

大量輸血に伴う血小板動態に関する臨床的並に実験的研究

第 2 編

大量輸血に伴う血小板の体内分布について

岡山大学医学部砂田外科教室（主任：砂田輝武教授）

助 手 佐 藤 訓 三

〔昭和33年12月27日受稿〕

内 容

第1章 緒 言
第2章 実験的研究
第3章 実験成績

第4章 総括並に考按
第5章 結 論

第1章 緒 言

輸血自体によつてもたらされる出血傾向成立機序の解明の一端として、血小板の変動を中心として、臨床的に実験的に追究し、凝固時間が出血時間に比してその変動が軽微であり、多くの例において凝固系の障碍が顕著でなく^{6) 7) 14) 17)} 血小板の激減が顕著なことから血小板減少が大量輸血時特に出血傾向発現に主因的役割をなすであろうと予測されたことは既に第1編で述べた。

この輸血時の血小板減少発生には、現在のところ血液稀釈、輸血にもとづく血小板抗体出現、保存血 γ -globulin による血小板破壊、線溶現象発現による血小板破壊などが考えられるが、定説がなく文献を徴するも好都合に本減少を説明するものに接しない現状である。

又医学的実験分野における放射性同位元素の応用は枚挙にいとまがない、中でも放射性磷 (P^{32}) は適当な半減期を有し、強い β 線を放射するので広く追跡実験に応用されているが、磷は又細胞活動のエネルギー代謝に関与する重大な因子でもあるので P^{32} を用いて或る組織の磷の動きを把握し、これにより該組織の活動状況を察知することも可能である。

著者は大量輸血時の血小板減少の成立機序を窺知する目的として犬血小板を P^{32} により標識しその輸注を行いし後大量輸血による標識血小板の体内分布状態を追求し聊か知見をえたのでここに報告する。

第2章 実験材料及び実験方法

使用動物は体重10~15kgの成犬を使用した。

第1節 血小板分離の方法⁵²⁾

1. 器具の前処置

使用ガラス器具：遠沈管及び注射針（最も太い輸血針で鋭くよく切れるもの）は化学的に徹底的に清浄にし、水道水、蒸留水で充分洗滌し乾燥後その器具及び針の内面をシリコン（信越化学のKF99）で non wettable とし使用迄清浄に保存した。

2. 採血並に血小板分離の方法

森田・日野⁵²⁾の法によつた、すなはち注射針に本採血用注射筒とは別の小注射筒を連結して股静脈を一気に穿刺し、約5ccの血液を採取後、此の注射筒を外して本採血筒（5%ブドウ糖液中に1%の割で Sequesterene- Na_2 を溶した液を5cc入れてある）を静脈に刺したままの針に連結し50ccを採血し4°Cに速かに冷却し、冷凍装置附遠心器で800回転、15分間遠心し、その上方浮游液を他の遠心管に移し、800回転で約10分間遠心し赤血球の沈澱を認めなくなる迄遠心を反覆し、赤血球のほぼ完全に除去された後に2000~2500回転、40分間遠沈し血小板をえて、これに生理的食塩水を適当に加え血小板浮游液を作製した。

第2節 P^{32} 血小板標識方法⁵³⁾

前記血小板浮游液に P^{32} 100~150 μ c をこの浮游液中に混じ、37°C恒温器中で2時間10分ごとに攪拌しつつ放置後これを遠心して上清をすて再び生理的食塩水で洗滌上清に放射能が認められなくなるまでにいたりこれに生理的食塩水 11cc を混じて P^{32} 標識血小板浮游液を作製した。

