

非活性化ヒト血小板細胞骨格の電子顕微鏡学的研究

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)

Electron Microscopic Studies on Cytoskeletons of Unstimulated Human Blood Platelets

Naoto OHTAKE

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

This study examined the ultrastructural organizations of cell membrane-cytoskeletal interactions in unstimulated human blood platelets.

Venous blood was obtained from healthy human adults and the platelet activation was inhibited with paraformaldehyde fixation. Some of the fixed platelets were dehydrated and embedded in epoxy resin. Quick-freezing and deep-etching replica method was applied to the other platelets which were split open mechanically without detergent treatment (Fig. 1).

By electron microscopy of ultrathin sections, the platelets were ascertained to have discoid shape (Fig. 2a). The cytoskeletons in cytoplasm fixed with osmium tetroxide were destroyed (Fig. 2b) more than in cytoplasm without fixing (Fig. 3). Osmium tetroxide fixation was therefore omitted when making replicas.

As observed by electron microscopy of the replicas, microfilaments were attached laterally to cytoplasmic sides of cell membranes (Figs. 4, 5, 7a). A geometrical pattern consisting of main hexagons and partial pentagons was formed on the cytoplasmic side with the microfilaments (Figs. 4, 5, 7a). A set of three microfilaments gathered at a point of the polygons and the filaments were attached to each other to make a bundle (Figs. 4, 5, 6, 7a). The bundles spread from the points into the cytoplasm and were associated with each other to form filamentous meshworks (Figs. 4, 5, 6, 7b).

It is concluded that unstimulated platelets have the characteristic structures of cytoskeletons which are essential to maintain discoid shape and have something to do with platelet functions. *Shinshu Med. J.*, 35: 45-56, 1987

(Received for publication July 12, 1986)

Key words: blood platelet, cytoskeleton, cell membrane-cytoskeletal interaction, quick-freezing, deep-etching replica

血小板, 細胞骨格, 細胞膜-細胞骨格結合, 急速凍結, ディープエッチングレプリカ

I 緒 言

血小板を含めた多くの非筋細胞にもアクチン細糸を主要な構成要素とする細胞骨格が存在し、形態学的変化に重要な機能を果たすと考えられている¹⁾。血小板においては、細胞骨格が活性化による血小板球形化、偽足突起形成、顆粒放出、血餅形成などの血小板機能と関係している²⁾⁻⁷⁾。

近年、これらの血小板機能と関係する細胞骨格の細糸性アクチンにおける非活性化血小板内含有量が研究されてきた。細胞骨格構成蛋白質は非活性化状態では生化学的にほとんど細糸化していないので⁸⁾、電子顕微鏡学的にも少量の短いマイクロフィラメントが観察できるのみで⁸⁾、細糸性アクチンは観察されないという報告がある⁹⁾。しかし、一方、非活性化血小板でも、ほとんどすべてのアクチン蛋白質が細糸として存在するという報告もある¹⁰⁾。比較的最近になって、全蛋白質の15~20%を占めるアクチン蛋白質の約30~50%が細糸性アクチンであるとする生化学的報告が次々となされ⁴⁾¹¹⁾⁻¹⁶⁾、形態学的所見とも一致してきたことから⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾、非活性化血小板にも多量の細胞骨格蛋白質が細糸として存在していることが認められるようになってきた。

血小板機能の中で活性化による血小板球形化、偽足突起形成、血餅形成には急速な細胞膜の形態学的変化を伴うので、収縮機能を持つアクチン細糸を主成分とする細胞骨格が細胞膜と結合していると考えられ、生化学的に報告された¹⁸⁾⁻²²⁾。さらに、電子顕微鏡学的にも血小板内マイクロフィラメントが細胞膜と結合していることが示された²⁾⁶⁾⁷⁾¹⁷⁾。しかし、形態学的に細胞膜と細胞骨格との結合を観察する方法にはいくつか問題点があった。第1に、血小板は種々の刺激により容易に活性化するために、非活性化血小板を得にくかった。第2に、従来より細胞内可溶性蛋白質除去のために用いた Triton X-100 などの界面活性剤は細胞膜構造も除去するので、電子顕微鏡学的に観察しても細胞膜と細胞骨格との結合様式は検索できなかった。

そこで、本研究ではパラホルムアルデヒドによる短時間固定により血小板活性化を止め、それら非活性化血小板を機械的に2分割した後、血小板内可溶性蛋白質を除去し、細胞膜構造と細胞骨格の両方を同時に保存させた。さらに、急速凍結、ディープエッチングレプリカ法を応用し、細胞膜と細胞骨格との結合様式を3次元的に検索した結果、いくつかの新しい知見を得

ることができたので報告する。

II 材料と方法

A 非活性化血小板の分離法

健康成人(20~30歳、男子3人、女子3人)より静脈血を15ml採血し、速やかに37°Cに温めた3mlの溶液A(71mMクエン酸、85mMクエン酸ナトリウム、111mMブドウ糖)²³⁾と混合した(Fig. 1a₁)。さらに血小板活性化を防ぐために、全血を溶液B(120mM塩化ナトリウム、13mMクエン酸ナトリウム、30mMブドウ糖、pH7.2)で希釈した37°Cの2%パラホルムアルデヒド(Merck, Darmstadt, Germany)水溶液で10分間固定した(Fig. 1a₂)。

