

## 血小板の活性化、染色と解析

### 概要

ここでは、溶血していない全血から、新鮮な血小板、固定した血小板、刺激していない血小板、または*in vitro*で活性化した血小板を調製する方法、血小板の染色方法、ならびに血小板のデータ収集に必要なFACSブランドフローサイトメーターのセットアップ方法を紹介します。

*in vivo*での血小板の活性化を検出するアッセイを行ったり、あるいは*in vitro*における血小板の活性化を解析する場合には、採血やサンプル取扱中に血小板を活性化してアーティファクトを生じるような状況を最少に抑えることが重要です。たとえ注意深く操作しても、低いレベルの血小板の活性化は避けられません。従って、刺激を加えない状態の血小板サンプルと、刺激を加えたサンプルを常に平行して解析し、活性化の作用を調べる必要があります。

フローサイトメーターによる血小板アッセイには幾つかのオプションがあります。抗凝固剤、採血方法、固定方法、アゴニストの種類、ゲーティング／解析の進め方を別々に選択できます。選択を限定されるのは抗体だけです。ガイドラインの幾つかをご紹介します。

### 必要な試薬と装置

1. ACD バキューティナ採血管 (BDカタログ番号 364816) または同等品
2. FALCONディスポーザル12×75mmキャップ付きポリスチレン試験管 (BDカタログ番号 352058) または同等品。
3. マイクロピペット
4. アデノシン2リン酸 (ADP)、 $2 \times 10^{-4}$ M (Bio/Data, Inc, Phila, PA, カタログ番号 101312) または同等品。メーカーの取り扱い説明書に従い調製し、2~8℃で保存します。
5. 0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで1%パラホルムアルデヒド溶液を調製します。褐色ビンに入れ、2~8℃で1週間まで保存できます。

**警告：**ホルムアルデヒドは吸い込んだり、皮膚に触れたり、または万一飲み込んだりしますと危険です。目や皮膚を刺激し、暴露されると癌を引き起こすことがあります。生体に不可逆的な作用を及ぼす可能性もあります。皮膚への接触により過敏症になることがあります。食べ物、飲み物、動物の飼料の近くには置かないでください。取り扱いには適切な保護服と手袋を着用して下さい。万一飲み込んだ場合、ただちに医師に連絡をとり、容器またはラベルを見せて下さい。廃棄に際しては、国、地方などの規則に従って行って下さい。

**警告：**アジ化ナトリウムは、万一飲み込んだりしますと有害です。食べ物、飲み物、動物の飼料などの近くに置かないでください。取り扱いには適切な保護衣と手袋を着用して下さい。万一飲み込んだ場合、ただちに医師に連絡をとり、容器やラベルを見せてください。酸に触れますと毒性のガスを発生します。アジ化合物を廃棄するときは大量の水で洗い流し、鉛または銅製水道管内に貯留しないようにして下さい。貯留しますと、爆発の危険があります。

6. 遠心分離装置
7. 洗浄緩衝液：0.1%アジ化ナトリウム入りリン酸緩衝生理食塩水（PBS<sup>-</sup>）（カルシウム、マグネシウム、またはフェノールレッドを含まない Dulbecco's PBS, pH7.2±0.2）<sup>1</sup>。PBSは使用前に0.2μmフィルターで濾過する。2~8℃で保存する。
8. ボルテックスミキサー
9. 染色液：0.1%アジ化ナトリウムと2%ウシ胎児血清（FBS）を含むPBS。2~8℃に保存します。
10. BD社製ヒト血小板抗原に対する蛍光標識モノクローナル抗体。詳細は試薬パッケージ内の取扱説明書をご覧ください。
11. Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS)(Sigmaカタログ番号 A9041)。PBSで10mg/mLに調製します。RGDSは標識PAC-1抗体と一緒に用います。  
**留意：**市販品には、強力な血小板活性化因子であるリポポリサッカライド（LPS）を含むものがあります。
12. FACSブランドフローサイトメーター。詳細は装置のユーザーズガイドをご覧ください。
13. CaliBRITEビーズ。詳細はCaliBRITEビーズパッケージ内の取扱説明書をご覧ください。
14. 装置セットアップ用ソフトウェアFACSCompと、データ取り込み・解析用ソフトウェアCellQuest。詳細はソフトウェアのユーザーズガイドをご覧ください。

