血小板拡張に関する研究*

塚原 敏 弘** 白井 達 男** 大橋 勲**
 大竹 喬 二** 清水 一 輝** 梅田 正 法**
 牧 一 正** 風 間 一** 渡 辺 総一郎**
 金子 晴 生** 古 川 溥** 森 下 健**

Key words : Platelet, Platelets function, Platelets spreadability, ATP

緒 言

血小板の形態と機能とを兼ね合わせた検査法である血小板拡張能検査法 (Die Ausbreitungsfähigkeit der Thrombozyten) は Marx (1960) Breddin (1965) らにより開発された検査法であるが、その臨床的意義と拡張機序は必ずしも明確でなく、まだ一般化された検査法とはいえない。私共はこの拡張能の新たな判定法を考案し、拡張機序と臨床的意義について検索しすでに日本血液学会等で発表してきたが、今回はその概略と新たな知見とを報告する。

I. 検査方法

1. 標本作製法

Breddin 法に準じて標本作製した。すなわち、クエン酸ナトリウム^{1/10}容を加えて採血、多血小板血漿を得る。これに生理食塩水を1:9比に加え、スライド上にて30分間の拡張操作を行なう。こ

Fig. 1 Classification of Spreaded Platelets Diameter.

Fig. 2 Classification of Spreaded Platelets Form.

* Studies on spreadability of platelets. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 29, 1975).

** 東邦大学医学部第一内科 [〒143 東京都大田区大森西 6-11-1], Toshihiro TSUKAHARA, Tatsuo SHIRAI, Isao OHASHI, Kyoji OTAKE, Kazuteru SHIMIZU, Masanori UMEDA, Kazumasa MAKI, Hazime KAZAMA, Soichiro WATANABE, Haruo KANEKO, Hiroshi FURUKAWA & Ken MORISHITA: The 1st Department of Internal Medicine, Toho University, School of Medicine, Tokyo, Japan 143.

Fig. 3 Spreadability of Platelets under the influence of Plasma.
left ; none Plasma, right ; added Plasma

の間器具はスライドも含めプラスチックを使用した。なお染色はギムザ液を使用した。

2. 測定法

スライド上の拡張血小板 (図 4 左) 500 個を計測し、直径と形態との二系列で分類する。

直径分類：図 1 の左の表の如く直径で 5 つの群に分け右の図の如くに作図する。次いで平均直径を算出、一視野の血小板数を数える。

形態分類：(図 2) 正常な円型をⅠ型とし、変形血小板をⅡ～Ⅴ型に分け、変形比を算出する。

3. 判定法

正常例は平均直径 $7.88 \pm 0.34 \mu$ であり、直径分布パターンは 3 群がピークで 50% 以上となる特徴がある。変形比は 5% 以下でほとんどがⅡ型で占められ、Ⅳ、Ⅴ型は通常みられない。良好例は平均直径の拡大とピークの右方移動がみられる。悪い例は平均直径の低下とピークの左方移動および変形比の増加がみられる。軽度の障害例は直径の変化は軽度であるが、ピークの 3 群が 50% 以下に低下反面 1 群、5 型および巨大型の増加する平低化パターンを示す。変形比の増加もまみられる。

II. 拡張機序の検索

拡張能に影響を及ぼす諸因子について検索した。

1. 付着 (粘着) との関係

拡張能は多血小板血漿を生理食塩水でうすめ、スライド上に 30 分間静置する拡張操低を行うが、この際にプラスチックに付着した血小板

Fig. 4 Spreadability of Platelets under the influence of ATP.
left ; control, right ; added 1mM ATP.

のみに拡張がみられ浮遊している血小板には拡張がみられない。すなわち、血小板の拡張は付着がきっかけとなり生ずる変化と考える。

2. 血漿因子の影響

正常血小板を洗滌して得た洗滌血小板を検体として以下の実験を試みた。

i) 血漿を加えず、洗滌血小板の生食のみでの拡張をみると、ほとんど拡張を示さない。

(図 3 左)

ii) これに血漿を加えると、ほぼ正常に近い拡張を示す。この事実より拡張には血漿因子が必要といえる。(図 3 右)

iii) 血漿に代り、脱フィブリノーゲン血漿を (トロンビン添加により作製) 用いると拡張は強く阻害される。

iv) 血漿の代りに血清を用いるとほとんど拡張を示さない。この事実より血漿因子中、特にフィブリノーゲンは重要な役割りを果していると思われる。

3. 低温度の影響

4℃中での拡張能をみると拡張は著しく阻害される。この事実より酵素系反応の関与が示唆される。

4. 時間の影響

検体を室温放置すると 3 時間目頃より低下傾向が現われ、5 時間後には明らかな拡張能の低下を示す。

6. 解糖系エネルギー代謝との関連

i) ATP 添加の影響 (図 4), ATP 1mM 濃度添加で、写真の如く明らかな直径の拡大の良好な血小板の増加と、付着血小板数の増加が

Fig. 5 Platelets Spreadability of Blood Diseases.

