

Review Article

マイクロパーティクル産生からみた sepsis の病態解明

藤見 聡, 小倉裕司, 康 泰珍, 藤田希恵子, 角 由佳, 中森 靖,
塩崎忠彦, 鎌方安行, 田中 裕, 嶋津岳士, 杉本 壽

大阪大学医学部附属病院 高度救命救急センター

The orchestration of microparticle formations: a novel mechanism in the pathophysiology of sepsis

Leukocytes, platelets, and endothelial cells appear to co-activate and interact in areas of vascular injury following severe insult. Leukocyte adhesion to endothelium, a pivotal event in the host defense mechanism and repair of tissue damage, has been shown to induce vascular and tissue injury in sepsis. Microparticles (MPs) have been recently detected as vesicles that are shed from various kinds of activated cells, and they have specific membrane components. MPs originated from polymorphonuclear leukocytes (PMNLs), platelets, and endothelial cells were discovered *in vitro* by recently developed flow cytometric methods. PMNL-derived MPs have been recently found to be activators of vascular endothelium *in vitro*. Levels of platelet-derived MPs have been shown to be elevated in various conditions including unstable angina, diabetes, and post cardiac surgery. Endothelial cell-derived MPs are increased in patients with a coagulation abnormality characterized by the presence of lupus anticoagulant and in patients with acute coronary syndrome.

These MPs are considered to activate other cells and to perhaps play a novel role in the pathogenesis of various diseases. The precise role of these MPs, however, has not been clarified in patients with sepsis. We developed a flow cytometric method for detecting these MP formation and quantitatively evaluating them in patients with sepsis. The production of each MP was significantly increased and the interaction between these MPs and other inflammatory cells was enhanced in the patients.

This review will provide an overview of our current understanding of PMNL-, platelet- and endothelial cell-derived MPs and their orchestration in sepsis patients.

Rec.6/4/2003, Acc.11/6/2003, pp18-26

Satoshi Fujimi, Hiroshi Ogura, Taichin Koh, Kieko Fujita, Yuka Sumi, Yasushi Nakamori, Tadahiko Shiozaki, Yasuyuki Kuwagata, Hiroshi Tanaka, Takeshi Shimazu, and Hisashi Sugimoto

Departments of Traumatology and Clinical Investigation, Osaka University Medical School

Key words マイクロパーティクル, sepsis, 細胞間結合, 多核白血球, 血小板, 血管内皮

はじめに

Sepsisにおける臓器障害の進行には全身性の血管内皮傷害が関与しており, 近年その主たる原因は血管内皮上での凝固・線溶のアンバランスと接着因子を介した血管内皮, 多核白血球, 血小板相互の活性化と考えられている¹⁾. Sepsisに伴い産生されるTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインは, 血管内皮細胞からのPAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) 産生を増加させ^{2, 3)}, 逆にthrombomodulinやheparan sulfate産生を減少させる^{4, 5)} 作

用を有し, 血管内皮細胞上での凝固・線溶バランスを凝固優位に崩して血管内皮を活性化する. また, 炎症性サイトカインによって活性化された多核白血球は, 接着因子を介して血管内皮細胞に接着し, プロテアーゼや活性酸素を産生して血管内皮傷害を引き起こす⁶⁻⁹⁾. 逆に炎症性サイトカインによって刺激され活性化された血管内皮細胞からは, GM-CSF, PAFなどのchemical mediatorsが産生され, 多核白血球が活性化されることも*in vitro*で指摘された¹⁰⁾. さらに, 活性化された血小板が直接多核白血球

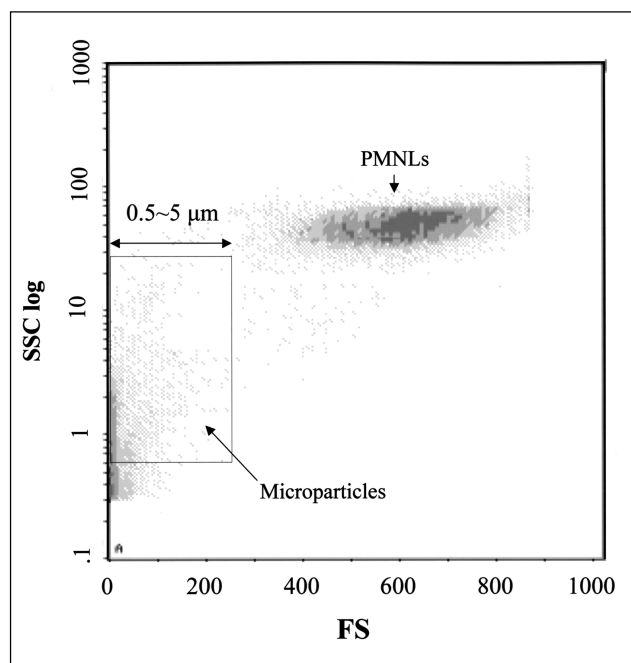


図1 Sepsis患者における多核白血球MPのフローサイトメトリー解析

FS(forward scatter)値とSSC(side scatter)値の小さいPMNLの膜成分を持ったPMNLとは明らかに異なる小胞集団が認められる。大きさ0.5~5.0 μm の集団をMPとして測定した。

