原 著

糖尿病患者におけるヘパリンと血小板
放出反応について大木 康雄* 中尾 一清* 島野ちか子*
松尾 武文* 松尾 理**

Heparin and platelet release reaction in diabetes mellitus

Yasuo OHKI*, Kazukiyo NAKAO*, Chikako SHIMANO*,
Takefumi MATSUO* and Osamu MATSUO**

Key words: platelet factor 4, heparin, release reaction,
diabetes mellitus, diabetic retinopathy

To study the platelet factor 4 (PF-4) concentrations after intravenous injection of heparin, blood samples from 6 normals and 50 patients with diabetes mellitus were collected.

The diabetics were divided into four groups according to the complication of retinopathy and condition of control.

The plasma level of PF-4 were measured before and 15, 30 and 60 minutes after heparin injection.

The results showed that the plasma level of PF-4 in diabetic groups were slightly higher than the normal controls, but no statistical differences.

The PF-4 level in plasma at 15 minutes after heparin injection, elevated to the maximum in normal and in all diabetic groups.

The elevation of PF-4 after heparin injection may suggested that platelets in complicated diabetics will be easily activated by heparin. And these increased platelet activation may contribute the aggravation of diabetic retinopathy.

The diabetics without complication and good control group showed to depress in comparison with other groups.

The platelet aggregation was increased according to the aggravation of complication but in normals and diabetics without complication and good control group did not increased the platelet aggregation. So these differences may be

* 兵庫県立淡路病院内科 [〒656 洲本市下加茂 1-6-6], Hyogo prefectural Awaji Hospital, Hyogo, Japan.

** 近畿大学医学部生理, Department of Physiology, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan.

effected by the platelet numbers that in normals are higher than diabetics or may suggest another reason, perhaps the endothelial surface.

緒 言

血小板凝集に際して、血小板 α 顆粒より放出される血小板特異蛋白である血小板等4因子(PF4)や β -トロンボグロブリン(β -TG)は、生体内における血小板活性化の指標として、動脈硬化に起因する血管病変や動脈血栓症で測定されている^{1,2)}。一方ヘパリンが生体内に投与されると、その機序はまだ明らかにされていないが、ADPやアドレナリンによる血小板凝集能の亢進^{3-5,6)}やヘパリン惹起性血小板減少症⁶⁾などが報告されている。

今回われわれは、ヘパリン静注によるヘパリン中和物質であるPF-4の放出をみるために、健常人および糖尿病患者を対象として糖尿病患者の病態とヘパリンによるPF-4の放出について経時的に測定し検討を行った。

I. 対象と方法

対象は健常人6名(27歳~52歳)と本院通院中および入院中の糖尿病患者50名(23歳~80歳)とし、糖尿病患者は、糖尿病性網膜症の合併の有無により、非合併群30名と合併群20名の2群に分類し、おのおのの群をさらに食後2時間における血糖値が6か月以上にわたり170 mg/dl以下にコントロールされている良好群と171 mg/dl以上のコントロール不良群に分類した。

ヘパリンの静注はカプロシン5,000単位の1回とし、採血は、テオフィリン、PGE₁を含むEDTA溶液1に対し全血5の割合で、ヘパリン静注前、静注後15分、30分、60分の4回行い、PF4の測定は、RIA法で行った。

II. 結 果

1. ヘパリン静注前のPF4値

ヘパリン静注前のPF4値を健常人および糖尿病の各群で比較した(図1)。健常人(N)では 6.1 ± 3.0 ng/mlに対し、糖尿病全例の平均値は 7.7 ± 3.9 ng/mlであった。糖尿病患者のう

Fig. 1 Plasma level of PF-4 before heparin injection

N: normal DM: diabetes mellitus
DM(-): without diabetic retinopathy
DM(+): with diabetic retinopathy
g: good control
p: poor control

ち網膜症合併の有無でみると、網膜症非合併群(DM(-))では 7.4 ± 2.4 ng/mlであり、合併群(DM(+))では 7.9 ± 5.8 ng/mlであった。

