

血小板減少動物モデルを対象に *in vivo* にて証明してきた。

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て、実験動物としてラットとウサギを使用して、臨床検査値(血液凝固系、血液生化学)への影響を検討した。さらに、小胞体の血中濃度をモニターできる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について検討を加えた。また、最も危惧される血栓症の誘発、増強作用に関して、血栓準備状態である DIC モデルラットを構築して、小胞体投与による血栓マーカーの変動を観察した。

## B. 研究方法

### 1. 正常ラットへの小胞体投与後 数日間の影響：血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値、臓器内脂質定量

Wistar 系雄性ラット(三協ラボ, 8 週齢, 230-280 g, [PLT] =  $8.1 \pm 0.8 \times 10^5$  /mL) にセボフラン麻酔後、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(10 -80 mg/kg)。投与1週間後(30分、1日、2日、4日、7日)まで各グループ(N=5)の血球測定や凝固検査・生化学検査・臓器内脂質検査を行った。血球測定装置(K-4500, Sysmex)にて各血球を測定した。

3. 13%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), フィブリノゲン抗原量(Fbg), の3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清を回収した。一般生化学

の項目 アルブミン(ALB)、総コレステロール(TC)、リン脂質、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7項目と脂質の項目 高密度リポ蛋白質(HDL)、低密度リポ蛋白質(LDL)、トリグリセリド(TG)、遊離型コレステロール、エステル型コレステロール、エステル型コレステロールの6項目を測定した(SRL)。

臓器内脂質定量は、心臓から全採血(犠牲死)後の Wistar 系雄性ラットから脾臓・肝臓を摘出し重量を測定しメノウ乳鉢にて生理食塩水を 1ml 添加しながらホモジナイズ(氷冷中)を施し-60℃にて保存した。総重量と測定したホモジナイズ量から組織中の総コレステロール・HDL・LDL・カイロミクロン(理論値)の4項目を算出・測定した。(組織化学研究所)

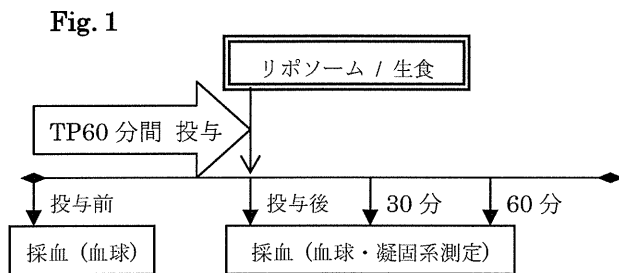
### 2. 小胞体投与量と脂質(TCとPL)濃度との関連の検討

前日から絶食をさせて採血終了まで水分のみの状態で飼育した Wistar 系雄性ラットにジエチルエーテル麻酔後、H12-(ADP)小胞体を尾静脈から投与した(10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg)。また、陰性対照群として生理食塩水を投与した。投与前と投与後10分、20分、30分、60分、120分、180分、1日(各N=2)まで各投与濃度の血液採取を行って、2種類の脂質を測定した(三菱化学メディエンスに委託)。また、ヒト血清検体の希釈系列を用いたリン脂質濃度測定は、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)を用いた。

### 3. DIC 血栓誘発モデルラットの構築と小胞体投与による血栓マーカー変動の検討

Wistar 系雄性ラット(三共ラボ, 7 週齢, 200-220g)ラットは麻酔下に尾静脈に留置針を留置された。生食に溶解したトロンボプラ

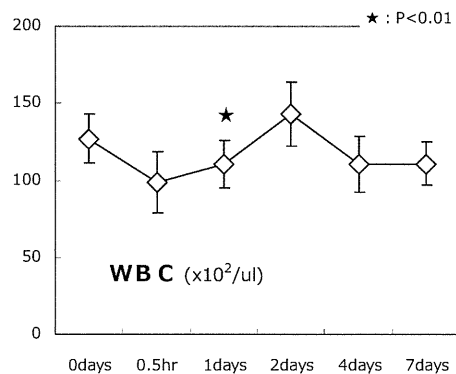
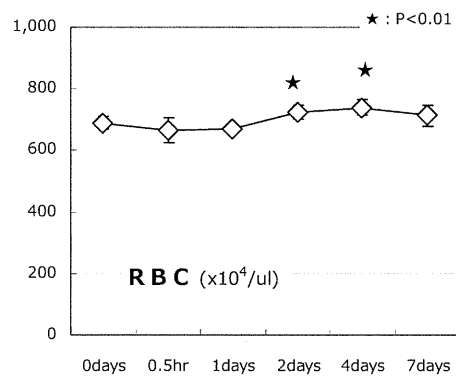
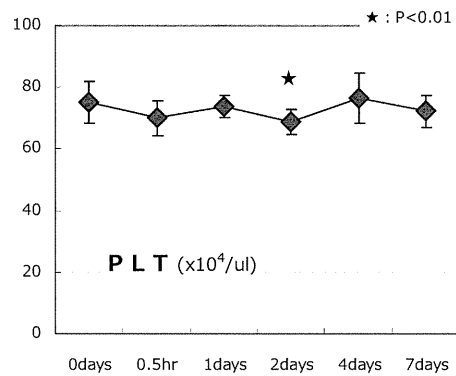
スチン (TP) (トロンボチェック PT プラス、Sysmex、ウサギ脳由来トロンボプラスチン+乳酸カルシウム) 溶液を、原液および 4 倍、6 倍、8 倍に希釈したもの 2 mL を 1 時間かけて、その留置針よりシリンジポンプ (Apparatus pump198, Harvard) を用いて持続投与した。同量の生食を投与したものを陰性対象とした。TP 投与終了直後、30 分後、60 分後に血小板・凝固検査を行った。その結果、8 倍希釈 TP により惹起される過凝固状態が最適であると判断して、DIC ラットモデルとした。H12(ADP)小胞体 (20mg/kg、40mg/kg 相当量を 1mL の PBS に懸濁) もしくは陰性対照の生食を、TP 投与終了直後に静注し、直後、30 分後、60 分後に採血を行い、血小板・凝固検査を行なった (Fig. 1)。鋭敏な血栓マーカーとしてアンチトロンビンと D-ダイマーを測定した (SRL)。



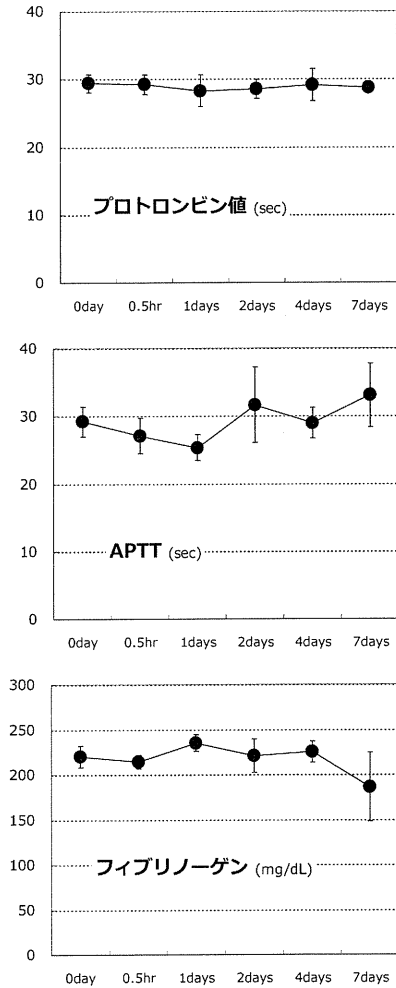
### C. 研究結果及び考察

#### 1. 正常ラットにおける小胞体投与による血液・凝固、脂質を含む血液生化学検査値への影響

常用量の H12(ADP)小胞体 (40mg/kg) を投与して、1 週間後までの経時的な血球数、凝固検査 (PT、APTT、フィブリノゲン) 施行したが、いずれも意味のある変動は観察されなかった (Fig. 2-1、2-2)。



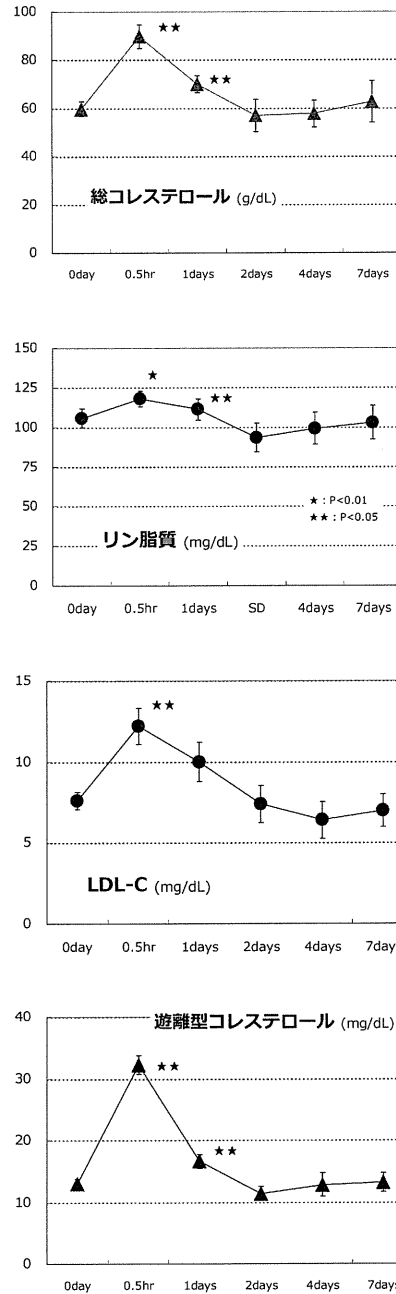
**Fig. 2-1** Blood counts 0.5hr & 1, 2, 4 and 7days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats (N=5 平均±標準偏差). ★P<0.01



**Fig. 2-2** Blood coagulation parameters  
(PT: APTT: フィブリノーゲン)  
0.5hr & 1, 2, 4 and 7days after H12-(ADP)vesicles  
injection into the normal rats  
(N = 5 平均±標準偏差).

