

活性化に伴うヒト血小板細胞骨格の微細構造変化

大 竹 直 人
信州大学医学部第1解剖学教室
(主任: 永田 哲士教授)

Ultrastructural Changes of Cytoskeletons in Human Blood Platelets during Activation

Naoto OHTAKE

*Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine
(Director : Prof. Tetsuji NAGATA)*

This study evaluated the changes of cytoskeletal organizations and the association of cytoskeletons with cell organelles in human blood platelets.

Nonactivated platelets were fixed with paraformaldehyde before or after isolation from venous blood. Other platelets were fixed with paraformaldehyde after thrombin-activation for 30 or 60 sec. The platelets were processed for the platelet-splitting method. Some nonactivated platelets fixed before isolation were additionally treated by the freeze-fracturing method. The replica membranes were routinely prepared by the deep-etching method.

Microfilamentous meshworks of cytoskeletons obtained by the combination method of platelet-splitting and freeze-fracturing methods in the nonactivated platelets fixed before isolation were randomly organized, and associated with cell organelles (Figs. 1, 2, 8a). Similar cytoskeletal organizations appeared in the platelets using the platelet-splitting method alone (Figs. 3, 4, 8a). Therefore, the cytoskeletal organizations in the deep cytoplasm can be revealed by using not only the combination method but also the platelet-splitting method alone. On the contrary, some microfilaments in the nonactivated platelets fixed after isolation ran parallel to each other and reached to the cell membrane (Figs. 5, 8b). After thrombin-activation, some microfilaments became to show more parallel arrangements to form bundles in the platelets activated for 30 sec (Figs. 6, 8c). They were also attached end-on and laterally to irregular-ellipsoid cell organelles with fine-nodular surfaces, and only laterally to round cell organelles with fine-nodular or smooth surfaces in the platelets activated for 30 or 60 sec (Figs. 6, 7, 8d).

It is concluded that some discoid platelets without filopodia which are fixed after isolation have already reorganized the cytoskeletons and are not true nonactivated platelets. Also, the dense attachment of cytoskeletons to cell organelles in the activated platelets seems to be important in the functional changes in the cytoplasm. *Shinshu Med. J.*, 35 : 581-591, 1987

(Received for publication January 23, 1987)

Key words : blood platelet, cytoskeleton, platelet-splitting method, freeze-fracturing method, deep-etching method

血小板, 細胞骨格, 血小板2分割法, 凍結割断法, ディープエッチング法

I 緒 言

血小板は活性化されると球形化、顆粒分泌、偽足突起形成、血餅形成などの形態学的変化を急速におこす¹⁾⁻⁵⁾。これらの変化は、アクチン細糸とアクチン結合蛋白質を主構成要素とする細胞骨格の構造変化によると報告されてきた⁶⁾⁻¹⁴⁾。実際に、血小板全蛋白質の15%と最も多いアクチン蛋白質に対するアクチン細糸の量は、非活性化状態では30—50%であるが、活性化すると70—80%を占めるようになり¹⁰⁾¹⁵⁾⁻²²⁾、細胞骨格構造がより複雑になると考えられる。このような細胞骨格構造変化が、上記の形態学的変化を示すためには、細胞骨格が細胞膜および分泌顆粒と結合していることが必要と考えられ、生化学的²³⁾⁻²⁷⁾および電子顕微鏡学的⁶⁾¹¹⁾²⁸⁾²⁹⁾に検索されてきた。しかし、従来の超薄切片による透過型電子顕微鏡学的方法では細胞質内立体構造を詳細に検索することが困難であったが、最近、機械的に2分割した細胞に急速凍結、ディープエッチングレプリカ法を用いて細胞質内レプリカ膜を作製し、細胞質内微細構造を高分解能で3次元的に検索する方法が考案された³⁰⁾。すでに著者はその方法を非活性化および活性化血小板に応用し、細胞骨格と細胞膜との結合様式について報告した³¹⁾³²⁾。本研究では、同方法とそれに凍結割断法を加えた方法を用いて血小板細胞質内レプリカ膜を作製し、非活性化血小板の細胞骨格構造における両方法での所見の相違、活性化に伴う細胞骨格構造の変化、および細胞骨格と細胞小器官との結合様式について検索した結果、興味ある所見が得られたので報告する。

II 材料と方法

A 血小板分離法

1 非活性化血小板は以下の2方法により得た。健康成人(男子:3人,女子:3人,20—30歳)より得た静脈血を37°Cに温めたクエン酸—クエン酸ナトリウム—ブドウ糖溶液³³⁾と混合し、既報に³¹⁾³²⁾従い全血を37°Cの2%パラホルムアルデヒドで10分間固定した後、Ca⁺⁺キレート剤添加溶液を用いて血小板を遠心分離した(以下、分離前固定非活性化血小板と称する)。一方、未固定全血より、Ca⁺⁺キレート剤添加溶液を用いて血小板を遠心分離した後、EDTA添加溶液(128mM塩化ナトリウム,2.9mM塩化カリウム,12mM炭酸水素ナトリウム,0.26mMリン酸2水素ナトリウム,5.5mMブドウ糖,1mMEDTA,pH7.4)で希

釈した37°Cの2%パラホルムアルデヒドで10分間固定した(以下、分離後固定非活性化血小板と称する)。

2 2種類のトロンビン活性化血小板は以下の方法により得た。同じ健康成人より得た静脈血をクエン酸—クエン酸ナトリウム—ブドウ糖溶液と混合した後、既報に³²⁾従いCa⁺⁺キレート剤添加溶液を用いて遠心分離した血小板を0.5unit/mlのトロンビンで30秒、および60秒間活性化した。さらに、EDTA添加溶液で希釈した37°Cの2%パラホルムアルデヒドで10分間固定した後、Ca⁺⁺キレート剤添加溶液を用いて活性化血小板を遠心分離した(以下それぞれ、30秒間活性化血小板、および60秒間活性化血小板と称する)。

