

Behçet 病の血小板機能

—血小板凝集能について—(図4, 表2)

大曾根倫子・吉川 啓司・小暮美津子 (東京女子医科大学眼科学教室)

Platelet Function in Patients with Behçet's Disease

—A Study on Platelet Aggregability—

Tomoko Ohsone, Keiji Yoshikawa and Mitsuko Kogure

Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical College

要 約

眼症を有する Behçet 病27例および健常者20例を対象として、Born-O'Brien による比濁法を用いて血小板凝集能測定を行い、ADP および epinephrine 添加により得られる最大凝集率と二次凝集の出現頻度について検討した。ADP, epinephrine 添加のいずれの場合にも、Behçet 病の発作期と寛解期における最大凝集率および二次凝集の出現頻度は、発作期に最も高く次いで寛解期に有意に高値を示した。また正常では二次凝集を生じない刺激に対しても本症では二次凝集を認めた。以上より、Behçet 病では発作期のみならず寛解期にも血小板凝集能が亢進していることが示唆された。これから、血小板凝集能の亢進は Behçet 病の病態自体の特徴であると考えられた。(日眼 92:188—193, 1988)

キーワード: Behçet 病, 血小板凝集能, 最大凝集率, 二次凝集

Abstract

Platelet aggregability in 27 patients with Behçet's disease showing ocular manifestation was examined by means of the optical density method of Born and O'Brien. Twenty normal subjects served as controls. ADP-or epinephrine-induced maximum aggregation rates were found to be significantly greater for patients with Behçet's disease in the ocular attack stage (median value; 63%, 72%) and remission stage (45%, 30%) than those in the control group (34%, 21%) ($p < 0.001$, $p < 0.001$ between attack and control, $p < 0.01$, $p < 0.01$ between remission and control). In addition, the figures for the ocular attack stage were significantly greater than those of the remission stage ($p < 0.05$, $p < 0.05$). Secondary aggregation following the addition of ADP or epinephrine was also examined. The secondary aggregation frequency was significantly greater for patients with Behçet's disease in the ocular attack stage than those in the remission stage or the control group ($p < 0.05$, $p < 0.01$). The figures for the remission stage of Behçet's disease were greater than those for the control group ($p < 0.05$). These results indicated that a considerable increase in platelet aggregability took place in the ocular attack stage and even in the remission stage of Behçet's disease. In light of this, it seems that the increased platelet aggregability might be caused by Behçet's disease itself. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 188—193, 1988)

Key words: Behçet's disease, Platelet aggregability, Maximum aggregation rate, Secondary aggregation

別刷請求先: 162 東京都新宿区河田町 8—1 東京女子医科大学眼科学教室 大曾根倫子 (昭和62年 8月31日受付)

Reprint requests to: Tomoko Ohsone, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tokyo Women's Medical College

8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

(Accepted August 31, 1987)

I 緒 言

我々はすでに Behçet 病の発作期には、血小板特異蛋白である血小板第 4 因子 (PF4), β -thromboglobulin (β TG) が高値をとり、血小板活性化が亢進していることを報告した¹⁾。これは Behçet 病患者では眼を初めとする種々の組織に微小血栓が認められるというこれまでの病理組織学的所見²⁾を、血小板凝集の面から裏付けるものであった。

血小板活性化が生じる原因としては、血小板自体の機能亢進あるいは血小板に対する凝集刺激の亢進が考えられる。

これまでも Behçet 病では血小板自体の機能の一つである血小板凝集の亢進が認められ、またその変動が臨床経過と関連する場合があることが報告されている^{3)~6)}。しかし本症の臨床病態の特徴である活動性の変動と血小板凝集能の関連は検討されていない。

そこで、今回、Behçet 病の活動性が臨床的に発作、寛解として明らかに把握し得る眼症状を対象とし、血小板機能の亢進の有無、特に血小板凝集能の関連を、Born-O'Brien による比濁法^{7,8)}を用い検討したので報告する。

II 方 法

1. 対象

昭和61年4月より昭和62年5月までに東京女子医科大学眼科ぶどう膜外来を受診した、厚生省診断基準を満たす Behçet 病27症例を対象とした。うちわけは男性16例(25~62歳、平均38.2歳)、女性11例(24~64歳、平均42.9歳)で全例が網脈絡膜炎型の眼症を有していた。また、このうち19例がそれぞれコルヒチン、プレジニン、シクロスポリンを単独使用または併用していたが、その用量、用法に観察期間中変更はなかった。非ステロイド性抗炎症剤、抗凝固剤、抗血小板剤などの薬剤を服用している例は対象から除外した。

