

血小板機能に関する臨床的研究

第二編

血小板 spreading out test に関して

岡山大学医学部第二内科（指導：平木潔教授）

林 久 智

（昭和49年9月6日受稿）

内 容 目 次

第1章 緒 言	第4節 血餅退縮能との関係
第2章 実験対象並びに実験方法	第5節 非粘着性血小板の spreading out 率 に関する検討
第1節 実験対象	第6節 Adenine nucleotides 添加による sp- reading out 率の変動に関する検討
第2節 実験方法	第4章 総括並びに考案
第3章 実験成績	第5章 結 論
第1節 血小板粘着能との関係	
第2節 血小板凝集能との関係	
第3節 血小板第3因子能との関係	

第1章 緒 言

Bizzozero (1882) によって初めて確認記載された血小板がその後の研究により止血機転や血栓形成に重要な役割を演じていることは周知の事実である。元来、流血中の血小板は一部球状であるが基本的には円盤状を呈している¹⁾ 損傷した血管の様な粗面に接触すると血小板は偽足を形成し、胞体は膨化し粗面への粘着現象が起る。粘着血小板から放出されるADPや、障害部位から遊離された組織トロンボプラスチン様物質により、外因性凝固系を介して生成された微量のトロンビンによって血小板凝集が惹起され、血小板血栓の形成を見る。

次に粘着・凝集した血小板はトロンビンの作用を受け、遂には粘性変型 (Viscous metamorphosis) を起し、血小板第3因子やセロトニン等が血中に放出される。血小板第3因子は内因系凝固に関与し、フィブリン血栓形成への橋渡しとなるのである。このように血小板が血栓形成や血液凝固に関与する過程でその形態学的変化は血小板機能を発揮する上で不可欠のものである。又一方、血小板機能の測定は従来粘着能にしろ、凝集能にしろ、血小板第3因子

能にしろ、血小板全体としての viability を測定する方法であった。1965年 Breddin は platelet aggregation test (以下 PAT) について報告している²⁾ この検査法は血小板多血漿を回転フラスコに入れ、フラスコの回転により血小板凝集を起こさせ、ホルマリン固定後過マンガン酸カリで酸化し、Giemsa 染色の後、血小板相互の凝集状態と未処置血小板多血漿のそれとを比較観察する方法である。PATは心筋梗塞を含む動脈硬化性疾患、糖尿病、肥満者では凝集亢進像を示し、充分臨床的に意義あるものとされているが、以前より Breddin は過マンガン酸カリによる酸化によって spreading out する血小板 (写真1：正常血小板の Giemsa 染色, 写真2：正常血小板の spreading out 像) に着目し、すでに1963年頃より Marx の提唱した方法³⁾ を改良した spreading out test を試み、血小板の形態学的変化を数量的に扱えるようにした⁴⁾ Breddin は spreading out する血小板は血小板造生の旺盛な時に見られると考えていたようである⁵⁾ このように血小板の形態学的変化を観察する spreading out test が血小板自体の機能と如何なる関係を持つものかを検討した報告はなされていない。そこで著者は血小板が spreading

