

# 慢性関節リウマチにおける血小板に関する研究

## 第 2 編

### 慢性関節リウマチにおける血小板特異蛋白

岡山大学医学部第 3 内科学教室

石 部 陽 二

(昭和56年11月24日受稿)

**Key words:** 慢性関節リウマチ  
血小板特異蛋白  
 $\beta$ -thromboglobulin  
血小板第 4 因子  
炎症の指標

#### 諸 言

第 1 編において、慢性関節リウマチ（以下 RA と略す）患者に血小板数の増加、および血小板機能のうちガラスビーズ法による血小板粘着能の亢進、アジュバント関節炎ラットにおける血小板数増多、粘着能亢進を認め、本症では炎症の過程で血小板が消費され、それが過代償されているものと考えた。

血小板は活性化され、一連の粘着、凝集、放出反応を来たすとき、 $\alpha$ -顆粒から特異蛋白を放出することが知られており、血栓性疾患での報告が散見されるに至っているが、膠原病での報告は少ない。現時点で血小板第 4 因子（以下 PF<sub>4</sub> と略す）と  $\beta$ -thromboglobulin（以下  $\beta$ -TG と略す）が測定可能であり、本編ではこれら血小板特異蛋白を測定することで RA の血小板機能の解析を試みた。

#### 患者並びに方法

$\beta$ -thromboglobulin および血小板第 4 因子を測定した RA 患者集団が完全に一致しないことから両者を分けて記載する。

#### I. $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG)

##### I-1. 対象

アメリカリウマチ協会（以下 ARA と略す）診断基準で definite および classical の RA 患者 42 例で、その内訳は、女性 41 例、男性 1 例、年齢は 24 才から 75 才までで平均 56.3 才である。また治療方法により分類すると、金塩剤投与群 10 例、D-ペニシラミン投与群 9 例、ステロイド剤経口投与群 5 例（そのうち 1 例は D-ペニシラミンを併用）、非ステロイド性消炎鎮痛剤単独投与群 18 例、無投薬群 1 例である。対照として健常人 17 例で  $\beta$ -TG を測定した。

##### I-2. $\beta$ -thromboglobulin の測定法

肘正中皮静脈より、ポリスチレン注射器に装着した 20 ゲージ針で 1 回穿刺で得た静脈血を、ただちにあらかじめ水冷しておいた Theophyllin, EDTA 加採血管に 2.5 ml 入れ、2~3 回反転混合し、碎水冷水中で約 15 分間冷却した。その後、2000G、30 分、4℃にて遠心沈殿し、乏血小板血漿である上清の 500  $\mu$ l を検体保存用のポリスチレンチューブに納め、-20℃で凍結保存し、2 週間以内にラジオイムノアッセイにて  $\beta$ -TG を測定した。測定には、英国 Amersham

社製の  $\beta$ -TG RIA KIT を用いた。すなわち  $\beta$ -TG 濃度が 10, 20, 50, 225 ng/ml の標準血清を用い標準曲線を作製した。50  $\mu$ l ずつ、2 本宛チューブに入れ各チューブに標識  $I^{125}$ - $\beta$ -TG 溶液 200  $\mu$ l を分注し、続いて抗  $\beta$ -TG 血清 200  $\mu$ l を分注した。全チューブをボルテックスミキサーを用いて十分混合した後、室温で 1 時間 incubate した。incubate 後全チューブに硫酸アンモニウム溶液 500  $\mu$ l を加え、十分に混合し、各チューブを 1500 G, 15 分間遠心沈殿し、結合した  $I^{125}$  と遊離の  $I^{125}$  を分離した。上清を decontamination した後各チューブを  $\gamma$  カウンターにより duplicate でカウントした。検体の測定には上記  $\beta$ -TG 標準血清のかわりに凍結より溶解した乏血小板血漿を用い、同じ方法で同時に検索した。

#### I-3. 血小板数の算定

ユノペット (藤沢メディカルサプライ株式会社製, up-5855) を用いた。方法の詳細は第 1 編に記したので省略する。

#### I-4. その他の臨床的炎症の指標

RA 炎症活動性指標として、同時期採血の検体を用いて測定した。血沈 1 時間値, CRP-titer, 血清  $\gamma$ -globulin 量を用いた。

