

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 318093

(P2001 - 318093A)

(43)公開日 平成13年11月16日(2001.11.16)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 6 3
45/00		45/00	4 B 0 6 4
A 6 1 P 9/10	101	A 6 1 P 9/10	101 4 C 0 8 4
29/00		29/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 14数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 136496(P2000 - 136496)

(22)出願日 平成12年5月9日(2000.5.9)

(71)出願人 899000079

学校法人 慶應義塾

東京都港区三田2丁目15番45号

(72)発明者 末松 誠

東京都新宿区大京町20 - 4 - 208

(72)発明者 半田 誠

東京都渋谷区神宮前3 - 38 - 16

(72)発明者 池田 康夫

東京都文京区小石川3 - 17 - 20

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血小板 G P I b の機能抑制物質を有効成分とする抗炎症剤

(57)【要約】

【課題】 白血球の血管への接着に起因する炎症性疾患を抑制することができる抗炎症剤を、インビボでスクリーニングする方法を提供すること。

【解決手段】 ラットに内毒素を投与して炎症反応を生じせしめると同時又はその前後に被検物質を投与するか、あるいは、炎症反応を常態で示す非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、インビボにおける血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着状態を、白血球回転速度 (V w) と赤血球速度 (V r) との比 (V w / V r) で求められる接着エネルギーを指標として評価し、血小板上に発現する糖タンパク質 G P I b の機能を抑制する抗炎症性物質をスクリーニングする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非ヒト哺乳動物に炎症反応を生じせしめると同時又はその前後に被検物質を投与するか、あるいは、炎症反応を常態で示す非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、インビボにおける血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着状態を検出・評価することを特徴とする血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法。

【請求項2】 エンドトキシンを投与して炎症反応を生じせしめることを特徴とする請求項1記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法。

【請求項3】 血小板として、CFSEで標識化された血小板を用いることを特徴とする請求項1又は2記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法。

【請求項4】 接着状態の検出・評価が、血管内の白血球回転速度(Vw)と赤血球速度(Vr)との比(Vw/Vr)で求められる接着エネルギーを指標とした検出評価であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法。

【請求項5】 投与が静脈内投与であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法。

【請求項6】 血管内皮細胞が後毛細血管細静脈であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法。

【請求項7】 非ヒト哺乳動物がラットであることを特徴とする血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質。

【請求項9】 血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションの変化を生じさせる物質であることを特徴とする請求項8記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質。

【請求項10】 GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項9記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質。

*【請求項11】 GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションと相互作用するペプチドであることを特徴とする請求項9記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質。

【請求項12】 請求項1～7のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法により得られる抗炎症性物質を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項13】 抗炎症性物質が、血小板上に発現する糖タンパク質GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションの変化を生じさせる物質であることを特徴とする請求項12記載の医薬組成物。

【請求項14】 GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項13記載の医薬組成物。

【請求項15】 モノクローナル抗体が、抗GPIIbモノクローナル抗体GUR83/35であることを特徴とする請求項14記載の医薬組成物。

【請求項16】 GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションと相互作用するペプチドであることを特徴とする請求項13記載の医薬組成物。

【請求項17】 抗炎症性物質が、動脈硬化、播種性血管内凝固症候群、多臓器不全、又は自己免疫疾患に対する抗炎症作用を有する物質であることを特徴とする請求項12～16のいずれか記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法や、該スクリーニング方法により得られる前記糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する新規物質や、前記スクリーニング方法により得られる抗炎症性物質を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】血液中に存在する直径1～2μmの無核の細胞として知られている血小板は、正常な状態においては、微小血管内皮細胞に非常に接近しながらも接着せずに循環すると考えられており、コラーゲンのような血小板活性化内皮物質に曝されなければ、負傷領域に接着することも、活性化させられることもないと考えられてきた(Lab Invest. 42, 366-374, 1980)。初期接着段

階において、血小板は、種々のメディエータを放出し、他の血小板を活性化することが知られており (Thromb Haemost. 78, 611-616, 1997)、初期に接着した血小板層が、安定した血栓形成性表面を形成すると、メディエータ誘導による血小板同士の相互作用により止血性血栓が発達することも知られている (Thromb Haemost. 78, 611-616, 1997)。

【0003】血小板の凝集に必要な接着分子の一つであるグリコプロテイン (GP) I b は、未刺激の血小板上に発現する糖タンパク質であり、この分子のレセプターの一つがフォンビルブラント因子 (vWF) であることが知られている。本発明者らの一人である池田らは、血小板が局所血流により生じるズリ応力を感じて一次凝集を起こすことを見出し、そのメカニズムとして GP I b と vWF の結合が重要であることを明らかにしており (Ikeda, et al. J. Clin. Invest. 87, 1234-1240, 1991)、このことから GP I b は生体における止血機序や血栓形成に重要な役割を果たすことが広く認められている。

【0004】一方、本発明者らの一人である半田らは、ヒト GP I b を認識するモノクローナル抗体を作製し、その中から vWF との結合を阻害する抗体である GUR 83 / 35 を見出し出している (Moriki, T., et al.; Blood 90, 698-705, 1997, Asazuma, N., et al.; Blood 90, 4789-4798, 1997)。この抗体はリストセチン (ristocetin) による GP I b のコンフォメーション変化を介して起こる血小板の凝集を特異的に制御し、本分子の N 末端から 1 ~ 302 アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープ (epitope) を認識することが報告されている。また最近、Gombart らは、白血球の接着分子の一つである Mac-1 (CD11b/CD18) がトランスフェクトされた 293 細胞が、固相化された GP I b に結合能を有することを報告 (Blood, Vol. 94, supplement 1, 369a, 1999) している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】多くのヒト炎症性疾患のうち、白血球の血管への接着反応は臓器障害の程度を決定する重要な因子であり、この白血球接着反応が憎悪すると考えられている疾患としては、動脈硬化、播種性血管内凝固症候群 (DIC)、多臓器不全 (MOF) などが挙げられる。また、自己免疫疾患では血小板を介したリンパ球の血管への接着が臓器障害の増悪因子となることが実験的に示されている。従って血小板の活性化を阻害する薬剤はこのような白血球を抑制する効果を持つ場合があり、ホスフォジエステラーゼ (phosphodiesterase) 阻害剤や抗トロンビン (thrombin) 剤などはその典型例といえる。しかしこれらの薬剤は、白血球接着の阻害活性を生体内で得るためには、通常、血小板凝集抑制に必要な量よりも大量の用量が必要とされ、出血傾向を助長させるリスクがあり、新しい治療ターゲットの創

出が待たれていた。本発明の課題は、白血球の血管への接着に起因する炎症性疾患を抑制することができる抗炎症剤を、インビボでスクリーニングする方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】インビボにおける、傍内皮空間に沿って流れる血小板の密度分布又は速度分布についての詳細な知識は、トロンボゲン発生の初期段階のメカニズム、及びその結果生じる白血球接着を伴う炎症反応を理解する上で重要である。第一に、局所における血小板の密度の測定により、局所血小板搬送速度を予測することができる。第二に、傍内皮血小板の速度分布分析により、病的状態における血小板及び内皮細胞間の接着力変化を予測することが可能になり、従って、フロー状態における接着性変化に関する重要な知見が得られる。第三に、白血球表面のリガンド分子と結合する血小板における種々の接着分子の存在を考慮すると、傍内皮空間における血小板の密度は、急性炎症プロセスにおいて細静脈への白血球の動員数を決定する要因となる (Lab Invest. 71, 380-386, 1994, J. Exp. Med. 187, 197-204, 1998)。しかし、生体内の血小板を信頼性の高い方法で可視化することは技術的に困難であるため、傍内皮空間を流れる血小板の詳細な挙動についての情報は限られていた。

