

血小板凝集能測定装置の使用経験 —学内実習への導入にむけて—

眞鍋 紀子^{1)*}, 山口 航¹⁾, 花村 悠¹⁾, 原 千紘¹⁾, 土居 愛祐美²⁾, 今井 正²⁾

¹⁾香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科

²⁾香川県立保健医療大学大学院保健医療学研究科保健医療学専攻

Experience of the use of platelet aggregation test apparatus for laboratory practice at the university

Noriko Manabe^{1)*}, Wataru Yamaguchi¹⁾, Chika Hanamura¹⁾, Chihiro Hara¹⁾,
Ayumi Doi²⁾, Tadashi Imai²⁾

¹⁾Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences

²⁾The Graduate School of Kagawa Prefectural University of Health Sciences Graduate School of Health Sciences
Course of Health Sciences

要旨

施設間差が大きいと指摘されている血小板凝集能測定の学内実習への導入のために、学内での測定を行った。対象者は、学生（20～22歳）とし、ADP（adenosine diphosphate：以下ADP）・collagenの2濃度法測定（正常モード）での検討を行った。ADP刺激における血小板凝集は、男性のみ低下例が見られ、女性のほうが男性より高かった（ $P<0.01$ ）。collagen刺激においても、同様であったが、高濃度のp値のみ $P<0.05$ であった。またcollagen刺激のlagtimeは、男性より女性の方が短かった。これは、女性の二次凝集の強さを裏付ける結果であった。女性の方が男性より血小板凝集能が亢進しているという結果は、藤田らの報告と一致した。

Key Words: 血小板凝集能検査 (platelet aggregation test), 正常モード (normal mode),
学内実習 (laboratory practice at the university), 男女差 (gender differences)

*連絡先: 〒761-0123 香川県高松市牟礼町原 281-1 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科 眞鍋 紀子

*Correspondence to: Noriko Manabe Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, 281-1 Murecho-Hara, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan
E-mail: manabe5@chs.pref.kagawa.jp

はじめに

血小板機能検査の目的は、以前の血小板機能低下の診断から血栓症発症と関連した機能亢進の診断に移行してきている。心筋梗塞や脳梗塞などの動脈血栓症においては血小板の機能亢進が報告され、これらの疾患の発症に血小板が深く関わっていることが示されている¹⁾。事実血小板の機能を抑える抗血小板薬が治療に使われ、予後の改善に寄与している。抗血小板薬はワーファリンや新規経口抗凝固薬のように過量による出血の危険性は少ないが、より強力な抗血小板薬の登場や併用療法の普及などにより、何らかのモニタリング検査が求められている。さらに、抗血小板薬療法による血管イベント予防効果は相対リスクの減少率が20~30%であり、リスク低減効果が低い要因の一つとして、薬剤を服用しているにもかかわらず薬理作用が発揮されないレジスタンスの存在が挙げられている^{1, 2)}。血小板機能検査により、薬効をモニターすれば、レジスタンスの発見や投薬量不足（過剰）を知ることができ、抗血小板療法の有効性や安全性をさらに向上させることが期待できる^{1~7)}。

血小板凝集能検査は、血小板機能検査の中で最も一般的な検査として知られている。血小板凝集能検査には、Bornら⁸⁾によって開発された透過光測定法やフローサイトメトリーの原理を用いた散乱光法、全血で測定可能なインピーダンス法、ずり応力による血小板凝集能測定法などさまざまな手法があるが、古くから世界中で用いられている透過光測定法が、最も一般的である。しかしその透過光測定法は、手技や条件設定での標準化が遅れており、施設間差を是正し、結果の精度を保証する必要性があるといわれている^{1, 3)}。

血小板凝集能検査は、臨床検査技師国家試験において出題傾向が高い検査項目であるが、学生にはかなり難解な項目であり、数年前までは、臨地実習の必須項目であった。しかし、臨地実習施設での実習が不可能となったため、我々は学内での機器購入を希望していた。

今回、学内実習の血小板凝集能検査機器の導入にあたり、本学での条件設定「ADP (adenosine diphosphate : 以下ADP)・collagenの2濃度法測定解析（正常モード）」による使用経験と、他施設との比較などから、学内実習に向けて、若干の知見を得たので報告する。

