

## 血流条件下、血小板の VWF 接着におよぼす赤血球の役割

田村典子\*, 後藤信哉\*

\* 東海大学医学部内科学系循環器内科 [〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143]

### 1. 緒言

赤血球は血液中の ATP, ADP の主要供給源である。血小板表面には ADP 受容体 P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> が存在し、ADP 刺激により凝集、活性化の影響を受ける。また、活性化した血小板の濃染顆粒からも ADP は放出される。血小板は血管内皮損傷部位の表面に出現するフォンビルブランド因子 (Von Willebrand Factor: VWF) に血小板膜タンパク GPIb $\alpha$  と結合し、さらに活性化型に構造を変化した血小板膜タンパク GPIIb/IIIa と結合することで凝集する。ヒトの赤血球、固定した赤血球、および直径 6, 8, 12  $\mu\text{m}$  とサイズの異なる赤血球代替え粒子 (ポリスチレン製球状ポリマー: Copolymer) を用いて、赤血球の生理活性、濃度および形状が血小板血栓形成の最初の過程である血小板の VWF 接着におよぼす影響について検討した。

### 2. 実験方法

健康成人の全血を、アルガトロバン (終濃度 100  $\mu\text{M}$ ) にて抗凝固処理をした。固定赤血球は終濃度 2% パラホルムアルデヒドにて調製した。血小板濃度 20 万/ $\mu\text{L}$  を含む、赤血球および固定赤血球の濃度ヘマトクリット (Ht) 4, 8, 12, 24, 36% の再構築血液をそれぞれ調整した。赤血球代替え粒子についてもそれぞれの volume 濃度で再構築血液を調整した。VWF と GPIb $\alpha$  を介した血小板の接着を観察するため、GPIIb/IIIa の機能を特異的に阻害する Fab 化したモノクローナル抗体 Abciximab (終濃度 10  $\mu\text{g/mL}$ ) を FITC 蛍光標識して用い、GPIIb/IIIa の活性化阻害および血小板の描出を行った。ガラスプレートに VWF を固相した並行平板フローチャンバーを用いて、1500  $\text{s}^{-1}$  の壁すり速度の血流条件下で血液を灌流した。VWF に接着する血小板細胞の接着動態を共焦点レーザー顕微鏡にてリアルタイムイメージングを行い VWF に接着した血小板数を経時的に定量した。血小板イメージの解析にはフリーソフトウェア ImageJ を用いた。

### 3. 実験結果

1500  $\text{s}^{-1}$  の流速条件下、VWF に接着した血小板数はそれぞれ経時的に増加した (図 1)。再構築した血液灌流 1 分後の VWF に接着した血小板数は Ht 4, 8, 12, 24, 36% の濃度依存的に増加が認められた (図 2)。赤血球、固定赤血球および赤血球代替え粒子では顕著な差はみ

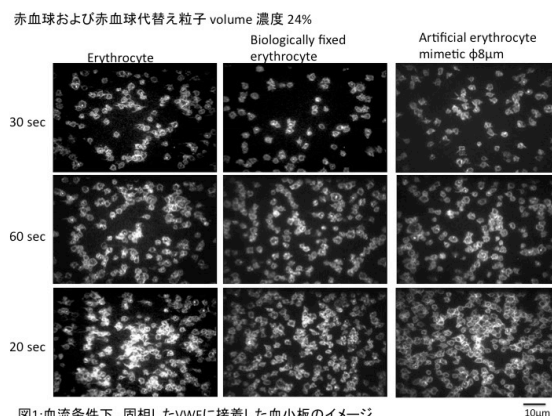


図1: 血流条件下、固相したVWFに接着した血小板のイメージ

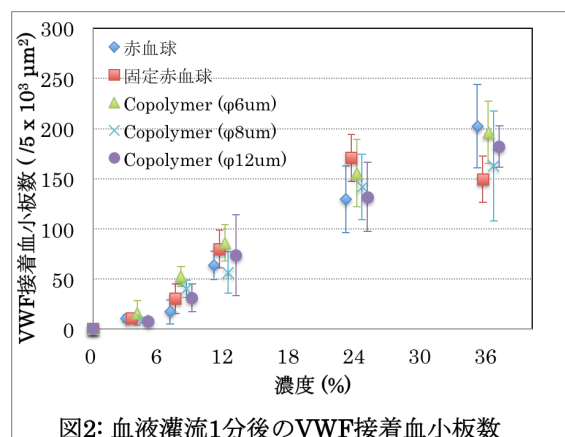


図2: 血液灌流1分後のVWF接着血小板数

とめられなかった。また、赤血球代替え粒子のサイズによる影響も認められなかった。

### 4. 考察

固相した VWF への GPIb $\alpha$  を介する血小板の接着は、再構成血液中の赤血球、固定赤血球、赤血球代替え粒子濃度により影響を受けた。しかし、赤血球、固定赤血球、赤血球代替え粒子の間には差異を認めず、これらの粒子の血小板接着におよぼす効果は ADP 放出に代表される生理学的因子ではなく、赤血球が血液流路中央に局在集中する物理的存在という力学的な因子の寄与が大であることを示唆した。また、赤血球の濃度を volume で比較しているためか、1500  $\text{s}^{-1}$  という血流条件下では、赤血球の形状や粒子径による影響は認められなかった。

### 5. 結言

血流条件下、血小板と固相した VWF との接着には赤血球の濃度に依存した、力学的な作用による影響が大きいことが示唆された。