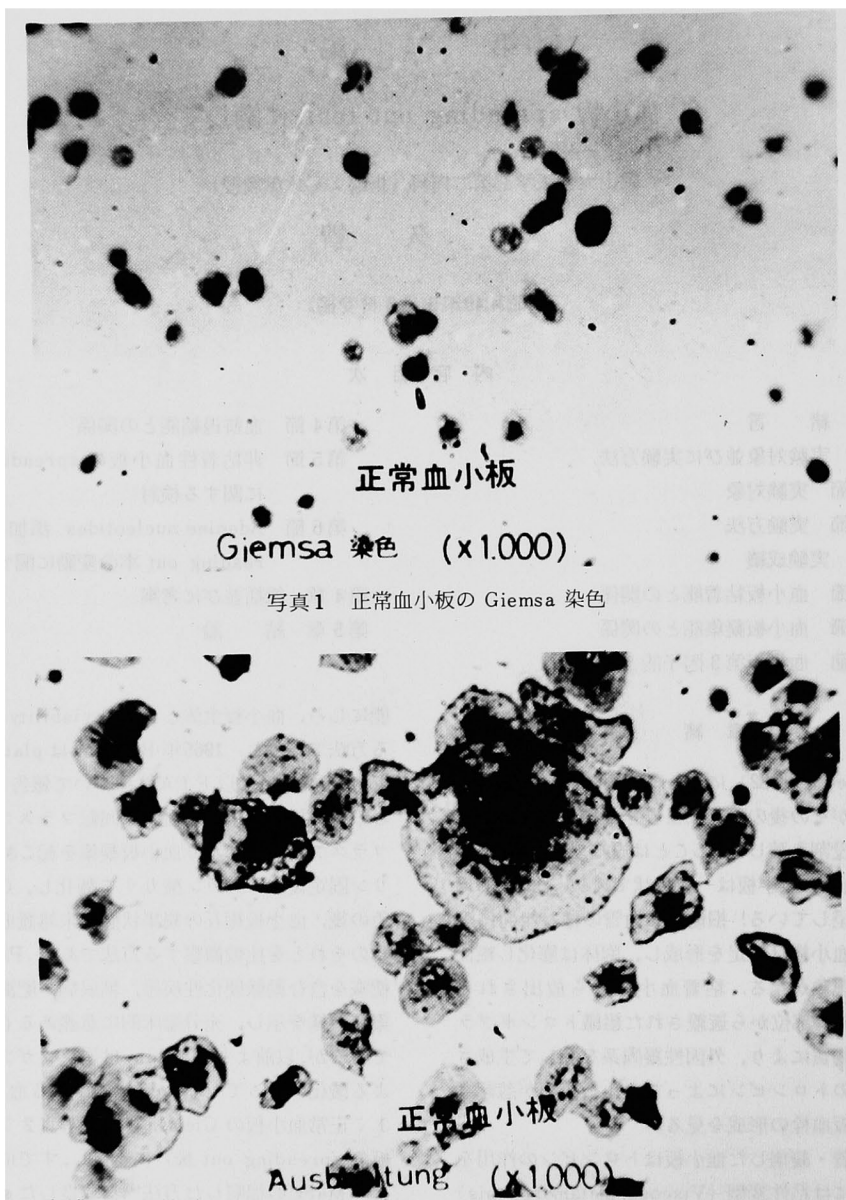


写真1 正常血小板の Giemsa 染色

写真2 正常血小板の spreading out 像

out されるということは、血小板機能と関係があるものか否か、又関係があるものなら、そのうち何を反映しているのかを検討した。

第2章 実験対象並びに実験方法

第1節 実験対象

昭和44年1月から昭和47年12月末までに岡山大学医学部第二内科に入院せる患者のうち無作意に抽出

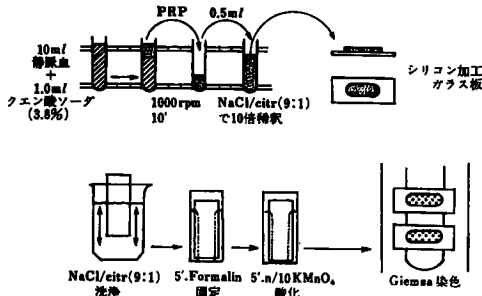
した84名を対象とした。

正常対象群には第1編と同様に岡山大学医学部第二内科に勤務せる医師、看護婦、技術員20名を選んだ。

第2節 実験方法

血小板 spreading out test は図1に示した方法で施行した。即ち第一編に記載した方法で得た血小板多血漿を10%クエン酸ソーダ加生理的食塩水で10

図1 血小板 spreading out test (Breddin⁽³⁾ より)



倍に稀釈し、シリコン処理スライドガラス上に滴下し、30分間放置し、血小板のスライドガラスへの着着を待つ。10%クエン酸ソーダ加生理的食塩水で軽く洗浄し、40%ホルマリン液で5分間固定後、5N過マンガン酸カリに5分間浸し、酸化する。その後水洗し、Giemsa染色を施行し鏡顕する。spreading out率は血小板200個算定し、spreading outした血小板の百分率で表現した。