対象および方法

(対象者)

本研究に同意し、事前アンケートで、現在の健康状態、服用している薬剤やサプリメント、高血圧・脂質異常症・糖尿病の有無、などを確認し、本検査に影響を与えないと考えられた学生23名（年齢20~22歳、男性11名、女性12名）を対象者とし、延べ68検体（男性33、女性35）について検討した。

(機器および試薬)

機器：HEMA TRACER 804（株式会社エル・エム・エス）

試薬：ADP試薬：「MCM」ADP（株式会社エル・エム・エス） $0.2 \mu\text{mol/vial}$ 、collagen試薬：「MCM」collagen（株式会社エル・エム・エス） 1mg/ml 、生理食塩水：0.9%NaCl solution

(方法)

1. 採血および試料

対象者の採血時刻は、午前8時~10時とし、採血前は安静を保ち、駆血時間は1分以内とした。21Gの翼針針にて採血し、捨て血を採った後、2ml用の3.2%クエン酸ナトリウム採血管に2本採血した。室温で1時間静置後、1100rpm (190g)・10分遠心し、PRP (platelet rich plasma : 以下PRP) (多血小板血漿) を調整した。さらにその沈渣部を3000rpm (1400g)・10分遠心し、PPP (platelet poor plasma : 以下PPP) (乏血小板血漿) を調整し、試料とした。

2. ADP・collagenの2濃度法測定（正常モード）

ADP試薬の $0.2 \mu\text{mol/vial}$ は、精製水2mlで溶解し、 $100 \mu\text{mol/l}$ ($100 \mu\text{M}$)のstock solutionとした。collagen試薬は、0.2ml秤量し、希釈保存液を1.8ml加え、 $100 \mu\text{g/ml}$ のstock solutionとした。ADP (最終濃度 $1.0 \mu\text{M}$, $3.0 \mu\text{M}$)、collagen (最終濃度 $0.25 \mu\text{g/ml}$, $2.0 \mu\text{g/ml}$)となるように惹起物質試薬を準備し、PRPに添加し、6分値まで測定した (PPP : 対照)。

HEMA TRACER 804の測定方法は、BornとO'Brienによって考案された光透過法⁸⁾ (比濁法)で、PRPに一定濃度の血小板凝集惹起物質を加えて攪拌すると、血小板凝集が起き血漿中に凝集塊が出現してPRPの光透過量が増大する。この変化を経時的に自動記録する方法^{8~9)}で行った (図1 : 光透過法ADP添加例 : 機器文献)。

正常モードの2濃度法測定では、健常人の「閾値」として確認されている、ADP $1.0\sim 3.0 \mu\text{M}$ 、collagen $0.25\sim 2.0 \mu\text{g/ml}$ を使用して反応を確認した。

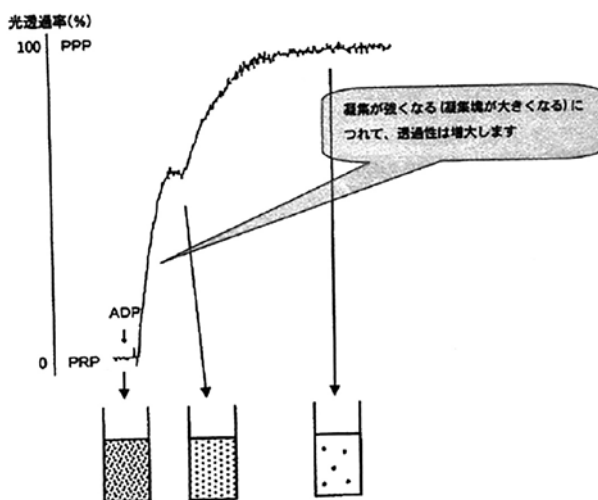


図1 光透過法 (ADP添加例)

