

凝集計を用いたストップ・アンド・フロー法による
血小板形態の定量法
—濃厚血小板の保存における品質管理への応用—

大軒 子郎 柴田 弘俊

大阪府赤十字血液センター

(平成8年11月5日受付)

(平成9年3月17日受理)

EVALUATION OF PLATELET SHAPE BY A STOP AND FLOW
METHOD USING AGGREGOMETER:

Application to Quality Control of Stored Platelet Concentrates

Shiro Ohnoki and Hirotoshi Shibata

Department of Research, Osaka Red Cross Blood Center

Platelets change from a discoid to a spherical shape during storage or on activation. Discoid platelets show higher transmittance in the flow state than at rest, but spherical platelets do not. We developed a method for evaluation of platelet shape from the transmittance of PRP using this property. A switch for disconnecting the electrical signal to the recorder and speed controller was attached to the platelet aggregometer, such that it was able to determine the transmittance of PRP at desired stirring rates. Transmittance showed maximum increase at the speed of 800 rpm. The content of spherical platelets was expressed by the extinction ratio (E_s/E_0) of PRP based on light-scattering theory. Extinction was linearly proportional to the concentration of platelets below $3 \times 10^8/\text{ml}$. E_s/E_0 values correlated with the percentage of spherical platelets but were independent of platelet count and extinction of PRP. Fresh PC had an E_s/E_0 value of 0.81 ± 0.02 , with this value of increasing gradually with storage time at 22°C with agitation. These findings demonstrated that it is possible to estimate the shape of platelets with a standard aggregometer by determining the transmittance of PRP at rest and flow.

Key words: platelet shape change, light transmittance platelet concentrates, platelet storage

はじめに

血小板は生体内においては薄い円盤状をしており、通常はこの状態で血液中を循環している。しかし、血小板は環境の変化に対して極めて鋭敏な細胞であり、異物面との接触、機械的ストレス、低温、EDTAのような抗凝固剤、ADPやトロンビンなどのアゴニスト（凝集惹起剤）により円盤状（ディスク型）から球状（スフィヤ型）に変化する。この形態変化を定量することは、臨床上あるいは輸血用血小板の保存条件の評価において重

要である。

現在のところ、血小板の形態を定量する満足すべき方法はない。従来から行われている光学顕微鏡や電子顕微鏡による形態観察は判定が難しく、主観的な要素が入りやすい欠点があった。また、形態の定量化には従来から Kunicki らのスコアリング法¹⁾が用いられているが、形態をどの程度反映しているかについては問題がある。

円盤状と球状の細胞の光学的性質は静止時と流動下では差がある²⁾。即ち、ディスク型血小板

は流動下で透過率が静止時より増加するが、スフィヤ型血小板は変化しない。この性質を利用した血小板形態の定量については、既にいくつかの報告^{3)~6)}があるが、本邦ではまだ応用された例がない。我々は通常の血小板凝集計を用いて、その方法の最適条件と実用性について検討し、簡単に客観的な血小板形態の定量法を確立したので報告する。

材料および方法

1. 多血小板血漿 (PRP)、乏血小板血漿 (PPP) および濃厚血小板 (PC) の調製

PRP は全血 (抗凝固剤, ACD-A 液) を 1,200rpm (270G) で 7 分, PPP は 3,200rpm (2,000G) で 10 分遠心することにより調製した。PC は全血を 4,000rpm で 6 分遠心した後、血液自動分離装置を用いて分取したパフィコート を 1,280rpm で 3 分遠心することにより調製した。

2. 凝集計の改造

PRP の透過率の測定には血小板凝集能測定装置 (NBS ヘマトレーサー 801, キュベットの内径: 6mm) を一部改造して用いた。即ち、スピードコントローラーを取り付け、回転速度を 300~1,000rpm の範囲で変えられるようにした。また、各チャンネルにスイッチを導入し、レコーダーへの電気信号の出力が制御できるようにした。このスイッチが OFF の状態ではチャートの基線は透過率 0 を表わし、ON の状態では試料の透過率を表わす。

