

血流下でコラーゲン上に形成される血小板血栓の形成に及ぼす Abciximab と Tirofiban の差異

Different Inhibiting Effects of Abciximab and Tirofiban on Platelet Thrombus Formation on a Collagen Surface Under Flow Conditions

島崎とも江
後藤 信哉
榊原 守
江藤 浩之
金 載 英
市川 典子
吉田美奈子
長岡 優多
一色 高明*
半田俊之介

Tomoe SHIMAZAKI, BS
Shinya GOTO, MD
Mamoru SAKAKIBARA, MD
Koji ETO, MD
Jae-Young KIM, MD
Noriko ICHIKAWA, MD
Minako YOSHIDA, MD
Yuta NAGAOKA, MD
Takaaki ISSHIKI, MD, FJCC*
Shunnosuke HANDA, MD, FJCC

Abstract

Objectives. Recently developed anti-GP b/ a agents effectively inhibit acute thrombotic occlusion of coronary arteries after interventional treatment, and have similar inhibiting effects on plasma ligand binding to GP b/ a. Clinical investigation has revealed that abciximab, the chimeric monoclonal antibody against GP b/ a, has superior *in vivo* antithrombotic effects to other agents. The inhibiting effects of abciximab and another anti-GP b/ a agent, tirofiban, were investigated on platelet thrombus formation on a collagen surface under flow conditions.

Methods. Blood was drawn from 6 normal volunteers and anticoagulated with a specific inhibitor of thrombin, argatroban, at a final concentration of 100 μM. Platelets were rendered fluorescent by addition of mepacrine to a final concentration of 10 μM. Mepacrine is concentrated in the dense granules of platelets and leukocytes, but does not accumulate in red blood cells, so platelet thrombi can be detected by fluorescence microscopy even in the presence of red blood cells. Horizontal glass slips covered with fibrillar type collagen were assembled in a Hele-Shaw type flow chamber.

Results. Platelet thrombi were developed on the collagen surface even in the absence of platelet activating agents. Both abciximab and tirofiban inhibited the platelet thrombus formation. Single platelet adhesion on the collagen surface was inhibited only by abciximab and not by tirofiban.

Conclusions. The superior *in vivo* antithrombotic effects of abciximab may be partially explained by its inhibiting effects on the platelet adhesion on exposed subendothelial matrix.

J Cardiol 2000; 36(2): 113 - 121

Key Words

Platelet(anti-GP b/ a agents)

Thrombosis

Collagen

はじめに

血小板表面上の膜糖蛋白 GP b/ a に , フィブリ

ノーゲン , フォン・ビレブランド因子(von Willebrand factor: vWF)などの血漿蛋白が結合し, 血小板同士を架橋することが血小板血栓の形成に至る final common

東海大学医学部 循環器内科: 〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143; * 帝京大学医学部 内科, 東京

Division of Cardiology, Tokai University School of Medicine, Kanagawa; * Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo

Address for reprints: GOTO S, MD, Division of Cardiology, Tokai University School of Medicine, Shimokasuya 143, Isehara, Kanagawa 259-1193

Manuscript received February 2, 2000; revised March 30, 2000; accepted March 31, 2000

pathwayであるとされる¹⁾。近年，血小板膜糖蛋白 GP b/ a に結合し，フィブリノーゲンなどの GP b/ a への結合を抑制することにより血小板凝集を抑制する GP b/ a 受容体阻害薬が開発された¹⁻⁴⁾。臨床試験の結果，経皮的冠動脈形成術後の急性期血管事故を劇的に減少させることが確認され，注目されている⁵⁻⁷⁾。複数の GP b/ a 受容体阻害薬が開発され，GP b/ a 受容体に非可逆的に結合するモノクローナル抗体である abciximab⁵⁻⁷⁾，環状ペプチドである integrilin⁸⁾，非ペプチド化合物である tirofiban⁹⁾ が臨床応用された。いずれの薬物も血小板凝集を同様に抑制するにもかかわらず，モノクローナル抗体である abciximab の臨床効果が，他の薬物に比較して強力であった⁷⁾。Abciximab が臨床的により有効である理由として，GP b/ a に対する結合が不可逆的で抗血栓効果が薬物の血中濃度消失後も遷延すること¹⁾，GP b/ a 以外のインテグリンの機能を抑制すること^{10,11)}，などが指摘されているが，正確なメカニズムは不明である。

