

- 4 『Label』で『Sample name』を入力する。
- 5 『Cell』で測定に用いるセル『PTS1060C-Clear disposable zeta cell』を選択する。
- 6 『Temperature』で『Temperature』を 25°C に設定する。
- 7 『Measurement』で『Number of Measurements』で測定回数を入力する。(通常 3 or 5)
- 8 『 Measurement 』で『 Advanced settings 』→『 Advanced 』→『 Manual 』を選択し、測定電圧を 20V 以下にする。
- 9 『Result calculation』、『Reports』、『Export』は以下の Fig. 8 から Fig. 10 のように設定をする。(細かな設定は特にしない)

過電流による故障を防ぐため。

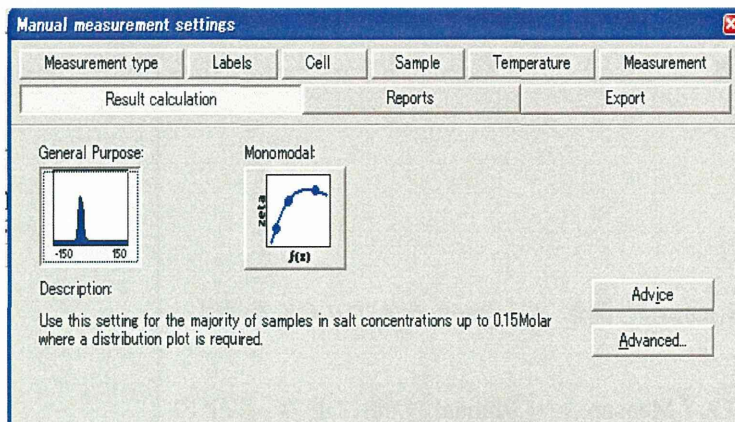


Fig. 8 『Result calculation』

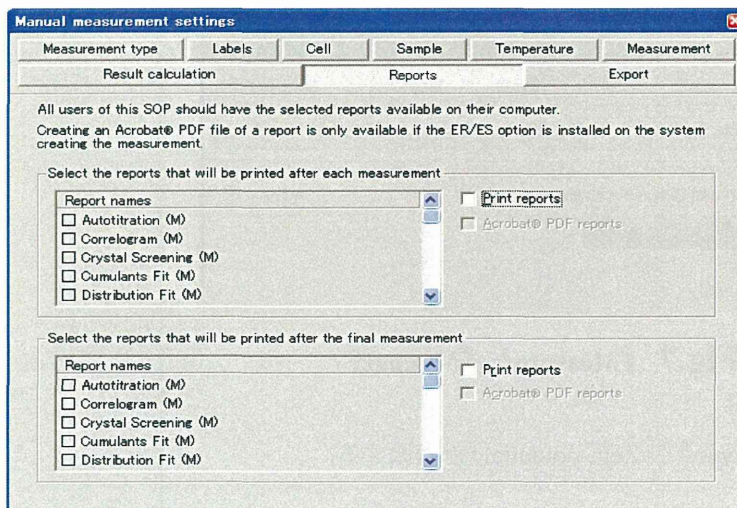


Fig. 9 『Reports』

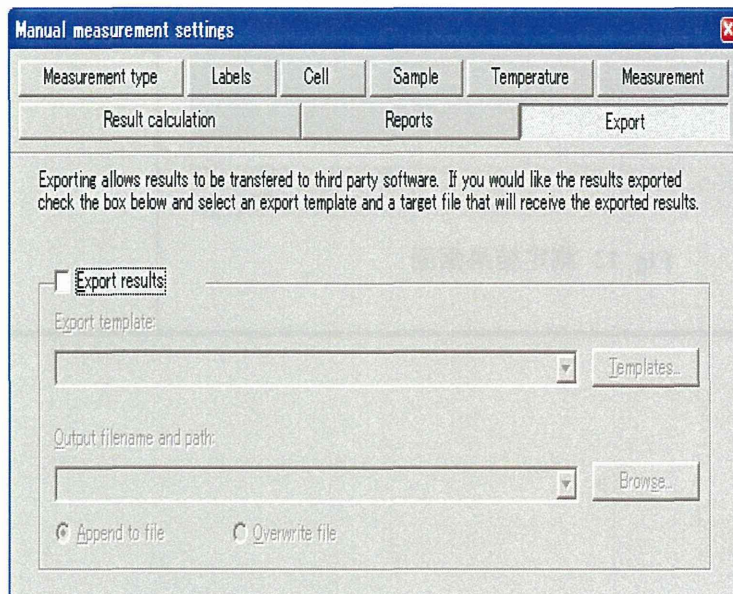


Fig. 10 『Export』

- 10 これらの設定が終わったら、『OK』をクリックし、以下の Fig. 11 の画面を得るので、『Start』をクリックし、測定を開始する。

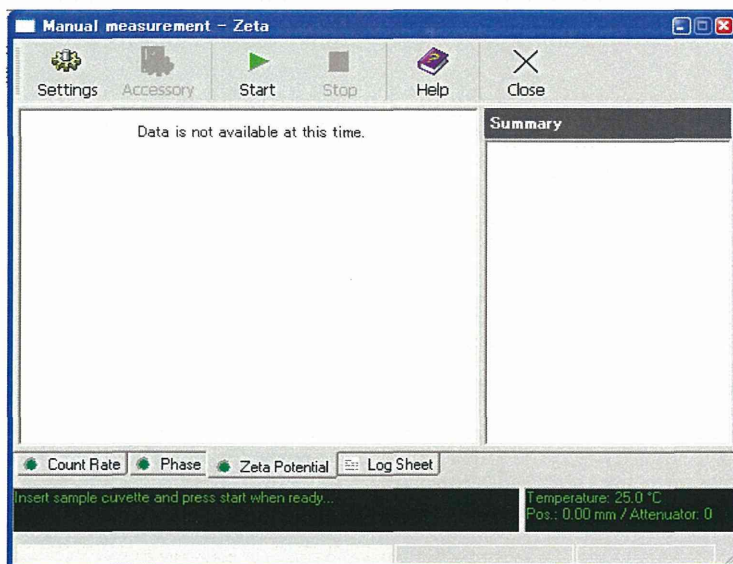


Fig. 11 測定開始画面

- 11 測定が終了すると、次の Fig. 12 の測定結果画面を得る。選択したゼータ電位測定結果の平均と Std.Dev が下に表示される。

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	ZP mV	Mob μmcm/Vs	Cond mS/cm
34	Zeta	110625-DIOH12(PBS)v-5/5/1	2011年6月27日 12:49:24	25.0	-9.74	-0.764	16.5
