

図5. 全体を通した血中好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光量: RLU) の推移

D. 考察

本研究では、血小板を減少させる目的で脱血操作を繰り返し行った。生体への影響を小さくするために、脱血検体より得られた赤血球成分の返却 (洗浄赤血球輸血) が行われたが、脱血後に好中球の接着・遊走能や好中球活性酸素産生能の有意な亢進が認められたことから (図1, 5)、それが大きなストレスとなった個体もあったものと考えられる。しかし、これらの個体に対し、人工血小板、人工化合物、生体由来物質のどれを投与した場合においても、輸液後に好中球の接着・遊走能や好中球活性酸素産生能の有意な上昇はみられなかった (図1, 5)。

また、人工血小板成分である ADP (アデノシン) については、先行研究において好中球の接着・遊走能や好中球活性酸素産生能を抑制する作用が報告されている (Elzschig HK, et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation. *Blood* 104: 3986-3992, 2004; Kumar V and Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* 616: 7-15, 2009)。この ADP の作用に関しては、人工化合物 2 種類、生体由来物質 2 種類を別々に群分けして統計解析を行った結果からも示唆された (図6)。すなわち、(ADP) リポソーム投与群と (PBS) リポソーム投与群双方において、脱血後の好中球活性酸素産生能が上昇し、輸液後には抑制されたが、有意な変動を示したのは (ADP) リポ

ソームのみであり、(ADP) リポソームと (PBS) リポソームそれぞれの脱血後からの抑制の傾きを比較すると、(ADP) リポソームにおいてより傾きが大きかった。

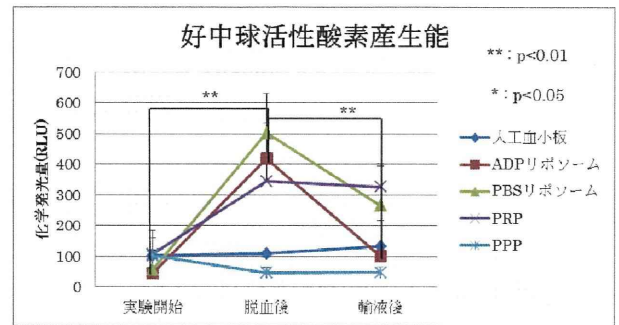


図6. 細分化した群分けにおける全体を通した血中好中球の活性酸素産生能 (ルミノール依存性化学発光量: RLU) の推移

以上の結果より、人工血小板である H12-(ADP) リポソームは異物反応を示さず、炎症や酸化ストレスを軽減できる可能性が示唆された。

E. 結論

本研究では、血小板減少状態で外傷性出血を起こす動物実験モデルにおいて、人工血小板の投与が血中好中球の機能に及ぼす影響について検討を行った。脱血によって好中球の接着・遊走能と活性酸素産生能の上昇がみられたが、人工血小板の投与による明らかな悪影響は認められなかった。一方、人工血小板による好中球機能の抑制作用が示唆された。これらの検討から、H12-(ADP) リポソームの安全性・有効性に関する評価指標の一つとして、好中球機能測定は有用と考えられた。

F. 健康危険情報: なし。

G. 研究発表: なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況: なし。

分担研究報告書

H12 (ADP) リポソームの人工血小板としての前臨床評価に関する研究

分担課題：マウスモデルを用いた安全性評価

研究分担者 後藤 信哉 東海大学医学部 内科学系（循環器内科） 教授

研究要旨

H12 (ADP) リポソームは止血機能を増強する。止血機能の過度の増強は心臓、脳など酸素需要の高い組織において臓器灌流血管の閉塞に基づく虚血症状を惹起するリスクがある。

血小板サイズ、臓器灌流血管のサイズ、臓器灌流血管の血管径と血小板サイズの比、ヒト血小板と H12 リポソームのサイズの比などに種差が大きいことを考慮すると、マウスモデルを用いた実験的研究においてヒトのイベントを予測することは困難とせざるを得ない。しかし、H12 (ADP) リポソームを用いた臨床試験を計画するためには、動物実験の施行は必須である。

本年度の研究では、昨年度に確認した H12 (ADP) リポソーム投与前後におけるマウスの行動異常の原因となる脳血管内の H12 (ADP) リポソームを中心とする血小板の集積の有無をマウス脳組織において組織学的に検討した。H12 (ADP) リポソーム投与後に行動異常を認めたマウスにおいても、脳組織内には H12 (ADP) リポソームを中心とする血小板の集積など血栓性の原因を見いだすことはできなかった。

大量投与時においても H12 (ADP) リポソームの血液中濃度が著しく高いわけではない。H12 (ADP) リポソームの存在は確率的に止血血栓の形成速度を増加させるものの、脳、心臓などの重要臓器に虚血性障害を惹起するほどのインパクトをマウスの実験では確認することができなかった。抗血小板薬、抗凝固薬など止血、血栓形成に影響を与える薬剤の有効性、安全性は最終的にはヒトにおいて十分数の症例を含む臨床試験により確認せざるを得ない。H12 (ADP) リポソームも止血に影響を与えるナノ粒子として、その有効性、安全性の確認は臨床試験に待たざるを得ない。

A. 研究目的

止血、血栓のバランスの重要性は高齢化社会において本質的に重要な問題である。加齢とともに血管内皮細胞の機能的障害を伴う動脈硬化性変化は進展し、身体は血栓性となるが、同時高齢者では出血性疾患である悪性腫瘍の有病率、発症率も高くなる。臨床的には、心筋梗塞、脳

梗塞などの血栓性疾患の発症予防のために抗凝固、抗血小板薬を使用する機会が増加しているが、同時に、抗凝固、抗血小板薬使用中の症例に悪性腫瘍が発症し、出血のため抗凝固、抗血小板薬を中止しなければならない事例も増加している。臨床データの蓄積が進むとともに、抗凝固、抗血小板薬中止を余儀なくされた症例で

は、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓イベントリスクが薬剤非使用例よりも高くなっていることも理解されてきた。すなわち、経験論的には、「出血イベントそのものが血栓イベントリスク」となることが理解されて来た。出血と血栓のバランスは単に局所における血栓性、止血性の変化のみでなく、全身の反応を含む複雑精妙な調節系の問題である。小動物を用いた実験はヒトを用いた臨床試験に進むためのデータ集積との点では必須である。しかし、H12 (ADP) リポソーム投与時の出血反応、止血反応については最終的にはヒトを対象とした臨床試験によらなければ結論を下すことが困難であることは抗血栓薬と同様と想定される。

B. 研究方法

1. 動物

週齢 10-11 週の ICR マウスを用いた。(CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan),

2. 倫理面への配慮

動物実験は、動物の生命を尊重するという基本的観点に基づく動物福祉を護持するための配慮を念頭に置き、東海大学実験動物委員会の定める各種規約を遵守して実験を施行した。

3. H12 (ADP) リポソームの投与

ケタミンによる前麻酔ののち、ネンブタールにより深麻酔を行った。尾静脈より 10 mg/kg にて H12 (ADP) リポソームを投与した。

4. マウスの行動異常の観察

昨年度、一昨年度の検討結果から H12(ADP) リポソーム投与マウス投与後のマウスの行動異常は確認されていた。本年度の研究でも H12 (ADP) 投与後のマウスの行動異常の有無については定性的に確認した。

4. 脳組織中切片中の H12 (ADP) リポソームを

中心とする微小血栓の有無の組織学的検討

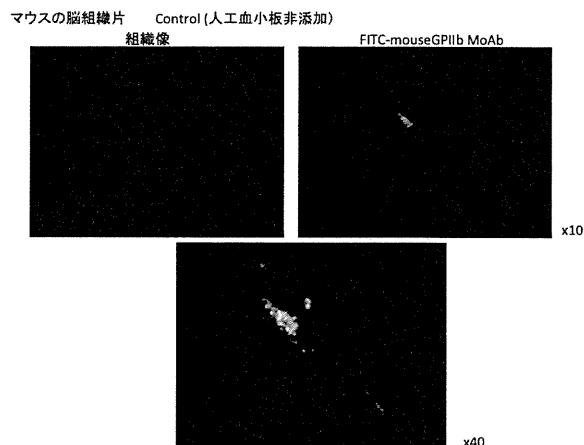
生理食塩水、または H12 (ADP) リポソームを含む生理食塩水を投与し、前回の実験にて顕著な行動以上を観察できた 30 分以上の時間まで放置した。その後、マウスを麻酔下に苦痛を除去して致死とした。マウスの脳を正中にて右/左の半分に切開し脳サンプルを作成した。作成したサンプルを未固定凍結ブロックとした。このブロックを 600 μ m 間隔にて薄片として、1 つのブロックサンプルから 5 つの薄片サンプルを作成した。マウスの血小板の脳内の局在を FITC 標識抗マウス CD41 抗体を用いて蛍光顕微鏡にて観察した。マウス血小板形状に比較して、H12 (ADP) リポソームのけは形態から弁別できる。Native 血小板と添加した H12 (ADP) リポソームの関係を検討した。リポソーム濃度は 10 mg/kg と 40 mg/kg を用いた。

