

原著

フローサイトメトリーによる血小板-白血球凝集と 活性化血小板の解析

井本しおん¹⁾ 松元英理子¹⁾ 坊垣美也子¹⁾ 澤田 浩秀¹⁾ 西郷 勝康²⁾

Analysis of platelet-leukocyte aggregate and platelet activation using flow cytometry

Shion IMOTO¹⁾, Eriko MATSUMOTO¹⁾, Miyako BOHGAKI¹⁾, Hirohide SAWADA¹⁾, and Katsuyasu SAIGO²⁾

Abstract

Thrombosis is one of the most important health problems among developed countries. Roles of Platelet-leukocyte interaction in thrombosis has been gradually recognized. Increase in platelet-leukocyte aggregate has been reported among patients with acute myocardial infarction and cerebral infarction. Increase in platelet-leukocyte aggregate has also been reported among patients with myeloproliferative neoplasms, for whom thrombosis is the major clinical problem. Platelet-leukocyte aggregate may be useful as a marker of thrombosis risk. We measured platelet-leukocyte aggregate and platelet activation among healthy volunteers using flow cytometry. Percentage of platelet-monocyte aggregate was higher than that of platelet-granulocyte aggregate, and showed larger individual variation. Percentage of activated platelet showed better correlation with percentage of platelet-monocyte aggregate than with platelet-granulocyte aggregate. Percentage of platelet-leukocyte aggregate changed widely during storage periods.

Key words Thrombosis, platelet-leukocyte interaction, platelet-monocyte aggregate, activated platelet, flow cytometry

1) 保健科学部医療検査学科
Faculty of Technical Medicine, Department of Health Science, Kobe Tokiwa University
2) 姫路獨協大学薬学部医療薬学科
Faculty of Pharmaceutical Science, Himeji Dokkyo University

緒言

動脈血栓による心筋梗塞や脳梗塞は、日本人の死因の第2位、第3位を占める重大な疾患である。動脈血栓の大部分は、動脈硬化巣（プラーク）を基に発生するが、プラークによる血管閉塞の程度よりプラークの性状の方が重要であり、マクロファージなど炎症性細胞の浸潤が強い不安定プラークの破たんが主な原因であることがわかってきた¹⁾⁻³⁾。また、血小板と白血球の相互作用（クロストーク）の重要性が、フローサイトメトリー（FCM）による解析を通じて認識されつつある。急性心筋梗塞や脳卒中患者では、血小板と白血球の活性化を反映して末梢血中の血小板-白血球凝集が増加することが報告されている⁴⁾⁻⁸⁾。

真性多血症（polycythemia vera：PV）や本態性血小板血症（essential thrombocythemia：ET）などの骨髄増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasm：MPN）は、慢性に経過する比較的予後良好な疾患であるが、血栓症と出血が高率に発生し、これらが生命予後を左右する因子となっている。MPNにおける出血や血栓は、原疾患に起因する血小板や白血球の異常な活性化が主な原因と考えられている⁹⁾⁻¹²⁾。MPNにおいても、血小板-白血球凝集の増加が報告されている^{10),11)}。

以上、血栓症を来す様々な病態において血小板-白血球凝集は、血栓リスクの指標となる可能性がある。我々は、健常人血液を用いて血小板-白血球凝集をFCMで測定する方法を検討し、血小板活性化との関連を検討した。また、臨床現場では採血からFCM測定まで時間がかかることを想定し、経過時間によって血小板-白血球凝集がどのように変動するのか、についても検討を行った。

対象および方法

1) 対象

健常人ボランティア9名から、本学研究倫理委員会で承認された文書による説明と同意を得た上で、末梢血採取を行った。肘静脈から静脈血を抗凝固剤ACD-A液入り真空採血管（BD社バキュテイナー採血管）に採血した。

2) 抗体試薬

FCM測定用の蛍光標識モノクローナル抗体として、CD61-PerCP（BD社）、CD62P-FITC（ベックマン社）、CD33-PE（BD社）、陰性コントロールとしてマウスIgG1-FITC（ベックマン社）、マウスIgG1-PE（ベックマン社）、マウスIgG1-PerCP（BD社）を用いた。