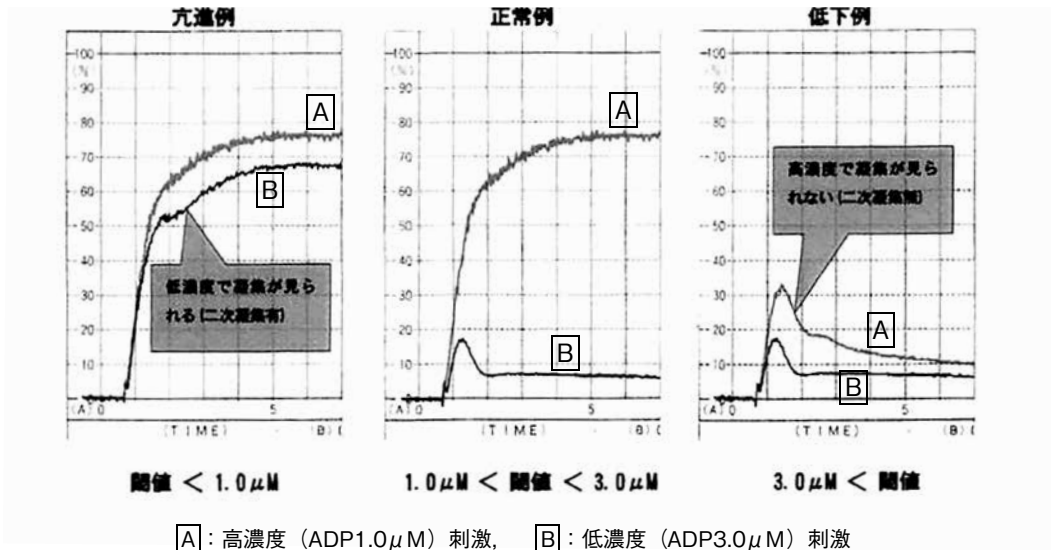
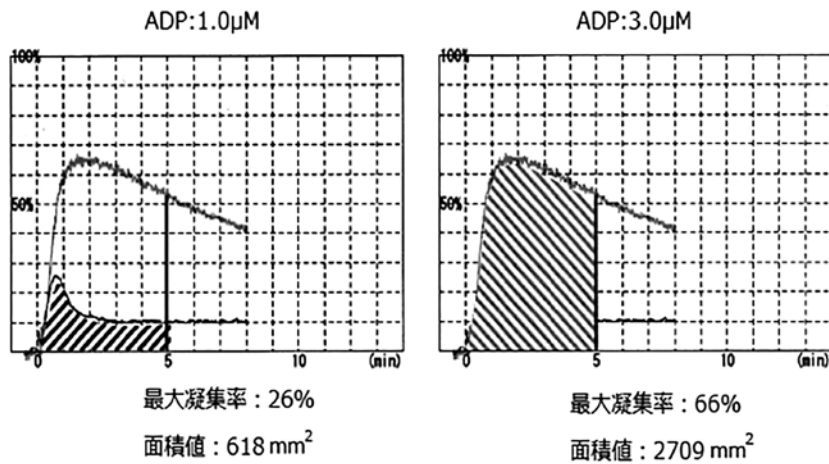


図2 凝集能曲線解析 (2濃度測定ADP例)



* ADP 面積値計算例 (表1の中に*表示)

ADP 例の面積値 (mm²) = 618 + 2709 = 3327 *

図3 正常モード2濃度測定・解析 (面積値計算)

3. 判定

判定は、各2濃度における最大凝集率、面積値などにより、凝集パターンを解析し、9クラス分類とし、判定した。クラス分類判定、ADP刺激の2濃度測定の低下例、正常例、亢進例 (閾値図) および面積値等の補正を示した (表1, 図2, 図3: 機器文献)。図3には、ADP刺激の面積値の計算例 (*) を示した。この例の面積値計算は3327 (*) となり、表1の (*) < 4200に該当するため、この例の判定は正常、クラス5となる (表1)。

4. 統計処理

統計処理は、2010Excelのデータ解析を用い、独立した2集団における、t-検定の「分散が等しくないと仮定した2標本による検定」を行い、P < 0.05を有意とした。

