◆総説：「血小板産生をめぐって」◆

第2部 骨髓巨核球の血小板産生, 分離放出

－ Proplatelet 説批判－

神 前 五 郎

Production and release of platelets by megakaryocytes

Goro KOSAKI

骨髓巨核球より血小板が産生・分離放出されるメカニズムを説明する仮説は2つに大別される。1つは proplatelet モデルであり、他は細胞質破碎（崩壊）モデルである。前者の主役である proplatelet は extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化、 $\beta 1$ チューブリンを包む微小カプセルの破壊という不可逆的な変化を伴う人工産物である。また、proplatelet からの血小板分離・産生は多くの研究にも拘わらず確認されていない。後者については、血小板分画膜を境界とする細胞質小片（血小板野）が分離・分散する状況が位相差顕微鏡観察によって確認され、また固定標本の光顕・電顕観察からも裏打ちされている。血小板野の成立を合理的に説明するために原血小板仮説が提唱された。それについても解説した。

Key words: megakaryocyte, platelet release, protoplatelet, proplatelet, platelet territory

略 語：PP = proplatelet PPF = proplatelet formation

TEM = 透過電顕 SEM = 走査電顕

骨髓巨核球という巨大多核細胞が、核は apoptosis に陥る傍ら、その細胞質全体を多数の血小板に分割して放出するという特異な現象は、Wright の最初の報告（1906）から 100 年間多くの人達によって研究されてきた。しかし、血小板産生・放出のメカニズムについては未だ定説がない。巨核球からの血小板放出はあくまでもそれが形態学的に認知されなければならない。その形態学上の場の上で起こる分子レベルの一連の変化が明らかにされれば、血小板産生・放出のメカニズムも明らかになったと言える。この 100 年間の報告を再評価し、整理して総説を記すこととする^{脚注参照}。

1. Proplatelet (PP) モデルとその矛盾点

血小板産生・放出のメカニズムについて Richardson ら（2005）¹⁾ は、それを2つの対立する説にまとめて論じている。1つは細胞質破碎（崩壊）モデルであり、他は PP モデルである。前者は、巨核球細胞質内によく発達した分画膜が、将来血小板となるべき血小板野をあらかじめ分画し、その分画膜の面で破碎して血小板放出が起こるとする。後者はこれと根本的に異なり、巨核球の全細胞質を PP 突起に作り直して、そこから血小板を放出するという。血小板を構成する小器官や顆粒などが巨核球胞体内で合成されるその場所から PP の先端まで運ばれ

脚注：電顕、光顕像を交えてやや詳しく3編に分けて記述した総説を綜合臨床（永井書店、大阪）2006年8、9、10月号に連載するので参照されたい。

て，そこで *de novo* に将来の血小板として組み立てられると考えている¹⁾²⁾。しかし，PP 形成 (PPF) が起こるのは巨核球の分化成熟が終わった時期であって，ほとんど合成も終わり，顆粒，小器官はすでに所定の位置すなわち血小板野 (将来の血小板) に，血小板として機能できる状態³⁾ で整然と貯えられている。これを取り崩して PP 先端まで運び，再び血小板に組み立てるという自然の理に悖る彼らの考え方は，前にも指摘した⁴⁾ ように何人によっても容認されないだろう。

1a. PP は不可逆的变化を伴う人工産物である。

成熟巨核球が *in vitro* 固体表面に接触し，細胞表面の integrin ($\alpha v \beta 3$)⁵⁾ に ligand (fibronectin)⁶⁾ が結合して活性化する integrin-generated signaling pathway と，トロンボポエチン作用下で活性化している PKC-generated signaling pathway とのクロストークによって刺激が増幅され，ERK (extracellular signal-regulated kinase) の強い活性化がもたらされ⁶⁾，アクチン系の変化⁷⁾，微小カプセルに貯えられていた $\beta 1$ チューブリン⁸⁾ の放出，巨核球本来の微小管のチューブリン脱重合と $\beta 1$ チューブリンも共重合した新しい微小管の形成⁹⁾ が起こって，PP 突起が伸びてくる。 $\beta 1$ チューブリンは流血中の血小板の微小管コイルを構成する β チューブリンの 90% 以上を占める⁸⁾ が，巨核球成熟の後期に初めて特別に合成される。そのとき巨核球本来の微小管に組み込まれることのないように微小カプセル内に隔離した上で，本来の微小管のルールによってすべての血小板野に運ばれ貯えられている⁸⁾。三次元血小板野が分離・放出されて血小板となったとき，新生血小板内で $\beta 1$ チューブリンは解放されて微小管コイル形成に加わり，血小板を円盤状に保つのに役立つ¹⁰⁾。この生理的に必要不可欠な $\beta 1$ チューブリンの微小カプセル内への隔離が破られるという不可逆的な変化が血小板分離前に起こってしまつて， $\beta 1$ チューブリンが PP を支え伸ばして行く微小管に転用される。このことは PPF が非生理的な

