

骨髓増殖症候群の血小板機能に関する研究

第 2 編

骨髓増殖症候群の血小板 Adenine nucleotides に関する研究

岡山大学医学部第2内科学教室（主任：木村郁郎教授）

野 崎 宏 幸

（昭和52年3月31日受稿）

目 次

第1章 緒 言

第2章 実験対象及び実験方法

第1節 実験対象

第2節 実験方法

第1項 採血方法

第2項 血小板凝集能測定法並びに血小板凝集惹起物質の調整

第3項 血小板 ADP 及び ATP の測定方法

I) 使用機器

II) 試 薬

III) 血小板内 ADP 及び ATP 並びに血小板放出 ADP 及び ATP の測定方法

IV) ADP 及び ATP の標準曲線

第4項 血漿 ADP ase 並びに ATP ase 様活性の測定方法

第3章 実験成績

第1節 血小板内 ADP 及び ATP 量に関する検討

第1項 血小板内 ADP 量に関して

第2項 血小板内 ATP 量に関して

第3項 血小板内 ATP, ADP 比に関して

第2節 血小板放出 ADP 及び ATP 量に関する検討

第1項 ADP 凝集時における血小板放出 ADP 及び ATP 量に関して

第2項 l-Epinephrine 凝集時における血小板放出 ADP 及び ATP 量に関して

第3項 Collagen 凝集時における血小板放出 ADP 及び ATP 量に関して

第4項 Bovine fibrinogen 凝集時における血小板放出 ADP 及び ATP 量に関して

第5項 Zymosan 凝集時における血小板放出 ADP 及び ATP 量に関して

第3節 症例別による血小板 Adenine nucleotides に関する検討

第4節 血漿 ADP ase 並びに ATP ase 様活性に関する検討

第4章 総括並びに考案

第5章 結 論

第1章 緒 言

慢性骨髓性白血病 (CML), 真性多血症 (PV), 本態性血小板增多症 (ET) 等の骨髓増殖症候群 (MPD) においては, 通常末梢血の血小板数の増加があるにもかかわらず, 出血傾向を認めたり又一方血栓傾向を認めることが古くより報告されて来た^{1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10)} 著者もその機序を解明せんとして血小板機能に着目し, 第1編に示した如く CML, PV 共に Epinephrine 凝集の低下と Platelet factor-3 availability の低下を高頻度に認め, しかもその他に Collagen 凝集の低下を, 又 PV では更に ADP 凝集の低下を認めた. 出血傾向を認めた症例には上記の血小板機能異常が重複して認められた. これらの凝集惹起物質による凝集には血小板内の ADP の関与が考えられており^{11) 12) 13) 14) 15) 16) 17) 18) 19)} そこで著者は MPD の上記血小板機能異常の機序を解明する目的で, MPD の血小板内 Adenine nucleotides と血小板凝集時における放出 Adenine nucleotides に関して検討した. MPD の血小板 Adenine nucleotides

に関しては、Tangün らによって Kaolin 添加時における MPD の血小板からの凝集惹起物質の放出能の低下が報告されている。しかしこの凝集惹起物質は ADP と考えられるが、Tangün らの測定は Weiss ら²⁰⁾の方法に準じたものであり、ADP を直接定量したものではない。又一方 Spaet ら²¹⁾は、¹⁴C-Serotonin 摂取率の低下を認め、このことより MPD の血小板内 Adenine nucleotides の低下を間接的に推測しているにすぎない。そこで著者は、Holmsen ら²¹⁾ 22) 23) 24) 25) の方法に準じ Luciferin-Luciferase 法にて、MPD の血小板内 ADP、ATP 量と血小板凝

集時における放出 ADP、ATP 量について検討を加えた。

第 2 章 実験対象及び実験方法

第 1 節 実験対象

対象は、第 1 編と同様に昭和 51 年 3 月から昭和 52 年 2 月までの 1 年間に当科に入院するか、もしくは外来受診した CML 26 例、PV 4 例の計 30 例の MPD である。性別は男 16 例、女 14 例である。年齢は 15 歳から 72 歳に及んだ。検査時における末梢血液像及び止血異常の既往は表 1 に示すごとくである。現在ま

Tab. 1 Clinical data.

Case Number	age sex	Bleeding history	Platelet ×10 ⁴ /mm ³	RBC ×10 ⁴ /mm ³	WBC ×10 ⁴ /mm ³	
CML						
Group I	1	15 M	nasal	33	362	6.3
"	2	36 M	—	30	450	1.9
"	3	41 M	—	34	426	1.8
"	4	18 F	—	38	448	0.8
"	5	30 M	—	33	417	2.1
"	6	42 F	subcutaneous	25	405	2.1
"	7	53 M	—	38	452	12.7
Group II	8	40 M	gastrointestinal	75	389	0.6
"	9	24 M	—	46	451	12.7
"	10	43 F	nasal	66	440	0.7
"	11	50 M	—	49	507	1.0
"	12	28 M	—	48	483	1.1
"	13	54 F	—	62	249	2.6
"	14	38 F	—	82	308	0.3
"	15	72 M	—	84	414	2.8
"	16	59 F	gingival	53	452	1.3
"	17	27 M	nasal	60	436	9.0
"	18	45 M	—	56	450	6.6
Group III	19	60 F	—	198	418	3.0
"	20	42 F	—	131	364	1.8
"	21	64 F	—	141	263	0.8
"	22	55 F	—	200	480	2.0
"	23	60 F	—	239	345	2.7
"	24	17 M	gastrointestinal	300	407	6.8
"	25	26 F	—	120	334	29.6
"	26	55 M	—	146	424	3.7
Polycythemia vera						
	1	53 M	thrombosis	62	751	0.7
	2	60 F	thrombosis	72	693	1.6
	3	30 M	wound	31	615	2.3
	4	40 M	nasal	60	694	1.1
	5	62 F	wound	63	636	0.8

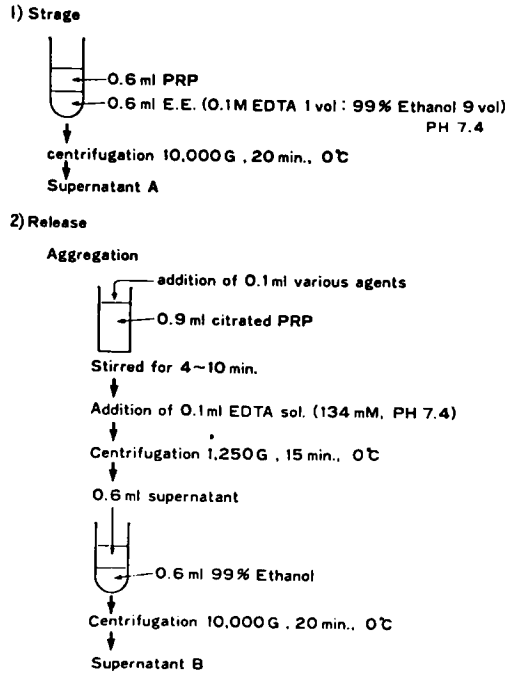


Fig. 1 The Assays of ADP and ATP from Platelet. (Strage and Release)

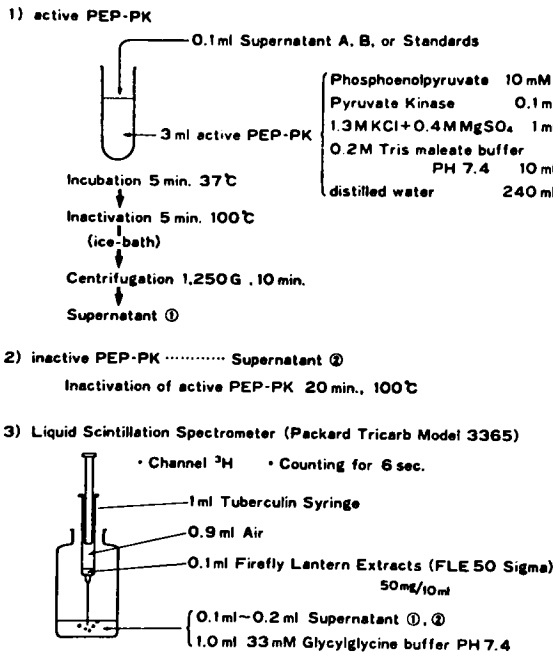


Fig. 2 Microdetermination of ADP and ATP by the Luciferase enzyme with Liquid Scintillation Spectrometer.

