

血小板サポニンテストの基礎的検討

川崎医科大学 血液内科
 武 元 良 整
 同 神経内科
 守 本 研 二
 同 検査診断学
 上 田 智
 同 救急医学
 小 浜 啓 次
 同 学 長
 柴 田 進

(昭和60年3月25日受付)

Studies on the Platelet Saponin Test

Yoshinobu Takemoto¹⁾, Kenji Morimoto²⁾
 Satoshi Ueda³⁾, Akitsugu Kohama⁴⁾
 and Susumu Shibata¹⁾

Division of Hematology¹⁾, Neurology²⁾,
 Clinical Pathology³⁾ and Emergency Medicine⁴⁾,
 Department of Medicine, Kawasaki Medical School

(Accepted on March 25, 1985)

連続平均容積測定装置を用いて、血小板容積(Initial mean particle volume; I-MPV), サポニン添加後の膨張率(expansion ratio; ER), 低張溶液中での縮小率(Shrinkage ratio; SR)を測定した。血小板容積の測定には3.13%クエン酸ソーダを用いた方がEDTA-3Kよりも再現性がよかった。健康成人(20-35歳, 男15人, 女15人)のI-MPVは $8.1 \pm 0.7 \mu^3$, ERは 1.41 ± 0.07 , そしてSRは 24 ± 4 であった。健康成人30人を含む100例, 112回の測定では血小板数とI-MPV, 血小板数とSRそしてI-MPVとERは負の相関があり($p < 0.001$), 血小板数とER, I-MPVとSRの間には正の相関($p < 0.05$)がみられた。

急性期脳血管障害患者では、血小板容積は大で、脳出血例のSR(凝集能)は高値であった。

熱傷患者の血小板容積は血小板数の動的変化に伴い変動し, ERとSRも同様に变化した。

以上より, 血小板容積を測定することは血小板数の測定により各種疾患の病態を把握するのと同様の意義があると思われた。

The initial mean particle volume of platelets (I-MPV), expansion ratio after addition of saponin (ER) and shrinkage ratio (SR) were measured with a continuous mean cell volume analyzer (CMA). Concerning the effects of anticoagulants on the platelet volume, better precision was obtained in sodium citric acid (3.13%) than in EDTA-3K.

Normal values obtained from 30 adults (aged 20 to 35, 15 males and 15 females) were I-MPV, 8.1 ± 0.7 ; ER, 1.41 ± 0.07 , and SR, 24 ± 4 (Mean \pm SD). Tests were performed 112 times on 100 subjects including 30 normals. There was a significant negative correlation ($p < 0.001$) between the platelet count and I-MPV, the platelet count and SR, and the I-MPV and ER. There was a significant positive correlation ($p < 0.05$) between the platelet count and ER, and I-MPV and SR.

Increased I-MPV was seen in cerebrovascular accident patients during the acute stage, and elevated SR (increased platelet function) was seen especially in patients with cerebral bleeding.

Decreased platelet counts in burned patients were followed by increased platelet volume, low level of ER and high SR.

These results indicate that the measurement of platelet volume is as useful as the platelet count in understanding the pathophysiology of various diseases.

Key Words ① Platelet volume ② Cerebrovascular accident ③ Burn

はじめに

血小板浮遊液にサポニンを添加すると、血小板はサポニンの影響でその容積をひろげ、その後容積は減少する。この容積変化を連続的に観察したものが血小板サポニンテストである。¹⁾ この連続平均体積測定装置は赤血球膜の性質を解析するためにはすでに検討されているが、²⁾ 今回は直径 60μ のアパーチャーを用いて血小板容積の測定をおこなった。ここでは若年正常人の血小板サポニンテストの成績と各種疾患における血小板サポニンテストの意義について述べる。

方 法

A. PRP (platelet rich plasma) の準備
 静脈血 2 ml を抗凝固剤にて採血し、1000 rpm, 5分間で PRP をつくる。PRP の作製から実験に使用するまでの時間は3時間以内とし室温 (22°C) にて保存した。

B. 装置

連続平均細胞体積測定装置 (continuous mean particle volume analyzer; CMA) の詳細についてはすでに報告されている。¹⁾ 原理は、細胞容積を連続的に測定、解析し、プリンター上に容積変化のグラフと種々のデータを打ち出すものである。血小板容積の検量線は $12, 19 \mu^3$ のラテックス粒子 (Dow chemical 社 U. S. A.) によりもとめた。

