◆診断・治療・技術講座◆

血小板由来マイクロパーティクル測定法 —フローサイトメトリー法—

小関 靖^{*1}, 野村昌作^{*2}

Assay for Platelet-Derived Microparticles
—Flowcytometry Method—

Yasushi OZEKI^{*1}, Shosaku NOMURA^{*2}

Key words: microparticles, flowcytometry, platelets

小関 靖

1988年 3月 九州大学理学部生物学科 卒業
1990年 3月 大阪大学大学院医科学研究科 修了
1990年 4月 大塚製薬株式会社 新薬第三研究所
1997年 4月 大塚製薬株式会社 血栓血管研究所
1997年 9月 金沢大学医学部 博士号(医学) 取得
2001年 8月 大塚製薬医薬営業本部プロダクト
マネジメントグループ
2006年 7月 サノフィ・アベンティス株式会社

はじめに

血小板由来マイクロパーティクル（以下PDMP）は血小板の放出反応と共に膜の一部がちぎれて放出される粒子であり、フローサイトメトリー（別称：フローサイトメーター、FACS）の画面上では血小板よりも小さい領域に粒子集団として見る事ができる（図1）¹⁾。血小板から放出されるマイクロパーティクルが最初に報告されたが²⁾，その後血管内皮細胞³⁾，単球⁴⁾，好中球⁵⁾，赤血球⁶⁾等の血液・血管構成細胞からも活性化によって同様のパーティクルが放出される事が確認されている。マイクロパーティクルの生理的役割は種々報告されているが，その中で最も重要なものは凝固能促進活性（プロコアグラント活性）⁷⁾であろう。各血球由来のマイクロパーティクルのうち，特に単球由来のマイクロパーティクルに組織因子（TF）が多く認められ，血液凝固促進・血栓形成に大きく関与しているという報告がある⁸⁾。血液凝固系への関与だけでなく，マイクロパーティク

ルは血小板に比べ相対的に高濃度のアラキドン酸や血小板活性化因子（PAF）を含有するという報告⁹⁾や，血管内皮細胞と単球の接着を仲介しているという報告¹⁰⁾もあり，血小板血栓の形成や炎症にも関与していると考えられている。

PDMPの測定法は幾種類か報告されている。古くはGeorgeらによって免疫電気泳動法¹¹⁾が報告され，その後ラジオイムノアッセイ（RIA）法がGeorgeら¹²⁾とVosら¹³⁾によって報告されている。また最近ではELISA法¹⁴⁾⁻¹⁶⁾も報告されている（本誌別稿参照）。

現在一般的に用いられるPDMPの測定法はフローサイトメトリーを用いた測定法であろう。フローサイトメトリー測定のための準備（機器のウォーミングアップ等）に必要な時間は1時間前後で，1検体の測定時間が3~5分程度のため，オートサンプラーが付属していない機器の場合は比較的少数（50本以内）の検体を測定するのに向いている。以下に筆者らが行っているフローサイトメトリー測定法のマニュアルを記載する。

^{*1} サノフィ・アベンティス株式会社 メディカルアフェアズ本部 クリニカルリサーチ部〔〒163-1488 東京都新宿区西新宿三丁目20-2 東京オペラシティタワー〕
Clinical Research Dept. Medical Affairs, sanofi-aventis K.K. [Tokyo Opera City Tower 3-20-2, Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-1488, Japan]
Tel: 03-6301-3379 Fax: 03-6301-3023 e-mail: yasushi.ozeki@sanofi-aventis.com

