

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業)
分担研究報告書

血小板減少ウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と
腹部手術モデルでの止血能評価

分担研究者 池田 康夫 (慶応義塾大学 医学部 血液内科, 教授)
研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
岡村 陽介 (早稲田大学 理工学研究所, ヒューマンサイエンス振興
財団研究員)
江藤 薫子 (早稲田大学大学院 理工学研究科, 修士 1 年)
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 血液内科, 研究員)

研究要旨

血小板止血機能を補助する微粒子系の開発において、フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV: H12) をポリエチレングリコール (PEG) 鎖末端に担持させたリン脂質小胞体は、活性化血小板表面にある活性化状態の GPIIb/IIIa を認識し、血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少症モデルラットの出血時間を短縮させることに成功した¹⁾。平成 18 年度には、更なる止血能の向上を目指し、血小板凝集惹起物質であるアデノシン 5'-二リン酸 (ADP) を内包させた (H12-(ADP)小胞体)。これは、血小板凝集塊の中でのみ特異的に ADP を放出することで止血能を増幅させ、血小板輸血群に匹敵する効果を発現した。

平成 19 年度は、血小板減少ウサギを用いて H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と血中濃度推移との関係を明らかにすると共に、血小板減少患者の外科手術への適応を想定し、従来の出血時間測定系よりも出血性の高い評価系 (腹部手術モデルの出血量測定法) を新たに確立し、止血能の測定を行った。まず、H12-(ADP)小胞体を 20、40 mg/kg で投与したところ、生理食塩水群、(ADP)小胞体群と比較して投与 6 時間後まで有意に高い止血効果を示すことを明らかにした。この効果は、H12-(ADP)小胞体の血中濃度に依存し、有効血中濃度は 100 mg/mL 以上であると算出された。他方、腹部手術モデルの出血量測定法を確立した。この評価法を用いて血小板減少症モデルウサギに H12-(ADP)小胞体を投与したところ、投与量依存的に出血量を有意に減少させ、血小板輸血群のそれに匹敵した。従って、血小板減少患者の外科手術に対する H12-(ADP)小胞体の適応の可能性も示すことができた。

A. 研究目的

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV: H12)をポリエチレングリコール(PEG)鎖末端に担持させたリン脂質小胞体は、活性化血小板表面に活性化状態にある GPIIb/IIIa を認識し、血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少症モデルラットの出血時間を短縮させることを既に報告してきた¹⁾。平成 18 年度には、止血能の更なる向上を目的とし、アデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた。これは、血小板凝集塊でのみ特異的に ADP を放出することで止血能を増幅させ、血小板輸血群に匹敵する効果の発現に成功した。

平成 19 年度は、血小板減少モデルウサギを用いて H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と血中濃度推移との関係を明らかにすると共に、血小板減少患者の外科手術への適応を想定して腹部手術モデルの出血量測定法を新たに確立し止血能測定を行った。

1) Okamura, Y. *et al. Bioconjugate Chem.* **16**, 1589-1596 (2005).

B. 研究方法

1. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成

1.1. Glu2C18 の合成

グルタミン酸(2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物(4.56 g, 24 mmol)をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた(105 °C, 1 hr)。この系にステアリアルアルコール(11.9 mg, 44 mmol) を添加して沸点還流させた(105 °C, 14 hrs)。溶媒を減圧除去後、残分をクロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で 2 回、水 150 mL で 2

回分液洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧除去した。メタノール再結晶、濾過後、乾燥させて白色粉末 Glu2C18(13.3 g, 収率 85 %)を得た。

1.2. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MALPEG-Glu2C18)の合成

クロロホルム 10 mL 中に Glu2C18(575.5 mg, 880 μ mol)、TEA(122.5 μ L, 880 μ mol)を添加後、MALPEG-NHS(Mw:3400, 1.5 g, 279 μ mol)を溶解、攪拌した(r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した後、エタノール再結晶を経てベンゼン中に溶解し凍結乾燥後、淡黄色粉末 MALPEG-Glu2C18(1448.1 mg, 収率 70 %)を得た。

1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成

MAL-PEG-Glu2C18(1000 mg, 253.7 μ mol)と C 末端にシステインを結合させた H12(328 mg, 253.7 μ mol)を DMF 10 mL に溶解、攪拌した(r.t., 72 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製後、メタノールにて抽出し、シリカゲルカラムにて精製した(展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水 = 65/25/4, v/v/v)。真空乾燥後、ベンゼンに溶解させて凍結乾燥し、白色粉末 H12-PEG-Glu2C18 (427.6 mg, 収率 32 %)を得た。

2. H12-(ADP)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl choline (DPPC) (1000 mg, 1.36 mmol)、cholesterol (527 mg, 1.36 mmol)、1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate

(DHSB) (190 mg, 136 μmol)、PEG-DSPE (47.4 mg, 8.17 μmol)、H12-PEG-Glu2C18 (43.4 mg, 8.17 μmol)をベンゼンに溶解させ、凍結乾燥させた (DPPC/cholesterol/DHSB/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.03/0.03, モル比)。ADP 水溶液(1 mM)にて水和させ、押出造粒法を用いて H12-(ADP)小胞体を調製した(粒径 250 ± 80 nm)。超遠心分離後(33000 rpm, 30 min, 4 °C)、PBS に分散させ小胞体分散液とした。さらに、小胞体分散液をゲルろ過(Sephadex G25)し、外水相に微量に残存する ADP を完全に除去した。

3. 血小板減少症モデルウサギを用いた耳介周囲部位の出血時間測定

ニュージーランドホワイトウサギ(雄性, 11 週齢, 2.5 kg)は、三協ラボサービス(株)より購入した。ケタミン(60 mg/mL)とセラクタール(2 %)の混合溶液(ケタミン/セラクタール = 3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔後、ブスルファン ポリエチレングリコール溶液(10 mg/mL)を 0、3 日目に下腹部皮下投与した(全投与量 30 mg/kg)。投与開始後 15 日目を血小板減少症モデルウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4$ / μL)とした。ケタミン/セラクタール麻酔後、23G 翼状針を装着したシリンジポンプにて試料(H12-(ADP)小胞体([lipid] = 20, 40 mg/kg)、生理食塩水、ウサギ多血小板血漿(PRP, [PLT] = 10, 50, 100 $\times 10^4$ / μL))を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与開始から 30、180、360、540 分経過後、耳の血管が目視できない部位に外科用メス(No. 11)を用いて切傷した(長さ 6 mm)。耳の切傷部位を生理食塩水中に浸し出血時間を測定した。

4. 血中濃度推移の測定法

Diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiOC₁₈)標識 H12-(ADP)小胞体あるいは(ADP)小胞体を血小板減少症モデルウサギに耳静脈から投与し([lipid] = 20, 40 mg/kg)、経時的に採血した。遠心分離後(10000 rpm, 5 min, r.t.)、得られた上清に deca(oxyethylene) dodecyl ether (C₁₂E₁₀)を添加し、蛍光測定した(ARVOTM SX, E_x = 485 nm, E_m = 500 nm)。