血小板数と3種類の凝固スクリーニング値に関しては、H12未結合リポソームを陰性対照として40mg/kgおよび80mg/kgの高用量投与の影響を投与1日後の測定値を比較検討したが、同様に有意な変動は見られなかった(データ未提示:H21年度分担報告書、Fig3-1及び3-2参照)。同様に20mg/kg及び80mg/kgの投与量の投与後1時間でのアンチトロンビンとD-ダイマー測定値は、H12未結合ADP未内包リポソームとの比較で、有意のある変動は観察されなかった(データ未提示:H23報告、Fig. 1b参照)。一方、生化学的検査は

脂質関連項目を除いて(アルブミン、総蛋白、ALT、クレアチニン)、有意のある変動は見られなかった(データ未提示:H21報告、Fig1-3及び3-3)。脂質関連検査値はリポソーム投与1日後まで一過性に増加した(Fig. 3)。



**Fig. 3** Biochemical blood parameters  
(総コレステロール:リン脂質;  
LDLコレステロール:遊離型コレステロール)  
0.5hr & 1, 2, 4 and 7days after  
H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats  
(N = 5 平均±標準偏差). ★P<0.01, ★★P<0.05

小胞体の脂質は主にコレステロールとリン脂質で構成されており (Table 1)、この2成分の測定値は投与用量 (40mg/kg と 80mg/kg で比較) に依存した増加傾向が明らかであった (データ未提示: H21 報告、Fig. 3-3、3-4)。

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

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

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

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

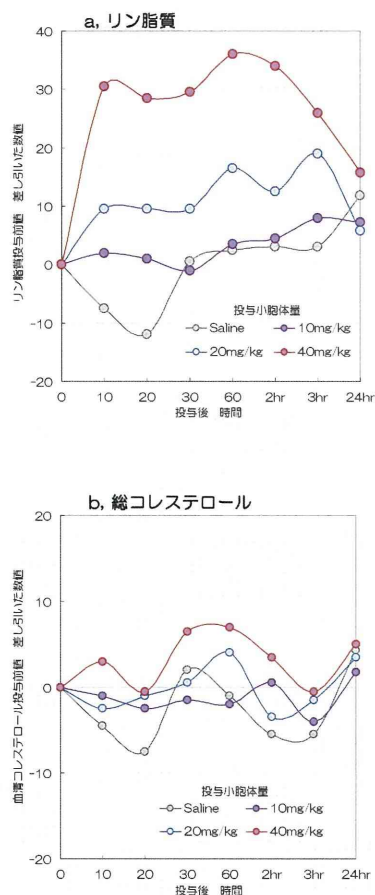
3) 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[monomethoxy] poly(ethylene glycol) (5000)

正常ラットの臓器内脂質濃度(総コレステロール、HDL、LDL、カイロミクロン)をそれらの血清濃度とともに投与1週間後まで測定した。肝臓と脾臓でのコレステロール含量は1日後に上昇し、2日後には投与前値より減少する傾向が7日目まで観察された (データ未提示: H21 報告、Fig 2)。そして、その上昇幅は、肝臓より脾臓で顕著であることから、以前報告したアイソトープ標識した小胞体の網内系での代謝が主に脾臓で行われることと合致した結果であった。さらに、脾臓と血清中の LDL とカイロミクロンは、1日目で上昇傾向を示したのに対して、肝臓では一旦減少し4日目には上昇した。小胞体の主な構成成分である脂質の代謝経路を反映した検査値の変動であることが確認された。

## 2. 小胞体投与量と脂質 (TC と PL) 濃度との関連の検討: 小胞体血中濃度の代理マーカーとなる可能性について

小胞体の主成分である TC と PL が小胞体血中濃度の代理マーカーとなる可能性について、各用量 (10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg) のリポソーム (陰性対照は生食) 投与後の経

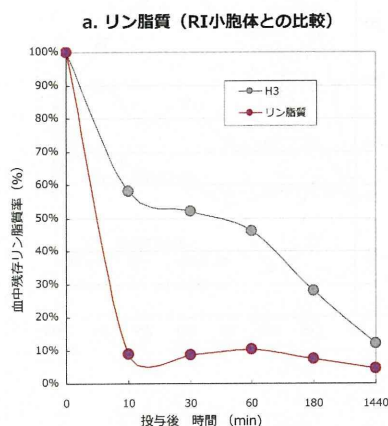
時的な検査値の変動を測定し、投与前値を差し引いて分析した (Fig. 4-1)。



**Fig. 4-1** Biochemical blood parameters 0,10,20,30,60,120,180min & 1 days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats (N=2 Ave).  
 a,リン脂質 b,総コレステロール

その結果、TC に比べて、個体差や腸肝循環の影響を比較的受けにくい PL では小胞体の投与量依存性の傾向が認められた。そこで次に、今回の血中 PL 値の推移結果と TC を RI 標識する事で得られたこれまでの小胞体の血中動態 (池田康夫: 厚生労働科学研究費助成金、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、H20 分担報告書「放射性同位元素標識 H12 (ADP) 小胞体の調製とその血中動態、臓器分布」) と比較したところ、経時的

な血中濃度減衰のパターンは類似しているものの、血中 PL 値による血中小胞体残存率はアイソトープで測定されたものに比べ、非常に低いことがわかった (Fig. 4-2)。



**Fig. 4-2** Biochemical blood parameters 0,10,20,30,60,120,180min & 1 days after H12-(ADP)vesicles injection into the normal rats (リン脂質 N=2, H3 N=5).

この原因として、1) 測定検体に存在する小胞体に存在する PL が正しく測定されていないこと、2) 酵素法による検査の測定感度が小胞体投与で得られる血中 PL の変動レベルを検出できる限度以下であること、があげられた。実際、可溶化剤と熱処理により、小胞体含有検体の PL 測定値は著しく上昇することが示された (データ未提示: H22 報告、Fig. 4)。一方、ヒト血清の希釈系列を用いて測定キットの感度を検討したところ、現在の測定系の感度レベルではシミュレートした小胞体血中濃度の検出幅には対応できないことが明らかとなった (データ未提示: H23 報告、Fig. 4)。

### 3. DIC モデルラットを使用した小胞体の血栓誘発性の検討

DIC ラットに H12(ADP)小胞体 (20mg/kg 及び 40mg/kg) と陰性対照 (PBS) を投与して、投与直後、30 分、60 分後の DIC マーカ (血小板、フィブリノゲン、D-ダイマー、

アンチトロンビン) を測定しが、DIC により変動した各検査項目とも、陰性対照と比較して、小胞体による有意な変化(DIC の増強作用を示唆する)は観察されなかった (Fig.5)。DIC は血栓および強い血栓準備状態を伴う病態であり、生体内で血小板は活性化され、H12(ADP)小胞体との特異的な結合を介して、血栓の増強作用が危惧されていた。しかしながら、今回の検討により、少なくとも使用した用量の範囲内では、DIC ラットへの血栓増強作用は認められなかった。

## D. 結論

H12-(ADP)小胞体の実験動物 (ラット) における血液適合性について以下のような結論に至った。

- 1) 小胞体の常用量あるいはその 2 倍量の単回投与においては、血液・凝固系および脂質を除く血液生化学スクリーニング検査値への影響は認められなかった。しかし、コレステロールやリン脂質等の脂質関連検査値は小胞体の構成成分であることから、投与量に関連した一過性に変動した。その変動のパターンは肝臓及び脾臓への代謝過程を反映したものであった。
- 2) 小胞体の血中濃度の測定系の開発は臨床試験の施行に有用である。そこで、その代理マーカとして血中リン脂質濃度の可能性を検討したが、市販の測定キットは、その検出感度の点から、有効ではないことがわかった。
- 3) 生理的な止血作用 (一次止血) を促進する小胞体の血栓誘発性および増強性は認めなかった。

血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体は人工血小板として安全な人工物であることが示唆された。