これら各群についてコントロールの良否で比較すると、網膜症非合併群のうち、コントロール良好群(g)では 6.3 ± 2.6 ng/mlであり健常人と比較しても差がみられなかった。一方コントロール不良群(p)では 8.0 ± 2.4 ng/mlとわずかに高値を示した。糖尿病性網膜症を合併する群についてコントロール状態で比較すると、コントロール良好群でも 8.6 ± 3.4 ng/mlと高値を示し、コントロール不良群の 7.6 ± 3.4 ng/mlと比較してもコントロールの良否でPF-4値には差がみられなかった。網膜症の合併によりPF-4値の上昇がみられたが各群間には有意の差を認めなかった。

Fig. 2 Time course of PF-4 and plasma heparin concentration on healthy control

Fig. 3 Time course of PF-4 and platelet numbers on healthy control

2. 健常人における PF-4 値の変化

健常人6名に対して5,000単位のヘパリンを静注し、ヘパリンの血中濃度とPF4の経時的变化をみた(図2)。ヘパリン静注前の血中ヘパリン濃度は 0.03 ± 0.02 U/mlであったが、静注後15分では 0.67 ± 0.2 U/mlと上昇し、その後は経時的に減少した。一方PF4は、ヘパリン静注前に 6.1 ± 3.0 ng/mlであったのが、静注後15分では 62.9 ± 10.4 ng/mlと上昇した後30分で 42.5 ± 10.1 ng/ml、60分で 16.2 ± 5.6 ng/mlと減少し、PF-4の上昇はヘパリン濃度の最も高い時期に一致して頂値を示した。また同時に測定した血小板数の変化は図3に示すように、ヘパリン静注前が 26.6 ± 3.3 万であったのがヘパリン静注後15分では 24.4 ± 3.8 万と減少し、30分でも 21.9 ± 3.4 万とさらに減少したのち60分には 23.1 ± 3.4 万と増加し、ほぼ前値に復した。

3. 糖尿病性網膜症の合併でみた PF-4 の変化

糖尿病患者を網膜症合併の有無により分類し、その2群間でヘパリン静注後のPF-4の変化を比較した(図4)。実線で示す網膜症合併群では、静注前値は 7.9 ± 5.8 ng/mlであったのが、15分では 58.3 ± 15.1 ng/mlと増加を示

Fig. 4 Time course of PF-4 on with or without diabetic retinopathy

したが、30分で 35.1 ± 13.9 ng/ml、60分で 19.2 ± 13.9 ng/mlと減少した。一方、点線で示す網膜症非合併群では、静注前に 7.4 ± 2.4 ng/mlであったPF-4値が15分で 56.8 ± 18.1 ng/mlへと増加したのち、30分で 36.7 ± 10.9 ng/ml、60分で 18.0 ± 9.6 ng/mlと減少した。両群間を比較してもPF-4値の増加には有意の

Fig. 5 Time course of PF-4 on good or poor control groups without diabetic retinopathy

Fig. 6 Time course of PF-4 on good or poor control groups with diabetic retinopathy

差がみられなかった。

4. 糖尿病のコントロールと PF-4 の変化

網膜症非合併群と合併群について糖尿病のコントロール状態によるヘパリン静注後の PF-4 の変化を検討した。

1) 網膜症非合併群

糖尿病性網膜症の非合併群をコントロールの良否で比較すると (図 5) 実線で示すコントロール不良群では、ヘパリン静注前に 8.0 ± 2.4 ng/ml であったのが、静注後 15 分では 61.9 ± 17.4 ng/ml と増加したのち、30 分で 36.4 ± 9.4 ng/ml、60 分で 18.8 ± 10.5 ng/ml と減少した。一方点線で示すコントロール良好群では、静注前が 6.3 ± 2.6 ng/ml であったのが、15 分では 43.4 ± 11.1 ng/ml と増加し、30 分で 31.0 ± 13.5 ng/ml、60 分で 15.7 ± 6.1 ng/ml と減少した。この両群間におけるヘパリン静注後 15 分での PF-4 値を比較すると、コントロール良好群の上昇はコントロール不良群に対して有意の ($p < 0.02$) の低値を示した。

2) 網膜症合併群

糖尿病性網膜症の合併群についても非合併群と同様にコントロール状態でヘパリンに対する変化を比較した (図 6)。

Fig. 7 Plasma level of PF-4 at 15 minutes after heparin injection

実線で示す網膜症合併群でコントロール不良群では、静注前が 7.6 ± 3.4 ng/ml であったが、15 分では 53.8 ± 8.9 ng/ml と増加し、30 分で 30.9 ± 9.6 ng/ml、60 分で 16.8 ± 11.6 ng/ml と減少した。一方点線で示すコントロール良好群では、静注前が 8.6 ± 8.0 ng/ml であったの

