

心臓弁置換患者における活性化血小板の検出とその意義

—— フローサイトメトリーを用いて ——

新潟大学医学部内科学第一教室 (主任: 柴田 昭教授)

堀 知行

Direct Detection of Activated Platelets in the Patients with Prosthetic Heart Valve by
Flow Cytometry and its Pathophysiological Significance

Tomoyuki HORI

*The First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Akira SHIBATA)*

Thromboembolism is frequently observed in patients with prosthetic heart valve and is believed to be a major cause of post-operative morbidity and mortality. The aim of this study is to elucidate the role of activated platelets in the patients with prosthetic heart valve. Forty patients (23 female and 17 male) were operated on between 1967 and 1994 for prosthetic heart valve replacement in our university. Mean age was 55 years (range 2~68). All patients received anti-coagulant therapy.

In 40 patients with prosthetic heart valve and 20 normal subjects, activated platelets were detected by flow-cytometric measurement of the proteins CD62P and CD63, which are expressed on the platelet surface membrane during platelet activation. Among healthy volunteers, a small percentage of platelets were activated (CD62P: $3.14 \pm 0.82\%$, CD63: $3.53 \pm 1.29\%$). In contrast, the patients group showed increased percentage of activated platelets. (CD62P: $4.08 \pm 2.25\%$, $p=N.S.$, CD63: $4.82 \pm 2.70\%$, $p<0.05$). In order to elucidate the pathophysiological role of the activated platelets in the patients, the 40 patients were divided into two groups according to the percentage of the activated platelets; activated platelets group (CD62P $\geq 4.77\%$ or CD63 $\geq 6.26\%$) and non-activated platelets group (CD62P $< 4.77\%$ and CD63 $< 6.26\%$). In the two groups, I analyzed the difference of four clinical factors, 1) history of prior cerebral infarction, 2) adequacy of anti-coagulant therapy (thrombotest $< 15\%$ or not), 3) heart rhythm (atrial fibrillation or sinus rhythm) and,

Reprint request to: Tomoyuki HORI,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
1-754 Asahimachi-dori, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町754
新潟大学医学部内科学第一教室

堀 知行

4) anti-platelet therapy. In the four clinical factors, the history of prior cerebral infarction was significantly higher in the activated group than the non-activated group.

These results suggest that activated platelets actually circulate in the peripheral blood of the patients with prosthetic heart valve and are involved in the pathogenesis of thromboembolism such as cerebral infarction.

Key words: activated platelets, flow cytometry, CD62P, CD63, prosthetic heart valve, history of prior cerebral infarction
 活性化血小板, フローサイトメトリー, 人工弁置換, 脳梗塞の既往

I. はじめに

心臓弁置換患者では種々の合併症を併発するが、中でも血栓塞栓症、感染性心内膜炎、弁機能不全などが主要な合併症として知られている¹⁾。このうち血栓塞栓症合併の主因は、人工弁またはその周囲で生じた血栓の遊離にもとづく全身の動脈塞栓症と人工弁自体で血栓が形成され発育した血栓弁による2種類があると考えられている²⁾。血栓塞栓症の80%は脳血栓症の形をとり、約半数が後遺症を残し、他は、腎、脾、冠動脈、四肢動脈等の血栓塞栓症となり、10%近くが死亡する³⁾。その発症頻度は、十分な抗凝固療法を施行されているにもかかわらず機械弁では僧帽弁置換例で0.9~5.0%/患者・年、大動脈弁置換例では0.7~2.3%/患者・年という報告がある⁴⁾⁻⁷⁾。また、血栓弁による機能不全は、急性心不全やショックを呈することもある⁸⁾⁹⁾。これらの病態として血小板の活性化が推測されており、血小板寿命¹⁰⁾¹¹⁾や血小板凝集能に関する検討¹²⁾などが行われてきたが、いずれも間接的な方法であり、活性化血小板を直接検出したと言う報告は殆どない。また、従来施行されてきた活性化の指標であるβ-thromboglobulin (β-TG)、Platelet Factor-4 (PF-4)等の測定では採血の手技や遠心操作等の影響を受けるため見かけ上高値を示すことが知られている。そこで、今回著者は活性化により血小板膜表面に移動する膜糖蛋白であるCD62P, CD63に注目し、全血でかつ遠心操作なしに検出する方法を考案し、弁置換患者における活性化血小板の検出をフローサイトメトリー(FACS)を用いて行ったので、その背景因子との関連も合わせて報告する。