3) フローサイトメトリー（FCM）による測定

FCMにはBD社FACSCaliburを用いた。

活性化血小板の測定：BD社Technical Protocol¹³⁾を改変して実施した。規定量の抗体と全血10 μ l、PBS（CellWash, BD社）100 μ lを混和し、室温暗所で30分間反応後、PBS 600 μ lを添加してFCMで3カラー解析を行った。

血小板-白血球凝集の測定：規定量の抗体と全血100 μ lを混和し、室温暗所で30分間反応後、PharmLyse（BD社）で赤血球を溶血し、PBSで洗浄後にFCMで3カラー解析を行った。

結果

1) 活性化血小板比率の測定

活性化血小板比率の測定では、遠心操作や溶血操作による血小板活性化を避けるため、全血を抗体で反応させた後、溶血せずPBSで希釈してFCM測定した。血小板と白血球の大きさの違いが大きいため、前方散乱（FSC）と側方散乱（SSC）には対数表示を用いた。対数表示したサイトグラム上では、血小板はほぼ中央の細胞集団、赤血球および白血球は右上の細胞集団として表示される（図1-a）。

血小板表面マーカー CD61と SSC を対数表示したサイトグラムでは、CD61-PerCP 陽性の細胞は2つの集団 (R1と R2) に分かれた (図 1 - b)。SSC 低値の R1分画は遊離の血小板、SSC 高値の R2分画は血小板-赤血球凝集、血小板-白血球凝集あるいは血小板-血小板凝集塊に該当する。

活性化血小板の表面マーカーには CD62P (P-セレクチン) を用いた。活性化血小板比率は、R1分画における CD62P-FITC 陽性細胞の比率として

計測した (図 1 - c)。

健常人 8 名から延べ 9 回測定した活性化血小板比率の平均値は1.53%、SD は1.57であった (図 4 参照)。

血小板-白血球凝集は、R2分画の中の白血球表面マーカー (CD33) 陽性細胞比率として計測した。R2分画中の CD33陽性細胞比率は 1% 未満であった (図 1 - d)。したがって、R2分画の大部分は血小板-赤血球凝集であると考えられた。

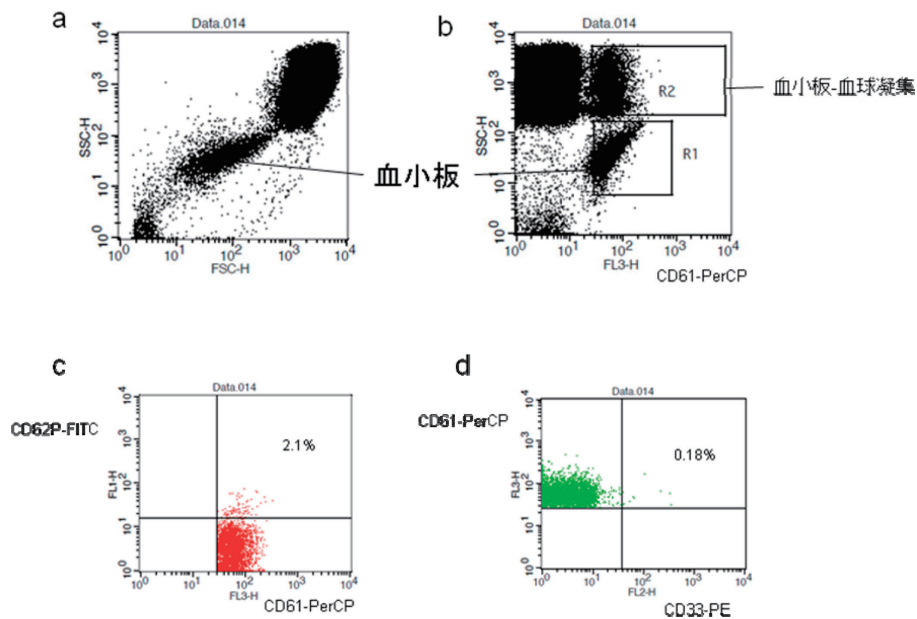


図 1. 活性化血小板比率の測定

2) 血小板-白血球凝集比率の測定

血小板-白血球凝集の測定には、白血球に対する通常の測定法、すなわち赤血球を溶血除去し、FSC と SSC を対数ではなくリニア表示を用いる方法で解析した (図 2 - a)。