B 凍結前血小板2分割法

非活性化および活性化血小板は、既報に³¹⁾³²⁾従い3-アミノプロピルトリエトキシシラン(半井化学薬品,京都)とグルタルアルデヒドを被覆した2枚のカバーガラスの間に挟み、機械的に2分割した後、細胞質内可溶性蛋白質を0.01M塩化ナトリウム添加0.1Mリン酸緩衝液,pH7.4(以下、緩衝液と称する)で除去し、2.5%グルタルアルデヒドで30分間固定した。

C 急速凍結法、凍結割断法、およびディープエッチング法

非活性化および活性化血小板を、既報に³¹⁾³²⁾従い液体窒素で約-190°Cに冷却したイソペンタン・プロパン混合液で急速凍結した。また、一部の分離前固定非活性化血小板はさらに液体窒素中でメス刃を用いて凍結割断を加えた。すべての試料は、既報に³¹⁾³²⁾従いエイコーFD-3S凍結試料処理装置(エイコー・エンジニアリング,茨城)内でディープエッチングを行いレプリカ膜を作製した。得られたレプリカ膜は日立H-700型電子顕微鏡(加速電圧,100kV)で観察し、±5°の角度を付けてステレオ写真を撮った。さらに反転ネガフィルムを作製し、そのフィルムから作製された写真は白金蒸着部位が明調に、背景が暗調に観察された。

III 結 果

A 分離前固定非活性化血小板

分離前固定非活性化血小板は円盤形を示し、偽足突起形成は認められなかった(Figs.1-4)。その血小板に対して凍結前血小板2分割法に凍結割断法を組合わせた方法と、凍結前2分割法のみの方を適用し、細胞質内レプリカ膜を作製して両者の所見を比較した。

凍結前血小板2分割法に凍結割断法を組合わせた方

法により細胞膜内葉外面が観察できたばかりではなく、細胞質も割断された (Figs. 1, 2)。さらにカバーガラスに付着した細胞膜の外葉細胞質面も観察できた (Fig. 1)。また、凍結割断された細胞質内には直径7 nmの細糸が相互に結合、解離を繰返し、方向性のない網目状構造を形成していることが認められた。その細糸は細胞膜裏面と細胞小器官に結合していた。

凍結前血小板2分割法のみによる分離前固定非活性化血小板の細胞質内レプリカ膜観察で得られた細胞骨格網目状構造の所見 (Figs. 3, 4) は、凍結割断法を組合わせた方法により得られた所見 (Figs. 1, 2) と同

様であった。凍結前血小板2分割法のみを適用した血小板を静かに緩衝液に浸漬し洗浄した場合、細胞骨格網目状構造の中に細胞小器官が観察でき、細糸と結合していた (Fig. 3)。微小結節状表面を持つ不規則な楕円体状細胞小器官と微小結節状および平滑表面を持つ2種類の球状細胞小器官が存在した。しかし、非活性化血小板に凍結前血小板2分割法を適用した後、緩衝液の流水で十分に洗浄すると、細胞質内よりほとんどの細胞小器官が除去された (Fig. 4)。また、洗浄後細胞質内に留った微小結節状表面を持つ球状細胞小器官が細胞骨格と結合していることが認められた (Fig. 4)。