【0007】本発明者らは、傍内皮空間に沿って流れる血小板の密度分布又は速度分布等、インビボにおける血小板の挙動を明らかにするために、生体内で血小板を染色できる蛍光色素であるカルボキシフルオレセイン ジアセテート スクシニミディルエステル (CFSE) による超高速増感顕微鏡検査を生体内において行ったところ、内毒素血症のような病的状態において、後毛細血管細静脈の傍内皮空間における白血球が血小板を介して転回及び接着していることを偶然に見出した。そこで、血小板上の GP I b の N 末端から 1 ~ 302 アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープ (epitope) を認識する前記モノクローナル抗体 GUR 83 / 35 を投与したところ、炎症性刺激により生じる白血球の血管内皮細胞への接着反応が、局所の血行動態を低下させることなく抑制されることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明は、非ヒト哺乳動物に炎症反応を生じせしめると同時又はその前後に被検物質を投与するか、あるいは、炎症反応を常態で示す非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、インビボにおける血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着状態を検出・評価することを特徴とする血小板上に発現する糖タンパク質 GP I b の機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法 (請求項 1) や、エンドトキシンを投与して炎症反応を生じせしめることを特徴とする請求項 1 記載の血小板上に発現する糖タンパク質 GP I b の機能を抑

制する抗炎症性物質のスクリーニング方法（請求項2）や、血小板として、CFSEで標識化された血小板を用いることを特徴とする請求項1又は2記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法（請求項3）や、接着状態の検出・評価が、血管内の白血球回転速度（Vw）と赤血球速度（Vr）との比（Vw/Vr）で求められる接着エネルギーを指標とした検出評価であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法（請求項4）や、投与が静脈内投与であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法（請求項5）や、血管内皮細胞が後毛細血管細静脈であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法（請求項6）や、非ヒト哺乳動物がラットであることを特徴とする血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法（請求項7）に関する。

【0009】また本発明は、請求項1～7のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質（請求項8）や、血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションの変化を生じさせる物質であることを特徴とする請求項8記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質（請求項9）や、GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項9記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質（請求項10）や、GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションと相互作用するペプチドであることを特徴とする請求項9記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する物質（請求項11）に関する。

【0010】さらに本発明は、請求項1～7のいずれか記載の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法により得られる抗炎症性物質を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物（請求項12）や、抗炎症性物質が、血小板上に発現する糖タンパク質GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォ

メーションの変化を生じさせる物質であることを特徴とする請求項12記載の医薬組成物（請求項13）や、GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項13記載の医薬組成物（請求項14）や、モノクローナル抗体が、抗GPIIbモノクローナル抗体GUR83/35であることを特徴とする請求項14記載の医薬組成物（請求項15）や、GPIIbのコンフォメーションの変化を生じさせる物質が、GPIIb分子のN末端から1～302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションと相互作用するペプチドであることを特徴とする請求項13記載の医薬組成物（請求項16）や、抗炎症性物質が、動脈硬化、播種性血管内凝固症候群、多臓器不全、又は自己免疫疾患に対する抗炎症作用を有する物質であることを特徴とする請求項12～16のいずれか記載の医薬組成物（請求項17）に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIbの機能を抑制する抗炎症性物質のスクリーニング方法としては、非ヒト哺乳動物に炎症反応を生じせしめると同時又はその前後に被検物質を投与するか、あるいは、炎症反応を常態で示す非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、インビボにおける血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着状態を検出・評価するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、ここで、炎症反応とは、微小循環系が分布している組織の有害刺激に対応する局所性反応をいい、有害刺激としては、外来性の異物、物理エネルギー、傷害された組織自体等を例示することができる。また、上記外来性の異物としては、炎症を確実に惹起しうる炎症起因物質、例えばエンドトキシンが好ましい。かかるエンドトキシン等の炎症起因物質を用いる場合、炎症起因物質と被検物質は、同時又はいずれか一方を先に他方を後に非ヒト哺乳動物の静脈等に投与することになる。

【0012】本発明のスクリーニング方法はインビボ系で行われることを大きな特徴とし、インビトロ系スクリーニングと異なり、目的とする抗炎症剤をより正確に効率よく選択することができる。かかるインビボにおける血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着状態の検出・評価方法としては、インビボにおける血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着状態を検出（測定）・評価しうる方法であれば特に制限されるものではないが、後毛細血管細静脈等における傍内皮空間（内皮に近接した空間）における血小板の挙動を正確に把握するために、血小板を標識化することが好ましく、生体内で血小板を染色できる蛍光色素であるカルボキシフルオレセイン ジアセテート スクシニミディル エステル（CFSE）による標識化を行い、血小板を可視化する

ことが特に好ましく、かかる標識化により超高速増感顕微鏡を用いての血小板の画像化が可能となる。

【0013】上記インピボにおける血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着状態の検出・評価方法としては、血小板を介しての白血球と血管内皮細胞との接着エネルギー及び/又は血小板を介しての血管内皮細胞への接着白血球数を指標とする検出評価方法を具体的に例示することができる。上記接着エネルギーは、血管内の白血球回転速度(V_w)と赤血球速度(V_r)との比(V_w/V_r)として求められ、 V_w/V_r が高い値の場合には接着エネルギーの低下を、低い値の場合には接着エネルギーの上昇を示す。また、白血球回転速度(V_w)及び赤血球速度(V_r)は、単位時間当たりの白血球及び赤血球のそれぞれの中心の移動距離で求められる。また、上記接着白血球数は、観察画面上で30秒以上同一領域に接着している細胞数として計測することができる。

【0014】本発明における非ヒト哺乳動物としては特に制限されるものではないが、ヒトGPIIb と交差反応性を有するvWFやP-セレクチンを有する非ヒト哺乳動物が好ましく、かかる非ヒト哺乳動物としてラットを具体的に例示することができる。

【0015】本発明の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIb の機能を抑制する物質としては、上記の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIb の機能を抑制する炎症性物質のスクリーニング方法により得ることができる新規な物質であれば特に制限されるものではないが、GPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションの変化を生じさせる物質、例えば、GPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体や、GPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションと相互作用するペプチドを具体的に例示することができる。前記のように、GPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体として、モノクローナル抗体GUR83/35が知られているが、これらGPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体は、GUR83/35をも含め、前記論文(Moriki, T., et al.; Blood 90, 698-705, 1997; Asazuma, N., et al.; Blood 90, 4789-4798, 1997)記載の方法により調製することができる。

【0016】本発明の医薬組成物は、上記の血小板上に発現する糖タンパク質GPIIb の機能を抑制する炎症性物質のスクリーニング方法により得られる炎症性物質を有効成分として含有するものであれば特に制限されるものではないが、上記炎症性物質としては、動脈

硬化、播種性血管内凝固症候群(DIC)、多臓器不全(MOF)、又は自己免疫疾患に対する抗炎症作用を有する物質が好ましく、具体的には、血小板上に発現する糖タンパク質GPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションの変化を生じさせる物質、例えば抗GPIIb モノクローナル抗体GUR83/35などのGPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識するモノクローナル抗体や、GPIIb 分子のN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーションと相互作用するペプチドを挙げることができる。

