放射性同位元素による血小板の研究

東邦大学医学部森田内科

小住喜久代

STUDIES ON BLOOD PLATELETS BY
RADIOACTIVE ISOTOPES

BY

Kikuyo Ozumi

Department of Internal Medicine, School of
Medicine, Tohō University
(Prof.: H. Morita)

梗概 血小板が生体内でいかなる運命を辿るやを究明せんとして、著者は P^{32} 標識血小板を健康および特定病的状態における家兎に注射し、所定時間後における体内分布を検査した。なお放射性同位元素としては、 P^{32} オルトリン酸が著者の実験条件に最も好く適するものと目された。健康家兎についての実験で、崩壊血小板片がまず脾臓に把握され、処理されることを示唆すると思われる成績が得られた。また健康家兎について血小板が急速大量に崩壊したと目される場合、および Schwartzman 現象惹起時には、肺にいちじるしく高い放射能活性が認められたが、その理由は未解明である。いわゆる血栓性血小板減少性紫斑病と類似の病変を呈するとされる Schwartzman 現象惹起時には、副腎、大脳、小脳、下垂体、尾状核における放射能活性が、健康家兎におけるよりは明らかに高かった。これはそれら諸臓器細小血管内の血小板血栓の存在によるものと思われる。

I 緒言

血小板は血液凝固機序に重要な役割を演じ、かつ血管壁と密接な関係を有することも想像せられているが¹⁾、血液有形成分中最も小であり、粘着凝集し易い性質のため、その取扱いが困難であり、また血液凝固にさいし崩壊するなどの性状のため、組織学的検索に適せず、未知の領域が多かった。

巨核球より生成された血小板が、生体内においていかなる運命を辿り、かつ、いかなる機能を保持しているかという問題も、上記の理由によりなお未解決である。

著者は放射性同位元素により標識した血小板を、健康ならびに特殊の病的状態における動物に

注射し、諸臓器組織の放射能活性を測定し、若干の成績を得た。

もちろん非生理的な操作を受けて生体内に注射された血小板は、生理的状态にある血小板と同一の性状を有するか否か、若干の疑問をはさむ余地のあるのはやむを得ないが、右の実験によりある程度まで生理的および或種病的条件下における血小板の態度を知り得ると信ずるのである。

II 実験方法

1) 標識血小板作製法

体重 1 kg 前後の健康家兎の心臓穿刺血液より冷凍遠沈器を用いて血小板を分離し、該分離血小板漿浮遊液に生理的食塩水で稀釈滅菌した P^{32} オルトリン酸を加えて（血液 10 cc につき 1 μ c）、孵

卵器内で (37°C) 14時間 incubate し、血漿にて 3 回洗滌後 (冷凍遠沈器使用)、血漿に再浮遊して直ちに実験に供した。このさい血小板血漿浮遊液の放射能活性が、第 3 回洗滌液の放射能活性の 10 倍以上に達したものを、標識が充分なものとして実験に供した。

なお P^{32} オルトリン酸の他に I^{131} 、 DFP^{32} 、 $Cr^{51}Na_2SO_4$ 、 S^{35} DL Cystine についても一応検討したが、著者の実験目的に対し、 I^{131} の半減期は短に過ぎ、 S^{35} DL Cystine は高価であり、 $Cr^{51}Na_2SO_4$ は適当なものの一つと思われたが、これまた経済的理由により避けざるを得なかった。

DFP^{32} は Cholinesterase と特異的に結合して DIP となり、再利用されぬ利点を有し、Leeksa³⁾ および Cohen⁴⁾ らは血小板標識に利用しているが、著者の検査によるといったん血小板に入られた後、比較的速かに遊離するかのとき成績が得られた。

また P^{32} オルトリン酸の半減期は 14 日で、入手時 100% の放射能活性が保持されており、入手後短時日内に使用すれば、著者の実験目的によく適合するものと思われた。なお実験は入手後 10 日以内に行なつた。

また実験にさいし、可及的無菌的に操作したが、全操作中雑菌の汚染を完全には防ぎ得ないので、上記 incubate 前に少量のマイシリン溶液を加えた。

incubate に 14 時間を選んだのは Müller⁸⁾ の方法を参考としたのであるが、著者自身、3 時間、6 時間および 14 時間 P^{32} で incubate した後、血小板を血漿で洗滌し、また血漿に再浮遊し、孵卵器内に (37°C) 放置したところ、3 時間および 6 時間の incubate を行なつたものでは、12 時間後に放射能活性は $1/2$ ないし $1/3$ を減じ、この時間の incubate では、血小板が P^{32} によつて充分標識されないことを知つた。

14 時間 incubate した場合 (図 1) には、6 時間、24 時間および 48 時間後に検査しても、血小板

Fig. 1. Changes on Phosphorus fractions of P^{32} -tagged platelets after IN VITRO incubation with plasma.