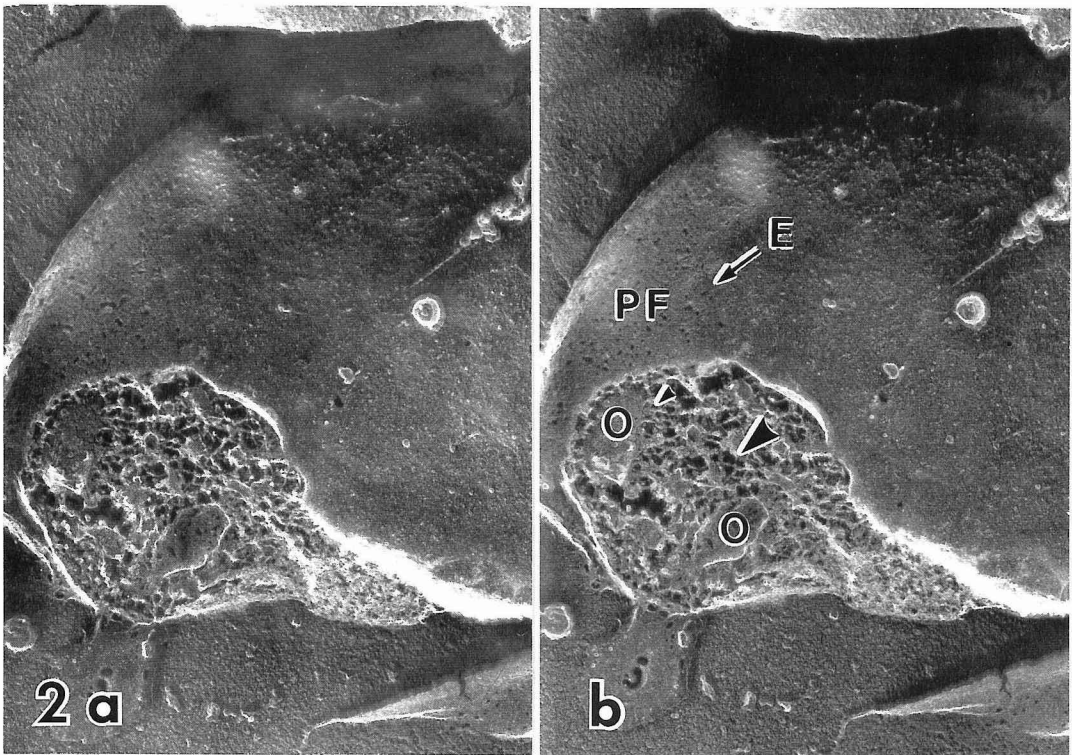
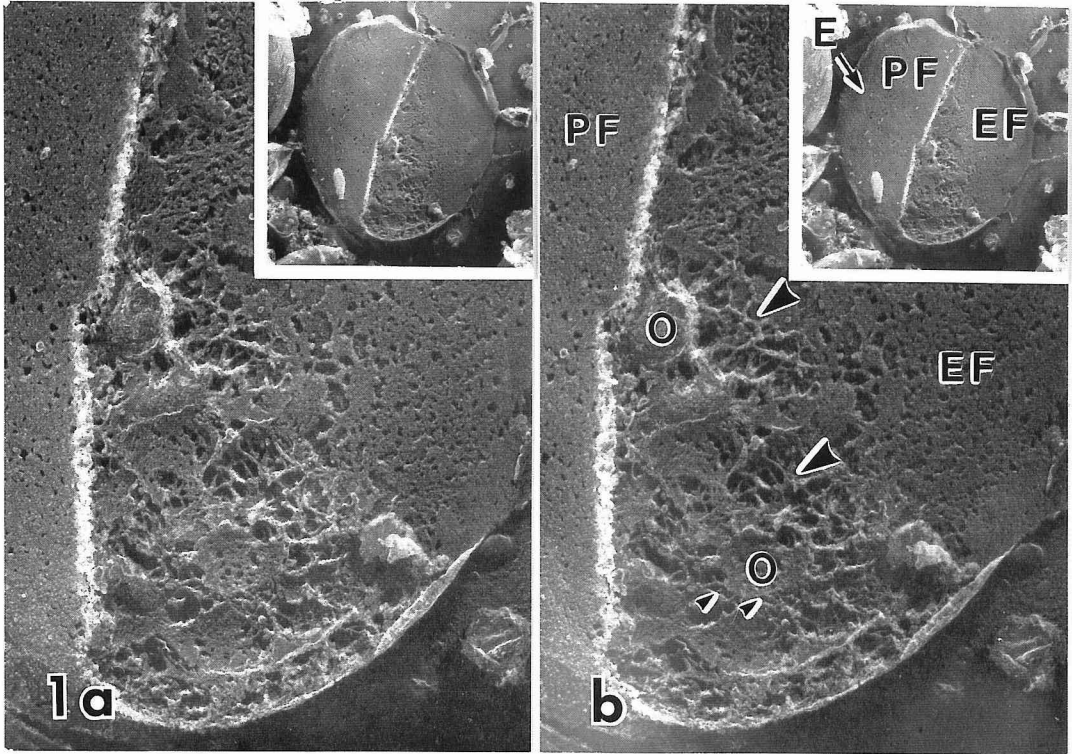
Fig. 1 a, b A pair of stereo-pictures of intracellular replica of the nonactivated platelets fixed before isolation and prepared by the combination of the platelet-splitting and freeze-fracturing methods. Cytoskeletal filaments are randomly organized (large arrowheads) and associated with cell organelles (small arrowheads) in the cytoplasm. Unit membranes of cell membranes and cell organelles were freeze-fractured. ($\times 42,000$) Insets: Low power magnification of a discoid platelet without filopodia. ($\times 9,000$) E: Edge of freeze-fractured cell membrane, EF: Exoplasmic face, PF: Protoplasmic face, O: Cell organelle.