3. PRP の透過率の測定

凝集計のレコーダーへの電気信号スイッチは OFF の状態に、インキュベーションタイムは 2 分に設定しておく。対照槽に水または PPP を入れ、試料槽 (チャンネル 1~8) に PRP を挿入する。スピードコントローラーは OFF の状態で測定を開始 (この時、基線は透過率 0 を表わす)、約 1 分後、各チャンネルのスイッチを ON にすると、試料の静止状態での透過率 T_0 が測定できる。インキュベーションタイム終了後、点滅ランプの横にある 0% 再較正ボタンを押して試料の透過率を基線に合わせた後、スピードコントローラーで回転させ、相対透過率の増加 T_r を記録する。この操作は回転

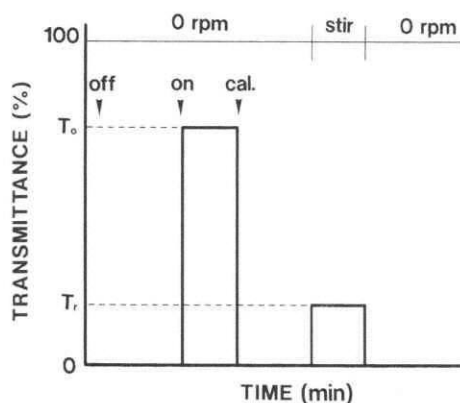


Fig. 1 Determination of transmittance of PRP with a remodeled aggregometer. Procedure: (1) water or PPP is placed in the reference holder and PRP in the sample holder, (2) recording is started with the switch off and without stirring (baseline shows 0% transmittance), (3) switch on (recorder shows $T_0\%$ of PRP), (4) button is pushed for calibration (baseline shows transmittance of PRP), (5) stirring (recorder shows the increase in relative transmittance), (6) stirring is stopped.

による透過率の変化を拡大して観測するためである (Fig. 1 参照)。X rpm 回転時の PRP の透過率 T_x は次式により算出した。

$$T_x = T_0 + T_r (1 - T_0 / 100)$$

血小板による吸光度 E_x は PPP の透過率 T_{PPP} より次式により求めた。

$$E_x = -\log(T_x / T_{PPP}) \quad (1)$$

血小板の形態は 800rpm 回転時と静止時の吸光度の比 E_0/E_0 を指標として表わした。なお、PRP の透過率の測定はすべて 37°C で 30 分インキュベーションした後、10, 20, 30 万 $/\mu\text{l}$ の 3 点濃度で行った。

4. 理論

光散乱理論によれば希薄懸濁液の吸光度 E は次式に従う。

$$E = KCL$$

ここに C は血小板の濃度、 L はキュベットの厚さ、 K はキュベットの形状、回転速度、血小板の形態によりきまる固有の定数である。ここで p をスフィヤ型血小板の比率、 K_0 、 K_x をディスクイド

型血小板の静止時と X rpm 回転時の定数, K'_0 , K'_x をスフィヤ型血小板の静止時と回転時の定数とすると

$$E_x = pK'_x CL + (1-p)K_x CL$$

$$E_0 = pK'_0 CL + (1-p)K_0 CL$$

従って,

$$\begin{aligned} \frac{E_x}{E_0} &= \frac{pK'_x + (1-p)K_x}{pK'_0 + (1-p)K_0} \\ &= \frac{p(K'_x/K_0) + (1-p)(K_x/K_0)}{p(K'_0/K_0) + (1-p)} \end{aligned} \quad (2)$$

ディスク型血小板の静止時の吸光度とスフィヤ型の血小板の吸光度は殆ど等しく, スフィヤ型血小板の吸光度は回転により変化しないので $K'_0 = K'_x = K_0$ とすると次の近似式を得る.

$$E_x/E_0 = p + (1-p)K_x/K_0 \quad (3)$$

変形するとスフィヤ型血小板の含量は次のようになる.

$$p = \frac{E_x/E_0 - K_x/K_0}{1 - K_x/K_0} \quad (4)$$

(2)式において K_x/K_0 , K'_0/K_0 , K'_x/K_0 はディスク型血小板とスフィヤ型血小板の吸光度の濃度依存性から決まる定数なので E_x/E_0 はスフィヤ型の含量の比率 p の関数となる. また, E_x/E_0 を測定すれば(4)式よりスフィヤ型の含量がわかる.