【0017】本発明の医薬組成物の投与方法としては、経口投与、静脈注射等の非経口投与のいずれでもよく、投与量は、投与方法、患者の症状・年齢、炎症性物質の物性等を考慮して適宜設定することができる。また、剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等を具体的に例示することができる。これらの製剤は製剤用担体と混合して調製した製剤の形で通常投与される。

【0018】

【実施例】以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 [ラット血小板のインピボ標識化]

(実験動物の調製)ウイスター系雄性ラット(300-350g)にペントバルビタールナトリウム(ネンブタール; pentobarbital sodium)50mg/kgを大腿筋に筋肉内注射することにより麻酔した後、この麻酔したラットの大腿静脈にPE-50ポリエチレン製カテーテルを挿入して薬物投与経路とし、カルボキシフルオレセインジアセテート スクシニミディル エステル(CFDA SE, Molecular Probes, Inc.製、オレゴン州ユージン)を注入してラット体内の血小板を標識した(Suematsu M., et al.; Lab Invest. 70, 684-695, 1994)。上記注入されたCFDA SEは、細胞内に拡散し、主に血小板及び白血球で起こるエステラーゼによる反応後、安定した蛍光色素CFSEを形成する非蛍光前駆物質である。このCFDA SE注入から5~10分後、上記標識したラットの腹部正中切開により、回盲部腸間膜を露出させ、管径25~40 μ mの後毛細血管細静脈を観察した。腸間膜は、窒素95%及び二酸化炭素5%からなる混合ガスで飽和された、37 $^{\circ}$ Cに保温されたKrebs緩衝液(pH7.4)で上記腸間膜表面を1ml/分の速度で灌流した。40-x対物レンズの顕微鏡観察によると、CFSE標識化血小板は針先大の蛍光活性を示し、他方、CFSE標識化白血球はより大きい球形細胞として血小板と容易に識別しえた。

【0019】(血小板CFSE標識化による影響)上記

インビボで標識化したラットから採血し、培養皿上に分取したCFSE標識化血小板画分の透過光線像を図1（参考写真1参照）に示す。また、インビボでの血小板CFSE標識化による影響を、血小板のリストセチン及びADPに対する凝集形成挙動について調べた。図2に示されるように、リストセチン処理又はADP処理により、CFSE標識化血小板とCFSE非標識化血小板とは、同程度の微小凝集形成性を示した。すなわち、リストセチンやADPにより誘発された小凝集塊形成（s）及び大凝集塊形成（l）並びに最大凝集反応強度及びその反応を示すまでの時間（%T）は、グループ間で統計学的に異ならなかった。さらに、これらのピーク値が観察された時間も顕著には異ならなかった。また、インビボにCFDASEを投与した群と投与しない群とでは循環血流中の血小板数に差異が認められなかった。これらのことから、本法による血小板CFSE標識化は、刺激による血小板凝集能に影響を与えないことがわかった。

【0020】実施例2 [赤血球の流速の測定]

微小血管を流れる個々の赤血球を、前報（Am J Physiol. 264, G828-834, 1993, Am J Physiol. 253, G596-600, 1987）のように、生体内超高速増幅ビデオ顕微鏡（Ektapro-2000/TMD-2、コダック社製、カリフォルニア州）で可視化した。枝分かれのない直線状の前毛細血管細動脈及び後毛細血管細静脈を選択し、焦点を細静脈内皮層に調整して、透過光線下40-x水浸式対物レンズで赤血球を可視化し、1000フレーム/秒で1秒間ビデオ録画したところ、図3A（参考写真2参照）に示されているように、赤血球を粒状パターン像として認識することができた（図中、a：細動脈、v：細静脈、バー：30μm）。次に、撮像のため選択した微小血管の横断面を同心円状にほぼ5分割した場合における各領域について、5 msecに相当する5フレーム間の移動距離を測定することにより、赤血球細胞の流速を算出した。また、測定は各領域における少なくとも5つの異なる赤血球について行った。結果を図4に示す。図4には、最も流速が大きい中心線領域の流速を100%とした赤血球の相対速度（z軸）が、測定時間（x軸）及び測定領域（y軸）の関数として表されている。なお、y軸におけるPcは中心線領域、Peは傍内皮領域、P1/4、P2/4、P3/4はそれらの間の領域を示している。図4に示されているように、細静脈中心線領域で測定された速度は、大きくは変動することなく、また細静脈内を流れる赤血球の速度は、中心領域から傍内皮領域の方にいくにしたがって低下することがわかる。

【0021】実施例3 [微小血管における血小板の挙動]

（血小板相対速度の測定）赤血球撮像用透過光線光源から落射蛍光用水銀ランプ（HB-100、ニコン、東京）に換えて、細静脈内を流れるCFSE標識化血小板を、470 nmの落射蛍光による蛍光像として可視化し

た。すなわち、標識化血小板からの蛍光放射を、510 nm以上の波長域透過フィルター、及び増幅器へ導かれた背景光を弱める近赤外線遮断フィルターを透過させた。CFSE標識化血漿部分により確認された血管内と血管外との間の中間面の画質確認による焦点調整後、超高速撮像を1000フレーム/秒で2秒間行った。傍内皮領域及び中心線領域に沿って流れる血小板の速度を、高速ビデオ画像の再生によりフレーム毎に分析して測定した（Am J Physiol. 264, G828-834, 1993）。

【0022】CFSEで標識化された血小板を可視化することができたが、血管内における厳密な局在位置は、その移動速度が速いため通常のビデオレートでは図3B（参考写真2参照）に示したようにほとんど確認することができなかったが、数フレーム/秒で再生し、針先大の蛍光を示す焦点の合った血小板のみを分析のために選択することにより、血小板の血管壁に沿った動きを追跡することができた。図3C～H（参考写真2参照）には、20 msec又は40 msec間隔での連続蛍光像が示されている。特に、細静脈壁との相互作用が、“星印”と“矢印”を付した2つの血小板により示されている。図3C～Hに示すように、“星印”を付した血小板の流速は遅く、“矢印”を付した血小板は速いことを示している。すなわち、細静脈の傍内皮領域で移動する個々の血小板の速度にはバラツキがあることがわかった。

【0023】血小板の流速は、赤血球の追突など赤血球速度により影響されることから、同一血管部位における血小板速度（Vp）と赤血球速度（Vr）との比（Vp/Vr）で表される血小板相対速度を、中心線領域と傍内皮領域について調べてみた。個々の血小板速度（Vp）は、赤血球の場合と同様に、5 msecに相当する5フレーム間の移動距離を測定することにより算出した。またこれとは別に、血管内皮細胞と相互作用する個々の血小板の瞬間的な速度変化を調べるために、血管内皮細胞に沿った10 μm又は20 μmの移動にかかる時間を血小板と赤血球とについて測定することによりVp/Vrを求めた。中心線領域と傍内皮領域において測定された少なくとも60個の血小板の測定から求めた血小板相対速度の分布を図5に示す。図5からわかるように、中心線領域におけるVp/Vr値はほぼ一定で約100%であるのに対し、傍内皮領域におけるVp/Vr値は変動し、50%まで低下することもあった。このことは、傍内皮領域の血小板と微小血管内皮細胞との接着相互作用の存在を示しており、傍内皮領域におけるVp/Vr値は、血小板と内皮細胞との接着エネルギーの指標とすることがわかる。