5. 血小板減少症モデルウサギの腹部手術モデルを用いた出血量測定

血小板減少症モデルウサギに H12-(ADP)小胞体あるいはウサギ PRP を耳静脈より投与し([lipid] = 40 mg/kg, [PRP] = 10, 50, 100 $\times 10^4$ / μL)、0.5mL/min、4mL/kg)、前腹壁にメス(No.11)で傷(長さ 5 cm、深さ 0.3 cm)をつけた。あらかじめ重量を測定したガーゼ(5 \times 5 cm)を傷口に乗せ、5 分間血液を吸収させた後、ガーゼの重量を測定し、出血量を算出した(Fig. 1)。

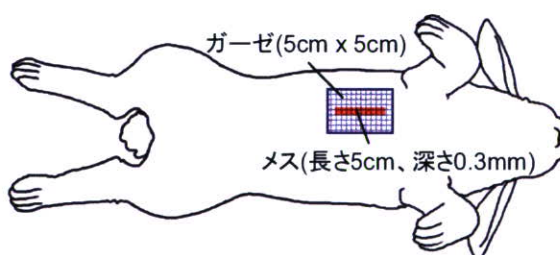


Fig. 1 Surgery wound model in thrombocytopenic rabbits.

6. ラット、ウサギ、ヒト血小板を用いた H12 の ADP 凝集阻害能

ラット全血(1/10 (v/v) 3.18 % クエン酸ナトリウム)²⁾、ウサギ全血(1/10 (v/v) 3.8 % クエン酸ナトリウム)、ヒト全血(1/10 (v/v) 3.8 % クエン酸ナトリウム)を遠心分離して(600 rpm, 15 min, r.t.)、PRP を得た。PRP([PLT] = 20 $\times 10^4$ / μL)に濃度の異なる

H12 水溶液(f.c. 0.125-4 mM)を添加後、5 分間振とうさせた。ADP(f.c. 20 μ M)にて血小板凝集を惹起させ、血小板凝集計を用いて透過率変化を測定しIC₅₀を算出した(SAS 前臨床パッケージ Version5.0)。

(2) Sudo, T. *et al.*, *Platelets*, **14**, 239-246 (2003).

C. 研究結果及び考察

1. 出血時間測定による H12-(ADP)小胞体の止血能持続効果と血中濃度推移

血小板減少症モデルウサギに生理食塩水を投与したところ(4 mL/kg)、出血時間は 1695 ± 197 秒であり、正常ウサギのそれ (112 ± 24 秒)と比較して約 15 倍延長した。H12-(ADP)小胞体をそれぞれ 20、40 mg/kg で投与したところ、投与 30 分後の出血時間はそれぞれ 442 ± 45 秒、 534 ± 227 秒と有意に短縮した。H12-(ADP)小胞体を投与してから 180、360、540 分後の出血時間を測定したところ、20 mg/kg ではそれぞれ 1123 ± 467 、 1259 ± 646 、 1517 ± 330 秒、40 mg/kg ではそれぞれ 674 ± 341 、 858 ± 361 、 1556 ± 337 秒と計測でき、投与 6 時間後までは、生理食塩水投与群と比較して有意に出血時間の短縮効果が維持できることが明らかとなった(Fig. 2 ▲, ●)。

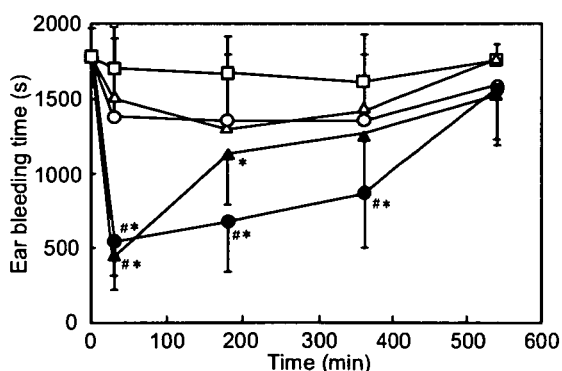


Fig. 2 Prolonged hemostatic abilities of H12-(ADP) vesicles at doses of 20 (▲), 40 (●) mg/kg, (ADP)vesicle at doses of 20 (△), 40 (○) mg/kg and saline (□) ear bleeding time (N=5-9). *P<0.05 vs. saline group. #P<0.05 vs. (ADP)vesicle group.

他方、生理食塩水あるいは(ADP)小胞体をそれぞれ 20、40 mg/kg で投与しても出血時間の短縮は見られなかったことから (Fig. 2 □, △, ○)、止血における H12 の必要性も再確認できた。

H12-(ADP)小胞体を 20、40mg/kg にて投与し、経時的に採血した後の上清の蛍光測定から血中濃度を測定したところ、Fig. 2 に示す止血効果は H12-(ADP)小胞体の血中濃度推移(血中半減期 T_{β1/2}: 522±30 分)と相関しており、血中濃度を約 100 μ g/mL 以上を保てば止血機能を維持できると算出された(Fig. 3)。

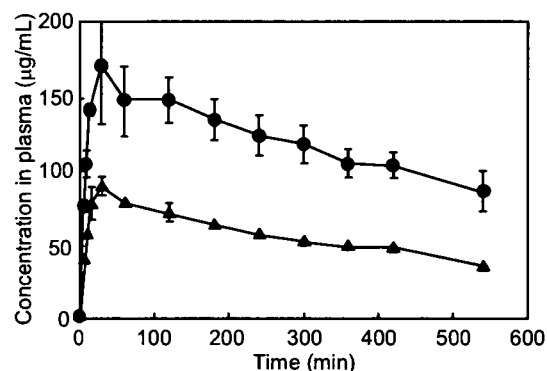


Fig. 3 Concentration of H12-(ADP)vesicles at doses of 20 (▲), 40 (●) mg/kg in plasma.

