

前腕陽圧負荷による血液学的データの検討

真鍋 紀子*, 一原 直人, 山本 幸奈, 堀地 ひかる
今井 正, 三好 真琴

香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科

Study of Hematological Data by Giving Positive Pressure on Forearm

Noriko Manabe*, Naoto Ichihara, Yukina Yamamoto, Hikaru Horichi
Tadashi Imai, Makoto Miyoshi

Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kagawa Prefectural College of Health Sciences

要旨

動脈硬化の測定法のひとつに、FMD (Flow Mediated Dilatation) 検査がある。この方法は血管内皮機能を測定する方法であり、陽圧負荷を与えた後の血管径増加率を%FMDとして計測するものである。値が小さいほど、動脈硬化の危険度が高いことを示す。しかし、この陽圧負荷は250mmHg、5分であるため、血液学的なデータへの影響が懸念される。今回我々は、健常者30名について、負荷前後の血小板活性化%、可溶性フィブリン(SF)、プラスミノゲン (PLG) 値を測定した。血小板活性化%の増加がみられた検体は2検体(12.6, 2.2%)で、わずかな活性がみられたものが3検体あった。血小板活性12.6%は、ADP添加8 μ M、2分の反応に相当した。またこの検体は、SFとPLGが共に異常値をしめした。この結果より、FMD検査は早期の動脈硬化の診断においても、リスクを考え、常に注意して行う必要があることが示唆された。

Key Words: 動脈硬化 (arteriosclerosis), FMD (Flow Mediated Dilatation), 前腕陽圧負荷 (Positive pressure on forearm), 血液学的データ (Hematological Data)

*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 真鍋 紀子

*Correspondence to: Noriko Manabe, Department of Medical Technology, Faculty of Health sciences, Kagawa Prefectural College of Health Sciences, 281-1 Murecho-hara, Takamatsu, Kagawa 761-0123 Japan

はじめに

日本の三大死因は「悪性腫瘍」「心疾患」「脳血管疾患」といわれている^{1,2)}が、心疾患、脳血管疾患はいずれも動脈硬化が主な原因である^{2,3)}。さらに動脈硬化は、高血圧、高脂血症、糖尿病、肥満などの原因あるいは合併症でもあり^{2,3,4)}注意すべき疾患である。

動脈硬化検査としては、PWV (Pulse Wave Velocity: 脈派伝播速度)、ABI (Ankle brachial Index: 上腕と足首の血圧比)、頸動脈エコーを使った、CAVI (Cardio Ankle Vascular Index: 動脈硬度指標) 等がよく知られている^{4,5)}。

近年、血流依存性血管拡張反応検査(Flow Mediated Dilation: FMD)による動脈硬化の危険因子度測定が、機器の自動化の進展によりかなり報告^{6,7,8)}されてきている。FMD検査は、安静時に前腕部を5分間、250mmHg圧にて駆血後解除することで生じる血流量の増加により、血管内皮細胞から血管拡張物質(NO)が放出され、血管が拡張する反応である。動脈硬化の危険因子度が高いと拡張度合いが低くなるため、血管径の増加度を検査する事で動脈硬化の危険因子度を知るものである。我々は、FMD検査が「下腕部を5分間、250mmHg圧にて駆血」する点に注目し、動脈血流を止血する圧力以上の圧による、血液凝固検査データへの影響について、健常人における検討を行ったので報告する。

対象および方法

【対象者および検査項目】

本研究に同意し、事前健康アンケートで健常であることを確認した学生30名(年齢21~23歳、男性5名、女性25名)を対象とした。

検査項目は、血小板活性化%、可溶性フィブリン(SF)、プラスミノゲン(PLG)とし、前腕部負荷の前後で測定した。さらに血小板活性化が見られた対象者についてのみ、後日、採血検体へのADP添加実験を行った。

【測定機器および試薬】

機器：フローサイトメーター EPICS XL (FCM: ベックマンコールター: BC)、LPIA-S500 (三菱化学メディエンス: MM)

試薬：4%パラホルムアルデヒドPBS (4%PA: 和光)、CD62p-PE・CD61-FITC・ネガティブ

コントロールIgG1(マウス): IOTest (BC)、イアトロSFII・クロモレイトPLG II: MM、アグリパックADP試薬(アークレイKK)

