原 著

血小板凝集反応の新しい解析法

東 照正* 橋本 正史* 垣下 栄三** 吉村 早苗**
小坂 博昭** 木村 信彦** 永井 清保**

The New Method for Kinetics Analysis of Platelet Aggregation by
Measurement of Numbers of Residual Single platelets
in Aggregation Reaction

Terumasa HIGASHI*, Masafumi HASHIMOTO*, Eizo KAKISHITA**,
Sanae YOSHIMURA**, Hiroaki KOSAKA**,
Nobuhiko KIMURA** and Kiyoyasu NAGAI**

Key words : platelet aggregation, new method of kinetics analysis,
electric particle counter, rate constant

The number of residual free single platelets was counted in the course of platelet aggregation reaction for the purpose of studying chemical kinetics analysis of platelet aggregation by ADP.

The change in number of single platelets agreed with the function :

k
single platelets $\xrightarrow{\quad}$ aggregates

$[P] = [P_0]e^{-kt}$, ($[P]$: the number of single platelets, $[P_0]$: the initial number of single platelets, k : rate constant, t : time)

and rate constant "k" was measured to know the degree of platelet aggregation. $[P]$ was measured by electric particle counter (Coulter Counter Model ZBI) under the condition of aperture tube : 70μ , aperture current : $1/4$, amplification : $1/4$, matching switch : 20 K and monometer position : 0.5 ml. Upper and lower thresholds were selected to include the main peak on platelet volume distribution curve.

By this method some results were obtained as follows. "k" was constant on the various concentrations of platelets from same blood. "k" changed in proportion to the degree of stir of reaction mixture. "k" was constant when ADP concentration was more than 10^{-6} M. But "k" was logarithmically decreased between 10^{-6} and 10^{-7} M of ADP, and got toward zero when ADP concentration was less than 10^{-7} M.

* 大阪大学医学部第一生理学(〒553大阪北区中之島4-3-57), Department of Physicochemical Physiology, Medical School, Osaka University, Osaka, Japan.

** 兵庫医科大学第二内科, Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan.

緒 言

血小板凝集反応測定のために一般に広く用いられている分光学的検査法は、粒子分散系での透過光の変化をみており、得られる凝集曲線の指標がどこまで確実に血小板凝集反応過程を反映しているか問題があり、真の定量性を得ることは難しいともいわれている¹⁾。

著者らはこれまでの本討議会において、ADP凝集反応の分光学的測定における真の凝集能を表わす指標をみつけるべく、反応速度論的考察を加え若干の知見を得、報告してきた²⁾³⁾。しかしこれも従来からの反応速度論的解析と同様、凝集反応の進行と光散乱との関係が明確に示されない限り検討すべき余地はなお残る。

そこで凝集反応の過程を凝集生成の面からでなく残る非凝集血小板数を測定することにより反応を速度論的に解析できないかと考えた。

すなわち凝集反応を

(1) $\text{single platelets} \xrightarrow{k} \text{aggregates}$ なる反応式で表わすとその速度式は、

(2) $-d[P]/dt = k[P]$ (ただし k : 反応速度定数, $[P]$: single platelets の濃度) である。これは

(3) $[P] = [P_0]e^{-kt}$ (ただし $[P_0]$: single platelets の初濃度, t : 経過時間) となる。

すなわち、凝集反応時に経時的に single platelets を測定して行くと、その血小板固有の凝集反応速度を表わす指標が得られることになる。

I. 方法と成績

家兎血液を1/9容クエン酸ソーダと混じて160G 10分間遠沈して血小板濃厚血漿(PRP)を得、これを実験に用いた。PRPに $4.0 \times 10^{-4}M$ のADPを1/10容加えて凝集反

応を起こさせ、ADP添加以後経時的に5秒毎にこの反応液中より0.1mlを取り、速やかに1.9%ホルマリン液1.0mlと混合、凝集反応を停止させ、それぞれの時点での反応状態を固定した。

1. 視算法による single platelets の測定

single platelets 濃度 $[P]$ の値を求めるため、顕微鏡下で視算した。この成績を図1上段に示す。

$[P]$ は時間とともに指数函数的に減少し、この場合 $8.3 \times 10^4/mm^3$ で一定になった。凝集後に残ったこの single platelets は元々機能を果さない血小板か、凝集塊からはがれて機能を失ったものと考えられ、この値を差し引いて片対数グラフに書くと、図1上段右図のごとくなり(3)式を満足させる。

2. 自動血球計数器による血小板の測定

自動血球計数器を用いて非凝集血小板を測定した。非凝集血小板と凝集血小板を区別して測定するためには粒子の大きさによって測定し分

Fig. 1 Changes of free single platelet numbers during aggregation reaction induced by ADP.

Fig. 2 The relationship between rate constant "k" and rate of magnetic stirring.

