

原 著

血小板拡張能に関する研究*

—走査電顕像による拡張様式について—

清水 一輝** 塚原 敏弘** 梅田 正法** 大橋 勲**
 牧 一正** 風間 一** 山口 了三** 渡辺総一郎**
 高槻 義夫** 平畑 徹幸** 石川 至** 大竹 喬二**
 白井 達男**

Key words : platelet, platelet adhesion, platelet spreadability,
 CML, ITP,

はじめに

血小板は止血に際し種々の重要な機能を果しているが、とくに止血初期の組織損傷部の collagen 線維への粘着は止血のキッカケとなる現象として注目されている。血小板は異物とくに非潤面への粘着後、著しい拡張を示し、この粘着と拡張は血小板の機能と関連し、疾患によってその態度が異なることを著者らは第4回血栓および止血に関する討議会において報告した。今回は血小板の拡張過程の形態変化と拡張血小板の諸種の形態を走査電顕で観察し、拡張様式について検索を試み、若干の新知見を得たので報告する。

I. 対象および方法

1. 血小板の拡張様式の観察について

血小板の拡張様式の検索には健康成人男子の血小板を用い、Breddin 変法にてプラスチック板上に粘着させ5分、10分および30分後に固定し走査電顕を用いて観察した。すなわち、1/10

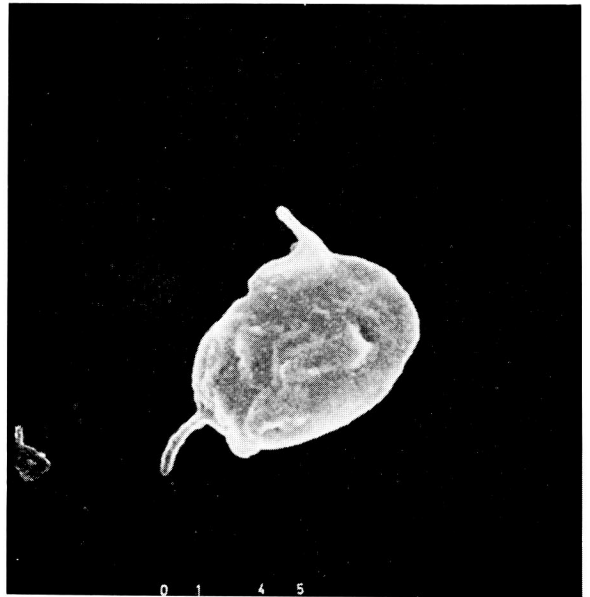


Fig. 1 This photograph show normal platelet that was fixed after 5 minutes of spreading. (10,000×)

容のクエン酸ソーダを加え、静脈血を採取し、800r.p.m. にて10分間遠沈し多血小板血漿をうる。これに1/10容クエン酸ソーダー添加生理食塩水を1 : 9比に加え、プラスチック板上で

* Studies on spreadability of platelets—Observations of platelets spreading by scanning electron microscopy— (The 5th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 20, 1976).

** 東邦大学医学部第一内科 (〒143 東京都大田区大森西6-11-1), Kazuteru SHIMIZU, Toshihiro TSUKAHARA, Masanori UMEDA, Isao OHHASHI, Kazumasa MAKI, Hajime KAZAMA, Ryoza YAMAGUCHI, Soichiro WATANABE, Yoshio TAKATSUKI, Tetsuyuki HIRAHATA, Itaru ISHIKAWA, Kyoji OTAKE and Tatsuo SHIRAI: The 1st Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan.

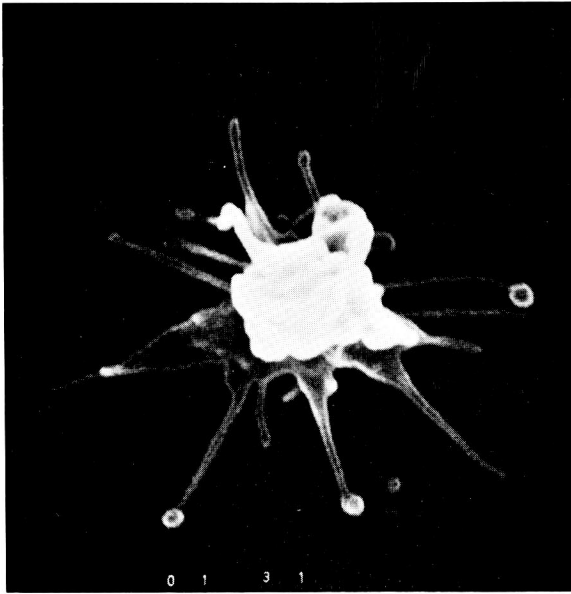


Fig. 2 After 15 minutes (10,000×)