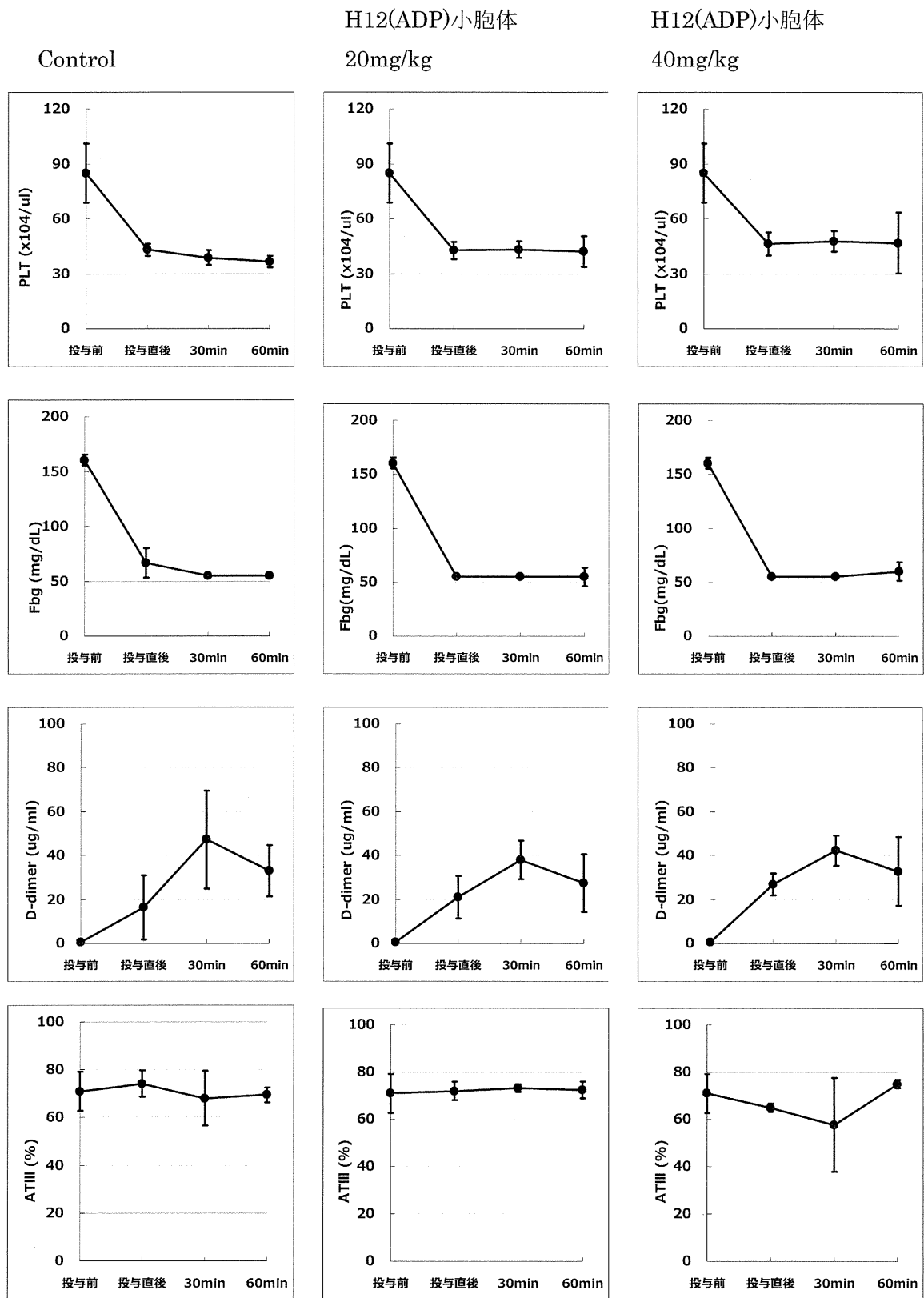


Fig.5 Blood parameters before & 0min, 30min and 60min after x8TP injection 1hr & H12(ADP)Liposome (20mg/kg , 40mg/kg) injection into the PreDIC model rats(n=2-6).

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

・Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 378(4):716-20、2009

・宗慶太郎、小峰梨沙、酒井宏水、小林絃一、槌田英俊、村田 満：ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査-デキストラン添加による干渉作用の回避- 人工血液 Vol.17 No.1 6-15、2009

### 2. 学会発表

・坂ノ上容子、松原由美子、星野晴彦、芝野俊郎、鈴木則宏、池田康夫、村田 満：血小板機能の簡易モニタリング開発機器 PEF-100 を用いた日本人における血小板機能評価の検討 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会 平成 21 年 8 月札幌

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 21-23 年度「創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業総合研究事業」  
『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

止血血栓への関与の超微細形態学的解析

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 $\gamma$ 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、ADP による血小板凝集を促進させることを報告してきた。21 年度は低濃度コラーゲンを加えて惹起される血小板凝集に対する各リポソームの効果を比較検討した。PRP に生食、コントロールリポソーム、H12 または H12-(ADP)リポソームを添加し、凝集を観察しつつ、凝集形態およびリポソームの分布についても電顕観察した。22 年度は従来リポソームより膜電荷が大きい新規の H12-(ADP)リポソーム(H555)を使い、ヒト PRP の ADP 凝集に対する本リポソームの効果を従来型のものと比較し、電顕観察も行った。23 年度は前年度までの研究で、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塊に巻き込まれて凝集を促進させ、次いでリポソーム内の ADP が漏れ出て他の血小板を刺激し、これらを凝集に参画させることによって凝集をさらに増強するものと考えてきた。しかし、ADP の漏れ出る機構については明らかではない。そこで、凝集塊に巻き込まれたリポソームの形態を把握し、ADP が漏れ出る機構を解明するために、急速凍結割断レプリカ法で検討した。その結果、血小板間に巻き込まれた H12-(ADP)リポソームは血小板凝集時の相互の接着力によって楕円体に変形するとともに、その表面に小孔が形成されることを見出した。すなわち、この小孔から ADP が押し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所見を得た。

A. 研究目的

これまで ADP を内包させた H12 リポソーム (H12-(ADP)リポソーム)は、ヒト多血小板血漿 (PRP)の ADP 凝集を促進させることを報告してきた。ところで、凝集がほとんど惹起されない低濃度の ADP またはコラーゲンを添加された血小板に、最初に添加した逆の低濃度コラーゲンまたは ADP を追加して添加すると、その相乗効果が出現してある程度の凝集を示すことが知られている。そこで 21 年度は、内包する ADP の凝集に対する関与をさらに明らかにするために、ヒト PRP に H12 未結合のコントロールリポソーム、H12 または H12-(ADP)リポソームをあらかじめ加え、さらに低濃度コラーゲンを添加し、惹起される凝集を凝集計で比較、検討した。さらに、その凝集形態を超薄切片法

で、リポソームの分布については抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で検討した。

22 年度は、リポソームの DHSG、PEG-DSPE、H12-PEG-Glu2C18 のモル比を変えることにより、従来型リポソームに比して膜電荷が約 2 倍増加したリポソーム(H555)が開発された。そこで、本リポソームのヒト PRP の ADP 凝集に対する効果を従来型のものと比較、検討した。さらに凝集形態の電顕観察も行った。

23 年度は前年度までの研究で、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塊に巻き込まれて凝集を促進させ、次いでリポソーム内の ADP が漏れ出て他の血小板を刺激し、これらを凝集に参画させることによって凝集をさらに増強するものと考えてきた。しかし、



ADP の漏れ出る機構については明らかではない。そこで、凝集塊に巻き込まれたリポソームの形態を把握し、ADP が漏れ出る機構を解明するために、急速凍結割断レプリカ法で検討した。

## B. 研究方法

平成 21 年度

### 1) 低濃度コラーゲン血小板凝集能の検討

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  $2 \times 10^5$  個/ $\mu\text{l}$  に調整した。血小板凝集計を使い、PRP に低濃度コラーゲン (0.1~0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え、生じる凝集曲線を観察した。次いで、この低濃度コラーゲン凝集時における H12-(ADP)リポソームの効果を明らかにするために、ヒト PRP にあらかじめ生食、H12 非結合のコントロールリポソーム(最終濃度 2 mg/ml)、H12-リポソーム(同)、または H12-(ADP)リポソーム (同)を加え、1 分後にさらに 0.1~0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のコラーゲンを添加し、生じる凝集曲線を観察した。

### 2) 低濃度コラーゲン凝集の形態観察

前記 1) の低濃度コラーゲンで惹起される凝集および H12-(ADP)リポソーム等を前もって加え、さらに低濃度コラーゲンを加えて惹起される凝集のピーク時に、0.1Mリン酸緩衝 0.4% グルタルアルデヒド液 (pH7.4) を凝集計のキュベット内に等量加えて凝集反応を停止させた。これをエッペンドルフ遠心管に移し、3,000 rpm で 1 分間遠心し、得たペレットを 4°C で静置してさらに 30 分間固定した。これらの試料は 0.1Mリン酸緩液で洗浄後、同液緩衝 1% 四酸化オスミウム後固定、エタノール系列で脱水、Epon 812 に包埋し、熱重合した。試料のブロックから超マイクロトームを使って超薄切片を得て、グリッドメッシュに回収し、これを酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色後、透過型電顕で観察した。

