血小板増多症における血小板凝集と糖代謝*

蔵 本 淳** 武 富 嘉 亮**

Key words : Glycolysis, Thrombocytosis, Platelet aggregability, Prostaglandins (PGE_2 , $\text{F}_{2\alpha}$), Myeloproliferative disorders

緒 言

血栓形成の病態生理には、血液細胞、血漿因子、血管組織、血行動態などが複雑に錯綜しており、これの動的解析が進められている。われわれは血栓の主体をなす血小板について、これの果たす役割を、機能・代謝および電顕組織化学的に検討してきた¹⁾²⁾。今回は血栓準備状態から血栓形成に至る際の生体の調節機構と、血小板の質的、量的要因について検索する目的で、とくに、血小板増多症での血小板機能・代謝の面から検討した。

いわゆる、骨髄増殖症、なかんずく、慢性骨髄性白血病 (CML) での血小板機能異常、例えば、エピネフリン凝集、時にコラゲン凝集も障害されていることが知られている³⁾。本症での経過中、血小板の著増 (100万以上) が、血栓症さらにそれに起因すると思われる出血をもたらすことがいわれている。そこで、凝集能の低下と末梢血中の血小板数との関連を血小板の糖エネルギー代謝面から解析を試みた。

I. 方法および対象

対象は、慢性骨髄白血病 (CML) 3 例、原発性血小板血症 (P. Th.) 3 例、骨髄線維症 (MM) 1 例、真性多血症 (P.V.) 1 例、計 8 例で、CML と P. Th. の 6 症例は、血小板数が、100 万以上の高値を示した状態に検査を施行した。血小板は抗凝固剤として、ACD 採血したバッグ血より分離した。in vitro での血小板による

糖エネルギー代謝は、各位 ^{14}C -glucose を基質とした場合の、各解糖経路からの $^{14}\text{CO}_2$ 産生と、乳酸産生を、その放射活性から測定した⁴⁾⁵⁾。

血小板凝集能は Bryston 社製の凝集メーターより検査した。これらの各種凝集剤による影響を比較検討したが、本研究では、エピネフリン、Latex 粒子、PGs (PGE_2 , 小野薬品) を使用した。β-線放射活性は液体シンチ (Beckman LS 230) により測定した。

II. 成 績

1. 血小板凝集能

CML 3 例の全例、P.V. および MMM の各 1 例に、エピネフリンの凝集能低下、障害がみられた。これらの症例に、あらかじめ PGE_2 ($\text{F}_{2\alpha}$) $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加、3 分間 37°C 孵置後に、エピネフリン凝集を再検討した結果は、CML の 2 例 (S.I. と K.K.), P.Th. の 2 例に、二次凝集の出現がみられた¹⁾。

2. CML 血小板における糖代謝

血小板 (10^9) による ^{14}C -6-glucose を基質として産生された $^{14}\text{CO}_2$ および ^{14}C -lactate の成績を表示した (表 1)。Basal は $^{14}\text{CO}_2$ 産生において、 $1.27\sim 1.63\text{ n mols}/10^9/2\text{hrs}$ であり、 ^{14}C -lactate 産生も、 $1.62\sim 1.91\mu\text{ moles}$ と、Control と比べて著変はない。エピネフリン ($2.6\times 10^{-7}\text{ M}$) 添加により、CML (S.I.) 例で、 1.88 n mols と 1.5 倍の増を認めたが有意の増加ではなく、他の 2 例では、変化がなかった。Control は、 3.37 n mols と 2.5 倍増を示した。Lactate も産

* Glucose metabolism of platelets in thrombocytotic stage of myeloproliferative disorders. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 29, 1975).

** 広島大学原爆放射能医学研究所内科 [〒 734 広島市霞 1-2-3], Atsushi KURAMOTO, Yoshinori, TAKETOMI : Department of Medicine, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

Table 1 Metabolic Response of Platelets in Chronic Myelogenous Leukemia (CML)

	Metabolic Stimulation	Basal	Epinephrine ($2.6 \times 10^{-7}M$)	PGE ₂ ($10\mu g/ml$)	Epinephrine +PGE ₂	Latex (0.234 μ)
¹⁴ CO ₂ -production from ¹⁴ C-6-glucose (n moles/ $1 \times 10^9/2hrs$)	Control	1.36	3.37	1.48	4.20	4.88
	CML (S.I.)	1.27	1.88	1.55	2.43	2.87
	CML (K.I.)	1.62	1.55	1.63	1.87	2.44
	CML (K.K.)	1.63	1.40	1.71	2.24	2.24
¹⁴ C-Lactate production from ¹⁴ C-6-glucose (μ moles/ $1 \times 10^9/2hrs$)	Control	1.84	2.13	1.72	2.06	2.71
	CML (S.I.)	1.91	1.72	1.94	1.95	2.31
	CML (K.I.)	1.62	1.72	1.93	2.40	2.36
	CML (K.K.)	1.88	1.87	2.15	2.27	2.28

Table 2 Metabolic Response of Platelets in Primary Thrombocythemia (P. Th.)