C. 測定

0.9% NaCl 50 ml (5 mM リン酸バッファー含む、 30°C) の中に $100 \mu\text{l}$ の PRP を滴下し、30秒後に 1% サポニン 0.15 ml 加える。血小板の平均容積の変化を1秒毎に Sysmex continuous MPV analyzer で200秒間カウントする。

次に、0.4% NaCl 50 ml (30°C) に PRP を $100 \mu\text{l}$ 滴下し、3秒後に容積変化の測定をはじめめる。

粒度分布を 0.9% および 0.4% NaCl 溶液で観察する。測定項目は I-MPV (initial mean

particle volume), M-MPV (maximum mean particle volume), E-R (Expansionratio), そして SR (shrinkage ratio) である. **Figure 1** に各測定項目を血小板サポニンテストの模式図上にあらわした.

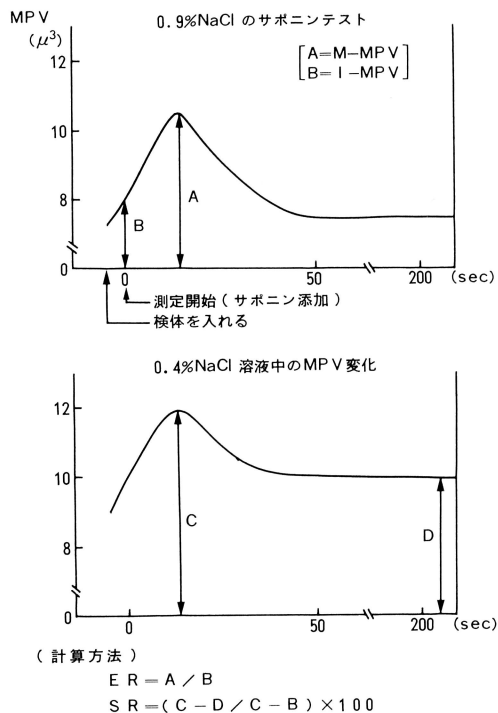


Fig. 1. Illustration of the method used to analyse the mean cell volume patterns of platelets.

D. 結果

1. 抗凝固剤の比較

3.13%クエン酸ソーダとEDTA-3Kの2種類の抗凝固剤を用いて、同一検体で(正常人)血小板サポニンテストの5重測定を行った(NaCl 0.9%). 3.13%クエン酸ソーダの測定値はI-MPV: 8.6 ± 0.08, M-MPV: 11.4 ± 0.24, E-R: 1.33 ± 0.02 EDTA-3Kではそれぞれ、9.2 ± 0.34, 12.2 ± 1.53, 1.33 ± 0.11であった. **Figure 2** であきらかなようにI-MPVとM-MPVは1%以下の危険率で2群間に有意差を認めた. ERは差がなかった.

2. 正常値(男15人, 女15人, 20~35歳)

血小板サポニンテストの正常値を **Table 1**

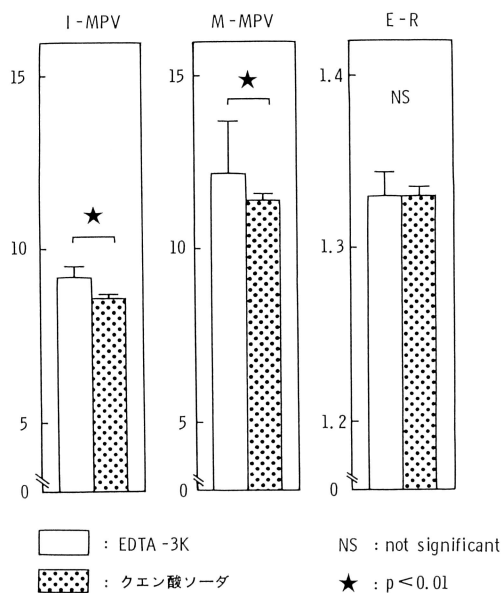


Fig. 2. Effects of anticoagulant on platelet saponin test.