白血球の表面マーカーとして CD33を用いると、陽性細胞は CD33発現の強さが異なる 2つの集団 (R1と R3) に分かれた (図 2 - b)。FSC/SSC サイトグラム (図 2 - a) との対比により、CD33弱陽性の R1分画は顆粒球 (好中球)、CD33強陽性の R3分画は単球であることが分かった。

血小板と白血球の凝集を、顆粒球分画 R1と単球分画 R3に分けて計測した。R1分画での CD33陽性

CD61陽性細胞 (図 2 - c 右上の区画) の比率は血小板と凝集している顆粒球の比率 (血小板-顆粒球凝集比率)、R3分画での CD33陽性 CD61陽性細胞 (図 2 - d 右上の区画) の比率は血小板と凝集している単球の比率 (血小板-単球凝集比率) である。次に、活性化血小板と白血球の凝集を、活性化血小板表面マーカー CD62P-PerCP を用いて解析した。R1分画での CD33陽性 CD62P 陽性細胞 (図 2 - e 右上の区画) を活性化血小板-顆粒球凝集比率、R3分画での CD33陽性 CD62P 陽性細胞 (図 2 - f 右上の区画) を活性化血小板-単球凝集比率として計測した。

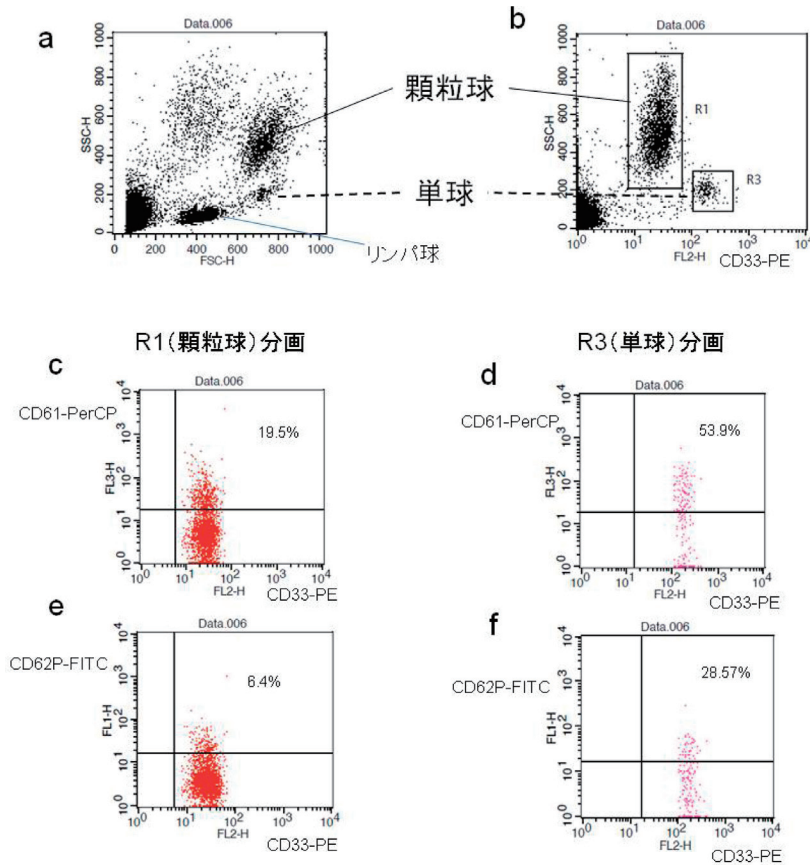


図2. 血小板-白血球凝集比率の測定

3) 健常人の血小板-白血球凝集比率

健常人9名（女性7名、男性2名、20歳代6名、50歳代3名）からのべ13回測定した結果を図3に示した。aは血小板-顆粒球凝集比率、bは血小板-単球凝集比率、cは活性化血小板-顆粒球凝集比率、dは活性化血小板-単球凝集比率である。女性は丸印、男性は角印、20歳代は黒、50歳代は白、で表示した。

血小板-白血球凝集比率と活性化血小板-白血球凝集比率のいずれにおいても、性別や年齢による明らかな偏りは見られなかった。

血小板-単球凝集比率の平均値（23.9%）は、血小板-顆粒球凝集比率の平均値（9.01%）よりも高値を示したが、最低値10.62%～最高値40.88%と個人差が大きかった（図3-a～d）。