35	Zeta	110625-DIOH12(PBS)v-5/5/5	2011年6月27日 12:53:18	25.0	-16.5	-1.29	15.9
36	Zeta	110625-DIOH12(PBS)v-5/5/5	2011年6月27日 12:55:01	25.0	-17.2	-1.35	16.3
37	Zeta	110625-DIOH12(PBS)v-5/5/5	2011年6月27日 12:56:45	25.0	-16.0	-1.25	16.4
Mean 35-41				25.0	-16.6	-1.30	16.2
Std Dev				0.0	0.640	0.0502	0.249

Fig. 12 測定結果画面

工程 No. 2-3	工程	ADP 内包量の測定
------------	----	------------

1.概要

HPLC を用いて ADP 内包量の測定を行う。

2.原料

原料	量	入手先
2-4 で作成したリポソーム分散液	3 μ l	-
1mM ADP 溶液	1 ml	SIGMA
可溶化剤 (1M Octyl β -D-glucopyranoside)	約 1 ml	SIGMA
蒸留水	2910 ml	大塚製薬
リン酸水素二ナトリウム・12 水	63.915 mg	関東化学
リン酸二水素ナトリウム	13.608 mg	和光純薬工業株式会社
メタノール(HPLC グレード)	90 ml	和光純薬工業株式会社
トリエチルアミン	12.39 ml	和光純薬工業株式会社

3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
HPLC カラム	1	0021456	東ソー
バイアル	6	186000848	Waters
キャップ	6	186000274	Waters
HPLC サンプルチューブ	6	C4010-630P	National Scientific
1L ビーカー	3		
スターラー	3		
3L ガロア瓶	1		
メスシリンダー	1		
ピペットマン	1	1K-PAS-9P	IWAKI
チップ	1		
ボルテックス	1	SI-0286	Scientific Industries
簡易濾過フィルター	1	430770	CORNING
アルミホイル	1		
HPLC	1	W2690	Waters
UV 検出器	1	W2487	Waters

