原 著

血栓予知法としての Wu & Hoak 法の再評価

水 野 昭* 磯 部 淳 一*

Re-evaluation of Wu & Hoak's method as a
prognostication for thrombosis

Akira MIZUNO* and Jun-ichi ISOBE*

Key words: Wu & Hoak's method, platelet aggregate ratio (PAR),
prostaglandin I₂, β -thromboglobulin, hyperaggregable state

We tried to re-evaluate Wu & Hoak's method¹⁾ as an in vivo prognostication for pre-thrombotic or thrombotic state using several parameters—platelet aggregate ratio (PAR), platelet maximal aggregation rate (MAR), platelet sensitivity to prostaglandin I₂ (PGI₂)⁷⁾ and serum β -thromboglobulin (β -TG).

Eight normal subjects and 45 patients [$\times 10$ cases of diabetes mellitus (DM), 6 cases of cerebrovascular attack (CVA), 4 cases of angina pectoris, 4 cases of gastric cancer with metastasis, 13 cases treated with warfarin, 8 cases of miscellaneous diseases] were investigated.

The results were as follows :

- 1) PAR was decreased linealy by the addition of ADP ranging from 10^{-9} - 10^{-6} M in vitro.
- 2) Mean values of PAR in normal group (n=8) and in a non-thrombotic group (n=16) were 0.88 ± 0.04 (M $\pm$ S.D.) and 0.88 ± 0.05 (M $\pm$ S.D.) respectively.
- 3) The value (M $\pm$ S.D.) of PAR in a thrombotic group (n=9) was reduced significantly (0.83 ± 0.03 , $p < 0.025$).
- 4) No significant relationships between PAR and the other parameters were found in all cases estimated.
- 5) Correlations between PAR and MAR (induced by adrenalin), PAR and PGI₂ sensitivity, PAR and β -TG were significant high in a group of non-treated DM and CVA.

These results suggest that Wu & Hoak's method is somewhat insensible method comparing with platelet function tests in vitro, but the vessel wall-platelet interaction is fairly reflected in this method, and repeated determination by this method is a useful means in vivo to prognosticate hyperaggregable state in non-treated thrombotic diseases at least.

*徳島大学医学部附属病院検査部 [〒770 徳島市蔵本町 2], Department of Laboratory Medicine, Tokushima University, Tokushima, Japan. [昭和59年2月22日受付, 昭和59年7月18日受理]

はじめに

In vivo における血小板の活性化ないし血栓状態を予知する方法として、血小板凝集とその解離分散時の血小板数の比から求める Wu & Hoak 法¹⁾が知られている。しかし、その臨床的有用性に関する評価は、報告者^{2)~5)}によってまちまちである。

そこでわれわれは、本法の特徴ないし限界につき若干の検討を試みた。

I. 実験方法

対象は正常者 8 名 (19~47 歳までの男女各 4 名)、各種疾患患者 45 例で、その内訳は糖尿病 10(7)例、脳血管障害 6(3)例、狭心症 4(2)例、担癌 4 例、ワルファリン服用 13 例、血栓性静脈炎 1(1)例ほか 7 例である。()内は抗血小板療法中の例数を示す。これらは 1~3 週間隔で行なった in vitro 血小板凝集能測定でいずれも正常~低値域にあった。われわれの正常値⁶⁾ ($M \pm S.D.$, $n=48$) は ADP ($6.25 \mu M$) $53 \pm 15\%$ 、コラゲン ($2 \mu g/ml$) $67 \pm 21\%$ 、アドレナリン ($2 \mu g/ml$) $23 \pm 8\%$ である。他に実験 DIC 作成の目的で家兎 4 匹を用いた。

血小板指標の項目として、血小板数 (PLT) はコールターカウンター SP 型により、血小板凝集指数 (platelet aggregate ratio, PAR) は図 1 のごとく原法¹⁾に準じて測定した。すなわち、測定手技は採取した静脈血 0.5 ml を各 2 ml の EDTA・ホルマリン溶液(1)および EDTA 溶液(2)に二分して注入し、22°C で 15 分間放置後、150 g、8 分間の軽遠心で得られた血小板浮遊血漿 (PRP) 中の PLT を算定する。そして、 $PAR = [\text{溶液(1)の PLT}] / [\text{溶液(2)の PLT}]$ で表現するものである。血液中にもし血小板凝集塊が存在しておれば、ホルマリンによってそれらは固定され、遠心除去される分だけ PRP 中の PLT は減少する。