活性化（CD62P+）血小板と白血球の凝集においても個人差が認められ、特に活性化血小板-単球

凝集では最低値1.9%～最高値25.5%と個人差が大きかったが、活性化血小板-顆粒球凝集では一例を除いて10%未満の低い比率を示した。また、顆粒球においても単球においても、活性化血小板との凝集比率は血小板全体との凝集比率よりも低値を示した。

血小板の活性化は、血小板-白血球凝集の重要な要因と考えられている。そこで、同一検体で活性化血小板比率も測定できた健常者9名において、図1で示した方法で測定した活性化血小板比率と、図2で示した方法で測定した血小板-白血球凝集比率との相関を解析した（図4）。血小板-顆粒球凝集比率と活性化血小板比率との相関係数は0.491、血小板-単球凝集比率と活性化血小板比率との相関係数は0.658であった。血小板-顆粒球凝集よりも血小板-単球凝集の方が、活性化血小板比率との相関が高いことが示された。

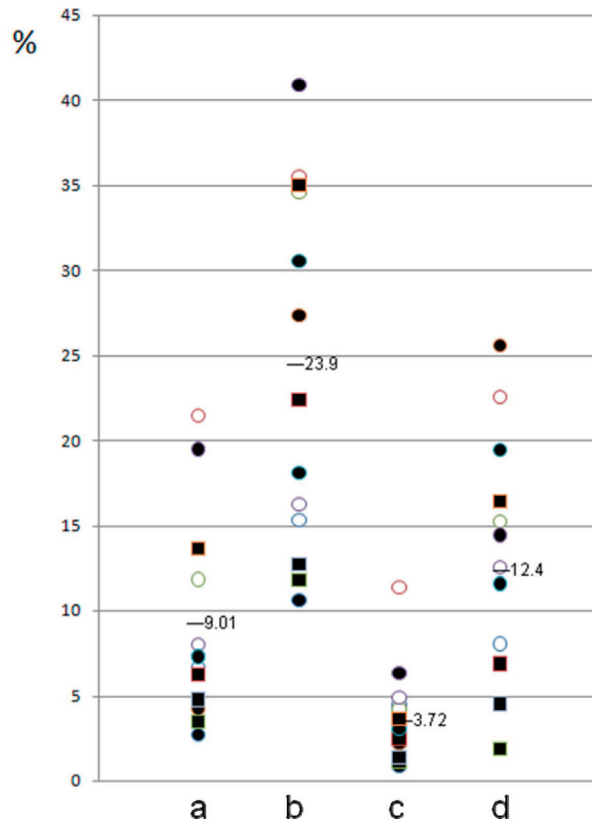


図3. 血小板-白血球凝集比率の測定結果

健康人9名から13回測定した結果を示す(図中の数値は平均値)。

- a : 血小板-顆粒球凝集比率 b : 血小板-単球凝集比率
 - c : 活性化血小板-顆粒球凝集比率 d : 活性化血小板-単球凝集比率
- 50歳代女性 ●20歳代女性 ■20歳代男性

