

妊娠時における血小板減少性紫斑病に関する研究

— 実験的血小板減少症を中心として —

Studies on Thrombocytopenic Purpura in Pregnancy—with Special
Reference to the Experimental Thrombocytopenia—

京都大学医学部婦人科学産科学教室 (主任: 西村敏雄教授)

広 崎 彰 良 Akiyoshi HIROSAKI

概要 血小板減少性紫斑病は、さほど稀な疾患ではないにもかかわらず、妊娠時にこの疾患が合併したという症例の報告はきわめて少ない。この点に着目した著者は、モルモットを用いて実験的に血小板減少症を惹起せしめ、妊娠時と非妊娠時におけるその影響の差を比較し、さらに血液学的に若干の実験を行ない、次の結果を得た。

まず、抗モルモット血小板家兎血清を作成し、これを妊娠モルモット群と非妊モルモット群に感作させたところ、両群ともに強い血小板減少が認められたが、その減少率において、両群の間に有意の差は認められなかった。しかし、皮膚および腹腔漿膜における出血の程度は、妊娠群では非妊群に比し明らかに軽微であった。

この原因をつきとめるべく、妊娠群と非妊群における抗血清感作前の血液性状および血管透過性を比較したところ、血液性状には有意の差は認められなかったが、微小血管透過性に関しては、妊娠群では非妊群に比し明らかな低下が認められた。

以上の結果から、妊娠時では血小板数の減少がかなり強くても出血斑として発現しにくく、この機序の一端に微小血管透過性の低下が関与しているものと推論した。

緒 言

血小板減少性紫斑病が妊娠時に合併することは意外に少なく、Barnesが1867年に本疾患と妊娠との合併例をはじめて報告して以来、国内、国外の報告を合わせても数十例にみたない。しかるに血小板減少性紫斑病は、非妊時ではさほど稀な疾患ではなく、しかも若年の女性に多いとされている。これらのことは、妊娠時では紫斑の出現を抑制し得る何らかの因子が存在する可能性を示唆しているといえよう。尾崎ら(1963)、野上ら(1964)も、この点に言及している。しかしながら、この問題にとり組んだ研究は著者の調べたかぎり未だみられない。この点をめぐって著者は、モルモットを用いて実験的血小板減少症惹起下若干の成績を得たので報告する。

実験材料・方法

A. 実験動物

体重 2.8kgの雄家兎、体重 300~ 600gの非妊娠雌モルモットおよび妊娠後期のモルモットを使用した。

B. 抗モルモット血小板家兎血清(Anti-Guinea-pig Platelet Immune Rabbit Serum以下A P Sと略す)の作成

1. モルモット血小板の分離

採血および血小板分離に用いた注射器、注射針、試験管はすべて非濡性のものを使用した。また、遠沈(Kubota 冷却遠心分離器KR—66型を使用)ならびに血小板の洗滌は、すべて約4℃の環境下で行った。

まず1% EDTA (disodium ethylene diamine tetra acetate 1gとNaCl 0.7gを蒸溜水で溶解して100mlとする)を $1/10$ 容とし、モルモット心よ

り18ゲージ針にて血液を採取した。数匹のモルモットから採取した合計約40mlの血漿を、あらかじめ4°Cに調節した冷却遠心器にかけ1000rpm, 10分間遠沈し, 得られた上清を800rpm, 10分間遠沈し, さらにその上清を800rpm, 10分間遠沈し, 出来得るかぎり赤血球その他の血球の混在しない多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma) を得た。

かくして得られた多血小板血漿に, あらかじめ4°Cに冷却しておいた0.85% NaCl 溶液を加えてよく洗滌したのち3000rpm, 20分間の遠沈を行ない, 得られた沈渣に再び0.85% NaCl 溶液を加えて同様の操作を行ない, これをさらに2回くり返して血小板を十分に洗滌し, 最終的に得られた沈渣 (血小板塊) に0.85% NaCl 溶液5mlを加えて浮遊液とし, これを抗原として用いた。各感作毎に以上の操作をくり返し, 新鮮な抗原を作成した。

