

原 著

In vitro におけるヘモグロビン小胞体の血小板活性化に対する影響

若本志乃舞¹⁾ 藤原 満博¹⁾ 阿部 英樹¹⁾ 山口 美樹¹⁾
武岡 真司²⁾ 土田 英俊²⁾ 東 寛¹⁾ 池田 久實¹⁾

¹⁾北海道赤十字血液センター

²⁾早稲田大学理工学総合研究センター

(平成 15 年 3 月 20 日受付)

(平成 15 年 7 月 29 日受理)

EFFECT OF HEMOGLOBIN VESICLES ON AGONIST-INDUCED PLATELET ACTIVATION IN VITRO

Shinobu Wakamoto¹⁾, Mitsuhiro Fujihara¹⁾, Hideki Abe¹⁾, Miki Yamaguchi¹⁾, Shinji Takeoka²⁾,
Eishun Tsuchida²⁾, Hiroshi Azuma¹⁾ and Hisami Ikeda¹⁾

¹⁾Hokkaido Red Cross Blood Center,

²⁾Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute for Science and
Engineering, Waseda University

Hemoglobin vesicles (HbV) a type of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) have been recently developed as an artificial oxygen carrier. The efficacy of HbV has been demonstrated in the transfusion of HbV into rodent models of hemorrhagic shock. It is important to evaluate the compatibility of HbV with human blood cells. We examined the effects of HbV on human platelet activation in vitro by estimating the platelet release reaction and expression of platelet surface activation markers in the presence or absence of agonists. HbV concentration in the reaction volume was prepared at 20% or 40%. Preincubation of platelet-rich plasma (PRP) with HbV had no adverse effects on RANTES or serotonin release from platelets. Preincubation of whole blood with HbV also had no effects on exposure of P-selectin on platelets. However, binding of PAC-1, a monoclonal antibody that detects the activation-dependent conformational change of $\alpha_{IIb}\beta_3$ to platelets, was amplified by preincubation of whole blood with HbV in the presence of relatively low concentration of ADP. These results suggest that HbV enhances the binding of PAC-1 to platelets. The clinical meaning of this increased binding of PAC-1 needs to be addressed.

Key words : Hemoglobin vesicles (HbV) RANTES, serotonin, P-selectin, PAC-1

はじめに

赤血球製剤の人工代替物として人工酸素運搬体の開発が行われている。人工酸素運搬体の臨床応用において考えられる利点は輸血時の血液型判定の必要がないこと、製剤の長期保存が可能となること、同種抗原感作や細菌感染およびウイルス感染の伝播を回避できること等があげられる¹⁾。

ヘモグロビン小胞体 (HbV) は人工酸素運搬体の一つとして開発された粒子径約 200~250nm の liposome 内包型 Hb である²⁾⁻⁴⁾。liposome 内包型 Hb とは細胞膜を模擬して人工的に作成した脂質二重膜からなる小胞体 (liposome) の中に Hb を内包したタイプの人工酸素運搬体の総称である。HbV の臨床応用を考えるうえで、その生体適合性

を評価することが重要である。これまで出血性ショックの動物モデルへの輸注において HbV の酸素運搬体としての有効性が示されているが、一方で副作用が観察されることがある⁵⁾⁻⁷⁾。その重篤な症状の一つとして急性血小板減少が報告されている。この急性血小板減少の発生原因を解明するため、*in vitro* において HbV とげっ歯類の血小板との結合に関して研究がなされてきた^{7,8)}。その結果、HbV の構成成分である負電荷の liposome はラット多血小板血漿 (PRP) とのインキュベーションにより血漿中の補体成分 C3b に覆われ、C3b を介した liposome-C3b-血小板上 CR1 receptor の結合による凝集塊が形成されることが報告されている。*in vivo* ではこの凝集塊が速やかに網内系によって処理されることが急性血小板減少の原因と考えられている⁸⁾。一方、ヒト血小板上には CR1 receptor が存在しないため、liposome と血小板との凝集塊は観察されない⁹⁾。従ってヒトにおいては動物モデルで観察される liposome 輸注後の急性血小板減少は発症しないことが推測される。しかし、HbV がヒト血小板機能に対して影響を与えるかどうかに関する報告は少なく、血小板減少以外の副作用発症の可能性を否定することはできない。