けることのできる性質を利用すれば可能である。そこで測定には Coulter Counter Model ZBIを用いた。aperture tube 70 μ を用い、aperture current 1/4, amplification 1/4 の条件で測定した。測定閾は試料になる血小板の大きさ、測定条件により異なるがあらかじめ血小板粒度分布を画いて main peak となる部分、すなわち大体15~35を選んだ。この条件下で凝集反応の各時間毎の[P]を計測したのが図1下段に示すものである。これは視算法で得られた成績とよく一致した。こうして得られたkはともにk=4.2/min となった。

このことは先に想定した理論式を実験的に証明したことになり、[P] すなわち single platelets の濃度測定に自動血球計数器が利用可能であることを示している。そこで以後の実験には Coulter Counter を用いて行った。

3. 血小板濃度の変化

血小板濃度を変化させ他は同一条件で反応させ、kの変化をみた。この場合はkに変化をみず初期血小板濃度に関係ないことを示した。

Fig. 3 The relationship between rate constant "k" and ADP concentration.

4. 凝集反応攪拌速度の変化

凝集反応時の攪拌速度を変化させ、他は同一条件で検討した。攪拌速度を変えるとkは変化し、攪拌速度とkとの関係をみると図2のごとく比例関係が認められた。

kと攪拌速度[r]との関係をみるとk=k'[r]+a(ただし、k':攪拌速度に関係する反応速度定数、[r]:攪拌速度、a:定数)となる。これを元の式[P]=[P₀]e⁻ᵏᵗに代入し[r]に関係する式にすることができる。

すなわち[P]=[P₀]e⁻(k'(r)+a)tとなる。

この場合、図でみるごとく、a=2となるので、k'=1.15×10⁻²/min となった。

5. ADP 濃度の変化

ADP 濃度を変化させて[P]の変化をみた。各ADP濃度にて[P]は片対数グラフ上で直線的に変化した。これから各ADP濃度におけるkを求めADP濃度とkの関係をみると図3のごとくになった。すなわち10⁻⁷M以下ではkは0に近くなり10⁻⁶M以上では大体一定の値をとり10⁻⁷と10⁻⁶Mの間で増加した。

II. 考 按

血小板凝集反応の反応速度論的解析は、いくつか試みられ⁴⁻⁶⁾、それぞれ反応形式の理解、臨床応用などに一応の成果をみることができているが、しかしいづれも緒言で述べた問題を含みなお検討すべき点がある。著者らは凝集反応の初速度を用いて凝集反応式をたて³⁾、これにより一定の反応速度定数を得ることを示した。

しかし初速度の分光学的測定は繁雑である。

そこで凝集反応を凝集過程での非凝集血小板数の測定により反応速度を測定できないかと考えた。このために凝集反応の理論式を想定し、これを実験的に証明し反応定数を得ることができるとを示した。

この際、非凝集血小板の測定のために、測定対象粒子の大きさを限定して測定できる自動血球計数器 (Coulter Counter Model ZBI) を利用できることを示した。非凝集血小板の測定閾値を決めるために、凝集反応を起させ経時的にホルマリン固定した反応液の粒度分布をみると、**main peak** が時間とともに低下していくのがみられ、したがってこの **peak** に相当する範囲が非凝集血小板に相当すると判断した。このようにして決めた閾値内の血小板数の変化と視算で得た変化と一致することから、自動血球計数器が利用できることが判った。

このようにして k は血小板濃度に関係ないこと、攪拌速度 $[\gamma]$ とは一定の比例関係があることが示された。また ADP 濃度との関係をみると $10^{-7}M$ 以下では k は 0 に近くなり、 $10^{-6}M$ 以上では大体一定の値をとることがみられ、 $10^{-7} \sim 10^{-6}M$ の間で片対数グラフ上で直線関係がみられた。この関係は初速度でみたものとよく似ており同様の解釈ができるものと思う。

いずれにせよ本質的に同じものをみているのであるから従来の分光学的解析と大きな違いはないと思われるが、この方法では 1 つの **parameter** のみを追跡しており現象を **simple** に解析し、方法論的にも簡便である点実用性があり、より確実な定量的指標を得ることができると思

われ、今後さらに研究していきたい。

結 語

自動血球計数器を用いて凝集反応の反応速度を定量的に測定できることを示し、この方法を用いて関係する条件を一定にして血小板固有の凝集能を表現する指標を得ることができる可能性を示唆した。

文 献

- 1) Born, G. V. R., et al.: Effects of numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma. *Nature*, **215**; 1027~1029, 1967.
- 2) 東 照正, 他: ADP による血小板一次凝集の反応速度論的考察—aggregometer で得た凝集能の臨床的指標に対する検討. 血液と脈管, **8**; 291~296, 1977.
- 3) 東 照正, 他: ADP による血小板凝集反応の解析. 血液と脈管, **9**; 375~379, 1978.
- 4) 安部 英, 他: ADP 血小板凝集作用の分析 (第2報). 日血会誌, **36**; 391, 1973.
- 5) 西沢一郎, 他: 血小板凝集曲線の反応速度論的解析とその応用 (種々の核酸関連物質の血小板凝集反応への影響). 血液と脈管, **8**; 285~289, 1977.
- 6) 奥 史郎, 他: ADP 凝集曲線の理論的実験的—考察. 血液と脈管, **7**; 1001~1006, 1976.
- 7) Rossi, E.C., et al.: Kinetic parameters of platelet aggregation as an expression of platelet responsiveness. *Thrombos. Haemostas.*, **37**; 283~290, 1977.