

血小板動態検査

山口 司

Study of Platelet Kinetics

Tsukasa YAMAGUCHI

概 要

近年、血小板機能検査の進歩は著しいものがある。なかでも、*in vivo* 検査は生体内での血小板の機能を知る上に、極めて有用であり、血小板の生成から崩壊に至る、血小板の動態を推測できる検査として、血小板寿命測定の意義は大きい。

その、血小板寿命測定について、ラジオアイソトープを用いる測定法として、従来から行われている $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 標識血小板法の概略と、われわれの経験例について述べた。さらに最近、血小板寿命測定に利用されようとしている半減期の短い ^{111}In -oxine 標識血小板法および、ラジオアイソトープを用いない点で注目されている Malondialdehyde (MDA) 産生能測定について紹介し、それぞれの問題点について文献的に考察した。

はじめに

近年、血小板の代謝などに関する新しい知見が得られつつあり、それにともない新しい血小板機能検査法も開発されてきている。その血小板機能は、血小板血栓の形成に関与するものと、血小板凝固に関与する機能とに大別でき、また、*in vivo* 検査と、*in vitro* 検査に分けると、*in vivo* 検査の方が生体内での血小板機能を忠実に反映するとして極めて有用であると考えられている。

いわゆる、血小板動態 (Platelet kinetics) をも推測できる検査として以前から血小板寿命測定が行われているが、最近の動向について述べることにする。

血小板の生成と崩壊

血小板は、多能性造血幹細胞 (multipotential stem cell) から巨核球系前駆細胞 (megakaryocyte committed stem cell) を経て¹⁾ トロンボポエチンの作用により巨核芽球 (megakaryoblast) になる。さらに、それが前巨核球 (promegakaryocyte)、巨核球 (megakaryocyte) から後巨核球 (metamegakaryocyte) になり、細胞質を小区画に区切ってつきつきに血小板として放出する²⁾。この巨核芽球が巨核球になるまでに約4日、巨核球から後巨核球の成熟までに約

3 日の日数を要する。

骨髓から末梢血液に放出されたばかりの血小板は古いものより大きい。また、血小板の造形成が、さかんな時には大きい血小板を末梢血液に放出する。若い血小板は、一応、末梢血液を流れる間に脾に抑留される。骨髓から末梢血に送り出された血小板の1/3が脾内にとどまり、2/3が血液中に浮遊して循環している。これらの血小板は約10日間で老衰し肝、脾のRES細胞に捉えられて破壊され、古いものから消失してゆく²⁾。

正常人の末梢血液の血小板数が $15 \times 10^4 \sim 35 \times 10^4 / \mu l$ に維持されるのは、血漿内 thrombopoietin の feedback 的な分泌による。単位時間内に末梢血液中出现してくる血小板量と、消失していく血小板量の均衡が保たれているときは、末梢血液中の血小板数は変わらない。したがって、血小板産生量が、血小板消失量の一方を知ることにより他方を推定することができる。

血小板の産生・崩壊に関する検査

血小板の産生量・消失量を知るとは、血小板数異常の病態を知り、診断・治療法の選択、あるいは治療効果の判定などに極めて重要であり、また、生体内で血栓が形成される場合、血小板消費の亢進が認められるので、血栓形成の予知も可能になる。

有効血小板産生量を知るための検査として、骨髓巨核数測定、巨核球容積測定、血小板容積による巨大血小板の出現率によって血小板産生量を表現する方法³⁾、⁷⁵Se-セレンメチオニン(⁷⁵SeM)、³⁵S-硫酸塩を用いた骨髓巨核球標識法⁴⁾、アスピリンの血小板 malondialdehyde(MDA) 産生能抑制作用を利用した方法⁵⁾があり、血小板の消失量を直接測定する検査としては、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 標識血小板法⁷⁾、¹¹¹Indium oxine 標識血小板法⁸⁾がある。

これらの検査のうち、血小板の生体内における動態を知る検査としての血小板寿命測定法について、ラジオアイソトープを使用する $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 標識血小板法、¹¹¹Indium-oxine 標識血小板法、ラジオアイソトープを使用しないMDA産生能測定法について少し詳しく述べてみたい。

RI 標識法による血小板寿命測定

I RI 標識法の基礎理論⁹⁾

骨髓でつくられた時期は異なるが、寿命はすべて同じである血小板が、末梢血液に出ると図1a)上のようになる。その各血小板にRIを用いて標識した時間を t とすると、それ以後、すなわち、点線の右側にある各線は、RIで標識された各血小板1~10が末梢血液中で生存している時間の長さを示すことになる。この各血小板の寿命を表す各線を、最初の部分を揃えて並べると、すべての血小板寿命は同じであるためその終末点も一様に揃うことになる。そこで、先に述べた t 以後の血小板寿命を長さの順に並べかえ、その終末点を結んだ点線は、血小板寿命曲線に一致する(図1a)下)。流血中の血小板寿命が、皆同じであればその寿命曲線は直線となり、X軸との交点が血小板の平均寿命を示すことになる。

ただ、健康人の血小板寿命曲線は右端で必ずしも直線を示すとは限らず曲線となり、いわゆ

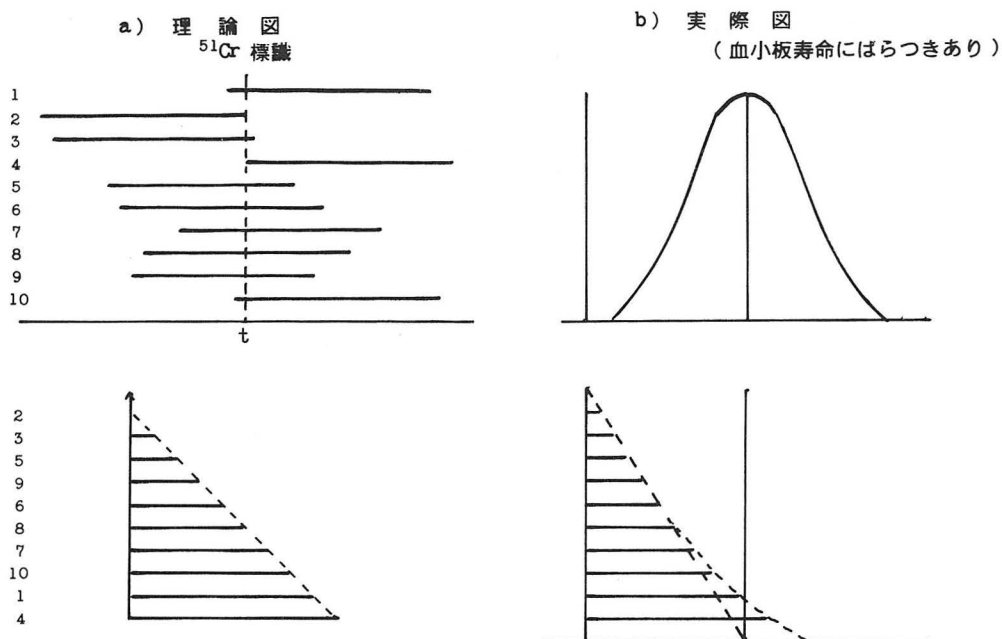


図1 自然崩壊(老化)の場合の血小板寿命曲線(文献⁹⁾参照)