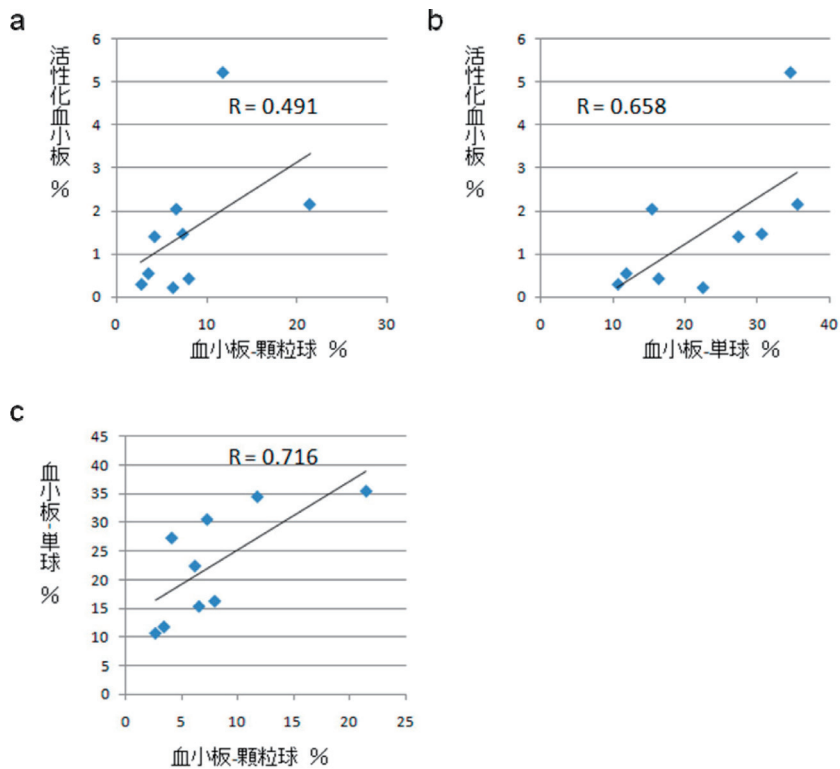


図4. 血小板-白血球凝集比率と活性化血小板比率との相関

4) 同一個人の測定日の違いによる血小板-白血球凝集比率の変動

次に、同一個人において採血日の違いによりどの程度変動するのかを検討した。4人の健常者から2回、1ヶ月以上の間隔をあけて測定した(図5)。図5における印の意味は図3と同じである。4名中3名では、測定日の違いによる変動は比較的小さかったが、1名においては1回目に血小板-顆粒球凝集比率、血小板-単球凝集比率のいずれも高値を示し、2回目測定時には他の3名と同等のレベルに低下した。

5) 採血後の時間経過による変動

血小板-白血球凝集比率が採血後の時間経過によってどのように変わるかを検討した。

健常者4名について、採血直後、2時間後、4時間後、6時間後、24時間後の血小板-白血球凝集率を測定した(図6)。時間経過による変動は、血小板-顆粒球凝集比率では比較的小さかったが、血小板-単球凝集比率では2時間後の時点で3倍近い変動を示すものが認められた。血小板-白血球凝集比率と経過時間との間に一定の関係は認められず、測定毎に変動を示した。

