Validity of Particle-Counting Method Using Laser-Light Scattering for Detecting Platelet Aggregation in Diabetic Patients

Hiromichi Nakadate Non-member (Graduate School of Science and Technology, Keio University)

Eiichi Sekizuka Non-member (Internal Medicine, National Hospital Organization, Saitama Hospital)

Haruyuki Minamitani Member (Graduate School of Science and Technology, Keio University)

Keywords : light scattering, particle counting method, platelet aggregation, diabetes

Today, our population of diabetic patients and diabetic patients-to-be is increasing year by year, and diabetic thrombotic complications such as myocardial infarction, stroke, and retinopathy have accordingly become social issues. Chronic hyperglycemia in diabetes causes various hemorheological abnormalities. One of these abnormalities is platelet hyperaggregation, which is a key marker of diabetic thrombotic complications. Therefore, the early detection of platelet hyperaggregation is of the utmost importance if we are to understand the pathogenesis of diabetic thrombotic complications and prevent their development. Among the methodologies for measuring platelet aggregation, a particle-counting method that uses laser-light scattering has recently been developed. Although several studies have used this method to investigate platelet hyperaggregation in diabetic patients, aggregation in some diabetic patients cannot be differentiated from that in healthy controls by the established analytical approach. Hence we aimed to study the validity of a new analytical approach that reflected the phase from platelet activation to the formation of small platelet aggregates. We hoped that this new approach would enable us to use the particle-counting method with laser-light scattering to measure platelet aggregation in healthy controls and in diabetic patients without complications.

We used a laser-light scattering particle analyzer (LSPA), in which platelet-rich plasma in a glass cuvette was irradiated with a laser beam with a wavelength of 675 nm and side-scattered light from platelet aggregates was detected. The size and number of platelet aggregates were then evaluated from the detected scattered light intensity (SLI). The glass cuvette was kept at 37 ± 0.5 °C, and platelet-rich plasma (PRP) was mixed by a stirrer during the experiments. We measured spontaneous platelet aggregation and agonist (adenosine diphosphate (ADP), epinephrine, or collagen)-induced platelet aggregation for 10 min by using LSPA. Agonists were added to the PRP 1 min after measurement started. Platelet aggregates were classified as small, medium, and large

according to their SLIs. To measure spontaneous platelet aggregation the total SLI from small aggregates over a 10-min period was compared among healthy controls, diabetic patients with $\text{HbA}_{1c} < 6.5\%$, and diabetics with $\text{HbA}_{1c} \geq 6.5\%$. To measure agonist-induced platelet aggregation the total SLI from small aggregates over a 10-min period (established analytical approach) and that over a 2-min period from 1 to 3 min after the initiation of measurement (new analytical approach) were compared among healthy controls, diabetic patients with $\text{HbA}_{1c} < 6.5\%$, and diabetics with $\text{HbA}_{1c} \geq 6.5\%$. In clinical studies it has been reported that diabetic patients with $\text{HbA}_{1c} \geq 6.5\%$ are at risk of developing diabetic complications.

In the measurement of spontaneous platelet aggregation, platelet aggregation in diabetic patients with $\text{HbA}_{1c} \geq 6.5\%$ was significantly greater than in healthy controls, but there was no significant difference in aggregation rates between healthy controls and diabetic patients with $\text{HbA}_{1c} < 6.5\%$. In the measurement of agonist-induced platelet aggregation the results obtained by the established analytical approach did not differ from the above spontaneous platelet aggregation results. However, use of the new analytical approach revealed that platelet aggregation in all diabetic patients was significantly greater than in healthy controls (Table 1).

In summary, neither spontaneous platelet aggregation nor agonist-induced platelet aggregation, as measured by the established analytical approach, could be differentiated between healthy controls and diabetic patients with $\text{HbA}_{1c} < 6.5\%$, i.e. patients in the early stages of diabetes. However, agonist-induced platelet aggregation as measured by the new analytical approach could be differentiated between healthy controls and patients with early diabetes. These results suggest that platelet aggregation as detected by the particle-counting method using laser-light scattering could be applied in clinical examinations by our new analytical approach to reflect the period from platelet activation to the formation of small platelet aggregates.

Table 1. ADP-induced aggregation of small platelet aggregates among healthy controls, diabetic patients with $\text{HbA}_{1c} < 6.5\%$, and diabetics with $\text{HbA}_{1c} \geq 6.5\%$

	Healthy controls (n = 6)	Diabetic patients	
		$\text{HbA}_{1c} < 6.5\%$ (n = 7)	$\text{HbA}_{1c} \geq 6.5\%$ (n = 9)
Fasting blood sugar [mg/dL]	82 ± 10	$116 \pm 54^*$	$135 \pm 76^*$
HbA_{1c} [%]	4.5 ± 0.4	$5.7 \pm 0.4^*$	$7.3 \pm 0.5^*$
Total SLI in 10 min [$\times 10^6$ a.u.]	22.0 ± 13.2	31.2 ± 18.9	$64.0 \pm 25.8^*$
Total SLI in 2 min after addition of ADP [$\times 10^5$ a.u.]	10.6 ± 10.4	$64.4 \pm 48.5^*$	$96.0 \pm 69.0^*$

SLI = scattered light intensity. All data are expressed as means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ vs. healthy controls.

