

Pentose phosphate pathway

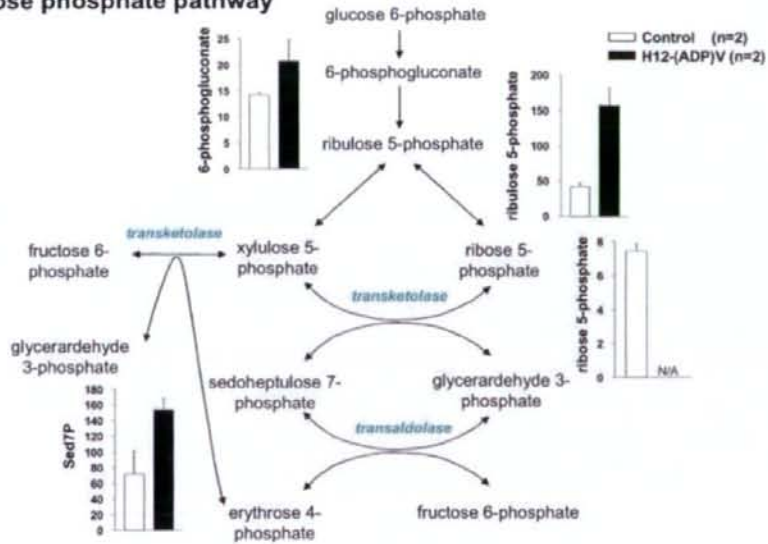


図 9. ペントースリン酸経路代謝物の変化

TCA cycle

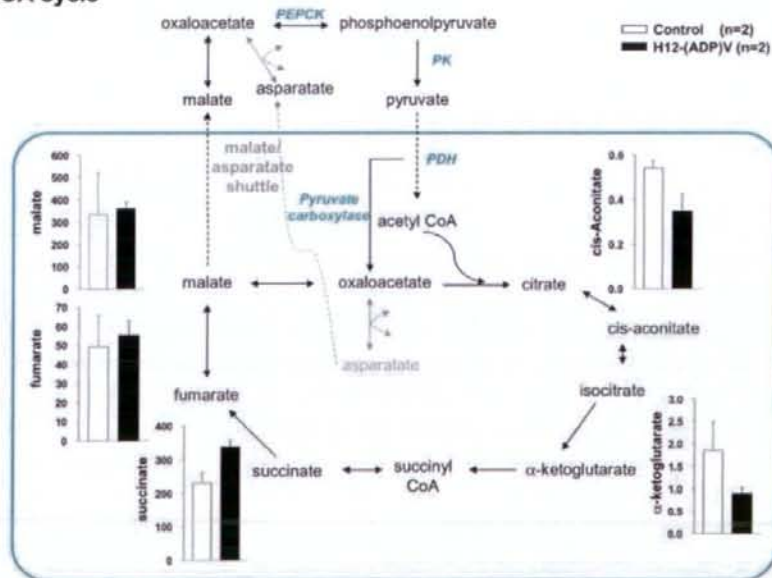


図 10. クエン酸回路代謝物の変化

D. 結論

1. H12-ADP liposome 投与後 6 時間では、肝臓及び脾臓の heme oxygenase-1 の発現レベルの上昇が認められた。
2. この上昇は一過性で、24 時間までに baseline レベルまで減少した。また肝臓及び脾臓で認められた heme oxygenase-1 の発現レベルの上昇は、ADP-liposome、H12-liposome、liposome 単独投与によっても惹起された。
3. H12-ADP liposome 投与による plasma 中の aspartate aminotransferase (GOT) および alanine aminotransferase (GPT) の変動は認められなかったことから、今回の投与プロトコール下では肝機能は正常に保持されていることの証左を得た。
4. 質量分析技術(CE-MS)を用い、肝臓の低分子代謝物を測定したところ、H12-ADP liposome 投与により解糖系、ペントースリン酸経路の構成分子の多くが増加する傾向にあることが明らかになった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

F-I. 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*, 2, 8-12, 2008.
2. Shintani T., Iwabuchi T., Soga T., Kato Y., Yamamoto T., Takano N., Hishiki T., Ueno Y., Ikeda S., Sakuragawa T., Ishikawa K., Goda

N., Kitagawa Y., Kajimura M., Matsumoto K., and Suematsu M. Cystathionine β -synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion, *Hepatology*, 49, 141-150, 2009.

3. Morikawa T., Hattori K., Kajimura M., and Suematsu M. The effects of cilostazol on tissue oxygenation upon an ischemic-reperfusion injury in the mouse cerebrum, *Advances in Experimental Medicine and Biology* (in press)

F-II. 邦文原著 著書

1. 山本 雄広、高野 直治、梶村 眞弓、足立 健、末松 誠。一酸化炭素とシグナル伝達 吉川 敏一監修 **酸化ストレスの医学 診断と治療社** 131-137, 2008.

F-III. 学会発表

1. Aug 2008 International Society on Oxygen Transport to Tissue, Sapporo, Japan. Kajimura M., Hattori K., Morikawa K., Ishikawa M., and Suematsu M., Regulation of vascular tone by gaseous mediators; Interactions of multiple gas-transducing systems utilizing molecular oxygen (invited speaker)
2. Aug 2008 International Society on Oxygen Transport to Tissue, Sapporo, Japan. Morikawa T., Hattori K., Kajimura M., and Suematsu M., The effects of cilostazol on tissue oxygenation upon an ischemic-reperfusion injury in the mouse cerebrum.
3. 平成 20 年 6 月 第 31 回日本バイオレオロジー学会、(東京)。(シンポジスト) 梶村 眞弓、石川 眞実、末松 誠。低分子ガスを介した情報伝達系による脳微小循環機能制御機構。
4. 平成 21 年 2 月 第 34 回日本微小

循環学会、(東京)。Takayuki Morikawa, Katsuji Hattori, Mayumi Kajimura, and Makoto Suematsu Carbon monoxide as a tonic modulator against hydrogen sulfide-dependent vasodilatation in the murine cerebellar microcirculation.

H. 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 CE-MS は、文部科学省 21 世紀リーディングプロジェクト生体・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。本厚生科研費では人工血小板粒子投与による代謝変動の解析評価にこれを利用し、双方の実験内容に重複がないことを記す。

厚生労働省科学研究費補助金

「政策創薬総合研究事業」

『臨床応用可能な人工血小板としてのH12結合微粒子の in vivo 評価』

平成20年度分担研究報告書

「H12 結合リポソームによる止血増強効果と ADP」

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

《研究要旨》高齢化の進行とともに心筋梗塞、脳梗塞などの有病率が増加している。これらの疾患の発症予防を目的としてアスピリン、チエノピリジンなどの抗血小板薬が広く使用されている。抗血小板薬の使用中の症例であっても手術、頭蓋内出血など局所的に止血機能の増強が必要となる病態に遭遇する機会は増加している。人工血小板は、短期、局所的な止血能の増強に大きな役割が期待される。既に、H12 結合リポソームが血小板減少動物の止血時間短縮効果を有することは確認済みである。血小板活性化機能を有するADPの局所放出機能を併せ持つことにより局所的な止血機能の増強が期待されるが、血栓性合併症発症リスクの増大も危惧される。われわれは生理的血小板数、血小板減少時のリポソームの血栓形成促進効果をH12結合、ADP含有の有無に分けて検討し、血小板減少時には血栓性合併症の発症リスク増大に対する危惧は少ないことを示した。また、リポソーム周囲の血小板の活性化動態を、血小板内カルシウムイオン濃度の周期的変動の計測により観測し、血小板減少状態では周囲の血小板の活性化動態に大きな影響を与える因子はADPよりもむしろH12であることを示した。