II. 対象

当大学第二外科において1967年~1994年までの期間に、心臓弁置換手術を施行された40例を対象とした。

対象患者群の内訳は、男性17例、女性23例で、平均年齢55歳(25~68歳)、全例が抗凝固療法を施行されていた。術式は、僧帽弁置換術(以下MVR)17例、大動脈弁置換術(以下AVR)10例、三尖弁置換術(以下TVR)2例、MVR+AVR 9例、MVR+TVR 2例であった(表1)。また、弁の種類は機械弁37例(St. Jude Medical 単独26例、Starr-Edwards 単独3例、Björk-Shiley 単独4例、Duromedics 単独2例、Starr-Edwards+Björk-Shiley 2例)、生体弁2例(Carpentier-Edwards 単独2例)、両者併用1例(St. Jude Medical+Carpentier-Edwards 1例)であった(表2)。正常群20例は、男性10例、女性10例で平均年齢46歳(35~58歳)であった。

表1 手術術式の内訳 (n=40)

僧帽弁置換術 (MVR)	17例
大動脈弁置換術 (AVR)	10例
三尖弁置換術 (TVR)	2例
僧帽弁置換術 (MVR)+大動脈弁置換術 (AVR)	9例
僧帽弁置換術 (MVR)+三尖弁置換術 (TVR)	2例

表2 弁の種類

1. 機械弁	37例
St. Jude Medical	26例
Starr-Edwards	3例
Björk-Shiley	4例
Duromedics	2例
Starr-Edwards+Björk-Shiley	2例
2. 生体弁	2例
Carpentier-Edwards	2例
3. 機械弁+生体弁	1例
St. Jude Medical+Carpentier-Edwards	1例

III. 方 法

1) 採血及び FACS による解析

患者及び正常対照より、20 G の翼状針で駆血帯を使用せず2シリンジ法で採血し、3.8%クエン酸加血を得た。PBS で血小板数を 15万/ μ l 以上になるように希釈した後、その 20 μ l を FITC 標識された各種抗体とインキュベートし、1% paraformaldehyde で固定し FACSscan にて解析を施行した。用いた抗体はマウス-IgG₁ (以下、全て抗体は IMMUNOTECH), CD42b (SZ2, Platelet glycoprotein I b; GP I b), あるいは、CD41 (P2, Platelet glycoprotein II b III a; GP II b III a), CD62P (CLBThromb/6), CD63 (CLBGran/12, Glycoprotein/53) であり、採血後6時間以内に解析が終了するようにした。FACS による解析は血小板の常在膜糖蛋白である GP I b (あるいは、GP II b III a) 陽性細胞をゲーティングした後、まず、正常血小板を用いて陰性コントロール用のマウス-IgG₁ で標識された血小板を一万个カウントした。陰性コントロールの血小板のヒストグラム上で陰性の領域を設定した後、患者血小板についてその陽性度を解析した。尚、マウス-IgG₁ を用いた陰性コントロールの血小板において陰性領域以上の蛍光強度を満たす血小板数が80個(0.8%)以上になった症例は破棄した。実際の具体例を図1及び図2に示す。