糖尿病患者におけるレーザ散乱粒子計測法を用いた 血小板凝集能測定の有用性

非会員 中楯 浩康* 非会員 関塚 永一**
正 員 南谷 晴之*

Validity of Particle-Counting Method Using Laser-Light Scattering for Detecting Platelet Aggregation in Diabetic Patients

Hiromichi Nakadate*, Non-member, Eiichi Sekizuka**, Non-member, Haruyuki Minamitani*, Member

We aimed to study the validity of a new analytical approach that reflected the phase from platelet activation to the formation of small platelet aggregates. We hoped that this new approach would enable us to use the particle-counting method with laser-light scattering to measure platelet aggregation in healthy controls and in diabetic patients without complications. We measured agonist-induced platelet aggregation for 10 min. Agonist was added to the platelet-rich plasma 1 min after measurement started. We compared the total scattered light intensity from small aggregates over a 10-min period (established analytical approach) and that over a 2-min period from 1 to 3 min after measurement started (new analytical approach). Consequently platelet aggregation in diabetics with $HbA_{1c} \geq 6.5\%$ was significantly greater than in healthy controls by both analytical approaches. However, platelet aggregation in diabetics with $HbA_{1c} < 6.5\%$, i.e. patients in the early stages of diabetes, was significantly greater than in healthy controls only by the new analytical approach, not by the established analytical approach. These results suggest that platelet aggregation as detected by the particle-counting method using laser-light scattering could be applied in clinical examinations by our new analytical approach.

キーワード : 散乱光, 粒子計測法, 血小板凝集, 糖尿病

Keywords : light scattering, particle counting method, platelet aggregation, diabetes

1. まえがき

現在, わが国における糖尿病患者およびその予備軍の人口は年々増加の一途をたどっており, 様々な血管合併症が社会的な問題となっている。糖尿病における慢性的な高血糖状態は, 2 次的変化として, 赤血球変形能の低下や血小板凝集能の亢進, 血液粘度の上昇など様々な血液レオロジー異常を引き起こす。このような異常が糖尿病性血管合併症の発症・進展を誘発する機序の多くは毛細血管や細小血管を有する微小循環の異常に起因するが, その中でも血小板凝集能の亢進は, 血管内において病的な血栓の形成を誘発させるため, 網膜症や心筋梗塞, 脳梗塞などの血栓性合併

症に密接に関与している。よって, 糖尿病患者における血栓性合併症の発症・進展を予防するためにも, 早期の血小板凝集能亢進の検知が大変重要である。また, 微小循環レベルでの血小板凝集能の亢進を検知するためには, 僅かな血小板の活性化や毛細血管や細小血管で観察されるような微小な凝集塊を検出する必要がある。現在, 臨床検査の項目でもある血小板凝集能測定は, 1962 年, Born らにより開発された透過光法による測定が広く応用されている^{(1)~(3)}。血小板凝集能測定とは, 血液から単離した血小板浮遊液に血小板同士の凝集を惹起する薬剤を添加し, 凝集程度を評価する検査である。しかし, 透過光法においては, 透過率に変化が生じるのが比較的大きな凝集塊が生じてからであるために, 微小凝集塊の検出精度が低下するという欠点がある^{(4)~(7)}。また, 実際の生体内では, 大凝集塊を形成させるような強い血小板凝集惹起物質が放出されることは少ない事からも, より低濃度の血小板凝集惹起物質により形成された微小凝集塊の検出精度の向上が求められる。そこで透過光法の欠点を改善すべく, 散乱粒子計測法を用いた血

* 慶應義塾大学大学院理工学研究科
〒223-0061 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1
Graduate School of Science and Technology, Keio University
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-city, Kanagawa 223-0061

** 国立病院機構埼玉病院内科
〒351-0102 埼玉県和光市諏訪 2-1
Internal Medicine, National Hospital Organization Saitama
Hospital
2-1 Suwa, Wako-city, Saitama 351-0102

血小板凝集能測定が考案された⁽⁸⁾⁽⁹⁾。現在、散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定は研究用途で使われており、臨床応用に向けた標準化や適切な評価法は未だ確立されていない。糖尿病患者における散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定はいくつか報告があるが、全ての糖尿病患者において健常者と有意な差が認められているわけではない^{(19)~(22)}。そこで本研究では、同測定法を用いた血小板凝集能測定の新しい解析法を提案することで、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進をより高精度に検出することを目的とした。