C. 結果

1. H12 (ADP) リポソーム投与後のマウスの挙動

投与前において、両ケージ内のマウスともに活発に行動していた。10 mg/dL 以上の濃度にて H12(ADP) リポソームを投与すると、その投与を受けたマウスに行動の活力の低下を昨年度の研究と同様に認めた。

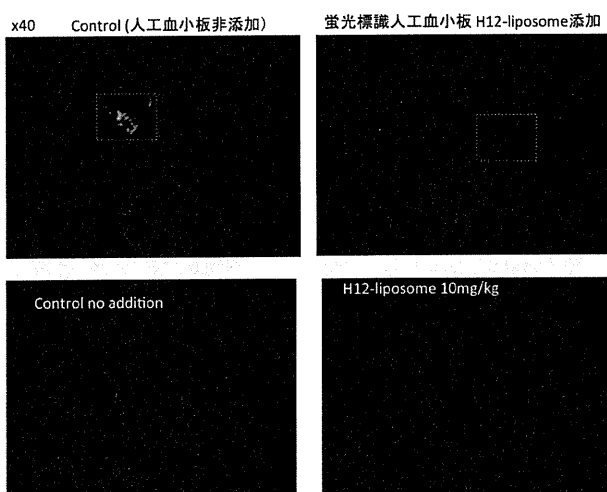
2. 脳組織切片における H12(ADP) リポソームと



血小板血栓の検討

H12 (ADP)リポソーム非添加のコントロール群にても、脳内には一部血小板の集積を認めた(前ページ右下図)。図内左上が脳組織像、右上および下がマウス血小板を蛍光標識した時の血小板塊の集積を示す。マウス血小板はサイズが小さいため、顕微鏡の倍率として10倍、40倍拡大では個別の血小板形態まで確認することはできなかつた。一方、脳組織の一部に血小板塊が存在することは確認できた。

同一の実験条件にてH12 (ADP)リポソームを10 mg/kgの濃度にて添加した結果を下段に示す。Native血小板集積部位にH12 ADP (リポソーム)と思われる球状小粒子を認めるが、コントロー



ルとの顕著な差は見られない。俯瞰的に見ても、H12 (ADP)リポソーム投与下において、脳組織内の血小板の集積が多いことも、個々の血小板集積か塊のサイズが大きいことも認めなかつた。

H12 (ADP) リポソーム投与下にて行動異常を認めたマウスでも脳組織内の微小血栓の集積に増加は明らかではなかつた。

D. 考察

H12 (ADP) リポソームは過去の動物実験にお

いて止血機能を増強することが明確に示されている。止血機能亢進の反面としての血栓性の亢進が危惧され、実際マウスにおいて高濃度のH12 (ADP) リポソーム投与後においてマウスの行動異常を認めた。昨年度までの簡易的な検討では、H12 (ADP) リポソーム投与後のマウスにて脳組織内にH12 (ADP) リポソームと血小板の集積を認めたため、過度の血栓性の亢進に伴う脳内の微小血栓の形成が行動異常の原因として疑われた。本年度の研究では、脳組織切片を詳細に検討した。H12 (ADP) を投与していないマウスでも脳組織内には血小板の集積を認め、また脳組織内の血小板の集積にサイズ、数いづれもH12 (ADP) リポソーム投与の有無において明らかな差異を認めなかつた。行動異常の原因を微小血栓による脳内の虚血とすることは困難である。

近年の臨床研究成果は、出血と血栓の関係が投与想定した以上に複雑であることを示唆している。血栓性の高い症例は出血イベントリスクの高い症例でもある。また、血栓イベントリスクの高い症例に対して抗血栓薬を投与すると血栓イベントリスクを一時的に低減させることは可能であるが、抗血小板薬により出血イベントを起こした症例では、逆に血栓イベントリスクが増加することも明らかにされた。出血、血栓のバランスは血管損傷部位局所における単純なバランスではなく、未知の部分も多く含む全身性の反応と考えざるを得ない。

*in vitro*の研究、小動物を用いた短期間の研究ではH12 (ADP) リポソーム投与時における止血機能の増強は確実に検証されている。懸念される安全性の問題としての血栓性の亢進については、小動物を用いた精巣動脈血栓モデル、脳組織の検討では明確な以上を示すことはできなかつた。止血/血栓の全身的な精妙さを考えると、安全性に関する懸念については最終的にはヒトの臨床試験まで未知の部分が残るとして検討を勧め

ざるを得ない。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Chan FK, Goto S, Wu MS, Abola MTB, Yeoh KG, Sutrisna B, Chua SS, Mahachai M, Turajane T, Wu B, Zeng QY, Sugano K. Burden of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Anti-platelet Drug use in Asia: A Multi-disciplinary Working Party Report. **Clinical Gastroenterology & Hepatology**, in press.

2. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, Burton P, Cohen M, Cook-Bruns N, Fox KA, Goto S, Murphy SA, Plotnikov AN, Schneider D, Sun X, Verheugt FW, Gibson CM; the ATLAS ACS 2-TIMI 51 Investigators. Rivaroxaban in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. **N Engl J Med**. 2011 Nov 13. *N Engl J Med*.366 (1):9-19

3. Kakkar AK, Mueller I, Bassand JP, Fitzmaurice DA, Goldhaber SZ, **Goto S**, Haas S, Hacke W, Lip GYH, Mantovani LG, Verheugt FWA, Jamal W, Misselwith F, Rushton-Smith S, Turpie AGG: International Longitudinal registry of patients with atrial fibrillation at risk of stroke: Global Anticoagulant Registry in the FIELD (GARFIELD). **Am Heart J** 163(1):13-19 e11, (2011)

4. Kawai T, Takagi Y, Fukuzawa M, Yamagishi T, Goto S: The role of trefoil factor family in apparently healthy subjects administered gastroprotective agents for the primary prevention of gastrointestinal injuries from low-dose acetylsalicylic acid: a preliminary study. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition** 49: 136-140,2011

5. Meadows T.A., Bhatt D.L., Cannon C.P., Gersh B.J., Rother J, Goto S, Liao C, Wilson P.W.F., Salette G, Smith S.C., Steg G, for the REACH Registry Investigators: Ethnic Differences in Cardiovascular Risks and Mortality in Atherothrombotic Disease: Insights From the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. **Mayo Clinic Proceedings** 86(10): 960-967,2011

6. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, Lopes RD, Hylek EM, Hanna M, Al-Khalidi HR, Ansell J, Atar D, Avezum A, Bahit MC, Diaz R, Easton JD, Ezekowitz JA, Flaker G, Garcia D, Geraldes M, Gersh BJ, Golitsyn S, Goto S, Hermosillo AG, Hohnloser SH, Horowitz J, Mohan P, Jansky P, Lewis BS, Lopez-Sendon JL, Pais P, Parkhomenko A, Verheugt FW, Zhu J, Wallentin L; the ARISTOTLE Committees and Investigators. Apixaban versus Warfarin in Patients

with Atrial Fibrillation. **N Engl J Med**. 365: 981-992, 2011

7. Origasa H, Goto S, Shimada K, Uchiyama S, Okada Y, Sugano K, Hiraishi H, Uemura N, Ikeda Y, on behalf of the MAGIC Investigators: Prospective Cohort Study of Gastrointestinal Complications and Vascular Diseases in Patients Talking Aspirin: Rationale and Design of the MAGIC Study. **Cardiovasc Drugs Ther** 25: 551-560, 2011 (DOI: 10.1007/s10557-011-6328-2)

8. Goto S, Ikeda Y, Shimada K, Uchiyama S, Origasa H, Kobayashi H; The J-TRACE Investigators. One-Year Cardiovascular Event Rates in Japanese Outpatients With Myocardial Infarction, Stroke, and Atrial Fibrillation. **Circ J**. 2011 Aug 20. 75(11):2598-2604

