

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16944

研究課題名(和文)フローサイトメトリーによるヒト流血中活性化血小板の検出法の確立

研究課題名(英文)The detection assay of activated platelets in human blood by flow cytometry

研究代表者

安本 篤史 (Yasumoto, Atsushi)

北海道大学・大学病院・臨床検査管理医師

研究者番号：90769887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1) クエン酸血を血小板凝集剤で刺激をして血小板凝集塊を作成し、光学/蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、Optofluidic time-stretch顕微鏡にて評価し、密度勾配法と細胞固定で感度良く血小板凝集塊を検出できた。
(2) そのサンプルのうちCD61+CD62P+PAC-1+が血小板凝集塊である。また、白血球と関連評価目的にCD45の染色も重要である。本研究成果をeLife誌で発表した(Zhou Y, Yasumoto A, et al. eLife. 2020; 9: e52938)。
(3) マイクロパーティクルの放出量から血小板活性化の程度を定量評価するアッセイを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞や心筋梗塞は日本での死亡原因の大きな要因であり、その克服は重要課題である。それら血栓症の原因のひとつは動脈硬化であり、活性化血小板が関与する。動脈硬化が進行すると活性化血小板は増加すると考えられるが、その測定法はいまだに確立していない。本研究では生体内の活性化血小板をOptofluidic time-stretch顕微鏡という新しい技術を用いて検出して、臨床現場で使えるものを作り上げた。これが実臨床で用いられた場合、脳梗塞や心筋梗塞の発症リスクを早期に検出でき、予防が可能になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：(1) Platelet aggregates were formed by stimulating citrate blood with various platelet agonists, and measured with an optical / fluorescence microscope, a flow cytometer, and an Optofluidic time-stretch microscope. Density-gradient method and cell fixation enabled platelet aggregates to be detected with high sensitivity.
(2) Platelet aggregates showed CD61 + CD62P + PAC-1 + by a flow cytometer. Staining of CD45 is also important to evaluate the association between leukocytes and platelets. The results of this research were published in eLife (Zhou Y, Yasumoto A, et al. eLife. 2020; 9: e52938).
(3) We established a functional assay, which quantitatively evaluates the degree of platelet activation by measuring released microparticles.

研究分野：臨床検査学

キーワード：活性化血小板 フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

アテローム性動脈硬化症では動脈の内膜に粥状物質(アテローム)が蓄積し、内膜が菲薄化して破裂すると血小板を活性化して血小板血栓が形成される。活性化血小板の果たす役割は大きく、臨床応用可能な活性化血小板の検出法が望まれている。過去に活性化血小板の検出法は多く報告されているが、サンプル調製の困難さ故に臨床応用されていない。我々は *in vivo* での活性化血小板の指標として血中の血小板凝集塊に着目し、正確に検出する方法を検討、報告してきた。この結果に基づいて、血中の血小板凝集塊測定に向けたサンプル調整方法とフローサイトメトリー法を用いた血小板凝集塊の検出法を確立し、将来の臨床検査への応用を目指している。

2. 研究の目的

アテローム性動脈硬化症およびそれに起因する血栓塞栓症は患者数が増加傾向であり、高い死亡率だけでなく、生活の質(QOL)も著しく低下させるため、その発症予防は急務である。高血圧、糖尿病のような生活習慣病がアテローム性動脈硬化症の増悪因子であるが無症候性に進行するため、将来の血栓塞栓症のリスクを評価できる検査法の確立が求められている。

動脈硬化が進行し、内膜の破綻、血小板の活性化の初期段階では有症状は出ないため、我々はこの段階での血小板活性化に伴う血小板凝集塊の検出を試みて早期診断法を確立する。我々は *in vivo* での活性化血小板の指標として血中の血小板凝集塊に着目し、正確に検出する方法を検討、報告してきた。この結果に基づいて、血中の血小板凝集塊測定に向けたサンプル調整方法とフローサイトメトリー法を用いた血小板凝集塊の検出法を確立し、将来の臨床検査への応用を目指す。