2. 腹部手術モデルを用いた止血能効果

血小板減少症モデルウサギに生理食塩水を投与したところ、出血量は 4.4 ± 1.5 g であり、正常ウサギのそれ (1.0 ± 0.3 g)と比較して約 4.5 倍増大した。陽性対照群としてウサギ血小板を 0.4×10^9 、 2.0×10^9 、 4.0×10^9 PLT/kg で投与したところ、血小板数依存的に出血量を減少させ (4.8 ± 1.3 、 2.6 ± 1.5 、 1.3 ± 0.8 g)、出血時間測定と相関する結果が得られた。そこで、H12-(ADP)小胞体を 20、40 mg/kg で投与したところ、出血量はそれぞれ 3.4 ± 1.3 、 2.5 ± 1.5 g であり、生理食塩水群と比較して有意に減少させ、血小板投

与群に匹敵する効果を得た(Fig. 4)。他方、(ADP)小胞体投与群では減少効果は見られなかった(20 mg/kg: 4.6 ± 2.0 g, 40 mg/kg: 4.7 ± 2.5 g)。耳介周囲の出血時間測定では、20 mg/kg で血小板輸血群(4.0×10^9 PLT/kg)に匹敵する効果であったのに対し、腹部手術モデルでは、投与量 2 倍(40 mg/kg)で血小板輸血群(2.0×10^9 PLT/kg)の出血量と同等の効果と算出された。これは腹部手術モデルがより出血性の高い実験系であるためと考えられる。しかし、H12-(ADP)小胞体は腹部手術モデルにおいても出血量を顕著に減少させる効果を実証され、血小板減少患者の外科手術への適応の可能性が示された。

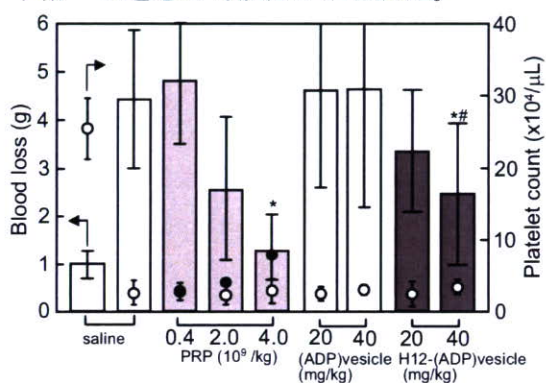


Fig. 4 Effects of the administration of H12-(ADP)vesicles and PRP on blood loss of anterior abdominal wall. The administered amount of H12-(ADP)vesicle was 20, 40 mg/kg, and PRP was 0.4, 2.0, 4.0×10^9 /kg. ○; platelet count in the rabbits before administration; ●; platelet count in the rabbits after administration (N = 6-9). *P<0.05 vs. saline groups, #P<0.05 vs. (ADP)vesicle group. (30 minutes after injection)

3. ラット、ウサギ、ヒト血小板の種差の相違による ADP と H12 の反応性

3.1. ADP の反応性

ラット PRP に ADP を添加し凝集させたところ、ADP 添加濃度の増大と共に透過率は上昇したが、2 次凝集には至らなかった。ウサギ PRP も同様に 2 次凝集には至らなかったが、ラット PRP と比較して透過率は増大し、ADP の反応性が高いことが示された。

さらに、ヒト PRP では、2 次凝集まで亢進し、最も ADP 反応性が高いことが確認できた。

3.2. H12 の反応性

PRP([PLT] = 20×10^4 /μL)に濃度の異なる H12 水溶液(f.c. 0.125-4 mM)を添加後、5 分間振とうさせた。ADP(f.c. 20 μM)にて血小板凝集を惹起させたところ、H12 の添加濃度依存的に血小板凝集が阻害された(Fig. 5)。得られた結果の最大透過率から、ラット、ウサギ、ヒト血小板に対する H12 の IC₅₀ は、それぞれ 1.07、0.69、0.70 mM と算出できた。従って、ヒトとウサギの血小板に対する H12 の反応性はほぼ同等であり、ラットはわずかに低下することが確認できた。

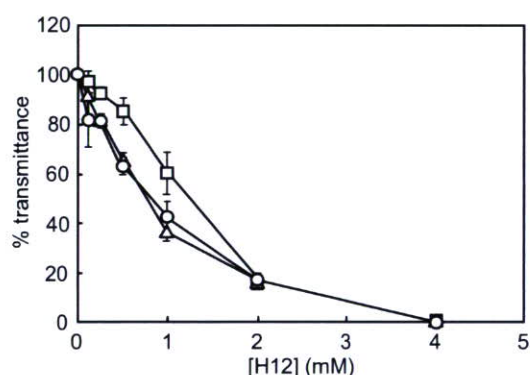


Fig. 5 Concentration-dependent inhibition of H12 to ADP stimulated platelets (20×10^4 /μL). (□) rat platelets, (△) rabbit platelets, and (○) human platelets. ADP: f.c. 20 μM.

以上より、ウサギ血小板に対する ADP と H12 の反応性がヒト血小板と近い結果から、ウサギを用いた止血能評価はヒトを想定した評価に近いものであると判断できた。

D. 結論

1) H12-(ADP)小胞体を 20、40 mg/kg で投与したところ、生理食塩水群、(ADP)小胞体群と比較して投与 6 時間後まで有意に短縮し、止血能の持続効果が証明できた。

2) H12-(ADP)小胞体の止血能を発現する有効血中濃度は100 µg/mL以上であると算出された。

3) 腹部手術モデルの出血量測定法を確立した。血小板減少症モデルウサギにH12-(ADP)小胞体を投与したところ、投与量依存的に出血量を有意に短縮させ、血小板輸血群のそれに匹敵した。

4) ラット、ウサギ、ヒト血小板凝集に対するH12のIC₅₀は、それぞれ1.07、0.69、0.70 mMと算出できた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Okamura, Y., Fujie, T., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide. *Transfusion* **47**, 1254-1262 (2007).

(2) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* (2008) *in press*.

(3) 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫. 「人工血小板の開発」 *Medical Science Digest*, **34** (4) (2008), 印刷中.

(4) Okamura, Y., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T.,

Maruyama, H., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M. Amplified hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide by adenosine 5'-diphosphate encapsulation as platelet substitutes. *Blood* (to be submitted) (2008).

2. 学会発表

(1) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(2) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., and Ikeda, Y. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(3) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(4) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. American Chemical Society 234nd National

Meeting & Exposition (2007.8., Boston).

(5) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y. Hemostatic effects of liposomes bearing fibrinogen γ -chain dodecapeptide amplified by encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitutes. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (2007.10.)

(6) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合 ADP 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(7) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(8) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「重篤な血小板減少モデル動物を用いた H12 ペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の止血能評価」第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(9) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「止血増幅機能を発現する人工血小板 - 血小板凝集をトリガーとして血小板凝集惹起物質を放出するリン脂質小胞体の構築 -」第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).

(10) 岡村 陽介, 武岡 真司, 鈴木 英紀, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 江藤 薫子, 池田 康

夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 30 回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).

(11) 鈴木 英紀, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「トロンビン刺激による H12 結合リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討」第 30 回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」特願 2007-000296.

