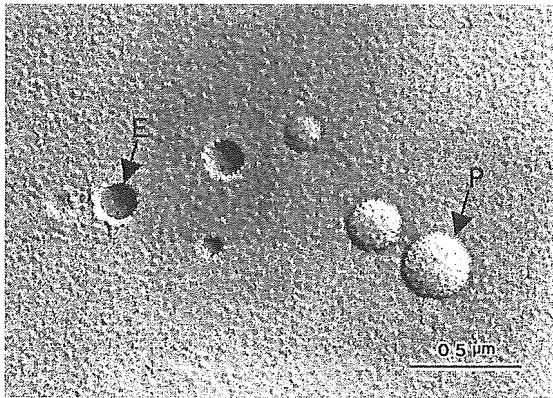


図 5. 凍結割断レプリカ法による ADP 内包リポソームの形態

大部分のリポソームは直径 150~300 nm の球状として観察される。E 面を露出している凹像と P 面を露出している凸像が観察される。両面ともにその表面は比較的スムーズである。

2) H12 結合 ADP 内包リポソームの凝集に対する効果の電顕的解析

ヒト PRP にコントロールの PBS または各種リポソームを加え、1 分後に 0.4 μg/ml コラーゲンを添加すると、PBS では 1 分以上のラグタイムが見られ、その後透過度が緩慢に上昇して約 35% に達し、さらに凝集の解離が観察された (図 6a)。一方、PEG-リポソーム (図 6e)、H12 結合-PEG-リポソーム (図 6d)、ADP 内包 PEG-リポソーム (図 6c) を加えた凝集は、ラグタイムが順次短くなり、透過度も PBS コントロールより上昇した。特に、ADP 内包-PEG-リポソーム (図 6c) および H12 結合 ADP 内包 PEG-リポソーム (図 6b) では、形態変化が迅速に惹起される上に、最高の透過度の上昇を示して解離も見られなかった。

一方、同様の PRP に ADP のみを添加すると、最終濃度 20 μM では添加直後に形態変化の下降曲線が見られ、その後直ぐに直線的に上昇するパターンを示し、約 75% の透過度でほぼ平衡になった (図 7A)。同じく 3.5 μM の ADP の添加では、約 35% の透過度の上昇が見られた後、凝集の解離が観察された (図 7A)。H12 結合 ADP 内包リポソームの ADP 凝集に対する効果を知るために、3.5 μM の ADP 濃度で検討した。前も

って PRP と H12 結合 ADP 内包リポソームを混和し、さらに 3.5 μM ADP を添加すると、ADP のみの時と同様にいったん下降し、その後約 50% の透過度の上昇が見られた (図 7B)。この時、凝集の解離はなかった。一方、コントロールのリポソームを加えた PRP は、約 30% の透過度の上昇が見られた後、凝集が解離した (図 7B)。

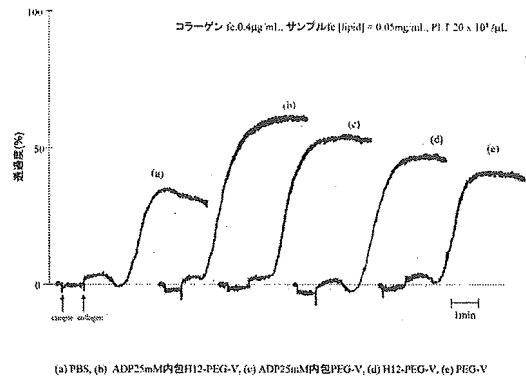


図 6. 各種リポソームのコラーゲン凝集に対する効果

PRP にコントロールの PBS または各種リポソームを加え、1 分後に 0.4 μg/ml コラーゲンを添加すると、PBS では 1 分以上のラグタイム、ゆっくりとした形態変化の後に約 35% の透過度の上昇が見られる (a)。一方、PEG-リポソーム (e)、H12-PEG-リポソーム (d)、ADP 内包 PEG-リポソーム (c) を加えた凝集は、ラグタイムが順次短くなり、透過度も PBS コントロールより上昇する。H12-ADP 内包-PEG-リポソーム (b) では最高の透過度の上昇を示し、解離も見られない。

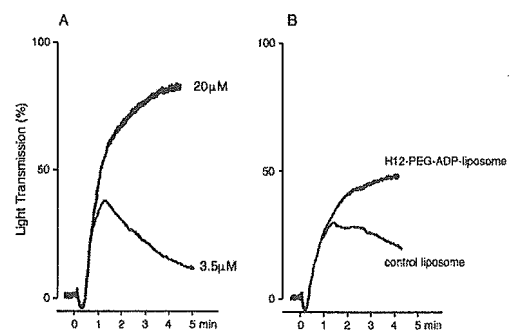


図 7. H12 結合 ADP 内包リポソームの ADP 凝集に対する効果

(A) 20×10^4 個/μl に調製した PRP に ADP を添加すると、最終濃度 20 μM では直線的な透過度の上昇が見られ、約 75% で平衡に達する。3.5 μM の ADP の添加では、約 35% の透過度の上昇が見られた後、凝集が解離する。(B) PRP と H12 結合 ADP 内包リポソームを混和し、さらに 3.5 μM ADP を添加すると、約 50% の透過度の上昇が見られ、平衡に達する。一方、コントロールのリポソームを加えた PRP は、約 30% の透過度の上昇が見られた後、凝集が解離する。