る, tailing 現象を示す。この現象については、次のように説明されている。健康人の血小板寿命の長さを横軸にとり、縦軸にはそれぞれの寿命をもつ血小板の出現頻度を表すと、寿命 μ を持つ血小板の数をもっとも多く、その分布は左右対称のつりがね状の正規分布を示している(図1b)上)。そこで寿命の順に並べるとその寿命に長短があるため終末点は揃わない。これを前と同様、RI標識後の血小板寿命曲線としてみると、個々の血小板寿命のバラツキによって tailing 現象を示す(図1b)下)。この場合は血小板寿命曲線の直線部分を延長してX軸との交点を求め、血小板の平均寿命とする。このように血小板の老化によって流血中から消失してゆく場合、すなわち、一定の寿命が来たものから順に消失していく場合の血小板寿命曲線は tailing 現象を伴った直線となる。

一方、血小板が老化とは無関係に、老幼の別なく破壊される場合(無選択崩壊)には血小板の寿命が短いもの、長いものなど様々まじりあっている(図2 a, b)。血小板をRIで標識した以後の血小板寿命を、長いものから順に並べて直線の末端を点線で結んだ血小板寿命曲線は指数曲線を呈する(図2, c)。この時の血小板平均寿命は、放射活性が1/2に減じるまでの時間を自然対数 $\ln 2 (0.693)$ で除して求める。

しかし、実際に個々の症例で得られた血小板寿命曲線を見ると、直線と指数曲線との中間型、すなわち、軽度の曲りを示す直線に近い線を示す場合、直線として求めるのか、指数曲線として求めるのか、判断に迷うことが多い。そこで塚田は客観的に血小板寿命を求めるために、実測した血小板寿命曲線に数式をあてはめ、荷重平均法、修飾指数曲線法、Gammaモデル法で検討を加え、コンピューターを用いる場合は、Gammaモデル法、卓上電子計算機を用いると

きは荷重平均値法が良いことを明らかにしている。また、従来の視算法も主観を除く努力を行えば、比較的両者の値に近く、日常検査としては十分であるとしている。¹¹⁾

II $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を用いる方法 (^{51}Cr 法)

われわれは、国際血液標準化委員会 (ICSH) の標準法に準じて行っている。¹²⁾

1. 試薬および器具

i) $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 注射液 (第一ラジオアイソトープ研究所: 比放射能 $20\text{mCi}/\text{mgNa}_2\text{CrO}_4$ 以上): 1回の検査に $500\mu\text{Ci}$ を用いる。

ii) ACD-A 液入り採血用ダブルバッグ (500 ml 用): 採血後血小板の分離に用いる。

iii) 注射用生理食塩水 (500 ml)

iv) EDTA 加食塩水: NaCl 0.7g, $\text{EDTA}-2\text{Na}$ 1.5g を 100 ml の純水に溶かし滅菌しておく。

v) プラスチック滅菌注射器, 同遠心管

vi) シリコン処理試験管: 採血用

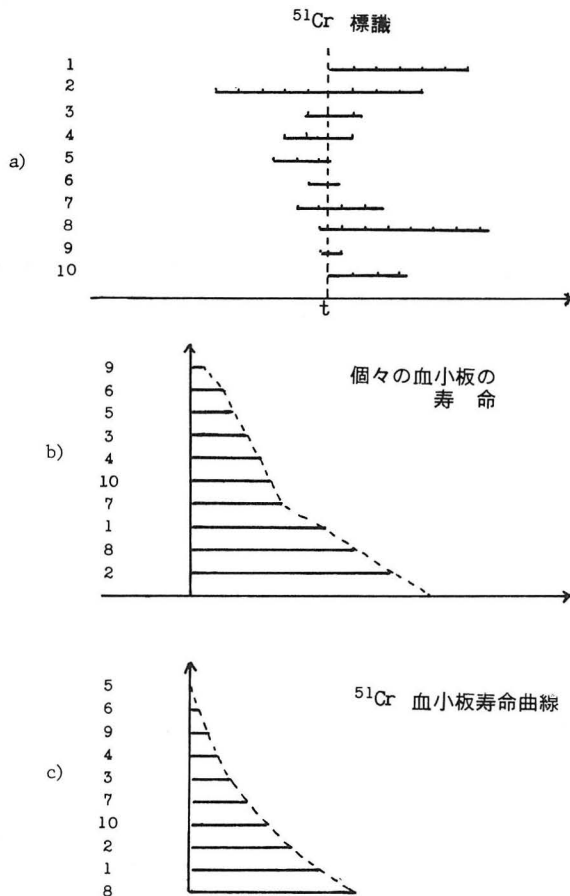


図 2 無選択破壊の場合の血小板寿命曲線 (文献⁹⁾ 参照)