コントロールとして、対象と性別および年齢のほぼ一致した健康人20例を用いた。

2. 方法

血小板凝集能の測定は Born-O'Brien による比濁法^{7,8)}を用いた。

1) 検体の採取

空腹時に21ゲージ針をつけたプラスチック製注射器を用いて肘静脈より採血し、あらかじめ3.1% trisodium citrate 0.5ml を入れたプラスチックチュー

ブに4.5ml を加え充分混和した。これを22℃, 70G にて15分間遠沈しその上清の一部を血小板多血漿 platelet rich plasma (PRP) として得、さらにその残りを22℃, 2,500G にて30分間遠沈し乏血小板血漿 platelet poor plasma (PPP) を作成した。次に PRP の血小板数を20万~30万/ μ l に調整した。すなわち血小板数が30万/ μ l 以上のときには PPP にて希釈し、また20万/ μ l 以下の場合には対象から除外した。

2) 凝集惹起剤

凝集惹起剤として adenosin diphosphate (ADP) ならびに epinephrine を用いた。

ADP (Sigma 社) を蒸留水で溶解し、10 μ M, 1 μ M に調整した。このうち25 μ l を225 μ l の PRP に添加し、終濃度1.0 μ M, 0.1 μ M で測定を行った。

epinephrine (ボスミン[®], 第一製薬) は蒸留水で1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml に希釈し、各々このうち25 μ l を225 μ l の PRP に添加した。すなわち終濃度0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml で測定を行った。

以下、ADP, epinephrine の濃度は全て終濃度で記載した。

3) 凝集能検査

血小板凝集計は Dual Sample Aggregometer, Model DP-247-E (Sienco 社) を用い、ガラス小キューベットに225 μ l の PRP をとり、これに25 μ l の凝集惹起剤を加え攪拌した。この検体の光透過率を縦軸、時間を横軸として透過率の変化を凝集曲線として連続記録した。測定条件は温度37℃, スターラー回転速度1,000rpm, 記録紙速度2cm/分とした。

なお測定は採血後3時間以内に行い、検体は測定に供するまで室温保存した。

4) 凝集曲線の解析

凝集曲線より最大凝集率を求めた。すなわち凝集惹起剤添加後の PRP の光透過率の最大変動幅を、PRP と PPP の光透過率の差で除して百分率で表し最大凝集率とした。

また、凝集曲線の形状より一次凝集すなわち凝集惹起剤添加後最初にみられる可逆的な凝集と、二次凝集すなわち一次凝集に続いてみられる非可逆的な凝集とを読み取り⁹⁾、一次凝集に留まるものと二次凝集を示すものに分類し、二次凝集の出現頻度を調べた。

なお、最大凝集率は ADP 1.0 μ M, epinephrine 0.1 μ g/ml 添加について、二次凝集の出現頻度は ADP 1.0 μ M, 0.1 μ M, epinephrine 0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml について検討した。

5) 病期の設定

問診, 眼科的諸検査で同定した眼発作開始日より7日以内の検体を眼発作期とし, 一方少なくとも検査前14日, 検査後7日間眼発作を認めないときの検体を寛解期とした。また病期の検討に際しては, 検査前後7日間以内に眼外症状を認めた時に得られた検体を除いた。

6) 統計学的検定

2群間の差の検定には Wilcoxon の順位和検定あるいは符号付き Wilcoxon 検定を, 出現頻度の差の検定には Fisher の直接確率検定を用いた。

III 結 果

1. 最大凝集率

1) Behçet 病の発作期, 寛解期およびコントロールの比較

(1) $1.0\mu\text{M}$ ADP 添加時 (図1)

