溶血赤血球中の凝固因子に関する研究

第2編 臨床的並びに実験的研究

信州大学医学部松岡内科学教室(指導: 松岡松三教授)

小林 和雄

STUDIES ON BLOOD CLOTTING FACTORS IN HEMOLYSATE

II. CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES

BY

Kazuo Kobayashi

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshū University, Matsumoto
(Prof.: Matsuzō Matsuoka)

梗概 血液凝固の分野における赤血球の研究は比較的新しいものである。

著者はさきに発表した第1編基礎的研究(日血会誌投稿中)に次いで、この因子の臨床的及び実験的研究を行なったので報告する。即ち基礎的研究により、溶血赤血球は血小板第3因子と類似の作用を有することを認めたが、これに基づいてトロンボプラスチン形成試験を利用して凝固因子と密接な関係を有する血液疾患及び肝疾患、更に実験的肝障害家兎についてこの因子の消長を検討し、貧血及び肝障害を有する疾患においては溶血赤血球の血小板第3因子作用は一般に低下し、かつ回復し得る貧血、肝疾患では低下したこの作用は病状の軽快に伴ない正常化する傾向を認め、実験的研究でも一致する結果を得た。

緒 言

血液凝固の分野における赤血球の研究は比較的新しいものである。1951年 Shinowara¹⁾ により初めて赤血球因子に関する報告がなされ、その後 Gollub²⁾, Walther³⁾, Quick et al⁴⁾, Georgatsos et al⁵⁾, Hussey et al⁶⁾ 等によりこの因子に関する研究が発表され、著者⁷⁾ はさきにその凝固因子作用と二、三の性質について報告したが、これらの研究はすべて赤血球因子の凝固学的性質に関する基礎的検討であり、未だ臨床的並びに実験的研究については発表されていない。

著者は基礎的研究⁷⁾ により得られた結果—溶血赤血球は血小板第3因子と類似の作用を有する—

に基づいて、トロンボプラスチン(以下トプと略す)形成試験を利用し、凝固因子と密接な関係を有する血液疾患及び肝疾患更に実験的肝障害家兎について、この因子の消長を検討したので報告する。

実験方法

(A) 溶血赤血球の調製法

血液9容と0.1M蔞酸ソーダ1容とを混合し毎分1,000回転5分間遠心して血漿を除去し、等量の生理食塩水を加えてよく混合し再び毎分1,000回転10分間遠心し、上澄を除去する。更に生理食塩水を加えて毎分3,000回転20分遠心し、上澄をすてこの操作を二回繰返し、最後に適量の生理

食塩水を加えて赤血球浮遊液を作り、 1 mm^3 中の赤血球数を算定し、 $-10^\circ\text{C}\sim-15^\circ\text{C}$ の氷室に保存して溶血せしめる。

実験には一晝夜氷室保存により得られた溶血赤血球を、 $100\times 10^4/\text{mm}^3$ の赤血球を含む濃度に調製して使用した。

(B) 溶血赤血球の血小板第3因子作用の検討方法

Biggs-Douglas 氏トプ形成試験⁹⁾によったが、教室では本法を検討し、多少の変更を加えて用いているのでこれに従った。

すなわち、(イ)被検血漿を $\text{Al}(\text{OH})_3$ で吸着する代りに BaSO_4 で吸着している。(ロ)血小板浮遊液は 1 mm^3 中に 100×10^4 以上含有するものを用いているの2点である。

形成されたトプ活性度を表現するには縦軸に凝固時間を取り、横軸に混合後の経過時間 (incubation time) をとり、最短凝固時間が混合後何分におこるかを記載する方法と、縦軸にトプ活性度を%でとり、横軸に経過時間を取り、最大の活性度が混合後何分におこるかを記載する方法とあるが、この場合には標準稀釈曲線の作製を必要とする。

著者は主として後者を用いてトプ活性度を表現した。

臨床実験成績

(I) 各種貧血患者の赤血球の血小板第3因子作用

血液疾患、肝疾患、腎疾患等にて血色素量80%以下、赤血球数 $400\times 10^4/\text{mm}^3$ 以下の貧血をみとめた37例につき、その溶血赤血球の血小板第3因子作用をトプ形成能により検討した。

実験成績：

図1はトプ形成能と血色素量との関係を表わしたものである。図に見られる如く、90%以上のトプ形成を認めたものは全例中4例に過ぎず、血色素量50%以下のものではトプ形成は全て80%以下を示した。更に全体としてこれを見るに血色素量の減少に伴って、トプ形成能すなわち血小板第

Fig. 1. The function of hemolysate as platelet factor 3 in various anemia.