次に非活性化血小板ペレットの作製に当たっては、Phillipsらの方法⁴⁾¹⁵⁾²³⁾を参考にして予備実験を行った結果、血小板収量の最も多かった次の条件を採用した。パラホルムアルデヒド固定した全血を160×g、20分間遠沈し多血小板血漿を得て、さらに、730×g、20分間遠沈し非活性化血小板を分離した。それらの血小板は溶液Bで2回、溶液C(154mM塩化ナトリウム、10mMトリス塩酸、1mMEDTA、pH7.4)で1回洗浄、遠沈した。洗浄した血小板は溶液D(138mM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、0.36mMリン酸2水素ナトリウム、5.5mMブドウ糖、1mMEDTA、pH7.4)を用いて血小板浮遊液にして、60分間37°Cで放置した後、遠沈して非活性化血小板ペレットを作製した(Fig. 1a₃)。なお、用いた溶液B~Dも37°Cに温め、遠沈は2000×g、10分間ずつ行った。血小板ペレットは速やかにレプリカ作製に用いたが、一部の血小板ペレットは通常の電子顕微鏡試料作製のために、以下の操作を行った。

B 通常の電子顕微鏡試料作製法

非活性化血小板であることと細胞質内細胞骨格の存在を確認するために、通常の超薄切片を作製した。なお、細胞質内細胞骨格の観察を容易にするために、血小板ペレットを溶液Dで6時間、さらに24時間放置した。その非活性化血小板ペレットに少量の分離血漿を加えた後、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で希釈した2.5%グルタルアルデヒド(半井化学薬品、京都)水溶液で、1時間室温で前固定し、塩化ナトリウム(0.01M)添加同緩衝液で3回洗浄した。さらに、一部を同緩衝液で希釈した1%四酸化オスミウム液(Merck, Darmstadt, Germany)で1時間後固定し、

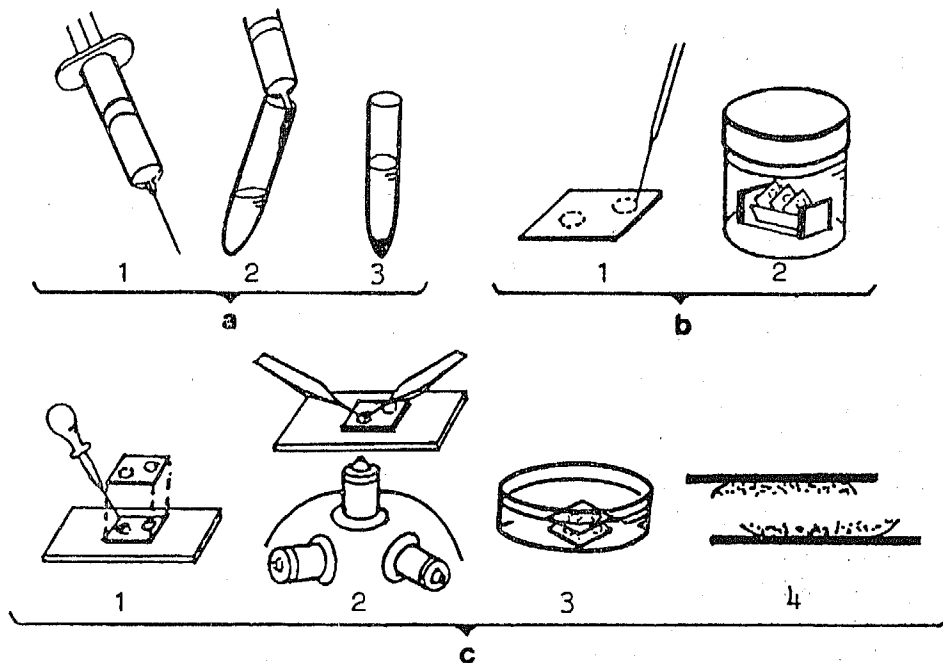


Fig. 1 Schematic representation of the process of preparing inside-out cell membranes of unstimulated human blood platelets.

a. Isolation of unstimulated platelets.

1. Human venous blood is taken from the cubital vein with a syringe.
2. The blood is put into paraformaldehyde fixative and fixed for inhibition of platelet activation.
3. The fixed platelets are isolated from the blood to make pellets by centrifugation.

b. Treatment of coverglasses.

1. Small circles are marked on coverglasses with a diamond pen.
2. The coverglasses are coated with 3-aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde.

c. Procedure of splitting open the platelets.

1. Two tiny drops of the platelet pellet are put on the circles of a coverglass and covered with another coverglass to sandwich the platelets.
2. The cell membranes are attached to each coverglass with forceps under a phase contrast microscope.
3. The platelets attached to both coverglasses are split open in phosphate buffer with saline.
4. The inside-out cell membranes are still attached to each coverglass.

塩化ナトリウム添加同緩衝液で3回洗浄した。両者を型のごとく、アルコール系列で脱水し、ルベアック（半井化学薬品、京都）（45°Cで5時間、60°Cで12時間、重合）に包埋した。Porter-Blum型MT2-B超ミクロトーム（DuPont-Sorvall, Newtown, Connecticut, USA）で厚さ0.05～0.1μmの超薄切

片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色後、日立HS-9またはH-700型電子顕微鏡（加速電圧75-200 kV）で観察した。

C 血小板2分割法

血小板細胞内レプリカ膜を作製するためには、血小板を2分割する必要がある。そこで、最近考案され

た細胞2分割法²⁴⁾を血小板に応用した。

ダイヤモンドペンで直径6mmの円を描いたカバーガラス (Fig. 1b₁) を十分に洗浄した後、細胞膜をカバーガラスに付着させるために、3-アミノプロピ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カバーガラスに被覆した²⁵⁾ (Fig. 1b₂)。