### 3) 低濃度コラーゲン血小板凝集時における H12-(ADP)リポソームの分布 (免疫電顕法)

H12 または H12-(ADP)リポソームをあらかじめ加えた試料について、抗 H12 抗体を使う免

疫電顕法を実施し、これらリポソームの凝集塊中における分布を検討した。すなわち、上記 2) で得た固定血小板ペレットを PBS で 5 回洗浄し、1 Mシヨ糖液中で 1 時間、さらに 2.3Mシヨ糖液中にオーバーナイトで浸漬した。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、凍結超マイクロトームを使って超薄切片を作製した。切片は 0.5%BSA で 15 分間ブロッキング後、家兔抗 H12 抗体で 4°C、オーバーナイトでインキュベイトし、PBS で水洗後、さらに 15 nm のコロイド金標識ヤギ抗ウサギ IgG で室温、1 時間インキュベイトした。以下、Tokuyasu 法に従って酢酸ウラニルで電子染色し、透過電顕で観察した。

平成 22 年度

### 1) ヒト PRP の ADP 凝集に対する新規リポソームの効果の検討

① 凝集の検討: 前年度と同様に健康成人から採血した血液を遠心し、PRP および PPP を得て、血小板数を  $2 \times 10^5$  個/ $\mu\text{l}$  に調整した。血小板凝集計を使い、PRP にあらかじめ 0.5 mg/ml の従来型 H12 未結合(C551)または結合 ADP 内包リポソーム(H551)、同新規型 H12 未結合(C555)または結合 ADP 内包リポソーム(H555)を加え、さらに 1 分後に 2.5  $\mu\text{M}$  ADP を添加し、生じる凝集曲線を観察した。

② 電顕的検索: 前年度と同様に、ADP 添加 5 分後にグルタルアルデヒド液を凝集計のキュベット内に等量加えて凝集反応を停止させた。以下、同様に試料を調製し、透過型電顕で観察した。

③ 免疫電顕的検討: 一部の試料は、前年度と同様に抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で検討した。すなわち、凝集試料を 0.2%グルタルアルデヒドで固定後、Tokuyasu 法に従って得た凍結超薄切を同様に免疫染色し、電子染色して観察した。

平成 23 年度

### 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：21年度と同様に健康成人から採血した血液を遠心し、PRPを得た。PRPにPGE<sub>1</sub>（最終濃度1 μM）を加えて遠心し、ペレットを0.35% BSAと1 μM PGE<sub>1</sub>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2.0×10<sup>5</sup>/μl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

平成21年度

### 1) 低濃度コラーゲン血小板凝集能の検討

ヒトPRPに0.1~1 μg/mlの濃度のコラーゲンを添加すると、0.1~0.5 μg/mlの間で濃度依存性の凝集が見られた(図1 A)。0.1 μg/mlのコラーゲン添加では透光度の上昇はわずかであったが、コラーゲン濃度の増加に伴って透光度は上昇し、0.5 μg/mlのコラーゲンでほぼ平衡に達した。

0.1 μg/mlコラーゲンをPRPに添加し、さらに2分後に単独ではほとんど凝集が起きない0.1 μM ADPを加えると、約30%以上の透光度の上昇が見られた(図1 B)。0.1 μM ADPをPRPに先に加え、2分後に0.1 μg/mlコラーゲンの添加をした場合でも、同様な相乗効果による明らかな凝集が出現した。

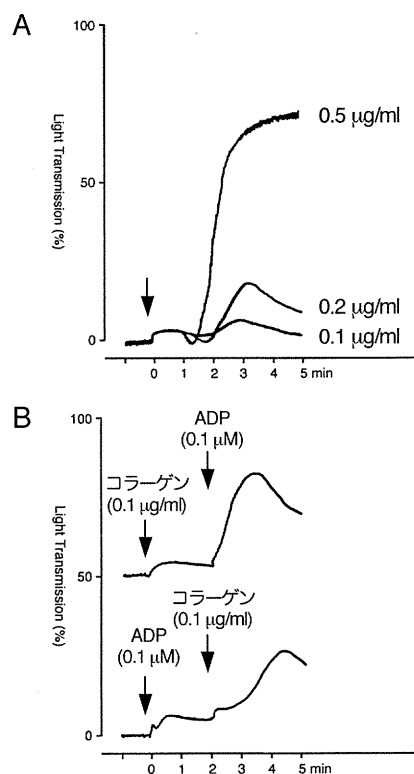


図1. ヒトPRPに対する低濃度コラーゲン凝集

A) 0.1~0.5 μg/mlのコラーゲン添加で濃度依存性の凝集が見られる。

B) コラーゲン0.1 μg/mlまたはADP 0.1 μMでは凝集がほとんど見られないが、同濃度のADPまたはコラーゲンを追加すると、相乗効果が出現して明瞭な凝集が生じる。

PRPにあらかじめ生食、H12非結合のコントロールリポソーム、およびH12-リポソームを加え、さらに1分後に0.2 μg/mlコラーゲンを添加すると、15~25%の透過度の上昇が見

られた (図2)。一方、H12-(ADP)リポソームでは、約40%の上昇を示し、生食、コントロールまたはH12リポソームとは異なる大きな凝集能を示した。

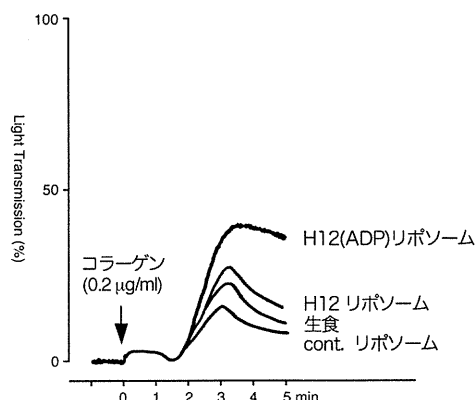


図2. 各種リポソームを添加したPRPに対する低濃度コラーゲン(0.2 µg/ml)凝集

生食、H12非結合のコントロールリポソーム、およびH12リポソームを加えたPRPでは、わずかに15~25%の透過度の上昇しか見られないが、H12-(ADP)リポソームでは約40%の透過度上昇が見られる。

## 2) 低濃度コラーゲン凝集の形態観察

図1Aで示した低濃度コラーゲンに反応したPRPの血小板形態を電顕観察した(図3)。

コラーゲン添加前のPRPでは、わずかに形態変化している血小板も見られたが、凝集は起こしていなかった(図3A)。0.1 µg/mlコラーゲン添加時は、ほとんどの血小板は形態変化を起していた。また、変形し単独に存在している血小板の間に極小凝集塊が部分的に存在した(図3B)。0.2 µg/mlコラーゲン添加時は、変形した単独血小板が少なくなり、明らかな凝集塊が形成された(図3C)。0.5 µg/mlコラーゲン添加時は、大凝集塊が形成され、辺縁部では顆粒の放出像が観察された(図3D)。

次いで、図2で示した生食、コントロールリポソーム、H12およびH12-(ADP)リポソームを前もってPRPに加え、さらに0.2 µg/mlコラーゲンを添加した血小板を電顕観察した(図4)。生食、コントロールリポソームおよび