A. 研究目的

心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性疾患の発症予防効果を期待してアスピリン、チクロピジン、クロピドグレルなどの抗血小板薬の投与を受ける症例が増加して

いる。実際、われわれの行った調査研究においても、本邦では冠状動脈、脳血管、末梢血管などに動脈硬化性病変を有する症例の症例80%以上、これらの動脈硬化性疾患を有さないものの、高血圧、

高脂質血症、糖尿病などのリスク因子を有する症例の 20%以上の症例がアスピリンを代表とする抗血小板薬による介入を受けていた(1)。現在使用されているアスピリン、チクロピジン、クロピドグレルなどの抗血小板薬はいずれも抗血小板効果が非可逆的である。すなわち、薬剤を中止しても抗血小板効果は長期にわたって継続する。心筋梗塞、脳梗塞などの既往を有する症例であっても悪性腫瘍などにより手術が必要となる症例、頭蓋内出血に代表される出血性合併症を発症する症例は避け難い。実際、本邦においても抗血小板薬単剤による介入を受けていた症例であっても年間 0.3%の症例が頭蓋内出血を発症すると報告されている(2)。全身性に増強した血栓リスクをさらに増強させることなく、局所的に必要な止血機能の増強効果を発揮する人工血小板の必要性は増加している。

冠動脈内ステント留置後、脳梗塞後にはアスピリンとともにチクロピジン、クロピドグレルが使用される場合が多い。チクロピジン、クロピドグレルなどの薬物は血小板表面上のADP受容体P2Y₁₂の機能を阻害することにより抗血小板効果を発揮する(3)。これらの薬物により血小板機能の阻害されている症例の出血性合併症対策としてADPの局所放出機能を有するリポソームを用いることには論理的整合性がある。局所放出されたADPによるヒト血小板の活性化動態は血小板内

カルシウムイオン濃度変化の追跡により評価可能でもある(4)。われわれはADP局所放出能を有するリポソームによる止血機能増強効果、血栓性亢進効果、周囲の血小板の活性化におよぼす効果をヒト血液とflow chamberを用いた人工的な血流条件下にて評価した。

B. 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、供血者からインフォームドコンセントを行った。

ADP放出能を有するリポソームによる止血機能の増強効果を臨床的に意味のある条件にて評価するためには血小板数が健康人と同一の条件と、血小板数を健康人の1/10程度に低下させた人工的な血小板減少症の条件における検討を行った。止血、血栓機能の評価に当ってはコラーゲン、von Willebrand因子(VWF)などの内皮下血栓性マトリックスを固相化したガラス板上に血液を灌流し、マトリックス上に形成された血栓の評価を行った。血小板の活性化動態の評価に当っては、予めヒト血小板をfluo-3により蛍光標識し、血小板内のカルシウムイオン濃度を蛍光強度の変化により定量化する方法を用いた(4,5)。

本研究では、健康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。

C. 研究結果

血小板数が正常の条件において、コラーゲン上に $1,500 \text{ s}^{-1}$ の条件にて蛍光標識した血小板を含む血液を灌流した時に形成される血小板血栓の2次元的、3次元的成長は ADP 局所放出能を有する H12 結合リポソームの存在下において促進された。

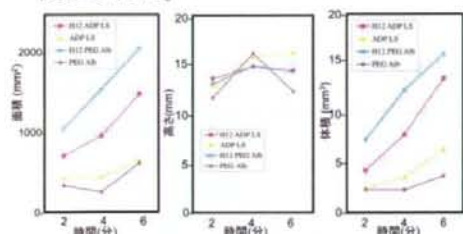


図 1. 各種リポソームの存在下にて、 1500 s^{-1} 6 分間の血液灌流によりコラーゲン上に形成された血栓のサイズ

一方、血小板数を健常人の 1/10 以下に減少させた血小板減少症モデルの条件では、ADP 含有 H12 結合リポソームによる血栓成長促進効果の増強効果は不明確であった。

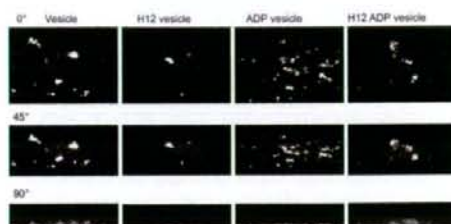


図 2. 各種リポソームの存在下にて、 1500 s^{-1} 6 分間の血液灌流によりコラーゲン上に形成された血栓のサイズ(血小板数を $2 \text{ 万}/\mu\text{l}$ に減少させた条件)

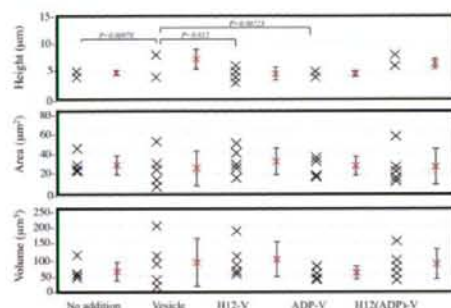


図 3. 各種リポソームの存在下にて、 1500 s^{-1} 6 分間の血液灌流によりコラーゲン上に形成された血栓のサイズ(血小板数を $2 \text{ 万}/\mu\text{l}$ に減少させた条件)

H12 ないし局所放出された ADP による周囲の血小板の活性化動態への影響を明確にするために、ヒト血小板にカルシウムイオン濃度感受性の蛍光色素 Fluo-3 を導入して血栓を形成する血小板内のカルシウムイオン濃度の変化を計測したところ、ADP 以上に H12 の存在がカルシウムイオン濃度に与える影響が大であることを確認した。

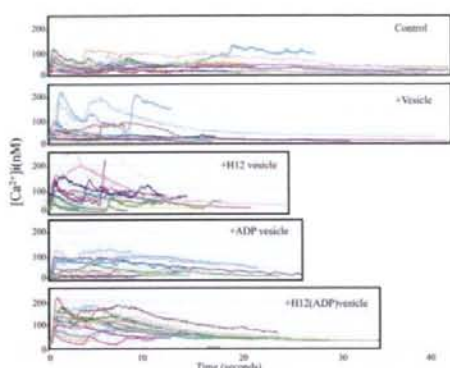


図 4. 血栓を形成する血小板内のカルシウムイオン濃度変化におよぼす H12 および ADP の関与の検討

H12 の存在する条件では、血小板からのカルシウムイオンの掃き出し効率が悪いことが示唆された。

D. 考察

H12 結合 ADP 含有リポソームの存在下では、血小板数が生理的条件下ではコラーゲン上の血小板血栓の成長が促進された。すなわち、H12 結合 ADP 含有リポソームを人工血小板として使用した場合には、血小板数が生理的条件下では心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性合併症の発症リスクの増強が懸念される。一方、血小板減少症をモデルとして血小板数 2 万 μl 以下の条件では、H12 結合 ADP 含有リポソームによるコラーゲン上の血小板血栓形成促進効果は認められなかった。血小板減少症例における一時的止血機能の増強には H12 結合 ADP 含有リポソームは有用である可能性が示唆された。

