◆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 —ELISA 法を中心に—

金谷一司^{*1}, 野村昌作^{*2}

Assay Methods for Platelet-Derived Microparticle
—Mainly on ELISA Method—

Kazushi KANATANI^{*1}, Syosaku NOMURA^{*2}

金谷一司

1985 年 愛媛大学理学研究科 修了
同年 株式会社 JIMRO 入社
現在に至る

Key words: microparticles, enzyme-linked immunoassay, platelets, mono-cyte

はじめに

生体内の血小板活性化マーカーの測定は心筋梗塞, 脳梗塞など血栓傾向を示す病態や, 血管内皮細胞の損傷に関わる動脈硬化進展の把握に重要であると考えられている¹⁾. 血小板は活性化されると形態変化とともに, α 顆粒をはじめとした β -TG や PF4 などの様々な物質の放出反応をおこし²⁾, その後膜の一部がちぎれてマイクロパーティクルと呼ばれる直径 $0.1\mu\text{m}$ ~ $0.5\mu\text{m}$ の膜成分を含んだ粒子を放出する³⁾. マイクロパーティクルは血小板以外にも単球をはじめとした様々な血液細胞や血管内皮細胞などに対する刺激によりそれらの細胞から放出され血中に存在しており⁴⁾⁻⁷⁾, 血中に含まれるマイクロパーティクルの多くが血小板由来であることがわかっている. この血小板由来マイクロパーティクル (PDMP) はプロコアグラント作用を有し, 多くの血栓性疾患において増加することが明らかになっており⁸⁾⁻¹⁰⁾, PDMP を測定することにより血小板機能亢進状態または血小板

活性化状態が検出可能ではないかと考えられる.

PDMP には GPIIb/IIIa や GPIb をはじめとした血小板膜糖蛋白質や^{11) 12)}, 血小板の活性化に伴って細胞内 α 顆粒から表出される P-セレクチン¹³⁾, さらに活性化に伴って起こる flip-flop 現象と呼ばれる膜の反転により血小板表面へ表出するホスファチジルセリンなどの陰性荷電したリン脂質が膜表面に含まれている^{14) 15)}.

PDMP の測定はこれらの物質を指標として George らによって免疫電気泳動法¹⁶⁾ が, さらに Vos ら¹¹⁾ によってラジオイムノアッセイ (RIA) 法を用いた検討が報告されている. 現在最も多く利用されている方法としてはフローサイトメトリーを用いた方法であるが, それは本誌別項を御参照頂くこととして, 本稿では現在筆者らが実施している酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA 法) について紹介したい.

^{*1} 株式会社 JIMRO 診断薬事業部 [〒370-0021 群馬県高崎市西横手町 351 番地 1]
Diagnostic Division, JIMRO Co., Ltd. [351-1, Nishiyokotemachi, Takasaki, Gunma 370-0021, Japan]
Tel: 027-353-1411 Fax: 027-353-1770 e-mail: kanatanik@jimro.co.jp

^{*2} 岸和田市民病院 血液内科
[〒596-8501 大阪府岸和田市額原町 1001 番地]
Division of Hematology, Kishiwada City Hospital [1001, Gakuhara-cho, Kishiwada, Osaka 596-8501, Japan]

採血方法

採血後の血小板の活性化を抑える目的で、抗凝固剤としてACD/EDTA液の入った真空採血管（商品名：ニプロネオチューブPET NP-AS0205-134：ニプロ社：JANコード4987458316012）を用い、さらに採血者間の採血方法を標準化する目的で21Gの注射針を用いて真空採血で行う。また、PF4や β TG等の血小板マーカーでは穿刺の刺激によりそれらが血小板から速やかに放出され、測定値が上昇することが見られるため、それを避ける目的で2本のシリンジで採血を行った後、初めの血液を廃棄し次のシリンジで血液検体を採取する2シリンジ法が推奨されている。そこでPDMPの測定に対しての穿刺による影響を調べる目的で、穿刺後に2本の採血管により血液検体採取しそれぞれのPDMP値の変動を確認する方法で検討したところ、2本の採血管でPDMP値には変化が無い（表1）、穿刺の影響は少なく、2シリンジ法等を用いる必要はないと考えられた。そこで通常の真空採血を行い、採血後は静かに2～3回転倒混和し必ず室温で静置、1時間以内にPDMP分離のための遠心操作を行いPDMP測定サンプルを調整することとした（図1）。

PDMP測定サンプルの調整

採血後の測定サンプル調整のための検体の取り扱い時は血小板が活性化しないよう注意が必要である。特に血小板は低温に放置すると速やかに活性化し、PDMPの急激な産生が見られる（図2）、このような低温刺激により生体中の正確なPDMP量の測定に影響をおよぼす恐れがあるため、採血後は決して氷水中や冷蔵庫保管することなく必ず室温で保管し速やかに遠心操作を行う。さらに遠心操作時は遠心機の冷却機能はOFFにし室温で遠心を行う必要がある。