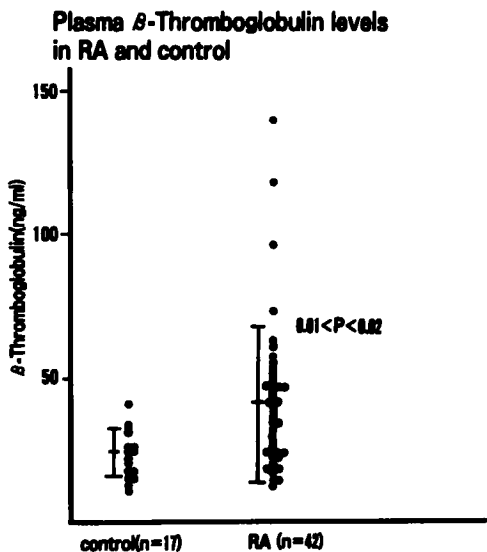


図 1. RA 患者群と健常人群の血漿  $\beta$ -Thromboglobulin 濃度: RA 患者群において健常人群に比し有意な  $\beta$ -TG の高値 ( $p < 0.02$ ) を認める。

## II. 血小板第 4 因子 ( $PF_4$ )

### II-1. 対象

ARA 診断基準で definite および classical の RA 患者 40 例で内訳は、女性 34 例、男性 6 例である。対照として健常人 17 例の  $PF_4$  活性を測定した。

### II-2. 血小板第 4 因子の測定法

松岡らの方法によった。すなわち、3.8% クエン酸ソーダ加血液 (3.8% クエン酸血液: 血液 = 1:9) を、3000 rpm, 15 分間室温にて遠心沈殿して得られた乏血小板血漿を、60°C, 10 分間加熱し、fibrinogen, 各種凝固因子, antithrombin, 血小板第 3 因子を失活させ、さらに 1500 rpm, 10 分間室温にて遠心沈殿してその上清を test-

表 1. 治療薬剤別にみた血漿  $\beta$ -TG 濃度: 各群間に有意差は認めない。なお、ステロイド群, D-ペニシラミン群, 金群の患者は全例非ステロイド性抗炎症剤を併用している。

### $\beta$ -Thromboglobulin levels in each group

	Pt. number	Mean $\beta$ -TG ng/ml $\pm$ SD
STEROID	5	50 $\pm$ 42
D-PENICILLAMINE	8	43 $\pm$ 41
NSAID ALONE	18	42 $\pm$ 21
GOLD SALTS	10	35 $\pm$ 12