われわれは、血小板活性化過程における細胞内カルシウムイオン濃度の周期的変動は主に ADP 受容体 P2Y₁₂ の刺激により調節されていることを示した(4)。リポソームの、ヒト血小板活性化におよぼす効果もまた ADP 含有の有無により主に影響を受けると推論した。しかし、予想に反して ADP 含有リポソームの存在下でもカルシウムイオン濃度の周期的変動は大きく影響を受けることはなかった。むしろ H12 の有無がカルシウムイオン濃度の周期的変動におよぼす効果が大きくなった。本実験は血小板数の少ない条件にて施行したため血小板数の多い条件での既報(4)との差異を呈したと想定された。H12 が周囲の血小板の持続的活性化を促すことにより血栓の安定性に寄与することは人工血小板としては有利な性質となり得ることが示唆された。

E. 結論

- 1) ADP 含有 H12 結合リポソームは、生理的血小板数の条件ではコラーゲン上の血小板血栓の成長を促進せる効果を有した。この効果は臨床使用時の心筋梗塞などの血栓性合併症発症率の増加に寄与することが懸念された。
- 2) 血小板数の減少した条件では ADP 含有 H12 結合アルブミン重合体によるコラーゲン上の血小板血栓形成促進効果は認められなかった。出血性

イベント発症リスクの高い条件では ADP 含有 H12 結合アルブミン重合体による血栓性の亢進効果は大きな問題とならないと推測された。

- 3) リポソーム周囲の血小板の活性化動態には、ADP 含有の有無よりも H12 結合の有無が大きな規定因子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. Yamazaki T, Goto S, Shigematsu H, et al. Prevalence, awareness and treatment of cardiovascular risk factors in patients at high risk of atherothrombosis in Japan. *Circ J* 2007;71:995-1003.
2. Toyoda K, Yasaka M, Iwade K, et al. Dual antithrombotic therapy increases severe bleeding events in patients with stroke and cardiovascular disease: a prospective, multicenter, observational study. *Stroke* 2008;39:1740-5.
3. 後藤信哉、浅田祐士郎. 血栓症一やさしく、くわしく、わかりやすく. 東京: 南江堂, 2006.
4. 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;47:155-62.

5. Tamura N, Kitajima I, Kawamura Y, et al. Important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombi formed under arterial blood flow conditions. *Circ J* 2009;73:540-8.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 出願人：東海大学／慶應義塾大学、
発明人：後藤信哉／末松誠. 血管内にステントを配置する際のステントの形状を最適化させるためのシミュレータ. 特許出願 2008

平成 20 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

H12-(ADP)小胞体の安全性評価 (血液凝固系、生化学検査)

分担研究者 村田 満 (慶応義塾大学 医学部 臨床検査医学, 教授)

研究要旨

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させたリン脂質小胞体は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成を促進させながら内包物質(モデルとして水溶性蛍光物質(カルボキシフルオロセイン)を利用)を放出し、特に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させれば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能は顕著に向上することを *in vivo* にて証明してきた。平成 19 年度は、血小板減少モデルウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価を目的とし、H12-(ADP)小胞体あるいは ADP 水溶液の投与前後の血小板活性化の有無を抗ウサギ P-セレクトリン抗体を用いたフローサイトメトリー測定にて検討したところ、H12-(ADP)小胞体を静脈投与しても未活性化血小板の活性化を引き起こすことはなく、H12-(ADP)小胞体の安全性に関する初期の要件は満足すると結論付けた。

平成 20 年度は、血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性評価を行うことを目的とした。H12-(ADP)小胞体を血小板減少症ラット、ウサギに投与しても、血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値に異常は見られなかったことから、血液学適合性の観点から安全性の高いナノ粒子であることを明らかにした。

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)を結合させたリン脂質小胞体は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成を促進させながら内包物質(モデルとして水溶性蛍光物質(カルボキシフルオロセイン)を利用)を放出し、特に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させれば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能は顕著に向上することを *in vivo* にて証明してきた。平成 19 年度は、血小板減少モデルウ

サギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価を目的とし、H12-(ADP)小胞体あるいは ADP 水溶液の投与前後の血小板活性化の有無を抗ウサギ P-セレクトリン抗体を用いたフローサイトメトリー測定にて検討したところ、H12-(ADP)小胞体を静脈投与しても未活性化血小板の活性化を引き起こすことはなく、H12-(ADP)小胞体の安全性に関する初期の要件は満足すると結論付けた。

平成 20 年度は、血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性評価を行うこと

を目的とし、H12-(ADP)小胞体の投与前後の血球数変動、血液凝固検査、血液生化学的検査を実施した。

B. 研究方法

1. 血小板減少ラットの血球数変動、血液凝固検査、血液生化学的検査方法

Wister 系雄性ラット(三協ラボ, 8 週齢, 230-280 g)にブスルファン ポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を 0, 3 日目に尾静脈投与し(全投与量 20 mg/kg)、投与開始後 10 日目を血小板減少ラット([PLT] = $19.6 \pm 2.6 \times 10^4 / \mu\text{L}$)とした。セボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体(早大 武岡真司先生より供与)を尾静脈から投与した(4 mL/kg)。对照群として生理食塩水を投与した。投与 30 分後に採血し、血球測定装置(K-4500, Sysmex)にて各血球を測定した。

3.8%クエン酸ナトリウム入真空採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液凝固検査用の血漿を回収し、ジエチルエーテルにて犠牲死させた。プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノーゲン抗原量(Fbg)、第Ⅷ因子様抗原量(VWF Ag)、VWF 活性の 5 項目を測定した(SRL に委託)。

他方、血清分離剤入採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液生化学的検査用の血漿を回収した。アルブミン(ALB)、総コレステロール(TC)、トリグリセリド(TG)、高密度リポ蛋白質(HDL)、低密度リポ蛋白質(LDL)、アラニン・アミノトランスフェラーゼ(ALT)、クレアチニン(Cr)の 6 項目を測定した(SRL に委託)。

6. 血小板減少ウサギを用いた止血能評価

ニュージーランドホワイトウサギ(雄性, 三協ラボ, 11 週齢, 2.5 kg)にケタミン(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)にて麻酔を施した。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 日目を血小板減少ウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$)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検体(H12-(ADP)小胞体、生理食塩水、PRP([PLT] = 10, 50, 100 $\times 10^4 / \mu\text{L}$))を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与 60 分後に採血し、血球測定装置(K-4500)にて各血球を測定した。

1.と同様に、3.8%クエン酸ナトリウム入真空採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液凝固検査用の血漿を回収し、ネンブタールにて犠牲死させた。PT、APTT、Fbg の 3 項目を測定した(SRL に委託)。