A.M.L. : acute myelocytic leukemia
C.M.L. : chronic myelocytic leukemia
I.T.P. : idiopatic thrombocytic purpura
Aplast. A. : aplastic anemia
Hyper S. : hyper splenism

みられる。これを計測すると、平均直径は7.8μから9.9μに著増、巨大型も5%と増加、ピークは4群に右方移動し拡張能は亢進する。また付着血小板も22%増加する。この傾向は glucose を添加することにより更に著明となる。

ii) 洗滌血小板の ATP 1mM 濃度、および glucose 100mg/dl 濃度を加えた生理食塩水中での拡張をみると、血漿不在でもかなりの拡張を示す。

iii) 解糖系阻害剤の影響、monoiodo acetic acid 100mg/dl 濃度で完全な阻害がみられる。完全阻害の限界濃度は 20mg/dl 前後であると思われる。2-deoxy-α-glucose 100mg/dl 濃度でも阻害がみられる。しかしその程度は前者程強くない。この差は阻害部位の差によるものと思われる。また他の薬剤 Aspirin, NaF, ED TA 等でも阻害はみられるが monoiodo acetic acid 程強くない。

これ等の事実より、拡張能は解糖系エネルギー代謝と深い関連を有するものと想定する。

III. 臨 床 例

1. 尿毒症例

腎不全6例（慢性腎炎末期で腹膜灌流施行中の患者）について検索した。灌流前の血小板拡張能は、平均直径 5.22±1.13μと低値、分布パターンは2峰性を示し、変形比も平均で15.3%と増加し、極めて不良である。この患者に灌流を施行すると、平均直径は全例に著しい改善がみられ、平均は7.05±0.40μと拡大する。分布パターンも2峰性は消失ピークが3群となる。変形比も1例を除き改善傾向がみられ、平均は9.7%と改善した。同時に施行した他の血小板機能検査、凝集能、TEG Ma 値等の改善は極く僅かであった。

この尿毒症例の拡張能の異常が血漿因子によるものか、血小板自身の異常によるものかについて検索した。

血漿因子について、洗滌正常血小板に尿毒症血漿を加え拡張能をみると極めて不良である。

血小板について、洗滌尿毒症血小板に正常血漿を加えると、かなり良好な拡張を示すが対照に比してなお不良である。なお正常血小板に、正常血漿を加えたものを対照とした。

この事より、尿毒症時の拡張能の異常は、血漿因子によるもののほか、血小板自身にも一因

があると想定する。

2. 諸種血液疾患

疾患別の平均は図5である。AML(8例)は平均直径($6.30 \pm 0.07\mu$)の低下と変形比(25.8%)の増大がある。CML(6例)では平均直径($6.44 \pm 0.07\mu$)の低下等 AML 類似の変化をするが、その程度はより軽度である。本態性血小板減少性紫斑病(9例)ではその平均直径の増大($9.87 \pm 0.32\mu$)が注目される。変形比の変化は軽度である。再生不良性貧血(6例)では平均直径($7.11 \pm 0.31\mu$, ただし分布パターンは平低化)の変化は軽度であるが、変形比が増大Ⅳ,Ⅴ型の出現がみられ拡張能の異常が示唆される。脾機能亢進症(2例)では症例が少ないが、変形比(16.8%)の増加と分布で3型優位が注目される。

以上の如く各疾患でかなり特徴的な変化を示している。これをさらに症例毎に検討するとそれぞれ類形的変化をしている事が確かめられた。

IV. 考 案

血小板の拡張に関しては1885年 Eberth らがガラス面で観察したことが端緒となった。その後 Marx ら(1960)がガラス面での染色法を報告、Breddin が(1965)これを改良し血小板機能検査法として発表した。Breddin 法によれば拡張血小板を1)巨大型, 2)大拡張型, 3)小拡張型, 4)不完全拡張型, 5)紡錘型, 6)円型, の6種に分けを拡張血小板と称している。Breddin の分類法はこのように直径と形態とを一面的に捉えた方法である。私共はこれを直径と形態との二系列で別個に分類する方法を考案した。この方法は Breddin 法では見出し得ない軽微な変化を捉え得る利点がある。

血小板拡張機序に関して Breddin は血小板の内在性エネルギーに依存し、幼若血小板の拡張能が良好であると述べている。ところで血小板の aging と代謝について諸家の報告がみられ新生血小板は糖代謝をはじめ、蛋白、脂質代謝は老熟血小板に比し優れ、かつ機能面でも優れていると報告されている。磯部ら(1974)も摘脾したウサギの実験で新生血小板の機能の優