操作手順

	<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
1	<p>使用器具の洗浄</p> <p>使用するメスシリンダー、1L ビーカー、3L ガロア瓶、シリンジは中性洗剤を用いて洗浄をし、アセトン、純水、アセトンの順に置換をして完全に乾燥させる。</p>	<p>操作の際はゴム手袋着用。</p> <p>汚れの有無は目視でも確認すること。</p>
	<p>調製工程(HPLC 流動相)</p>	
1	<p>洗浄、乾燥後の各 1L ビーカーに各試薬を秤量し、入れる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・リン酸水素二ナトリウム・12 水 21.305 g ・リン酸二水素ナトリウム 4.536 g 	
2	各 1L ビーカーにスターラーと蒸留水を 970 ml 入れる。	
3	メタノールを各 1L ビーカーに 30ml ずつ入れる。	
4	ドラフト内でシリンジを用い、トリエチルアミン 4.13ml ずつを各 1L ビーカーに入れる。	トリエチルアミンは必ずドラフト内で扱うこと。
5	アルミホイルで各 1L ビーカーにふたをし、試薬が完全に溶解するまで攪拌する。	
6	簡易濾過フィルターを減圧ポンプにつなぎ、5までに作成した溶液をすべて濾過させ、3L ガロア瓶に移す。	
	<p>調製工程(HPLC 測定サンプル)</p>	
1	1.5 ml チューブを用いて 1 M Octyl β-D-glucopyranoside と H12-(ADP)リポソームサンプルを 100μl ずつ混合し、ボルテックスで 10 秒間攪拌する。	

- 2 1mM ADP 溶液を用いて Table. 3 のように検量線サンプルを 1.5 mL チューブに作成する。

Table. 3 検量線サンプル

基準濃度 (mM)	1mM ADP 溶液 (μ l)	PBS (μ l)
0.1	100	900
0.05	50	950
0.01	10	990
0.005	5	995
0.001	1	999

- 3 1, 2で作成したサンプルを各 180 μ l ずつ HPLC サンプルチューブに入れタッピングをする。その後、ガラス瓶へ入れキャップをする。

気泡が下部に溜まらないようにタッピングをする。

測定

- 1 HPLC カラムを装着し、パソコン上で解析アプリ『Millennium 32』をひらく。
- 2 アプリを開いたら、『サンプルの分析』をクリックして、以下の Fig. 14 の画面を得る。

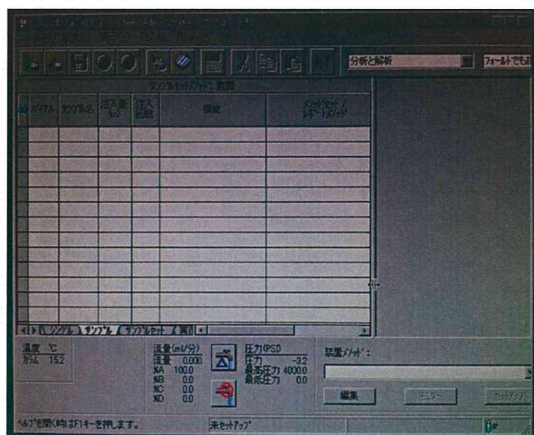


Fig. 14 サンプルの分析

3	<p>シングルインジェクションの画面で装置メソッドを作成する。</p> <p>W2690</p> <p>【送液】</p> <p>最大圧力(psi) 4000.0</p> <p>ポンプモード アイソクラテック</p> <p>合計流量 1.000</p> <p>流量が 10ml/分になるまでの時間 2.00 分</p> <p>%A 100.0 %B 0.0% %C 0.0% %D 0.0%</p> <p>【温度】</p> <p>カラム温度は制御しない</p> <p>W2487</p> <p>【チャンネル 1】</p> <p>波長(nm) 260</p>	<p>※その他の条件は変更しない</p>						
4	送液 A に HPLC 流動相が入っている 3L ガロア瓶をセットする。	およそ 60 分間						
5	Fig.1 の装置メソッドで3で作成した装置メソッドを選択し、モニターをクリックしてカラムの平衡化を始める。							
6	モニターより、ベースラインが安定するまでカラムの平衡化を行う。							
7	調製工程(HPLC 測定サンプル)で作成した各サンプルを HPLC(w2695)へセットする。							
8	<p>サンプルセット欄に測定情報を入力し、測定を開始する。</p> <p style="text-align: center;">Table. 4 測定情報</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">注入量 (μL)</th> <th style="text-align: center;">注入回数 (回)</th> <th style="text-align: center;">分析時間 (分)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">30</td> </tr> </tbody> </table>	注入量 (μ L)	注入回数 (回)	分析時間 (分)	20	1	30	
注入量 (μ L)	注入回数 (回)	分析時間 (分)						
20	1	30						