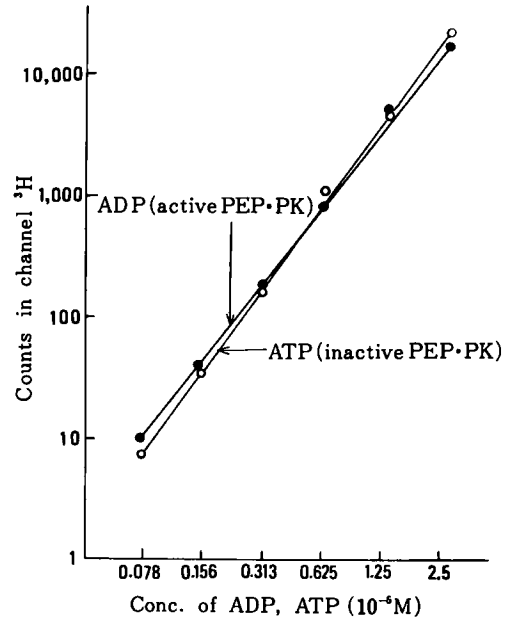


Fig. 3 Standard curve of ADP & ATP assays

て溶解)を吸引し更に0.9 mlの Airを吸引し、前記キュベットに吹きこむ。直ちに生じた蛍光を Channel ³Hにて6又は12秒間測定する。(Fig. 1, Fig. 2.)

IV) ADP 及び ATP の標準曲線

各標準曲線は測定時ごとに作成する。Channel ³Hの Countは両対数グラフの縦軸にとり、ADPとATPの濃度は横軸にとる。標準曲線の一例を提示すると表2、図3の如くなる。active PEP-PKによるADPの値とinactive PEP-PKによるATPの値はほとんど同一直線上に分布した。inactive PEP-PKのADP値はほとんど零を示した。(Tab. 2, Fig. 3.)

第4項 血漿 ADP ase並びにATP ase様活性の測定方法

37°C恒温槽中にて、被検血漿にADP, ATPを添加し、そのADP, ATPの時間的減衰を測定し、ADP ase, ATP ase様活性の指標とした。ADP, ATPの測定は、血小板ADP, ATPの測定と全く同様の方法により測定した。

第3章 実験成績

第1節 血小板内ADP及びATP量に関する検討
第1項 血小板内ADP量に関して

血小板内ADP量はCML Group Iにおいては31.2±12.7nMであり、CML Group IIでは32.4±

Tab. 2 Counts of Standard ADP & ATP assays

conc. of ADP or ATP	active PEP·PK sol. ADP counts	in inactive PEP·PK sol. ADP counts	ATP counts
Blank	1	0	1
0.078	11	3	7
0.156	44	0	41
0.313	208	0	193
0.625	894	3	1,121
1.25	5,235	4	4,682
2.5	16,667	13	18,644
10 ⁻⁵ M			

10.6nM であり、CML Group III では32.7±7.8nM となり、各 Group 間に差異は認められなかった。CML 全体では32.1±10.0nM であった。PV では22.4±3.4nM であった。正常対照では42.6±10.4 nM であった。CML、PV は正常対照より有意(p<0.005, p<0.002)に血小板内 ADP 量は低値を示した。(Fig. 4)

第2項 血小板内 ATP 量に関して

血小板内 ATP 量は CML Group I においては49.8±14.2nM であり、CML Group II では59.8±7.9nM であり、CML Group III では70.0±12.2nM となり、血小板数の多い群ほど血小板内 ATP 量は正常に近い値を示した。CML 全体では60.2±13.3

nM であった。PV では53.6±13.5nM であった。正常対照では74.1±10.5nM であった。CML 全体、PV は共に正常対照より有意(p<0.001, p<0.005)に低値を示した。(Fig. 4) 図の黒丸は止血異常の既往がある症例である。

第3項 血小板内 ATP, ADP 比に関して

血小板内 ATP/ADP は CML Group I においては1.76±0.6であり、CML Group II では1.95±0.39 であり、CML Group III では2.18±0.34となり、血小板数の多い群ほど高値を示した。CML 全体では1.97±0.45であった。PV では2.41±0.55であった。正常対照では1.82±0.44であった。CML は正常対照との間に有意の差は認めないが、PV は有意(p<

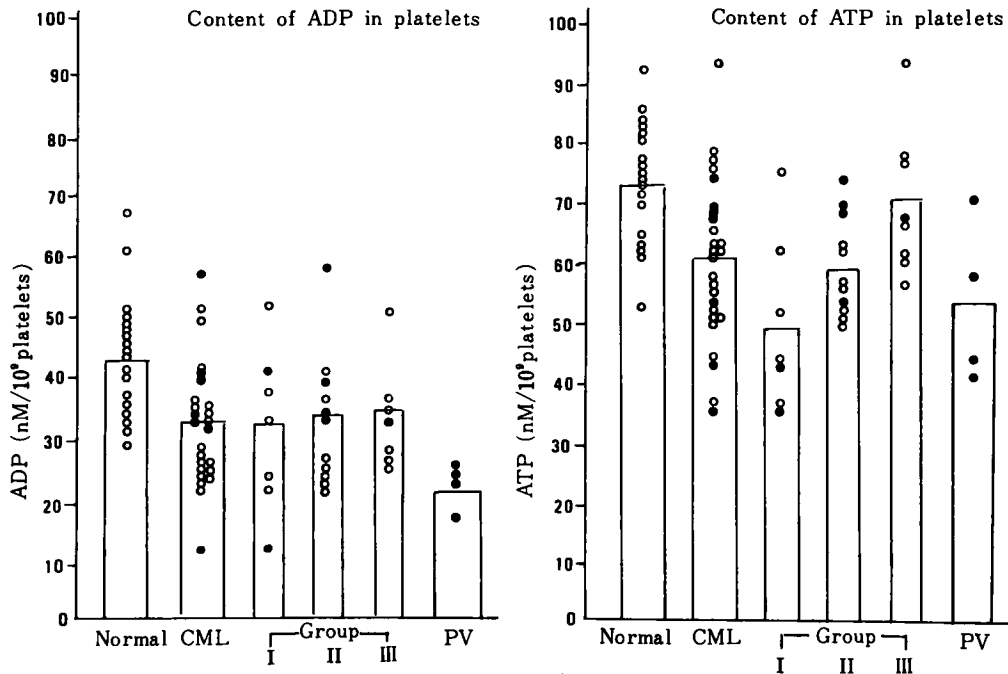


Fig. 4 Content of ADP & ATP in platelets.

Tab. 3 Released-ADP, ATP & maximum aggregation by 2×10^{-6} M ADP

Diagnosis	n	released-ADP mean \pm S. D.	released-ATP mean \pm S. D.	maximum aggregation mean \pm S. D.
CML	26	3.5 \pm 5.3	2.9 \pm 4.3	48.2 \pm 25.5
CML I	7	3.0 \pm 7.9	2.4 \pm 6.5	37.9 \pm 22.1
CML II	11	2.8 \pm 4.2	2.4 \pm 3.1	46.0 \pm 25.7
CML III	8	4.8 \pm 4.2	4.1 \pm 3.7	60.1 \pm 26.1
PV	4	1.1 \pm 1.2	1.1 \pm 1.2	10.8 \pm 11.3
Normal	17	2.6 \pm 5.5	2.1 \pm 4.2	34.1 \pm 14.9
		nM/ 10^9 platelets	nM/ 10^9 platelets	%

0.05)の高値を認めた。

第2節 血小板放出ADP及びATP量に関する検討
第1項 ADP凝集時における血小板放出ADP及びATP量に関して

最終濃度 2×10^{-6} M ADPにより放出されるADP量は、添加されたADPと混じる為、その正確な値を算出する事は困難であるが、添加ADP量を実測ADP量より差し引いた値を放出ADP量とした。CML Group Iにおいては、75%の最大凝集率を示した1例にのみ 21.0 nMのADP、 17.1 nMのATPの放出を認めた。残り6例は最大凝集率は50%未満であり、ADP、ATPの放出は認められなかった。CML Group II 11例では4例に50%以上の最大凝集率を認め、この4例はすべてADP、ATPの放出が認められた。7例に50%未満の最大凝集率を認めたが、1例を除いて、ADP、ATPの放出は認められなかった。CML Group IIIでは6例に50%以上の最大凝集率を認めたが1例を除いてADP、ATPの放出を認めた。最大凝集率が50%未満の2例には、放出は認められなかった。CML全体では最大凝集率と放出ADP、ATP量の間には相関係数 $\gamma=0.71$ 、 0.72 にて高い正の相関が認められた。PVでは全例最大凝集率は50%未満であり、放出ADP、ATPも認められなかった。

(Tab. 3, Fig. 5)なお正常対照でも最大凝集率と放出ADP、ATP量の間には $\gamma=0.55$ 、 0.59 にて正の相関が認められた。(Fig. 6)

第2項 l-Epinephrine凝集時における血小板放出ADP及びATP量に関して

放出ADP、ATP量はCML Group Iにおいては 8.3 ± 9.6 nM、 5.8 ± 7.2 nMであり、CML Group IIでは 5.3 ± 5.7 nM、 4.6 ± 4.6 nMであり、CML Group IIIでは 7.5 ± 6.0 nM、 6.8 ± 6.2 nMとなり、各Group間に有意の差は認められなかった。CML全体では 6.8 ± 6.9 nM、 5.6 ± 5.7 nMであった。PVでは 2.3 ± 2.6 nM、 1.5 ± 1.8 nMであった。正常対照で

は 13.8 ± 5.4 nM、 12.7 ± 4.3 nMであった。CML、PV共に正常対照より有意($p < 0.001$)に放出ADP、ATP量は低値を示した。なおCMLでは最大凝集率と放出ADP、ATP量の間には相関係数 $\gamma=0.6$ 、 0.61 にて正の相関が認められた。(Fig. 7.)