2. 方 法

〈2・1〉 レーザ散乱粒子計測法による血小板凝集能測定

本研究では、Fig. 1 に示したようなレーザ散乱粒子計測装置 (laser-light scattering particle analyzer 以下 LSPA) を用いた。LSPA は、low shear rate で流動する血小板浮遊液にレーザ光を照射し、得られる側方散乱光強度から凝集塊の大きさと数を定量的に評価する。レーザ光には半導体レーザ (波長 675 nm) の近赤外光を用いている。そして集光レンズを用いて、照射径約 40 μm 程度にまで絞られ試料に照射される。試料は、専用の外径 7 mm、高さ 50 mm の円柱状のガラスキューベットに入れて実験を行なう。キューベットはインキュベーターを用いて生体内と条件が等しくなるように 37°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) に保温されている。また測定中はキューベット内の金属スターラーが 1000 rpm で回転しており、試料を攪拌する。レーザ光は、多重散乱を避けるため、キューベットの内壁より約 1 mm の近傍に照射され、2 箇所の測定領域 ($20 \times 60 \times 140 \mu\text{m}$) より入射光の光軸に対して 90° 方向の散乱光を対物レンズにて集光し、2 つのフォトダイオードにより散乱光強度を電圧として 100 μs 毎に検出する。その際、散乱光強度は差動増幅器によりバックグラウンドをキャンセルされ、絶対値回路と AD コンバーターを経てパソコンに電圧値として取得される (Fig. 2)。

Fig. 1. Diagram of Laser-light scattering particle analyzer

〈2・2〉 データ処理 電圧値として取得された散乱光強度は、1 から 32 の閾値によりレベル分けされ (Fig. 3)、各閾値における検出回数 (Fig. 3 のピーク数) を時系列で解析可能である (Fig. 4)。閾値 2 から 21 までは小凝集塊 (S 領域)、閾値 22 から 27 までは中凝集塊 (M 領域)、閾値 28 から 31 までは大凝集塊 (L 領域) とし、各領域内で検出された散乱光強度の総和 (総散乱光強度) の時系列変化を凝

集曲線として解析可能である (Fig. 5)。ここで、閾値 L を (1) 式に、S, M, L の各領域の総散乱光強度を (2) 式より定義した。散乱光強度 I は粒子径の 2 乗に比例することから、閾値 L は粒子径に対して線形を示し、検出された凝集塊の大きさを表す指標となる。よって LSPA を用いた血小板凝集能測定では、凝集能は各領域の総散乱光強度で定義され、凝集塊の大きさと個数を反映する。なお、凝集していない単一血小板からの微弱な散乱光強度 (閾値 1 以下) と出力電

Fig. 2. Detection method of scattered light from platelet aggregates

Fig. 3. Image of electronic signal converted from scattered light intensity by LSPA

Fig. 4. Real-time analyses of platelet aggregates count by LSPA

圧が飽和に達した散乱光強度（閾値 32 以上）は解析データに含めなかった。

$$L = 16.1 \times \log_{10} I - 20.6 \quad (1)$$

L : Threshold level $1 \leq L \leq 32$, I : Scattered light intensity

各領域の総散乱光強度 = 各領域の閾値 L (散乱光強度 I)
× 検出回数 (2)

Fig. 5. Real-time platelet aggregation curve by LSPA

〈2・3〉 小凝集塊生成初期における血小板凝集能解析

健康者および合併症を併発していない糖尿病患者を HbA_{1c} が 6.5%未満および 6.5%以上の 2 群に分け、LSPA を用いて血小板凝集能測定実験を行った。インフォームドコンセントの下、薬剤を服用していない健康者および糖尿病患者から 3.8%クエン酸採血により採取した血液を 150 g (g は重力加速度) で 10 分間の遠心分離により PRP (platelet-rich plasma) を、その後さらに 550 g で 10 分間の遠心分離により PPP (platelet-poor plasma) を作成した。実験には、PRP を PPP で約 30 万個 / μ l に濃度調整を行った調整 PRP を用いた。測定時間は 10 分間とし、キュベット内のスターラーの攪拌だけで血小板凝集を惹起させる実験（自然凝集）と、低濃度の血小板凝集惹起物質（終濃度 adenosine diphosphate; ADP 0.5 μ M, Epinephrine 0.3 μ M, Collagen 1.0 μ g/mL）を用いた実験を行った。血小板凝集惹起物質は、測定開始 1 分後に調整 PRP に添加した。得られた測定データから血小板凝集能を二通りの解析法で評価した。第一は、測定開始から 10 分間の S 領域における総散乱光強度を求めた。これは、小凝集塊生成後の血小板凝集能を表す。第二に、測定開始 1 分後から 3 分後までの 2 分間の S 領域における総散乱光強度（自然凝集以外）を求めた。これは、血小板の活性化から小凝集塊生成初期の血小板凝集能を表す。