解析

- 1 Millennium32 初期画面の「データの解析」をクリックする。
- 2 サンプルセットの欄より、解析するサンプルセットをクリックし、さらに各インジェクションをクリックする。
- 3 「解析」→「波形解析」の順にクリックし、波形解析の画面を得る。
- 4 保持時間およそ 12-13 分のピーク面積を記録する。

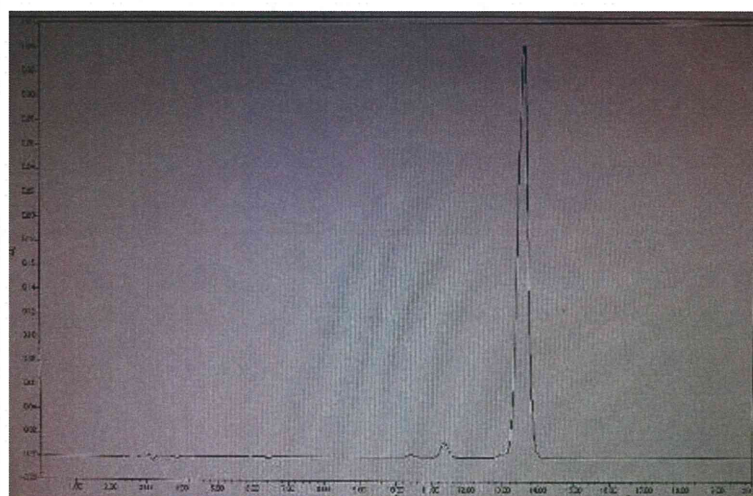


Fig. 15 HPLC ピーク

Table. 5 HPLC 保持時間(分)

ADP	AMP
約 12 分	約 10 分

- 5 4で得られた値より検量線を求め、各リポソーム分散液に含有されている ADP 量を求める。

6	<p>各リポソーム分散液に含有されている ADP 量をリポソーム濃度で割った値を求め、各リポソームサンプルの ADP 量スペックとする。</p> <p><u>HPLC カラム洗浄</u></p>	
1	送液 A へ蒸留水をセットする。	
2	Fig.1 の画面より、「モニター」をクリックし、30 分蒸留水で洗浄する。	
3	送液 A へアセットにトリルをセットし、同様に 30 分間洗浄を行う。	「Sift」+「1」で UV ランプ消灯
4	洗浄終了後、カラムを取り外し、UV ランプを消灯した後、パソコンの電源を切る。	

工程 No. 2-4	工程	ADP 漏出量の測定
------------	----	------------

1.概要

HPLC を用いて ADP 漏出量の測定を行う。

2.原料

原料	量	入手先
2-4 で作成したリポソーム分散液	400 μ l	-
1mM ADP 溶液	1 ml	SIGMA
DPBS	500 ml	invitrogen
アセトニトリル	300 ml	和光純薬工業株式会社
蒸留水	300 ml	大塚製薬
アセトン	100 ml	関東化学

3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
HPLC カラム	1	0021456	東ソー
限外濾過チューブ	1	Amicon® Ultra-0.5	MILLIPORE
バイアル	6	186000848	Waters
キャップ	6	186000274	Waters
HPLC サンプルチューブ	6	C4010-630P	National Scientific
HPLC	1	W2690	Waters
UV 検出器	1	W2487	Waters
遠心機	1	MX-305	トミー精工

操作手順

	<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
	<p>使用器具の洗浄</p> <p>使用するメスシリンダー、1L ビーカー、3L ガロア瓶、シリンジは中性洗剤を用いて洗浄をし、アセトン、純水、アセトンの順に置換をして完全に乾燥させる。</p>	<p>操作の際はゴム手袋着用。</p> <p>汚れの有無は目視でも確認すること。</p>
	<p><u>調製工程(HPLC 測定サンプル)</u></p>	
1	H12-(ADP)リポソームサンプル分散液 400 µl を限外濾過チューブに入れ、20,000 G の条件で 10 分遠心する。	
2	遠心後、ろ液 100 µl を HPLC サンプルチューブに入れタッピングをし、その後ガラス瓶へ入れキャップをする。	気泡が下部に溜まらないようにタッピングをする。
	<p><u>解析</u></p>	
1	解析アプリ『Millennium 32』をひらく。	
2	アプリを開いたら、『サンプルの分析』をクリックして、3-4 の Fig.1 の画面を得る。	
3	シングルインジェクションの画面で装置メソッドを作成する。	
	<p><u>W2690</u></p> <p>【送液】</p> <p>最大圧力(psi) 4000.0</p> <p>ポンプモード アイソクラティック</p> <p>合計流量 1</p> <p>流量が 10ml/分になるまでの時間 2.00 分</p> <p>%A 100.0 %B 0.0% %C 0.0% %D 0.0%</p> <p>【温度】</p> <p>カラム温度は制御しない</p>	