第3項 Collagen凝集時における血小板放出ADP及びATP量に関して

放出ADP、ATP量はCML Group Iにおいては 10.2 ± 5.3 nM、 8.0 ± 4.7 nMであり、CML Group IIでは 12.9 ± 10.0 nM、 12.3 ± 9.3 nMであり、CML Group IIIでは 14.0 ± 7.1 nM、 10.9 ± 4.6 nMとなり各Group間に有意の差は認められなかった。CML全体では 12.5 ± 8.0 nM、 10.7 ± 7.0 nMであった。PVでは 7.1 ± 3.9 nM、 5.4 ± 2.1 nMと低値を示した。正常対照では、 20.6 ± 6.4 nM、 18.2 ± 4.3 nMであった。CML、PV共に最大凝集率は正常対照と有意差は認められなかったが、放出ADP、ATP量は有意($p < 0.001$)に低値を示した。(Fig. 8)

第4項 Bovine fibrinogen凝集時における血小板放出ADP及びATP量に関して

放出ADP、ATP量はCML Group Iにおいては 13.8 ± 7.5 nM、 10.3 ± 6.2 nMであり、CML Group IIでは 10.1 ± 6.9 nM、 8.0 ± 5.8 nMであり、CML Group IIIでは 9.4 ± 7.4 nM、 8.9 ± 6.9 nMとなり、各Group間に有意の差は認められなかった。CML全体では 11.1 ± 7.3 nM、 9.0 ± 6.0 nMであった。PVでは 8.7 ± 7.1 nM、 5.0 ± 2.3 nMと最も低値を示した。正常対照では 24.4 ± 6.4 nM、 20.4 ± 4.6 nMであった。CML並びにPV共に最大凝集率は正常対照と有意差はなかったが、放出ADP、ATP量は有意($p < 0.001$)に低値を示した。(Fig. 9)

第5項 Zymosan凝集時における血小板放出ADP及びATP量に関して

放出ADP、ATP量はCML Group Iにおいては 10.5 ± 7.3 nM、 7.9 ± 4.7 nMであり、CML Group

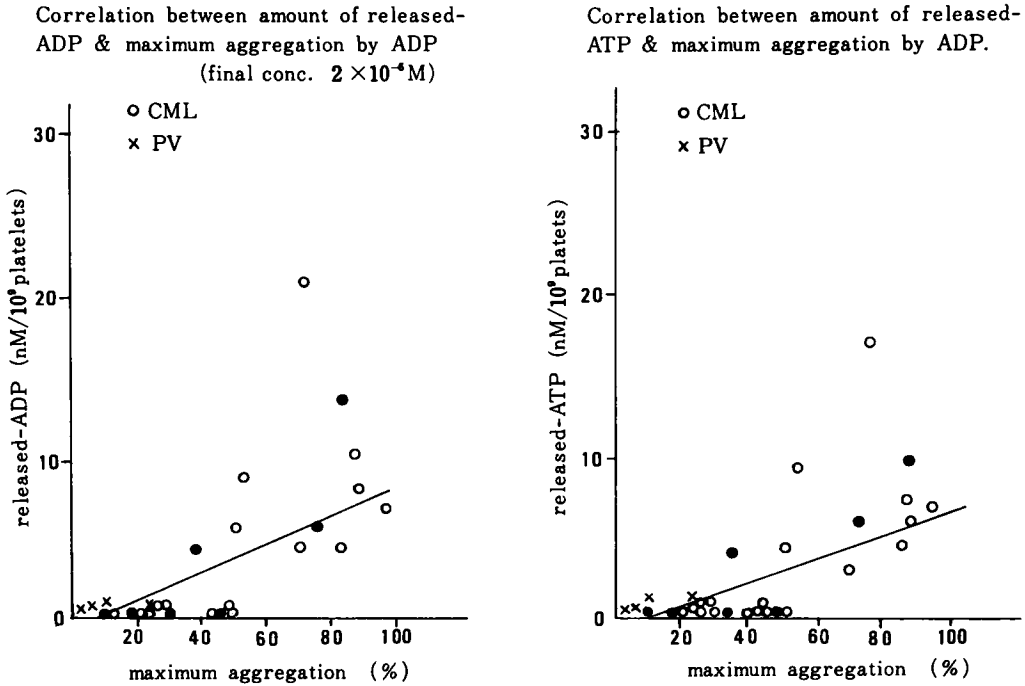


Fig. 5 Correlation between amount of released-ADP, ATP & maximum aggregation by ADP in MPD.

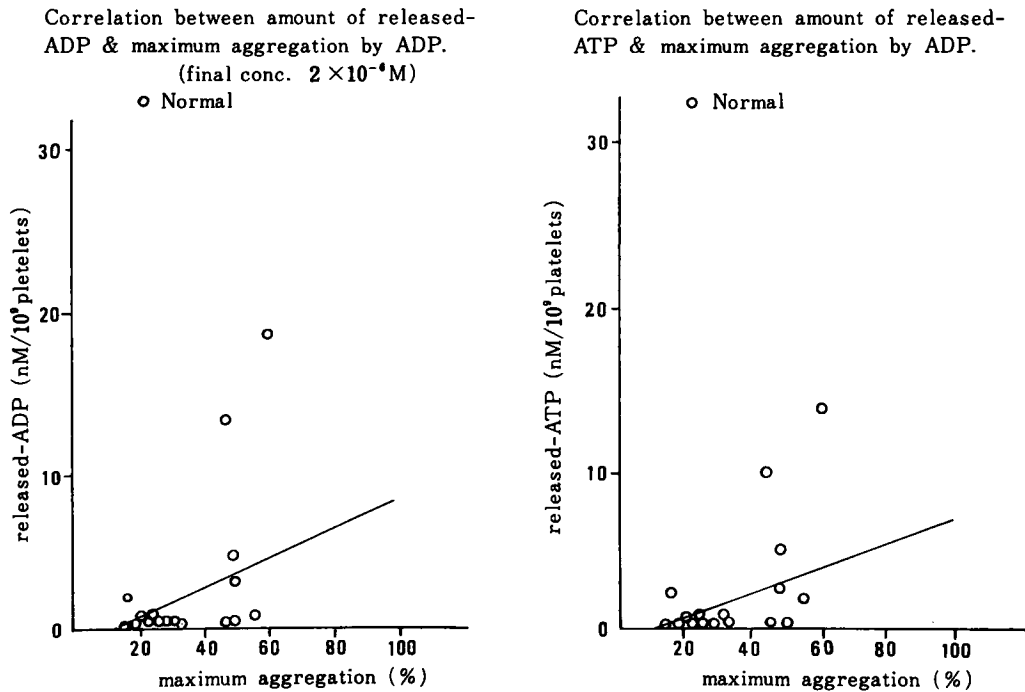


Fig. 6 Correlation between amount of released-ADP, ATP & maximum aggregation by ADP in normal control.