2. 手技；すべて室温で無菌的に行う。

j) 血小板の分離と ^{51}Cr の標識法

術者は、採血を始める前に患者、または供血者に生理食塩水500mlの点滴静注を行い、約150ml注入した後、採血バッグに採血をはじめめる。採血中はバッグを連続的に攪拌し、ACD液と血液との接触を素早く行うことが大切である。なお、採血は10分で終わるようにする。赤血球層は供血者自身に返却するため、採血終了後も点滴部位はそのまま確保しておく。採血した血液バッグは230G、15分遠心し、多血小板血漿（PRP）を分離し、これをセカンドバッグに移す。残った赤血球は、バッグから採血者に返却する。PRP中に赤血球が混入することがあり（特に血小板数の少ない例）、これを除くため再び230Gで10分遠心して赤血球を沈澱させ、上清のPRPを用いる。得られたPRPの重量の1/10量に当たる滅菌ACD-A液を入れた別の採血用ダブルバッグにPRPを移してpHを6.5前後に下げ、1500G 30分遠心して血小板と乏血小板血漿（PPP）とに分離する。PPPをセカンドバッグに移し保存する。血小板沈澱は10mlのPPPに均等に浮遊させ血小板濃縮血漿（PC）を作製する。PC中の血小板が凝集していないことを確かめた後、500 μCi の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 液を加え、時々振盪しながら室温に30分間保つ。その後、PPPを20ml加え混和し1500G 30分遠心してその上清を完全に取り除く。沈澱の ^{51}Cr 標識血小板に再びPPP 23mlを加え均等に浮遊させる。この1mlを標準試料としてプラスチック試験管に分けた後、20mlのPCをプラスチック滅菌注射器に正確にとり、被検者の静脈内に注入し、正確な注入量と終了時間を記録しておく。

ii) 血小板寿命の測定

プラスチック試験管に標準試料を確実に0.5ml入れ、2600G 30分 20℃で遠心してPPPを捨て、沈澱の血小板に生理食塩水10mlを加え、2600G 15分 20℃で2回洗浄する。沈澱の ^{51}Cr 標識血小板の放射活性〔A〕を、ウェル型 γ カウンターで測定する。この放射活性とPCの注射総量から、被検者に注射した血小板の総放射活性を求める。

$$\text{注入血小板の総放射活性} = A \times \text{注射量 (ml)} / 0.5 \text{ (ml)}$$

著明な血小板減少がみられる患者では、総放射活性が 10^6 cpm以上であることが望ましいとされている。¹³⁾

^{51}Cr 標識血小板を注射した反対側の肘静脈から注射後10分、30分、1、2、3、4時間とそれ以後毎日1回ずつ採血を10日間行い、被検者流血中の標識血小板放射活性を測定し、その減衰状態を観察する。

採血はプラスチック滅菌注射器で静脈血9mlを正確に採取し、EDTA加食塩水1mlを予め入れたシリコン処理試験管に採り、静かに転倒してよく混和する。この全血の血小板数（全血血小板数/ μl 〔C〕）を計算し、同時に全血1mlの放射活性（全血cpm〔F〕）を測定する。それから230G 20分 20℃で遠心してPRPを分離し、このPRP中の血小板数（PRP血小板数/ μl 〔D〕）を算定してプラスチック試験管にPRPをとる。これを2600G 30分 20℃で遠心して血小板沈澱とPPPに分け、両者の放射活性を測定する（血小板cpm〔B〕）。なお、PPPの量

PPPml〔E〕も測定しておく。注射後の各時間に採取された被検者血液1ml中の血小板放射活性は次式により計算する。

$$\begin{aligned} & \text{血液 1ml 中の血小板放射活性 (cpm)} \\ &= \frac{\text{血小板放射活性 (cpm〔B〕)} \times \text{全血 1ml 中の血小板数 (/ml〔C〕)} \\ & \quad \text{PRP 1ml 中の血小板数 (/ml〔D〕)} \times \text{PPP 量 (ml〔E〕)} \end{aligned}$$

PRP中の血小板がすべて血小板沈渣として得られたと仮定し、この放射活性をPRP中の全血小板数で除すと、血小板1個の放射活性が求められる。これに全血1ml中の血小板数を乗ずれば血液1ml中の血小板放射活性を求めることができる。

ところが、被検者の血小板数が $8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 以下の著明な減少を示す場合は、血小板数算定の誤差が血小板放射活性の値に大きな影響を与える可能性もある。そのため全血1mlの放射活性が全血1ml中の血小板放射活性を知る大まかな目分となるところから、採血直後に測定した全血1mlの放射活性（全血cpm〔F〕）に10/9（希釈倍数）を乗じて算定する。

注入した標準血小板の総放射活性cpmを身長、体重、性別より求めた循環血液量（ml）¹⁴⁾で除すと、被検者の血液1mlについての血小板放射活性値が求められる。この値は注入した標識血小板が被検者の流血中に100%出現したと仮定した場合の放射活性である。

被検者血液1mlについての血小板放射活性値

$$= \frac{\text{注入血小板総放射活性値}}{\text{循環血液量 (身長, 体重, 性別による計算)}} \quad (\text{理論値})$$

この値と各採血時間における被検者血液1ml中の血小板放射活性値との割合を求めたものが血小板回収率 (recovery rate) である。

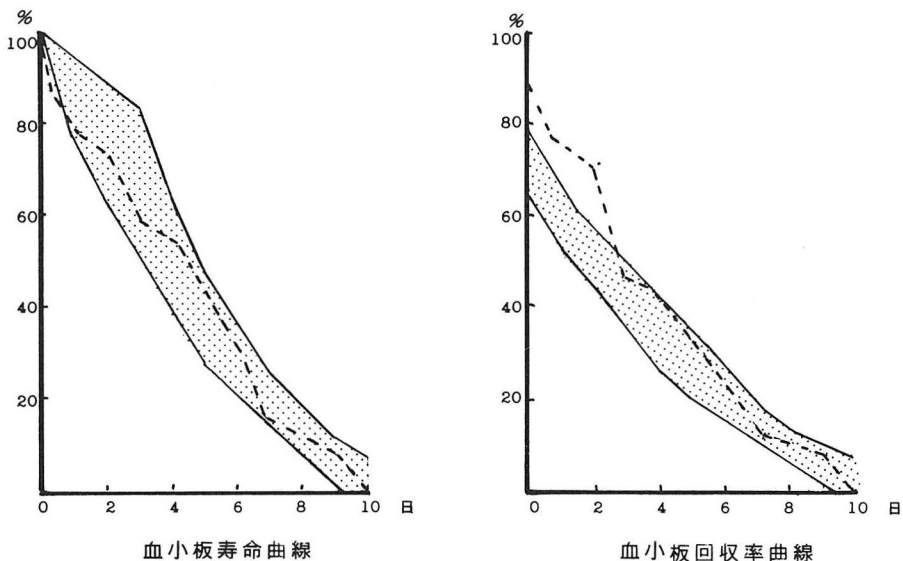


図3 ⁵¹Cr法による健康成人例

血小板回収率

$$= \frac{\text{血液 } 1\text{ml 中の血小板放射活性 (各時間値)}}{\text{血液 } 1\text{ml 中の血小板放射活性 (理論値)}} \times 100\%$$