W2487

【チャンネル 1】

波長(nm) 260

- 4 送液 A に工程 2-3 で作製した HPLC 流動相が入っている 3L ガロア瓶をセットする。
- 5 Fig.1 の装置メソッドで3で作成した装置メソッドを選択し、モニターをクリックしてカラムの平衡化を始める。
- 6 モニターより、ベースラインが安定するまでカラムの平衡化を行う。
- 7 調製工程(HPLC 測定サンプル)で作成したサンプルと工程 2-3 の方法により作成した各 ADP 検量線サンプルを HPLC(w2695)へセットする。
- 8 サンプルセット欄に測定情報を入力し、測定を開始する。

およそ 60 分

Table. 6 測定情報

注入量 (μL)	注入回数 (回)	分析時間 (分)
20	1	30

解析

- 1 Millennium32 初期画面の「データの解析」をクリックする。
- 2 サンプルセットの欄より、解析するサンプルセットをクリックし、さらに各インジェクションをクリックする。
- 3 「解析」→「波形解析」の順にクリックし、波形解析の画面を得る。
保持時間およそ 12-13 分のピーク面積を記録する。

4

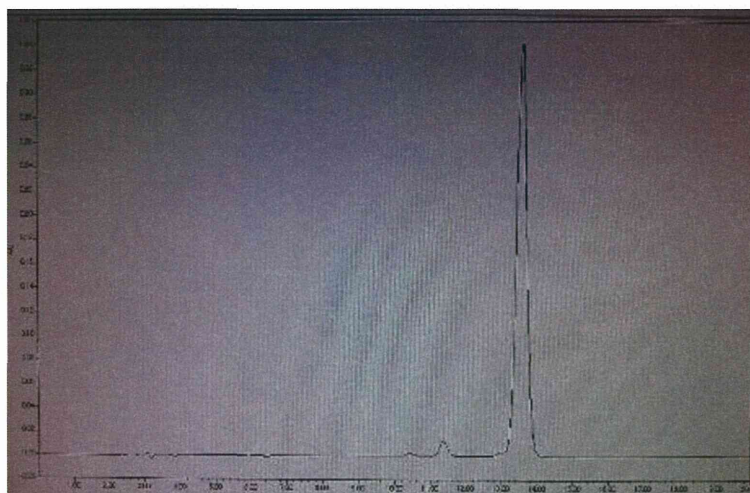


Fig.16 HPLC ピーク

Table. 7 HPLC 保持時間(分)

ADP	AMP
約 12 分	約 10 分

5

4で得られた値より検量線を求め、リポソームより溶出した ADP 量を求める。

HPLC カラム洗浄

1

3-4 での HPLC カラム洗浄と同様にして洗浄を行う。

工程 No. 2-5	工程	脂質組成比の測定
------------	----	----------

1.概要

作成したリポソームサンプルの脂質組成比を測定する。

2.原料

原料	量	入手先
2-4 で作成したリポソームサンプル	リポソームサンプル濃度による	-
重クロロナトリウム	1.5ml	SIGMA
発煙硝酸	約 10 mL	和光純薬工業株式会社
純水	約 50 mL	
アセトン	約 300 mL	和光純薬工業株式会社
ドライアイス	約 300 g	

3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
NMR 管	1	12-01-01	草野科学
パスツールピペット	1	1K-PAS-9P	IWAKI
NMR 測定機	1	Varian INOVA 400 WB	

