

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460679

研究課題名(和文) 活性化血小板マイクロパーティクル特異的高感度定量法の開発と血栓形成促進作用の解明

研究課題名(英文) Development of a superior assay for activated platelet-derived microparticles by ELISA and elucidation of a mechanism of hypercoagulability.

研究代表者

岡野 こそえ (OKANO, Kozue)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50160693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：活性化血小板マイクロパーティクル(aPLT-MP)は血栓形成や炎症促進に強く関与するが、確立した測定系やメカニズムは明らかでない。我々は各種血小板関連抗体を用いたELISA法でaPLT-MP定量の開発と血栓形成促進作用の解明を試みた。健康人13例と患者検体178例のクエン酸Na血漿を用いた。aPLT-MP ELISA法は、4種の一次抗体と8種の二次抗体で検討した結果、一次抗体に抗AnnexinV抗体、二次抗体に抗GPⅡb抗体が最も感度、特異性、再現性が良かった。健康人aPLT-MP値と患者aPLT-MP値に有意差は無かったがaPLT-MP値へ影響を与える因子として不整脈と抗凝固薬が抽出された。

研究成果の概要(英文)：Activated-Platelet derived microparticle (aPLT-MP) has a strong influence on the blood clot formation and inflammatory, however, measuring method and mechanism of clot formation have not been clarified. We conducted a fundamental examination of an assay by ELISA using various platelet-related antibodies to determine aPLT-MP. Citrated plasma samples were obtained from 13 healthy volunteers, 72 patients with atrial fibrillation, 60 with hypertension, and 41 with diabetes mellitus. The sensitivity and specificity of aPLT-MP varied according to the combination of platelet-related antibodies, and anti-AnnexinV polyclonal antibody for solid-phase and anti-GPIIb monoclonal antibody for detector was the most suitable combination for aPLT-MP. There was no significant difference in PLT-MP values of volunteers between healthy and patients. Influencing factors to aPLT-MP values were arrhythmia and anticoagulant drugs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：活性化血小板 マイクロパーティクル ELISA法 血小板関連抗体 抗AnnexinV抗体 採血条件 不整脈  
抗凝固薬

1. 研究開始当初の背景

血中マイクロパーティクル (Microparticle:MP)は血小板、血管内皮、単核球など、様々な細胞から生じることが知られており<sup>1)~4)</sup>、糖尿病患者では、血小板由来MP(Platelet derived MP: PDMP)、血管内皮由来MP、単球由来MP、顆粒球由来MPが検出され、脳卒中患者ではPDMP、内皮由来MPが測定されるなど、多彩な疾患に関与していると言われている<sup>2,5)</sup>。活性化血小板由来MP(activated Platelet-Microparticle : aPLT-MP)は、トロンピン、ADP、コラーゲンなどの血小板活性アゴニストによる刺激や、補体活性の結果産生され、Membrane attack complexによるCaイオンの細胞内流入、シエラストレスによるvWF因子への接着への関与などが報告されている。働きとしては、強力な凝固活性促進や炎症促進作用を持ち、血栓症、脳血管疾患、炎症性疾患などで血中に放出されると言われているため、血栓止血分野において臨床研究で注目を集めている<sup>6)~8)</sup>。また、生成の過程で、細胞膜に存在する膜蛋白や脂質、さらには細胞質蛋白や mRNA までも細胞から供与されるため MP は表面また内部にこれら種々の物質を含有しながら、それを標的細胞に向けて輸送する細胞間のトランスポーターとして機能していることも判明してきている<sup>3),9)</sup>。以上のことより、aPLT-MP を測定することは、疾患との関与を検索することにより、病状のモニタリングやリスク算出など、幅広い臨床検査での応用が示唆される。

2. 研究の目的

各種血小板関連抗体と、血小板活性化マーカーである抗 AnnexinV 抗体を用いた ELISA 法 (サンドイッチ ELISA 法)について、aPLT-MP 測定プロトコルを作製し患者検体を測定し、臨床検査法としての有用性について評価した。