結果

1. 回転速度と透過率の関係

回転速度と相対透過率の関係を Fig. 2 に示した. 回転による相対透過率の増加は400~800rpm で大きな差はなかったが, 平均値は800rpm で最大を示し, 300rpm および1,000rpm では低下(いずれも $n=12$) した.

2. 形態に及ぼす低温と ADP の影響

PRP を 4°C で一昼夜保存すると回転による透過率の増加は殆ど無くなった. また, 5mM EDTA 存在下で $10\mu\text{M}$ ADP を添加した時も同様な現象が見られた (Fig. 3).

3. 血小板濃度と吸光度の関係

全血より調製した新鮮な PRP について各種濃度の血小板を含む PRP の透過率を静止状態と 800rpm で測定し(1)式により求めた吸光度の結果を Fig. 4 に示した. 血小板濃度が $25\sim 30$ 万/ μl

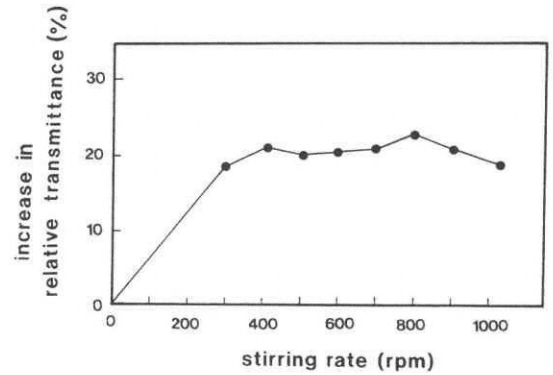


Fig. 2 Relative transmittance at various stirring rates (mean, $n=12$).

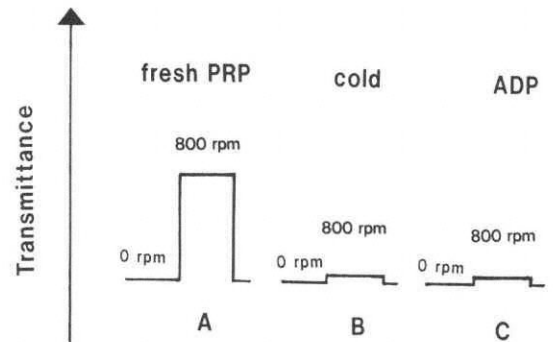


Fig. 3 Effect of cold and ADP on the shape of platelets. A: fresh PRP, B: stored at 4°C for one day, C: fresh PRP in the presence of $10\mu\text{M}$ ADP and 5mM EDTA.

までほぼ直線性を示した. また, 回転すると吸光度は低下した. 吸光度の比 E_8/E_0 は 0.81 ± 0.02 ($n=11$) であった. また, 5mM EDTA と $20\mu\text{M}$ ADP の存在下では PRP の吸光度は回転により殆ど変化せず, E_8/E_0 は $0.97\sim 1.00$ であった.

4. ディスク型とスフィヤ型血小板の混合物の E_8/E_0

PRP を 22°C で一日振盪保存したもの(ディスク型)と 4°C で一晩静置保存したもの(スフィヤ型)を各種の比率で混合した PRP について, 静止時と 800rpm 回転時の透過率を測定した. 回転時と静止時の PRP の吸光度の比 (E_8/E_0) はスフィヤ型の量に応じて増加し, スフィヤ型が 100% では 0.97 の値を示した. 完全に 1 にならないのは

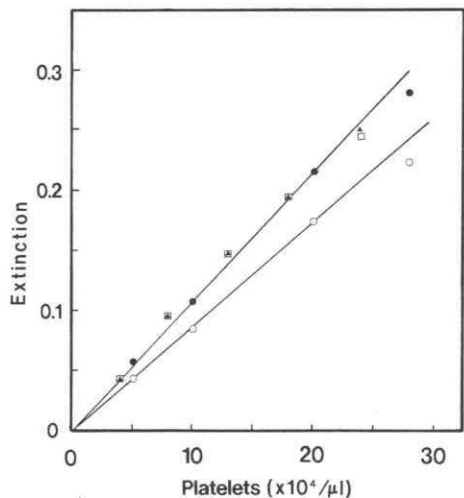


Fig. 4 Effect of platelet count on extinction of fresh PRP at 0rpm (●) and 800rpm (○) and on extinction of PRP in the presence of 20μM ADP and 5mM EDTA at 0rpm (▲) and 800rpm (□) (mean, n=11).