Pt: Patient. NSAID: nonsteroidal antiinflammatory drugs

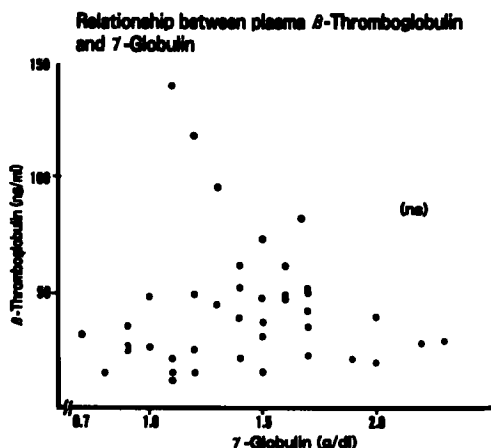


図 2. 血漿  $\beta$ -Thromboglobulin 濃度と  $\gamma$ -globulin の関係: 有意な相関は認めない。

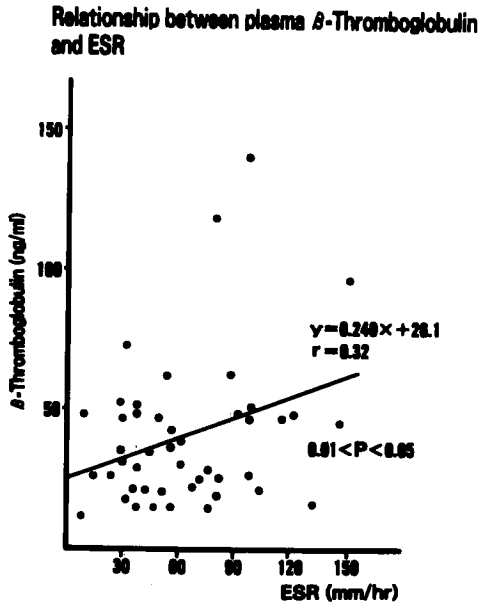


図3. 血漿  $\beta$ -TG 濃度と血沈1時間値の関係：正の相関 ( $\gamma=0.32$ ,  $p<0.05$ )を認める。

Relationship between plasma  $\beta$ -Thromboglobulin and CRP

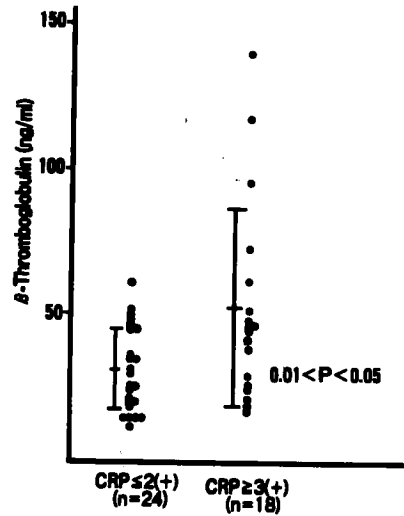


図5. 血漿  $\beta$ -TG 濃度と CRP-titer の関係：CRP 3 (+) 以上群と 2 (+) 以下群に分類すると、前群に有意な  $\beta$ -TG の高値 ( $p<0.05$ ) を認める。

Relationship between plasma  $\beta$ -Thromboglobulin and Platelet count

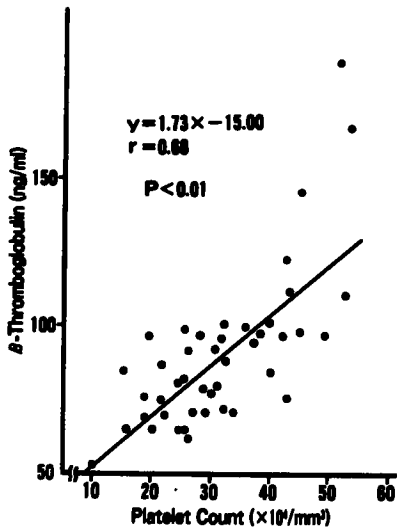


図4. 血漿  $\beta$ -TG 濃度と血小板数の関係：正の相関 ( $\gamma=0.68$ ,  $p<0.01$ )を認める。

Plasma PF<sub>4</sub> activity

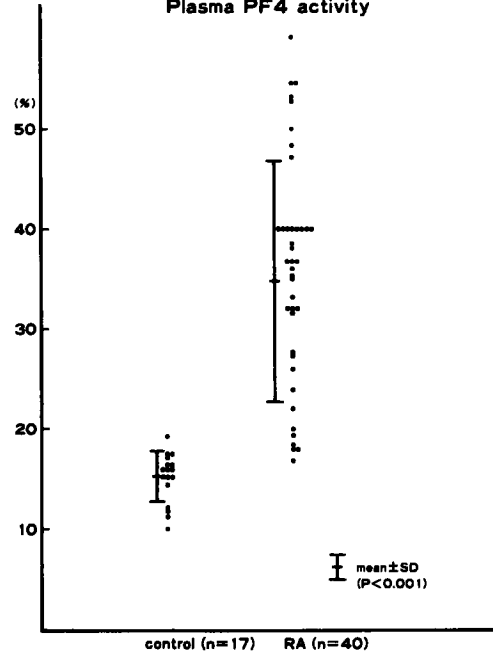


図6. RA 患者群と健常人群の血漿PF<sub>4</sub>活性：RA 患者群において健常人群に比し有意な PF<sub>4</sub> 活性の亢進 ( $p<0.001$ ) を認める。

表2. RA患者群と健常人群の血小板数, FDP, Fibrinogen, Antithrombin IIIの比較:  
RA患者群において有意な血小板数( $p < 0.001$ ), FDP ( $p < 0.005$ ), Fibrinogen ( $p < 0.001$ )の高値と, Antithrombin III ( $p < 0.001$ )の低値を認める.

