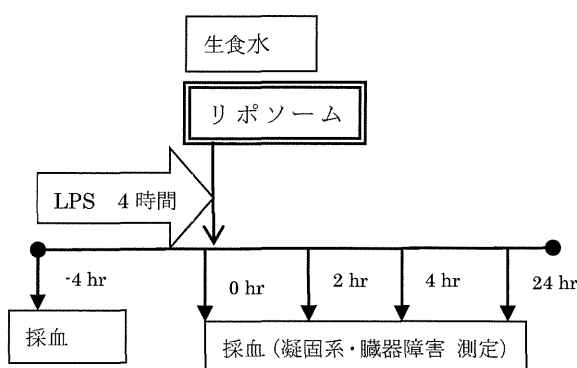


血中クレアチニン (Cr) の 2 項目を測定 (三菱化学メディエンスに委託) した。尾静脈に設置した留置針を経て、LPS (E. coli 055:B5, SIGMA) 30mg/kg を 4 時間かけて、シリンジポンプで持続投与した。そして、終了直後に H12(ADP) 小胞体 (80mg/kg 相当量を 1ml の PBS に懸濁) を投与した。生理食塩水および mock 小胞体 (80mg/kg) を陰性対照とした。LPS 投与終了直後、2 時間後、4 時間後、24 時間後に採血を行い、血小板数、凝固検査、血栓症マーカー、臓器障害マーカーの測定を行った (Fig. 2)。

Fig2



C. 研究結果及び考察

<TP誘発DICラットモデルでの検討>

出血症状優位型の当該モデルは、8倍希釈した低用量のTPを1時間かけて持続投与することでovert DICを誘発せずに、被検製造物の血栓誘発・促進効果を評価する目的で確立した。H12(ADP)小胞体 (20mg/kg、40mg/kg、そして80mg/kg) の投与による血栓マーカーの変動を検討した。血小板数の減少やフィブリノゲンの低下 (データ未提示)、アンチトロンビンの低下に関して、陰

性対照 (生食群とmock小胞体: 80mg/kg) と同様に、H12(ADP)小胞体の投与による影響は認めなかった。一方、D-ダイマー値は80mg/kg投与群においてのみ、投与30分後に統計学的 (t検定) に有意でないが一過性の上昇傾向が認められた。同程度のD-ダイマー一過性上昇作用がmock小胞体でも認められた (Fig. 3)。実際、健常動物への投与 (80mg/kg) 後、20分、60分後のマーカーの変動を検討した以前の結果では、D-ダイマーの上昇は全く認められなかった。D-ダイマー測定系への多量の小胞体による非特異的な影響の可能性が高いが、小胞体自体が *in vivo* で線溶系 (二次/一次線溶ではない) に影響する可能性も否定できないため、投与量を増加させて、さらなる検討が必要と考えられた。

<LPS誘発DICラットモデルでの検討>

H12-(ADP)小胞体過量 (80mg/kg、常用量は10-20 mg/kg) 投与群及び対照であるmock小胞体と生理食塩水投与群において、投与直後 (0時間)、2時間後、4時間後、及び24時間後の、各種血栓症マーカー (血小板数: PLT、フィブリノゲン: Fbg、アンチトロンビン: AT、TAT、PAI-1、D-ダイマー) 及び臓器障害マーカー (肝機能: ALT、腎機能: クレアチニン) を測定した (Fig. 4)。LPSの4時間持続投与によって、PAI-1濃度の著明な増加が誘発され、血小板やフィブリノゲンは減少し、その他のマーカーはDICを示唆する変動をきたした。一方、血栓症による肝臓及び腎臓の障害が出現し、少なくとも24時間後まで持続した (血栓優位型DIC)。いずれのマーカーにお

いても、またいずれの時点においても、その変動は、3群間で有意な差（t検定）は認めなかった。血栓優位型のDICモデルにおいても血栓増強効果を示唆するマーカーの変動は認められなかったことから、少なくとも常用量の4-8倍の投与量(80 mg/kg)の範囲内では、H12-(ADP)小胞体の血栓症誘発作用は認められなかった。

当該製造物は、ヒト血小板製剤の代替物として、大量出血・輸血で誘発された急性血小板減少症への投与によって、止血を促進して患者の救命に資する目的で開発が進められている。このような緊急の条件下ではしばしばDICが併発して、出血と血栓が共存する複雑な病態を呈することが稀ではない。したがって、今回の検討結果は、当該製造物の開発を進めるうえにおいて、その安全性を示唆する点において有意義であると考えられる。しかしながら、今回は極めて限られた用量でのみの検討に終わった。今後は、安全性試験として、投与量を100倍量までエスカレーションして、その影響を確認することが必要である。

D. 結論

出血優位型及び血栓優位型のいずれのDICラットモデルでの検討においても、対照リポソームと比較して、H12-(ADP)小胞体のbolus投与は、評価した用量の範囲内（～80mg/kg、常用量は10-20 mg/kg）において、血栓症マーカーの変動に有意な影響は及ぼさなかった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

総説

1) 半田誠：人工血小板開発の現状と今後の展望．日病薬誌．（2013）49(9):949-53.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig. 3 H12(ADP) リポソームの血栓マーカに及ぼす影響: TP惹起DICラットモデルでの検討

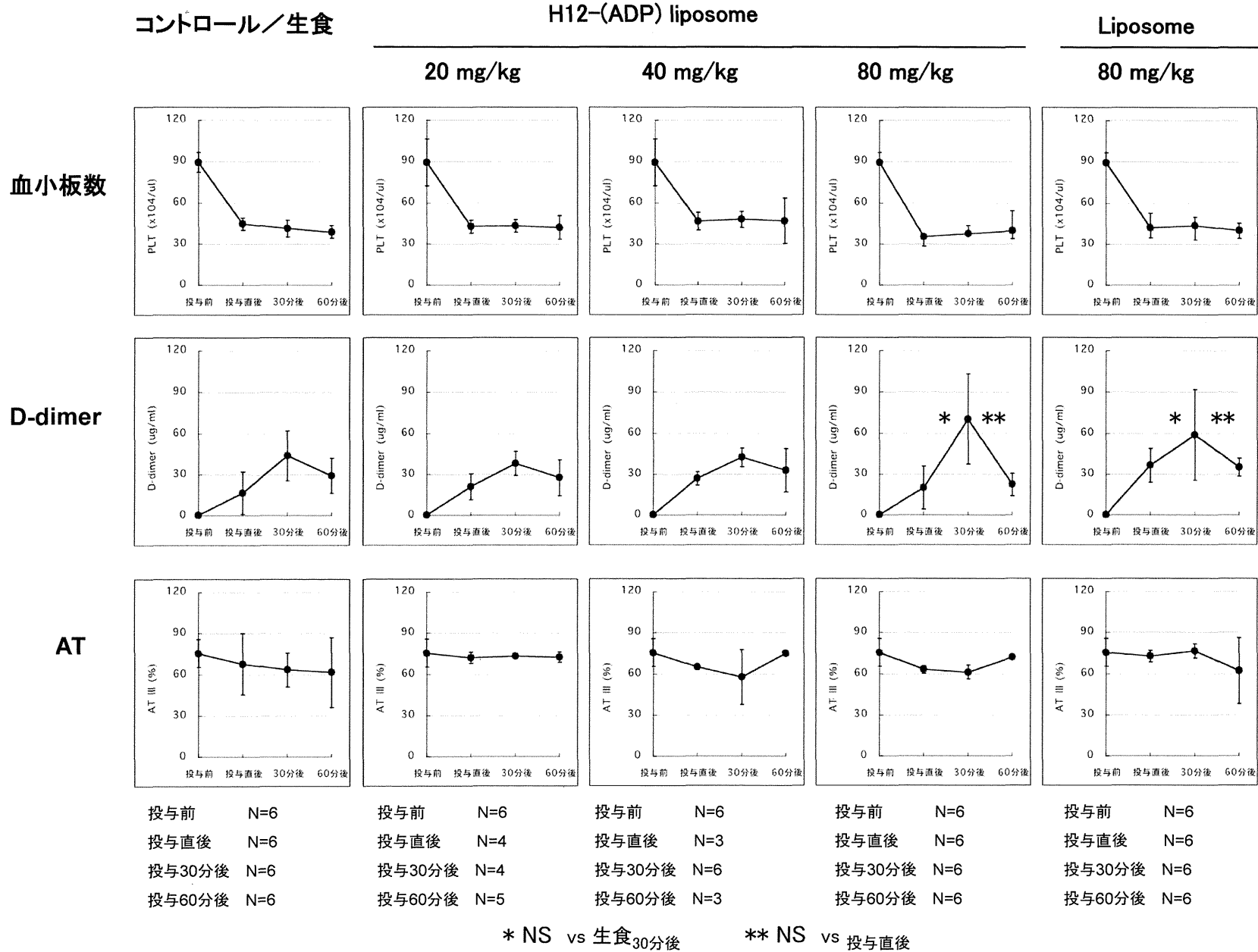
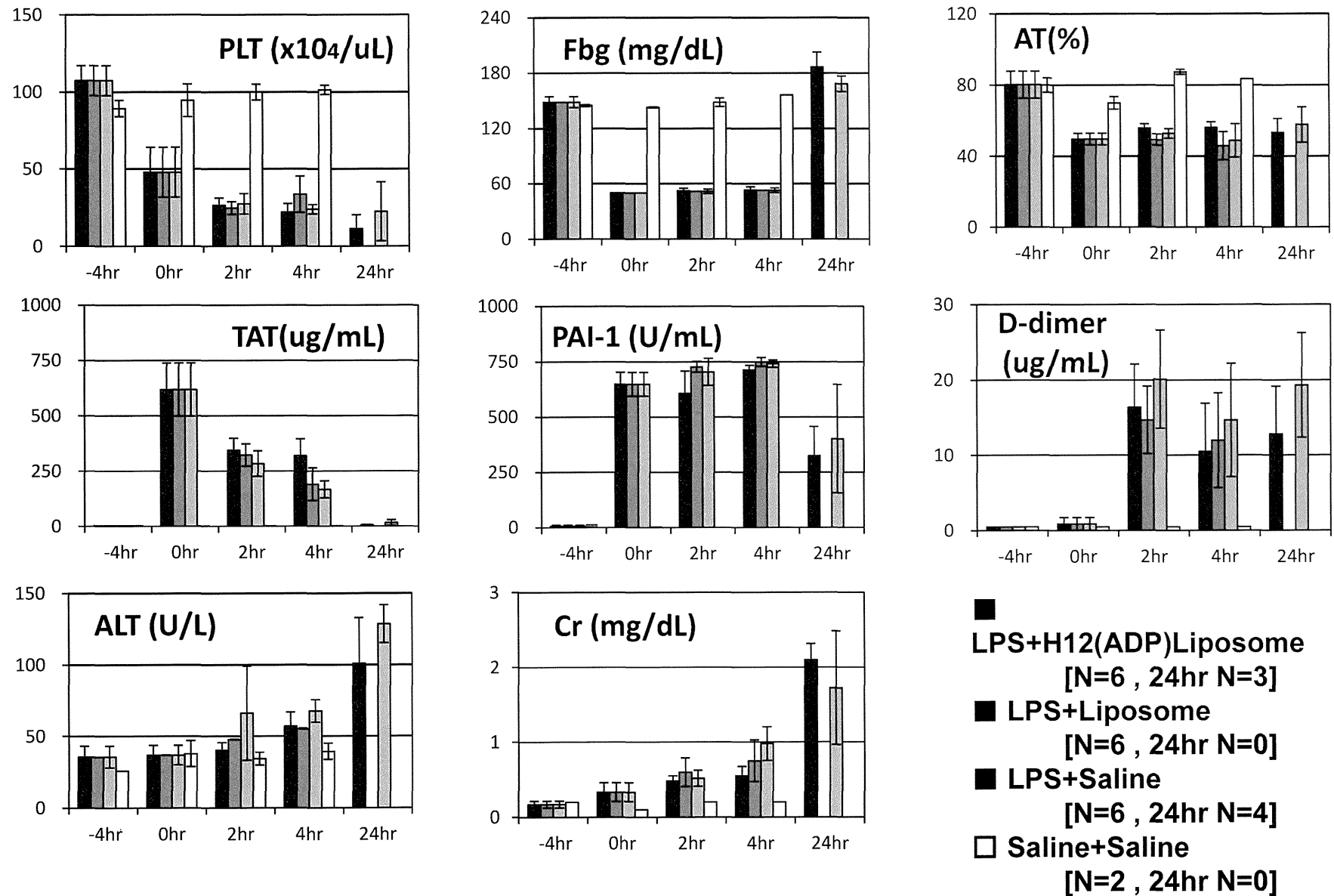