スライドガラスの上に置いたカバーガラスの円の中央部に非活性化血小板ベレットを1滴置き、速やかにもう1枚のカバーガラスを重ねて血小板を挟んだ (Fig. 1c₁)。ニコン倒立 MD 型位相差顕微鏡の対物鏡 DDL (20×) を使用し、血小板の状態を確認しながら、上方のカバーガラスをピンセットで適度に圧迫して血小板を上下のカバーガラスに付着させた (Fig. 1c₂)。貼り付いた2枚のカバーガラス間に多量の塩化ナトリウム (0.01M) 添加0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) を加えると、毛細管現象によりカバーガラスが互いに剥れる (Fig. 1c₃) と同時に血小板も機械的に2分割された (Fig. 1c₄)。2分割された血小板細胞質内可溶性蛋白質を塩化ナトリウム添加同緩衝液で十分に洗い流した後、0.1Mリン酸緩衝液で希釈した2.5%グルタルアルデヒド水溶液で30分間固定した。以上のように処理した血小板はカバーガラスに付着させたまま塩化ナトリウム添加同緩衝液中、4°Cで保存した。

D 急速凍結、ディープエッチングレプリカ法

2分割血小板を急速凍結する前に、蒸留水に浸漬して塩類を除き、さらに10%メタノール溶液に浸漬して氷晶形成防止を行った²⁶⁾。2分割血小板が載っているカバーガラスに付着した余分な水分を濾紙で十分に吸い取った後、カバーガラスをグリセリンを用いて試料

台に付着させた。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²⁷⁾中に2分割血小板、カバーガラス、グリセリン、試料台を一緒に血小板付着面より浸漬し急速凍結した。

エイコーFD-2A型凍結試料処理装置 (エイコー・エンジニアリング、茨城) で、あらかじめ-170°C以下に冷却した標本台に凍結試料を移し、-95°C、 10^{-7} - 10^{-8} Torr で60分間ディープエッチングを行い、白金と炭素を60°の角度で回転蒸着した。レプリカ試料を凍結試料処理装置から取り出し、速やかにレプリカ膜上にアミルアセテートで希釈した2%コロジオン液を塗布し、十分に乾燥させた。

試料付レプリカ膜をカバーガラスごと家庭用漂白剤のハイター (花王石鹼、東京) 液中に入れ、2~3時間処理して細胞成分を溶かしコロジオン膜付レプリカ膜を得た。さらにレプリカ膜を蒸留水で2回洗浄した後、眼科用鉗で適当な大きさに細切し、あらかじめホルムバル膜を張った銅グリッド (Veco, 150メッシュ) に付着させた。その後、アミルアセテートとアセトンを用いて、レプリカ膜上のコロジオンを溶かし除いた。作製したレプリカ膜をH-700型電子顕微鏡 (加速電圧100kV) で観察し、±5°の角度をつけて2枚のステレオ写真を撮り3次元的に検索した。

III 結 果

最初に血小板が活性化していないことを確認するために、通常の超薄切片による電子顕微鏡学的検索を行った。非活性化血小板は円盤形を示すが、活性化すると偽足突起形成や顆粒放出をおこすことが報告されて

