血小板第4因子の代謝と役割*

星 山 真 理** 桜 川 信 男** 品 田 章 二**
 神 保 長 三** 高 橋 薫** 松 岡 松 三**
 大 西 義 久***

Key words : Platelet factor 4, Platelet antibody, Bisulfan treated rabbits,
 Experimental DIC, Antithrombin III-heparin complex

はじめに

1961年, Deutsch らが crude platelet extracts より血小板第4因子 (platelet factor 4, PF₄) を isolate し, これが抗ヘパリン作用を有し, heat stable で高分子糖蛋白であることを報告して以来, PF₄ に関する研究がなされてきた. 著者らは, Fuster らの血漿 PF₄ 測定法を用いて, 次の点より検討したので報告する.

- A. ヒト血小板より PF₄ の純化精製
- B. 実験的 disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC) における PF₄ の動態.
- C. 各種出血性疾患における出血症状と PF₄.

I. 方法と材料

1. PF₄ 測定法

材料と方法は Fuster らの方法¹⁾に改変を加えた著者らの方法を用い, 詳細はすでに報告した²⁾. PF₄ 活性測定に用いた標準曲線は図1のようになり, 正常人25名による正常値は $14.6 \pm 5.1\%$ ($M \pm SD$) であった.

2. 正常ヒト血小板浮遊液

正常男子の 3.8% クエン酸ソーダ加血液 (3.8% クエン酸ソーダ:血液=1:9) を 1000rpm, 20分, 室温で遠心して得た platelet rich plasma (PRP) を 2000rpm, 15分, 室温で遠心した後,

Fig. 1 Standard curve for Estimation of Plasma PF₄ activity.

platelet pellet を生食水で数回洗滌し, 血小板浮遊液を作製した.

3. Heparin-sepharose column

東邦大学生化学教室と第一化学より提供を受けた, 30ml の syringe に 20ml の heparin-sepharose をつめ, 溶出液は 0.01M phosphate buffer (pH7.2), 0.25M, 0.5M, 0.75M, 1M-NaCl phosphate buffer (pH7.2) を用いた.

4. G-75 sephadex column: 2×95cm のカラムにつめ, 0.01M phosphate buffer (pH7.2) で溶出した.

5. Bacterial endotoxin: (Difco 社製) E. Coli endotoxin を生食水 10ml に溶解して, 体

* The role of platelet factor 4 (PF-4) in the haemostatic-coagulation system. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 29, 1975).

** 新潟大学医学部第一内科 (〒951 新潟市旭町通り1), Mari HOSHIYAMA, Nobuo SAKURAGAWA, Shoji SHINADA, Chozo ZINBO, Kaoru TAKAHASHI & Matsuzo MATSUOKA: The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan 951.

*** 同 第二病理, Yoshihisa ONISHI: The 2nd Department of Pathology, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan 951.

重2.8~3.2kgの家兎に100r注入による前処置を行い、この12時間後2000r, 10分間で注入した。注入方法は家兎の中央耳静脈からポリビニールカテーテル(NS-520, 4Fr, イリカ器械)を挿入して心右房へ到達させて、このカテーテルを通して行い、endotoxin注入後はカテーテルが閉塞しないように生食水を流入後1, 2, 4および6時間で3.8%クエン酸ソーダ1容と全血9容で行った。

凝固因子の測定は citrated plasma を生食水で20倍に希釈して各凝固因子欠乏血漿(Dade社)の補正効果を凝固時間によって測定した。第VIII因子測定は2段測定法³⁾を併用した。他に activated partial thromboplastin time (PTT), Prothrombin 1段測定法(Quick)(PT), thrombin time, fibrinogen, euglobulin lysis timeは教室の方法⁴⁾によった。Antiplasmin⁵⁾とantithrombinは教室の方法によった。血小板数測定は直接法で行った。

6. 血小板減少家兎

Evensen らの方法⁶⁾にしたがい、Busulfan(Myleran: 武田薬品)をTween 80に10mg/mlに溶解し、これを1回25mg/kg家兎の割に腹腔内に注射し、3日間隔で2回実施し、2週間前後で血小板数が20~30%に減少した家兎を実験に使用した。実験前日100rのendotoxinで前処置し、12時間後に2000rのendotoxinを5と同様に注入した。さらに血小板減少家兎へendotoxinの代りに、胃癌組織 extracts 1.2mlを注入した。

7. 抗家兎血小板モルモット血清グロブリン(血小板抗体)

大熊⁷⁾, 前川らの方法⁸⁾に従って作製した。得られた血清を43%飽和硫酸で塩析し、 γ -globulinにしたものを600r, 対照として正常モルモット血清 γ -globulin 600rをそれぞれ5と同様方法で注入した。