最大回収率を示した時点の放射活性を100%として各時間における試料の放射活性の変化を図示したものが血小板生存曲線である。

iii) 血小板平均寿命と血小板回転

血小板の平均寿命(平均生存時間)は血小板生存曲線より求める。すなわち、1)生存曲線が直線の時時は時間を表すX軸との交点、2)軽度の曲線の時時は初期生存曲線の接線とX軸との交点、3)指数曲線の時時は放射活性が50%に減じるまでの時間(T1/2)を自然対数 ln 2 (0.693)で除して求める。日常検査としては、このようにして求めるが、最近ではコンピューターによる解析が行われている。^{14) 15)}

血小板消失量を示す血小板回転(turn over)は血小板寿命測定により求められた平均寿命、最大回収率、末梢血血小板数から計算する(Hakerの式)。³⁾

血小板回転(/ μl / 日)

$$= \frac{\text{末梢血血小板数} / \mu\text{l}}{\text{平均寿命 (日)}} \times \frac{90}{\text{最大回収率 (\%)}}$$

血小板回転は単位時間に、末梢血液中に破壊や消費によって消失していく血小板量を示す。もし血小板寿命測定期間中に末梢血血小板数が大きな変動を示さない場合には、1日に消失していく血小板数は1日に産生される血小板数と同じと考えられるので、血小板回転は骨髓内巨核球の有効血小板産生量を間接的に示すことになる。

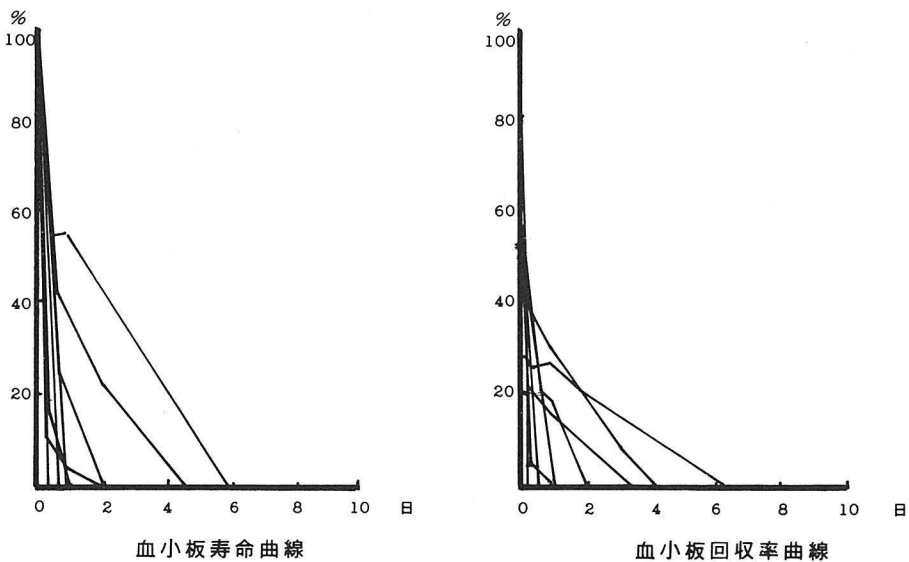


図4 ⁵¹Cr法によるITP例

iv) 臓器体表活性

^{51}Cr や ^{111}In を用いた場合、scintillation detector により、体表から心、肝、脾に集まった標識血小板の放射活性を測定できる。心の放射活性値は流血中の血小板の放射活性、肝・脾の放射活性値はこれらの臓器に集積し破壊されていく血小板の放射活性を示している。われわれは、あらかじめ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ で被検者の心、肝、脾の位置を確かめ、皮膚に印をつけテープを貼り毎回、同じ位置に detector をおき測定している。

測定した放射活性値は絶対値ではなく、各臓器間の放射活性比を求める。

v) 測定例

^{51}Cr 法による健康成人(図3)ならびに特発性血小板紫斑病(I TP)(図4)について、血小板生存曲線と血小板回収率曲線を示した。また、各測定値をまとめると(表1, 2)塚田ら¹⁶⁾の報告ともほぼ一致している。

vi) 測定上の問題点

第一に、in vitro で ^{51}Cr を標識された血小板が流血中のすべての血小板を代表するかどうかという点だが、血小板生成の項で述べたように末梢血に放出されたばかりの血小板は古いものより大きい。この幼若血小板がもし密度も高いとすると全血から PRP を分離する際の遠心¹⁷⁾条件によっては幼若な ^{51}Cr 標識血小板が赤血球に混じって落ちてしまい、寿命は見かけ上短縮

表 1

	塚田, 他 ⁽¹⁶⁾	山口, 他
最大回収率	70 ± 6 %	86.6 %
平均生存時間	8.6 ± 0.8 日	8.0 日
血小板回転 (消失血小板)	27,000 ± 4,000/μl/日	31,000/μl/日
臓器体表活性比		
脾/肝	2.0 ± 0.6	0.69
脾/心	4.9 ± 2.9	1.01
脾/心	2.8 ± 1.6	1.12

表 2

	例	血小板数	平均生存時間 (日)	最大回収率 (%)	血小板回転 (×10 ⁴ /μl/日)
正常人	1	24.0	8.0	86.6	3.1
I T P	8	3.3 ± 0.9*	1.0 ± 0.3	57.3 ± 7.6	12.1 ± 4.7
血小板減少症	5	4.7 ± 0.9	2.8 ± 1.3	30.4 ± 7.8	7.3 ± 2.7
血小板機能異常	4	17.8 ± 3.5	5.6 ± 1.1	69.2 ± 3.4	4.0 ± 0.6

* M ± SE

することになる。それに反し、血小板の幼若度は大きさ、密度にはほとんど関係がないとする¹⁸⁾と、遠心による影響は考えなくてよい。

次に問題となるのは、血小板の老幼によって⁵¹Crのとりこみが均等でないという点である。通常の血小板寿命測定に使用するCrの濃度0.1mMという低濃度では、代謝が盛んな幼若血小板は老化血小板よりCrを多くとりこむことが実験的に証明されている¹⁹⁾。すなわち、Cr濃度が0.1mM以下ではエネルギー依存性の能動輸送により血小板にとりこまれ、0.1mM以上では拡散によってとりこまれる²⁰⁾。Crの濃度を高くして5mM以上にすると血小板の老幼によるとりこみの差は認められなくなるが、0.1mM以上では血小板機能が阻害される²¹⁾。また、たとえ高濃度のCrをとりこませても注入直後in vivoにおいてCrの遊出量が増えることも報告されている²²⁾。⁵¹Crのとりこみは血小板の老幼に関係なく均等であることが望ましく、したがって0.1mM以下の使用量での不均等性の解決が望まれている²³⁾。