9. Wiviott SD, Flather MD, O'Donoghue ML, Goto S, Fitzgerald DJ, Cura F, Aylward P, Guetta V, Dudek D, Contant CF, Angiolillo DJ, Bhatt DL, on behalf of the LANCELOT-CAD Investigators. Randomized Trial of Atopaxar in the Treatment of Patients With Coronary Artery Disease. **Circulation** 123: 1854-63, 2011

10. O'Donoghue ML, Bhatt DL, Wiviott SD, Goodman SD, Fitzgerald DJ, Angiolillo DJ, Goto S, Montalescot G, Zeymer U, Aylward PE, Guetta V, Dudek D, Ziecina R, Contant CF, Flather MD, on behalf of the LANCELOT-ACS Investigators. Safety and Tolerability of Atopaxar in the Treatment of Patients With Acute Coronary Syndromes. **Circulation**, 123: 1843-53, 2011

11. Gibson CM, Mega JL, Burton P, Goto S, Verheugt F, Bode C, Plotnikov A, Sun X, Bruns NC, and Braunwald E: Rationale and design of the Anti-Xa therapy to Lower cardiovascular events in Addition to standard therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome-Thrombolysis in Myocardial Infarction 51(ATLAS-ACS 2 TIMI 51) trial: A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of rivaroxaban in subjects with acute coronary syndrome. **American Heart Journal** 161: 815-821 e6 (2011)

(総説、著書など)

1. Goto S: Monitoring of the Effects of New-Generation Oral Anticoagulants –What Does It Mean? -. **Circulation Journal** in press, Feb.2012

2. Goto S: Role of Platelet in Cardiovascular Events with Coronary Intervention. **Proceedings in Korean Society of Interventional Cardiology** 2(1): 65-68, 2011

3. Goto S, Serebruany V: VORAPAXAR.PAR1 receptor antagonist, Antiplatelet therapy. **Drugs of the Future** 2011 36(2): 101-113.2011

4. Goto S. PAR1 Inhibitors in ACS. **Acute**

- Coronary Syndrome** 10(3): 103-108
5. Kawai T, Lanas A, and Goto S. European physician don't like cytoprotective agents? **J Clin Biochem Nutr** 49: 67, 2011
 6. Goto S. Use of statins and recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation or electrical cardioversion: An old question revisited. **Thromb Haemost**, in press (2011)
 7. Goto S, Serebruany V. Vorapaxar: PAR1 receptor antagonist, antiplatelet therapy. **Drugs Fut** 2011, 36(2): 101-108
- G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）
該当なし

平成 23 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) リポソームの人工血小板としての前臨床評価 (効力と安全性)

H12-(ADP) 小胞体の安全性評価 : 血栓誘発性の検討 / 静脈血栓マーカーへの影響
リン脂質を用いた H12-(ADP) 小胞体の血中濃度測定の有用性

研究分担者 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 丸山 仁美 (同 輸血・細胞療法センター 技術員)

渡邊 直英 (同 輸血・細胞療法センター 助教)

半田 誠 (同 輸血・細胞療法センター 教授)

研究要旨

人工血小板の候補薬物である H12-(ADP) 小胞体は、止血部位で活性化した残存血小板を特異的に認識・架橋するとともに、内包物質である生理的血小板凝集因子の ADP を放出することで、止血血栓の形成を促進し、血小板輸血に匹敵する効果を発揮する。しかしながら、止血血栓の促進作用の程度によっては、病的血栓の誘発作用の危惧が必ず伴う。そこで今回、正常および DIC による静脈血栓症マウス (トロンボプラスチン誘発性) に小胞体を投与して、生体内での過凝固および二次線溶マーカーであるフィブリノゲン、アンチトロンビンおよび D-ダイマーの変動を経時的に測定して、静脈血栓症の誘発性について検討を加えた。また、H12-(ADP) 小胞体の血中濃度代理マーカーとして、その構成成分であるリン脂質の測定がその感度において有用であるか否かを、ヒト血清の希釈系列を使用して検討した。その結果、陰性対照小胞体 (H12 非結合と ADP 非内包 PBS 内包小胞体) と比較して、H12-(ADP) 小胞体は、検討した投与量の範囲内 (常用量: 20 mg/kg および高用量: 40 mg/kg) で正常および DIC マウス (トロンボプラスチン投与量を最適化することで血栓準備状態に準じた条件に設定) の生体内を反映する血栓症マーカーに影響を及ぼさなかった。また、ヒトへの標準的な小胞体投与量から推測したリン脂質の血中濃度の変動レベルは、実際の測定キットの感度では対応することが困難な低レベルであり、リン脂質の血中濃度は小胞体の代理マーカーとしては適当ではないことがわかった。

A. 研究目的

フィブリノゲン 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 (H12-(ADP) 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

包物質の血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate (ADP) を放出して、その血小板輸血に匹敵した止血能を発揮することを、血小板減少動物モデルを対象に *in vivo* にて証明してきた。

平成 21 年度および 22 年度は、H12-(ADP) 小胞体を単回で正常ラットに投与し (20 mg/kg、40 mg/kg、80mg/kg)、投与後の血液凝固検査値、血液生化学的検査値、臓器内(脾臓・肝臓) 脂質検査値 への影響を検討した。その結果、血液凝固、血液生化学的検査値には明らかな影響はないものの、脂質関連検査値 (コレステロール、リン脂質、LDL コレステロール) のみが、小胞体の血中濃度を反映して、一過性に、その投与量依存性に増加することを明らかにした。平成 23 年度は、当該小胞体の副作用として最も危惧される血栓誘発に関して、正常および血栓症マウスを用いて検討を加えた。また、リン脂質濃度が小胞体の血中濃度を反映する代理マーカーとなりうるか否かを、ヒト血清の希釈系列を使用して検討した。

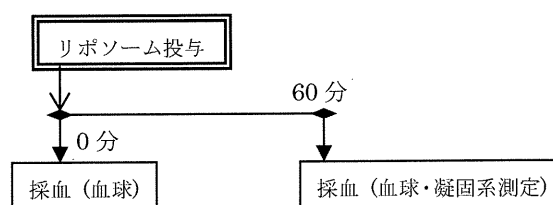
B. 研究方法

Wistar 系雄性ラット (三共ラボ、7 週齢、200-220g) は、一晚 (最低 16 時間) 絶食した後、以下の実験に用いた。ラットは、ジエチルエーテル麻酔下に尾静脈より小胞体およびトロンボプラスチンを投与され、その後、腹部大動脈より 3.13% クエン酸ナトリウム入真空採血管を用いて採血された。この血液検体は、遠心分離 (2,200g, 10 min) し、血液凝固検査用血漿を回収した。血液凝固検査は、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)、フィブリノゲン抗原量 (Fng)、アンチトロンビン活性 (ATIII)、D-ダイマーの 5 項目を測定 (三菱化学メディエンスに委託) した。血球数は、自動血球計算計 (K-4500, Sysmex) にて測定した。

<正常ラットへの H12(ADP)小胞体投与>

ラットは麻酔下に尾静脈に注射針を刺入され、血球数計測用の血液 0.2mL 採取した後に H12(ADP)小胞体 (20mg/kg、80mg/kg 相当量を 1mL の PBS に懸濁) を投与された。同量 (1mL) の生理食塩水および (PBS) 小胞体 (H12 を表面に持たず、ADP を含まない PBS を内包したリポソーム) 懸濁液を投与したものを陰性対照とした。小胞体投与 60 分後に採血を行い、血球数および凝固能を評価した (Fig. 1a)。

Fig.1-a



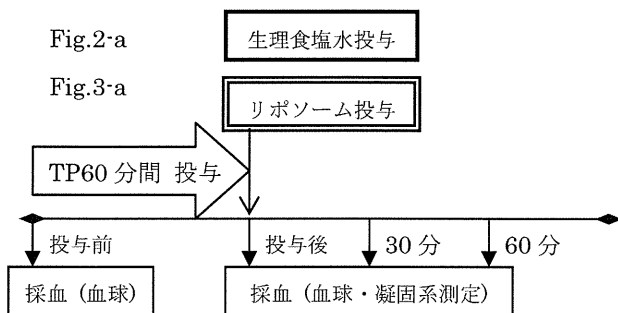
<血栓誘発モデルラットの作製>

ラットは麻酔下に尾静脈に留置針を留置された。トロンボプラスチン (TP) (トロンボチェック PT プラス, Sysmex、ウサギ脳由来トロンボプラスチン+乳酸カルシウム) は、PT 検査の使用説明書にある通りの濃度に生食で溶解し、そのままの濃度のもの (原液) または 4 倍、6 倍、8 倍に生食で希釈したもの 2 mL を 1 時間かけて、その留置針よりシリンジポンプ (Apparatus pump198, Harvard) を用いて持続投与した。同量の生食を投与したものを陰性対象とした。TP 投与終了直後、30 分後、60 分後に採血を行い、血小板数、凝固系検査を行った。(Fig. 2a)

