血液検査法

血小板第3因子*

福 武 勝 博** 竹 内 泉**

Key words : phospholipid, blood coagulation.

血小板凝固因子には表1のごとく種々のものが知られているが⁶⁾、すべてが血小板に特異的な成分ではなく、血漿に由来するものもある。しかし血小板第3因子 (platelet factor 3) は血小板に特異的な成分であり、血液凝固過程に重要な役割を果している。

血小板第3因子は内因性血液凝固過程で次の二つの反応段階に関与している。その一つは第Ⅷ因子との共存による第Ⅹ因子の活性化で、他の一つは第Ⅴ因子とカルシウムの共存のもとでの活性化第Ⅹ因子によるプロトロンビンの活性化に関与している。血小板第3因子の凝固促進活性は血小板の α 顆粒中に認められ、その活性物質はペプチド、遊離コレステロール、および不飽和脂肪酸(リノレン酸、アラキドン酸、オレイン酸など)を主成分とするリン脂質より構成される高分子のリポ蛋白分画にあるとされている³⁾。血小板より抽出される脂質分画のうち、phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine は凝固促進活性が強く、さらにその他の inositol phosphatides のような phosphatides もある程度の凝固促進活性を有している³⁾。血小板第3因子の凝固活性はこれらの脂質分画の総合的な作用といえる。

血小板第3因子は次の三つの形で存在しているようである。一つは正常血液にみられる形で、血小板内の α 顆粒中に凝固学的に不活性状態で存在しており、他の二つは血小板に凝血活性を生じた場合で、その一つは血小板膜の表

面に活性型として存在するものであり、残る一つは血小板より凝血学的活性物質として血漿中に放出されたものである。血小板がカオリンなどと接触した際、血小板粘着に引き続いて血小板第3因子は血小板表面にて活性化されるが、その変化は α 顆粒内リン脂質のミセル形成と関係があり、活性化された血小板第3因子は血漿凝固因子の親和力を増加させる。すなわち血小板の膜は凝固因子が適当な条件で反応できるような場としての接触表面となるようである⁴⁾。

血小板放出反応は release inducer によって2つの段階に分けられる。ADP, epinephrine, serotonin などの inducer は dense body 中の adenine nucleotides, serotonin などを放出し (release I), collagen, thrombin のような inducer は release I の他、 α 顆粒中の lysosomal enzymes, 血小板第3因子などを放出させる (release II)。collagen, thrombin などが少量、低濃度の場合は release I と release II の中間の反応をおこすという²⁾。 α 顆粒中の血小板第3因子も collagen, thrombin などにより放出されるが、放出反応の際の血小板膜の機能的変化に引き続き、血小板膜上にて血小板第3因子が凝血促進的に利用される (available) 状態になることも事実のようである²⁾。

血小板第3因子を測定するには活性化された血小板の血小板第3因子能を測定する方法 (platelet factor 3 availability test) などと、血小板内に存在する血小板第3因子量を測定する方

* Platelet factor 3.

** 東京医科大学臨床病理, Katsuhiko FUKUTAKE, Izumi TAKEUCHI : Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan.

表1 血小板因子 (Johnson 1967)⁶⁾

-Platelet Factor	1 (platelet Ac-globulin, adsorbed plasmatic factor V)
-Platelet Factor	2 (fibrinoplastic factor)
-Platelet Factor	3 (platelet lipoproteins)
-Platelet Factor	4 (anti-heparin factor; paracoagulation factor; factor neutralizing the anticoagulant activity of some fibrinogen derivatives).
-Platelet Factor	5 (fibrinogen-like factor, clottable factor)
-Platelet Factor	6 (antifibrinolysin factor)
-Platelet Factor	7 (cothromboplastin or snake venom factor)
-Platelet Factor	8 (antithromboplastin factor)
-Platelet Factor	9 (Ac-globulin stability factor)
-Platelet Factor	10 (serotonin, vasoconstrictor factor)

表2 血小板第3因子能試験での血漿の組み合わせ

試験番号	PRP	PPP
1. 8	正常 0.1ml	正常 0.1ml
2. 7	正常 0.1ml	患者 0.1ml
3. 6	患者 0.1ml	正常 0.1ml
4. 5	患者 0.1ml	患者 0.1ml

