

骨髓増殖症候群の血小板機能に関する研究

第 1 編

骨髓増殖症候群の血小板凝集能に関する研究

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	
第 3 項 Platelet factor-3 availability test	
第 4 項 出血時間	
第 3 章 実験成績	
第 1 節 血小板凝集能に関する検討	
第 1 項 ADP 凝集による検討	
I) 凝集 Pattern に関して	
II) 最大凝集率に関して	
第 2 項 1-Epinephrine 凝集による検討	
I) 凝集 Pattern に関して	
II) 最大凝集率に関して	
第 3 項 Collagen 凝集による検討	
I) 凝集 Pattern に関して	
II) 最大凝集率に関して	
III) Lag phase に関して	
第 4 項 Bovine fibrinogen 凝集による検討	
I) 凝集 Pattern に関して	
II) 最大凝集率に関して	
第 5 項 Zymosan 凝集による検討	
I) 凝集 Pattern に関して	
II) 最大凝集率に関して	
III) Lag phase に関して	
第 2 節 Platelet factor-3 availability test に関する検討	

第 3 節 出血時間に関する検討

第 4 節 症例別による各血小板機能に関する検討

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(Chronic myelocytic leukemia 以下 CML と略す), 真性多血症(Polycythemia vera 以下 PV と略す)をはじめとする骨髓増殖症候群(Myeloproliferative disorders 以下 MPD と略す)において我々は出血傾向あるいは血栓傾向を示す症例にしばしば遭遇する。その発現機序を血漿凝固線溶系の異常に原因を求めるものもあるが^{1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10) 11) 12) 13)}しかし, 現状は未だ十分に解明されたとはいえない。そこで著者は, MPD の出血傾向及び血栓傾向の原因を究明する目的で特に血小板系に着目し, CML 26例, PV 5例について血小板凝集能を中心に, Platelet factor-3 availability test (以下 Pf-3 a と略す)及び出血時間を測定し, これら血小板機能と末梢血小板数並びに臨床症状との関連につき検討を加えた。この CML 26例に関する検討は現在までに報告されているものの中では最多症例数による解析である。又血小板凝集能を論じるにあたり常に問題となる¹⁴⁾のが血小板凝集惹起物質として何が使用されたかである。従来の報告では, ADP, Epinephrine, Collagen が用いられてきたが, 著者は以上の凝集惹起物質に加え, それに含まれる第Ⅳ因子様物質を介して血小板を凝集させると考えられている Bovine fibrinogen¹⁵⁾とさらに, 1974年に Pfueller ら^{16) 17)}及び Zuker ら¹⁸⁾により報告され,

補体系の Alternate pathway 及び Fibrinogen を介して血小板凝集を惹起すると考えられている Zymosan を加えて、以上5種類の凝集惹起物質につき血小板凝集能を検討した。

第2章 実験対象及び実験方法

第1節 実験対象

対象は、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 5例、計31例の MPD である。性別は男17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。現在までの報告で PV では血小板数の増多例で血小板機能障害と出血傾向が報告されている。¹²⁾そこで著者は CML を血小板数の多寡により3つの Group に分けて検討した。即ち Group I は血小板数が1立方ミリ当り45万未満の正常血小板数 Group とし、Group II は45万以上100万未満の中等度増加 Group、Group III は100万以上の高度増加 Group としたところ、Group I は7例、Group II は11例、Group III は8例となった。対照症例は正常健康人20例をとり、その年齢は20歳

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

から48歳であった。対象例及び正常例は共に検査施行2週間前よりAspirin等の血小板機能を抑制すると考えられている薬剤の投与はうけていない。又検査時CMLにおいて症例7, 9, 26以外は, Myleran, Dibromomannitol 又は, Carboquone にて治療がなされていた。PVは症例5のみPhlebotomyにて治療中であった。(Tab. 1.)

第2節 実験方法

第1項 採血方法

採血は空腹時に, Plastic syringe を用いシリコン処理21G針にて肘静脈より行なった。採血後直ちに3.8% Sodium citrate を1容含むシリコン処理試験管に採血血液を9容入れ, 混和した。すみやかに1,000回転10分間遠沈し, 上清のPlatelet rich plasma (以下PRPと略す)を別のシリコン処理試験管にとり, 再び1,000回転5分間遠沈し, PRP中への赤血球及び白血球の混入を避けた。PRPを採取後, 更に3,500回転15分間遠沈して, その上清即ちPlatelet poor plasma (以下PPPと略す)を得た。PRP中の血小板数はBrecher-Cronkite法¹⁹⁾によって算定した。血小板凝集能測定時には血小板数を各PPPにて1立方ミリ当り30万に調整した。

第2項 血小板凝集能

血小板凝集能はBornら²⁰⁾の比濁法により, Platelet aggregation meter model 169 (Evans社製)を使用し測定した。30万に調整した0.9mlのPRPを凝集計付属のキュベットに入れ, 37℃にて2分間加温後0.1mlの各種凝集惹起物質を添加し, 測定した。凝集計の攪拌速度は1,000rpmとし, 記録紙の速度は2cm/minとした。Zymosan凝集測定時のみ0.4cm/minとした。

凝集惹起物質は下記の如く調整した。Adenosine 5'-diphosphate sodium (ADP) (Sigma社製)は生食にて 10^{-3} Mにし-20℃に凍結保存したものを使用时生食にて 2×10^{-6} Mに希釈した。l-Epinephrine (石津薬品社製)は生食にて 10^{-3} Mに調整し, 添加時十分に攪拌の上使用した。Collagen (Bovine tendon collagen) (Sigma社製)の調整は100mgを5ml生食に浮遊させ, 氷水中でガラスホモゲナイザーにて砕磨し, 1,500rpm 20分間, 遠沈後, その上層の白濁液を用いた。Bovine fibrinogen type II (第一化学薬品製)は20mgを生食1mlに溶解して使用した。Zymosan (Sigma社製)は10mgを再蒸留水に浮遊させ1時間煮沸の後, 3回生食にて洗滌後, 生食2mlに浮遊させたものを使用した。

第3項 Platelet factor-3 availability test

Hardisty and Hutton²¹⁾のKaolin-Ca凝固時間を測定する方法を用い, その成績は秒単位で表わした。

第4項 出血時間

Ivy法²²⁾に準じ, ランセット針(フェザー社製)を使用し測定した。

第3章 実験成績

第1節 血小板凝集能に関する検討

第1項 ADP凝集による検討

I) 凝集Patternに関して: ADPによる血小板凝集Patternは次の2つに大別される。即ち1次凝集のみを示すPattern Iと2次凝集を伴うPattern IIである。Pattern Iは図1の如く解離を示すPattern I aと解離を認めないPattern I bに分類された。Pattern

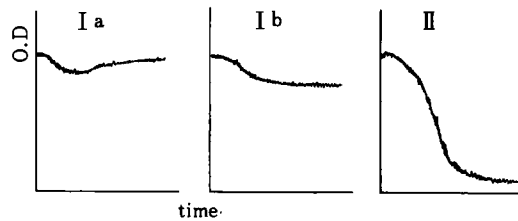


Fig. 1 Patterns of ADP-induced aggregation
(final conc. 2×10^{-6} M)

(Fig. 1.) CML Group I においては, Pattern I a は2例, Pattern I b は4例, Pattern II は1例である。CML Group II では, Pattern I a は4例, Pattern I b は3例, Pattern II は4例である。CML Group III では, Pattern I a は1例, Pattern I b は1例, Pattern II は6例である。血小板数の多いGroupほど, Pattern II 即ち凝集能の亢進Patternを示す症例の頻度が高い。CML全体ではPattern I a は7例, Pattern I b は8例, Pattern II は11例であった。PVは4例全例Pattern I aであった。正常対照では, Pattern I a は9例, Pattern I b は6例, Pattern II は5例であり, CMLは正常対照よりPattern II 即ち凝集亢進Patternを示す頻度が高く, 又特に血小板数増加群にその傾向が強いという結果を得た。(Fig. 2.)