5. 倫理的配慮

対象者に対して、研究の趣旨と研究の協力は自由意志であること、不参加でも不利益にならないこと、個人の評価には関わらないこと、個人の秘密は厳守すること、

表1 閾値、面積値などによるクラス判定

クラス	判定		ADP閾値		面積値 (mm ²)	
			COL閾値	ADP	Collagen	
1	低下	高度低下	3.0 μM↑ 2.0 μg/ml↑	<600	<500	
2		中等度低下		<1600	<1200	
3		軽度低下		<2600	<1700	
4	正常	正常(やや低下)	1.0~3.0 μM 0.25~2.0 μg/ml	<3300	<2300	
5		正常		* <4200	<3300	
6		正常(やや亢進)		<4900	<4300	
7	亢進	軽度亢進	1.0 μM↓ 0.25 μg/ml↓	<5800	<4900	
8		中等度亢進		<6800	<5600	
9		高度亢進		<8000	<8000	

データは実習と研究以外に使用しないことを口頭で説明した。本研究は、実習等における被験者となることへの同意書の確認とともに、香川県立保健医療大学研究等倫理審査委員会の承認 (No.145) と同時進行で行い、アンケート、同意書等で本人の意思を再確認した上で行った。

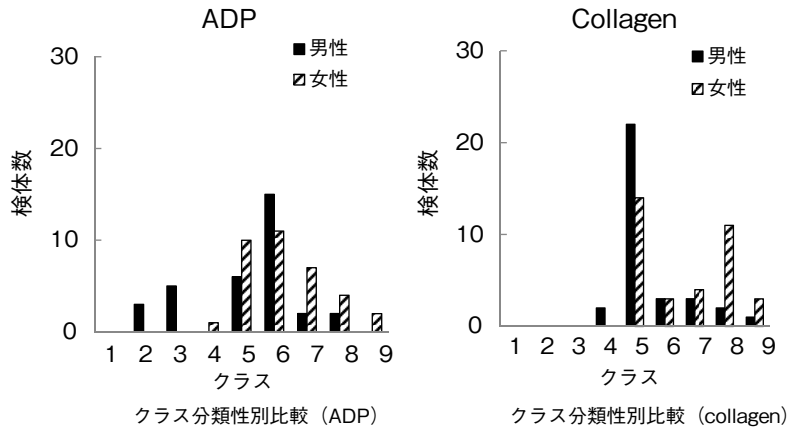


図4 クラス分類性別比較, 性別比較: ADP, collagen

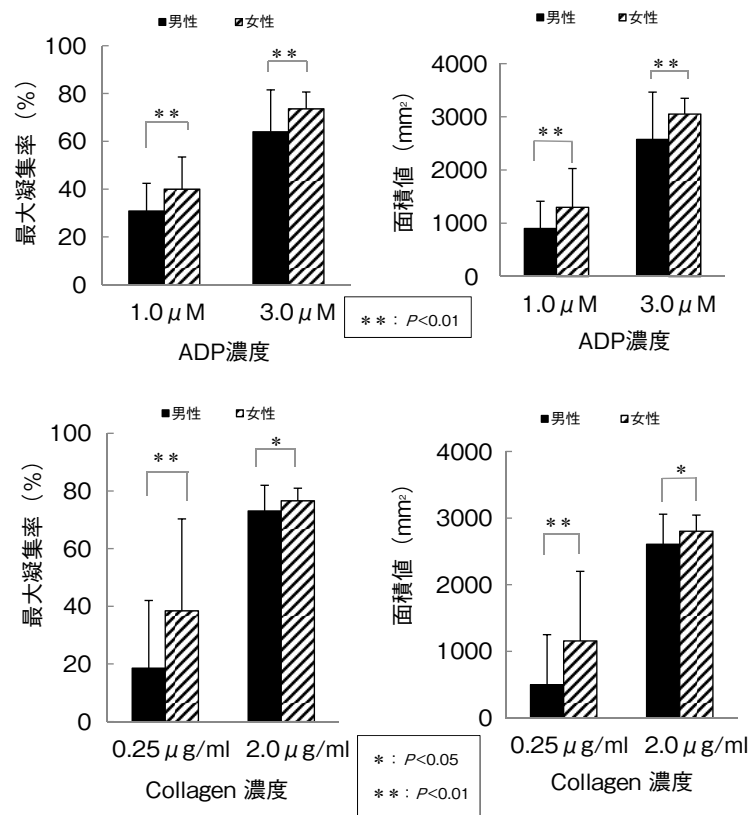


図5 最大凝集率および面積値の性別比較: ADP, collagen

結果

1. 各2濃度における性別のクラス分類については、ADP刺激では、男性のみ低下例が見られ、ピークは男女共クラス6であり、女性が高いクラス(7,8,9クラス)が多かった。また、collagen刺激では、男性でクラス4,5が多く、女性は、5,8にピークがあった(図4)。