Comparison of platelet count, FDP, Fibrinogen, and Antithrombin III between control and RA

	control (n=17)	RA (n=40)	
Platelet count ( $\times 10^4$ )	25.1 $\pm$ 6.57	43.5 $\pm$ 11.5	P<0.001
FDP ( $\mu$ g/dl)	4.11 $\pm$ 2.49	7.50 $\pm$ 4.12	P<0.005
Fibrinogen (mg/dl)	316 $\pm$ 50.1	468 $\pm$ 88.6	P<0.001
Antithrombin III (mg/dl)	31.1 $\pm$ 2.38	25.1 $\pm$ 4.03	P<0.001

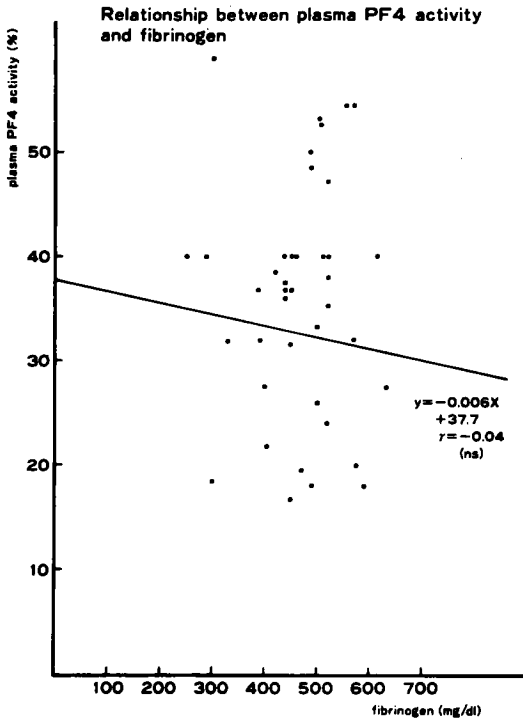


図7. 血漿PF<sub>4</sub>活性とFibrinogenの関係: 有意な相関は認めない.

plasmaとして用いた。基質として健常人plasma 0.3mlを用い、これにtest-plasma 0.1ml及びheparin (0.5u/ml) 0.1mlを加え、37°C, 2分間incubate後、thrombin (30u/ml) 0.1mlを加えて、heparin-thrombin-time (HTT) Asec. を測定した。同様にしてtest-plasmaのかわりに蒸

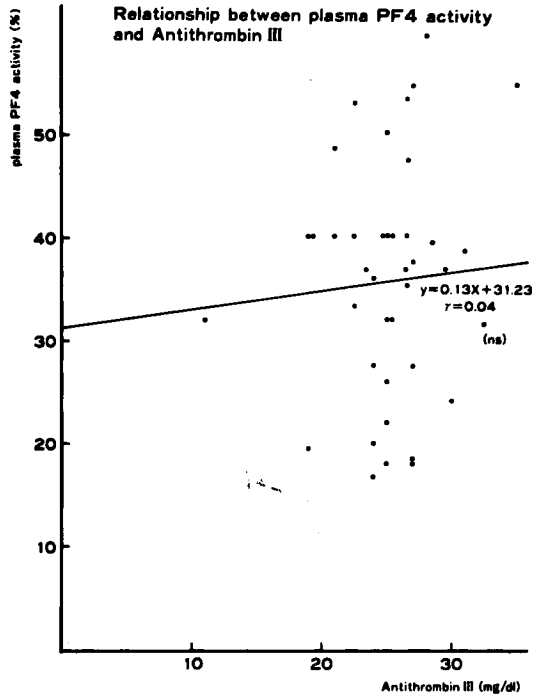


図8. 血漿PF<sub>4</sub>活性とAntithrombin IIIの関係: 有意な相関は認めない.

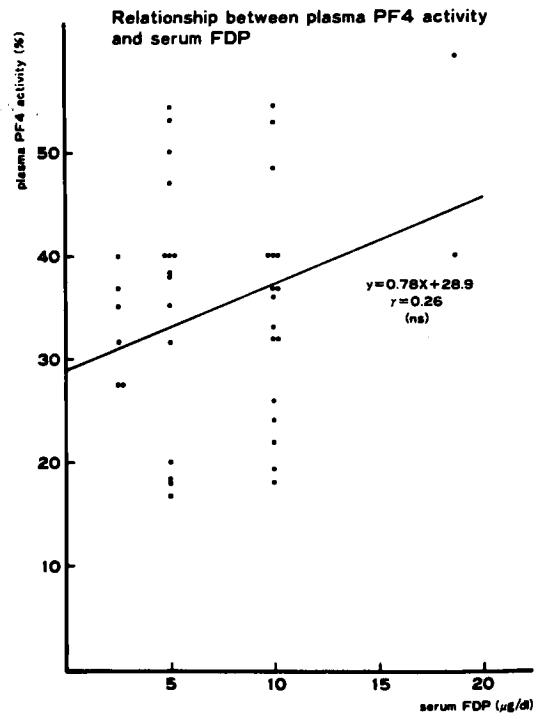


図9. 血漿PF<sub>4</sub>活性と血清FDPの関係: 有意な相関は認めない.