Fig. 4 H12(ADP) リポソームの血栓マーカに及ぼす影響: LPS惹起DICラットモデルでの検討



平成 24～26 年度 厚生労働科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業」

『人工血小板／H12 (ADP) リポソーム：臨床研究への移行を
目指した品質管理と薬物試験 (H24-創薬総合-一般-008)』

分担研究報告書

超微細形態解析

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 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 24 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、固定および未固定試料を急速凍結切断エッチングレプリカ法で観察した。血小板凝集に巻き込まれたリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示し、表面には固定試料の結果と同様に小孔が見られ、この穴から ADP が漏れ出る可能性を示した。25 年度は、ウサギを使った *in vivo* の実験で、低血小板肝臓出血モデルで血小板血栓に巻き込まれたリポソームを確認し、H12-(ADP) リポソームが血小板減少状態の生体の止血に関与することを示唆する結果を得た。26 年度は衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微細形態的検討を行った。すなわち、H12-(ADP) または (ADP) リポソームをマウス尾静脈から注入後、右肺に衝撃波を照射すると、右肺では肺出血が著明で、血小板凝集塊が肺胞血管内腔および肺胞に形成された。さらに、凝集塊には H12-(ADP) リポソームが巻き込まれていた。しかし、(ADP) リポソームの前投与では致死率が高いこと、凝集塊中への巻き込みも少ないことから、本傷害に対する H12-(ADP) リポソームの前投与が有効であることが示唆された。

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、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。

平成 24 年度の検討では、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ことから、固定および未固定試料を急速凍

結切断エッチングレプリカ法で観察した。未固定試料でも血小板塊のリポソームは変形し、その表面に小孔が形成される所見を得た。すなわち、この小孔から ADP が漏れ出すことが示唆された。

一方、H12-(ADP) リポソームの動物を使った *in vivo* における実験においても、本リポソームはラットの止血時間を短縮させる効果を得ている。しかし出血局所でのリポソームの所在については明らかではなかった。そこで 25 年度は、前もって急性的に血小板減少状態を生起したウサギに、本リポソームを投与し、さらに肝出血させた低

血小板肝臓出血モデルの電顕観察を行った。その結果、出血部に血小板凝集が形成され、その中にリポソームが観察された。すなわち、in vitroの実験と同様に、H12- (ADP) リポソームは凝集を促進し、局所での血栓形成に有効である結果を得た。

26年度は、爆発などの衝撃波による外肺損傷で致死性の肺出血を合併することが知られている。そこで、本症マウスモデルを作製し、衝撃波で生じた肺出血性の致死に対する、H12-(ADP) リポソームの有効性についての電顕検索を行った。

B. 研究方法

平成 24 年度

1) ヒト血小板と H12-(ADP) リポソーム混合液のトロンビン刺激と凍結

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 PGE₁ (最終濃度 1 μM) を加えて遠心し、ペレットを 0.35% BSA と 1 μM PGE₁ 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、攪拌して凝集させた。1,000 rpm で 1 分間遠心後、上清を捨て、血小板凝集ペレットを試薬用スパーテルでかき取り、凍結用キャリアーに載せ、余分な水分を吸い取った上で、氷晶の発生や成長を抑えるために高圧凍結装置 (Balzer's 社, EM HPM-010) で急速凍結した。凍結試料は液体窒素中に保存した。

2) 凍結割断エッチングレプリカ膜の作製

凍結試料が載っているキャリアーをあらかじめ真空排気と -110°C に温度設定したレプリカ試料作製装置 (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、割断面から氷の昇華を促すために -90°C に温度を上げてエッチングした。その面

に白金を 40 度の角度から 2 nm の厚さに蒸着し、次いでカーボンで 90 度の角度から 10 nm の厚さで蒸着した。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。

平成 25 年度

1) 急性血小板減少症ウサギの作製法

ニュージーランドホワイトウサギの右大腿動脈および左大腿静脈にカニューレーションを行い、動脈は脱血と動脈圧測定用、静脈は輸液および輸血用とした。血小板を減少させるために、25ml の脱血を行い、同時に低分子デキストラン液を 25ml 輸液した。この脱血と低分子デキストラン液の輸液は、さらにもう 1 回行った。3 回目の脱血後、1 回目の脱血で得られた洗浄赤血球を生理食塩水で 25ml に希釈して輸血した。次いで、4 回目の脱血を行い、2 回目の脱血で得られた洗浄赤血球を同様に輸血した。以下、1 回 25ml の脱血を計 10 回 (合計平均 250 ml) 行い、最後の 10 回目の脱血で採取した洗浄赤血球は生理食塩水で 25ml にして投与した。このようにしてウサギの血小板数を $19.5 \pm 5.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ から $5 \pm 0.6 \times 10^4 / \mu\text{l}$ に減少させた。

2) 肝臓出血法と人工血小板の投与方法

ウサギを開腹し、肝臓の一葉に Derma punch (直径 5 mm) を刺して貫通、損傷させ、oozing 出血を持続させた。バルーンカテによる圧迫止血を行いながら、直ちに H12-(ADP) リポソームを体重当たり 20 mg/kg 投与した。同時に、損傷 0 分から 5 分経過後、および 5 分から 10 分経過後の出血量を測定し、止血を確認できたものは閉腹し、臓器出血量と 24 時間の生命予後について比較した。

3) 電顕的検索

肝臓の欠損孔を含む部位を細切し、これを 2% グルタルアルデヒド液 (pH7.4) 中に浸漬して約 2 時間固定した。次いで、0.1M リン酸緩液で洗浄後、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光顕用切片を作製し、これをトルイジブルーで染色、観察した。その後、電顕観察部位をトリミングし、超薄切片を調製、グリッドメッシュに回収した。これを酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色後、同様に透過型電顕で観察した。

平成 26 年度

1) Blast Lung Injury マウスの作製

レーザー誘起衝撃波装置は波長 694 nm の Q スイッチ・ルビーレーザーをターゲット(天然ゴム + 直径 12 mm、0.5 mm 厚の亚克力板)に単発照射し、プラズマ現象から 8J の衝撃波を発生するものを自作した。マウスには前もって H12-(ADP) リポソーム、コントロールのための (ADP) リポソーム、PBS リポソームまたは生食を尾静脈から 120 μ l (20 mg/kg) 投与した。1 時間後、マウスを剃毛後、腹臥位に固定し、レーザー装置をマウス右側背より密着させた上で、衝撃波を右肺全体に照射し、Blast Lung Injury を作製した。レーザー照射後、気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60 分間呼吸状態などを観察した。