血餅退縮能はMac farlaneの変法⁽⁵⁾により測定した。即ち直径10mmの試験管へ血液1mlを採取し、37℃で2時間放置後、凝血塊を取り出し、残りの血清量(S)mlを測定し、血餅退縮能は $\frac{S}{1.0} \times 100$ (%)で表現する。正常値は40~50%であった。その他の血小板機能の測定法は第一編に記載した如く、血小板粘着能の測定はWright氏の回転フラスコ法を一部改変した方法⁽⁶⁾で、血小板凝集能の測定はRenz-enbrinkの変法⁽⁷⁾で血小板第3因子能の測定はトロンボプラスチン形成試験法により施行した。Adenine nucleotides 添加実験では、Adenosine. AMP, ADP及びATP各々の最終濃度が10 μ g/mlになるように血小板多血漿に添加し、37℃30分間放置し、その後spreading out testを施行した。

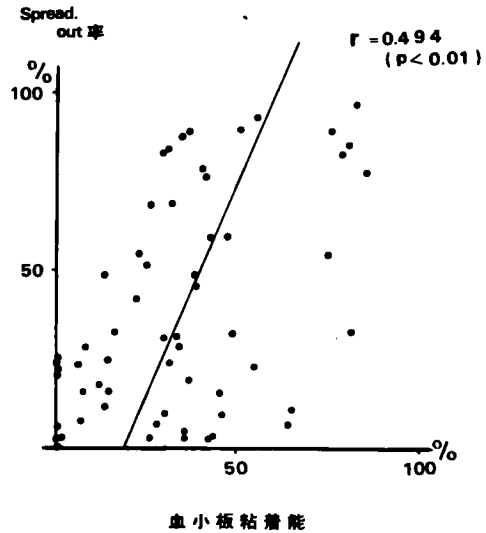
非粘着性血小板のspreading out testには田中氏法⁽⁸⁾の血小板粘着能測定に使用するグラスフィルターを2回通した血小板多血漿を使用して施行したものである。

第3章 実験成績

第1節 血小板粘着能との関係(図2)

横軸に血小板粘着能を、縦軸にspreading out率(以下Sp.O率)をとり各測定値をプロットすると図2の如くなる。血小板粘着能とSp.O率の間には推計学的に正の相関($r=0.494$, $P<0.01$)が認め

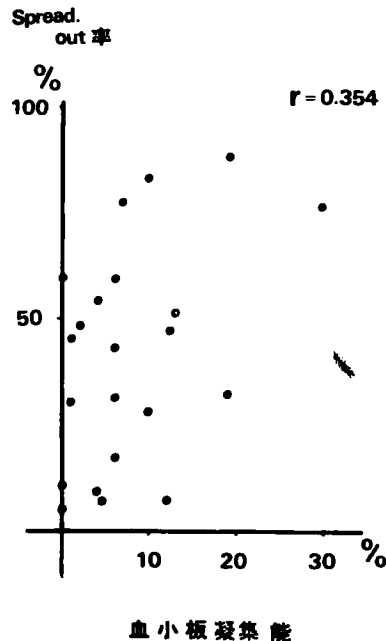
図2 Spreading out test と血小板粘着能



られた。血小板粘着能の亢進(40%以上)を示す症例ではSp.O率も高値を示すものが多く、粘着能低下(20%未満)を示す症例ではSp.O率も良好なものは一例も認められず、全て低値を示した。

第2節 血小板凝集能との関係(図3)

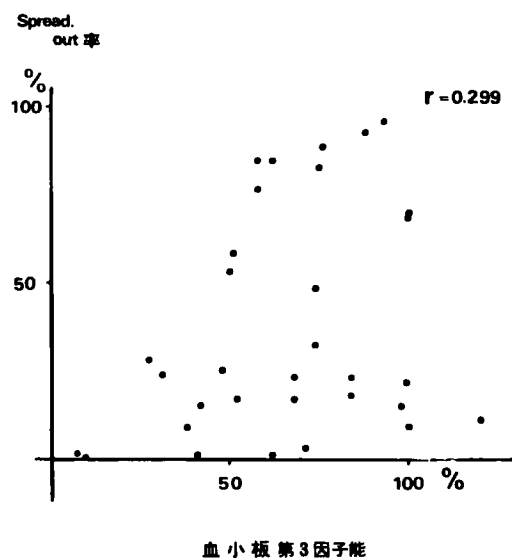
図3 Spreading out test と血小板凝集能



横軸に血小板凝集能を、縦軸に Sp. O 率をとり各測定値をプロットすると図3の如くなる。凝集能との間には推計学的には相関関係を認め得なかった。

第3節 血小板第3因子能との関係(図4)