血小板血栓の形成メカニズムは，Born¹²⁾ の開発した血小板凝集計を用いて評価されてきた。すなわち，血小板をアデノシン二リン酸 (adenosin diphosphate: ADP) などの刺激物質で刺激した後に，攪拌して惹起される血小板凝集を血小板血栓として評価していた。急性心筋梗塞などの急性冠動脈症候群を惹起する冠血栓は，早くて豊富な冠血流の存在下で惹起される¹³⁾。我々は，これまでに血流下の血小板血栓形成機転が血小板凝集機転とはまったく異なること¹³⁻¹⁵⁾，すなわち，血流下では vWF と血小板膜糖蛋白 GP b, GP b/ a との相互作用が血栓形成において必須の役割を果たすことを報告してきた¹³⁻¹⁶⁾。本研究では，flow chamber を用いて動脈硬化巣の破綻とともに血流に曝露されるコラーゲン上に^{17,18)}，血流下で形成される血小板血栓に及ぼす abciximab と tirofiban の血栓抑制効果の差異を検討した。

対象と方法

1. 血液検体の調整

抗血小板薬の服用歴のない健康成人 6 例を対象とした。安静坐位で肘静脈より 19 ゲージの注射針を用いて採血した。採血直後に，選択的な抗トロンピン薬であるアルガトロバン (三菱化成製，終濃度 100 μM) により抗凝固処理を行った。血小板凝集評価用として 0.38%

クエン酸ナトリウムにより抗凝固処理した血液サンプルも同時に採取した。アルガトロバンにより抗凝固処理した血液には，蛍光色素であるキナクリン (quinacrin dihydrochloride; Sigma 製，終濃度 10 μM) を添加し，血球細胞を蛍光標識した。キナクリンは dense granule に選択的に取り込まれるため，血小板と白血球が選択的に標識される¹⁹⁾。赤血球の存在下でも蛍光顕微鏡により血小板血栓の形成過程を観察できる²⁰⁾。血小板と白血球は，両者の大きさが異なるため顕微鏡下で識別可能である。クエン酸により抗凝固処理した血液は，100 g で 15 分間遠心して，多血小板血漿を分離した。

2. Flow chamber system の作成

牛アキレス腱より採取した型コラーゲン (Sigma 製) 1 mg に，12 ml の酢酸と 188 ml の蒸留水を加え，室温で 10 分間攪拌した。ハンドホモゲナイザー (Dremel racine) によりさらに懸濁したのち，遠心 (1,000 rpm, 15 分, 4 $^{\circ}\text{C}$)，上清を回収した。上清を 4 $^{\circ}\text{C}$ で実験日まで保存した。実験当日，コラーゲン溶液 200 μl をスライドグラス (24 \times 50 mm; Matsunami Glass 製) に滴下し，室温で 1 時間放置して乾燥させた。表面の乾燥後，HEPES 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し，遮光して湿度の多い状態で保存した。コラーゲンを固相化したスライドグラスを後述する flow chamber の底に使用した。

厚さ 254 μm のシリコンラバーをガスケットとして使用した²¹⁾。シリンジポンプ (Model 935; Harvard Apparatus 製) により，蛍光標識した血小板を含む血液を flow chamber を通して定量吸引した。Hele-Shaw 型の flow chamber²²⁾ を使用したため，chamber 内の部位により異なる壁すり速度の条件での血栓形成を評価することができる。1,500 sec^{-1} の壁すり速度の部位でのコラーゲン上の血栓形成を倒立蛍光顕微鏡により連続的に観察した。蛍光顕微鏡 (DM IRB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH) の画像は，CCD カメラ (L-600, Leica 製) を用いてビデオ信号に変換したのち，コンピューターにデジタル画像として取り込んだ。また，ビデオカセットレコーダー (SVO-5800, SONY 製) に連続的に録画した。実験開始直後および実験終了直前にコントロールの実験を行い，血液およびコラーゲンの劣化の影響を除外した。用いた血流下の血栓評価システムの概要を Fig. 1 に示した。

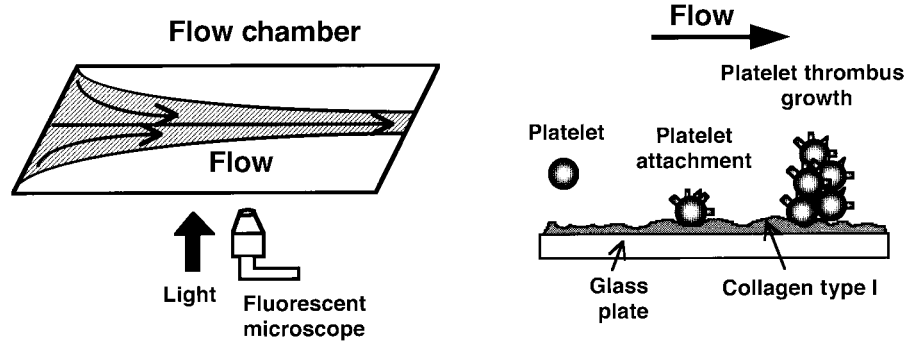


Fig. 1 Visualization of platelet thrombus formation on collagen surface under flow conditions
Platelets stained by the fluorescent dye mepacrine and attached to a collagen surface are visualized by inverted stage epi-fluorescent video microscopy.

