原 著

血小板電気泳動度とその生理的意義

菊 谷 典 久* 本 宮 武 司* 榊 原 千 枝 子*
渡 辺 節 子* 山 崎 博 男*

Electrophoretic mobility of platelets and its physiological significance

Norihisa KIKUTANI*, Takeshi MOTOMIYA*, Chieko SAKAKIBARA*,
Setsuko WATANABE* and Hiroh YAMAZAKI*

Key words : electrophoresis of platelets, neuraminidase,
platelet volume

Increasing attention has been paid to the surface electrical charge of platelets in relation to their functions. However there are several criticisms in methodological respects. In the present investigation the effect of neuraminidase on platelets was examined utilizing newly developed instruments of electrophoresis. These are Free-Flow Electrophoresis model Vap-5 (Bender and Hobein, West Germany) and Laser-Zee System 3000 (Pen-Kem Inc., U.S.A.). Rabbits were catheterized in the carotid artery and blood was obtained with EDTA as an anticoagulant. Platelet rich plasma was washed twice with Tris-HCl buffered saline and platelets were finally suspended in pH 5.3 acetate buffered saline. Washed platelets added with various concentrations of neuraminidase or control saline were incubated at 37°C for an hour. After incubation platelets were washed and suspended in 3 mM triethanolamine acetate or 0.001 M HEPES-NaOH, 0.15 M NaCl buffer for electrophoresis with Free-Flow or Laser-Zee system respectively.

Results: Electrophoretic distribution of neuraminidase-treated platelets was shifted to the cathode side as compared with the control. The magnitude in shift of electrophoretic distribution depended upon neuraminidase concentration and there was a correlation between them (Fig. 1A, B). Relation between electrophoretic mobility and volume of platelets before and after the neuraminidase treatment was shown in Fig. 2A, B and 3. In general larger platelets were distributed in the anode side and smaller in the cathode side. With lower concentration of neuraminidase treatment this trend as shown by a regression line got greater. This result represents that the sensitivity of platelets to neuraminidase is various in accordance with the platelet volume and smaller platelets are more sensitive to neuraminidase. The platelet sensitivity to neuraminidase

* 東京都臨床医学総合研究所循環器部〔〒113 東京都文京区本駒込3-18-22〕, Division of Cardiovascular Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

may have some role in platelet turn-over as smaller platelets have been believed as older ones.

緒 言

細胞電気泳動の血小板への応用は、1960年代を中心に数多くなされてきている¹⁾。1968年 Bolton ら²⁾は、「冠動脈疾患患者の血小板の泳動度は、健常者に比し、大きい」と報告。また、1969年 Grøttum ら³⁾は「Congenital Macrothrombocytic Thrombocytopenia では、その血小板の泳動度は低下している」と報告している。このように血小板の電気泳動度と、その機能・形態との間には密接な関係があることが示されているが、現在の電気泳動法には、いくつかの欠点がある。たとえば、①計時操作に由来する誤差、②手動のために測定細胞数の増加には限度があること、③泳動度に応じて血小板を分離・採取できないこと、などである。そこでわれわれは、本来 lysosomes など細胞内小器官の分離・採取を目的に近年開発された Han-nig 考案⁴⁾の無担体連続電気泳動装置 (Bender & Hobein GMBH) および米国 Pen-Kem 社で開発された自動化泳動装置 Laser-Zee System 3000 を血小板に用い、neuraminidase の血小板に対する影響を調べ、多少の知見が得られたので報告する。

I. 実験方法

体重 2.5~3.5kg の成熟家兎を ペントバルビタール麻酔下、頸動脈にカニューレを挿入し EDTA 採血。遠沈し PRP を得た後 Tris-HCl 緩衝生食水 (pH 7.4) にて 2 回洗浄し、最後に酢酸緩衝生食水 (pH 5.3) に血小板を浮遊。この液に、Neuraminidase (西独 Behringwerke) および CaCl_2 (終濃度 12.5mM) を加え、37°C 1 時間インキュベート。なお、Neuraminidase のかわりに等容量の生食水を加え、同様に処理したものを対照として用いた。インキュベート後、各電気泳動用緩衝液* で洗浄、浮遊し、泳動を行った。

(* 無担体連続電気泳動用緩衝液: 0.25M Suc-

rose, 1mM EDTA を含む 3mM トリエタノールアミン酢酸溶液, pH 7.4. Laser-Zee 用緩衝液: 0.001M HEPES-NaOH, 0.15M NaCl 溶液, pH 7.0)。

〔使用機器〕 無担体連続電気泳動装置: 2 枚のガラス板からなる分離槽の上部より、サンプルは注入され、左右両側に置かれた電極により生じた電場中を落下していく。その落下中に荷電粒子は、それぞれ陰または陽極に偏向していく。下部には 90 本の採取フラクションがあり、Fr. 1 は陽極側、Fr. 90 は陰極側である。Laser-Zee System 3000: 従来、細胞の電極間移動速度を顕微鏡などを利用し、直視下用手的に測定していた部分を、レーザー光の散乱に置き換え、そのドップラー効果を利用して自動的に泳動度を出す。それゆえ、短時間に多くのサンプルが測定できる。