【0024】（血小板密度の測定）次に、微小血管の傍内皮領域及び中心線領域における血小板密度の差異を調べた。前記のように、赤血球速度は中心線領域が傍内皮領域よりも速く、傍内皮領域に比べてより多くの循環血小板が中心線領域に供給されると考え、中心線領域にお

けるCFSE標識化血小板の密度(Dpc)と傍内皮領域の密度(Dpe)とを次式のようにそれぞれ定義した。

【数1】

$$Dpc = Npc / Apc \cdot Vpc$$

$$Dpe = Npe / Ape \cdot Vpe$$

(式中、Npc及びNpe、Apc及びApe、Vpc及びVpeは、それぞれ中心線領域及び傍内皮領域における、単位時間に観察された血小板数、血小板を含む局所血管領域範囲、血小板速度を表す。したがって、Apc・Vpc及びApe・Vpeは単位時間当たりの流量を表すことになる。)また、Dpe/Dpcを傍内皮空間における血小板の相対密度とすることができる。

【0025】実施例4[LPS投与による血小板への影響]

(血小板相対速度)炎症反応が生じている場合の血小板の挙動を調べるために、エンドトキシンで誘発される播種性血管内凝固症候群実験モデルに関する文献(Am J Pathol. 65,51-58, 1971)の記載に準じて、ラットに内毒素(LPS; O111B4, Sigma製、ミズーリ州セントルイス)を1.0mg/kg/hrで静脈内注射した。なお、対照として、担体としての生理食塩水を同様に静脈内注射した。LPS投与区、対照区とも6匹以上のラットを用い、両区とも約100個の異なる血小板について傍内皮領域における血小板相対速度(Vp/Vr)を測定した。結果を図6に示す。対照区における平均Vp値は、平均Vr値の約92%であったが、図6からわかるように、LPSでラットを処理することにより、血小板と血管内皮細胞との相互作用が高まり、血小板相対速度(Vp/Vr)が全体的に低下した。

【0026】(細静脈壁ズリ速度)赤血球の壁ズリ速度(sec⁻¹)は次式により求めることができる(J Clin Invest. 96, 2009-2016, 1995)。

【数2】

$$\gamma = 8 \times (Vm / Dv)$$

(式中、Vmは前記赤血球の中心線領域流速の平均値/1.6で求められる平均赤血球速度を、Dvは血管内径をそれぞれ表す。)かかる赤血球の細静脈壁ズリ速度(sec⁻¹)を上記LPS投与区、対照区について測定したところ、投与開始後30分では、それぞれ486±39sec⁻¹及び476±52sec⁻¹(7実験の平均値±SD)であり、統計学的差異を示さなかった。この細静脈壁ズリ速度の結果と前記血小板相対速度の結果とを考慮すると、LPSがインビボで傍内皮血小板と細静脈内皮との接着エネルギーを増加させることがわかる。

【0027】実施例5[抗ヒトGPIbモノクローナル抗体GUR83/35のインビボ投与におけるLPS誘発接着エネルギーの抑制]

(血小板の転回反応の抑制)実施例4におけるLPS投与の5分前に、抗ヒトGPIbモノクローナル抗体GUR83/35を生体内注射(1.5mg/kg)により投与した。また比較のために、抗ヒトGPIbモノクローナル抗体WGA3を同様に投与した。前記のように、抗体GUR83/35は、ヒトGPIbのN末端から1~302アミノ酸残基が形成するコンフォメーション特異的なエピトープを認識し、リストセチン存在下におけるvWFのヒト血小板への結合を阻止するが、抗体WGA3は、ヒトGPIbの同領域に結合するが、この反応を阻止しない(Blood.90, 4789-4798, 1997)。対照区、LPS投与区、GUR83/35・LPS投与区及びWGA3・LPS投与区について、各区6匹のラットを用いて、循環血小板数、前記傍内皮領域における血小板の相対密度(Dpe/Dpc)及び傍内皮空間における血小板相対速度(Vp/Vr)を、生理食塩水又はLPS投与20分後に測定した。結果を図7に示す。

【0028】図7からわかるように、LPS投与により、血液中の血小板量は著しく低下したが、相対密度(Dpe/Dpc)は約20%上昇した。LPS誘発による傍内皮領域における血小板の相対密度の上昇は、傍内皮空間における血小板相対速度(Vp/Vr)の低下が示したと同様に、血小板と内皮細胞との接着相互作用の増加を表している。また、抗体GUR83/35をLPS投与に先だてて予めインビボ投与した場合、対照区と同じ程度まで上記LPSにより誘発される血小板と血管内皮細胞との相互作用を抑制しうることがわかったが、他方、抗体WGA3を予めインビボ投与した場合、LPSにより誘発される血小板と血管内皮細胞との相互作用を何ら抑制しないことがわかった(図7中、“*”は対照区と比べて、また“*#”はGUR83/35・LPS投与区と比べて、統計学的に有意差があることを示す)。また、図7には示されていないが、抗体GUR83/35又は抗体WGA3をLPS未処理ラットへ投与した場合における各種測定値は対照区の値と変わらなかった。

【0029】(白血球の転回抑制)上記の実験において、抗体GUR83/35のインビボ投与における白血球の挙動に与える影響について調べた。また、参考のため、LPS未処理ラットへ抗体GUR83/35を投与した。対照区、GUR83/35投与区(参考区)、LPS投与区、GUR83/35・LPS投与区について、傍内皮領域における赤血球速度(Vr)、傍内皮空間における白血球相対速度(Vw/Vr)及び接着白血球数を測定した。傍内皮領域における白血球速度(Vw)は、赤血球速度や血小板速度と同様に測定した。白血球相対速度(Vw/Vr)は、血小板相対速度(Vp/Vr)と同様に、白血球と血管内皮細胞との接着相互作用を示し、この値が大きいと接着エネルギーが

低下したことを、小さいと接着エネルギーが増加したことを示す。また、上記接着白血球数は、観察画面上で30秒以上同一部位に接着している細胞数として計測した。したがって、接着白血球数が多くなると、白血球と

血管内皮細胞との接着相互作用が増大していることを意味する。結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

グループ		Vr (mm/sec)	Vw/Vr (%)	接着白血球数 (#/100-mmPCV)	実験数 (n)
LPS(-)	GUR83/35(-)	2.41±0.29	2.32±0.29	0.78±0.22	9
	GUR83/35(+)	2.36±0.24	2.12±0.23	0.40±0.55	5
LPS(+)	GUR83/35(-)	2.37±0.34	1.23±0.22	7.67±3.14	6
	GUR83/35(+)	2.33±0.27	1.78±0.32	4.83±2.32	6

【0031】表1からわかるように、LPS未処理の場合(対照区及び参考区)、抗体GUR83/35の有無にかかわらず、白血球相対速度(Vw/Vr)や接着白血球数において有意な差は認められなかった。これに対して、LPS投与区では、赤血球速度(Vr)においては対照区と変わりがないが、白血球相対速度(Vw/Vr)は50%程度の低下を示し、また、接着白血球数も顕著に増加し、白血球と血管内皮細胞との接着エネルギーが増大したことが示された。他方、インビボで抗体GUR83/35を投与し、5分後にLPSを投与したGUR83/35・LPS投与区では、LPSにより誘発される接着エネルギーの増加を、白血球相対速度、接着白血球数ともに統計学上有意な差をもって、顕著に抑制した。これらの結果は、GPIbの機能を抑制することにより、刺激に伴う白血球の接着反応が抑制されることを示しており、また、参考区の結果からして、GPIbの機能を抑制することにより生じる、白血球接着に対する抑制効果は、血管が刺激を受けた状況下においてのみ発現することがわかった。