コントロールのアルブミン重合体、同リポソーム、または H12 結合アルブミン、同 ADP 内包リポソームを PRP に混ぜ、さらに ADP を加え、5 分後の凝集を電顕で観察した。PRP とコントロールのアルブミンまたはリポソームを混合し、ADP の添加では、血小板は偽足を出して変形し、相互に接着して小さな凝集塊を形成していた(図 8)。しかし、血小板相互の接着度は弱く、ほとんどの血小板では顆粒が残存していた。一方、H12 結合アルブミンまたは同 ADP 内包リポソームを混合し、ADP の添加では、コントロールに比して大きな凝集塊が形成され、凝集塊中の血小板の変形度および相互の接着度も強かった。顆粒はまだ残存している血小板が少なくなかったが、一部の血小板では消失し、放出反応を示す所見が見られた(図 9)。

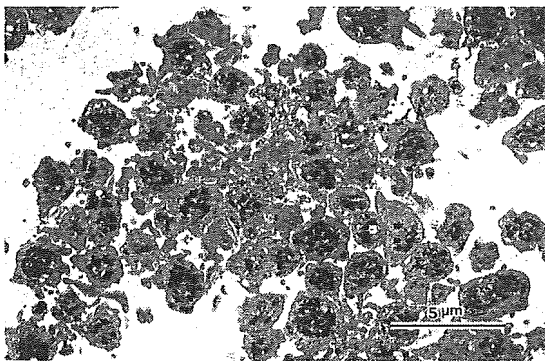


図 8. コントロールリポソーム混和による PRP の ADP 凝集 5 分後の像

血小板は偽足を出して変形し、相互に接着して小さな凝集塊を形成している。しかし、血小板相互の接着度は弱く、ほとんどの血小板では顆粒が残存している。

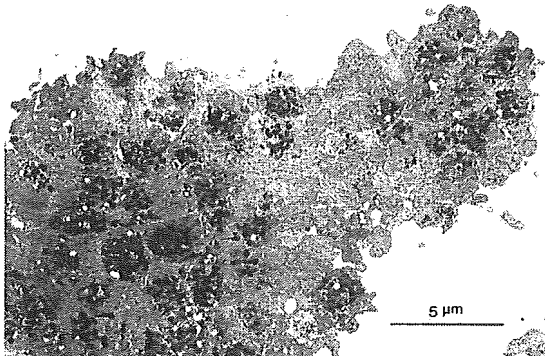


図 9. H12 結合 ADP 内包リポソーム混和による PRP の ADP 凝集 5 分後の像

コントロールに比して凝集塊が大きく、それぞれの血小板の変形度および相互の接着度も強い。血小板内顆粒はまだ残存している血小板が少なくないが、一部の血小板では顆粒が消失し、放出反応を示す所見が見られる。

H12 結合アルブミンまたは同ラテックス粒子を PRP に混ぜ、さらに ADP を加え、惹起される凝集の 5 分後の試料で H12 の分布を免疫電顕的に検討すると、これらの担体は凝集塊の表面および一部の血小板と血小板の間に分布した(図 10、11)。しかし、ADP 凝集時にはほとんど全ての血小板間に存在するフィブリンノゲンとは異なり、一部の血小板間に存在するのみであった。

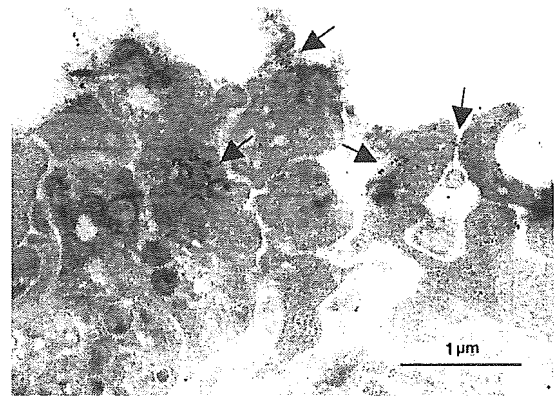


図 10. H12 結合アルブミンを PRP に混ぜ、ADP を加えて惹起される凝集 5 分後の H12 の分布

H12 の存在を示す金粒子は血小板凝集塊の表面および血小板間に分布している(矢印)。

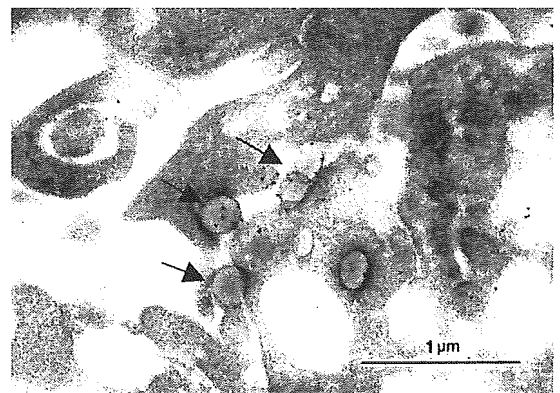


図 11. H12 結合ラテックスを PRP に混ぜ、ADP を加えて惹起される凝集 5 分後の H12 の分布

直径約 300 nm の丸い粒子が観察され、その表面には H12 の存在を示す金粒子が分布していることから、丸い粒子は H12 結合ラテックスであることが分かる(矢印)。ラテックスは凝集塊の血小板間に分布している