2) Blast Lung Injury マウス肺の電顕観察

レーザー照射マウスの右肺、左肺を切り出し、細切して 2% グルタルアルデヒドに浸漬した。次いで、油回転ポンプで肺の空気抜きを行い、沈下させて固定した。以下、上記した超薄切片法の試料作製を行い、同様に透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

平成 24 年度

1) 固定試料によるヒト血小板と 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固定血小板は円盤状の形態を維持した(図 1)。この時、H12-(ADP) リポソームは全く観察されなかった。

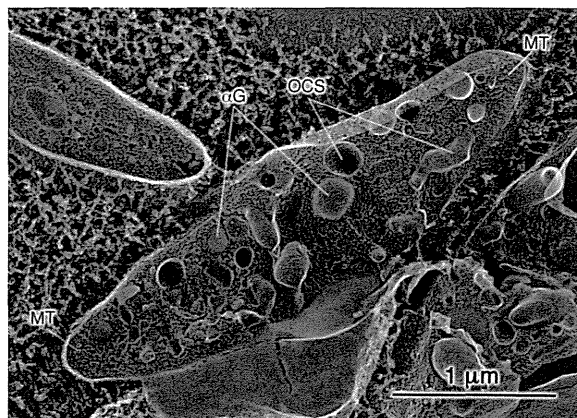


図 1. トロンビン添加前の固定血小板のレプリカ像
洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームのみを加え、グルタルアルデヒドで固定後、レプリカ試料を作製した。中央の血小板はほぼ赤道面で割断されている。円盤状血小板の両端部に微小管 (MT)、中央部に α 顆粒 (α G)、開放小管系 (OCS) が観察される。リポソームは観察されない。

洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加え、さらにトロンビン添加して攪拌した 5 分後に固定した試料では、血小板は相互に接着して凝集塊を形成した(図 2)。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 3)。また、それらの一部には表面が裂けた小孔が見られた。

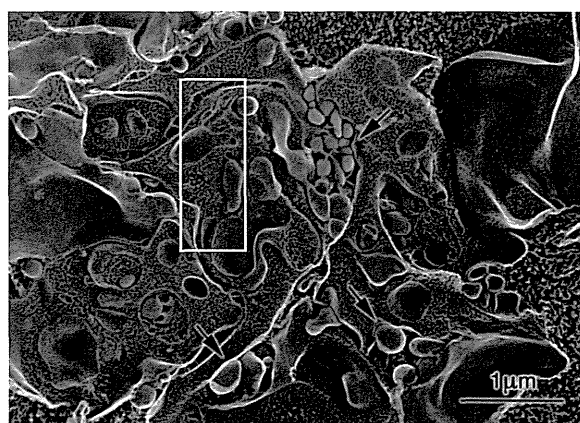


図 2. トロンビン添加、攪拌下 5 分に固定した血小板凝集のレプリカ像

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)。

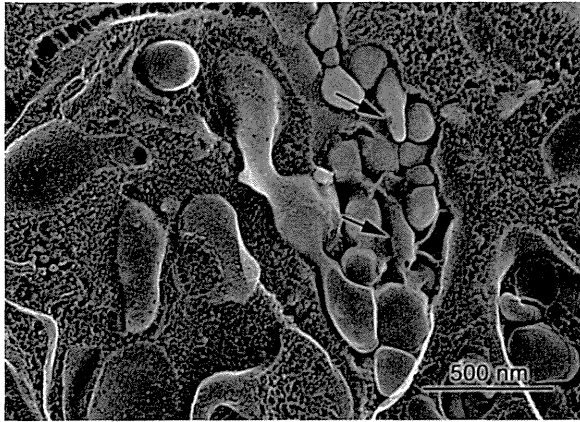


図3. 図2口部の拡大図

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)。

リポソームは血小板中または血小板間と思われる部位に、多数見られた。拡大像ではリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示した(図5)。これらのリポソーム表面には、固定したものと同様な小孔が観察された。

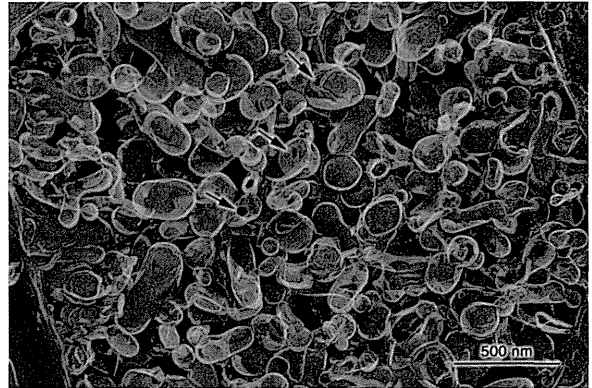


図5. 図4口部の拡大図

リポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示している。リポソーム表面には、固定したものと同様な小孔が観察される(矢印)。

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

一方、未固定の試料を得るために、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加え、さらにトロンビンを加えて攪拌し、固定試料と同様に凝集させた。この後、軽度遠心し、ペレットをかき取り、凍結キャリアーに載せて高圧凍結した。しかし、これらの時間に手間取り、固定試料のようにトロンビン添加5分というような経時的な試料採取はできなかった。このようにトロンビン添加5分以降に採取、凍結し、調製した未固定凝集塊のレプリカ像では、血小板は識別できない程に複雑な形態を示した(図4)。

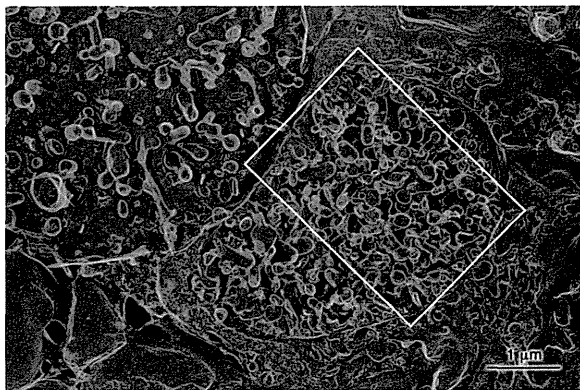


図4. 未固定凝集塊のレプリカ像

トロンビン刺激、攪拌5分後に遠心、凝集塊を集めて凍結した。凍結までの時間がかかり、トロンビンの反応は強くなっている。凝集血小板の断面に多数のリポソームが見られる。

平成 25 年度

1) 急性血小板減少症ウサギの肝出血に対する H12-(ADP) リポソームの効果

実験前のウサギにおけるヘモグロビン量と血小板数はそれぞれ 11.8 g/dL、 21.0×10^4 個/ μ L であった。脱血完了後のそれらは 6.6 g/dL、 3.3×10^4 個/ μ L に低下、減少していた。さらに H12-(ADP) リポソーム投与後では、ヘモグロビン量 4.3 g/dL、血小板数 2.5×10^4 個/ μ L であった。出血量は 0-5 分後は 14.5 g、5-10 分後は 15.2 g であった。しかし、1 時間経過しても止血できなかったが、そのまま解剖し、電顕検体とした。

2) 肝損傷部の電顕的検索

電顕観察前に、光顕用のトルイジンブルー染色切片を観察した(図6)。肝損傷部では血管または毛細血管にあたる類洞からの出血のために多くの赤血球が見られた。損傷部の赤血球の周囲では白血球も見られたが、多くはなかった。損傷部からやや遠い部位に血小板凝集塊が観察された。この部を拡大すると、少数の赤血球と白血球を巻き込んだ混合血栓のように観察された(図7)。中央部はフィブリン層に囲まれているような血栓像を示した。

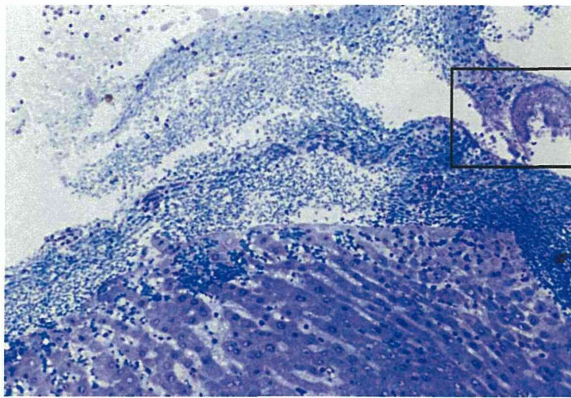


図6. 肝損傷部のトルイジンブルー染色像
肝臓損傷部の境界面には多数の赤血球が見られ、白血球は多くはない。図右上に血小板凝集塊が見られる(口部)。

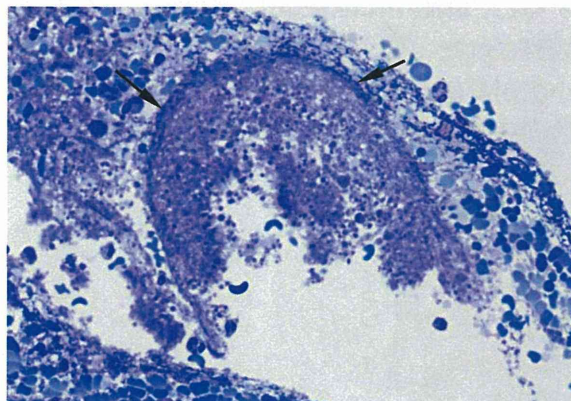


図7. 肝損傷部のトルイジンブルー染色像
図6の口部を拡大した。赤血球、白血球を含む血小板凝集塊が見られ、中央部の血小板凝集塊はフィブリンの帯(矢印)に囲まれている。