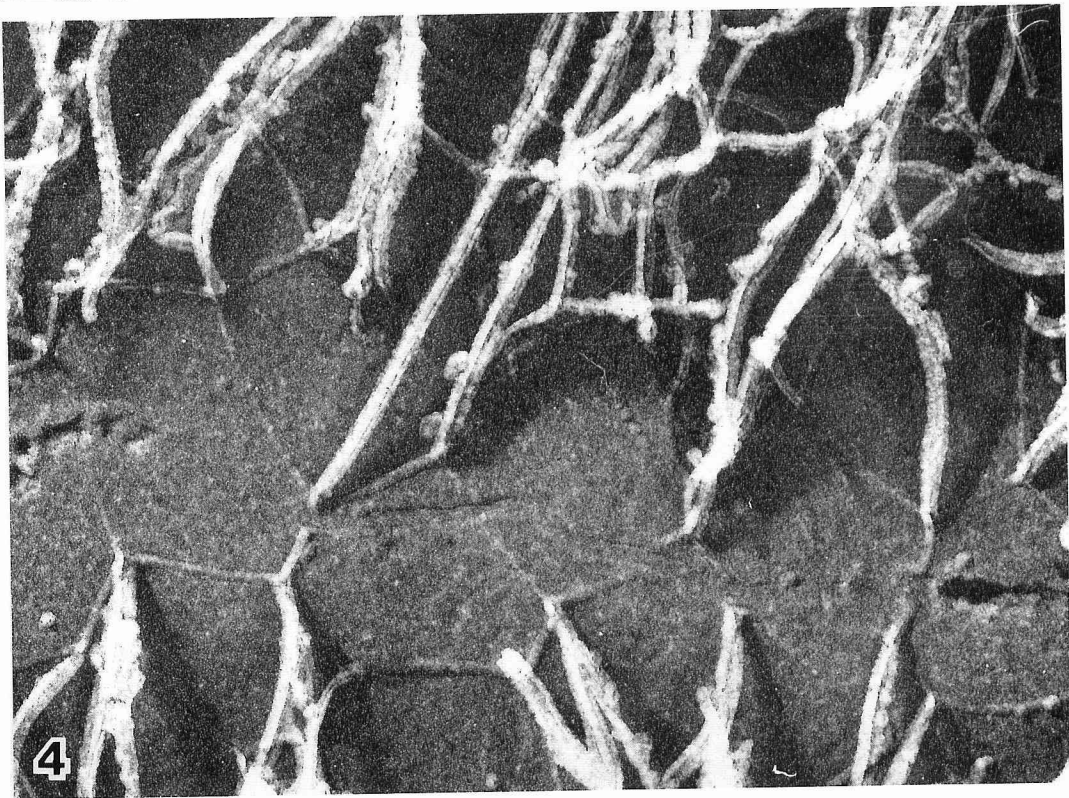
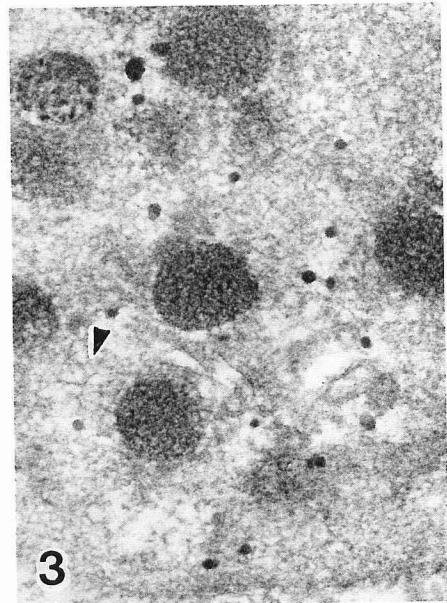
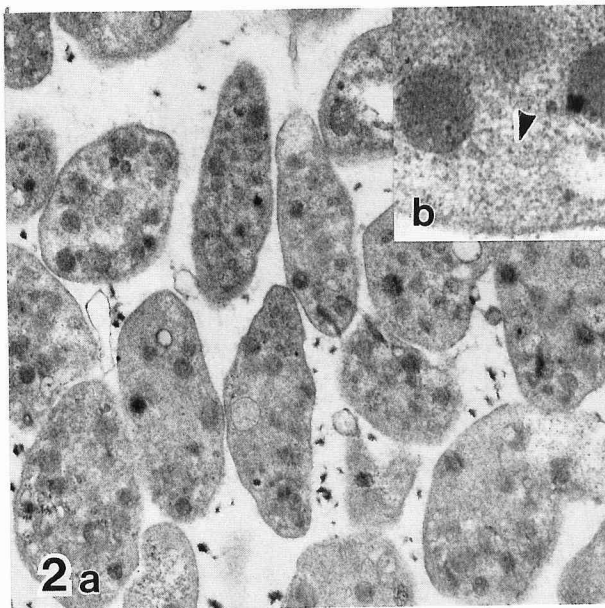
Fig. 2 Electron micrographs of ultrathin sections of unstimulated platelets fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide after paraformaldehyde treatment.

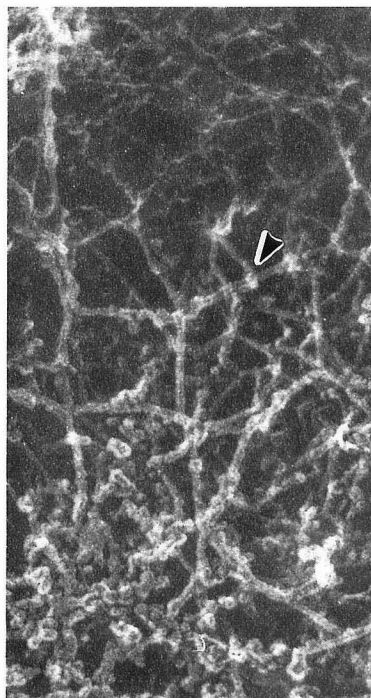
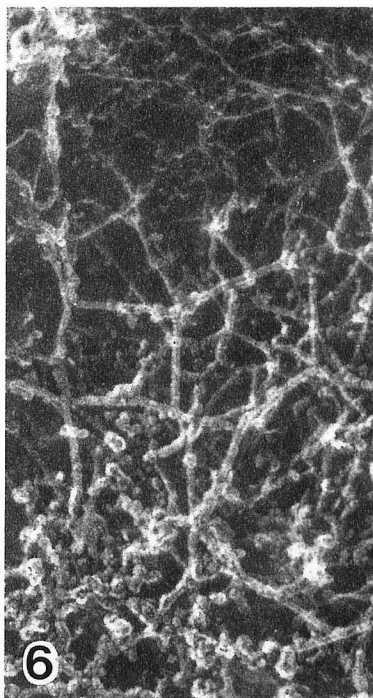
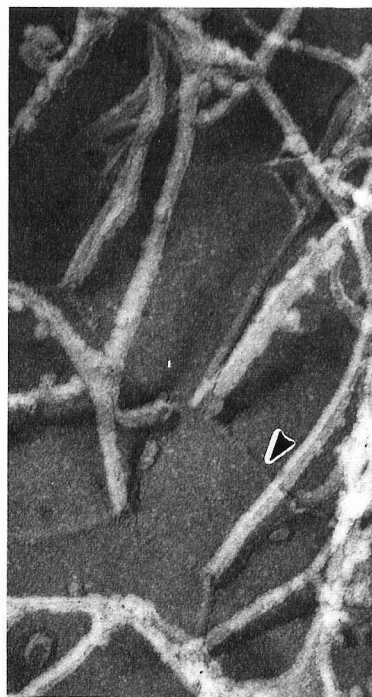
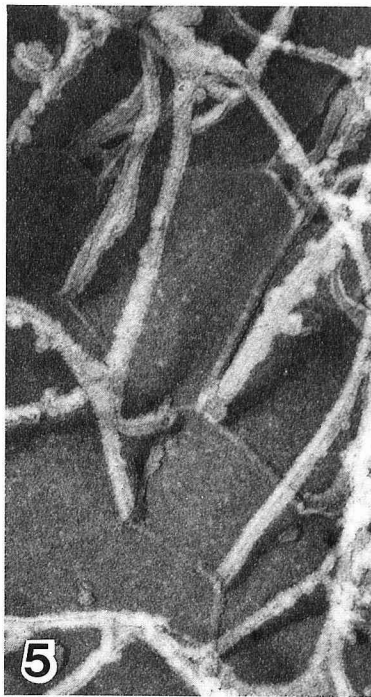
- Platelets incubated in solution D for 6 hr contain secretory granules and no filopodia, demonstrating unstimulated platelets with discoid shape. (×14,000)
- The cytoplasm of the platelets incubated in solution D for 24 hr is compacted with fine granular structures (arrowhead). (×80,000)