(I) Correlation between its activity and hemoglobin.

Fig. 2. The function of hemolysate as platelet factor 3 in various anemia.

(II) Correlation between its activity and erythrocyte count.

3因子作用の低下する傾向を認めた。

図2は同じく赤血球数との関係を表わしたもの

であり、赤血球数 $200 \times 10^4/\text{mm}^3$ 以下のものでは1例を除き他は全て80%以下である。

又血色素量におけると同様に、赤血球数においてもその減少に伴って、トプ形成能は低下する傾向を認めた。

以上の実験成績より、貧血を有する患者の溶血赤血球の血小板第3因子作用は一般に低下しており、その程度は貧血の程度とほぼ平行していると見なすことが出来る。

(Ⅱ) 血液疾患における溶血赤血球の血小板第3因子作用の治療による影響

前項においては、広く一般に貧血を有する患者の溶血赤血球の血小板第3因子作用は減弱し、貧血の程度とほぼ相関々係を有することを報告したが、本項においては更にこれが治療によって疾患が回復した場合に、この作用が如何に変化するかを二、三の疾患について検討した。

a) 本態性低色素性貧血

本態性低色素性貧血に鉄剤を投与して治療した場合には図3の如く、貧血の回復に伴ない血色素

量及び赤血球数の増加にはほぼ平行して溶血赤血球の作用は何れも著しく回復し、トプ形成能の増大を認めた。

b) 再生不良性貧血

入院時貧血の著明な場合と、輸血・プレドニゾン投与等によって貧血が改善された場合との溶血赤血球の作用を比較すると図4の如く、本態性低色素性貧血の場合と異なり、貧血が回復した場合にも溶血赤血球のトプ形成作用は回復しないか、回復しても極めて軽度である。

c) 急性赤白血病

図5に示す如く、b)と同様の傾向が見られた。

d) 血小板減少性紫斑病

本例は紫斑病により二次性貧血を起こした症例であるが、図5に示す如く、a)と同様の傾向を認めた。

e) パンチ氏病

図6に示す如く、入院時の溶血赤血球によるトプ形成能は58%と極めて不良であつたが、脾摘出

Fig. 3. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (1).

Fig. 4. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (2).

Fig. 5. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (3).

Fig. 6. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (4).

を行ない術後12日目、貧血が改善された時は84%と著しく増加し、a)と同様の傾向を示した。

f) スルフヘモグロビン血症

週2回 200cc宛等量の瀉血と輸血を繰り返した症例であり、貧血は余り高度でなく、かつ常に同

Fig. 7. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (5).

程度にとどまっていた。溶血赤血球のトプ形成能は図6の如く、著明な変化を見なかつた。

g) 血友病—B

症例1, 2共に殆ど貧血をみず、溶血赤血球のトプ形成能は図7の如く、症例1では何れも100%であり、症例2では極く僅かの血色素量及び赤血球数の増加によつて著しく増大した。

(Ⅲ) 肝疾患の溶血赤血球の血小板第3因子作用

肝障害を有する患者34例につき、その溶血赤血球の血小板第3因子作用をトプ形成能によつて調べ、これと肝機能(BSP排泄能、黄疸指数)との関係を検討した。

a) BSP排泄能との関係

溶血赤血球のトプ形成能とBSP排泄能との関係は図8に示す如く、BSP値(45分, %)の増加に伴つてその作用は減弱する傾向が認められた。

b) 黄疸指数との関係

同じく黄疸指数との関係は図9に示す如く、指数の増加に伴つてその作用は減弱する傾向が認

Fig. 8. The function of hemolysate as platelet factor 3 in liver injury.

(I) Correlation between its activity and BSP-test.

Fig. 9. The function of hemolysate as platelet factor 3 in liver injury.

(II) Correlation between its activity and icterus index.