2. 最大凝集率と面積値についての性別比較では、ADPとcollagen刺激共、低濃度も高濃度も性別で差が認められ、女性のほうが男性より高かった(図5)。その危険率は、ADPの低濃度、高濃度およびcollagenの低濃度では、 $P < 0.01$ であり、collagenの高濃度のみ、 $P <$

0.05であった(図5)。

3. collagen刺激のlagtimeは、男性より女性の方が短く、 $P < 0.05$ であった(図6)。

4. 女性の方が男性より血小板凝集能が亢進しているという結果は、藤田らの文献⁽¹⁰⁾の20代のクラス分類結果と一致した(図7)。

考察および結論

我々の血小板凝集能の結果では、男性のみ低下例があり、男性より女性に亢進例が多かった。これは、最終的なクラス判定だけではなく、最大凝集率と面積値の個別

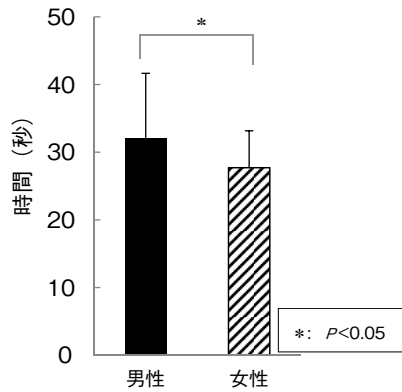


図6 Lagtime (collagen) 性別比較

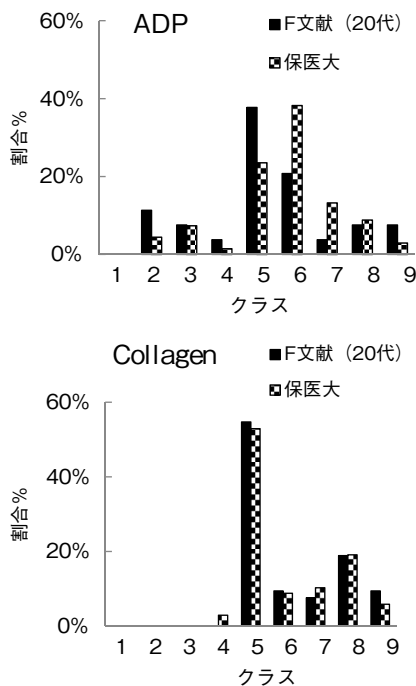


図7 他文献とのクラス別比較 (年齢: 20代)

の結果もすべて同様であった。藤田らの文献¹⁰⁾では、年齢別の性別比較はされていなかった。しかし、20代から70代までの350例(男性170例、女性180例)のうち、凝集能低下は男性14例・女性5例、凝集能亢進は、男性22例・女性44例であった。すなわち、低下例が男性に有意($P=0.021$)に多く、亢進例は女性に有意($P=0.004$)に多いという結果であった。また、対象者の年齢に相当する文献比較の結果も結果4(図7)のように一致した。この藤田らの文献¹⁰⁾では、年齢階層別健常人(20, 30, 40, 50, 60, 70歳代)のADPとcollagenのクラス別割合が示されていたが、興味深いのは、20歳代が低下も亢進も一番多かったことである。また、通常高齢になると血小板凝集亢進者が増加すると考えられているが、健常人では全年代にわたって亢進が高率になることはない¹⁰⁾と結論されている。これは、例えば、高齢者になると高血圧や脂質異常症などが増加してくるなど、健常とされ

る対象者が減少してくることが関与していると考えられるべきであろう。

Collagenのlagtimeが男性より女性で短かった($P<0.05$)ということは、collagenと接触した血小板が放出する血小板活性化物質(ADP, TXA2(thromboxane A2)など)による二次凝集が女性の方が男性より強いことを示しており、女性の凝集能が亢進していたことと一致する。この男女差は、月経や出産に関する女性特有のホルモン等の影響があるとも考えられるが、推測の域を超えず、検討が必要である。