近年、血小板は止血血栓の形成のみならず、炎症反応にも関与していると考えられている。これは血小板がその顆粒に種々の炎症性生理活性物質を含有していることや血小板膜表面の接着分子を介して白血球と結合し、相互作用を有するためである⁹⁾。従って HbV の投与により生体内で血小板が活性化したり、あるいはアゴニストによる反応を過剰に亢進させたりすると、血小板由来生理活性物質の放出による炎症反応が惹起される可能性が考えられる。そこで、今回、HbV のヒト血小板活性化に対する影響を検討した。HbV の濃度は臨床での使用が想定される 20% および 40% とした。血小板活性化の評価は HbV 20%、40% 存在下では濁度法での凝集能の測定が不可能であるため、血小板の α 顆粒に存在する炎症性ケモカイン、RANTES (regulated on secretion, normal T-cell expressed and secreted) および濃染顆粒に

存在する serotonin の放出反応と血小板膜糖蛋白 (α IIb β 3) の構造変化を認識する抗体、PAC-1 の結合および α 顆粒由来の CD62P の発現解析を指標とした。

材料と方法

1. HbV の調製

HbV の脂質成分として 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine/cholesterol, 1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid/polyethyleneglycol-1,2-distearyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine を 5/5/1/0.033 モル比で混合し、エクストルージョン法で HbV を調製した。

2. RANTES および serotonin の放出反応

全血(クエン酸三ナトリウム加)から PRP を採取した。血小板浮遊液 (PRP: 1.7×10^8 /ml) と HbV (0, 20, 40%) を 37℃, 60 分間プレインキュベーションした後、collagen ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (NYCOMED ARZNEIMITTEL GMBH) または collagen 希釈用 buffer を添加して 5 分間のインキュベーションを行った。反応後上清を採取し、RANTES および serotonin の濃度を ELISA kit (RANTES: R & D system, serotonin: ICN) にて測定した。

3. PAC-1 および CD62P の発現

PAC-1 および CD62P の発現の測定は幸村ら¹⁰⁾ および Hagberg ら¹¹⁾ の方法に準じた。

全血(クエン酸三ナトリウム加)と HbV または Hb を含有しない空小胞体 (0, 20, 40%) を 37℃, 60 分間にてインキュベーションした。その混合液を HEPES Tyrode's buffer (KCl 2mM, NaCl 127 mM, NaH_2PO_4 0.5mM, glucose 5.6mM, NaHCO_3 12mM, HEPES 5mM, 0.35% BSA, pH7.3) にて 5.4 倍に希釈した。

FITC 標識 PAC-1, PE 標識 CD62P, PerCP 標識 CD42a (以上 BD 社) のカクテル $18 \mu\text{l}$ に上記の混合液 $18 \mu\text{l}$ と ADP (最終濃度 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 μM (SIGMA) $4 \mu\text{l}$ を添加し、ピペティングで混合した。各抗体の陰性 control として FITC 標識マウス IgM, PE 標識マウス IgG, PerCP 標識マウス IgG (以上 BD 社) を用いた。20 分間、室温、暗所で反応後、1% パラホルムアルデヒド $500 \mu\text{l}$ を添加して固定した。固定後、PBS 1ml を添加し