や血管内皮に接着して多核白血球の活性化や血小板血栓形成に関与する現象が*in vitro*や動物モデルでとらえられた^{11,12)}。Sepsisの病態においても、血管内皮、多核白血球、血小板が互に相互作用によって全身性炎症反応、臓器障害を進行させるのか、メカニズムの詳細な解明が期待されている。

近年活性化された種々の細胞が、おのおの独自の膜成分を持った小胞であるマイクロパーティクル (MP) を産生し、細胞相互間の活性化に関わる可能性が注目されている¹³⁻¹⁷⁾。特に白血球、血小板、血管内皮の各MPの産生は、フローサイトメトリー法によって測定が可能となり、種々の炎症反応におけるMPの関与が*in vitro*研究の結果をもとに検討されている¹⁸⁻²⁵⁾。しかしながら、臨床患者におけるMP産生の報告は少なく、多核白血球、血小板、血管内皮細胞の活性化が引き起こされるsepsis患者においても各MP産生の動態とその役割は明らかになっていない。本稿では重症sepsis患者におけるMP産生の動態を総括的に検討し、MPと多核白血球、血小板、血管内皮細胞の相互作用を中心に述べる。

Sepsis患者における多核白血球MP産生

活性化された多核白血球は、sepsisなどの侵襲に伴う生

体反応において生体防御と組織障害の両面の役割を担う。Mehdiらは、健康人の血液中に多核白血球MPが存在することを初めて明らかにした¹⁸⁾。同時に*in vitro*で白血球の走化因子であるFMLP (formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) 刺激により産生された多核白血球MPが、HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) のIL-6 mRNA発現を有意に増加させることから、血管内皮細胞の活性化に多核白血球MPが関与する可能性を示した。また、Watanabeらはlipopolysaccharide刺激によって健康人の多核白血球が活性化されると小胞形成がみられ、MPとして放出されることを示し、calpeptinでMP産生を抑制するとPAF産生も抑えられることから、多核白血球MPがPAFの重要な供給源であることを指摘した²⁶⁾。さらにRauchらは、*in vitro*で血液にTNF- α を添加すると、多核白血球や単球由来のMPがtissue factorを血小板に運び、血小板の活性化を介して凝固亢進を引き起こすことを報告した²⁷⁾。以上のように、多核白血球MPの多彩な働きが*in vitro*では証明されているが、sepsis患者における多核白血球MP産生の報告はみられない。

当センターにおいてsepsisの診断基準を満たし、血清CRP値が10mg/dl以上の21症例において、①MP産生(無刺激およびFMLP刺激下)、②MP表面に発現している接着因子のCD11b、③白血球機能としての活性酸素産生能(無刺激およびFMLP刺激下)をフローサイトメトリーにより測定した^{19,20)}。また、同時に④血液中Eセレクトリン、トロンボモデュリン、好中球エラスターゼを測定した。各症例の内訳は、壊死性筋膜炎7例、肺炎4例、腹膜炎、熱傷が3例ずつ、髄膜炎、縦隔炎が2例ずつであった。

MPの測定方法を示す。ヘパリン下採血後、比重遠心法にて多核白血球を分離し、分離した多核白血球をフローサイトメトリー法で解析した。Forward Scatter (FS) 値、Side Scatter (SSC) 値からPMNLより明らかに小さい小胞集団が認められた(図1)。小胞集団は細胞膜標識であるPKH26と多核白血球にのみ存在するCD抗原であるCD16bが、ともに陽性であり、多核白血球由来のMPと考えられた。フローサイトメトリー法で無刺激状態とFMLP刺激下で多核白血球MP数を測定した。刺激は分離した多核白血球に対して 10^{-7}mol/L のFMLPを37°Cで15分間反応させた。CD11b発現はMPの大きさにより1 μm 以下のものと1 μm 以上のものに分け、それぞれ蛍光強度を測定した。活性酸素産生能は、多核白血球に取り込まれたDCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate) が産生された活性酸素により蛍光を発するDCFに変化する際の蛍光強度として測定し、無刺激状態とFMLP刺激(FMLP 10^{-7}mol/L , 37°Cで15分間の反応時間)に分けて評価した。