現象であることを強く示唆している。

もちろん， $\beta 1$ チューブリンを包む微小カプセルの本態も，それが破られる機序も不明である。ERK 活性化という細胞質の非常事態とどう関係するかも明らかでない。新生血小板が誕生したとき，その微小カプセルが破られるメカニズムも不明である。これらの解明はこれからのことであるが，上記のストーリーはいくつもの事実を柱として組み立てられた合理的なものと筆者は考えている。また，後述 (2b) のように *ex vivo* で巨核球を観察するとき，血小板産生・放出が起こるのは固体表面に長く接触していない巨核球に限られ，長時間経過して PP が形成されると，それからは血小板放出は起こらないことを Radley ら¹¹⁾ や Albrecht^{12) 13)} は強調している。この事実も上記のストーリーが妥当なものであることを示している。

1b. PP よりの血小板放出は確認されていない

巨核球 PP 突起を *in vitro* で長時間観察してもそれから血小板が分離産生されることはない^{14) 15)}。また，*in vivo* で PP から血小板が産生される確かな証拠はないとされている¹⁶⁾。

1c. PPF を伴わずに血小板は放出される

PP モデルに従えば PP ができない条件下では血小板産生・放出は起こらないという²⁾。果たしてそうか。 $\beta 1$ チューブリン^{-/-} マウスでは骨髓巨核球を *in vitro* に取り出しても PP を作ることはできないが，その動物では $\beta 1$ チューブリンを持たないために円盤状となり得ない球状の血小板が，数は正常の 30 数%と減少しているが産生されている¹⁷⁾。また，Wistar ラットに vincristine を注射すると 4～24 時間後に血小板数の減少と平均血小板容積の増大が起こるが，球状の血小板が確実に産生されている¹⁸⁾。さらに，Albrecht の *ex vivo* 巨核球観察では，有糸分裂を阻止し得る濃度のコルヒチン存在下で細胞質崩壊・血小板放出が起こるという¹³⁾。すなわち，巨核球よりの *in vivo* あるいは *ex vivo* 血小板放出は PP を経由することなく起こる。

2. 細胞質破碎モデルは実証されている

2a. *in situ* 観察

Kinosita ら¹⁹⁾は、生きている家兎の大腿骨末梢端近くの骨質に向かい合った2つの穴を開け、2枚の窓ガラスの間に伸びて来た骨髓組織を *in situ* 位相差顕微鏡観察した。すでに萎縮した多核を持ち、髄索内で洞様血管壁に接して、あるいはその近くに存在する成熟巨核球の辺縁部から細胞質の分裂・崩壊が始まり、各方向へ進展し、細胞質は多数の断片（顆粒を内部に持つ新生血小板）となる。それらは互いに離れて組織液中に漂い、周囲に拡散して行く。これが血小板分離であるが、全過程は約5時間を要する。新生血小板は洞様血管壁を通り抜けて循環血中に入り、あとに裸核が残る。洞内に出ていた巨核球が同じように分解して新生血小板で洞内を満たすことがあるという。