図4 Spreading out test と血小板第3因子能



横軸に血小板第3因子能を、縦軸に Sp. O 率をとり各測定値をプロットすると図4の如くなる。血小板第3因子能と Sp. O 率の間には推計学的には相関関係を認め得なかった。

第4節 血餅退縮能との関係(図5)

横軸に血餅退縮能を、縦軸に Sp. O 率をとり各測定値をプロットすると図5の如くなる。血餅退縮能と Sp. O 率の間には推計学的には相関関係を認め得なかった。

以上血小板機能と Sp. O 率の間には血小板粘着能とのみ正の相関関係を認め得たので更に以下の実験を行った。

第5節 非粘着性血小板の Sp. O 率に関する検討(図6)

非粘着性血小板を得る目的で実験対象群より無作為に抽出した20名の血小板多血漿(以下 PRP)をガラスフィルターで2回濾過した。濾過前後の PRP にて spreading-out test を施行した。濾過前血小板の Sp. O 率は $37.5 \pm 25.4\%$ に対し、濾過後血小板即ち非粘着性血小板は $6.4\% \pm 9.6\%$ であり、明らか

図5 Spreading-out test と血餅退縮能

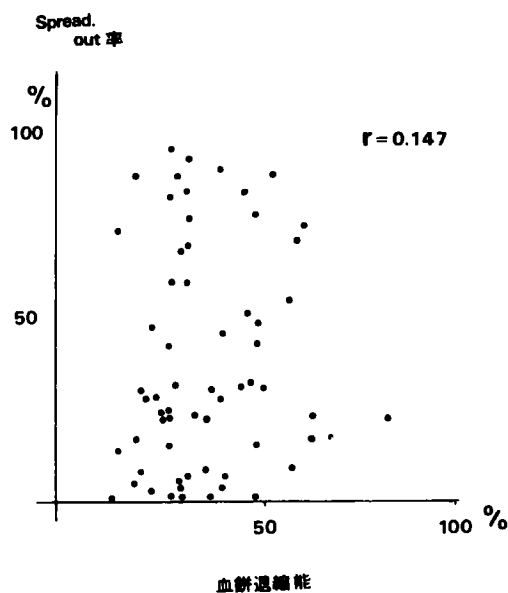
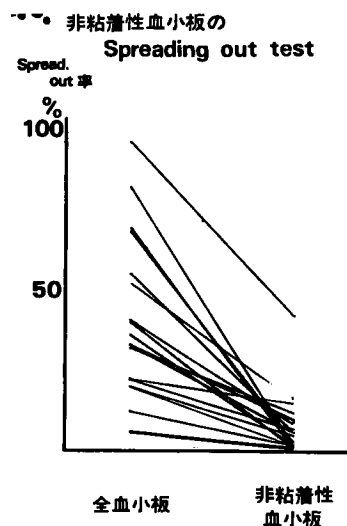


図6 非粘着性血小板の Spreading-out test
図6



に非粘着性血小板で Sp. O 率の抑制傾向が認められ、粘着性血小板が spreading out する可能性が示された。

第6節 Adenine nucleotides 添加による Sp. O 率の変動に関する検討(図7, 8)