また、ELISA法の測定はPDMPに存在する

表1 穿刺によるPDMP測定値の影響
(単位: U/mL)

No.	採血管1本目	採血管2本目
1	4.6	5.5
2	3.8	4.1
3	7.6	7.1
4	36.8	40.1
5	6.8	7.6
6	9.2	11.1
7	12.0	8.0
8	7.6	8.2
9	15.2	14.2
10	13.6	15.2
11	4.4	3.7
12	5.4	5.3
13	14.6	13.8
14	22.2	24.8
15	12.0	12.7
16	28.2	29.5
17	7.6	8.3
18	5.7	6.3
19	5.8	5.5
20	4.2	5.2

2種類の抗原に対する抗体を用いて行っているが、それらの抗原は血小板にも存在するため測定サンプルの調整時の遠心操作には血小板が混入しないよう充分注意が必要である。遠心操作は卓上型小型遠心機を使用して、1.5mL容のマイクロチューブ（材質：Polypropylene）に血液を1mL入れて行う。その遠心条件を設定する目的で重力加速度、遠心時間を変えてPDMP値の変動で評価した結果、遠心加速度6000G以上で3min以上の遠心を行うことによりPDMP値の安定した結果が得られた（図3）。そこで、遠心加速度8000G遠心時間5minを標準法とした。遠心後はただちに遠心機から取り出し、血漿の上面からゆっくりと200 μ L回収し、新しいサンプルチューブに移しELISAの測定に使用する。また、後で測定するために保管する場合は-40℃以下で保存することが可能である（図4）。

図1 PDMP 測定サンプルの調整

図2 採血後 PDMP サンプル分離までの時間・温度の影響

遠心時にもう一点注意が必要な操作として、遠心操作で用いる小型の高速遠心機は、ロータがアングル型に設計されており、遠心時の加速度は重力に対して垂直に作用している。そのためロータの中では遠心後の血球ペレットの界面は重力に対して平行の方向に凝集しているが、時間と共に垂直に戻ろうとするため、図5のようにアングル型のロータに放置することによりペレットの界面がより大きく乱れ、血小板が舞い上がり測定サンプルに混入する可能性がある。そこで血小板の舞い上がりを抑える目的で、遠心後はただちにサンプルチューブを遠心機から取り出し直立させて静置し、速やかに測定サンプルを回収することが必要である。

ELISA 法の測定

PDMP の測定は抗 GPIX モノクローナル抗体 (KMP-9) をマイクロプレート上にコートし、前述した方法で血小板を除去した PDMP 測定サンプルをまず GPIX 抗原でマイクロプレートに反応、固定化させ、ペルオキシダーゼ標識した抗 GPIb モノクローナル抗体 (NNKY5-5) で反応後発色し定量する方法である (図6)。具体的な手順としては以下のとおりである。

1. 第1反応

(1) 抗 GPIX 抗体 (10 μ g/mL in PBS) をコーティングしたプレートを作成。

(2) 各 well に非特異反応を防ぐ目的で、

図3 遠心分離による分離条件の検討

図4 PDMP サンプル分離後の保存安定性 (-40°C・-80°C)

BSA を含んだ前処理液 50 μ L ずつ加える。

(3) 測定サンプルを 50 μ L ずつ各 well に加え、well (プレート) をシールで密閉して 20~30°C で 3 時間振とうし反応させる。

2. 第2反応

(4) well 内の反応液を除去し、各 well を 350 μ L の洗浄液で 3 回洗浄する。

(5) ペルオキシダーゼ標識した抗 GPIIb 抗体

図5 遠心後の検体の変化

図6 PDMP ELISA 法の測定原理

溶液を $100\mu\text{L}$ ずつ各 well に加え、シールで密閉して $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ で1時間振とうし反応させる。

3. 第3反応及び測定

(6) 酵素標識抗体溶液を除去し、各 well を $350\mu\text{L}$ の洗浄液で3回洗浄する。

(7) 酵素反応基質液を $100\mu\text{L}$ ずつ各 well に加え、遮光して $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ で20分間反応させる。

(8) 酵素反応停止液を $100\mu\text{L}$ ずつ各 well に加え、反応を停止させ、主波長 450nm 副波長 620nm で吸光度測定する。

測定性能

PDMP 測定に使用する ELISA については現在キット化されており、その PDMP の ELISA キットの性能について、同時再現性は CV. 1.1

% $\sim 4.0\%$ 、日差再現は CV. $5.2\%\sim 8.8\%$ と良好な成績が得られている。

考 察

マイクロパーティクルは多種類の蛋白質や脂質を保持しているため様々な方法で測定されてきた¹⁷⁾。その中でこれまでにフローサイトメトリーを用いて様々な細胞から放出されるマイクロパーティクルを測定した多くの研究が報告されている。しかしフローサイトメトリー法は各施設や機器間で測定条件が微妙に異なりその測定値を各施設間で評価することが困難であることや、フローサイトメトリーの機器が比較的高価で特殊なためこの施設でも測定できるということではない、また測定する検体の長期保管