$1.0\mu\text{M}$ ADP 添加時の最大凝集率はコントロールで

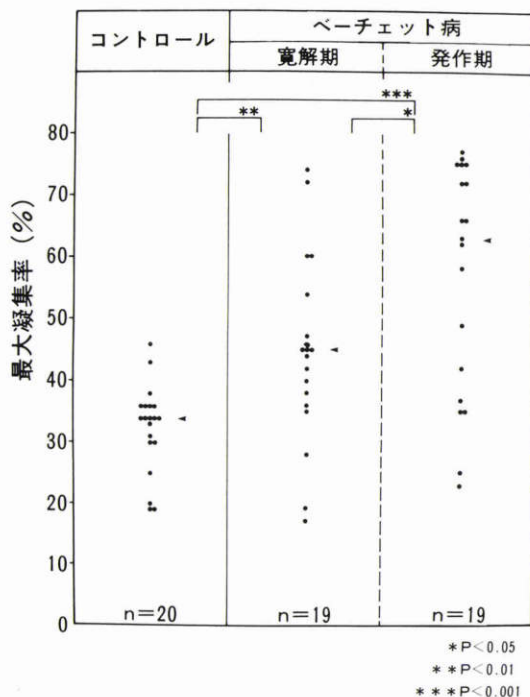


図1 $1.0\mu\text{M}$ ADP 添加時の Behçet 病の寛解期, 発作期およびコントロールにおける最大凝集率。Behçet 病の発作期および寛解期はコントロールに比べ有意に高値をとった ($p < 0.001$, $p < 0.01$)。また発作期は寛解期よりも高値であった ($p < 0.05$)。◀は中央値を示す。

は19~46% (中央値34%), Behçet 病の寛解期では17~74% (中央値45%), 発作期では23~77% (中央値63%)と, Behçet 病では寛解期においてもコントロールに比べ明らかに高値をとり ($p < 0.01$), また発作期は寛解期に比べさらに高値を示した ($p < 0.05$)。

(2) $0.1\mu\text{g/ml}$ epinephrine 添加時 (図2)

$0.1\mu\text{g/ml}$ epinephrine 添加時の最大凝集率はコントロールでは12~33% (中央値21%), Behçet 病の寛解期では12~78% (中央値30%), 発作期では18~82% (中央値72%)と, Behçet 病では寛解期においてもコントロールに比べ有意に高値をとり ($p < 0.01$), また発作期は寛解期に比べさらに高値を示した ($p < 0.05$)。

2) 同一症例における発作期と寛解期の比較

(1) $1.0\mu\text{M}$ ADP 添加時 (図3)

発作期と寛解期の両期に検査の行えた Behçet 病7例全例で, $1.0\mu\text{M}$ ADP 添加時の最大凝集率は発作期 (37~77%, 中央値72%) において寛解期 (18~70%, 中央値35%) に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

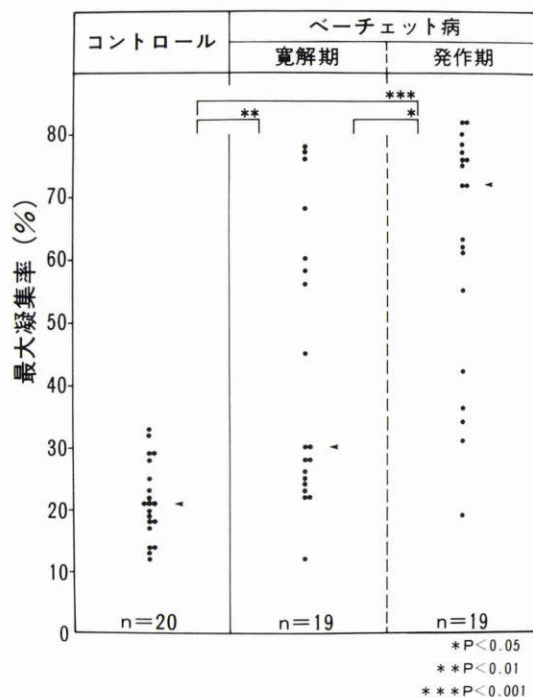


図2 $0.1\mu\text{g/ml}$ epinephrine 添加時の Behçet 病の寛解期, 発作期およびコントロールにおける最大凝集率。Behçet 病の発作期および寛解期はコントロールに比べ有意に高値をとった ($p < 0.001$, $p < 0.01$)。また発作期は寛解期よりも高値であった ($p < 0.05$)。◀は中央値を示す。

(2) 0.1 μ g/ml epinephrine 添加時 (図4)

0.1 μ g/ml epinephrine 添加時の最大凝集率は7例すべてにおいて発作期 (42~82%, 中央値72%) が寛解期 (22~76%, 中央値28%) に比べ明らかに高かった ($p<0.05$).

2. 二次凝集の出現頻度

1) Behçet 病の発作期, 寛解期およびコントロールの比較 (表1)

(1) 1.0 μ M ADP 添加時

二次凝集はコントロール20例中7例35%, Behçet 病では寛解期の19例中9例47%, また発作期の19例中16

例84%でみられた. この出現頻度は Behçet 病の発作期ではコントロールならびに寛解期に比べ有意に高かった ($p<0.01$, $p<0.05$). しかし寛解期とコントロールの間には明らかな差を認めなかった.