Table 1. 血小板サポニンテストの正常値 (♂=15, ♀=15)

NaCl 濃度	Platelet 濃度 (× 10 ⁴ /μl)	I-MPV	M-MPV	ER	SR
0.9%	24.2 ± 4.4	8.1 ± 0.7	11.5 ± 1.2	1.41 ± 0.07	/
0.4%	24.2 ± 4.4	9.8 ± 0.8	12.5 ± 1.2	1.28 ± 0.08	24 ± 4

Mean ± SD

に示した.

3. 各種疾患 (**Table 2**)

正常人30人を含む100例, 延べ112回の血小板サポニンテストを行った. 脳血管障害は出血例12名, 梗塞例12名について検討した.

4. 血小板数と各種計測値 (**Table 3, 4**)

血小板数と各計測値の成績を表3に, その相関係数を **Table 4** に示す, 血小板数とI-MPV, 血小板数とSR, そしてI-MPVとERはいずれも負の相関がある (p < 0.001). 血小板数とER, I-MPVとSRは正の相関がある (p < 0.05).

5. 血小板数とI-MPVそしてE-Rの関係 (**Fig. 3**)

症例数の多い血小板数40万まではI-MPVと

Table 2. 対 象

正 常	30	30
血液疾患	14	18
DIC	5	7
多発性骨髄腫	3	5
鉄欠乏性貧血	2	2
悪性リンパ腫	2	2
白血 病	1	1
血 栓 症	1	1
脳血管障害	24	25
肝 疾 患	4	5
熱 傷	3	6
感 染 症	7	8
術 後	5	6
心筋梗塞	2	2
そ の 他	11	12
	100例	112例

Table 3. 血小板数と各種計測値(112例)

以上～* 未満	n	Platelet	I-MPV	E-R	S-R
～10	14	7.2± 2.1	9.9±0.9	1.19±0.08	25±7
10～20	34	15.7± 3.2	9.1±0.9	1.31±0.10	24±7
20～30	47	24.4± 2.6	8.6±1.0	1.36±0.09	24±6
30～40	11	34.7± 3.1	7.8±0.3	1.33±0.10	21±5
40～50	3	46.1± 2.8	6.8±0.3	1.33±0.02	17±3
50～	3	70.9±14.3	7.3±0.5	1.27±0.10	14±3

* Platelet count ($\times 10^4/\mu\text{l}$) mean±SD

Table 4. 測定項目と相関係数(112例)

	血小板数	I-MPV	E·R	S·R
血小板数	*	-0.577 [○]	0.201 [▲]	-0.319 [○]
I-MPV	-0.577	*	-0.434 [○]	0.227 [▲]
E·R	0.201	-0.434	*	-0.068
S·R	-0.319	0.227	-0.068	*

{[○]: $p < 0.001$ }
{[▲]: $p < 0.05$ }

血小板数は相関係数 = -0.543 と負の相関があるが、血小板数 40 万以上では図 3 のごとく症例も少ないため一定の傾向はない。血小板数と ER の関係も同様である。

6. 脳血管障害患者(脳出血と脳梗塞)の検討 (Table 5)

脳血管障害急性期(24時間以内)の24人について血小板サポニンテストを行った。血小板容積は脳出血(1%以下の危険率で有意)および脳梗塞(5%以下の危険率で有意)ともに正常値より大きく、血小板凝集能の指標とされるSR 値¹⁾は脳梗塞症例よりも脳出血の方が高値であった。(凝集能亢進)

7. 熱傷と血小板サポニンテスト

熱傷例(3例, 6回測定)の血小板サポニンテストでは Table 6 にみられるように、I-MPV は 9.0 ± 1.5 (正常人と比較して $p < 0.05$ で有意差あり), ER は 1.26 ± 0.07 (同様に $p < 0.01$ で有意差あり), SR は 23 ± 6 (有意差なし)であった。

考 察

血小板容積は保存状態や抗凝固剤の種類により変化しやすいことが知られている。³⁾ そこで正常値をもとめるために測定は採血から3時間以内に行うこととし、抗凝固剤はEDTA-3Kと3.13%クエン酸ソーダの2種類について検討を加えた。Figure 2 に示すよ