4.操作手順

	<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
	NMR 管の洗浄	
1	NMR 管をアセトンで洗浄したあと、純水で置換する。	
	(以下、ドラフトベンチ内での操作)	
2	ビーカーに水道水を 100 mL ほど入れ、ドラフト内へ入れる。	ドラフトベンチ内で操作する。
3	パスツールでNMR管に下から5cmの高さまで発煙硝酸を入れ、サクラメンをかぶせて2-3時間ほど静置する。 使用したパスツールは、用意した水道水で洗浄してから廃棄する。	必ずサクラメンを着用。
4	静置後、純水にてNMR管を2~3回洗浄する。	
5	管内部をアセトンで置換し、3時間ほど真空乾燥する。	発熱に注意する
	<u>測定工程</u>	
1	脂質量およそ 40 mg のリポソーム溶液をアセトンとドライアイスを用いて凍結させた後、凍結乾燥する。	
2	凍結乾燥後、重クロロホルム 1.5 mL に溶解させ、NMR 管へ入れる。	NMR 管の底からおよそ 4-5 cm
3	NMR 測定機にてスペクトルの測定を行う。	まで入れる。
	<u>解析</u>	
1	Cholesterol にもみ特徴的なスペクトル 5.35 ppm(1H, s, -CCHCH ₂ -)を積分比の基準とし、他の各脂質の特徴的なスペクトルの積分比よりプロトン比を算出し、このプロトン比から各脂質の混合比を算出する(自動計算)(Table .7)。	

Table 7 各脂質に特徴的なスペクトルのピーク

Lipid	Characteristic spectrum
DPPC	5.20 (q, 1H, -CH ₂ CHCH ₂ -)
Cholesterol	5.35 (d, 1H, -CCHCH ₂ -)
DHSG	4.52-4.71 (dd, 1H, -COONHCHCH ₂ -)
PEG-DSPE	3.65 (m, 456H, -OCH ₂ CH ₂ -)
H12-PEG-Glu2C18	3.65 (m, 312H, -OCH ₂ CH ₂ -)

PEG-DSPE と H12-PEG-Glu2C18 については両者共通の PEG 連続配列のピークを用いることとし、PEG 比のみでの算出

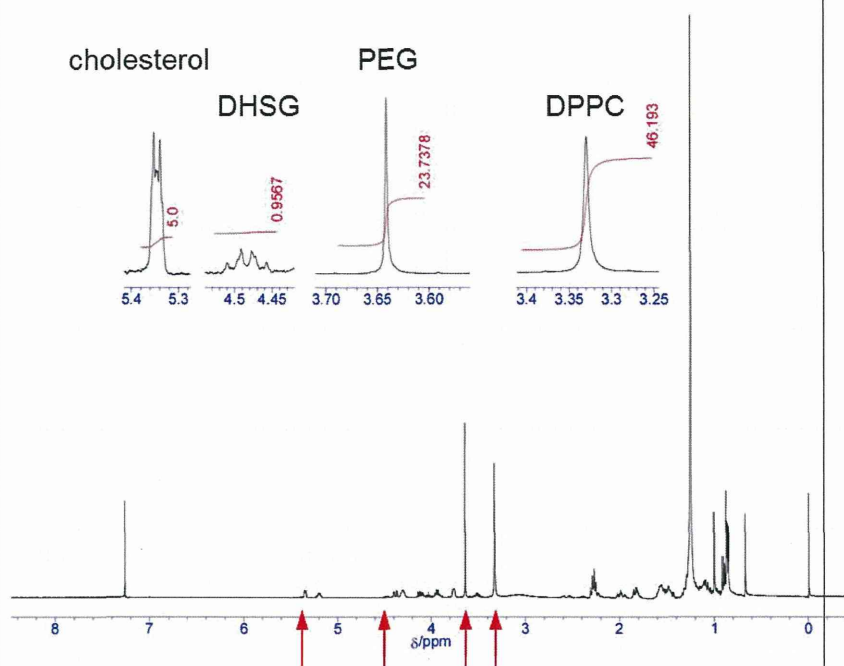


Fig. 17 リポソームのNMRスペクトル

工程 No. 2-6	工程 H12-PEG-Glu2C ₁₈ の定量
------------	------------------------------------

1.概要

アミノ基標識試薬であるフルオレスカミンを用いて、H12-PEG-Glu2C₁₈ を蛍光標識し、定量を試みる。

2.原料

原料	量	入手先
20mg/mL に調整した リポソームサンプル	10 μ L	-
1M Octyl- β -D-glucopyranoside	1mL	SIGMA
DPBS	100mL	Invitrogen
Fluorescamine	0.1mg	Tokyo Chemical Industry
アセトニトリル	1mL	
ホウ酸	6.18g	
四ホウ酸ナトリウム	20.1g	
純水	2L	-