【方法】

1. 採血および負荷

採血時刻は午前8時~10時とした。負荷は市販の血圧計を用い、250mmHg、5分間とした。採血は、負荷の前後で2回行い、それぞれ翼状針で3.18%クエン酸Na採血管に2本採血し、各2本目を検体とした。

2. 血小板活性化測定

全血検体100 μ Lに、1%に希釈したPAを1mL加え、2~8 $^{\circ}$ Cで2時間固定(採血後10分以内に固定)した。遠心し、上清をアスピレーターで吸引し、PBSで浮遊させた(X)。上述の抗体各2 μ Lに(X)を50 μ L加え、ゆっくり回転させ混合し、暗所、室温で15分間反応させた。次に1%PAを1mL加え、攪拌した。遠心後、PBS 2mLに浮遊させFCMで解析を行った。

検体ごとに、前方および側方散乱光とCD61から血小板をゲーティングし、同定された血小板について、陰性対照で陽性部分を設定し、陽性率や蛍光強度を指標にp-セレクチン(CD62p)の発現量を測定し、血小板活性化%とした。

3. SF, PLG測定

検体を遠心し、各血漿について、LPIA-S500で、SF, PLGを測定した。

4. ADP試薬添加実験

血小板活性がみられた対象者について、後日、同様(負荷なし)に採血を行った。ADP試薬は添付書に従って溶解し、0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0(μ M)濃度のADP液を作成した。反応時間は30, 60, 120(秒)のいずれかとした。各濃度のADP液100 μ Lを同量の全血と反応させた後、同様な解析を行い、検体の血小板活性化%と同程度になるようなADP濃度・反応時間の組み合わせを検討した(重複測定)。

【倫理的配慮】

研究に先立ち、本学の研究等倫理委員会に審査請求し、承認を得た。対象者には、研究の概要、プライバシーの保護、研究協力は任意であること、プライバシーの保護、協力の有無により不利益を被らないこと、収集したデータは研究目的以外では使用し

ないことを説明するとともに、研究に関する説明書、同意書、事前健康アンケートを配布した。また、同意書と健康アンケートの回収により、研究協力への同意と判断した。

結 果

1. 対象検体30検体中25検体は、負荷による検査データの変化がみられなかった。負荷後に血小板活性化の上昇がみられた検体は2検体 (A, B), わずかな上昇がみられたものが3検体 (C, D, E) あった。この5検体の検査データを Table 1 に示した。正常値との比較から、A 検体は SF と PLG が明らかに異常値を示した。

血小板活性化の上昇がみられなかった25検体の SF の平均値±SD は、負荷前 ($0.763 \pm 0.675 \mu\text{g}/\text{mL}$), 負荷後 ($0.825 \pm 0.774 \mu\text{g}/\text{mL}$) であった。同様に25検体の PLG 値は負荷前 ($100.3 \pm 7.3\%$), 負荷後 ($97.7 \pm 6.9\%$) であった。

2. 負荷後の A 検体の FCM による血小板の活性% は12.6%であり (Fig 1), これは同じ被験者検体への ADP 添加 $8 \mu\text{M} \cdot 2$ 分反応と同程度の活性であった。

B 検体の2.2%の活性は、ADP 添加 $1 \mu\text{M} \cdot 2$ 分反応に相当した。またわずかな上昇をみせた3検体 (C, D, E) の平均値も、ADP 添加 $1 \mu\text{M} \cdot 2$ 分反応に相当した (Table 2)。

考 察

活性化血小板の指標には、p-セレクトリン (CD62p), PAC-1, CD63, 血小板由来マイクロパーティクルおよび血小板プロコアグulant活性, 網状血小板などが用いられている^{9,10,11)}。しかし、血栓症患者においてどのような時間経過で活性化マーカーが認められるか、どのような病態をどのマーカーが鋭敏に反映するかなどは明らかではない⁹⁾とされ、標準化が求められている。今回の我々の血小板活性化測定には、最も汎用されている p-セレクトリンを使用した。本実験は小人数による検討であったが、健常人であっても陽圧負荷により血小板活性、さらには SF, PLG も増加する検体 (A) を確認した。A 検体は、SF が負荷前と比較して明らかに増加し、血小板の活性化だけでなく、血管内のトロンビン産生をしめしている¹²⁾といえる。また負荷後の PLG 値は異常値をしめしたが、負荷前の値を考慮すると、線