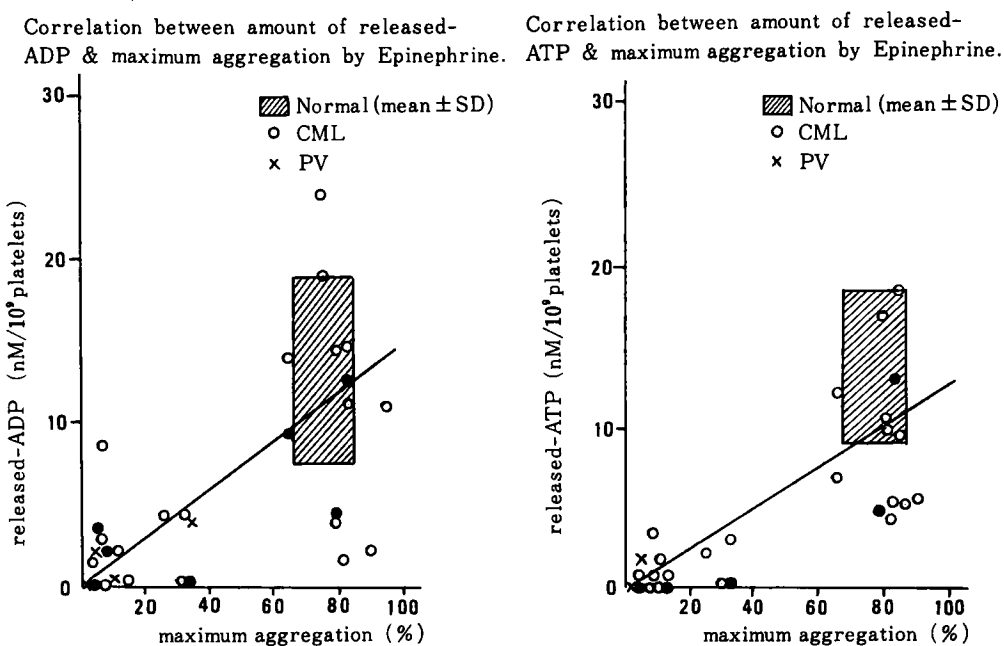


Fig. 7 Correlation between amount of released-ADP, ATP & maximum aggregation by Epinephrine.

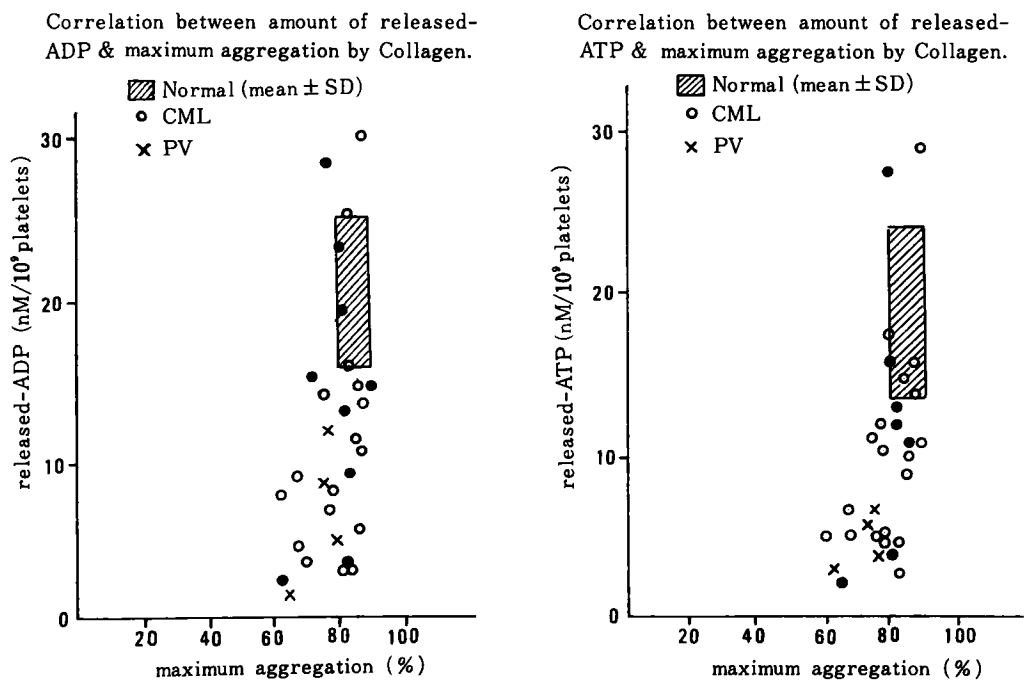


Fig. 8 Correlation between amount of released-ADP, ATP & maximum aggregation by collagen.

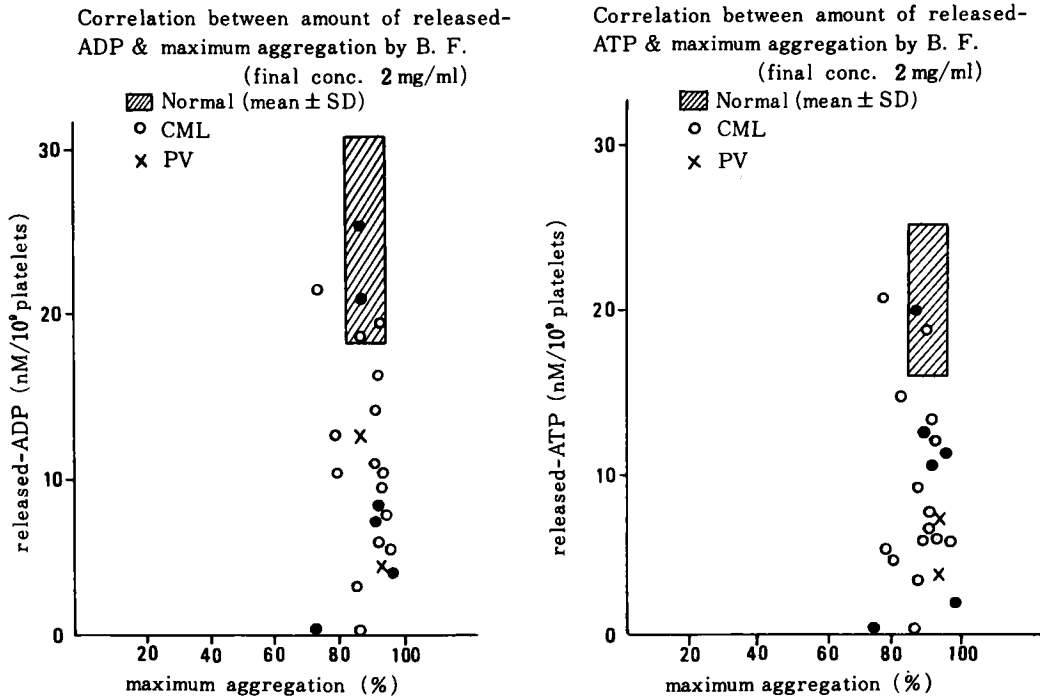


Fig. 9 Correlation between amount of released-ADP, ATP & maximum aggregation by Bovine Fibrinogen.

II では 10.5 ± 8.8 nM, 8.5 ± 9.5 nM であり, CML Group III では 6.1 ± 7.8 nM, 3.6 ± 5.1 nM となり, 各 Group 間に有意の差は認められなかった. CML 全体では 8.9 ± 7.9 nM, 6.5 ± 6.1 nM であった. PV では 9.0 ± 7.1 nM, 6.4 ± 4.0 nM であった. 正常対照では 17.6 ± 14.2 nM, 11.3 ± 9.3 nM であった. CML 全体並びに PV においては正常対照との間に有意差は認められなかった.

50%以上の最大凝集率を示す CML 10例と正常対照 5例において検討すると, CML は正常対照に比して有意 ($p < 0.005$, $p < 0.05$) に低値を示した. (Tab. 4)

なお CML においては最大凝集率と放出 ADP, ATP 量に相関係数 $\gamma = 0.63$, 0.52 にて正の相関が認められた. 正常対照においても相関係数 $\gamma =$

0.97 , 0.82 と高い正の相関が認められた. (Fig. 10, Fig. 11)

第3節 症例別による血小板 Adenine nucleotides に関する検討

個々の症例の血小板内 ADP, ATP 量並びに Epinephrine, Collagen 及び Bovine fibrinogen 凝集時における血小板放出 ADP, ATP 量と最大凝集率を表示した. (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8.) 表中の*印は正常対照平均 - 2標準偏差より低値を示した症例である.

血小板内 ADP 量が低値を示した症例は, CML 26例中2例に, PV では4例中1例に認められた.