3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
1.5 mL エッペンドルフ チューブ	12		
ヒートブロック	1		
ボルテックスミキサー	1		LMS
卓上遠心機	1		WAKEN
ピペットマン	1		GILSON
チップ			
蛍光測定用 96 well plate	1		
マルチプレートリーダ ー(Power Scan HT)	1		DS ファーマバイオ メディカル

4.操作手順

	<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
1	1.5 mL エッペンドルフチューブに 0.1mg の Fluorescamine を入れ、1mL のアセトニトリルに溶解させ、0.1mg/mL の Fluorescamine アセトニトリル溶液を調製する。	
2	6.18g のホウ酸および 20.1g の四ホウ酸ナトリウムをそれぞれ、1L の純水に溶解し、0.1M ホウ酸水溶液と 0.1 M 四ホウ酸ナトリウム水溶液を調製する。	
3	3 の水溶液を混合して、pH を 9 に合わせ、ホウ酸緩衝液 (pH 9)を調製する。	

	<u>調製工程</u>	<u>注意事項</u>
1	1.5 mL エッペンドルフチューブにリポソームサンプル (20mg/mL)と等量の 1 M Octyl-β-D-glucopyranoside を混合する。	
2	検量線作成用に、1.5 mL エッペンドルフチューブに H12-PEG-Glu2C ₁₈ -PBS 溶液(0、0.1、0.2、0.4、0.6 mg/mL) と等量の 1 M Octyl-β-D-glucopyranoside を混合する。	
3	1、2 のサンプルを Vortex にて混合した後、50 °C に加温したヒートブロックで 30 分静置させる。	
4	1.5 ml エッペンドルフチューブに、3 の可溶化したサンプルを 20 μL とり、そこに Borate Buffer(pH 9.0)を 150 μL 添加し、vortex にて攪拌する。	
5	4 のチューブに、50 μL の Fluorescamine-Acetonitrile 溶液 (0.1mg/mL)を添加し、vortex 攪拌した後、室温にて 15 分間静置する。	
6	蛍光測定用 96 well microplate に 5 のサンプルを 180 μL ずつ移し、マルチプレートリーダーで蛍光強度を測定する (Ex/Em=400/480nm)。	
	<p><u>解析</u></p> <p>1 測定された検量線サンプルの蛍光強度を用いて、検量線を作成し、リポソーム分散液 (20 mg/mL) 中の H12-PEG-Glu2C₁₈ 濃度を算出する。</p>	

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進総合研究事業)
分担研究報告書

負電荷リポソームと活性化血小板の結合能向上のメカニズムの解明

分担研究者 池田 康夫 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
陳 素雲 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
渡邊 直英 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 助教)
丸山 仁美 (慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法センター, 技術員)

【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)を表面に結合させたリポソームは、活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させると共に、血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包することで(H12-(ADP)リポソーム)、その止血能が向上できることを *in vivo* にて証明してきた。

平成 22、23 年度では、従来の H12-(ADP)リポソーム(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.033/0.033(モル比))よりも負電荷脂質である DHSG 含量を増やしたりポソーム(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/5/0.045/0.045(モル比))を構築し、その機能評価を行ってきた。フローサイトメトリーによるリポソームと活性化血小板の結合能評価では、高い結合能を示したが、血小板減少症モデルラットを用いた止血能評価では、出血時間を短縮することはなかった。

そこで平成 24 年度は、負電荷脂質 DHSG を増やしたりポソームの、活性化血小板との結合能向上のメカニズムの解明を目的とした。DHSG と同様に負電荷を持ち、アシル鎖の短い DHSG アナログ (DMSG) を用いて、負電荷脂質 DHSG の含量を増やしたりポソームと活性化血小板との結合および、血小板凝集に対する阻害効果を試験したところ、阻害効果は見られなかった。次いで、負電荷のポリマーである poly(acrylic acid) (PAA)を用いて、同様の阻害効果を試験したところ、活性化血小板との結合および血小板凝集に対して、PAA による濃度依存的な阻害効果が認められた。以上の結果から、DHSG 含量を増やしたりポソームと活性化血小板との結合には、DHSG に起因する負電荷のリポソーム膜と活性化血小板の膜の間にはたらく相互作用が関係していることが示唆された。

A. 研究目的

リポソーム表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を

結合させ、その内水相に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)リポソームは、活性化血小