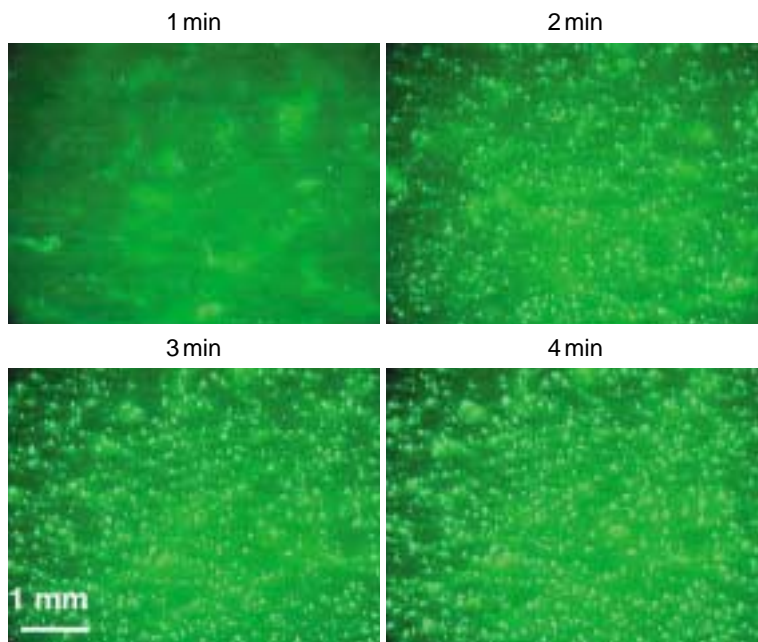


Fig. 2 Platelet thrombus formation on collagen surface in the absence of anti-GP b/ a agents

Platelet thrombus formation on the collagen surface was investigated by perfusing the anticoagulated blood containing fluorescently labeled platelets on immobilized type I collagen under controlled flow conditions in a parallel plate flow chamber. The green particles in the figure represent individual platelets attached to the collagen surface under a flow generating wall shear rate of $1,500 \text{ sec}^{-1}$. Platelets can be visualized only after attaching to the surface. As shown in the figure, platelet thrombus growth occurs under perfusion.

3. GP b/ a 受容体阻害薬

GP b/ a 受容体阻害薬として、モノクローナル抗体である abciximab (ReoPro®: chimeric Fab fragment of 7E3), 非ペプチド化合物である tirofiban を用いた。血小板凝集に及ぼす両薬物の効果を検討するために、多血小板血漿に abciximab, tirofiban を添加した。血小板凝集率を連続的に観察することを可能とした cone-plate viscometer²³⁾ により、ずり応力惹起血小板凝集²⁴⁾ に対する抑制効果を検討した。Abciximab は終濃度を $2 - 50 \mu\text{g/ml}$, tirofiban は終濃度を $20 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$ とした。コラーゲン上の血栓に対する抑制効果も、同一の終濃度の abciximab と tirofiban で検討した。

結 果

Fig. 2 に示すように、ADP, トロンピンなどの血小板活性化物質をまったく添加していないにもかかわらず、血流下ではコラーゲン上に血小板血栓が形成され時間経過とともに成長した。Fig. 3 に、abciximab (終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$), tirofiban (終濃度 $500 \mu\text{M}$) の、コラーゲン上の血小板血栓の形成に及ぼす効果を示した。両者はいずれも、高ずり速度下 ($1,500 \text{ sec}^{-1}$) における血小板血栓の形成をほぼ完全に抑制した。Abciximab, tirofiban とともに使用した用量では血小板凝集を完全に抑制していた (Fig. 4)。Fig. 3 を詳細に観察すると、単