〈2・4〉 統計学的解析 小凝集塊生成初期過程における凝集能解析のデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で表し、健康者および糖尿病患者の血小板凝集能における有意差検定には Steel 検定を用いた。

3. 結 果

〈3・1〉 健康者および糖尿病患者における自然凝集

健康者および糖尿病患者におけるキュベット内のスターラーの攪拌だけで血小板凝集を惹起した際に得られた凝集曲線の典型的な一例を Fig. 6 に示した。健康者においては小凝集塊の形成はほとんど認められなかったが (Fig. 6 a)), 糖尿病患者においては、小凝集塊の形成が明らかに認められた患者と (Fig. 6 b)), 健康者と同様、僅かな形成しか認められなかった患者（データ未掲載）が存在した。

健康者、 HbA_{1c} が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者を対象に、血小板を自然凝集させる条件で、測定開始から 10 分間の S 領域における総散乱光強度を Table 1 に示した。その結果、健康者に比し、 HbA_{1c} が 6.5%以上の糖尿病患者では 10 分間の総散乱光強度に有意な増加が認められたのに対し、6.5%未満の糖尿病患者では有意な増加は認められなかった。

Fig. 6. Typical patterns of spontaneous platelet aggregation curve in a healthy control a) and a diabetic patient b)

〈3・2〉 健康者および糖尿病患者における ADP 惹起血小板凝集

健康者および糖尿病患者における ADP 惹起血小板凝集能測定実験で得られた凝集曲線の典型的な一例を Fig. 7 に示した。凝集曲線は、小、中、大凝集塊から検出された散乱光強度の総和が経時的に変化している状態を表している。ADP 惹起においては、健康者では一度小凝集塊 (S 領域) が生成した後、凝集塊が解離する一次凝集が認められたのに対し (Fig. 7 a)), 糖尿病患者では、生成した小凝集塊が解離しない二次凝集が認められた (Fig. 7 b))。また、糖尿病患者では小凝集塊とともに中凝集塊の生成が認められた。

Table 1. Spontaneous platelet aggregation of small aggregates among healthy controls, diabetic patients with $HbA_{1c} < 6.5\%$ and diabetics with $HbA_{1c} \geq 6.5\%$

	Healthy controls (n=6)	Diabetic patients	
		$HbA_{1c} < 6.5\%$ (n=5)	$HbA_{1c} \geq 6.5\%$ (n=6)
Fasting blood sugar [mg/dL]	95 $\pm$ 13	130 $\pm$ 60	126 $\pm$ 69
HbA_{1c} [%]	4.9 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.3*	7.3 $\pm$ 0.5*
Total SLI in 10 min [$\times 10^6$ a.u.]	3.5 $\pm$ 2.0	6.5 $\pm$ 3.5	39.0 $\pm$ 31.5*

SLI = scattered light intensity. All data are expressed as means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ vs. healthy controls.

Table 2. ADP-induced platelet aggregation of small aggregates among healthy controls, diabetic patients with HbA_{1c} < 6.5% and diabetics with HbA_{1c} ≥ 6.5%

	Healthy controls (n=6)	Diabetic patients	
		HbA _{1c} < 6.5% (n=7)	HbA _{1c} ≥ 6.5% (n=9)
Fasting blood sugar [mg/dL]	82±10	116±54*	135±76*
HbA _{1c} [%]	4.5±0.4	5.7±0.4*	7.3±0.5*
Total SLI in 10 min [$\times 10^6$ a.u.]	22.0±13.2	31.2±18.9	64.0±25.8*
Total SLI in 2 min after addition of ADP [$\times 10^5$ a.u.]	10.6±10.4	64.4±48.5*	96.0±69.0*

SLI = scattered light intensity. All data are expressed as means ± SD. * P < 0.05 vs. healthy controls.

健常者、HbA_{1c}が6.5%未満および6.5%以上の糖尿病患者を対象に、測定開始から10分間のS領域における総散乱光強度、および測定開始1分後から3分後までの2分間のS領域における総散乱光強度をTable 2に示した。その結果、健常者に比し、HbA_{1c}が6.5%以上の糖尿病患者では10分間と2分間の両方で総散乱光強度に有意な増加が認められた。一方、6.5%未満の糖尿病患者では10分間の総散乱光強度に有意な増加は認められなかったが、2分間の総散乱光強度には有意な増加が認められた。

Fig. 7. Typical patterns of ADP induced-platelet aggregation curve in a healthy control a) and a diabetic patient b)

〈3・3〉 健常者および糖尿病患者における Epinephrine 惹起血小板凝集 健常者および糖尿病患者における Epinephrine 惹起血小板凝集能測定実験で得られた凝集曲線の典型的な一例を Fig. 8 に示した。Epinephrine 惹起においては、健常者では小凝集塊のみの生成が認められたが (Fig. 8 a)), 糖尿病患者では小, 中凝集塊の生成が認められた (Fig. 8 b))。