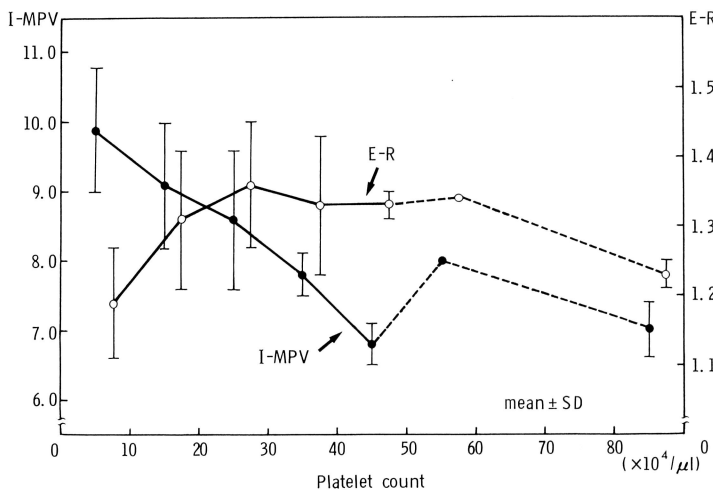


Fig. 3. Interrelation between platelet counts and I-MPV and ER.

Table 5. 脳血管障害と血小板サポニンテスト (24例)

(n)	血小板数($\times 10^4/\mu\text{l}$)	I-MPV	ER	SR
正 常 (30)	24.2 \pm 4.4*	8.1 \pm 0.7***	1.41 \pm 0.07***	24 \pm 4**
脳 出 血 (12)	19.2 \pm 5.8	8.9 \pm 0.7	1.36 \pm 0.08	31 \pm 5**
脳 梗 塞 (12)	21.8 \pm 9.0	9.0 \pm 0.9	1.32 \pm 0.09	23 \pm 6

2群間の有意差検定 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, t-test)

Table 6. 熱傷患者と血小板サポニンテスト

Case No.	血小板数($\times 10^4/\mu\text{l}$)	I-MPV(μ^3)	E-R	SR
32	16.5	10.9	1.22	32
48	19.9	10.3	1.14	26
84	26.8	8.1	1.30	26
92	29.0	9.6	1.25	18
102	36.3	8.1	1.33	15
106	43.2	7.2	1.31	21
Mean \pm SD	28.6 \pm 9.9	9.0 \pm 1.5	1.26 \pm 0.07	23 \pm 6

うに I-MPV と M-MPV は 2 群の間には 1% 以下の危険率で有意差をみとめた。ER (膨張率) は 2 者間で差をみとめない。I-MPV の再現性は 3.13% クエン酸ソーダの方がすぐれている。したがって抗凝固剤の差により血小板容積は変化すると考えられた。血小板膜には Ca が多く含まれているため、EDTA-3K の様なカルシウムキレート剤により何らかの作用が働き血小板容積が大きくなるのであろう。この傾向は他の報告とも一致しており^{3),4)} 今後血小板容積の測定では 3.13% クエン酸ソーダの使用が望ましいと考えられる。

血小板容積は血小板数の回復期に増大し⁵⁾ また大型血小板の機能は亢進しているとの報告がある^{6),7),8),9)} **Figure 3** の成績は、諸種疾患 112 例の総集計であるために、正常人によるところの血小板数とその容積の関係ではないが、両者間には負の相関を認めた (**Table 4**)。この理由の 1 つには血小板減少の症例には DIC (disseminated intravascular coagulation) が多く、産生亢進による新生大型血小板が多いため血小板容積が増大している可能性がある。血小板数と血小板容積の負の相関関係は脳卒中^{9),10)} 虚血性心疾患および正常人¹¹⁾ でもみ

られると報告されているが血小板数 50 万以上の少数例では血小板容積はやや増加する傾向にあった (**Table 3**)。したがって、今後は血小板産生の低下または血小板分布異常による血小板減少例および血小板増多症での血小板容積の検討も必要であろう。