II) 最大凝集率に関して: 最大凝集率は, PPPとPRPのOptical Densityの差を100%としたとき, 最大凝集に達した時点のO.D.とPRPのO.D.の差を百分率で表わしたものであり次式で表わされる。

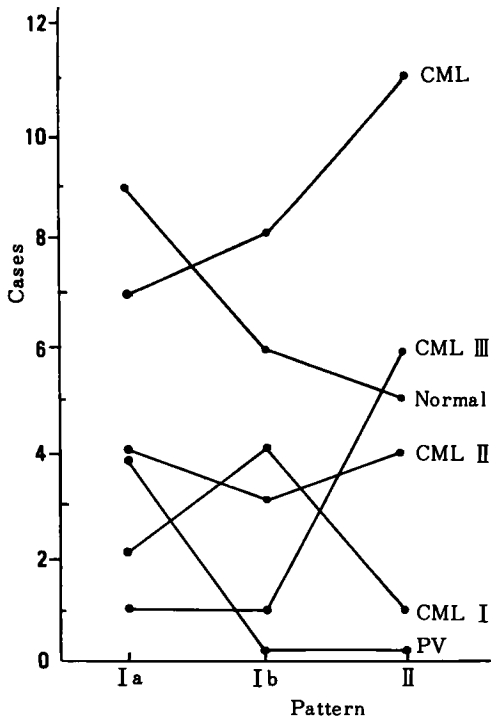


Fig. 2 Analysis by patterns of ADP-induced aggregation. (final conc. $2 \times 10^{-6}M$)

Maximum aggregation =

$$\frac{O. D. (max. agg.) - O. D. (PRP)}{O. D. (PPP) - O. D. (PRP)} \times 100$$

CML Group I においては、 $37.9 \pm 22.1\%$ であり、CML Group II においては、 $46.0 \pm 25.7\%$ であり、CML Group II では $60.1 \pm 26.1\%$ となり、血小板数の多い Group ほど最大凝集率は高値を示した。CML 全体では $48.2 \pm 25.5\%$ であった。PV は $10.8 \pm 11.3\%$ であった。正常対照は $36.0 \pm 16.4\%$ であった。CML 全体としては正常対照との間に有意の差は認めないが、CML Group III は有意 ($p < 0.01$) の亢進を、又 PV は有意 ($p < 0.02$) の低下を示すという結果を得た。なお図中の黒丸は止血異常の既往のある症例である。(Fig. 3.)

第2項 1-Epinephrine 凝集による検討

I) 凝集 Pattern に関して：1-Epinephrine による血小板凝集 Pattern は1次凝集のみを示す Pattern I と2次凝集を伴う Pattern II とに大別される。(Fig. 4.) CML Group I においては Pattern I は4例、Pattern II は3例である。CML Group II

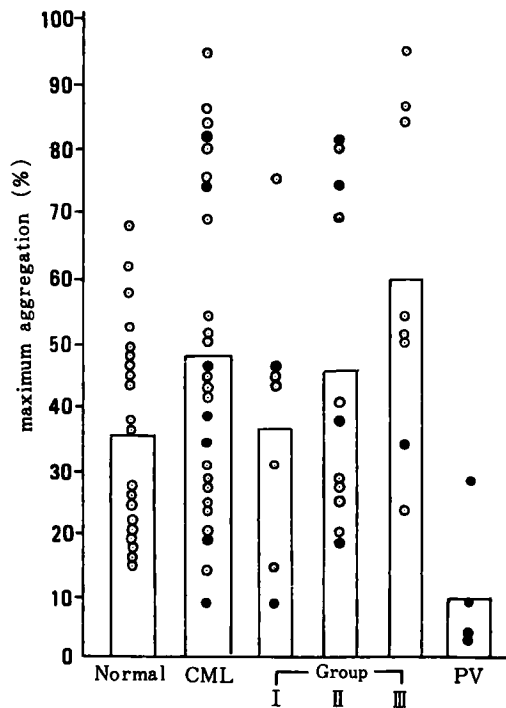


Fig. 3 Maximum aggregation of ADP-induced aggregation (final conc. $2 \times 10^{-6}M$)

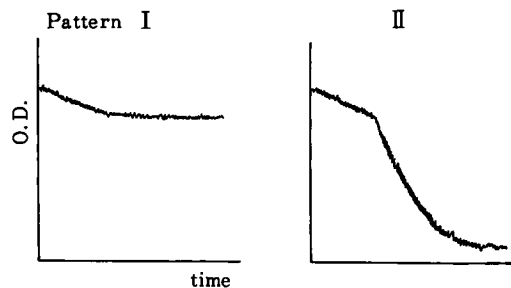


Fig. 4 Patterns of Epinephrine-induced aggregation (final conc. $10^{-6}M$)

では Pattern I は6例、Pattern II は5例である。CML Group III では Pattern I は3例、Pattern II は5例であった。CML Group III においては Group I, II と比較して Pattern II が優位であった。CML 全体では Pattern I は13例、Pattern II は13例であった。PV は5例全例 Pattern I を示した。正常対照では、Pattern I はわずかに1例であり、残り19例が Pattern II に属した。正常凝集 Pattern は Pattern II、即ち2次凝集型である。CML において50%に、PV は全例 Pattern I、即ち2次凝集欠損

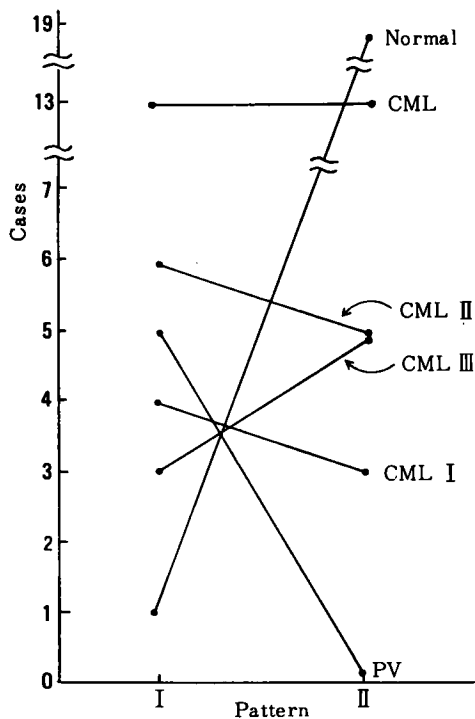


Fig. 5 Analysis by patterns of Epinephrine-induced aggregation (final conc. $10^{-4}M$)