【0032】実施例6[抗ヒトGPIbモノクローナル抗体GUR83/35による血小板のインビトロ処理におけるLPS誘発接着エネルギーの抑制](ヒト及びラット血小板のインビトロCFSE標識化)上記LPS処理ラットにおける抗ヒトGPIbモノクローナル抗体GUR83/35によるラット血小板やラット白血球の血管内皮細胞との接着抑制効果がヒト血小板においても同様に発現するかどうかを、LPS投与ラットにヒト血小板を注射して、ラット後毛細血管細静脈におけるヒト血小板のインビボにおける挙動を、前記生体内顕微鏡を用いて調べた。ヒト血小板のCFSE標識化は、当然のことながらインビトロで行われることから、インビトロ標識化も含めてこの実験のコントロールとしてラット血小板のインビトロCFSE標識化も併せて行った。

【0033】健康なボランティアから採取したヒト血液サンプルを用いてヒト血小板を調製した(J Clin Invest. 101, 479-486, 1998)。通常この調製には、トロンビン抑制剤が凝集阻害剤として使用されるが、この実験系では内毒素血症ラットで内因性トロンビン活性により誘発される細胞の接着反応を阻害する可能性を除外

するために、3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝剤として用いた。次に、ヒト血小板が豊富に含まれる血漿(PRP)サンプルを、90µMのCFDASEで10分間室温でインキュベートし、その後一回洗浄することにより、CFSE標識化ヒト血小板を調製した。また、蛍光標識化ヒト血小板を最終濃度20µg/mlの抗ヒトGPIbモノクローナル抗体GUR83/35又はWGA3の存在下で浮遊させ、5.0×10⁵細胞/mlで含む抗体処理ヒト血小板懸濁液を調製し、125µl/分で4分間かけてラットに静脈注射した。かかる静脈注射により、ヒト血小板はラットの腸間膜微小血管系において鮮明なスポットとして認識できるようになった。

【0034】同様に、ex vivoでCFSE標識した濃度5.0×10⁵細胞/mlのラット血小板を調製した。この標識化ラット血小板を豊富に含む血漿を用いて、インビトロにおいて細胞が刺激依存性凝集を適切に示すかどうかを、ADP及びリソチミンを刺激剤として用いるレーザー微小凝集測定法により試験した。この試験により、単離過程におけるテクニカルエラーにより起こることがある凝集能が低下した血小板サンプルを排除することができた。また、ヒト血小板におけると同様に、抗体GUR83/35でインビトロにおいて前処理した後、ラットに静脈注射した。

【0035】(ラットの標識化血小板及び白血球の挙動)前記超高速撮像条件では録画時間に制限(1~2分)があったため、蛍光標識した血小板を外から投与するこの実験では、標識化血小板の挙動をより長期間撮像することができるように、超高感度シリコン増幅ターゲットカメラ(SIT、C2400-08、Hamamatsu Photonics製、浜松市)を用いた。このカメラで30フレーム/秒で撮像し、数分間蛍光像を得ることができたので、再生ビデオ画像を用いて比較的転回速度の遅い血小板のフレーム毎の解析を行った。図8(参考写真3参照)には、LPS処理したラット細静脈におけるモノクローナル抗体処理又は未処理ラット血小板を、上記SITカメラを用いて撮像した結果が示されている。図8から、注入された血小板は一過性接着及び転回を示したが、いくつかの細胞は細静脈内皮への固定接着を示すことがわかった。また、傍内皮空間を流れている血小板の

ある集団は、しばしば転回白血球に付着し、白血球 - 血小板複合体を形成して、白血球の転回速度をさらに減速させた。なお、図8における左上の数値は標識化ラット血小板注射後の経過時間を表し、白抜き及び黒の“星印”はそれぞれ転回血小板、捕捉血小板を示し、白抜きの“矢印”は転回白血球の表面に接着した血小板を、黒の“矢印”は流動状態の血小板が衝突して複合体を形成し血管細胞壁にゆっくりと接着していく白血球を示している(バーは40 μ m)。

【0036】次に、標識化ラット血小板を抗体GUR83/35で前処理した場合の転回血小板数を調べた。画像領域において血管に沿った一過性的に転回を示す血小板は、血管の特定部位で捕捉されたものと同様に、転回細胞とした。このような転回血小板数を、標識化ラット血小板(PLT)のみ投与の対照区、PLT・LSP投与区及びPLT・GUR83/35・LSP投与区につき、各5匹の異なるラットの血管内で1分間測定した。結果を図9に示す。図9から、抗体GUR83/35で前処理した場合、LPSにより誘発された血小板と血管内皮細胞との接着作用が、LPS未処理の対照区とほぼ同程度まで抑制されることがわかった。このことは、血小板上に構成的に発現するGPIbの機能阻害が、前記インビボで標識化した血小板の場合と同様な結果を与えることを示している。

【0037】(ヒト標識化血小板の挙動)上記標識化ラット血小板を外から注入した場合における結果を踏まえて、標識化ヒト血小板を外から注入した場合における、インビボでのヒト血小板とラット血管内皮細胞との接着相互作用、特にGPIbの機能阻害による接着相互作用について調べた。図10には、生理食塩水注射後にヒト血小板を注射した対照区と、LPS注射後にヒト血小板を注射したLPS投与区との、傍内皮領域におけるヒト血小板の転回速度(V_p)のヒストグラムがそれぞれ示されている。ヒト血小板の転回速度は、標識化ラット血小板を外から注射開始後4~8分間の血管壁上の転回血小板数を再生ビデオテープにより測定した。図10に示されるように、LPS処理ラットに投与されたヒト血小板は、対照区と比べ、転回速度の全範囲において、より高頻度で現出し、0.2mm/秒より低速度のロー転回を示すヒト血小板数は、LPS処理グループにおいて著しく上昇した。このことは、ラットにおけるインビボの実験系がヒトの抗炎症剤のスクリーニングに適していることを示している。

【0038】また、図11には、生理食塩水注射後にヒト血小板を注射した対照区と、LPS注射後にヒト血小板を注射したLPS投与区と、LPS注射後にヒト血小板を注射したLPS投与区と、LPS注射後に抗体GUR83/35処理ヒト血小板を注射したGUR83/35・LPS処理区及びLPS注射後に抗体WGA3処理ヒト血小板を注射したWGA3・LPS処理区における*

転回ヒト血小板数について、各5匹の異なるラットの血管内で1分間測定した結果が示されている。図11に示されるように、LPS誘発による転回ヒト血小板数の増加は、モノクローナル抗体GUR83/35によりインビボで前処理した場合、有意に減少したが、抗体WGA3による前処理では減少しなかった。このことは、ヒトGPIbの機能を阻害する抗ヒトGPIbモノクローナル抗体GUR83/35が、ヒト白血球のヒト血管内皮細胞への接着に起因する炎症性疾患を抑制することができることを示している。