健常者、HbA_{1c}が6.5%未満および6.5%以上の糖尿病患者を対象に、測定開始から10分間のS領域における総散乱光強度および測定開始1分後から3分後までの2分間のS領域における総散乱光強度をTable 3に示した。その結果、健常者に比し、HbA_{1c}が6.5%以上の糖尿病患者では10分間と2分間の両方で総散乱光強度に有意な増加が認められた。一

Fig. 8. Typical patterns of epinephrine induced-platelet aggregation curve in a healthy control a) and a diabetic patient b)

方、6.5%未満の糖尿病患者では10分間の総散乱光強度に有意な増加は認められなかったが、2分間の総散乱光強度には有意な増加が認められた。

〈3・4〉 健常者および糖尿病患者における Collagen 惹起血小板凝集 健常者および糖尿病患者における Collagen 惹起血小板凝集能測定実験で得られた凝集曲線の典型的な一例を Fig. 9 に示した。Collagen 惹起においては、健常者、糖尿病患者ともに小, 中, 大凝集塊への生成が経時的に推移する様子が認められた (Fig. 9 a, b))。また、中凝集塊の生成においては両者で同程度であるのに対して、小凝集塊と大凝集塊の生成においては糖尿病患者で明らかに増大していた。

健常者、HbA_{1c}が6.5%未満および6.5%以上の糖尿病患者を対象に、測定開始から10分間のS領域における総散乱光強度および測定開始1分後から3分後までの2分間のS領域における総散乱光強度をTable 4に示した。その結果、健常者に比し、糖尿病患者の両群において10分間の総散乱光強度に有意な増加は認められなかったが、2分間の総散乱光強度には有意な増加が認められた。

以上の結果から、同種同濃度の惹起物質で血小板を刺激した際、健常者に比し、糖尿病患者では血小板凝集能が充

Table 3. Epinephrine-induced platelet aggregation of small aggregates among healthy controls, diabetic patients with HbA_{1c} < 6.5% and diabetics with HbA_{1c} ≥ 6.5%

	Healthy controls (n=6)	Diabetic patients	
		HbA _{1c} < 6.5% (n=5)	HbA _{1c} ≥ 6.5% (n=7)
Fasting blood sugar [mg/dL]	86±11	103±23	138±64*
HbA _{1c} [%]	4.3±0.2	5.7±0.8*	7.1±0.4*
Total SLI in 10 min [$\times 10^6$ a.u.]	21.7±10.4	37.2±18.0	53.8±21.4*
Total SLI in 2 min after addition of Epinephrine [$\times 10^5$ a.u.]	2.3±2.6	60.1±73.7*	64.6±71.2*

SLI = scattered light intensity. All data are expressed as means ± SD. * P < 0.05 vs. healthy controls.

Table 4. Collagen-induced platelet aggregation of small aggregates among healthy controls, diabetic patients with HbA_{1c} < 6.5% and diabetics with HbA_{1c} ≥ 6.5%

	Healthy controls (n=5)	Diabetic patients	
		HbA _{1c} < 6.5% (n=6)	HbA _{1c} ≥ 6.5% (n=8)
Fasting blood sugar [mg/dL]	86±11	117±58	113±22*
HbA _{1c} [%]	4.2±0.2	5.4±0.6*	7.0±0.3*
Total SLI in 10 min [$\times 10^6$ a.u.]	17.8±7.3	30.3±19.8	22.5±17.7
Total SLI in 2 min after addition of Collagen [$\times 10^5$ a.u.]	9.4±14.4	55.1±19.3*	34.1±26.5*

SLI = scattered light intensity. All data are expressed as means $\pm$ SD. * P < 0.05 vs. healthy controls.

進していることが示された。また、測定開始 1 分後から 3 分後までの 2 分間の S 領域における総散乱光強度を血小板凝集能として評価することで、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進をより高精度に検出できることが示された。

Fig. 9. Typical patterns of collagen induced-platelet aggregation curve in a healthy control a) and a diabetic patient b)