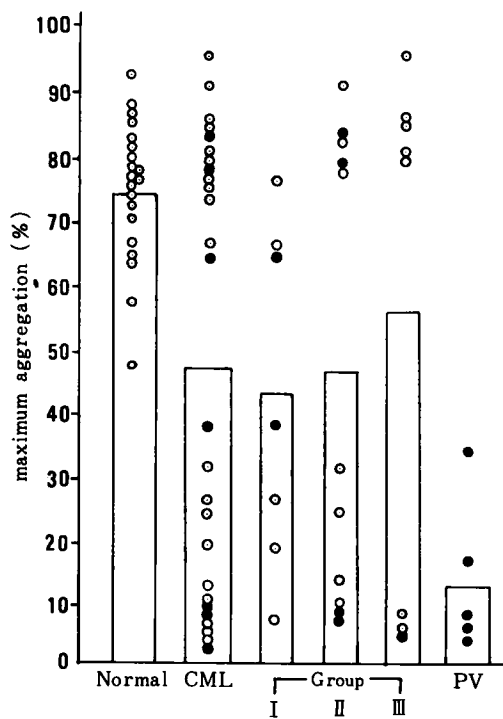


Fig. 6 Maximum aggregation of Epinephrine-induced aggregation (final conc. $10^{-4}M$)

Patternをとった。(Fig. 5.)

II) 最大凝集率に関して：最大凝集率は CML Group I においては $42.4 \pm 27.1\%$ であり, CML Group II では $45.5 \pm 36.1\%$ であり, CML Group III では $54.0 \pm 40.4\%$ となり, 血小板数の多い群ほど最大凝集率は正常に近い値を示した。CML 全体では $47.3 \pm 34.3\%$ であった。PV は $12.2 \pm 12.2\%$ であった。正常対照は $73.8 \pm 10.4\%$ であった。CML 全体としては正常対照との間に有意 ($p < 0.002$) の低下が認められた。PV は正常と比較して極めて有意 ($p < 0.001$) の低下を認めた。(Fig. 6.)

第3項 Collagen凝集による検討

I) 凝集 Pattern に関して：Collagen による血小板凝集 Pattern は, CML, PV, 正常対照共に同一であり, Collagen 添加後, 非凝集時間即ち Lag phase を認め, その後強い凝集を示した。(Fig. 7)

II) 最大凝集率に関して：最大凝集率は CML Group I においては $77.0 \pm 10.0\%$ であり, CML Group II においては $80.1 \pm 6.0\%$ であり, CML Group III では $81.0 \pm 6.9\%$ となり, 各 Group 間に特に差異は

認められなかった。CML 全体では $79.7 \pm 7.6\%$ であった。PV は $77.0 \pm 9.1\%$ であった。正常対照は $84.3 \pm 6.8\%$ 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。

(Fig. 8.)

III) Lag phase に関して：Lag phase は CML Group I においては 1.19 ± 0.38 分であり, CML Group II では 0.97 ± 0.25 分であり, CML Group III では 0.99 ± 0.17 分であった。CML Group I において Lag phase はやや延長する傾向にあった。CML 全体では 1.03 ± 0.28 分であった。PV は 1.12 ± 0.44 分であった。正常対照においては 0.83 ± 0.14 分であった。CML 全体, 並びに PV の Lag phase は正常対照と比較して有意 ($p < 0.01$) の延長を認めた。(Fig. 9.)

第4項 Bovine fibrinogen凝集による検討

I) 凝集 pattern に関して：Bovine fibrinogen による血小板凝集 pattern は, CML, PV, 正常対照共に同一であり, Bovine fibrinogen 添加後直ちに凝集を開始し, 図の如く, 急速な凝集を示す。(Fig.

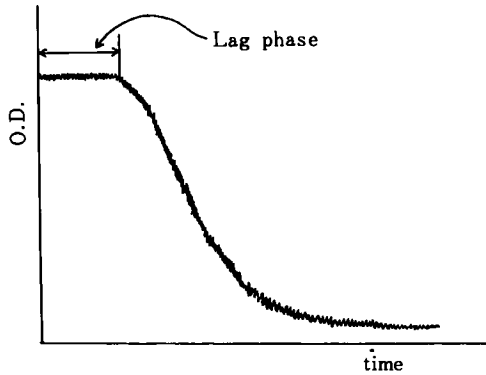


Fig. 7 Patterns of Collagen-induced aggregation.

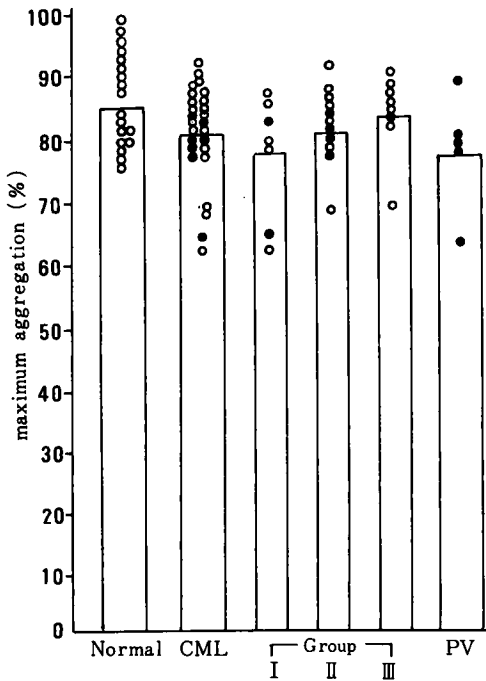


Fig. 8 Maximum aggregation of Collagen-induced aggregation.

10.)

II) 最大凝集率に関して：最大凝集率は，CML Group I においては $88.1 \pm 6.1\%$ であり，CML Group II では $85.4 \pm 7.6\%$ であり，CML Group III では $89.5 \pm 3.8\%$ となり，各 Group 間に特に差異は認められなかった。CML 全体では $87.5 \pm 6.2\%$ であった。PV は2例についてののみしか検討していないが95%と93%であった。正常対照においては $88.3 \pm 6.2\%$ 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。(Fig. 11.)

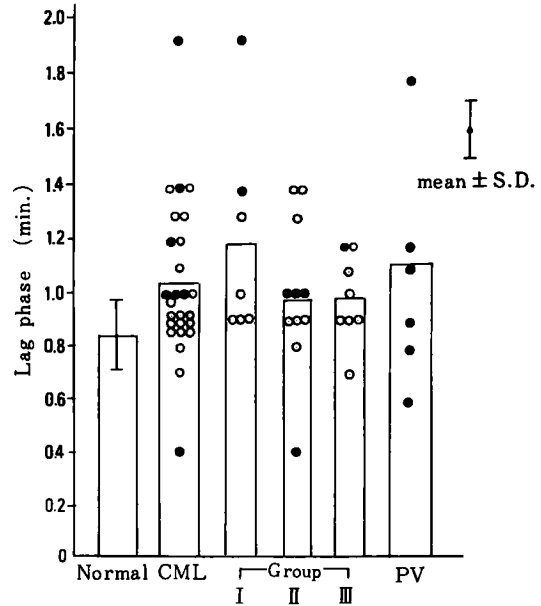


Fig. 9 Lag phase in Collagen-induced aggregation.