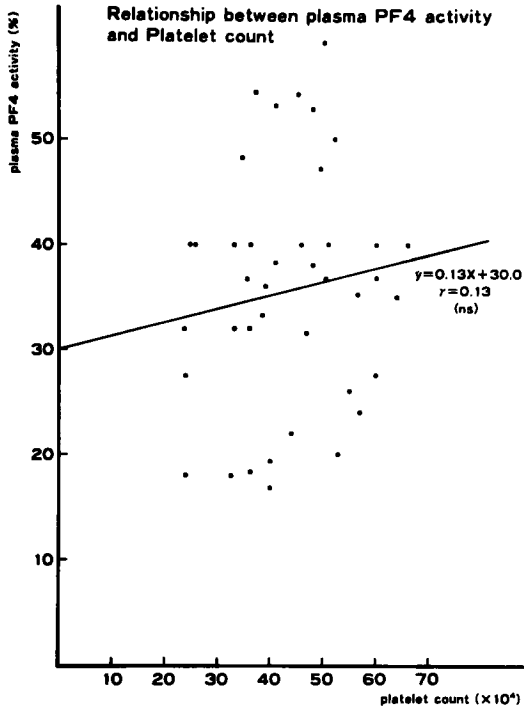


図10. 血漿 PF<sub>4</sub> 活性と血小板数の関係：有意な相関は認めない。

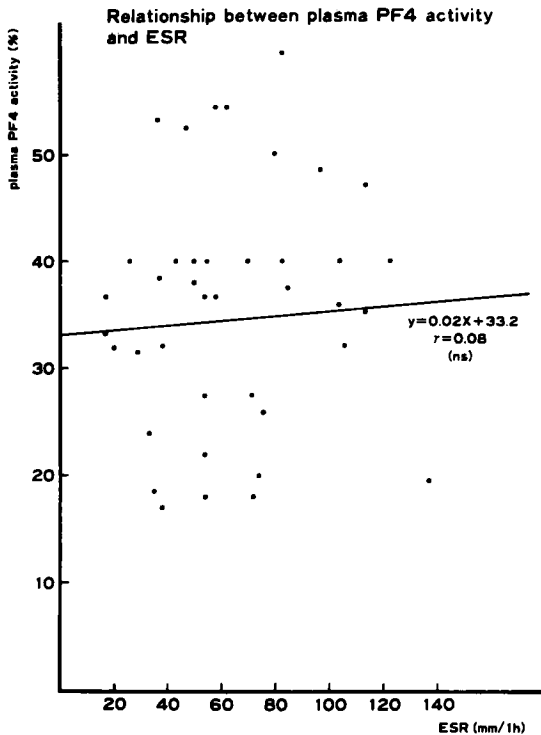


図11. 血漿 PF<sub>4</sub> 活性と血沈1時間値の関係：有意な相関は認めない。

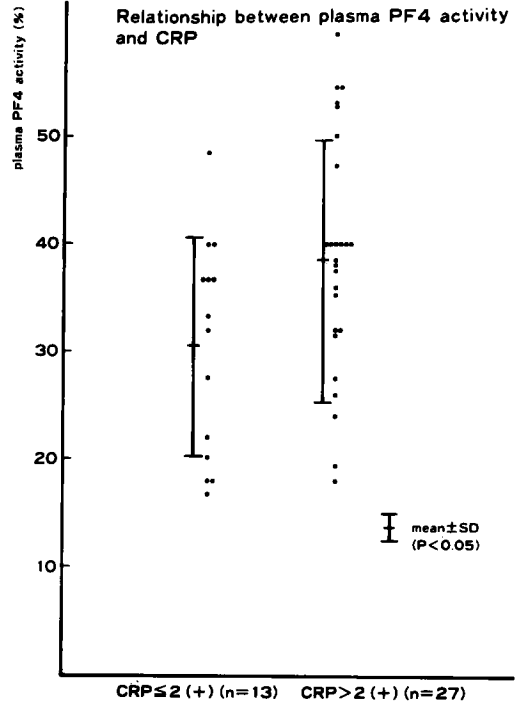


図12. 血漿 PF<sub>4</sub> 活性と CRP-titer の関係：CRP 3 (+) 以上群と 2 (+) 以下群に分類すると、前群に有意な PF<sub>4</sub> 活性の亢進 (p < 0.05) を認める。

