アグリゴメーターによる血小板粘着能測定

石川 善英* 笹川 滋*

Measurement of platelet adherence using an aggregometer

Yoshihide ISHIKAWA* and Shigeru SASAKAWA*

Key words : platelet, adhesion, collagen, aggregation, EGTA

Platelet adhesion to collagen fibril is important as the first step of the defense against bleeding. However, there are no suitable methods for the measurements of platelet adhesiveness. Various conditions effected to platelet adhesion were studied and a simple method using an aggregometer was determined. The measurement was carried out in the presence of collagen and EGTA with or without Mg^{2+} under stirring at $37^{\circ}C$. After addition of collagen into PRP with EGTA, optical transmittance on an aggregometer decreased temporary and then increased lineary within a few minute. The aggregation of platelets did not occurred at this time, which was conformed by SEM observation. Therefore, the adherence was determined by the transmittance change at the initial stage. The error in this method was within 5 %, when the method was used at pH 7-8 and platelet concentration was 3×10^5 cells/ μl or more. The excellent reproducibility was obtained. In this reaction, the well dispersed, high active and fibrous collagen will be required. The adherence to collagen was increased by Mg^{2+} and inhibited by aspirin. The adhesiveness of PC stored at $22^{\circ}C$ decreased 20 % for 24 hours and 50 % for 48 hours, respectively.

緒 言

血管が損傷を受けた場合、露出したコラーゲンへの血小板粘着により止血反応が開始されることから、粘着能は凝集能、放出能とともに血小板が備えなければならない重要な機能の一つである。粘着能測定のために、いくつかの方法が試みられている。粘着担体としてはガラス、内皮下組織、コラーゲンなどが用いられ、カラ

ム、口過、攪拌などにより血小板との接触がなされている。また、定量法としてはアイソトープあるいは血球計数機による粘着血小板数測定、粘着に伴う濁度変化の測定などが行なわれている。しかし、いずれも定量性、簡便性、粘着担体の質などで一長一短がある。そこでわれわれは、Morin ら¹⁾が von Willebrand 病の検出に用いているアグリゴメーターによる血小板のコラーゲンへの粘着能測定法を検討し、定量化す

* 日本赤十字中央血液センター 研究部 (〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31), Department of Research, Central Blood Center, Japanese Red Cross Society, Tokyo, Japan.

Fig. 1 SEM pictures of platelets adhering to collagen.

ることができた.

I. 方 法

コラーゲン：牛の腱コラーゲン（日本医用高分子材料研究所）を 1/1000 NHCl 水溶液にホモジナイザー（日本精機製作所 AM-70）にて分散し、0.2% としたものをを用いた.

血小板の調製：ACD 加全血より遠心分離 (250 g×20 min) により調製した多血小板血漿 (PRP), およびこれをさらに遠心し (500 g×20 min) 濃度を調製したものをを用いた. EGTA 5

mM を含む血小板遊離液に 37°C で攪拌しながらコラーゲンを加えたときに起こる粘着をアグリゴメーターによる透過度変化 (Bryston 社製) として測定した.

II. 結果および考察

EGTA を含む PRP に 37°C で攪拌しながらコラーゲンを加えると、透過度は一過性の低下後、1.5 分ほど直線的に、以後ゆるやかに増加した (図 1). コラーゲンとして市販の血小板凝集測定用分散液も用いたが、高濃度を要する

Fig. 2 The effect of aspirin on the platelets-collagen interaction. ○: Control, ●: 100 μM aspirin added.

ため、PRP に添加した際の透過度変化が大きく、また、PPP に加えた場合も重合によると思われる透過度変化が続き、測定には適さなかった。このような測定に用いるコラーゲンは分散度すなわち活性が高く、モノマーを含まないものが適していると思われる。凝集の有無を確認するため、図1の各段階の血小板を4%グルタルアルデヒドで固定し、走査型電顕で観察した。透過度が直線的に増加する範囲では凝集は生じていないことが確認された。そこでこの範囲での1分間の透過度変化率(b/a)により粘着を定量化した。この方法により測定誤差5%以内の再現性が得られた。また、攪拌速度は600 rpm, 1,100 rpm のいずれでも正常血小板では差はみられなかった。

