

血小板表面抗原の測定

(全血直接法による細胞表面抗原の染色)

はじめに

フローサイトメーターを用いた血小板抗原の測定アプリケーションでは、血小板の自然活性化の影響をできるだけ少なくする必要があります。そのため、サンプル調製方法として抗体とのインキュベーションの前に血小板をパラホルムアルデヒドPBSで固定する方法が従来より用いられています。

また、採血による血小板の活性化をできるだけ防ぐ方法で採血し、全血の状態ですぐに抗体と反応させた後、固定し測定する方法もあります。この全血直接法は、初期活性化マーカーのgpIIb/IIIaの立体構造変異部位に対する抗体であるPAC-1のように、固定により抗体が結合不可となる系に有効です。

フローサイトメーターによる血小板の解析において、正確に血小板分画をゲーティングするために、従来の散乱光パターンによる血小板ゲートに加えて、活性化非依存性の血小板特異マーカーに対する抗体(CD61あるいはCD41等)を用いて、抗体と反応した細胞集団、すなわち血小板をゲートし、解析する方法が推奨されています。

このテクニカルプロトコルでは、CD61 PerCP陽性血小板ゲートを設定し、血小板活性化マーカーCD62PとPAC-1の同時解析例を用いて、全血直接法による血小板抗原測定方法を概説します。

試薬および器材

1. ACD 採血管(BDバキュティナ™ 滅菌済み採血管 カタログ番号: 364606)
注: 凝固検査用3.8%あるいは3.2%クエン酸ナトリウム緩衝液入り採血管(カタログ番号: 367706あるいは367716)も使用できます。PAC-1はpHとCaイオンの影響を受けやすいので、ACDまたはクエン酸で採血した検体以外は使用できません。
測定する抗原により、抗凝固剤を選択する必要があります。
2. 12×75 mm BD Falcon™ ポリスチレン製ディスポーザブル試験管(カタログ番号: 352052、352054、352058)
3. チップ付きマイクロピペッター
4. Vortexミキサー
5. 1%パラホルムアルデヒド; 1%パラホルムアルデヒド0.1%アジ化ナトリウムPBS溶液またはCellFIX(カタログ番号: 340181)
6. 蛍光標識抗ヒト血小板モノクローナル抗体; CD61 PerCP(カタログ番号: 340506) PAC-1 FITC(カタログ番号: 340507) CD62P PE(カタログ番号: 348107) 血小板/細胞内用マウスIgG1 PE Contro(カタログ番号: 340013)
7. Arg-Gly-Asp-Ser(RGDS)(Sigma カタログ番号: A9041); PBS(-)で10 mg/mLに溶解
PAC-1陰性コントロールサンプルに使用。
注: 他社のRGDSの中には血小板を活性化させるLPSを含んでいるものがありますのでご注意ください。
8. FACSブランド フローサイトメーター
9. CaliBRITE3(カタログ番号: 340486)

操作方法

【血液採取】

アーチファクトによる血小板の活性化を最小にするように採血します。

1. 採血管を用意し、後の手順で扱いやすいように試験管立てに置きます。
2. 21ゲージ針を用いて採血します。最初に駆血帯を装着し、静脈穿刺したのち、約2 mL採血します。この際、採血管の種類は問いません。この血液には針を刺したことによる物理的刺激で活性化した血小板が含まれる可能性があるため、廃棄します。次に、駆血帯を外し、ACD溶液入り採血管あるいはクエン酸ナトリウム緩衝液入り採血管に血液を採取します。この血液を血小板染色に使用します。
3. 直接法の場合、血液採取後10分以内に次の抗体染色を行ないます。

【抗体染色】

1. 試験管2本を用意し、コントロールと試薬名をラベルします。蛍光補正用サンプルの試験管も用意します。ただし、FACSCCompのLyse/washによる機器設定を実施する場合は蛍光補正用サンプルの必要はありません。

例：FL1-%FL2用として、FITC標識抗体染色のみのサンプル。FL2-%FL1用として、PE標識抗体染色のみのサンプル。

(【データの取り込み機器条件設定】を参照してください。)

2. 活性化非依存性血小板特異的な抗体をすべての試験管に添加します。
CD61 PerCPの場合、20 µL添加します。
3. 適切な陰性コントロール試薬あるいは血小板抗原に対する抗体を適量加えます。
留意：1) 陰性コントロール抗体と血小板抗原に対する抗体は、同濃度になるように添加量を調節します。BD社製抗体の抗体濃度はデータシートあるいはパイアルラベルに表示されています。
CD62P PEの場合、CD62P PE 20 µLに対して、血小板用マウスIgG1 PE Control(カタログ番号:340013)をPBS(-)で16倍希釈したものを20 µL使用すればほぼ同濃度になります。
2) PAC-1の陰性コントロールとしては、RGDS 10 µLをPAC-1抗体20 µLと共にサンプルに添加します。
4. 採血後10分以内に、全血を5 µLずつ試験管に加えます。添加の際には毎回新しいマイクロピペッター用チップを使用し、血液は試験管底部に入れ、管壁につかないようにします。血液が管壁に付いた場合には染色されない可能性があるため、その試験管は廃棄してやりなおしてください。
5. ゆっくりと試験管を振って混合します。vortexミキサーは使用しないでください。
6. 室温暗所で15~20分インキュベートします。
7. 各試験管に冷1%パラホルムアルデヒド(2~8°C)1 mLを加えます。最低30分間、2~8°C、暗所で保存します。24時間以上は放置しないでください。
8. フローサイトメーターで測定します。