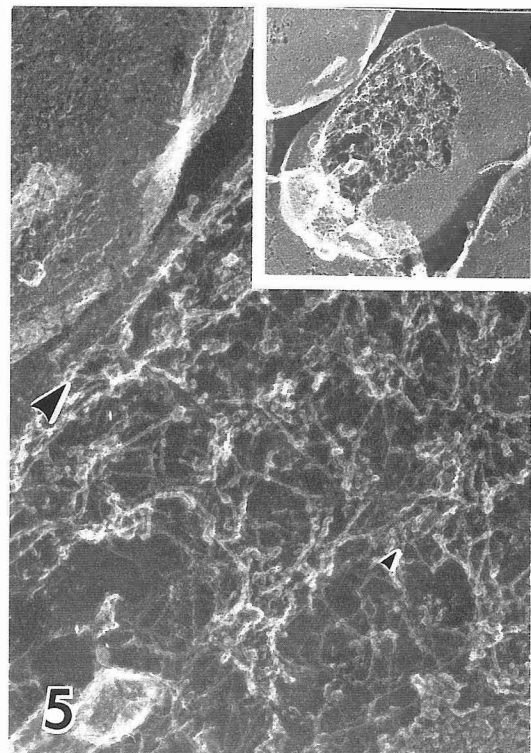
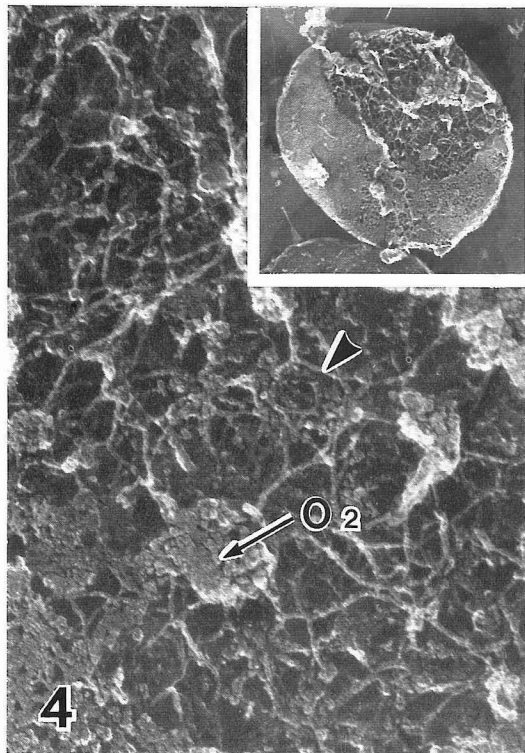
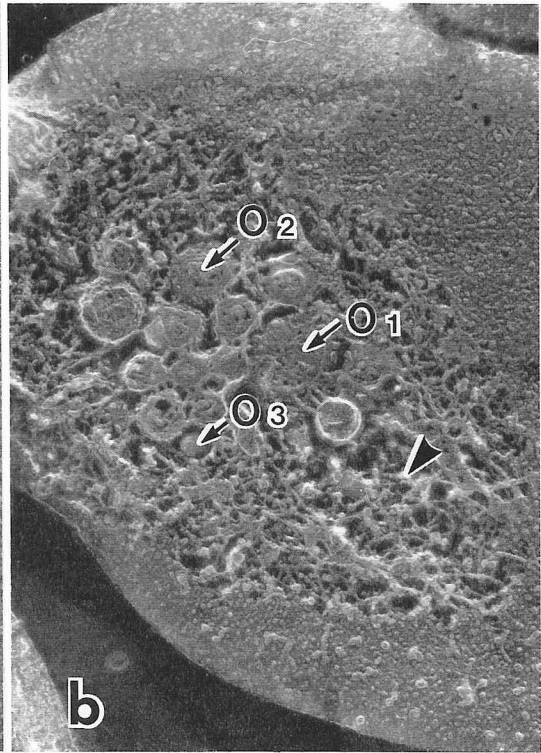
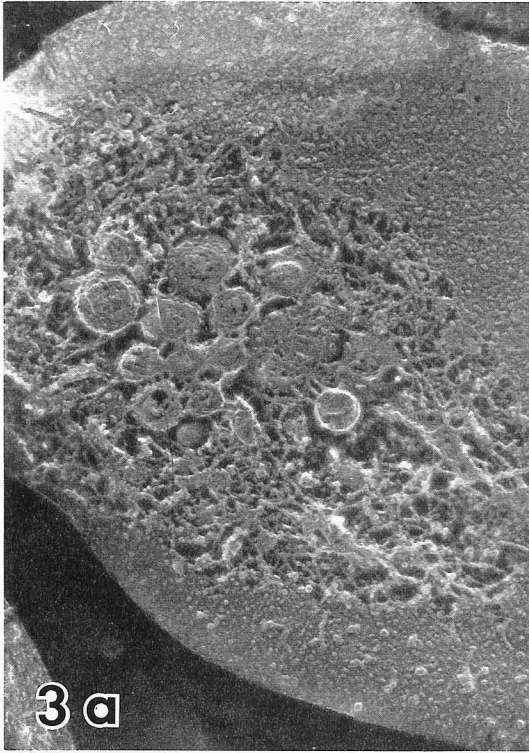
Fig. 2 a, b A pair of stereo-pictures of intracellular replica of the nonactivated platelets treated by the same methods in Fig. 1. The microfilaments are randomly distributed (large arrowhead) and associated with cell organelles (small arrowhead) in the freeze-fractured cytoplasm. The top cell membrane is freeze-fractured to show the protoplasmic face. ($\times 42,000$) E, EF and O: The same abbreviations to those in Fig. 1.

Fig. 3 a, b A pair of stereo-pictures of intracellular replicas of the nonactivated platelets fixed before isolation and prepared by the platelet-splitting method alone. Cytoskeletal organizations are similar to those observed in Figs. 1, 2 (large arrowhead). The microfilaments are associated with three kinds of cell organelles in the cytoplasm which are preserved by weak washing treatment. ($\times 42,000$) O₁: Irregular-ellipsoid cell organelle with fine-nodular surface, O₂: Round cell organelle with fine-nodular surface, O₃: Round cell organelle with smooth surface.

Fig. 4 An electron micrograph of intracellular replica of the nonactivated platelets treated by the same methods in Fig. 3. The cytoskeletal organizations are similar to those observed in Figs. 1, 2 (large arrowhead). Almost all cell organelles are removed from the cytoplasm by sufficient washing treatment after the platelet-splitting method. The microfilaments are associated with a few round cell organelles with fine-nodular surfaces. ($\times 72,000$) Inset: Low power magnification of a discoid platelet without filopodia. ($\times 11,000$) O₂: The same abbreviation to that in Fig. 3.

Fig. 5 An electron micrograph of intracellular replica of the nonactivated platelets fixed after isolation and prepared by the platelet-splitting method alone. Meshworks of cytoskeletal microfilaments become finer than those in the nonactivated platelets before isolation. Some microfilaments run parallel to each other (small arrowhead) and reached to the cell membrane (large arrowhead). ($\times 58,000$) Inset: Low power magnification of a discoid platelet without filopodia. ($\times 11,000$)





B 分離後固定非活性化血小板

凍結前血小板2分割法のみを適用し、緩衝液の流水で十分に洗浄した分離後固定非活性化血小板の中で、偽足突起を持たない円盤形血小板を選択して検索すると、細胞質内に直径7 nmの細糸が平行に走行している部分が観察された (Fig. 5)。また、細胞膜と平行に走行する細糸束から分枝した細糸が細胞膜裏面と結合していることが認められた。しかし、細胞質内には細胞小器官はほとんど観察されなかった。

C 活性化血小板

凍結前血小板2分割法のみを適用し、緩衝液の流水で十分に洗浄した30秒間活性化血小板では、細胞質内で直径7 nmの細糸の配列が密になり、長く平行して走る細糸束が形成されていることが認められた (Fig. 6)。細糸の表面には微細顆粒状物質が付着し、細糸束が細胞小器官を取囲んでいた。それらの細胞小器官は洗浄した後も細胞質内に留まり、細糸が微小結節状表面を持つ球状細胞小器官と側面付着していることが観察された。

60秒間活性化血小板に凍結前血小板2分割法を適用した後、緩衝液の流水で十分に洗浄しても細胞骨格と細胞小器官との結合様式が検索できた (Fig. 7)。直径7 nmの細糸は微小結節状表面を持つ不規則な楕円体状細胞小器官に対し点付着と側面付着し、平滑表面を持つ球状細胞小器官とは側面付着のみしていることが認められた。