8. 病理組織所見

死亡直後にホルマリン固定を行い、Hematoxylin-Eosin 染色による肺・腎を中心として、全身各臓器の血栓形成の有無を検索した。

9. 臨床例での研究方法

新潟大学医学部附属病院第一内科に入院およ

Table 1 Preparation of crude PF₄

び外来通院中の再生不良性貧血患者15例にPF₄測定を経時的に行い、出血症状との関係をみた。対象となった患者で感染症の合併しているものおよび続発性発症例は除外した。出血例としたものは、自然出血が認められ、Rumpel-Leede現象が陽性のものとし、打撲による出血例は除外した。

同様条件での特発性血小板減少症(ITP)患者7例についてPF₄を測定した。7例のうち1例はSLE, 1例は原発性甲状腺機能低下症を併発している症例であった。

同様条件でのDIC6例についてPF₄を測定した。6例のうち4例が急性前骨髄性白血病(APL)であり、1例が急性骨髄球性白血病(AML)であり、1例が胃癌(Adenocarcinoma tubulare)を原疾患としていた。

II. 成 績

1. ヒト血小板よりのPF₄の純化精製

表1はcrude PF₄の精製法を示した。血小板浮遊液を超音波でhomogenizeした後、15,000rpm, 30分, 4°Cで遠心し、上清1mlにつき

Fig. 2

0.04ml の $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel で吸着し、遠心分離後、非吸着部分を crude PF₄ として、heparin-sepharose affinity chromatography にかけた。図2上のごとく、各 tube 3ml, 溶出速度は 24ml/hr であり、0.25M NaCl-phosphate buffer (pH7.2) で elute した部に強い PF₄ 活性を認めた。この部をさらに G-75 sephadex column chromatography にてゲル透過を行なうと図2下のごとく、tube number 15~19 の peak に強い PF₄ 活性を認めた。Disc 電気泳動では単一の蛋白帯を認め、分子量は約 2 万であった。

表2に、各精製段階における PF₄ 活性、比活性、回収率を示した。Final PF₄ の活性は186%, 比活性 11.3, 回収率 0.17% であった。正常ヒト血小板約 150×10^8 個から、22.4mg の crude PF₄ と 330r の final product が得られたことになり、中和しうる heparin は 200u/ml であった。

2. 実験的 DIC における PF₄ の動態

生体内での PF₄ の役割を知るために、血小板が重要な役割を占める DIC について種々の動物実験を行った。表3に示したように、血小板

Table 2 Purification Steps of PF₄

		Protein(mg/dl)	PF ₄ (%)	Specific activity	Recovery rate(%)
Step 1	Platelets Suspension	473	10>	0.02	100
	Sonicated Supernatant	278	220	0.78	58.0
	Supernatant after Al(OH) ₃ gel absorption	160	196	1.25	31.0
Step 2	Heparin-Sepharose Affinity Column Chromatography (Peak II)	18.7	57.5	3.07	5.2
Step 3	Sephadex G-75 Gel filtration (Peak II)	16.5	186	11.3	0.17

Table 3 Summary of the Results

Treatment	DIC	Thrombus formation	Platelet counts	PF ₄ activity
infusion of Endotoxin (E. Coli : 2000r)	occurred(+)	(++)~(+++)	100→24(%)	moderately increased ↑
infusion of Endotoxin (E. Coli : 2000r)	occurred(+)	(++)~(+++)	100→20	markedly increased ↑↑
infusion of Endotoxin (E. Coli : 2000r) into Busulfan treated rabbit	not occurred(-)	(±)	100 ↓ 28	unchanged →
infusion of extract from cancer tissue into Busulfan treated rabbit	not occurred(-)	(-)	100 ↓ 18→6	unchanged →
infusion of Anti-rabbit platelet anti-guinea pig serum	not occurred(-)	(-)	100→12	markedly increased ↑↑
infusion of non-immunized guinea pig serum	not occurred(-)	(-)	100→310	minimal changed ↗
infusion of physiological saline	not occurred(-)	(-)	100→100	unchanged →

数が正常の家兎に endotoxin 2000r を注入した際には、凝血学的に DIC の所見を著明に認め、病理所見でも血栓形成を肺・腎を中心に認めた。血小板数は 50.4×10^4 から $10.9 \times 10^4/\text{cmm}$ と 24% に減少し、PF₄ は 40% まで増加した。Busulfan 処置によって、血小板数が 114×10^4 から $20.4 \times 10^4/\text{cmm}$ と 28% に減少した家兎に胃癌組織抽出液を注入すると、著明な凝血学的変動や血栓形成は認められず、血小板数も 12% に減少し、PF₄ の変動も軽度であった。同様の処置によって、血小板数が 60×10^4 から $10.7 \times 10^4/\text{cmm}$ と 18% に減少した家兎に、endotoxin 100r で前処置し、12 時間後に 2000r の endotoxin 注入では、凝血学変動および血栓形成は著明でなく、血小板数は 6% に減少し、PF₄ の変動も軽度であった。血小板数が正常の家兎に血小板抗体を注入すると、凝血学的変動や血栓形成は