<血栓誘発モデルラットへの H12(ADP)小胞体投与>

ラットは、麻酔下に尾静脈から 8 倍希釈した TP 2 mL を 1 時間かけて持続投与され、

その直後に H12(ADP)小胞体 (20mg/kg、40mg/kg 相当量を 1mL の PBS に懸濁) を投与された。生理食塩水を陰性対照とした。TP 投与終了後に小胞体を投与し、直後、30 分後、60 分後に採血を行い、血小板数、凝固系の測定を行った (Fig. 3a)。



<血中リン脂質濃度の測定>

リン脂質の測定は小胞体の定量に使用しているリン脂質測定キット(リン脂質 C-テストワコー, 和光純薬工業株式会社)を用いた。

C. 研究結果及び考察

H12(ADP)小胞体は、H12 を介して活性化した血小板同士を架橋する事で血小板凝集に巻き込まれ、さらには内包する血小板凝集惹起物質である ADP を放出する事で血小板血栓の形成を促進する能力を有している。つまり、そのもの自体が血栓形成を助長する可能性が示唆される。そこで、まずは血小板数が正常なラットに治療的および過剰量の H12(ADP)小胞体を投与し、血栓傾向がないかを検討した。さらに血栓が出来やすい状態での安全性評価のため、血栓傾向のモデルラットを作製し、これに治療的および過剰量の H12(ADP)小胞体を投与して、その血栓傾向を促進しないかを検討した。

1. 正常ラットへの H12(ADP)小胞体投与

(Fig. 1b)

正常ラットに H12(ADP)小胞体または (PBS)小胞体を投与し、血栓傾向が認められるかを検討したところ、生理食塩水のみ投与と比べ、血小板数には有為な変化は認められなかった。PT は、生理食塩水のみ投与と比べ小胞体を投与したものでは有為な短縮を認めたが、PT の短縮そのものは臨床的な意義はなく、等量の H12(ADP)小胞体または (PBS)小胞体を投与したもの同士での比較では有為な差は認められなかった。また、フィブリノゲン値は、H12(ADP)小胞体 20mg/kg または (PBS)小胞体 80mg/kg を投与した群で有為な上昇を認めたが、等量の H12(ADP)小胞体または (PBS)小胞体を投与した群と比較すると有為な変化は認められず、用量依存性も認めなかった。一方、APTT は、H12(ADP)小胞体 20mg/kg 投与で有為な延長を認め、80mg/kg ではさらに延長し、用量依存性を認めた。また、ATIII 値では、H12(ADP)小胞体 80mg/kg 投与でデータのバラツキは認めたものの生理食塩水のみ投与と比較で有為差なく、(PBS)小胞体 80mg/kg 投与で有為な活性上昇を認めたが ATIII 活性の上昇に臨床的意義はない。H12(ADP)小胞体または (PBS)小胞体の投与により D-ダイマーの上昇も認めなかった (Fig. 1b)。以上より、H12(ADP)小胞体投与は、APTT 延長の様な凝固系への試験管内 (*in vitro*) での影響 (凝固阻害) を認めたものの、D-ダイマーの上昇は認めず、それ以外の生体内 (*in vivo*) の凝固系を反映するマーカーへの明らかな影響を認めなかったことから血栓傾向はなかったものと考えられた。

2. 血栓誘発モデルラットの作製

正常ラットへの H12(ADP)小胞体投与で

in vitro 凝固系への影響を認めたことから、血栓傾向を誘発させた状態で H12(ADP)小胞体はその血栓傾向を助長しないかどうかを検討する事とした。人工的な血栓傾向の代表例として DIC モデル動物が知られており、これは動物にトロンボプラスチンまたは LPS を持続投与する事で作製出来る。LPS は、単球や血管内皮細胞に作用して組織因子の発現を促す事で外因系凝固系を活性化し血栓を形成すると同時に PAI の発現も促し線溶系を抑制する事で多発血栓による多臓器不全(線溶抑制型 DIC) が前景となる DIC を誘発すると考えられている。また、検査データとしては PAI の著しい上昇と D-ダイマーの増加が軽度であるのが特徴で、フィブリノゲンや ATIII 活性の低下が遷延する。一方で、トロンボプラスチンで誘発される DIC は、組織因子の直接投与であるから、外因系凝固系と線溶系の活性化が同時に起こり、凝固因子の欠乏による出血症状(線溶亢進型～線溶優位型 DIC) が前景となる。検査データとしては、D-ダイマーの著しい増加が特徴的となり、PAI の上昇は軽度である。以上の特徴から我々は、H12(ADP)小胞体による血小板血栓形成の度合いをその分解産物である D-ダイマーの増減としてとらえる事の出来るトロンボプラスチン誘発による血栓誘発モデル動物の基礎検討を行った。

PT の測定に用いるトロンボプラスチンの原液およびそれを 4 倍、6 倍、8 倍も希釈したものをラット体重 100g あたり 1mL (ラット体重が 200~220g であったので、2~2.2mL) を 1 時間かけて尾静脈からシリンジポンプを用いて持続投与し、投与直後、30 分後、60 分後に採血し、凝固系の検査を行った (Fig. 2a)。トロンボプラスチンの投与後における全ての検査ポイントにおいて

APTT、PT は測定不能まで延長し、血小板は 40 万/ μ L 前後、フィブリノゲンは 50mg/dL 前後まで低下したままだった (Data not shown, Fig. 2b)。一方、トロンボプラスチン投与量の多いラットでは D-ダイマーの測定限界を超えてしまっていたが、原液を 6 倍または 8 倍に希釈したものを投与したラットでは、D-ダイマーは測定可能であった。以上より、ラットにはトロンボプラスチンの原液を 6 倍または 8 倍に希釈したものを投与し、血栓誘発モデルラットとした。

3. 血栓誘発モデルラットへの H12(ADP)小胞体投与

8倍希釈したトロンボプラスチンを1時間かけて持続投与して血栓傾向を誘発後に H12(ADP)小胞体を20mg/kgまたは40mg/kgを投与し、凝固系への影響を検討した。血小板数の減少やフィブリノゲンの低下、D-ダイマーの増加に関して、H12(ADP)小胞体の投与による影響は認めなかった。ATIIIは40mg/kg投与直後から30分後にかけて低下を示したが検体上は有為な変化は認められず、60分後にはトロンボプラスチン投与前の値まで正常化していた (Fig. 3a, 3b)。

以上より、この血栓誘発条件下でも、H12(ADP)小胞体の常用量上限(20mg/kg)では血栓傾向を増悪する事なく、過剰量(40mg/kg)でもH12(ADP)小胞体による明らかな血栓の増悪傾向は認めなかった。

4. リン脂質濃度の測定

H12(ADP)リポソームを構成する成分である DPPC がリン脂質であることから、これまで H12(ADP)リポソームの定量にはリン脂質の定量キットを用いてきた。しかし、その測定誤差が大きい事がわかっていたので、まずは実際に H12(ADP)リポソームをヒト

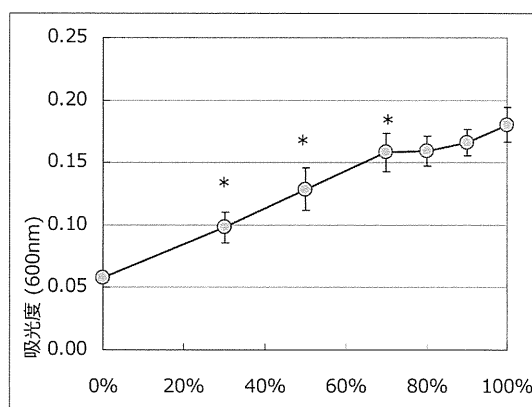
に投与したと仮定し、リン脂質の増加度合いをシュミレーションした。体重 50kg のヒトに過剰量 40mg/kg(常用量の最大を 20mg/kg としてきた) の H12(ADP)リポソームを投与し、その全てが血中に存在したとすると、リポソーム濃度は $(40\text{mg/kg} \times 50\text{kg}) / (70\text{mL/kg} \times 50\text{kg}) = 0.57\text{mg/mL}$ となる。さらにリポソームの 55%を DPPC が占めているので、リン脂質濃度は 0.314mg/mL 上昇する事となる。ヒトの血中リン脂質の基準値が 1.5~2.8mg/mL (通常は 150~280mg/dL と標記されている。) であるから、過剰量のリポソームを投与してもリン脂質の増加量は 10~20%の増加でしかない事がわかった。