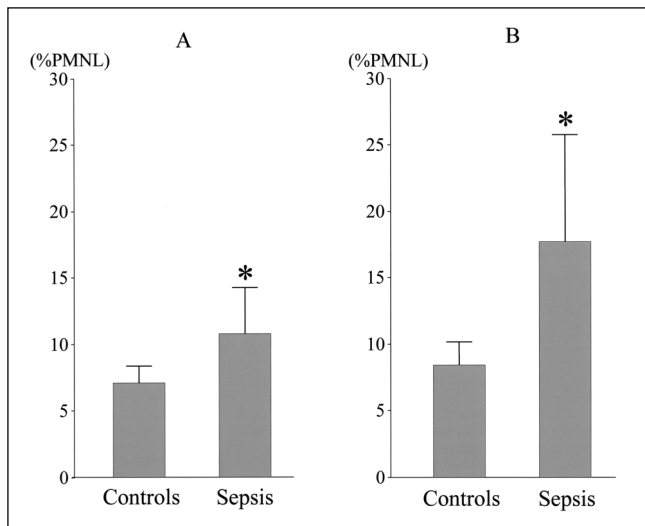


図2 多核白血球 MP 産生

多核白血球数に対するMP産生数の割合をパーセントで示した(%PMNL)。

A:無刺激状態でのMP産生の結果

B:FMLP(formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)刺激下でのMP産生

mean $\pm$ SD *: $p < 0.05$ vs. healthy controls

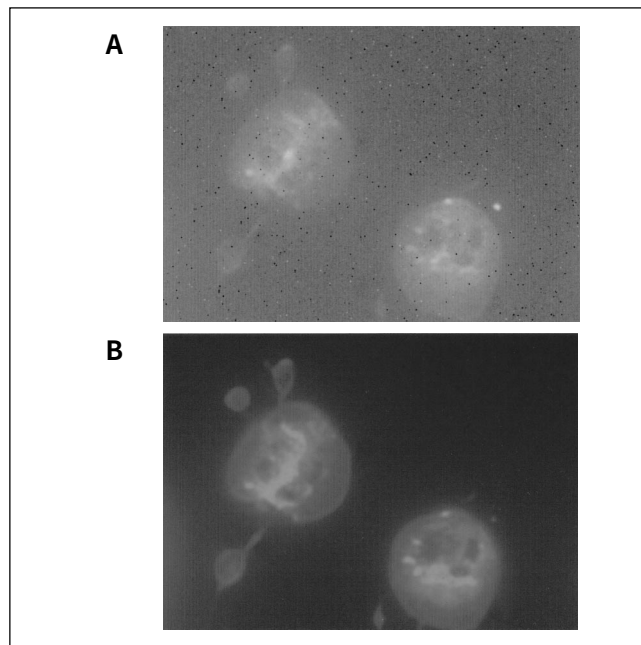


図3 蛍光顕微鏡でとらえた MP 像

多核白血球から複数のMPが産生されている。

A: FITC-labeled anti-CD16b monoclonal antibody staining (green fluorescence).

B: PE-labeled PKH-26 staining (red fluorescence)

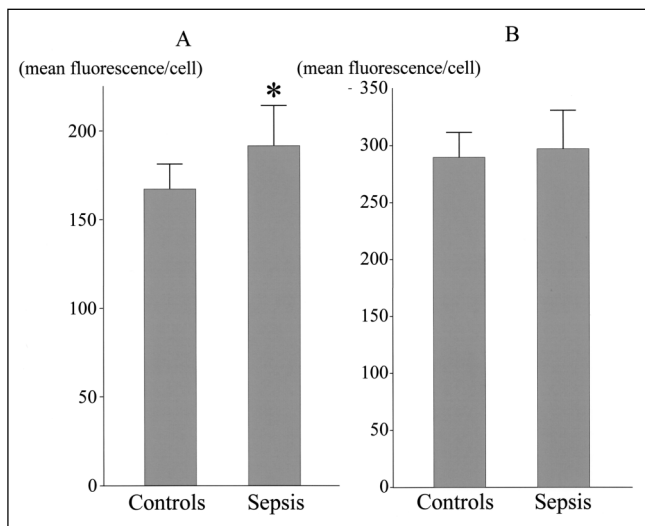


図4 MP 表面の CD11b 発現の結果

A:microparticle size $\leq 1.0 \mu\text{m}$

B:microparticle size $> 1.0 \mu\text{m}$

mean $\pm$ SD. *: $p < 0.05$ vs. healthy controls

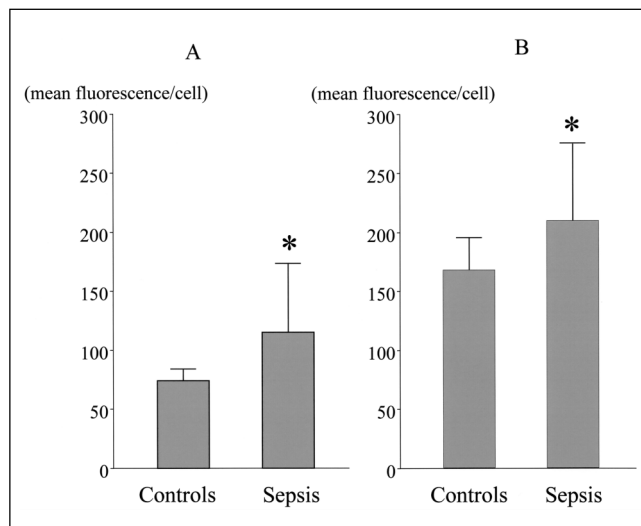


図5 多核白血球機能としての活性酸素産生能の結果

A:無刺激状態

B:FMLP刺激

mean $\pm$ SD. *: $p < 0.05$ vs. healthy controls

図2に示すように多核白血球MP産生は健康人に比べて無刺激, FMLP刺激ともに有意に増加していた。図3に蛍光顕微鏡でとらえたMP像を示す。MP表面上の接着因子であるCD11b発現の結果を図4に示す。1 μm 以上の大きさを持つMP表面のCD11bは、健康人と比べて優位な増加は認められなかったものの、1 μm より小さいMP表面