次に Epinephrine による血小板放出 ADP 量が低値を示した症例は, CML 26例中11例に, PV では4例中2例に認められた. Collagen による血小板放

Tab. 4 Released-ADP, ATP & maximum aggregation by Zymosan in cases with over 50% maximum aggregation

Diagnosis	n	released-ADP mean \pm S. D.	released-ATP mean \pm S. D.	maximum aggregation mean \pm S. D.
CML	10	13.3 \pm 8.0	9.3 \pm 6.7	79.7 \pm 9.8
Normal	5	29.5 \pm 6.6	18.5 \pm 6.0	77.8 \pm 10.7
		nM/10 ⁹ platelets	nM/10 ⁹ platelets	%

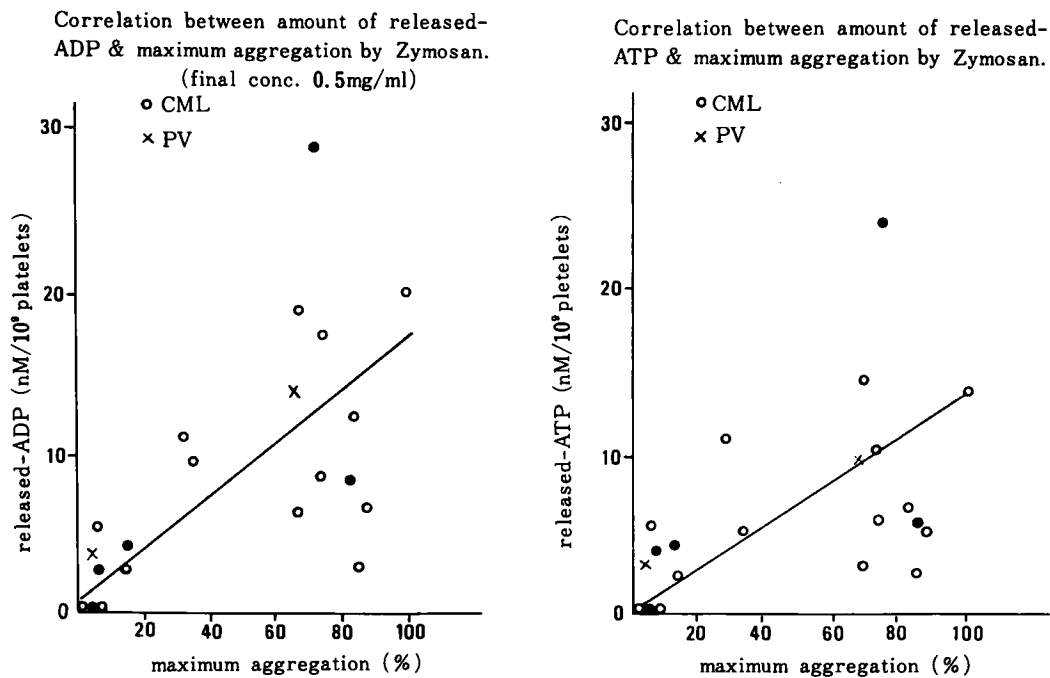


Fig.10 Correlation between amount of released-ADP, ATP & maximum aggregation by Zymosan in MPD.

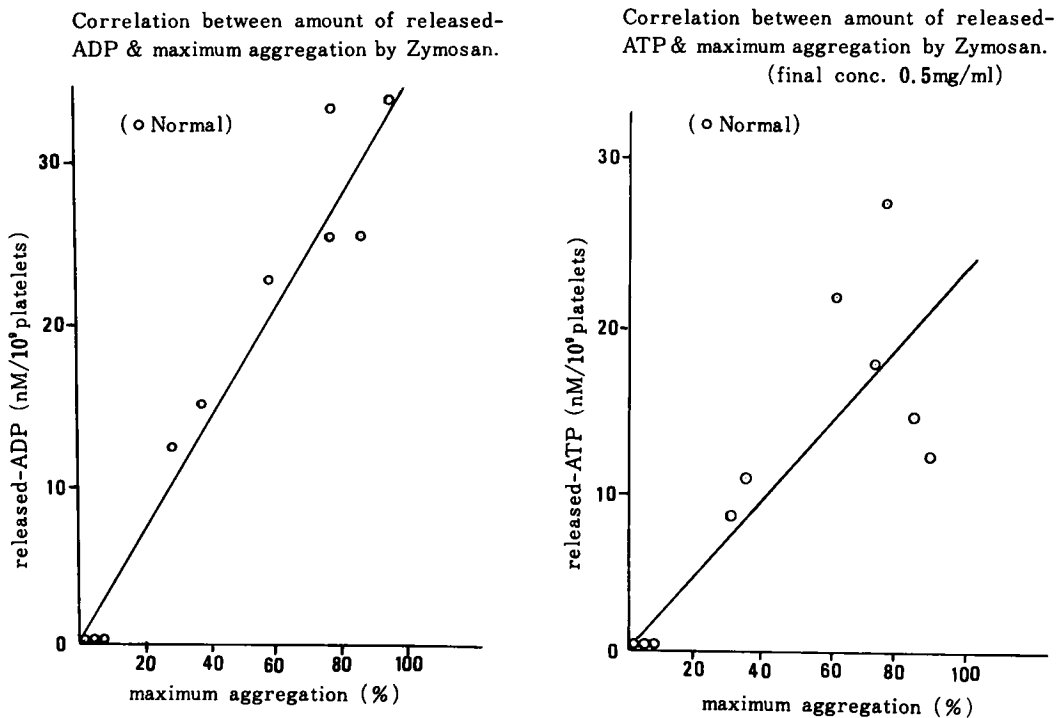


Fig.11 Correlation between amount of released-ADP, ATP & maximum aggregation by Zymosan in normal control.

Tab. 5 Content of ADP, ATP & released-ADP, ATP in CML group I

Case	Content			Epi.			Collagen			B. F.		
	ADP	ATP	ATP/ADP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP
1	39.6	43.2*	1.09	66	9.3	6.9	84	13.7	10.6	85	25.6	14.6
2	25.1	50.8*	2.02	14*	0*	0*	86	11.4	8.7*	88	11.7	8.2*
3	21.1*	37.4*	1.77	30*	0*	0*	80	5.2*	3.0*	91	9.9*	6.4*
4	32.3	44.2*	1.37	8*	8.6	3.4*	62*	8.0	5.0*	90	10.3*	7.7*
5	50.7	61.9	1.22	76	25.9	19.0	85	16.0	14.5	89	14.1	12.5
⑥	12.7*	36.0*	2.83*	37*	0*	0*	64*	2.0*	2.0*	97	3.6*	2.1*
7	36.7	75.1	2.05	66	14.4	11.4	79	14.8	11.9	77	21.7	20.8
nM/10 ⁹ platelets				% nM/10 ⁹ platelets								

* = < mean - 2 S. D. (normal)

Tab. 6 Content of ADP, ATP & released-ADP, ATP in CML group II

Case	Content			Epi.			Collagen			B. F.		
	ADP	ATP	ATP/ADP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP
8	32.2	56.8	1.76	79	3.9	6.5	81	4.6*	3.7*	90	7.1*	10.2*
9	39.9	62.2	1.56	79	19.6	12.6	91	31.4	29.7	90	16.9	12.2
⑩	38.8	69.5	1.79	8*	2.1*	1.5*	74	15.5	15.5	73*	0*	0*
11	34.5	60.5	1.75	24*	5.0	2.6*	77	14.0	11.8	79	10.6*	5.7*
12	25.2	51.0*	2.02	12*	2.9*	1.1*	78	9.3	5.2*	92	6.3*	5.6*
13	22.0	52.3*	2.38	81	1.9*	4.8	84	3.1*	4.2*			
14	26.0	51.0*	1.96	7*	0*	0*	69*	4.9*	6.3*			
15	24.5	56.4	2.30	32*	4.4	3.1*	78	8.3	5.0*	80	12.8	4.9*
16	58.2	69.0	1.19	6*	3.3	0*	80	31.6	28.7	84	21.5	19.2
17	31.7	73.7	2.32	82	12.7	13.0	82	13.2	11.2			
18	23.0	55.3	2.40	90	2.6*	5.8	87	5.9*	13.7	95	5.2*	6.4*
nM/10 ⁹ platelets				% nM/10 ⁹ platelets								

* = < mean - 2 S. D. (normal)

Tab. 7 Content of ADP, ATP & released-ADP, ATP in CML group III

Case	Content			Epi.			Collagen			B. F.		
	ADP	ATP	ATP/ADP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP
19	50.2	78.9	1.57	5*	1.7*	1.7*	82	22.7	17.4	85	0*	0*
20	31.5	75.4	2.39	83	11.1	9.8	83	14.7	12.6	85	2.7*	3.3*
21	28.4	59.9	2.11	80	4.1	6.2	83	11.6	3.7*	92	8.6*	6.4*
22	34.1	93.5	2.74*	84	14.9	18.7	89	25.3	15.7			
23	26.3	56.4	2.14	89	11.1	6.1	68*	3.7*	5.5*			
24	31.3	68.2	2.18	4*	0*	0*	84	9.4	10.4	94	7.9*	11.9
25	25.7	60.8	2.37	80	14.6	10.8	87	14.6	10.8	92	19.4	12.9
26	34.0	66.6	1.96	7*	2.7*	1.1*	74	10.1	11.0	89	18.0	18.7
nM/10 ⁹ platelets				% nM/10 ⁹ platelets								

* = < mean - 2 S. D. (normal)

Tab. 8 Content of ADP, ATP & released-ADP, ATP in Polycythemia vera

Case	Content			Epi.			Collagen			B. F.		
	ADP	ATP	ATP/ADP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP	max. agg.	ADP	ATP
1	24.9	57.8	2.32	5*	4.6	3.8*	77	8.4	6.6*			
2	23.3	70.7	3.03*	3*	0*	0*	80	5.3*	4.1*			
3				7*			88					
④	17.3*	44.7*	2.58	13*	0*	0*	63*	2.7*	3.2*	95	3.6*	3.3*
⑤	23.9	41.2*	1.72	33*	4.4	2.1*	79	11.8	7.7*	93	13.7	6.6*
nM/10 ⁹ platelets				% nM/10 ⁹ platelets								