この血小板浮游液は検鏡するも凝集はみとめられなかつた。

第3節 実験方法

実験犬を4群に分ち次のごとく実験を行った。

A群： P^{32} 追跡実験として P^{32} 100 μ c を生理的食塩水11ccに混和し注入を行った。

B群： P^{32} 標識血小板単独注入による体内分布を観察した。

C群： P^{32} 標識血小板注入後に大量輸血を行い注入血小板の体内分布観察を行った。

D群： P^{32} 標識血小板注入後に生理的食塩水大量注入を行い注入血小板の体内分布を観察した。

注入はすべて股静脈を使用した。

第1篇第3章の実験は大量の輸血及び輸注を100分内外で終わるようにしたので、それに従って各群とも次のように行った。

各群とも実験を行う前にその含有放射性同位元素 P^{32} 稀釈溶液又は P^{32} 標識血小板浮游液の1ccを正確にケールダールコルベンに移し、次いでその10ccを股静脈に注入し、注入後1時間、2時間目に股静脈より血液3cc採取し、C群（大量輸血）D群（生食水注入）のものは、2時間目の股静脈血液採取後直ちに点滴装置に針を連結し輸血群にては保存血800~1200cc、生食水注入は1200cc、の点滴を開始し、60分にて輸血、注入の終るようにし、A群、B群では3時間目に又C、及びD群にては輸注終了と同時に股静脈、肺静脈、肝静脈より各々3ccの血液採取を行い、又心、腎、肝、脾、肺臓、骨髓より組織各々3gを正確に採取した。

第4節 灰化及測定方法

血液3cc、 P^{32} 稀釈溶液又は P^{32} 標識血小板浮游液、臓器3gに各々硫酸、硝酸の各3ccを加え、加熱し、湿性灰化し、これに第1燐酸カリ (KH_2PO_4) 溶液を添加し、蒸留水にて稀釈し塩化マグネシウムと塩化アンモニウムとの混合液とアンモニアとを加え、燐酸マグネシウムアンモンを沈澱さし、暫次放置後この沈澱を濾紙を2重とした測定皿に吸引濾過装置を行つて試料を沈着さし、乾燥後 β 線用のガイガーミューラー計数管を用いて測定した。

P^{32} 濃度を次の式の如く算出した。

$$P^{32}\text{濃度} = \frac{P^{32}\text{counts per min. per 3g}}{\text{全投与}P^{32}\text{counts per min.}}$$

第3章 実験成績

上記の方法で求められた各群の成績は各節で述べるが各群の比較は第1, 2, 3図に示す。

第1節 A群： P^{32} 追跡群

第1表

No.101

	活性値 C/M/3g	P^{32} 濃度
注射後 4分	2306	1224×10^{-4}
1時間	2079	1103×10^{-4}
2時間	1472	728×10^{-4}
3時間	1091	579×10^{-4}
肺静脈	1141	605×10^{-4}
肺動脈	1105	586×10^{-4}
肺	1862	988×10^{-4}
脾	1728	917×10^{-4}
腎	2878	1528×10^{-4}
骨髓	1731	919×10^{-4}
肝	5135	2725×10^{-4}
筋肉	296	157×10^{-4}
心臓	2258	1198×10^{-4}

No.102

	活性値 C/M/3g	P^{32} 濃度
注射後 4分	4843	1398×10^{-4}
1時間	4463	1288×10^{-4}
2時間	2263	653×10^{-4}
3時間	1142	329×10^{-4}
肺	2762	879×10^{-4}
脾	2291	661×10^{-4}
腎	8496	2453×10^{-4}
骨髓	3980	1149×10^{-4}
肝	7159	2066×10^{-4}
筋肉	540	155×10^{-4}

正常犬2頭を使用し測定した結果は第1表の如くで燐の性質上標識血小板から P^{32} の多少の遊離が考えられるので、真の血小板の分布を推定する為に対照として P^{32} 燐酸の単独静注を行ったもので、この場合末梢血液の放射能活性は注射後に尿への排泄が多い為か急に末梢血より減少を示し1時間目より2時間目、3時間目と半減する、一方臓器の3時間の分布は第1表の如く、肝臓、腎臓に高い活性を認めるが、肺臓、脾臓の活性は特に高くない。

第2節 B群： P^{32} 標識血小板注入群

P^{32} 標識血小板を再輸注した群の成績は表2の如くで、注入後末梢血は1時間値に比して2時間目、3時間目と漸次活性度は減じるがその度合は極めて少い。各臓器3時間目の分布は肝次いで脾、肺、心、腎となり骨髓、筋肉に比しやや高い活性を示した。A群と比