が、15分で $59.9 \pm 18.6 \text{ ng/ml}$ と増加し、30分で $38.2 \pm 15.4 \text{ ng/ml}$ 、60分で $21.1 \pm 15.0 \text{ ng/ml}$ と減少した。これら糖尿病性網膜症合併群では、糖尿病のコントロール良好群でも網膜症非合併群でみられたような PF-4 値の有意差は認めなかった。

6. ヘパリン静注後15分における PF-4 値

ヘパリン静注後に PF-4 値の最も上昇した15分における値を糖尿病の各群比較した (図7)。

糖尿病全例での平均値は $57.5 \pm 17.1 \text{ ng/ml}$ であった。そのうち糖尿病性網膜症を合併していない群 (DM (-)) では、コントロール良好群 (g) は $43.4 \pm 11.1 \text{ ng/ml}$ であり、コントロール不良群では $61.9 \pm 17.4 \text{ ng/ml}$ であり、コントロール良好群は不良群に比較して有意の低値であった ($p < 0.02$)。一方糖尿病性網膜症を合併する群ではコントロール良好群が $53.8 \pm 8.9 \text{ ng/ml}$ であり、コントロール不良群も $59.9 \pm 18.6 \text{ ng/ml}$ と両群共に高値を示し、コントロールの良否による PF-4 の上昇に有意の差はみられなかった。ヘパリン静注後15分における PF-4 値は、網膜症非合併群でコントロール良好群のみがいずれの群に比較しても有意な PF-4 値の上昇が少なかった。

III. 考 按

ヘパリンにより、血小板粘着や凝集能の亢進、血中 PF-4 の増加することが知られている。今回、健常人および糖尿病患者にヘパリンの静脈内投与を行い、糖尿病患者では糖尿病性網膜症の合併の有無と糖尿病のコントロール状態による PF-4 の変化を経時的に測定した。

ヘパリン静注による PF-4 の変化は、静注後3分で頂値に達し、その後減少することを Davi らが報告している¹¹⁾。今回の検討でも健常人、糖尿病群共に静注後15分で頂値を示し、その後経時的に減少した。

ヘパリン静注前の PF-4 値は健常人と合併症のない糖尿病群が最も低値であり、網膜症を合併し、コントロールが悪い群で最も高値を示した。糖尿病患者では、網膜症の合併、コントロールの状態、治療方法により血小板凝集能に変化がみられ、合併症の進展やコントロールの悪

化により血小板凝集能は亢進する⁷⁾。このことから血小板凝集能の亢進した症例では、PF-4 の放出も亢進していると考えられる。一方、ヘパリン静注後の PF-4 の変化は、健常人と糖尿病群全例で比較すると有意の差はみられなかったが、糖尿病群のうち合併症のない、コントロールの良好群とでは有意にコントロール良好群が低値を示した。

PF-4 は血小板の α 顆粒に存在する血小板特異蛋白ではあるが、血小板以外にも血小板や血管内皮に多量に存在しており⁹⁾¹⁰⁾、ヘパリン静注により、PF-4 は増加するが β -TG の増加がほとんどみられないことから¹¹⁾、血管壁由来の PF-4 が考えられる¹²⁾。Dawes¹³⁾らの報告では、健常人でのヘパリン静注時の PF-4 は血小板由来が約5%であるとしていることから、血小板凝集能の亢進していない健常人や合併症のない糖尿病では、血小板由来の PF-4 はきわめて少ないと考えられる。しかし、血管合併症やコントロールの悪化した糖尿病群では、血小板由来の PF-4 の割合が増加していると考えられる。

ヘパリン静注時の PF-4 値で健常人と合併症のないコントロール良好な糖尿病群で差がみられたが、血小板凝集能はいずれの群でも亢進がみられないため凝集能の亢進による差とは考えられない。しかし、血小板数をみると健常人では 27.0 ± 3.2 万であるのに対して糖尿病群では 22.2 ± 4.1 万と健常人の方が多く、血小板数の差によるものかも知れない、またヘパリン静注時にみられる大量の PF-4 は血管壁由来であるために血管壁からの差であるかも知れない。このため PF-4 の由来を知るためにも Dawes¹²⁾らの報告にみられるようにヘパリンによるヘパリン中和物質としての PF-4 と血小板由来の PF-4 を区別して検討する必要があると考えられた。