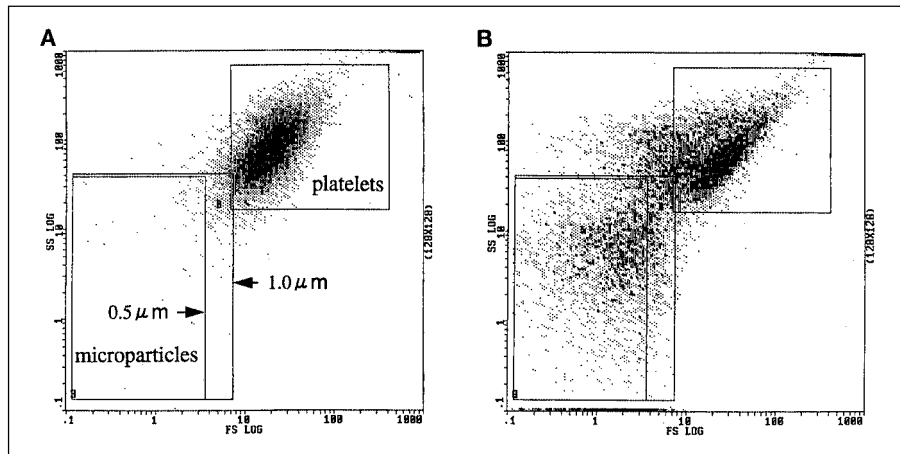
のCD11b発現はsepsis患者において有意に増加していた。以上より、1 μm より小さいMPは接着因子を豊富に発現することが明らかになった。

多核白血球の活性化の指標としてPMNLの活性酸素産生能の結果を図5に示す。Sepsis患者において無刺激, FMLP刺激とも有意に多核白血球は活性化されていた。し

表 Soluble E-selectin, Thrombomodulin, and PMNL Elastase Levels in Blood

	Soluble E-selectin (ng/ml)	Thrombomodulin (U/ml)	PMNL Elastase (μg/ml)
Sepsis	103 ± 66	18.8 ± 10.5	255 ± 158
Normal values	46 ± 17	8.9 ± 3.0	57 ± 28

mean ± SD are shown

**図6 Sepsis患者における血小板MPのフローサイトメトリー解析**

1.0μmと0.5μmの標準ビーズを用いてFS値を決定した.大きさが0.5μm以下の集団をMPとして測定した.

A:無刺激 B:Ionomycin刺激

刺激後にMP産生が増加している

たがって, MP産生は活性化された多核白血球において有意に増加していると考えられた. 表に血中のEセレクトリン, トロンボモデュリン, 好中球エラスターゼの測定結果を示す. いずれの項目も sepsis 患者において増加しており, 多核白血球の活性化や血管内皮細胞障害が起こっていると考えられた.

以上の結果から, sepsis患者において活性化された多核白血球からのMP産生は亢進しており, 産生された1.0 μm以下のMP表面にはCD11bの発現が亢進していた. 生体内においてもMP表面の接着因子を介して血管内皮細胞が活性化される可能性が示唆された. MP産生のメカニズムに関しては, 多核白血球細胞内のcalpain機能を抑制することにより, 酸化ストレスや活性化刺激によるMP形成が抑えられることが報告されており, 今後細胞内signal transductionの面から検討が必要である²⁶⁾.

Sepsis患者における血小板MP産生

活性化された血小板は微小循環における凝固・線溶のアンバランスを介して組織障害や臓器障害の進行に重要な役割を果たしている. 血小板MPはWolfらによって発見され, 血管壁と血小板の接着に関与する重要な因子であることが報告された²⁸⁾. その後の臨床研究の知見として, 血小板MPが糖尿病, 不安定狭心症, 開心術後などの病態で有意に増加することが明らかになり, 関節リウマチにおいては血小板MPが炎症活動性の良い指標とな

ることが報告されている²¹⁾. また, 血小板MPはPAF (Platelet activating factor) を豊富に含み, 血小板, 単球, 血管内皮細胞とそれぞれ接着して存在することも示されており, 血小板MPが他細胞の活性化因子になる可能性が考えられる^{29,30)}. 実際, Nomuraらはhigh shear stressで活性化された血小板から産生されたMPが, *in vitro*で血管内皮細胞を活性化してCD54やCD63など接着因子の発現を増強させると同時に, IL-1β, IL-6, IL-8など炎症性サイトカインの産生を引き起こすことを示した³¹⁾. 以上のように, 血管内皮傷害においても血小板MPが一役を担う可能性があるが, sepsis患者における血小板MP産生の報告はみられない.

当センターにおいて sepsis の診断基準を満たし, 血清CRP値が10mg/dl以上の14例において, ①血小板MP産生(無刺激およびionomycin刺激), ②血小板表面に発現している接着因子(P-selectin;CD62p), ③血小板-多核白血球結合(無刺激, ionomycin刺激, P-selectinレセプターブロック後ionomycin刺激)をフローサイトメトリーにより測定した²³⁾. 各症例の内訳は, 肺炎7例, 壊死性筋膜炎, 髄膜炎, 腸炎がそれぞれ2例ずつ, 腹膜炎が1例であった.