第5項 Zymosan 凝集による検討

I) 凝集 Pattern に関して：Zymosan による血小板凝集 Pattern は次の3つに大別された。即ちほとんど凝集を認めない Pattern I と，十数分の Lag phase の後に弱い凝集を示す pattern II と，同様に十数分の Lag phase の後に強い凝集を示す Pattern III の3型に大別された。(Fig. 12.) CML Group I においては Pattern I は2例，Pattern II は認めず，Pattern III は4例であった。CML Group II では Pattern I は1例，Pattern II は3例，Pattern III は4例であった。CML Group III では Pattern I は3例，Pattern II は1例，Pattern III は4例であった。Pattern に関する検討では各 Group 間に著明な差異は認められなかった。CML 全体では Pattern I は6例，Pattern II は4例，Pattern III は12例であった。PV は Pattern I は3例，Pattern II は認めず，Pattern III は1例であった。正常対照では Pattern I は3例，Pattern II は2例，Pattern III は5例であり，CML は各 pattern に正常対照とはほぼ同じ頻度に分布しているが，PV は Pattern I が優位であり，即ち凝集低下傾向を示した。(Fig. 13.)

II) 最大凝集率に関して：最大凝集率は CML Group I においては $51.7 \pm 38.0\%$ であり，CML Group II では $52.3 \pm 33.7\%$ であり，CML Group III では

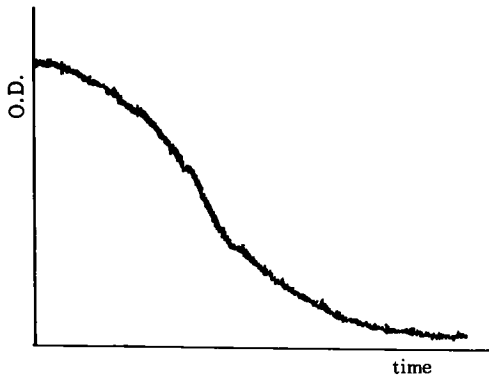


Fig. 10 Patterns of B.F.-induced aggregation.
(final conc. 2 mg/ml)

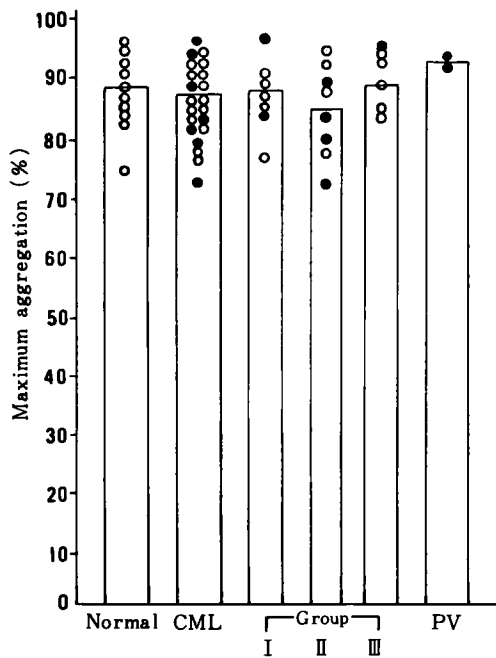


Fig. 11 Maximum aggregation of B.F.-induced aggregation.
(final conc. 2 mg/ml)

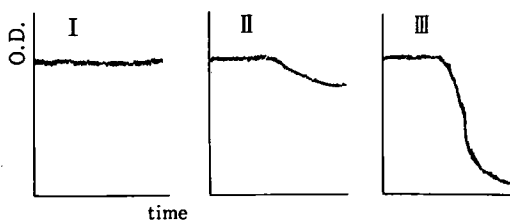


Fig. 12 Patterns of Zymosan-induced aggregation.
(final conc. 0.5 mg/ml)

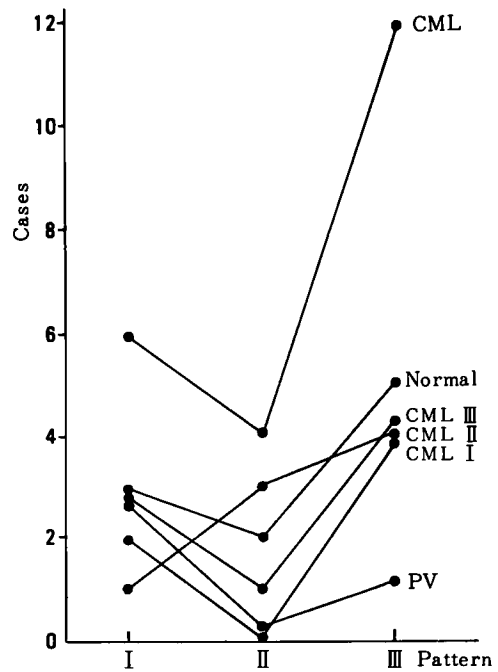


Fig. 13 Analysis by patterns of Zymosan-induced aggregation.
(final conc. 0.5 mg/ml)

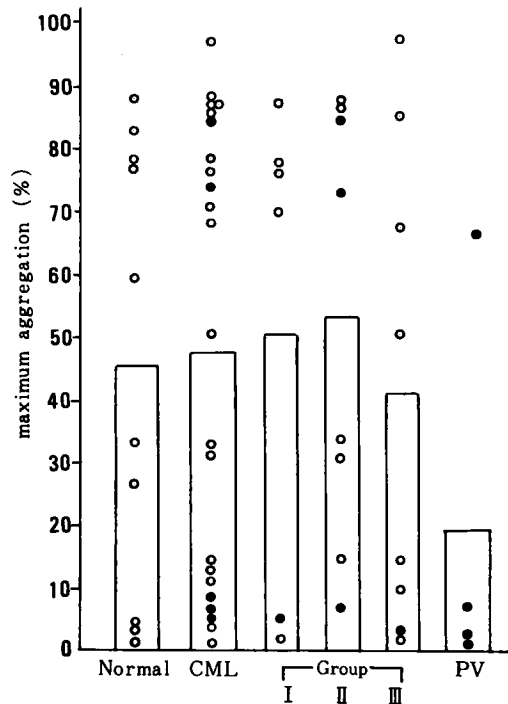


Fig. 14 Maximum aggregation of Zymosan-induced aggregation.
(final conc. 0.5 mg/ml)