法（融解 TGT 法など）とがある。後者は血小板の凍結融解を繰り返すことにより血小板を破壊し、血小板内の第3因子量を測定する方法である。後述する血小板融解をおこなわないトロンボプラスチン形成試験法（TGT法）はトロンビンの血小板への関与が考えられ、platelet factor 3 availability test とは類似しているが、多少意義が異なるようである⁸⁾。collagen などで放出反応を起こさせ、PRP を超遠心し、その上清の凝固活性を測定することにより、血漿中に放出された活性化血小板第3因子を検査する方法も著者によって検討されているが、血小板放出反応の検査法の項で述べるつもりである。

I. 血小板第3因子の測定法

1. トロンボプラスチン生成試験法¹⁾

原理：

トロンボプラスチン生成試験にて、正常吸着血漿、正常血清と被検者の血小板浮遊液を組み合わせると、被検血小板の第3因子活性により凝固時間は限定される。

手技

37°C の恒温槽中の 6 本の小試験管に正常血漿を 0.1ml ずつ入れる。他の 1 本の試験管に正常 BaSO₄ 吸着血漿（5 倍希釈）、正常血清（10

図1 血小板第3因子検量線。

倍希釈)、被検血小板浮遊液を 0.3ml ずつ加え、これに 0.025M, CaCl₂, 0.3ml を加えて秒時計を開始する。その後 0.025M, CaCl₂, 0.1ml と、この混合液 0.1ml を 1 分間の間隔をもって 6 本の小試験管に加え、それぞれの試験管について、混合液添加時からの凝固時間を測定する。基質血漿の最短凝固時間をもって血小板第3因子活性とする。

血小板浮遊液の作製

1) 器具はすべてシリコン塗布したもの、あるいはプラスチック製のものを用いる。

2) 3.13 (あるいは 3.8) % クエン酸ナトリウムと全血を 1 : 9 の割合で混合する。

3) 1,000rpm, 10 分間遠心して、PRP を分離する。

4) PRP を 3,000rpm, 15 分間遠心し、上清の PPP を除去する。

5) 沈渣に生理食塩液を加え、木製棒で混和し、均一に浮遊させる。

6) これを 3,000rpm, 15 分間遠心し、洗滌液

図2 血小板数とカオリン凝固時間との関係。正常者20名の変動幅と平均値。(Hardisty and Hutton, 1965⁵⁾).

をすてる。この操作を3回繰り返す。

7) 洗滌した血小板に生理食塩液を加え、30万/ mm^3 になるように浮遊させる。

検量線の作製

正常血小板浮遊液を、血小板第3因子活性が100%, 50%, 25%, 12.5%となるように倍数希釈し、それぞれについてTGTを用いて最短凝固時間を求める。倍数希釈列を横軸に、凝固時間を縦軸に、両対数グラフで検量線を作製する(図1)。

正常値: 80~120% (基質血漿最短凝固時間9~11秒; 3~5分)。

2. 血小板第3因子能試験(platelet factor 3 availability test)-カオリン・Ca再加時間法⁵⁾

原理

血小板第3因子は流血中では、なんらかの刺激で活性化されるまでは、利用される状態ではないので、カオリンによって血小板第3因子を十分に活性化させて、カルシウム再加時間を測定し、血小板第3因子能を測定する方法である。

手技

1) 正常人および被検者のクエン酸ナトリウム加血液よりPRP, PPPを作製し、血小板数を算定しておく。

2) 表2のような組み合わせで試験管を8本用意する。

図3 カオリン・蛇毒時間(Spaet and Cintron, 1965⁷⁾).