## 方法

### 血液の採取

**警告：**作業中に接触する全ての生物検体と材料については感染の危険があるものとして取り扱い、国、地方などの規則に従い適切に廃棄する必要があります。**口でのピペット操作は絶対にしないで下さい。**検体が皮膚や粘膜に触れないようにして下さい。BDでは抗凝血剤としてACD、クエン酸ナトリウム、EDTAが使用可能であることが確認できました。ヘパリンは血小板を活性化するため*in vivo*での血小板活性化測定への利用はお薦めできません

**留意：**フィブリノーゲンレセプターへのPAC-1の結合はpHとCa<sup>++</sup>に敏感です。<sup>2</sup> PAC-1はEDTA処理された血液には結合しません。PAC-1は、通常、ACDに比べクエン酸ナトリウム中でより強く結合します。

以下の作業手順は採血時の血小板のアーティファクトの活性化を最小限に止めるよう考えられたものです。<sup>3</sup>

1. 採血管にラベルを貼り、使い易いようにチューブラックに並べます。
2. 20ゲージの針で静脈穿刺し、最大2mLまでの血液をバキュティナ採血管（どのタイプでもよい）に無菌的に採取します。この血液の血小板は活性化されているので廃棄します。続いてラベルを貼ったACDバキュティナ採血管に採血します。この血液を染色に利用します。
3. 採血後10分以内に血小板を活性化し、染色・固定します。<sup>3,4</sup>

## 全血の活性化

ここに紹介する方法は、血小板の活性化に応用できる各種の方法のうち、その一例です。BDではADP、エピネフィリン、Phorbol 12-ミリステン 13-酢酸塩 (PMA)、トロンビンとトロンビンレセプターアゴニストペプチド (TRAP) が利用できることが確認できています。

1. 採血後10分以内に、ADP液50 $\mu$ Lを12×75mm試験管に加えます。
2. 0.45mLの全血を加え、ゆっくり回して混合します。
3. 室温 (20~25 $^{\circ}$ C) で2分間反応させます。
4. すぐに染色または固定します。

## 固定

血液を染色する前にパラホルムアルデヒドで固定すると、血小板の自然活性化が阻害できます。臨床検査では、血小板を固定すると検査をコントロールしやすくなります。固定は活性化依存型血小板抗体に影響します。PAC-1はパラホルムアルデヒド固定した血小板には結合せず、CD62P結合は減少します。固定が必要ない場合や不可能な場合には、新鮮全血を用い次のセクション“直接免疫蛍光染色”を行って下さい。

1. 採血後10分以内に、刺激していない全血、または活性化した全血100 $\mu$ Lを、冷やした (2~8 $^{\circ}$ C) 1%パラホルムアルデヒドPBS溶液1mLを含む12×75mm試験管に加えます。

**留意：**全血100 $\mu$ Lから20テスト分の固定血液が得られます。さらに固定血液が必要な場合には、必要に応じてチューブの数を調整して下さい。1本のチューブで取り扱う血液量やパラホルムアルデヒドの量を増やさないで下さい。血小板が凝集する可能性が高くなります。

2. 血小板を2~8 $^{\circ}$ Cで少なくとも2時間固定します。固定した血小板は5日間は安定です。保存は2~8 $^{\circ}$ Cで保存します。
3. 染色前に、固定血液を1,200xgで5分間、室温 (20~25 $^{\circ}$ C) で遠心分離します。
4. 上清を取り除いて、室温の洗浄緩衝液1mLを加えます。
5. よく攪拌して沈殿を再懸濁します。1,200xgで5分間、室温で遠心分離します。
6. 上清を取り除いて、沈殿を室温の染色液1mL中に再懸濁します。