急性期脳卒中患者の平均血小板容積と血小板数の間には負の相関があり、血小板容積が大きい時には血小板凝集能が亢進しているとの報告がある^{9),10)} それらの関係を調べるために血小板サポニンテストの SR 値に注目して検討を行った。SR 値は血小板機能検査の 1 つである Hypotonic shock response (% HSR) と正の相関 ($r=0.861$) があり¹⁾ 凝集能が亢進している時には高値となる。私たちの成績からは脳出血群の急性期は正常値に比べ、血小板数減少、血小板容積増大、ER (膨張率) 低下そして SR (凝集能) 亢進であった。このことは脳出血後の急性期は反応性の凝集能亢進状態であると考えられる。一方、脳梗塞急性期は脳出血群に比べ SR (凝集能) は予想¹⁰⁾ に反して高値ではない。しかし、正常と比して血小板容積は増大している。以上のことから血小板凝集能が抑制された可能性として、血小板容積は大きくても血小板濃染顆粒や α 顆粒さらに血小板 LDH 活性値が低下しているためかもしれない⁷⁾

熱傷では重症度に比例して DIC を合併しやすく、それは熱傷皮膚創面の治癒につれて改善する¹²⁾ したがって熱傷の急性期には血小板減少や、血小板機能の亢進状態などがみられやすい。熱傷患者 (3 例) で 6 回の血小板サポニンテストを行った (**Table 6**)。血小板数の増加につれて、I-MPV および SR は低下する傾向がある。しかし、血小板数 20 万以下の 2 例の血小

板容積は大きく、SR 値は上昇していることから、熱傷例で血小板減少を来す傾向のものは血小板が大型で凝集能が亢進していると予想できる。

以上、各種疾患について血小板サポニンテストを行い、血小板数、容積、ER そして SR の関係を検討した。血小板数と I-MPV, I-MPV

と SR はいずれも負の相関があり (Table 4) 血小板サポニンテストによる病態の把握が可能であろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に技術協力をいただいた仁田美恵、萩原宏美、上田智子の諸嬢に感謝いたします。

文 献

- 1) Watanabe E., Sasakawa S.: Changes of platelet cell volumes in hypotonic solution. *Thrombosis research* 31: 13—21, 1983
- 2) Ueda S., Harano K., Takemoto Y., Harano T., Shibata S.: Continuous measurement of the change of erythrocyte volume after addition of saponin (Saponin test). *Kawasaki Med. J.* 7: 127—135, 1981
- 3) 岡田徳弘, 織辺紀芳, 林 則人, 松本英彬: 多項目粒度分布測定装置 PDA-410 の検討—第5報平均血小板容積 (MPV) について—*Sysmex Journal* 5: 244—255, 1982
- 4) 上原総一郎, 平山亮夫, 志田直徳, 河原崎侑: 血小板容積の基礎的ならびに臨床的研究, *現代医療* 15: 1051—1057, 1983
- 5) Kravtman M.: Platelet site in thrombocytopenia and thrombocytosis of various origin. *Blood* 41: 587—598, 1973
- 6) Karpatkin S.: Heterogeneity of human platelets VI. Correlation of platelet function with platelet volume. *Blood* 51: 307—316, 1978
- 7) Thompson C. B., Eaton K. A., Princiotta S. M., Rushin C. A., Valeri C. R.: Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Brit. J. Haemat.* 50: 509—519, 1982
- 8) Thompson C. B., Jakubowski J. A., Quinn P. G., Deykin D., Valeri R.: Platelet size as a determinant of platelet function. *J. Lab. Clin. Med.* 101: 205—213, 1983
- 9) 小金丸茂喜, 野村俊也, 森川英治, 沖田肇, 大屋 恵, 原田 昭, 橋田伸生, 上村徹治: 血小板回転と血小板容積—脳血管障害における検討. *広島医学* 36: 422—426, 1983
- 10) 小金丸茂喜, 町田新一郎, 安岡大和, 金丸英治, 沖田肇, 久住静代: 血小板回転と血小板容積—脳血管障害における検討 (第2報). *広島医学* 37: 538—541, 1984
- 11) 八木高秀, 小橋紀之, 浜 純吉, 岡林孝直, 香取 瞭, 森嶋祥之, 大場康寛: 虚血性心疾患, 心不全における平均血小板容積及び血小板数の変動について. *近大雑誌* 9: 67—73, 1984
- 12) 武元良整, 久村英嗣, 田中 茂, 田辺 潤, 中村義博, 小浜啓次: 重度外傷・熱傷と DIC 外科治療 49: 424—432, 1983