2) 背景因子に関する検討

正常対照群における CD62P, CD63 の陽性率より平均値及び標準偏差を算出し、平均値+2SD 以上の陽性率を示した場合を活性化血小板陽性例として定義した。これにより活性化血小板陽性群と活性化血小板陰性群とに分け、術式及び ① 臨床的に明らかな脳梗塞の既往の有無 ② トロンボテストのコントロールの程度(15%未満かどうか) ③ 心調律(心房細動か洞調律のいずれか) ④ 抗血小板療法併用の有無の各因子につき、 χ^2 検定で比較検討した。本文中の結果は mean \pm 1SD で表した。

IV. 結 果

1) 正常群及び弁置換患者における陽性率の比較

正常群の CD62P 陽性血小板の出現率は、3.14 \pm 0.82%、患者群は、4.08 \pm 2.25%、CD63 陽性率はそれぞれ、3.53 \pm 1.29%、4.82 \pm 2.70%であり、いずれも患者群では正常群に比して高値を示したが、CD63 のみ統計学的に有意であった(図3)。活性化血小板陽性例は弁置換患者群40例中11例(27.5%)に認められた(表3)。

2) 活性化血小板陽性群における患者背景

活性群の内訳は、表3に示す如く、平均年齢は54 \pm 12歳であり、術式は MVR 5例、AVR 2例、TVR 1例、MVR+AVR 2例、MVR+TVR 1例であった。術後経過年数は、9.7 \pm 6.9年(4~27年)で、心房細動を

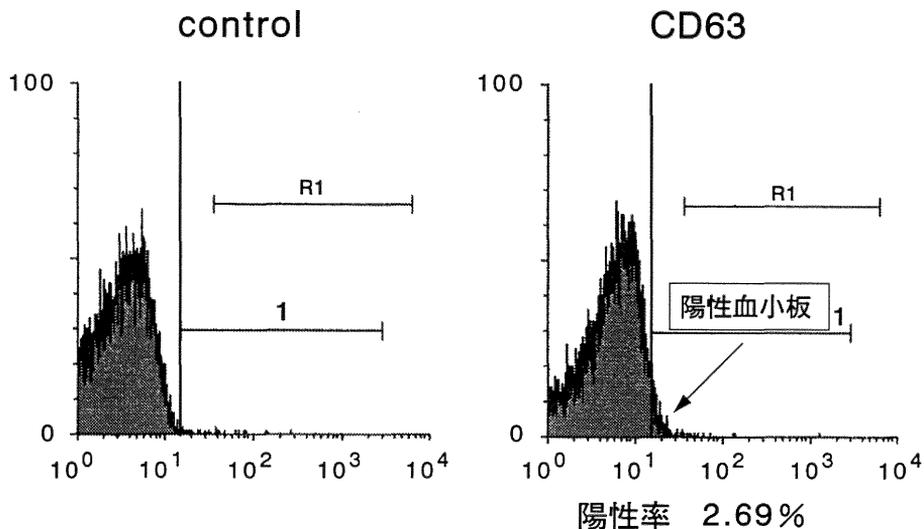


図1 正常対照(グラフの縦軸は細胞数を、横軸は対数表示の蛍光強度を表す.)