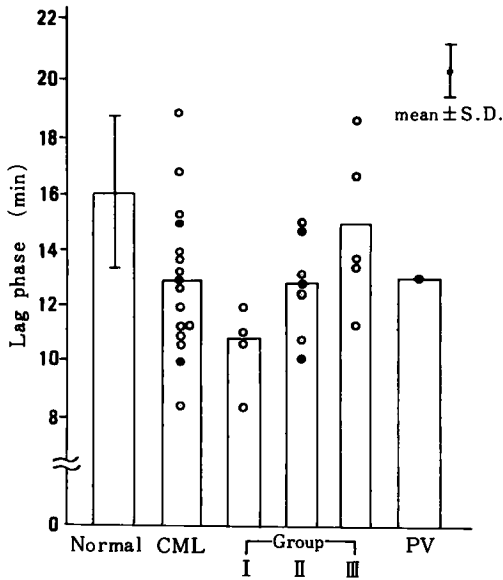


Fig. 15 Lag phase of Zymosan-induced aggregation.
(final conc. 0.5mg/ml)

40.9±39.2%となり、各 Group の中で最大凝集率にばらつきがあり、有意差は認められなかった。CML 全体では48.0±35.6%であった。PV は19.0±30.0%であった。正常対照は45.7±36.1%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。(Fig. 14.)

III) Lag phase に関して: Pattern II と Pattern III における Lag phase を検討した。CML Group I においては10.6±1.5分であり、CML Group II では12.8±2.0分であり、CML Group III では15.1±2.9分であった。血小板数の多い Group に Lag phase の延長傾向が認められた。CML 全体では13.0±2.7分であった。PV は1例だけの測定であるが、13.5分であった。正常対照は16.1±2.8分であり、CML 全体の Lag phase は正常と比較して有意の短縮が認められた。(Fig. 15.)

第2節 Platelet factor-3 availability test に関する検討

Pf-3 a は Hardisty-Hutton 法²¹⁾ に準じて、Kaolin-Ca 凝固時間を測定し、その成績は秒単位で表示した。正常対照が40.2±2.6秒を示したのに反し、CML 全体では51.0±10.2秒、PV は65.0±11.8秒を示した。CML、PV 共に正常対照と比較して有意 ($p < 0.002$) の延長を認めた。又 CML の血小板数と Pf-3 a の関係では、CML Group I においては

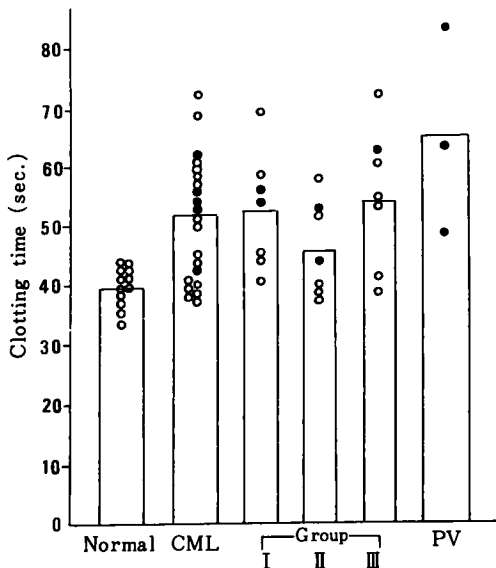


Fig. 16 Pf-3 availability test.

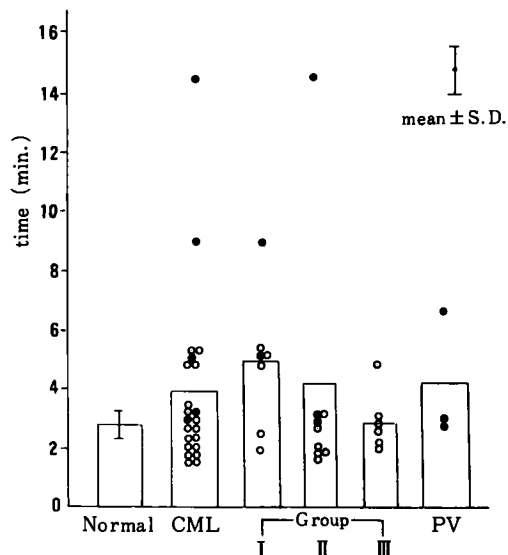


Fig. 17 Bleeding time.

Tab. 2 Platelet functions in CML group I

	ADP	Epi.	Collagen	B. F.	Zymosan	Pf-3 a	Bleeding time
Case 1	10	66	84	85		54.3*	5*
2	43	14*	86	88	74	44.5	5*
3	31	40*	80	91	86	45.8*	5.5*
4	14	8*	62*	90	2	54.8*	5*
5	75	76	85	89	74	67.6*	2
⑥	47	37*	64*	97	4	56.5*	9.5*
7	45	66	79	77	70	40.0	2.5
	%	%	%	%	%	second	min.

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

*=> mean + 2 S. D. (normal) in Pf-3 a and Bleeding time

Tab. 3 Platelet functions in CML group II

	ADP	Epi.	Collagen	B. F.	Zymosan	Pf-3 a	Bleeding time
Case 8	74	79	81	90		52.9*	2
9	41	79	91	90	30	38.7	2.5
⑩	18	8*	74	73*	14	41.9	15*
11	25	24*	77	79	8	37.3	3.5
12	28	12*	78	92		59.0*	3.5
13	70	81	84		86		
14	20	7*	69*		87		
15	28	32*	78	80	36	52.6*	2
16	38	6*	80	84	73		3.5
17	83	82	82		84		3
18	81	90	87	95		40.5	2
	%	%	%	%	%	second	min.

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

*=> mean + 2 S. D. (normal) in Pf-3 a and Bleeding time

Tab. 4 Platelet functions in CML group III

	ADP	Epi.	Collagen	B. F.	Zymosan	Pf-3 a	Bleeding time
Case 19	24	5*	82	85	1	54.5*	2
20	50	83	83	85	9	54.0*	2.5
21	87	80	83	92	68	41.4	5*
22	55	84	89		100	69.4*	2
23	96	89	68*		52		
24	34	4*	84	94	3	63.8*	
25	84	80	87	92	81	38.2	2.5
26	51	7*	74	89	13	63.5*	3
	%	%	%	%	%	second	min.

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

*=> mean + 2 S. D. (normal) in Pf-3 a and Bleeding time

51.9±9.3秒であり、CML Group II では46.1±8.5秒であり、CML Group III では55.0±11.8秒であった。血小板数中等度増加群が他の2 Group に比して障害は軽度であった。(Fig. 16.)

第3節 出血時間に関する検討

正常対照は2.8±0.6分であった。CML 全体においては4.0±3.1分であり、PV では4.2±2.0分であった。CML, PV 共に正常対照と比較して有意な差

Tab. 5 Platelet functions in Polycythemia vera

	ADP	Epi.	Collagen	B. F.	Zymosan	Pf-3 a	Bleeding time
Case 1	3*	5*	77		3	84.4*	
2	10	3*	80		6	63.1*	3
3		7*	88				
④	3*	13*	63*	95	3		3
⑤	27	33*	79	93	4	47.6*	6.5*
	%	%	%	%	%	second	min.

