Flow cytometry を用いた血小板機能の解析

小 田 淳

Analysis of Platelet Function by Flow Cytometry

Atsushi ODA, MD. Ph. D.

Key words : platelet, flow cytometry, indo-1, actin, calcium

緒 言

Flow cytometry はレーザー光を用いて、溶液中の個々の細胞ないし細胞片の生物学的様態を解析する手段である。

血小板研究において以下の分野で応用されている。

1. 血小板無力症（の一部）など血小板膜糖蛋白の主に量的異常の検索。

2. 血小板由来の micro particle の検出。

これは主として、Shattil や Sims のグループにより研究されてきた分野である¹⁾。彼らは、抗 Gplb 抗体陽性の血小板由来の微小粒子が Flow cytometry の電氣的ノイズと区別が可能であり、またこれらは thrombin 形成などに重要な役割を果たすものとしており、注目を集めている。

3. 血小板機能の解析

ほとんど全ての血小板機能が Flow cytometry で解析可能である。血小板への Fibrinogen や vW Factor の結合を始め、顆粒放出反応、血小板表面糖蛋白の形態変化など多種多様である^{2)~7)}。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) や pH の測定も可能である^{8)~11)}。

Flow cytometry は血小板研究に広く応用さ

れているばかりか、他の手法と異なり細胞間の多様性を簡便に検索できるといった長所を有する。この Flow cytometry のデータの解釈には十分な技術的側面の理解が必須であると考えられるが、限られた紙面で上記の全分野について詳述するのは不可能である。そこで、筆者が Harvard 大医学部の Salzman 教授の研究室で行なった研究成績を基に主として技術的側面から表題のテーマについて解説を試みたい。

1. 個々の血小板の $[Ca^{2+}]_i$ と他のパラメーターの同時測定

0.38% クエン酸加多血小板血漿 (PRP) に、市販の Indo-1 AM (acetoxymethylester) を終濃度 $10 \mu M$ で $37^\circ C$, 30 分間、付置することにより、Indo-1 Loading が行なわれる。Indo-1 AM は DMSO に 2 mM の Stock 溶液として前もって用意しておく。必ず、小分けしてあるものを deep freeze して保存し、凍結融解を繰り返さないようにする。この Stock を Loading 直前に融解して使用するが、融解も PRP 付置も暗所で行なう。Loading 後の血小板も暗所保存（室温）するが、Jennings らはこのように Loading された血小板は 8 時間以上実験に使用可能と主張しており、また筆者らも

Fig. 1 Distribution of $[Ca^{2+}]_i$ among individual platelets in three-dimensional histograms; x-axis is violet/blue fluorescence ratio of Indo-1 as an index of $[Ca^{2+}]_i$ expressed in arbitrary unit; y-axis is time; z-axis is cell number. Arrows indicate time of addition of thrombin (I-4.5 nM, II-1.0 nM, III-0.5 nM, IV-0.25 nM). (from ref. 8)

4~5 時間は ADP のように洗浄血小板が不応性を獲得しやすい agonist に対しても一定の成績が得られることを経験している¹¹⁾。この Loading 後の血小板を $[Ca^{2+}]_i$ 測定直前に 37°C に加温している buffer 中に 1/500~1/200 程度に希釈する。これは fibrinogen や prothrombin の濃度を低下させまた血小板同志の衝突確率を減らし凝集を抑制するために必須である。この際、外液中の Indo-1 の影響もまた無視し得るほど小さくなる。この希釈血小板を Chamber に入れ Flow cytometer で、解析するが、この Chamber 周囲を 37°C の液で流し保温する必要がある。Jennings らは実験を室温で行なっているが、すでに Ca^{2+} 蛍光指示薬と Ca^{2+} の解離定数が温度の影響を受けることが知られているので、室温で行なわれた実験のデータ解釈には慎重さが必要である¹²⁾。

実際、筆者らは実験中の温度変化がみかけ上の $[Ca^{2+}]_i$ 変化をもたらすことを経験している。

筆者は、Coulter Electronics 社の Epics V (モデル 753) もしくは Epics Elite を $[Ca^{2+}]_i$ の解析に使用してきた。希釈血小板は 1 秒間 600~1,500 個程度の“Flow rate”で解析する。Flow rate を上げすぎると血小板が破碎される。血小板の同定には、PRP を用いるのであれば正面方向および直角方向のレーザー光の散乱 (Scattering) を利用する。血小板が破碎される場合は正面方向の散乱 (Forward scattering=FSC) の小さい粒子が多数出現してくる。Indo-1 は励起波長一つで検出波長が二つの Ca^{2+} 蛍光指示薬である。励起には通常 351 nm と 363 nm の波長のレーザー光が使用される。図 1 は、Indo-1 付加血小板の 405 ± 20 nm (vio-

