◆診断・技術講座◆

Flow chamber システムによる血小板 血栓の解析

田村 典子*

Analysis of platelet thrombus, using flow chamber systems

Noriko TAMURA *¹

Key words: platelet thrombus, collagen, von Willebrand factor,
calcium oscillation, shear stress.

田村典子

1994年 日本女子大学家政学部卒業
1996年 千葉大学大学院園芸学研究科修士課程修了
1996~2000年 株式会社特殊免疫研究所勤務
2000年 東海大学医学部循環器内科研究員
現在に至る
2005年 博士医学(東海大学医学部)

はじめに

血小板血栓の形成メカニズムは、Born¹⁾の開発した血小板凝集系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 (adenosine 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されていた^{2)~4)}。しかし、生体内の血流条件下において、血小板は動脈硬化巣のような血管壁の損傷部位に集積し、血流で曝露されたコラーゲンとの相互作用、コラーゲンに結合する血漿蛋白 von Willebrand 因子 (VWF) との相互作用が血栓形成に必須の役割を果たしている^{5)~6)}。Flow chamber システムは、血管壁の損傷部位で血流に曝露されるマトリックスを固相化した血管壁損傷モデルである。血管内皮下のマトリックス、コラーゲンを固相化したガラス表面上に、抗凝固処理したヒトの全血を灌流することにより、顕微鏡下で血小板血栓の成長を観察することが可能である⁷⁾。本システムの特徴には血小板血栓を形成する過程において、1) ずり応力による血小板の活性化と 2) コラーゲンによる血小板の活性化が大きく関与している。本実験では抗凝固剤として高い

濃度の選択的可逆的抗トロンビン薬アルガトロバンを用いているが、室温での実験にも関わらず血小板血栓はこれらの強力な刺激を受けてコラーゲン表面に血小板血栓を形成する。動物モデルとは異なり、ヒトの血管壁損傷モデルとして健常人の血液を用いることにより、より純粋な実験系として臨床データとの比較が可能である。また血流速度を調節した血流条件下で、リアルタイムに血小板血栓の成長過程を経時的にイメージングできることが最大の特徴である。本実験系では高速レーザー共焦点顕微鏡を用いることにより血小板血栓の成長過程を3次元的に動的に観察することを可能にした^{8)~9)}。本稿では、Flow chamber システムを用いた血管壁損傷モデルにおける血小板血栓の実験例を紹介したい。

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常人より、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。採血直後に選択的可逆的抗トロンビン薬であるアルガトロバン (三菱化学製、終濃

* 東海大学医学部内科学系 [〒 259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143]

Department of Medicine, Tokai University School of Medicine [143 Shimokasuya Isehara, Kanagawa 259-1143, Japan]

Tel: 0463-93-1121 e-mail: htamura@is.icc.u-tokai.ac.jp

図1 Flow chamber システムと血流条件下での血小板血栓の形成

血小板と白血球を蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡にて血流条件下の血小板血栓を観察した。Flow chamber 内のガラスプレート上に固相したコラーゲン上に、血小板は粘着し、血栓を形成した。

度 $100 \mu\text{M}$) を添加し抗凝固処理を行なった。アルガトロバンにより抗凝固処理した血液には、血小板と白血球の濃染顆粒が選択的に染まるメパクリン (quinacrin dihydrochloride; Sigma 製, 終濃度 $10 \mu\text{M}$) を添加し、血球成分の蛍光標識を行なった¹⁰⁾。血小板と白血球は大きさが異なるために顕微鏡下で識別が可能であり、赤血球の存在下においても、蛍光顕微鏡により血栓の成長過程を観察することは可能である。

2. Flow chamber システムの作成

牛アキレス腱由来のI型コラーゲン (Sigma 製) に6%の酢酸水を添加し、室温で10分間浸透させた。ハンドホモゲナイザー (Dremel racine 製) によりコラーゲン繊維の破碎を20分間行なったのち、1,000 rpm 10分間遠心にて大きなコラーゲン繊維を除去した。回収した上清を再度3,000 rpm 30分間遠心し、脂分を含む上清を除去し、沈殿を6%の酢酸水にて懸濁した。ガラスプレート ($24 \times 50 \text{ mm}$; Matsunami Glass 製) をアルコールにてよく脱脂乾燥させ、調整したコラーゲン溶液を $200 \mu\text{l}$ 塗布した。室温のデシケータ内で2時間乾燥させた後、使用直前に HEPES 緩衝液 (pH7.4) で湿潤させた。コラーゲンを固相化したガラスプレートを平行平板 Flow chamber に設置し、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全血を Flow chamber 内に灌流した。Hele-Shaw 型の Flow chamber¹¹⁾ の使用により、chamber 内の部位による異なる壁すり速度の条件下で血栓形成を倒立蛍光顕微鏡により経時的に観察した (図1)。蛍光顕微鏡 (DM RB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH) の画像は、デジタル CCD カメラ (Penguin Pro 600CL Pixera 製) を用いてコンピュータ (Windows XP10, Microsoft 製) にデジタル画像として取り込んだ (図2)。得られた画像は NIH Image 1.63 (シェアウェア) を用いて解析した。血小板血栓は高すり速度 ($1,500 \text{ s}^{-1}$) 条件下では、コラーゲン上に形成される血小板血栓の顕著な2次元的成長が観察された。一方、低すり速度 (100 s^{-1}) では、個々の血小板血栓の成長は緩やかであった。また、Flow chamber システムではリアルタイムにガラスプレート上に固相化したマトリックスと血小板との粘着反応を観察することが出来る^{12) 13)}。図3はコラーゲンと von Willebrand Factor (VWF) のマトリックス上に血液を灌流した時の血小板の軌跡を示している。高すり速度条件下では血小板は強力なコラーゲン刺激により活性化され、コラーゲン結合膜蛋白