最後にCrの遊出という点だが、血小板にとりこまれたCrは細胞質に61%、膜に29%存在し、細胞質内でのCrの分布は、その56%がATP・ADPに結合して、31%が遊離の形で存在する²⁴⁾。膜と結合したCrは血小板洗浄時に容易に遊出する。細胞質内のCrはin vitroで血小板抗体と作用させると遊出することが報告され²⁴⁾、in vivoでも血小板同種抗体によって、注入後30分以内に細胞質から約50%のCrが遊出し、血小板回収率がみかけ上減少するとの報告がある²⁵⁾。これは早い時期に起こるため血小板寿命曲線にはあまり大きな影響を与えないが、血小板回転をHarkerの式で計算する時、回収率の低下が、単位時間に血液中から消失する血小板量を見かけ上大きくし、免疫性血小板減少症では、それが問題となる。このような点から、Branehögの式によれば回収率の変化によって影響を受けることがなく推奨されている²⁶⁾。

Ⅲ ¹¹¹Indium oxine を用いる方法

1976年以来、血小板寿命測定にIndium-111が用いられるようになり種々の検討が行われている⁸⁾。現在、Hawkerらの方法がoptimal methodとして行われているが、本邦において日常検査に適していると思われる油井らの方法に準じて述べる²⁸⁾。

1. ¹¹¹In の RI 特性

¹¹¹Inの特徴は、半減期が2.8日であり⁵¹Cr 27.8日に比して短い。また、 γ 線のエネルギーも⁵¹Crが320KeVで9%であるのに対し¹¹¹Inは173KeVで84%、247KeVで94%の放出がみられ臓器活性の測定も容易に行える²⁹⁾。

2. 試薬および器具

i) ¹¹¹In-oxine液：Radiochemical Centre（比放射能 10mCi / μ gIn：科研化学、治験用）。1回の検査に300 μ Ciを用いる。

ii) ACD-A液

iii) ACD-生理食塩水：ACD-A液と生理食塩水を1：7に混合し2NaOHでpH 6.5とする。

iv) 50～60ml容フタ付遠心管：シリコン処理をしておく。

v) その他、⁵¹Cr法に準ず。

3. 手技, すべて室温で無菌的に行う。

i) 血小板の分離と¹¹¹Inの標識法

患者または供血者血液44 mlを採血し, ACD-A液6 mlを加えた滅菌フタ付遠心管に入れてよく混和した後, それを300G 15分室温で遠心する。滅菌注射器で上清のPPPをとり, 別の滅菌フタ付遠心管に入れ保存しておく。沈渣の血小板にACD-生食水(pH 6.5)を3 ml加えて血小板を完全に浮遊させる。血小板が凝集していないことを確かめ, ¹¹¹In-oxine溶液300 μ Ciを加え時々, 振盪しながら室温で20分間保つ。先のPPP 15 mlを加え混和し, 1500G 15分遠心する。上清のPPPは完全に捨てる。沈渣の¹¹¹In-oxine標識血小板にPPP 11 mlを加え均一に浮遊させ, 標識血小板濃厚血漿(PC)とする。この1 mlを標準試料としてプラスチック試験管に分けた後, 10 mlのPCをプラスチック滅菌注射器でとり, 被検者の静脈内に注入し, 正確な注入量と終了時間を記録しておく。

ii) 血小板寿命の測定

¹¹¹In-oxine標識血小板を注射した反対側の肘静脈より, 注射後10分, 30分, 1~4時間と以後毎日1回採血を10日間行い, 被検者流血中の標識血小板放射活性を測定し, その減衰状態を観察する。この採血回数および採血期間は症例に応じて適時に行う。

採血, およびそれ以後の操作, また, 血小板平均寿命と血小板回転の求め方, 臓器体表活性についても⁵¹Cr法に準じて測定する。

iii) 正常値

Heaton³⁰⁾らは血小板寿命 8.82 ± 0.21 日, 最大回収率 $71 \pm 4\%$, Hawker²⁸⁾らは 8.44 ± 0.18 日, 最大回収率 $69.3 \pm 2.97\%$ であったと報告しており⁵¹Cr法に比し血小板寿命はやや短い。

iv) 測定上の問題点

¹¹¹In-oxineを血小板に標識するに当たり, 血小板を自己血漿³¹⁾, Tyrode-アルブミン溶液⁸⁾²⁸⁾, 生理食塩水³¹⁾, ACD生理食塩水²⁹⁾³²⁾に浮遊させた報告がある。血漿中のトランスフェリンは¹¹¹Inとの親和性が強く標識率を低下させると考えられており, 一方, 血漿に浮遊させた場合に比し, 生理食塩水浮遊血小板は回収率が著しく低下する³¹⁾とも報告されている。油井²⁹⁾らはACD生理食塩水によるBASP法が, 臨床応用に最も適していると述べている。

Inの血小板への取りこみについては, oxineが脂溶性であることから細胞膜の通過が容易であると³²⁾されているが, はっきりした機構についてはわかっていない。

Inの生体内での遊出は少ないことが知られている。ただ, 血小板抗体の影響による¹¹¹Inの遊出については, まだ報告されていない。⁸⁾

Oxineの濃度については, in vitroで¹¹¹In-oxineが $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上になると血小板機能に影響がみられ, 血小板浮遊液1 mlに対し, oxineの最終濃度が $5 \mu\text{g}$ になるように加えることが³³⁾適当であるとの報告がある。

RI を用いない血小板寿命測定

I Malondialdehyde (MDA) 法の原理

血小板の活性化反応(顆粒内容物の放出および凝集反応)において、プロスタグランジン(PG)の代謝が重要な役割を果たしている。

血小板細胞膜のリン脂質から遊離したアラキドン酸(AA)は種々の物質を生成する。³⁴⁾この代謝系路はアラキドン酸カスケードと呼ばれており、一つは、リポキシゲナーゼ(PLO)による系路だが、その生物活性はまだよくわかっていない。他の一つは、シクロオキシゲナーゼ(PCO)による系路であり、AAからPGG₂、さらにPGH₂を経てトロンボキサンA₂(TXA₂)へと強力な血小板凝集を引き起こす物質に変換される。このTXA₂はPGH₂からTX合成酵素によって生成されるが不安定であり、速かに安定なTXB₂に変化する。このTXA₂合成酵素はTXA₂とHHT(12-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid)を同時に別々に生成し、HHTと同時にマロンジアルデヒド(MDA)が生成される。このMDAが、チオバルビツール酸(TBA)によって呈色反応を示すところから、

