◆技術講座◆

Flow cytometry による活性化血小板の検出

清水美衣^{*1}, 篠原幸人^{*2}

清水美衣

Detection of activated platelets in whole blood by flow cytometry

Mie SHIMIZU^{*1}, Yukito SHINOHARA^{*2}

Key words: Platelet activation, PAC1, CD62P, flow cytometry, 動脈硬化性病変

1985年 名城大学薬学部卒業
1986年 名古屋大学医学部・産婦人科 研究助手
1988年 東海大学医学部・病理学および臨床病理教室 (現;臨床検査医学教室) 研究助手
1992年 東海大学医学部・臨床病理学教室 リサーチフェロー
1994年-2003年 ・同教室 研究員
2003年 ・東洋医学講座 研究員
2004年 ・同講座 助手 現在に至る

はじめに

脳梗塞・心筋梗塞などの動脈血栓症の発症には, 血小板活性化も関与しているとされる. そのメカニズムとして, 加齢にともなう動脈硬化に加え糖尿病, 高脂血症, 高血圧などのリスクファクターにより全身の血管内皮が傷害され, 血管内でさらなる動脈硬化が進行し, 血小板が活性化状態になる. そこに血管内皮の剥離や動脈硬化病変の急速な進展が起ると, 内皮下組織からコラーゲン繊維の露出や血管狭窄が引き起こされることとなる¹⁾²⁾. この病変部位を血液が通過する際, さらに周りの静止血小板も活性化され, 血小板の粘着, 凝集が生じる. すなわち活性化血小板マーカーの検出は血小板を活性化させる原因となる動脈硬化病変などの存在を示唆するきっかけともなり, さらにその後に生じる血小板血栓の早期予防にも繋がると考えられる. 近年, 血小板が活性化する際, 発現するエピトープを認識するモノクローナル抗体

(MoAb) と高感度検出器として知られている flow cytometer によりこの活性化血小板を簡便, 迅速に検出することが可能となった³⁾⁴⁾. 我々は, 種々の閉塞性血管病変患者において, 活性化血小板特異的のモノクローナル抗体, 抗フィブリノゲンレセプター抗体 (PAC1), 抗 P-selectin (CD62P) 抗体を用いた活性化血小板の検出を行ってきた.

本稿では flow cytometry による活性化血小板検出について, 基礎的に検討した項目をまとめて紹介し, さらに血栓症の治療戦略として検査の有用性について解説する.

1. Flow cytometry による活性化血小板の検出

Flow cytometry を利用した活性化血小板マーカーの検出法としては, 表 1 のようにモノクローナル抗体による細胞膜抗原⁵⁾, 血小板プロコアグulant 活性による表面リン脂質変化⁶⁾, 血小板由来マイクロパーティクル (PDMP)⁷⁾ な

^{*1} 東海大学医学部東洋医学講座 [〒 259-1193 神奈川県伊勢原市望星台]

Department of Oriental Medicine and Center for Complementary and Alternative Medicine, Tokai University School of Medicine [Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan]

Tel: 0463-93-1121 (内線 2249) Fax: 0463-95-3892 e-mail: mie@is.icc.u-tokai.ac.jp

^{*2} 東海大学医学部東京病院 脳卒中・神経センター [〒 151-0053 東京都渋谷区代々木 1-2-5]

Center for Stroke and Neurological Diseases, Tokai University Tokyo Hospital [1-2-5 Yoyogi, Shibuya, Tokyo, 151-0053, Japan]