の放射能活性は減弱を示さず、さらに血小板を酸溶性リン分劃、リポイドリン分劃および有機リン分劃に分けて検討したところ⁸⁾、特に有機リン分劃の放射能活性の変動が少なく、6 時間、48 時間ではほとんど変化が認められず、すなわち 14 時間の incubate は P^{32} で血小板を充分標識し得ることを知つた。

2) 実験動物

体重 1 kg 前後の健康家兎および Shwartzman 現象惹起⁹⁾家兎を用い、上記標識血小板を耳静脈より注射して、所定時間後に心臓穿刺により瀉血死せしめ、同血液より血小板、赤血球および寡血小板血漿を冷凍遠沈器により分別し、心、肺、脾、肝、腎、副腎、骨髓、大脳、小脳、下垂体および尾状核等諸臓器組織の細片を取り、トルジオンスバランスで秤量し、蟻酸を加えて放射能測定血

の中で均質化し、赤外線ランプで乾燥後、Geiger Müller 計数管（医理学研究所製 Aloka D-C III 型）で測定した。実験値は、100mg/cpm に換算した。

なお Schwartzman 現象惹起家兎については、10倍稀釈コンムン原液（大腸菌濾液、藤沢薬品）1 ccを耳静脈内に注射し、14時間後同量の惹起注射を施行し、同時に P^{32} 標識血小板を反対側の耳静脈に注射した。

III 実験成績

1) 健康家兎についての実験成績

④ 試験管内において、 P^{32} を標識した血小板を家兎耳静脈より注射し、2時間後に諸臓器について測定したところ（図2），放射能活性は脾に最も著明で、心、肺、肝、腎、副腎、下垂体などの諸臓器にも明らかに認められ、かつ、これら臓器の単位重量の放射能活性に著差なく、大脳、小尾状核では少なかった。

つぎに P^{32} 標識血小板注射12時間後に検査した家兎では（図2），脾の放射能活性ははなはだしく高度である。他の諸臓器では、2時間後検査した動物の諸臓器に比べ、放射能活性は明らかに少なかった。

Fig. 2. Radioactivity in organs of healthy rabbits (a).

なお2時間および12時間後の分離血小板、赤血球、寡血小板血漿のいずれにもかなり明らかな放射能活性が認められたが、その活性度に差異があり、血小板、赤血球、寡血小板血漿の順位であった。

⑤ P^{32} 標識血小板注射後、24時間および48時間後に瀉血死せしめて検査した動物では（図3），脾の放射能活性化は他の諸臓器に比べて差異が認められない。なお血小板、赤血球に依然として放射能活性が認められた。

Fig. 3. Radioactivity in organs of healthy rabbits (b).

⑥ つぎに分離血小板の放射能活性が微弱で、注射操作中ないしは注射後短時間で、 P^{32} 標識血小板の大多数が崩壊したとされる場合が往々にして経験されたが、そのさいの諸臓器の放射能活性は、上述せるところといささか異なつた様相を呈した（図4）。すなわち放射能活性は肺においてははなはだ高度であり、脾および肝がこれに次ぎ、心、腎、副腎、骨髄はさらにこれより弱い。

2) Schwartzman 現象惹起家兎についての実験成績

Fig. 4. Radioactivity in organs of healthy rabbits (c).