著明でなかったが、血小板数は 100×10^4 から $12 \times 10^4/\text{cmm}$ と 12% に減少し、PF₄ は 20 から 45% まで増加した。対照の正常モルモット血清 γ -globulin を注入した実験では、血小板数は 87×10^4 から $241 \times 10^4/\text{cmm}$ と 310% の増多を認め、PF₄ は 16 から 18% の変動であった。

表 4 に、種々の trigger substance を家兎に注入した時の血小板数、PF₄ の変動と血栓形成の有無について著者らの成績を示した。

Tissue thromboplastin, 胃癌組織抽出液、白血細胞 lysates, thrombin, endotoxin, 血小板抗体, urine factor によって、血小板減少と PF₄ 高値および血栓形成が生ずることが認められた。しかし、Busulfan 処置血小板減少家兎実験で認められたように、血小板減少がすでに存在し、trigger substance の注入によっても血小板減少が著明でない時は、PF₄ 高値は認めら

Table 4 PF₄ Changes by Infusion of various trigger substances into Rabbits

Infusion Substance	platelet count	PF ₄ level	Thrombus formation
Thromboplastin	↓	↗	marked
Cancer tissue extracts	↓	↗	moderate
Lysates of leukemic cells	↘	↗	moderate
Thrombin	↘	↑	marked
Factor Xa	↘	↘	marked
Lactic acid	↘	→	minimal
Haemolysates	↓	↗	moderate
Endotoxin (2000r)	↓	↑↑	marked
Trypsin	↘	↘	minimal
Urokinase (10,0000u)	↘	↗	minimal
Anti-platelet serum	↓↓	↑↑	minimal
Urine factor	↓	↑	marked

↑↑ : markedly increased (>40) ↑ : increased (25~40%) ↓ : decreased (0~5%) ↗ or ↘ : moderately changed (5~25%)

Table 5 Relationship of PF₄ to Haemorrhage

disease	PF ₄ levels in the haemorrhagic patients	
disseminated intravascular coagulation (DIC)	markedly increased ↑↑	25~40%
hypoplastic anemia	increased ↑	20~38%
idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)	decreased ↓↓	0~ 5%

(normal range 10~20%)

れなかった。

3. 各種出血性疾患における出血と PF₄

臨床的に DIC 4 例, 再生不良性貧血 15 例, ITP 6 例について, 出血と血小板数および PF₄ の動態を検索し, まとめたのが表 5 である。

DIC では, 出血時に血小板数の著減と PF₄ 高値(25~40%), 再生不良性貧血では, 同様に PF₄ の高値 (20~38%), ITP では Pf₄ の低下 (0~5%) を認めた。全症例で, 血小板数が増多し, 出血が軽減するに従って, PF₄ の正常値への回復を認めた。

種々の trigger substance の家兎注入実験および DIC 症例で認められた PF₄ の動態は, 血小板の凝集・破壊・消費の結果, PF₄ release が亢進したために, PF₄ が高値であると考えられた。PF₄ は主として heparin 中和作用を有し, hepa-

rin を stoichiometric に中和することで, Anti-thrombin III-heparin による thrombin 形成への抑制作用を減弱させ, 血栓形成に荷担していると思われる⁹⁾。一方, 再生不良性貧血で認められた PF₄ の動態は, 血小板減少下でも血小板機能亢進状態があり, PF₄ 高値となる可能性を示唆しており, またすでに報告されたように再生不良性貧血の出血時の Antithrombin III 高値に対する heparin 中和による PF₄ の間接的な阻止効果とも考えられる。ITP は血小板減少と共に血小板機能低下による低値が考えられた²⁾。

ま と め

以上, Fuster らの血漿 PF₄ 測定法を用いて, ヒト血小板よりの PF₄ の純化精製, 実験的 DIC における PF₄ の動態, DIC, 再生不良性貧血,

ITP の患者における出血と PF₄ との関係について検討した。

PF₄ の heparin 中和機構に関した知見として、血小板の α 顆粒中の lysozomal enzyme の一つとして PF₄ を isolate した報告や¹⁰⁾、PF₄ carrier として chondroitin-4 sulphate proteoglycan をあげ、PF₄ が血中に放出されると heparin とより強い結合力で complex を作ることで、中和作用を発揮するとも考えられている¹¹⁾。しかし、現在のところ生体内での heparin 量やその存在様式には未知の部分が多い。