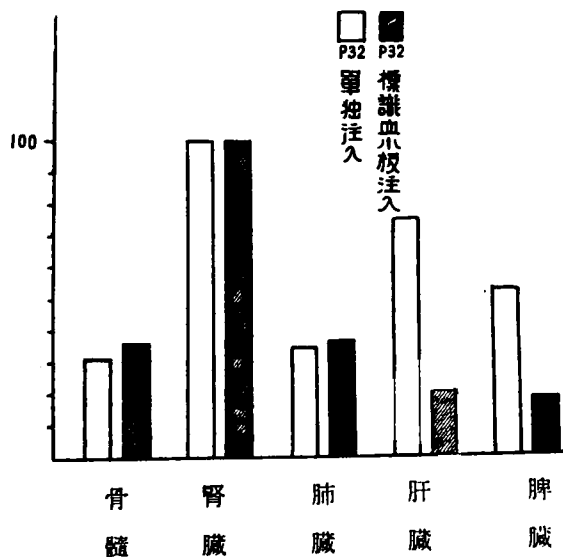
第 2 表

No.103

	活 性 値 C/M/3g	P ₃₂ 濃度
注射後 1 時間	173	1190 $\times 10^{-4}$
2 時間	44	303 $\times 10^{-4}$
3 時間	44	303 $\times 10^{-4}$
肝静脈	28	193 $\times 10^{-4}$
脾静脈	30	207 $\times 10^{-4}$
肺動脈	32	220 $\times 10^{-4}$
肺	124	854 $\times 10^{-4}$
脾	198	901 $\times 10^{-4}$
骨 髄	108	741 $\times 10^{-4}$
肝	391	2690 $\times 10^{-4}$
筋	151	1030 $\times 10^{-4}$
心	218	1500 $\times 10^{-4}$

No.104

	活 性 値 C/M/3g	P ₃₂ 濃度
注射後 1 時間	93	154 $\times 10^{-4}$
2 時間	84	139 $\times 10^{-4}$
3 時間	72	119 $\times 10^{-4}$
肺	686	1141 $\times 10^{-4}$
脾	749	1246 $\times 10^{-4}$
骨 髄	136	226 $\times 10^{-4}$
肝	1873	3117 $\times 10^{-4}$
筋 肉	90	148 $\times 10^{-4}$
心	410	682 $\times 10^{-4}$
腎	326	542 $\times 10^{-4}$

第 1 図 肝臓の P₃₂ 活性度を 100 とした各臓器の比較

第 3 表

No.105

	活 性 値 C/M/3g	P ₃₂ 濃度
注射後 1 時間	14	87 $\times 10^{-4}$
2 時間	12	74 $\times 10^{-4}$
輸 血 600cc		
3 時間	1	6 $\times 10^{-4}$
肝静脈	11	68 $\times 10^{-4}$
脾静脈	13	81 $\times 10^{-4}$
肺動脈	9	56 $\times 10^{-4}$
肺	228	1420 $\times 10^{-4}$
脾	66	410 $\times 10^{-4}$
肝	149	930 $\times 10^{-4}$
骨 髄	78	487 $\times 10^{-4}$
筋 肉	30	187 $\times 10^{-4}$
心 臓	36	220 $\times 10^{-4}$

No.106

	活 性 値 C/M/3g	P ₃₂ 濃度
注射後 1 時間		
2 時間	29	730 $\times 10^{-4}$
輸 血 1000cc		
3 時間	9	230 $\times 10^{-4}$
肝静脈	7	170 $\times 10^{-4}$
脾静脈	10	230 $\times 10^{-4}$
肺動脈	7	170 $\times 10^{-4}$
肺	125	3180 $\times 10^{-4}$
脾	54	1370 $\times 10^{-4}$
肝	140	3750 $\times 10^{-4}$
骨 髄	140	3750 $\times 10^{-4}$
筋 肉	2	50 $\times 10^{-4}$
心 臓	15	380 $\times 10^{-4}$