3. 研究の方法

研究計画は4つで構成されている。(1)最適なサンプル調整方法の確立、(2)健常人の血液サンプルでの血小板凝集塊の測定系を確立、(3)患者検体での有用性を示す、(4)HIT抗体による血小板活性化の検出アッセイの確立の4つである。以下の4つの研究の方法を記す。

(1)健常成人を対象としてクエン酸血とEDTA血を採取し、採血管内で全血に血小板凝集剤(ADP、コラーゲン、TRAP-6、U46619)を添加して tapping, pipetting, vortex で攪拌し血小板凝集塊を作成する。できたサンプルを全血、赤血球溶血、赤血球分離(密度勾配)とで比較し、固定する/しないを光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、Optofluidic time-stretch 顕微鏡で評価する。

(2)前述で最適化された血小板凝集塊をCD61, CD62P, PAC-1で染色して、フローサイトメトリーで測定する。このアッセイでは全血で凝集塊を作成しているため leukocyte-platelet aggregates も存在するため、CD45でも染色することでその割合を評価することができる。

(3)患者の臨床残余検体を用いて検討する。D-dimer 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の検体を処理してフローサイトメトリーで解析し、実臨床での有用性を明らかにする。

(4)抗血小板第4因子/ヘパリン複合体抗体(HIT抗体)を用いて洗浄血小板を活性化し、放出されたマイクロパーティクルを測定し、血小板活性化の程度を定量化する。マイクロパーティクルの測定にはCD62Pで染色して、サイズとCD62Pを用いてフローサイトメーターで測定する。

4. 研究成果

前述の4つについてそれぞれ記載する。

(1) 最適なサンプル調整方法の確立

初めに採血管の条件を検討した。抗凝固薬としてクエン酸とEDTAを用いたがEDTAでは血小板凝集剤による刺激で血小板凝集塊が誘導されず、*in vivo* で形成された血小板凝集塊も離れてしまうことが示され、本研究には適さなかった。次に検体の処理の方法で tapping, pipetting, vortex を比較したところ、予想通り強度が強い方法ほど血小板凝集塊は大きく、明瞭にできていた(tapping < pipetting < vortex)。そのため本アッセイの確立時には vortex で検体を作成したが、患者検体を取り扱う際は *in vitro* での刺激を最小限にするため、tapping が推奨される。全血、赤血球溶血、赤血球分離では全血で評価できるのが理想であるが、赤血球は数が多く、少ない血小板凝集塊の割合が相対的に少なくなり評価が困難であった。赤血球溶血と赤血球分離では溶血で血小板凝集塊への影響が強く、できた凝集塊を壊してしまい小さくなることが観察された(図1)。最後に固定の有無で評価した。図2で示す通り、非固定では血小板凝集塊は経時的に小さくなることが観察され、臨床現場ではすぐに測定ができない場合も多く、固定することが妥当と判断した。

結果として、クエン酸を用いて採血を行い、検体処理には tapping を用いるなど外部の刺激を避け、密度勾配法などの赤血球分離法で赤血球を除いた後、1%パラホルムアルデヒドで固定した検体を用いることが高感度に血小板凝集塊を検出できると結論づけた。