^{*2} 市立岸和田市民病院血液内科
Hematology, Kishiwada City Hospital

図1 血小板由来マイクロパーティクルの電子顕微鏡写真とフローサイトメトリー画面

A. PDMP 測定用血液サンプルの調製法

1. 採血後直ぐに測定する場合の調製法

血液中を循環している PDMP を定量する場合と、取り出した血小板に刺激を加えて PDMP の産生量を検討する場合は採血時の抗凝固剤が異なる。生体中を循環している PDMP を測定する場合は、採血時の種々の刺激による血小板の活性化（＝人工的な PDMP 産生）を抑えるために、21G 以上の採血針を使用し、抗凝固剤は EDTA 若しくは EDTA/ACD を使用する。逆に採血後血小板を活性化させて PDMP の産生量を検討したい場合は、抗凝固剤はクエン酸を使用する。採血時の駆血帯は通常通り使用し、穿刺直後の血液を捨血する two-syringe 法は行っていない。血小板膜表面の P-selectin 発現や GpIIb/IIIa の活性化（PAC-1）が血小板活性化後非常に早期（数十秒）に起きるのに比べ、血小板膜がちぎれる PDMP 産生は比較的后期に起きる現象であるため、P-selectin 等の測定ほど採血後の検体の取り扱いに注意を払う必要は無いと考えている。

採血した血液は冷却せず、室温で 1000 rpm/10 分 遠心分離して多血小板血漿（PRP）を分取する。PRP の中に PDMP も含まれてい

るため、これを PDMP 測定用の検体として用いる。

2. 凍結保存検体の調整法

採血後血液検体を凍結保存する場合には、遠心分離によって血小板を完全に除去する必要がある。血小板が残存している検体を冷却・凍結すると、血小板が崩壊し PDMP が大量に生成するためである。血小板を除去するための遠心分離の条件は数多くの方法が報告されている。多くは Platelet Poor Plasma → Platelet Free Plasma 調製と多段階の遠心分離を行うもので、G や温度がそれぞれ異なっている¹⁷⁾。検体を凍結・融解した前後での PDMP 量はそれぞれの方法で大きく異なっているが、一般的にはより大きな G で遠心した方が血小板の残存が少なく、安定した値が得られるようである（表 1）。著者らは ELISA 測定法開発の経験から、21G 以上の注射針で採血し、採血後 1 時間以内にマイクロチューブを用いて全血から 1 ステップで Platelet Free Plasma を調製する高速遠心法を行っている（図 4）。詳細は本誌別稿「血小板由来マイクロパーティクル測定法—ELISA 法を中心に—」を参照下さい。

表1 PDMP の分離と保存方法

Methods	Centrifugation Step for Isolation			Storage
	1 st	2 nd	3 rd	
(A) Jimenez	200 xg, 10', RT	1,500 xg, 7', RT		Supernatant -80°C
(B) Horn	1,500 xg, 15', 4°C			Supernatant -80°C
(C) Freyssinet	1,500 xg, 15', 4°C	13,000 xg, 2' RT		Supernatant -80°C
(D) Biro	1,550 xg, 20', 4°C	2x(18,000 xg, 30', RT)		Pellet -80°C
(E) Shet	1,050 xg, 20', RT	13,000 xg, 10' RT	2x (100,000 xg, 1h, 4°C)	Pellet -80°C

JY W, et al. : J thromb Haemosta 2 (10) : 1842-1852, 2004.

B. PDMP 測定に使用する抗体

フローサイトメーター測定による PDMP の同定には、血小板膜表面に存在する糖タンパク質に対する抗体を使用する。血小板膜表面上で最も数の多い糖タンパク質である GpIIb (CD41) または GpIIIa (CD61) に対する標識抗体が多く用いられる。しかし GpIIIa は血管内皮細胞や活性化単球にも発現が確認されており、これらの抗体を使用する場合はその解釈に注意が必要である。筆者らは血小板特異的な糖タンパク質である GpIb の FITC 標識抗体を使用している。PDMP の構成成分は血小板膜成分を含むもの以外に、血小板内部顆粒を含むもの等多岐に渡ると考えられる。全ての血小板由来のパーティクルを測定するには、血小板膜タンパクに対する抗体だけでなく、血小板顆粒膜上にある蛋白の抗体を組み合わせる必要があると考えられる。その他、血小板の活性化によって反転し表出した膜のリン脂質（特にフォスファチジルセリン：PS）に高い親和性を持つリン脂質結合タンパク質：アネキシン V を用いた測定も報告されている¹⁸⁾。目的に応じて使用する標識抗体を選択でき、研究に対して汎用性が高いのがフローサイトメーター測定の利点である。