容易に定量することができる。ところが、AAからPGG₂に変換される際に働くPCOの酵素活性が、アスピリンによって不可逆的な阻害を受けるとMDAは生成されない。

血小板が老化する正常な場合と、無選択崩壊の場合で考えてみると刈米らは次のように説明している。³⁶⁾

アスピリンを投与し血中にある血小板のPCOをブロックすると、AAを加えてもMDAは産生されない。正常な場合、アスピリンの血中濃度が低下してから、新たに血中に入ってきた血小板はアスピリンの影響を受けていないのでPCO活性は正常であり、AAを加えるとMDAの産生がみられる。PCOがブロックされた血小板が死滅するともなると、PCO活性をもつ血小板と入れ替わるので、アスピリン投与後、日が経つにしたがって単位血小板数当たりの

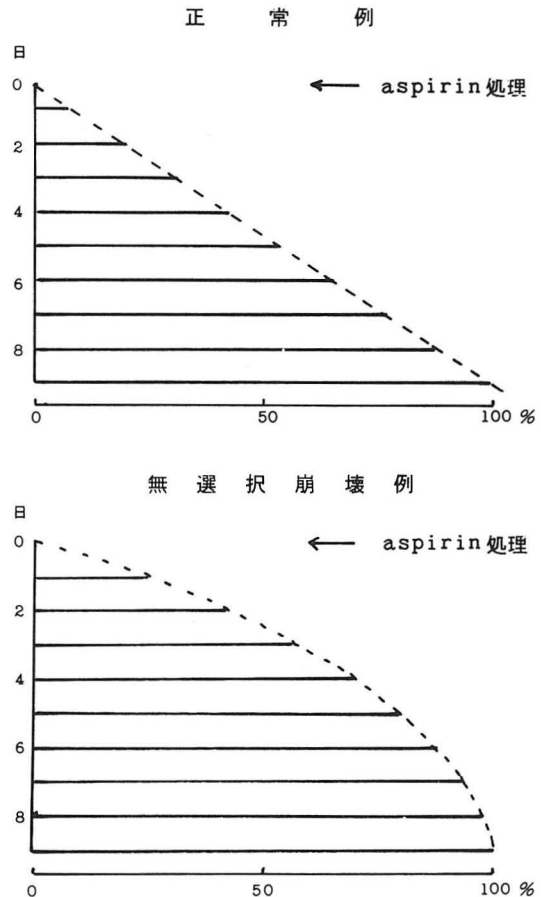


図5 血小板崩壊と血小板MDA産生能

MDA 産生能は増加してくる。アスピリン投与時、血液中にあった血小板の寿命がつきと、すべての血小板が正常のPCO活性をもっているので、AA添加後のMDA産生能はアスピリン投与前と同じ水準に達する。その間8～10日かかる。その増加は直線的な関係にあり、この直線がアスピリン投与前値にまで復する期間が血小板寿命となる。すなわち、アスピリン処理血小板の寿命曲線が直線であることを意味し、 ^{51}Cr 法による寿命曲線と同じ意義がある(図5)。

血小板が無選択に崩壊する場合は、アスピリン処理血小板も、MDA産生能をもつ新生血小板も同じ比率で破壊され消失していく。アスピリン負荷後、血小板のMDA産生能の増加は、はじめ著しく次第に少なくなり、ついにはプラトーに達する。このことはMDA産生能増加曲線、すなわち、アスピリン処理血小板の消失曲線が指数曲線であることを逆から示していることになる(図5)。ただ、血小板寿命短縮例におけるMDA産生能回復曲線は ^{51}Cr 法の寿命曲線と異なり、典型的な指数曲線を示さない場合も認められている。

II MDA法の実際

1. 試薬および器具

- i) 3.8%クエン酸ナトリウム液
- ii) 77 mM EDTA- Na_2 (pH 7.4)
- iii) 0.15 M トリス-HCl (pH 7.4)
- iv) 2 mM アラキドン酸 (Sigma 社) : 0.1 M- Na_2CO_3 に溶解
- v) TBA 試薬⁶⁾ (J. T. Baker 社) : 濃NaOH 10 ml に 2-thiobarbituric acid 800mg を溶かし 50ml の精製水を加える。濃過塩素酸液を加えて pH を 7.4 に合わせ、精製水を加え全量を 100ml とする。この溶液に 7%過塩素酸液 50ml を加える。

vi) Biosolb (BBS-3, Beckman)

vii) 1N-NaOH

2. 手技

i) アスピリンの負荷³⁷⁾

被検者よりアスピリン投与前に静脈血を 9ml 採血し、あらかじめ 3.8%クエン酸ナトリウム 1ml を加えてある試験管に入れ、よく混和する(負荷前値測定用)。ただちに、アスピリン 500 mg を経口投与する。投与 2 時間後から、原則として毎日 10 日間 3.8%クエン酸ナトリウム 加試験管に 9ml 採血する。素早く血小板を分離し MDA 産生能を測定する。

ii) 血小板MDAの測定法³⁸⁾

被検血液は、よく混和し 230 G, 10 分 遠心する。PRP を別の試験管に分離し、77 mM EDTA-2Na 液を PRP の 1/10 容加えて混和する (pH 7.4)。血小板数を算定し試験管当たり 1×10^8 に血小板を調整した後、1500 G, 20 分、20°C で遠心する。その上清を捨て血小板沈渣を 0.15 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 0.475 ml に再浮遊させる。この血小板再浮遊液に 2 mM アラキドン酸 0.025 ml (最終濃度 0.1 mM) を加えて 37°C, 5 分静置する。次に TBA 試薬 0.5 ml を加えてよく混和し、100°C, 15 分加熱した後、室温に放置冷却する。冷えてから Biosolb (BBS-3)