抗 H12 抗体を使った免疫電顕法では、凝集血小板間に検出される H12 が予想より少なかったために、H12 結合 ADP 内包リポソームの ADP 凝集においては、本リポソームをビオチン標識したものを使用した。すなわち、PRP と H12 結合 ADP 内包リポソームを混和後、さらに ADP

を加えて5分後に固定し、以下、凍結、超薄切片の作製後、抗ビオチン抗体を使う免疫電顕法で検討した。ADP を加えない無刺激の PRP では、血小板は偽足を伸張しているものも観察されたが、全体的に円盤状を示した(図 12)。顆粒はほとんどの血小板で保持されていた。ビオチンの存在を示すコロイド金粒子は、バックグラウンドレベルにしか分布しなかった。

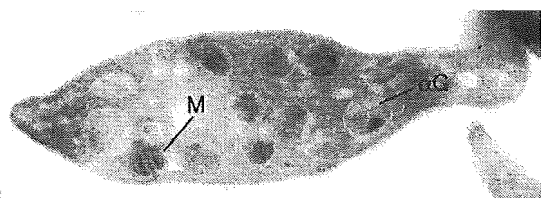


図 12. 多血小板血漿(PRP)中の血小板におけるビオチンの分布

PRP 中の血小板の大部分は円盤状を示す。ビオチンの存在を示すコロイド金粒子はほとんど分布しない。 αG : α 顆粒、M: ミトコンドリア

PRP と H12 結合 ADP 内包リポソームを混和後、さらに ADP を加えて5分後の血小板は、変形して比較的大きな凝集塊を形成していた(図 13)。凝集塊における血小板相互の接着は、中心部では密着しており、辺縁部では粗な部分も観察された。円状に分布した多数のコロイド金粒子を持つ H12 結合 ADP 内包リポソームは多くは観察されなかったが、一部の血小板間に分布していた(図 13 矢印)。

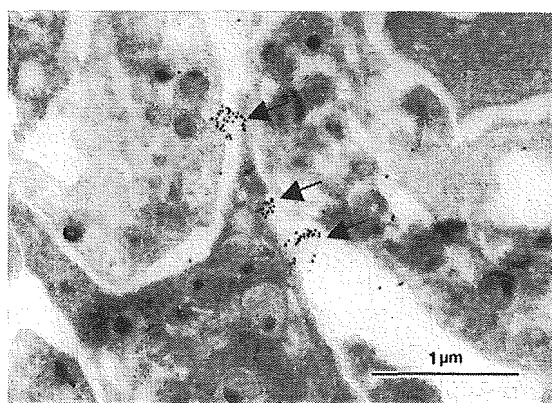


図 13. PRP に H12 結合 ADP 内包リポソームを混ぜ、さらに ADP を添加した凝集5分のビオチンの分布

血小板は凝集しているが、一部の顆粒は細胞質内に残存している。ビオチン標識したリポソームは、比較的疎な血小板間で多数のコロイド金粒子から成るが円状のクラスターとして検出される(矢印)。

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 γ 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 16 年度、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。PRP と H12 結合アルブミン重合体または同ラテックスを混ぜ、ADP を添加した時、コントロール担体と比べると凝集を促進させた。さらに免疫電顕的に、これらの H12 結合担体は血小板間に検出された(図 10、11)。従って、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ことを形態学的に明らかにした。しかし、ADP 凝集時において全ての血小板間に存在するフィブリノゲンの分布と比較すると、H12 結合担体の分布は部分的であった。これは抗体の特異性はあるものの、必ずしも抗体の力価が必ずしも十分でなかったためと考えられた。

さらに 17 年度は、新規に調製された H12 結合 ADP 内包リポソームの PEG の末端にビオチンを標識することによって、凝集血小板間に分布すると予想される本リポソームを市販の抗ビオチン抗体で検出することを試みた。ビオチン標識した H12 結合 ADP 内包リポソームを抗ビオチン抗体によるネガティブ染色法で観察すると、本リポソームは直径 200~400 nm の球状を示し、その表面にはビオチンの存在を示すコロイド金粒子が多数分布した(図 4)。この結果より、ビオチン標識は凝集時に血小板間に存在すると予想される H12 結合 ADP 内包リポソームを形態学的に識別しうる有効なツ-

ルになることが示唆された。

ところで今回、ネガティブ染色法に加えて、H12 非結合 ADP 内包リポソームを凍結割断レプリカ法で観察した。ネガティブ染色法は試料を膜メッシュ上で風乾するために、水が乾燥する時に生じる表面張力によって試料のアーティファクトが生じることが考えられる。約 200 nm に調製されたリポソームであるが、やや大きく観察されたのはそこに起因していると考えられた。一方、凍結割断レプリカ法は試料に氷晶が生成しないように急速凍結し、レプリカ膜を作製するまで凍結状態で行う。従って、試料形態の保存は優れていると考えられる。また、試料は白金で影付けによって陰影を持つ三次元像を示し、ネガティブ染色法より立体的に観察できること、さらに膜内粒子をも観察できることの特徴をもつ。今回の検討では、リポソームはネガティブ染色法の結果よりやや小さい直径 150~300 nm の球状を保った小胞として観察された(図 5)。この結果は凍結割断レプリカ法が、よりアーティファクトのない正確な形態を示す方法と考えられた。さらに、リポソームは二重膜の外側の E 面 (extracellular face) を示す凹像と細胞質側の P 面 (protoplasmic face) を示す凸像の 2 種類が観察され、両面ともにその表面は比較的スムーズであった。膜内粒子は観察されなかった。以上の結果より、凍結割断レプリカ法はリポソームの形態および性状検索に有効な手段と考えられた。