められた。

以上の事実より肝障害を有する患者の溶血赤血球は、一般に血小板第3因子作用は低下しており、BSP排泄障害及び黄疸指数とは逆の相関、すなわち肝機能障害と相関々係があるものと

Fig. 10. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (1).

a) Acute hepatitis

考えられる。

(IV) 肝疾患における溶血赤血球のトプ形成能の治療による変化

前項においては一般に肝障害を有する患者の溶血赤血球の血小板第3因子作用と、BSP排泄能及び黄疸指数との関係について述べたが、本項においては更にこれを二、三の肝疾患について、その治療前後における変化を検討した。

a) 急性肝炎

図10に示す如く両例共肝機能の改善に伴って、溶血赤血球のトプ形成能は増大した。

b) 慢性肝炎

入院経過に従って4回の検討を試みた処、図11に示す如くBSP排泄能が16%から8%に、黄疸指数が11から7に改善された時には溶血赤血球のトプ形成能は68%から93%と著しく増大したが、その後BSP排泄能が8%前後に、黄疸指数が7前後に停滞するに及び、そのトプ形成能は再び74%~77%と減少した。

c) 肝硬変症

Fig. 11. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (2).

Fig. 12. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (3).

図12に示す如く治療によりBSP排泄能は34%から24%と減少し、黄疸指数は逆に6から10とやや増加したが、その溶血赤血球のトプ形成能は74%, 70%で著変をみとめなかつた。

Fig. 13. Changes of the thromboplastic activity of hemolysate in the clinical course (4).

d) 肝膿瘍

図12の如く症状が増悪した時、そのトプ形成能は88%から78%と低下した。

e) 肝癌

図13に示す如く、症例1においては黄疸はやや増強し、BSP排泄能はほぼ同程度であるが溶血赤血球のトプ形成能は著しく増加した。又症例2においては高度の黄疸及びBSP排泄障害があるにもかかわらず、そのトプ形成能は増加を示した。

以上の如く急性肝炎、慢性肝炎では疾患の軽快に伴ない溶血赤血球の作用は回復するが、肝硬変症では著変をみとめず、肝癌では病状の悪化にもかかわらずその作用の増強したことは病変の性質を異にするためと考えられる。

動物実験成績

成熟家兎6例に、体重1kg当り1.0ccの20% CCl₄ オリーブ油溶液を1回筋注して肝障害を惹起し、その後グルクロン酸を毎日1g宛5日間投与してその前後における溶血赤血球の血小板第3因子作用をトプ形成能により比較した。

Tab. 1. Changes of liver functions of rabbits after experimental liver injury.

Cases	Before injury			3 days after injury			7 days after injury		
	Urobilinogen (Ehrlich test)	BSP (%)	Retention time (sec.)	Urobilinogen (Ehrlich test)	BSP (%)	Retention time (sec.)	Urobilinogen (Ehrlich test)	BSP (%)	Retention time (sec.)
I	0.54	0	7.3	1.68	/	9.4	0.32	20.5	7.3
II	0.42	2.0	7.5	1.52	/	8.5	0.60	12.0	7.6
III	0.50	0	7.5	1.21	/	8.8	0.51	16.0	7.4
IV	0.45	1.0	7.6	1.86	/	15.4	0.84	19.0	7.8
V	0.67	0	7.4	1.41	/	9.7	1.01	18.0	7.6
VI	0.64	2.0	7.0	1.47	/	13.3	1.01	44.0	7.7

Tab. 2. Changes of the thromboplastic activity of rabbit-hemolysate after experimental liver injury.

Cases	Thromboplastic activity (%)		
	Before injury	3 days after injury	7 days after injury
I	84	41	45.5
II	62	7	40
III	66	37	58
IV	50	16	79
V	45	24	54
VI	57.5	18.5	59

Fig. 14. Changes of the thromboplastic activity of rabbit-hemolysate after experimental liver injury.

表1は障害前後の肝機能を表わし、障害により低下した肝機能が、グルクロン酸の投与により回復に向う事を示している。表中のプロトロンビン時間は松岡一段法¹⁰⁾により測定した。