* = < mean - 2 S. D. (normal)

出 ADP 量が低値を示した症例は、CML 26例中 7例に、PV では 4例中 2例に認められた。Bovine fibrinogen による血小板放出 ADP 量が低値を示した症例は、CML 21例中 12例に、PV では 2例中 1例に認められた。MPD の血小板放出能の低下は、Bovine fibrinogen, Epinephrine, Collagen の順に高頻度であった。

血小板内 ADP 量と血小板放出 ADP 量との関連を検討すると、血小板内 ADP 量の低下を示した 3例は全例、Epinephrine, Collagen, Bovine fibrinogen による血小板放出 ADP 量の低下を示した。血小板放出 ADP 量相互の関連を検討すると、Collagen 凝集時において血小板放出 ADP 量が低値を示した 9例中 8例は、Epinephrine 又は Bovine fibrinogen による血小板放出 ADP 量の低下を示した。又検査時、出血症状を有した 4例（表中○印症例）のうち、2例は血小板内 ADP 量の低下と血小板放出 ADP 量の低下を合併し、1例は血小板内 ADP 量は正常範囲であるが、血小板放出 ADP 量は低下を示し、1例は血小板内 ADP 量、血小板放出 ADP 量共に正常の下限を示した。

第 4 節 血漿 ADP ase 並びに ATP ase 様活性に関する検討

Tangün ら⁴⁾の方法を改変し、血漿に ADP, ATP を添加しその減衰を測定して ADP ase, ATP ase

Tab. 9 The decline of ADP concentration in the plasma in time lapse

Diagnosis	time		
	0	5	15 min.
CML No. 1	—	1.0	0.64
No. 2	—	1.0	0.69
No. 4	—	1.0	0.66
No. 9	—	1.0	0.63
No. 11	—	1.0	0.53
PV No. 5	—	1.0	0.84
Normal	—	1.0	0.80

様活性とした。まず CML 5例, PV 1例, 正常対照 1例について検討した。37℃恒温槽中にて血漿 0.9ml に血小板凝集に用いる濃度の 2×10^{-6} M ADP 0.1ml を添加し、添加 5 分后、15分后の ADP の値を測定した。5 分后の ADP 値を 1.0 とし、それと 15 分后の値を対比し検討した。CML は 5例共正常より ADP の崩壊は早く、又 PV では正常との間に差を認めなかった。即ち CML の ADP ase 様活性は正常対照より高値を示した。(Tab. 9)

さらに他の CML 4例, 正常対照 1例について、ADP の濃度を上げ、血小板内 ADP 量もしくは血小板放出 ADP 量に近い濃度、即ち 10^{-6} M の ADP 0.2 ml を血漿 1.8ml に添加し、添加直后、15分后、30分后、60分后の ADP 量の減衰を測定した。15分后では CML 4例中 2例が正常対照以上の減衰を、又 2例は正常以下の減衰を示した。この CML 4例, 正常対照 1例について 10^{-6} M の ATP にて同様の方法による検討を加えた。表 10, 図 13 に示す如く 4例共、正常対照以上の ATP の減衰を示した。即ち CML の ATP ase 様活性は正常より高値を示した。(Tab. 10, Fig. 12, Fig. 13.)

以上より CML 9例中 7例は ADP ase 様活性は正常対照より高く、PV 1例は正常対照とはほぼ同一であった。又 CML 4例では全例 ATP ase 様活性は正常対照より高値を示した。なお ADP, ATP 共に、生食中にて、37℃, 60分間 incubate しても、全く減衰を認めなかった。又血漿に $\frac{1}{10}$ 量の 0.1 M EDTA を添加し、更に 0℃にて 10^{-6} M ADP を添加し、その ADP の時間的減衰を検討すると 30分后でさえ ADP の減衰は、5%未滿であった。(Tab. 11)

今回の血小板 ADP, ATP の測定には、EDTA が添加される事により血漿中の ADP ase 様物質による ADP の崩壊は防止された。

第 4 章 総括並びに考案

骨髓増殖症候群 (MPD) の止血異常の機序は、血

Tab. 10 The decline of ADP & ATP concentration in the plasma in time lapse

Diagnosis	ADP (10^{-6} M)				ATP (10^{-6} M)		
	0	15	30	60 min.	0	15	30 min.
CML No. 21	10	6	3.7	0.1	10	5.0	1.5
No. 19	10	4.8	1.6	0	10	4.1	0.6
No. 5	10	6.0	2.4	0	10	2.6	0.6
No. 3	10	3.1	0.7	0	10	1.5	0
Normal	10	5.1	3.4	0.6	10	6.6	1.7
0.9% NaCl	10	10.8	10.5	10.6	10	10.1	9.9

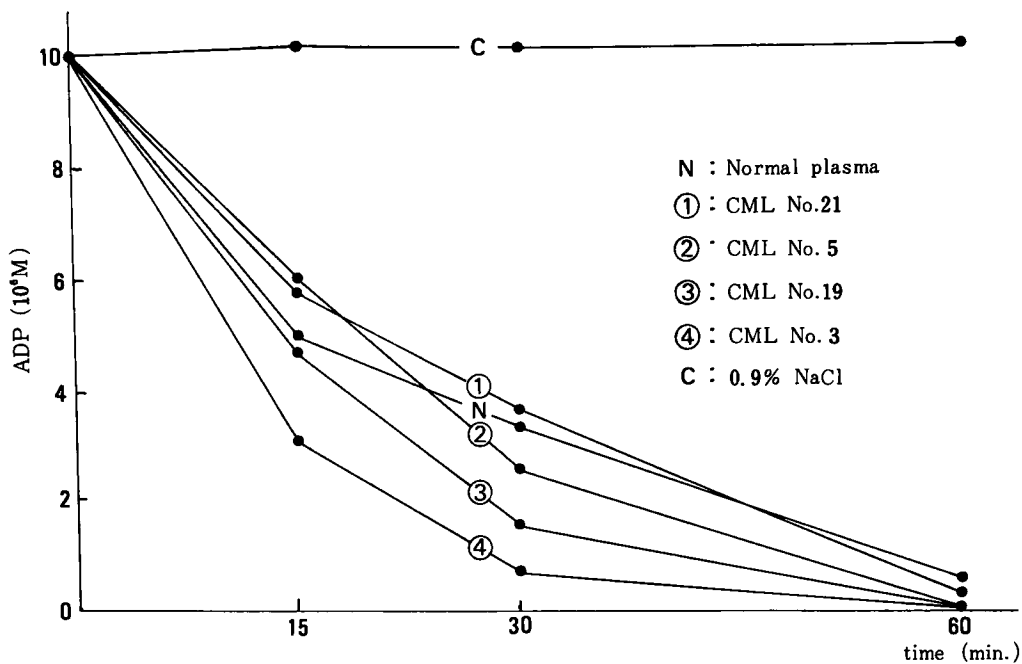


Fig.12 The declining curve of ADP concentration in the plasma in time lapse.

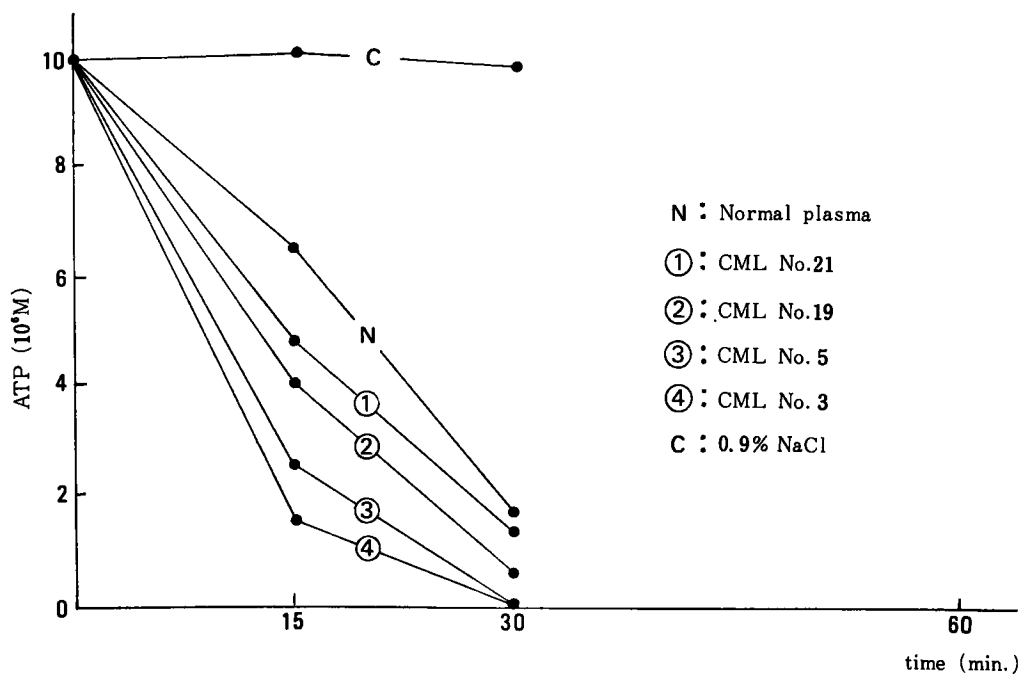


Fig.13 The declining curve of ATP concentration in the plasma in time lapse.