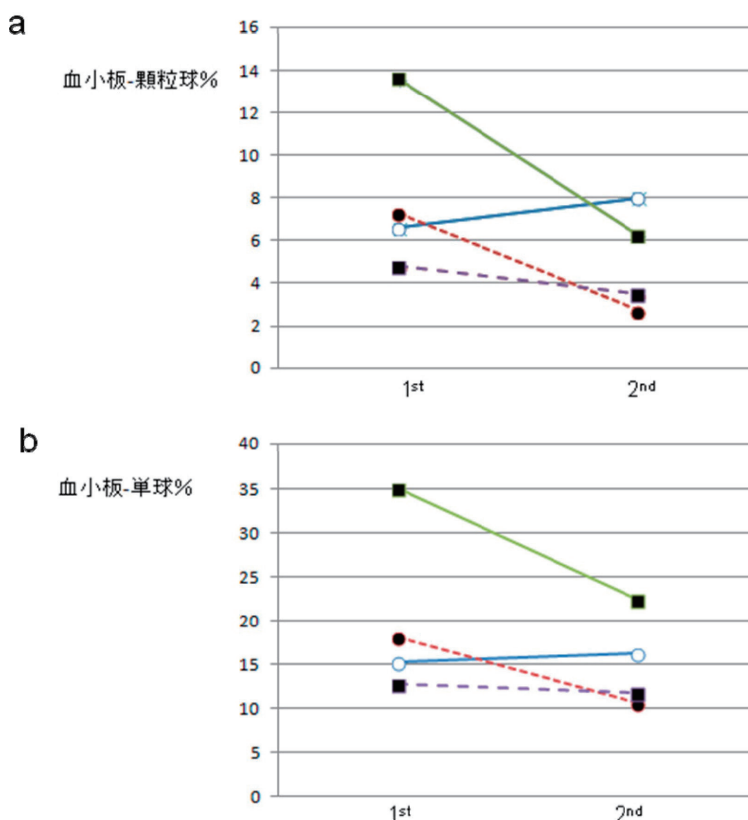


図5. 測定日の違いによる血小板-白血球凝集比率の変動

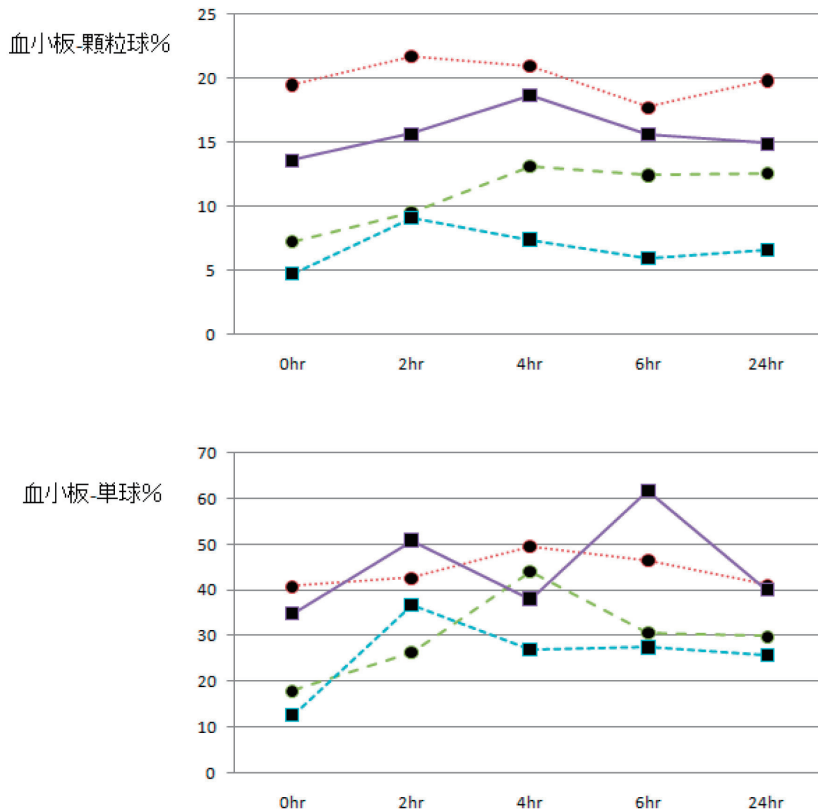


図6. 血小板-白血球凝集比率の経時変化

考察

FCMを用いた血小板-白血球凝集の測定方法は、報告論文によって異なっている^{5), 6), 8), 11)}。我々は白血球の表面マーカーとしてCD33を用いることにより、顆粒球と単球を明確に区別して解析することができた(図2-b)。我々が予備実験的に測定したMPN患者の中にはFSC-SSCサイトグラムでは単球分画と顆粒球分画が不分明な例があったが、CD33の発現の差によって明確に区分することができた(データは提示しない)。

血小板の普遍的な表面マーカーとしては、論文によってCD41、CD42、あるいはCD61が用いられているが、我々は検討した中で非特異反応が少なかったCD61-PerCPを用いた。活性化血小板の表面マーカーには、CD62P(P-セレクチン)を用いた。

血小板全体における活性化血小板の比率は、CD61-PerCPとCD62P-FITCを用いて、赤血球溶血除去や遠沈操作をしない方法で測定した。

血小板-白血球凝集の解析では、CD61-PerCP、CD33-PE、CD62P-FITCを用いてFCMで3カラー解析することにより、血小板-顆粒球凝集比率、血小板-単球凝集比率、活性化血小板-顆粒球凝集比率、活性化血小板-単球凝集比率、を各々計測できた。

末梢血中の血小板-白血球凝集は、血小板と白血球の活性化を反映すると推定されているため、活性化血小板比率が高いほど血小板-白血球凝集比率は上昇することが予想される⁶⁾。我々は、図1の方法で求めた活性化血小板比率と、図2の方法で求めた血小板-白血球凝集比率との比較検討を行った。活性化血小板比率と血小板-単球凝集比率との相関係数は0.658であり、活性化血小板比率と血小板-顆粒球凝集比率との相関係数0.491よりも高い相関を示した(図4)。したがって、血小板-単球凝集比率の方が血小板-顆粒球凝集比率よりも血小板の活性化を反映していると考えられた。

また、顆粒球も単球も、活性化(CD62P+)血小板との凝集比率は血小板との凝集比率よりも低

値であったことより、血小板と白血球の凝集には CD62P 以外の血小板表面抗原も関与していることが示された。血小板と白血球の凝集は、活性化血小板に発現する P-セレクトリン (CD62) と白血球上の P-セレクトリン受容体 (PSGL-1) との結合が主要と考えられているが、活性化した白血球上の CD11b (Mac-1) と血小板の GPIIb/IIIa との結合や、白血球上の CD40 と血小板上の CD40 リガンドとの結合も関与することが報告されている^{4), 7), 10)}。実際にはどのような分子が血小板-白血球凝集に関与しているのか、さらなる検討が必要である。

