原 著

Bモード超音波による血小板凝集の形態学的検査

町 淳 二*

Morphological evaluation of platelet aggregates
by B-mode ultrasound method

Junji MACHI*

Key words: high resolution B-mode ultrasound, platelet
aggregation, size and sedimentation of
platelet aggregate, shear rate of flow

A new method to detect and measure platelet aggregates in vitro was devised using high resolution real-time B-mode ultrasound. Platelet rich plasma (PRP) was circulated in 9 mm diameter vertical and horizontal tubes at mean shear rates from 60 to 0 sec⁻¹. Platelet aggregates were induced by ADP, imaged by ultrasound, and measured by computer analysis of images. Untreated PRP was sonolucent, while platelet aggregates were noted by ultrasound as clusters of echoes. Individual aggregates increased in size (cross-sectional area) from less than one mm² at the highest shear rate to approximately 24 mm² at stasis. These aggregates tended to sediment toward the dependent wall of horizontal tubes at shear rate lower than 10 sec⁻¹.

Ultrasonic aggregometry of platelets provides a valuable means to morphologically evaluate platelet dynamics in large caliber tubes under controlled flow conditions in vitro. In addition, it may present a technique for extending the study of platelet aggregation to in vivo and clinical situations.

はじめに

血小板や血小板凝集 (platelet aggregation, PA) の形態学的検索あるいは凝集過程の検査は、従来より主として、顕微鏡検査¹⁾ならびに光透過性を利用した platelet aggregometry²⁾に

より行われてきた。光顕・電顕の観察は優れた解像力を有し、血小板内部構造の解明も可能であるが、一般に血小板を固定後検査することになる。また、aggregometry は PA の際の血小板の shape change, first and second phase of aggregation を検査する上で最も広く応用され

* イリノイ大学医学部外科 (シカゴ), Department of Surgery, University of Illinois at Chicago, Illinois, U.S.A.

Fig. 1 A series of sonograms showing ultrasonic echoes resulting from ADP-induced platelet aggregates at various shear rates of flow in a vertical tube. The aggregates are depicted by ultrasound as clusters of echoes. With decreasing shear rate, progressive increase in size of platelet aggregates was noted. Arrows indicate the upward direction of flow. The superficial and deep walls of the tube in reference to ultrasonic transducer are marked (sw) and (dw), respectively.

ているが、流体力学的に一定条件下の PA を直接的に観察できない。したがってこれら従来の方法においては、コントロールされた血流下における PA のダイナミックス（動態）を、直接画像として検索することは不可能であった。強いといえば、光顕的に微小循環系における PA をとらえることは可能であるが、この方法は太い内腔の血管には不適當である。

そこで著者は、高周波数を有する B モード超音波が赤血球の凝集を検出できる³⁻⁵⁾ ことに着目し、この方法を用いて PA の形態学的検査を試みたので、その結果を報告する。この *in vitro* の実験では、比較的太い内腔をもつ循環システム内において、一定の条件下で流動する血小板凝集塊を超音波的に観察した。

I. 実験方法

ラテックス（長さ 5 cm）とビニール（長さ 38 cm）チューブ（内径 9 mm）よりなる既報^{3,5)} の *in vitro* 閉鎖性循環装置を用い、PA の動態を B モード超音波装置（High Stoy, 周波数 10 MHz）によって検索した。20~35 歳の正常人 10 人から得た platelet rich plasma (PRP)（血小板数 $2.5 \sim 4.5 \times 10^5/\text{mm}^3$ ）を、このチューブ内に内圧 150 mmHg になるよう満たし、拍動性ポンプにより種々の速度にて循環させた。ラテックスチューブ部分およびその部位をスキニングする超音波プローブは、acoustic coupling

を得るため水浸し、チューブ縦断面がスキャンできるように固定した。循環系チューブは PA の大きさならびに沈降（sedimentation）測定の目的で、それぞれ垂直位および水平位に保持した。PRP を循環させた状態で、チューブ側管より adenosine diphosphate (ADP) を最終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるよう注入し、血小板が凝集する前後で PRP を超音波にて観察した。ポンプの速度とチューブ内径より shear rate（剪断力, SR）を算出し^{3,5)}、 $60 \sim 0 \text{ sec}^{-1}$ 間の 6 ポイントにおいて超音波撮影を行い、PA の大きさ（断面積）および沈降程度を画像のコンピュータ処理によって分析した。

II. 結 果

PRP 自体は、本実験の SR 下では常に sonolucent であった。一方、ADP 注入後 PA は、超音波により echogenic な凝集塊として検出され、これらの echogenic な凝集塊は光顕的に血小板より成り立っていることが確認された。垂直位のチューブ内において、PA はポンプ作動によって反重力方向（上方向）に、チューブ壁に付着することなく流動した。SR の高値（速い流速）の状態では、PA の大きさは比較的小さくチューブ内にほぼ均一に分散していたが、SR 低下とともに PA は互いに付着しあい、SR 10 sec^{-1} 以下ではことにその大きさを増した（図 1）。特に SR 約 3 sec^{-1} 以下にて、巨大化

Table 1 Mean cross-sectional areas of platelet aggregates at various shear rates measured by computer analysis of ultrasound results.