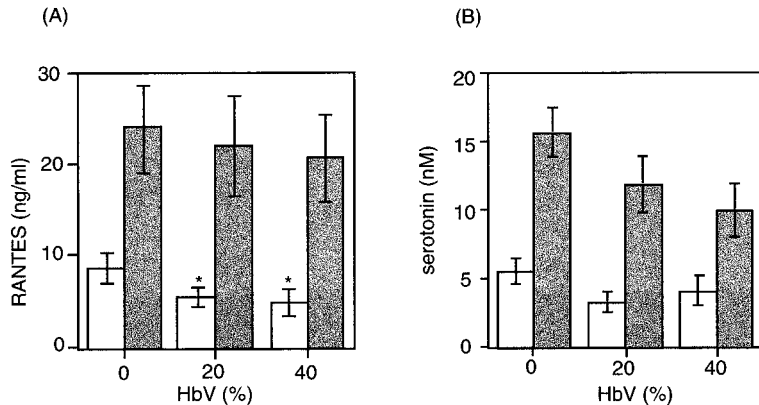


Fig. 1 Effect of HbV on platelet mediator release

Values are means \pm SE of five donors. RANTES (A) and serotonin (B) release from platelets. Open columns are non-stimulated PRP and hatched columns are collagen-stimulated PRP after incubation with various concentrations of HbV as described in Materials and Methods. * $p < 0.05$, in comparison with control (0% of HbV)

て遠心し(2,500rpm, 5min), PBSに再浮遊した。

フローサイトメトリーにて scatter gram 上で血小板高密度領域にゲートを設定し,更に CD42a 陽性細胞をゲートして PAC-1 および CD62P 陽性細胞率を測定した。フローサイトメーターは BD 社 LSR を使用し,解析は Cell Quest software (BD 社)にて行った。

4. 統計学的解析

HbV または空小胞体 0%, 20%, 40% の 3 群間の有意差検定には two-way Repeated Measures ANOVA を用いた。この検定により 3 群間に有意差がみられた場合, HbV または空小胞体 0% と 20% 及び 40% との有意差検定は Bonferroni correction によって行った。なお,有意差水準は $p < 0.05$ (HbV または空小胞体 0% vs 20%, 40%) を用いた。

結 果

1. 血小板の放出反応に対する HbV の影響

PRP と HbV (0, 20, 40%) を 37, 60 分間プレインキュベーションした後, collagen 刺激の有無における反応上清中の RANTES および serotonin 濃度を測定した (Fig. 1)。collagen 無添加の血小板からの RANTES の放出レベルは 20% および 40% HbV とのプレインキュベーションに

よって, control (HbV 0%) に比較して僅かではあるが,有意な減少がみられた。一方, collagen 刺激によって反応上清中の RANTES レベルは増加したが, HbV とのプレインキュベーションによる有意な差はみられなかった (Fig. 1A)。血小板からの serotonin の放出レベルは PRP と HbV とのプレインキュベーションにより, collagen 刺激下において control (HbV 0%) よりも低い傾向がみられたが,有意差はなかった。また, collagen 無添加の場合の反応上清中の serotonin レベルにおいても, HbV とのプレインキュベーションの影響はみられなかった (Fig. 1B)。

2. 血小板の PAC-1 および CD62P の発現に対する HbV の影響

全血と HbV (0, 20, 40%) を 37, 60 分間プレインキュベーションした後の ADP 刺激による血小板の PAC-1 および CD62P の発現を Fig. 2 に示す。PAC-1 陽性血小板の割合は ADP 濃度 (0~10 μ M) に依存して増加した。全血と 20% および 40% HbV のプレインキュベーションによって ADP による PAC-1 の発現が亢進し, ADP 0.1 μ M および 0.5 μ M 条件下では control (HbV 0%) に比し,有意となった (Fig. 2A)。一方, PAC-1 と同様,血小板の CD62P の発現も ADP 濃度 (0~10

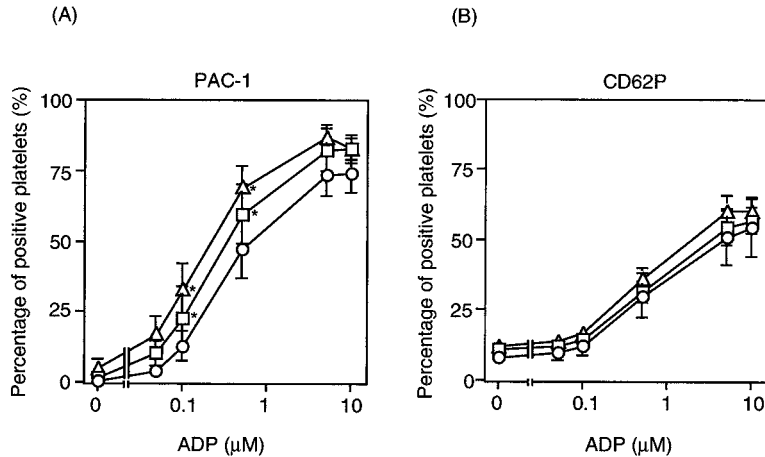


Fig. 2 Effect of HbV on expression of platelet surface activation markers
Values are means \pm SE of three donors. PAC-1 (A) and CD62P (B) exposure on platelets. Whole blood was incubated with HbV at 0% (circle) 20% (square) or 40% (triangle). Whole blood was then stimulated with or without various concentrations of ADP as described in Materials and Methods. * $p < 0.05$, in comparison with control (0% of HbV)