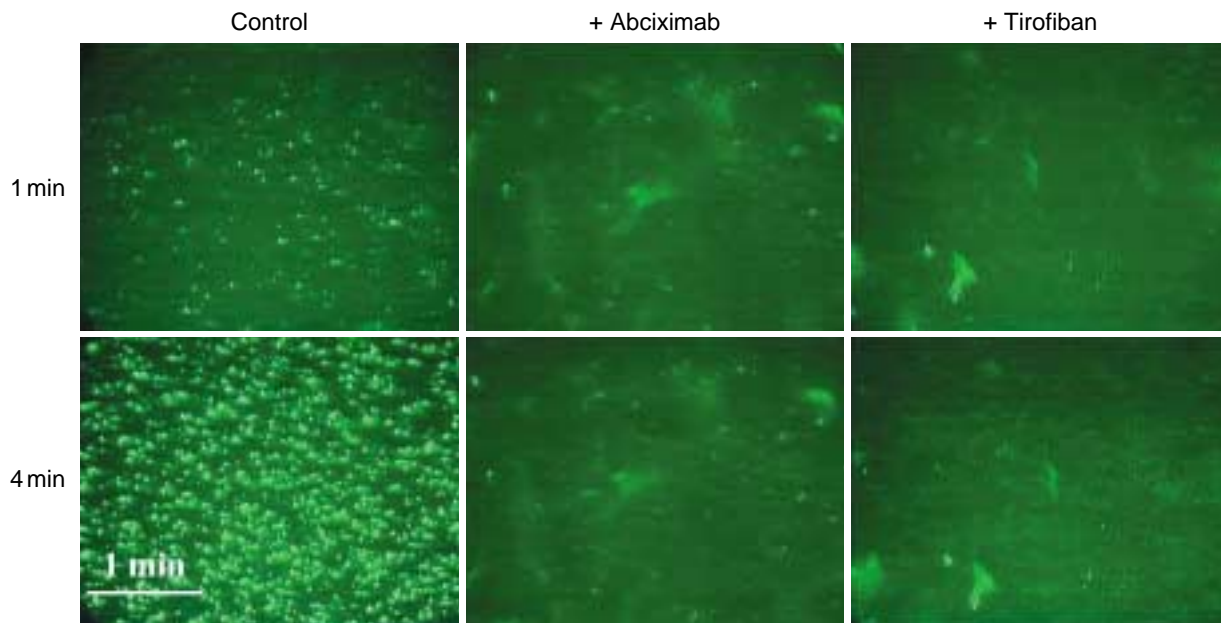


Fig. 3 Inhibiting effects of abciximab and tirofiban on platelet thrombus formation occurring under a shear rate of $1,500 \text{ sec}^{-1}$

Inhibiting effects of abciximab and tirofiban were demonstrated at a final concentration of $10 \mu\text{g/ml}$ and $500 \mu\text{M}$, respectively. As shown in Fig. 4, such concentrations of the anti-GP b/ a agents abciximab and tirofiban are enough to achieve complete inhibition of platelet aggregation. Although both abciximab and tirofiban completely inhibited platelet thrombus formation on the collagen surface, a single layer of platelet deposition, which is more clear in Fig. 5, could be inhibited by abciximab but not by tirofiban.

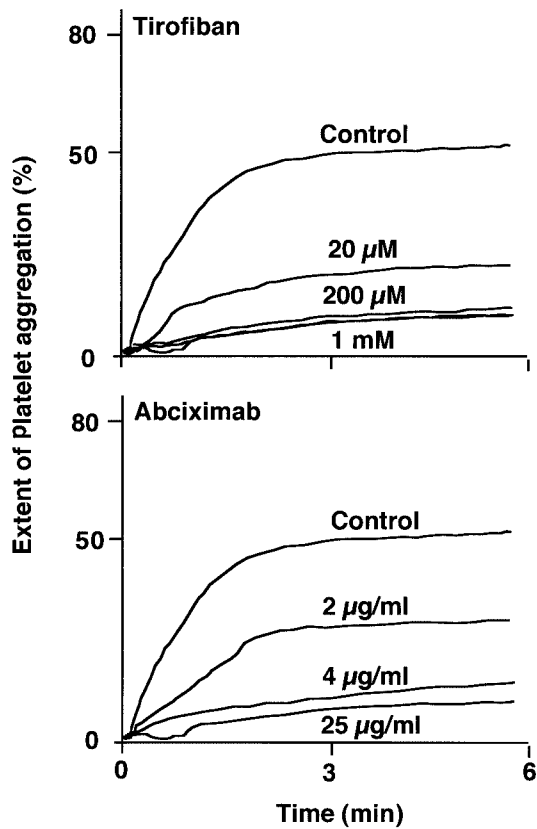


Fig. 4 Effects of abciximab and tirofiban on shear-induced platelet aggregation

Platelet aggregation occurring under a high shear rate of $10,800 \text{ sec}^{-1}$ in an optically modified cone-plate viscometer was inhibited to a similar extent by both abciximab and tirofiban. Maximum inhibition was achieved with $4 \mu\text{g/ml}$ of abciximab and $200 \mu\text{M}$ of tirofiban.