表1 Flow cytometry による活性化血小板の検出

- I. 活性化血小板認識モノクローナル抗体⁵⁾¹⁵⁾
 活性化による表面抗原 (抗体名)
 ① GPIIb/IIIa の立体構造変化
 構造変化によるフィブリノーゲン結合部位の出現 (PAC1)
 リガンド結合による GPIIb/IIIa レセプターの構造変化 (LIBS1, LIBS6)
 GPIIb/IIIa レセプターに結合したフィブリノーゲンの構造変化 (2G5, 9F9, F26)
 ② 細胞内顆粒の膜糖タンパクの表出
 CD62P (F-selectin) (α 顆粒より) (S12, AC1.2, 1E3)
 CD63 (Lysozome より) (CLB-gran/12)
 LAMP-1 (Lysozome より) (H5G11)
 LAMP-2 (Lysozome より) (H4B4)
 CD40L, CD154 (TRAP1)
 ③ 血小板由来蛋白の血小板表面への結合
 Thrombospondin (PS, TSP-1)
 Multimerin (JS-1)
 ④ 血小板プロコアグulant 活性による表面の変化
 Factor V/Va 結合 (V237)
 Factor X/Xa 結合 (5224)
 Factor VIII 結合 (1B3)
- II. 血小板プロコアグulant 活性による表面の変化の検出⁶⁾
 Phosphatidylserine (annexin V*)
- III. 血小板由来マイクロパーティクル (PDMP) の検出 (Flow cytometry, ELISA 法)⁷⁾
 活性化による血小板断片

*は結合分子

図1 血小板の構造

(A) 静止血小板 (B) 活性化血小板 CD62P; P-セレクトリン, MoAb CD62P; 抗 CD62P モノクローナル抗体, Fibrinogen; フィブリノーゲンレセプター, MoAb CD61; CD61 モノクローナル抗体. 血小板は刺激を受けると静止状態から活性化状態に変化する. 活性化血小板マーカー PAC1 と MoAb CD62P は静止状態では結合できないが活性化すると発現する糖タンパクに結合できる.

どの検出など数種類が挙げられる。3 color・flow cytometry 法とは、3 種類の蛍光色素で標識されたモノクローナル抗体と flow cytometry を用いて血小板の活性化状態を感度良く検出する方法である。本稿で紹介する3 種のモノクローナル抗体は図1に示すように①血小板を認識するモノクローナル抗体 (GPIIIa 認識抗体抗 CD61 抗体)、②2 種類の活性化血小板特異的モノクローナル抗体 (フィブリノゲン レセプター認識抗体 PAC1, P-セレクチン認識抗体抗 CD62P 抗体) である。本法の利点として、全血小板認識抗体 (抗 CD61 抗体) を同時に用いているため血小板 (CD61 陽性細胞) のみを選択的に取り込むことができる。そのため、非血小板が混在している全血をそのままサンプルとして用いることができ、さらに血小板と赤血球や白血球の断片との区別も可能となる⁸⁾。静止状態の血小板は、抗 CD61 抗体のみしか結合できないが、活性化血小板には抗 CD61 抗体のみでなく活性化の状態に応じて PAC1, あるいは抗 CD62P 抗体 (以下 CD62P), または PAC1 と CD62P の両方に結合できる細胞が存在する。

2. 方 法

方法はすでに報告済みであるが、ここに簡単に記す⁹⁾。図2に示すように、全血小板を認識する Peridinin chlorophyll protein (Per CP) 標識抗 CD61 モノクローナル抗体とフィブリノゲン レセプター認識抗体 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 PAC1 および P-セレクチンを認識する Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD62P モノクローナル抗体 (すべて BD バイオサイエンス, CA) の入ったカクテルにクエン酸血を添加後、暗所で15分反応させ、1%パラホルムアルデヒドにて固定した。次いで、FACScan (BD バイオサイエンス, CA) にて測定、Cell Quest で解析した。陰性コントロールとしては、PAC1 の結合を妨げるブロックペプチドとしてアルギニン、グリシン、アスパラギン酸、セリン

図2 3 color flow cytometry による活性化血小板検出法

(RGDS) (Sigma Aldrich, CA, USA) と抗 CD62P モノクローナル抗体のコントロールとして、マウス IgG の入ったカクテルを用いた。図3に示すように、測定は抗 CD61 抗体陽性細胞を10,000 個取り込み (図3 ①), 取り込んだ細胞をもとに解析を行なった。解析は、陰性コントロールにて陰性領域に血小板細胞が99%以上含まれるようにセッティングマーカをセットし、それより強い蛍光強度をしめす血小板を陽性血小板とし、その陽性率をもって活性化の指標とした (図3 ②)。