次頁に我々が行っているフローサイトメーター測定までのサンプル調整のフローチャートを示す。

C. フローサイトメリーの条件設定

1. PDMP 測定ゲートの設定

フローサイトメリーによる測定で一番の問題となるのは、PDMP エリアのゲート設定方法である。筆者らは健常人の PRP を吸引させて血小板のゲートと PDMP のゲートを設定している（図2）が、ゲート設定に主観が入る事は否定できない。一度設定したゲートは、サンプルが代わっても変更しない事が肝要である。客観的に PDMP ゲートを設定するには、Ogura らが行っているように粒子サイズの判っているビーズを流し PDMP のゲートを設定する方法がある¹⁹⁾（図3）。

2. サンプルの取り込み量

フローサイトメリーに取り込ませるサンプル量を一定にする方法もいくつか報告されている。Abrams らはフローサイトメリーの計測速度を一定と仮定して、測定された PDMP を count/sec で表示している²⁰⁾。また計測された血小板数で PDMP 数を補正する方法も報告されている²¹⁾。しかし、これらの方法は検体間で

a-i) 生体中の PDMP 測定用サンプル調製方法

1. EDTA または EDTA/ACD 採血
2. 検体は冷却せずに 1000 rpm/10 分遠心分離にて多血小板血漿 (PRP) を作成
3. PRP 50 μ l に対し FITC 標識-抗 GpIb 抗体 (終濃度 0.5-1 μ g/ml) を添加
4. 対照として全てのサンプルで FITC 標識のネガティブコントロール抗体を添加した検体も作成
5. 暗所にて 30 分留置
6. 一定量のコントロールビーズ (Flow-Count ; Immunotech 社) を加え, 2 ml の PBS (またはシー
ス液) で希釈
7. フローサイトメトリーで測定

a-ii) 血小板活性化後の PDMP 測定用サンプル調製方法

1. 3.8% クエン酸 (1/10 ; v/v) 採血
2. 検体は冷却せずに 1000 rpm/10 分遠心分離にて多血小板血漿 (PRP) を作成
3. シリコン処理したキュベット内で PRP に各種アゴニストを添加し, 37°C で 15 分以上攪拌しながらインキュベーションする
4. 10mM の EDTA/PBS を PRP の 1/10 量添加
5. 室温にて 3000 rpm/20 分遠心して血小板凝集塊を除く
8. 上澄 (PDMP 分画) 50 μ l に対し, FITC 標識-抗 GpIb 抗体 (終濃度 0.5-1 μ g/ml) を添加
9. 対照として全てのサンプルで FITC 標識のネガティブコントロール抗体を添加した検体も作成
10. 暗所にて 30 分留置
11. 一定量のコントロールビーズ (Flow-Count ; COULTER 社製) を加え, 2 ml の PBS (またはシー
ス液) で希釈
12. フローサイトメトリーで測定

b-i) フローサイトメトリーでの測定条件設定

1. Acquire 画面は FSC/SSC と FSC/FL-1 (いずれも log scale) を設定
2. FSC の threshold は 10 に設定
3. 標準ビーズにてキャリブレーションし, Voltage は各器械固有の値を入力
4. 粒子の取り込み量は, 一定量のコントロールビーズを取り込むように設定

b-ii) フローサイトメトリーの解析方法 (図 2 参照)

1. 事前に健常人の PRP を吸引し, FSC/SSC 画面上で血小板のゲートと PDMP のゲートを設定する
2. FSC/SSC 画面の PDMP エリアを FSC/FL-1 画面に展開する
3. FITC 標識のネガティブコントロール抗体を添加した検体で, FITC (+) と (-) の境界 (ゲート) を設定する
4. FITC 標識-抗 GpIb 抗体を添加した検体の FITC (+) 領域を再度 FSC/SSC 画面に展開する
5. FSC/SSC 画面の PDMP ゲートの粒子数をカウントし, その検体の PDMP 量とする

の血小板数がほぼ一定の場合は良いが, 血小板数の減少した検体があると過大評価することになる。実際, 疾病を持つ患者さんの血液では血小板数が減少している検体が少なくない。そこで, このような問題を解決するために PDMP 分画に別調製の濃度の判っている血小板を添加

