原 著

カルシウム添加による Viscous metamorphosis の再検討

板倉 宰* 森上 泰忠* 門原 温子*
千代 俊夫* 中村 克己**

Restudying of viscous metamorphosis after addition
of calcium to PRP

Tsukasa ITAKURA*, Yasutada MORIGAMI*, Atsuko KADOHARA*,
Toshio CHISHIRO* and Katsumi NAKAMURA**

Key words: platelet, recalcification, SEM, thrombocythemia,
hemophilia

Scanning electron microscopic observation of morphological change of platelets when calcium (Ca) was added to platelet-rich plasma (PRP) was carried out in healthy, patients with hemophilia and thrombocythemia.

1) In PRP, many platelets showed pseudopods or aggregation more or less. This may be attributed to stimulation on platelet at blood collection and centrifugation. But platelets with severe abnormality in thrombocythemia showed on pseudopods at all. 2) When fluid was moved after addition of Ca to PRP, platelets was transformed physiologically and showed "cherry blossom-like" in generally. 3) In the case of hemophilia, fibrin-nets were produced independently from the platelets or products of transformed platelets. 4) Morphological change of platelets when Ca was added to PRP of thrombocythemia were multifariousness. When Ca was added to PRP of thrombocythemia, moved and fixed at a proper good time, a few fibrin-like markedly long pseudopods were seen in platelets.

Even morphological changes that could not be recognized in normal could be inferred by using PRP of hemophilia and thrombocythemia.

はじめに

血液が凝固する過程は複雑で、形態的には充分把握されていない。多血小板血漿 (PRP) に塩化カルシウム (Ca) を添加した場合は、フィブリン網の完成までに時間を要し、その間、操作および条件などにより変化が生じ易いが、血小板を主とした内因系の形態観察には適当と考

えられる。最近、走査型電子顕微鏡が導入され、性能も著しく向上したので、Viscous metamorphosis について再検討を加えたので報告する。

I. 対象および方法

対象：健康人、真正血小板血症および血友病患者の PRP を用いた。

* 鳥取大学第二内科 (〒683 鳥取県米子市西町36-1), The Second Department of Internal Medicine, Tottori University School of Medicine, Tottori, Japan.

** 同 中央検査部, Department of Clinical Laboratory, Tottori University School of Medicine, Tottori, Japan.

方法：器具は直径8mmの小試験管を除き、シリコン加工を施し、血小板血症および血友病ではシリコン加工のための注射針を用い、健康人においては特にニプロの19Gの留置針、注射器ともクエン酸ソーダ液で浸したのち採血した。PRPの採取はすべて1,000回転10分とした。健康人および各疾患のPRPを数本の直径8mmの試験管に0.1ccずつ分注し、1/40MのCaをそれぞれ等量加えたのち、管内の混合液をときどき傾けて流動させて、適当な時期にあらかじめ蒸着した小ガラス片を試験管内に入れて浮遊物を付着させ、また、フィブリン完成間際に同様小ガラス片を試験管内に入れてフィブリンを付着させて、1~2%のグルタルアルデヒドで順次固定した。なお、健康人の場合には特に血小板の初期形態変化を観察するため、前述の小ガラス片を数枚用意し、PRPとCaを等量滴下して適当な時期に順次グルタルアルデヒドで固定し、以後はエタノールで脱水、臨

界点乾燥および蒸着して観察した。

II. 結 果

1. 健康人の場合

1) PRPの血小板は互いに多少凝集し、偽足を出すものが多かった。

2) PRPにCaを加えてときどき傾けて流動させた場合には血小板はほとんど同時に変形して桜花状を呈し(図1a)、その後、内因系の凝固因子が活性化されるとフィブリンが生じてフィブリン網が完成した。

3) PRPにCaを加えて静置すると、多くは血小板の凝集塊を中心としたようなフィブリン網が析出する(図1b~図1d)。

2. 血小板血症の場合

1) PRPで大きな血小板は偽足を出しにくく、異形が著しく加わると、全く偽足を出さなかった(図2a)。

2) PRPにCaを加えて流動させると、正

a	b
c	d

Fig. 1 Morphological change of platelets when Ca was added to PRP in normal.

a) "Cherry blossom-like" formation when fluid was moved. $\times 1,600$.

b) Stillness was maintained after four minutes. $\times 1,800$.

c) Stillness was maintained after eight minutes. $\times 5,000$.

d) Stillness was maintained after twelve minutes. $\times 3,000$.

a	b
c	d
e	f

Fig. 2 Morphological change of platelets when Ca was added to PRP in thrombocythemia.

a) No pseudopods at all in spite of stimulation. $\times 8,500$.

b) Slow transformation of large platelets. $\times 12,500$.

c) Fibrin-like pseudopods. $\times 3,500$.

d) Fibrin-like pseudopods. $\times 12,500$.

e) Production of fibrin-nets. $\times 3,500$.

f) Production of fibrin-nets. $\times 16,500$.