ヒト血清を 100% (2.35mg/mL) として、生理食塩水で希釈し、その 90% (2.12mg/mL)、80% (1.86mg/mL)、70% (1.65mg/mL)、50% (1.18mg/mL)、30% (0.71mg/mL) 血清 (括弧内は希釈後の血清リン脂質濃度) を作製し、リン脂質濃度をそれぞれ 6 回測定 (通常 3 回測定) した (Fig. 4)。平均実測値では 90%=2.04mg/mL、80%=1.89mg/mL、70%=1.87mg/mL、50%=1.23mg/mL、30%=0.57mg/mL と 70%以外は比較的理論値に近い数値が得られたが、逆に明らかに濃度の違う 80%と 70%でほぼ同じ平均実測値となった。しかし、実際の実測値はバラツキが大きい事から、100%血清とそれぞれの濃度の実測値で T 検定を行った所、90%と 80%は有為な差としてとらえられず、70%で初めて有為差を認めた。同様に 70%と 50%では約 30%の相違があるが、これは有為な実測値の差としてとらえる事が出来ていた。つまり、このリン脂質の測定法では 20% (0.49mg/mL) 程度の差までは測定した時に明らかな差としてとらえられない事が示唆された。

我々のこれまでの H12(ADP)リポソームの血中滞留時間の検討によれば 3 時間後にはその 40~50%しか残存していない事を考慮すると、常用量のリポソームを投与した後に血中リポソーム残量の定量をリン脂質濃度で間接的に測定するのは可能ではないと考えられた。

Fig 4

ヒト血清の希釈系列を用いたリン脂質濃度の測定値



D. 結論

生理的な止血作用 (一次止血) を促進する H12-(ADP)小胞体は、標準 (20mg/kg) および高用量 (40mg/kg) の投与量においては、鋭敏な血液代理マーカー (D-ダイマーやアンチトロンビン) に影響を及ぼさず、血栓の誘発作用は認められなかった。リン脂質の測定はその感度の点から常用量の小胞体の血中濃度のモニタには有用ではないことがわかった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

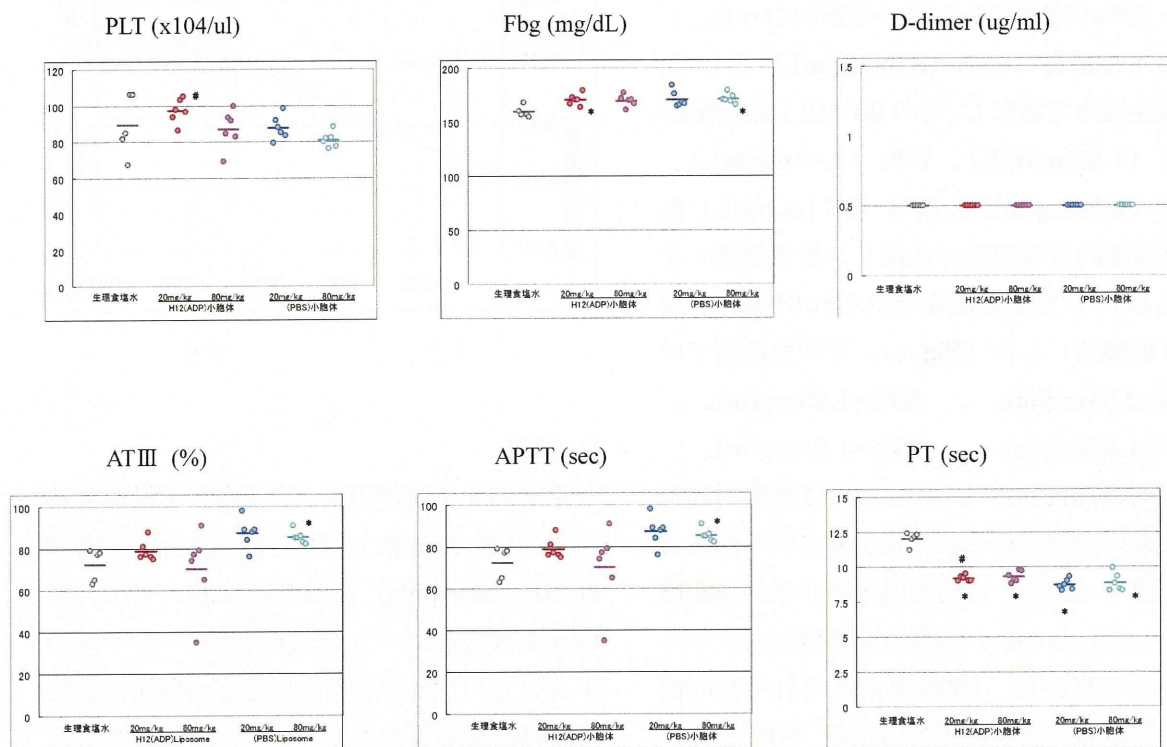
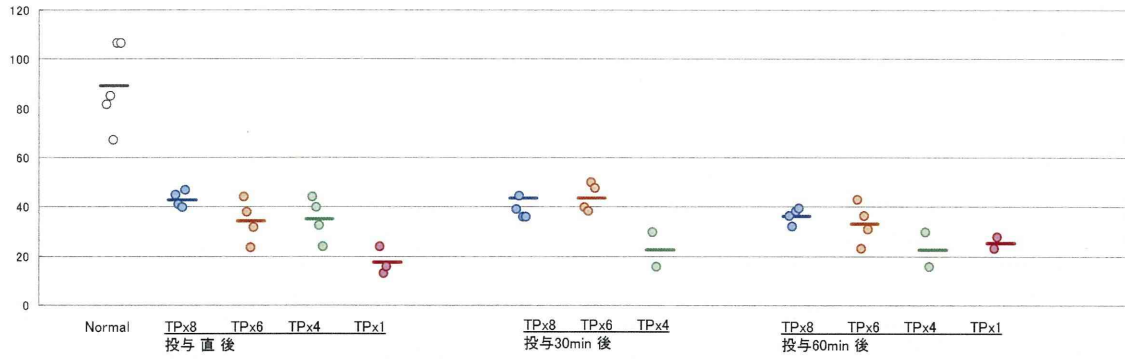


Fig.1b Blood parameters at 60min after H12(ADP)Liposome injection into the normal rats(n=6).

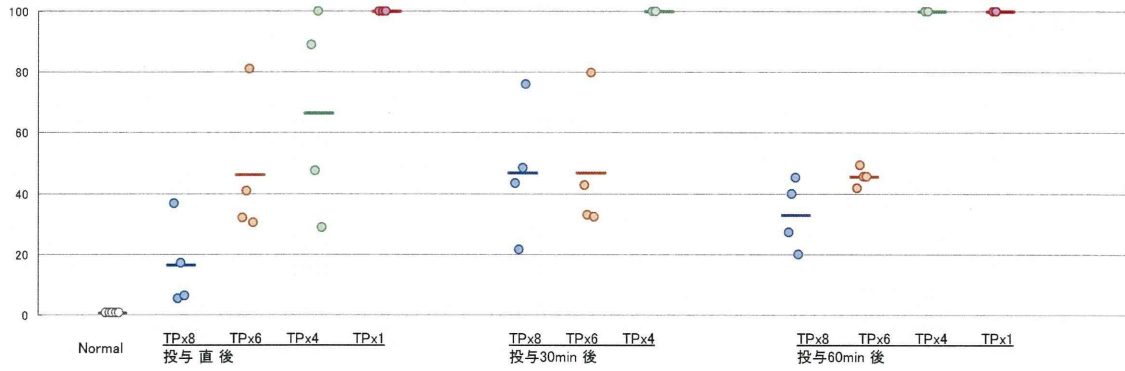
P<0.05 represents a significant difference between the Normal and Liposome induced/

DIC models*, Liposome and H12(ADP)liposome#

PLT (x10⁴/ul)



D-dimer (ug/ml)



ATIII (%)