Tab. 11 The decline of ADP concentration in the EDTA-Plasma

Diagnosis	time	
	0 min.	30 min.
CML No. 3	10	9.7
No. 21	10	9.6
Normal	10	9.9

(10⁻⁶M)

小板機能の低下に起因するとの報告が散見される。

1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10)

Spaet ら²⁾ は、特発性血小板增多症 (ET) の 3 例において ADP 凝集の減弱と Epinephrine 凝集の欠如を報告した。Tangün ら⁴⁾ は、ADP 凝集、Epinephrine 凝集及び Collagen 凝集の低下と Pf-3a の低下を認める症例があることを報告し、又 Zuker ら⁵⁾ は出血症状を認める MPD において血小板凝集能の低下を報告した。又 Adams ら⁶⁾ は CML では末梢血小板数の差異により血小板機能に差は認められないが、Polycythemia vera (PV) では血小板数 50 万以下の症例では血小板機能低下を認める頻度は少ないと報告している。Cardamone ら⁶⁾ や、Berger ら⁷⁾ も MPD の血小板凝集能の低下を報告している。著者も第 1 編にて示した如く MPD において、Epinephrine 凝集と Pf-3a の低下を高頻度に認め、一部の症例に Collagen 凝集の低下を、又 PV では更に ADP 凝集の低下を認めている。Tangün ら⁴⁾ は、血小板凝集能の低下が、血小板内 ADP の放出障害に起因するのではないかと予測しているが、ADP の定量は施行しておらず推測の域を出ていない。Spaet ら²⁾ も Epinephrine 凝集の欠如の原因として、血小板からの ADP の放出障害を推測している。しかし Spaet らも定量的実験を行っていない。

そこで著者は、Holmsen ら^{21) 22) 23) 24) 25)} の方法に準じ、Luciferin-Luciferase 法にて MPD の血小板内 ADP, ATP 量と、血小板凝集時における放出 ADP, ATP 量について検討を加えた。その成績を総括すると次の如くである。

血小板内 ADP, ATP 量は、CML, PV 共に正常対照より有意に低値を示し、正常対照平均 - 2 標準偏差より低値を示した症例も 3 例に及んだ。ATP は metabolic pool に主として含まれ、ADP は non-metabolic pool 即ち放出に主として関与する¹⁹⁾。そこで、ATP, ADP の比をとると、PV では有意の高値を認めた。即ち血小板 non-metabolic pool の減少を意味した。

ADP 凝集時における血小板放出 ADP 量は、CML, PV 共に正常対照と有意の差を認めなかった。

最大凝集率に有意の差を認めた Epinephrine 凝集時における血小板放出 ADP 量は、CML, PV 共に正常対照に比して有意に低値を示した。

最大凝集率には有意の差を認めなかったところの Collagen 凝集及び Bovine fibrinogen 凝集時における血小板放出 ADP 量は、CML, PV 共に正常対照に比して有意に低値を示した。Bovine fibrinogen は、それに含まれる第 VIII 因子様物質を介して 1 次凝集を惹起させ、引き続いて血小板内 ADP を放出させ、2 次凝集を惹起するとの報告¹⁶⁾ もあり、著者も血小板無力症において ADP の放出は認められるが、2 次凝集の欠如を思わせる最大凝集率の低下を認めている。しかし MPD の血小板は正常とほとんど変わらない凝集を示しているにもかかわらず、放出 ADP 量の低下を認め、ADP を介さない凝集機序も想定される。このことは同様に Collagen 凝集についても想定され、Pearson-Stoba anomaly²⁶⁾ の如く Collagen 凝集にも ADP を介さない他の凝集機序も考えられる。

Zymosan 凝集時における血小板放出 ADP 量は、CML, PV 共に正常対照と有意の差を認めなかったが、最大凝集率が 50% 以上を示した群においては、CML は正常対照に比して血小板放出 ADP 量は有意に低値を示した。Zymosan 凝集において最大凝集率と血小板放出 ADP 量は正の相関を示し、Zuker ら¹⁶⁾ の報告と一致した。Zymosan は又、血清補体系の Alternate pathway を活性化させる物質であるが、著者は補体系については今回は検討を加えていない。

CML において、末梢血小板数の多寡により分類した各 Group 間には、血小板内 ATP 量は血小板数の多い群ほど正常に近い値を示したが、血小板内 ADP 量、血小板放出 ADP, ATP 量には各 Group 間に有意差は認められなかった。

ところで血小板内 ADP 量の低値を示した 3 症例は全例、Epinephrine, Collagen, Bovine fibrinogen による放出 ADP 量の低下を認めた。これらの症例は、Holmsen ら²¹⁾ が報告した 1 家系 3 症例、即ち出血症状を示しかつ血小板凝集能の低下と血小板内 ADP 量の低値を示した Storage pool disease の概念に酷似していた。Hardisty ら²⁸⁾ は 2 人の Albinism において、血小板内 ADP 量が低値を示し、血小板凝集能の異常と出血症状を伴った症例を報告

している。又 Zahavi ら³⁰⁾は、Circulating antiplatelet antibodies を伴った後天性の Storage pool disease を報告している。又 Pareti ら³¹⁾は、Disseminated intravascular coagulation (DIC) の症例において、血小板内 ADP 量の低下と、血小板凝集能の低下を伴ったことを報告し、その機序としては、Thrombin あるいは Plasmin の如き Protease に血小板がさらされた時、既に生体内で血小板内 ADP が放出される事によると想定している。著者の MPD においては、Albinism とか Circulating antiplatelet antibodies 及び DIC の存在を思わせる症例は認められなかった。Cowan ら³²⁾は、最近、急性白血病 6 例、CML の急性転化例 3 例において、血小板内 ADP 量の低下と Collagen による血小板放出 ADP 量の低下を報告しているが、その低下の機序は未だ明らかにされていない。

又 Aspirin 服用者において、その血小板機能は低下し、血小板放出 ADP 量も低下を示したという報告³³⁾がある。著者が MPD において認めた血小板内 ADP 量は正常であるが、血小板放出 ADP 量は低下を示した前記 17 例は、この Aspirin like release defect の概念に該当するものと思われる。

Tangün ら⁴⁾は MPD 特に CML の血漿中に、ADP consuming factor の存在を想定し、CML の血漿中では正常人より、ADP は早く消費される事を確認し、血小板機能異常の原因の一つと推測している。著者は Tangün らの間接的な方法と異なり、Luciferase 法による直接測定にて、ADP の崩壊が CML 血漿中では亢進する傾向を *in vitro* で確認した。前記の如く MPD の血小板機能異常が、Storage pool disease と Aspirin like release defect の両者に大別されたが、両者共凝集惹起物質に対して二次凝集を引き起こす血小板放出 ADP の低下が既に存在している。その上に、この ADP ase 様活性の亢進は一層 MPD 血小板に対して、二次凝集を引き起こすのに不利な環境を助長する恐れがあると思われる。

最後に、MPD 血小板は各種凝集惹起物質の血小板凝集機序の解明にとって、貴重な後天性 Model であると考えられ、今后更に多面的な検討が加えられ

ることになるであろう。

第 5 章 結 論

骨髄増殖症候群 (MPD) の血小板機能異常と、血小板 Adenine nucleotides が如何なる関連を有するかを追求する目的で、血小板内 ADP、ATP 量及び各種凝集惹起物質による血小板放出 ADP、ATP 量の測定により次の結果を得た。

1) MPD の血小板内 ADP、ATP 量は正常対象より有意に低値を示した。

2) MPD の血小板において、Epinephrine 凝集時における血小板放出 ADP 量は正常対照より有意に低値を示し、かつ最大凝集率と放出 ADP は正の相関を示すことが判明した。

3) MPD の血小板において、Collagen 及び Bovine fibrinogen 凝集時における血小板放出 ADP 量は正常対照より有意に低値を示した。

4) MPD の血小板において、ADP、Zymosan 凝集時における血小板放出 ADP 量は正常対照と有意差を認めないが、しかし、CML で Zymosan 凝集時に最大凝集率が 50% 以上を示したものは、血小板放出 ADP 量は有意に低値であった。

5) 以上より MPD の血小板機能異常は、Storage pool disease の概念に該当するものと、Aspirin like release defect の概念に該当するものとに大別出来ることが判明した。即ち血小板内 ADP 量が低値を示し、血小板機能低下と血小板放出 ADP 量の低下を示す症例と、血小板内 ADP 量は正常範囲内であるが、血小板機能低下と血小板放出 ADP 量の低下を示す症例とに大別された。

6) CML の血漿 ADP ase 様活性は正常対照より高値の傾向を示し、血小板機能異常を助長する可能性が示唆された。

擧筆するにあたり終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った恩師木村教授並びに喜多嶋講師、又直接御教示を受けた林助手に厚く感謝致します。

(本論文の要旨は第 18 回日本臨床血液学会総会に於て発表した。)

文 献

- 1) 高田昭, 小林一到, 杉山篤弘, 大森肇, 江幡謙次, 西出啓二郎, 篠田晤, 水島泰治: 粒球血症の 2 例 (附, 本邦における統計的考察). 最新医学, 18: 172-182, 1963.