	Metabolic Stimulation	Basal	Epinephrine ($2.6 \times 10^{-7}M$)	PGE ₂ ($10\mu g/ml$)	Epinephrine +PGE ₂	Latex (0.234 μ)
¹⁴ CO ₂ -production from ¹⁴ C-6-glucose (n moles/ $1 \times 10^9/2hrs$)	Control	1.36	3.37	1.48	4.20	4.88
	P.Th. (S.S.)	1.41	4.93	1.62	4.98	6.46
	P.Th.(Y.K.)	1.48	1.67	1.44	2.78	4.46
	P.Th. (S.U.)	1.69	2.84	1.72	3.72	4.01
¹⁴ C-Lactate production from ¹⁴ C-6 glucose (μ moles/ $1 \times 10^9/2hrs$)	Control	1.84	2.13	1.72	2.06	2.71
	P.Th. (S.S.)	3.08	3.11	3.64	2.80	4.56
	P.Th.(Y.K.)	1.58	1.84	1.88	1.98	2.06
	P.Th. (S.U.)	1.33	1.54	1.62	1.90	2.39

生増を認めなかった。PGE₂ (10 $\mu g/ml$) 単独の添加によつては、Control, CML 例共、変化は認められなかった。反応 medium にあらかじめ PGE₂ を加え、次いでエピネフリンを加えた場合には、CML の 2 例 (S.I. と K.K.) に軽度ながら ¹⁴CO₂ 産生の有意の増加を認めた。Control で、エピネフリンによる産生増が PGE₂ により増強されている。乳酸産生については、Control でかかる相乗効果はみられないが、CML の 2 例 (K.I. と K.K.) ではむしろ増加傾向を示した。これらの反応態度の程度を比較する目的で、Latex 粒子 (0.234 μ 大) による貪食刺激に対する成績を検討した成績を、表 1 の右端に示した。CML 症例では、¹⁴CO₂ 産生は、Control の、せいぜい $\frac{1}{2}$ 値までしか達しないし、¹⁴C-lactate 産生も Control に比べて、すくない。

3. 原発性血小板増多症 (P. Th.) における血小板糖代謝

本症の 3 症例で ¹⁴CO₂ 産生、¹⁴C-lactate 値を表 2 に示した。¹⁴CO₂ 産生は Basal で Control と差異は認めないが、¹⁴C-lactate 値は、P. Th.

の 1 例 (S.S.) で高値を示した。エピネフリン添加により、Y.K. 例では反応がみられなかったが、S.U. と S.S. の 2 例では、2.84, 4.93 n moles と増加がみられたが、¹⁴C-lactate には増加はみられない。PGE₂ の単独添加では、¹⁴CO₂ 産生、¹⁴C-lactate 産生共に、Control 同様に、P.Th. 全例に変化はみられなかった。エピネフリンと PGE₂ の両者では、Y.K. と S.U. の 2 例で、¹⁴CO₂ 産生における PGE₂ の増強効果 (Y.K. で $1.67 \rightarrow 2.78$ n moles, S.U. 例で $2.84 \rightarrow 3.72$ n moles) が認められた。しかし、PGE₂ による ¹⁴C-lactate 産生増は認められなかった。これらの値を比較検討する目的で、Latex 粒子刺激による測定値を表示したが、P.Th. 2 例 (S.S. と Y.K.) では、3 倍以上の増加、他の 1 例 (S.U.) でも、4.01 n moles ($\times 2.4$ 増) を示した。¹⁴C-lactate 産生も、ほぼ正常に近い反応値を示した。

III. 考 察

¹⁴C-6-glucose からの ¹⁴CO₂ 産生増が、血小板

Fig. 1 $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -6-glucose by Platelets of Thrombocytic Patients; Chronic Myelogenous Leukemia (CML), Primary Thrombocythemia (P. Th.), Myeloid Metaplasia with Myelofibrosis (MMM) and Polycythemia Vera (P.V.).