【参考：血小板の固定】

血液を抗体染色前に固定することにより、血小板の自然活性化を防ぎ、サンプルとして取り扱いやすくなりますが、PAC-1は固定すると全く反応しなくなり、CD62P抗体は結合が減少するので、このプロトコールでは固定しません。参考までに血小板の固定方法を示します。

1. 採血後10分以内に、活性化あるいは無活性の全血100 µLを12×75 mm試験管に分注し、冷(2~8°C)1%パラホルムアルデヒドPBS1 mLを加えます。
注：全血100 µLは、20テストに使用できます。
2. 2~8°Cで少なくとも2時間固定します。固定血小板は、2~8°C保存で5日間保存可能です。
3. 抗体染色前に、室温、1200xg、5分間遠心します。
4. 上清を除去し、室温のWashing Bufferを1 mL加えます。
5. Vortexでペレットを再浮遊させ、室温、1200xg、5分間遠心します。
6. 上清を除去し、室温のStaining Medium 1 mLを加えます。

【データ取り込み機器条件設定】

1. 機器を立ち上げます。
2. CaliBRITE3とFACSCCompソフトウェア(Lyse/wash)による機器のキャリブレーションを行ないます。
3. データ取り込み&解析ソフトウェアCELLQuestを立ち上げます。
4. FACSCCompのLyse/Wash機器設定を呼び出し、CellQuestのCytometerメニューよりDetector/Ampsウィンドウを表示させ、FSCおよびSSCパラメータをLin modeからLog modeに変更します。(既に、血小板データ取り込み用機器設定条件が保存されている場合は、その機器条件をCellQuestのCytometerメニューのInstrument Settingウィンドウで呼び出します。)
5. 散乱光ドットプロット(FSC vs SSC) (図1) およびFL3 (CD61 PerCP) vs SSCドットプロット(図2)を作成します。
6. 陰性コントロールサンプルあるいは機器調整用サンプルを機器にセットし、予備取り込みを行ないながら、次の7、8、9に従って機器条件の微調整をします。
7. 血小板特異抗体による血小板ゲートをセットする場合は、CytometerメニューのThresholdを、FSCから蛍光パラメータ(FL3; CD61 PerCP)に変更し、抗体陰性ポピュレーションのデータを取り込まないようにします。
8. 血小板集団を限定するG1=R1あるいはG2=R2あるいはG3=R1 and R2ゲートを作成します。
9. 8で作成した血小板ゲートのFL1 vs FL2ドットプロットを作成し(図3) 陰性コントロールサンプルによるドットパターンをみながら、4分画蛍光マーカで陰性領域を設定します。FL1および、FL2 voltageの微調整が必要な場合(4分画マーカがX軸およびY軸の 10^1 レベルから、かなりかけ離れている場合のみ) CellQuestのCytometerメニューのDetector/ Ampsウィンドウでvoltageを変更し調整します。
10. FACSCComp Lyse/washの機器設定を利用できない場合は、蛍光Compensation用のサンプル*を用いて、CellQuestのCytometryメニューのCompensationウィンドウでFL2-%FL1およびFL1-%FL2を調整します。

蛍光コンペ - ション用のサンプル例

PAC-1 FITC/CD62P PE/CD61 PerCPによる3カラー解析の場合、活性化させた血小板検体を用いて下記の2種類のサンプルチューブを調製し、1:1に混合したサンプルを流しながら、図4のようになるようにFL1-%FL2およびFL2-%FL1 Compensationを微調整します。

- 1) 活性化血小板サンプル+PAC-1 FITC/マウスIgG1 PE/CD61 PerCP
 - 2) 活性化血小板サンプル+RGDS+PAC-1 FITC/CD62P PE/CD61 PerCP
11. データ取り込みを行ないます。血小板の赤血球および白血球への同時通過を防ぐため、サンプルの流量はLowにします。