図2 血小板血栓の2次元成長

コラーゲン上の血小板血栓は2次元的な成長が観察された。Shear speedの速い条件下では、血小板血栓の成長は促進した。

図3 固相化したマトリックスと血小板の粘着

$1,500 \text{ s}^{-1}$ のずり速度では、マトリックスがコラーゲンの時には、血小板はコラーゲンに粘着後の移動距離は短く、粘着が強力であることが認められた。VWFがマトリックスの時には、血小板は粘着後しばらく VWF 上を転がる様子が、軌跡として認められた。

Goto S et.al 2006. JACC改変

図4 高速レーザー共焦点顕微鏡

A. 高速レーザー共焦点顕微鏡。ピエゾモーターを用いて対物レンズを上下動させることにより、血小板血栓を3次的に解析した。B. NIH イメージを用いて血小板血栓を3次的に投影したイメージングが可能になった。

Glycoprotein VI (GPVI) と Glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa), およびコラーゲン表面に結合した血流中の VWF へ、VWF 結合膜蛋白 Glycoprotein Ib α (GPIb α) と Glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) が強力に粘着する。そのためコラーゲン表面上での血小板の移動距離は短く、血小板による軌跡はほとんど認められなかった ($0.38 \pm 0.49 \mu\text{m}$)。一方 VWF 表面では血小板が GPIb α と GPIIb/IIIa を介して粘着し、VWF 表面上を転がっていった軌跡が観察された ($3.03 \pm 2.52 \mu\text{m}$)。

3. 高速レーザー共焦点顕微鏡イメージングシステムを用いた血小板血栓の3次元構造の解析

高速レーザー共焦点顕微鏡を用いて血小板血栓の3次元的な形態評価を行なった(図4A)。高速レーザー共焦点顕微鏡は20,000のピンホールを有する円盤を高速回転させ、共焦点ユニット(CUS10, 高速タイプ, 横河電機)と画像増強システム(SRUB GEN III+, Solamer, イ

ンターメディカル)を用いることによりビデオレートでの共焦点画像の撮影を可能とした⁹⁾。ピエゾモーターユニットを用いて対物レンズを $0.8 \mu\text{m}$ /秒の一定速度で上下させ底面から上面までの血栓の断像イメージを連続的に記録した(図4B)。血栓の成長過程で観察部位を一カ所に固定し、記録した断層像を重ね合わせることで、血小板血栓の3次元の投影像を再構成することが可能となった(図4B)。図5はコラーゲン上に形成された血小板血栓の3次元的な成長を経時的に観察した結果である。血小板血栓は、横方向の2次元的な成長と同様、高さ方向の成長も認められた。

図6はこの実験系を用いて、あらかじめコントロール全血によりコラーゲン上に形成させた血小板血栓に対する、Glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) の阻害薬の作用効果を検討したものである⁸⁾。コントロールの全血を引き続き6分間灌流したときには、血小板血栓の3次元的な成長が観察された。GPIIb/IIIa 阻害薬を作用

図5 血小板血栓の3次元成長

コラーゲン上の血小板血栓の3次元成長を高速レーザー共焦点顕微鏡にて経時的に観察した。血小板血栓は2次元に成長するだけでなく、3次元にも積みあがっていく様子が観察された。

図6 コラーゲン上に形成された血小板血栓におよぼす GPIIb/IIIa 受容体阻害薬の影響

I. コラーゲン上の血小板血栓に、引き続きコントロールの全血を灌流した時の血小板血栓。血小板血栓は2次元、3次元にも成長が認められた。II. コラーゲン上の血小板血栓に、引き続き GPIIb/IIIa 受容体阻害薬を添加した全血を灌流した時の血小板血栓。血小板血栓は2次元のみならず3次元にも一層まで血栓を脆くした。A. 直上投影像 B. 斜め45°投影像 C. 側面投影像

1,500 s⁻¹
Goto S et.al 2004. JACC改変

させた全血を続けて灌流させた時には、血小板血栓は崩れ、血栓の高さは低くなった。このように Flow chamber システムを用いることにより血小板血栓の成長過程と、あらかじめ形成された血小板血栓におよぼす各種阻害薬の効果をリアルタイムにイメージングすることが可能になった。