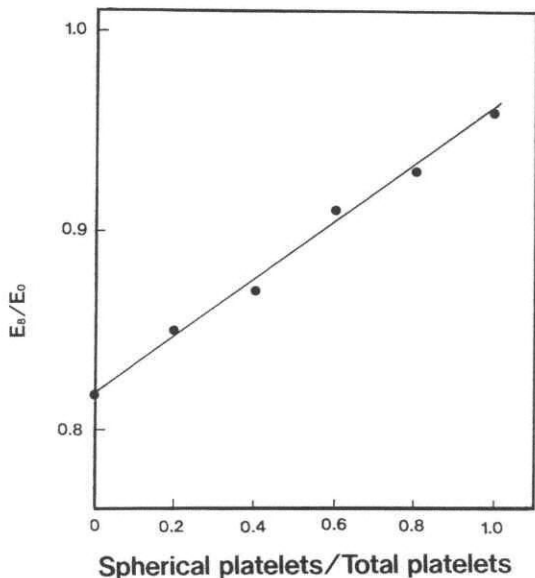


Fig. 5 E_s/E_0 values obtained with a mixture of discoid and spherical platelets.

スフィヤ型といっても完全な球形ではないためである (Fig. 5).

5. PC 保存中の血小板形態の経時変化

400ml 由来 PC を 22°C で振盪保存した時の血小

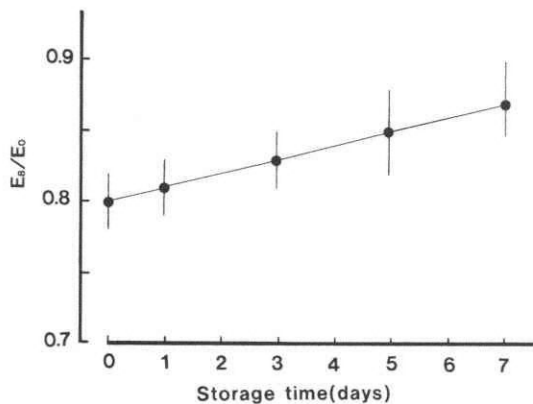


Fig. 6 E_s/E_0 values of PC stored at 22°C with agitation (mean±SD, n=6).

板の E_s/E_0 の経時変化を Fig. 6 に示した。スフィヤ型血小板の含量を反映する E_s/E_0 は 1 日後で殆ど変化せず、以後、保存とともに緩やかに上昇し 7 日で 0.87 ± 0.03 に、10 日には 0.90 ± 0.05 の値を示した。5 日保存後に pH が 6.2 以下に低下した例があったが、この検体の E_s/E_0 は 7 日で 0.93 であった。これは殆どスフィヤ型であることを示している。成分献血由来の PC-10 についても調べたが、1 日で 0.81 ± 0.03 、3 日で 0.83 ± 0.02 、5 日で 0.86 ± 0.02 、6 日で 0.87 ± 0.02 (いずれも $n=6$) となり、PC-2 とほぼ同様の結果を得た。

考 察

従来、血小板形態の観察は光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いて行われてきた。また、その定量法として Kunicki らのスコアリング法¹⁾が用いられてきた。我々も以前 PC の保存に伴う血小板形態の変化を走査型電子顕微鏡を用いて観察した⁷⁾。しかし、この方法は煩雑であり主観による要素が入りやすい欠点があった。また、Kunicki らの方法に従ってスコアリングを行ったが、その配点法には後で記述するように、偽足型とスフィヤ型の配点を逆にした方が合理的と考えられるなどの疑問があった。