C. 研究結果及び考察

1. H12-(ADP)小胞体の物性

H12-(ADP)小胞体は、早大 武岡真司先生より提供された。以下にその物性を示す (Table 1, 2)。

Table 1 Lipid components of H12-(ADP)vesicles.

components	Molar ratio
DPPC ¹⁾	5
Cholesterol	5
DHSG ²⁾	1
PEG-DSPE ³⁾	0.03
H12-PEG-Glu2C18	0.03

1) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine

2) 1,5-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate

3) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-[monomethoxy]poly(ethylene glycol)(5000)

Table 2 Characterization of H12-(ADP)vesicles.

sample name	H12-(ADP)vesicles
diameter (nm)	280 ± 70
lipid concentration (mg/mL)	10
Encapsulated ADP (mM)	1
LPS (EU/mL)	<0.2

2. 血球数測定

血小板減少ラットに生理食塩水あるいは H12-(ADP)小胞体(1, 4, 10 mg/kg)を投与しても、投与 30 分後の各血球には何ら変動せず、溶血や活性化、凝集を引起さないことを確認した。特に、血小板数変動を以下に示す (Fig. 1)。血小板減少ウサギでも同様の試験を行ったが、何ら変動しないことを確認した (Fig. 2)。

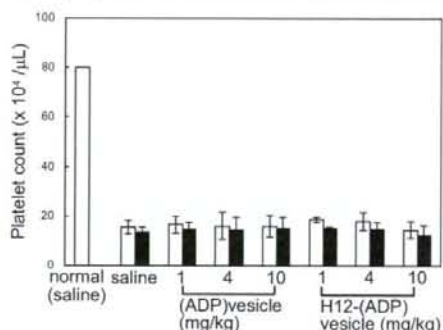


Fig. 1 Platelet counts 30 min before (white column) and after (black column) H12-(ADP)vesicles injection into the thrombocytopenic rats (N = 8-12).

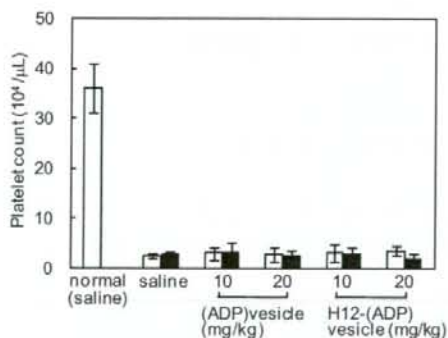


Fig. 2 Platelet counts 60 min before (white column) and after (black column) H12-(ADP)vesicles injection into the thrombocytopenic rabbits (N = 8).

3. 血液凝固検査

血小板減少ラットに H12-(ADP)小胞体を投与し、それぞれ 30 分後、24 時間後の血液凝固検査 (PT, APTT, Fbg, VWF Ag, VWF 活性の 5 項目) を行った (Table 3)。H12-(ADP)小胞体を投与しても、血液凝固系に何ら影響を与えないナノ粒子であることが確認できた。血小板減少ウサギでも同様の試験を行い (投与 60 分後)、何ら変動しないことを確認した (PT, APTT, Fbg の 3 項目, VWF Ag, VWF 活性は測定不能) (Table 4)。

4. 血液生化学的検査

血小板減少ラットに H12-(ADP)小胞体を投与し、それぞれ 30 分後、24 時間後の血液生化学的検査 (ALB, TC, TG, HDL, LDL, ALT, Cr の 7 項目) を行った (Table 5)。まず、H12-(ADP)小胞体を投与しても ALB は変動せず、血漿は等張を維持していることを確認した。投与 30 分後、TC は投与量依存的にわずかに上昇する傾向が見られたものの、24 時間後には生理食塩水群と同等となった。これは、投与後、血中に滞留している H12-(ADP)小胞体構成成分のコレステロールに起因するものと判断できる。また TG, HDL, LDL は変動しなかった。さらに、ALT, Cr も変動せず、H12-(ADP)小胞体投与しても腎臓、肝臓障害を引起さないことを確認した。

D. 結論

H12-(ADP)小胞体をラット、ウサギに投与しても、血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値に異常は見られなかったことから、血液学適合性の観点から安全性の高いナノ粒子であることを明らかにした。

Table 3 Blood coagulation parameters on normal and thrombocytopenic rats before and after infusion of the H12-(ADP)vesicles (N = 10-16).

30 min after injection	normal rats	thrombocytopenic rats		
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
PT (s)	31.1 ± 0.4	32.2 ± 2.3	30.8 ± 2.2	30.8 ± 2.7
APTT (s)	28.8 ± 0.9	29.8 ± 7.4	30.3 ± 9.6	31.6 ± 11.0
Fbg (g/dL)	256.8 ± 23.9	262.2 ± 65.3	224.8 ± 33.2	234.2 ± 23.2
VWF Ag (%)	11.3 ± 4.1	14.2 ± 6.1	16.0 ± 5.4	13.0 ± 5.0
VWF activity (%)	62.5 ± 4.4	66.7 ± 7.0	60.1 ± 13.4	63.0 ± 7.8
24 hr after injection	normal rats	thrombocytopenic rats		
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
PT (s)	30.2 ± 0.3	28.5 ± 3.1	31.1 ± 3.2	27.0 ± 6.6
APTT (s)	29.3 ± 1.2	29.5 ± 5.5	33.1 ± 6.1	34.1 ± 4.7
Fbg (g/dL)	242.5 ± 26.9	222.0 ± 36.4	243.7 ± 31.3	228.8 ± 24.8
VWF Ag (%)	11.9 ± 3.2	19.2 ± 7.3	20.4 ± 1.7	18.4 ± 6.1
VWF activity (%)	64.3 ± 4.3	60.8 ± 24.6	69.6 ± 4.0	61.4 ± 10.1

Table 4 Blood coagulation parameters on normal and thrombocytopenic rabbits before and after infusion of the H12-(ADP)vesicles (N = 6).

1 hr after injection	normal rabbits	thrombocytopenic rabbits		
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			10 mg/kg	20 mg/kg
PT (s)	9.0 ± 0.1	8.7 ± 0.0	9.3 ± 0.6	9.1 ± 0.4
APTT (s)	27.2 ± 2.2	27.2 ± 3.3	27.3 ± 1.8	26.5 ± 3.1
Fbg (g/dL)	234.1 ± 25.2	241.5 ± 24.9	225.0 ± 40.5	257.2 ± 32.7

Table 5 Biochemical blood parameters on normal and thrombocytopenic rats before and after infusion of the H12-(ADP)vesicles (N = 5-7).