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業)
分担研究報告書

実験小動物用 *in vivo* CT システムを用いた H12-小胞体の特異的集積性評価

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
研究協力者 岡村 陽介 (早稲田大学 理工学研究所, ヒューマンサイエンス振興財
団研究員)
江藤 薫子 (早稲田大学大学院 理工学研究科, 修士 1 年)
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 血液内科, 研究員)

【研究要旨】

血小板止血機能を補助する微粒子系の開発において、フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)をポリエチレングリコール(PEG)鎖末端を介して結合させたリン脂質小胞体(H12-小胞体)は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少ラットに静脈投与すると出血時間を短縮させることを既に報告してきた¹⁾。

平成 19 年度は、造影剤 (*N,N'*-Bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxypropylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (Iopamidol: IOP)) を内包した H12-(IOP)小胞体を新規に調製し、実験小動物用 X 線コンピュータ断層撮影法(computed tomography (CT))を用いてラット尾静脈の出血部位、あるいは頸静脈の塩化鉄傷害血栓に対する特異的集積性を検討した。H12-小胞体は IOP を効率良く内包することができ、4 日後でも IOP を安定に内包させることを確認した。そこで、H12-(IOP)小胞体をラットに投与し、尾静脈の出血部位、頸静脈の塩化鉄傷害血栓を作製して CT 観察したところ、傷害部位のみが白く造影され、生理食塩水投与群、IOP 水溶液投与群、(IOP)小胞体群では造影は認められなかった。従って、H12-(IOP)小胞体は出血部位に対して特異的に集積することを *in vivo* 試験で初めて証明できた。さらに、H12-(IOP)小胞体を投与 1 時間後の CT 観察により、脾臓・肝臓へ集積することを明らかにし、IOP を小胞体に内包することで IOP の造影剤自身の体内動態を腎臓から脾臓、肝臓に変換させることに成功した。

A. 研究目的

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を表面に結合させたリン脂質小胞体(H12-小胞体)は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少ラットに静脈投与すると出血時

間を短縮させることを既に報告してきた¹⁾。

今年度は、造影剤 (*N,N'*-Bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxypropylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (Iopamidol: IOP, Mw: 777) (Fig. 1)) を内包した H12-(IOP)小胞体を調製し、実験小動物用

X 線コンピュータ断層撮影法 (computed tomography (CT))を用いてラット尾静脈の出血部位、あるいは頸静脈の塩化鉄傷害血栓に対する特異的集積性を検討した。

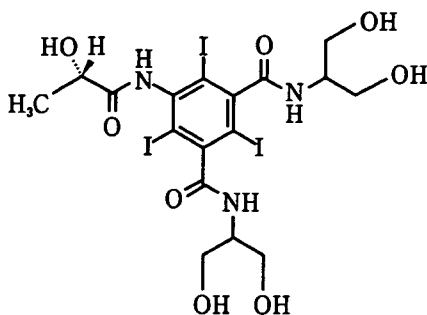


Fig. 1 Chemical structure of Iopamodol.

1) Okamura, Y. *et al. Bioconjugate Chem.*, **16**, 1589-1596 (2005).

B. 研究方法

1. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成

1.1. Glu2C18 の合成

グルタミン酸(2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物(4.56 g, 24 mmol)をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた(105 °C, 1 hr)。この系にステアリルアルコール(11.9 mg, 44 mmol) を添加して沸点還流させた(105 °C, 14 hrs)。溶媒を減圧除去後、残分をクロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で 2 回、水 150 mL で 2 回分液洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧除去した。メタノール再結晶、濾過後、乾燥させて白色粉末 Glu2C18(13.3 g, 収率 85 %)を得た。

1.2. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MALPEG-Glu2C18)の合成

クロロホルム 10 mL 中に Glu2C18(575.5 mg, 880 μmol)、TEA(122.5 μL, 880 μmol)を添

加後、MALPEG-NHS(Mw:3400, 1.5 g, 279 μmol)を溶解、撹拌した(r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した後、ベンゼン中に溶解し凍結乾燥後、白色粉末 MALPEG-Glu2C18(1448.1 mg, 収率 70 %)を得た。

1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成

MAL-PEG-Glu2C18(1000 mg, 253.7 μmol)と C 末端にシステインを結合させた H12(328 mg, 253.7 μmol)を DMF10 mL に溶解、撹拌した(r.t., 72 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製後、メタノールにて抽出し、シリカゲルカラムにて精製した(展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水 = 65/25/4, v/v/v)。真空乾燥後、ベンゼンに溶解させて凍結乾燥し、淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18 (427.6 mg, 収率 32 %)を得た。

2. H12-(IOP)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl choline (DPPC) (1000 mg, 1.36 mmol)、cholesterol (527 mg, 1.36 mmol)、1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) (190 mg, 136 μmol)、PEG-DSPE (47.4 mg, 8.17 μmol)、H12-PEG-Glu2C18 (43.4 mg, 8.17 μmol)をベンゼンに溶解し、凍結乾燥させた (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.03/0.03, モル比)。IOP 水溶液(80 mM)にて水和させ、押出造粒法を用いて H12-(IOP)小胞体を調製した(粒径 250 ± 80 nm)。超遠心分離後(33000 rpm, 30 min, 4 °C)、PBS に分散させ小胞体分散液とした。さらに、小胞体分散液をゲルろ過(Sephadex G25)し、外水相に微量に残存

している IOP を完全に除去した。

3. IOP 内包安定性試験

H12-(IOP)小胞体(脂質濃度: 10 mg/mL)を 4 °C にて保存した後、経時的に採取した。ゲルろ過(Sephadex G25)後、2%(v/v)ラウリルエーテル水溶液にて可溶化し(50 °C, 5 min)、高速液体クロマトグラフィー(TSKGel G3000PW_{XL}, 1 mL/min, Ab. 240 nm)を用いて残存 IOP を定量した。同時に、リン脂質定量を行い内包率を算出した。

4. CT システムを用いた H12-(IOP)小胞体の特異的集積性評価法

Wister 系雄性ラット(三協ラボサービス(株), 8 週齢, 250-300 g)をネブタール麻酔下、H12-(IOP)小胞体を尾静脈投与した(脂質重量換算: 130 mg/kg)。また、生理食塩水、IOP 水溶液、(IOP)小胞体を陰性対照群とした。投与 5 分経過後、尾先端から 1 cm の部位にメス(No. 11)を用いて切傷し(長さ 1 cm)。止血するまで尾先端を生理食塩水中に浸した。犠牲死させた後、CT(eXplore LocusTM, GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)にて尾を観察した。

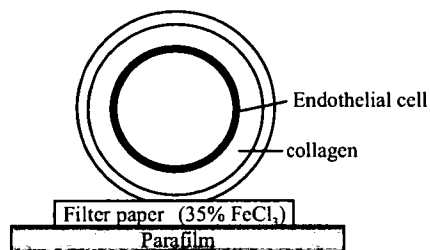


Fig. 2 Schematic image of ferric chloride-induced thrombosis model.