以上の結果を模式図に示した (Fig. 8)。分離前固定

非活性化血小板の細胞骨格細糸は方向性を持たない網目状構造を形成していた (a)。しかし、分離後固定非活性化血小板では、細胞骨格細糸は部分的に平行するようになった (b)。活性化すると細胞骨格構造は密になり、長く平行して走る細糸束は細胞小器官を取囲むようになった (c)。さらに、活性化血小板では細胞骨格細糸が微小結節状表面を持つ不規則な楕円体状細胞小器官に対しては点付着と側面付着していたが (d₁)、微小結節状および平滑表面を持つ2種類の球状細胞小器官に対しては側面付着のみしていた (それぞれ、d₂ および d₃)。

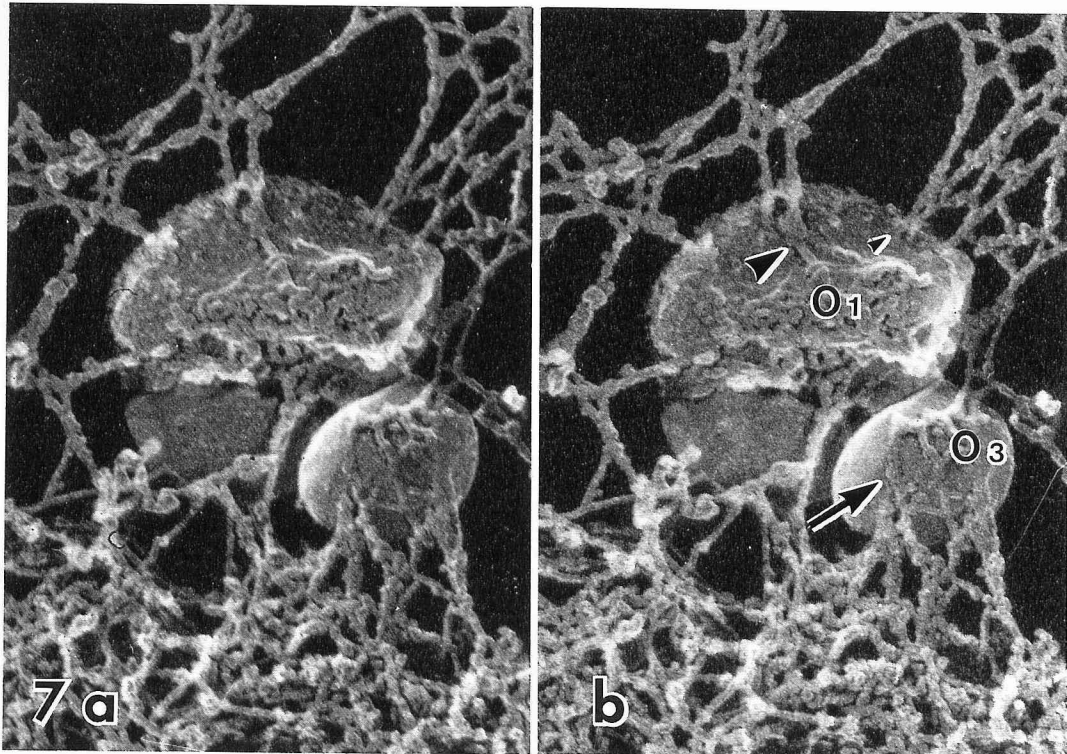
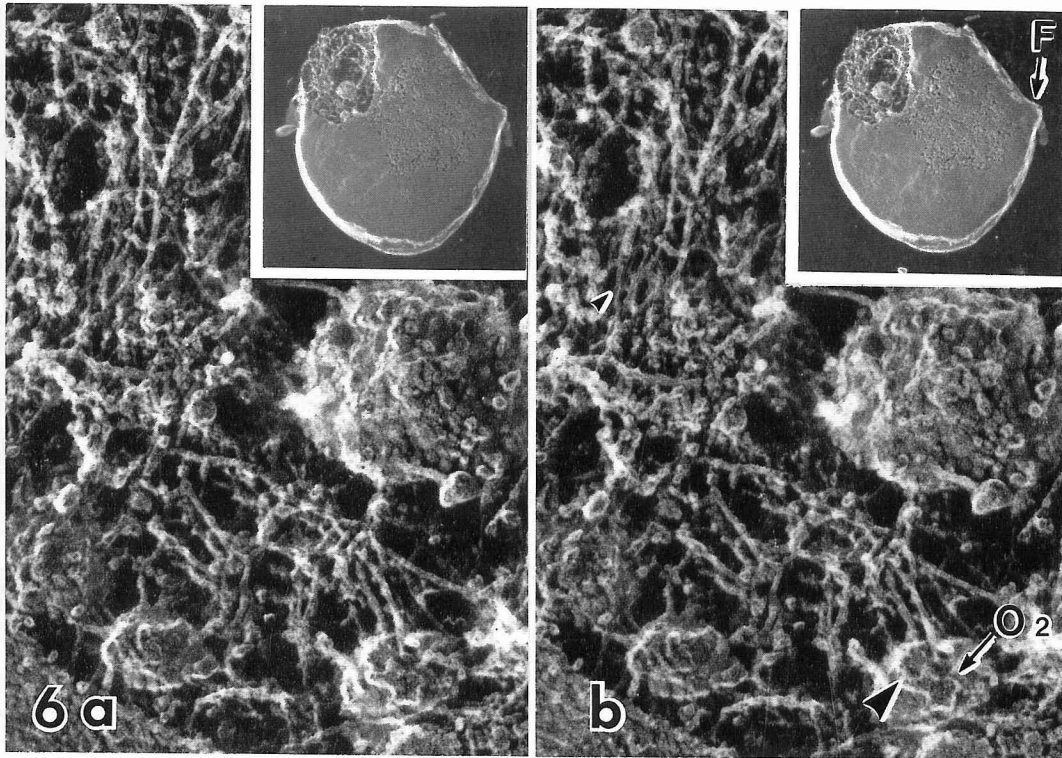
IV 考 察