【0039】

【発明の効果】本発明によると、白血球の血管への接着に起因する炎症性疾患を抑制することができる抗炎症剤をラット等の動物を用いてインビボでスクリーニングすることができることから、インビボでのスクリーニングに比べて、精確かつ効率よく抗炎症剤を見出すことができる。例えば、インビボにおける本スクリーニング方法により見い出された抗ヒトGPIbモノクローナル抗体GUR83/35は、動脈硬化、播種性血管内凝固症候群、多臓器不全、自己免疫疾患等に対する抗炎症剤として使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】インビボCFSE標識化ラット血小板の透過光源像を示す図である。

【図2】インビボCFSE標識化血小板とCFSE非標識化血小板における、リストセチン及びADPに対する凝集形成挙動を示す図である。

【図3】時間的経過にしたがって撮像した微小血管を流れるインビボCFSE標識化血小板と赤血球を示す図である。

【図4】微小血管の各領域において測定された赤血球の相対速度、測定時間、測定領域を3次的に示す図である。

【図5】中心線領域と傍内皮領域におけるインビボCFSE標識化血小板相対速度の分布を示す図である。

【図6】LPS投与によるインビボCFSE標識化血小板相対速度(V_p/V_r)における影響を示す図である。

【図7】抗体GUR83/35投与による循環インビボCFSE標識化血小板数、血小板の相対密度及び血小板相対速度における影響を示す図である。

【図8】LPS処理したラット細静脈におけるインビボCFSE標識化ラット血小板を示す図である。

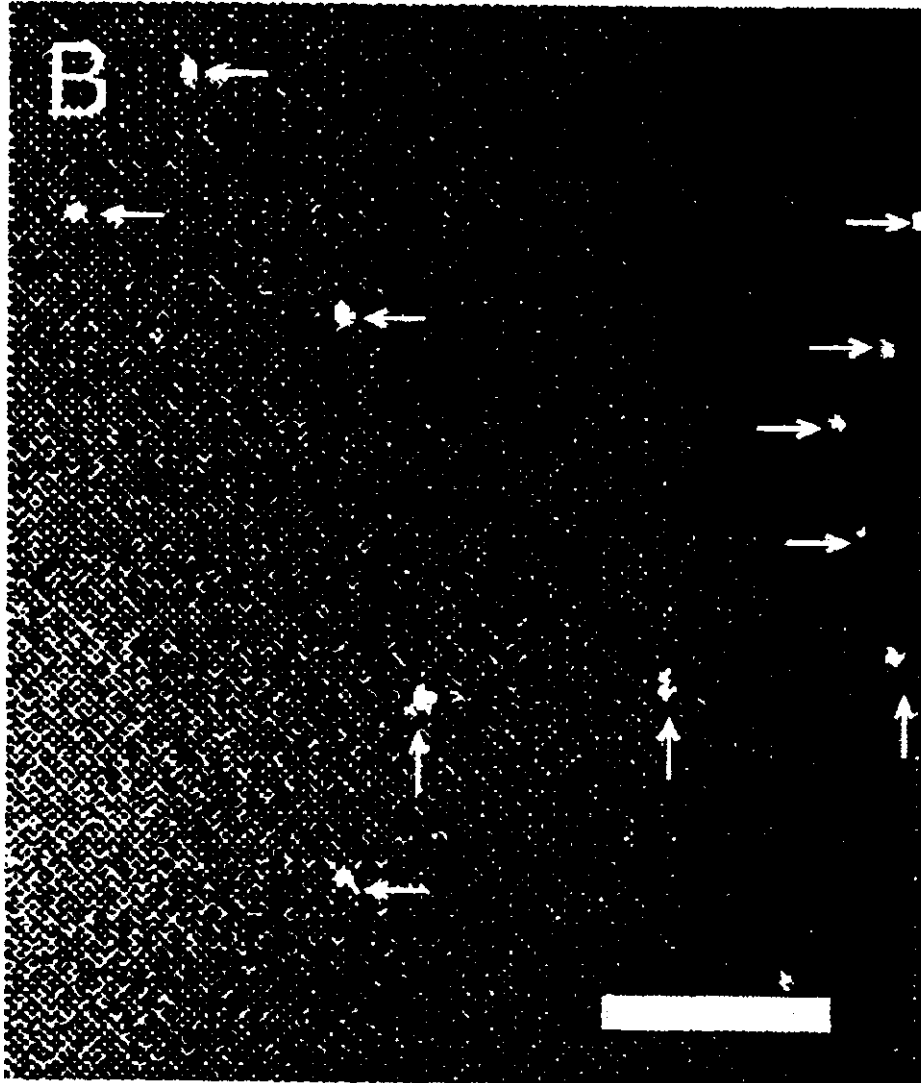
【図9】抗体GUR83/35投与によるインビボCFSE標識化ラット血小板の転回血小板数における影響を示す図である。