Fig. 2 Two dimensional view of Fig. 1. (from ref. 8)

let) と 530 ± 20 nm (blue) の検出波長を個々の血小板について記録したものである。ここで Ca^{2+} の Indo-1 は violet の Ca^{2+} 非結合型のそれは blue の蛍光を示すので violet/blue の蛍光比の上昇は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を反映しているものと考えられる。また X 軸は時間、Z 軸は細胞数を示している。 α -thrombin (4.5 nM) を添加すると当初左側に位置していた血小板集団のほとんどの細胞が右側に移動しているのが明確である。すなわちほとんどの血小板が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させている。それに反して 1 nM, 0.5 nM, 0.25 nM と α -thrombin の濃度を低下させると遅れて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させてくる細胞が現れてくる。ここで明確にしておきたいが、血小板の 1 nM 以下の α -thrombin に対する反応は、Davies らの主張する如く “all-or-non” では無い。当初 non-responder に見える細胞でも後から $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させてくるものがある。Jennings らもやはり all-or-non の反応は認めていない¹¹⁾。筆者は、この一見、多様に認めら

れる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の分布は、細胞が急激に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させてくるまでのいわゆる lag time の違いによるものと解釈している。このような lag time の多様性は、他の多くの細胞でも認められていて、恐らく蛍光指示薬を用いた場合の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定全般に認められる現象であろう。図2は図1を直上から見下ろしたもので、細胞数の多い所を濃く表わした frequency plot である。1 nM thrombin では当初、まったく non-responder に見える細胞群が、早くから $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させていた細胞群に加わって行くようすが見てとれる。血小板に別の Ca^{2+} 蛍光指示薬である fura-2 を用いて、細胞群全体の平均 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を反映する I_{340}/I_{380} ⁸⁾ を測定すると、同様の α -thrombin 濃度の範囲で低濃度の thrombin を使用すると Ca^{2+} スパイクのピークが後にずれ込むことが明らかである(図3)。この現象は “all-or-non” のモデルでは説明がつかず、筆者の低濃度 thrombin 使用下ではゆっくり $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させてくる細胞が

増加するといった Flow cytometry の成績と一致する。

[Ca²⁺]_i の上昇は血小板活性化に重要な働きをしていることは広く認められているが¹³⁾, 数秒～分の短時間のうちに C-キナーゼの活性化, チロシン磷酸化, cGMP の上昇^{14),15)} など数多くの現象が血小板中で起こってくるため未だにその機能発現への影響には不明な点が多い。果たして上記の如くの [Ca²⁺]_i の多様性は生理的意義を持ち得るのであろうか。この問題に対す

Fig. 3 Measurement of [Ca²⁺]_i in platelets (3×10^8 cells/ml) loaded with fura-2. Fura-2 fluorescence ratio (I_{340}/I_{380}) is that of emission of fluorophore at 505 nm excited by 340 nm or 380 nm alternately. (from ref. 8)

る一つのアプローチとして筆者らは Indo-1 の励起に使用した紫外レーザー光とは別の 488 nm のレーザー光を使用し, FITC 標識 S 12 抗体の血小板への結合と [Ca²⁺]_i を合わせて測定した。ここで, 紫外光レーザーと 488 nm レーザー光は 7 μ sec の差で血小板を hit するように調整した。これは Indo-1 の blue の蛍光と FITC の蛍光が大きく重なる (共に 530 ± 20 nm の範囲で検出) ために必須の操作である。ここで S 12 抗体は血小板非活性状態では主として α 顆粒の内面に存在している糖蛋白 GMP-140 を認識しており, Dr. Rodger P. McEver から供与された¹⁶⁾。FITC 標識 S 12 は Indo-1 付血小板とともに溶液中に存在するのであるが, Flow cytometry ではレーザー光が細胞を hit する際は細胞は細い流線中にあり (core stream), 溶液中の FITC の影響は少ない。図 4 で右側は横軸を時間, 縦軸を FITC の蛍光をとった frequency plot であるが, thrombin 0.5 nM 添加後 FITC 蛍光を上昇させてくる血小板の存在が明らかである。この細胞群に Electronic gate を設定して, この細胞群のみの [Ca²⁺]_i を測定すると, S 12 陽性の細胞は lag phase にある細胞では無く, 明確な [Ca²⁺]_i 上昇を伴った細胞のみであることが証明できた。筆者らはこの成績から thrombin に

Fig. 4 [Ca²⁺]_i distribution of "S 12-positive" platelets. (from ref. 8)

Fig. 5 NBD-phalloidin binding to unstimulated platelets. (from ref. 5)