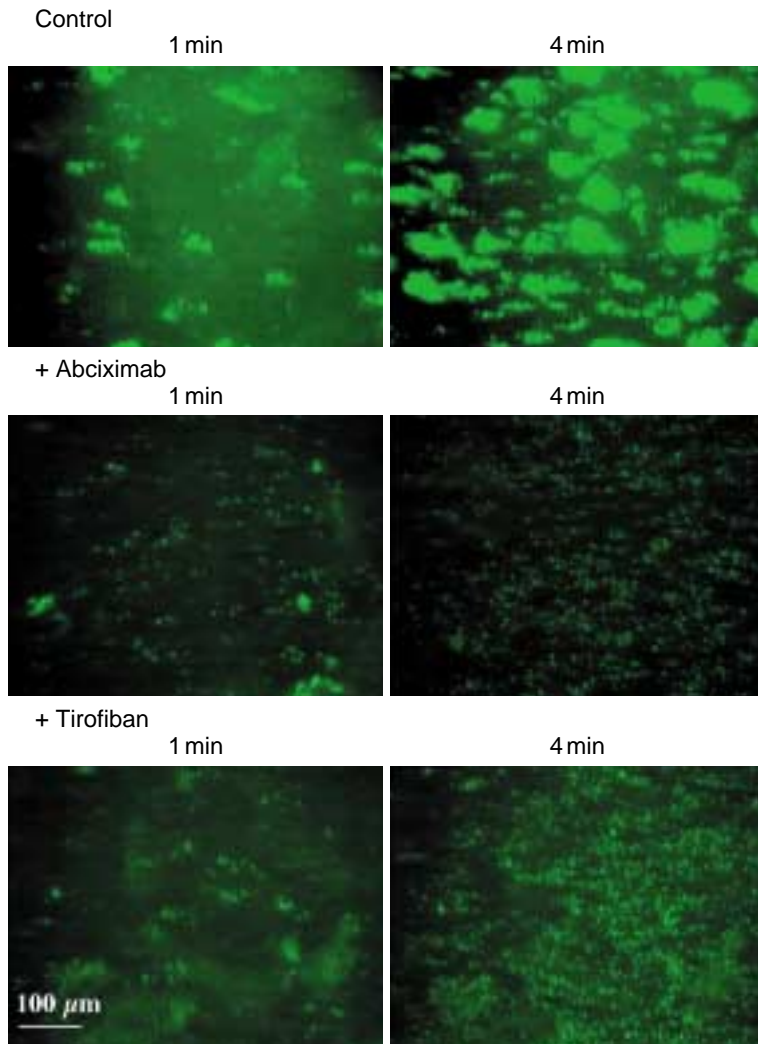


Fig. 5 Visualization of single platelet attachment on a collagen surface under high power microscopy

Inhibiting effects of anti-GP b/ a agents on platelet thrombus formation were investigated as described in Fig. 3, but with higher power microscopy. Single platelet attachment to the collagen surface was inhibited by abciximab but not by tirofiban. The lack of inhibition of single platelet attachment on the collagen surface by tirofiban is still true even in the presence of higher concentrations up to 1 mM (data not shown).

一血小板のコラーゲン表面への粘着はabciximabでは抑制されているものの、tirofibanでは必ずしも抑制されていないことがわかる。Fig. 5にtirofiban(終濃度500 μM)における血流開始4分後の強拡大図を示す。単一血小板の粘着がabciximabでは抑制されているが、tirofibanでは抑制されていないことが明らかである。本現象は動画においてはより明らかであった。

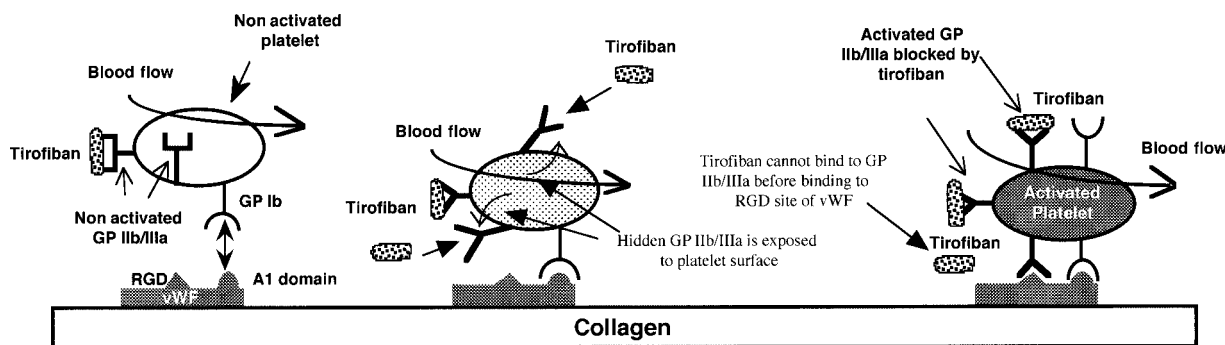
考 案

臨床応用されている代表的なGP b/ a受容体阻害薬であるabciximabとtirofibanの抗血栓効果を、コラーゲン上に血流下に形成される血小板血栓を指標として評価した。Abciximab, tirofibanはいずれもコラーゲン上の血小板血栓の形成を用量依存性に抑制した。

しかしながら、詳細に検討すると、いずれも単一血小板のコラーゲンへの粘着を完全には抑制しなかった。両者を比較すると、血小板凝集を同程度に抑制する用量において、単一血小板のコラーゲン上への粘着に対する抑制効果はabciximabのほうがtirofibanよりも強かった。Tirofibanの用量をさらに増加させても粘着に対する抑制効果が増強しなかったことから、粘着抑制効果におけるtirofibanとabciximabの差異は、用量に依存する現象ではなく、両薬物の薬理作用の差異に依存する現象であると考えた。