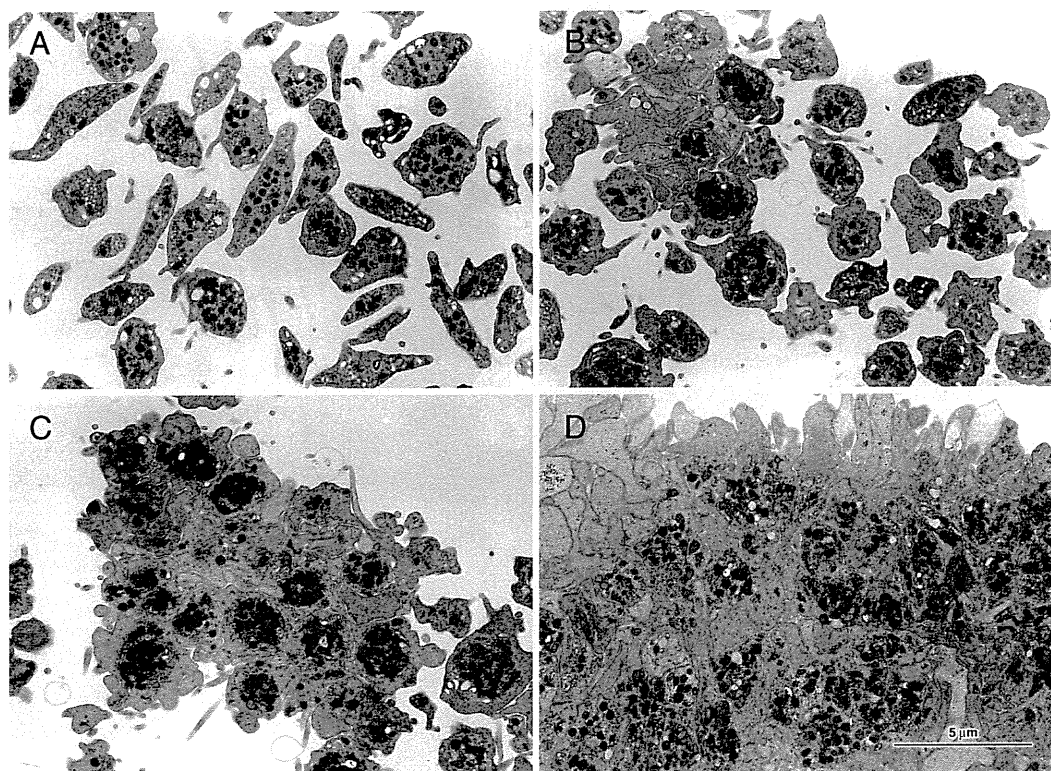


図3. 低濃度コラーゲン添加3分の血小板の電顕像

A) コラーゲン添加前のPRP。わずかに形態変化している血小板も見られるが、凝集は起こしていない。B) 0.1 µg/mlのコラーゲン添加。血小板は形態変化を起し、極小凝集塊がわずかに存在している。C) 0.2 µg/mlのコラーゲン添加。変形した単独血小板が少なくなり、小凝集塊が形成されている。D) 0.5 µg/mlのコラーゲン添加。大凝集塊が形成され、辺縁部では顆粒の放出像が観察される。

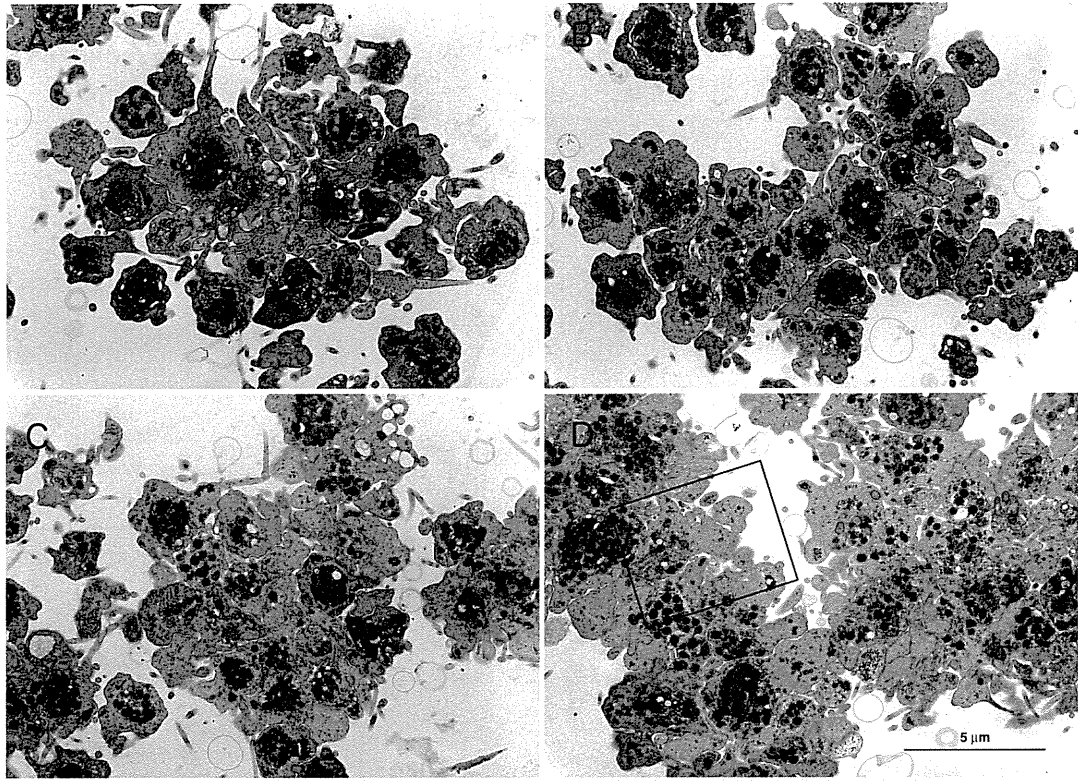


図4. 各種リポソームおよび低濃度コラーゲン (0.2 μg/ml) 添加後に生じる凝集の電顕像  
 A) の生食、B) のコントロールリポソーム、C) の H12-リポソームではコラーゲン添加後に形成される凝集塊は小さいが、D) の H12-(ADP)リポソームのものは凝集塊が大きい。

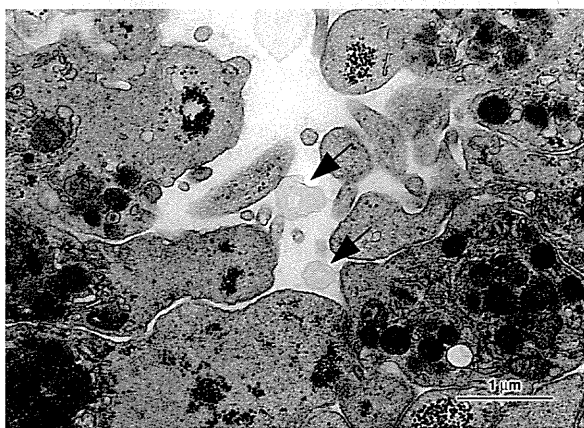


図5. 図4Dの□部の拡大像  
 凝集塊中にリポソーム様の構造が観察されるが(矢印)、リポソームであるかどうかは不明である。

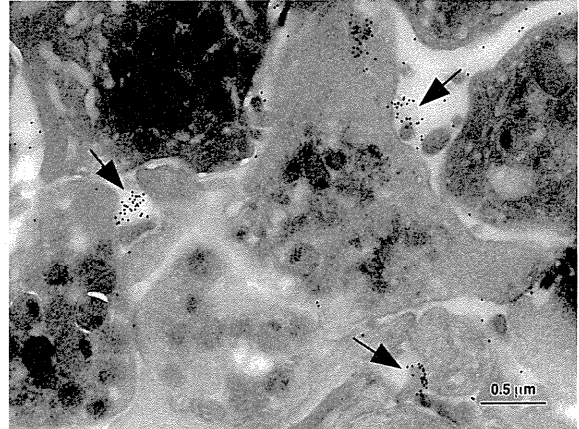


図6. 低濃度コラーゲン添加で生じる凝集塊中における H12-(ADP)リポソームの分布  
 凝集している血小板相互の間に H12 の存在を示すコロイド金粒子が付着したリポソームが分布している(矢印)。

H12-リポソーム添加時は、明らかな凝集塊の形成が見られたが、これらはほとんど同サイズの小さな凝集塊であった(図4 A-C)。一方、H12-(ADP)リポソーム添加時は比較的大きな凝集塊が形成された(図4D)。

H12-(ADP)リポソーム、さらに0.2 μg/ml

コラーゲン添加時に形成された凝集塊の一部を拡大して観察すると、凝集した血小板の周囲にはリポソーム様の構造が観察された(図5)。しかし、超薄切片法では、リポソームは試料調製時に使う脱水剤のアルコールによって溶けてしまうために、これらの構造がリポソームか

どうかは不明である。

### 3) 低濃度コラーゲン血小板凝集時におけるH12-(ADP)リポソームの分布 (免疫電顕法)

抗 H12 抗体を使う免疫電顕法でコラーゲン添加後に形成された凝集塊を観察すると、凝集し密着している血小板間にコロイド金で標識されたリポソームが存在した (図6)。

平成 22 年度

### 1) ヒト PRP の ADP 凝集に対する新規リポソームの効果の検討

PRP にあらかじめ従来型および新規型リポソームを加え、さらに1分後にADPを添加すると、従来型のH12未結合のC551と同結合のH551の凝集は解離性を示した(図7)。一方、新規型H12未結合のC555と同結合のH555は従来型に比べて高いADP凝集率を示し、二次凝集まで出現した。

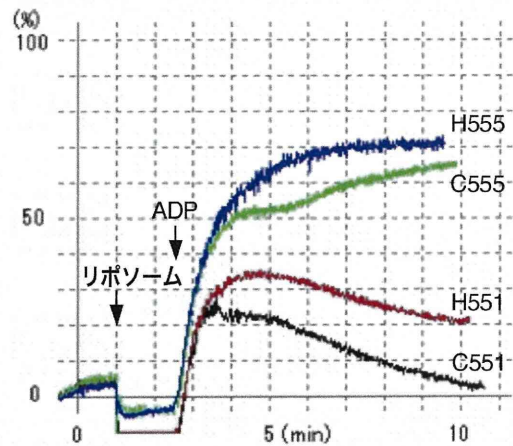


図7. ヒト PRP の ADP 凝集に対する新規リポソームの効果

従来型リポソームの C551 と H551 を加えた ADP 凝集は 25-35% の凝集率を示すが、解離する。一方、新規型リポソームの C555 と H555 は 60-70% の凝集率を示す。