MPの測定方法を簡単に示す. 血液検体にfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識の抗CD42a抗体を投与し, 無刺激状態ionomycin刺激下においてフローサイトメトリー法でCD42a陽性かつ血小板より明らかに小さい0.5 μm以下の小胞をMPとして測定した(図6). Ionomycin刺激は

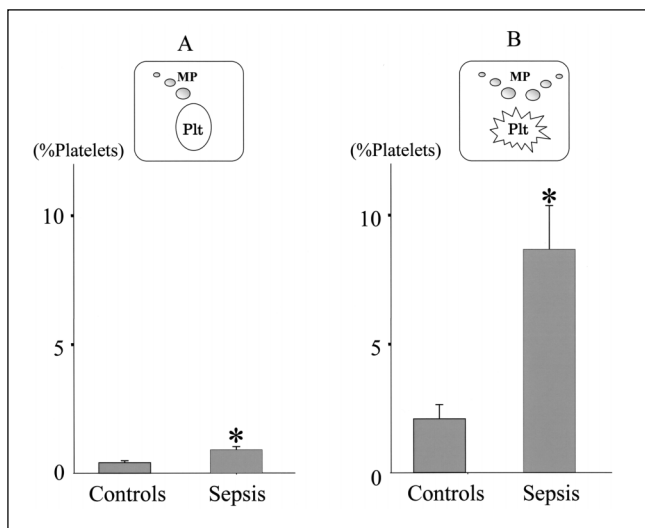


図7 血小板MP産生

血小板数に対するMP産生数の割合をパーセントで示した(% platelet)。

A:無刺激状態でのMP産生 B:ionomycin刺激下でのMP産生
mean ± SEM *:p<0.05 vs. healthy controls

8 µg/ml の ionomycin を加え、室温で 15 分間反応させた。血小板 P セレクチン発現は、phycoerythrin (PE) 標識抗 CD62p 抗体を使用し、フローサイトメトリーを用いてその蛍光強度を測定した。血小板-多核白血球結合は、白血球に結合している CD42a をフローサイトで解析することにより測定した。FITC 標識抗 CD42a 抗体をサンプルに加え ionomycin 刺激の有無で測定した。また、P セレクチンブロッカーを投与することにより血小板-多核白血球結合の変化を測定した。

図7に示すように、血小板MP産生は健康人に比べて無刺激、ionomycin刺激ともに有意に増加していた。血小板表面の接着因子である P-セレクチンの発現は健康人に比べ、sepsis 患者では無刺激、ionomycin 刺激ともに有意に増加した。血小板-多核白血球結合は、無刺激では有意差は認められなかったが、ionomycin 刺激において健康人に比べ、sepsis 患者の血小板-多核白血球結合は有意に増加していた。MP産生が亢進する活性化血小板は、自らも他細胞の活性化因子になりうることを示す。

図8はionomycin刺激下での血小板-多核白血球結合ならびにsepsis患者におけるPセレクチンブロッカー投与後の血小板-白血球結合の結果である。Sepsis患者においてPセレクチンブロッカー投与後に血小板-白血球結合は明らかに抑制されたことから、血小板-多核白血球結合にPセレクチンが関与していることが明らかとなった。

以上の結果から、sepsis患者において活性化された血小板のMP産生やPセレクチン発現は亢進しており、増強す

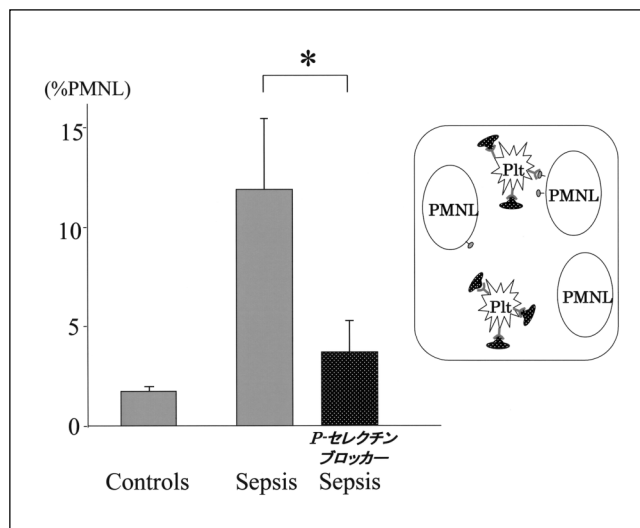


図8 Ionomycin刺激下での血小板-多核白血球結合ならびにsepsis患者におけるP-セレクチンブロッカー投与後の血小板-多核白血球結合

▽:P-セレクチン ●:P-セレクチンブロッカー
mean ± SEM *:p<0.05

る血小板-多核白血球結合に血小板表面のPセレクチンが関与していることが明らかとなった。MP産生のメカニズムに関しては、血小板上に発現する glycoprotein IIb/IIIa の拮抗剤を使用することにより shear stress 下のMP形成が抑えられること、calpain 活性を抑制することにより MP 産生が減少することなどが報告されており、両者の関連性など今後の検討が待たれる^{32, 33)}。