血小板数および容積は、Couter Counter ZBI および同 Channelyzer にて測定。

II. 結 果

Neuraminidase 活性と血小板電気泳動度変化: 血小板に作用させる neuraminidase 活性を種々に変えて無担体連続電気泳動装置を使用し、酵素処理血小板と対照血小板の泳動度変化をみた。図 1-A は、血小板 2×10^8 あたり 6.5U の酵素を作用させた場合で、酵素処理群では対照に比し、全体に陰極側に分布が移動している。mode 分画の差は 12 分画あった。また、1.7 [U/ 2×10^8 血小板] では、酵素処理と対照との mode 分画の差は 0 であったが、2.5U で 3 分画、3.3U で 7 分画、4.6U で 10 分画、6.3U で 11 分画となり、酵素濃度依存性的変化を示した (図 1-B)。

血小板容積と電気泳動度: 無担体連続電気泳動装置により、各分画に分離された neuraminidase 処理およびその対照血小板について、その容積を測定し、分画番号と容積との関係をみたのが図 2-A, B である。A は neuraminidase

Fig. 1 A Electrophoretic mobility distribution of the control and neuraminidase treated platelets. The distribution of neuraminidase treated platelets is shifted to the cathode side as compared with the control.

B Relation between neuraminidase activity and the increment in the peak electrophoretic fraction number. The magnitude in shift of the peak fraction number depends upon neuraminidase activity.

活性を高くした場合の一例で、Bは低い場合である。なお、図に加えられた直線は、おのこの回帰直線である。Aでは回帰直線の傾きは、ほぼ等しく、酵素処理前後で、各泳動分画での

容積分布様相にほとんど変化のないことを示唆している。やや右下がりの直線は、陰性荷電の強い血小板の方がわずかに容積の大きいことを示す。一方、Bでは、対照に比し neuraminidase

Fig. 2 Relation between electrophoretic mobility and platelet volume.

A: Neuraminidase concentration of 6.3 unit per 2×10^8 platelets. The slope of the regression line of neuraminidase treated platelets is almost as same as that of the control.

B: Neuraminidase concentration of 2.5 unit per 2×10^8 platelets. The slope of the regression line of neuraminidase treated platelets is steeper than that of the control.

処理血小板では回帰直線の傾きは著しく大きくなっており、陽極側の分画には大型血小板が、陰極側には小型とほぼ順序よく分布し、血小板容積により血小板泳動度の再分布が生じたことを示唆している。図3は、これら回帰直線の傾き

と使用 neuraminidase 活性をプロットしたものである。このグラフから、酵素活性の低い場合ほど傾きが大きくなっていることがわかる。なお、酵素処理前後では、全血小板の容積分布には有意の変化は認められなかった。

Laser-Zee System 3000: 本機においても neuraminidase 処理血小板では、泳動度が低下していることが mobility histogram に示された。

III. 考案および総括

本宮ら⁵⁾はすでに抗ウサギ血小板モルモット血清を使用し、家兎で作製した血小板減少回復期の「若年血小板」と仮定した血小板群と、正常血小板群を無担体連続電気泳動装置にかけると、「若年血小板」は正常のものに比し陰極側に分布が移動することを報告した。この際、この結果が果たして、血小板の陰性荷電の変化によるものなのか、それともこの装置の原理よりみて、血小板容積および比重が結果に影響しているのではないかという疑問が残った。今回の neuraminidase 処理実験において、使用した neuraminidase 活性と泳動分布のシフトの

大きさには dose-dependent の関係が示され、無担体連続電気泳動法は血小板の表面荷電の差によって、それらを分離していることが示された。

低活性の neuraminidase を血小板に作用さ

せると各分画の血小板容積の分布様式が変化し、大型ほど陽極側に分布し小型のものほど陰極側に集まった。なお、neuraminidase 処理によっては、血小板の容積そのものは変化しないことから、血小板表面に存在するシアル酸の neuraminidase に対する感受性は血小板容積によって違っており、小型のものほど高く、酵素活性の低い場合には小型血小板のシアル酸が、ほぼ選択的に外されるために、その陰性荷電が減少して陰極側にシフトすると思われる。一方、酵素活性が高くなると、どの血小板も一様に一定レベルま

でシアル酸が外されてしまうために、その容積分布は対照と差がなくなってしまうと考えられる。従来老年血小板は小型で若年血小板は大型であると考えられているが⁶⁾、上記のごとく、小型血小板ほどシアル酸の neuraminidase による遊離性が高いとすると、血小板回転のメカニズムに関して重要な示唆を与えられると思われる。

最後に、無担体連続電気泳動に関し、御指導いただいた東京医科歯科大学遺伝生化学教室・中島 熙、沢崎嘉男両氏に感謝する。

文 献

- 1) Hampton, J.R., Mitchell, J.R.A.: Effect of aggregating agents on the electrophoretic mobility of human platelets. *Br. Med. J.*, **1**; 1074~1077, 1966.
- 2) Bolton, C.H., Hampton, J.R., Mitchell, J.

Fig. 3 Relation between neuraminidase activity and the slope of the regression line. There is reversed linear correlation between neuraminidase activity and the slope of the regression line.

R.A.: Effect of oral contraceptive agents on platelets and plasma-phospholipids. *Lancet*, **1**; 1336~1341, 1968.

- 3) Grøttum, K. A., Solum, N. O.: Congenital thrombocytopenia with giant platelets: a defect in the platelet membrane. *Br. J. Haematol.*, **16**; 277~290, 1969.
- 4) Hannig, K.: Eine Neuentwicklung der trägerfrei, kontinuierlichen Elektrophorese. *Z. Physiol. Chem.*, **338**; 211~227, 1964.
- 5) 本宮武司, 他: 血小板年齢と容積, 電気泳動度の関係. *日血会誌*, **41**; 2, 397, 1978.
- 6) Karparkin, S.: Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. *J. Clin. Invest.*, **48**; 1073~1082, 1969.