トルイジンブルー染色で見られた血小板凝集を電顕で観察した(図8)。

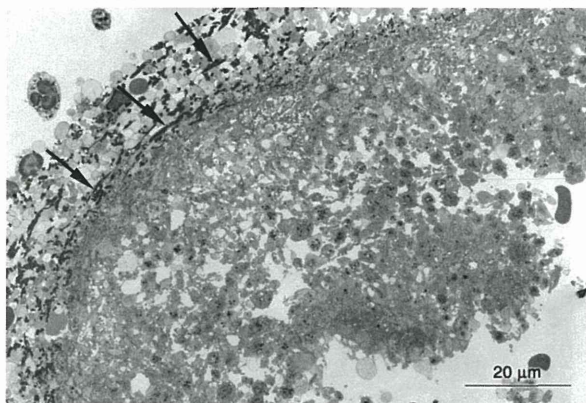


図8. 肝損傷部の血小板血栓の電顕像
フィブリン(矢印)により外側と内側に分けられているのが分かる。外側では血小板は脱顆粒し、赤血球と白血球も観察される。一方、内側では大部分が血小板による凝集塊として観察される。血小板相互には隙間が多く観察される。

血小板凝集塊をさらに拡大して観察すると、血小板が存在しない隙間が明瞭になった(図9)。この部分にはやや形態が不整形であるが、直径500 nm程で二重膜をもつリポソームが存在していた(図9口部拡大図A, B)。他の血小板間の明るく見える部位にも、このようなリポソームが多く観察された。

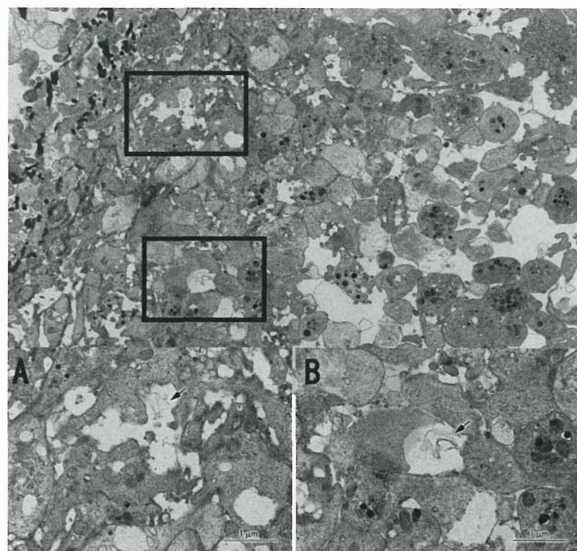


図9. 肝損傷部における血小板凝集像
凝集塊中の血小板は形態変化を起し、少数の血小板では顆粒は残存しているが、多くの血小板では放出像が多く観察される。また、血小板相互間に隙間が多く観察される(口部)。口部を拡大して観察すると、やや形態が不整形ではあるが、二重膜をもつリポソームが見られる(A, B, 矢印)。また、リポソームの崩壊物も見られる。

平成27年度

1) 衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微形態的検討

マウスの肺は外側から肺胸膜、細線維からなる支持組織、気管枝、細気管枝、空気が充満している肺胞管、肺胞、酸素と二酸化炭素の交換の場である毛細血管が観察される(図10)。正常肺では肺胞中に血液細胞および血漿成分が漏れ出すことはない。

電顕で観察すると、小室に仕切られた肺胞の上皮細胞は、I型および高電子密度で界面活性物質を含む層板小体をもつII型肺胞上皮細胞が見られる(図11)。毛細血管中には内皮細胞、赤血球が多数見られる。

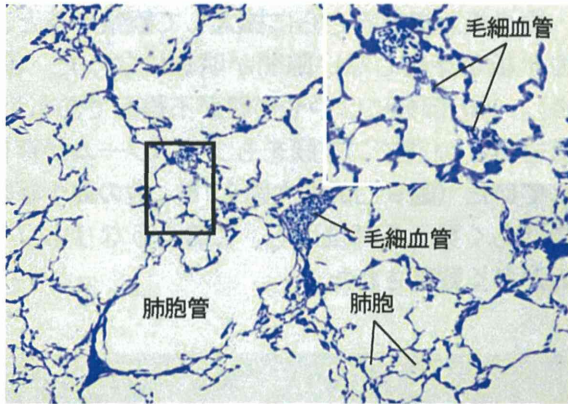


図 10. マウス正常肺のトルイジンブルー染色光顕像
マウス肺には肺胞管、肺胞、毛細血管が見られる。挿入図は□部の拡大像を示す。この図には気管枝または細気管枝は見られない

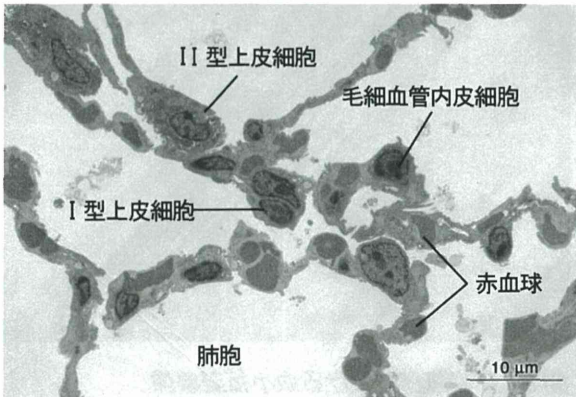


図 11. マウス正常肺の電顕像
肺胞は毛細血管を含む上皮細胞によって小室に区切られている。肺胞上皮は I 型および II 型細胞よりなる。毛細血管中には赤血球が充満している。

一方、前もって H12-(ADP) または (ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺では、特に右肺の肺出血が顕著に見られた (図 12、図 13)。

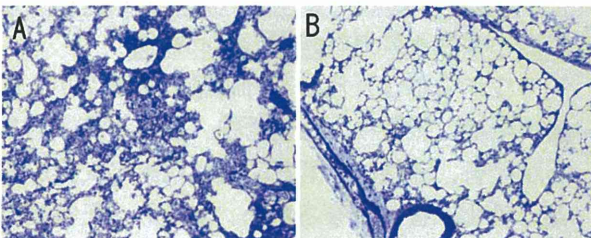


図 12. H12-(ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺の光顕像
右肺では肺胞中に出血が見られる (A)。しかし、左肺では出血はほとんど見られない (B)

H12-(ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺を電顕で観察

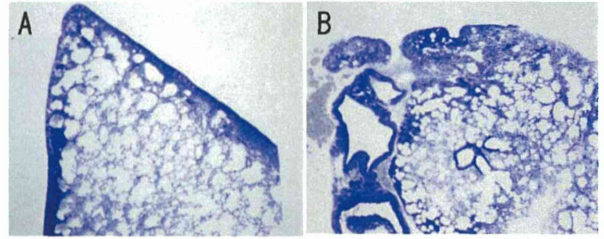


図 13. (ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺の光顕像
右肺では肺胸膜以下の肺胞内に出血が目立っている (A)。本マウスでは、左肺胞内にも出血が見られる (B)。しかし、全体的には H12-(ADP) リポソーム注入時と同様な所見を示している

すると、肺胞中には多数の赤血球とフィブリンが観察された (図 14)。さらに、毛細血管中には血小板が凝集を形成した像が見られた (図 15)。

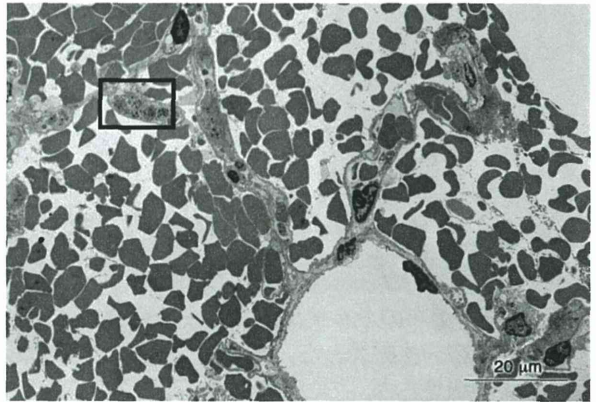


図 14. 衝撃波を照射したマウス右肺の電顕像
ほとんどの肺胞中には、多量の赤血球とフィブリンが見られる。毛細血管中には変形し、凝集した血小板が観察される (□部)

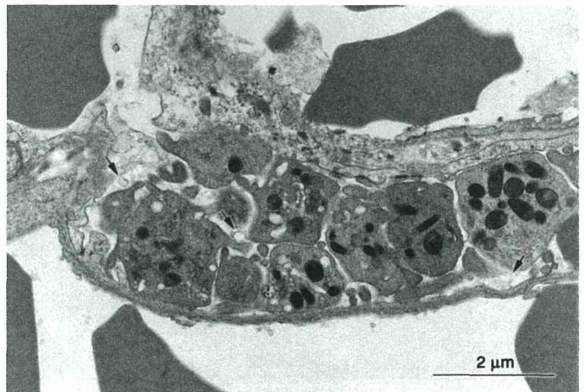


図 15. 衝撃波を照射したマウス右肺の電顕像 (図 14 □部の拡大像)
毛細血管中には変形し、凝集した血小板が観察され、さらにリポソームも見られる (矢印)