spreading out する血小板は粘着性血小板らしいという所見が得られたので、血小板粘着に著明な影

図7 血小板 Spreading-out test 良好群に於ける Adenine nucleotides の添加実験

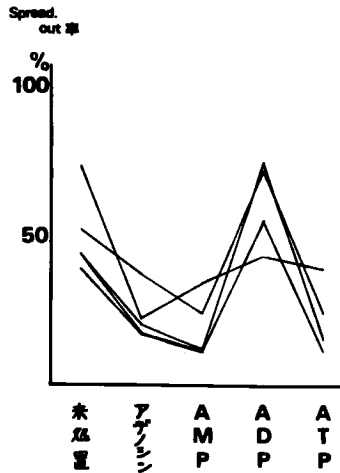
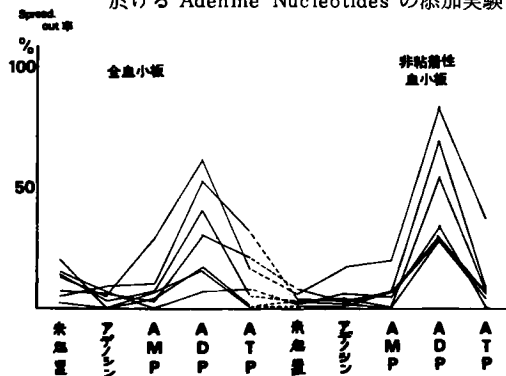


図8 血小板 Spreading out test 良好群に於ける Adenine Nucleotides の添加実験



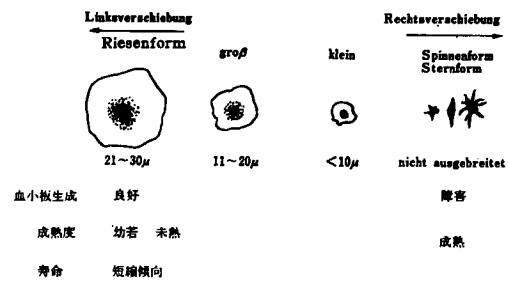
響を及ぼす Adenine nucleotides 即ち Adenosine AMP, ADP 及び ATP の添加により, Sp. O 率が如何なる変化を受けるかを検討した. 先ず正常な Sp. O 率を示した 5 例に対して検討した. 図7に示す如く未処置対象群の Sp. O 率 $44.9 \pm 13.4\%$ に対し, Adenosine 添加群 $20.1 \pm 9.1\%$, AMP 添加群 $15.1 \pm 9.4\%$, ATP 添加群 $19.0 \pm 11.1\%$ と明らかに Sp. O 率の抑制を認めた. 一方, ADP 添加群は $57.1 \pm 12.9\%$ と上昇傾向を認めた. Sp. O 率不良を示した 7 症例についての検討では, 図8に示す如く未処置対象群 $10.8 \pm 5.9\%$, Adenosine 添加群 $9.4 \pm 3.3\%$, AMP 添加群 $8.6 \pm 8.9\%$ 及び ATP 添加群 $12.0 \pm 10.7\%$ とほとんど不変であるが ADP 添加群では $32.3 \pm 19.0\%$

と Sp. O 率を亢進させる所見を示した.

第4章 総括並びに考案

血小板 spreading out test は Breddin によって臨床医家の注目を集めるようになった血小板の形態学的機能検査と呼ばれるべき検査法である. 彼は図9に示す如く spreading out した血小板をその直

図9 Spreading out した血小板の直径による分類



径により Riesenform (直径 $20 \sim 30 \mu$), Großform ($11 \sim 20 \mu$) 及び Kleinform (10μ 以下) の 3 種類に, spreading out しないものを Spinnenform と分類し, Riesenform~Großform の様に大きく spreading out するものは比較的幼若な血小板であり, 血小板造生の旺盛なときに認められると述べている. 臨床的には止血機能を反映するものであり, 血小板性出血性素因のほとんどは spreading out test は抑制傾向にあり, なかには血小板数が正常でしかも血餅退縮, トロンボエラストグラフに異常を認めないのに spreading-out test のみに異常を認めたことすらあると報告している! 又, 保存血小板の機能の判定にも有用で Sp. O 率 50% を判定基準とし, 血小板の保存が良好であるかどうかを決定し得るとも報告している. 即ち 6~7 日の保存では普通保存良好であれば Sp. O 率は正常であると報告している! しかし現象論的に述べられているだけで, 他の血小板機能と比較検討した報告はない. 著者は spreading out test が Breddin の指摘するように血小板の止血機能を反映するものならば, 種々の血小板機能のなかで如何なる機能と関連があるものかを検討する目的で実験を行なった. 止血に関する機能として止血機序における最初の反応である血小板粘着能及び血小板凝集能について検討し, ついで止血栓の強固化に關与する血餅退縮能及び内因性血液凝固に作用する血小板第 3 因子能の以上 4 者と spreading out