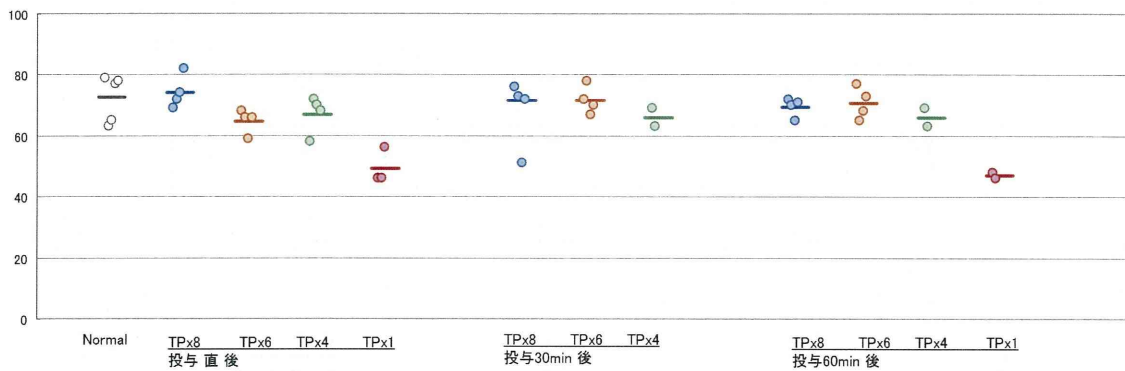


Fig.2b Blood parameters before, 0min, 30min and 60min after TP x1, x4, x6, x8 injection 1hr into the normal rats(n=2-6).

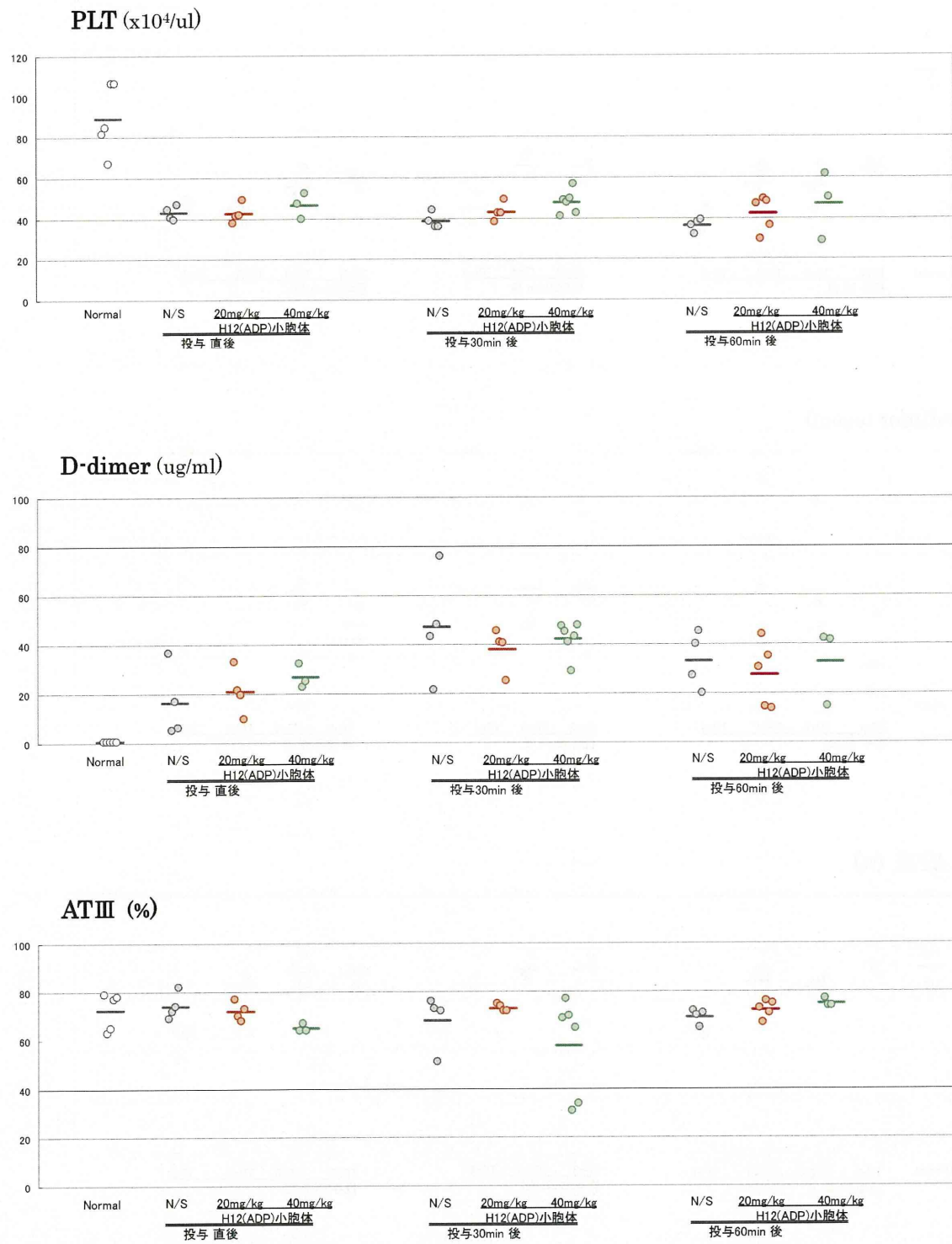


Fig.3b Blood parameters before & 0min, 30min and 60min after x8TP injection 1hr & H12(ADP)Liposome (20mg/kg , 40mg/kg) injection into the PreDIC model rats(n=2-6).

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助「創薬基盤推進研究事業」
『H12(ADP)リポソームの人工血小板としての前臨床評価（効力と安全性）』

分担研究報告書

血小板凝集塊に巻き込まれた H12(ADP)リポソームの形態について
- 急速凍結割断レプリカ法による検討 -

分担研究者 鈴木 英紀（日本医科大学・形態解析共同研究施設・准教授）

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)を結合させ、さらに ADP を内包させた H12(ADP)リポソームは、ヒト血小板浮遊液のコラーゲンおよび ADP により惹起される血小板凝集を促進させることを電顕的に報告してきた。H12(ADP)リポソームは凝集塊に巻き込まれ、そこで内包された ADP がリポソームから漏れ出ることによって、凝集を促進すると考えられる。しかし、血小板凝集塊に巻き込まれた H12(ADP)リポソームから ADP がどのような機構で漏れ出ることについては明らかではない。そこで今年度は、凝集塊に巻き込まれたリポソームの形態をより把握するために、急速凍結割断レプリカ法で検討した。作製した H12(ADP)リポソームは、直径 100~250 nm のほぼ球状な形態を示した。洗浄血小板に H12(ADP)リポソームを混ぜ、さらにトロンビンを加えると、攪拌なしでは血小板は凝集することなく、単独に存在した。この時、リポソームは血小板の表面膜および開放小管系中に観察された。特に狭い開放小管系中に多量に分布するリポソームは、球体ばかりでなく楕円体の形態を示すものもあった。トロンビンを加えて攪拌すると、血小板は凝集し、この時リポソームは血小板相互間にも多量に存在した。そのほとんどが楕円体を示し、その一部の表面には、小孔様の穴も観察された。すなわち、H12(ADP)リポソームは血小板凝集塊中で変形するとともに、その表面に小孔が形成され、この小孔から ADP が放出されることによって、凝集をさらに促進させると考えられる。

A. 研究目的

H12 を表面に結合させ、ADP を内包させた H12-(ADP)リポソームは、ヒト血小板浮遊液へのコラーゲンまたは ADP 添加により惹起される血小板凝集を促進させる。すなわち、リポソームはその表面の H12 によって血小板のフィブリノゲン受容体(GPIIb/IIIa)に結合し、血小板相互を架橋する。次いで、内包する ADP が凝集塊中で漏れ出ることによって凝集をさらに促進させると考えられている。

ところで、これまで H12-リポソームまたは H12-(ADP)リポソームの形態を作製した直後のものから、血小板凝集塊に巻き込まれるものまで電顕的に観察してきた。ネガティブ染色法

では、作製直後のリポソームは立体的ではなくてつぶれた多角形に見えた。さらに凍結超薄切片法では、その切り口の断面は球状を想像させるきれいな円形ではないものの、その二重膜によりリポソームと判断できた。すなわち、これらの方法は必ずしもリポソームの正確な形態を反映していないと考えられた。さらに、凝集塊中のリポソームはコントラストが不十分なために、通常の電顕法では十分に可視化できなかった。しかし、抗 H12 抗体を使い、凍結超薄切片法による免疫電顕法を採用することによって、リポソームは球状ではなくても凝集塊中のそれらを可視化してきた。それでも、凍結超薄切片を使う限りにおいては、リポソームの