また他の部位では、肺胞内にも大きな血小板凝集塊が形成されていた。H12-(ADP) リポソームは多くはないが、凝集塊に巻き込まれていた。さらにその周囲には、フィブリン形成が見られた。左肺では、肺胞への出血は全体的に軽微であった。

(ADP) リポソーム注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺を顕微鏡で観察すると、H12-(ADP) リポソームと同様な所見を得た。すなわち、右肺では肺胸膜直下の肺胞から出血が見られた(図 13A)。一部のマウスでは、左肺でも肺胞出血が見られた(図 13B)。電顕でも肺胞出血、フィブリン形成、毛細血管内および肺胞での血小板凝集塊が H12-(ADP) リポソーム注入後と同様に観察された。しかし、凝集塊に巻き込まれた(ADP) リポソームは少なかった。

D. 考察

平成 24 年度

平成 23 年度から急速凍結レプリカ法を実施してきた。本法で H12-(ADP) リポソームのみを観察した時、直径 100~250 nm の断面の凸部と凹部が観察され、リポソームは元々直径 100~250 nm の球形であることを確認できた。

次いで、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加え、さらにトロンビンを加えた後、経時的にグルタルアルデヒドで固定した。この固定試料を急速凍結切断レプリカ法の試料とした。その結果、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームのみを加えた固定試料では、血小板は他の方法と同様に円盤状を示し、 α 顆粒、開放小管系、微小管などが識別された。しかし、血小板に結合する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ビンを加え、攪拌した 5 分後の固定試料では、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た。さらに、リポソーム上の小孔は ADP の通路となると考えた。

しかし、この小孔は固定によるアーティファクトの可能性も否定できなかった。そこで 24 年度は、未固定試料を急速凍結切断エッチングレプリカ法で観察した。未固定の試料を得るために、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加え、さらにトロンビンを加えて攪拌し、固定試料と同様に凝集させた。この後、軽度遠心し、ペレットをかき取り、凍結キャリアーに載せて高圧凍結した。しかし、これらの時間に手間取り、固定試料のようにトロンビン添加 5 分というような経時的な試料採取はできなかった。このようにトロンビン添加 5 分以降に採取、凍結し、調製した未固定凝集塊のレプリカ像では、血小板は識別できない程に複雑な形態を示した。一方、リポソームは血小板中または血小板間と思われる部位に、多数見られた。拡大像ではリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示した。これらリポソーム形態の多様性は、固定試料では見られなかった。未固定試料ではトロンビン刺激から凍結までに手間取ったために、トロンビン刺激がより強くなってリポソームの形態にも影響したと考えられる。さらに、未固定試料でもリポソーム表面には、固定したものと同様な小孔が観察された。従って、小孔の形成は固定によるアーティファクトではないと考えられた。

平成 25 年度

これまでウサギ低血小板肝臓出血モデルを用いて、出血後に自己の血小板、血漿、H12-(ADP) リポソームを投与し、止血時間と 24 時間の生命予後を検討してきた。肝損傷部からの出血は自己血漿投与群では、止血不能で、全例が数時間で出血死した。自己の血小板と H12-(ADP) リポソーム投与群は、平均 25 分で止血され、約半数例を救命できた。すなわち、低血小板状態で進行する出血に対して、H12-(ADP) リポソーム投与が血小板輸血と同等の止血ならびに救命効果を発揮し、血小板代替物として機能することが示唆されている。しかし、これまで、出血部における、血小板と本

リポソームの相互関係を示す所見は得られていない。

今回の超薄切片法では、肝出血させたと同時に H12-(ADP) リポソームを投与したにもかかわらず、1時間経過しても止血されなかった。しかし、このウサギを屠殺して顕微鏡で観察すると、肝損傷部では出血のために主に多くの赤血球が見られ、さらに損傷部からやや遠い部位に血小板凝集塊が観察された。この血小板凝集塊は、少数の赤血球と白血球を巻き込んだ混合血栓のように観察された。中央部はフィブリン層に囲まれているような血栓像を示した。また、この血栓を電顕で観察すると、黒染しているフィブリン層、赤血球、白血球が見られ、さらにフィブリン層の内側では主に血小板による凝集塊が観察された。凝集塊の血小板相互の間には、電子密度がない隙間が目立って見られ、この中にやや形態は不整形なものの、直径 500 nm 以下で一部で二重膜をもつリポソームが存在することが観察された。この結果は、これまでの凍結超薄切片法およびレプリカ法の *in vitro* の実験により得られた血小板と H12-(ADP) リポソームの相互関係と良く似ていた。すなわち、今回 *in vivo* の実験で使用したウサギの止血時間は平均時間の 25 分よりも延長したにもかかわらず、H12-(ADP) リポソームが血小板血栓中に巻き込まれている所見は、生体中で減少状態にある血小板と混合することで、より大きな血小板血栓を形成し、止血に関与することを示唆している。

平成 26 年度

分担研究者の木下グループが、H12-(ADP) リポソームの前投与は、衝撃波による致死性肺出血マウスに対して救命効果があることを実験、証明してきた。そこで、本症例における H12-(ADP) リポソームの有効性解析のために電顕検索を行った。H12-(ADP) または (ADP) リポソームをマウス尾静脈に注入し、さらに右肺に対する衝撃波を照射したマウス肺を観察すると、肺胞中には多数の赤血球とフィブリンが観察され、さらに、毛細血管中には血小板凝集塊が見られた。この凝集塊中には H12-(ADP) リポソームも含まれていた。(ADP) リポソームでは延命効果がないこと、凝集塊中への巻

き込みも少ないことから、本効果は H12-(ADP) リポソームに特有な効果と考えられる。すなわち、H12 を介してリポソームは凝集塊に巻き込まれ、その局所で ADP を放出することが必須と考えられる。ADP は病変部で代謝され、アデノシン作用を示すことによって、延命効果を示すと考えられる。

E. 結論

平成 24 年度は *in vitro*、25 および 26 年度は *in vivo* における血小板と人工血小板 H12-(ADP) リポソームとの相互関係を形態的に検討した。24 年度は、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不明であったことから、リポソームの形態をより良く把握できる急速凍結切断エッチングレプリカ法で観察した。試料は固定および未固定試料を使用した。未固定試料では、血小板凝集に巻き込まれたリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示し、表面には固定試料の結果と同様に小孔が見られ、この穴から ADP が漏れ出る可能性を示した。25 年度は、ウサギを使った *in vivo* の実験で、低血小板肝臓出血モデルで血小板血栓に巻き込まれたリポソームを確認し、H12-(ADP) リポソームが血小板減少状態の生体の止血に関与することを示唆する結果を得た。26 年度は衝撃波に起因するマウス肺の変化に対する人工血小板注入効果の超微形態的検討を行った。すなわち、H12-(ADP) または (ADP) リポソームをマウス尾静脈から注入後、右肺に衝撃波を照射すると、右肺では肺出血が著明で、血小板凝集塊が肺胞血管内腔および肺胞に形成され、H12-(ADP) リポソームが巻き込まれていた。しかし、(ADP) リポソームの前投与では致死率が高いこと、凝集塊中への巻き込みも少ないことから、本傷害に対する H12-(ADP) リポソームの前投与有効であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

1) 萩沢康介, 木下学, 宮脇博基, 佐藤俊一, 鈴

- 木英紀, 土井麻美, 武岡真司, 小野聡, 斎藤大蔵, 西田育弘: 衝撃波による致死肺出血マウスに対する人工血小板 (H12-ADP-liposome) の救命効果. Shock 29 (2): 1-8, 2014.
2. 学会発表:
- 1) 鈴木英紀, 諸根信弘: ヒト血小板と人工血小板粒子の相互作用の解析 -急速凍結切断レプリカ法による検討-. 日本顕微鏡学会第 68 回 学術講演会. 2012. 5. 14-16, つくば
- 2) 鈴木英紀, 諸根信弘, 武岡真司, 池田康夫, 半田誠: ヒト血小板と人工血小板 (H12-ADP) リポソームの相互作用の形態解析. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会. 2013. 5. 30-6. 1, 山形市.
- 3) 鈴木英紀, 萩沢康介, 木下学, 武岡真司, 半田誠: 人工血小板/H12(ADP) リポソームの超微形態学的検討. 第 21 回日本血液代替物学会年次大会. 2014. 12. 8-9, 東京.
- 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

α IIb β 3 インテグリンと H12 担持リポソームの結合解析

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

H12 担持リポソーム (H12V) は、活性化血小板と結合することにより、その止血機能を増強する。したがって、H12V と血小板の結合を正確に測定することは、その止血作用を予測する上で不可欠であるばかりでなく、製剤の品質をモニターする上でも重要である。本研究では H12V と精製 α IIb β 3 の結合測定法の検討を行った。