【図10】抗体GUR83/35投与によるCFSE標識化ヒト血小板の転回速度における影響を示す図である。

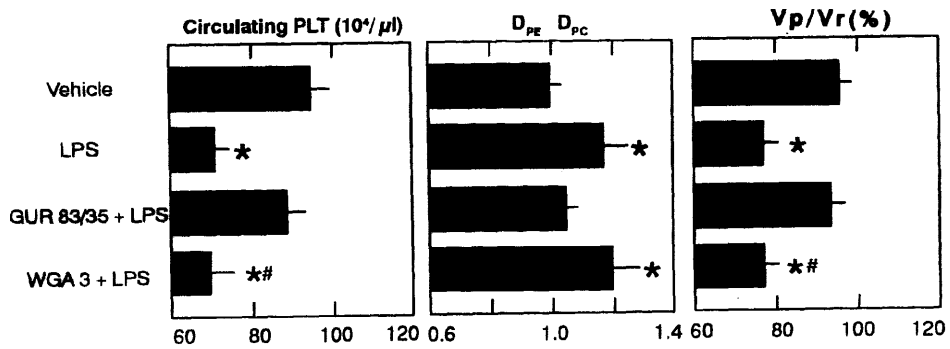
【図11】抗体GUR83/35投与によるCFSE標

識化転回ヒト血小板数における影響を示す図である。

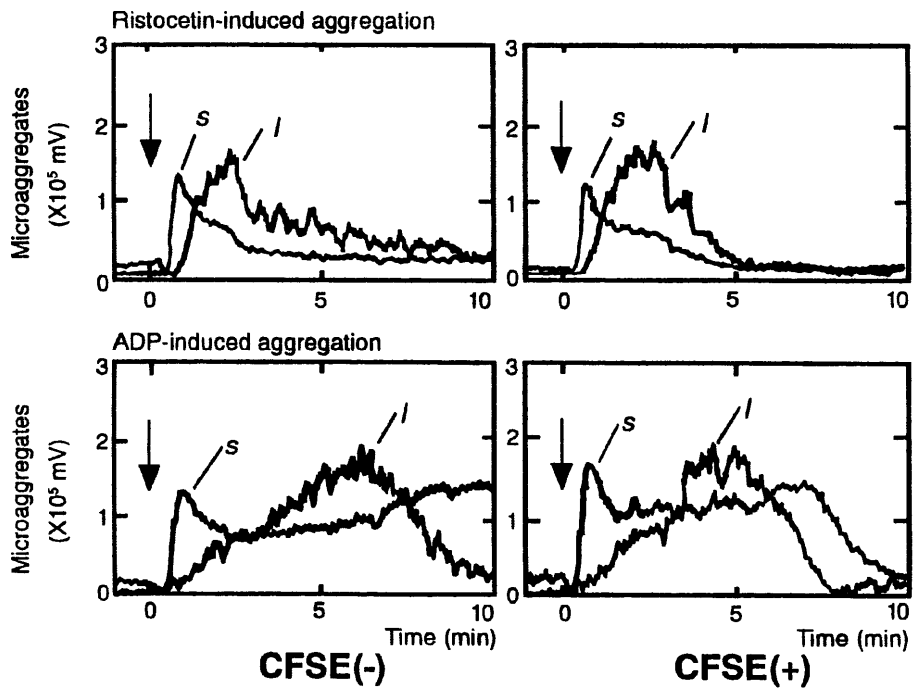
【図1】



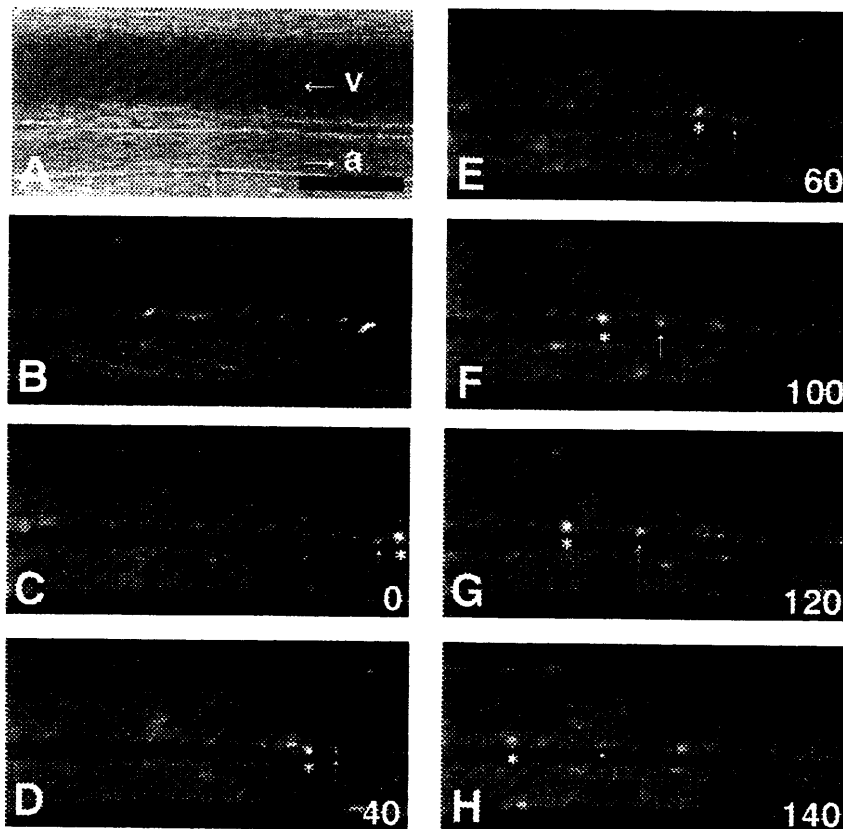
【図7】



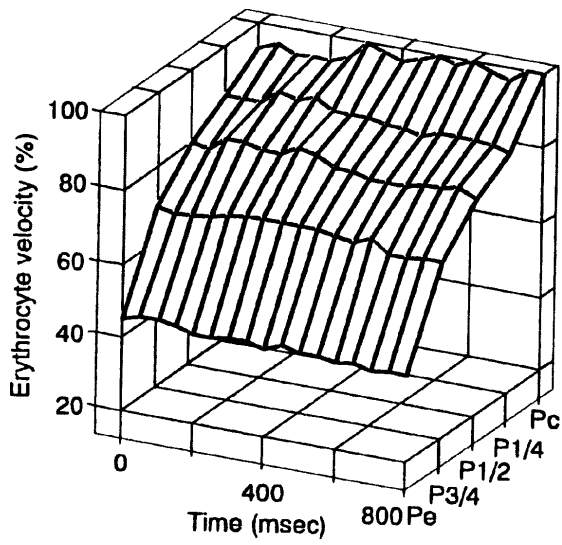
【図2】



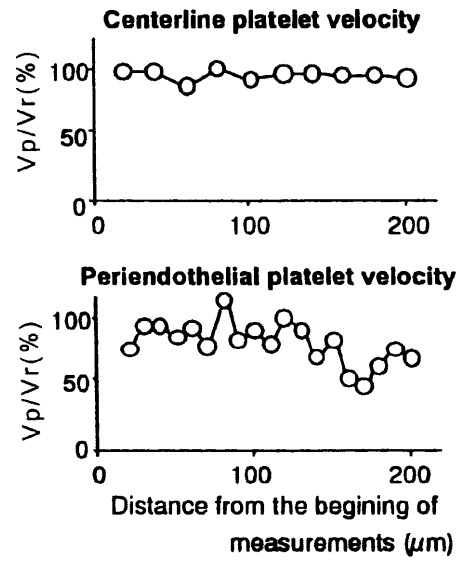
【図3】



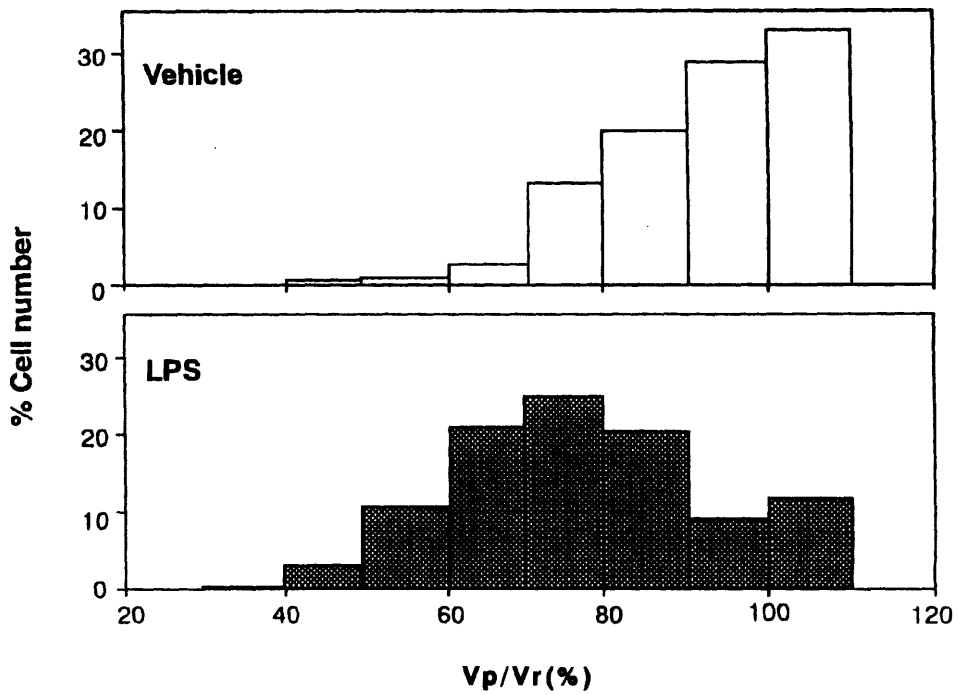
【図4】



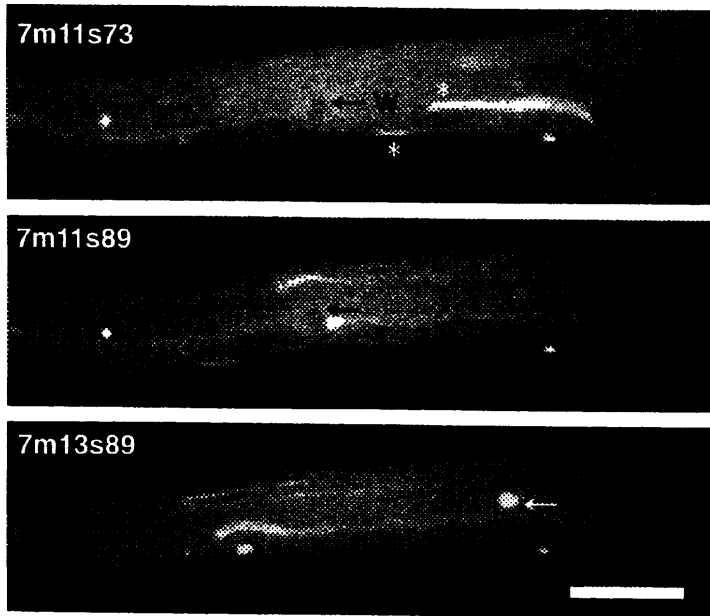
【図5】



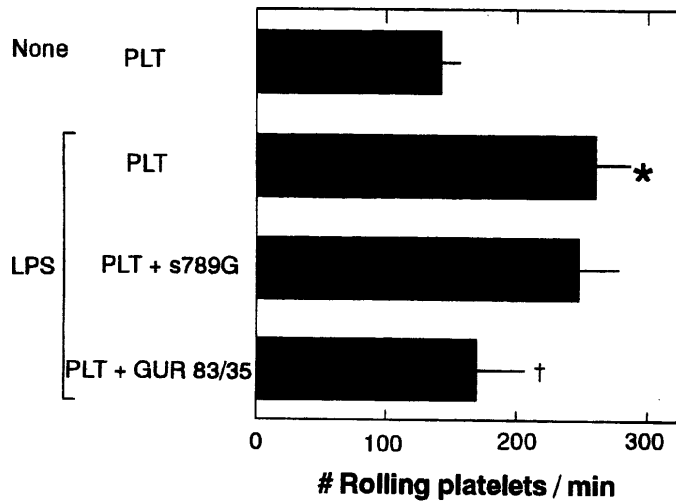
【図6】



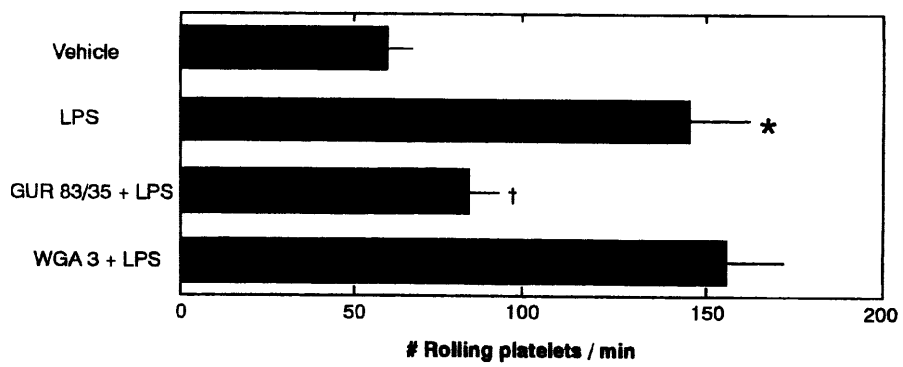
【図8】



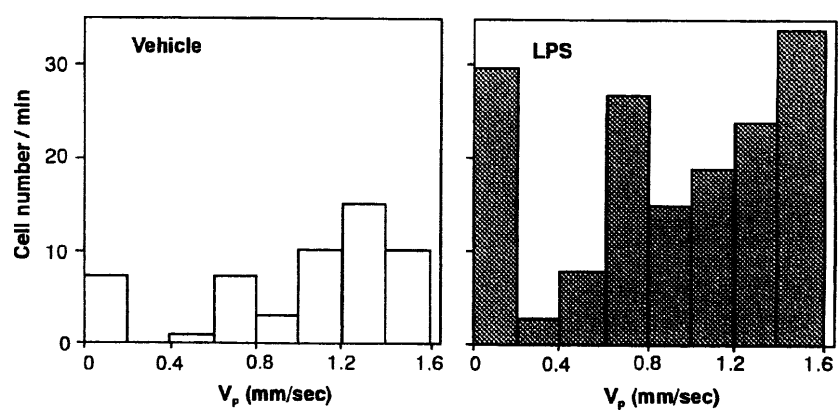
【図9】



【図11】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

A 6 1 P 37/02
 C 0 7 K 16/28
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/15
 33/53

A 6 1 P 37/02
 C 0 7 K 16/28
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/15
 33/53

Z
 V

Fターム(参考) 2G045 AA40 CA24 CA25 DA36 FB03
 FB07 FB12 GC15
 4B063 QA01 QA18 QQ02 QR72 QX10
 4B064 AG27 DA08
 4C084 AA17 NA14 ZA451 ZA541
 ZB071 ZB112 ZC511
 4C085 AA14 BA42 BB12 DD61
 4H045 AA11 AA30 CA42 DA76 EA22

专利名称(译)	含有抑制血小板GPIIb α 物质的物质作为有效成分的抗炎剂		
公开(公告)号	JP2001318093A	公开(公告)日	2001-11-16
申请号	JP2000136496	申请日	2000-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人 慶應義塾		