Sepsis患者における血管内皮MP産生

活性化された血管内皮細胞は侵襲時臓器障害の進行に不可欠な因子であるが、血管内皮MPは *in vitro* においてサイトカイン、トロンビン、calcium ionophoreなどの種々のagonistsにより活性化された血管内皮細胞から産生されることがHamiltonらによって報告された³⁴⁾。臨床患者では、急性冠動脈症候群、血栓性血小板減少性紫斑病や多発性硬化症などの症例で血管内皮MP産生の増加が認められており、病勢の判断に有用であることが示された^{22, 35, 36)}。Sabatierらは血管内皮MPが血管内皮細胞と同様に接着因子を表面に発現することから、血管内皮MPが“circulating endothelial compartment”として白血球との相互作用に関与する可能性を指摘している²⁴⁾。以上のように、血管内皮MPは内皮細胞の活性化や傷害の過程で産生される可能性があるが、sepsis患者における血管内皮MP産生の報告はみられない。

当センターにおいて sepsis の診断基準を満たし、血清CRP値が10mg/dl以上の12例において、①血管内皮MP産

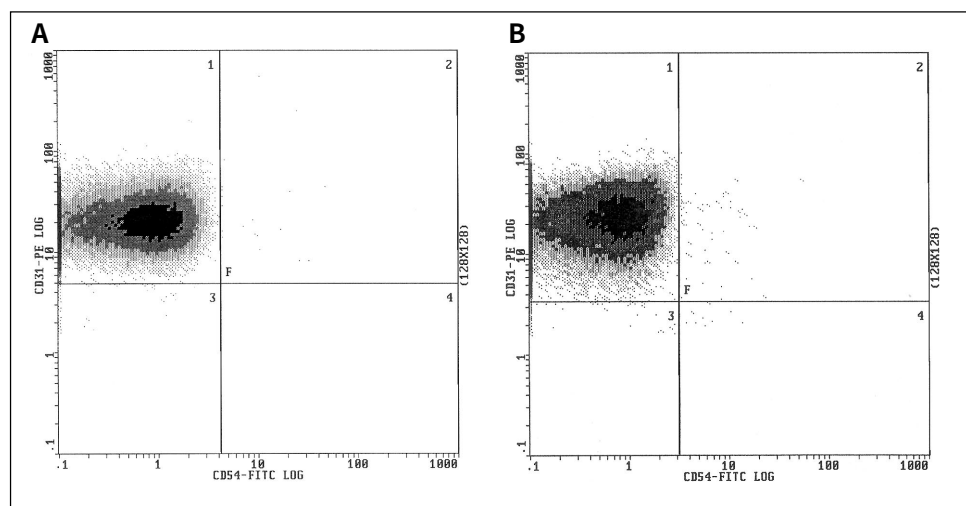


図9 血管内皮 MP のフローサイトメトリー解析
縦軸: PE標識抗CD31抗体
横軸: FITC標識抗CD54抗体
CD31(PCAM-1);血管内皮,血小板に存在するCD抗原
CD54(ICAM-1);血管内皮,多核白血球に存在するCD抗原
A: 健康人 B: sepsis