4. 考 察

本研究では、健常者と合併症を伴わない糖尿病患者における小凝集塊の自然凝集を、散乱光法を用いて検討した。2 型糖尿病患者を対象に厳格な血糖コントロールにより患者の QOL を脅かす網膜症や腎症、神経障害といった細小血管合併症の発症・進展が阻止できるかどうかを 6 年間追跡した Kumamoto Study において、HbA_{1c} が 6.5% 未満、食後 2 時間血糖値が 180mg/dL 未満であれば細小血管合併症の出現する可能性が少ないことが報告されている⁽¹²⁾。よって我々は、糖尿病あるいはその予備軍の早期発見、合併症発症の予防診断を目的に、糖尿病患者を HbA_{1c} が 6.5% 未満と 6.5% 以上に分け血小板凝集能を測定した。まずキュベット内のスターラーの攪拌だけで惹起した血小板凝集を検討した。その結果、健常者に比し、HbA_{1c} が 6.5% 以上の糖尿病患者では小凝集塊の有意な増加が認められたが、HbA_{1c} が 6.5% 未満の糖尿病患者では有意な増加は認められなかった。このことは、HbA_{1c} が 6.5% 未満の糖尿病患者では、自然凝集をする患者としない患者が存在することが原因であると考えられる。先行研究において、糖尿病患者における自然凝集の増加は既にいくつか報告されている^{(19)~(21)}。Fukuda らは、健常者に比し糖尿病患者において有意に自然凝集が増加していることを報告しているが、糖尿病患者の平均 HbA_{1c} が 7.5% であり⁽¹⁹⁾、一概に本結果とは比較し難い。また Iwase らは、糖尿病が進行することで併発する網膜症、腎症、神経障害の重篤度に伴って自然凝集の有意な増加を報告しているが、健常者とこれらの合併症を伴わない糖尿病患者と

では自然凝集に有意な差は認められていない⁽²⁰⁾。よって、合併症の併発もなく HbA_{1c} も 6.5% 未満である糖尿病患者において検討した報告は未だなく、本実験結果からも自然凝集のみで糖尿病の初期および合併症発症前の血小板凝集能の亢進は検知できないため、惹起物質による血小板凝集能測定が必要だと思われる。

次に我々は、低濃度の血小板凝集惹起物質を用いて検討を行った。LSPA などの凝集計による *in vitro* 系の血小板凝集機序は、生体内の血栓止血機構とは異なる。血小板は、通常基石のような円盤状を示しているが、凝集惹起物質の添加により活性化され、棘状の偽足を出した球状に形態変化する。血小板の活性化に伴い、血小板膜糖タンパクである GPIIb/IIIa 複合体が活性化し粘着タンパクの高親和性受容体に構造を変化させる。血漿中には二量体構造を持つ粘着タンパクの Fibrinogen が存在するため、活性化血小板同士を Fibrinogen が GPIIb/IIIa を介して架橋することで可逆的な血小板凝集が起こる（一次凝集）。そして凝集が惹起されると血小板の形態変化は促進され、凝集した血小板の偽足が複雑に絡み合い、ADP などの濃染顆粒の放出や強い血小板凝集作用を持つ Thromboxane A₂ (TX A₂) を産生する。放出された ADP や TX A₂ は他の血小板を活性化し、不可逆的な凝集を亢進させる（二次凝集）⁽¹³⁾。ADP 惹起による血小板凝集は、血小板膜上の受容体に ADP が結合することにより、一次凝集を惹起することが報告されている⁽¹⁴⁾。本実験の ADP 惹起血小板凝集能測定においても、健常者では小凝集塊において、糖尿病患者では中凝集塊において一度凝集塊が生成した後に凝集塊が解離する一次凝集が認められた。Epinephrine は、血小板膜上に存在する α_2 -adrenaline 受容体を介して血小板凝集を惹起することが知られている⁽¹⁵⁾。また Epinephrine 自体は血小板凝集惹起物質ではなく、ADP 結合の親和性を増強させることで凝集を惹起しているという報告がある⁽¹⁶⁾。そのため、本実験の Epinephrine 惹起血小板凝集能測定で観察された緩やかな凝集反応は、上述した一次凝集を経た後、二次凝集が起こっていると考えられる。Collagen による血小板活性化は、血小板膜上の Collagen 受容体である GPVI との結合により、刺激がチロシンリン酸化を介して伝達されると考えられている⁽¹⁷⁾。また Collagen 惹起による血小板凝集は、ADP や Epinephrine とは異なり、一次凝集を経ずに最初から放出反応を伴う二次凝集を惹起するという報告がある⁽¹⁸⁾。本実験の Collagen 惹起血小板凝集能測定においても、Collagen 添加直後から大凝集塊を惹起する強い凝集反応が観察された。何れの惹起物質を用いた血

血小板凝集能測定においても、凝集反応のパターンは同様であるが、健常者に比し、糖尿病患者ではより大きな凝集塊が生成されており、糖尿病患者において血小板凝集能の亢進が示された。糖尿病患者の血小板凝集能亢進は、上述した凝集機序からも、糖尿病患者の血小板における Fibrinogen に対する結合の亢進⁽¹⁰⁾や TX A₂ 合成亢進⁽¹¹⁾が関与していると考えられる。