3. 基礎的検討

ここに活性化血小板検出法の臨床応用に向けて我々が行った検討結果のいくつかを紹介する⁸⁾⁻¹⁰⁾。

* 抗凝固剤の選択

血栓症患者における活性化血小板の検出を検討するため、まずは検査に適した抗凝固剤の検討を行なった (図4)。抗凝固剤は5 種類を用い ACD, 3.13% クエン酸ナトリウム, ヘパリン, EDTA-2K (以上、テルモ(株), 東京), 終

図3 活性化血小板陽性率の解析

全血から血小板陽性細胞 (CD61 陽性細胞) を 10,000 個取り込み (①), 陰性コントロールによりマーカーを設定し, それより強い蛍光強度をもつ細胞を陽性細胞とした (②)

図4 活性化血小板陽性率への各種抗凝固剤の影響

(A); PAC1 陽性率 (%), (B); CD62P 陽性率を示す。

濃度 100 μ M アルガトロバン (第一製薬(株), 東京) について検討した。易活性化状態をより反映できる抗凝固剤を決定するため, 健常者検体を用い各種抗凝固剤の活性化血小板陽性率と ADP 惹起による活性化血小板の反応性を検討し, また一部の抗凝固剤については, 同時に血

小板数や顕微鏡下での血液像も確認した。その結果, ヘパリン血では無刺激にもかかわらず, すでに血小板の活性化が亢進し, ばらつきも大きかった。一方で EDTA 血を用いた場合の CD62P 陽性率は ACD 血, クエン酸血と同様であったが, PAC1 陽性細胞はほとんど出現しな

表2 活性化血小板検出の基礎的知識

採血法	真空法はシリンジ法より活性化されやすい
採血から抗体反応までの放置時間	易活性化状態の検体は活性化されやすいか15分以内は安定
固定後保存可能期間	固定後冷暗所で、1週間は安定
血漿フィブリノゲン濃度の影響	影響なし（検討したフィブリノゲン 880mg/dl まで）
測定の実現性	再現性はCD62P, PAC1 陽性率ともに良好
日内変動	活性化は朝亢進している（採血時間は一定にすべき）

文献8)を一部改変

表3 採血法と注意事項

<p>➤ 脈血帯をゆるく締め、21G 針付真空採血管を使用</p> <p>➤ 採血管は、3.13%クエン酸 2ml × 1本を使用</p> <p>➤ 1本目は捨て、2本目以降を検体とする（2シリンジ法）</p> <p>➤ 採血後は、ゆっくり転倒混和（2-3回）</p> <p>注意事項；</p> <p>* 採決後 15分以内に処理するため、採血前に必ず連絡してください</p> <p>* 採血困難な場合は伝票に必ず記入してください</p> <p>* 抗凝固剤の比率を一定にするため、必ず 2ml（最後まで）採血してください</p>

かった。これは、EDTA がキレート薬であるため細胞外 Ca^{2+} の抑制により Ca^{2+} 依存性のフィブリノゲン レセプターが発現しなかったためと考えられる。以上のことからヘパリン、EDTA 血は易活性化状態を把握する目的においての活性化血小板の検出には不适当と結論された。また、ACD、クエン酸およびアルガトロバン血を用いた場合の無刺激時の活性化血小板陽性率は、PAC1 と CD62P 陽性率ともに反応性を良好にとらえられた。しかし、ADP 刺激における活性化血小板の検討において、ACD 血では ADP 刺激に反応しない例が 10 例中 3 例存在し、酸性下条件での血小板膜の安定化により血小板がより活性化しにくい状態にあると考えられた（データ表示せず）。そのため、ACD 血も血栓症患者など易活性化状態をとらえる目的には適さないといえる。アルガトロバン血は、ヘパリン血同様とくに PAC1 陽性率にばらつきがあった。また、血球算定で使用する EDTA 血を対照に血小板数を検討した結果、クエン酸採血での血小板数 ($20.4 \pm 5.1 \times 10^4 \text{ plt}/\mu\text{l}$) は EDTA 血の血小板数 ($20.1 \pm 7.2 \times 10^4 \text{ plt}/\mu\text{l}$) と変わらないが、アルガトロバン血の血小板数 ($11.4 \pm 2.0 \times 10^4 \text{ plt}/\mu\text{l}$) は EDTA 血