次いで、ビオチン標識した H12 結合 ADP 内包リポソームの ADP 凝集における関与を検討するために、抗ビオチン抗体を使う凍結超薄切片法を実施した。H12 結合 ADP 内包リポソームを添加した ADP 凝集では、コントロールのリポソームを添加して形成される凝集が解離するのに対して、凝集が促進され、より大きな凝集塊が形成された(図 7)。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。免疫電顕法では、一部の凝集塊表面および血小板間には決して多くはないが、ビオチンを指標にした H12 結合 ADP 内包リポソームが検出された。しかし、抗 H12 抗体を使った時と同様に、H12 結合担

体の分布は一部の血小板間に限定していた。すなわち、H12 結合担体の血小板を相互に接着させる能力はフィブリノゲンには及ばないものの、少なくとも血小板減少時の凝集を補助、促進させる人工血小板としての能力をもつことが明らかになった。

E. 結論

H12 を結合させたアルブミン重合体、同リポソームは、血小板減少症状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。さらに H12 結合リポソームを PEG 化、ADP の内包によって、血小板凝集促進作用はさらに向上した。平成 15-17 年度の検討では H12 結合担体の有効性のメカニズムを明らかにするために、ADP 凝集時において、H12 結合アルブミンの分布をウサギ抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で検出した。また、同様の ADP 凝集において、ビオチン標識 H12 結合 ADP 内包リポソームの分布を市販の抗ビオチン抗体を使って検討した。これらの H12 結合担体は ADP 凝集塊の一部の表面および血小板間には検出された。すなわち、H12 結合担体は ADP で惹起された凝集の一部の血小板間に介在して血小板減少時の凝集を促進させ、本担体は血小板の代潜物としての能力を持つことを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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.
2. 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潜物の展開. *人工血液*, 11:

205-210, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成15—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
分担総合報告書

ヒトへの投与を前提とした人工血小板の止血能と血栓性の評価に関する研究

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

人工血小板を臨床応用するに当たって、人工血小板による止血能の増強に伴う血栓性の亢進が懸念される。止血能のみを増強し、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患の合併を増加させない人工血小板の設計のためには、開発した人工血小板の止血能と血栓性を簡易に評価する評価系の開発が必須である。われわれは、止血能の評価にあたって、創傷により血流に曝露される血栓性マトリックスであるコラーゲンを固相化したガラス表面上にヒト血液を灌流して、血小板によるコラーゲンの被覆を定量化する方法を開発した。血管の損傷部位が被覆されれば止血には十分であるのに対して、血栓が3次元的に成長して血管を閉塞するほど大きくなる、あるいは末梢血栓を惹起することが血栓性合併症の発症につながることから、コラーゲン上の血小板血栓のz軸方向の成長は血栓性の指標になると考えた。各種サイズのアルブミン重合体を担体とし、各種の機能蛋白を結合させて作成した人工血小板の止血能と血栓性を *ex vivo* 流動状態下で評価した。また、血栓性疾患の代表である急性心筋梗塞を惹起した冠動脈の閉塞血栓を組織学的に検討し、病的血栓の形成に関与する因子を検討した。両者の比較によりわれわれの *ex vivo* 評価系の妥当性を検討した。

A. 研究目的

世界的に心筋梗塞、脳梗塞などのアテローム血栓症が増加している¹。アテローム血栓症の予防を目的として抗

血小板薬が使用される機会も増加している¹。アスピリン、チクロピジンに代表される抗血小板薬は血小板の機能を非可逆的に阻害する。抗血小板薬

服薬中に冠動脈バイパス手術、内視鏡手術などの必要が生じた場合にも、服薬中止後血小板機能の回復には数日以上が必要となってしまう。緊急手術などの歳には資源の限られた、かつ感染リスクのある血小板輸血が唯一の対処法であった。強力な抗血小板薬の開発とともに、急速に止血能を回復させる人工血小板の必要性が増加している。

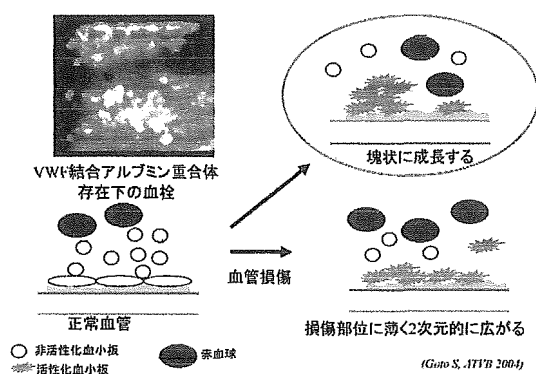


図1. 病的血栓の形成

止血能の回復を目指す人工血小板には血栓性合併症を増加させるリスクが内在する²。人工血小板の開発にあたって止血能を亢進させつつも、血栓性を亢進させるリスクの少ない担体と機能蛋白を選択する必要がある。止血には血小板血栓の2次元的成長が重要であるのに対し血管を閉塞する、あるいは末梢塞栓を惹起する血栓は3次元的に血管内腔方向に成長するとの特徴を有する³。両者の特徴に注目し、止血能と血栓性を分けて評価するスクリーニング系の開発を目指して