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

*=> mean + 2 S. D. (normal) in Pf-3 a and Bleeding time

は認められなかった。CMLの血小板数と出血時間の関係について検討すると、CML Group Iにおいては、 4.9 ± 2.4 分であり、CML Group IIにおいては 4.1 ± 1.1 分であり、CML Group IIIでは 2.8 ± 1.1 分であった。CML Group Iに延長傾向が認められたが各Group間には有意差は認められなかった。(Fig. 17.)

第4節 症例別による各血小板機能に関する検討

個々の症例のADP, Epinephrine, Collagen, Bovine fibrinogen及びZymosanによる血小板最大凝集率とPf-3 a及び出血時間を表示した。(Tab. 2, 3, 4, 5,)表中の*印は最大凝集率に関しては、正常対照平均-2標準偏差より低値を示した症例であり、Pf-3 a, 出血時間に関しては、正常対照平均+2標準偏差より長時間を要した症例を示し、これらは血小板機能の低下を示す。

ADP凝集において最大凝集率が低値を示した症例はCML 26例中1例もなく、PVは4例中2例に低下が認められた。Epinephrine凝集では、CML 26例中13例に低下がみられ、PVでは5例全例に低下がみられた。Collagen凝集では、CML 26例中4例に低下がみられ、PVは5例中1例に低下がみられた。Bovine fibrinogen凝集ではCML 21例中1例に低下がみられ、PVの2例は正常範囲であった。Zymosan凝集では正常対照においてもばらつきが大きく、正常対照とCML並びにPVとの比較はできなかつた。

Pf-3 aではCML 21例中13例に低下がみられ、PVは3例全例に低下がみられた。出血時間の延長はCML 22例中7例にみられ、PVでは3例中1例にみられた。

以上MPDの血小板機能の低下の頻度は、Pf-3 a, Epinephrine凝集, 出血時間, Collagen凝集, ADP凝集, Bovine fibrinogen凝集の順に高率であった。

次に各血小板機能低下を示す症例の相互の関係を

検討した。ADP凝集の低下を示した2例のうち1例はEpinephrine凝集の低下とPf-3 aの低下を認め、他の1例はEpinephrine凝集とCollagen凝集の低下を認めた。ADP凝集の低下を示す症例は他の血小板機能異常を伴っていた。Epinephrine凝集の低下を認めたCML及びPVは計18例あり、Epinephrine凝集のみ低下を示す症例は4例しかなく、残りの14例はなんらかの他の血小板機能異常を伴っていた。Collagen凝集の低下を認めた5例のうち4例は他のなんらかの血小板機能異常を合併していた。Bovine fibrinogen凝集の低下を認めた1例はEpinephrine凝集の低下を合併していた。Pf-3 aの低下を認めた16例中、Pf-3 aのみ低下を示した症例は5例であり、残り11例は血小板凝集能の低下を合併していた。

出血時間を除いた血小板機能の低下を2項目以上にわたって有した症例は、CMLでは26例中10例に認められ、PVでは5例中4例に及んだ。検査時出血症状を認めた4例(表中○印症例)はいずれも上記14例の中に含まれ、しかも全例Epinephrine凝集の低下を示し、出血症状と血小板機能低下の間に密接な関連が存在する事が明らかとなった。なお出血時間が著明な延長を示したCML症例6は、Epinephrine凝集の低下, Collagen凝集の低下, Pf-3 aの低下を、CML症例10は、Epinephrine凝集の低下, Bovine fibrinogen凝集の低下を合併し、又これら2例は検査施行時出血症状も有していた。

以上血小板機能の低下は、相互に関連し、又出血症状、出血時間の延長とも密接な関連を有することが確認された。

第4章 総括並びに考案

慢性骨髄性白血病(CML), 真性多血症(PV), 本態性血小板増多症(ET)等のいわゆる骨髄増殖症候群(MPD)に含まれる疾患では、通常紫斑は認め

られないが、血小板増多があるにもかかわらず齒齦出血、および性器出血等の出血傾向を認めることは古くから報告されて来た^{1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10) 11) 12) 13)} 出血を誘発する機序について、その原因を凝固異常に求めるものでは、¹²⁵I-Prothrombin と ¹²⁵I-Fibrinogen を使用し、それぞれの因子の Turn over を測定したところ、Hypercatabolism が存在することを認めたとの Martinetz ら²⁾ の報告がある。一方 Klein ら¹⁾ はメカニズムは不明であるとしながらも血小板数の増多が in vitro でトロンボプラスチン形成に関して阻止的に作用し、又血小板数を正常レベルまで希釈するとトロンボプラスチン形成能も Ca 再加凝固時間も正常化することを認めており、本疾患の出血に対して血小板の Anticoagulant 作用がいくらかは関与していると推論している。このように凝固系についても明確な見解がみられていない。血小板機能についても諸家の報告が今迄にみられている。Spaet ら⁵⁾ は ET 3 例に関する検討で、Collagen 凝集と Pf-3 a は正常であるが ADP 凝集は減弱し、Epinephrine 凝集は欠如していることを指適している。Tangün ら⁷⁾ の 19 例の CML 及び 6 例の PV を含む 33 例の MPD に関する検討では、ADP 凝集、Epinephrine 凝集、Collagen 凝集及び Pf-3 a の低下を認めている。Zuker ら⁹⁾ は MPD における出血症状と血小板機能について検討し、出血の既往のある群に ADP 凝集、Epinephrine 凝集及び Pf-3 a の低下を認め、Collagen 凝集は正常であったと報告している。Cardamone ら⁸⁾ による CML 9 例、PV 8 例を含む MPD 21 例の検討では、CML 9 例中 4 例に出血の既往を認め、血小板凝集能は 7 例に低下を、Pf-3 a は 4 例に異常を、又出血時間は 1 例に延長を認めた。PV は 8 例全例に出血の既往を認め、血小板凝集能は 7 例に低下を、Pf-3 a は 4 例に異常を、又出血時間は 2 例に延長を認めている。又 Berger ら¹⁰⁾ は 47 例の PV について、ADP 凝集の低下は 47% に、Epinephrine 凝集の低下は 52% に、Collagen 凝集の低下は 37% に認め、ADP 凝集と Collagen 凝集の低下例はヘマトクリットの高い群に高頻度出現すると報告している。Adams ら¹¹⁾ の CML 8 例、PV 7 例、ET 6 例の MPD 21 例に関する検討によると、CML では血小板数の多寡と血小板機能との間に関連は認められないが、PV では血小板数 50 万以上の例に血小板機能の低下は高頻度であると報告している。以上の如く必ずしも MPD の血小板機能低下について一定の所見が得られず、未

だ定説がない。

そこで著者は MPD の止血異常の原因を血小板系に求め、CML 26 例、PV 5 例について、血小板凝集能を中心に、Pf-3 a 及び出血時間を測定し、これら血小板機能と臨床症状との関連につき検討した。CML 26 例に関する検討は現在までの報告中では最多症例数である。従来の報告と著者の成績を比較検討する為に、まず“症例別による血小板機能”から総括並びに考案を行なう。