Table 1 Hematological data of the subjects before and after the positive pressure

| Subjects | Platelet Activity (%) | | SF ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | PLG (%) | |
|------------------|-----------------------|----------------|--------------------------------|----------------|---------------|----------------|
| | pre-treatment | post-treatment | pre-treatment | post-treatment | pre-treatment | post-treatment |
| A | 0.1 | 12.6 | 0.3 | 90.0 | 117.5 | 126.4 |
| B | 0.7 | 2.2 | 0.3 | 0.3 | 105.2 | 110.3 |
| C | 0.2 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 85.7 | 84.7 |
| D | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 109.5 | 110.9 |
| E | 0.3 | 0.5 | 0.3 | | 82.1 | 76.1 |
| The Normal Value | | | 7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ↓ | | 82.0~118.0% | |

The treatment: The positive pressure at 250mmHg for 5 min.

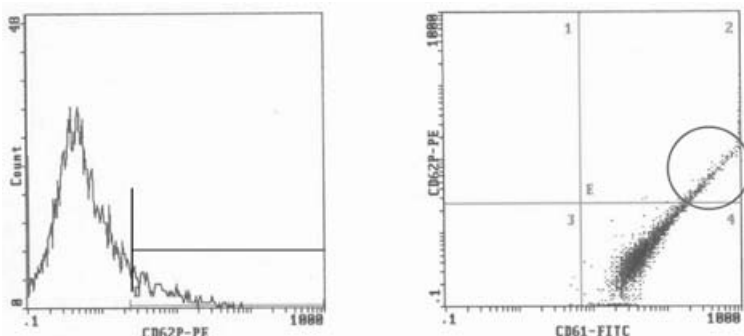


Fig.1 Flow cytometry results of subject A.

Table 2 The dosage of ADP and reaction time parallel with platelet activity

| Subjects | Platelet Activity (%) | The dosage of ADP, reaction time |
|----------|-----------------------|----------------------------------|
| A | 12.6 | $8 \mu\text{M}$, 2min |
| B | 2.2 | $1 \mu\text{M}$, 2min |
| C | 0.5 | |
| D | 0.3 | $1 \mu\text{M}$, 2min |
| E | 0.5 | |

溶亢進データであるとはいい難い。この点については、プラスミノゲンや $\alpha 1$ マクログロブリンが、ストレスで増加する血中蛋白である¹³⁾ことから、過度の陽圧負荷によるストレスによる影響が現れたのではないかと考える。

血小板活性がみられた被検者血へのADP添加実験において、検体AのFMDと同様の負荷による血小板の活性%は、ADP 8 μ Mで2分反応させた時と同様な血小板活性%を示した。また検体Bと検体C・D・EのADP添加量・反応時間が同じ(ADP 1 μ M, 2分)であったことは、検体Bが他の3検体より、ADPに対する血小板の活性度が高いことを示している。この結果から、血小板の活性化はかなり個人差があることが確認できた。PAC-1は、より低濃度の刺激(ADP)においても、血小板の活性化をとらえることが報告されている¹⁴⁾ことから考えると、p-セレクチンとPAC-1を併用しておけば、より高感度でかつ特異的に検出できたとと思われる。また清水らの報告¹⁵⁾にあるように、解析ソフトを導入することにより、さらに時間短縮や微妙な血小板活性の測定誤差を軽減できると考える。

最近増加傾向にある2型糖尿病は、虚血性心疾患や脳梗塞の基礎疾患としての頻度も高くなってきており、糖尿病における血栓症対策は重要視されつつある^{4,11,16)}。2型糖尿病が高血圧症や高脂血症を合併することが多い^{4,11)}ことなどを考えても、血小板活性化の傾向も顕著¹⁷⁾であり、血栓症への罹患リスクも高くなる。報告^{6,7,8)}にあるように、FMD検査は動脈硬化の検査として有用なものであることには疑いを持たない。しかし、検査を必要とする被検者は、今回の実験のような健常人ではなく、糖尿病なども含む多くの血栓性疾患リスクを持っている可能性が強いことを、十分に考慮した上で、行うべきであると考えられる。