凝集塊中にある正確な形態を把握できない。換言すれば、血小板凝集塊中に巻き込まれた H12-(ADP)リポソームから ADP が漏れ出るとすると、その形態に何らかの変化があると考えられるが、従来の方法ではその変化を捉えられないことになる。

そこで、急速凍結割断レプリカ法の採用に至った。本法は試料を液体ヘリウム温度で試料を急速に凍結し、試料作製器内で試料面を割断、その断面に対して白金およびカーボンを蒸着してレプリカ膜を作製し、それを電顕観察する方法である。本法は一般的に試料の形態保存に優れ、断面における構造を立体的に観察できるために、リポソームの形態を正確に反映すると考えられる。

B. 研究方法

1) H12-(ADP)リポソームの凍結割断レプリカ法による検討

調整した H12-(ADP)リポソーム液を超遠心し、上清を棄て高粘度の液状とした。これに氷晶防止剤としてグリセロールを 40% になるように加えて 2 時間静置した。試料の 1 滴を凍結レプリカ作製装置の試料台に載せ、液体窒素中で凍結した。あらかじめ真空排気と -110°C に温度設定した凍結試料作製装置 (日本電子 EM-19500 JFD II) の中に試料を導入し、排気した。試料の表面をナイフで面出し、割断後、その面に白金およびカーボンを蒸着した。試料を装置から取り出し、室温に戻ってから試料を次亜塩素酸のハイターで溶かし、蒸着膜(レプリカ膜)を遊離させ、これを 2 回蒸留水で洗浄した。レプリカ膜をグリッドメッシュに回収し、透過型電顕 JEM1010 (日本電子) で観察した。

2) ヒト血小板と H12-(ADP)リポソームのトロンビン刺激後の相互関係の検討

① 洗浄血小板の調整：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) を得た。PRP に PGE_1 (最終濃度 $1\ \mu\text{M}$) を加えて遠心し、ペレットを 0.35% BSA と $1\ \mu\text{M}$ PGE_1 を含む HEPES-Tyrode 液に浮遊した。37°C で 15 分間静置後、遠心し、ペレットを

0.35% BSA を含む HEPES-Tyrode 液に再浮遊し、血小板数を $2.0 \times 10^5/\mu\text{l}$ に調整した。

② 血小板と H12-(ADP)リポソームの相互反応：洗浄血小板浮遊液 (0.8 ml) に 0.5 mg/ml の H12-(ADP)リポソームを 0.1 ml 加えて混合し、さらに 1 分後に 1U/ml トロンビンを 0.1 ml 添加し、数回転等混和して凝集しないように静置した。また、血小板凝集計内の攪拌下で同実験を行った。5 分後に両試料に 4% グルタルアルデヒドを 1 ml 加えて固定し、エッペンドルフチューブに移し、遠心、ペレットとした。

③ 凍結割断レプリカ膜の作製：固定したペレットを緩衝液で洗浄後、これを凍結レプリカ作製装置の試料台に載せ、液体ヘリウムで冷却した急速凍結装置の銅板に圧着して凍結した。凍結試料を液体窒素に浸漬し、以下 1) と同様に凍結試料作製装置に導入し、ナイフで割断、断面に白金およびカーボンを蒸着してレプリカ膜を作製後、透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

1) H12-(ADP)リポソームの凍結割断レプリカ法による検討

H12-(ADP)リポソームを凍結割断レプリカ法で観察すると、割断によりリポソームの外膜が外れ、内膜以下の本体部が見えている凸部(P面)および同様に割断で内膜以下の本体部が外れ、外膜部が見えている凹部(E面)が観察された(図1)。いずれも割断面はきれいな正円状で、100~250 nm の直径を示した。

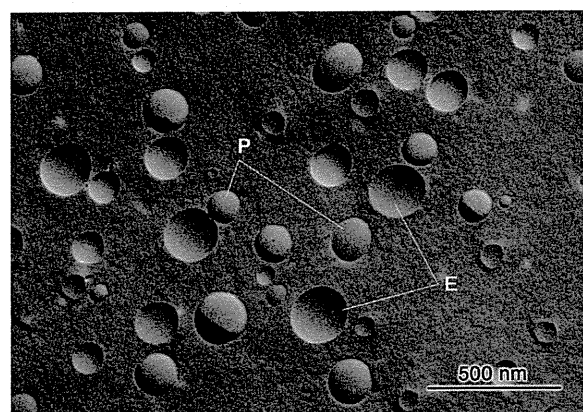


図1. H12-(ADP)リポソームの凍結割断像
リポソームの断面の凸部のP面 (P)および凹部のE面 (E)が観察される。ほとんどのリポソームの断面は直径100~250 nmの正円状を示している。

2) ヒト血小板と H12-(ADP)リポソームのトロンビン刺激後の相互関係の検討

洗浄血小板に H12-(ADP)リポソームを加えた、トロンビン添加前の血小板は円盤状の形態を維持した(図2)。この時、H12-(ADP)リポソームは全く観察されなかった。

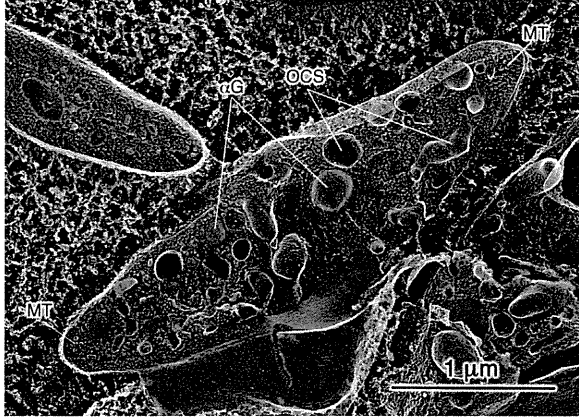


図2. トロンビン添加前の血小板のレプリカ像

洗浄血小板に H12-(ADP)リポソームのみを加えた。中央の血小板はほぼ赤道面で割断されている。円盤状血小板の両端部に微小管 (MT)、中央部にα顆粒 (αG)、開放小管系 (OCS)が観察される。リポソームは観察されない。

洗浄血小板に H12-(ADP)リポソームを加えた、さらにトロンビン添加して非攪拌下で静置した5分後では、血小板は円盤状から球状に変形するものの、凝集することなく単独に存在した(図3)。この時、リポソームは血小板の表面膜および開放小管系中に観察され、球状の形態を示したが、狭い開放小管系中のものの一部はラグビーボール状の楕円形を示した。

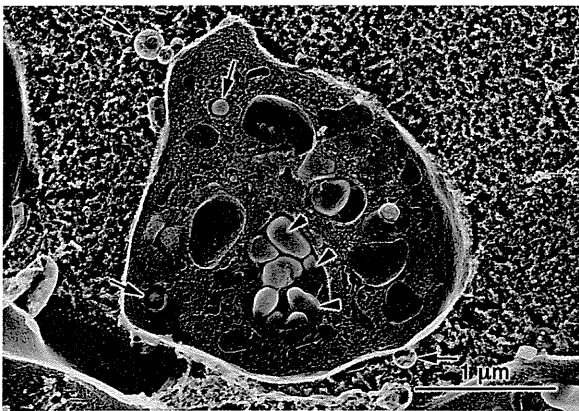


図3. トロンビン添加5分、非攪拌のレプリカ像

血小板は凝集することなく、単独に存在する。リポソームは血小板の表面膜および開放小管系中に観察され、球状(矢印)または楕円体(矢尻)の形態を示す。

洗浄血小板に H12-(ADP)リポソームを加え、さらにトロンビン添加して攪拌した5分後では、血小板は相互に接着して凝集塊を形成した(図4)。この時、リポソームは開放小管系中に存在するばかりでなく、接着している血小板相互間に多量に観察された。このような部分を拡大して観察すると、ほとんどのリポソームは楕円体を示した(図5)。また、それらの一部には表面が裂けた小孔が見られた。