いわゆる血栓性血小板減少性紫斑病と類似の変化を呈するとされる, Schwartzman 現象惹起家兎について検索した(図5)。

また同現象発現家兎の腸間膜毛細血管について顕微鏡的に観察し, 血小板が処々に集積してゆく状態を観察した。

すなわち Schwartzman 現象時に, 全身諸臓器組織の細小血管に発生する血栓は, 血小板の集積によるものであることを知った。

さて Schwartzman 現象惹起時(惹起注射2時間で瀉血死)には, 脾の放射能活性はいちじるしいが, 肺においてそれがさらにはなほだしく高度であった。

肝, 腎は脾に次ぎ, 大脳および小脳の放射能活性は小であった。

この成績を上記注射操作時, あるいは注射短時間後に大多数の血小板が崩壊したと目される場合の成績と比較すると, 肺の放射能活性が高度で, 脾のそれがこれに次ぐ等, 一見類似しているが, 下垂体, 大脳, 小脳, 尾状核その他諸臓器の放射能活性分布が概して Schwartzman 現象において

Fig. 5. Radioactivity in organs of Schwartzman Phenomen

明らかに高い事実が注目される。

なお典型的な Schwartzman 現象を呈したものの血小板減少率は, 43~97%で平均77%であった。

IV 考 案

血小板が生体内において, 諸臓器組織にいかように分布され, いかなる運命を辿るかを究明する一助たらしめんとして, 著者は健康家兎ならびに Schwartzman 現象惹起家兎に, P^{32} で標識した血小板を耳静脈内より注入し, 所定時間後に瀉血死せしめて, 諸臓器組織の放射能活性を検索した。

血小板の体内分布を追究する手段としては, 組織学的検査はほとんど利用し得ないので, 現在のところ, 放射性同位元素標識血小板を用いて追跡する以外に方法がない。

しかし, いずれの放射性同位元素を利用するかは, 血小板を確実に標識し, かつ血小板崩壊後再利用されず, かつ必要以上の長期間生体内に放射能活性を持続しないものが理想とされることはいうまでもない。

著者は I^{131} , DFP^{32} , $Cr^{51}Na_2SO_4$, $S^{35}DL$ Cystine などについても検討したが, 前述の理由でこれ

を避け、 P^{32} オルトリン酸を用いた。

P^{32} オルトリン酸14時間の incubate で、試験管内において P^{32} は分離血小板をよく標識し得、かつこのさい P^{32} は有機リン酸分劃に多く取入れられており、しかもこの分劃に取入れられた P^{32} は、試験管内で長時間血漿中に遊離しないことが確かめられ、しかも取扱いが便利であり、半減期も使用目的に適するのである。

ただ標識血小板が崩壊した後に、 P^{32} が生体内で再び血球その他諸臓器組織に取入れられるはずであるが、実測値の処理に慎重であれば充分利用価値があると考えられる。

さて血小板の体内分布について Julliard & Maupin¹⁰⁾, Müller⁸⁾らは、 P^{32} をもって標識した血小板を動物体内に注射し、その分布を検索しているが、ともに2時間後に放射能活性が脾に最大値を示し、他の肝、肺、骨髄などの網内系細胞群を有する臓器にも著明であると報告して、脾および他臓器、網内系組織の血小板破壊作用を示唆している。

著者の実験成績によれば、2時間および12時間ともに脾の放射能活性が他の諸臓器のそれに比し圧倒的に強く、心、肺、肝、腎における放射能活性は、ほぼ同程度に明らかに認められ、骨髄の放射能活性はそれら臓器に及ばず、大脳、小脳、尾状核においても放射能活性は軽度であつた。

しかして、24時間、48時間後には、脾の放射能活性は、心、肺、肝、腎に比し、とくに優位を示さない事実が注目された。

なお48時間では、下垂体の放射能活性がはなはだ高度であつた。

このさいの放射能活性はいうまでもなく P^{32} そのものに由来するものであり、 P^{32} 標識血小板の分布とどの程度の平衡関係を有するか、慎重な検討を要するところである。

しかして血液分劃についての検査成績から、2時間後すでに輸入 P^{32} 標識血小板のかなりの部分が崩壊し、このさい遊離せる P^{32} が各血液細胞その他諸臓器に取入れられているはずである。

よつて各臓器、組織の放射能活性は、血小板標識 P^{32} およびその他の P^{32} の両者に由来するものである。

しかし他の諸臓器組織に比して、脾に2時間および12時間で放射能活性が圧倒的に多い事実が指摘されるが、これについて考察を加えるに、元来脾は血球の墓場と称せられ、血小板がその寿命を終えて崩壊するさい、最後の処理は脾によつて行なわれると解されているが、著者の上記の成績は、崩壊によつて生じた血小板片が脾に集積して、その放射能活性を高からしめていると考えられる。