今回の対象者は、学内実習で行うルンペルレーデ試験(100mmHg, 5分間負荷)の経験者であったため、負荷や採血の説明に対する同意を得易い利点があった。今後可能であれば、より多くの健常人における検討が必要である。

文 献

- 1) 財団法人 厚生統計協会 (2009) “図説 国民衛生の動向2009”, 厚生統計協会, 東京, p13
- 2) 山本清高 (1992) 血管内皮細胞障害と動脈硬化 - 増殖因子 -. 血管と内皮2: 593-599

- 3) 野村昌作 (2009) 抗血小板療法と動脈硬化. 循環 Plus 9: 2-6
- 4) 寺島 茂 (2006) 動脈硬化検査機器. Medical Technology 34: 1713-1718
- 5) 山本智幸, 原田昌明, 山西昭夫 (2005) 動脈硬化検査. 臨床検査 49: 1541-1546
- 6) Fan LX, Santago P, Jiang H, Herrington DM (2000) Ultrasound measurement of brachial flow-mediated vasodilator response. I.T.Med. IMAGING 19: 621-631
- 7) 村田和也 (2007) 動脈硬化をエコーで診る 血管内皮機能検査FMDとは. 心エコー 8: 894-899
- 8) 曾我潤子, 東幸仁 (2009) 血管内皮機能(FMD). 血圧 16: 416-420
- 9) 山崎昌子, 内山真一郎 (2003) 血栓と循環の検査法 - Flow Cytometerを用いた血小板機能測定 -. Thrombosis and Circulation 11: 358-362
- 10) 野村昌作 (2007) 血小板活性化マーカー. 血栓止血誌 18: 597-606
- 11) 野村昌作 (2006) アテローム血栓症の病態と対策を探る - 血小板活性化マーカーとして何を測定すべきか. Vascular Medicine 1: 45-52
- 12) 桜井錠治, 中原邦彦 (2004) 可溶性フィブリン(SF)測定の実際とテクニカルな問題点. 日本検査血液学会雑誌 5: 97-107
- 13) 金井正光 (2005) “臨床検査提要” 第32版, 川井弘光, 東京, p451-452
- 14) 若本志乃舞, 藤原満博, 安部英樹, 山口美樹, 武岡真司, 土田英俊他 (2003) In vitroにおけるヘモグロビン小胞体の血小板活性化に対する影響. J.J.of Transfusion Med. 49: 653-659
- 15) 清水美衣 (2007) フローサイトメトリーによる活性化血小板の検出. 検査と技術 35: 1433-1437
- 16) 野村昌作 (2003) 血小板関連因子に関して. 臨床病理 51: 1096-1101
- 17) 清水美衣, 篠原幸人 (2006) 活性化血小板の認識とその臨床的意義. Vascular Medicine 2: 87-94
- 18) 伊藤裕子, 秋山秀彦, 斉藤翠, 椎野由裕, 徳永恵津子, 勝田逸郎他 (2003) 医学検査 52: 954-958
- 19) M. R. BARNARD, M. D. LINDEN, A. I. FRELINGER III, Y. LI, M. I. FURMAN et. al.

(2005) Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and

neutrophil procoagulant activity. *JThromb Haemost* 3: 2563-2570

Abstract

One of the methods to detect arteriosclerosis is Flow Mediated Dilation (FMD). This method is to evaluate arterial endothelial dysfunction by measuring the percentage difference between the diameter of arteries before and after the positive pressure. The less the difference is, the higher the risk of atherosclerosis. This method applies positive pressure at 250 mmHg for 5 minutes, which raises our concern for its effect on the hematological data.

We examined the hematological data of 30 healthy volunteers before and after the positive pressure. The examined data include platelet activity(%), soluble fibrin (SF), and plasminogen (PLG). The increase in the platelet activity was observed in 2 subjects (12.6% and 2.2%), and slight increase in the activity was observed in 3 subjects. The subject with platelet activity of 12.6% corresponded to the dosage of 8 μ M of ADP for 2 minutes. Furthermore, the SF and PLG values of this subject had deviated from the normal value. These results indicate that there is a need to be always aware of the risks associated with diagnosing early stages of arteriosclerosis.

受付日 2009年10月16日

受理日 2009年12月24日