に比べ、有意に減少していた ($p < 0.001$)。その全血を顕微鏡下で確認したところ血小板が相互に凝集していたことが明らかとなった（未発表データ）。以上よりこの 5 種類の抗凝固剤のうち生体内の易活性化状態をより反映できる抗凝固剤として、我々はクエン酸血を採用することとした。

*その他の基礎的検討

その他、我々の基礎的検討を表2に紹介する⁸⁾。この結果を参考に、採血から反応までの時間や、固定後の保存期間、採血時間を一定にするなどの規定を設け、さらに最もアーチファクトを生じやすい採血から反応までの操作は、方法の画一化と手技の安定化を図るため、採血マニュアルを作成した（表3）。これにより当施設とその関連施設においては、採血および検体処理による結果のばらつきを抑えることができた。当施設での採血マニュアルの特徴は、採血法に真空採血による2シリンジ法を採用したことである。これは血小板活性を誘発してしまう可能性が否定できなかったが、本検査を広く普及させる目的のために敢えて行なった。例えば血漿トロンボグロブリン ($\beta\text{-TG}$) や血小板第4因子 (PF4) の測定のように、真空採血法

やカテーテルからの採血は行わず、シリンジ採血のみという制限をつけると、中央検査室への採血依頼が困難となるため、我々は真空法を採用しルーチン検査の一環として本検査を取り入れることを可能とした。

4. 臨床的検討

* 慢性期脳梗塞患者における活性化血小板の検討

我々は、急性期および慢性期脳梗塞患者における活性化血小板マーカー PAC1, CD62P がともに健常者と比較して有意に (PAC1, CD62P ともに $p < 0.001$) 亢進していることをすでに報告済みである¹¹⁾。また、慢性期脳梗塞患者についての抗血小板薬投与前後における血小板活性化マーカー、PAC1 および CD62P 陽性率のモニタリングも個々に行なった。結果は、病型 (アテローム血栓性脳梗塞やラクナ梗塞) のいずれにおいても、抗血小板剤の効果は症例によりさまざまであった。

* 閉塞型睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) における活性化血小板の検討

血栓性疾患の発症頻度が高いことで知られている閉塞型睡眠時無呼吸症候群¹²⁾ (以下 OSAS) 94 例において活性化血小板の出現率を検討した。その結果、活性化血小板マーカー PAC1, CD62P ともに健常者群に比べ OSAS 群は、有意に亢進していることが明らかになった (PAC1 $p < 0.001$, CD62P $p < 0.005$)。以上より、血小板活性化が OSAS における血栓性疾患の発症に一部関与している可能性が示唆された。さらに、OSAS の代表的治療法である経鼻式持続陽圧気道 (CPAP) 療法による活性化血小板の変動を検討したところ、CPAP 療法にて活性化血小板が正常化する群としない群に分かれ、正常化しない群には血栓性疾患が確認された。つまり、CPAP 療法により気道が確保され、睡眠構築が改善され血中カテコールアミンの上昇や血管狭窄が回避されたにも拘らず、活性化血小板の亢

進が持続している場合は、おそらくそれ以外の活性化血小板出現要因、つまり血栓性疾患発症の可能性が考えられる、と報告した¹³⁾。

5. 活性化血小板マーカーが亢進する可能性のある疾患および病態

活性化血小板マーカーが亢進する可能性のある疾患および病態^{4) 15)} には 1) 不安定狭心症や急性期心筋梗塞、2) 急性冠虚血時の血管形成術や心・肺バイパス術後、3) 一過性脳虚血や脳梗塞発作^{11) 14)}、4) 糖尿病などがある。また活性化血小板発現のリスクには 5) 喫煙、6) 過剰なストレス、7) 炎症、8) 妊娠などがある。

6. 今後の展望

Flow cytometry による活性化血小板検出の将来の展望として、脳梗塞のリスクファクターとして知られている 1) 高血圧、高脂血症、糖尿病あるいは閉塞型睡眠時無呼吸症候群¹³⁾ など脳梗塞予備軍における脳梗塞発症の予知、2) 脳梗塞急性期および慢性期の再発作の予知、3) 心筋梗塞の再発作の予知、4) 血管形成術前の活性化血小板の検査により術後の再梗塞発症を予測可能、となるほか 5) 血小板をターゲットとした抗血小板薬適応者の選別、さらに抗血小板薬服用による効果判定など、血栓性疾患の治療戦略に利用できることが期待される。