コラーゲン表面上への血小板の粘着、血栓形成には、コラーゲンと血小板表面のコラーゲン受容体の相互作用、コラーゲン上に固相化したvWFと血小板膜糖蛋白GP b, GP b/ aの相互作用など複数の受容体-リ

Tirofiban



Abciximab

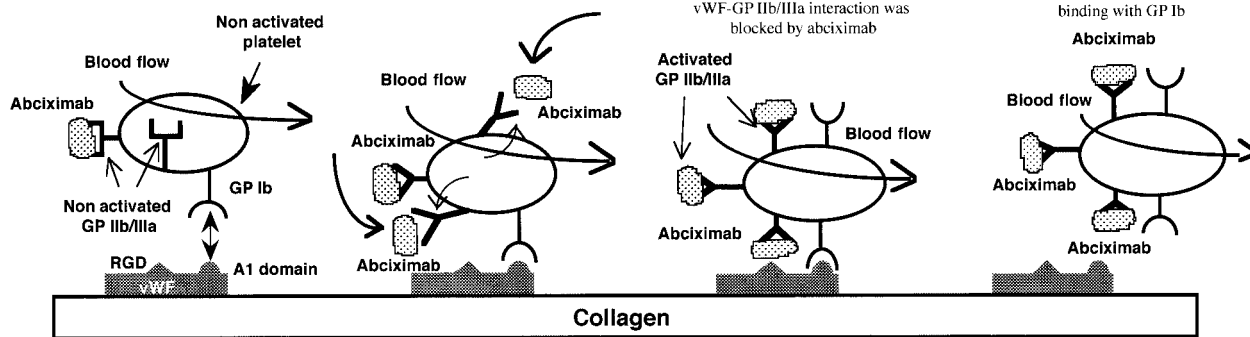


Fig. 6 Proposed mechanism of different effects of anti-GP b/ a agents on single platelet attachment on a collagen surface

Our hypothesis to explain why abciximab and tirofiban, both of which can inhibit ligand binding to activated GP b/ a and platelet aggregation to a similar extent, have different effects on single platelet attachment on a collagen surface.

Once endothelial damage occurs and subendothelial matrix including collagen is exposed to the bloodstream, plasma protein of von Willebrand factor (vWF) is immobilized on the collagen surface by its binding site for collagen. Flowing, non-activated platelets come adjacent to the immobilized vWF and interact with the A1 domain of vWF, through the receptor protein of GP b .

Shear force applied to GP b , as well as intracellular signaling generated by vWF interaction with GP b , exposes GP b/ a molecules which were previously hidden in the intracellular canalicular system and unable to interact with anti-GP b/ a agents.

The difference between abciximab and tirofiban is explained by the difference in binding rate to the GP b/ a binding site of vWF. Abciximab can inhibit stable single platelet attachment on the collagen surface, since it can block the binding of newly exposed GP b/ a to the GP b/ a binding site of vWF, so stable binding of platelets mediated through concurrent binding of both GP b and GP b/ a with the same vWF molecules does not occur. In contrast, tirofiban, which has a lower binding rate to GP b/ a molecules than the GP b/ a binding site of vWF, could not inhibit concurrent binding of vWF with both GP b and GP b/ a.

Thus, stable single platelet attachment on collagen surface could not be inhibited by tirofiban, although the agent can inhibit ligand binding to activated GP b/ a like abciximab.

ガンド関係が関与するとされる²⁵⁾。血小板血栓を形成するうえで最も重要なものは、結合を形成するまでの時間が短く、高い速度下でも血小板をとらえることを可能とするvWF-GP bの相互作用および安定な結合に必要なvWFまたはフィブリノーゲンと活性化

GP b/ aの相互作用であろう²⁵⁾。血流下で惹起されるvWFとGP b、vWFとGP b/ aの相互作用のメカニズムは、従来知られていた血小板をリストセチンやトロンピンで刺激したときに惹起される相互作用とはまったく異なる²⁶⁾。トロンピンにより惹起される活性

化GP b/ aへのvWFの結合を抑制するモノクローナル抗体、ペプチドの中にも血流下のvWFのGP b/ aへの結合を抑制しないものも確認されていることから²⁶⁾, tirofibanが血流下でのvWFとGP b/ aの結合を抑制せず, abciximabのみが抑制するという可能性が考えられる。実際, 同程度に抗GP b/ a効果を有する物質の中でもabciximabのみが血流下でvWF依存性に惹起される血小板の活性化を抑制することもすでに報告されている²⁷⁾。