左—正常対照群におけるコントロール IgG₁

右—正常対照群における CD63

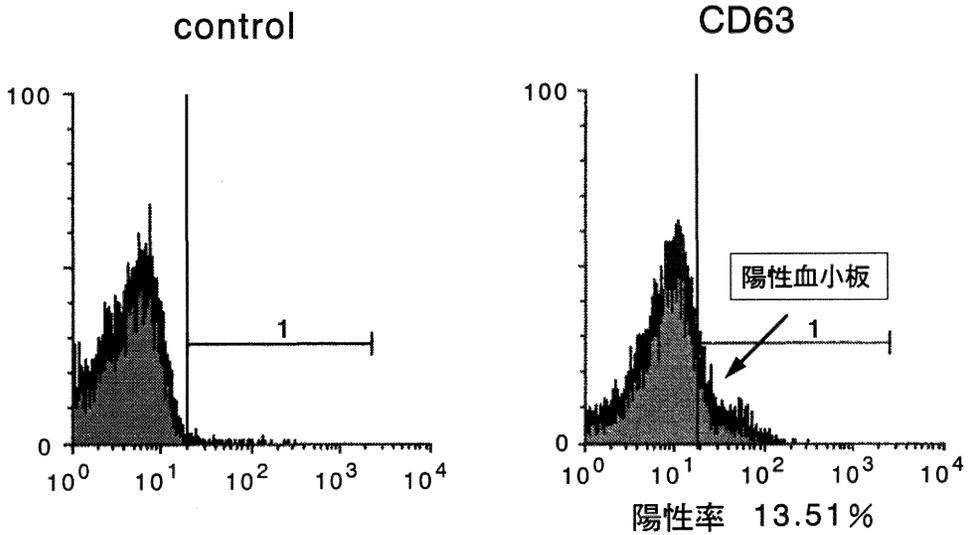


図 2 弁置換患者（活性化血小板陽性例，グラフの縦軸は細胞数を横軸は対数表示の蛍光強度を表す。）

左—弁置換患者におけるコントロール IgG₁

右—弁置換患者（活性化血小板陽性例）における CD63

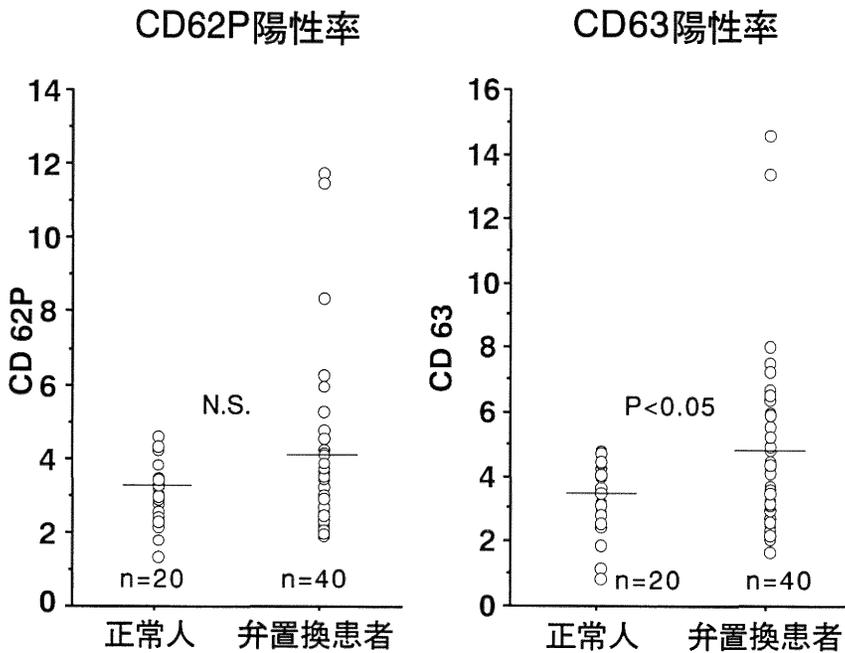


図 3 正常及び弁置換患者の CD62P, CD63 の活性化血小板陽性率（グラフの縦軸は%）

表3 活性化血小板陽性群の背景

番号	年齢(才)	性別	診断	手術	術後(年)	Hb(g/dl)	薬	TTO(%)	調律	血小板(万/ μ l)	脳梗塞
1	56	F	MSR	M	4	11.2	W+T+A	14.7	af	13.7	あり
2	41	M	MR	M	7	13.7	W	28.0	sinus	21.1	あり
3	48	F	MR+AR	M+A	27	8.3	W	15.1	sinus	18.1	あり
4	62	M	MSR+ASR	M+A	12	13.7	W	21.8	sinus	14.0	あり
5	49	F	Ebs+TR	T	5	14.2	W	19.0	af	16.2	なし
6	27	F	ECD	M+T	14	12.2	W	10.6	sinus	13.6	なし
7	56	F	MR+TR	M	11	13.4	W	13.0	af	13.7	なし
8	62	F	MSR+TR	M	8	11.1	W+T+A	17.3	af	11.2	なし
9	66	M	AR	A	4	12.1	W	20.3	sinus	15.2	なし
10	61	F	AS	A	3	11.8	W	17.5	sinus	23.4	なし
11	68	M	MS+TR	M	12	11.4	W	14.4	af	16.0	なし