非対称な形態をした細胞の懸濁液の透過率は流動により影響を受けることは既に知られている²⁾。細胞は静止状態では無秩序な方向を向いているが、流動下では流動の方向に対して細胞の長

軸が平行になるように並ぶ。即ち、流線の方向に対して垂直な断面が最小になるように配向する。このことにより透過光は流動下では静止時より増加する。同様の現象は凝集計のキュベットの中にある血小板浮遊液の中でも働いていると考えられる。

Holme らはこの原理を利用して、透過率の測定から血小板の形態が客観的に評価できることを示した³⁾。この方法は簡便ですぐに応用できるにも関わらず、本邦ではまだ応用された報告はない。

実際、凝集計で PRP の透過率を静止時と回転時で測定すると、回転時に透過率は増加した。一方、血小板は低温にさらしたり、ADP の存在によりディスク型からスフィヤ型に変化することが知られている^{8)~10)}が、このような処理により血小板浮遊液の静止時と回転時の透過率の差は殆ど無くなった (Fig. 3)。

この原理を応用してディスク型 (またはスフィヤ型) の含量を定量する方法を検討し、手近にある凝集計を用いて血小板形態の定量が可能であることを示した。

血小板凝集計は本来、相対透過率 (PRP の透過率が 0, PPP の透過率が 100) が表示されるように作られているので、真の透過率が測定出来るようにするため、レコーダーへの出力が 0 になるようにスイッチを導入し、スイッチ OFF の状態ではレコーダーの基線が透過率 0 を、スイッチが ON の状態では透過率を表わすようにした。また、静止時と回転時の透過率が測定出来るようにスピードコントローラーを取り付けた。この改造により、任意の回転速度における PRP の真の透過率と相対透過率が測定出来るようになった。Fig. 2 は回転による透過率の変化を相対透過率で見たものであるが、回転速度が 800rpm の時が最も大きかった。1,000rpm では 800rpm の時より 10~20% 低値を示した。従って、本研究では PRP の透過率を 0 と 800rpm で測定し、形態の指標として E_s/E_0 を用いた。普通、凝集計は 1,000rpm で固定されており、そのまま測定しても透過率の変化を記録することが出来る。但し感度は 800rpm の時より若干落ちることになる。Holme らは小さいキュベッ

ト (6.5mm 径) を用いた場合、透過率は 200rpm で静止時の値より減少し、700rpm で最大を示したと報告し、彼らは形態の指標として E_7/E_2 を用いた³⁾。しかし、我々の実験ではこのような現象は観察されなかった。また、Patscheke ら⁴⁾は 8mm のキュベットを用い 400rpm を、Trenchard⁵⁾は 7.7mm のキュベットを用い 900rpm で測定した。これらの違いはキュベットの大きさ、攪拌子の形状や凝集計の違いによるものと思われる。

この静止時と回転時の透過率の差はそれらの吸光度の比 (E_s/E_0) として標準化することが出来る (理論参照)。(2)式からわかるように、この値は血小板の濃度や吸光度に無関係な量となり、PRP 中のスフィヤ型血小板の割合によってのみ決まる。

新鮮な PRP の E_s/E_0 は 0.81 ± 0.02 であった。また、4°C で保存した PRP や ADP 処理した PRP (スフィヤ型) の透過率は回転により殆ど変化せず E_s/E_0 は $0.97 \sim 1.00$ であった。そして、Fig. 5 に示す如くこの値はスフィヤ型の含量に応じてほぼ直線的に変化した。従って、 E_s/E_0 は血小板の形態の指標として使うことができる。