留水0.1mlを用い(HTT) Aosecを測定しこれをblankとしA/Ao比を求めた。さらに、あらかじめ正常人血漿中のPF<sub>4</sub>活性を100%と見なし、これを生理食塩水で希釈して、前記の方法にて作成した検量線を用いてRA患者 plasma PF<sub>4</sub>活性を%にて算出した。

### II-3. その他の凝固、線溶系の指標

同時にRAおよび対照の全例で、血小板数をユノペットによる直接法で、fibrinogenとanti-thrombin IIIをM-パルチゲン(Hoechst社製)を用いた免疫一次拡散法で、FDPをFDP KIT(Wellcome社製)で測定し、PF<sub>4</sub>活性との相関をみた。

### II-4. その他の臨床的炎症の指標

RA炎症の活動性指標として、血沈1時間値、CRP-titerを用いた。

## 結 果

### I. β-Thromboglobulin 値

RA患者群と健常人のβ-TG値を比較すると、

RA 群で $41 \pm 27 \text{ ng/ml}$ 、健常人で $24 \pm 8 \text{ ng/ml}$ となり、RA 患者群に推計学的に有意な( $p < 0.02$ )増加を認めた(図1)。

次に RA 患者群において、治療薬剤別にみるに、ステロイド群 $50 \pm 42 \text{ ng/ml}$ 、D-ペニシラミン群 $43 \pm 41 \text{ ng/ml}$ 、非ステロイド性消炎鎮痛剤単独群 $42 \pm 21 \text{ ng/ml}$ 、金塩群 $35 \pm 21 \text{ ng/ml}$ となり、ステロイド群に最も高値を示したが、推計学的な有意差は認めなかった(表1)。

RA 炎症の臨床的指標のうち、 $\gamma$ -globulin と  $\beta$ -TG は一定の関係を認めなかったが、 $\beta$ -TG と血沈1時間値及び  $\beta$ -TG と血小板数との間には有意な正の相関( $\gamma = 0.32$ ,  $p < 0.05$ )( $\gamma = 0.68$ ,  $p < 0.01$ )を認めた(図2, 3, 4)。また  $\beta$ -TG と CRP-titer との間には、CRP 2(+)以下群と 3(+)以上群に分類した場合、 $\beta$ -TG値は前者で $32 \pm 14 \text{ ng/ml}$ 、後者で $53 \pm 34 \text{ ng/ml}$ となり推計学的に有意差( $p < 0.01$ )を認めた(図5)。

## II. 血小板第4因子(PF<sub>4</sub>)

PF<sub>4</sub>活性は RA 患者群において $34.8 \pm 12.0\%$ 、健常人群で $15.1 \pm 2.5\%$ となり、RA 患者群に有意な( $p < 0.001$ )亢進を認めた(図6)。次に血中 fibrinogen 量は RA 患者群 $466 \pm 86.6 \text{ mg/dl}$ 、健常人群 $316 \pm 50.1 \text{ mg/dl}$ であり、RA 患者群に有意な( $p < 0.001$ )高値を認め、また強力な凝固阻止物質として知られている antithrombin III は、RA 患者群 $25.1 \pm 4.03 \text{ mg/dl}$ 、健常人群 $31.1 \pm 2.38 \text{ mg/dl}$ となり RA 患者群に有意な( $p < 0.001$ )低値を認めた。一方、線溶能の指標の1つである血中 FDP についてみると、RA 患者群 $7.50 \pm 4.12 \mu\text{g/dl}$ 、健常人群 $4.11 \pm 2.49 \mu\text{g/dl}$ と RA 患者群に有意( $p < 0.005$ )の高値を認めた(表2)。fibrinogen, antithrombin III, FDP と PF<sub>4</sub>活性の相関は認めなかった(図7)。

RA 患者群において、PF<sub>4</sub>活性と RA 炎症活動性指標との相関を検討したところ、PF<sub>4</sub>活性と血小板数、血沈1時間値、との間には相関を認めなかった(図10, 図11)。しかし CRP との間には、CRP 2(+)以下群と 3(+)以上群に分類した場合 PF<sub>4</sub>活性は前者で $30.5 \pm 10.0\%$ 、後者で $48.5 \pm 12.0\%$ となり、CRP 3(+)以上群に有意な( $p < 0.05$ ) PF<sub>4</sub>活性の亢進を認めた(図12)。