7. おわりに

今回は、flow cytometry による活性化血小板の検出法について基礎的および臨床的面から解説した。flow cytometry による活性化血小板の検出法は全血のまま、簡便、迅速に測定可能で、定量性があるため抗血小板薬適応患者の選択、抗血小板薬の効果判定およびモニターに適している。現在まだ十分なエビデンスがあるとはいえないが、血栓性疾患についての血小板機

能亢進や、活性化状態の把握という点で、何らかの検査が必要なのは言うまでもなく、血栓性疾患の治療においても抗血小板薬適応者を的確に判断した上に、個々の患者にあう抗血小板薬を選択していくいわゆる *tailor-made medicine* が重要であると考え、その点において今後、*flow cytometry* による活性化血小板の検出法が血栓症の予知に関する一つの担い手になることを期待したい。

文 献

- 1) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* **326** : 310-318, 1992.
- 2) George JN, Shattil SJ: The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med* **324** : 27-39, 1991.
- 3) Schattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA: Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* **70** : 307-315, 1987.
- 4) Michelson AD: Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* **87** : 4925-4936, 1996.
- 5) Michelson AD, Bernard MR, Krueger LA, Frelinger AL III, Furman MI: Flow cytometric analysis of platelet function. : In Gresele P, Page CP, Fuster V, Vermynen J (eds): *Platelets*. UK, Cambridge, 2002, 485-498.
- 6) Kington JK, Bayly WM, Sellon DC, Meyers KM, Wardrop KJ: Measurement of the activation of equine platelets by use of fluorescent-labeled annexin V, anti-human fibrinogen antibody, and anti-human thrombospondin antibody. *Am J Vet Res* **63** : 513-519, 2002.
- 7) 小関靖, 野村昌作: 血小板由来マイクロパーティクルの測定法—利点と問題点—. *日本血栓止血学会誌* **15** : 286-292, 2004.
- 8) 清水美衣, 田中由美子, 安藤泰彦: フローサイトメトリー法による血小板膜抗原測定の意義とその注意点. *日本検査血液学会雑誌* **4** : 99-108, 2003.
- 9) 清水美衣, 安藤泰彦, 武井美恵子, 宮地勇人, 田中由美子, 川田勉: 全血を用いた活性化血小板測定法の基礎的検討 I. 血小板同定, 採血所要時間, 放置時間および Iloprost の影響について. *臨床病理* **49** : 402-407, 2001.
- 10) 清水美衣, 安藤泰彦, 小原さおり, 田中由美子, 宮地勇人, 布施川久恵, 山本正博: フローサイトメトリー法を利用した活性化血小板の基礎的検討—同時再現性, 固定後の安定性惹起物質反応性に関する検討—. *日本検査血液学会雑誌* **3** : 157-163, 2002.
- 11) 清水美衣, 山本正博, 安藤泰彦, 田畑修, 篠原幸人: 急性期および慢性期脳梗塞患者における活性化血小板の検出. *脳卒中* **24** : 234-239, 2002.
- 12) Sanner BM, Konermann M, Tepel M, Groetz J, Mummenhoff C, Zidek W: Platelet function in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* **16** : 648-652, 2000.
- 13) Shimizu M, Kamio K, Haida M, Ono Y, Miyachi H, Yamamoto M, Shinohara Y, Ando Y: Platelet activation in patients with obstructive sleep apnea syndrome and effects of nasal-continuous positive airway pressure. *Tokai J Exp Clin Med* **27** : 107-112, 2002.
- 14) Yamazaki M, Uchiyama S, Iwata M: Measurement of platelet fibrinogen binding and p-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction. *Thromb Res* **104** : 197-205, 2001.
- 15) Michelson AD and Shattil SJ: The use of flow cytometry to study platelet activation. In Watson SP, Authi K (eds): *Platelet Function and Signal Transduction: A Practical Approach*. UK, Oxford 1996, pp. 111-129.