すでに報告したように³¹⁾³²⁾、凍結前血小板2分割法を非活性化および活性化血小板に適用し、細胞質内レプリカ膜で検索した結果、分離前固定非活性化血小板の細胞膜裏面に結合した亀甲状膜骨格は60秒間活性化血小板では細かい網目状膜骨格となり、細胞膜裏面と結合していた。この凍結前血小板2分割法は細胞膜と細胞骨格との結合様式を検索するには、非常に有用な方法であったが、細胞質深部の細胞骨格構造を観察する場合には、血小板を2分割する時に細胞骨格が伸展され人工的な微細構造を形成する可能性が考えられた。今回、凍結前血小板2分割法による細胞骨格構造所見と、できる限り人工的变化を防いだ細胞骨格構造所見とを比較するために、凍結前血小板2分割法に凍結断法を組合わせて検索した。すなわち、凍結前血

Fig. 6 a, b A pair of stereo-pictures of intracellular replica of the platelet activated for 30 sec and prepared by the platelet-splitting method alone. Cytoskeletal microfilaments are organized more densely than those in the nonactivated platelets and form a dense meshwork of the bundles which run parallel around cell organelles (small arrowhead). The microfilaments are attached laterally to the round cell organelles with fine-nodular surfaces. ($\times 100,000$) Insets: Low power magnification of an activated platelet with a short filopodia. ($\times 8,500$) O₂: The same abbreviation to that in Fig. 3, F: Filopodia.

Fig. 7 a, b A pair of stereo-pictures of intracellular replica of the platelets activated for 60 sec and prepared by the platelet-splitting method alone. The microfilaments are attached end-on and laterally to the irregular-ellipsoid cell organelle with fine-nodular surface (large and small arrowheads, respectively), and only laterally to the round cell organelles with smooth surfaces (arrow). ($\times 105,000$) O₁ and O₃: The same abbreviations to those in Fig. 3.

活性化に伴う血小板細胞骨格の微細構造変化



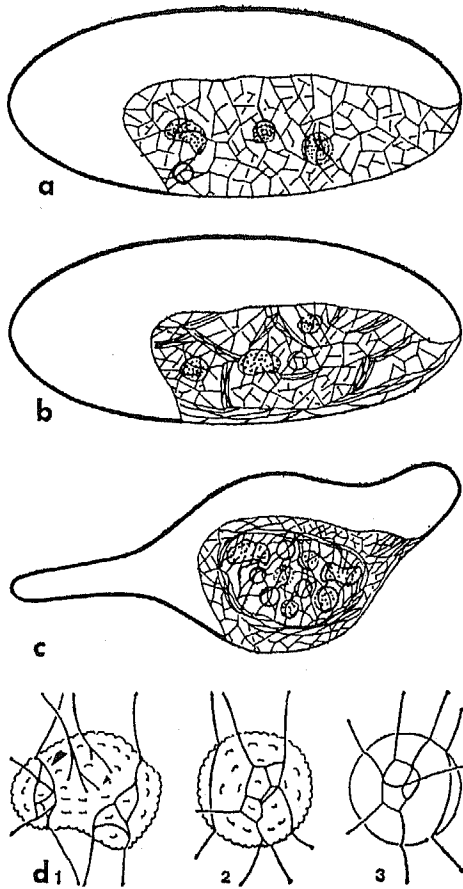


Fig. 8 Schematic representation of cytoskeletal organizations in the nonactivated and activated platelets.

- a. Cytoskeletal microfilaments in the nonactivated platelet fixed before isolation are randomly distributed in the cytoplasm.
- b Some microfilaments in the nonactivated platelet fixed after isolation run parallel to each other and are associated with the cell membrane.
- c Microfilaments in the platelet activated for 30 or 60 sec form a condensed meshwork of the bundles which run parallel around the cell organelles.
- d The microfilaments are attached to three kinds of cell organelles.
 - 1 End-on and lateral attachments to the irregular-ellipsoid cell organelle with fine-nodular surface (small and large arrowheads, respectively).
 - 2 Only lateral attachment to the round cell organelle with fine-nodular surface.
 - 3 Only lateral attachment to the round cell organelle with smooth surface.

小板2分割法を用いて細胞骨格が変化しないように、2枚のカバーガラスの間に挟んだ血小板をできる限り軽度な力で圧迫し、細胞膜の極く一部を取除き細胞質内可溶性蛋白質を除去した。さらに人工的な微細構造変化を最少限に留めることができると考えられる凍結割断法を適用し細胞骨格構造を観察した。その結果、この方法による細胞骨格構造と同様な所見を凍結前血小板2分割法のみの場合でも示したので、凍結前血小板2分割法のみを適用した血小板でも細胞質深部の細胞骨格構造をかなり正確に検索できることが明らかになった。

分離前固定非活性化血小板は偽足突起を持たず、すべて円盤形を示したが³¹⁾³²⁾、分離後固定非活性化血小板の中には偽足突起を持つものも観察された。今回、分離前固定非活性化血小板と比較するために分離後固定

非活性化血小板の中の円盤形血小板を選んで検索した。その結果、分離後固定非活性化血小板の方が分離前固定非活性化血小板よりも細胞骨格構造が密であり、部分的に細糸が平行して走る細糸束も観察されたので、分離後固定非活性化血小板の方が分離前固定非活性化血小板よりも、わずかではあるが活性化されたと考えられる。したがって、初期活性化血小板では細胞膜の形態学的変化を示さず円盤形をしていても、細胞骨格には活性化による変化が生じていることが明らかになった。本研究で細胞質内に観察された直径7nmの細糸は他の報告より⁶⁾⁻¹⁴⁾²¹⁾⁻²³⁾²⁸⁾²⁹⁾アクチン細糸であると考えられる。今までに非活性化血小板のアクチン細糸量が報告されてきたが、その値に大きなばらつきがあった¹⁵⁾⁻²²⁾³⁴⁾。その原因として、従来より円盤形血小板をすべて非活性化血小板として扱ってきたので、