さらに我々は、健常者、HbA_{1c} が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者を対象に、ADP, Epinephrine, Collagen 惹起血小板凝集能測定から得られたデータを二通りの解析法で評価した。第一は、小凝集塊生成後の血小板凝集能として、測定開始から 10 分間の S 領域における総散乱光強度を求めた。第二は、血小板の活性化から小凝集塊生成初期の血小板凝集能として、凝集惹起物質を添加した測定開始 1 分後から 3 分後までの 2 分間の S 領域における総散乱光強度を求めた。その結果、HbA_{1c} が 6.5%以上の糖尿病患者においては、Collagen 惹起を除いて、10 分間の総散乱光強度および血小板凝集惹起物質を添加後 2 分間の総散乱光強度の両解析法で、健常者に比し、小凝集塊の有意な増加が認められた。一方、HbA_{1c} が 6.5%未満の糖尿病患者においては、血小板凝集惹起物質を添加後 2 分間の総散乱光強度でのみ小凝集塊の有意な増加が認められた。この結果は、従来、解析されてきた小凝集塊生成後の血小板凝集能を評価するよりも、今回我々が提案した血小板の活性化から小凝集塊生成初期の血小板凝集能を評価する方が、より糖尿病患者における血小板活性化のし易さや血小板凝集の亢進度を顕著に反映するためと考えられる。先行研究においては、Matsuno らが合併症を伴わない糖尿病患者における ADP 惹起血小板凝集能測定を検討している⁽²²⁾。Matsuno らは、まず糖尿病患者を自然凝集する患者としない患者に分け、各群を健常者と比較している。その結果、自然凝集する糖尿病患者では健常者に比べ有意に小凝集塊が増加しているのに対し、自然凝集しない患者は有意な差は認められなかった。また、両糖尿病患者群の HbA_{1c} は自然凝集する群で平均 7.2%、自然凝集しない群で 6.7%であった。この結果は、本実験結果を支持するものであり、合併症を伴わず、HbA_{1c} が低い糖尿病患者では、健常者に比し、自然凝集および従来の解析法では判別しにくいことを示唆するものである。よって、我々が提案する新しい解析法を用いることにより、より高精度で糖尿病患者における血小板凝集能の亢進を検出可能であることが示唆された。今後、レーザ散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定は、我々が提案した解析法を用いることで、様々な疾患に臨床応用が可能であることが期待される。

5. むすび

本研究では、血小板の活性化から小凝集塊生成初期に血小板凝集能の解析を限定することで、血小板活性化のし易さと血小板凝集の亢進度を明瞭に検知でき、健常者に比し、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進をより高精度に検

出できることが示された。

(平成 19 年 1 月 26 日受付, 平成 19 年 5 月 7 日再受付)

文 献

- (1) GV. BORN : "Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal", *Nature*, Vol.194, pp.927-929 (1962)
- (2) GV. BORN : "Observations on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate", *J Physiol.*, Vol.209, No.2, pp.487-511 (1970)
- (3) GV. Born and M. Hume : "Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma", *Nature*, Vol.215, No.5105, pp.1027-1029 (1967)
- (4) A. Kitek and K. Breddin : "Optical density variations and microscopic observations in the evaluation of platelet shape change and microaggregate formation", *Thromb Haemost.*, Vol.44, No.3, pp.154-158 (1980)
- (5) AR. Gear and JK. Lambrecht : "Reduction in single platelets during primary and secondary aggregation", *Thromb Haemost.*, Vol.45, No.3, p.298 (1981)
- (6) MM. Frojmovic, JG. Milton, and A. Duchastel : "Microscopic measurements of platelet aggregation reveal a low ADP-dependent process distinct from turbidometrically measured aggregation", *J Lab Clin Med.*, Vol.101, No.6, pp.964-976 (1983)
- (7) NT. Thompson, MC. Scrutton, and RB. Wallis : "Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus", *Thromb Res.*, Vol.41, No.5, pp.615-626 (1986)
- (8) Y. Ozaki, K. Satoh, Y. Yatomi, T. Yamamoto, Y. Shirasawa, and S. Kume : "Detection of platelet aggregates with a particle counting method using light scattering", *Anal Biochem.*, Vol.218, No.2, pp.284-294 (1994)
- (9) T. Yamamoto, Y. Egawa, Y. Shirasawa, Y. Ozaki, K. Sato, Y. Yatomi, and H. Kume : "A laser light scattering in situ system for counting aggregates in blood platelet aggregation", *Meas. Sci. Technol.*, Vol.6, pp.174-180 (1995)
- (10) G. DiMinno, MJ. Silver, AM. Cerbone, G. Riccardi, A. Rivellese, and M. Mancini : "Platelet fibrinogen binding in diabetes mellitus. Differences between binding to platelets from nonretinopathic and retinopathic diabetic patients", *diabetes*, Vol.35, Vol.2, pp.182-185 (1986)
- (11) G. Davi, I. Catalano, M. Averna, A. Notarbartolo, A. Strano, G. Ciabattini, and C. Patrono : "Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus", *N Engl J Med.*, Vol.322, No.25, pp.1769-1774 (1990)
- (12) Y. Ohkubo, H. Kishikawa, E. Araki, T. Miyata, S. Isami, S. Motoyoshi, Y. Kojima, N. Furuyoshi, and M. Shichiri : "Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A randomized prospective 6-year study", *Diabetes Res Clin Pract.*, Vol.28, No.2, pp.103-117 (1995)
- (13) H. Suzuki, RL. Kinlough-Rathbone, MA. Packham, K. Tanoue, H. Yamazaki, and JF. Mustard : "Immunocytochemical localization of fibrinogen on washed human platelets. Lack of requirement for fibrinogen during adenosine diphosphate-induced responses and enhanced fibrinogen binding in a medium with low calcium levels", *Blood*, Vol.71, No.4, pp.850-860 (1988)
- (14) RW. Colman : "Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation", *FASEB J.*, Vol.4, No.5, pp.1425-1435 (1990)
- (15) HJ. Motulsky and PA. Insel : "Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation, and clinical alterations", *N Engl J Med.*, Vol.307, pp.18-29 (1982)
- (16) WR. Figures, LM. Searce, Y. Wachtfogel, J. Chen, RF. Colman, and RW. Colman : "Platelet ADP receptor and alpha 2-adrenoreceptor interaction. Evidence for an ADP requirement for epinephrine-induced platelet activation and an influence of epinephrine on ADP binding", *J Biol Chem.*, Vol.261, No.13, pp.5981-5986 (1986)
- (17) Y. Miura, M. Ohnuma, MJ. Stephanie, and M. Moroi : "Cloning and Expression of the Platelet-Specific Collagen Receptor Glycoprotein VI", *Thromb Res.*, Vol.98, No.4, pp.301-309 (2000)
- (18) T. Nakano, K. Hanasaki, and H. Arita : "Possible involvement of cytoskeleton in collagen-stimulated activation of phospholipases in human