No.107

	活 性 値 C/M/3g	P ₃₂ 濃度
注射後 1 時間	38	388 $\times 10^{-4}$
2 時間	35	358 $\times 10^{-4}$
輸 血 800cc		
3 時間	8	81 $\times 10^{-4}$
肝静脈	36	368 $\times 10^{-4}$
肺動脈	18	184 $\times 10^{-4}$
肺	2320	23743 $\times 10^{-4}$
脾	414	4236 $\times 10^{-4}$
肝	482	4932 $\times 10^{-4}$
骨 髄	80	818 $\times 10^{-4}$
筋 肉	22	225 $\times 10^{-4}$
心 臓	23	235 $\times 10^{-4}$

較すると(肝の活性を100とする)第1図の如くで、単独注入では腎、骨髓の活性が標識血小板注入に比して高い。

第3節 C群：大量輸血後 P^{32} 標識血小板分布

P^{32} 標識血小板注入後2時間目より大量輸血を行ったものでその成績は表3の如くで、 P^{32} 標識血小板注入後2時間目より輸血を行った群に於ては P^{32} 標識血小板のみの注入群に比して肺、骨髓に高い活性度がみられた。

末梢血は2時間値より3時間にいたり急激に活性度は減少し同時に測定した末梢血血小板数ともその減少は一致する。

第4節 D群：生理的食塩水注入後 P^{32} 標識血小板分布

No.108

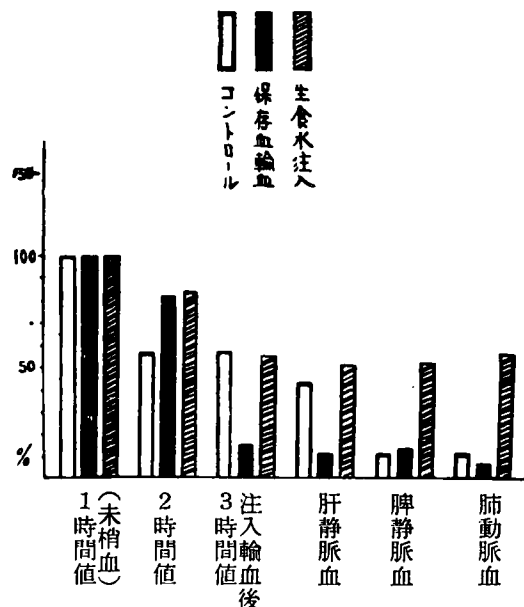
	活性値 C/M/3g	P^{32} 濃度
注射後 1時間	54	475×10^{-4}
2時間	46	405×10^{-4}
生食水注入		
3時間	29	255×10^{-4}
肝静脈	25	221×10^{-4}
肺動脈	29	255×10^{-4}
肺	234	2060×10^{-4}
脾	828	7290×10^{-4}
肝	570	5018×10^{-4}
骨 髓	30	264×10^{-4}
筋 肉	41	369×10^{-4}
心 臓	44	387×10^{-4}