3) No.1の試験管を37°Cの恒温槽中に入れ、よく混和した0.5%カオリン浮遊液(カオリン0.5gをトリス緩衝液100mlに浮遊)0.2mlを加えて秒時計を開始する。

4) 引き続き他の試験管(No.2~No.8)にも各分毎にカオリン浮遊液を加え、37°Cにて振盪しながら保温する。

5) 20分経過したらNo.1からNo.8までののおのの試験管に0.025M, CaCl_2 , 0.2mlを加え、凝固時間を測定する。

判定

PRP中の血小板数が20~60万/ mm^3 の範囲にあり、試験管番号2, 7と, 3, 6の組み合わせの平均値の差が2~3秒以内の時は、被検PRPの血小板第3因子能は異常がないと考えてよい。これらの凝固時間の差が3秒以上あり、試験管番号1, 8と2, 7の凝固時間の平均値に差がなければ(被検血漿に凝固異常がないことを示す), 検量線より血小板第3因子を求められる。

検量線の作製

正常PRPを同一人のPPPで倍数希釈し、カオリン添加による凝固時間を測定し、血小板数との関係を片対数グラフにとる(図2)。

血小板第3因子能指数の算出

(例) 被検PRPの凝固時間 50秒

被検PRPの血小板数 $25 \times 10^4/\text{mm}^3$

図4 カオリン蛇毒時間の検量線.

被検PRPの凝固時間に相当する正常PRPの血小板数

$$1.3 \times 10^4/\text{mm}^3$$

$$\text{血小板第3因子能指数} = \frac{1.3 \times 10^4}{25 \times 10^4} \times 100 = 5(\%)$$

正常値 : 25%以上⁵⁾.

注 :

血漿凝固因子に異常のある患者では、血小板第3因子能指数の算出は困難である。

3. 血小板第3因子能試験 -カオリン・蛇毒時間法⁷⁾

原理

Stypven(Russell Viper Venom) は第Ⅹ因子を直接活性化するが、プロトロンビンがトロンビンに転化する反応系で stypven を添加し、第Ⅴ因子およびカルシウムが十分に存在すれば、この反応系を限定する要素は血小板第3因子ということになる。

手技

1) Stypven (RVV-Wellcome 社製) を、正常 PPP の凝固時間が、リン脂質および 0.025 M, CaCl_2 を添加して20秒程度になるように蒸溜水にて稀釈する。

2) 正常および被検者 PRP 0.9ml を 37°C の恒温槽中に入れ、カオリン浮遊液 0.1ml を加え、秒時計を開始する。試験管は時々振盪する。

3) 5, 10, 15, 20, 25, 30分後に試験管より 0.1ml をとり、Stypven 0.1ml および 0.025 M, CaCl_2 液 0.1ml を加えて凝固時間を測定す

る。最短時間は図3のごとく20分~30分で安定してくるので、その頃の時間で一回計測するだけでもよい。

検量線の作製

正常 PRP を同一人の PPP で倍数稀釈し、カオリン蛇毒時間を測定し、血小板数との関係を両対数あるいは片対数グラフにとる (図4)。被検 PRP の血小板数を算定して、前述のカオリン Ca 再加時間法と同様に血小板第3因子能指数を算出できる。

正常値 : 14~31秒 (平均22秒)⁷⁾.

注 :

本試験は血漿中の第Ⅹ, V, プロトロンビン, フィブリノゲンが減少、あるいは異常であっても、凝固時間が延長する。

文 献

- 1) Biggs, R. and Douglas, A.S. : The thromboplastin generation test. J. Clin. Path., **6**; 23, 1953.
- 2) Day, H. J. and Holmsen, H. : Concepts of the blood platelet release reaction. Ser. Haemat., **4**; 3, 1971.
- 3) de Gaetano, G., Vermeylen, J., et al. : Platelet factor 3; properties and clinical significance, Advance in Experimental Medicine and Biology, **34**; 159, 1972.
- 4) Hardisty, R.M. and Hutton, R. A. : Platelet aggregation and the availability of platelet factor 3. Brit. J. Haemat., **12**; 764, 1966.
- 5) Hardisty, R.M. and Hutton, R. A. : The kaolin clotting time of platelet-rich plasma. Brit. J. Haemat., **11**; 258, 1965.
- 6) Johnson, S.A. : platelets in hemostasis. Academic press., New York, 1967, p. 379.
- 7) Spaet, T.H. and Cintron, J. : Studies on platelet factor 3 availability. Brit. J. Haemat., **11**; 269, 1965.
- 8) 安永幸二郎 : 血小板第3因子能. 臨床検査, **16**; 552, 1972.