この方法で PC の保存に伴う血小板形態の経時変化を調べたところ、 E_s/E_0 は 1 日後は殆ど変化せず、3 日目からは緩やかに増加した。我々は以前、走査型電子顕微鏡を用いて、PC の保存に伴う血小板形態の変化を観察し、Kunicki らのスコアリング法により形態の定量化を行ったが、スコアは初日が 310 点で 2 日までに 350 点に上昇し、以後、4 日までほぼ一定であった。この方法はディスク型が 100% の場合 400 点となるので、ディスク型は初日の 78% から 2 日後に 88% まで若干増加することを意味している。この結果は今回 E_s/E_0 で評価した形態変化とは必ずしも一致しなかった。これは本法が細胞のふくらみ具合を細胞の全集団について統計的に評価しているのに対して、Kunicki らの方法はディスク型 4 点、スフィヤ 2 点、偽足の出ているもの 1 点、その他を 0 点として評価していることによるものと思われる。血小板は活性化によりディスク型から偽足を出した状態を経てスフィヤ型に移行するので、偽足型とスフィヤ型の配点は逆にする方が合理的で

あると思われる。

血小板の形態の変化と *in vivo* の生存率とはよく相関することが知られている¹¹⁾¹²⁾。従って、 E_8/E_0 を測定することは血小板の機能を評価する *in vitro* 検査法として極めて有用であると思われる。また、この方法は主観によらないで客観的に形態を定量化できる点で優れている。

まとめ

1. ディスコイド型血小板は流動により透過率が増加するが、スフィヤ型は変化しない。この原理を応用して PRP の透過率の測定から血小板の形態を定量する方法を検討した。

2. 凝集計を改造して任意の回転数における PRP の透過率と相対透過率が測定出来るようにした。

3. 800rpm と静止時の PRP の吸光度の比 E_8/E_0 はスフィヤ型の量に応じて増加した。

4. PC の E_8/E_0 値は初日が 0.81 で保存と共に緩やかに増加した。

5. 本法は血小板の形態を定量的、客観的に評価するのに有用である。

文 献

- 1) Kunicki, T.J., Tuccelli, M., Becker, G.A. and Aster, R.H.: A study of variables affecting the quality of platelets stored at "Room Temperature". *Transfusion*, 15: 414-421, 1975.
- 2) Frojmovic, M.M.: Rheo-optical studies of blood cells. *Biorheology*, 12: 193-202, 1975.
- 3) Holme, S. and Murphy, S.: Quantitative measurements of platelet shape by light transmission study; application to storage of platelet for transfusion. *J. Lab. Clin. Med.*, 92: 53-64, 1978.
- 4) Patscheke, H., Dubler, D., Deranleau, D. and Luscher, E.F.: Optical shape change analysis in stirred and unstirred human platelet suspensions. A comparison of aggregometric and stopped-flow turbidimetric measurements. *Thromb. Res.*, 33: 341-353, 1984.
- 5) Trenchard, P.H.: Continuous monitoring of platelet morphology during small-scale *in vitro* storage. *Vox Sang.*, 51: 185-191, 1986.
- 6) Funheer, R., Pietersz, R.N.I., de Korte, D. and Roos, D.: Monitoring of platelet morphology during storage of platelet concentrates. *Transfusion*, 29: 36-40, 1989.
- 7) 杉本昭子, 大軒子郎, 山口英夫, 大久保康人: 濃厚血小板の保存に伴う血小板の形態変化. *血液事業*, 11: 5-10, 1988.
- 8) Holme, S. and Murphy, S.: Coulter counter and transmission studies of platelets exposed to low temperature, ADP, EDTA, and storage at 22°C. *J. Lab. Clin. Med.*, 96: 480-493, 1980.
- 9) Baythoon, H., Tuddenham, E.G.D. and Hutton, R.A.: Morphological and functional disturbances of platelets induced by cryopreservation. *J. Clin. Pathol.*, 35: 870-874, 1982.
- 10) Winokur, R. and Hartwig, J.H.: Mechanism of shape change in chilled human platelets. *Blood*, 85: 1796-1804, 1995.
- 11) Solberg, C., Holme, S. and Little, C.: Morphological changes associated with pH changes during storage of platelet concentrates in first generation 3-day container. *Vox Sang.*, 50: 71-77, 1986.
- 12) Murphy, S., Rebull, P., Bertolini, F., Holme, S., Moroff, G., Snyder, E. and Stromberg, R.: *In vitro* assessment of the quality of stored platelet concentrates. *Trans. Med. Rev.*, VIII: 29-36, 1994.