[标]发明人	末松誠 半田誠 池田康夫		
发明人	末松 誠 半田 誠 池田 康夫		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/10 A61P29/00 A61P37/02 C07K16/28 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/50.Z A61K39/395.N A61K45/00 A61P9/10.101 A61P29/00 A61P37/02 C07K16/28 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.V		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CA24 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QR72 4B063/QX10 4B064/AG27 4B064/DA08 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA451 4C084/ZA541 4C084/ZB071 4C084/ZB112 4C084/ZC511 4C085/AA14 4C085/BA42 4C085/BB12 4C085/DD61 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA22		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种体内筛选能够抑制由白细胞粘附于血管引起的炎症疾病的抗炎剂的方法。解决方案：在给予内毒素的同时，之前或之后，将一种测试物质同时给药于大鼠，以诱导炎症反应，或者向一种通常表现出炎症反应的非人类哺乳动物给药。以白细胞旋转速度（V_w）与红细胞速度（V_r）之比（V_w/V_r）的比值（V_w/V_r）作为指标，评价通过血小板在体内的白细胞与血管内皮细胞的体内附着状态。筛选出抑制血小板表达的糖蛋白GPIIb α 功能的抗炎物质。

したがって、接着白血球数が多くなると、白血球と 【表1】

グループ		V _r (mm/sec)	V _w /V _r (%)	接着白血球数 (#/100-mmPCV)	実験数 (n)
LPS(-)	GUR83/35(-)	2.41±0.29	2.32±0.29	0.78±0.22	9
	GUR83/35(+)	2.36±0.24	2.12±0.23	0.40±0.55	5
LPS(+)	GUR83/35(-)	2.37±0.34	1.23±0.22	7.67±3.14	6
	GUR83/35(+)	2.33±0.27	1.78±0.32	4.83±2.32	6