30 min after injection	normal rats	thrombocytopenic rats		
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
ALB (g/dL)	3.8 ± 0.1	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1
TG (mg/dL)	62.0 ± 5.0	64.4 ± 7.7	68.4 ± 6.6	79.0 ± 7.4
TG (mg/dL)	49.7 ± 3.2	25.3 ± 12.2	25.0 ± 9.7	26.4 ± 9.1
HDL (mg/dL)	24.3 ± 1.2	23.0 ± 2.1	22.2 ± 2.4	23.4 ± 2.9
LDL (mg/dL)	8.3 ± 1.5	6.9 ± 1.8	6.9 ± 1.0	9.1 ± 1.2
ALT (IU/L)	50.3 ± 7.5	42.9 ± 4.3	42.4 ± 7.1	44.8 ± 5.7
Cr (mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
24 hr after injection	normal rats	thrombocytopenic rats		
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
ALB (g/dL)		3.5 ± 0.7	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.3
TG (mg/dL)		69.8 ± 14.4	66.1 ± 5.8	73.0 ± 6.4
TG (mg/dL)		32.0 ± 14.7	31.3 ± 18.5	28.6 ± 7.4
HDL (mg/dL)		23.0 ± 6.6	25.1 ± 2.5	24.8 ± 4.1
LDL (mg/dL)		7.3 ± 2.7	7.0 ± 0.8	8.8 ± 3.3
ALT (IU/L)		44.0 ± 5.3	45.9 ± 4.6	47.2 ± 9.6
Cr (mg/dL)		0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara Y, Murata M, Watanabe G, Ikeda Y: Enhancing effect of the (145)Met-allele of GPIb alpha on platelet sensitivity to aspirin under high-shear conditions. *Thrombosis Research*. 2008;123(2):331-5. Epub 2008 Apr 16.
2. Ishikawa J, Okada H, Kato H, Takeshita S, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y, Kokubo Y, Okamura T, Tomoike H, Miyata T: Association of Asn221Ser mutation in tissue factor pathway inhibitor beta with plasma total TFPI level. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2008
3. Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, Okada H, Takeshita S, Sakata T, Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y: Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thrombosis Research*. 2008
4. Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y. Polymorphisms of platelet membrane glycoproteins. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis*, 277-289, 2008
5. Yabe M, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y. Alpha 2A adrenergic receptor polymorphism is associated with plasma von Willebrand factor levels in a general population. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 19: 395-399, 2008
6. Matsubara Y, Murata M, Watanabe G, Ikeda Y: Enhancing effect of the (145)Met-allele of GPIb alpha on platelet sensitivity to aspirin under high-shear conditions. *Thromb Res*. 2008;123(2):331-5. Epub 2008 Apr 16.
7. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN: Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol*. 2009 Mar;144(5):742-54. Epub 2008 Nov 26.
8. Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. 2009 Jan 23;378(4):716-20. Epub 2008

- Dec 6.
9. 小笠原由佳、片桐尚子、杉崎憲子、清水長子、三ツ橋雄之、村田 満：全自動総合血液学分析装置 CELL-DYN Sapphire による自動白血球分類の評価 **医学と薬学** 59 (2) 249-255, 2008
 10. 村田 満：紫斑病と血小板の病気 **新版「ホーム・メディカ家庭医学大辞典」** 1454-1464 小学館 2008
 11. 浅井百合子、小笠原由佳、杉崎憲子、片桐尚子、清水長子、柴田綾子、三ツ橋雄之、村田 満：全自動総合血液学分析装置 CELL-DYN Sapphire の基礎的検討
 12. 早川富夫、渡部直美、大竹和子、石田浩二、石橋みどり、大竹皓子、菊池春人、村田 満：多項目自動分析装置の精度管理プログラムの自主開発～第1報：精度管理試料の測定結果の監視～ **日本臨床検査自動化学会会誌** Vol.33-No.1 2008
 13. 光吉慶生、野口昌代、大竹和子、柴田綾子、菊池春人、村田 満：血糖自己測定器 4 機種と比較検討—ヘマトクリットとマルトースおよび溶存酵素との相乗作用について— **医療と検査機器・試薬** 31 巻 4 号 411-419 2008 年 10 月
 14. 北村尚子、長谷川喜久子、柴田綾子、菊池春人、村田 満：全自動尿分析装置オーションマックス AX-4030 の性能評価 **医療と検査機器・試薬** 第 31 巻第 5 号 583-594 2008
 15. 村田 満：5-8 特発性血小板減少性紫斑病 5-9 播種性血管内凝固症候群 5-10 血友病 **薬学コアカリ対応 病態・薬物治療概論** 濱崎孝・高木康・村田満・木内祐二・立石正登編著 (220-230) 丸善株式会社 2008
 16. 村田 満：中央臨床検査部 **慶応義塾医学部新聞** 2008 年 1 月
 17. 矢部麻里子、村田 満：血栓性疾患 **わかりやすい内科学** 358-363 第 3 版 2008 年 1 月
 18. 村田 満：凝固・線溶関連検査 (出血時間・毛細血管抵抗試験・血小板凝集能・血小板粘着能・血小板寿命・ β トロンボグロブリン・血小板第 4 因子) **最新臨床検査項目** 81-85 2008 年 3 月 医歯薬出版株式会社
 19. 村田 満：95. 特発性血小板減少性紫斑病 **総合臨牀** 第 57 巻増刊号 312(1114)-313(1115) 2008 年 4 月
 20. 村田三繁、村田 満：心臓病と遺伝 **からだの科学 心臓病のすべて** 16-20 2008 年 5 月 日本評論社
 21. 村田 満：血小板の異常 **スタンダード検査血液学 第 2 版** 日本検査血液学会編 263-269 2008 年 5 月 医歯薬出版株式会社
 22. 村田 満：1. アラキド酸カスケード 2. PGI₂ 誘導体 **日本血栓止血学会ホームページ用語集** 2008 年 5 月
 23. 松本公宏、村田 満：アスピリン療法による一次予防効果と出血リスクのバランス **血栓と循環** Vol16 No.2 23(105)-29(111) 2008 年 6 月
 24. 村田 満：1. 輸血検査 2. 凝固検査用の採血 3. 血液検査用検体 **臨床検査の正しい仕方-検体採取から測定まで-** 57-61 第 1 版 2008 年 7 月 株式

- 会社宇宙堂八木書店
25. 松原由美子、村田 満：抗血栓療法の簡易モニター (point-of-care) **分子脳血管病** 第 7 巻 第 4 号 58(418)-64(424) 2008 年 10 月 先端医学社
 26. 村田 満：C. 血栓・止血 3. DIC の病態と臨床 **臨床検査 Yearbook2009 血液検査編** 特集第 142 号臨床病理レビュー(106-111) 臨床病理刊行会 2009 年 1 月
2. 学会発表
1. Yo K, Suzuki M, Kurihara T, Kobayashi Y, Murata M, Aikawa N: Derivation of the risk stratification system of the blood stream infection for severely burned patients. **The 14th Congress of the International Society for Burn Injuries** Canada Montreal Sep 2008
 2. Yokoyama K, Tsukada Y, Matsubara Y, Kawai T, Oikawa Y, Shimada A, Shibano T, Itoh H, Murata M, Ikeda Y: ANALYSIS OF PLATELET FUNCTION OF JAPANESE TYPE 2 DIABETIC PATIENTS. 5th conference of the Asian-pacific society on Thrombosis&Hemostasis. 2008Sep Singapore
 3. Mitsuhashi T, Murata M: Development and evaluation of usefulness of a virtual slide database. 21th The International Society for Laboratory Hematology. April-May2008 Sydney Australia
 4. Murata M: Inter-individual Variation of Platelet function and anti-platelet drug resistance - is monitoring necessary? 21th The International Society for Laboratory Hematology. April-May2008 Sydney Australia
 5. 松原由美子、川島 亮、池田康夫、村田 満：アスピリンと血小板膜受容体 GPIb α ：多型による反応性の影響 **第 8 回 T T M フォーラム** 平成 20 年 3 月 東京
 6. 横山健次、塚田唯子、松原由美子、河合俊英、及川洋一、島田 朗、芝野俊郎、伊藤 裕、村田 満、池田康夫：糖尿病患者における血小板機能亢進状態の評価 **第 105 回日本内科学会総会・講演会** 平成 20 年 4 月 東京
 7. 本間桂子、太田敦美、本間誠次郎、小山雄平、三輪雅之、池田一成、村田 満、長谷川奉延：新生児血中ステロイド測定のプロットホール **第 81 回日本内分泌学会学術集会** 平成 20 年 5 月 青森
 8. 柴田洋考、太田敦美、河辺博史、村田 満、伊藤 裕、齊藤郁夫：高血圧症における血漿活性レニン濃度を用いたアルトステロン/レニン比の検討：2 つの異なる健康診断 1396 名における検討 **第 31 回日本高血圧学会総会** 平成 20 年 10 月 札幌
 9. 大野明美、長谷川喜久子、山崎恵美、田中真弓、石田浩二、柴田綾子、菊池春人、村田 満：尿中有形成分分析装置画像を用いた尿沈渣研修マニュアルの構築と実践 **第 40 回日本臨床検査自動化学会** 平成 20 年 10 月 横浜
 10. 高橋恭美、関口 仁、大野明美、太田