3. 研究の方法

(1)試料は、健常人 13 例と患者残余検体 178 例のクエン酸 Na 血漿を用いた。測定用検体は、採血後 15 分以内に 1200g, 10 分で遠心分離した血漿を用いた。患者背景は採血時のカルテ情報を参照した。患者の主な病態は、心房細動(72 例)、高血圧(60 例)、糖尿病(41 例)などであった。その他に各種培養細胞を用いた。

(2)aPLT-MP ELISA 法の試薬は、4 種の一次抗体 (抗 AnnexinV -Mb 抗体と抗 AnnexinV -Pb 抗体、抗 vWF -Pb 抗体、抗 GP b/ a-Pb 抗体)と 8 種の二次抗体 (抗 CD36 -Mb 抗体、抗 GPIb -Mb 抗体、抗 AnnexinV -Mb 抗体、抗 p53 -Mb 抗体、抗 CD40-Mb 抗体、抗 TP80-Mb 抗体、抗 vWF -Pb 抗体、抗 GP b/ a-Pb 抗体)の組み合わせを用いた。

(3)採血器具は、4 種類の採血管 (ネオチューブ、BD Vacutainer、インセパック、ベロジェクト)とフラッシュバック有り無し採血針 2 種に aPLT-MP ELISA 法への影響を比較

した。

(4)機器は、プレートウォッシャー (HydroFlex ウォッシャー:TECAN) 超音波発生機 UD-200(トミー精工社)を用いた。

(5)反応条件は、各種緩衝液で抗体を希釈し、aPLT-MP に感度・特異性の高い緩衝液と pH および希釈倍数を検索した。反応温度は 4 ~ 37、反応時間は 1 時間から over night までを検討し、aPLT-MP に感度・特異性の高い測定条件を検索した。

(6)aPLT-MP の標準液は、健常人 PRP の血小板数を  $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$  に調整し、刺激剤 ADP で 37 下にて 170g 10 分間攪拌後、凍結、超音波処理をして標準液とした。

赤血球由来 MP の標準液は、健常人末梢血から赤血球を分離し数を計測した後、aPLT-MP と同様の操作で作成した。血管内皮由来、白血球細胞株由来 MP は、培養後、数を計測し、aPLT-MP と同様の操作で作成した。その後、測定まで -20 で冷凍保管した。

4. 研究成果

(1)各種抗体の組み合わせ：一次抗体に抗 AnnexinV-Pb 抗体、二次抗体に抗 GP b-Mb 抗体の組み合わせが最も感度、特異性、再現性良く aPLT-MP を捉えた。

(2)固相化抗体に 1,000 倍抗 vWF PAb を用いた時の結果を図 1 に示す。トリス緩衝液 pH9.0 と 0.05M 炭酸 Na 緩衝液 pH9.6 で吸光度が高くなり、固相化に適していた。反応条件は、37 1 時間静置が最も吸光度が高くなり、固相化に適していた。以後の固相化は、トリス緩衝液 pH9.0、37 1 時間静置で行った。

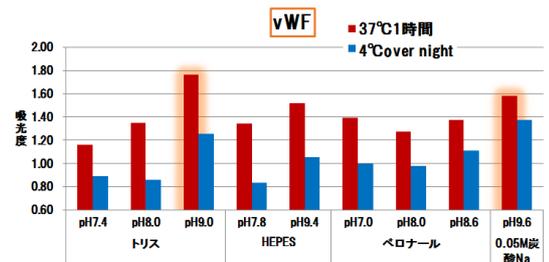


図 1 固相化用緩衝液の比較

(3)検量線は、既知濃度の aPLT-MP と吸光度において直線性が得られた (図 2)。

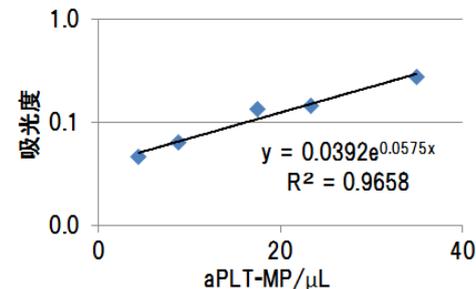


図 2 aPLT-MP 検量線

(4)採血条件では、4 種の採血管間、フラッシュバック有り無し採血針間で aPLT-MP 値に有意な差は見られなかったが、シリンジ採血は有意に高値を示した (図 3)。