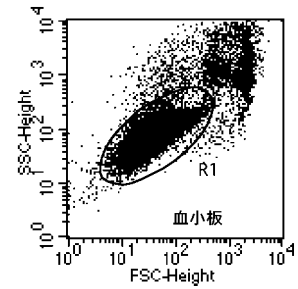


図1

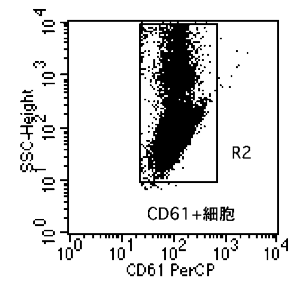


図2

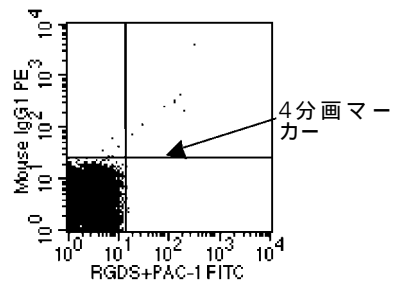


図3

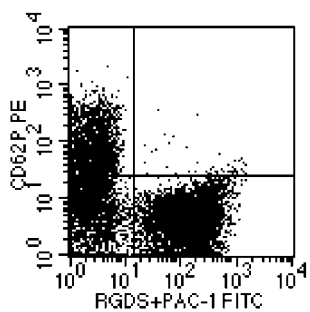


図4

【解析】

1. 陰性コントロールのデータ呼び出し、血小板集団にゲートを設定します。(散乱光ゲートまたはCD62P vs SSCゲート。

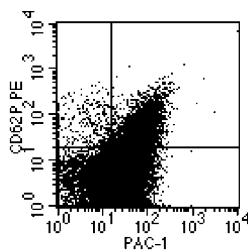
(このProtocolの【データ取り込み機器条件設定】の7, 図1, 図2を参照してください。)

2. 1のゲート内の血小板集団について、FL1 vs FL2ドットプロットまたはFL1あるいはFL2ヒストグラムを作成します。
3. FL1 vs FL2ドットプロットの場合は、4分画マーカをセットします。ヒストグラムの場合は、陰性、陽性マーカをセットします。
4. Statsメニューより、統計解析結果を表示します。

【参考文献】

1. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thrombosis and Haemostasis*. 1991;65:467-473.
2. 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.
3. Abrams CS, Ellison N, Budzinski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*. 1990;75:128-138.
4. 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
5. 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
6. 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.
7. 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.
8. Slockblower J, Belgeri K, Bruck E, et al. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (H3-A2)*. Villanova, PA: The National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1984.
9. Fijnheer R, Modderman PW, Veldman H, et al. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. *Transfusion*. 1990;30:20-25.

解析<ドットプロット>



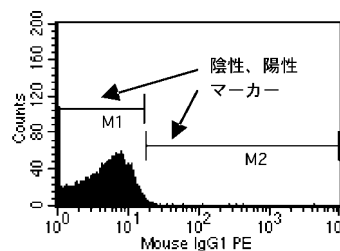
Quadrant Statistics

X Parameter: FL1-H PAC-1 (Log)
Y Parameter: FL2-H CD62P PE (Log)
Quad Location: 15, 18

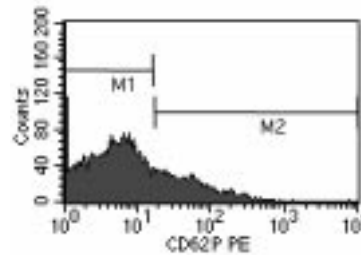
Quad	Events	% Gated	Y Mean	Y Geo Mean
UL	370	2.24	79.38	54.23
UR	3243	19.60	71.34	50.65
LL	5290	31.98	4.45	3.28
LR	7639	46.18	5.44	3.78

解析<ヒストグラム>

陰性コントロール



CD62P PE

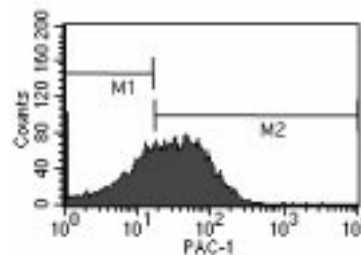


Histogram Statistics

X Parameter: FL2-H CD62P PE (Log)

Marker	Left, Right	% Gated
All	1, 9910	100.00
M1	1, 16	75.88
M2	17, 9910	23.34

PAC-I FITC



Histogram Statistics

X Parameter: FL1-H PAC-1 (Log)

Marker	Left, Right	% Gated
All	1,9910	100.00
M1	1, 16	35.58
M2	17, 9910	62.73



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

www.bd.com/jp/

お客様情報センター 0120-8555-90
製品関連・資料請求 / 納期・在庫 Fax: 024-593-5761

BD Biosciencesに関する技術的、学術的なお問い合わせ先
アプリケーションホットライン Tel: 03-5805-9960
技術研修室 E-Mail: tech_cell@bd.com

機器修理・メンテナンス ☎ 0120-7099-12

試薬カスタマーサポート ☎ 0120-4890-77
E-Mail: tech_cell@bd.com