M=MVR; A=AVR; T=TVR; W=ワーファリン; A=アスピリン; T=チクロピジン

5例に認めた。血小板数は 16.0 ± 3.6 万/ μ l とほぼ正常で、Hb も 12.1 ± 1.68 g/dl と正常であった。トロンボテスト値は 17.5 ± 4.8 % と比較的良好にコントロールされており、抗血小板療法を併用している例は3例であった。CD62P, CD63 の陽性率は CD62P 単独陽性が3例、CD63 単独陽性が3例、両方陽性なのは5例であった。術式との関連では11例中8例が MVR を含んでいたが、各術式と CD62P, 及び CD63 の陽性率には有意な相関は認められなかった。

3) 背景因子による検討結果

背景因子による検討では、表4の如く脳梗塞の既往例が、活性化血小板陽性群で11例中4例(36.4%)、活性化血小板陰性群では29例中2例(6.9%)にみられ、活性化血小板陽性群で有意に多かった ($p < 0.05$)。トロンボテストのコントロール値で見ると、15%未満にコントロールされていた症例が、活性化血小板陽性群で4例(36.4%)、活性化血小板陰性群では8例(27.6%)で両者に有意差を認めなかった。心調律では心房細動が活性化血小板陽性群で5例(45.5%)、活性化血小板陰性群で16例(55.2%)に認められたが、やはり有意差はなく、抗血小板療法の併用例も、活性化血小板陽性群で2例(18.2%)、活性化血小板陰性群で6例(20.7%)であり有意差を認めなかった。

V. 考 案

フローサイトメトリーを用いた今回の検討では、正常人に比し弁置換患者では明らかに CD62P, CD63 陽性血小板率が高いことが明らかになった。従来、弁置換患

表4 背景因子の関連

	活性化血小板陽性群(11例)	活性化血小板陰性群(29例)
1. 脳梗塞の既往あり	4例	2例 $p < 0.05$
2. TTO 15%未満	4例	8例 N.S.
3. 心房細動	5例	16例 N.S.
4. 抗血小板療法併用あり	3例	6例 N.S.

χ^2 検定により $p < 0.05$ を有意とした。

者では、血小板寿命の短縮¹⁰⁾¹¹⁾、 β -TG, PF4 の高値¹³⁾⁻¹⁵⁾、術後早期における一過性の血小板凝集の亢進¹²⁾、慢性期の機械弁を通過する乱流による血小板の活性化¹⁶⁾などが報告されてきたが、いずれも活性化血小板の出現に基づく間接的な現象をとらえているに過ぎなかった。今回、著者は活性化血小板を直接検出することを目的に、CD62P, CD63 の陽性血小板比率を検討した。この結果、健常人に比して有意に高値であったことから、弁置換患者では、実際に活性化された血小板が流血中を循環していることが明らかとなった。また、活性化血小板陽性群11例での CD62P, CD63 の陽性度は CD62P 単独陽性が3例、CD63 単独陽性が3例、両方陽性が5例であった。服部らによる in vitro のデータ¹⁷⁾ではアラキドン酸、STA₂, A23187 が CD62P を、トロンピンは CD63 を有意に活性化させると報告しており、今回検討した活性化血小板陽性群11例でも各症例において血小板活性化機序が異なる可能性が考えられた。

次に活性化血小板陽性群と陰性群における背景因子の

表 5 抗血小板薬併用患者 (n = 8)