他方、EDTA のみでは血小板凝集塊は解離分散し、PLT 減少がおこりにくい。したがって溶液(1) PLT/溶液(2) PLT の比は 1.0 以下となり、in vivo で血小板活性化の程度が大なるほど、この比は低値となる、というのが本法の

1) Procedure

2) Expression of the result (platelet aggregate ratio, PAR)

$$PAR = \frac{\text{Platelet-count in EDTA/formalin} \cdot \text{PRP}}{\text{Platelet-count in EDTA} \cdot \text{PRP}}$$

Fig. 1 Wu & Hoak's method

原理である。

ADP、コラゲンおよびアドレナリンによる血小板凝集能(maximal aggregation rate, MAR)は比濁法によってそれぞれ測定した。In vitro における血小板のプロスタグランディン I_2 (PG I_2) 感受性試験は著者らの方法⁷⁾によった。その測定原理は ADP 凝集過程において、反応が最大に達した時点で PGI_2 を加え、その 50%凝集解離を示す PGI_2 の最小濃度 (PGI_2 濃度) を内挿法あるいは外挿法によって求めるものである。血漿 β -トロンボグロブリン (β -TG) 測定は市販 RIA キットを用いて行った。

II. 実験成績

1. ADP 凝集と PAR との関係

本法の信憑性をみる目的で、クエン酸加全血に ADP を 10^{-10} ~ $10^{-5}M$ (f. C.) 添加し、ADP 濃度と PAR 変化との関係をみると、PAR は ADP 10^{-9} ~ $10^{-6}M$ の範囲で ADP 濃度依存性に図 2 のごとく直線的に低下した。

2. 実験 DIC における PLT および MAR の変動

家兎で ADP 10 mg/kg, 1 回静注による PLT および MAR の経時変化をみると、図 3 に示したように各値が旧値に復するまでの間 (30 分)、両者は平行して推移し、PAR の変動を確認した。

3. 正常者ならに疾患例における PAR 値

PAR の正常値は 0.88 ± 0.04 ($M \pm S.D.$, $n=8$) で、非血栓性および非出血性疾患群をあ

Fig. 2 Induction of platelet aggregation with ADP.

わせた平均値も 0.88 ± 0.05 ($n=16$) であった。これらに対し、血栓性疾患のうち抗血小板薬による治療群においては 0.90 ± 0.03 ($n=13$) にとどまるものの、未治療群では 0.83 ± 0.03 ($n=9$) であり、有意の低下を認めた ($p < 0.025$, 図 4)。

4. 各指標間の相関性

正常者でのパラメーター相互間の相関性は総じて低く (表 1), 全疾患でのそれは, PAR とその他のパラメーターとの組み合わせに限れば, PAR とコラゲン凝集能および PAR とアドレナリン凝集能との間で, 有意の負相関を認めたにすぎなかった (表 2)。しかし, 糖尿病ならびに脳血管障害において, 治療群では上記と同様, 指標間の相関性は低いものの, 未治療群では表 3 に示したごとく, 明らかな相関関係が認められ, ことに糖尿病では PAR とアドレナリン凝集能, PAR と PGI_2 濃度, および PAR と β -TG 値との間で高い負相関が得られた。これと同様の傾向は胆癌例ならびにワルファリン服用例でもみられた。因みに図 5 は血栓性疾患における PAR とアドレナリン凝集能, PAR と PGI_2 濃度, および PAR と β -TG 値との相関性を示す。いずれの組み合わせにおいても有意の負相関 (前二者で $p < 0.025$, 最後者で $p < 0.05$) が認められた。

III. 考 察

動脈血栓の形成において, 血小板が中心的役割を演じていることが明らかとなつてから, 血

Fig. 3 Changes of platelets and maximal aggregation rate caused by ADP injection in rabbits.

Fig. 4 The average values of platelet aggregate ratio in normal subjects and patients with thrombotic disease.