2b. *ex vivo* 観察

骨髓組織小片を *in vitro* 位相差顕微鏡観察するとき、ガラス面との接触をできるだけ避けると、PPFを伴わない巨核球から血小板分離の起こるのが見られるという。このような *ex vivo* 観察で、Albrecht は1個の巨核球の細胞質のすべてが爆発的に血小板となって分離するのを見た¹²⁾¹³⁾。爆発的と言っても数時間の経過を要するという。Radley ら¹¹⁾はマウス骨髓組織小片より多数の血小板と、それに混じって巨核球起源の短い細胞突起断片（2個から10個にも及ぶ血小板と思われるものが一列に連なったもの—いわゆる血小板短鎖）が游出してくるのを見た。同じ年、Tong ら²⁰⁾、Handagama ら²¹⁾はそれぞれ別個にこの血小板短鎖を中心静脈血より集めて観察した。その形態学的特徴も同一で、また血小板造血が促進された時に増加するということを3グループが同じく認めている。Tong らのTEMから血小板が縦に細長く伸びて、その細くなった先端で互いに接着して一直線上に並んでいることが分かる。この短鎖は肺循環を通ることによって個々の血小板になるの

であろうとされている²¹⁾。

2c. 固定標本による観察

Wright の先駆的研究の後およそ半世紀を経過した頃まで、解剖学の教科書²²⁾²³⁾にはWright 説も紹介されていたが、現在の細胞質破碎・崩壊モデルと同じ記述がなされていた。例えばBargmann²³⁾は、1個の巨核球細胞質のほとんどすべてが血小板産生に使い尽くされて、そこに雲集している新生血小板の直中に裸核が横たわるのが見られるという。

灌流固定された小動物骨髓について、Behnke²⁴⁾をはじめ多くの人達がTEM観察を行ったが、固定液の灌流によっても流されずに残った細胞の任意の切片についての観察で、参考意見に止まる。著者ら²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾はヒト肋骨骨髓組織片を急いで浸漬（immersion）固定して切片を作りTEM観察を行った。骨髓穿刺にて得た86個を加えて巨核球として認め得た計212個の細胞について、遊走中のため判定不能であった16個を除く196個のすべてについて、いかなる分化成熟過程にあるかを判定することができた。それらは物質合成の盛んな細胞から、やがて特殊顆粒、分泌顆粒を持ち、また血小板分画膜が形成されるというように移り変わって行くが、それは核、遊離リボソーム、粗面小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア（大きさと基質の電子密度）、グリコーゲン顆粒などの変遷消長と合理的に一致するものであった。やがて血小板野を分け隔てる分画膜の2枚のシートの間に間隙が見られるようになり、それまで髄索内において他の細胞と密接して存在した巨核球が、この時期以後血管洞内にしばしば見られるようになる。この196個の巨核球の示す一連の連続的な形態の変化から、筆者らは血小板野形成とそれに続く細胞質破碎モデルを電顕形態学的に確認し得たと考えている。実際に、髄索内にある成熟巨核球の細胞質が辺縁から中心に向かって小片に分離しつつある像、また巨核球裸核に少数の血小板がなお付着している像を得ている。もちろん、巨核球の分化成熟から血小板分離放

出に至る過程に PP の介在する余地はない。なお，Zucker-Franklin ら²⁸⁾ はマウス肺組織の浸漬固定標本で，肺毛細血管内の成熟巨核球から血小板野が血小板として放出される像を報告している。液体培養巨核球を浮遊状態で固定した光顕，電顕（TEM，SEM）像でも細胞質崩壊モデルが確認されている^{29) 30) 31)}。

3. 血小板野形成と原血小板仮説

3a. 巨大多核細胞を構成する構造的機能的単位

細胞間期の 2N 細胞は 1 個の核と，細胞中心に 2 個の中心小体を含む 1 個の微小管形成中心（MTOC）を持っている。MTOC から複数本の微小管が細胞末梢まで走り 1 つの array を作る。微小管は細胞骨格であるとともに細胞中心と細胞末梢を結ぶレールとして小胞，小器官の双方向への運搬にかかわる。核ならびに物質合成の場である細胞中心野と，MTOC に連なる微小管 array に支えられた細胞質が揃って 1 つの構造的単位として細胞の機能が営まれる。細胞融合や細胞分裂を伴わない核分裂によって，たとえば 32N 巨核球が出来上がったとき，TEM 像³¹⁾ より推定すれば 32N の巨大な核に囲まれて細胞中心があり，そこに 32 個の中心小体すなわち 16 個の MTOC がある。それぞれの MTOC からそれぞれ複数本の微小管が出て巨核球表面近くまで到達してそれぞれの微小管 array を作り，それに支持された細胞質小単位が計 16 個存在することになる。物質合成は主として核と細胞中心野で行われるが，合成された物質は小胞，小器官の形でそれぞれの MTOC から伸びる微小管の 1 本 1 本をレールにして，それら細胞質小単位の中を末梢ときに中枢へと運ばれる。1 つの細胞質小単位と他の小単位との境界面には，元はそこにあったかも知れない細胞膜は今では無いが，小胞とか小器官が隣の小単位に移送されることはないだろう。微小管は MTOC を出て分岐することなく最末