表2及び図14は各時期における肝障害家兎溶血赤血球のトプ形成能の比較であり、障害により不良となつたトプ形成能は、回復に伴ない再び正常化する事を示している。

この結果は臨床実験成績(Ⅲ)とほぼ一致した。

なお、トプ活性度(%)の表現に当つては、各時期共健康人溶血赤血球のトプ形成能を100%として標準稀釈曲線を作製して算出し、比較した。

総括並びに考案

種々の凝固因子とともに血小板は血液凝固及び止血作用に重要な役割を有しているのは周知の事実であり、更に血小板は凝固因子を供給する唯一の血液細胞成分と考えられており、赤血球は血液凝固に関しては殆ど顧慮されていなかったが、Shinowara¹⁾, Gollub²⁾ 等により赤血球はトプ活性を有する事が報告され、又 Walther³⁾, Quick⁴⁾ は溶血した赤血球によりプロトロンビン消費が著しく亢進する事を認め、更に Georgatsos et al⁵⁾ は溶血赤血球は血小板因子と類似の作用を有し、Biggs-Douglas 法によるトプ形成試験⁶⁾において血小板に代用出来る事を示唆しており、著者の基礎的研究⁷⁾においても同様の結果が得られた。

溶血赤血球の血小板第3因子作用を検討するに当り、 $100 \times 10^4/\text{mm}^3$ の赤血球を含む濃度に調整した溶血赤血球を使用した根拠は、さきの研究⁷⁾において報告した如く、その作用は $60 \times 10^4 \sim 125 \times 10^4/\text{mm}^3$ の赤血球を含む濃度がもつとも強力であると認めた事によるものであり、この濃度の正常溶血赤血球のトプ形成能は、正常血小板による最高トプ形成能を100%として作製した標準稀釈曲線に当てはめて算出すると、90%~110%の範囲に存在する。

血液凝固因子は種々の疾患により消長をみる

が、殊に血液疾患及び肝疾患においては著しい。よつて著者は、赤血球因子がこれら両疾患において如何に変化するかを検討した処、溶血赤血球の血小板第3因子作用はそのトプ形成能により測定すると、貧血及び肝障害の程度とほぼ相関々係を有する事が認められ、 CCl_4 による実験的肝障害家兎における結果もこれと一致した。

又これと同時に各種臨床検査成績（安定因子、不安定因子、フィブリノーゲン量、血漿蛋白量等）との関係を検討したが、目下の処何れも有意の相関は認められない。

赤血球因子の純化の試みは各方面から検討されているが、1956年 Hussey et al⁶⁾は溶血赤血球に生理食塩水を加えて強遠心する事により、赤血球基質は血色素から分離され、プロトロンビン消費試験¹¹⁾によりこの因子は基質内に存在すると述べているが、著者⁷⁾も濾紙電気泳動法¹²⁾により、その作用は血色素とは異なつた分割に存在する事を確めた。

しかし乍らこの因子の本質的な問題についての研究は、今後に俟たねばならない。

結 論

血液疾患、肝疾患及び実験的肝障害家兎の溶血赤血球の血小板第3因子作用を、トプ形成試験により検討して次の結論を得た。

1) 貧血を有する患者の溶血赤血球の血小板第

3因子作用は一般に低下しており、その程度は貧血の程度とほぼ平行する。

2) 肝実質障害を有する肝疾患の溶血赤血球の血小板第3因子作用は一般に低下し、BSP排泄障害及び黄疸指数とほぼ逆の相関がある。

3) 回復し得る貧血、肝疾患では低下した溶血赤血球の血小板第3因子作用は、病状の軽快に伴ない正常化する傾向を示した。

4) 実験的肝障害家兎の溶血赤血球の血小板第3因子作用は低下した。

（本論文の要旨は 第20回日本血液学会総会 において発表した）。

文 献

- 1) Shinowara, G.Y.: J. Lab. & Clin. Med., 38: 11, 1951. — 2) Gollub, S.: Fed. Proc., 12: 54, 1953. — 3) Walther, G.: Blut, 2: 211, 1956. — 4) Quick, A.J., Georgatsos, J.G., Hussey, C.V.: Am. J.M. Sc., 228: 207, 1954. — 5) Georgatsos, J.G., Hussey, C.V., Quick, A.J.: Am. J. Physiol., 181: 30, 1955. — 6) Hussey, C.V., Kaser, M.M.: Fed. Proc., 15: 2788, 1956. — 7) 小林和雄: 日血会誌投稿中 (22巻3号, 昭34, 掲載予定). — 8) Biggs, R., Douglas, A.S.: J. Clin. Path., 6: 23, 1953. — 9) 松岡松三: 臨床の日本, 4: 676, 昭33. — 10) 松岡松三: 日内会誌, 37: 195, 昭24. — 11) Quick, A.J., Favre-gilly, J.E.: Blood, 4: 1281, 1949. — 12) 小林茂三郎, 森五彦: 濾紙電気泳動法の実験, 110, 昭30.