結 論

健常人および糖尿病患者にヘパリン 5,000 単位の1回静注を行い、PF-4 の経時的变化を検討し、以下の結論を得た。

1. ヘパリン静注前の PF-4 値は健常人で最

も低く、合併症を有するコントロール不良の糖尿病で高値を示した。

2. 健常人、糖尿病群共にヘパリン静注後15分で頂値となり、その後減少した。

3. 血小板数はヘパリン静注により減少し、ヘパリン血中濃度と逆相関を示した。

4. ヘパリン静注後の PF-4 値は、糖尿病群のうち、合併症の無いコントロール良好群で最も低い値を示した。

5. 健常人と糖尿病非合併群でコントロール良好群との PF-4 の差は、血小板数または、血小板以外の PF-4 によると考えられた。

文 献

- 1) Kaplan, K.L. and Owen, J.: Plasma level of β -thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood*, **57**; 199~202, 1981.
- 2) Cella, G., Colby, S.I., Tayler, A.D., McCracken, I., Parisi, a. and Sasahara, A.A.: Platelet factor 4 (PF-4) and heparin released platelet factor 4 (HR-PF4) in patients with cardiovascular disorders. *Thromb. Res.*, **29**; 499~509, 1983.
- 3) Thomson, C., Forbes, C.D. and Prentice, C. R.M.: The potentiation of platelet aggregation and adhesion by heparin in vitro and in vivo. *Clin. Science and Molec. Med.*, **45**; 485~494, 1973.
- 4) Salzman, W.E., Rosenberg, D.R., Smith, H. M., Lindon, N.J. and Favreau, I.: Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J. Clin. Invest.*, **65**; 64~73, 1980.
- 5) Rao, K.A., N., Niewiarowski, S., James, P., Holt, C.J., Elfenbein, B. and Bastl, C.: Effect of heparin on the in vivo release and clearance of human platelet factor 4. *Blood*, **61**; 1208~1214, 1983.
- 6) Zalcborg, J.R., McGrath, K., Dauer, R. and Wiley, J.S., Heparin induced thrombocytopenia with associated disseminated intravascular coagulation. *Br. J. Haematol.*, **54**; 655~660, 1983.
- 7) Davi, G., Rini, G.B., Averna, M., Difede, s., Mattina, A., Notarabartolo, A. and Strano, A.: Enhanced platelet release reaction in insulin-dependent and insulin-independent diabetic patients. *Haemostasis*, **12**; 275~281, 1982.
- 8) Moor, S., Pepper, D.S. and Cash, J.G.: Platelet antiheparin activity. Isolation and characterization of platelet factor 4 released from thrombin aggregated washed human platelets and its dissociation into subunits and the isolation of membrane-bound antiheparin activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **379**; 383, 1975.
- 9) O'Breien, J.R., Finch, W. and Clerk, E.: Plateletbond and soluble platelet factor 4: effects of aggregating agents of aggregation, and of aspirin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **134**; 1128~1131, 1970.
- 10) 佐藤マキ, 遠藤安行: β -トロンボグロブリンと血小板第4因子について. *臨床検査*, **28**; 14~19, 1984.
- 11) Davi, G.B., Averna, M., Novo, S., DiFede, G., Mattina, A., Notarbartoro, A., and Stano, A.; Enhanced platelet release reaction in insulin-dependent and insulin-independent diabetic patients. *Haemostasis*, **12**; 257~281, 1982.
- 12) O'Breien, J.R., Ethrington, D. and Pashley, M.: Intra platelet factor 4 and the heparin mobilisable pool of PF4 in health and atherosclerosis, *Thromb. Haemostas.*, **354**; 354~357, 1984.
- 13) Dawes, J.P., Pumphey, C.W., McLean, M., Drowse, C.V. and Popper, D.S.: The in vivo release of human platelet factor 4 by heparin. *Thromb. Res.*, **26**; 851~861, 1982.