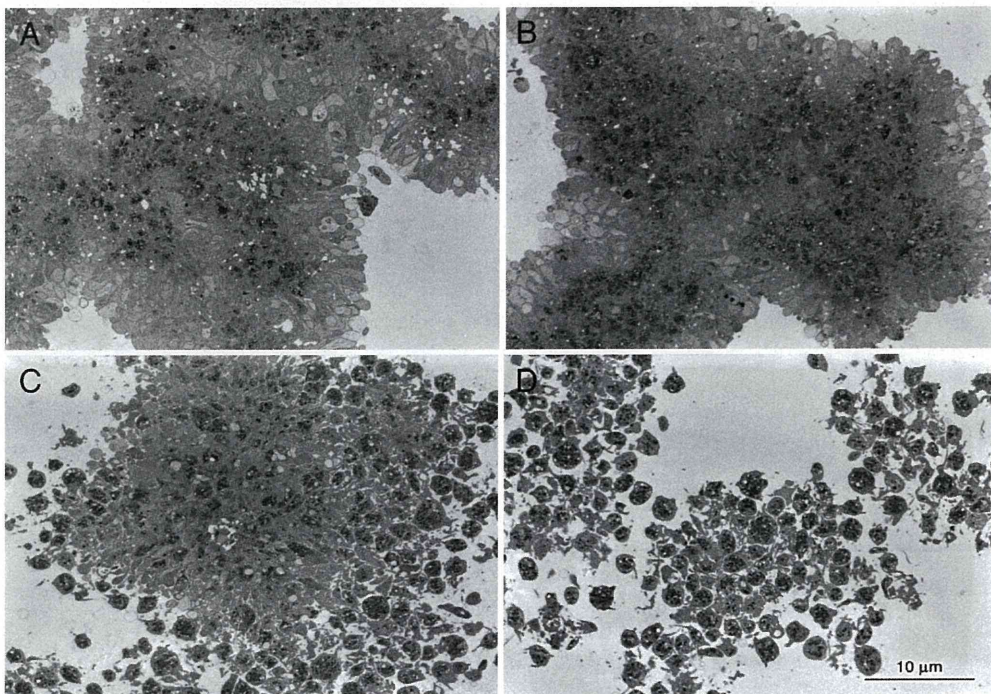


図8. 新規および従来型リポソームのヒト PRP に対する ADP 凝集の電顕像 (低倍)

ヒト PRP に新規型リポソームの H555(A) と C555(B) を添加し、さらに ADP を添加すると、直径 50  $\mu\text{m}$  前後の大きな血小板凝集塊が形成される。一方、従来型リポソームの H551(C) と C551(D) を加えた血小板では、ADP 添加後の形成される凝集塊は新規型に比べて小さい。

### 2) 従来または新規型リポソーム添加時の ADP 凝集の形態観察

図1で得られたADP凝集時の血小板形態を電顕観察した(図8)。

新規型リポソームの H555 と C555 を添加し、さらに ADP を添加すると、大きな凝集塊が形成された。この中の血小板は相互に強く密着し、片縁部の血小板では脱顆粒していた(図8A、B)。

一方、従来型リポソームの H551 と C551 を加えた血小板では、新規型のものに比べて小さな凝集塊が形成された(図 8 C、D)。C551 のよるものは特に小さく、血小板相互の密着度は弱かった。高倍で観察すると、新規型リポソームの H555(A) と C555(B) を加えた凝集塊では、電子密度が低い領域が多く観察された(図 9 A、B、矢印)。この領域は従来型リポソ-

ム H551(C) を添加した凝集塊でもやや少なく観察されたが(図 9 C 矢印)、C551(D) を添加したものでは観察されなかった(図 9 D)。凝集塊の電子密度が低い領域に存在するのは、リポソームと考えられた。そこで、抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で観察したところ、凝集の隙間にコロイド金が付着した多数のリポソームが確認された(図 10)。

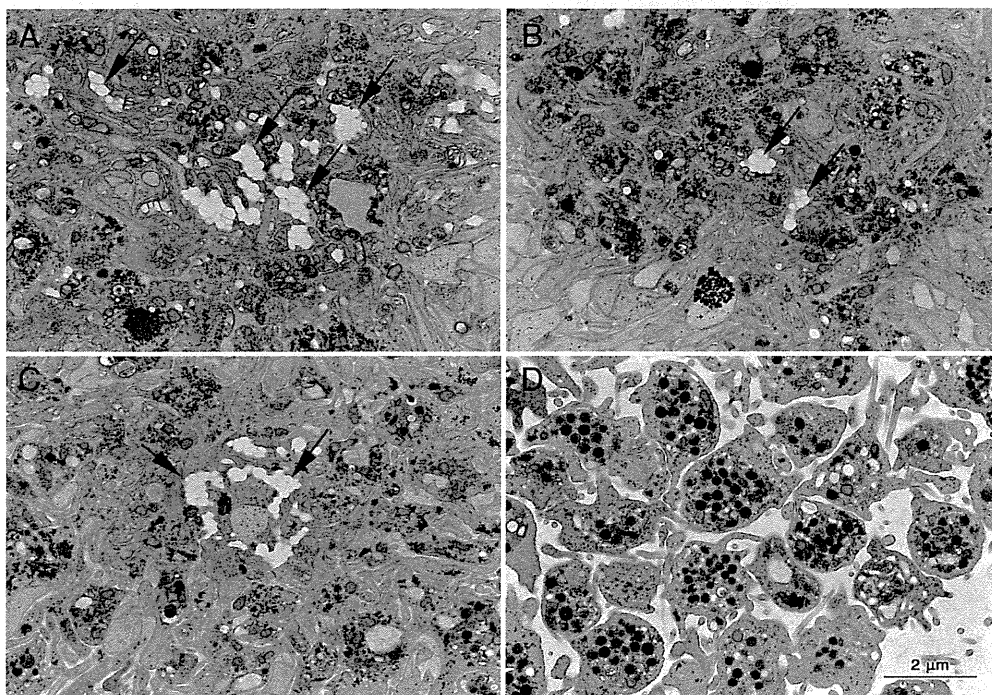


図 9. 新規および従来型リポソームのヒト PRP に対する ADP 凝集の電顕像 (高倍)

新規型リポソームの H555(A) と C555(B) を加えて形成された ADP 惹起血小板凝集塊では、電子密度が低い領域が多く観察される(矢印)。従来型リポソーム H551(C) を添加した凝集塊でもこの領域が観察されるが、C551(D) を添加したものでは観察されない。

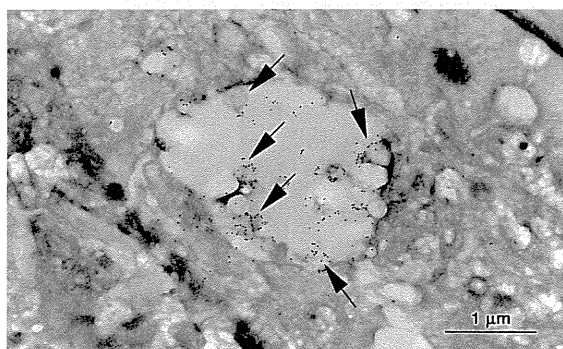


図 10. 新規型リポソームの H555 添加の ADP 凝集塊中における H12-(ADP)リポソームの分布

血小板間の大きな隙間に H12 の存在を示すコロイド金粒子が付着したリポソームが多数分布している(矢印)。

平成 23 年度

#### 1) H12-(ADP)リポソームの凍結切断レプリカ法による検討

H12-(ADP)リポソームを凍結切断レプリカ法で観察すると、切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)および同様に切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 11)。いずれも切断面はきれいな正円状で、100~250 nm の直径を示した。

#### 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

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 12)。この時、H12-(ADP)リポソームは全く観察されなかった。

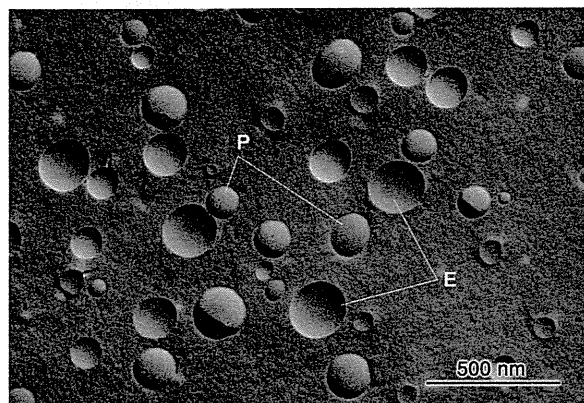


図 11. H12-(ADP)リポソームの凍結切断像  
リポソームの断面の凸部のP面 (P)および凹部のE面 (E)が観察される。ほとんどのリポソームの断面は直径 100~250 nm の正円状を示している。