## 考 按

従来より血小板は止血栓の形成に関与していることが知られているが、近年血小板に関する研究が進むにつれて、各種炎症反応に関与していることが明らかになってきた。血小板は炎症局所において microthrombus を形成することにより、局所循環を障害するとともに、血管透過性物質を放出し<sup>6),7)</sup>、また補体を賦活し、白血球遊走をひきおこすという<sup>8)</sup>。さらに血小板中には各種 lysosomal-enzyme や protease 等の酵素も含まれており、これらの物質は炎症誘発物質として知られている。また、血小板中には fibroblast を増殖させる物質が含まれているという報告<sup>9)</sup>や、血小板中に含まれた serotonin が collagen を増殖させるという報告<sup>10)</sup>もあり、起炎作用のみならず肉芽形成にも関与している可能性が考えられる。

1975年に Mooreらは、thrombin による血小板凝集の際、多くの血小板内容物質が放出されるが、これらの大部分は血小板に特異な物質ではなく、他の in vivo の細胞からも出ていていると考えられるが、 $\beta$ -TG は血小板に特異な蛋白であろうと報告している。その後、静脈血栓症<sup>3)</sup>、臨床的に micro-angiopathy を伴った糖尿病等の血栓性疾患での血漿中  $\beta$ -TG 増加が報告されるに至っているが、膠原病、特に RA における報告は見当たらない。今回の検索の結果では、RA 患者の乏血小板血漿中の  $\beta$ -TG は健常人に比しての有意な増加と RA 炎症活動性とのある程度の相関を示した。このことから、RA では血小板系が活性化され、一連の粘着、凝集、放出反応も亢進しており、大多数の症例で抗血小板剤が投与されているにもかかわらず、 $\beta$ -TG は高値を示したものと考えられる。しかし未血中の血小板数の増加が  $\beta$ -TG の増加の原因とも考えられるが、遠藤らの報告によれば、血小板数の増加しない疾患での  $\beta$ -TG の高値も見られるという。

いま1つの血小板特異蛋白である PF<sub>4</sub>も、血小板の  $\alpha$ -顆粒に含まれる分子量27000 の蛋白で、血小板の破壊、消費の際に放出され、その作用は heparin と complex を作ることにより、anti-

heparin 活性を示し<sup>12)</sup>, また soluble fibrin monomer complex に対する非酵素的 paracoagulation 作用を有し, さらに fibrin沈着の trigger としての役割を持っている<sup>13)</sup>とされている. P-F<sub>4</sub>測定に際し松岡らの方法に準じ heparin-neutralizing-activity を用いた. 松岡は PF<sub>4</sub>の動態によって各種疾患の血小板機能を3型に分類している<sup>5),14)</sup>. すなわち, (1)血小板消費, 破壊, 凝集が亢進していることにより, PF<sub>4</sub>高値をとるもの, (2)血小板機能が血小板の幼弱化, 刺激に対する過敏性, 活発な代謝などにより亢進するために PF<sub>4</sub>高値をとるもの, (3)血小板数減少のみでなく, 機能低下があるために PF<sub>4</sub>の分泌, 放出反応が低下して低値をとるもの, とに分類している. それぞれに相当する代表的疾患として(1)DIC, (2)再生不良性貧血, (3)特発性血小板減少性紫斑病, をあげている. 今回の PF<sub>4</sub>の検索の結果, RA 患者における PF<sub>4</sub>活性は健常人に比しての有意な亢進と, CRP 強陽性群に弱陽性群に比しての有意な亢進が認められた. 一方, antithrombinIII の有意な低下と, 血中FDPの有意な上昇がみられたことから, 本症患者には凝

固能の亢進とそれに伴う二次的線溶亢進状態が存在していると考えられる.

以上の結果より, 本症においては血小板の破壊, 消費の亢進があり, それに伴った代償性の血小板産生亢進により, 未血中の血小板数増多, 血小板機能亢進を来し, いわゆる血栓準備状態にあるものと考えられる.

## 結 語

RA 患者の血小板特異蛋白を検索し, 次の結果を得た.

1. 血漿  $\beta$ -TG 濃度は健常人に比し, 有意な高値を認め, 血小板数, 血沈1時間値と正の相関を示し, CRP 強陽性群で弱陽性群に比し高値を示す傾向を認めた.

2. 血漿 PF<sub>4</sub>活性は健常人に比し, 有意な亢進を認め, CRP 強陽性群で弱陽性群に比し高値を示す傾向を認めた.