### 直接免疫蛍光染色

本アッセイではシングルまたはマルチカラー染色が利用できます。マルチカラー染色では、ひとつの標識抗体を用いて、活性化非依存型の血小板特異抗体（例えばCD61またはCD42a）と結合する血液細胞だけのThresholdのデータを取り込み、解析します。そして、別の蛍光色素で標識された別の抗体を用いて、血小板関連、活性化依存型抗体（例えばCD62PまたはPAC-1）との結合を同時に調べます。CD61、CD62PやPAC-1試薬を組み合わせると、血小板活性化の2つの側面が調べられる3カラーアッセイが可能です。以下マルチカラー染色法の手順をご紹介します。

1. 12×75mmチューブにラベルを貼ります。
2. ラベルの表記にしたがって、適切な量の活性化非依存型血小板特異抗体を試験管に加えます。
3. ラベルの表記にしたがって、適切な量のアイソタイプコントロールまたは血小板活性化依存モノクローナル抗体を試験管に加えます。テスト用の抗体とコントロール用の抗体濃度は一致させなければなりません。それぞれのテスト抗体に使用するコントロールの量（ $\mu\text{g}$ 単位）は、モノクローナル抗体のデータシートを参照します。

**留意：**特異的なPAC-1結合を見るためには、染色混合液に10 $\mu\text{L}$ のRGDS液を加えた試験管を1本加える必要があります。RGDSペプチドはPAC-1結合を競合的に阻害します。PAC-1のデータシートをご覧ください。

4. ピペットチップは操作ごとに新しくし、次のいずれかをチューブの底に注意深く加えます。
  - ・採血後10分以内の未刺激、または活性化した新鮮全血5 $\mu\text{L}$
  - ・固定5日以内の未刺激、または活性化した固定全血50 $\mu\text{L}$
  - ・血液がチューブ側壁を伝って流れ落ちない様に特に注意すること。血液が側壁に残ると、染色されなくなります。この様な場合には、廃棄して再度調製して下さい。
5. 試験管をゆっくり回転させ、混合します。
6. 暗所で15～20分間、室温で反応させます。
7. 冷やした（2～8 $^{\circ}\text{C}$ ）1%パラホルムアルデヒドPBS溶液1mLを各チューブに加え、攪拌します。染色・固定された細胞を2～8 $^{\circ}\text{C}$ の暗所に少なくとも30分間放置します（最長24時間保存できます）。フローサイトメーターで解析します。

## データ取り込みと解析

データの取り込みと解析は散乱光ゲーティング（図1～図4）または蛍光ゲーティング（図5～図8）で行うことができます。血小板数が少ない時や、サンプルに凝集が見られる時は散乱光ゲーティング（前方散乱 [FSC] と側方散乱 [SSC] のゲーティング）は利用できません。ドナーが健常の場合でもまた疾患を持つ場合でも、特に血小板が活性化された場合には、血小板と赤血球の散乱光は重複します。散乱光ゲーティングを利用する時は、細胞のデブリを除き、FSC Thresholdを適切に設定してバックグラウンドノイズを下げる必要があります。

蛍光ゲーティング（FL3とSSCのゲーティング）は活性化非依存型血小板マーカーに対して、陽性細胞集団の散乱光を別々に解析することができます。通常、静脈血は3種類のドットの集団になります（図6）。主要な集団は単独で無傷の血小板です。第二の集団は、通常、全集団の5%を占め、単独の血小板より大きな散乱光を示し、大きな白血球（WBC）と結合した血小板です。<sup>3,6</sup> 3番目の集団は、ドットの5～15%を占め、散乱光は単独で無傷の血小板より低く、平均直径0.1  $\mu\text{m}$ の血小板由来のドットです。<sup>5</sup> 蛍光ゲーティングでは、FL3 Thresholdを適切に設定して細胞のデブリを除きバックグラウンドノイズを下げる必要があります。

FACS ブランドフローサイトメーターは、FACSComp ソフトウェアと CaliBRITE ビーズを用いてキャリブレートしなければなりません。血小板には、Lyse/No Washセットアップが利用できます。しかし、血小板は白血球よりも遙かに小さいので、各軸へのデータ表示は最適とは言えません。次の方法で蛍光ゲーティングを行い、セットアップすると血小板イベントの最適な表示が可能です。