- 2) Speat, T. H., Lejnieks, I., Gaynor, E. & Goldstein, M. L. : Defective platelets in essential thrombocythemia. *Arch. Intern. Med.*, **124** : 135—141, 1969.
- 3) 永井清保, 下谷三喜夫, 原宏, 大植更二, 小林司郎, 川越裕也, 阿部裕, 泉口康幸 : 栓球血症について (自験例を中心として). *臨床血液*, **10** : 101—109, 1969.
- 4) Tangün, Y. : Platelet aggregation and platelet factor 3 activity in myeloproliferative disorders. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **25** : 241—251, 1971.
- 5) Zuker, S. and Mielke, C. H. : Classification of thrombocytosis based on platelet function test : correlation with hemorrhagic and thrombotic complications. *J. Lab. Clin. Med.*, **80** : 385—394, 1972.
- 6) Cardamone, J. M., Edson, J. R., McArthur, J. R. & Jacob, H. S. : Abnormalities of platelet function in the myeloproliferative disorders. *J. Amer. Med. Ass.*, **211** : 270—273, 1972.
- 7) Berger, S., Aledort, L. M., Gilbert, H. S., Hanson, J. P. & Wasserman, L. R. : Abnormalities of platelet function in patients with polycythemia vera. *Cancer Res.*, **33** : 2683—2687, 1973.
- 8) 芳賀圭五 : 栓球血症 (栓球增多症) についての 2, 3 の考察. *臨床血液*, **14** : 1359—1364, 1973.
- 9) Adams, T., Schutz, L. and Goldberg, L. : Platelet function abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Scand. J. Haemat.*, **13** : 215—224, 1974.
- 10) 田上憲治郎, 小野沢康輔, 足立山夫, 柏木平八郎, 大久保嘉明, 山崎博男 : 原発性血小板血症の 3 例における骨髓巨核球と血小板に関する研究. *臨床血液*, **15** : 477—486, 1974.
- 11) Holmsen, H., Day, H. J. and Setkowsky, C. A. : Secretory mechanism: Behaviour of adine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline. *Biochem. J.*, **129** : 67—82, 1972.
- 12) Holmsen, H. : Collagen-induced release of adenosine diphosphate from blood platelets with radioactive phosphate in vitro. *Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, **17** : 239—246, 1965.
- 13) Kattlove, H. and Gomez, M. H. : Collagen-induced platelet aggregation: The role of adenine nucleotides and the release reaction. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **34** : 795—805, 1975.
- 14) Huzoor-Akbar and Ardlie, N. G. : Evidence that collagen releases human platelet constituents by two different mechanisms. *Brit. J. Haematol.*, **34** : 137—146, 1976.
- 15) Ostvold, A. C., Lindberg, M. E., Solum, N. O. and Holmsen, H. : Adenine nucleotide metabolism during the aggregation of human platelets by Bovine Factor VIII. *Haemostasis* **4** : 3—11, 1975.
- 16) Pfueller, S. L. and Lüscher, E. F. : Studies of the mechanisms of the human platelet release reaction induced by immunologic stimuli: I. Complement-dependent and complement-independent reactions. *J. Immunol.*, **112** : 1201—1210, 1974.
- 17) Pfueller, S. L. and Lüscher, E. F. : Studies of the mechanisms of the human platelet release reaction induced by immunologic stimuli: II. The effect of Zymosan. *J. Immunol.*, **112** : 1211—1218, 1974.
- 18) Zuker, M. B. and Grant, R. A. : Aggregation and release reaction induced in human blood platelets by Zymosan. *J. Immunol.*, **112** : 1219—1230, 1974.
- 19) Holmsen, H. : Biochemistry of the platelet release reaction. *Biochemistry and Pharmacology of Platelets. Ciba Foundation Symposium*, **35** : 175—205, 1975.
- 20) Weiss, H. J., Chervenick, P. A., Zalusky, R. and Factor, A. : A familial defect in platelet function associated with impaired release of adenosine diphosphate. *New Eng. J. Med.*, **281** : 1264—1270, 1969.
- 21) Holmsen, H., Holmsen, I. and Bernhardsen : Microdetermination of adenine diphosphate and

- adenine triphosphate in plasma with the firefly luciferase system. *Anal. Biochem.*, **17**: 456—473, 1966.
- 22) Stanley, P. E. and Williams, S. G.: Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal. Biochem.*, **29**: 381—392, 1969.
 - 23) Holmsen, H., Storm, E. and Day, H. J.: Determination of ATP and ADP in blood platelets : a modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal. Biochem.*, **46**: 489—501, 1972.
 - 24) Hammerstedt, B. H.: An automated method for ATP analysis utilizing the liciferin-luciferase reaction. *Anal. Biochem.*, **52**: 449—455, 1973.
 - 25) 神保長三: 血小板の放出反応と adenine nucleotides 代謝. *臨床血液*, **17**: 1235—1260, 1976.
 - 26) Sanderson, J. H., Dodsworth, H., Shorroch, M. and Israëls, M. C. G.: A new anomaly of platelet aggregation. A report of two families. *Acta Haemat.*, **49**: 340, 1973.
 - 27) Holmsen, H. and Weiss, H. J.: Hereditary defect in the platelet release reaction caused by a deficiency in the storage pool of platelet adenine nucleotides. *Brit. J. Haematol.*, **19**: 643—649, 1970.
 - 28) Hardisty, R. M., Mills, D. C. B. and Ketsa-Ard, K.: The platelet defect associated with albinism. *Brit. J. Haematol.*, **23**: 679—692, 1972.
 - 29) Zahavi, J. and Marder, V. J.: Acquired "Storage pool disease" of platelets associated with circulating antiplatelet antibodies. *Am. J. Med.*, **56**: 883—890, 1974.
 - 30) Pareti, F. I., Capitanio, A. and Mannucci, P. M.: Acquired storage pool disease in platelets during disseminated intravascular coagulation. *Blood*, **48**: 511—515, 1976.
 - 31) Cowan, D. H., Graham, R. C. and Baunach: The platelet defect in leukemia. *J. Clin. Invest.*, **56**: 188—200, 1975.
 - 32) Ball, G., Fulwood, M., Ireland, D. M. and Yates, P.: Effect of some inhibitors of platelet aggregation on adenine nucleotides. *Biochem. J.*, **114**: 669—671, 1969.

Studies on platelet functions in myeloproliferative disorders
Part 2. Studies on adenine nucleotides in platelet
in myeloproliferative disorders

Hiroyuki NOZAKI

Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Ikuro Kimura)

Abnormalities of platelet-function, particularly decrease of platelet aggregation, in myeloproliferative disorders have been already reported in Part 1 of this study. In this paper author studied a relationship between these abnormalities and Adenine Nucleotides (AN) in platelets. Materials were 26 cases of chronic myelocytic leukemia and 4 cases of polycythemia vera. AN in platelets (ADP, ATP) and released-AN (ADP, ATP) from platelets were assayed by Luciferin-Luciferase method. As results followings were obtained. In these myeloproliferative disorders, not only contents of ADP and ATP in platelets but also released-ADP and ATP have been significantly decreased. Furthermore, these cases have been classified into two groups: (i) cases, which showed decreased platelet aggregation and decrease of released-ADP and ATP due to decrease of contents of ADP and ATP in platelets. (ii) cases, which showed decreased platelet aggregation and decrease of released-ADP and ATP inspite of normal ADP and ATP contents in platelets. These results were thought to suggest that hemostatic abnormalities in myeloproliferative disorders might be classified into two categories, namely "Storage pool disease" and "Aspirin like release defect".