Shear Rate (sec^{-1})	Cross-Sectional Area (mm^2)
60.0	0.72 ± 0.14
22.6	0.82 ± 0.09
13.2	1.19 ± 0.34
5.5	2.89 ± 0.78
1.6	8.29 ± 2.14
0.0	23.63 ± 5.21
(mean $\pm$ S.D.)	

したPAはプラズマの流れ（上方向）に反して重力によって下方向に沈降した。表1は、10回の実験での各SR下におけるおのおののPAの平均断面積を示す。60 sec^{-1} ではPAは1 mm^2 以下であったが、10 sec^{-1} 以下で急激に大きさを増し、0 sec^{-1} （静止状態）では約24 mm^2 に達した。

次に、水平位チューブを用いた実験を通して、PAはSR低下による大きさの増大とともに、重力によってチューブ後壁に向かって沈降することが判明した。このPAの沈降は、主としてSR 10 sec^{-1} 以下において観察された（図2）、各SR下でのPA沈降の程度は、超音波画像上チューブ後半分（チューブ中央線より後壁までの間）に存在するPAの合計量を、チューブ全体（チューブ前壁と後壁の間）に存在するPAの量で割った値（%）で示した。表2はその結果であるが、SR 10 sec^{-1} 以上ではこの値は約50%（すなわちPA沈降なし）であったが、SR 5.5 sec^{-1} で約70%、1.6 sec^{-1} で約90%、0 sec^{-1} で約100%に上昇した（SR 10 sec^{-1} 以下におけるPAの沈降程度は統計的にも有意であった）。垂直位・水平位いずれのチューブ内においても、0 sec^{-1} で増大し沈降したPAは、再びSRを上昇させるとその大きさを減少し、分散しながら流動した（凝集塊の部分的な解離現象）。

III. 考 察

赤血球凝集が高周波数を用いたBモード超音波によって検出できることを報告した³⁻⁵⁾、

Fig. 2 A series of sonograms demonstrating platelet aggregate echoes at varying shear rates in a horizontal tube. Progressive enlargement of aggregates with reduced shear rates was present, and subsequent sedimentation of aggregates on the dependent wall (dw) of the tube occurred at the shear rate below 10 sec^{-1} . Arrows indicate the direction of flow.

今回の実験ではこの方法を血小板凝集の形態学的検索に応用した。その結果、超音波検査法がin vitroのPAを検出でき、その動態を直接画像上で検索できることが判明した。ことにコントロールされたSR下において、PAの動態（大きさおよび沈降の変化）をリアルタイム像として観察可能であることは意義あることであろう。今回用いた超音波の周波数は10 MHzであり、その解像力は0.3~0.4 mm程度である。したがって、個々の血小板や小さな凝集塊は描出できないが、ADPによって誘発された比較的大きな凝集塊（macroaggregates）を検出・測定することが可能であった。

Table 2 Sedimentation of platelet aggregates at various shear rates.

Shear Rate (sec ⁻¹)	% Sedimentation (%)	Significance of Sedimentation
60.0	50.11 ± 2.49	P > 0.8
22.6	50.73 ± 2.03	P > 0.6
13.2	51.92 ± 3.23	P > 0.6
5.5	68.63 ± 4.28	P < 0.002
1.6	87.80 ± 3.27	P < 0.0001
0.0	99.60 ± 0.45	P < 0.0001
(mean ± S.D.)		(t-Test)

この実験を通して、PA の大きさ・沈降程度が、SR 依存性であることが示された。フィブリノーゲンなどの macromolecules のブリッジングによる赤血球凝集が SR 依存性である³⁻⁵⁾ ことと同様に、本実験の PA も ADP によるフィブリノーゲンブリッジング⁶⁾ に起因するため SR に依存することが推測される。特に低 SR 下 (10 sec⁻¹ 以下) では、PA は極めて巨大化する。臨床的には血流の低下や渦流 (vortex) 内において低 SR 状態が出現する^{7,8)} が、このような条件下では血流内に巨大な PA が誘発され、静脈血栓の誘因になったり、macroaggregate embolization の原因ともなることが予測される。