血小板凝集能検査を行う目的として、出血傾向(血小板機能低下の検索)、血栓傾向(血小板機能亢進の検索)、抗血小板薬の効果判定がある。2008年報告のアンケート調査¹⁾による目的調査では、複数回答可で、血小板機能低下の検索37%、血小板機能亢進の検索67%、抗血小板薬の効果判定84%で、22%は不明であった。尚、アンケートでは、採血条件(採血針、駆血)、遠心までの時間、遠心分離条件、血小板数補正の有無、惹起物質の濃度、報告条件など、施設による諸条件が施設によって大きく異なっている点の指摘^{1, 3)}があり、標準化により、特に血栓症に対するモニタリングへの評価が高くなると考えられる。

また、血小板凝集能亢進の是正が、脳の白質病変を抑制するという報告¹¹⁾もあり、血小板凝集が与える影響は多岐にわたる。よって標準化が進み施設間是正が行われれば、血栓性疾患や認知症検査へのさらなる期待が寄せられると思われる。

今回、学内実習への導入に向け、諸条件を決定し、学内実習で検体となる20代学生の健常データを検討した。この検討を今後の実習にいかし、学生の課題レポートとして、論文検索や考察の一助になればと考えている。

参考文献

- 1) 佐藤金夫, 清水美衣, 小野さおり, 後藤秀之ほか. アンケートにみる血小板凝集能検査測定法の現状—血小板凝集能検査の標準化にむけて—. 日本検査血液学雑誌 9(2): 167-177, 2008.
- 2) Patrono C, Garcia R LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. N Engl J Med 353(22): 2373-2383, 2005.
- 3) 丸尾理恵, 金子 誠. 血小板凝集能検査. 検査と技術 43(2): 110-116, 2015.
- 4) 松野一彦. 血小板関連検査と血栓症. 臨床検査. 58(8): 956-966, 2014.
- 5) 松野一彦, 重松雅彦, 宇佐美貴之. 抗血栓薬の基礎知識. Medical Technology. 40(11): 1180-1184, 2012.
- 6) 服部 晃, 本間義章, 布施一郎, 犬塚 貴ほか. 凝

- 集抑制目標を設定した抗血小板療法（微量アスピリン・チクロピジン併用）による脳血栓の再発防止
Clinical Pharmacotherapy 2(2) : 154-157, 1996.
- 7) Eto K, Takeshita S, Ochiai M. Platelet aggregation in acute coronary syndromes : use of a new aggregometer with laser light scattering to assess platelet aggregometet with laser light scattering to assess platelet aggregability. Cardiovasc Res 40(1) : 223-229, 1998.
- 8) Born GV, O' Brien. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 194 : 927-929, 1962.
- 9) 尾崎由紀夫. 散乱光を用いた血小板凝集能の検査. 臨床病理 96(特) : 46-55, 1993.
- 10) 藤田稠清, 石川 誠, 岡田 聰. 健常者の血小板凝集能の年齢階層別性別分布—2 濃度パターンコンピュータ解析法による分析—. 機器・試薬22(4) : 315-320, 1999.
- 11) 藤田稠清. 血小板凝集能亢進の是正で白質病変の体積増加は 1 / 3.9 に抑制される—是正, 非是正 2 群比較—. Dementia Japan 24(1) : 46-56, 2010.

Abstract

The author used the apparatus for platelet aggregation test, whose measurement results are said to vary considerably among facilities, for laboratory practice at the university. The subjects were students aged 20 to 22 years. Their platelet aggregation was tested by measuring the concentrations of adenosine diphosphate (ADP) and collagen under the normal mode. The decline in ADP-induced platelet aggregation was observed only for male subjects, and ADP-induced platelet aggregation for female subjects was higher than that for male subjects ($p < 0.01$). Collagen-induced platelet aggregation showed the same tendency, but only p-value of high concentration cases was $p < 0.05$. The lag time of collagen stimulation for female subjects was shorter than that for male subjects. This indicates that the secondary platelet aggregation is more efficient for women. The result indicating that women have more efficient platelet aggregation than men is consistent with the report by Fujita, et al.

受付日 2015年10月8日
受理日 2016年1月27日