これまでの研究から、血小板を用いた測定法は不確定要素が多く、再現性に欠くことが明らかになった。一方、血小板の代わりに α IIb β 3一過性発現細胞を用い、FACSにて蛍光標識H12Vの結合を測定する方法では、結合パラメータを測定することが可能であり、有用な測定法であることがわかった。しかし、1) 実験結果が使用する細胞の状態に大きく依存する、2) 実験ごとに使用する細胞の α IIb β 3発現量が異なる、3) 化学標識したH12Vを使用しなくてはならないなどの問題点も多いため、新たな測定法の確立が求められる。本研究では、これらの方法に代わる新たな測定法として、1) LigandTracerを用いた測定法、2) SPR法を用いた無細胞系の測定法を検討した。LigandTracerによる測定法は、リガンドの結合と解離の経時的な測定が可能なものの、培養細胞を用いる点、蛍光標識H12Vを必要とする点ではFACSによる測定法と何ら変わらない。一方、SPR法を用いた測定法は先に述べた問題点がほとんど無く、再現性の高い測定法と考えられる。この方法ではセンサーチップに α IIb β 3を固定化し、その上にH12Vを注入することによって結合をリアルタイムで測定する。当初、 α IIb β 3のソースとして α IIb β 3安定発現細胞の細胞膜を界面活性剤で可溶化したものを用いた。十分な量の α IIb β 3をセンサーチップに固定化することができたものの、 α IIb β 3を固定化したチップへのH12Vの結合は全く測定されず、抗 α IIb β 3モノクローナル抗体の結合も測定されなかった。精製の過程、特に界面活性剤の使用により α IIb β 3が変性したと考えられた。そこで細胞膜に留まらず細胞外に分泌される可溶性 α IIb β 3を作成し、界面活性剤を用いずに精製する方法を試みた。この可溶性 α IIb β 3は実際に培養液中に分泌され、アフィニティーカラムを用いて精製することが可能であった。量的な問題はあるが培養のスケールを増やすことにより克服可能であろう。今後はこの方法で精製した α IIb β 3を用い、SPR法によるH12V機能の測定法を完成させる予定である。

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H12V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進すると考えられる。フィブリノーゲン

と異なり、H12Vは α IIb β 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の共存下でも血小板と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。そのためには、H12Vの機能を評価する測定系の確立が不可欠である。

H12Vの止血機能は、血小板 α IIb β 3 インテグリンとの結合に依存していると考えられる。したがって、H12Vと α IIb β 3 インテグリンの結合親和性、結合動態を測定することは、H12Vの止血機能の予測に役立つばかりでなく、製剤の安定性を評価する上でも重要である。これまでの研究で示したように、H12Vと α IIb β 3 インテグリン結合の測定法には幾つかの方法が考えられる。

1) 血小板と H12V の結合を測定：この場合、H12Vを蛍光色素あるいは放射性アイソトープで標識し、血小板と混和した後に、結合したH12V量をFACSあるいは放射線測定機器で測定する。この方法は血小板をヒトから採取する段階から様々な不確定要因を抱えている。このため、再現性のある結果を得るのは非常に困難であり、測定系として妥当ではない。

2) α IIb β 3 発現細胞と H12V の結合を測定 (図 1 A)：この方法は、血小板の代わりにヒト遺伝子組み換え α IIb β 3 を大量発現した動物細胞を用いる。このため、血小板のように個人差や採取の過程で生じる影響を無視できる。しかし、CHO細胞に発現した α IIb β 3 は不活性であるため、H12Vとの結合を調べるためには、活性化モノクローナル抗体 PT25-2 を用いて、 α IIb β 3 そのものを活性化が必要がある。すなわち、実験結果が使用する PT25-2 の活性に依存することになる。また、

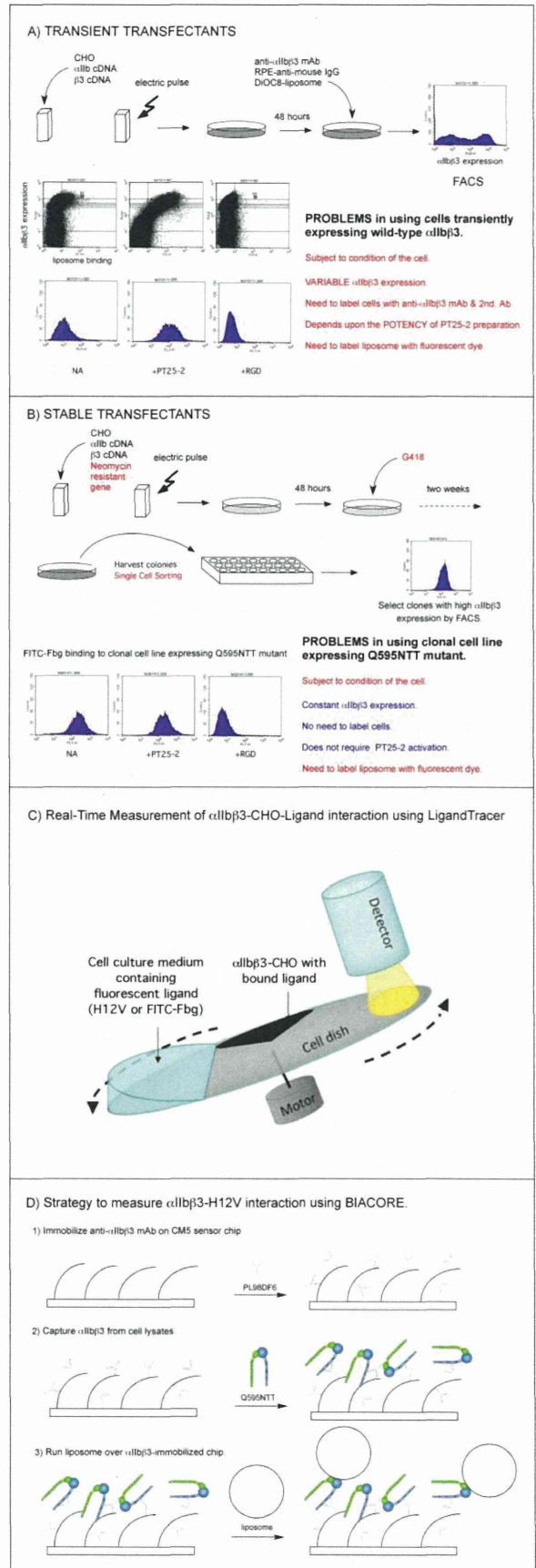


図 1. H12V の機能測定系

一過性発現系では、 α IIb β 3 の発現量を正確にコントロールできないため、測定ごとに α IIb β 3 の発現量を測定し、補正を加えなくてはならない。ここでも、何らかの方法で H12V を標識する必要がある。3) α IIb β 3 発現細胞株と H12V の結合を測定 (図 1 B) : 測定系は 2) と基本的には同じであるが、細胞は α IIb β 3 を安定発現した細胞株を用いるため、測定ごとに α IIb β 3 の発現を調べる必要がなく、複数の測定結果の比較も容易となる。この場合も PT25-2 を使用する必要があるが、これを回避する方法として、 α IIb β 3 の Q595NTT 変異体の使用が考えられる。これは、 α IIb β 3 の高次構造が extended の状態になるようにデザインされたものであり、常に高活性状態にあることが確認されている。この測定系の最大の問題点は、 α IIb β 3 を多量に発現した細胞株の作成が困難なことである。4) Ligand Tracer による α IIb β 3 発現細胞と H12V の結合測定 (図 1 C : この方法は、蛍光標識した H12V と α IIb β 3 発現細胞の結合を測定する。この測定法は FACS と異なり、ディッシュに接着した細胞と蛍光標識したリガンドの結合を経時的に測定する。このため結合親和性の他に結合速度定数の測定も可能である。5) SPR 法による α IIb β 3 と H12V の直接結合の測定 (図 1 D) : センサーチップ側に α IIb β 3 を固定化し、その上に H12V を注入することによって結合をリアルタイムで測定する。この場合、生きた細胞を使用せず、H12V の標識も不要であるため、測定に関わる不確定要素をほぼ排除することができる。

本研究では、H12V の機能の機能評価系として測定法 2)、3)、4)、5) の比較検討を行った。

B. 研究方法

I. α IIb β 3 変異体の作成

α IIb 鎖、 β 3 鎖の cDNA は Joseph C.

Loftus 博士 (Mayo 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 α IIb 変異体である Q595NTT の cDNA は site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。膜貫通ドメイン以降のアミノ酸配列を欠損した α IIb-960tr、 β 3-691tr は、 α IIb のアミノ酸残基 Glu-960、 β 3 のアミノ酸残基 Pro-691 に停止コドン導入することで作製した。C 末端側のアミノ酸残基 Leu-959 と、Pro-688 をそれぞれ Cys 残基に置換した α IIb-959C-960tr、 β 3-688C-691tr も site-directed mutagenesis 法により作成した。これらの変異と Q595NTT を組み合わせた α IIb-595N-960tr、 α IIb-595N-959C-960tr は、それぞれ α IIb-960tr、 α IIb-959C-960tr の BamHI 断片を Q595NTT の BamHI 断片と交換することで作成した。

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、CO₂ 濃度 5% の incubator で行った。50 μ g の α V 又は α IIb cDNA は 50 μ g の β 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。

III. α IIb β 3 を安定発現したクローン細胞の作成

50 μ g の α IIb cDNA、50 μ g の β 3 cDNA と共に 5 μ g の Neomycin resistant gene pFneo をトランスフェクトして 48 時間培養した後、700 μ g/ml の G418 を含んだ培養液でさらに 2-3 週間コロニーが形成されるまで培養した。コロニーを剥離した後、抗 α IIb β 3 抗体、二次抗体として RPE 標識抗マウス IgG と反応させ、single cell sorter にて α IIb β 3 発現量の高い細胞を一

