血小板の Sialic acid*

山 田 兼 雄** 真 貝 晃**
白 幡 聡** 目 黒 嵩**

Key words : Platelets, Sialic acids, Sialyltransferase, Newborn,
Mucocutaneous lymph node syndrome (MCLS)

はじめに

血小板の粘着、凝集のメカニズムに関しては、まだ解明されない多くの問題点が残されている。われわれはこの分野における不明な諸点を解明する一つの糸口として数年前から血小板の sialic acid を中心として検討を行ってきた。その研究の端緒は Bernard-Soulier 症候群の症例を経験したことによるものであった。Bernard-Soulier 症候群では、大血小板が本症候群の特徴の一つであるが、Grøttum ら¹⁾、Biethel ら²⁾の報告によればこの大血小板の sialic acid の量が少ないことが異常の本質であると強調されている。

この報告では、数年前より現在までに検討を行ってきた sialic acid の測定成績を述べるとともに、最近測定を試み始めた sialyltransferase の測定方法ならびにその測定成績について述べてみたい。

I. 測 定 法

a) sialic acid, $\frac{1}{10}$ 容の EDTA-2Na で採血, 1000rpm, 4°C, 7 分遠心, PRP を得る。これを 0.02 M トリス生食緩衝液 pH 7.4 で 4 回洗滌 (3000rpm, 4°C, 15分) して血小板を得る。そして約 2×10^9 の既知量の血小板を 2mM 塩化カル

シウム含有の 0.02M トリス生食緩衝液, pH7.4 の 0.2ml 中に浮遊させる。これを Ultrasonicator (Branson sonifier) で約 15 秒処理して血小板のホモジネートを作製する³⁾。以上の方法によって得られたホモジネート 0.2ml に 0.2N 硫酸 0.2ml を加え, 80°C, 60 分加熱して加水分解する。これを 3000rpm, 10分遠心, 上清 0.3 ml に 0.2M 過沃素酸ナトリウム 0.2ml を加え, 20分間室温に放置し, さらに 10% 亜砒酸ナトリウム 2.0ml を加えて強く混和し, 0.6% チオバルビツール酸 3.0ml を加え, 20分煮沸, さらに 5 分間冷却し, シクロヘキサノン 2.5ml を加えて強く混和, 得られたヘキサノン層を 532, 549 nm で各々比色する。結局, 過沃素酸で酸化するとマロンジアルデヒドを生じるので, これをチオバルビツール酸と縮合させて生成する赤色を比色定量する原理に基くものである⁴⁾。

b) sialyltransferase の測定⁵⁾, $\frac{1}{10}$ 容の ACD で採血した全血を 1100rpm, 4°C, 7 分間遠心して PRP を得る。これを生食で 10 倍に希釈した ACD 溶液で 4 回洗滌 (3000rpm, 4°C, 15分) する。このようにして得られた血小板 ($1 \sim 0.5 \times 10^9$) を, 0.1% Triton を 100 倍に希釈したものの 50 μ l に浮遊させ, Ultrasonicator で約 60 秒処理してホモジネートを得る。このホモジネート 50 μ l に脱シアル化した fetuin (fetuin を製

* The studies on sialic acid of platelet. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 29, 1975).

** 慶応大学医学部小児科 [〒160 新宿区信濃町 35], Koneo YAMADA, Akira SHINKAI, Akira SHIRAHATA: Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

*** 荻窪病院特殊血液検査室, Takashi MEGURO: Research Project of Hematology, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

Fig. 1 The assay of sialic acid in the platelets of cord blood, newborns and adults and children. The average of cord bloods (13 cases) was $6.5 \mu\text{g}/10^9$ platelets, $\text{SD} \pm 2.6$, $6.84 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein, $\text{SD} \pm 2.2$. The average value of 4 newborns was $4.3 \mu\text{g}/10^9$ platelets, $\text{SD} \pm 2.5$, $5.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein, $\text{SD} \pm 1.3$. The average value of adults and children (8 cases) was $10.2 \mu\text{g}/10^9$ platelets, $\text{SD} \pm 1.3$, $9.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein, $\text{SD} \pm 2.9$ ⁶⁾.