test とを比較検討したが、血小板凝集能、血小板第 3 因子能及び血餅退縮能とは関連を示す所見が得られなかった。血小板凝集能に関しては、血小板凝集能測定に使用される Inducer として何を使用するか又その濃度に関しても問題があり、種々議論のある所であるから今後尚検討を要するが兎に角著者の測定では相関を認めることが出来なかった。しかし血小板粘着能に関しては、粘着能と spreading out 率との間には正の相関関係を認め得た。田中氏法の血小板粘着能測定に使用するグラスフィルターを使用して得た非粘着性血小板は明らかに全血小板の Sp. O 率より抑制されており、粘着性血小板が spreading out する可能性を示す所見を得た。Breddin の指摘した如く、spreading out 良好な血小板が血小板造生の亢進時に高頻度に認められること、又血小板造生の亢進時には幼若血小板が著増していると考えられるので、従来血小板の Aging と粘着能とは密接な関連が存在することが報告されており^{9), 10)} 間接的ではあるが Breddin の説を支持しているのであろう。血小板粘着現象と密接な関係にある^{11), 12)} Adenine nucleotides との関係を添加実験で検討した結果は ADP の添加により、Sp. O 率は著明に亢進する。そもそも ADP 添加それ自体で血小板はある程度腫脹変化を起す¹³⁾ が spreading out するまでには致らない。ATP, AMP 及び Adenosine では血小板の spreading out は抑制された。血小板粘着が ADP によって亢進され、ATP, AMP 及び Adenosine では抑制されること¹⁴⁾ と全く一致した成績を示した。又血小板粘着を抑制するモノヨード酢酸、シアン化カリ等によっても Sp. O 率が抑制されることを Breddin も指摘している⁹⁾ しかし何故、血小板が spreading out するかについては、過マンガン酸カリの酸化作用により血小板の解糖系その他の酵素反応に影響を及ぼすことによるものと推定しているものもあり⁹⁾ 又近年では血小板粘着能を阻害する fibrinolytic early split products が血小板の spreading out を阻害することも報告され、今後血小板機能を

形態学的変化として把握する spreading out test は病態生理学上一層興味をもたれる検査法となるであろうと思われる。

第 5 章 結 論

Breddin により始められ、臨床医家の注目を浴びるようになった血小板 spreading out test 即ち過マンガン酸カリによる血小板の spreading out は血小板機能と関連があるものか否か、又関連があるとすれば血小板の機能の中で如何なるものを反映しているものかどうかを検討した。

(1) 血小板粘着能と spreading out test との比較検討では粘着能と spreading out 率の間には正の相関関係 ($r=0.494$, $P<0.01$) を認め得た。血小板多血漿をグラスフィルターにて濾過して得た非粘着性血小板は濾過前血小板多血漿に比較して Sp. O 率は著明に低下していた。以上のことは血小板が spreading out する際には粘着性血小板が主役をなすものと想定された。

(2) Adenine nucleotides との関係では、Adenosine, AMP 及び ATP は血小板の spreading out を抑制し、ADP は亢進せしめる傾向を認めた。これは血小板粘着能が Adenosine AMP 及び ATP で抑制され、ADP によって亢進されるというこれまでの所見と一致し、血小板の spreading out test と粘着能測定とが密接な関係にあることを裏付けるものである。

(3) しかし検討した他の血小板機能即ち血小板凝集能、血小板第 3 因子能及び血餅退縮能と spreading out test の成績の間には推計学的に有意な相関を証明する結果は得られなかった。