- 敦美、石橋みどり、柴田綾子、菊池春人、村田 満：全自動化学発光酵素免疫システム「ルミバルス Presto II」による感染症項目の基礎的検討と運用 **第 40 回日本臨床検査自動化学会** 平成 20 年 10 月 横浜
11. 中川央充、松本幸子、大槻由美、小口修司、石橋みどり、大竹皓子、村田 満、菱沼義寛：酵素法によるヘモグロビン A1c(HbA1c)と K0500 法との比較検討 **第 40 回日本臨床検査自動化学会** 平成 20 年 10 月 横浜
12. 宮田敏行、川崎富夫、辻 肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田 満、阪田敏幸、竹下 聡、小久保喜弘、本田繁則、小亀浩市、岡田浩美、池田康夫：日本人の血栓症の遺伝的背景に関する調査研究 **第 70 回日本血液学会総会** 平成 20 年 10 月 京都
13. 横山健次、松原由美子、蔵 良政、澤田海彦、鈴木英紀、村田 満、池田康夫：巨大血小板がみられた von Willebrand's disease (VWD) type 11B の症例 **第 70 回日本血液学会総会** 平成 20 年 10 月 京都
14. 松原由美子、村田 満、鈴木英紀、横山健次、石原宏朗、森島義行、芝野俊郎、池田康夫：巨核球分化・血小板産生における GSK3 β の役割：in vitro 分化誘導法による検討 **第 70 回日本血液学会総会** 平成 20 年 10 月 京都
15. 柴田洋考、太田敦美、河辺博史、栗原勲、三石木綿子、本杉裕一郎、村田 満、伊藤 裕、齊藤郁夫：高血圧者および正常血圧者におけるアルドステロン/レニン比高値の臨床的意義 **第 16 回日本ステロイドホルモン学会** 平成 20 年 11 月 福井
16. 尾原秀明、相川直樹、池田康夫、石坂彰敏、岡本真一郎、小林芳夫、武田純三、堀 進悟、村田 満、北川敏光：リアルタイム PCR を応用した新しい敗血症診断法 **第 21 回日本外科感染症学会** 平成 20 年 11 月 札幌
17. 山口雄亮、森木隆典、和田英夫、松本雅則、藤村吉博、池田康夫、村田 満：血栓性血小板減少性紫斑病にみられる自己抗体 IgG が結合する ADAMTS13 エピトープ配列 **第 31 回日本血栓止血学会学術集会** 平成 20 年 11 月 大阪
18. 塚田唯子、石田 明、古海佐千代、渡邊直英、中島秀明、横山健次、松原由美子、村田 満、半田 誠、池田康夫：糖尿病患者における末梢血管内皮前駆細胞数と循環血管内皮細胞数の解析 **第 31 回日本血栓止血学会学術集会** 平成 20 年 11 月 大阪
19. 村田 満：『血栓症研究の最近の話題』 Nagoya Brain Forum 平成 20 年 3 月 名古屋
20. 松原由美子、川島 亮、池田康夫、村田 満：アスピリンと血小板膜受容体 GPIb α ：多型による反応性の影響 T TMフォーラム 平成 20 年 3 月 東京
21. 村田 満：『血栓症の病態・検査・治療』 **第 8 回 MCM 臨床検査フロンティア講演会** 平成 20 年 6 月 東京
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成 20 年度「政策創薬総合研究事業総合研究事業」
『臨床応用可能な人工血小板としての H12 結合微粒子の in vivo 評価』

分担研究報告書

<H12 結合微粒子の止血メカニズム> 形態的観察
- 膜流動性または被覆層数の異なるリポソームの形態と
それらの血小板凝集に対する検討 -

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：フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)が結合したリポソーム(H12-リポソーム)は血小板凝集を促進させることをこれまで報告してきた。今回、膜流動性に異なる H12-リポソーム (膜流動性：DMPC>DPPC>DSPC)を調製し、さらにこれらに ADP を内包した。さらに、DPPC については被覆層数の異なるものを作製した。これらのリポソームをネガティブ染色法、凍結超薄切片法で観察するとともに、ADP 凝集に対する効果と凝集塊におけるリポソームの分布を検討した。その結果、流動性の大きい DMPC、DPPC リポソームは、ヒト PRP の ADP 凝集において促進的な効果を示した。これらは凝集塊の血小板間に存在した。しかし、流動性の小さい DSPC は凝集促進効果を示さず、血小板間の分布はまばらであった。被覆層数 2 層の DPPC は単層のものに比較すると、ヒト PRP の ADP 凝集が低下したが、凝集塊の血小板間における分布は単層のものと同様であった。

A. 研究目的

フィブリノゲン γ 鎖 C 末端のドデカペプチド(H12)を結合させたリポソーム(H12-リポソーム)は、血小板凝集を促進させることにより、in vivo の止血作用を発揮すると考えられている。今回、ADP を内包した膜流動性または被覆層数の異なる H12-リポソームを作製し、これらの形態と血小板凝集に対する効果の検討し、その効果を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) ADP を内包した膜流動性または被覆層数の異なる H12-リポソームの作製とネガティブ染色法または凍結超薄切片法による観察

膜流動性の異なる 3 種類の H12-リポソームを作製し、DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine)、DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-

choline)、DSPC (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine)とした。膜流動性は DMPC>DPPC>DSPC の順を示す。また DPPC は室温または 60°C で造粒し、一重、二重の膜を持つリポソームを調整、さらに ADP を内包して H12-(ADP)リポソームとした。