研究を行った。

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。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/ μ 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血栓性の評価に用いた。

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 Willerand 因子結合アルブミン重合体、2) GPIb α 結合アルブミン重合体、3) GPIa/IIa 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。アルブミン重合体はサイズ 300 nm から 1,500 nm までの異なるサイズを用いて止血能と血栓性におよぼす効果を比較検討した。

創傷、血管損傷のモデルとして内皮損傷部位で血流に曝露されるコラーゲンを固相化したガラス板上に、全血を 1,500 s^{-1} のずり速度の条件で灌流する装置を用いた。止血能の指標として

血小板によるコラーゲンの被覆率を蛍光顕微鏡により評価した。また、血栓性の評価として、血小板血栓の3次元形態を、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。

将来人工血小板に結合させる蛋白の候補として、今回用いたリガンド側であるH12ではなくて、受容体である活性型の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、3次元成長とのかかわりについて検討した。将来アルブミン重合体に結合させる機能蛋白として活性型GPIIb/IIIaが適当であるか否かを検討した。

血栓性の評価に用いたex vivo流動状態下の評価の妥当性を明らかにするために、代表的な血栓性疾患である心筋梗塞を惹起した冠動脈血栓の組織学的検討を行った。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^{4,5}。

(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、研究参加に同意しても、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

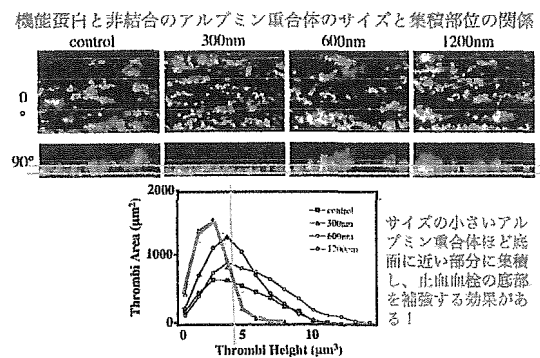


図 2. アルブミン重合体のサイズが血栓の2次元、3次元成長におよぼす効果

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。

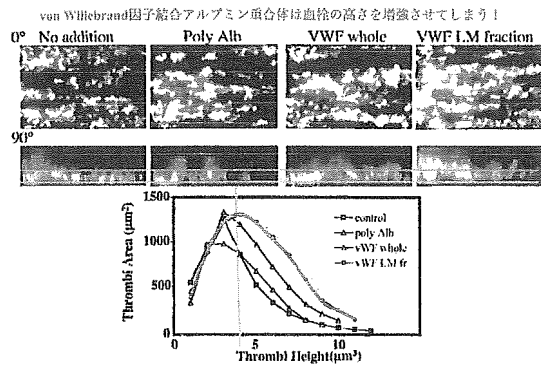


図 3. von Willebrand 因子結合アルブミン重合体は3次元形態を有する血小板血栓の上部に選択的集積する傾向を呈した

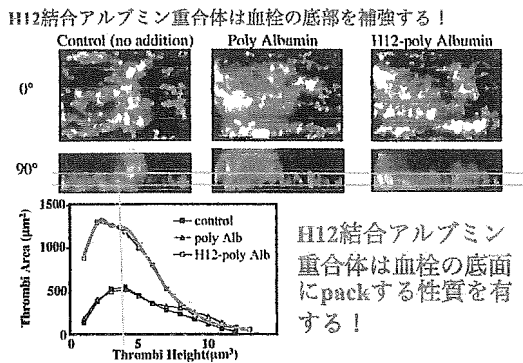


図 4. H12 結合アルブミン重合体はむしろ血栓の底部に集積して止血血栓を安定化させる効果を有した。

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 GPIb α 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 GPIa/IIa 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！

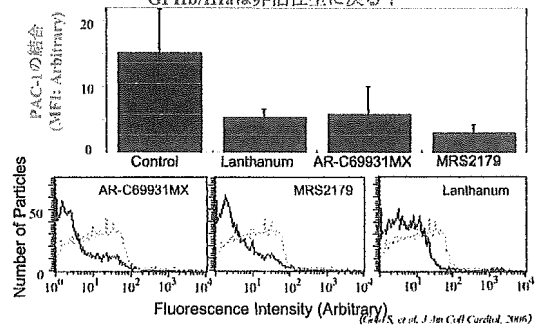
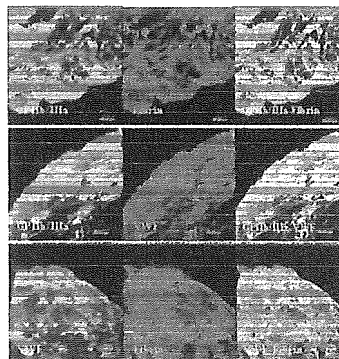


図 5. GPIIb/IIIa の活性化構造の維持における持続的 ADP 受容体刺激とカルシウム流入の必要性

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、引き続き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⁶。