末梢血においては漸次活性度は低下し、生食水大量注射後においては低下するも保存血輸血後にみる程低いものでない。

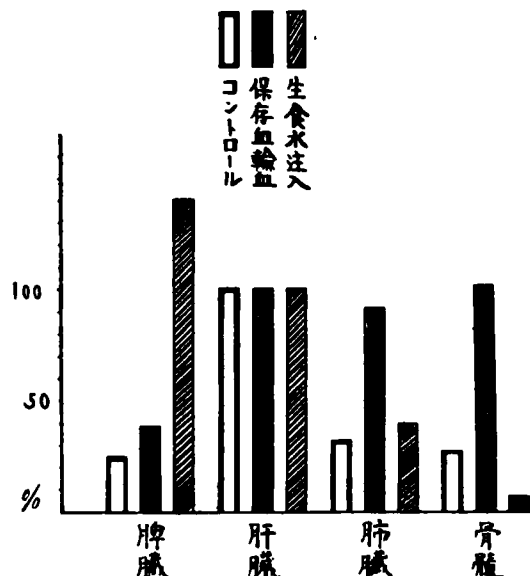
臓器としては、脾、肝臓に高い活性度がみられた。

以上の各成績を末梢血(1時間目の活性値を100とする)及び臓器(肝臓の活性値を100とする)の P^{32} の活性度を図に示すと第2, 3図のごとくなり末梢血は保存血輸血後においては生食水注入及コントロールとして注入した P^{32} 稀釈溶液、又は P^{32} 標識血小板浮游液の単独注入よりも活性度の低下は著しく同時に測定した血小板数とも比例している。臓器の分布状態は、肝臓の活性値を100とした場合をみると保存血輸血後には他のものに比して肺、及び骨髓に著しい活性値の増加を示し注入された標識血小板が分布異常を来していることが推察される。

第2図 P^{32} 標識血小板の静脈血内分布状態



第3図 P^{32} 標識血小板の分布状態



第4章 総括並に考按

著者は第1篇において大量輸血によつて起る最も著明な変化は血小板の減少であると述べたが、輸血後に血小板の減少をみた報告は少なく、Stefanini & Chattergea¹⁸⁾、Desforges¹⁹⁾、Krevans & Jackson²⁰⁾、本邦でも多くの報告例^{21) 22) 23)}があり彼等も大量輸血後に起る出血傾向の最も大きい因子として血小板の減少を考えているが、この血小板減少発生機構については未だ定説がなく、この減少機転を窺知する目的で正常犬に自家血小板に P^{32} を標識後再輸注し大量輸血を行い該血小板の体内分布を観察せんとし、先ず

P³²の追跡実験、自家P³²標識血小板輸注による体内分布状態を測定、次いでこの再輸注され一応体内に分布した標識血小板が大量輸血後、或いは生食水輸注によりいかに分布を変えるか否かを測定し、大量輸血後においてはP³²標識血小板は肺及び骨髓に高活性度を示す成績をえた。このことは大量輸血時の高度の血小板減少に対しての成因機序としてこれ迄に緒言で述べた稀釈、破壊、抗体出現などの諸説に何等かの原因により血小板が体内分布異常を来すことを推察せしめうる。このことは輸血によつて末梢血に減少を来した血小板が24時間後には術前の約60~70%値に数的にかえること及び同時に本学平木内科教室にて行つた大量輸血時及び24時間後の骨髓培養においてthrombopoeseの状態は正常範囲に止まつていることはこの血小板減少には体内分布異常が何等かのかたちで参与することをものがたるものであろう。大量保存血輸血の為血液稀釈が起りそれに血小板の分布異常が加われば末梢血においては著明な血小板減少が起るわけである。

採血小板の標識に関しては1951年にJ. Julliard⁵⁴⁾は人血小板をP³²で標識し満足な結果をえて、これを家兎の体内に注入し各臓器の分布状態について報告し、本邦にては井口⁵⁸⁾が家兎よりSequesterene-Na₂添加血液より血小板を分離しこれにP³²にて標識しこれにより障害血管壁における栓球の撰択的吸着能について発表し、又、湯浅⁵⁵⁾も家兎血小板を放射性同位元素で標識するについて、I¹³¹、P³²、P³²-DFP、S³⁵-硫酸ソーダ、S³⁵-dl シスチン、Cr⁵¹-クローム酸ソーダの各々について in vitro, in vivo の標識操作を行ない検討しP³²による in vitro の方法が良結果をえたと報告している。又標識方法はJ. Julliardは37°C 90分~2時間保温、井口も同様に行つている。

湯浅は標識された血小板のP³²は大部分が代謝の安定な有機磷分割にあり、更に血漿を in vitro で保温するも48時間後にもなお有機磷分割のP³²が大部分を占め、この標識血小板を家兎に静注するも、注射後62時間迄は明かに血小板分割に放射能活性を認めえて標識の充分であることを強調している。著者も標識放射性同位元素にはP³²を使用し、標識時間は37°C、2時間とした。又採血血小板分離一標識一注入には常に同一犬を使用し異種血小板注入による抗原抗体反応発現を避けるようにした。保存血における血小板は保存第3日にして殆んど破壊されるので、大量輸血にあつては当然稀釈ということは考えられるが前篇でのべたごとく種々なる輸注によつても高度に減少をみ、輸血では生理的食塩水注入で稀釈のみにつて期