ネガティブ染色法は蒸留水で 100 倍に希釈した H12-リポソームを予めフォルムバーム膜を張った電顕用グリッドメッシュに 5 μ l 載せ、5 分間静置した。濾紙で過剰液を吸い取り、さらに 2%酢酸ウランを 5 μ l 載せ、1 分後に過剰液を吸い取り乾燥させた後、透過型電顕で観察した。一部のグリッドメッシュに載った H12-リポソームは水洗、さらに PBS で洗浄後、ウサギ抗 H12 抗体、15 nm のコロイド金標識ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベートし、同様に酢酸ウラン染色後、観察した。

凍結超薄切片法は H12-リポソームに 0.2% グルタルアルデヒドを等量加え、4°C で 10 分

間固定した。遠心して得たペレットを PBS で洗浄、1 M ショ糖液中で 1 時間、さらに 2.3 M ショ糖液中に一昼夜浸漬した。この試料を凍結用試料ピンに載せて液体窒素中で凍結後、超ミクロトームで凍結超薄切片を作製した。切片は酢酸ウランで染色して透過型電顕で観察した。一部の試料はネガティブ染色法と同様に H12 の免疫染色を行った。

2) 膜流動性のまたは被覆層数の異なる ADP 内包 H12-リボソームのヒト PRP の ADP 凝集に対する効果の検討

健康成人から 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として血液を採血し、これを遠心して多血小板血漿 (PRP) および貧血小板血漿 (PPP) を得て、血小板数を 2×10^5 個/ml に調整した。これに上記で作製した 3 種類の H12 (ADP) リボソーム (2 mg/ml)、さらに ADP (80 μ M) を加え、凝集を測定した。同様に、被覆層数の異なる H12-(ADP) リボソーム (DPPC) の ADP 凝集に対する効果も検討した。

3) 凝集塊の電顕観察

2) と同様の凝集させた PRP に 5 分後に 0.2% グルタルアルデヒドを等量加え、4°C で 30 分間固定した。遠心してペレットを作製後、PBS で洗浄し、1 M ショ糖液中で 1 時間、さらに 2.3 M ショ糖液中に一昼夜浸漬した。この試料を凍結用試料ピンに載せて液体窒素中で凍結後、超ミクロトームで凍結超薄切片を作製した。切片は酢酸ウランで染色して透過型電顕で観察した。切片の一部は H12-リボソームの分布を同定するために、上記のようにウサギ抗 H12 抗体、さらにコロイド金標識ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベイトした。以下、同様に酢酸ウランで電子染色し、透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

1) 膜流動性または被覆層数の異なる H12-(ADP) リボソームの作製とネガティブ染色法または凍結超薄切片法による観察

DMPC、DPPC および DSPC をネガティブ染色で観察すると、それぞれのリボソームは直

径 200 nm 前後の粒子として観察された (図 1)。しかし、流動性が最も高い DMPC はリボソーム本体から突起状のものが出現していた。DPPC または DSPC には突起様構造が見られず、丸い形状を示した。

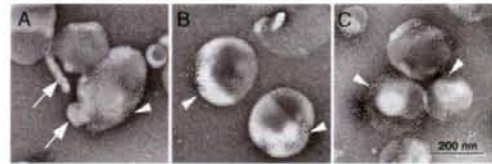


図 1. H12-リボソームのネガティブ染色像

A) DMPC はリボソーム本体から出現した突起が見られる (矢印)。B) DPPC は丸い形状を示す。C) DSPC も球状に観察される。リボソーム表面には H12 の存在を示すコロイド金が分布する (矢印)。

凍結超薄切片法ではそれぞれのリボソームは、ネガティブ染色像よりやや小さめに観察された (図 2)。しかし、DMPC では突起様構造は観察されず、球状を示した。リボソームの断面像では、リボソーム特有の脂質二重層が観察された。H12 の存在を示すコロイド金も表面に分布した。一方、60°C で造粒された DPPC は膜構造が複雑で、一部では 2 層に観察された (図 3、矢印)

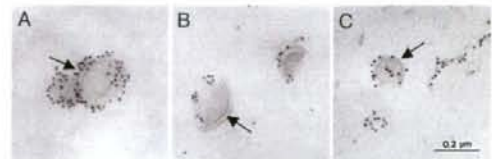


図 2. H12 リボソームの凍結超薄切片像

DMPC (A)、DPPC (B) および DSPC (C) は直径 200 nm 前後の球状を示し、断面には脂質二重層が観察される (矢印)。表面には H12 の存在を示すコロイド金が分布する。

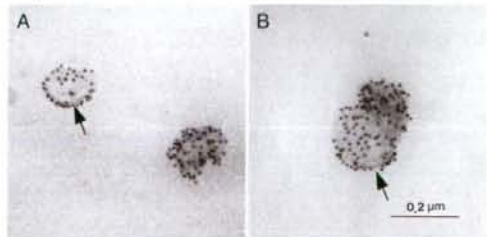


図 3. 室温または 60°C で造粒した DPPC の凍結超薄切片像

(A) 室温で造粒した DPPC は膜構造が単層を示す (A、矢印)。(B) 一方、60°C のものは膜構造が複雑で、一部では 2 層に観察される (矢印)

2) 膜流動性または被覆層数の異なる H12-(ADP)リポソームのヒト PRP の ADP 凝集に対する効果の検討

ヒト PRP にコントロールの H12-リポソーム (DPPC)、または ADP を内包した DMPC、DPPC、DSPC を加え (2 mg/ml)、さらに ADP (80 mM) を加えた (図 4)。コントロールの H12-リポソームでは、ADP 凝集に特有な二次凝集が強く惹起されず、凝集が解離する傾向を示した。DMPC および DPPC の添加では強い二次凝集が見られ、凝集がさらに促進された。一方、DSPC ではコントロールとほぼ同様な凝集を示し、二次凝集が解離した。

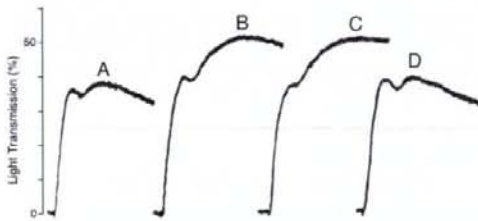


図 4. コントロール H12-リポソーム、ADP を内包する DMPC、DPPC、DSPC の ADP 凝集に対する効果

PRP にそれぞれのリポソームを加え、さらに ADP を添加した。コントロール (A) に比べて、DMPC (B) と DPPC (C) はヒト PRP の ADP 凝集を促進させる。しかし、DSPC (D) は促進させない。

一方、被覆層数の異なるように調製したリポソームは、室温で造粒したコントロールの ADP 内包リポソームが 1.0 ± 0.3 枚膜であった。同様に室温で造粒した H12-(ADP) リポソームは 1.1 ± 0.2 枚膜で、一方 60°C で造粒した H12-(ADP) リポソームは 1.8 ± 0.3 枚膜であった。これらリポソームのヒト PRP に対する ADP 凝集では (図 5)、コントロールの 1.0 ± 0.3 枚膜をもつ ADP 内包リポソームではが約 35% の透光度の上昇を示して凝集した後、解離した。室温で造粒し、 1.1 ± 0.2 枚膜をもつ H12-(ADP) リポソームでは 50% 以上の透光度の上昇を示し、凝集は促進されて解離は示さなかった。一方、 60°C で造粒した 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP) リポソームでは凝集が室温で造粒したものよりわずかに減弱していた。