粘着はコラーゲン量とともに増加し、100 μg/ml でほぼ飽和した。あらかじめ5mM MgCl₂が

Fig. 3 The collagen induced aggregation and adhesion response of stored PC. ○: Adhesion, □: Aggregation, ●, ■: 37°C, 1 hour incubation

存在する場合には、すでに Cowan ら²⁾が報告しているように粘着が高められ、20 μg/ml で飽和がみられた。そこでコラーゲン量を一定にして二価カチオンの効果を濃度を変えて調べた。Ca²⁺を添加した場合には凝集が生じるため粘着への効果は明かではなかったが、Mg²⁺では濃度に依存して粘着が増加し、5 mM 添加では無添加の場合の1.5~2 倍の値を示した。

図2にはアスピリンの血小板凝集および粘着への効果を示した。PRP に100 μM アスピリンを添加し、室温で10分間静置後コラーゲン凝集および粘着を測定した。すでによく知られているように凝集は著しく抑制されたが粘着 (no Mg²⁺) は全く影響されなかった。ところが、Mg²⁺ 存在下での粘着はアスピリンにより明らかな抑制がみられた。このことから Mg²⁺ 存在下と非存在下での粘着は異なった mechanism が考えられる。

本法の一つの応用として、濃縮血小板血漿 (PC: 血小板濃度 100~150万個/μl) の保存による粘着能変化の測定を試みた (図3)。測定の際には凝集能測定の場合と同様血小板濃度を35万個/μl に調整した。PC の粘着能は室温静置保存により、24時間、48時間でそれぞれ20%, 50%の低下を示したが、この程度はコラーゲン凝集能に比べ明らかに小さかった。これはおそらく粘着と凝集ではエネルギー依存性が異な

るためと推察する³⁾。

結 語

本法はコラーゲン分散液の調製法を選択すれば簡便性、定量性、再現性にすぐれた方法である。また、ガラスビーズカラム法では粘着のみられないクエン酸採血した PRP でも比較的高い値で粘着を測定できることから、血小板粘着能のルーチン検査に応用可能な方法と思われる。

終りにコラーゲンを提供していただき、また、コラーゲン分散液の調製につき貴重な御意見を賜った日本医用高分子材料研究所長・宮田暉夫博士に深謝する。

文 献

- 1) Morin, R. J., Chen, A. F. T., Narayanan, A. S., Raye, C., Moss, R. A., Srikantiah, M. V. and Barajas, L.: Platelet adhesion to collagen in normal and von Willebrand's disease subjects. *Thromb. Res.*, **17**; 719~728, 1980.
- 2) Cowan, D.H., Robertson, A. L., Shook, P. and Giroski, P.: Platelet adhesion to collagen: Role of plasma, ADP, and divalent cations. *Br. J. Haematol.*, **47**; 257~267, 1981.
- 3) Morin, R. J. and Chen, F. T.: Relationships of adenine nucleotide metabolism to platelet-collagen adhesion. *Thrombs. Haemostas.*, **39**; 366-378, 1978.

●日常診療の落とし穴と安全性を示す！

小児の医療事故と救急処置

編集 日本大学小児科教授 馬場一雄 専門医50氏分担執筆
B5判 337頁 図52 表120 定価9,800円(〒240円)

日常の診療業務はいたるところに落とし穴の掘られている原野を進むようなものである。どんなに気をつけて歩いても、落とし穴に落ち込まないですむ保証はない。しかし、どこに落とし穴が隠されているか予め知っているのと知らないのとでは、安全の程度が全く異なる。本書は、小児の日常診療の場に隠されている落とし穴の位置と迂回路を示す羅針盤である。

●内容：〔医療事故〕1.医療事故と医事紛争、2.医療過誤の実態と責任の所在、3.突然死の実態、4.最近における医事紛争の問題点と小児科領域における診療事故死、5.小児救急患者の実態、6.過敏性体質、7.臨床検査に伴う事故とその対策(その1)、8.臨床検査に伴う事故とその対策(その2)、9.注射に伴う事故とその対策、10.輸血に伴う事故とその対策、11.輸液に伴う事故とその対策、12.交換輸血に伴う事故とその対策、13.麻酔に伴う事故とその対策、14.小児外科手術に伴う事故とその対策、15.放射線照射に伴う障害とその対策、16.看護に伴う事故とその対策、〔救急処置〕1.急発症状と応急対策、2.救急疾患と緊急治療、3.救急医療。