μM)に依存して増加したが、ADPによるCD62Pの発現の増加に対する20%および40% HbVのプレインキュベーションの影響はみられなかった (Fig. 2B)。

3. 血小板のPAC-1およびCD62Pの発現に対するHbを含有しない空小胞体の影響

全血とHbVとのプレインキュベーションによってみられたPAC-1の発現の増加がHbを含有していない空小胞体の構成脂質に起因するかを検討する目的で、全血と空小胞体(0, 20, 40%)を37, 60分間プレインキュベーションし、ADP刺激による血小板のPAC-1およびCD62Pの発現を測定した (Fig. 3)。ADPによるPAC-1の発現は全血と空小胞体とのプレインキュベーションにより亢進が認められ、ADP 0.1 μM および 0.5 μM 条件下ではcontrolに比し、有意となった (Fig. 3A)。しかし、ADP刺激による血小板のCD62Pの発現に対する空小胞体のプレインキュベーションの影響はみられなかった (Fig. 3B)。

考 察

人工酸素運搬体の一つとして開発されたHbVの生体適合性の評価として、HbVの血小板由来生

理活性物質、RANTES及びserotoninの放出反応と血小板活性化マーカーであるCD62P及びPAC-1の発現に対する影響を検討した。

RANTESは血小板の α 顆粒に存在する炎症性ケモカインで、好塩基球、好酸球、単球及びリンパ球に対する強力な走化作用を有する⁹⁾¹²⁾。また、serotoninは血小板の濃染顆粒に存在する生理活性アミンで、血管収縮作用をはじめ繊維芽細胞増殖作用、マクロファージの活性酸素産生促進作用、NK細胞活性化促進作用を有する⁹⁾。このような生理活性を有することからいずれも炎症反応において重要な役割をはたしていると考えられている。20%及び40% HbVと血小板とのプレインキュベーションによってcollagen刺激、あるいは未刺激血小板のRANTES及びserotoninの放出反応を亢進したり、また、著しく減少させるような作用はみられなかった。従ってHbVの生体適合性は血小板放出反応を指標とした場合には良好であることが示唆された。

近年、血小板活性化に伴って膜表面の発現量が変化する抗原をフローサイトメトリーによって捉え、血小板活性化の程度を評価する方法が広く行

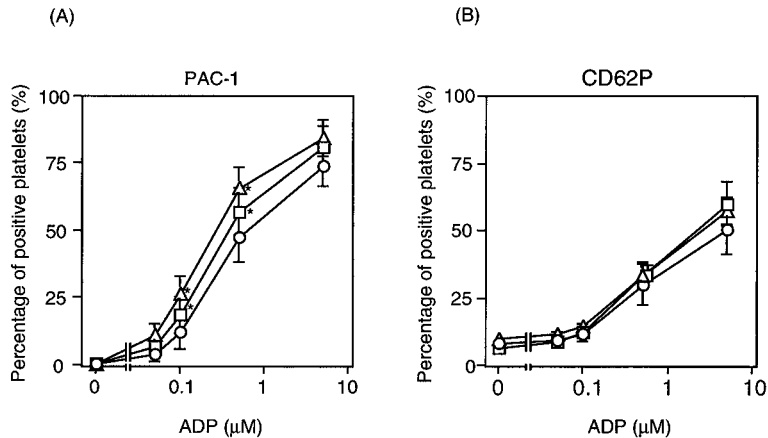


Fig. 3 Effect of vesicles on expression of platelet surface activation markers
Values are means \pm SE of three donors. PAC-1 (A) and CD62P (B) exposure on platelets. Whole blood was incubated with empty liposomes at 0% (circle), 20% (square), or 40% (triangle). Whole blood was then stimulated with or without various concentrations of ADP as described in Materials and Methods. * $p < 0.05$, in comparison with control (0% of HbV)