待される血小板減少の2倍以上でありKrevans & Jackson⁶¹⁾、Mustard⁵⁶⁾も稀釈以外の因子を予想している。Stefanini & Plitaman²⁶⁾は頻回の輸血により血小板凝集素が発生するのを証明し、Harrington²⁷⁾もこの血小板の型の差異で輸血により血小板に対する同種免疫のおこる可能性を予想している。渋沢⁵⁷⁾は血小板抗体の発生の可能性を述べ、著者の実験では第3編でのべるが血小板凝集が保存血輸血により高まる成績をえている。又Stefanini & Chatterjea¹⁸⁾は輸血後の受血者血清中に血小板減少因子が発生することを観察し、Bell⁴⁾、Mustard⁵⁶⁾もこの見解を支持している。最近血小板の分布異常により末梢血液に血小板減少をきたすという報告が多々ある。Vilalobos et al⁵⁹⁾によれば低体温麻酔時に血小板減少をきたし、加温により増加するが血小板をP³²で標識した実験において血小板が一時的に分布異常をきたすことを立証し、緒方⁸²⁾はチフスワクチン注射時に起る末梢血の血小板減少を実験的に肺、肝、脾、骨髓にそれが抑留される為であると述べ又河合³³⁾もアナフィラキシー時におこる血小板の減少に関して凝集、抑留、破壊という機序が考えられたと述べている。

分布異常による血小板減少の発生機転は充分解明されえないが、最近問題となつた抗原抗体反応か、著者が第3編でのべる血小板凝集の増強が関係するか、ともあれ稀釈加うるに何等かの関係により血小板が体内分布異常を来たしより高度に末梢血に血小板減少をきたすものと推測する。

第5章 結 論

P³²標識血小板を作製これを注入した後大量輸血を行い各臓器の分布状態を観察し次の結論をえた。

1. P³²標識血小板単独注入にては肝、脾に高い活性度がみられた。
2. P³²標識血小板注入後大量輸血を行つたものはその単独注入に比して肺、骨髓にその活性度が高くみられた。
3. 大量生食水注入例においては、P³²標識血小板単独注入及び注入後大量輸血を行つた例に比して脾及び肝に高活性度がみられ、肺の活性度及び骨髓の活性度は前者に比して低い。
4. この実験により大量輸血時の血小板減少は稀釈に加え何等かの影響により体内分布異常をきたし末梢血においてはより著明に血小板減少がおこると推察された。

本論文の要旨は、日本輸血学会第5回総会及び福岡医学会第15回総会及び第3回中国四国輸血学会において発表した。

主要文献は第3篇に一括掲載する。

稿を終るに臨み、御指導をたまわつた恩師津田誠次名誉教授に深甚の謝意を捧げると共に、終始直接御指

導、御校閲をいただいた恩師砂田輝武教授に、衷心より感謝の意を表します。又常に御教示いただいた杉原博博士、御援助をいただいた伊達和、須藤和夫、阪田光昭、志水浩、平尾喜茂、小野晶美、吉田茂、森本接夫、河合進の諸学士に謝意を表します。

(本研究は文部省科学研宄費の援助によつた。)

Clinical and Experimental Studies on the Changes of Platelets Following Massive Transfusions of Preserved Blood

Part II. Changes in Distribution of Platelets Following Massive Transfusions of Preserved Blood

by

Kunso SATO

The II. Division of Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Terutake SUNADA, M. D.)

Distribution of platelets in the various organs after massive transfusions of preserved blood was investigated by the injection of P^{32} labeled platelets. Higher activities were found in the liver and the spleen in case of injecting P^{32} labeled platelets alone, but found in the lung and the bone marrow in case of massive blood transfusions following injection of P^{32} labeled platelets.

Therefore, it was guessed that remarkable decrease of platelets count in the peripheral blood was caused by changing in distribution of platelets in organs, in addition to dilution with infused blood.