Fig. 3 Electron micrograph of ultrathin section of the unstimulated platelet incubated in solution D for 24 hr without osmium tetroxide fixation.

Filamentous structures and meshworks can be easily visualized throughout the cytoplasm (arrowhead), as compared with Figure 2b. (×80,000)

Fig. 4 Electron micrograph of inside-out cell membrane replica. Microfilaments are attached laterally to cytoplasmic side of cell membrane. They form a geometrical pattern of main hexagons and partial pentagons on the side. Bundles spread from points of the polygons into the cytoplasm and are attached to each other to form filamentous meshworks. (×100,000)





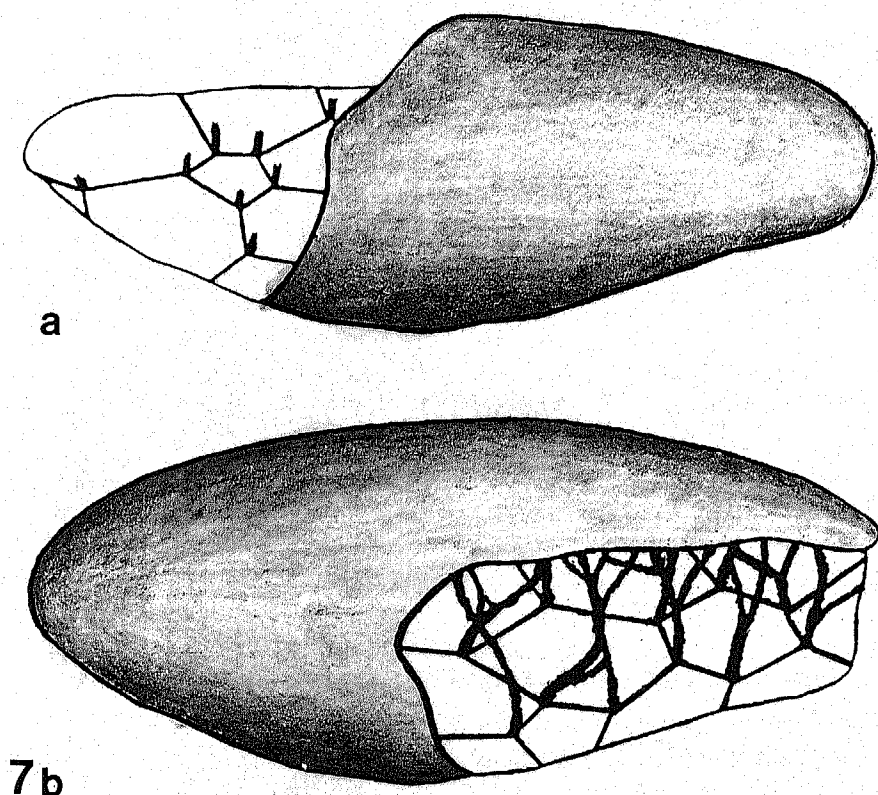


Fig. 5 A pair of stereo-pictures of electron micrographs of replica. A pentagon (arrowhead) is identified among the hexagons. ($\times 100,000$)

Fig. 6 A pair of stereo-pictures of electron micrographs of replica. Only cell membrane is removed, so that organization of superficial cytoskeletons under the cell membranes is revealed. Polygonal patterns of the cytoskeletons can be identified (arrowhead). Filamentous meshworks are formed in the deep cytoplasm. ($\times 80,000$)

Fig. 7 Schematic representation of cytoskeletal organization in unstimulated platelets.
 a. A geometrical pattern of main hexagons and partial pentagons is attached to cytoplasmic side of cell membrane after removing thick bundles near points of polygons.
 b. The thick bundles spread from points of the polygons into the cytoplasm and are associated with each other to form filamentous meshworks.