われている。CD62Pはセレクチンファミリーに属する接着分子である⁹⁾。血小板の α 顆粒に存在し、血小板活性化にともなって膜表面に分布するため、血小板活性化マーカーとして汎用されている¹¹⁾³³⁾。PAC-1は血小板上の α IIb β 3(GPIIb-IIIa, CD41/CD61)が血小板活性化にともなって構造変化を起こした時に発現するエピトープを認識するモノクローナル抗体である¹⁰⁾¹¹⁾³⁴⁾。 α IIb β 3はインテグリンファミリーに属する接着分子であり、血小板においてフィブリノーゲンや von Willbrand 因子のレセプターとして機能し、血小板凝集や粘着に重要な分子である¹⁵⁾。PAC-1が認識するエピトープはフィブリノーゲンの結合部位またはその近辺とされている¹⁰⁾¹¹⁾³⁴⁾。PAC-1発現の臨床的意義についての検討は少ないが、低濃度のADP刺激によっても発現の増加がみられることから高感度でかつ特異的な血小板活性化マーカーとして有用であるとされている。

今回の検討において、HbVと血小板のプレインキュベーションは、ADP刺激および未刺激血小板のいずれにおいてもCD62Pの発現に影響を与えなかった。一方、PAC-1の発現はHbVとのプレ

インキュベーションにより比較的低濃度のADP刺激血小板において亢進された。PAC-1の発現の亢進は空小胞体と血小板のプレインキュベーションにおいても観察されたため、Hb包埋の有無にはよらず、小胞体それ自体または、小胞体の構成成分に起因する可能性が考えられる。この結果はHbVの構成成分である小胞体は血小板の α IIb β 3の構造変化を促進するが、 α 顆粒の内容物の膜表面への表出を亢進する作用はないことを示唆している。小胞体の作用に対してPAC-1の発現とCD62Pの発現に乖離がみられたことの原因は明らかではないが、原因の一つにはPAC-1とCD62Pとではそれぞれの発現を惹起する刺激の閾値が異なることが考えられる。PAC-1は低濃度(0.1 μ M)のADP刺激によっても発現の増加がみられるがCD62Pはそれよりも高濃度(0.5 μ M)のADP刺激において発現の増加がみとめられる(Fig. 2, 3)。このことからPAC-1は弱い刺激においても血小板の活性化をとらえるが、CD62Pは比較的強い刺激に対する血小板の活性化を反映することが考えられる。従って、血小板に対する小胞体の作用は比較的弱い刺激であり、活性化マ

カーとして PAC-1 を用いた場合には捉えられるが, CD62P によっては捉えられない刺激であると推測される。

最近, 西谷らは血小板代替物 (recombinant 血小板膜糖蛋白を固相化した liposome) の血小板への影響を検討した報告において, 何も固相化していない空小胞体のみでも血小板の小凝集塊が形成されたこと, またその時に大凝集塊は形成されなかったと述べている¹⁶⁾。彼らの使用した小胞体と今回我々が使用した小胞体は同一ではなく, また, 反応系における濃度も異なるが, 彼らの結果からも小胞体はなんらかの血小板活性化作用を有することが示唆される。詳細については今後の検討が必要である。