他方、Wister 雄性ラット(250-300 g)の頸部を切開し、頸静脈を露出させ、その下にパラフィルム(20 x 6 mm)および濾紙(10 x 5 mm)を敷いた(Fig. 2)。H12-(IOP)小胞体を尾

静脈より投与し(130 mg/kg)、5 分後に 35% 塩化鉄水溶液 10 μ L を濾紙に吸収させた。添加 30 分後に犠牲死させ、CT により撮影した。

C. 研究結果及び考察

1. H12-(IOP)小胞体の内包安定性

H12-(IOP)小胞体を 4 °C にて保存し、経時的に採取して IOP 内包率を算出したところ、4 日経過しても調製直後の IOP 内包率を維持した(Fig. 3)。従って、IOP は安定にカプセル化されていることを確認し、以下に示す動物実験を行った。

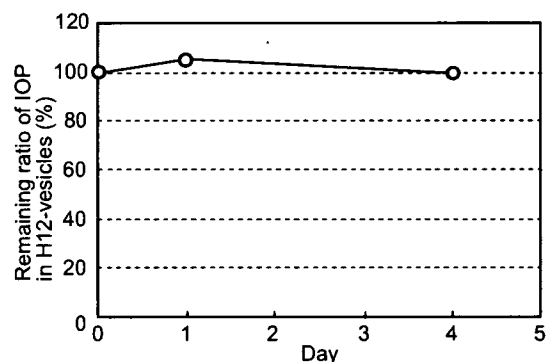


Fig. 3 Remaining ratio of IOP into H12-vesicles.

2. IOP 水溶液と H12-(IOP)小胞体の体内動態

IOP 水溶液(80 mM)を尾静脈投与したところ、投与 5 分後には腎臓(Fig. 4(a), (b))および膀胱(Fig. 4(c))が鮮明に造影され、速やかに代謝されることを確認した。これは、IOP 水溶液の臨床での適応(静脈性尿路撮影等)による動態と矛盾しない結果であった。他方、H12-(IOP)小胞体を投与したところ、腎臓や膀胱は造影されず、投与約 1 時間後には脾臓(Fig. 5 (a), (b))や肝臓への集積が観察された。これは、小胞体の体内動態²⁾を再現する結果であると共に、IOP が小胞体に安定に内包されていることを示しており、

Fig. 3 の結果を支持した。さらに、IOP を小胞体に内包させることで、造影剤としての体内動態を腎臓から脾臓や肝臓に変換させることに成功し、造影剤の適応拡大にも繋がると考えられる。他方、心臓も造影されたことから、H12-(IOP)小胞体は投与約 1 時間後も血中を循環していることが示唆された。

2) Sou, K. *et al. J. Phaemacol. Exp. Therapeu.* **312**, 702-709 (2005).

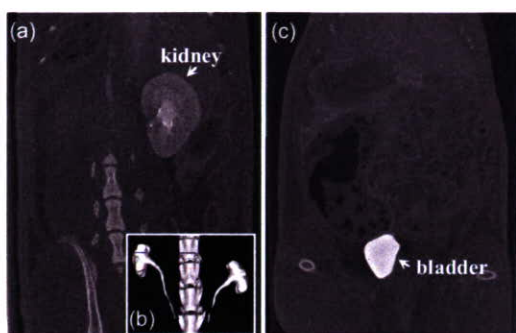


Fig. 4 CT images of IOP-injected rat. (a) 2-D CT image of kidney, (b) 3-D CT image of kidney, and (c) 2-D CT image of bladder.

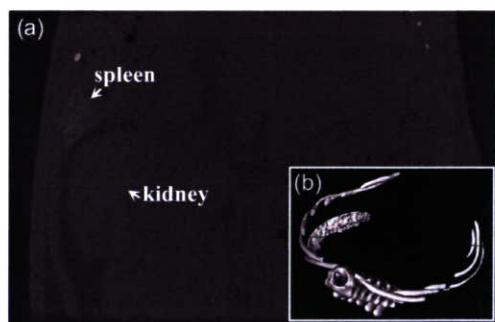


Fig. 5 CT images of H12-(IOP)vesicles-injected rat. (a) 2-D and (b) 3-D CT images of spleen.

3. H12-(IOP)小胞体の尾静脈の出血部位への特異的集積と定量

H12-(IOP)小胞体を投与 5 分後に尾静脈をメスで切傷し(Fig. 6 (a))、止血完了後に CT 観察したところ、出血部位に対応する部位が白く造影された(Fig. 6 (b))。断面図(Fig. 6 (c))、3D 像(Fig. 6 (d))もそれを支持した。他方、生理食塩水投与群(Fig. 7 (a))、IOP 水溶液投与群(Fig. 7 (b))、(IOP)小胞体群(Fig. 7

(c))では造影されなかった。従って、(IOP)を内包させることによって、H12-小胞体が出血部位に対して特異的に集積することを *in vivo* 試験で初めて証明できた。

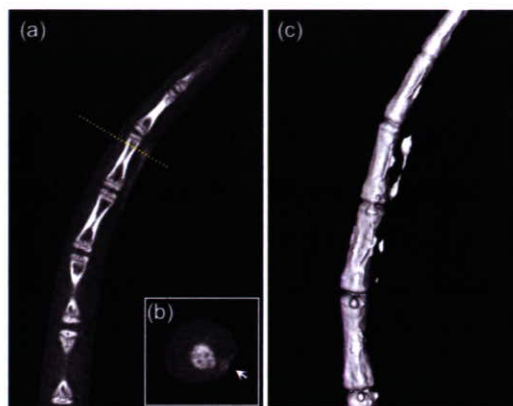


Fig. 6 Specific accumulation of H12-(IOP)vesicles to the vascular injury. (a) 2-D CT image of tail of rat. (b) cross-sectional CT image of the tail. (c) 3-D CT images of the tail.

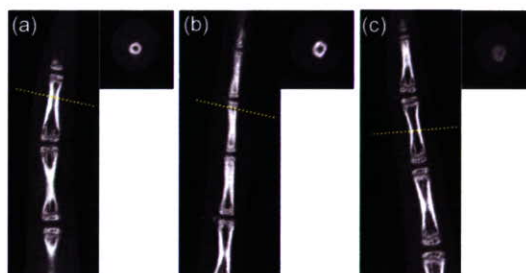


Fig. 7 CT images of tail of rat received with (a) saline, (b) IOP solution, and (c) (IOP)vesicle.

そこで、脂質濃度既知の H12-(IOP)小胞体を CT 測定することで、1voxel あたりの脂質重量に対する 1voxel あたりの CT 値を算出し、検量線を作成した(Fig. 8)。Fig. 6 (d) から、H12-(IOP)小胞体によって造影された部位の 1voxel あたりの CT 値は 54.1 (-)と算出された。検量線に外挿したときの 1voxel あたりの脂質重量は 0.0913 (ng)となり、造影部位は 77072 voxel からなることから、7 μ g に相当する脂質重量が傷害部位に集積した計算となった。

以上より、実験小動物用 CT を用いることで H12-(IOP)小胞体の出血部位に対する特異的集積性が証明でき、集積性の定量化

も可能であることを初めて明らかにした。

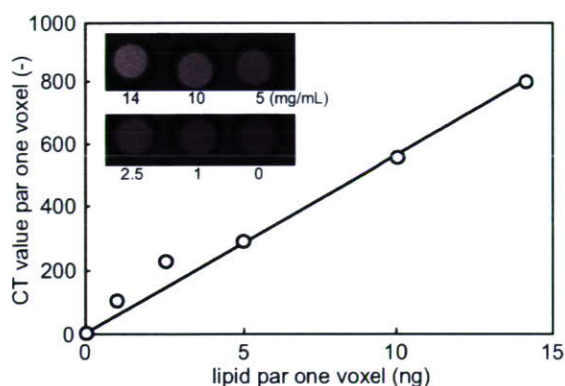


Fig. 8 Correlation of lipid concentration of H12-(IOP) vesicles with CT value.