常大の血小板より変形し、ややおくれで大きな血小板が変形する (図 2 b)。

3) PRP に Ca を加えて流動し、適当な時期に静止させると、血小板の一部からフィブリン様の長い偽足がみられた。また、桜花状の血小板変形産物は正常より多く生じた (図 2 c ~ 図 2 d)。フィブリンの形成には血小板および血小板変形産物と一部は関係し、他はほとんど無関係にみえた (図 2 e)。フィブリン網は健常人

に比して著変がみられなかった (図 2 f)。

3. 血友病の場合

1) PRP に Ca を加えて流動させると桜花状の血小板変形産物が同様に生ずるが、内因子の活性化がおくられるために、ときとしては血小板変形産物が再び凝集して塊を作り (図 3 a ~ 図 3 b)、さらにフィブリンが生じてくるが、この場合にはフィブリンは血小板変形産物とは全く無関係であった (図 3 c ~ 図 3 d)。

a	b
c	d

Fig. 3 Morphological change of platelets when Ca was added to PRP in hemophilia.

a) Shape of reagglutination in products of transformed platelets. $\times 100$.

b) Shape of reagglutination in products of transformed platelets. $\times 800$.

c) A piece of fibrin. $\times 27,000$.

d) Fibrin-nets independently of platelets or its products. $\times 27,000$.

III. 考 按

顕微鏡の性能が向上するにつれて、血小板表面構造の保持も一層要求されるが、血小板の性質上この条件を満たすことはなかなか困難である。したがって、採血に細心の注意が必要となり、なるべく太目でシリコン処理した採血針が用いられる。今回、健康人ではテフロン留置針および注射器にクエン酸ソーダを吸および排液し、管壁をしめしたのちに採血した。健康人のPRP でみられる血小板形態は多少の差はあったも偽足を出し、なかには凝集もみられた。このことより、通常の血小板形態とされている円形ないし楕円形の血小板がPRP中に観察されても、機能の低下により刺激を受けても偽足を出さない血小板と考えられないこともない。これは形態学的な溢路であろう。血小板血症の血小板は形態的、機能的にも多種多様で、著しい

異形の血小板は偽足を出さず、大きな血小板は偽足を出すのがおそく、両者とも機能の低下が考えられた。健康PRPにCaを加えて静置した場合は今迄に発表されているように、一部の血小板はフィブリンに無関係であるが、多くは血小板凝集塊を中心としてフィブリンが生じているように観察された。これはCaを加えて静置しているので、血小板が変形するまでに時間を要し、血小板の変形と同時にフィブリンが完成するため、血小板凝集塊とフィブリンが互いにもつれあってフィブリン網を完成すると考えられる。また、PRPにCaを加えて流動させた場合には血小板は速かに変形して血小板第3因子を放出し、内因系の凝固機序を活性化するため、フィブリン網の完成が短時間となる。一方、血小板血症のような血小板機能に著しい相違がある場合には、一部の血小板は変形せずに経過し、他の変形した血小板の刺激によってフ

ィブリン様の長い偽足が生じるのではないかと考えられる。さらに、血友病では血小板機能にはほとんど異常がないと考えるが、凝固機序の活性化に時間を要するため、血小板変形産物は再凝集して塊を作り、特に重症の血友病にみられる。この場合フィブリン網は血小板変形産物とは無関係に生じた。

結 論

走査電顕を用いて健常人、血小板血症、および血友病の症例について PRP および PRP に Ca を添加し、静置あるいは流動させて血小板からフィブリン網の生成までの過程を形態的に観察して次の結果を得た。

1) 血小板血症において著しい異形を示した血小板は刺激に鈍感で偽足がみられず、健常人および血友病の PRP では多少の差はあっても軽い凝集および偽足がみられた。

2) 健常人の PRP に Ca を添加して静置し

た場合は、血小板およびその変形産物とフィブリンの関係は不明確であった。

3) 血小板血症の血小板は多種多様な形態および機能を有し、一部の血小板は Ca 添加後、流動させてから静置するとフィブリン様の長い偽足を生じた。このことから、血小板血症の PRP を用いて Ca 添加後の血小板形態を観察することにより、変化がすみやかで画一的な健常血小板では明確にできなかった血小板の複雑な形態的变化も幾分解明できたと考える。

4) 血友病では血小板およびその変形産物に無関係にフィブリンが生じることを観察した。

以上のことより、健常 PRP に Ca を添加した場合には観察できなかった種々な変化が血小板血症および血友病の PRP を用いることによって一層明確にできたと考える。

稿を終るにあたり、御指導および御助力下さった本学第2解剖田中敬一教授、長武均技官に満謝する。

●葉酸研究の完全なる集大成！

葉 酸 — 基礎と臨床

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀
専門医18氏分担執筆

A5判 484頁 図172 表104 定価9,800円(〒200円)