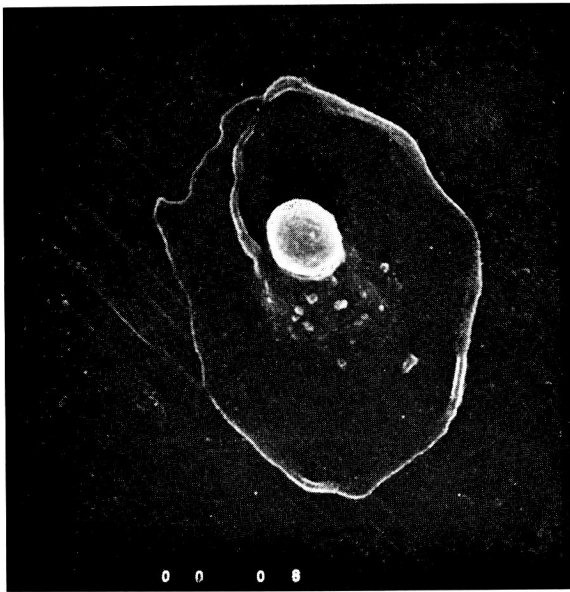


Fig. 3 After 30 minutes (10,000×)

5分, 15分, 30分の血小板拡張操作を行なった後, 1% Glutalaldehyde phosphate buffer にて1時間固定, 同液にて2回洗滌し 1% Osmum酸で再固定後エタール系列で脱水し Isoamylacetate に置換, 致界点乾燥器 (日立 HCP-I) で乾燥し, カーボン, 金蒸着後, 日本電子 JEM 100B の ASID にて観察した。

2. 疾患による拡張血小板の形態変化

拡張能不良な慢性骨髄性白血病と拡張能良好な本態性血小板減少性紫斑病の拡張操作30分後の拡張血小板の形態を光顕および走査電顕で正常例と比較検討を試みた。

II. 成 績

1. 血小板拡張様式について

1) 5分後: 大部分の血小板は図1に示すように, 大きさはほぼ正常血小板と同様であるが, 1~2本の偽足を突出し, clear zone のみられない非拡張血小板である。しかし, 一部には初期より僅かに clear zone を有するやや拡張した血小板も散見される。

2) 15分後: 図2に示すように血小板は明らかに拡張し, 偽足は増加, 伸展し, 典型的な dendritic form を形成する。これらの偽足間には明らかな clean zone が認められる。かかる血小板が大多数を占めるも一部には偽足の中央部あるいは先端に円形に拡大した clear zone を形成しているものも存在する。この時点でもなお一部には clear zone を有しない非拡張型の血小板も観察される。

3) 30分後: 大部分が図3に示すように著明に拡張し, 明らかな clear zone を有し, 類円形を呈している。clear zone の中央部には1~2ケのゲル様物質が存在している。とくに拡張良好な血小板では中央のゲル様物質は縮少し, clear zone の周囲に数個の梁状物質が認められるようになる。

以上のことから血小板の最も一般的な拡張様式は, まず初めに1~2本の偽足を突出し, 時間的経過とともに偽足は数を増し, 伸展し, dendritic form を形成する。偽足は更に太く長くなり偽足間に膜を張るような状態でゾル様の clear zone を形成し, 漸次拡張していくとともに中心部のゲル様物質は縮少し最終的に類円形の拡張血小板となるものと考えられる。

2. 疾患による拡張血小板の形態変化

1) 正常例：正常拡張血小板のギムザ染色標本は大部分が拡張した類円形血小板で、その平均直径は 7.8μ である。なお著者らの分類による変形血小板は極く僅かに認められるにすぎない。この拡張血小板の走査電顕像は図3に示したように類円形を呈し、中央部に1~2個の小ゲル様物質が存在する。

2) 慢性骨髓性白血病：全体に拡張不良の血小板が多く、その平均直径は 6.4μ と著明に減少し、明らかに拡張能の低下が認められる。また変形血小板の増加も認められる。

この走査電顕像は図4(5,000倍)に示すように中央部のゲル様物質周囲の clear zone は星形で、偽足を突出し、dendritic form を呈する拡張不良の血小板が多数認められる。

3) 本態性血小板減少性紫斑病：平均直径は 9.8μ と著明に増大し、とくに直径 20μ 以上の正常ではほとんど出現しない巨大型も認められ明らかに拡張能の亢進が窺われる。変形血小板は若干認められるにすぎない。