よる血小板の α 顆粒放出反応には $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が必要なファクターであると結論した。

筆者らはさらに Jennings らの見解とは異なり ADP 刺激下でも外液 Ca^{2+} の有無に拘らず、ほとんどすべての血小板が $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることや、 Ni^{2+} 阻害性の Ca^{2+} channel がほとんどすべての血小板に分布していることを明らかにした。また FITC 標識 Fibrinogen の血小板への結合と $[Ca^{2+}]_i$ の同時測定も可能である⁹⁾。

さて、この一見多様である血小板の $[Ca^{2+}]_i$ 変化は、全くその分子的機構が明らかではない。この分野は未だに論文数も比較的少なく、また上記のように必ずしも研究者間でコンセンサスが無いため、広く追試が行なわれることを希望する。

2. 個々の血小板の Filamentous actin (F-actin) 含量の測定

血小板には actin の含量が総蛋白の

15~20% と多く、また thrombin などの刺激で globular actin (G-actin) から filamentous actin (F-actin) への変換が急速に血小板中で起こることが知られている。この actin 重合 (G→F 変換) の意義は案外良く理解されていないが、最近の報告からすると血小板表面糖蛋白の分布変化に関連するらしい¹⁷⁾。この G→F 変換の機構は長らく不明であったが Nachmias らの仕事から Thymosin β_4 が重要な役割を果たすことが示唆されている。この G→F 変換が果たしてすべての血小板に起き得る現象であるか不明であったので、筆者らは F-actin の測定に蛍光標識キノコ毒 NBD-Phalloidin (7-nitrobenz-2-oxa-1, 3 phalloidin) を利用した。以下方法を概略する。

血小板は PRP を用いた。これは洗浄したりゲルろ過の過程で F-actin の血小板含量が上昇することが良く知られていたためである。さらに PRP は使用前 30 分間、37°C で加温して置いたものを使用した。血小板凝集阻止のため血

Fig. 6 Effects of ADP and U 46619 on actin polymerization and light scattering of platelets; Inhibition by cytochalasin D. (from ref. 5)

血小板刺激直前に 5 mM の EDTA を加えた。適時 10~50 μ l の PRP を 1.5 ml の 2.5% グルタルアルデヒド加 100 mM PBS に加え固定した。グルタルアルデヒド固定は強力であるので plasma がゲル化しないよう、PRP はこの程度に希釈が必要である。最低、2 時間固定後、PBS で 2 回洗浄後、3.3 μ M の NBD-phalloidin に 30 分以上暗所で付置した。筆者は Molecular Probes 社の NBD-phalloidin を用いて、PBS に溶解して使用した。この付置後の血小板をさらに PBS で洗浄後、Flow cytometer で解析した。NBD の蛍光の検出は FITC と同様である。図 5-A でこの NBD-phalloidin 処理後の血小板は自己蛍光 (破線) に比して明確に高い蛍光を有している。この上昇は固定血小板を市販の非標識 phalloidin で処理したり、phalloidin 自体を F-actin で吸

収すると認められなくなる (図 5-C, D)。これに反して、NBD-phalloidin を G-actin で処理しても NBD-phalloidin の固定血小板への結合はほとんど影響されない (図 5-B)。これらのデータは NBD-phalloidin が固定血小板の F-actin に特異的に結合していることを示唆している。

プロスタグランジン H_2 誘導体 U 46619 (1 μ M) や ADP (10 μ M) により、EDTA (5 mM) 存在下に血小板を刺激 (15 秒間) し、上記の如く固定し NBD-phalloidin で処理後、Flow cytometry で解析すると、大部分の固定血小板の NBD-蛍光が上昇していることがわかる (刺激前=破線、刺激後=実線、図 5-A, C) ここで Cytochalasin D (10 μ M) を刺激 1 分前に血小板に作用させるとこの上昇は認められなくなる (図 5-B, D)。注目されるのは、刺

激前，刺激後を問わず，NBD-phalloidin の結合は，正規分布を示さないという事実である。上記のように NBD-phalloidin の結合は特異的であり，自己蛍光は正規分布に近いそれを示すことを考えると，このことは血小板の F-actin の分布が不均等であることを示唆しているものと考えられる。

筆者らはさらに，この F-actin の含量の少ない血小板を検索するため NBD-phalloidin の蛍光と scattering を比較した。静止状態の固定血小板の FSC と SSC (side scattering, right

angle scattering) を二次元の frequency plot で解析すると，三角形に近いパターンを示す(図 6-E, 左端)。これに対し，ADP および U46619 で刺激下では FSC と SSC は正相関を示すようになり，また FSC の上昇が認められる(図 6-E, 中央および右端)。この際，F-actin の含量の少ないものは FSC, SSC とともに刺激前後で小さい細胞群であることがわかる。Holme や Jennings らの研究より^{11),19)}，FSC, SSC と血小板の size にはある程度の正相関が認められるので，F-actin が少ない細胞は小さ