3. このことから RA では血小板機能は亢進しており, いわゆる血栓準備状態にあると考えられる.

## 文 献

1. Moore, S., Pepper, D.S. and Cash, J.D.: The isolation and characterization of platelet-specific  $\beta$ -globulin ( $\beta$ -thromboglobulin) and the detection of anti-urokinase and anti-plasmin released from thrombin-aggregated washed human platelets. *Biochem. Biophys. Acta* 379, 360—369, 1975.
2. Ludlam, C.A., Moore, S., Bolton, A.E., Pepper, D.S. and Cash, J.D.: The release of a human platelet specific protein measured by a radioimmunoassay. *Thromb. Res.* 6, 543—548, 1975.
3. Ludlam, C.A., Bolton, A.E., Moore, S. and Cash, J.D.: New rapid method for diagnosis of deep vein thrombosis. *Lancet* 2, 259—260, 1975.
4. Preston, P.E., Ward, J.D., Marcola, B.H., Porter, N.R., Timperley, W.R., O'Malley, B.C.: Elevated  $\beta$ -thromboglobulin levels and circulating platelet aggregates in diabetic microangiopathy. *Lancet* 1, 238—239, 1978.
5. 松岡松三, 星山真理, 品川章二, 桜川信男: 血小板第4因子に関する研究—第1報, 血小板第4因子と出血との関係—, *臨床血液*, 16, 936—945, 1975.
6. Mustard, J.F., Movat, H.Z., MacMorine, D.R.L. and Senyi, A.: Release of permeability factors from the blood platelet. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119, 988—991, 1965.
7. Nachman, R.L., Weksler, B. and Ferris, B.: Characterization of human platelet vascular permeability-enhancing activity. *J. Clin. Invest.* 51, 549—556, 1972.
8. Weksler, B.B. and Coupal, C.D.: Platelet-dependent generation of chemotactic activity in serum. *J. Exp. Med.* 137, 1419—1430, 1973.

9. Rutherford, R.B., Ross, R.: Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells. Quiescent in plasma serum to proliferate. *J. Cell. Biol.* **69**, 196—203, 1976.
10. Aalto, M. and Kulonen, E.: Effects of serotonin, indomethacin and other anti-rheumatic drugs on the synthesis of collagen and other proteins in granulation tissue slices. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 2835—2840, 1972.
11. 遠藤安行, 間宮繁夫, 佐藤マキ, 高橋恵子: 慢性骨髄性白血病などにおける  $\beta$ -Thromboglobulin の異常について, *医学のあゆみ*, **109**, 312—313, 1979.
12. Nath, N., Niewiarowski, S. and Joist, J.H.: Platelet factor 4—antiheparin protein releasable from platelets. Purification and properties. *J. Lab. Clin. Med.* **82**, 754—768, 1973.
13. Niewiarowski, S. and Thomas, D.P.: PF<sub>4</sub> and ADP release during human platelet aggregation. *Nature* **222**, 1269—1270, 1969.



**Studies on thrombocytes in patients with rheumatoid arthritis**  
**Part 2. Platelet specific protein in patients with rheumatoid**  
**arthritis.**

**Yoji ISHIBE**

**Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School.**

Plasma  $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) concentration and platelet factor 4 (PF<sub>4</sub>) activity were examined and related to parameters of inflammation in patients with rheumatoid arthritis (RA). In 42 RA patients, the  $\beta$ -TG concentration assessed by radioimmunoassay ( $\beta$ -TG RIA KIT Amersham) was significantly higher than that of 17 normal controls ( $p < 0.002$ ). The  $\beta$ -TG concentration correlated with the platelet count ( $r = 0.68$ ,  $p < 0.01$ ) and erythrocyte sedimentation rate ( $r = 0.32$ ,  $p < 0.005$ ). Plasma PF<sub>4</sub> activity, tested by heparin neutralizing activity, was significantly higher than that of 17 normal controls ( $p < 0.001$ ). In the strongly positive CRP group (CRP 3(+) or more) PF<sub>4</sub> activity was significantly higher than in the weakly positive CRP group (less than CRP 2(+)) ( $p < 0.05$ ). No correlation between PF<sub>4</sub> activity and other parameters such as the platelet count, erythrocyte sedimentation rate, fibrinogen, antithrombin<sup>III</sup>, or FDP was demonstrated. These results suggest that accelerated platelet functions were present in patients with clinically active RA.