擱筆に臨み御指導と御校閲をいただいた恩師平木潔教授に深謝するとともに懇切なる御指導と御助言をいただいた半沢敦正博士ならびに喜多嶋康一講師に感謝の意を表する。

参 考 文 献

- 1) 神前五郎, 井上勝男: 血小板の微細構造, 日本臨床, 31: 765-768, 1973.
- 2) Breddin, K.: Thrombozytenagglutination und Gefäßkrankheiten. Blut, XI: 144-164, 1965.
- 3) Breddin, K.: Zur Klinik der Thrombozytopathien... Diskussion. Der Thrombozyt, J. F. Lehmanns Verlag, München,
- 4) Breddin, H.: In-Vitro-Methoden zur Beurteilung der Plättchenfunktion. Blut, X VIII, 84-89, 1968.
- 5) 松岡松三: 出血性素因と血栓症 P 203, 1969, 金原出版, 東京.
- 6) Pfliegerer, T. and Brossmer, R.: zur Mechanismus der Thrombozytenaggregation. II. Erhöhung der Klebrigkeit durch geladene Makromolekuele, Thr. Diathe, Häm., 18: 674-685, 1967.
- 7) Renzenbrink, J., Holzknacht, E. und Braunsteiner, H.: Erhoete Aggregation der Thrombozyten bei essentiellen Hyperlipemia, Acta. Haemat, 38: 95-103, 1967.
- 8) 田中隆一: 血小板機能に関する研究, 特に血小板粘着能について, 日血会誌, 20: 270-282, 1957.
- 9) Hirsh, J., Glynn, M. F. and Mustard, J. F.: The effect of platelet age on platelet adherence to collagen. J. Clin. Invest., 47: 466-473, 1968.
- 10) Ginsburg, A. D. and Aster, R. H.: Kinetic studies with chromium-labeled platelet cohorts in rats. J. Lab. and Clin. Med., 74: 138-144, 1969.
- 11) Hellem, A. J., Borchgrevink, C. F., and Ames, S. B.: The role of red cells in hemostasis: The relation between hematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. Brit. J. Haemat., 7: 42-50, 1961.
- 12) Gaarder, A., Jonsen, J., Laland, S., Hellem, A. and Owren, A.: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. Nature, 192: 531-532, 1961.
- 13) O'Brien J. R.: Dynamics of the the thrombus Formation and Dissolution J.B. Lippincott Co. Philadelphia and Toronto, p. 121, 1969.
- 14) 斉藤昌信, 畔柳武雄: 血小板メタボリズム, 血液と脈管, 1: 615-624, 1970.
- 15) Marcus, A. J. and M. B. Zucker: The physiology of Blood platelets Grune & Stratton, New York., 1965.
- 16) 半沢敦正: 血小板異常と出血性素因, 臨床病理, 19: 526-531, 1971.
- 17) Breddin, K. and Burck K. H.: Zur Klinik der Thrombozyten-funktionsstörung unter besonderer Berücksichtigung der Ausbreitungsfähigkeit der Thrombozyten an silikonisierten Glasflächen. Thromb. Diath. Haemorrh., 9: 525-545, 1963.
- 18) Marx, R., Ibrom, H. and Stanlawski, F.: The staining of spread out thrombocytes adherent to film and glass. A procedure for improved light-microscopic thrombocyte analysis. Blut, 6: 335-338, 1960.

Clinical Studies on Platelet Functions**Part II****Platelet spreading-out test**

by

Hisatomo HAYASHI

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Kiyoshi HIRAKI)

For the purpose of elucidating the relationship between the spreading-out test proposed by Breddin and the current routine tests of platelet functions, the spreading-out index was studied in comparison with adhesiveness, aggregation, factor-3 and clot retraction. The results obtained are as follows.

Positive correlation was observed between the spreading-out index and platelet adhesiveness. Non-adhesive platelets obtained by filtering the platelet rich plasma through a glass wool filter was found to have a lower spreading-out index than the untreated platelets. Therefore, it was considered that the adhesive platelets played a role in the spreading-out phenomenon.

Although the adding of adenosine, AMP and ATP suppressed the spreading-out of the platelet, the adding test of ADP induced a tendency to increase the spreading-out index. The above result corresponded with the relationship between platelet adhesiveness and adenine nucleotides, and also supported the finding that spreading-out test is closely related to platelet adhesiveness.

No significant correlation was observed between the spreading-out index and the other platelet functions, i. e., aggregation, platelet factor-3 and clot retraction.