HbV と全血のインキュベーションにより血小板の PAC-1 の発現が亢進されたことの臨床的意義は不明である。この反応を非生理的な血小板活性化と捉えると, 生体内で HbV は炎症反応を惹起する可能性が懸念される。しかし, 本来, 生理的な酸素運搬体である赤血球はアゴニスト存在下において血小板活性化亢進作用を有することが知られている¹⁷⁾¹⁸⁾。すなわち, *in vitro* で PRP と赤血球 (ヘマトクリット 40%) をインキュベーションした混合細胞浮遊液を collagen で刺激すると, 反応上清中の serotonin 及び β -TG の濃度は PRP 単独の場合よりも高いこと, またその反応上清は PAC-1, CD62P の発現及び血小板凝集を惹起し, いずれの反応も PRP 単独の反応上清による血小板活性化よりも亢進されることが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。これらの反応は赤血球本来の作用である酸素運搬能に加え, 生体内の出血部位において止血・血栓の形成が速やかに行われるうえで生理的に重要と考えられている。このことから, 我々が観察した HbV を構成している小胞体による血小板活性化現象の臨床的意義は, 生体にとって有害ではなく, 赤血球本来のもつ生理活性に類似していると考えられるかもしれない。いずれにしても, HbV による血小板の活性化機序とその生理的な意味づけを明確にするには検討症例数を増やした更なる解析が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 高折益彦: 赤血球代替物の臨床応用を目指して. 人工赤血球, 8(4): 85-89, 2000.
- 2) Tsuchida, E., Takeoka, S.: Stabilized hemoglobin vesicles. Artificial Red, Cells. (E. Tsuchida, Ed) pp35-64, Wiley, New York.
- 3) Sakai, H., Takeoka, S., Park, S.I., Kose, T., Nishide, H., Izumi, Y., Yoshizu, A., Kobayashi, K., Tsuchida, E.: Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. Bioconjugate Chem, 8(1): 23-30, 1997.
- 4) Yoshioka, H.: Surface modification of haemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. Biomaterials, 12(9): 861-864, 1991.
- 5) Rabinovici, R., Rudolph, A.S., Feuerstein, G.: Characterization of hemodynamic, hematologic, and biochemical responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin in the conscious, freely moving rat. Circ, Shock, 29(2): 115-132, 1989.
- 6) Izumi, Y., Sakai, H., Hamada, K., Takeoka, S., Yamahata, T., Kato R, Nishide, H., Tsuchida, E., Kobayashi, K.: Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. Crit. Care. Med., 24(11): 1869-1873, 1996.
- 7) Phillips, W.T., Klipper, R., Fresne, D., Rudolph, A.S., Javors, M., Goins, B.: Platelet reactivity with liposome-encapsulated hemoglobin in the rat. Exp. Hematol, 25(13): 1347-1356, 1997.
- 8) Loughrey, H.C., Bally, M.B., Reinish, L.W., Cullis, P.R.: The binding of phosphatidylglycerol (PG) liposomes to rat platelets is mediated by complement. Thromb. Haemost, 64(1): 172-176, 1990.
- 9) Klinger, M.H.F.: Platelets and inflammation. Anat. Embryol., 196(1): 1-11, 1997.
- 10) 幸村 近, 林 由紀子, 池田久實: フローサイトメトリーを用いた活性化血小板の検出法. 臨床病理, 47(5): 447-452, 1999.
- 11) Hagberg, I.A., Lyberg, T.: Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. Platelets, 11(3): 151-160, 2000.
- 12) Baggiolini, M., Dahinden, C.A.: CC chemokines in allergic inflammation. Immunol, Today, 15(3): 127-133, 1994.

- 13) Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., Bainton, D.F. : A platelet alpha-granule membrane protein(GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Cell Biol.*, 101(3) : 880 - 886, 1985.
- 14) Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M., Brass, L. F. : Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb•IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.*, 260(20) : 11107 - 11114, 1985.
- 15) Hynes, R.O. : Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69(1) : 11 - 25, 1992.
- 16) Nishiya, T., Kainoh, M., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y. : Platelet interactions with liposomes carrying recombinant platelet membrane glycoproteins or fibrinogen : approach to platelet substitutes. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, 29(6) : 453 - 464, 2001.
- 17) Santos, M.T., Valles, J., Marcus, A.J., Safier, L.B., Broekman, M.J., Islam, N., Ullman, H.L., Eiroa, A. M., Azner, J. : Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes : a new approach to platelet activation and recruitment. *J. Clin. Invest.*, 87 : 571 - 580, 1991.
- 18) Valles, J., Santos, M.T., Aznar, J., Martinez, M., Moscardo, A., Pinon, M., Broekman, M.J., Marcus, A.J. : Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb) beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment : down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood*, 99(11) : 3978 - 3984, 2002.
-