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！

(Hawkins et al. Am J Cardiol, 2004)

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^{4,5}

D. 考察

人工血小板の止血能と血栓性を分けて評価するヒト血液を用いた ex vivo 評価システムを作成した。本システムを用いると、von Willebrand 因子—GPIIb/IIIa 系が血栓の3次元成長に重要な役割を果たすことが示唆された。担体として各種サイズのアルブミン重合体を用いた検討では、サイズの小さいアルブミン重合体が止血能の促進には有用であることが示唆された。

この ex vivo 評価システムの妥当性を臨床検体との対比により検討した。すなわち、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ることを示した。われわれの 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。

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、3次元成長について、さらに検討が必要と考えられた。

E. 結論

- 1) ヒト血液を用いた人工血小板の止血能、血栓性の ex vivo 評価システムを開発した。
- 2) ex vivo の評価の結果、担体としてはサイズの小さいアルブミン重合体を用いることが止血能の選択的増強に有利であることが示唆された。
- 3) 機能蛋白としては von Willebrand 因子—GPIIb/IIIa 系は血栓性合併症のリスクが増えることが懸念された。コラーゲン受容体 GPIIb/IIIa ないし H12 が適切と考えられた。
- 4) 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. Cilostazol: Potential mechanism of action for

- antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. *Atheroscler Suppl.* 2005.
3. Goto S. Propagation of Arterial Thrombi-Local and Remote Contributory Factors-. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2004;in press.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

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

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)
平成 15-17 年度 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 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)
平成 17 年度に関しては、梶村が研究分担者に、末松が研究協力者へと変更

研究要旨

止血や病的血栓形成の mechanism 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、血流速度を勘案した条件下で止血血栓形成・崩壊プロセスを二次元および三次元的に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。これにより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的評価が可能となった。

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。

研究初年度の平成 15 年度には、本研究班で開発された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)の微小循環内における挙動を解析した。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きた。しかしながら、リポソーム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、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)の挙動を *in vivo* で解析することを試みた。その結果、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ことなく、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ことが確認された。

平成 16-17 年度は、前年度に構築した新規 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 parameter (障害サイズ、flying thrombus のサイズおよび発生頻度など) を *in vivo* で測定した。これにより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 algorithm や parameter 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 intravital microscope で観察した。Wistar 系雄性ラット (200 - 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) 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 488 nm 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

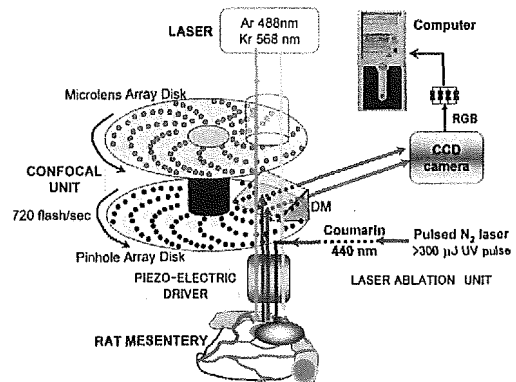


図 1. 生体顕微鏡システム

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. Drug treatment

PDE inhibitor (100mg/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. 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 α -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 microL/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) を測定し、blood brain barrier および neural dysfunction の指標とした。

B-4. 2D 画像解析法

記録した蛍光画像をもとに、血管内から漏出した Rhodamine 標識-liposome の分布と量の半定量的解析を行った。血管壁上の窒素レーザー照射部位 (point of injury) を中心とし、血管の長軸方向、あるいは法線方向に軸を設定し、内皮下腔に漏出した蛍光の強度を 8-bit gray level (0-255) で測定した。測定には汎用画像解析ソフト (MetaMorph 6.1, Universal Imaging Corporation) を用い、血管の長軸に沿って 2 micron ごと、あるいは法線に沿って 5 micron ごとに gray level を測定した (図 2)。Gray level の測定は各単位 μm 内で 10 箇所程度の測定値の平均値を代表値とし、4 匹の異なる動物、異なる細動脈、細静脈において測定した平均値 (標準誤差) で data を表現した。

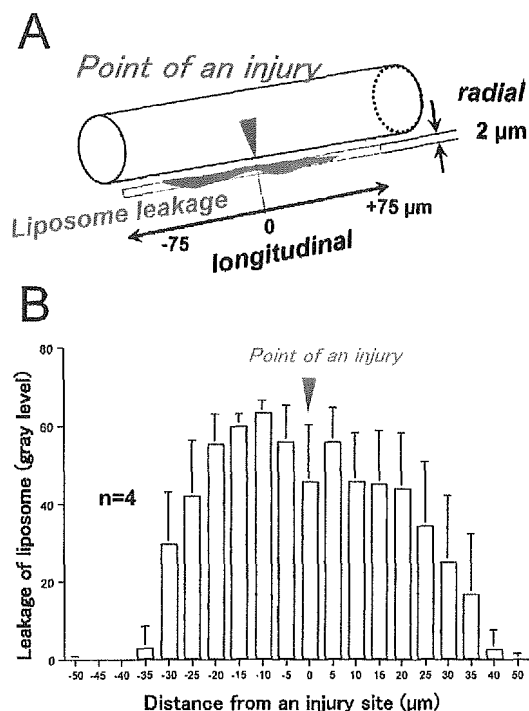


図2. 細動脈・血管障害部位でのリポソームの集積パターン A. 解析模式図 B. リポソームの漏出と集積、矢印：レーザー照射部位

B-5. 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。

B-6. Laser ablation による微小血管上への血栓形成

前述した (B-1) 生体顕微鏡システムと微小循環観察記録システムとほぼ同様の

セットアップで実験を行った。唯一の modification は長時間持続しての記録を可能にするため computer hard disk への書き込みは行わず、analog video recorder に記録した。