精し, neuraminidase で脱シアル化したもの) $50 \mu\text{l}$, 0.1M 塩化マンガン $10 \mu\text{l}$, 0.1M トリス塩酸緩衝液 $\text{pH } 7.6$, $20 \mu\text{l}$, $\text{CMP}-[^{14}\text{C}] \text{ NANA } 10 \mu\text{l}$ を加え, 37°C , 30分加熱, さらに 0.1% 燐タングステン酸 10ml を加えて 3000rpm , 室温で30分間遠心, その沈殿物の放射能を測定する. 測定前に 0.1% 燐タングステン酸で4回洗滌し, 得られた沈殿物に 0.4M NaOH を加える処理を行ってから放射能を測定する.

II. 成績ならびに考案

a) 新生児血ならびに臍帯血の血小板の sialic acid (図 1): 臍帯血の血小板の sialic acid (13例) は, $6.5 \mu\text{g}/10^9$ platelet, $\text{SD} \pm 2.6$ であり, また $6.84 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein, $\text{SD} \pm 2.2$ であった. 新生児の血小板の sialic acid (4例) は $4.3 \mu\text{g}/10^9$ platelet $\text{SD} \pm 2.5$ であり, また $5.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein, $\text{SD} \pm 1.3$ であった. これは成人, 年長児 (8例) の $10.2 \mu\text{g}/10^9$ platelets $\text{SD} \pm 1.3$ ならび

に $9.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein $\text{SD} \pm 2.9$ に比して各々著しく低いものであった⁶⁾.

b) 種々の疾患の血小板の sialic acid (表 1). 主として血小板機能異常症について測定した成績が表 1 のごとくである. 現在までの成績では明らかな傾向を見出すことはできない. Bernard-Soulier 症候群では, 血小板当りの sialic acid は非常に高値である. しかし本症候群の血小板は非常に大きな血小板で, われわれの症例の血小板もすでに報告したごとく, 非常に大きな血小板であったため, 血小板の蛋白量当りとして計算すると, かなり低下している. われわれの結果からでも, 本症候群の血小板は sialic acid の密度とい点から考えると低いということがいえるであろう.

われわれが Essential athrombia と診断したもののうち 2 例は, 一応正常値を示すものの中に入れたが, 2 症例の測定値には差異が大で, 9 歳の症例はむしろ低下している方に入れるべき

Table 1 Sialic acid of Platelets in Various Disorders

	Name	Yr.	Disease	Sialic acid	
				$\mu\text{g}/10^9$ Plat.	$\mu\text{g}/\text{mg}$ Prot.
Normal value	K. K.	3	Thrombasthenia	12.0	8.8
	S. H.	8	"	11.7	9.6
	H. U.	8	Thrombopathy	8.6	7.2
	M. S.	11	Hermesky Pudlak syndrome	9.0	12.9
	H. M.	9	Essen. Athrombia	9.6	5.9
	H. M.	5	"	17.3	11.4
	T. K.	3	von Willebrand	—	10.6
	I. Y.	6	Chronic ITP	13.8	7.3
	I. K.	9	Anaphy. Purpura	8.3	6.7
	M. A.	5	C. H. D.	15.0	7.3
Decrease	T. M.	5	Bernard-Soul. synd.	21.6	5.5
	I. J.	9	Thrombocythemia	6.4	6.4
	K. K.	4	C. H. D. (Fallot)	10.0	4.6
	S. K.	12	Pancytopenia	2.4	2.3

かもしれない。Essential athrombia という疾患について今後診断上考慮する問題を残しているように思える。また血小板無力症はこの表に示された2例は正常値のグループに入れられているが、これ以外に最近経験した症例は sialic acid が低い。安藤⁷⁾は、現在血小板無力症の glycoprotein を研究中であるが、SDS 電気泳動でその組成を観察してみると、血小板無力症といわれるものの中に、ある種の glycoprotein が欠損しているものと、欠損していないものが存在しているようである。この事実と結びつけて sialic acid の正常なものと、低下しているものが存在することを考えると、今後血小板無力症がさらに分類される可能性を示すものといえよう。