栓形成ないしその準備状態を予知する試みが種々なされている。しかし, その多くは in vitro での検討であり, 手技的にも問題がある。そして最も重要なことは, これら in vitro 法による成績が, in vivo における変化をどの程度忠実に反映しているか, ということにある。In vivo 法の Wu & Hoak 法²⁾が注目されるゆえんである。しかしながら, 本法も多数の追試²⁾⁻⁵⁾がなされた結果, 必ずしも一定の評価は得られていない。

本法は着眼点にすぐれ, 簡易な手技で特別な機器も必要としない利点を有する。しかし反

Table 1 Relationships among platelet parameters in normal subjects

Combination		R	Combination		R
PAR	-ADP agg.	-0.185	Coll. agg.-Adr. agg.		0.377
PAR	-Coll. agg.	-0.256	Coll. agg.-PGI ₂		0.149
PAR	-PGI ₂	-0.185	Coll. agg.-β-TG		0.813
PAR	-β-TG	-0.297	Adr. agg.-PGI ₂		0.517
PAR	-Coll. agg.	-0.298	Adr. agg.-β-TG		0.326
ADP agg.-Adr. agg.		0.412	PGI ₂ -β-TG		0.445
ADP agg.-PGI ₂		0.531			
ADP agg.-β-TG		0.083			(n=8)

R: Correlation coefficient
PAR: platelet aggregate ratio
β-TG: β-thromboglobulin
ADP agg.: ADP (-induced) aggregation

Coll. agg.: collagen aggregation
Adr. agg.: adrenalin aggregation
PGI₂: prostaglandin I₂ sensitivity

Table 2 Relationships among platelet parameters in various diseases

Combination		R	Combination		R
PAR	-ADP agg.	-0.345	ADP agg.-β-TG		0.509*
PAR	-Coll. agg.	-0.420*	Coll. agg.-Adr. agg.		0.450*
PAR	-Adr. agg.	-0.433*	Coll. agg.-PGI ₂		0.379*
PAR	-PGI ₂	-0.280	Coll. agg.-β-TG		0.446*
PAR	-β-TG	-0.335	Adr. agg.-PGI ₂		0.497*
ADP agg.-Coll. agg.		0.817*	Adr. agg.-β-TG		0.441*
ADP agg.-Adr. agg.		0.585*	PGI ₂ -β-TG		0.553*
ADP agg.-PGI ₂		0.448*			

(n=45)
PAR: platelet aggregate ratio
ADP agg.: ADP (-induced)
 aggregation
Coll. agg.: collagen aggregation

*p<0.05
Adr. agg.: adrenalin aggregation
PGI₂: prostaglandin I₂ sensitivity
β-TG: β-thromboglobulin
R: correlation coefficient

Fig. 5 Relationship among platelet parameters in thrombotic disease (2).

Table. 3 Relationships among platelet parameters in thrombotic diseases (1)

	DM		CVA	
	Treat. n=7	Non-treat. n=5	Treat. n=6	Non-treat. n=4
PAR-Adr.	-0.28	-0.63	-0.31	-0.72
PAR-PGI ₂	-0.54	-0.63	-0.41	-0.42
PAR- β -TG	-0.41	-0.91	-0.45	-0.42
Adr.-PGI ₂	0.43	0.93	0.21	0.63
Adr.- β -TG	0.48	0.85	0.41	0.52
PGI ₂ - β -TG	0.51	0.82	0.66	0.68

PAR: platelet aggregate ratio
 Adr.: adrenalin-induced aggregation
 PGI₂: prostaglandin I₂ sensitivity
 β -TG: β -thromboglobulin

DM: diabetes mellitus
 CVA: cerebrovascular attack
 Treat.: treatment
 Non-treat.: non-treatment

面、諸家の報告³⁾⁸⁾ならびに今回の実験 DIC の成績から推して、急性 DIC のごとき激しい病態では PAR も大きく変化するが、軽度の病態では必ずしも PAR 変動は捉え難いという弱点もあわせもっている。その理由としてわれわれの PGI₂ 感受性試験の検討成績⁷⁾ (in vitro で ADP 凝集が PGI₂ 添加により、容易に解離し非血栓性疾患に比し血栓性疾患で有意に PGI₂ 感受性が低下する) からみて、in vivo でも弱い血小板凝集は PGI₂ によって解離する可能性があるのでと考えられる。これが PAR で表現する本法の測定上の特徴であり限界であって、本法に対する評価のわかれる主な原因と思われる。他に採血手技の巧拙も影響要因となるであろう⁹⁾。今回の臨床的検討成績で、糖尿病および脳血管障害の未治療例でのみ PAR は有意に低下し MAR, PGI₂ 濃度および β -TG 値と高い相関性を示したことは、上述の考えを支持するものである。

われわれは昭和51年2月より日常検査として MAR (ADP, コラゲン, アドレナリン) 測定を行なっているが、血栓状態の予知指標としてアドレナリン凝集能の上昇を重視している⁶⁾。しかし、これとて in vitro 法であり、統計上の根拠から採用しているにすぎず、確かな実証はない。In vivo 法としては本法以外、簡便な方法も知られておらず、また in vitro 法として血小板寿命あるいは血小板特異蛋白 (β -TG, 血小板第4因子) 放出能の測定も、実施