0.1 ml および 1N-NaOH 0.9 ml を加え正確に 1 分経って 548 nm で比色する。各試料中の MDA 量は次式により計算する。

$$\text{MDA 量 (nmol)} = \text{OD}_{548} \times 14$$

iii) MDA 産生能回復曲線について

グラフの縦軸に MDA %，横軸に負荷後の日数をとると，正常例における血小板 MDA 産生能の回復曲線は，ほぼ直線を示し，アスピリン負荷前の 100% 水準に達するのに 8~9 日を要し，血小板寿命を表現している。ITP などのような無選択崩壊のある場合には，先に述べたようにアスピリン投与後の MDA 産生能回復は指数曲線の裏返しという形になる (図 6)。

iv) 正常値

健康成人例の血小板寿命は 9.83 ± 0.76 日と報告されている。³⁶⁾

v) 測定上の問題点

血小板 MDA 測定法について，発色のため TBA 試薬を加えるが，その際，混濁して比色時に誤差を与えるので，Sturt⁶⁾らは遠心して 532 nm で比色するが，内野³⁸⁾らは界面活性剤を加え 548 nm で比色することを推奨している。

MDA 産生能回復曲線をみると，多くの例では 1~2 日の間は回復が悪いものがみられる。血小板の新生は絶えず起こっているのに，MDA 産生能は，アスピリン投与直後とあまり変わらず (lag phase) 24 時間以後になり徐々に上昇してくる。その原因として，アスピリンが流血中の血小板のみでなく，骨髓中の巨核球にも作用して PCO の活性を阻害するため，投与後産生された血小板も，PCO 活性を失っているためであると考えられている。³⁹⁾これに対しアスピリ

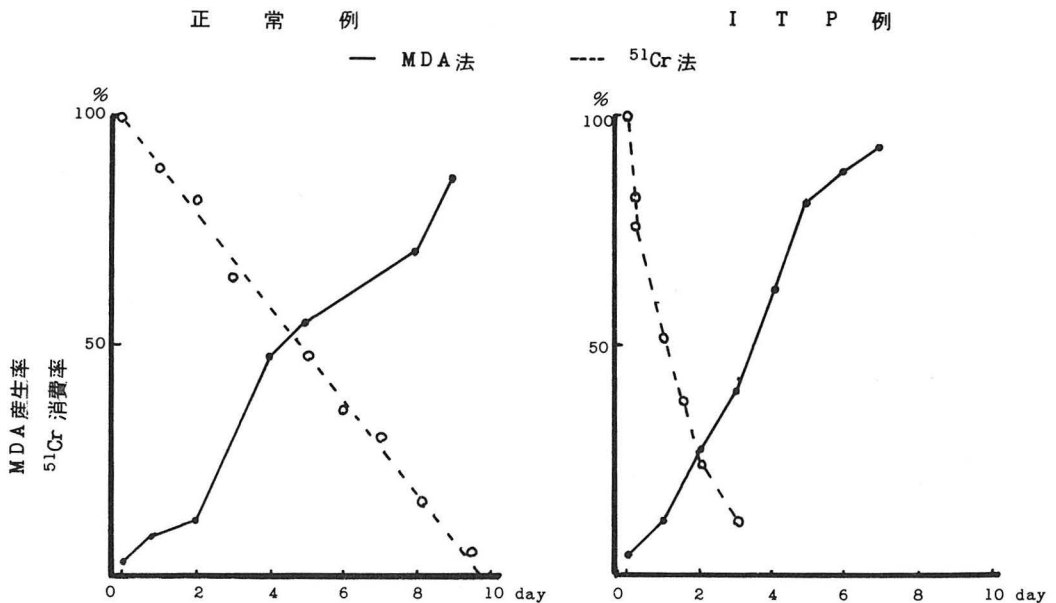


図 6 MDA 法，⁵¹Cr 法による血小板寿命 (刈米ら：文献 36)

ンの経口投与量について内野らは⁴⁰⁾50~100mg程度の少量経口投与法を推奨し、刈米らは⁴¹⁾アスピリンの少量静脈内投与(63mg)により、MDA 回復曲線は完全な直線を示し精度がよくなることを報告している。

MDA法と⁵¹Cr法とを比較すると、血小板の崩壊が老化による正常な場合には、血小板寿命は両者でよく一致するが、³⁶⁾⁴²⁾ITPのような無選択崩壊のある場合は、MDA法と⁵¹Cr法の成績が一致したという報告と、必ずしも一致しないという報告がある。刈米らによれば、MDA法による結果を片対数グラフに目盛って、そのMDA産生能増加と⁵¹Cr標識血小板の消失直線を比較するとその傾きに差異が認められ、他のITP例でも、MDA法T1/2 1.53±0.47日、同じ症例の⁵¹Cr法でT1/2 1.05±0.77日のように⁵¹Cr法が短くその差は有意であると報告しており、その原因として阿部らは、²⁵⁾家兎を使って⁵¹Crの血小板からの溶出が、同種血小板抗体を有する例では、正常例に比して大きいことをみており、このことからMDA法に問題があるためではなく、むしろ⁵¹Cr法の場合、血小板から⁵¹Crが著明に溶出するため寿命が非常に短く表現される場合が多いと考えられている。

お わ り に

血小板の生成と崩壊、いわゆる血小板回転に関してその動態を比較的よく反映できる血小板寿命測定法の現状について述べた。

Na₂⁵¹CrO₄法が、標準法として広く行われているが、RIとして⁵¹Crよりすぐれた特性をもつ¹¹¹In-oxineが血小板標識にとりいれられてきている。RI法としては安定した成績が得られるとはいえ、やはりラジオアイソトープということで手技の煩雑さ、専用施設を要し、環境汚染防止などの問題もあって、なかなか普及し難い面がある。その点、RIを用いないMDA法はどこでも簡単に行えるという有利さがあるが、なお精度その他の点でまた難点が多く、今後の研究成果によってはさらに普及すると思われるが、いずれにしても現状では、血小板寿命測定法としてそれぞれ一長一短があるといえよう。

謝 辞

本稿を終えるに当たり、種々御教示いただいた川崎医科大学核医学診断部 伊藤安彦教授、御校閲いただいた川崎医科大学中央検査部 上田 智教授に深謝致します。

文 献

- 1) 野村武夫, 他: 巨核球と血小板生成, 医学のあゆみ, 114: 510~516, 1980.
- 2) 柴田 進: 図解—出血と凝固(動的血液学), 1, p48, 金芳堂, 京都, 1977.
- 3) Harker, L. A., et al: Thrombokinetis in man. J. Clin. Invest., 48: 963-974, 1969.
- 4) Garg, S. K., et al: Use of megathrombocyte as an index of megakaryocyte number. New Engl. J. Med., 284: 11, 1971.
- 5) Najean, Y., et al: The use of ⁷⁵Semethionine for the *in vivo* study of platelet kinetics. Scand. J. Haemat., 6: 395, 1969.