な細胞の中にあることが示唆された (図 6-F, G). 以前から, 小血小板は中～大血小板に比して機能が減弱していることが示唆されてきた。筆者らの知見は当然そのことと関連するものと考えられる。また, この方法により, actin 重合と他の機能 (顆粒放出など) との同時測定も可能であり広く追試されることを希望する⁵⁾。

おわりに

本稿は筆者が Salzman 教授の研究室で行なった研究の成績を基に, 同教授の了解を得て執筆したものです。今回の執筆の機会を与えて下さいました慶應義塾大学医学部池田康夫教授および, ご指導, ご助言いただきました, 手稲溪仁会病院前久保博士院長に深謝致します。

文 献

- 1) Sims, P.J., Wiedmer, T., Esmon, C.T., Weiss, H.J. and Shattil, S.J.: Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. *Studies in Scott syndrome: an isolated defect in procoagulant activity*. *J. Biol. Chem.* **264**: 17049~17057, 1989.
- 2) Adelman, B., Calson, P. and Poweres, P.: von Willebrand factor is present on the surface of platelets stimulated in plasma by ADP. *Blood* **70**: 1362~1376, 1987.
- 3) Jackson, C.W., and Jennings, L.K.: Heterogeneity of fibrinogen receptor expression on platelets activated in normal plasma with ADP: analysis by flow cytometer. *Br. J. Haematol.* **72**: 2674~2680, 1988.
- 4) Shattil, S.J., Hoxie, M., Cunningham, M. and Brass, L.F.: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* **260**: 11107~11114, 1985.
- 5) Oda, A., Daley, J.F., Cabral, C., Kang, J., Smith, M. and Salzman, E.W.: Heterogeneity in filamentous actin content among individual human blood platelets. *Blood* **79**: 920~927, 1992.
- 6) Kienast, J. and Schmitz, G.: Flow cytometric analysis of thiazide orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* **75**: 116~121, 1990.
- 7) Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K. A. and Smith B.R. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* **78**: 1730~1737, 1991.
- 8) Oda, A., Daley, J.F., Kang, J., Smith, M., Ware, J. A. and Salzman, E.W. Quasi-simultaneous measurement of ionized calcium and α -granule secretion. *Am. J. Physiol.* **260**: C 242~C 248, 1991.
- 9) Oda, A., Daley, J.F., Kang, J., Smith, M., Ware, J. A. and Salzman, E.W. Quasi-simultaneous measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and fibrinogen binding of individual platelets. (Abstract) *Blood* **74**, Suppl.: 208 a, 1989.
- 10) Davies, T.A., Drotts, D., Weil, G.J. and Simons, E. R. Flow cytometric measurements of cytosolic calcium changes in human platelets. *Cytometry* **9**: 138~142, 1988.
- 11) Jennings, L.K., Dockter, M.E., Wall, C.D., Fox, C. F. and Kennedy, D.M.: Calcium mobilization in human platelets using Indo - 1 and flow cytometry. *Blood* **74**: 2674~2680, 1989.
- 12) Shuttleworth, T.J. and Thompson, J.L.: Effect of temperature on receptor-operated changes in $[Ca^{2+}]_i$ and their determination using fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* **266**: 1410~1417, 1991.
- 13) Salzman, E.W. and Ware, J.A. Ionized calcium in blood platelets. In: *Platelet Membrane Receptors-Molecular Biology, Immunology, Biochemistry, and Pathology.*, edited by G.A. Jamieson. New York: Liss, 1988, p 419~430, 1988.
- 14) Oda, A., Druker, B.J., Smith, M. and Salzman, E. W.: Inhibition by sodium nitroprusside and PGE1 of tyrosine phosphorylation induced in platelets by thrombin or ADP. *Am. J. Physiol.* **262**: C 701~C 707, 1992.
- 15) Siess, W.: Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol. Rev.* **69**: 58~178, 1989.
- 16) Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V. and Bainton, D.F.: A platelet α -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Biol. Chem.* **101**: 880~886, 1985.

-
- 17) Michelson, A.D., Ellis, P.A., Barnard, M.R., Matic, G.B., Viles, A.F. and Kestin, A.S.: Down regulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in the whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or an in vitro wound. *Blood* **77**: 770~779, 1991.
- 18) Holme, S., Heaton, A., Konchuba, A. and Hartman, P.: Light scattering and total protein signal distribution of platelets by flow cytometry as parameters of sizes. *J. Lab. Clin. Med.* **112**: 223~230, 1988.
-