4. 血流条件下における血小板のカルシウムイオン濃度の観察

活性化した血小板は、VWF-GPIIb α による最初の刺激を受けると、血小板内にカルシウムイオンの流入が生じる^{14) 15)}。Flow chamber システムでは、より生体内での反応に近い血流条件下で、血小板がマトリックスに粘着した時の血小板内のカルシウムイオン濃度の変動を検出することを可能にした。本実験系ではカルシウムインディケータである Fluo-3 AM を用いコラーゲン上に粘着した血小板の血小板血栓形成過程におけるカルシウムイオンの変動を観察した¹⁶⁾。以下サンプルの調整方法を記す。前述の採血した血液を 100 × g 15 分間遠心分離し、多血小板血漿を分離した。多血小板血漿に Fluo-3 AM を終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように添加し、クエン酸ナトリウムを添加後 37 °C で 30 分間反応させた。遠心分離後の赤血球分画はさらに 1,500 × g 10 分間遠心し、血球分画と血漿とを分離した。Fluo 3-AM を含む多血小板血漿を血球分画に混合し 1,500 × g 10 分間遠心後、未反応の Fluo 3-AM を含む上清を取り除いた。HEPES 緩衝液を添加し懸濁後、再度 1,500 × g で 10 分間遠心分離し血球を洗浄した。分離した血漿は Flow chamber に血液を灌流する直前に血球分画に懸濁した。図 7 は高速レーザー共焦点顕微鏡を用い、コラーゲン上に集積する血小板のカルシウムイオン濃度を観察したものである。個々の血小板がそれぞれ独立した一定の周期をもつ、血小板内のカルシウムイオン濃度の増減が観察された。

図 7 コラーゲン上の血小板内のカルシウムイオン濃度
血流条件下でコラーゲンに粘着した血小板はそれぞれ独立した、周期的なカルシウムイオン濃度の増減が認められた。

5. 今後の展望

高速レーザー共焦点顕微鏡による 3 次元的血小板血栓の成長を、複数の波長の異なる蛍光を用いることにより観察するを検討している。これにより血栓中に含まれる血小板のみならず、VWF やフィブリン、組織因子 および血小板血栓中に巻き込まれている各種白血球との関わりを動的にイメージングすることが可能になる。ヒトの血流条件下による血小板血栓の成長をより多面的に解析することが期待される。

謝辞：本研究は東海大学医学部循環器内科にて行なわれたものである。本稿記載にあたり、東海大学医学部内科学助教授、後藤信哉先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Born GVR: Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194** : 927-929, 1962.
- 2) Hollerperter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Julius D, Conley PB: Identification of the platelet ADP receptor targeted by

- antithrombotic drugs. *Nature* **409** : 202–207, 2001.
- 3) Cattaneo M, Gachet C: ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19** : 2281–2285, 1999.
 - 4) Daniel JL, Dangelmaier CA, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP: Molecular basis for ADP-induced platelet activation, I: Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* **273** : 2024–2029, 1998.
 - 5) Goto S: Role of von Willebrand factor for the onset of arterial thrombosis. *Clin Lab* **47** : 327–334, 2001.
 - 6) Back CH, Radbill JR, Crawford DW: Analysis of pulsatile viscous blood flow through diseased coronary arteries of man. *J Biomech* **10** : 339–353, 1977.
 - 7) 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 blockage by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood* **81** : 1263–1276, 1993.
 - 8) Goto S, Tamura N, Ishida H: Ability of anti-glycoprotein IIb/IIIa agent to dissolve platelet thrombi formed on a collagen surface under blood flow condition. *J Am Coll Cardiol* **44** : 316–323, 2004.
 - 9) Genka C, Ishida H, Ichimori K, Hirota Y, Tanaami T, Nakazawa H: Visualization of biphasic Ca^{2+} diffusion from cytosol to nucleus in contracting adult rat cardiac myocytes with an ultra-fast confocal imaging system. *Cell Calcium* **25** : 199–208, 1999.
 - 10) Dise CA, Burch JW, Goodmann DB: Direct interaction of mepacrine with erythrocyte and platelet membrane phospholipid. *J Biol Chem* **257** : 4701–4704, 1982.
 - 11) Usami S, Chen HH, Zhao Y, Chien S, Skalak R: Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Ann Biomed Eng* **21** : 77–83, 1993.
 - 12) Goto S, Tamura N, Eto K, Ikeda Y, Handa S: Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor (P2Y₁₂) in platelet activation initiated by binding von Willebrand factor to platelet GPIb alpha induced by condition of high shear rate. *Circulation* **105** : 2531–2536, 2002.
 - 13) Goto S, Tamura N, Handa S, Arai M, Kodama K, Takayama H: Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions. *Circulation* **106** : 266–272, 2002.
 - 14) Mazzucato M, Paradella P, Cozzi MR, De Marco L, Ruggeri ZM: Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein IIb/IIIa mechanoreceptor. *Blood* **100** (8) : 2793–800, 2002.
 - 15) Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S: Signal events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* **1**(7) : 1602–12 2003.
 - 16) Goto S, Tamura N, Ishida H, Ruggeri ZM: Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling. *J Am Coll Cardiol* **47**(1) : 155–162, 2006.