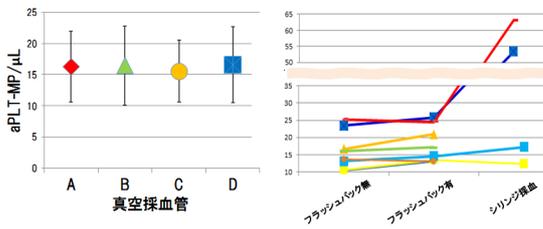


図3 真空採血管および針の違いによる aPLT-MP 値の比較

(5)保存方法作成日を 0 日目とし、冷蔵保存と凍結保存に分けて 6 日間に渡り aPLT-MP を測定検討した結果を図 4 に示す。冷蔵保存では徐々に吸光度が下がり、特に 3 日目から急激に低下していることが分かった。凍結保存では目立った変化は見られなかったが、長期間の保存についての検討も必要と考えられた。

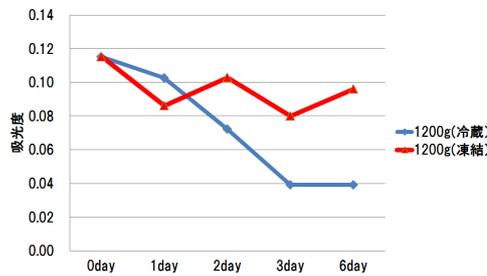


図4 aPLT-MP の保存方法の比較

(6)再現性は、同時再現性は、3 濃度(高濃度、中濃度、低濃度)の aPLT-MP 値検体を、同一ウェル内で測定した結果、高濃度では CV=14.9%、中濃度では CV=11.2%、低濃度では CV=12.6%であった。日差再現性は CV=12.6%、プレート内ウェル間差再現性は CV=5.8%と良好な結果であった。  
(7)感度・特異性は、aPLT-MP ELISA 法は白血球や培養細胞由来 MP とは反応せず、aPLT-MP に高い感度・特異性を示した(図 5)。

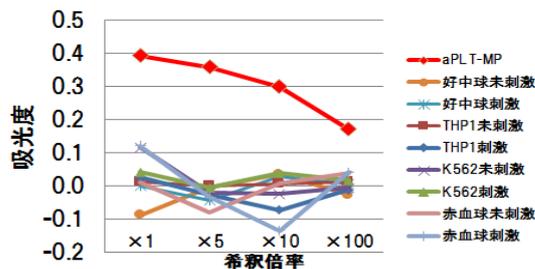


図5 感度・特異性の比較

(8) 健常人検体の aPLT-MP 値は  $13.1 \pm 3.18/\mu\text{L}$  (n=13)、患者検体の aPLT-MP 値は  $12.4 \pm 6.54/\mu\text{L}$  (n=178)であった(図 6)。aPLT-MP 値へ影響を与える因子として不整脈と抗凝固薬が抽出された。重回帰分析においても、aPLT-MP 値へ影響を与える因子として不整脈と抗凝固剤が抽出された(表 1)。