最後に pancytopenia を示した症例は興味がある。長期にわたって赤血球、白血球、血小板が軽度ないし中等度に減少している症例である。骨髓では低形成は認められず、網状赤血球は 20~30‰ を示している。この症例に関して今後さらに観察して、別の機会に詳細に報告したいと考えている。

c) MCLS の血小板の sialic acid. 急性熱性皮膚リンパ節症候群 (infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome, MCLS または MLNS) は現在本邦の小児 (乳幼児) に

Fig. 2 Changes of Sialic acid of Plateles in the cases with MLNS.

流行している疾患である⁸⁾。治療期に冠動脈血栓のために突然死をおこすことで非常に注目をおびるに至っている⁹⁾。この疾患の詳細の説明は省略するが、われわれは本症候群の血栓形成のメカニズムを血小板機能の面より検討してきた。検討を行った一部の症例に血小板の sialic acid を測定し、図2のごとき成績を得ている。第10~20病日にかけて血小板の silic acid が著

Table 2 Sialyltransferase of Platelets in Newborns and Adults

No.	Sample	DPM/10 ⁹ Platelets.
1	Adult 1	56627.86
2	Adult 2	54775.18
3	Adult 3	37265.51
4	Cord blood 1	39884.84
5	Cord blood 2	111190.37
6	Cord blood 3	59877.98
7	Cord blood 4	38324.72
8	Newborn 1	22928.89
9	Newborn 2	51981.78
10	Newborn 3	42833.94
11	Newborn 4	34390.86

明に減少し、以後次第に増加していく。非ステロイド系抗炎症剤であり血小板機能抑制剤である flurbiprofen¹⁰⁾ を 2~3mg/kg 連日服用させると、sialic acid は上昇する傾向を示す。また服用を中止すると sialic acid は低下し、さらに長期間観察すると sialic acid は再び上昇し、正常範囲に近づいていく。そしてこの傾向は、すでに報告してきた血小板の ADP 2×10^{-6} Mol (最終濃度) による凝集と逆の態度を示している。すなわち、sialic acid が低下している時に、ADP による血小板凝集は亢進する。一方 sialic acid が上昇し、正常近くになると、血小板の ADP による凝集は低下して正常に近くなる。flurbiprofen を投与した場合でも同様のことがいえる。

これらの成績の解釈は容易でないところもある。現在のところ以下のごとき結論、あるいは解釈が可能と考えられる。

血小板の sialic acid の低下は、本症候群の病像の反映と思える。低値から正常に復帰することにより、本疾患の治癒を想像させる。そしてこの sialic acid の低値は本症候群の動脈炎の反映と考えられるが、その確認はまだ得られていない。

つぎに sialic acid の低値が、flurbiprofen により正常値に回復するという事実に対する解釈である。Aspirin は glucosyltransferase の作用を抑制することがすでに報告されている¹¹⁾。Flurbiprofen は aspirin とほぼ同様の血小板機

能抑制作用を有すると考えられている。また、われわれの成績の中で flurbiprofen の代りに aspirin を使用した例が 1 例ある。やはり sialic acid は上昇している。もしも flurbiprofen が直接に血小板の sialyltransferase に影響を及ぼしているとすれば、血小板の sialic acid はむしろ低下すべきではなかろうか。われわれは現在のところ、MCLS に flurbiprofen を投与した場合の sialic acid の変化は、血小板の直接の影響の結果というよりはむしろ、血管壁から脱シアル化する物質 (neuraminidase, plasmin 等) が遊離するのを flurbiprofen の抗炎症作用で抑制している結果による変化が主体であると考えたいがいかがであらうか。

d) Sialyltransferase の成績 前述の方法で、成人、新生児、臍帯血の sialyltransferase を測定し、表 2 のごとき結果を得ている。まだ例数が少なく結論を出すに至らない。新生児、臍帯血の sialyltransferase は若干成人のものより低い印象を与えるが、sialic acid の低値を説明するのに十分な成績ではないであろう。すなわちこの時期の sialic acid の低値は他の原因によることが想像されるが、さらに検討を続けたい。