- 6) Stuart, M. J., et al : A simple nonradioisotope technic for the determination of platelet life-span. *New Engl. J. Med.*, 292 : 1310-1313, 1975.
- 7) Aas, K. A., et al : Survival of blood platelet labeled with chromium. *J. Clin. Invest.*, 37 : 1257-1268, 1968.
- 8) Thakur, M. L., et al : Indium-111 labeled platelet : Studies on preparation and evaluation of in vivo and in vitro function. *Thromb. Res.* 9 : 345-357, 1976.
- 9) 塚田理康 : 血小板寿命, 検査と技術, 9 : 13~17, 1981.
- 10) 塚田理康 : 血小板の産生, 崩壊に関する検査法, 臨床検査, 24 : 1410~1417, 1980.
- 11) 塚田理康, 他 : 血小板寿命の測定, 臨床検査, 25 : 874~880, 1981.
- 12) International committee for standardization in hematology : Recommended method for radioisotope platelet survival studies. *Blood*, 50 : 1137-1144, 1977.
- 13) 塚田理康 : 血小板寿命, 臨床病理, 特集 (27) : 42~52, 1976.
- 14) Nadler, S. B., et al : Prediction of blood volume in normal human adult. *Surgery*, 51 : 224-232, 1962.
- 15) Paulus, J. M., et al : Platelet kinetics, 60~75, Amsterdam, 1971.
- 16) 塚田理康, 他 : 血小板寿命検査, 臨床検査, 22 : 944~950, 1978.
- 17) Corash, L., et al : Heterogeneity of human whole blood platelet sub-population, I, Relationship between buoyant density, cell volume and ultrastructure. *Blood*, 49 : 71~87, 1977.
- 18) Penington, D. G., et al : Platelet density and size : the interpretation of heterogeneity. *Brit. J. Haematol*, 34 : 365-376, 1976.
- 19) Tukada, T., et al : Chromium⁵¹ uptake as a function of platelet age. *Scand. J. Haematol*, 8 : 270-275, 1971.
- 20) Tukada, T., et al : Mechanism and kinetics of chromate transport in human platelet. *Am. J. Physiol*, 221 : 1697-1705, 1971.
- 21) Kattlove, H. E., et al : The effect of chromium on platelet function in vitro. *Blood*, 35 : 659-668, 1970.
- 22) Tessier, C., et al : Measurement of platelet kinetics using ⁵¹Cr. In : Platelet : Production, function, transfusion and storage. 327, Eds. by Baldini, M. G., Grunc and Stratton, New York, 1974.
- 23) 塚田理康 : 血小板寿命測定の問題点, 医学のあゆみ, 114 : 523~528, 1980.
- 24) Steiner, M., et al : Subcellular distribution of ⁵¹Cr and characterization of its binding sites in human platelets. *Blood*, 35 : 727-739, 1970.
- 25) 阿部 師, 他 : 血小板に標識された各種アイソトープの抗血小板抗体存在下での安定性の比較, 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班, 53年度第2回総会報告, 1979.
- 26) Branehög, I : Platelet kinetics in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) before and at different times after splenectomy. *Brit. J. Haematol*. 38 : 413-426, 1975.
- 28) Hawker, R. J., et al : Indium (¹¹¹In)-labeled human platelet : optimal method. *Clin. Science*, 58 : 243-248, 1980.
- 29) 油井徳雄, 他 : ¹¹¹In-oxine による血小板標識の基礎的検討, 核医学, 18 : 463~472, 1981.
- 30) Heaton, W. A., et al : Indium-111 : a new radionuclide label for studying human platelet kinetics. *Brit. J. Haematol*, 42 : 613-622, 1979.
- 31) Goodwin, D. A., et al : Indium-111 labeled autologous platelet for location of vascular thrombi in humans. *J. Nucl. Med.*, 19 : 626-634, 1978.

- 32) Thakur, M. L., et al : Indium-111-labeled leukocyte for the localization of abscesses : preparation, analysis, tissue distribution and comparison with gallium-67-citrate in dogs. J. Lab. Clin. Med, 89 : 217~228, 1977.
- 33) Thakur, M. L., et al : Indium-111-labeled human platelet : improved method, efficacy, and evaluation. J. Nucl. Med. 22 : 381~385, 1981.
- 34) 山本尚三 他 : プロスタグランディンと関連物質, 代謝, 18 : 307~317, 1981.
- 35) 久米章司 他 : 血小板機能とプロスタグランディン, 代謝, 18 : 329~341, 1981.
- 36) 刈米重夫 他 : 血小板寿命測定法の問題点 — MDA 測定による方法, 医学のあゆみ, 114 : 529~537, 1980.
- 37) Okuma, M., et al : Studies on lipid peroxides in plateletes I. Method of assay and effect of storage. J. Lab. Clin. Med, 75 : 283~296, 1970.
- 38) 内野治人 他 : アスピリン負荷後血小板のMDA量による血小板回転測定法に関する基礎的検討, 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班, 昭和53年度研究業績報告書, 401~405, 1979.
- 39) Burch, J. W., et al : Inhibition of platelet prostaglandinsynthetase by oral aspirin. J. Clin. Invest, 61 : 314~319, 1978.
- 40) 内野治人 他 : アスピリン負荷後血小板のMDA定量による血小板回転測定法に関する基礎的検討—特にアスピリン少量投与方法について, 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班, 昭和54年研究報告書, 345~349, 1980.
- 41) 刈米重夫 他 : アスピリン少量負荷後血小板MDA産生能の消長による血小板寿命測定法の検討, 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班, 昭和55年研究報告書, 252~257, 1981.
- 42) 鯉江捷夫 他 : Aspirin 負荷後の血小板 malondialdehyde 生成能による慢性ITP患者血小板回転の検討, 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班, 昭和51年研究報告書, 17~28, 1977.
- 43) 鯉江捷夫 他 : 血小板血症におけるアスピリン負荷法および⁵¹Cr標識法による血小板寿命, 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班, 昭和53年研究報告書, 412~415, 1979.