が難しい等の様々な課題がある。そのためフローサイトメトリー法を用いたマイクロパーティクル測定の標準化が試みられているが、統一した評価はできていない。そこで今回紹介したようなELISA法を利用すれば、測定値の定量化が可能となり、一般的なマイクロプレートリーダがあればどこでも簡便に測定できる、さらに測定サンプルとして調整後は -40°C 以下であれば凍結保管が可能であるためまとめて測定でき、検査センターなどの他施設でも測定が可能であるという利点があり、施設間差を気にせず統一した評価ができるものと期待される。但し、ELISA法の測定に際しては、フローサイトメトリー法と異なり、測定サンプル中に血小板が混入すると測定時にPDMPと分別することができないため、実際よりPDMP値が大きく表現されてしまう。そのため前処理として測定サンプルを調整する際の遠心操作で完全に血小板を除く必要があり、その作業に慎重な注意が必要である。

血栓性疾患とPDMP値の上昇については今回紹介したELISA法を用いた報告でも明らかになっており¹⁸⁾、血小板活性化のマーカーとしてPDMPのこの測定法を活用できる可能性が考えられる。一方、Mallat¹⁹⁾らによりプロトロンビナーゼ活性を指標にマイクロパーティクルを測定する方法が報告されており、これらも新たな測定法として期待される。

血漿中には血小板だけでなく、血管内皮細胞、単球・顆粒球等の細胞から由来する多様なマイクロパーティクルが存在する。近年Smalley²⁰⁾らにより、これらのマイクロパーティクルに存在する蛋白質について質量分析技術を用いたプロテオミクス法により詳細な解析が行われており、血漿中のPDMP以外のマイクロパーティクルに存在する蛋白質がより明らかにされている。今後これらの蛋白質を指標としたELISA法やマイクロパーティクルの持つプロコアグulant活性を指標とした方法で多様なマイクロパーティクルを識別して測定すること

により、様々な血管系疾患との関連が明らかになってくることと思われる。

文 献

- 1) Nomura S : Function and clinical significance of platelet-derived microparticles. *Int. J Hematol* **74** : 397-404, 2001.
- 2) Kaplan KL, Owen J : Plasma level of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation *in vivo*. *Blood* **57** : 199-202, 1981.
- 3) Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ : Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. *J Biol Chem* **264** (29) : 17049-17057, 1989.
- 4) Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat GF : In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* **104** : 93-102, 1999.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Biro E, Sturk-Maquelin 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** (12) : 2561-2568, 2003.
- 8) Nomura S, Inami N, Iwasaka T, Liu Y : Platelet activation markers, microparticles and soluble adhesion molecules are elevated in patients with arteriosclerosis obliterans : therapeutic effects by cilostazol and potentiation by dipyridamole. *Platelets* **15** : 167-172, 2004.
- 9) Craft JA, Masci PP, Roberts MS, Bribhton TA, Garrahy P, Cox S, Marsh NA : Increased platelet-derived microparticles in the coronary circulation of percutaneous transluminal coronary angioplasty patients. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **15** : 475-482, 2004.
- 10) Morel O, Hugel B, Jesel L, Mallat Z, Lanza F, Douchet MP, Zupan M, Chauvin M, Cazenave JP, Tedgui A, Freyssinet JM, Toti F : Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-IIIa antagonists. *J Thromb Haemost* **2** : 1118-1126, 2004.
- 11) 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** (4) : 447-450, 1987.
- 12) Gemmell CH, Sefton MV, Yeo EL : Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol Chem* **268** (20) : 14586-14589, 1993.
- 13) Zee PM, Biro E, Ko Y, Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R : P-Selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clinical Chemistry* **52** (4) : 657-664, 2006.
- 14) VanWijk MJ, VanBavel E, Strurk A, Nieuwland R :

- Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* **59** : 277-287, 2003.
- 15) Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A : Circulating microparticles : a Potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* **48** : 180-186, 2006.
- 16) George JN, Thoi LL, Mcmanus LM : Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* **60** : 834-840, 1982.
- 17) Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS : Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* **2** : 1842-1851, 2004.
- 18) Namba M, Tanaka A, Shimada K, Ozeki Y, Uehata S, Sakamoto T, Nishida Y, Nomura S, Yoshikawa J : Circulating platelet-derived microparticles are associated with atherothrombotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27** : 255-256, 2007.
- 19) Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A : Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques. *Circulation* **99** : 348-353, 1999.
- 20) Smalley DM, Root KE, Cho H, Ross MM, Ley K : Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* **97** : 67-80, 2007.