梢まで至り，隣の細胞質小単位内に迷入することは考えられないからである。そして，巨核球表面の 1/16 ずつを 16 個の細胞質小単位の末梢表面が担当することになる。これが筆者が推定した 32N 巨核球の機能的構造的実態である。実証はされていないが，次節に述べる Radley の実験は形を変えた 1 つの実証であろう。

3b. Radley の実験と膜流動モデルの矛盾点

Radley ら³²⁾ はマウス骨髓巨核球を *in vitro* で位相差顕微鏡下に 37°C 4 時間保温したところ，全細胞質は十数本の PP となって，萎縮した核を含む細胞中心から放射状に伸びる形となった。それぞれの PP には 10 個かもう少し多い数の三次元血小板野が数珠玉のように見られた。そこで温度を変えて 4°C に保つとチューブリンの脱重合が起こって，2 時間後には微小管という支柱を失った PP は短く太くなって核を中心に集まり，およそ球状に近い元の巨核球の大きさにまとまった。短縮した PP はほぼ同じ太さで，他の PP と融合することもない。この短くなった PP が前節に述べた細胞質小単位に相当するものであると筆者は考えた。さらに同じ細胞を再度 37°C に保温すると，1 時間後には PP は以前のように再び細く長く伸展した。チューブリンの再重合が起こったのである。この奇異に見える現象は，筆者の言う細胞質小単位仮説，原血小板仮説（3c. 参照）から考えれば当然の現象である。

しかし，Radley らは別の観点，膜流動モデルによって説明しようとした。すなわち，第 1 に，TEM で血小板野としての微細構造は認められるが，そこに流血中血小板の特徴である微小管コイルが見られないから，これを将来血小板となるべき血小板野であるとは認知できない。第 2 に，血小板分画膜という名称は間違いで，これは将来 PP 突起が伸びて行く時それを覆う細胞膜の予備として細胞質内にランダムに貯えられたものであって，任意の切片で偶然血小板野を分画する膜に見えたに過ぎないとした。第 1 の問題は，1a に述べたごとく，巨核

球血小板野では $\beta 1$ チューブリンは微小カプセル内に貯えられ、微小管コイルが形成されないのは当然である。第2の問題は、①分画膜が巨核球細胞膜の陥入によってできると考えたとしても、新しく合成された膜成分の補給が無ければ不可能であるが、それへの配慮が足りない。②細胞の形態維持、物質運搬の役割を果たしている巨核球本来の微小管の走行を無視して、ランダムに膜がそこに進入してそれを遮断することは許されない。結局、分画膜は上記の細胞質小単位と隣の小単位の間に伸びて行かざるを得ず、後述する原血小板仮説と同じことになる。

3c. 血小板野の成立と原血小板仮説

上述 (3a) のように多核巨大細胞はその ploidy 数に応じた数の細胞質小単位を持ち、それらはそれぞれの MTOC に連なる微小管 array によって構造的にも機能的にも支えられている。ところが、Radley ら³³⁾ は骨髓巨核球が成熟すると、2 個の中心小体が分離して別方向に動き、単独中心小体としてそれぞれ別個に細胞末梢 (細胞膜の近く) に到着していることを連続切片電顕像から確かめた。これが事実であるとする、上述の細胞質小単位をさらに縦に二分した細胞質小単位、すなわち 1 個の中心小体とそれにかかわる微小管 array の存在を考えた方が良いのであろう。そうすると、16N 巨核球は 16 個の中心小体と 16 個の細胞質小単位より構成されるということになる。