(2) 0.1 μ M ADP 添加時

コントロールおよび Behçet 病の寛解期では二次凝集は見られなかった. しかし, Behçet 病の発作期の19例中6例 (32%) で二次凝集が認められ, これはコントロール, 寛解期に比して明らかに高頻度であった ($p<0.01$, $p<0.01$).

(3) 0.1 μ g/ml epinephrine 添加時

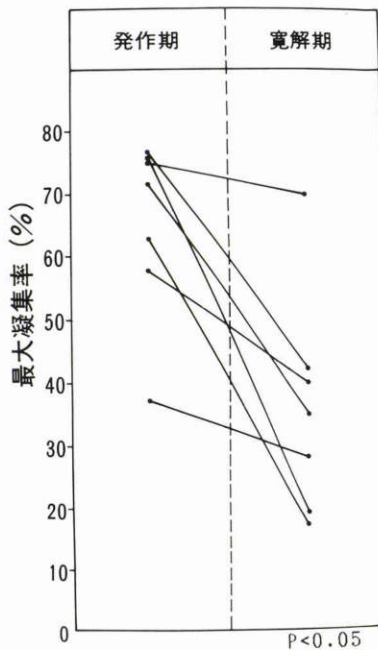


図3 1.0 μ M ADP 添加時の最大凝集率, 発作期と寛解期の両期に測定を行えた Behçet 病7例の比較. 全例で寛解期に比べ発作期に有意に高値をとった ($p<0.05$).

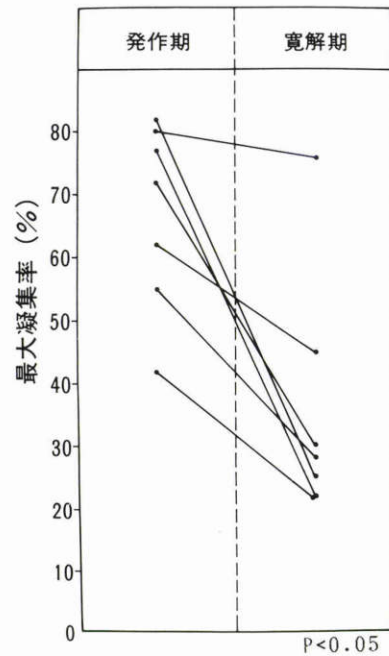


図4 0.1 μ g/ml epinephrine 添加時の最大凝集率, 発作期と寛解期の両期に測定を行えた Behçet 病7例の比較. 全例で寛解期に比べ発作期に有意に高値をとった ($p<0.05$).

表1 1.0 μ Mおよび0.1 μ MADP, 0.1 μ g/mlおよび0.01 μ g/ml epinephrine添加時の二次凝集の出現頻度. Behçet病の発作期, 寛解期およびコントロールの比較.

	ADP		epinephrine	
	1.0 μ M	0.1 μ M	0.1 μ g/ml	0.01 μ g/ml
コントロール	7/20 (35.0%)	0/20 (0.0%)	5/20 (25.0%)	0/20 (0.0%)
ベーチェット度				
寛解期	9/19 (47.4%)	0/19 (0.0%)	11/19 (57.9%)	4/19 (21.1%)
発作期	16/19 (84.2%)	6/19 (31.6%)	17/19 (89.5%)	6/19 (31.6%)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

表2 二次凝集を示した凝集惹起剤の濃度の変化、
発作期と寛解期の両期に測定を行えた Behçet 病
7 例の比較.

寛解期	発作期	例数
ADP		
2.0 μ M 以上	1.0 μ M	5
1.0 μ M	0.1 μ M	2
epinephrine		
1.0 μ g/ml	0.1 μ g/ml	4
0.1 μ g/ml	0.01 μ g/ml	2
0.01 μ g/ml	0.01 μ g/ml	1

(n=7)

二次凝集はコントロール20例中5例25%, Behçet 病では寛解期19例中11例58%, 発作期19例中17例90%でみられ, その出現頻度は Behçet 病の寛解期および発作期でいずれもコントロールに比べ有意に高く ($p < 0.05$, $p < 0.001$), 更に発作期で寛解期よりも高かった ($p < 0.05$).