Abciximabのみが単一血小板のコラーゲン上への結合を抑制することを示した我々の結果は, vWFとGP b/ aの相互作用, もしくはその後の細胞内情報伝達に必須の過程をabciximabは抑制するが, tirofibanは抑制しないことを示唆している。両者の作用の相違は, 我々が以前報告²⁶⁾したモデルにおいて, abciximabとtirofibanのGP b/ aへの結合のon rateの相違により説明可能と考える。すなわち, 血流下でvWFがGP bにtransientに結合し^{28,29)}, 血小板内に隠蔽されていたGP b/ a分子³⁰⁾が表面に発現する際に, abciximabはvWFよりも早くGP b/ aに結合するため, vWFとGP b/ aの結合を抑制し, tirofibanは抑制しないと考えると, 両者の作用が血流下でのみ異なる理由を説明できる(Fig 6)。もう一つの可能性として結合部位の相違も考えられる。すなわち, 抗体から作成したabciximabはtirofibanより巨大分子であり, GP b/ aとの結合部位も複数存在する可能性が高い。血流下でのvWFとGP b/ aの結合様式が血流非存在下と異なれば, 複数の結合部位を通じてより安定に結合するabciximabのみが, 血流下でも抑制効果を有している可能性はある。

*in vivo*の血小板血栓形成に及ぼす抗血小板薬の薬効を*in vitro*または*ex vivo*で評価する方法として, 血小板凝集が広く用いられてきた。血小板を高濃度の

ADP, トロンピンなどで刺激したのちに攪拌して惹起される血小板凝集を, 多血小板血漿の透過光量の変化として定量化するBornらの血小板凝集計は, 簡便な評価法として広く普及していた。しかしながら, 血小板凝集を急性冠動脈症候群の発症に關与する冠動脈血栓のモデルと考えるには, 多くの問題があることが近年理解されるようになった。実際, 冠血流下の血栓形成において重要な役割を果たすvWFの役割³¹⁾を血小板凝集計では検出することができなかった。

本研究において我々が使用したflow chamber systemは, 動脈硬化巣の破綻とともに血流に曝露される血栓性成分であるコラーゲン上に, 冠血流に相当する血流下での血栓形成を評価している点で, 血小板凝集に比較して*in vivo*の血栓形成により近い条件を再現していると考える。コラーゲン上に粘着した血小板は活性化され^{32,33)}, 血小板内の生理活性物質の放出を通じて凝固血栓の形成に關与すると考えれば, 血小板血栓の形成のみならず, 単一血小板のコラーゲン上への結合をも抑制するabciximabが, 抗GP b/ a効果に基づく血小板凝集抑制効果以上の抗血栓効果を発揮する可能性を理解することができる。

結 語

GP b/ a受容体阻害薬の中でもabciximabは, 血流下コラーゲン上の血小板血栓形成を抑制する効果を呈した。本効果が, *in vivo*のabciximabの抗血栓効果の一部として作用していることが示唆された。

本研究の一部は文部省科学研究費(09770506, 11770367), 1999年度および1999年度東海大学医学部研究助成, 日本学術振興会未来開拓学術推進事業(JSPS-RFTF97I00201), 三越厚生事業団研究助成1999および医科学応用研究財団研究助成1999の助成を受けた。

要 約

目的: 血小板膜糖蛋白であるGP b/ aに結合して血小板凝集を抑制するGP b/ a受容体阻害薬が, 強力な抗血小板効果から抗血栓薬として注目されている。臨床研究の結果, 同様の抗GP b/ a作用を有する薬物であっても, 抗血栓効果が異なる可能性が示唆された。そこで, 冠動脈インターベンション後の急性期再閉塞予防効果が最も優れていると報告されたabciximabの血小板血栓抑制効果を, コラーゲン上に血流下で形成される血小板血栓を指標としてtirofibanと比較検討した。

方 法: 血液を健常成人6例から採取し, 2価イオン濃度に影響を与えない抗凝固物質であるアルガトロンにより抗凝固処理をした。血小板をキナクリンにより蛍光標識し, 血小板を含む全血を, flow chamberを用いてコラーゲンを固相化したガラス板の上に流した。そのときにコラーゲン上の壁すり速度が $1,500 \text{ sec}^{-1}$ となるように流量を調節した。コラーゲン上に形成される血小板血栓を蛍光顕微鏡で観察し, abciximab, tirofibanによる血小板血栓抑制効果を比較した。

結 果: コラーゲン上に血液を流すと, アデノシンニリン酸などの血小板活性化物質を添加しなくても, コラーゲン上に血小板血栓が形成されるのが観察された。Abciximab, tirofibanはいずれも血栓形成を抑制した。Abciximabは, 単一血小板のコラーゲン上への粘着をも抑制したが, tirofibanには粘着抑制効果を認めなかった。