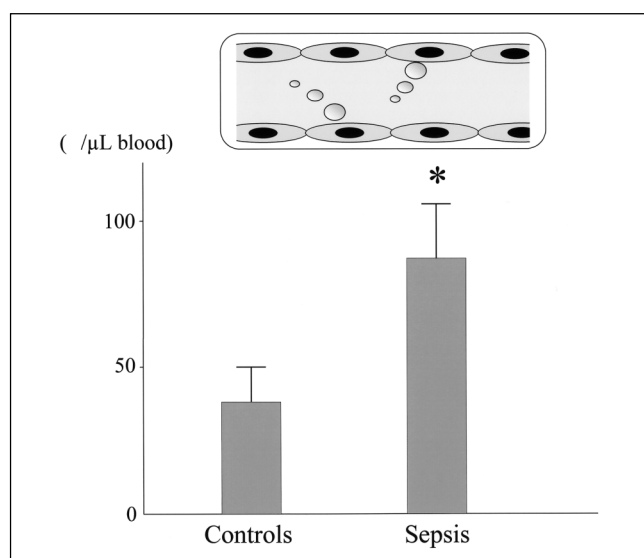


図10 血管内皮 MP 産生
mean $\pm$ SEM *: $p < 0.05$ vs. healthy controls

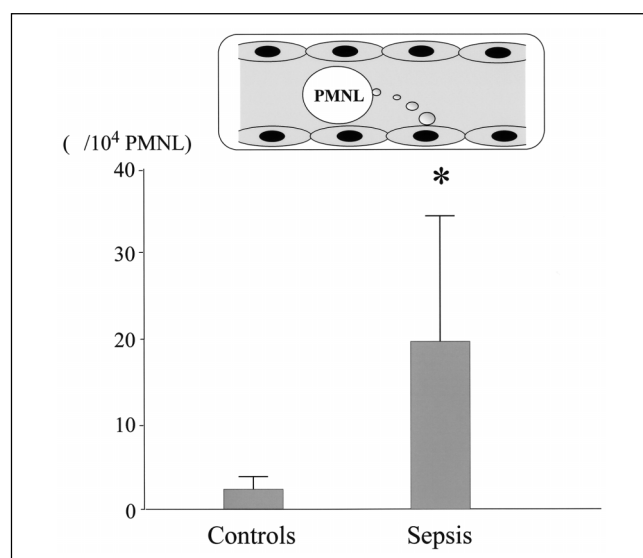


図11 血管内皮 MP-多核白血球結合
mean $\pm$ SEM *: $p < 0.05$ vs. healthy controls

生, ②血管内皮MP-多核白血球結合をフローサイトメトリーにより測定した²⁵⁾. ③血清E-セレクトリン, トロンボモデュリン, PAI-1も同時に測定した. 各症例の内訳は, 壊死性筋膜炎5例, 腹膜炎4例, 心内膜炎, 肺炎, 深在性真菌症がそれぞれ1例であった.

血管内皮MPは全血を用い, フローサイトメトリー法で抗CD31抗体と抗CD54抗体ともに反応する小胞集団として測定した(図9). 図10に示すように, 血管内皮MP産生は健康人に比べsepsis患者において有意に増加していた. 血管内皮MPと多核白血球間の結合を抗CD31抗体とCD62E(E-selectin)抗体を用いてフローサイトメトリーにより測定したところ, 血管内皮MP-多核白血球結合もsepsis患者において有意に増加していた(図11). 血中のEセレクトリン, トロンボモデュリン, PAI-1値も患者においていずれも増加しており, 血管内皮細胞の活性化や細

胞傷害が起こっていると考えられた.

以上の結果から, sepsis患者において活性化された血管内皮からのMP産生は亢進しており, 血管内皮MPの多核白血球への結合が増強していることが明らかとなった. MP産生のメカニズムに関しては十分な検討が行われていないが, 内皮細胞をTNF- α , mitomycin C, camptothecinなどのagonistsで刺激するとMP産生が増えること, その際アポトーシス細胞からのMP産生が多くみられること, などが指摘されており, 細胞死とMP産生との関連性も今後注目される^{37, 38)}.

まとめ

Sepsis患者において, 1) 活性化された多核白血球からのMP産生は亢進する. 1.0 μ m以下の多核白血球MP表面にはCD11bの発現が亢進しており, 接着因子の発現を

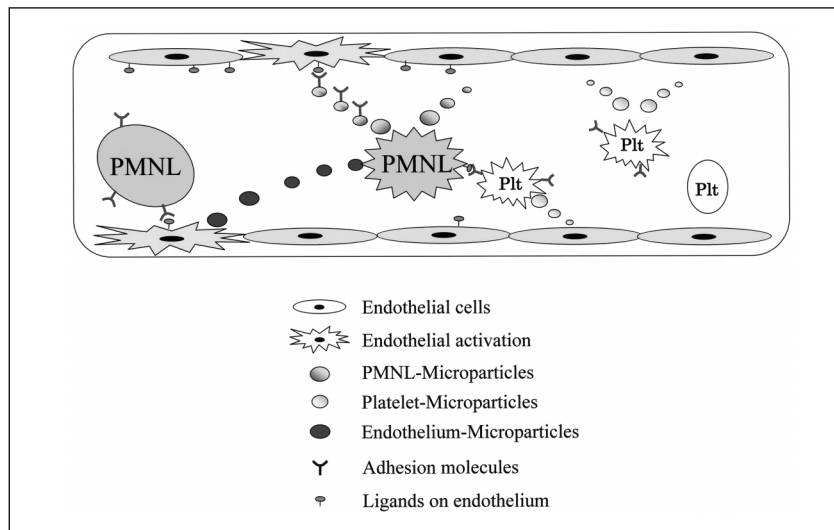


図 12 Sepsis 患者の血管内皮細胞障害進行における各 MP の関与

介して血管内皮を活性化することが考えられる。2) 活性化された血小板からの MP 産生は亢進する。血小板-多核白血球間の結合は増強しており、血小板表面の P-セレクトリンを介して血小板および血小板 MP が多核白血球の活性化、血管内皮接着に関与する可能性が考えられる。3) 活性化された血管内皮からの MP 産生は亢進しており、血管内皮 MP と多核白血球間の結合も増強する。

以上から重症 sepsis 患者において、活性化された多核白血球、血小板、血管内皮の MP 産生はいずれも亢進しており、細胞相互間の活性化を介して血管内皮傷害の進行に新たな一役を担う可能性がある (図 12)。今後 sepsis に伴う各 MP 産生と血管内皮傷害、臓器障害との関連を明らかにし、MP 産生の臨床的意義や臨床診断への応用をさらに検討する必要がある。