2. 抗体の作成

0.85% NaCl 溶液5mlに浮遊させた新鮮な血小板を家兎耳静脈よりゆつくりと注入して, 家兎を感作した。この感作を2~3日間隔で6回施行し, 最終感作日より10日目に, 家兎から5mlの血液を採取し血清を分離した。この血清を56°Cで30分間静置して非働化し, 硫酸バリウムでプロトロンビンを吸着したのち, モルモット血小板浮遊液に滴下し, 顕微鏡下で血小板凝集反応を観察した。この凝集反応が360倍稀釈まで陽性であることを確認したのち, 家兎心臓より一気に約80mlの血液を採取し, 血清を分離した。これが求める抗モルモット血小板家兎血清 (APS) である。これを1mlずつ小試験管に入れ, -20°Cで保存し, 必要に応じて使用した。

C. 血小板数算定法

Rees-Ecker 直接法を用い, 算定前にあらかじめプランクテストを行なった。

D. Prothrombin Time

組織トロンボプラスチン試薬として Lyoplastin (持田), 抗凝固剤として3.8%クエン酸ナトリウム液を使用し Quick 1 段法で行なった。なお, 凝固時間測定には Clot-timer Model 202 (Heller

Lab. California) を使用した。

E. Partial Thromboplastin Time (PTT)

PTT 試薬として Cephaloplastin (Dade, ミドリ十字), 抗凝固剤として3.8%クエン酸ナトリウム液を使用した。なお, 凝固時間測定には前述の Clot-timer を使用した。

F. フィブリン平板

トロンビン (持田), ウシフィブリノーゲン (Armour, Cohn 画分1) を用い, Astrup-Müllertz の標準フィブリン平板を作成した。

G. ユーグロブリン溶解時間

血漿を1%酢酸液にてpH 5.2に急速に低下させて得られた Euglobulin 画分を使用した (Von Kaulla 法)。

実験成績

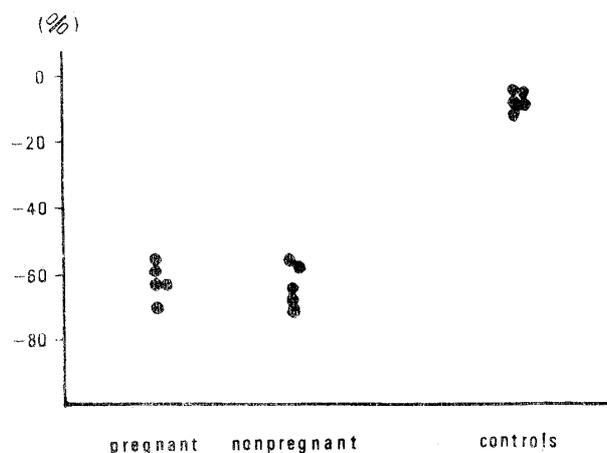
A. まず, 抗血清 (APS) 感作後における影響を比較するため, 1~4の各項は, それぞれ妊娠群5例, 非妊娠群5例, 対照血清使用群5例を用いて実験を行なった。

1. APS 心内注入後の血小板減少率

APS 1ml/kg をモルモット心臓内に注入し, 10分後に算定した場合の血小板減少率を両群の間で比較すると, 妊娠群 $-62.5 \pm 6.0\%$, 非妊娠群 $-63.6 \pm 5.7\%$ で有意の差は認められなかった。

一方, 対照として, APS をモルモット血小板で吸着した血清を用い同様の操作を行なって比較

図1 Fall of platelets count, 10 minutes after injection of APS in the heart

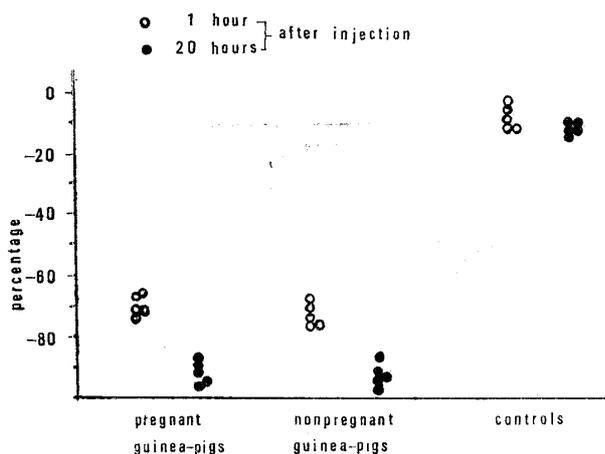


してみると、APSそのもので感作させたものとの間には明らかな差が認められた ($-12.0 \pm 2.2\%$) (図1).