初期活性化がおこった円盤形血小板の細胞質内に増加したアクチン細糸を非活性化状態での値として計測した可能性がある。したがって、真の非活性化血小板を得るためには、採血した後静脈血を素早く固定し血小板活性化を防ぐことが最良であると考えられる³¹⁾³²⁾。

通常、凍結前血小板2分割法を適用した後、緩衝液の流水で十分に洗浄すると非活性化血小板細胞質内には細胞小器官がほとんど観察されなかった。その理由は、細胞骨格の網目状構造が疎であり、また非活性化および初期活性化血小板では細糸と細胞小器官との結合も弱いから、細胞質内可溶性蛋白質除去と同時に取除かれたためと考えられる。しかし、活性化血小板を緩衝液の流水で十分に洗浄しても、細胞質内に細胞小器官が観察できた。活性化すると細糸束が分泌顆粒などの細胞小器官を取囲むことは、すでに超薄切片による透過型電子顕微鏡学的方法で認められている¹⁴⁾²²⁾。本研究の Fig. 6 でも同様な所見が認められ、このような活性化による密な細胞骨格構造が細胞小器官を細胞質内に留めたと考えられる。また、活性化によりアクチン細糸と分泌顆粒との結合が強くなった可能性もある。

すでに、細胞骨格と分泌顆粒との結合については報告されているが¹¹⁾²⁷⁾、その結合様式や他の細胞小器官との結合については詳細に報告されていない。今回、観察された細胞小器官は直径200—500nmであり、大きさでは分泌顆粒と他の細胞小器官を同定することができないが、形態により推定すると不規則な橢円体状細胞小器官は糸状体で、球状細胞小器官は分泌顆粒と考えられる。不規則な橢円体状細胞小器官の表面は微小結節状であり、細糸が点付着と側面付着していた。一方、球状細胞小器官の表面は微小結節状と平滑の2種類があったが、細糸は両者に対して側面付着のみしていた。分泌顆粒は解放小管系に接合し内容物が放出されるが²⁾²⁹⁾³⁵⁾³⁶⁾、細糸が細胞膜裏面に対して側面付着しているので³¹⁾³²⁾、分泌顆粒に対しても側面付着していれば、活性化により分泌顆粒と細胞膜とを強い力で急速に接近させることができると考えられる。また、分泌顆粒には dense granule と α -granule があり³⁷⁾、

今回観察された2種類の球状細胞小器官がそれぞれどちらに相当するのか今後の検索を必要とするが、 α -granule のみが欠如している gray syndrome に³⁸⁾ 本研究を応用すれば、dense granule の表面構造が観察できると考えられる。一方、非活性化血小板にも2種類の球状細胞小器官が観察されたので、活性化により平滑表面が微小結節状に変化した可能性はなく、膜蛋白質や含有物質などに対する抗体を用いてそれぞれの細胞小器官を同定する必要があると考えられる。

V 結 語

非活性化および活性化ヒト血小板の細胞質内レプリカ膜で、活性化に伴う細胞骨格の3次元微細構造変化を電子顕微鏡学的に検討した結果、以下の結論を得た。

1) 凍結前血小板2分割法に凍結割断法を組合わせた方法ばかりではなく、凍結前血小板2分割法のみでも血小板細胞質深部における細胞骨格微細構造をかなり正確に検索できることが明らかとなった。

2) 分離方法によっては初期活性化が起こった円盤形血小板も存在し、細胞骨格構造が変化した可能性があることを示した。

3) 非活性化血小板では細胞骨格と細胞小器官との結合は弱いから、活性化により細胞骨格構造が密になり、細胞小器官を取囲むだけでなく、細胞骨格と細胞小器官との結合も強くなることを示した。

4) 活性化血小板において細胞骨格細糸は微小結節状表面を持つ不規則な橢円体状細胞小器官とは点付着と側面付着しているが、表面が微小結節状および平滑の2種類の球状細胞小器官に対しては側面付着のみしていることが明らかになった。

本研究の要旨は第91回日本解剖学会総会（昭和61年4月、東京）において発表した。

稿を終るに当たり、御指導、御校閲を賜りました当教室の永田哲士教授、大野伸一助教授、並びに御協力をしていたいただきました藤井靖久助手に深く感謝いたします。

文 献

- 1) White, J. G. : Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. *Blood*, 31 : 604-622, 1968
- 2) White, J. G. : Exocytosis of secretory organelles from blood platelets incubated with cationic polypeptides. *Am J Pathol*, 69 : 41-54, 1972