さて、巨核球が ploidy 増加を停止して分化過程に入ると、細胞中心野で合成された各種素材がそれぞれの細胞質小単位に分配され、その中をさらに微小管をレールとして末梢にまで運ばれる。特殊顆粒、濃染顆粒を含む細胞小器官が順次蓄積され、微小管以外の細胞骨格とともに三次元血小板野が構成され、1 個の細胞質小単位の中に中枢から末梢へと巨核球本来の微小管に貫かれた複数個の三次元血小板野が一列に並んだ形が出来上がる。この時期に、細胞膜の構成成分リン脂質分子は小胞体膜で産生され、別に合成されたタンパク質、糖などとともにゴル

ジ体で最終的に血小板分画小胞の形にまとめられて、各細胞質小単位に分配され、微小管を介して各小単位の末梢、すなわち細胞質小単位と隣の小単位の接する面に送られるのであろう。この分画小胞の融合によって分画膜が形成され³⁴⁾、巨核球表面から巨核球中心部へとつながる分画膜系が、あたかも細胞膜が陥入して細胞中心まで進んだかのごとく形成される。核と細胞中心野を共有し、各個の中心小体を出発点とする 1 つ 1 つの細胞質小単位が分画膜によって互いに隔てられてはいるが、1 個の成熟巨核球として存在することになる。三次元血小板野が細胞中心から末梢へと一列に連なり分画膜に覆われているこの細胞質小単位を筆者は原血小板 (protoplatelet) と名付けた³⁵⁾。

原血小板を内包する成熟巨核球が固体表面に接触して integrin の ligation が起こると各原血小板はそれぞれ伸長して PP 突起を作る。他方、PPF と無関係な成熟巨核球はその表面に近い部分から各個の原血小板に分かれ、各原血小板がそれぞれの三次元血小板野に分断されて血小板放出が起こる。ただし、この詳しいメカニズム (特に後者の) は不明である。すでに 2b に述べたごとく、血小板造血促進状態では血小板短鎖が放出される。このことは、成熟巨核球内に三次元血小板野が一列に並んだ形の原血小板が前もって作られているという筆者の原血小板仮説を支持するものであろう。

(2006. 3. 20. 記)

文 献

- 1) Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE Jr: Mechanism of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* **106** : 4066-4075, 2005.
- 2) Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH: Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* **147** : 1299-1312, 1999.
- 3) Radley JM, Hartshorn MA, Green SL: The response of megakaryocytes with processes to thrombin. *Thromb Haemost* **58** : 732-736, 1987.
- 4) Kosaki G: *In vivo* platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *Int J Hematol* **81** : 208-219, 2005.