	年齢	性別	抗血小板薬	CD62P 陽性率 (%)	CD63 陽性率 (%)
活性化血小板 陽性群 (n = 2)	56	女性	ASA 30 mg + T 300 mg	4.91	6.85
	62	女性	ASA 20 mg + T 200 mg	11.60	14.71
活性化血小板 陰性群 (n = 6)	61	男性	ASA 60 mg + T 200 mg	3.59	1.81
	50	女性	ASA 10 mg + T 200 mg	2.98	2.81
	63	男性	T 200 mg	2.97	2.23
	68	女性	ASA 20 mg + T 200 mg	2.61	4.53
	61	男性	ASA 30 mg + T 300 mg	2.46	3.33
	46	女性	ASA 30 mg	3.87	5.36

ASA=アスピリン；T=チクロピジン

検討で、活性化血小板陽性群に脳梗塞の既往が有意に多いことが明らかになった。脳梗塞を始めとする血栓塞栓症は、術中の体外循環施行中¹⁸⁾や弁置換後3ヶ月以内の早期に多いことが知られており¹⁶⁾¹⁹⁾、原因として人工弁と生体側の間に仮性内膜が完成するのに6ヶ月近くかかることや、術後1ヶ月間は凝固能に変動がみられ、抗凝固療法などのコントロールが難しいことなどが挙げられている²⁰⁾。今回の検討では、脳梗塞発症例は必ずしも弁置換後3ヶ月以内の症例だけではなく、このことは血小板の活性化が、術後早期だけでなく慢性期においても血栓塞栓症において重要な因子であることを示唆すると考えられた。また、抗血小板療法の併用により、術後長期間にわたり血栓塞栓症の合併が有意に低下したという最近の報告は²¹⁾²²⁾、この結果を支持するものと思われた。

トロンボテストが15%未満にコントロールされていた症例数は、活性化血小板陽性群で11例中4例、活性化血小板陰性群で29例中8例と有意差を認めなかったが、このことは抗凝固療法が十分に行われていても、活性化血小板の出現を阻止できないことを示唆している。

心調律に関しても、心房細動を呈する症例頻度は両群間に有意差を認めなかった。その原因として、活性化血小板陽性群で洞調律を維持していた6例中3例が10~30歳代の弁膜症早期に手術が施行されており、心房細動にまで至らず差が生じなかった可能性も考えられた。しかし、一般に、心房細動における左房内血栓形成は、血流の鬱滞が主因と考えられており、血小板の関与より、フィブリン形成が優位に関係すると考えられていることからこの可能性は低いものと考えられた。また、抗血小板療法の併用の有無をみても、今回の検討では、活性化血小板陽性群においても抗血小板療法施行例が認められ、そ

の施行率は活性化血小板陰性群のそれと有意差は認められなかった。両群における抗血小板薬の種類及び用量を表5に示すが、両者とも、微量アスピリン(10~60mg)とチクロピジン(200~300mg)が用いられていた。抗血小板薬使用にもかかわらず、活性化血小板陽性率が高値であった2例は、抗血小板療法の基本概念から言えば、薬剤使用量が充分とは言えない可能性があり、その意味で今回の活性化血小板検出法は、新たな抗血小板療法施行時の治療指針の目安となり得る可能性も示唆された。

従来、弁置換患者における脳梗塞を始めとした血栓塞栓症の危険因子として、抗凝固療法コントロール不良例、持続する心房細動の存在、脳梗塞の既往、左心房の拡大、置換弁のデザインなどが^{23)~26)}挙げられている。今回の検討結果から、活性化血小板の有意な増加も、血栓塞栓症の危険因子の1つに加えて良いものと考えられた。今回、著者が行ったFACSによる活性化血小板の検出^{27)~29)}は、方法は異なるものの、不安定狭心症や冠動脈形成術施行中の患者などに対して施行されるようになってきており³⁰⁾³¹⁾、血栓準備状態を把握する検査としての今後の普及が期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の御指導、並びに御校閲いただいた、新潟大学医学部内科学第一教室 柴田 昭教授、布施一郎先生、松原 琢先生、田村 雄助先生、山添 優先生、外科学第二教室 大関 一先生、林 純一先生に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Roberts, W.C., Fishbein, M.C. and Golden, A.: Cardiac pathology after valve replacement by disc