4. 塩化鉄傷害モデルを用いた H12-(IOP)小胞体の頸静脈への集積

H12-(IOP)小胞体を投与5分後に塩化鉄溶液を添加し、添加30分後にCT観察したところ(Fig. 9)、傷害部位に対応する部位が白く造影された(Fig. 10 (a))。他方、(IOP)小胞体群(Fig. 10 (b))では造影されなかった。これは、ラット尾静脈出血部位へのCT撮影の結果を支持しており、このモデルにおいてもH12-(IOP)小胞体が血栓に特異的に集積することを明らかにできた。



Fig. 9 Photo of ferric chloride-induced thrombosis model.

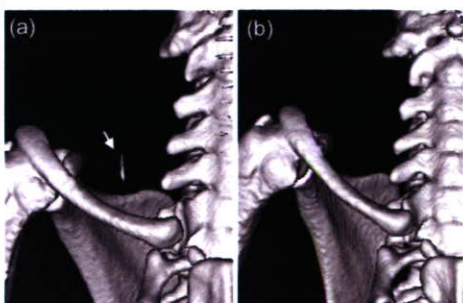


Fig. 10 Specific accumulation of (a) H12-(IOP) vesicles to the jugular vein. (b) (IOP) vesicles did not accumulate. Arrow shows accumulation site of H12-(IOP) vesicles.

D. 結論

- (1) H12-小胞体は、IOPを内包させることができ、4日後でも安定に内包されていた。
- (2) H12-(IOP)小胞体を投与1時間後のCT観察により、脾臓・肝臓へ集積することを明らかにした。
- (3) *in vivo* CTシステムを用いて、H12-(IOP)小胞体がラット尾静脈の出血部位、頸静脈の塩化鉄傷害血栓に対して特異的に集積することを初めて明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okamura, Y., Fujie, T., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide. *Transfusion* **47**, 1254-1262 (2007).
- (2) Fujie, T., Okamura, Y., and Takeoka, S. Ubiquitous transference of free-standing polysaccharide nanosheet in the development of a nano-adhesive plaster. *Adv. Mater.* **19**, 3549-3553 (2007).
- (3) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* (2008) *in press.*
- (4) Okamura, Y., Utsunomiya, S., Suzuki, H.,

Niwa, D., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of freestanding nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using sacrificial films. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2008) *in press*.

(5) Okamura, Y., Goto, T., Niwa, D., Fukui, Y., Otsuka, M., Motohashi, N., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having hetero-surface. *J. Biomed. Mater. Res. A* (2008) *in press*.

(6) 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫「人工血小板の開発」*Medical Science Digest*, **34** (4) (2008), 印刷中.

(7) 武岡 真司, 岡村 陽介.「血液の仕組みと人工血液(血液代替物)へのアプローチ」*化学と教育 ~ヘッドライン~* (2008), 印刷中.

(8) Okamura, Y., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M. Amplified hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide by adenosine 5'-diphosphate encapsulation as platelet substitutes. *Blood* (to be submitted) (2008).

2. 学会発表

(1) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(2) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., and Ikeda, Y. Hemostatic effects of

liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(3) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress. (2007.7., Geneva, Switzerland).

(4) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. American Chemical Society 234nd National Meeting & Exposition (2007.8., Boston).

(5) Takeoka, S., Fujie, T., Okamura, Y. Modification of free-standing polysaccharide nanosheets and their application on a nano-adhesive plaster. American Chemical Society 234nd National Meeting & Exposition (2007.8., Boston).

(6) Fujie, T., Okamura, Y., Takeoka, S. Fabrication of free-standing polysaccharide nanosheet in application of "nano-adhesive plaster". 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes (MMC-12) (2007.8., Fukuoka).

(7) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y.. Hemostatic effects of liposomes bearing fibrinogen γ -chain dodecapeptide amplified by encapsulating

adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitutes. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (2007.10.)

(8) 岡村 陽介, 宇都宮 沙織, 武岡 真司. 「親-疎水性マイクロパターン基板を用いた微粒子融合シートの構築と表裏へのヘテロ修飾」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(9) 福井 慶仁, 宇都宮 沙織, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「親 - 疎水性マイクロパターン基板を用いたポリ乳酸ナノ粒子シートの調製と表裏ヘテロ修飾」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(10) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「交互積層法による多糖ナノシートの構築とナノ絆創膏としての応用」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(11) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合 ADP 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 55 回高分子学会年次大会 (2007.5., 京都).

(12) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(13) 藤枝 俊宣, 岡村 陽介, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「重篤な血小板減少モデル動物を用いた H12 ペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の止血能評価」第 14 回日本血液代替物学会年次大会 (2007.6., 東京).

(14) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 福井 慶仁. 「新しいバイオマテリアルとしてのフリースタンディングな高分子ナノシート-血小板代替物からナノ絆創膏までの医用展開-」第 56 回高分子討論会 (2007.9., 富山)

(15) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「止血増幅機能を発現する人工血小板 - 血小板凝集をトリガーとして血小板凝集惹起物質を放出するリン脂質小胞体の構築 -」第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).

(16) 福井 慶仁, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ポリ乳酸ナノシートによる活性化血小板認識評価」第 29 回日本バイオマテリアル学会大会 (2007.11., 大阪).

(17) 岡村 陽介, 武岡 真司, 鈴木 英紀, 前川 一平, 藤枝 俊宣, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」第 30 回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).

(18) 鈴木 英紀, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「トロンビン刺激による H12 結合リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討」第 30 回日本血栓止血学会学術集会 (2007.11., 三重).

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 武岡 真司, 岡村 陽介, 前川 一平, 半田 誠, 池田 康夫. 「薬物運搬体」特願 2007-000296.