(4) 0.01 μ g/ml epinephrine 添加時

二次凝集は Behçet 病の寛解期の19例中4例21%, また発作期の19例中6例32%で認められた. しかしコントロールではみられなかった. すなわち二次凝集の出現頻度は Behçet 病の寛解期および発作期で各々コントロールに比べて明らかに高かった ($p < 0.05$, $p < 0.01$)⁹, 寛解期と発作期の間に差は見られなかった.

2) 二次凝集を示す凝集惹起剤の濃度—Behçet 病の発作期と寛解期の比較 (表2)

(1) ADP 添加時

発作期と寛解期の両期に検査を行えた Behçet 病7例のうち, 寛解期に2.0 μ M 以上の濃度の負荷でのみ二次凝集を認めた5例は発作期には1.0 μ M 負荷で二次凝集を示した. また寛解期に1.0 μ M 負荷で二次凝集を生じた2例は発作期には0.1 μ M 負荷でも二次凝集を認めた.

(2) epinephrine 添加時

ADP 添加時と同じ7例を対象とした. 寛解期には1.0 μ g/ml 以上の濃度の負荷でのみ二次凝集を示した4例は, 発作期には0.1 μ g/ml 負荷で二次凝集を生じた. また寛解期に0.1 μ g/ml の負荷で二次凝集を生じた2例は発作期には0.01 μ g/ml 負荷でも二次凝集を認めた. 1例は寛解期においても0.01 μ g/ml の負荷で二次凝集を示し, 発作期においても同じく0.01 μ g/ml 以上の濃度の負荷でのみ二次凝集を生じた.

IV 考 按

Behçet 病の病態の変動と血小板凝集との関連を検討するため, Born-O'Brien による比濁法を用いて血小板凝集能の測定を行った.

本法では結果が凝集曲線として得られるが, これにはいくつかの解析があり¹⁰⁾¹¹⁾, このうち複数の解析法を用いて凝集能を解釈することが望ましいと考えられている⁹⁾. 解析方法は曲線の形状をパターン分類するいわば定性的解析と, 凝集率の大きさまたは反応時間を測定する定量的解析に大別することができる. そこで今回は前者として二次凝集の発現の有無を, 後者として最大凝集率を用い血小板凝集能の検討を行った.

二次凝集の発現の有無を用いたのは, 本症の病変には血栓が頻繁に認められ²⁾, 一方, 血栓症において二次凝集の発現は最も鋭敏にその病態を反映すると報告されていること¹²⁾, 血小板血栓は血栓形成における早期の反応として重要な位置を占めるが, この血小板血栓の形成において二次凝集は必要不可欠の反応であり, この点からも検討が重要と考えられたこと, また凝集惹起剤の濃度を変えて二次凝集の有無を検討することによって血小板の凝集感受性を調べることができること¹³⁾, 等の理由による.

また最大凝集率を用いたのは本法の凝集率の代表値としてこれが最も適当と考えられているからである¹⁰⁾.

まず最大凝集率は Behçet 病の発作期および寛解期でコントロールに比べて有意に高値を示し, さらに発作期は寛解期よりも高値であった. また発作期と寛解期の両期に測定のできた Behçet 病7例では, その全例において最大凝集率は発作期で寛解期に比べ有意に高値であった. これらの傾向は ADP, epinephrine のいずれの負荷によっても同様であった.

これより血小板の反応性は本症の発作期のみならず寛解期においても亢進しており, さらに発作期には寛解期に比べて高まっていることが示唆された.

次に二次凝集は ADP, epinephrine いずれの負荷においても Behçet 度の発作期で寛解期およびコントロールに比べ高頻度に出現した. また epinephrine 負荷では寛解期においてもコントロールに比べ有意に多くこれが観察された. しかも正常では二次凝集を生じない低濃度の ADP, epinephrine 負荷⁹⁾でも, Behçet 病では発作期はもとより寛解期にも二次凝集を生じる例が少なからず認められた. これから Behçet 病では

血小板の凝集感受性が高くこれは特に発作期に著しいことが示唆された。

Behçet 病の病期と血小板の凝集感受性についてさらに検討するため、同一症例で発作期と寛解期の両期に測定のできた 7 例について二次凝集を生じうる凝集惹起剤の濃度を調べた。ほぼ全例で発作期の方が寛解期に比べ低濃度の刺激で二次凝集を生じる傾向があり、寛解期に比べ発作期には血小板の凝集感受性が高まっていることが示された。