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-7. 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、の各群である。

血流速度は、free flow の CFSE 標識-血小板の center line velocity を測定した。障害部位の size の測定は、z-plane の optical sectioning を行った画像を digital 変換し、画像解析ソフト(MetaMorph 6.1, Universal Imaging Corporation)を用い前述の方法で行った。血栓の size や形状も、MetaMorph を使用し、ROI (region of interest) を指定することにより得られる pixel 数の情報を基に算定した。

B-8. 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. 正常微小循環における liposome の挙動

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。これらの血小板は画面上で緑色の破線状に撮像された (図 3B)。Rhodamine B

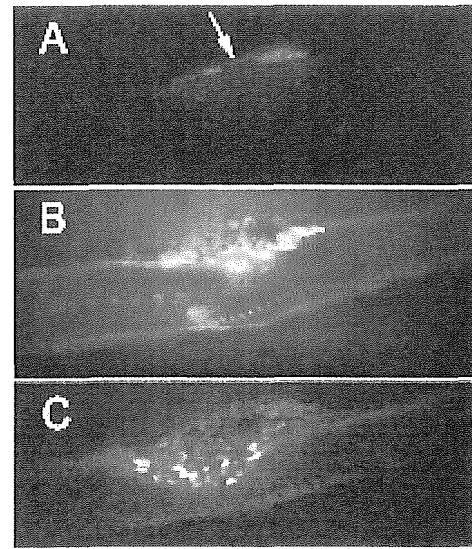


図 3. Laser ablation 後の細静脈内・近傍での liposome・血小板の挙動 A. liposome B. 血小板 C. Merge、矢印：レーザー照射部位

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 3 は細静脈における 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集塊が形成された。図 3A 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. *Rhodamine* 標識-liposome の血管内皮下腔への集積

図 4 に細動脈における障害部位での liposome 集積の解析結果を示す。解析は liposome の漏出と集積が定常状態に達する ablation 後 5 分後以降に行った。



図 4. 細動脈における血管障害部位での liposome の集積。血管内皮下腔と想像される部位に集積をずる liposome。矢頭；レーザー照射部位。

これらのデータの平均値をグラフ化したものが図 2B であり、Point-of-injury を中心として約 30 μm 内外に集中して liposome が集積することが確認された。また法線方向での解析でも point-of-injury を中心として限局した集積を示し、障害部位反対側への粒子の移行はわずかであった。

一方細静脈においては障害部位を中心として約 40 μm の幅をもって集積が起こった。法線方向の分布も細動脈の際とほぼ同様であったが、時に障害部位と反対側の血管壁への liposome の移行が見られる場合があった。

C-4. 血管障害部位および血栓の三次元構築

図 5 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 6 にラット腸間膜細静脈壁で laser

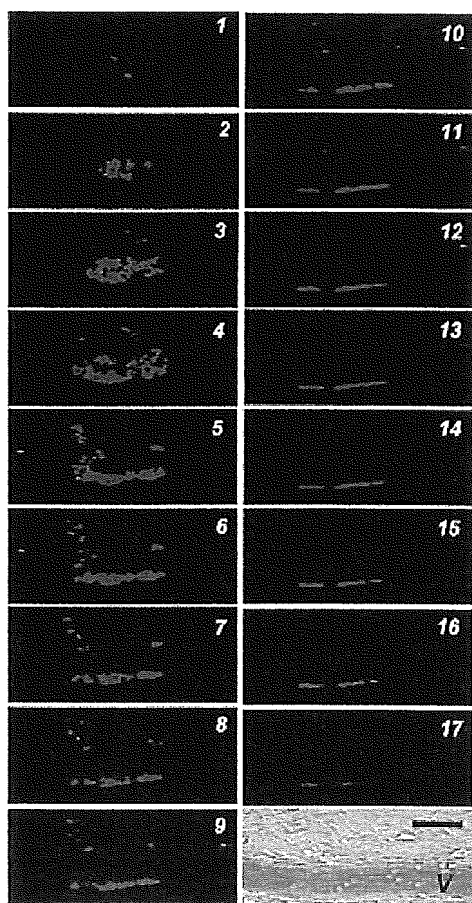


図 5. liposome にコートした rhodamine の蛍光強度を指標とした血管障害部位の三次元構築。Gray level 60 を閾値とし、それ以上の蛍光強度の point を緑でハイライトした(Panel 1-17, optical section の厚さは 2.5 micron)。これらを積算し、total injury area、 $6600 \mu\text{m}^2$ を算定した。Scale, 30 micron.