個ずつ 96 穴プレートに採取した。700 $\mu\text{g/ml}$ の G418 を含んだ培養液でさらに 2-3 週間培養して細胞を増やした後、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の発現量を FACS にて測定して発現量の高い細胞を保存した。

IV. Flow Cytometry

細胞を剥離した後 1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} 加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10 $\mu\text{g/ml}$ 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^{2+} /1mM Mg^{2+} 加 HEPES-buffered saline (HBS) に再浮遊させ、FACS Calibur 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. ウェスタンブロッティング

可溶性 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ cDNA (αIIb -960tr/ β_3 -691tr、 αIIb -595N-960tr/ β_3 -691tr、 αIIb -959C-960tr/ β_3 -688C-691tr、 αIIb -595N-959C-960tr/ β_3 -688C-691tr) を CHO 細胞にトランスフェクトし、一定時間培養した後に培養液を回収して 4000rpm で 15 分遠心した。培養上清 10 μl を等量のサンプルバッファーと混合した後 96 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間加熱し、7.5% SDS-PAGE で泳動した。泳動したタンパクは PVDF 膜に転写した後、anti- β_3 mAb の VNR5-2 と反応させた。PVDF 膜を洗浄したのち HRP 標識抗マウス IgG と反応させた。抗体と結合したタンパクは SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate を用いて発光させ、フィルムに露光したのち現像した。

V. $\alpha\text{IIb}\beta_3$ のアフィニティー精製

$\alpha\text{IIb}\beta_3$ 発現細胞からの $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の精製は RGD カラムを使用して行った。製造元の方法に従い、NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) に GRGDS ペプチドを固定化した。Q595NTT 発現細

胞株#48 を T150 フラスコ 4 個分培養した後剥離し、界面活性剤 n-octylglucopyranoside を含む細胞溶解液 4ml で細胞を溶解した。遠心した後、可溶性画分を RGD-Sepharose Beads 5ml と 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。RGD-Sepharose Beads を洗浄・遠心したのち、結合した $\alpha\text{IIb}\beta_3$ を 5mM EDTA を含むバッファーにて溶出した。

可溶性 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の精製は、各培養上清 50ml を使用して行った。RGD-Sepharose Beads 5ml と 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させたのち RGD-Sepharose Beads を洗浄・遠心し、結合した $\alpha\text{IIb}\beta_3$ を 5mM EDTA を含むバッファーにて溶出した。

精製した $\alpha\text{IIb}\beta_3$ は SDS-PAGE にて展開し、ウェスタンブロット法で分子量の確認を行った。また、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の定量は BCA 法により行った。

VI. SPR 法による H12V と $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の結合測定

SPR 法による測定は、Biacore 2000 を用いて行った。まず、Sensor Chip CM5 に抗 αIIb モノクローナル抗体 PL98DF6、抗 β_3 モノクローナル抗体 VNR5-2 を固定化した。次に、Q595NTT 発現細胞株#48 を界面活性剤 n-octylglucopyranoside を含む細胞溶解液で溶解した後遠心し、可溶性画分を得た。これを、抗体を固定化した CM5 に注入し、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の捕捉を試みた。他の実験では、方法 V で精製した $\alpha\text{IIb}\beta_3$ を直接、あるいは抗 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 抗体を固定化したセンサーチップ CM5 上に流し固定化した。

H12V を、1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} 加 HBS に希釈し、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ を固定化した CM5 上に注入して結合を測定した。同様に、抗 β_3 モノクローナル抗体 VNR5-2、抗 αIIb モノクローナル抗体 PL98DF6 を希釈し、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 固定化 CM5 上に流して結合を測定した。

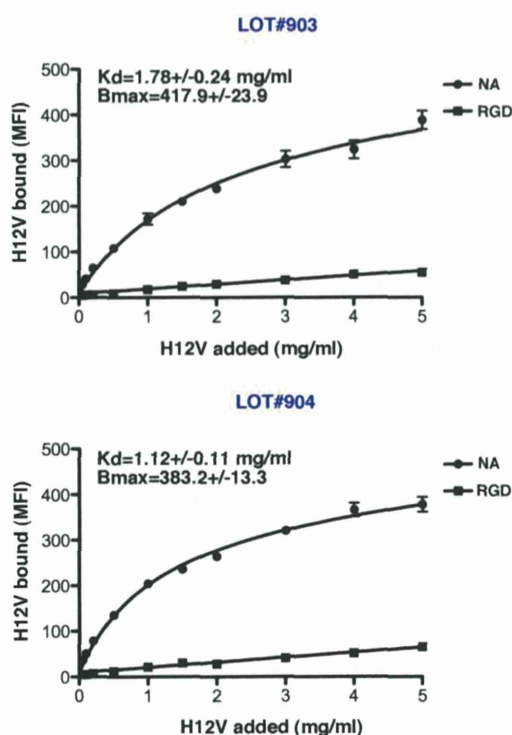


図 2. 高活性型 α IIb β 3 (Q595NTT) -CHO と H12-vesicle の結合

C. 研究結果

I. H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合解析: 一過性発現細胞を用いた解析

高活性型の Q595NTT 変異体を発現した細胞を用いて測定を行った。H12V は製造日時の異なる Lot#903 と #904 を使用した (平成 23 年度結果)。図 2 は蛍光色素 DiOC18 で標識した H12V と α IIb β 3-CHO 細胞の結合を FACS にて測定したものである。横軸は DiOC18 標識 H12V 濃度、縦軸は細胞への結合量 (平均蛍光強度 MFI) を示す。それぞれ総結合量と結合阻害剤である RGD ペプチド共存在下での非特異的結合を示した。Q595NTT 変異体は高活性型の α IIb β 3 を発現した細胞で、活性化抗体なしでもフィブリノーゲンを結合する。両 Lot とも PT25-2 非存在下で濃度依存性に Q595NTT 変異体発現細胞と結合した。結合の Kd 値はそれぞれ 1.78 ± 0.24 mg/ml、

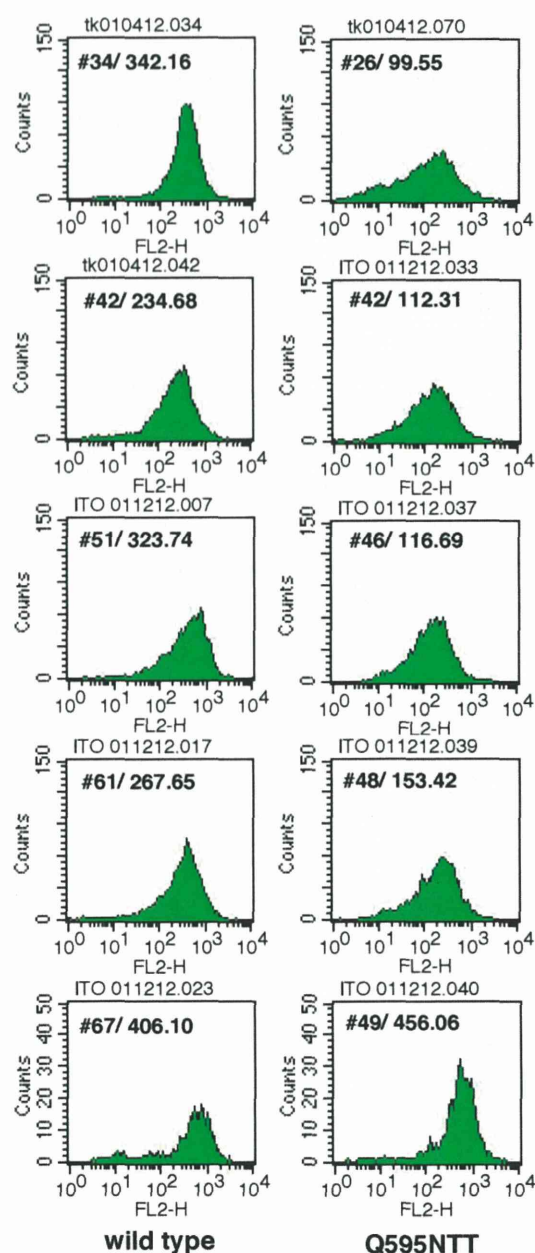


図 3. α IIb β 3 安定発現細胞株の FACS 解析

1.12 ± 0.11 mg/ml、Bmax 値はそれぞれ 417.9 ± 23.9 、 383.2 ± 13.3 であった。

II. α IIb β 3 安定発現細胞株の作成

野生型 α IIb β 3 と Q595NTT 変異体の安定発現細胞を single cell sorting して培養した結果、幾つかの細胞株を得ることができた (平成 23 年度研究結果より)。図 3 に

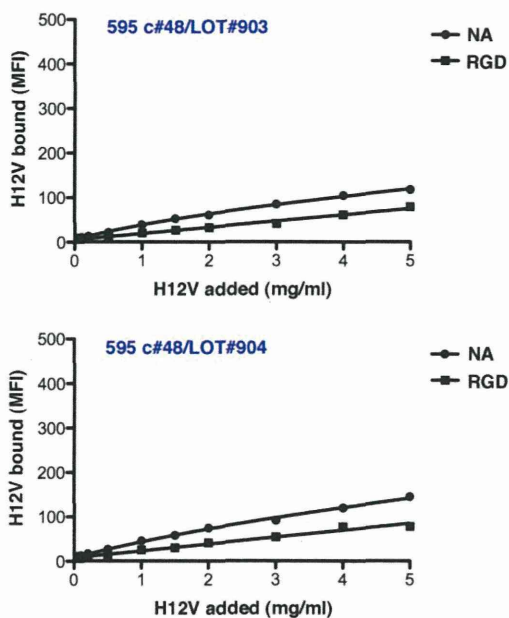


図4. α I**Ib** β 3 安定発現細胞株と H12-vesicle の結合

その発現を示す。何れもシングルピークのクローンが得られた。しかし、Q595NTT クローンの発現量は野生型に比べて有意に低く、#49 を除き MFI < 200 であった。Q595NTT#49 の発現量は MFI > 400 と高かったが、増殖が非常に遅く実際の使用には適さなかった。以上の理由から、本研究では Q595NTT#48 を使用した。