図 1. 赤血球溶血と赤血球分離による血小板凝集塊の差

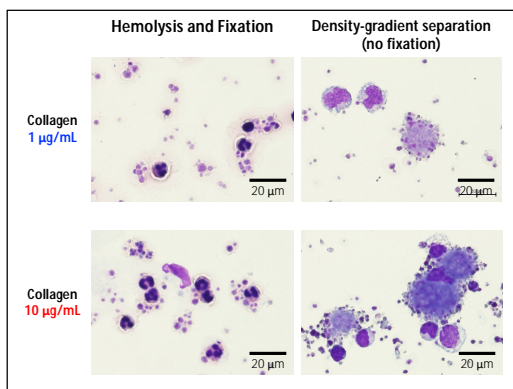
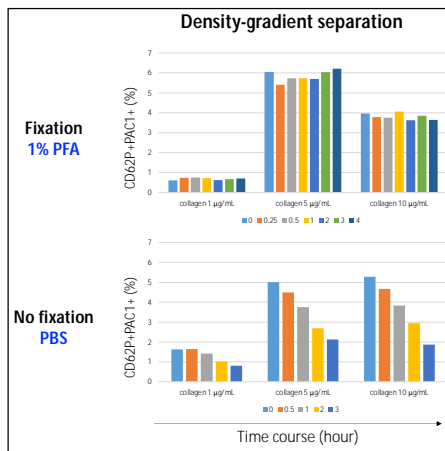


図 2. 固定の有無で血小板凝集塊の経時的変化



(2) 健常人の血液サンプルでの血小板凝集塊の測定系を確立

(1)で処理したサンプルを用いて測定系の確立を目指した。血小板マーカーとしてCD61、血小板活性化マーカーとしてCD62PとPAC-1を用いて、染色後に1%パラホルムアルデヒドにて固定した。この方法はこれまで報告がある方法であるが、血小板のみの凝集塊でしか評価されていない。一方、本研究では全血で凝固させているため白血球-血小板凝集塊の検出を目指し、さらに白血球のマーカーであるCD45も合わせて評価した(図3)。図3のフローサイトメーターの結果で血小板凝集剤ごとに分布が異なることがわかるがその詳細までは評価できない。そこで我々は開発中の intelligent platelet aggregate classifier (iPAC)を用いてこれらの凝集塊を分類可能か評価した。その結果、ADP、コラーゲン、TRAP、U46619による血小板凝集塊が図4に示すように、人工知能を用いると血小板凝集塊の形態に差を認めることを明らかにした(Zhou Y, Yasumoto A, et al. eLife. 2020; 9: e52938)。

この新しい技術の臨床応用を考えると、ある患者から検出された血小板凝集塊でTRAP-6が多いとトロンビン刺激による血小板凝集塊であることがわかり、静脈系由来であることが推察でき、またコラーゲンが多いと血管内皮傷害による影響が推察されるなど、血小板凝集塊の由来が推測でき、適切な治療が可能となる、いわゆる個別化医療の提供が可能になる可能性がある。

図 3. 血小板凝集剤による白血球-血小板凝集塊の分布差

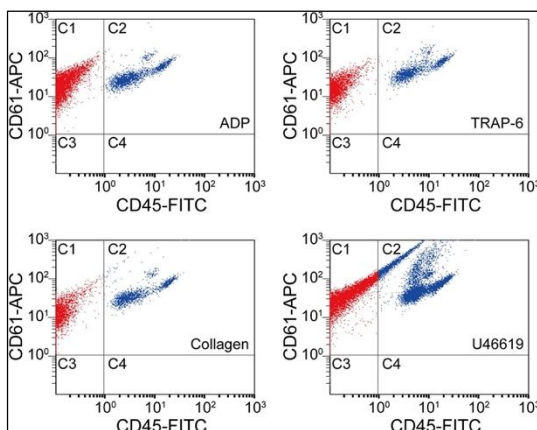
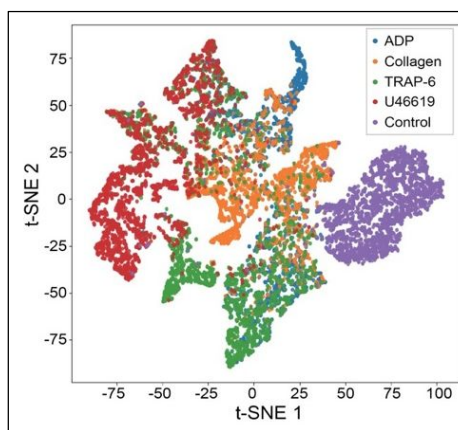