1. FSCとSSCのゲインは、対数増幅を選択します。
2. 同時通過が最少になるように流量を低く調整します。
3. FL3蛍光色素に結合させた活性化非依存型血小板特異抗体を利用して、陽性イベントを検出します（図5）。
4. アイソタイプコントロールで染色した血小板、または活性化依存型モノクローナル抗体で染色した未刺激血小板を利用して、FL1とFL2のPMT電圧を調整します。FL1/FL2のベースラインシグナルは、FL1対FL2のドットプロットでは10以内になければなりません。PAC-1については、PAC-1とRGDSで染色された不活血小板を利用します（図7）。
5. FL3の活性化非依存型血小板特異抗体で染色した活性化血小板と、活性化依存型抗体とアイソタイプコントロールの混合試薬を利用して、蛍光補正を行います。例えば、PAC-1 FITC/マウスIgG<sub>1</sub> PE/CD61 PerCPで染色された血小板を使って、FL2からのFITCの蛍光補正を行います。PAC-1 FITCを使用した場合にFL1からのPEの蛍光補正を行うには、RGDS存在下にPAC-1 FITC/CD62P PE/CD61 PerCPで染色しPAC-1結合を阻害します。

- 
6. 5,000～10,000の活性化非依存型血小板イベントを取り込みます。
  7. 全ての血小板集団（WBCと結合した血小板または散乱光ゲートの細胞集団）を2カラードットプロットで表示し、統計解析します（図8）
- 

## 参考文献

1. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
2. Shattil SJ, Motulsky HJ, Insel PA, Flaherty L, Brass LF. Expression of fibrinogen receptors during activation and subsequent desensitization of human platelets by epinephrine. Blood. 1986;68:1224-1231.
3. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. Blood. 1987;70:307-315.
4. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. Thrombosis and Haemostasis. 1991;65:467-473.
5. Abrams CS, Ellison N, Budzinski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. Blood. 1990;75:128-138.
6. Jennings LK, Ashmun RA, Wang WF, Dockter ME. Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. Blood. 1986;68:173-179.

## 散乱光ゲーティング

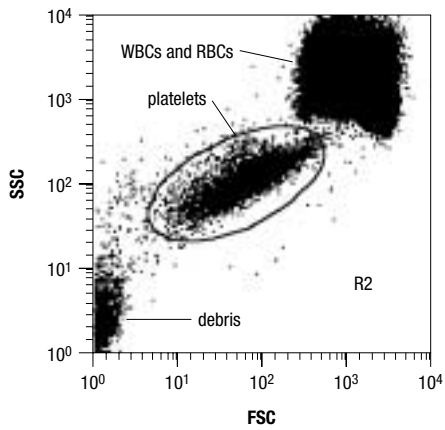


図1 未刺激新鮮全血

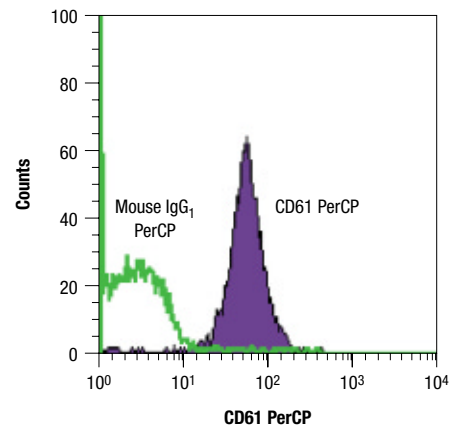


図2 未刺激新鮮全血  
(R2にゲート設定)

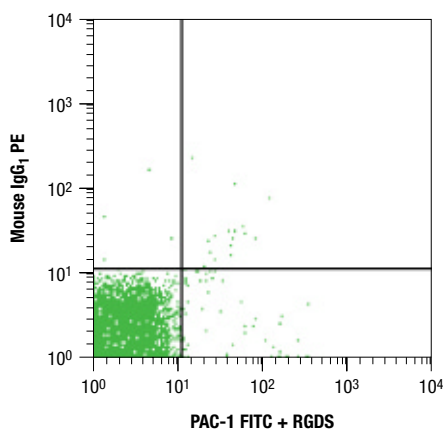


図3 未刺激新鮮全血  
(R2にゲート設定)