走査電顕像は図5に示すように中心部に凹凸不整のゲル様物質があり、その周囲に広い clear zone が広がり数個の梁状物質が認められ著明な拡張を呈している。一部の巨大に拡張した血小板では外縁が外に突出し、花卉状を呈するものがあり、慢性骨髓性白血病の星形と対比的な形態と考えられる。

以上、慢性骨髓性白血病と本態性血小板減少性紫斑病とでは正常例と比較し、clear zone の形、中心部のゲル様物質などに明らかな差異が認められた。

III. 考 案

血小板拡張能検査は Marx¹⁾, Breddin²⁾³⁾ らによって開発された血小板機能検査の1つである。

血小板の異物面への粘着による拡張はすでに Eberth らによって1885年見出された現象であ

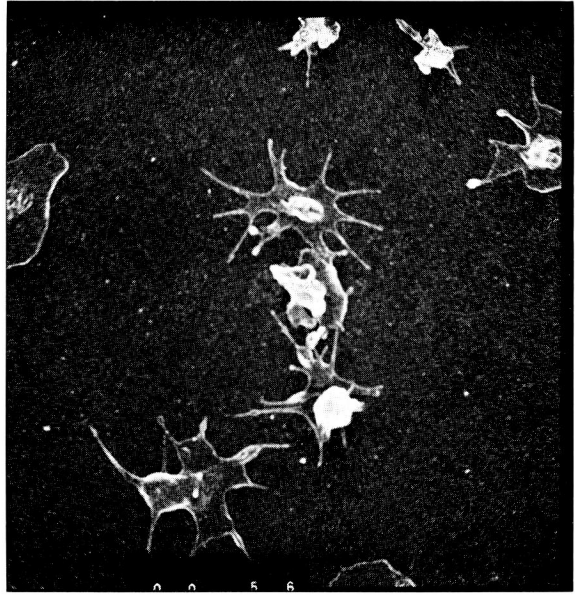


Fig. 4 This photograph shows spread platelets of CML. (3,000×)



Fig. 5 This photograph shows spread platelet of ITP. (10,000×)

るが、Marx(1960)らはガラス面に粘着した拡張血小板の染色法を発した。これが端緒となり Breddin がこの方法を改良し、血小板機能検査法として確立させた。

この血小板拡張機序について Breddin は血

血小板の内在性エネルギーに依存することを報告しているが、著者ら⁴⁾は血小板の解糖エネルギー代謝が重要な役割を演じていることを明らかにした。そこでこの検査法をより価値あるものにすべく、従来の Breddin 法をさらに改良し、直径と形態の 2 系列による新たな判定法を考案した。本法を用いて諸種血液疾患をはじめいろいろな疾患につき測定し、血小板拡張能検査の臨床的意義について報告してきた。

従来、拡張血小板の形態変化は光顕レベルの観察であったが、さらに微細構造を知る目的で走査電顕による観察を試みた。今日まで拡張血小板の電顕的観察はほとんど報告がみられない。

著者らの観察で明らかのように正常血小板の一般的拡張様式は初期に 1～2 本の偽足を突出し、時間的経過とともに偽足の数は増加伸展し dendritic form を形成する。ついで偽足間に膜を張るような状態で clear zone を形成し、漸次類円形に拡張していくものと解せられる。かかる一般的な拡張様式とは別に dendritic form の偽足の一部がゾル状に流出し、これが拡大して中央部よりのものと一緒に類円形に拡大するものがある。その他初期に clear zone が認められる拡張血小板も存在するが、この拡張様式は前二者のいずれかが急速に起ったものか、あるいは別の様式によるものかはさらに検討を要する。

ところで、血小板拡張能は諸種血液疾患でその態度を異にし、疾患別に特異的なパターンを呈している。とくに慢性骨髄性白血病と本態性血小板減少性紫斑病とは平均直径と変形比に大きな差異が認められている。また電顕像においても両者はともにそれぞれの特徴的形態を有し、かつ正常例とは著しく異なることは、これら疾患の血小板機能異常を示唆するものと解せられる。

慢性骨髄性白血病の dendritic form は正常血小板の拡張過程における dendritic form とは中心部のゲル様物質の形態、また clear zone の広がりなどの異なる点がみられることから慢性骨髄性白血病の血小板の拡張は dendritic form より以上には拡張しないものと考えられる。本態

性血小板減少性紫斑病のさい出現する巨大型が正常血小板においても起りうるか否かについては、中心部のゲル様物質の凹凸不整形とその周囲の梁状物質は正常血小板にはほとんど見出せないものであり、とくに花卉状の clear zone は本態性血小板減少性紫斑病に特有の変化と考えられる。また本症の血小板拡張能の亢進理由は本来血小板そのものが大きいということではなく、先に述べたように血小板の解糖系エネルギー代謝の亢進によるものである。