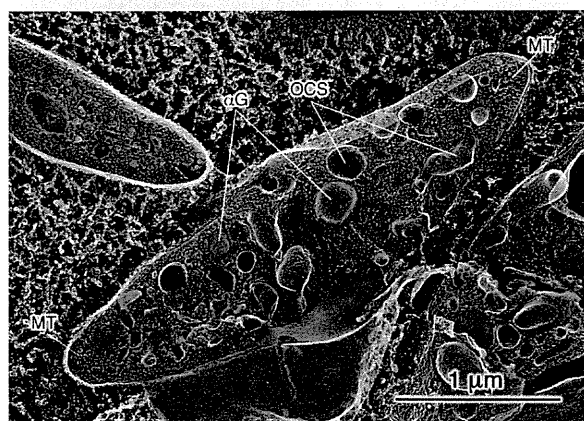


図 12. トロンビン添加前の血小板のレプリカ像  
洗浄血小板に H12-(ADP)リポソームのみを加えた。中央の血小板はほぼ赤道面で切断されている。円盤状血小板の両端部に微小管 (MT)、中央部にα顆粒 (αG)、開放小管系 (OCS)が観察される。リポソームは観察されない。

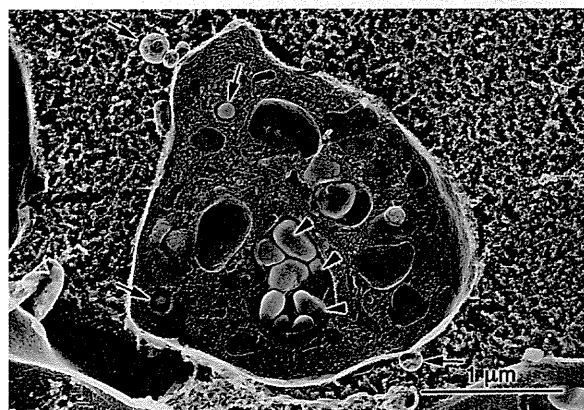


図 13. トロンビン添加5分、非攪拌のレプリカ像  
血小板は凝集することなく、単独に存在する。リポソームは血小板の表面膜および開放小管系中に観察され、球状(矢印)または楕円体(矢尻)の形態を示す。

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 13)。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。

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 14)。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 15)。また、それらの一部には表面が裂けた小孔が見られた。

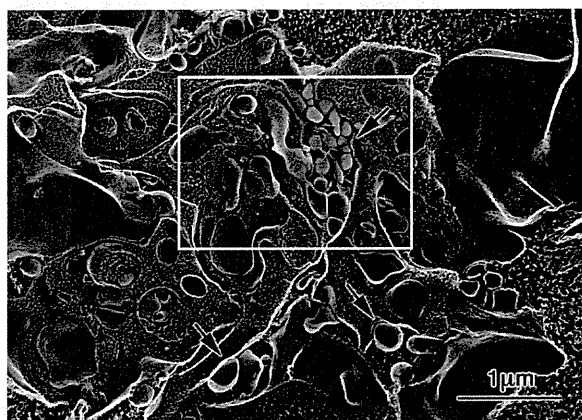


図 14. トロンビン添加5分、攪拌下のレプリカ像  
数個以上の血小板が凝集している。血小板相互間にリポソームが存在し、複数個以上のリポソームが存在する部分も観察される (矢印)。

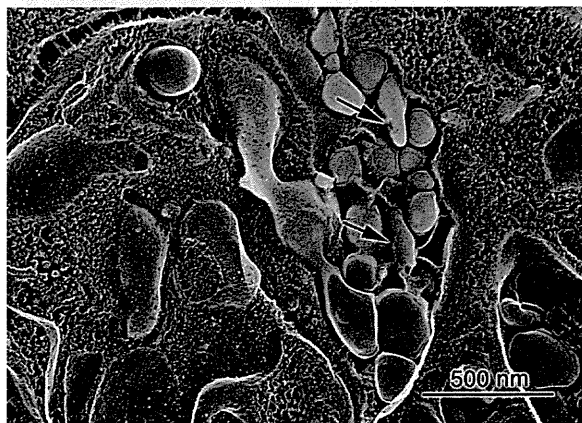


図 15. 図4□部の拡大図  
血小板相互間に存在しているリポソームは、そのほとんどが楕円体を示している。リポソームの一部の表面には小孔様の陥没も観察される (矢印)。

#### D. 考察

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をこれまで報告してきた。ところで、血小板の濃染顆粒にはADPが存在し、これは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。そこで、H12-リポソームにADPを内包させれば、その凝集促進作用は単なるH12-リポソームより強くなると考えられることから、ADP内包H12リポソーム (H12-(ADP)リポソーム)の検討を20年度から実施してきた。

21年度はヒトPRPに生食、H12未結合のコントロールリポソーム、H12またはH12-(ADP)リポソームをあらかじめ加え、さらに低濃度コラーゲン(0.2 µg/ml)を添加し、惹起される凝集を凝集計で比較、検討した。その結果、H12-(ADP)リポソームは他のものより大きな凝集能を示した。同時に行った電顕観察でも、H12-(ADP)リポソームは大きな凝集塊を形成させた。また、本リポソームの分布を免疫電顕で検討したところ、凝集し密着している血小板間に分布した。これらの結果は、低濃度コラーゲンによって形成された凝集局所にH12-(ADP)リポソームが巻き込まれ、その部位でリポソーム内に内包のADPが漏れ出ることによって、凝集をさらに促進することを示している。

ところで、22年度は従来のリポソームより膜電荷が大きい新規のH12-(ADP)リポソーム (H555)を使い、ヒトPRPのADP凝集に対する本リポソームの効果を従来型のものと比較し、電顕観察も行った。膜電荷が大きい新規のリポソームはH12の結合、非結合に関わらず、ヒトPRPのADP凝集を従来型に比較して増大させた。特にH12結合リポソームはADP凝集の中で、塊状および散在して分布した。塊状の分布は従来型に比べて大きく、その分布頻度も従来型のものより多かった。新規リポソームは従来型に比べて活性化血小板に多く結合し、凝集も増大させると考えられた。

23年度は凝集塊に巻き込まれたリポソームの形態を把握し、ADPが漏れ出る機構を解明するために、急速凍結切断レプリカ法で検討した。まずリポソームのみを本レプリカ法で検討し、

リポソームはもともと直径100~250 nm球体であることを確認した。次いで、H12-(ADP)リポソームと血小板の関連を刺激前後で検討した。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。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。リポソームは血小板表面に結合しているものはほぼ球体であったが、開放小管系中に存在しているものは、その大部分がラグビーボール状の楕円体を呈していた。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ると考えられている。実際、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

H12-(ADP)リポソームはその表面に標識された 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ことによって凝集を促進させる。次いで、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) Okamura Y, Fukui Y, Kabata K, Suzuki H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S: Novel platelet substitutes: disk-shaped biodegradable nanosheets and their enhanced effects on platelet aggregation. *Bioconj Chem.* 20: 1958-1965, 2009
- 2) Okamura Y, Katsuno S, Suzuki H, Maruyama H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S: Release abilities of adenosine diphosphate from phospholipid vesicles with different membrane properties and their hemostatic effects as a platelet

substitute. *J Control Release.* 148: 373-379, 2010.

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

##### 2. 学会発表：

- 1) 鈴木英紀, 岡村陽介, 武岡真司, 池田康夫, 半田誠: 血小板代替物の開発 -H12 結合リポソームの微細構造とヒト血小板との相互反応の検討-. 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会, 2009.5.29, 仙台
- 2) 鈴木英紀, 岡村陽介, 武岡真司, 池田康夫, 半田誠: 血小板代替物 H12 結合リポソームの超微形態と血小板との相互反応の検討. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会, 2009.6.6. 小倉
- 3) 勝野峻介, 岡村陽介, 鈴木英紀, 渡邊直英, 池田康夫, 武岡真司, 半田誠: 膜流動性の異なるドデカペプチド結合(ADP 内包)リポソームの ADP 放出特性とその止血能評価. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会, 2010.4.22-24. 鹿児島
- 4) Suzuki H, Okamura Y, Ikeda Y, Takeoka Y, Handa M: Thrombin-induced interaction between human platelets and fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide-modified liposomes 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21・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

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。H12 担持人工粒子 (H12-vesicle) は、フィブリノーゲンのαIIbβ3 結合部位を構成する H12 ペプチドをリポソーム表面に担持させたものであり、これまでの研究から、これが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、安全性の確保と試料の品質を正しく評価する方法を確立することが必要である。

本研究では、1) H12-vesicleの機能測定法確立の基礎となるαIIbβ3高次構造と活性の相関を明らかにし、2) この知見を利用した複数のH12-vesicle機能測定を実施して、どの測定法が最適か評価を行い、3) リポソーム膜脂質組成がH12-vesicle機能に与える影響および、製造日時の違いがH12-vesicle品質に与える影響を調べた。その結果、αIIbβ3活性化のためには、αIIbβ3分子の”extension”とβ3のhybrid domainの”swing-out”の二つの構造変化が必須であることが分かった。高次構造が”extension”の状態を保持するαIIbβ3変異体Q595NTTは常に活性の高い状態にあり、この分子を表面に大量発現させた細胞を利用することにより、H12-vesicleの結合親和性を算出することが可能である。その結果、リポソーム膜脂質の組成が結合親和性に大きく影響すること、H12-vesicle製剤のロットによって、結合親和性に違いが出る可能性が示唆された。