このさい脾の高度の放射能活性が、主として遊離 P^{32} によるものでないと想像されるのは、24時間および48時間後における脾の放射能活性が他の諸臓器に比して差異のないことより、脾に遊離 P^{32} がとくに多くとり入れられるものでないことが知られるからである。

血小板崩壊によつて遊離された P^{32} が、いくばくに達するやの推算は困難であるが、2時間および12時間後の諸臓器組織の放射能活性は、かなりの程度に P^{32} 標識血小板のそれと平衡関係を有することが想像に難くない。

さて単位重量の心、肺、肝、腎の放射能活性に差異なく、骨髄のそれが劣る事実は Julliard & Maupin¹⁰⁾ および Müller⁸⁾ の成績と一致せず、脾以外の網内系組織による血小板の処理は、その臓器の放射能活性をとくに左右する程度に達しないことが示されるようである。

48時間後に、下垂体の放射能活性が高度であつたが、その理由についてはここに考察をすすめることはさし控える。

つぎに輸入標識血小板の大多数が、輸入操作時、あるいは輸入短時間内に崩壊したと目される場合には、肺にとくに高い放射能活性が認められた。

そして肝、脾これに次ぎ、心、腎、副腎等はそれよりも明らかに劣っており、骨髄のそれはさら

に軽度であり、下垂体、大脳、小脳、尾状核ではきわめて微弱にすぎない。

右の成績は、骨髓の放射能活性の少ない事実を除いては、Müller⁸⁾らの成績とほぼ一致するものようである。

肺にとくに高度の放射能活性が認められる事実については、Julliard¹⁰⁾らは P^{32} が白血球に摂取され、この標識された白血球が肺に定着するためとなっているが、著者はこの点については語るべき多くの検索成績を有しない。後日を期して、この問題の検索を行ないたいと考えている。

つぎに Schwartzman 現象惹起家兎についての検査成績について考察を加える。

著者が同現象⁹⁾¹¹⁾についてとくに検索を試みたのは、本現象が血栓性血小板減少性紫斑病^{12)~14)}なる特異な疾患時に見られる病変と類似するとされるからである。

血栓性血小板減少性紫斑病は、脾腫があり、全身諸臓器の毛細血管および細小動脈に硝子様血栓が生じ、ために不定の脳症状を呈するが、そのうちに血小板減少性紫斑病と、溶血性黄疸が現われ、多くは急性に経過して死の転帰を取り、まれに比較的慢性に経過するという特異な疾患である。

その血栓の成立に関しては、一般に血小板の集積¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾によるとされているが、異論もあり、血小板の集積が先か、内被細胞の変化が一次的であるかに至つては、もとより未解決の問題である。

ただ Schwartzman 現象惹起時に、同様の事実が見られるとされ、先に森田¹⁷⁾もその事実を認めている。

著者は、さらにこの問題の究明の一步を進める目的で、Schwartzman 現象惹起家兎にその惹起注射と同時に P^{32} 標識血小板を注射し、典型的同現象発現時に瀉血死せしめて、諸臓器組織の放射能活性を追究した。

なおそのさい、流血血小板数はいずれも明らかに減少し（平均77%）、かつ腸間膜毛細血管を顕微鏡的に観察し、血小板が処々に集積する事実を確

認した。

さて諸臓器組織の放射能活性について見るに、肺において最高であり、脾はこれに次ぎ、肝、腎はこれに劣り、心、副腎、骨髓は比較的軽度であつた。またこのさい、尿中の放射能活性ははなはだ高度であつた。

右の放射能活性分布像で、肺にきわめて高く、脾がこれに次ぐ点で、前述の標識血小板が輸入操作時、あるいは輸入短時間内に大量に崩壊したと思われる。そして一見類似する。

右の成績によつて Schwartzman 現象に見られた放射能活性の分布が、Schwartzman 現象そのものに特徴的なものであるか、あるいはかかる特異な状態ではなしに、血小板の体内における急激なる崩壊の結果の現われに過ぎないのであるかの判定は困難となるが、ただ大脳、小脳、下垂体および尾状核その他諸臓器における放射能活性が、Schwartzman 現象惹起時に、明らかに高い事実は、それら臓器細小血管内における血小板血栓の存在によるものと思われる。