の viability の指標となること、凝集とくに放出反応におけるエネルギー消費の亢進をよく反映しているとの考えから⁴⁾⁵⁾、凝集能とくにエピネフリン凝集で、放出反応に伴う二次凝集に異常を示す疾患群について検討した。

従来からこれら骨髄増殖症における血小板増多時(100万以上)の合併症として、しばしば出血を伴う血栓症を伴うことが知られ、Busulfan や 6-MP などによって数を 60~70 万以下に下げることが治療の中心であった。Mason ら (1974) の報告によれば、CML で血小板増多の症例 111 例の retrospective な解析で、血栓症を証明したのは 4 例にすぎず懸念されるほど、頻度の高いものではないという。しからば、すでに指摘されているような、出血時間の延長、血小板粘着能の低下、epinephrine, collagen 凝集の異常(低下)を、thrombocytosis によってもたらされた血栓傾向に対する反応と解釈するか、本疾患群の病態に起因する thrombopathia を伴った thrombocythemia と理解すべきかが、治療方針上重要な点である。すでに報告したように、CML 例でも、血小板数を 100 万以下に抑制すれば、出血、血栓症状もみられなくなり、血小板凝集異常も正常化する傾向を認め、

一見、凝集異常を呈する血小板が Busulfan-sensitive であり、これの減少により、正常血小板の population が優位となってくるという、two population の存在を考えさせる。しかし、症例 (CML, K.K. 例) によっては、Busulfan でのコントロールが困難で、増多血小板 (200~300 万) がエピネフリン凝集能の低下を示すにもかかわらず、頭重感、狭心症様発作などの血栓症状を呈した。かかる場合には、アスピリン・トレランス試験で、出血時間に異常な延長のないことを確認した上で、アスピリンと Dipyridamole を投与して症状の改善に成功している。

本研究は、上述の曖昧な面に代謝の面からメスを加えて、その本態と、治療への手掛りを明らかにしようとした。対象とした、CML と P. Th. 各 3 症例については、100 万以上の血小板増多時について、MMM と P.V. の各 1 例では、100 万以下の時点で、糖代謝を、とくに解糖系の主要経路である Embden-Meyerhof 経路の活性を、乳酸産生から、ミトコンドリアでの TCA 回路活性を、 ^{14}C -6-glucose からの $^{14}\text{CO}_2$ 産生から解析した。この面の研究はなお十分検討されていないが、今回の研究により、血小板放出反応による二次凝集に異常の認められる CML 3

例では、これと直接関連する TCA 回路活性(図1)も、エピネフリンによる活性化の増加がみられなかった。CMLの血小板も、ADP凝集は正常に保たれているし、電顕学的にもこれらの血小板中の α -顆粒は正常で、微細構造上の著変は認めなかった⁷⁾ので、エピネフリンに対する α -受容体、mediatorを介しての放出反応の障害が推測された。ちなみに Latex 粒子の貪食刺激に対しても反応は低下している。

近年、放出反応の mediator としてプロスタグランジン (PGE_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ ないしはその中間体 PGG_2 , PGH_2) が注目されており、 PGE_2 添加が血小板のエピネフリンによる二次凝集異常を正常化させることが知られている¹⁾。そこで、解糖系に及ぼす影響をみたが、CMLで軽度ながら、エピネフリン作用による TCA 回路活性の増強効果を認めることができた。すなわち、添加 $\text{PGE}_2(\text{F}_{2\alpha})$ が糖エネルギー代謝を介して、または直接に放出反応を促していることを示唆する成績であった。原発性血小板血症 (P. Th.) では、同様の凝集異常を示すにもかかわらず、エピネフリンによる TCA 回路活性の増加反応は、3例中2例にかなり保たれていた。さらに PGE_2 による効果も明らかことから、受容体以降の mediator の生成ないしは作働機序に障害があると考えられる。Latex 粒子の貪食刺激にはほぼ正常に反応した。CMLと P. Th. でのこの差異は一口に骨髓増殖症といわれる疾患群の中の heterogeneity を反映したものか、個々の病態の時期による、血小板 population の heterogeneity を示すものかは、今後の課題として残された。