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業)
分担研究報告書

人工血小板粒子の微小循環動態特性の生体内解析
-H12 結合アルブミン重合体の微小循環挙動-

分担研究者 梶村 眞弓 (慶應義塾大学・医学部・医化学教室・講師)
研究協力者 末松 誠 (慶應義塾大学・医学部・医化学教室・教授)
森川 隆之 (慶應義塾大学・医学部・医化学教室・特別研究助教)

研究要旨

血小板膜上に発現する活性化型 GPIIb/IIIa を特異的に認識する fibrinogen γ 鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させたアルブミン重合体 (H12-PEGpolyAlb) 粒子は、血小板止血機能を補助する微小粒子として本研究班で開発された。これまでの本班の研究により H12-PEGpolyAlb 粒子が、血小板減少ラット及びラビットで出血時間を短縮させる効果を有することが確認されている。そこで、H12 結合アルブミン重合体の止血効果のメカニズムを検討するため、*in vivo* 微小循環実験モデルを用いて、生体内で本粒子と血小板を可視化し、H12 結合アルブミン重合体と活性化血小板の特異的な相互作用を捉えることを目指した。具体的には laser ablation 技術を駆使して微小血管の任意の場所に血栓を作製し、形成過程にある一次血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子と活性化血小板接着・凝集支持作用を解析した。さらに血流速度を勘案した条件下で、本粒子と白血球や内皮細胞との相互作用を検討した。その結果、本粒子が活性化した血小板に選択的に接着し、非活性型の血小板とは相互作用しないことが確認された。このことから H12-PEGpolyAlb 粒子が有する止血増強作用は活性化血小板との特異的な結合により発揮される可能性が示唆された。

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。

血小板の膜上に発現する活性化型 GPIIb/IIIa を特異的に認識する fibrinogen γ 鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させたアル

ブミン重合体 (H12-PEGpolyAlb) 粒子は、血小板止血機能を補助する微小粒子として本研究班で開発された。これまでの研究により、この H12-polyAlb 粒子が、血小板減少ラット及びラビットを用いた実験系で出血時間を短縮させる効果を有することが確認されている。しかしながら、H12-polyAlb 粒子の有する止血増強効果が活性化血小板との特異的な

結合により発揮されるか否かは、*in vitro* の実験系においては示唆されていたが、*in vivo* の系では証左が得られていなかった。そこで、本粒子の微小循環内挙動および活性化血小板との相互作用を *in vivo* 実験系を用い検討した。粒子の微小循環内での可視化を容易にするため、粒子径約 $1\mu\text{m}$ という通常の約4倍の径を有する H12 結合アルブミン重合体を作製し、この粒子と活性化血小板の特異的な相互作用を捉えることを目指した。laser ablation 技術を駆使して任意の場所の血管内皮細胞を障害し、微小血管に血栓を惹起し、形成過程にある一次血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子と活性化血小板接着・凝集支持作用を解析した。その結果、本粒子が活性化した血小板に選択的に接着し、非活性型の血小板とは相互作用しないことが確認された。

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 pentobarbital sodium 50mg/kg 筋肉注射で麻酔し頸動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

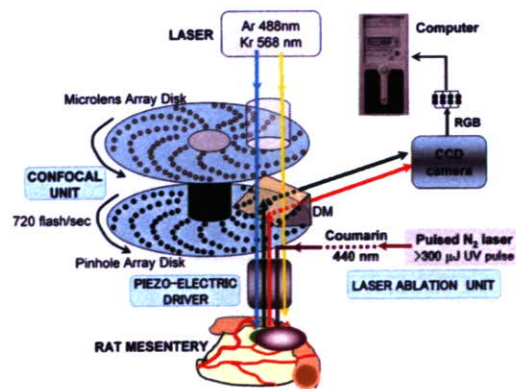


図 1. 生体顕微鏡システム

用した。

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窒素色素レーザー (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、コラーゲン非露出型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 H12-PEGpolyAlb 粒子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. Laser ablation による微小血管上への血栓形成

Laser ablation のための窒素色素レーザー (Micropoint 社) の出力エネルギーは、破綻性出血を伴わず血管内皮細胞を障害し血栓形成を惹起し血小板を活性化するレベルを用いた。具体的には frequency, 3Hz, filter transmission, 30-45%で行った。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、血管壁に到達するレーザーのエネルギーを一定レベルに保つためである。

任意の場所の血管内皮細胞を障害し、微小血管に血栓を惹起し、形成過程にある一次血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子と活性化血小板接着・凝集支持作用を 10 分間記録・観察した。

B-2. H12-PEG-polyAlbumin の投与

Rhodamine B 標識 H12-PEG-polyAlb 分散液([HSA]=14 mg/mL, Table 1)は、早稲田大学武岡真司教授から供与を受けた。

Table 1

Characterization of H12-PEG-polyAlb		
	H12-PEG-polyAlb	L-Cys-PEG-polyAlb
diameter (nm)	930 ± 220	702 ± 294
H12 (/particle)	1.6 × 10 ⁴	-
[rHSA] (mg/mL)	14	14
LPS (EU/mL)	<0.05	<0.05
label	rhodamine	rhodamine

ラット回盲部腸間膜を腹腔外に展開後、laser ablation により血管内皮細胞を障害

することにより微小血管に血栓を惹起し、活性化した血小板が可視化できるようになったところで、頸動脈カテーテルより H12-PEG-polyAlb を投与した(500 μL/rat, injection rate; 1 mL/min)。

C. 研究結果及び考察

C-1. H12-PEG polyAlb と活性化血小板の相互作用

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。

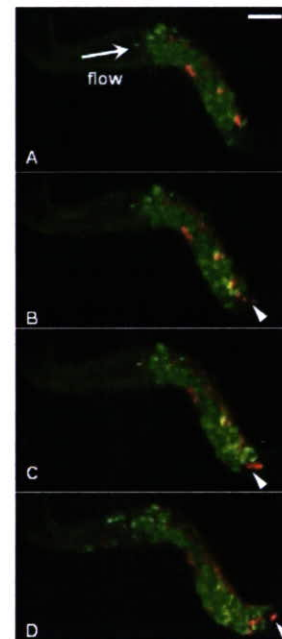


図 2. 血小板血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子の挙動。矢頭；活性化血小板と接着した後垂離する H12-PEG polyAlb 粒子。

図 2 にラット腸間膜細静脈に形成された血小板血栓内及びその近傍での rhodamine 標識 H12-PEGpolyAlb の挙動を示した。H12-PEGpolyAlb を注入すると CFSE で染色された血小板に混じって rhodamine B 標識 H12-PEG polyAlb が血栓表面の活性化した血小板と接着し、さらに大きな血栓を形成していく様子が

観察された。また図 2 のパネル B,C,D の矢頭で示したように、血小板に粘着した後、血流によって血栓から乖離し下流に押し流される様子も観察された。このような血小板との相互作用は、fibrinogen γ 鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) の代わりに cysteine を担持させたコントロール粒子である L-cys PEG-polyAlbumin では認められなかった(図 3)。

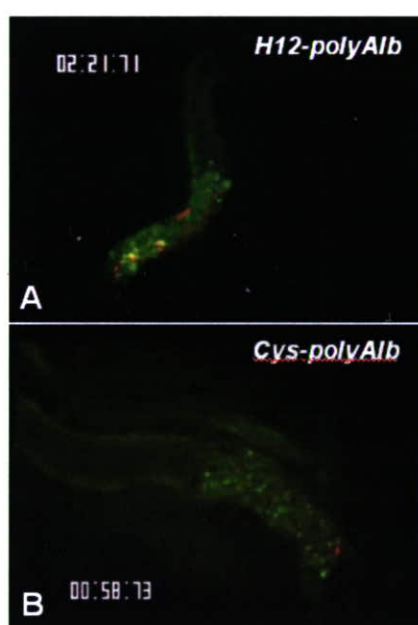


図 3. 血小板血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒子 (A)、コントロール粒子 (B)の挙動。