図 4. 血小板凝集剤による血小板凝集塊の形態を差別化できる



(3) 患者検体での有用性を示す

この技術を実臨床でも証明するため患者の臨床残余検体を用いて検討した。D-dimer 5.0 µg/mL以上の血栓症が起きていると考えられる症例を抽出して、(1)の検体処理を用いてフローサイトメーターおよびiPACで測定を行った。少数の検体で期待された結果が得られたが再現性に乏しく、少なくとも残余検体では十分な評価は困難であった。残余検体の場合、採血手技のばらつき、採血してから検査されるまでの放置時間がin vitroでの刺激を増やしてしまい、in vivoの状態を反映していないと考えられた。前向き研究として研究用に検体を得て行う研究を現在進行中である。

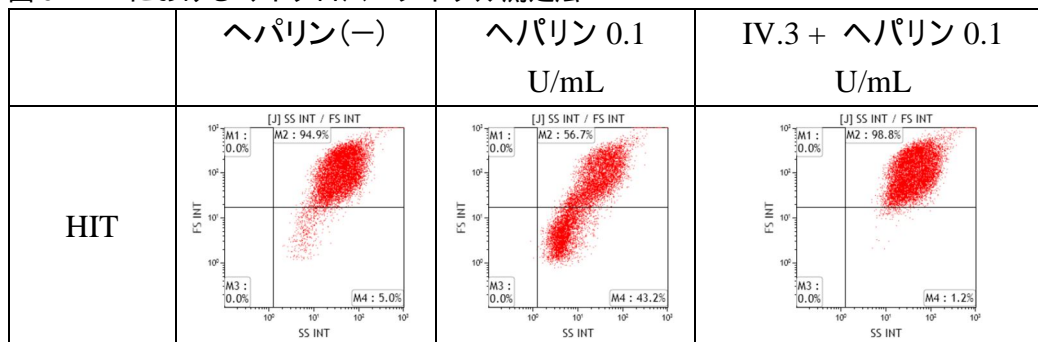
(4) HIT 抗体による血小板活性化の検出アッセイの確立

研究代表者が研究施設を異動したことにより iPAC を用いた研究の継続が困難となったことで最終年度ではフローサイトメーターを用いた検出系に限定した。研究代表者は血小板活性化に関連した測定系の開発に注力していたため、最終年度には HIT 抗体による血小板活性化の検出アッセイの確立を目指した。海外では血小板活性化時に放出されるセロトニンを測定する方法や血小板が活性化した結果、形成される血小板凝集塊を検出する方法が行われている。本研究では血小板凝集塊の検出とそこから放出されるマイクロパーティクルの検出を行った。

初めに HIT モノクローナル抗体を用いて血小板を刺激して血小板凝集塊が形成される様子を 96-well plate にて観察し、血小板凝集塊を認める well 中のマイクロパーティクルを測定した。フローサイトメーターの測定系を設定し、実際に HIT を発症した患者血清を用いた結果が図 5 である。ヘパリン非添加では 5% (cut off <10%) であるところ、ヘパリン 0.1 U/mL 添加することで 43.2% に増加し、IV.3 を加えることで抑制された。これは典型的な HIT 患者でみられる現象であり、機能的測定法が確立された。血小板凝集塊の形成とともに評価しているが、感度としてはマイクロパーティクル測定法の方が高い。

現在、本邦では HIT 患者で検出される HIT 抗体の血小板活性化能を測定する方法はなく、前向きに臨床研究を進めていく予定である。

図 5. HIT におけるマイクロパーティクル測定法



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhou Yuqi, Yasumoto Atsushi, Lei Cheng, Huang Chun-Jung, Kobayashi Hirofumi, Wu Yunzhao, Yan Sheng, Sun Chia-Wei, Yatomi Yutaka, Goda Keisuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Intelligent classification of platelet aggregates by agonist type	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e52938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.52938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安本篤史
2. 発表標題 人工知能による活性化血小板の革新的検出技術
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

血小板凝集塊は分類可能！人工知能が発見 https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2020/6852/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------