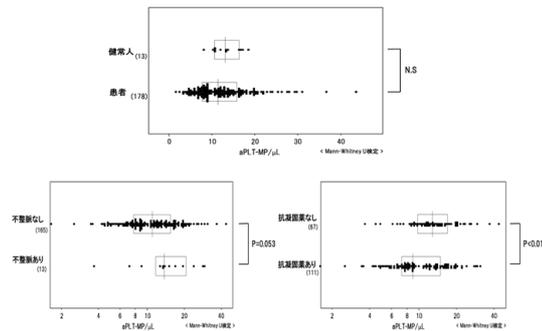


図6 健常人および患者における aPLT-MP 値

表1 患者間重回帰分析の結果

		サンドイッチELISA法		
因子	N	aPLT-MP	std $\beta$	P
健常人	13	$13.1 \pm 3.18$		
患者	178	$12.4 \pm 6.54$		
Sex	男:女 92:86		0.0249	0.7644
Age	$76.6 \pm 12$		-0.098	0.2544
心房細動	72	$11.34 \pm 5.25$	0.0719	0.4477
高血圧	60	$13.28 \pm 6.75$	0.0766	0.423
心不全	38	$12.05 \pm 7.02$	0.0071	0.9293
糖尿病	41	$12.73 \pm 7.51$	-0.0574	0.6119
脳梗塞	10	$13.55 \pm 8.43$	0.0482	0.532
不整脈	13	$15.87 \pm 7.70$	0.181	0.0229
抗凝固薬	111	$11.23 \pm 5.96$	-0.3078	0.0021
降圧薬	76	$13.10 \pm 6.72$	0.0871	0.3719
糖尿病治療薬	31	$13.34 \pm 8.18$	0.0605	0.5911

患者間重回帰分析

<引用文献>

- 1)野村昌作：フローサイトメトリーによるマイクロパーティクル計測の標準化に関する検討. Cytometry Research. 2011; vol.21, No.1; 71-84
- 2)Shosaku Nomura, Yukio Ozaki, Yasuo Ikeda : Function and role of microparticles in various clinical settings. Thrombosis Research. 2008 ; vol.123 ; 8-23
- 3)Francoise Dignat George : Microparticles in vascular diseases. Thrombosis Research. 2008 ; vol.122 Suppl.1 ; S55-S59
- 4)小林恒雄：マイクロパーティクルに誘導される血管機能障害の新知見. 日薬理誌.2016 ; vol.147 ; 122
- 5) Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F : Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; vol.31 ; 15-26.
- 6) 浅田祐士郎：生体内における血液凝固メカニズムと動脈血栓形成への関与.医学のあゆみ.2009 ; vol.228 No.10 ; 1062-1066
- 7) Jin Zhou, Huibo Li, Yueyue Fu, Jialan Shi, Jinxiao Hou, Yingmei Zhang, Xiuhua Liu, Peng Song : Arsenic trioxide induces procoagulant activity through phosphatidyleserine exposure and

microparticle generation in endothelial cells. Thrombosis Research.2011 ; vol.127 ; 466-4

- 8) 井上晃男,野面孝一:血小板由来マイクロパーティクルと atherothrombosis. 血管医学. 2009 ; vol.10, No2 ; 43-48
- 9) Alphonse Goubran, Thierry Burnouf, Julie Stakiw, Jerard Seghatchian: Platelet microparticle: A sensitive physiological " fine tuning " balancing factor in health and disease. Transfusion and Apheresis Science. 2015 ; vol 52:12-18

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

下本和輝、岡野こずえ、野島順三、荒木三奈子、中野かおり、活性化血小板由来マイクロパーティクル測定 ELISA 法の開発、第 18 回日本検査血液学会、2017 年 7 月 23 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 発表確定

下本和輝、岡野こずえ、荒木みな子、中野かおり、磁気ビーズ標識抗 CD61 抗体を用いた新たな血小板由来マイクロパーティクル測定 ELISA 法の開発、第 49 回日本臨床衛生検査技師会中国四国支部医学検査学会、2016 年 11 月 27 日、高知市文化プラザかるぼーと (高知県高知市)

Kazuki Shitamoto, Kozue Okano, PhD, Minako Araki, Kaori Nakano 、 Development of an assay for activated platelet-derived microparticles by ELISA、The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science、2016 年 9 月 2 日、Kobe International Conference Center (兵庫県神戸市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

岡野 こずえ (OKANO, Kozue)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 5 0 1 6 0 6 9 3

### (2)研究分担者

野島 順三 (NOJIMA, Junzou)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 3 0 4 4 8 0 7 1

研究分担者

丸田 雄一 (MARUTA, Yuichi)  
山口大学・医学部・特別医学研究員  
研究者番号 : 3 0 5 4 3 9 7 0

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

下本 和輝 (SHITAMOTO, Kazuki)