著者の実験は、かかる方法による Schwartzman 現象ないし血栓性血小板減少性紫斑病の血小板の態度についての究明の可能性を、提示したものと称し得るであろう。

以上著者は P^{32} 標識血小板を健康家兎および Schwartzman 現象惹起家兎に注射して、健康時および特異な病的状態における血小板の体内分布ないし運命の追究を企てたのである。

多くの重要な問題は未解決のまま残され、その解決はなお将来の研究にゆだねざるを得なかつたのであるが、著者の実験成績から、崩壊血小板片がまず主として脾に把握され、処理されることを想定するに十分な根拠が得られたと信ぜられる。

また体内諸臓器組織における血小板の分布をある程度まで推定し得る成績があげられた。

つぎに、まだその理由は不明であるが、血小板の急速な崩壊時には、肺にいちじるしく高度の放射能活性が証明されたが、これは注目に値する事実であると思われる。

さらに Schwartzman 現象を介し、血栓性血小板減少性紫斑病時の血小板減少機序について検索を試み、ある程度の解明に成功したと信ずる。

右の諸事実は、さらに、より改善されたる検索手段を用いて検討せられるべきであり、著者らも目下それを企図しているが、一応現在までの成績を報告し、大方の追試ならびに御批判を乞う次第である。

V 結 論

生体内における血小板の態度を窺わんとし、著者は P^{32} 標識分離血小板を (P^{32} オルト磷酸使用)、健康家兎および Schwartzman 現象惹起家兎に注射し、所定時間後に瀉血死せしめ、諸臓器の放射能活性を測定し、つぎの成績を得た。

1) 健康家兎については、 P^{32} 標識血小板注射後 2 時間および 12 時間後に、脾の放射能活性がいちじるしく大であった。24 時間および 48 時間ではかかることは見られなかった。

2) 健康家兎についての実験で、注射された P^{32} 標識血小板の大多数が、注射操作中ないしは注射後短時間内に崩壊したと目される場合、放射能活性は肺にいちじるしく高度であった。

3) Schwartzman 現象惹起家兎における成績では、放射能活性は肺に最も高度に認められ、その他諸臓器組織の放射能活性は概して健康家兎におけるそれに比し大であった。

(本研究は文部省科学試験研究費の補助を受けた。)

文 献

- 1) 森田久男：日内会誌, 46 : 803, 1958. — 2) Morgan, M.C. et al.; Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 85 : 420, 1954. — 3) Cohen, J.A. & Warrington, G.P.J.; J. Clin. Invest., 33 : 459, 1954. — 4) Leeksma, C.H.W. & Cohen, J.A.; Nature (London), 175 : 552, 1955. — 5) Karger, S.; Bibl. Haemat., Fasc. 7 : 364, 1958. — 6) Morgan, M.C., Keating, R.P. & Reisner, E.H. Jr.; J. Lab. Clin. Med., 46 : 521, 1955. — 7) Robertson, J.S., Milne, W.L. & Cohns, S.H.; Proc. II Internat. Radioisotopes Congress, p. 205, 1954, Butterworth Scientific Publications, London. — 8) Müller, J.F.; Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83 : 557, 1953. — 9) Schwartzman, G., Klemperer, P. & Gerber, I.E.; J.A.M.A., 107 : 1946, 1936. — 10) Julliard, J., Maupin, B., Loverdo, A.A., Bernard, J., Colvez, P. and Lecomte, M.; Presse Med., 60 : 518, 1952. — 11) Schwartzman, G. & Gerber, I.E.; Ann. New York Acad. Sci., 159 : 627, 1948. — 12) Singer, K., Bornatein, F.P. & While, S.A.; Blood, 2 : 542, 1947. — 13) Singer, K., Motulsky, A.G. & Shanberge, G.N.; Blood, 5 : 434, 1950. — 14) Meacham, G.L., Orbison, J.L., Heine, R.W., Steele, H.J. & Schaffer, J.A.; Blood, 6 : 706, 1951. — 15) Heilmeyer, L. & Begemann, H.; Handbuch d. inn. Med. Bd. II. Springer, Berlin, 1951. (4 Aufl.). — 16) Wintrobe, M.M.; Clinical Hematology, Lea & Febiger, Philadelphia. 1956. (4 Ed.). — 17) 森田久男：血液学討議会報告, 5 : 298, 1953.