- prosthesis. A study of 61 necropsy patients. *Am. J. Cardiol.*, **35**: 740~760, 1975.
- 2) 青崎正彦: 人工弁置換と血栓塞栓症, 血管と脈管, **16**: 117~139, 1985.
 - 3) Fuster, V., Pumphery, C.W., McGoon, M.D., Chesebro, J.H., Pluth, J.R. and McGoon, D.C.: Systemic thromboembolism in mitral and aortic Starr-Edwards prosthesis: A 10-19-year follow-up. *Circulation*, **66** (Suppl I): I-157~161, 1982.
 - 4) Burckhardt, D., Striebel, D., Vogt, S., Haffmann, A., Roth, J., Weiss, P., Kiowski, W., Pfisterer, M., Burkart, F., Althaus, U., Goy, J.J., Sadeghi, H. and Grädel, E.: Heart valve replacement with St. Jude Medical valve prosthesis. Long term experience in 743 patients in Switzerland. *Circulation*, **78** (Suppl I): I-18, 1988.
 - 5) Zussa, C., Ottino, G., diSumma, M., Poletti, G.A., Zattera, G.F., Pansini, S. and Morea, M.: Porcine cardiac bioprostheses: Evaluation of long-term results in 990 patients. *Ann. Thorac. Surg.* **39**: 243~250, 1985.
 - 6) Bloomfield, P., Kitchin, A.H., Wheatley, D.J., Walbaum, P.R., Lutz, W. and Miller, H.C.: A prospective evaluation of the Björk-Shiley, Hancock, and Carpentier-Edwards heart valve prosthesis. *Circulation*, **73**: 1213, 1986.
 - 7) Horstkotte, D., Korfer, R., Seipel, L., Bircks, W. and Loongen, F.: Late complication in patients with Björk-Shiley and St. Jude Medical heart valve replacement. *Circulation*, **68** (Suppl II): II-175~184, 1983.
 - 8) Moreno-Cabel, R.J., McNamura, J.J., Mamiya, R.T., Brainard, S.C. and Chung, G.K.T.: Acute thrombotic obstruction with Björk-Shiley valves. Diagnostic and surgical considerations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **75**: 321~330, 1978.
 - 9) Copans, H., Laiker, J.B., Kinsley, R.H., Colsen, R.H., Colsen, P.R., Fritz, V.U. and Barlow, J.B.: Thrombosed Björk-Shiley mitral prostheses. *Circulation*, **61**: 169~174, 1980.
 - 10) Harker, L.A. and Slichter, S.J.: Studies of Platelet and fibrinogen kinetics in patients with prosthetic heart valve. *N. Engl. J. Med.* **283**: 1302~1305, 1970.
 - 11) Weily, H.S., Steele, P.P., Davies, H., Pappas, G. and Genton, E.: Platelet survival in patients with substitute heart valves. *N. Engl. J. Med.*, **290**: 534~537, 1974.
 - 12) McKenzie, F.N., Dhall, D.P., Arfors, K.E., Nordlund, S. and Matheson, N.A.: Blood platelet behavior during and after open heart surgery. *Br. Med. J.*, **2**: 795~798, 1969.
 - 13) Dudczak, R., Niessner, H., Thaler, E., Lechner, K., Kletter, K., Frischauf, H., Domaning, E. and Aicher, H.: β -thromboglobulin, platelet factor 4, and fibrinopeptide A in patients with porcine and prosthetic heart valves (abstr.). *Thrombs. Haemostas.*, **42**: 72, 1979.
 - 14) Ludlam, C.A., Allan, N., Blandford, R.B., Dowdle, R., Bentley, N.J. and Bloom, A.L.: Platelet and coagulation function in patients with abnormal cardiac valves treated with sulphynpi-razon. *Thrombs. Haemostas.*, **46**: 743~746, 1981.
 - 15) Doyle, D.J., Chesterman, C.N., Cade, J.F., McGready, J.R., Rennie, G.C. and Morgan, F.J.: Plasma concentrations of platelet-specific proteins correlated with platelet survival. *Blood*, **55**: 82~84, 1980.
 - 16) Douglas, H.I., Samin, K.S. and Valentin, F.: Antithrombotic therapy in prosthetic heart valve replacement. *Am. heart. J.*, **127**: 400~411, 1994.
 - 17) 服部 晃: 未発表データ
 - 18) Becker, R.M., Smith, M.R. and Mary, Dobell, A.R.C.: Effect of platelet phenomena in cardiopulmonary bypass in pigs. *Ann. Surg.*, **179**: 52~57, 1974.
 - 19) Edmunds, L.H.: Thrombotic and bleeding complications of prosthetic heart valves. *Ann. Thorac. Surg.*, **44**: 430~445, 1987.
 - 20) 垣下栄三, 魚本智子, 末広 謙, 中島督夫, 木村信彦, 永井清保, 宮本 巍, 福地 稔, 吉村早苗: 人工弁置換患者における凝血学的変化についての検討, *臨床血液*, **21**: 1519~1527, 1980.
 - 21) Hayashi, J., Nahazawa, S., Oguma, F., Miyamura, H. and Eguchi, S.: Combined warfarin and anti platelet therapy after St. Jude Medical valve replacement for mitral valve disease.