著者の成績によれば、ADP 凝集は CML 26 例中 2 例は認めず、又 PV では 4 例中 2 例に低下を認めた。MPD 全体としては 30 例中 2 例即ち 6.7% に ADP 凝集の低下を認めた。この成績は Zuker らの報告よりもさらに低頻度である。これは凝集に用いる ADP の濃度が研究者間で異なる事にも起因し、一概に結論は出せないが、CML の血小板は外因性の ADP には、その濃度が 2×10^{-5} M 以上の時十分反応を示すと理解された。

Epinephrine 凝集は CML 26 例中 13 例に、PV は 5 例全例に低下を認め、MPD 全体 31 例では 18 例即ち 58.1% に低下を認めた。この成績は他の研究者の報告とも一致し、MPD の Epinephrine 凝集は異常である事が判明した。

次に Collagen 凝集は CML 26 例中 4 例に、PV は 5 例中 1 例に低下を認め、MPD 全体 31 例では 5 例即ち 16.1% に低下を認めた。この成績もほぼ他の研究者の報告と一致し、MPD の Collagen 凝集は、Epinephrine 凝集より軽微であるが、やはり異常である事が判明した。

以上が現在まで MPD の血小板凝集能に用いられてきた凝集惹起物質による検討であるが、今度著者は、Bovine fibrinogen と Zymosan を初めて MPD の血小板凝集能の判定に使用し検討した。Bovine fibrinogen 凝集は CML 21 例中 1 例に低下がみられ、PV の 2 例は正常範囲であった。MPD の Bovine fibrinogen 凝集は正常対照とほぼ等しいことが判明した。次に Zymosan 凝集は正常対照においてもばらつきが大きく、MPD において正常対照と有意差のある症例は認められなかった。

Pf-3 a は CML 21 例中 13 例に、PV は 3 例全例に低下が認められ、MPD 全体 24 例では 16 例即ち 66.7% に異常が認められ、Epinephrine 凝集の異常よりも高頻度であった。この成績は Tangün ら及び Cardamone らの報告と一致し、MPD の Pf-3 a は異常である事が判明した。

出血時間の延長は、CMLにおいて22例中7例に、PVでは3例中1例に認められた。MPD全体25例では8例即ち32.0%に延長を認め、著明な延長を示した2例は出血の既往と、多項目に及ぶ血小板機能異常を認めた。Zuckerらも指適している如く出血症状と血小板機能の低下及び出血時間に密接な関連があることが示唆された。

次にCMLにて末梢血小板数の多寡により、血小板機能にいかなる差異を認めるかを検討し、又CML全体及びPVと正常対照の間に、統計的に有意差を認めるか否かも合せ検討した。血小板凝集能に関しては、凝集Pattern、最大凝集率、Lag phaseについて検討し、Pf-3a及び出血時間に関しては、その所要時間について検討した。AdamsらによりCML8例について、その血小板数の多寡と血小板機能の関連が報告されているが、著者の検討した26例という多数の集団における分析は未だない。又CML全体と正常対照との間における血小板機能の有意差を検討した報告はない。著者の成績を総括並びに考案すると次の如くである。

ADP凝集では、CMLは正常対照より凝集亢進Patternを高頻度に認めるが最大凝集率に有意差を認めない。PVは正常対照に比して凝集減弱patternを高頻度に認め、最大凝集率も有意に低下を示す。CMLにて血小板数の多い群ほど凝集の亢進を認めた。

Epinephrine凝集では、CML及びPV共に凝集減弱Patternを高頻度に認め、最大凝集率も有意に低下を示した。CML Group間では、血小板数の多い群ほど正常対照に近い成績を示した。

Collagen凝集では、CML及びPV共に正常対照と比較して凝集Patternにも、最大凝集率にも差異は認められなかったが、Lag phaseには有意の延長が認められた。CML各Group間に差異は認められなかった。

Bovine fibrinogen凝集では、CML及びPV共に正常対照と比較して凝集Patternにも最大凝集率にも差異は認められなく、又CML各Group間に、差異はなかった。

Zymosan凝集では、CMLは正常対照と比較して凝集Pattern、最大凝集率に差異は認められなかったが、Lag phaseは有意の短縮を認めた。PVは凝集減弱Patternが高頻度に認められ、最大凝集率も低値を示したが、正常対照にばらつきが大きく有意の差は認められなかった。CML各Group間には血

小板数の多い群ほどLag phaseの延長傾向が認められた。

Pf-3aでは、CML、PV共に正常対照と比較して有意の延長を認めた。CML各Group間では、中等度増加群においてその障害は軽度であったが有意差は認められなかった。

出血時間では、CML、PV共に正常対照と比較して有意な差は認められなかった。

以上の成績を“症例別による血小板機能”も含めて総括すると次の如くである。

ADP凝集において、CMLは正常対照との間に差異を認めないが、PVは正常より低下を示す。Epinephrine凝集においては、CML、PV共に低下を認める。Collagen凝集においては、CML、PV共に最大凝集率に差異を認めないが、Lag phaseの延長を認め、又個々の症例においては、凝集低下を示す症例が認められる。Bovine fibrinogen及びZymosan凝集では、CML、PV共に正常対照と比較して差異を認めない。Pf-3aでは、CML、PV共に正常対照より延長を認め、出血時間ではCML、PV共に正常対照と差異は認めないが、個々の症例においては、延長を示す症例が認められる。

以上の結果をその凝集機序に焦点をあて考案すると次の如くである。

ADP凝集の機序は、まず添加されたADPにより1次凝集を示し、ひきつづいて血小板内ADPが放出され、その放出ADPにより2次凝集が始まると説明されている²⁾ PVは2次凝集が障害されており、放出障害が考えられたが、CMLは著者の実験前の推測に反し、正常と差異を認めなかった。CMLでは添加したADPにより、血小板内ADPが十分放出される事が推測された。Epinephrine凝集の機序もADP凝集と同一機序が考えられており³⁾ Collagen凝集もほぼ同一機序が報告されている⁴⁾ MPDの血小板において、Epinephrine凝集は高度に、Collagen凝集は一部の症例にて障害されていた。又Collagen凝集の低下はEpinephrine凝集の低下も合併していた事も合せ考えると、MPDのこの2つの凝集異常は血小板のADPの放出障害を思わせた。なおCollagen凝集において報告者間に成績の差がみられる事は、使用したCollagenの濃度差に起因するのではないかと著者は考えている。

ところでBovine fibrinogen及びZymosanをMPDの血小板凝集に使用したのは、著者が初めてであると思うが、その成績により、MPDと正常対

照との間にほとんど差異は認められなかった。Bovine fibrinogen は、それに含まれる第Ⅳ因子を介し、血小板内 ADP を放出させて凝集をおこすという報告¹⁵⁾があり、又 Zymosan は、補体の C₃ を活性化させ、その C₃ と Zymosan が複合体を作り、血漿 Fibrinogen とも関連して血小板凝集をひきおこし、その凝集時には血小板内 ADP が放出されるという報告^{16) 17) 18)}がある。又 ADP により凝集を示さない血小板無力症の血小板は、Bovine fibrinogen により凝集を示すが、Zymosan では凝集を示さないという報告がある。著者の Bovine fibrinogen 凝集、Zymosan 凝集の成績では、MPD において正常と差がないことが判明し、MPD の止血異常とは直接関連を有さないけれども、血小板の凝集機序の解明には、貴重な実験成績であると考えられ、今後更に多面的な検討が加えられる事となろう。