いる²⁸⁾⁻³²⁾。本研究では Fig. 2a で示すように活性化による変化がまったく観察されないので分離した血小板は非活性化状態であることが確認された。

超薄切片で細胞骨格の観察を容易にするために、パラホルムアルデヒド固定後グルタルアルデヒド固定

まで6時間放置した (Fig. 2a) が不十分なので、さらに時間を長くして24時間とした (Figs. 2b, 3)。そのため Figs. 2b, 3 の血小板とも細胞膜の保持は良くなかった。Fig. 2b の四酸化オスミウム後固定をした血小板は細胞質内に微細顆粒状の物質が多量に詰って

たが、一方、Fig. 3 の四酸化オスミウム未固定の血小板には微細顆粒状物は少量で、細胞骨格が網目状や細糸状に観察された。この相違は四酸化オスミウムが血小板内細胞骨格を破壊したことによると考えられる。したがってレプリカ作製に用いた血小板には四酸化オスミウム固定を行わなかった。

血小板を機械的に2分割し、レプリカ膜を作製することにより、細胞膜裏面と細胞骨格との結合様式を3次的に検索した。Fig. 4 は細胞膜細胞質側を観察できるレプリカ写真である。細胞膜裏面に接して走るマイクロフィラメントが認められ、直径は約 8nm で表面は平滑であった。マイクロフィラメントは互いに約 120° の角度をなし、細胞膜裏面上に六角形、一部に五角形の混在する幾何学模様を形成していた。多角形の1辺の長さは 0.1-0.5 μ m であり、おのおの頂点に集まる3本のマイクロフィラメントは互いに接着してより太い細線維束となり細胞質側へ立ち上がっていた。これらの細線維束の直径は約 15nm で表面は粗であり、互いに結合と解離を繰り返すことにより細胞質内に網目状構造を形成していた。

細胞膜裏面のマイクロフィラメントによる幾何学模様は主に六角形により構成されていたが、所々に五角形が混在していた (Fig. 5)。五角形に隣接する多角形はほとんど六角形であったが、五角形と五角形との隣接も認められた。

血小板2分割時に、細胞膜のみが除かれ、その細胞膜直下に局在する細胞骨格構築が観察できることがあった (Fig. 6)。非活性化血小板細胞膜直下にマイクロフィラメントによる多角形が存在し、さらに深部の細胞質内に形成された網目状構造に移行していることがステレオ写真で明瞭に示された。なお、通常の超薄切片による電子顕微鏡写真で確認された分泌顆粒は、いずれのレプリカ写真でもほとんど観察されなかった。

以上の結果を Fig. 7 で模式図に示した。Fig. 7a は立ち上がる細線維束を多角形頂点付近で切断して、細胞膜裏面に付着する六角形、五角形による亀甲状の幾何学模様を明瞭に示し、また、Fig. 7b はそれらの多角形より立ち上がる細線維束が細胞質内で網目状構造を形成している像を示している。

IV 考 察

本研究の結果から、非活性化血小板細胞膜裏面にはマイクロフィラメントによる六角形、一部に五角形の

混在する幾何学模様が存在し、その多角形頂点から細線維束が立ち上がって細胞質内に網目状構造を形成していることが明らかになった。

これらの所見を明らかにするためには、最初に非活性化血小板を分離する方法が重要であった。血小板は物理的刺激⁹⁾¹⁵⁾、低温¹⁵⁾²⁰⁾³³⁾、カルシウムイオン³²⁾³⁴⁾ や種々の薬品²⁹⁾³⁵⁾ により容易に活性化されることはよく知られている。そのためクエン酸溶液や EDTA 溶液などのキレート剤含有溶液を用いてカルシウムイオンを除き、溶液を 37°C に温めて実験したり、さらにブドウ糖含有溶液中で30分以上放置したりして活性化を防いできた⁹⁾¹⁵⁾¹⁷⁾。しかし、以上の処理方法のみでは遠沈時での血小板活性化を十分に止めることが不可能であるため、さらにプロスタサイクリン¹⁵⁾¹⁷⁾、アスピリン³⁶⁾³⁷⁾ やサイトカラシン⁵⁾¹³⁾¹⁶⁾³⁸⁾ を溶液に加えて実験している。

本研究においては一般的な血小板活性化阻止剤を使用せず、採血後速やかにパラホルムアルデヒドで固定することにより血小板活性化を止めることができた。パラホルムアルデヒドは浸透性が良いため、血小板は活性化する以前に固定されたと考えられる。また、パラホルムアルデヒド単独固定で血小板を2分割すれば、細胞質内可溶性蛋白質を除去することができる利点もあった。このことは Figs. 2, 3 でも確認することができた。血小板はパラホルムアルデヒド固定後グルタール固定まで長時間溶液 D で放置すると、細胞質内可溶性蛋白質の一部が除去され、細胞膜や細胞質内に疎になり超薄切でも細胞骨格が観察できるようになったと考えられる。一方、グルタールアルデヒドで固定すると可溶性蛋白質がゲル状になり除去することができなくなる³⁹⁾。したがって2分割前にパラホルムアルデヒド単独固定することは、血小板活性化阻止と血小板内可溶性蛋白質除去のために有用であった。

血小板細胞膜と細胞骨格との結合は、従来より示唆されてきたが、3次的結合様式を観察した報告はなかった。本研究ではその結合様式を直接電子顕微鏡学的に検索することができた。マイクロフィラメントが細胞膜裏面に一点で付着しているのではなく、その縦軸方向に側面で付着しているということは細胞膜との結合を強くしていると考えられる。さらにマイクロフィラメントが互いに多角形を形成し付着することにより、血小板活性化に伴う形態学的変化に対して細胞膜を急速に変化させることができると思われる。一方、細胞質内に局在する分泌顆粒がいずれのレプリカ写真