結 論: Abciximabによる粘着抑制効果が, 臨床における抗血栓効果と関連している可能性が示唆された。

— J Cardiol 2000; 36(2) 113 - 121 —

文 献

- 1) Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA: A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins b and/or a. *J Clin Invest* 1983; **72**: 325 - 338
- 2) Peerlinck K, De Lepeleire I, Goldberg M, Farrell D, Barrett J, Hand E, Panebianco D, Deckmyn H, Vermynen J, Arnout J: MK-383(L-700, 462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein b/ a antagonist, is active in man. *Circulation* 1993; **88**: 1512 - 1517
- 3) Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie G, Ginsberg MH: Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. *Blood* 1987; **70**: 110 - 115
- 4) McEver RP: Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **714**: 185 - 189
- 5) The EPIC Investigators: Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein b/ a receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; **330**: 956 - 961
- 6) The EPILOG Investigators: Platelet glycoprotein b/ a receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997; **336**: 1689 - 1696
- 7) Topol EJ, Byzova TV, Plow EF: Platelet GP b- a blockers. *Lancet* 1999; **353**: 227 - 231
- 8) The PURSUIT Trial Investigators: Inhibition of platelet glycoprotein b/ a with eptifibatid in patients with acute coronary syndromes: Platelet glycoprotein b/ a in unstable angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. *N Engl J Med* 1998; **339**: 436 - 443
- 9) The RESTORE Investigators: Effects of platelet glycoprotein b/ a blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty: Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and Restenosis. *Circulation* 1997; **96**: 1445 - 1453
- 10) Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK: 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein b/ a cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 528 - 535
- 11) Tam SH, Sassoli PM, Jordan RE, Nakada MT: Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein b/ a and alpha(v)beta3 integrins. *Circulation* 1998; **98**: 1085 - 1091
- 12) Born GVR: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; **194**: 927 - 929
- 13) Goto S, Handa S: Coronary thrombosis: Effects of blood flow on the mechanism of thrombus formation. *Jpn Heart J* 1998; **39**: 579 - 596
- 14) Goto S, Ikeda Y, Saldivar E, Ruggeri ZM: Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow condition. *J Clin Invest* 1998; **101**: 479 - 486
- 15) 後藤信哉: 冠動脈血栓の分子メカニズム. 血栓と循環 1998; **6**: 19 - 24
- 16) Goto S, Sakai H, Goto M, Ono M, Ikeda Y, Handa S, Ruggeri ZM: Enhanced shear-induced platelet aggregation in acute myocardial infarction. *Circulation* 1999; **99**: 608 - 613
- 17) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes(1). *N Engl J Med* 1992; **326**: 242 - 250
- 18) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes(2). *N Engl J Med* 1992; **326**: 310 - 318
- 19) Dize CA, Bursh JW, Goodmann DBD: Direct interaction of mepacrine with erythrocyte and platelet membrane phospholipid. *J Biol Chem* 1982; **257**: 4701 - 4704
- 20) Alevriadou BR, Moake JL, Turner NA, Ruggeri ZM, Folie BJ, Phillips MD, Schreiber AB, Hrinda ME, McIntire LV: Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood* 1993; **81**: 1263 - 1276
- 21) Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E: Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* 1999; **94**: 172 - 178
- 22) Usami S, Chen HH, Zhao Y, Chien S, Skalak R: Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Ann Biomed Eng* 1993; **21**: 77 - 83

- 23) Ikeda Y, Murata M, Goto S: Von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation: Basic mechanisms and clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **811**: 325 - 336
- 24) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I, Sakai K, Ruggeri ZM: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1234 - 1240
- 25) Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM: Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; **94**: 657 - 666
- 26) Goto S, Salomon DR, Ikeda Y, Ruggeri ZM: Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23352 - 23361
- 27) Goto S, Eto K, Ikeda Y, Handa S: Abciximab not RGD peptide inhibits von Willebrand factor-dependent platelet activation under shear. *Lancet* 1999; **353**: 809
- 28) Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM: Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; **84**: 289 - 297
- 29) Miyata S, Ruggeri ZM: Distinct structural attributes regulating von Willebrand factor A1 domain interaction with platelet glycoprotein b alpha under flow. *J Biol Chem* 1999; **274**: 6586 - 6593
- 30) Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM: Increased surface expression of the membrane glycoprotein b/ a complex induced by platelet activation: Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 1987; **70**: 475 - 483
- 31) Bellinger DA, Nichols TC, Read MS, Reddick RL, Lamb MA, Brinkhous KM, Evatt BL, Griggs TR: Prevention of occlusive coronary artery thrombosis by a murine monoclonal antibody to porcine von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8100 - 8104
- 32) Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S: High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996; **88**: 3456 - 3464
- 33) Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM: Modulation of platelet function through adhesion receptors: A dual role for glycoprotein b- a (integrin alpha b beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein b-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 11300 - 11306