- J. Am. Coll. Cardiol., **23**: 672~677, 1994.
- 22) **Turpie, A.G.G., Gent, M., Laupacis, A., Latour, Y., Gunstensen, J., Basile, F., Klimek, M. and Hirsh, J.**: A comparison of aspirin with placebo in patients treated with warfarin after heart-valve replacement. *N. Engl. J. Med.* **329**: 524~529, 1993.
- 23) **Acar, J., Enriquez-Sarano, M., Farah, E., Kassab, R., Tubiana, P. and Roger, V.**: Recurrent systemic embolic events with valve prosthesis. *Eur. Heart J.*, **5** (Suppl. D): D-33~D38, 1984.
- 24) **Björk, V.O. and Henze, A.**: Ten years experience with the Björk-Shiley tilting desk valve. *J. Thorac. Cardiovasc Surg.*, **78**: 331~339, 1979.
- 25) **Karp, R.B., Cyrus, R.J., Blackstone, E.H., Kirklin, J.W., Kouchouros, N.T. and Pacifico, A.D.**: The Björk-Shiley valve: intermediate-term follow-up. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **81**: 602~611, 1981.
- 26) **Duvoisin, G.E., Brandenburg, R.O. and McGoon, D.G.**: Factors affecting thromboembolism associated with prosthetic heart valves. *Circulation*. **35/36** (suppl-I): 77~81, 1967.
- 27) **Corash, A.L.**: Measurement of platelet activation by fluorescence-activated flow cytometry. *Blood Cells*. **160**: 97~108, 1990.
- 28) **Abrams, C.S., Ellison, N., Budzynski, A.Z. and Shattil, S.J.**: Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*. **75**: 128~138, 1990.
- 29) **Shatti, S.J., Cunningham, M. and Hoxie, J.A.**: Detections of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*. **70**: 307~315, 1987.
- 30) **Tschoepe, D., Schultheib, H.P., Kolarov, P., Schwippert, B., Dannehl, K., Volksw, D., Nieuwenhuis, H.K., Kehrel, B., Strauer, B. and Gries, F.A.**: Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic event after PTCA. *Circulation*. **88**: 3742, 1993.
- 31) **Becker, R.C., Tracy, R.P., Bovill, E.G., Mann, K.G. and Ault, K., for the TIMI-III Thrombosis and Anticoagulation Study Group.**: The clinical use to flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. *Cor. Art. Dis.* **5**: 339~345, 1994.

(平成7年12月22日受付)