位性を示唆している。しかし、新生血小板の増加が窺える慢性骨髄性白血病で拡張能の低下がみられる事等より、血小板の拡張は、血小板の生命、機能の保持に重要な役割りを演ずる代謝面に求めるのが妥当と考え、私共はこれを解糖系エネルギー代謝に求めた。ATP 添加の一連の成績および解糖系阻害剤が拡張を抑制する事実はこの裏付けと考える。また低温度(4℃)で阻害されることは拡張に酵素反応が関与するためと考える。さらに拡張は浮遊血小板にみられず、付着血小板のみにみられる変化であることから、拡張は付着によるキッカケが必要であり、血漿因子の実験から、付着および拡張には血漿因子、特にフィブリノーゲンは重要な意義を有するものと考えられる。

臨床例では尿毒症例で、その血小板機能の低下は血漿因子に主因がある他血小板自身にもその一因があることを指摘し得たものと思う。また灌流前後で他の検査ではその差が必ずしも明確ではないが、本法では明らかに区別をし得ることより、かなり鋭敏な信頼度の高い検査法といえる。諸種血液疾患での成績は各疾患でかなり特徴的な変化を示している。

結 語

私共は血小板拡張能検査法の新たな判定法を考案し、拡張機序の検討と種々疾患について測定した。血小板の拡張は、血小板の付着がキッカケとなり、酵素反応が関与した、解糖系エネルギー代謝と深い関連を有する変化であり、この際、血漿因子特にフィブリノーゲンは重要な意義を有するものと推定する。また臨床成績より本法はかなり鋭敏な検査法であり、機能検査のみならず疾患鑑別の一助としてもまた有用と考える。

<ABSTRACT>

Studies on Spreadability of Platelets

by

Toshihiro TSUKAHARA, Tatsuo SHIRAI
Isao OHASHI, Kyoji OTAKE, Kazuteru SHIMIZU, Masanori UMEDA, Kazumasa MAKI, Hazime KAZAMA, Soichiro WATANABE, Haruo KANEKO, Hiroshi FU-

RUKAWA and Ken MORISHITA
from

The 1st Department of Internal Medicine,
Toho University School of Medicine, Tokyo,
Japan.

We contrived new method of the adjudication of platelets spreadability (Die Ausbreitungsfähigkeit der Thrombozyten) which had been developed by Marx (1960) and Breddin (1965). Using this method, we examined platelets spreadability of blood diseases and uremia, and investigated mechanism of platelets spread.

Method: Object-slide was made according to Breddin method and we used the slide made of plastic. Our method is to classify each one by platelets Diameter and Form. Classification of diameter; Platelets is divided into five groups by its diameter and figure out real dimension of its diameter. Normal mean diameter was $7.88 \pm 0.34\mu$. (Fig. 1) Classification form; Platelets is divided five types by its form and figure out ratio of abnormal form. Ratio of abnormal form was under 5 per cent. (Fig. 2) Adjudication of platelets spreadability; We judge by mean diameter and ratio of abnormal form, besides attach importance to its distribution pattern.

Clinical cases: In uremia (6 cases), platelets spreadability decreased, but increased remarkably after P.D. in all cases. (to $7.05 \pm 0.40\mu$ from $5.22 \pm 1.13\mu$) We tried next studies. Using washing normal platelets to add uremic plasma, its spreadability inhibited remarkably, and case of added normal plasma for washing uremic platelets, spreadability was inhibited slightly. Consequently we conceive in uremia drop of spreadability is mainly because of plasma and

partly because of platelets abnormality. Result of several blood diseases is shown Fig. 3.

We investigated spreadability of platelets under the influence of several factor: a) Adhesion; Platelets did not adhere to slide was not spreaded. b) Plasma factor; Used washing normal platelets. In absence of plasma, platelets did not spreaded. In case of added plasma, platelets spreaded almost normally. In case of added afibrinogen-plasma (used trombin), spreadability inhibited remarkably. In case of added serum, platelets did not spreaded. c) Glycolysis; Added 1mM A.T.P. increased spreadability. In added 1mM A.T.P. and 100mg/dl glucose to washing platelets, platelets spreaded. Added antiglycolysis (monoiodo acetic acid and 2-deoxy d-glucose) decreased spreadability. d) Low temperature; In 4°C , spreadability was inhibited.

We conceive that platelets spread after adhesion to slide, plasma factor is required and spreadability relates to the energy of glycolysis metabolism.

<DISCUSSION>

塚田理康(虎の門病院血液学科)私共の成績では、ガラスビーズカラムを用いる方法は血小板の粘着能を忠実に表現していない。血小板拡張能と血小板粘着能との関係を追求する際には粘着能検査は他の方法を選ばれるのが良いと考える。

塚原敏弘(東邦大学第一内科)先生の御指導のごとく、本法をガラスで行うと付着は極めて不良であることを観察しており、ガラスビーズ球への付着による粘着能検査とは直接関係はうすいように思うが、データの単純な比較には前述のような関連を示した。