おわりに

血小板の sialic acid ならびに sialyltransferase の臨床例の検討は少ない。われわれは現在のところこの分野の研究を徐々に行っているが早急に結論を出すことはさしひかえたい。

文 献

- 1) Grøttum, K. A. and Solum, N. O.: Platelet surface charge and aggregation effects of polyelectrolytes. *Thromb. Diath. hamorrh.*, **21**; 450~462, 1962.
- 2) Bithel, T. C., Parekh, S. J. and Strong, R. R.: Platelet function in the Bernard-Soulier Syndrome. *Ann. New York Acad. Sci.*, **201**; 145~160, 1972.
- 3) Madoff, M. A., Ebbe, S. and Baldini, M.: Sialic acid of human platelets. *J. Clin. Invest.*, **43**; 870~877, 1964.
- 4) Warren, L.: The thiobarbituric acid assay

- of sialic acid. *J. Biol. Chem.*, **234** ; 1971~1975, 1959.
- 5) Bosmann, H. B.: Platelet adhesiveness and aggregation, II. Surface sialic acid, glycoprotein: N-acetylneuraminic acid transferase, and neuraminidase of human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta.*, **279** ; 456~474, 1972.
 - 6) Yamada, K., Toraya, A. and Meguro, T.: Bovine fibrinogeninduced platelet aggregation in qualitative platelet disorders and umbilical cord blood, *Thromb. Diath. haemorrh. Suppl.*, **60** ; 193~201, 1974.
 - 7) 安藤泰彦: 私信による.
 - 8) Kawasaki, T., Kosaki, F., Ogawa, S., Shigematsu, I. and Yanagawa, H.: A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan. *Pediatr.*, **54** ; 271~276, 1974.
 - 9) Yanagawa, M., Kobayashi, N. and Matsuya, S.: Myocardial infarction due to coronary thromboarteritis, following acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) in an infant. *Pediatr.*, **544** ; 277~281, 1975.
 - 10) Nishigawa, E. E., Wynolda, D. J., Suydam, D. E. and Molony, B. A.: Flurbiprofen, a new potent inhibitor of platelet aggregation. *Thromb. Res.*, **3** ; 577~588, 1973.
 - 11) Jamieson, G. A., Urban, C. L. and Barber, A. J.: Enzymatic basis for platelet: Collagen adhesion as the primary step in haemostasis. *Nature New Biology*, **234** ; 5~7, 1971.

<ABSTRACT>

The Studies on Sialic Acid of Platelets

by

Kaneo YAMADA, Akira SHINKAI, Akira SHIRAHATA and Takashi MEGURO

from

Department of Pediatrics, Keio University,

and Research Project of Hematology, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

Studies on the sialic acid of platelets in adults, newborns, and cases with various kinds of diseases were carried out by the method of Madoff and Warren. Additionally the sialyltransferase of platelets was assayed on the platelets of adults and newborns by the Bosman's method which was partially modified by us. The sialic acid of platelets in newborns was markedly low (Fig. 1) and the sialic acid of a case with Bernard-Soulier syndrome was low in the meaning of per protein of platelet, though rather high by the case of single one platelet (Table 1). The changes of sialic acid in the MLNS (acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome) during the course of illness were interesting. The sialic acid of platelets decreased at 10 to 20 days from the onset of the illness and then increased slowly up to the normal range in accordance with improvement (Fig. 2). By the administration of flurbiprofen, the sialic acid increased rapidly, being decreased by cessation of the administration.

The sialyltransferase of platelets in newborns and cord blood were seemed to be slightly low in our present results. In order to get final conclusion on the sialyltransferase of platelets in newborns, further studies would be necessary.

<DISCUSSION>

今岡真義(大阪大学第二外科) Sialic acid の少ない人の血小板凝集は如何であるか。ADP, Epinephrine, Collagen あるいは特に Serotonin 凝集について変化があれば御教えを乞う。

山田兼雄(慶応大学小児科) Sialic acid を添加して aggregation をみたことはない。

Sialic acid の低いものは ADP aggregation の強いように思われる。