文 献

- 1) Fuster, V., Kazmier, F., Cash, J., Bodwie, E. W. and Owen, C. A. : Assay of platelet factor 4 in plasma. Mayo Clin. Proc., **48**; 103~106, 1973.
- 2) 松岡松三, 星山真理, 品田章二, 桜川信男: 血小板第4因子に関する研究. 臨床血液, **16**(10); 936~945, 1975.
- 3) 松岡松三: 血液凝固検査, 金原出版, 東京, 1971.
- 4) Sakuragawa, N. and Matsuoka, M. et al. : Antiplasmin assay method by a plasminogen free system. Acta Med. Biol.(Niigata), **21**; 1, 1973.
- 5) 松岡松三, 桜川信男, 高橋 薫: 蛇毒 Defibrase (Bothrops Marajoensis) の研究, 凝固線溶因子におよぼす影響および Antithrombin 測定への応用. J. Med. Enzymology, **3**; 118~121, 1974.
- 6) Evensen, S. A., Jeremic, M. and Hjort, P. F. : Experimental thrombocytopenia induced by busulfan (Myleran) in rabbits: extremely low platelet levels and intact plasma clotting system. Thrombos. Diathes. Haemorrh., **19**; 570~577, 1968.
- 7) Okuma, M. : Studies on experimental immune thrombocytopenia VI. Thrombocytopenia in rabbits induced by anti-human platelet immune guinea pig serum with special reference to antigens common to different species of animals, Acta Haematol. Jpn., **30**; 800~812, 1967.
- 8) 小林紀夫, 前川 正: 血小板よりみた血栓症の成因. 脈管学, **14**; 575~579, 1974.
- 9) Abildgaard, U. : Heparin cofactor and antithrombin. Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg.), **33**; 38~42, 1974.
- 10) Walsh, P. N. and Gagnatelli, G. : Platelet antiheparin Activity: Storage site and release mechanism. Blood, **44**(2); 157~167, 1974.
- 11) Barber, A. J., Käser-Glanzmann, R., Jakábová, M. and Lüscher, E. F. : Characterization of a chondroitin 4-sulphate proteoglycan carrier for heparin neutralizing activity (Platelet Factor 4) released from human blood platelets. Biochim. Biophys. Acta, **286**; 312~329, 1972.

<ABSTRACT>

The Role of Platelet Factor (PF-4) in the Haemostatic-Coagulation System

by

Mari HOSHIYAMA, Nobuo SAKURAGAWA, Shoji SHINADA, Chozo ZINBO, Kaoru TAKAHASHI, Matsuzo MATSUOKA and Yoshihisa ONISHI*

from

The 1st Department of Internal Medicine and *2nd Department of Pathology, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

- (1) Platelet factor 4 (PF-4) which shows anti-heparin activity was purified from the human platelets. After homogenization by sonifier and Al (OH)₃ gel absorption, crude PF₄ was further purified by the Heparin-Sepharose affinity column chromatography and G-75 sephadex gel filtration. Final PF-4 activity was 186% and purification fold was 500. The purified PF₄ neutralized 200u /ml of heparin. The molecular weight of final PF₄ was found to be about 20,000.
- (2) In normal rabbits a single injection of 2000r endotoxin, extracts of gastric cancer tissue, anti-rabbit platelet immune guinea pig serum and a subsequent infusion of normal saline induced disseminated intravascular coagulation(DIC). The remarkable changes of platelet count and PF₄ levels were observed. In contrast to these facts,

in the thrombocytopenic rabbits treated with Busulfan DIC was not induced by the infusion of the same trigger substances and PF4 levels did not change dominantly.

- (3) The relationship of PF4 to haemorrhagic tendency in the patients with DIC, hypoplastic anemia and ITP was investigated. PF4 levels increased markedly in the haemorrhagic patients with DIC and hypoplastic anemia, but it decreased in the patients with ITP. In all cases it was observed that when platelets counts increased and haemorrhage was relieved, PF4 levels became to normal. PF4 would be a good parameter to reflect the platelet function in haemorrhagic disorders and thromboembolic diseases.

<DISCUSSION>

塚田理康（虎の門病院血液学科）PPP 中の PF4 を heparin thrombin 時間を測定する際には antithrombin III, その他の影響が考えられるが, PF-4 による heparin thrombin 時間の延長と結論するには他のトロンビン inhibitor の測定が必要か.

桜川信男（新潟大学第一内科）Anti-thrombin III については, われわれの成績では PF₄ を manly にして測定しているので Ant. III には関係ない.

山田兼雄（慶応大学小児科）この測定しておられる物質は大変重要な物質であると思う. しかしこれがすべて血小板由来のものであろうか.

桜川信男（新潟大学第一内科）PF₄ の測定についてはわれわれの in vitro & in vivo の成績から manly PF₄ を測定しているものを示した.