Pf-3 a は血小板内 phospholipid であると考えられており、Pf-3 a はその放出能の測定である。MPD において Pf-3 a は低下を示したが、この事は、やはり血小板放出異常を示唆すると思われる。

以上 MPD の血小板機能は、Pf-3 a と、Epinephrine 凝集は高頻度に障害され、ADP 凝集、Collagen 凝集は一部の症例において障害されており、その原因としては、血小板放出異常が示唆された。

第5章 結 論

骨髄増殖症候群 (MPD) においては、血小板数は正常ないしは増加を認めるにもかかわらず、止血異常をしばしば経験する。そこでこの機序を解明する目的で、血小板機能特に血小板凝集能、Platelet factor-3 availability test (Pf-3 a) と出血時間の測定を行ない次の結果を得た。

1) ADP 凝集においては、Polycythemia vera

(PV) は正常対照に比較して凝集能の低下を示すが、CML は差異を認めず、CML の血小板高度増加 Group はむしろ亢進を示すことが判明した。

2) Epinephrine 凝集においては、CML、PV 共に正常対照に比較して凝集能の低下を認めしたが、CML の血小板数の多い Group ほど正常に近い凝集を示した。

3) Collagen 凝集においては、CML、PV 共に一部の症例に凝集能の低下を認めた。

4) Bovine fibrinogen、Zymosan 凝集において、その凝集能は CML、PV 共に正常対照とほとんど差異を認めなかった。

5) Pf-3 a においては、CML、PV 共に正常対照に比較して有意の低下を示すことが明らかとなった。

6) 検査時出血症状を認めた症例は、Epinephrine 凝集の低下を必発とし、他に何らかの血小板機能低下を合併していた。このうち 50% に著明な出血時間の延長を認めた。

7) MPD の血小板機能異常は、著者の測定系では Pf-3 a、Epinephrine 凝集、出血時間、Collagen 凝集、ADP 凝集、Bovine fibrinogen 凝集の低下の順に異常を認め、これらの異常は単独で出現する頻度は少なく、CML、PV 共に放出障害による血小板機能障害が主であると考えられた。PV に一層その傾向が強いことが判明した。

欄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) Klein, E., Farber, S., Freeman, G. and Fiorentino, R.: The effect of varying concentration of human platelets and their stored derivatives on the recalcification time of plasma. *Blood*, **11**: 910—915, 1956.
- 2) Martinetz, J. Shapiro, S. S. and Holbum, R. R.: Metabolism of human prothrombin and fibrinogen in patients with thrombocytosis secondary to myeloproliferative states. *Blood*, **42**: 35—46, 1973.
- 3) Carvalho, A. and Ellman, L.: Activation of the coagulation system in polycythemia Vera. *Blood*, **47**: 669—678, 1976.
- 4) 高田昭, 小林一到, 杉山篤弘, 大森肇, 江幡謙次, 西出啓二郎, 篠田暁, 水島泰治: 栓球血症の2例(附, 本邦における統計的考察). *最新医学*, **18**: 172—182, 1963.
- 5) Spaet, T. H., Lejnieks, I., Gaynor, E. & Goldstein, M. L.: Defective platelets in essential thrombocythemia. *Arch. Intern. Med.*, **124**: 135—141, 1969.
- 6) 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.
- 7) Tangün, Y.: Platelet aggregation and platelet factor 3 activity in myeloproliferative disorders. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **25**: 241—251, 1971.
- 8) 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.
- 9) Cardamone, J. M., Edson, J. R., McArthur, J. R. and Jacob, H. S.: Abnormalities of platelet function in the myeloproliferative disorders. *J. Amer. Med. Ass.*, **211**: 270—273, 1972.
- 10) Berger, S., Aledort, L. M., Gilbert, H. S., Hanson, J. P. and Wasserman, L. R.: Abnormalities of platelet function in patients with polycythemia vera. *Cancer Res.*, **33**: 2683—2687, 1973.
- 11) 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.
- 12) Adams, T., Schutz, L. and Goldberg, L.: Platelet function abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Scand. J. Haemat.*, **13**: 215—224, 1974.
- 13) 田上憲次郎, 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.
- 14) Lüscher, E. F. and Massini, P.: Common pathways of membrane reactivity after stimulation of platelets by different agents. *Biochemistry and Pharmacology of Platelets. Ciba Foundation Symposium* **35**: 5—21, 1975.
- 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) Brecher, G. and Cronkite, E. P.: Morphology and enumeration of human blood platelet. *J. Appl. Physiol.*, **3** : 365, 1950.
- 20) Born, G. V. R. and Cross, M. J.: The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.*, **168** : 178—195, 1963.
- 21) Hardisty, R. M. and Hutton, R. A.: The Kaolin clotting time of platelet-rich plasma. A test of platelet factor-3 availability. *Brit. J. Haematol.*, **11** : 258—268, 1965.
- 22) Ivy, A. C., Nelson, D. and Bucker, G.: The standardization of certain factors in the cutaneous "Venostasis" bleeding time technique. *J. Lab. Clin. Med.*, **26** : 1812—1822, 1941.
- 23) Holmsen, H., Day, H. J. and Setkowsky, C. A.: Secretory mechanism: Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline. *Biochem. J.*, **129** : 67—82, 1972.
- 24) 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.

Studies on platelet functions in myeloproliferative disorders

Part 1. Studies on platelet aggregation in myeloproliferative disorders

Hiroyuki NOZAKI

Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Ikuro Kimura)

Mechanisms of hemostatic abnormalities in myeloproliferative disorders are still questionable. In this study author examined platelet aggregation, platelet factor-3 availability (pf-3a) and bleeding time. Platelet aggregation was induced by epinephrine, collagen, ADP, bovine-fibrinogen (bf) and zymosan, respectively. Pf-3a was examined by Kaolin-Ca method and bleeding time was examined by Ivy method. Materials were 26 cases of chronic myelocytic leukemia and 5 cases of polycythemia vera. As results following were obtained. Namely, significant decreases of pf-3a and epinephrine-induced platelet aggregation were most frequently seen in these cases. Their incidences were 66.7% and 58.1%, respectively. Particularly decrease of epinephrine-induced platelet aggregation was recognized in all 4 cases which showed hemorrhagic tendencies. Prolongation of bleeding time and decrease of collagen-, ADP-, and bf-induced platelet aggregation were seen in 32.0%, 16.1%, 6.7% and 4.3%, respectively. Furthermore, it was recognized that two or more disturbances of platelet-functions were present in these myeloproliferative disorders. These results were thought to suggest that hemostatic abnormalities in myeloproliferative disorders might be mainly due to decreases of pf-3a and epinephrine-induced platelet aggregation.