- platelets”, J Biol Chem., Vol.264, No.10, pp.5400-5406 (1989)
- (19) K. Fukuda, Y. Ozaki, K. Satoh, S. Kume, M. Tawata, T. Onaya, K. Sakurada, M. Seto, and Y. Sasaki : “Phosphorylation of myosin light chain in resting platelets from NIDDM patients is enhanced: correlation with spontaneous aggregation”, Diabetes, Vol.46, No.3, pp.488-493 (1997)
- (20) E. Iwase, M. Tawata, K. Aida, Y. Ozaki, S. Kume, K. Satoh, R. Qi, and T. Onaya : “A cross-sectional evaluation of spontaneous platelet aggregation in relation to complications in patients with type II diabetes mellitus”, Metabolism, Vol.47, No.6, pp.699-705 (1998)
- (21) T. Yamamoto, M. Kamei, N. Yokoi, T. Yasuhara, M. Tei, and S. Kinoshita : “Platelet aggregates in various stages of diabetic retinopathy: evaluation using the particle-counting light-scattering method”, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., Vol.243, No.7, pp.665-670 (2005)
- (22) H. Matsuno, H. Tokuda, A. Ishisaki, Y. Zhou, Y. Kitajima, and O. Kozawa : “P2Y12 receptors play a significant role in the development of platelet microaggregation in patients with diabetes”, J Clin Endocrinol Metab., Vol.90, No.2, pp.920-927 (2005)

中 楯 浩 康

(非会員) 1978年5月18日生。2002年3月慶應義塾大学理工学部物理情報工学科卒業。2004年3月同大学大学院理工学研究科修士課程修了。現在、同大学大学院同研究科博士課程に在籍。生体医工学、バイオイメージング、バイオメカニクスなどの研究に従事。日本微小循環学会、日本バイオイメージング学会、日本バイオレオロジー学会各会員。

関 塚 永 一

(非会員) 1951年11月23日生。1980年慶應

義塾大学医学部卒業。医学博士。現在、国立病院機構埼玉病院副院長および付属看護学校副学校長。同臨床研究部臓器循環器室長。臓器微小循環、糖尿病細小血管障害、カロリー制限・絶食療法の生体に及ぼす影響などの研究に従事。日本消化器病学会、日本糖尿病学会、日本肝臓病学会、日本微小循環学会、日本バイオイメージング学会各会員。

南 谷 晴 之

(正員) 1943年10月31日生。1966年3月慶

應義塾大学工学部電気工学科卒業。1971年3月慶應義塾大学大学院工学研究科博士課程修了。工学博士。現在、慶應義塾大学理工学部物理情報工学科教授。生体医工学、バイオイメージング、生体光計測などの研究に従事。電子情報通信学会、計測自動制御学会、日本生体医工学会、日本バイオイメージング学会、日本微小循環学会等各会員。