B モード超音波による PA の画像検査にはいくつかの長所短所がある。今回の超音波装置では、顕微鏡によるような高度の解像力は得られない。すでに木村らは周波数 3.5 MHz の装置を用いた in vitro の実験を通して、超音波検査は赤血球フィブリン血栓、血小板フィブリン血栓ならびに全血血栓を明瞭に描出できるが、これらの血栓は超音波画像上差がみられなかったと報告している⁹⁾。同様に 3-10 MHz 程度の装置の解像力では、血小板凝集塊と赤血球凝集塊の鑑別は困難と思われる。しかし解像力に関しては、超音波顕微鏡¹⁰⁾ などのさらに高い解析力をもつ装置の導入が今後可能である。また、超音波検査では、platelet aggregometry で得られるような詳細な血小板凝集過程を判別できない。

一方、超音波 PA 検査の長所として、コントロールされた血流下 (一定の SR 下) における PA の動態をリアルタイムの画像として描出できる点があげられる。ことにこの検査は、太い

内腔のチューブ (あるいは血管) に対しても応用できる。さらに、得られた超音波画像をコンピュータ分析することによって、PA の大きさや沈降を算出可能である。そこで、この新しい PA 検査法を従来の方法に加えて利用することは、PA の形態学的検索を行う上で、実験上・臨床上意義あることと考える。今後は、B モード超音波検査法の技術や装置の改良とあいまって、この方法が in vitro ばかりでなく、in vivo の実験や、この検査法の安全性を考慮して実際の臨床にも応用されることが期待される。

文 献

- 1) Baumgartner, H.R. and Haudenschild, C.: Adhesion of platelets to subendothelium. Ann. New York Acad. Sci., **201**; 22~36, 1972.
- 2) Born, G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, **194**; 927~929, 1962.
- 3) Sigel, B., Machi, J., Beitler, J.C., Justin, J.R. and Coelho, J.C.U.: Variable ultrasound echogenicity in flowing blood. Science, **218**; 1321~1323, 1982.
- 4) Machi, J., Sigel, B., Beitler, J.C., Coelho, J.C.U. and Justin, J.R.: Relation of in vivo blood flow to ultrasound echogenicity. J. Clin. Ultrasound, **11**; 3~10, 1983.
- 5) Sigel, B., Machi, J., Beitler, J.C. and Justin, J.R.: Red cell aggregation as a cause of blood flow echogenicity. Radiology, **148**; 799~802, 1983.
- 6) Bennett, J.S. and Vilaire, G.: Exposure of

- platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. J. Clin. Invest., **64**; 1393~1401, 1979.
- 7) Grabowski, E.F., Franta, J.T., and Didisheim, P.: Platelet aggregation in flowing blood in vitro. II. Dependence of aggregate growth rate on ADP concentration and shear rate. Microvas. Res., **16**; 183~195, 1978.
- 8) Karino, T. and Goldsmith, H.L.: Aggregation of human platelets in an annular vortex distal to a tubular expansion. Microvasc. Res., **17**; 217~237, 1979.
- 9) 木村道夫, 小島 研司, 花野 政晴, 矢沢良光, 和泉 徹, 服部 晃, 紫田昭: 断層エコー法による血栓描出の基礎的検討. 血液と脈管, **14**; 333~336, 1983.
- 10) Kessler, L.W.: A review of progress and applications in acoustic microscopy. J. Acoust. Soc. Am., **55**; 909~918, 1974.

●わが国唯一のビタミンB₁₂研究の完全な集大成!

ビタミンB₁₂ —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医24氏分担執筆

A 5判 367頁 図157 表73 定価7,800円(〒300円)

ビタミンB₁₂は最も新しく発見されたものであるが、その構造の特異性や作用の独自性から、その研究の進歩は著しいものがある。最近では、その同族体の臨床応用が広がってきたものの、生化学、酵素学などの基盤にたった合理的な使用法はまだほど遠い所にある。本書はわが国でのB₁₂研究を現時点で集大成し、関係各方面の研究者に便ならしめた。

●内容: 第1章 ビタミンB₁₂研究の進歩と問題点, 第2章 ビタミンB₁₂の吸収, 第3章 ビタミンB₁₂の腸管吸収機構, 第4章 Whole body counterのビタミンB₁₂吸収試験ならびにB₁₂代謝への応用, 第5章 悪性貧血と胃の自己免疫, 第6章 悪性貧血の成因に関する自己免疫の考察, 第7章 ビタミンB₁₂の生体内転換利用, 第8章 ビタミンB₁₂結合蛋白, 第9章 Acid-resistant binding capacity と "granulocyte related" binding proteinについて, 第10章 トランスコバリンII欠乏症, 第11章 ビタミンB₁₂のradioassay, 第12章 ビタミンB₁₂と薬酸代謝, 第13章 ビタミンB₁₂と中毒, 第14章 巨赤芽球性貧血, 第15章 尿中メチルマロン酸排泄とビタミンB₁₂代謝, 第16章 高ビタミンB₁₂血症, 第17章 ビタミンB₁₂代謝と神経系, 第18章 ビタミンB₁₂と神経疾患。