し, 一定数の血小板を取り込む事によってサンプルの吸引量を調整する方法がある。筆者らはもっと簡便な方法として, 濃度の判っているコントロールビーズ (Flow-Count : COULTER 社製) を一定量サンプルに添加し, 一定量のビーズを取り込む事によってサンプルの取り込み量

図2 フローサイトメトリーによるPDMP解析画面

図3 粒子径計測ビーズによるマイクロパーティクル領域のゲーティング方法

を補正, 最終的には計算によって count/ μL で PDMP 量を表示する方法を採っている。

おわりに

フローサイトメトリーによる PDMP の測定には, ①機器間の感度の違い ② PDMP 領域のゲートの囲み方 ③測定限界の問題 (フローサ

図4 PDMP 測定のための保存検体の調整方法

イトメトリーの測定下限は $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$ と言われており PDMP 測定はこの測定下限付近での計測となるため, 検体中のゴミやノイズが入りやすい。) ④使用する抗体の種類による測定値の違い等の問題を含んでいるものの, 機器さえあれば簡便に測定できるため, 特に臨床研究の分野での報告が近年増えてきている。測定方法の標準化が出来れば, ある程度測定施設間のデータの比較が可能になるのではないだろうか。

現在のところ血小板の活性化をモニターする方法として, 血小板凝集能を測定する方法が一般的であるが, これはあくまでも取り出した血小板の反応性を見る方法である。真に血小板が生体中で活性化しているかどうかをモニターする方法として, 生体中の PDMP を測定する事は意義深いと考える。

文 献

- Inami N, Nomura S, Kikuchi H, Kajiura T, Yamada K, Nakamori H, Takahashi N, Tsuda N, Hikosaka M, Masaki M, Iwasaka T : P-selectin and platelet-derived microparticles associated with monocyte activation markers in patients with pulmonary embolism. *Clin Appl Thromb. Hemosta* **9** : 309-316, 2003.
- Wolf P : Platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **13** : 269-288, 1967.
- Hladovec J, Prerovsky I, Stanek V & Fabian J : Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenschr* **56** : 1033-1036, 1978.
- Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A : Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques : A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* **99** : 34-53, 1999.
- Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y : Blood-borne tissue factor : Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 2311-2315, 1999.
- Biro E, Sturk-Maquin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R : Human cell-derived microparticles promote thrombus formation *in vivo* in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost.* **1** : 2561-2568, 2003.
- Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM : Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta.* **1180** : 1-8, 1992.
- Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B : Accumulation of tissue factor into developing thrombi *in vivo* is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med.* **197** : 1585-1598, 2003.
- Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M : Platelet microparticles : a carrier of platelet-activating factor? : *Biochem Biophys Res Commun.* **218** : 940-944, 1996.
- Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA : Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* **102** : 136-144, 1998.
- George JN, Tholi LL, Mcmanus LM : Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* **60** : 834-840, 1982.
- George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ : Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest.* **78** : 340-348, 1986.
- Vos JJ, Huisman JG, Modderman PW, von dem Borne AE : Detection of circulating human platelet fragments by using monoclonal antibodies against platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *Br J Haematol.* **65** : 447-450, 1987.
- Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Edmunds LH Jr, Niewiarowski S : Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GPIIb/IIIa. *Thromb Haemost.* **80** : 225-230, 1998.
- Osumi K, Ozeki Y, Saito S, Nagamura Y, Ito H, Kimura

- Y, Ogura H, Nomura S : Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost.* **85** : 326-330, 2001.
- 16) Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariépy J, Freyssinet J-M, and Tedgui A : Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26** : 2775-2780, 2006.
- 17) Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP : Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* **2** : 1842-1851, 2004.
- 18) Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, and Key NS : Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood*, **103** : 4545-4553, 2004.
- 19) Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, Koh T, Tanaka R, Ozeki Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H : Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J Trauma* **50** : 801-809, 2001.
- 20) Abrams C, Shattil SJ : Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost.* **65** : 467-473, 1991.
- 21) Nomura S, Shozu A, Omoto S, Hayakawa T, Kagawa H, Nishikawa M, Inada M, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S : Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Thromb Haemost* **80** : 388-392, 1998.