III. H12-vesicle と α I**Ib** β 3-CHO の結合: 安定発現細胞を用いた解析

野生型 α I**Ib** β 3 と Q595NTT 変異体の安定発現細胞を single cell sorting した結果、幾つかの細胞株を得ることができた。何れもシングルピークのクローンが得られたが発現は低く、特に Q595NTT クローンの発現は一部を除き、MFI < 200 であった。図4は Q595NTT#48 と H12V Lot#903、Lot#904 の結合を調べたものである（平成23年度結果）。Q595NTT#48 への結合は PT25-2 非存在下で用量依存性に増加したものの、5 mg/ml で飽和傾向を認めず、10 mg/ml の高濃度でも飽和することはなかった（データ記載せず）。

IV. LigandTracer を用いた α I**Ib** β 3-CHO と FITC 標識フィブリノーゲンの結合測定

α I**Ib** β 3-CHO とリガンドの結合を測定する第二の方法として、LigandTracer を用いた測定法を検討した。この方法は、蛍光標識したリガンドと α I**Ib** β 3 発現細胞の結合を測定する点では、前述した FACS と同じである。しかし、FACS では同一の細胞で単一濃度のリガンドの結合しか測定でき

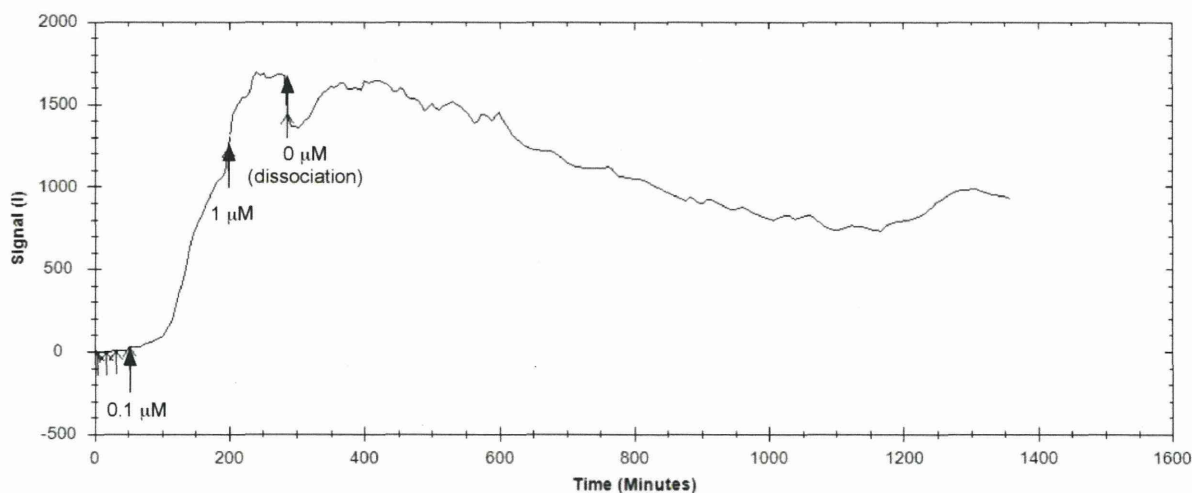


図5. LigandTracer による α I**Ib** β 3-CHO と FITC 標識 Fbg の結合

ないのに対し、LigandTracer では複数の異なった濃度のリガンドの結合の測定が経時的に行える。すなわち、結合の親和性だけでなく、結合・解離の速度定数も測定可能である。今回はリガンドとしてH12Vではなく FITC 標識フィブリノーゲンを使用

し、この測定法の基礎的検討を行った。使用した細胞は、Q595NTT 変異体を安定発現したクローン#48 である。図 1 C に示したように細胞培養ディッシュの一部に細胞を接着させ、2ml の細胞培養液に異なる濃度の FITC 標識フィブリノーゲンを加えて

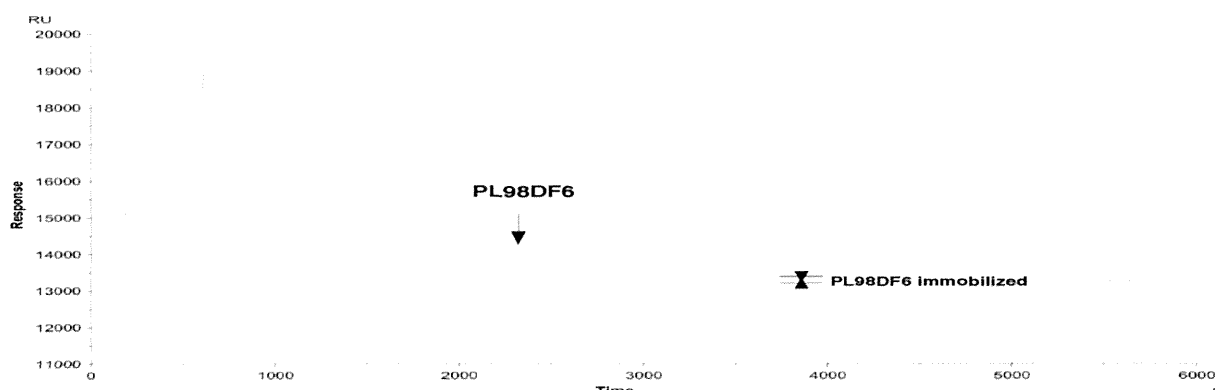


図 6. 抗 α I**b** 抗体 PL98DF6 の固定化

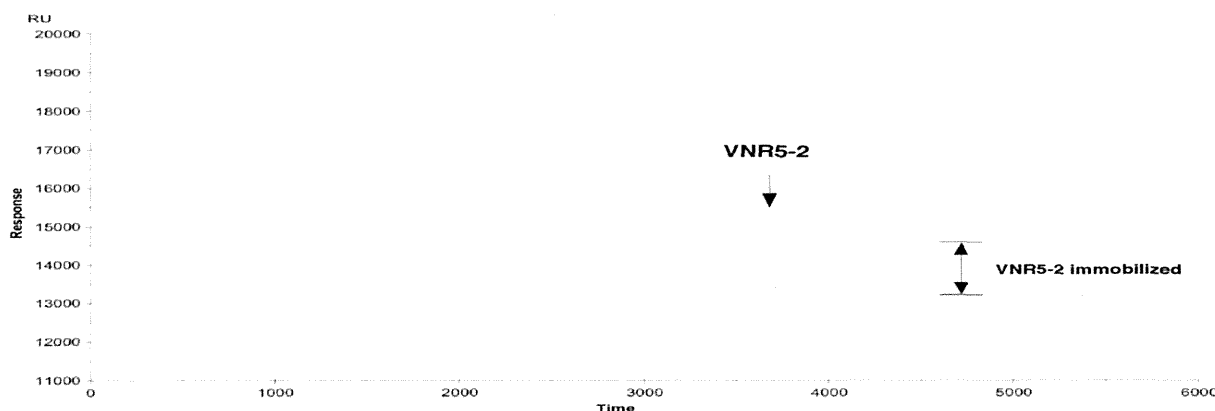


図 7. 抗 β 3 抗体 VNR5-2 の固定化

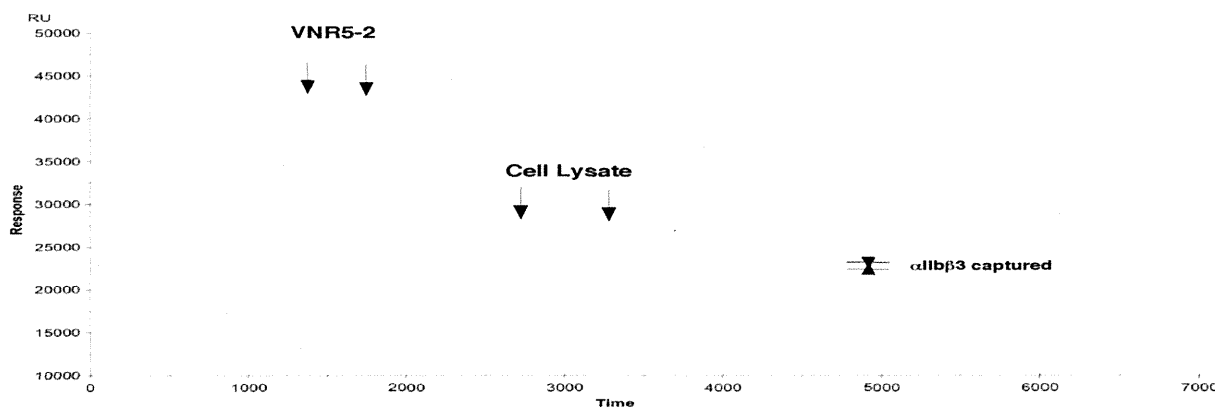


図 8. 細胞溶解液からの α I**b** β 3 の捕捉