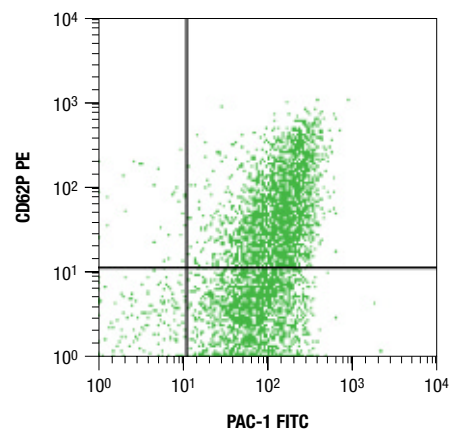


図4 ADP刺激新鮮全血  
(R2にゲート設定)

蛍光ゲーティング

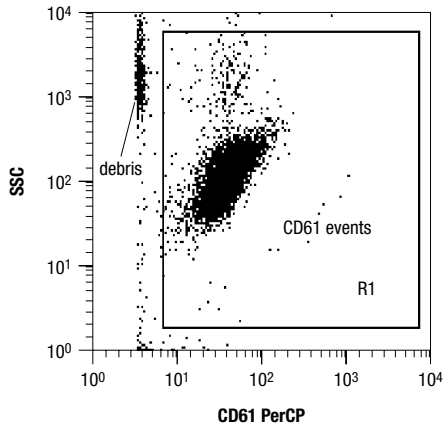


図5 未刺激新鮮全血

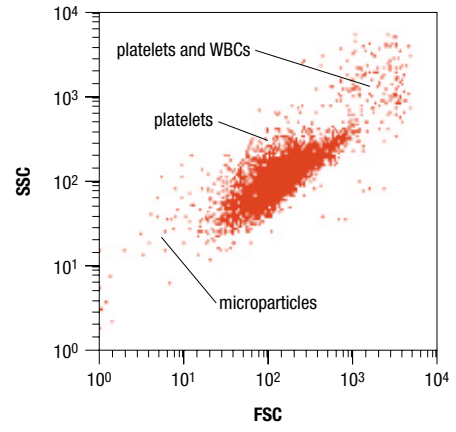


図6 未刺激新鮮全血  
(R1にゲート設定)

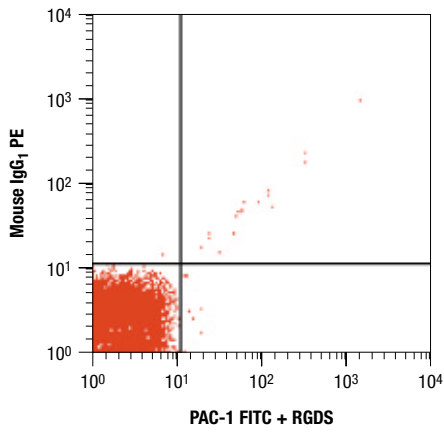


図7 未刺激新鮮全血  
(R1にゲート設定)

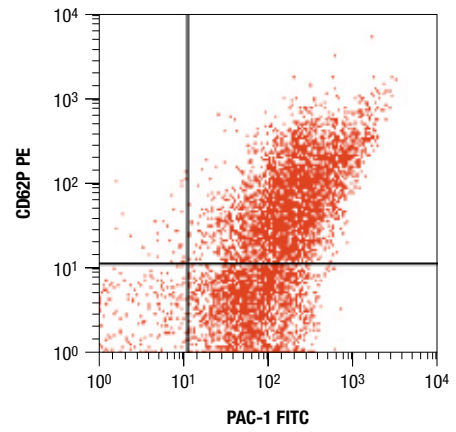


図8 ADP刺激新鮮全血  
(R1にゲート設定)