- 5) Leven RM, Tablin F: Extracellular matrix stimulation of guinea pig megakaryocyte proplatelet formation *in vitro* is mediated through the vitronectin receptor. *Exp Hematol* **20** : 1316-1322, 1992.
- 6) Jiang F, Jia Y, Cohen I: Fibronectin- and protein kinase C-mediated activation of ERK/MAPK are essential for proplateletlike formation. *Blood* **99** : 3579-3584, 2002.
- 7) Rojnuckarin P, Kaushansky K: Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase C α . *Blood* **97** : 154-161, 2001.
- 8) Lewis SA, Gu W, Cowan NJ: Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell* **49** : 539-548, 1987.
- 9) Lecine P, Italiano JE Jr, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA: Hematopoietic-specific β 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* **96** : 1366-1373, 2000.
- 10) Italiano JE Jr, Bergmeier W, Tiwari S, Falet H, Hartwig JH, Hoffmeister KM, André P, Wagner DD, Shivdasani RA: Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* **101** : 4789-4796, 2003.
- 11) Radley JM, Hartshorn MA: Megakaryocyte fragments and the microtubule coil. *Blood Cells* **12** : 603-610, 1987.
- 12) Albrecht M: Studien zur Thrombocytenbildung an Megakaryocyten in menschlichen Knochenmarkkulturen. *Acta Haematol* **17** : 160-168, 1957.
- 13) Albrecht M: Untersuchungen zur Thrombozytenbildung an Megakaryozyten *in vitro*, in Marx R (ed): *Der Thrombozyt*. München, Lehmanns, 1969, 44-51.
- 14) Thiéry JP, Bessis M: Mécanisme de la plaquetogénèse: étude "*in vitro*" par la microcinématographie. *Rev Hématol* **11** : 162-174, 1956.
- 15) Haller CJ, Radley JM: Time-lapse cinemicrography and scanning electron microscopy of platelet formation by megakaryocytes. *Blood Cells* **9** : 407-418, 1983.
- 16) Choi ES, Hokom MM, Chen JL, Skrine J, Faust J, Nichol J, Hunt P: The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis. *Br J Haematol* **95** : 227-233, 1996.
- 17) Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE Jr, Hartwig JH, Shivdasani RA: A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol* **11** : 579-586, 2001.
- 18) Stenberg PE, McDonald TP, Jackson CW: Disruption of microtubules *in vivo* by vincristine induces large membrane complexes and other cytoplasmic abnormalities in megakaryocytes and platelets of normal rats like those in human and Wistar Furth rat hereditary macrothrombocytopenias. *J Cell Physiol* **162** : 86-102, 1995.
- 19) Kinoshita R, Ohno S: Biodynamics of thrombopoiesis, in Johnson SA, Monto RW, Rebuck JW, Horn RC (eds): *Blood Platelets*. Boston, Little Brown, 1961, 611-616.
- 20) Tong M, Seth P, Penington DG: Proplatelets and stress platelets. *Blood* **69** : 522-528, 1987.
- 21) Handagama PJ, Feldman BE, Jain NC, Farver TB, Kono CS: Circulating proplatelet: isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss. *Am J Vet Res* **48** : 962-965, 1987.
- 22) Maximow A: Megakaryocyten, in Möllendorff W (ed): *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, 2ter Band, 1ter Teil. Berlin, Julius Springer, 1927, 405-409.
- 23) Bargmann W: *Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Stuttgart, Georg Thieme, 1959, 317-318.
- 24) Behnke O: An electron microscope study of the rat megakaryocyte, II: some aspects of platelet release and microtubules. *J Ultrastruct Res* **26** : 111-129, 1969.
- 25) 神前五郎, 田中健一, 井下勝男: 骨髓巨核球の分化と血小板産生過程の電顕的観察. *日血会誌* **36** : 383-384, 1973.
- 26) Kosaki G, Inoshita K, Okuma H: Electron microscopic studies on human thrombocytopoiesis, in Didisheim P, Shimamoto T, Yamazaki H (eds): *Platelets, Thrombosis and Inhibitors*, Stuttgart, Schattauer, 1974, 97-102.
- 27) 神前五郎, 藤本高義: 血小板形態, 脇坂行一, 安部 英, 安永幸二郎, 編集, 新版日本血液学全書 11巻; 出血性素因・基礎. 東京, 丸善, 1979, 1-55.
- 28) Zucker-Franklin D, Philipp CS: Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol* **157** : 69-74, 2000.
- 29) Zucker-Franklin D, Petrusson S: Thrombocytopoiesis: analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megakaryocytes. *J Cell Biol* **99** : 390-402, 1984.
- 30) Straneva JE, Goheen MP, Hui SL, Bruno E, Hoffman R : Terminal cytoplasmic maturation of human megakaryocytes *in vitro*. *Exp Hematol* **14** : 919-929, 1986.
- 31) Falcieri E, Bassini A, Pierpaoli S, Luchetti F, Zamai L, Vitale M, Guidotti L, Zauli G : Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat Rec* **258** : 90-99, 2000.
- 32) Radley JM, Haller CJ: The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* **60** : 213-219, 1982.
- 33) Radley JM, Scurfield G: The mechanism of platelet release. *Blood* **56** : 996-999, 1980.
- 34) Yamada E: The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)* **29** : 267-290, 1957.
- 35) 神前五郎: 微細構造より見た骨髓巨核球よりの *in vivo* 血小板分離. 果してそれは proplatelet を經由するか. —新しい概念 "proplatelet" の提唱— *血栓止血誌* **14** : 495-506, 2003.