でもほとんど確認できなかったのは、血小板2分割後洗浄することにより除去されたため、非活性化状態では分泌顆粒と細胞骨格との結合が疎である可能性がある。

細胞膜裏面に存在するマイクロフィラメントによる多角形幾何学模様の中で6角形間の所々に5角形が散在する意義は、6角形のみでは球面に付着することは難しいが、所々に5角形が加わればその付着が容易になるためであり、円盤形をした非活性化血小板細胞膜の曲面付着には5角形が必要であると考えられる。一方、このような6角形と5角形の組み合わせは、クラスリン被覆小胞のクラスリン構築が良く知られている⁴⁰⁾⁴¹⁾。本研究でこの組み合わせが血小板細胞膜裏面の細胞骨格構築にも見られたため、他の細胞内にもこのような多角形構造が曲面を形成する膜構造の裏打ちとして、細胞機能と密接に関係し存在する可能性が示唆される。また、この多角形構築が曲面を形成する膜構造の裏打ちとして、他の細胞にも見出されれば、被覆小胞や血小板細胞膜裏面に観察された亀甲状の幾何学模様も含めて、亀甲状膜骨格(tortoise shell pattern membrane skeleton)と総称することができると思われる。

細胞膜裏面の細胞骨格裏打ち構造については、従来より赤血球について詳細に検索されてきた。赤血球ではスペクトリンがアクチン細糸とともに裏打ち構造を形成して形態保持をしていることが知られている⁴²⁾⁴³⁾。最近、血小板にも免疫学的に赤血球スペクトリン抗体と反応を示す蛋白質が存在することが報告された⁴⁴⁾、その量は少量であり、細胞骨格の主成分にはなり得ない。本研究で認められた血小板裏面に付着するマイクロフィラメント構成蛋白質の同定が、今後重要な問題となるが、直径が約8nmであり、すでに生化学的に報告されているように血小板細胞膜細胞骨格にはアクチン蛋白質が最も豊富に存在することから²²⁾、アクチン細糸である可能性が強い。また、細胞質内に網目状や細糸状に観察された細胞骨格(Fig. 3)は、四酸化オスミウム固定により切断されて微細顆粒状になった(Fig. 2b)ので、アクチン細糸により主に構成されていると考えられる¹⁷⁾⁴⁵⁾⁴⁸⁾。

また、細胞膜と細胞骨格との接着にはアクチン蛋白質以外にミオシン、ゲルソリン、 α -アクチニン、ビンクリンなどのアクチン結合蛋白質も関与していると考えられる¹⁶⁾。したがって本研究で観察された幾何学模様を形成するマイクロフィラメントのアクチン以外の

構成蛋白質成分を同定することは重要であり、種々の抗体を用いて現在検索中である。

さらに細胞骨格が細胞膜に結合する場合、細胞膜糖蛋白質との結合が考えられる。活性化血小板のアクチン細糸は糖蛋白質 IIb-III_b 複合体と結合すると報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾⁴⁹⁾。しかし、非活性化血小板の細胞骨格が糖蛋白質 I_b⁵⁰⁾、I_b⁴⁹⁾⁵¹⁾と結合しているという生化学的報告以外、非活性化状態でアクチン細糸が直接糖蛋白質と結合しているという報告はほとんどない。一方、これらの細胞膜糖蛋白質の異常や欠損がある先天性血小板活性化異常症として Bernard-Soulier 症候群や Glanzmann's thrombasthenia などが知られている³¹⁾⁵²⁾。これら疾患の血小板活性化異常はこれまで糖蛋白質のレセプター部位の異常や欠損によるものと報告されている。しかし、レセプターの異常だけではこれらの疾患で見られる非活性化状態での血小板の形態異常が説明できない。したがって細胞膜糖蛋白質と細胞骨格との結合の異常や不全があり、それによって血小板形態異常が現れるのではないかと考えられる。本研究の方法をこれら疾患の血小板に応用し、細胞膜と細胞骨格との結合様式を検索することは、これら疾患における活性化異常の機構解明に役立つと思われる。

V 結 語

機械的に2分割した非活性化ヒト血小板に急速凍結、ディープエッチングレプリカ法を応用し、細胞骨格の3次元的微細構造を電子顕微鏡学的に検討した結果、以下の結論を得た。

1 非活性化血小板細胞膜裏面にはマイクロフィラメントによる6角形、一部に5角形の混在する多角形の幾何学模様が存在し、血小板機能に深く関与していると考えられる。また、このような構造を亀甲状膜骨格(tortoise shell pattern membrane skeleton)と総称することを提唱した。

2 非活性化血小板細胞質内では細胞膜裏面上の多角形頂点で3本のマイクロフィラメントが接合し立ち上がり、太い細線維束となり、互いに結合や解離を繰り返して網目状構造の細胞骨格を形成している。この細線維束は分泌顆粒と強い結合をしていないと考えられる。

本研究の要旨は第90回日本解剖学会総会(昭和60年4月、博多)において発表した。

稿を終わるに当たり、御指導、御校閲を賜りました いたします。
当教室の永田哲士教授、大野伸一助教授に深く感謝い

文 献

- 1) Korn, E.D. : Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (A review). *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 588-599, 1978
- 2) Zucker-Franklin, D. : The submembranous fibrils of human blood platelets. *J Cell Biol*, 47 : 293-299, 1970
- 3) Nachmias, V., Sullender, J. and Asch, A. : Shape and cytoplasmic filaments in control and lidocaine-treated human platelets. *Blood*, 50 : 39-53, 1977
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Zobel, C.R. and Manuel, H. : The platelet reticular network¹. *J Ultrastruct Res*, 89 : 89-97, 1984
- 7) 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
- 8) Gonnella, P.A. and Nachmias, V.T. : Platelet activation and microfilament bundling. *J Cell Biol*, 89 : 146-151, 1981
- 9) Nachmias, V.T. : Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J Cell Biol*, 86 : 795-802, 1980
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Casella, J.F., Flanagan, M.D. and Lin, S. : Cytochalasin D inhibits actin polymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature*, 293 : 302-305, 1981
- 14) Davies, G.E. and Palek, J. : The state of actin polymerization in tetracaine-treated platelets. *Thromb Haemost*, 48 : 153-155, 1982
- 15) 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
- 16) 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 Publishing Co., New York, 1985
- 17) Boyles, J., Fox, J.E.B., Phillips, D.R. and Stenberg, P.E. : Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelet : Preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage. *J Cell Biol*, 101 : 1463-1472, 1985
- 18) 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
- 19) 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