文 献

- 1) 蔵本 淳：血小板の代謝・形態および回転からみた血栓形成の解析，日本内科学会雑誌，**64**；1115～1120，1975。
- 2) 武富嘉亮，蔵本淳，内野治人：Thorotrast による血小板膜表面の電顕的観察——保存によるシアル酸値の変動との関連について。血液と脈管，**7**；917～923，1976。
- 3) Zucker, S. and Mielke, C. H.: Classification of thrombocytosis based on platelet function test. J. Lab. & Clin. Med., **80**；385～394，

1972。

- 4) Kuramoto, A., Steiner, M. and Baldini, M. G.: Metabolic basis of platelet phagocytosis. Biochim. Biophys. Acta., **201**；478，1970。
- 5) Steiner, M. and Kuramoto, A.: Energy metabolism of aggregating platelets. Ser. Haemat., **4**；98～124，1971。
- 6) Mason, J. E. Jr., LeVita, V. T. and Canellos, G. P.: Thrombocytosis in chronic granulocytic leukemia: Incidence and clinical significance. Blood, **44**；483～487，1974。
- 7) 武富嘉亮，井原章裕，蔵本淳，内野治人：血小板増多(血症)における血小板機能について——貪食能の電顕組織化学的観察，日血会誌，**35**；411～412，1972。

<ABSTRACT>

Glucose Metabolism of Platelets in Thrombocytotic Stage of Myeloproliferative Disorders

by

Atsushi KURAMOTO and Yoshinori TAKE-TOMI

from

Department of Medicine, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

Thromboembolic and hemorrhagic episodes were encountered not infrequently in the period of thrombocytosis of myeloproliferative disorders; chronic myelogenous leukemia (CML), primary thrombocythemia (P. Th.), myelofibrosis with myeloid metaplasia (MMM) and polycythemia vera (P. V.). Establishment of the early detection and the regimen for prevention of these episodes are mandatory and prompted us to study the biochemical background of abnormalities in platelet functions; absence of second aggregation by epinephrine and of collagen induced aggregation, decreased platelet retention.

To analyse glucose metabolism of platelets, to which release reaction and aggregation are dependent as the energy source, we observed the activity of Embden-Meyerhof pathway and TCA cycle by measuring ^{14}C -lactate and $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -6-glucose. Basal metabolism

of platelets in three cases of CML, three of P.Th. and one case of each MMM and P.V., were as active as control. Epinephrine stimulated control platelets in $^{14}\text{CO}_2$ and lactate production twice as much of basal level, but could not stimulate platelets of CML. Preincubation of these platelets with PGE_2 , which alone could not induce metabolic response, brought about enhanced metabolic activity in two of three cases but to the level of control. Platelets in MMM and P.V. behaved similar to those of CML. In primary thrombocythemia, platelets responded to epinephrine in two of three cases as well as control and exhibited enhanced activity by PGE_2 .

Since these platelets in myeloproliferative disorders, aggregated normally by exogenous ADP, release mechanism seemed to be suppressed or regulated by feed-back mechanism to raise threshold for thrombus formation. In CML, α -receptor on the platelet membrane seemed to be not sensitive enough for epinephrine to induce metabolic response and production of mediator (s) for release reaction. In thrombocythemia, production of mediator (s) for release reaction might be not enough, in spite of fairly good increase of glycolysis by platelets.

With the results obtained by this study, we concluded that metabolic abnormalities exist

in the platelets of myeloproliferative disorders, being accompanied with release abnormality. The mechanism how those mediators; cyclic nucleotides, prostaglandins and their metabolites are participating to give rise these abnormalities, is under investigation. Metabolic study as well as kinetic study are promising to detect and evaluate initiation of platelet consumption and hypercoagulable state, and to institute fit therapy to prevent hemorrhagic thrombosis.

<DISCUSSION>

- 大熊 稔 (京都大学第一内科) 1) エピネフリン凝集で異常を示した骨髓増殖症で、プロスタグランジン E_2 による凝集は正の態度と、エネルギー代謝に及ぼすプロスタグランジン E_2 の影響の態度に相関が見られるか。
- 2) 私も骨髓増殖症で凝集異常に及ぼすプロスタグランジン E_2 の影響を検討し、極めて多様性に富むことを報告したことがあるが、この点についての先生のご経験はいかがか。

蔵本 淳 (広島大学原医研内科) エピネフリン凝集に異常のある CML の血小板は、エピネフリンによる糖代謝反応 (乳酸産生, TCA 回路活性の亢進) にも異常がみられた。しかし、血小板血症の 1 例に、糖代謝反応は正常でありながら、エピネフリン凝集異常が存在した例も経験しているので、mediator 乃至は、その調節機序の異常が推定され、検討中である。