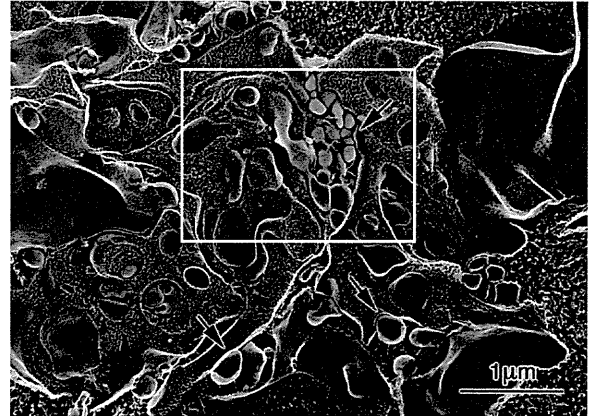


図4. トロンビン添加5分、攪拌下のレプリカ像

数個以上の血小板が凝集している。血小板相互間にリポソームが存在し、複数個以上のリポソームが存在する部分も観察される(矢印)。

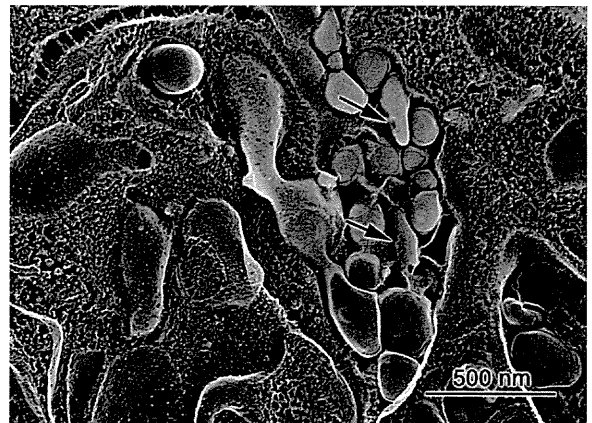


図5. 図4□部の拡大図

血小板相互間に存在しているリポソームは、そのほとんどが楕円体を示している。リポソームの一部の表面には小孔様の陥没も観察される(矢印)。

D. 考察

急速凍結割断レプリカ法で H12-(ADP)リポソームのみを観察した時、直径 100~250 nm の断面の凸部の P 面および凹部の E 面が観察された。この結果は、作製直後の H12-(ADP)リポソームは元々直径 100~250 nm の球形である

ことを示唆している。すなわち、本法はリポソームの本来の形態を反映するものと判断される。

洗浄血小板に H12-(ADP)リポソームのみを加えた時、急速凍結切断レプリカ法による血小板は他の方法と同様に円盤状を示した。ただ、 α 顆粒、開放小管系、微小管は識別されるものの、濃染顆粒、暗調小管系、細線維は同定できなかった。この点で、超薄切片法に劣る。ところで、血小板に結合するリポソームまたはバックグラウンドのリポソームは、全く観察されなかった。この結果は H12-(ADP)リポソームは無刺激血小板に結合しないことを示しており、既報の H12-リポソームの分布と同じであった。

血小板に H12-(ADP)リポソームとトロンピンを加え、静置した5分後では、血小板は球状に形態変化を起こすが、凝集は観察されなかった。 α 顆粒は見られず、放出像を示した。この時、H12-(ADP)リポソームは血小板表面に観察されるばかりでなく、開放小管系中にも見られた。この結果は既報の H12-リポソームのものと同様であった。リポソームは表面のものはほぼ球体であったが、開放小管系中のものは、その大部分がラグビーボール状の楕円体を呈することを見出した。すなわち、狭い開放小管系中に入り込んでいる多くのリポソームは、開放小管系の大きさおよび形に応じて、相互に変形するものと考えられる。

血小板に H12-(ADP)リポソームとトロンピンを加え、攪拌した5分後では、血小板は相互に接着し凝集を形成していた。この時、H12-(ADP)リポソームは開放小管系中に存在するばかりでなく、接着している血小板相互間に多量に観察された。このような部分を拡大して観察すると、ほとんどのリポソームは楕円体を示した。また、それらの一部には表面が裂けた小孔が存在することを見出した。すなわち、凝集は血小板相互の接着であるが、この接着力が強くなるに従って、リポソームは球体から楕円体に変形すると考えられる。また、リポソーム上の小孔は ADP の通路となることが考えられる。

H12-リポソームは凝集塊に巻き込まれることを報告してきたが、本リポソームは凝集塊中に巻き込まれる分だけ凝集塊をより大きく形成させ、

凝集を促進させた。H12-(ADP)リポソームも凝集塊に巻き込まれて凝集促進に関与する。しかも、内部の ADP が漏出することによって、他の血小板を刺激して凝集に参画させることによってさらに凝集を増進させ、その効果は H12-リポソームのものより大きかった。しかし、その ADP 放出の機構は不明であった。今回の急速凍結切断レプリカ法の結果は、血小板が凝集を強固にするために、相互に強く接着するようになるが、血小板間に存在するリポソームはこの接着力により楕円体に変形するとともに、その表面に小孔が生じ、この穴から ADP が押し出されて凝集をさらに増強することを示している。

E. 結論

急速凍結切断レプリカ法によって、H12-(ADP)リポソームから ADP が漏れ出る機構を検討した。血小板間に存在する本リポソームは血小板の凝集時の接着力によって球体から楕円体に変形するとともにその表面に小孔が形成され、この小孔から ADP が押し出される。漏れ出た ADP は、他の血小板を刺激して凝集に参画させ、さらに凝集を増強させるとの考えを支持する形態的所見を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

1) Suzuki H, Okamura Y, Ikeda Y, Takeoka S, Handa M: Ultrastructural analysis of thrombin-induced interaction between human platelets and liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Thromb Res*, 128: 552-559, 2011.

2. 学会発表：

1) Suzuki H, Okamura Y, Ikeda Y, Takeoka Y, Handa M: Thrombin-induced interaction between human platelets and fibrinogen γ -chain dodecapeptide-modified lipo-

somes as a synthetic platelet substitute.
XXIIIrd Congress of the International
Society on Thrombosis and Haemostasis,
2011.7.24-28. Kyoto.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

平成23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

αIIbβ3 インテグリンと H12 担持リポソームの結合機序に関する研究
—リポソーム製剤の機能評価系の確立—

分担研究者 鎌田徹治 (慶應義塾大学医学部 解剖学教室 専任講師)

研究要旨

血小板は活性化した時にのみフィブリノーゲンと結合して血栓を形成する。これは血小板膜表面のαIIbβ3 インテグリンが血小板の活性化に伴って低親和型の bent conformer から高親和型の extended conformer へ立体構造を変化させ、リガンドとの結合親和性を高めるためである。これまでの研究から、H12 担持人工粒子もフィブリノーゲンと同様に活性化血小板と選択的に結合し、止血機能を有することが明らかとなった。しかしながら、臨床応用に耐えうる人工粒子を開発するためには、試料の最適化とその評価系を確立することが必要である。

本年度の研究では、製造日時の異なる2つのロットのH12担持リポソーム(H12-vesicle)の機能を複数の測定法を用いて解析し、その評価を行った。1) αIIbβ3を一過性発現した細胞とH12-vesicleの結合動態の測定を行い、ロット間の違いが無いか検討した。2) 同様の実験を、αIIbβ3を安定発現したクローン細胞を用いて行い、一過性発現と同様の結果が得られるか否かを検討した。野生型 αIIbβ3を一過性発現した細胞を用いた測定系では、Lot#903でKd=2.75±0.54 mg/mlに対し、Lot#904ではKd=2.45±0.39 mg/mlであった。一方、高活性型のQ595NTTを発現した細胞を用いた場合、Lot#903でKd=1.78±0.24 mg/mlに対し、Lot#904ではKd=1.12±0.11 mg/mlであった。前年度の結果で、野生型 αIIbβ3に対するKd=1.095±0.172 mg/ml、Q595NTTに対するKd=1.028±0.090 mg/mlであったことを考慮すると、野生型 αIIbβ3発現細胞に比べてQ595NTT発現細胞を用いた測定法は信頼性が高いと考えられる。また、この方法からH12-vesicle製剤の異なるロット間で、αIIbβ3への結合親和性に違いがある可能性が明らかとなった。一方、αIIbβ3を安定発現したクローン細胞を用いた測定では、αIIbβ3の発現量が低く、評価可能な実験結果を得ることができなかった。

αIIbβ3を一過性発現した細胞を用いた測定系は有用であるものの、再現性に若干の問題を抱えている。今後は表面プラズモン共鳴などの無細胞測定系による、再現性の高い機能評価が求められる。

A. 研究目的

血小板は、血管壁損傷時に露出した内皮下組織に接着し、さらにフィブリノーゲンを架橋分子として互いに結合することによって止血血栓を形成する。人工粒子

H12-vesicle は、フィブリノーゲンと同様に血小板同士を架橋することによって血栓形成を促すと考えられる。フィブリノーゲンと異なり、H12-vesicle はαIIbβ3 インテグリンの結合部位を複数もつために結合の