解糖系エネルギー代謝に起因する血小板拡張能は血小板機能検査の 1 つとして極めて有用な検査法と考えられる。今後他の機能検査との関連性を解明することが重要な課題である。

結 語

走査電顕を用いて血小板の拡張様式を検索し、三種類の拡張様式を観察した。このことは血小板粘着過程解明の一助として意義あるものと考えられる。また慢性骨髄性白血病と特発性血小板減少性紫斑病では形態に著しい変化が認められ、これら疾患の血小板機能異常を示唆するものと解せられる。

文 献

- 1) Marx, R., Ibrom, H., Stanislawski, F.: Die Färbungsfolien und glasadhärenter Thrombozyten. Ein Verfahren zur verbesserten leichtmikroskopischen Thrombozytenanalyse. Blut, 6; 335~338, 1960.
- 2) Breddin, K., Bauke, J.: Thrombozytenagglutination und Gefäßkrankheiten. Blut., 11; 144~164, 1965.
- 3) Breddin, K., Hoff, F.: Die Thrombozytenfunktion bei hämorrhagischen Diathesen, Thrombosen und Gefäßkrankheiten. p. 63~156. Schttauer Stuttgart.
- 4) 塚原敏弘: 血小板拡張能に関する研究. 東邦医会誌, 23; 110~121, 1976.

<ABSTRACT>

Studies on spreadability of platelets
—Observations of platelets spreading by scanning electron microscopy—

by

Kazuteru SHIMIZU, Toshihiro TSUKAHARA, Masanori UMEDA, Isao OHASHI, Kazumasa MAKI, Hajime KAZAMA, Ryoza YAMAGUCHI, Soichiro WATANABE, Yoshio TAKATSUKI, Tetsuyuki HIRAHATA, Itaru ISHIKAWA, Kyoji OTAKE and Tatsuo SHIRAI

from

The First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan.

The spreading of blood platelets after adhesion was first observed by Eberth et al. (1885) and has been studied since by many investigators. The underlying mechanisms, however, are not known in many respects and there has been no report so far of its electron microscopic observation.

PURPOSE: For making observation of the mode of normal platelet adhesion and spreading by scanning electron microscopy as well as to investigate morphological changes of spreading platelets in elected hematologic disorders.

SUBJECTS: The mechanism of platelet spreading was investigated with specimens from healthy male adults, followed by comparison of the spreading of platelets from patients with C.M.L. or I.T.P.

PROCEDURE: Platelets were allowed to spread on plastic plates by the method of Breddin and fixed after intervals of 5, 15 or 30 minutes for microscopic observation. Those from patients were fixed after 30 minutes of spreading. For electron microscopy, specimens were fixed with 1% glutaraldehyde and, after postfixation in 1% OsO₄, they were dehydrated, dried and covered by the vacuum evaporation of carbon and metal.

RESULTS: Mode of spreading—At 5 minutes of spread each platelet was found to have sent out one or two pseudopodia. When 15 minutes

had elapsed the pseudopodia were found increasing in number and elongated to shape up a dendritic form. At 30 minutes, the platelet was spread to assume a discoid shape with the peripheral transparent hyalomere and the central portion consisting of a gel-like material. A series of scanning electron micrographs shows that, generally speaking, the platelet sends out pseudopodia which thereafter increase in number and extend to form dendroid structures with a subsequent formation of the hyalomere just like a membrane spreading around neighboring pseudopodia; the platelet thereby gradually spreads into an ellipsoid shape. An occasional platelet shows the formation of a clear zone by a sol-like outflow around the pseudopodia, followed by its confluence with the substance from the central portion to eventually make the platelet discoid. It was also noted that a platelet had a peripheral clear zone formed around it at as early as the initial stage of adhesion and thereafter appeared to continue spreading in all directions; it remains yet to be determined whether or not this represents the consequences of a rapid progress in platelet spreading in either of the foregoing two fashions. Platelets from patients—Most platelets from CML patients were found asteroid with incompletely spread peripheral dendroid structures. In ITP, platelets were ellipsoid and displayed remarkably active spreading; the central portion consisted of a gel-like substance with an irregularly uneven surface and with trabeculations around it.

CONCLUSION: Blood platelets were observed to spread in three different modes, and this finding would be of significance as an aid to elucidation of the process of platelet adhesion. The observation also disclosed a remarkably striking difference in the morphology of platelet spreading between CML and ITP, suggesting likely abnormalities of platelet function in these conditions.