- 3) Allen, R.D., Zacharski, L.R., Widirstky, S.T., Rosenstein, R., Zaitlin, L.M. and Burgess, D.R. : Transformation and motility of human platelets. Details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. *J Cell Biol*, 83 : 126-142, 1979
- 4) Bennett, W.F. and Lynch, G. : Low-temperature induction of calcium-dependent protein phosphorylation in blood platelets. *J Cell Biol*, 86 : 280-285, 1980
- 5) Gear, A.R.L. : Rapid platelet morphological changes visualized by scanning-electron microscopy : kinetics derived from a quenched-flow approach. *Br J Haematol*, 56 : 387-398, 1984
- 6) Zucker-Franklin, D. : The submembranous fibrils of human blood platelets. *J Cell Biol*, 47 : 293-299, 1970
- 7) Nachmias, V., Sullender, J. and Asch, A. : Shape and cytoplasmic filaments in control and lidocaine-treated human platelets. *Blood*, 50 : 39-53, 1977
- 8) Gonnella, P.A. and Nachmias, V.T. : Platelet activation and microfilament bundling. *J Cell Biol*, 89 : 146-151, 1981
- 9) Jennings, L.K., Fox, J.E.B., Edwards, H.H. and Phillips, D.R. : Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *J Biol Chem*, 256 : 6927-6932, 1981
- 10) Carroll, R.C., Butler, R.G., Morris, P.A. and Gerrard, J.M. : Separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons. *Cell*, 30 : 385-393, 1982
- 11) Zobel, C.R. and Manuel, H. : The platelet reticular network¹. *J Ultrastruct Res*, 89 : 89-97, 1984
- 12) Tanaka, K., Onji, T., Okamoto, K., Matsusaka, T., Taniguchi, H. and Shibata, N. : Reorganization of contractile elements in the platelet during clot retraction. *J Ultrastruct Res*, 89 : 98-109, 1984
- 13) Cohen, I. : The mechanism of clot retraction. In : George, J.N., Nurden, A.T. and Phillips, D.R. (eds.), *Platelet membrane glycoproteins*, pp.299-323, Plenum Publishing Co., New York, 1985
- 14) Escolar, G., Krumwiede, M. and White, J.G. : Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol*, 123 : 86-94, 1986
- 15) Blikstad, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T. and Lindberg, U. : Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I. *Cell*, 15 : 935-943, 1978
- 16) Carlsson, L., Markey, F., Blikstad, I., Persson, T. and Lindberg, U. : Reorganization of actin in platelets stimulated by thrombin as measured by the DNase I inhibition assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 : 6376-6380, 1979
- 17) Casella, J.F., Flanagan, M.D. and Lin, S. : Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature*, 293 : 302-305, 1981
- 18) Fox, J.E.B., Dockter, M.E. and Phillips, D.R. : An improved method for determining the actin filament content of nonmuscle cells by the DNase I inhibition assay. *Anal Biochem*, 117 : 170-177, 1981
- 19) Fox, J.E.B. and Phillips, D.R. : Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. *Nature*, 292 : 650-652, 1981
- 20) Davies, G.E. and Palek, J. : The state of actin polymerization in tetracaine-treated platelets. *Thromb Haemost*, 48 : 153-155, 1982
- 21) Fox, J.E.B., Boyles, J.K., Reynolds, C.C. and Phillips, D.R. : Actin filament content and organization in unstimulated platelets. *J Cell Biol*, 98 : 1985-1991, 1984
- 22) Fox, J.E.B. : The organization of platelet contractile proteins. In : George, J.N., Nurden, A.T. and Phillips, D.R. (eds.), *Platelet membrane glycoproteins*, pp.273-298, Plenum Pub-

- lishing Co., New York, 1985
- 23) Phillips, D.R., Jennings, L.K. and Edwards, H.H. : Identification of membrane proteins mediating the interaction of human platelets. *J Cell Biol*, 86 : 77-86, 1980
 - 24) Painter, R.G., Ginsberg, M. and Jaques, B. : Concanavalin A induces interactions between surface glycoproteins and the platelet cytoskeleton. *J Cell Biol*, 92 : 565-573, 1982
 - 25) Pribluda, V. and Rotman, A. : Dynamics of membrane-cytoskeleton interactions in activated blood platelets. *Biochemistry*, 21 : 2825-2832, 1982
 - 26) Zucker, M.B. and Masiello, N.C. : The Triton X-100-insoluble residue ("cytoskeleton") of aggregated platelets contains increased lipid phosphorus as well as ¹²⁵I-labeled glycoproteins. *Blood*, 61 : 676-683, 1983
 - 27) Davies, G.E. : Association of actin with the platelet membrane. *Biochem Biophys Acta*, 772 : 149-160, 1984
 - 28) Boyles, J., Fox, J.E.B., Phillips, D.R. and Stenberg, P.E. : Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets : Preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage. *J Cell Biol*, 101 : 1463-1472, 1985
 - 29) Mosher, D.F., Pesciotta, D.M., Loftus, J.C. and Albrecht, R.M. : Secreted alpha granule proteins. The race for receptors. In : George, J.N., Nurden, A.T. and Phillips, D.R. (eds.), *Platelet membrane glycoproteins*, pp.171-191, Plenum Publishing Co., New York, 1985
 - 30) Ohno, S. : Immunocytochemical study on the cytoplasmic side of cell membranes infected with vesicular stomatitis virus by quick-freezing and deep-etching replica method. *Histochem*, 82 : 565-575, 1985
 - 31) 大竹直人 : 非活性化ヒト血小板細胞骨格の電子顕微鏡学的研究. *信州医誌*, 35 : 45-56, 1987
 - 32) Ohtake, N. : Attachment of cytoskeletons to cell membranes in human blood platelets as revealed by quick-freezing and deep-etching replica method. *J Ultrastruct Molec Struct Res*, 95 : 84-95, 1986
 - 33) Phillips, D.R. and Agin, P.P. : Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthemia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest*, 60 : 535-545, 1977
 - 34) Rosenberg, S., Stracher, A. and Lucas, R.C. : Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets. *J Cell Biol*, 91 : 201-211, 1981
 - 35) Behnke, O. : Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelets. *Anat Rec*, 158:121-138, 1967
 - 36) Hols, H., Sixma, J.J., Leunissen-Bijvelt, J. and Verkley, A. : Freeze-fracture studies of human blood platelets activated by thrombin using rapid freezing. *Thromb Haemost*, 54 : 574-578, 1985
 - 37) Zucker, M. B. : The functioning of blood platelets. *Sci Am*, 242 : 70-89, 1980
 - 38) Nurden, A.T. : Glycoprotein defects responsible for abnormal platelet function in inherited platelet disorders. In : George, J.N., Nurden, A.T. and Phillips, D.R. (eds.), *Platelet membrane glycoproteins*, pp.357-392, Plenum Publishing Co., New York, 1985

(62. 1. 23 受稿)