今回、Behçet 病の眼症状に限定し病期を設定して検討したところ、最大凝集率および二次凝集の出現頻度は寛解期においても高値をとり、また発作期には更に高値を示した。これより本症では寛解期においても血小板凝集能が亢進し、また発作期には寛解期を上回って更に凝集能が高まっていることが示唆された。これはこれまでの知見^{3)~6)}を支持するものであったが、これに加えて Behçet 病では寛解期にも血小板凝集能が亢進していることが新たに見いだされた。このことから本症では血小板凝集能は発作などによる結果として亢進するのではなく、むしろ本症の病態の一部であることが推測された。

ところで本症の眼発作期で PA4、 β TG の高値で表される in vivo での血小板活性化の亢進が示唆されたことはすでに報告した¹⁾。これと今回の結果とを考えると、眼発作期では血小板は凝集能が高いのみでなく in vivo ですでに凝集に向けて活性化が生じており、一方寛解期は血小板の潜在的凝集能は高まっているものの in vivo での活性化は高まっていない状態であることが推測された。すなわち発作期はすでに血小板血栓を生じようとしている状態、寛解期は血栓準備状態と考えられた。

in vivo での血小板の活性化の差異を生み出す因子として血小板自体の因子と血小板に対する刺激因子とが考えられる。今回の検討で Behçet 病では血小板凝集能が発作期に著明に亢進しているという結果を得、血小板活性化に関与している血小板自体の一因子が明らかとなった。しかし、血小板の機能はまず刺激物質と血小板膜受容体との結合により発現すること¹⁴⁾、さらに血小板機能は周囲の環境の影響を受け変化すること¹⁵⁾が知られている。Behçet 病でも免疫複合体の高値¹⁶⁾、PAF (Platelet Activating Factor) inactivator の低値¹⁷⁾等が報告されており、これらが血小板活性化に影響することも考えられる。今後さらに、本症にお

ける血小板機能と血小板の周囲の因子との関連について検討が必要と考えた。

稿を終えるにあたり、御校閲頂きました内田幸男教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 大曾根倫子, 吉川啓司, 高橋義徳他: ベーチェット病の血小板機能—血小板特異蛋白とアラキドン酸代謝物について. 眼紀 39: 3号 掲載予定.
- 2) 杉浦清治: わが国の葡萄膜炎について. 日眼 80: 1285—1326, 1976.
- 3) 水島 裕, 松田隆秀, 大浜永俊: ベーチェット病と血小板機能. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和57年度研究業績, 173—177, 1983.
- 4) 西沢一郎, 玉手純子: Behcet 病患者の血小板凝集曲線の解析. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和48年度研究業績, 204—208, 1974.
- 5) Haim S, Brook JG, Gilhar A, et al: Platelet function in Behcet's disease. J Dermat 11: 117—120, 1984.
- 6) 山中 学, 増田寛次郎, 渋谷英美他: ベーチェット病における血小板凝集能の変動と臨床経過. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和49年度研究業績, 106—114, 1975.
- 7) Born GVR: Aggregation of blood platelets by adenosin diphosphate and its reversal. Nature 194: 927—929, 1962.
- 8) O'Brien JR: Platelet aggregation—II. Some results from a new method of study. J Clin Pathol 15: 452—455, 1962.
- 9) 渡辺清明, 小野文子: 血小板凝集能. 臨床医 7: 1600—1603, 1981.
- 10) 安永幸二郎: 血小板凝集曲線における各凝集値の評価. 血液と脈管 7: 981—984, 1976.
- 11) 山中 学: 血小板凝集能. 臨床病理特集 27: 15—28, 1976.
- 12) Yamazaki H, Takahashi T, Sano T: Hyper-aggregability of platelets in thromboembolic disorders. Thrombos Diathes Haemorrh 34: 94—105, 1975.
- 13) 寺田秀夫: 血小板凝集. 臨床病理特集 71: 151—164, 1987.
- 14) 池田康夫: 血小板膜レセプター. Medical Technology 13: 805—807, 1985.
- 15) 川村光信, 内藤周幸: 高脂血症. 日本臨床 44: 1124—1129, 1986.
- 16) 大曾根倫子, 吉川啓司, 高橋義徳他: ベーチェット病長期観察例における血中免疫複合体の動向. 眼紀 37: 1693—1697, 1986.
- 17) 鈴木修二, 中村恒敬, 石原桂子他: Behcet 病における PAF. 第2報. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和59年度研究業績, 192—194, 1985.