採血から FCM 測定までの時間経過と血小板-白血球凝集率の検討では、時間経過によって最大 3 倍程度の変動が認められた (図 6)。しかし時間経過と比率の間には一定の関係が認められず、増加または減少を示したことより、試験管内で血小板と白血球の可逆的な凝集が起きていることが推定された。

以上、今回の検討により、血小板-白血球凝集比率、特に血小板-単球凝集比率は血小板活性化の指標となる可能性があること、凝集には P-セレクトリン以外の血小板表面抗原も関与していること、が示された。しかし、個人差が大きく、同一個人でも測定日によって変動が認められるため、血栓症リスクの指標として用いることができるかどうかについては、さらに検討する必要がある。

本研究は当初、MPN 患者の血小板-白血球凝集を測定することをめざしていた。臨床現場では採血から FCM 測定まで時間がかかることが想定されるため、時間経過による血小板-白血球凝集率の変動を検討した結果、時間経過によって最大 3 倍程度の増加または減少を示すことが判った。時間経過による変動を防ぐためには血液を固定する必要があるが、固定すると血小板活性化マーカー発現が著しく低下するため、固定する前に抗体と反応させる必要がある。臨床で使用するためには、検査技師 (マンパワー) の充実および FCM の普及が課題であると考えられた。

謝辞

本研究にご協力くださいました柏原赤十字病院の患者の方々および職員の方々に深謝いたします。血液を提供してくださった神戸常盤大学の卒業研究ゼミ学生に感謝します。

本研究は、平成 22 年度の神戸常盤大学共同研究「血液疾患における白血球-血小板相互作用検討による血栓症リスク指標の探索」として研究助成を受けました。

文献

- 1) 菊池真由美、杉岡憲一、上田真喜子：動脈硬化症：診断と治療の進歩 II. 促進因子 病因と病態 2. 病理面から：冠動脈を中心に 日本内科学会雑誌 102 : 271-3, 2013.
- 2) 浅田祐士郎：特集 血液凝固・線溶・血小板と動脈硬化～アテローム血栓症 update ～序～アテローム血栓症の発症における血栓形成機構～血液フロンティア 21(8) : 1115-1118, 2011
- 3) Woollard, K.J., and Geissmann, F : Monocytes in atherosclerosis : subsets and functions. *Nat Rev Cardiol.* 7(2) : 77-86, 2010.
- 4) Cerletti, C., Tamburrelli, C., Izzi, B., Gianfagna, F., and de Gaetano, G : Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res.* 129(3) : 263-6, 2012.
- 5) Ishikawa, T., Shimizu, M., Kohara, S., Takizawa, S., Kitagawa, Y., and Takagi, S : Appearance of WBC-platelet complex in acute ischemic stroke, predominantly in atherothrombotic infarction. *J Atheroscler Thromb.* 19(5) : 494-501, 2012.
- 6) McCabe, D.J., Harrison, P., Mackie, I.J., Sidhu, P.S., Purdy, G., Lawrie, A.S., Watt, H., Brown, M.M., and Machin, S.J : Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent

phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol.* 125(6):777-87, 2004.

- 7) Freedman, J.E. and Loscalzo, J : Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation.* 105(18):2130-2, 2002.
- 8) Sarma, J., Laan, C.A., Alam, S., Jha, A., Fox, K.A. and Dransfield, I : Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation.* 105(18):2166-71, 2002.
- 9) Falanga, A. and Marchetti, M : Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012:571-81, 2012.
- 10) Cervantes, F., Arellano-Rodrigo, E. and Alvarez-Larrán, A : Blood cell activation in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 94(11):1484-8, 2009.
- 11) Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., Balducci, D. and Barbui, T : Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol.* 33(5):523-30, 2005.
- 12) Falanga, A., Marchetti, M., Evangelista, V., Vignoli, A., Licini, M., Balicco, M., Manarini, S., Finazzi, G., Cerletti, C. and Barbui T: Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood.* 96(13):4261-6, 2000.
- 13) BD 社 Technical Protocol 血小板表面抗原の測定 www.bdj.co.jp/pdf/66-010-01.pdf 2013年9月25日