図 4 には、shear rate が 1500 s^{-1} と高い時の本粒子の挙動をラットのネイティブの血小板のそれと比較して示した。ラットネイティブ血小板は、血栓表面の活性化血小板と”touch-and-go”を繰り返した。同様の挙動は、H12-PEGpolyAlb でも認められたことから、本粒子がネイティブ血小板と酷似した挙動をとりうることの証左を得た。

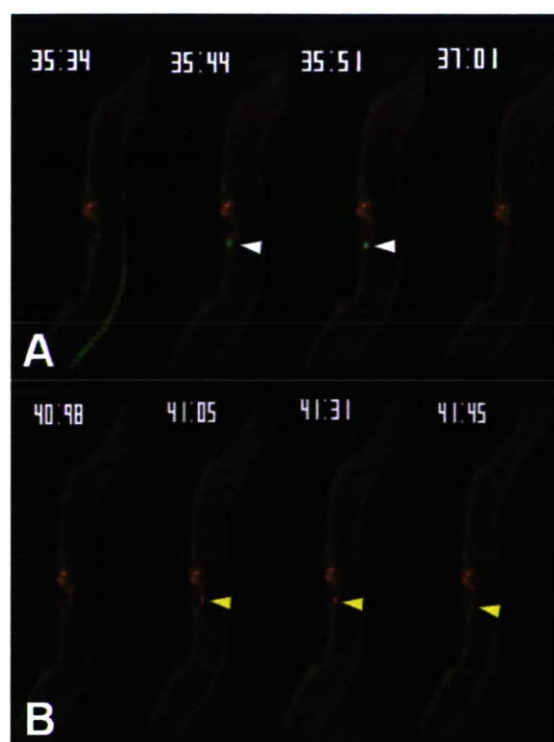


図 4. Laser ablation により形成された止血血栓と人工血小板粒子 H12-PEGpolyAlb との相互作用。Rat native 血小板(白矢頭)の挙動 (A)、人工血小板粒子(黄色矢頭)の挙動 (B)。

C-2. H12-PEG polyAlb と白血球の相互作用

昨年度までの研究により、H12-PEG polyAlb は、炎症や障害のない正常微小循環においては、血小板、白血球、及び血管内皮細胞を不必要に活性化しないことを確認した。しかしながら、laser ablation 後の微小血管内の活性化したと思われる白血球に本粒子が接着して流

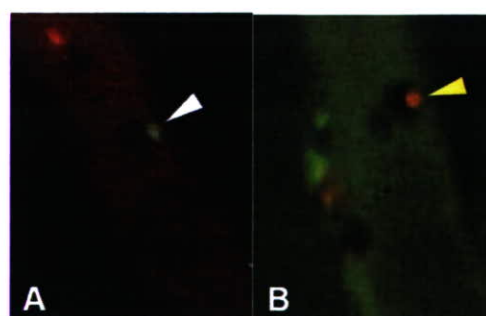


図 5. 白血球と人工血小板粒子 H12-PEG polyAlb との相互作用。Native rat 血小板(白矢頭)の挙動 (A)、人工血小板粒子(黄色矢頭)の挙動 (B)。

れる様子が頻繁に観察された(図 5)。図 5A に示されるように、ネイティブ血小板でもこのような非特異的な接着が認められた。

D. 結論

H12-PEG polyAlb 粒子は、血小板膜上の活性化したインテグリン α IIb β 3 のリガンドであるフィブリノーゲンの C 末端アミノ酸配列に相当する合成ペプチドを担持した人工血小板粒子であるが、これまでこの粒子が微小循環内でどのような挙動をとるのか、また止血効果を発揮するメカニズムが活性化した血小板との相互作用に依存するか否かは不明であった。

これまでの実験で用いた H12-PEGpolyAlb 粒子径は 250 nm であったが、これを約 4 倍の 1 micron まで大きくしたことにより、この人工血小板粒子の可視化を容易にした。ただし、粒子径を増大させることによって血中半減期が著しく減少する *disadvantage* を補うため、予め血栓を作製しその微小循環床へ H12-PEGpolyAlb 粒子を短時間で導入すべく頸動脈経路で *small-train-bolus* を注入する手法を選択した。その結果、血小板血栓周辺での本粒子と CFSE 標識-血小板の相互作用をリアルタイムで捉えることに初めて成功した。コントロール粒子である *L-cys-PEGpolyAlb* の活性化血小板との相互作用はほとんど認められなかったのに対して、期待したように H12-PEGpolyAlb 粒子が活性化血小板と特異的に接着する様子が捉えられた。これらの成績は H12-PEGpolyAlb の投与がえないことを示す証左となった。

本研究班で作製した血小板代替物ナノ粒子である H12-PEGpolyAlb を、*in vivo* 微小循環実験モデルを用いその生体内挙

動を評価した結果、本粒子が活性化した血小板を特異的に認識し接着能を有することの証左が得られた。

E. 健康危惧情報

なし

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Morikawa T., Kajimura M., Ichikawa M., and Suematsu M. Three-dimensional imaging of growing thrombus *in vivo*. *Microvascular Reviews and Communications* (in press).

F-2. 学会発表

1. 第 28 回日本炎症・再生医学会 Differing effects of cilostazol and aspirin on thrombus formation and microvascular permeability、森川隆之、梶村 眞弓、市川美緒、星野利津子、末松 誠、2007 年 8 月 3 日 (東京)

2. The 8th World Congress for Microcirculation, (Invited speaker) Interactions of multiple-gas transducing systems in the brain. Kajimura M. Ishikawa M., and Suematsu M. 2007 年 8 月 16 日 (Milwaukee, USA)

3. The 80th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Distinct effects of cilostazol and aspirin on thromboembolic reaction and microvascular permeability, Morikawa T. Kajimura M., Ichikawa M., Hoshino R., Suematsu M. 2007 年 12 月 12 日 (Yokohama, Japan).

G. 知的財産権の出願・登録状況・関連特許取得

なし

備考

本実験を施行するにあたっての血栓作製用レーザーアブレーション装置は、文部科学省 21 世紀リーディングプロジ

エックト生体・細胞機能シミュレーションプロジェクト「網羅的代謝計測技術に基づく細胞シミュレーションの構築とその応用並びに支援・基盤領域の研究開発」の助成金で導入したものである。本厚生科研費では血栓止血の定量的評価にこれを利用し、文部科学省 21 世紀リーディングプロジェクトでは血小板血栓止血シミュレーションの仮想実験の実証に利用しており、双方の実験内容に重複がないことを記す。