には制約のある現状では、本法と MAR の組み合わせが血栓状態のスリリーニング法として実用的かも知れない。この点に関しては例数を重ねて検討中である。

要は本法の特徴ないし限界を認識した上で反復測定、症例の選択、他法との併用を適宜行なって、本法の有用性を見直すべきであろう。抗血小板療法の普及してきた現在、日常検体の増加に対処するためにも、これらの検討は重要と思われる。

結 語

簡易な in vivo 血栓予知法としての Wu & Hoak 法の再評価を試みた。その結果、本法は未治療の血栓性疾患における血栓形成の予測に役立つと思われるが、日常検査に導入するためには、本法の測定限界を認識するとともに、なお、使い方に検討の余地があると考えられる。

文 献

- 1) Wu, K.K. and Hoak, J.C.: A new method for quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet*, **ii**; 924~926, 1974.
- 2) 佐野忠弘, 山崎博男: 血小板機能検査法の進歩と血栓予知. *日本臨牀*, **36**; 3836~3841, 1978.
- 3) Packham, M.A.: Method for detection of hypersensitive platelets. *Thromb. Haemostas.*, **40**; 175~195, 1978.

- 4) Olsson, J.E.: Comparison between induced platelet aggregation and circulating platelet aggregates as platelet function tests in patients with transient ischemic attacks. *Acta Neurol. Scand.*, **65**; 122~132, 1982.
- 5) Dettor, A.G., Quintavalla, R. and Poli, T.: Circulating platelet aggregates in diabetes mellitus. *Acta Haematol.*, **96**; 65~66, 1983.
- 6) 磯部淳一, 中西まみ子, 浜井洋子, 丸伝信江, 楠本昌子, 田原口経貞: 血小板凝集能測定の臨床的意義. *臨床病理*, **28**; 799~803, 1980.
- 7) Jun-ichi Isobe and Akira Mizuno: A prospective method for thrombotic diseases using prostaglandin I₂. *Tokushima J. Exp. Med.*, **29**; 95~101, 1982.
- 8) 小池周子, 栢木典子, 高橋郁子, 塚田理康: in vivo における血小板凝集検査について—基礎的検討と in vitro 法との比較—. *臨床病理*, **31**(補); 80, 1983.
- 9) 磯部淳一, 水野 昭: 易血栓状態における血小板の形態変化. *臨床病理*, **31**; 603~608, 1983.

● 周産(生)期感染症の臨床指針書!

妊婦・胎児・新生児の感染症

編集 日本周産(生)期医学研究会 専門医91氏分担執筆

B5判 289頁 図102 表175 定価9,800円(〒350円)

本書は周産(生)期医学の立場に立って問題の多い妊婦, 胎児, 新生児の感染症を再検討し, ウィルス, マイコプラズマ, 原虫, 細菌を含めて, 新しく見出された疾患, 従来より知られた感染症を現代の進歩したウィルス学, 細菌学および免疫学より洗い直し, 産婦人科医, 小児科医の実地診療上必要な感染症の臨床指針書である。

●内容: 【妊婦の感染症】1. 妊婦感染症, 2. 化学療法, 3. 産褥感染症, 4. 妊婦慢性腎盂腎炎, 【胎児の感染症】1. 胎児感染症の化学療法, 2. 先天性トキソプラズマ症, 3. サイトロメガロウィルス感染症, 4. HBs抗原と垂直感染, 5. B型肝炎ウィルスの垂直感染, 6. B型肝炎ウィルスの母児間伝播, 7. 前期破水, 分娩遷延と未熟児感染症, 8. 感染の母児相関, 9. 新生児肺炎と産科的異常, 10. 妊婦予防接種の胎児への影響, 【新生児の感染症】1. 新生児感染症, 2. 新生児と抗生物質, 3. 新生児感染症の診断と治療, 4. 先天性免疫不全症と新生児敗血症, 5. 予後不良であった新生児細菌感染症, 6. 未熟児室における感染症の集団発生, 7. 新生児室内感染, 8. 細菌培養と感受性検査, 【周産期感染症と免疫】1. 妊婦の感染と免疫, 2. 胎児感染と免疫, 3. 新生児感染症と免疫, 4. 初乳の免疫に関する役割。