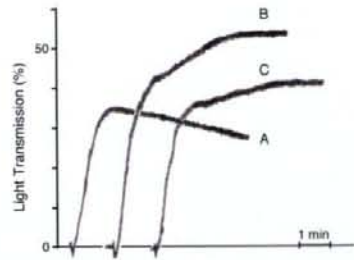


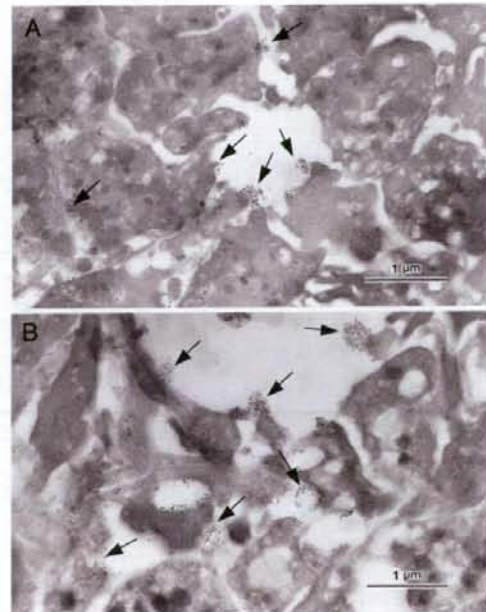
図 5. 被覆層数の異なる H12-(ADP) リポソーム (DPPC) の ADP 凝集に対する効果

(A) 室温で造粒し 1.0 ± 0.3 枚膜を持つコントロールの ADP 内包リポソームは解離性の凝集が起こる。(B) 室温で造粒し 1.1 ± 0.2 枚膜をもつ H12-(ADP) リポソームは強い凝集を示し、非解離性である。(C) 60°C で造粒し 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP) リポソームでは室温の 1 枚膜のものより凝集が低下している。(PRP: $2.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 、リポソーム: 1×10^6 個、ADP: $4 \mu\text{M}$)

3) 凝集塊の電顕観察

ウサギ抗 H12 抗体、さらにコロイド金標識ヤギ抗ウサギ抗体による免疫染色を行い、ヒト PRP の ADP 凝集 5 分時の DMPC、DPPC および DSPC の分布を観察した。

凝集能の測定で DMPC と DPPC による ADP 凝集は非解離性の強い凝集を示したが、電顕下でもこれらの血小板は著しく変形し、大きな凝集塊の形成が観察された (図 6)。



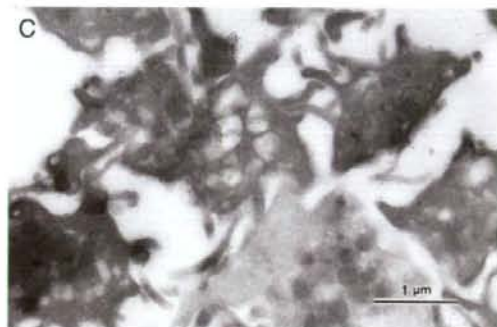


図 6. ヒト PRP の ADP 凝集における流動性の異なる ADP 内包 H12-リボソームの分布

(A) DMPC による ADP 凝集では、変形した血小板間に H12 の存在を示すコロイド金をもつリボソームが多く分布している(矢印)。(B) DPPC による ADP 凝集では、DMPC と同様に凝集塊中に多くのリボソームが分布している(矢印)。(C) しかし、DSPC による凝集では血小板相互の接着が弱く、観察されるリボソームは少ない。

DMPC による ADP 凝集では、変形した血小板間に H12 の存在を示すコロイド金をもつリボソームが多く分布していた(図 6 A、矢印)。同様に、DPPC による ADP 凝集でも、凝集塊中に多くのリボソームが分布していた(図 6 B、矢印)。しかし、DSPC による凝集では血小板相互の接着が弱く、観察されるリボソームは少なかった(図 6 C)。

被覆層数の異なるように調製したリボソームによる ADP 凝集では凝集能と同様に大きな違いは観察されなかった(図 7)。室温で造粒し 1.1 ± 0.2 枚膜の H12-(ADP)リボソームは血小板間に数多く分布した(図 7 A)。また、 60°C で造粒し 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP)リボソームも大きな凝集塊中に分布した(図 7 B)。

D. 考察

H12 を結合させたリボソーム (H12-リボソーム)は血小板凝集を促進させることをこれまで報告してきた。今年度は、このリボソームに ADP を内包させた。ADP は血小板濃染顆粒に存在し、血小板活性化時に血小板外に放出され、凝集の促進作用をもつ。すなわち、ADP が内包された H12-リボソームの凝集促進作用は単なる H12-リボソームより強くなると考えられた。また、流動性または被覆層数の異なるリボソームも作

製した。内包した ADP がその効果を発揮するためには、H12-リボソームが血小板に結合した後、リボソームから漏れ出なければならない。そこで、流動性または被覆層の異なるリボソームを作製し、どの条件の H12-リボソームが内包した ADP の効果が出やすいかを把握するために、まずそれぞれのリボソームの形態観察を行い、さらに血小板凝集で検討した。

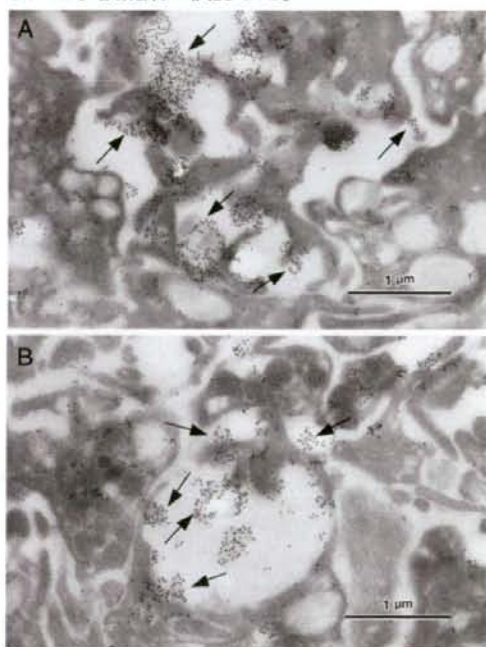


図 7. ヒト PRP の ADP 凝集における被覆層数の異なる ADP 内包 H12-リボソームの分布

(A) 1.1 ± 0.2 枚膜の H12-(ADP)リボソームによる ADP 凝集では、変形した血小板間に H12 の存在を示すコロイド金をもつリボソームが多く分布している(矢印)。(B) 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP)リボソームによる ADP 凝集では、DMPC と同様に凝集塊中に多くのリボソームが分布している(矢印)。

流動性が DMPC > DPPC > DSPC となるこれらのリボソームをネガティブ染色法または凍結超薄切片法で観察すると、それぞれは大差なく直径 200 nm 前後の粒子として観察された。凍結超薄切片法ではこれらの断面に単層の脂質二重層が観察された。ただし、DMPC はネガティブ染色法で本体から突起状のものが出現していた。この所見は凍結超薄切片法では見られなかった。すなわち、ネガティブ染色法は試料を固