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。

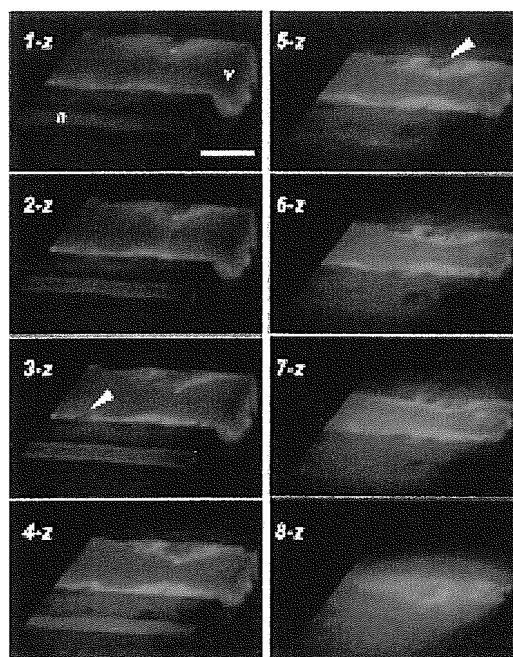


図 6. Laser ablation による破綻性出血により形成された血小板血栓の三次元構築。Panel 1-z から 8-z は z 軸方向の slicing。矢頭、血栓内に trap された leukocyte。Scale, 20 micron.

C-5. 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 histamine 表面灌流による functional な障害モデルで、liposome の挙動を検討した。

図7にラット腸間膜に histamine を表面灌流した時の細静脈血管壁透過性の経時的变化を示した。Histamine 表面灌流後、water permeability (L_p , slope)は増加し、6分後に最大値に達した(図7A)。図7Bに同じ data を re-plot した。

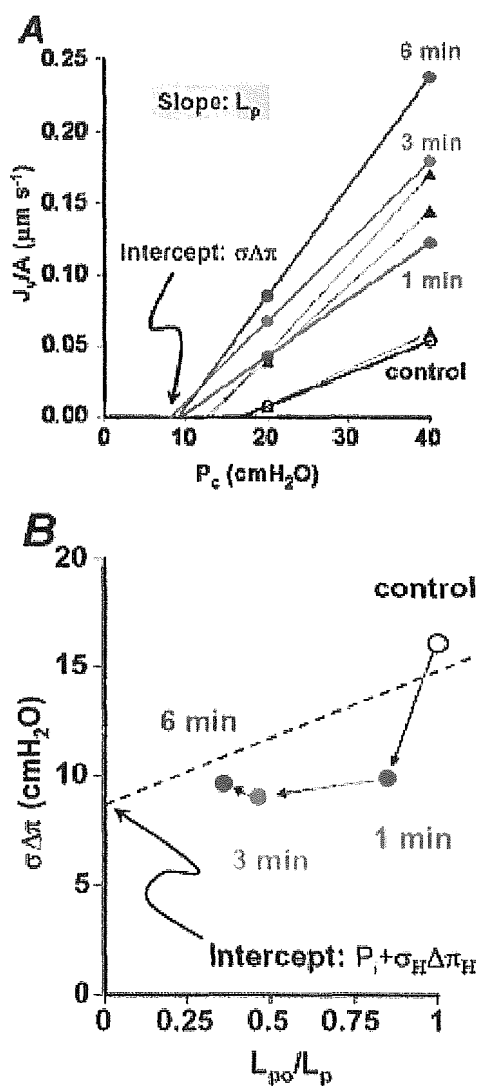


図7. Histamine 表面灌流によるラット腸間膜細静脈血管壁透過性の経時的变化。Histamine (30 microM)により water permeability, L_p は増加、effective oncotic pressure, $\sigma\Delta\pi$ は減少した。

横軸に control L_p を test L_p で割った値を、また縦軸には gap の size の評価の指

標となる effective oncotic pressure ($\sigma\Delta\pi$) を plot した。 $\sigma\Delta\pi$ は 1 分後で大きく減少し、3 分後、6 分後ではさらなる減少は認められなかったことから、定常状態では存在しない liposome が透過できるサイズの大きな gap は、比較的早い time point で形成されることが示唆された。

図8には腸間膜細静脈壁への liposome の集積を二次元および三次元の image で示した。

表面灌流開始後 23 秒では leukocyte がある部分に liposome の集積がみられ、1 分後には血管壁が竹の節のように顕著な rhodamine の蛍光がみられた。2 分後以降ではさらなる集積はみとめられなかった。この変化は、図7で示した GAP formation の time course と一致していることが判明した。

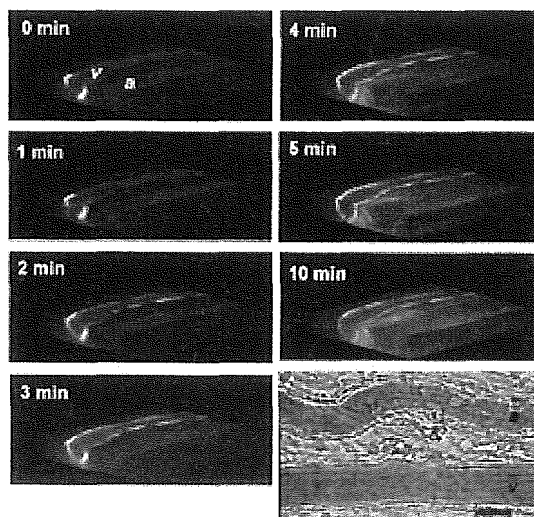


図8. Histamine 表面灌流によるラット腸間膜細静脈壁でのリポソーム集積の経時的变化。