- 20) Pribluda, V. and Rotman, A. : Dynamics of membrane-cytoskeleton interactions in activated blood platelets. *Biochemistry*, 21 : 2825-2832, 1982
- 21) 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
- 22) Davies, G.E. : Association of actin with the platelet membrane. *Biochim Biophys Acta*, 772 : 149-160, 1984
- 23) Phillips, D.R. and Agin, P.P. : Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest*, 60 : 535-545, 1977
- 24) 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
- 25) Büechi, M. and Bächli, T. : Immunofluorescence and electron microscopy of the cytoplasmic surface of the human erythrocyte membrane and its interaction with Sendai virus. *J Cell Biol*, 83 : 338-347, 1979
- 26) Heuser, I.E. and Kirschner, M.W. : Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell Biol*, 86 : 212-234, 1980
- 27) Jehl, B., Bauer, R., Dörge, A. and Rick, R. : The use of propane/isopentane mixtures for rapid freezing of biological specimens. *J Microsc*, 123 : 307-309, 1981
- 28) White, J.G. : Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. *Blood*, 31 : 604-622, 1968
- 29) White, J.G. : Exocytosis of secretory organelles from blood platelets incubated with cationic polypeptides. *Am J Pathol*, 69 : 41-53, 1972
- 30) 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
- 31) Zucker, M.B. : The functioning of blood platelets. *Sci Am*, 242 : 70-89, 1980
- 32) 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
- 33) Bennett, W.F. and Lynch, G. : Low-temperature induction of calcium-dependent protein phosphorylation in blood platelets. *J Cell Biol*, 86 : 280-285, 1980
- 34) Fox, J.E.B., Reynolds, C.C. and Phillips, D.R. : Calcium-dependent proteolysis occurs during platelet aggregation. *J Biol Chem*, 258 : 9973-9981, 1983
- 35) Phillips, D.R. : Receptors for platelet agonists. In : George, J.N., Nurden, A.T. and Phillips, D.R. (eds.), *Platelet membrane glycoproteins*, pp.145-169, Plenum Publishing Co., New York, 1985
- 36) Smith, J.B. and Willis, A.L. : Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature New Biology*, 231 : 235-237, 1971
- 37) Brass, L.F. and Shattil, S.J. : Changes in surface-bound and exchangeable calcium during platelet activation. *J Biol Chem*, 257 : 14000-14005, 1982
- 38) Fox, J.E.B. and Phillips, D.R. : Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. *Nature*, 292 : 650-652, 1981
- 39) Pearse, A.G.E. : *Histochemistry theoretical and applied*, Vol. 1 : Preparative and optical technology. 4th ed., pp.101-103, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, 1980
- 40) Pearse, B.M.F. : Clathrin : A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73 : 1255-1259, 1976
- 41) Crowther, R.A. and Pearse, B.M.F. : Assembly and packing of clathrin into coats. *J Cell*

- Biol, 91 : 790-797, 1981
- 42) Marchesi, V.T. : The red cell membrane skeleton : Recent progress. *Blood*, 61 : 1-11, 1983
 - 43) Bennett, V. : The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann Rev Biochem*, 54 : 273-304, 1985
 - 44) Davies, G.E. and Cohen, C.M. : Platelets contain proteins immunologically related to red cell spectrin and protein 4.1. *Blood*, 65 : 52-59, 1985
 - 45) Maupin-Szamier, P. and Pollard, T.D. : Actin filament destruction by osmium tetroxide. *J Cell Biol*, 77 : 837-852, 1978
 - 46) Boyles, J. and Bainton, D.F. : Changing patterns of plasma membrane-associated filaments during the initial phases of polymorphonuclear leukocyte adherence. *J Cell Biol*, 82 : 347-368, 1979
 - 47) Small, J.V. and Langanger, G. : Organization of actin in the leading edge of cultured cells : Influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J Cell Biol*, 91 : 695-705, 1981
 - 48) Boyles, J., Anderson, L. and Hutcherson, P. : A new fixative for the preservation of actin filaments : Fixation of pure actin filament pellets. *J Histochem Cytochem*, 33 : 1116-1128, 1985
 - 49) Clemetson, K.J. : Glycoproteins of the platelet plasma membrane. In : George, J.N., Nurden, A.T. and Phillips, D.R. (eds.), *Platelet membrane glycoproteins*, pp.51-85, Plenum Publishing Co., New York, 1985
 - 50) Rotman, A., Heldman, J. and Linder, S. : Association of membrane and cytoplasmic proteins with the cytoskeleton in blood platelets. *Biochemistry*, 21 : 1713-1719, 1982
 - 51) Solum, N.O. and Olsen, T.M. : Glycoprotein Ib in the Triton-insoluble (cytoskeletal) fraction of blood platelets. *Biochim Biophys Acta*, 799 : 209-220, 1984
 - 52) 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

(61. 7. 12 受稿)