本研究で確立した H12-vesicle の機能測定法は、H12-vesicle の最適化および品質管理を行う上で非常に有用と考えられる。しかし、生きた細胞を用いるため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

インテグリンとリガンドの結合は細胞内シグナル (inside-out signaling) と 2 価イオンの影響を強く受けるが、その構造メカニズムは不明であった。最近の構造解析の進歩により、inside-out signaling では talin などの細胞内タンパクがβ鎖の細胞内ドメ

インに結合するために、α鎖とβ鎖の細胞内ドメイン間の結合が解離してインテグリンが活性化すると考えられている (図1)。一方、細胞外ドメインの立体構造は、結晶構造、電子顕微鏡像の解析からα鎖とβ鎖はともに頭部 (head) を形成する球状ドメインと脚部 (tail) を形成する棒状のドメイン

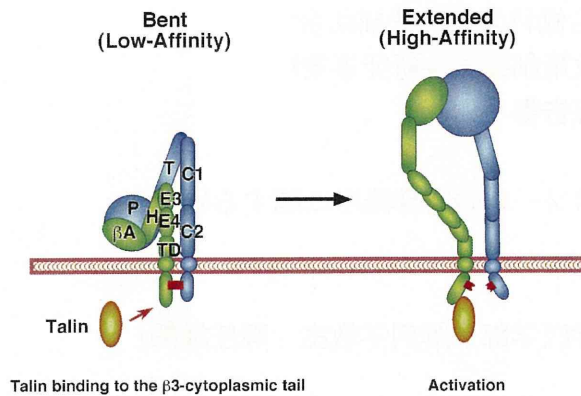


図1. インテグリン活性化のメカニズム

から構成されることがわかった (図2)。結晶構造では $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の head は会合して大きなリガンド結合部位を形成し、tail は genu で137度折れ曲がり head を下に向けている像 (bent conformer) が得られた。しかし電子顕微鏡解析では head を上に向け tail がまっすぐな像 (extended conformer) も観察されているため、インテグリンには bent と extended の少なくとも二つの立体構造が存在することになる。その後の研究から bent が不活性型で extended が活性型とする説が有力だが、bent form が活性型であるとする報告もあり、未だに解決していない。

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。血栓形成には様々な分子が関与するが、中でも $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンは血小板凝集塊の形成に不可欠である。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンは vWF に存在する RGD 配列、あるいはフィブリノーゲン $\gamma$ 鎖 C 末端の12アミノ残基で構成される H12 配列と結合する。われわれが開発した止血機能を有する人工粒子は、H12 ペプチドをその表面に担持している。フィブリノーゲンと異なり、H12-vesicle は $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンの結合部位を複数もつために結合の avidity は高く、高濃度の

フィブリノーゲン共存下でも血小板と

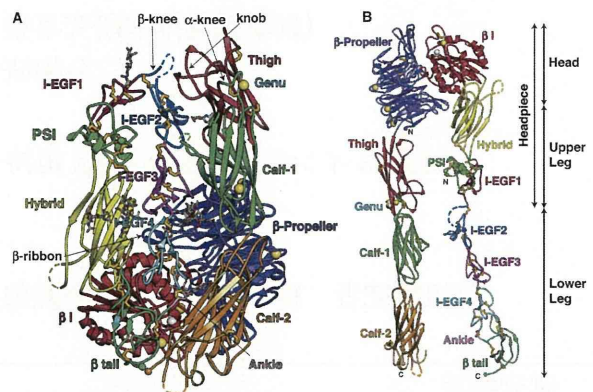


図2.  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンの結晶構造。

結合することが可能である。実際に経静脈投与により血小板減少症マウスの出血時間の短縮が認められているが、臨床応用を考慮した場合、製剤の機能の安定性が確保されていなければならない。すなわち、製剤間の機能のばらつきを最小限にとどめなくてはならない。そのためには、H12-vesicle の機能を評価する測定系の確立が不可欠である。

RGD ペプチド、H12 ペプチドは単独で $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と結合するが、vWF、フィブリノーゲンなどの高分子リガンドと大きく異なる点は、これらの低分子リガンドは活性化に依存せず $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と結合することである。すなわち、RGD、H12 ペプチドは非活性化血小板とも結合するため、もし H12-vesicle も同じ性質を持っているとすると血栓症を惹起する可能性があり、臨床応用上大きな障害となる。また、これらの低分子リガンドは $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と結合し、立体構造の変化を誘発することが知られている。この構造変化に伴い、通常隠れている $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のエピトープが表出されるため、免疫反応が惹起される可能性がある。実際に、抗血栓薬として開発され、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と強固に結合して $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と vWF/フィブリノーゲンの結合を阻害する低分子 ligand-mimetic の投与を受けた患者が、抗

$\alpha$ IIb $\beta$ 3 自己抗体を形成したことが報告されており、臨床応用する上で大きな障害となる。H12-vesicle が生体内で有効かつ安全に機能するためには、1) 活性化血小板のみと結合し、非活性化血小板とは結合しないこと、2) 高濃度のフィブリノーゲン存在下でも結合しうる、高い結合親和性を持つこと、3) たとえ高濃度でも、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の構造変化をひき起こさないことが重要である。これまでの研究で H12-vesicle がこれらの条件を満たしていることを明らかにしてきた。しかし、より止血効果が高く、安全性の高い人工粒子を開発するためには、最適化の方法と、その評価系を確立する必要がある。

本研究では H12-vesicle の機能評価法を確立し、脂質膜構成やロットの違いが H12-vesicle の機能に与える影響を調べた。また、H12-vesicle の安全性に関する評価も行った。

## B. 研究方法

### I. $\alpha$ IIb $\beta$ 3 変異体の作成

$\alpha$ IIb 鎖、 $\beta$ 3 鎖の cDNA は Joseph C. Loftus 博士 (Mayor Clinic, AZ) から供与された。これらを哺乳類発現ベクターである pBJ-1 (Mark Davis 博士 University of California, San Francisco) から供与) にクローニングした。高活性型  $\alpha$ IIb 変異体である Q595NTT の cDNA は site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。

### II. 細胞培養とトランスフェクション

Chinese hamster ovary (CHO-K1) 細胞は 10% fetal calf serum、1% penicillin and streptomycin、1% non-essential amino acids 添加 Dulbecco's modified Eagles medium を用い 37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の incubator で行った。50  $\mu$ g の  $\alpha$ V 又は  $\alpha$ IIb cDNA は 50  $\mu$ g の  $\beta$ 3 cDNA と

一緒に CHO-K1 細胞へ electroporation 法を用いてトランスフェクトした。一過性発現細胞を用いた実験では、トランスフェクトした細胞は 48 時間後に培養皿から剥離し解析に用いた。

### III. Flow Cytometry

細胞を剥離した後 1mM Ca<sup>2+</sup>/1mM Mg<sup>2+</sup>加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10 $\mu$ g/ml と混和し氷上で 30 分間反応させた。遠心洗浄した後、二次抗体として RPE 標識抗マウス IgG と氷上で 30 分間反応させた。遠心洗浄の後細胞を 1mM Ca<sup>2+</sup>/1mM Mg<sup>2+</sup>加 HEPES-buffered saline (HBS) に再浮遊させ、FACSCalibur を用いて細胞の各モノクローナル抗体による陽性率と蛍光強度を測定した。

### IV. フィブリノーゲン結合実験

野生型あるいは変異を有する  $\alpha$ IIb cDNA 50  $\mu$ g と野生型  $\beta$ 3 cDNA 50  $\mu$ g を CHO 細胞にトランスフェクトした。48 時間後細胞を剥離して 10  $\mu$ g/ml の抗  $\alpha$ IIb モノクローナル抗体 PL98DF6 を含有する HTB に再浮遊して氷上で 30 分間反応させた後細胞を遠心洗浄し、RPE 標識抗マウス IgG と氷上で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後 1 $\mu$ M の FITC 標識フィブリノーゲン (FITC-Fbg)、10  $\mu$ g/ml の各種モノクローナル抗体あるいは 1mM の GRGDS ペプチドを含んだ HTB と氷上で 2 時間反応させた。細胞を 1mM Ca<sup>2+</sup>/1mM Mg<sup>2+</sup>加または 1mM Mn<sup>2+</sup>加 HBS に再浮遊させ、FACSCalibur を用いて FL2>500 の領域の細胞集団の平均蛍光強度 (FL1) を測定した。

### V. $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を安定発現したクローン細胞の作成

50  $\mu$ g の  $\alpha$ IIb cDNA、50  $\mu$ g の  $\beta$ 3 cDNA と共に 5  $\mu$ g の Neomycin resistant gene pFneo をトランスフェクトして 48 時間培