文 献

- 1) Aird W: Endothelial cell dynamics and complexity theory. *Crit Care Med*, 30: S180-S185, 2002.
- 2) Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA Jr, Loskutoff DJ: Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem*, 263: 5797-5803, 1988.
- 3) Van der Poll T, Levi M, Buller HR, van Deventer SJ, de Boer JP, Hack CE, ten Cate JW: Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subject. *J Exp Med*, 174: 726-732, 1991.
- 4) Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ, Platt JL: Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today*, 14: 500-505, 1993.
- 5) Moore KL, Enderson CT, Esmon NL: Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood*, 73: 159-165, 1989.
- 6) Sacks T, Moldow CF, Craddock PR, Bowers TK, Jacob HS: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. *J Clin Invest*, 61: 1161-1167, 1978.
- 7) Weiss SJ, Young J, LoBuglio AF, Slivka A, Nimeh NF: Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *J Clin Invest*, 68: 714-721, 1981.
- 8) Harlan JM: Leukocyte-endothelial interactions. *Blood*, 65: 513-525, 1985.
- 9) Harlan JM, Schwartz BR, Reidy MA, Schwartz SM, Ochs HD, Harker LA: Activated neutrophils disrupt endothelial monolayer integrity by an oxygen radical-independent mechanism. *Lab Invest*, 52: 141-150, 1985.
- 10) Takahashi T, Hato F, Yamane T, Fukushima H, Suzuki K, Ogita S, Nishizawa Y, Kitagawa S: Activation of human neutrophils by cytokine-activated endothelial cells. *Circ Res*, 88: 422-429, 2001.
- 11) Bonomini M, Stuard S, Carreno S, Settefrati N, Santarelli P, Haeffner-Cavaillon N, Albertazzi A: Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron*, 75: 402-411, 1997.
- 12) Andre P, Denis C, Ware J, et al: Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endot-

- helium in stimulated veins. *Blood* 96: 3322-3328, 2000.
- 13) Tocchetti E, Flower R, Lloyd J: Assessment of in vitro-generated platelet microparticles using a modified flow cytometric strategy. *Thromb Res*, 103: 47-55, 2001.
 - 14) Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M: Platelet microparticles: a carrier of platelet-activating factor? *Biochem Biophys Res Commu*, 218: 940-944, 1996.
 - 15) Mesri M, Altieri D: Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 274: 23111-23118, 1999.
 - 16) Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM: Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 153: 3245-3255, 1994.
 - 17) Combes V, Simon A, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F: In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*, 104: 93-102, 1999.
 - 18) Mehdi M, Dario C: Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*, 161: 4382-4387, 1998.
 - 19) Fujimi S, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hosotsubo H, Nakamori Y, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H: Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis. *J Trauma*, 52: 443-448, 2002.
 - 20) Fujimi S, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hosotsubo H, Nakamori Y, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H: The increased production of leukocyte microparticles with enhanced expression of adhesion molecules from activated polymorphonuclear leukocytes in severely injured patients. *J Trauma*, 54: 114-120, 2003.
 - 21) Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA: Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46: 1498-1503, 2002.
 - 22) Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS: Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol*, 112: 81-90, 2001.
 - 23) Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, Koh T, Tanaka R, Ozeki Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H: Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J Trauma*, 50: 801-809, 2001.
 - 24) Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F: Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*, 99: 3962-3970, 2002.
 - 25) Ogura H, Tanaka H, Koh T, Fujimi S, Nakamori Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H: Enhanced production of endothelial microparticles with increased binding to leukocytes in patients with severe SIRS. *J Trauma*, in press.
 - 26) Watanabe J, Marathe G, Neilsen P, Weyrich A, Harrison K, Murphy R, Zimmerman G, McIntyre T: Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem*, 278: 33161-33168, 2003.
 - 27) Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimann B, Himber J, Riederer M, Nemerson Y: Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15b and tissue factor. *Blood*, 96: 170-175, 2000.
 - 28) Wolf P: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 13: 269-288, 1967.
 - 29) Barry OP, Pratico D, Lawson JA: Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*, 99: 2118-2127, 1997.
 - 30) Barry OP, Pratico D, Savani RC: Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*, 102: 136-144, 1998.
 - 31) Nomura S, Tandon N, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J: High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*, 158: 277-287, 2001.
 - 32) Haga J, Slack S, Jennings L: Comparison of shear stress-induced platelet microparticle formation and phosphatidylserine expression in presence of alphaIIb beta3 antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol*, 41:363-371, 2003.
 - 33) Rendu F, Brohard-Bohn B, Pain S, Bachelot-Loza C, Auger J: Thiosulfates inhibit platelet aggregation and microparticle shedding at a calpain-dependent step. *Thromb Haemost*, 86: 1284-1291, 2001.
 - 34) Hamilton K, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ: Complement

- proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem*, 5: 3809-3814, 1990.
- 35) Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A: Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 101: 841-843, 2000.
- 36) Larkin M: Raised endothelial microparticles an early marker for multiple sclerosis? *Lancet*, 357: 1679, 2001.
- 37) Jimenez J, Mauro L, Ahn Y, Newton K, Mendez A, Arnold P, Schultz D: Agonist-induced capping of adhesion proteins and microparticle shedding in culture of human renal microvascular endothelial cells. *Endothelium*, 9: 179-189, 2002.
- 38) Simak J, Holada K, Vostal J: Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol*, 3: 11, 2002.