2. APS腹腔内注入後の血小板減少率

APS 2ml/kg をモルモット腹腔内に注入し、1時間後、20時間後に血小板数を算定した。妊娠群では、1時間後 $-71.2 \pm 4.3\%$ 、20時間後 $-91.0 \pm 4.3\%$ 、非妊娠群では、1時間後 $-72.2 \pm 3.7\%$ 、20時間後 $-91.2 \pm 4.2\%$ と、それぞれ顕著な血小板数の減少が認められたが、その減少率においては両群の間に有意差はなく、一方、対照群では、1時間後に $-7.6 \pm 2.7\%$ 、20時間後 $-10.6 \pm 1.7\%$ で、前2群との間に明かな差が認められた (図2).

図2 Fall of platelets count induced by injection of APS intraperitoneally.



3. 腹腔内における出血

2の実験で用いたモルモットをAPS注入後24時間目に開腹してみると、大網、腸間膜、腹膜に、特有の点状出血斑がみられたが、妊娠群における出血は、非妊娠群のそれに比し、明らかに軽微であった (写真1, 2). 一方対照群では、いささかも出血斑は認められなかった。

4. 皮膚における出血

APS 2ml/kg を腹腔内に注入し、24時間後に腹部の毛を、写真3, 4の如く、右側を脱毛クリームで、左側を暴力的に、それぞれ脱毛させ、3分後に毛囊からの出血を比較してみると、妊娠群に

写真1 非妊時の大網 (APS感作後24時間)

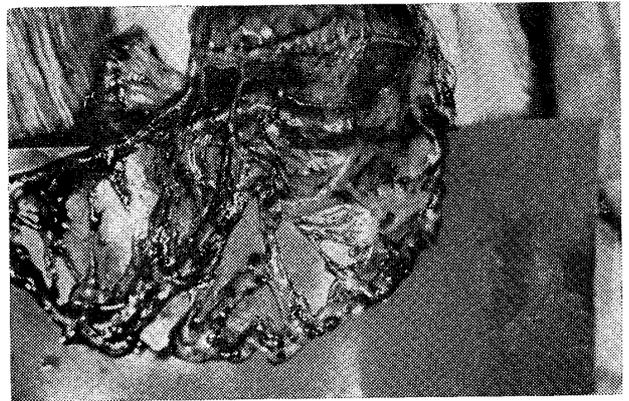


写真2 妊娠時の大網 (APS感作後24時間)

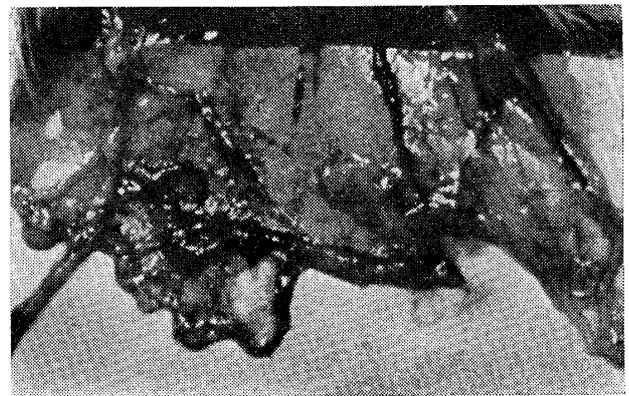
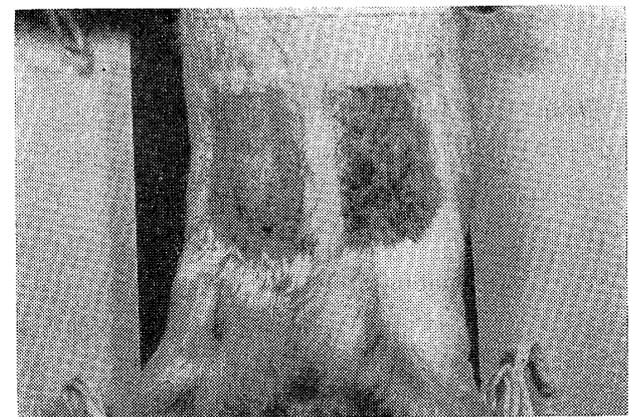


写真3 非妊時の皮膚 (APS感作後24時間)



における出血は、非妊娠群に比し、明らかに軽微であった。一方、対照群では左右側とも出血は認められなかった。

B. つぎに、非感作の妊娠モルモット群、非妊娠モルモット群において、次の各項目に関して実験し、比較検討した。

1. 血小板数

写真4 妊娠時の皮膚 (APS感作後24時間)

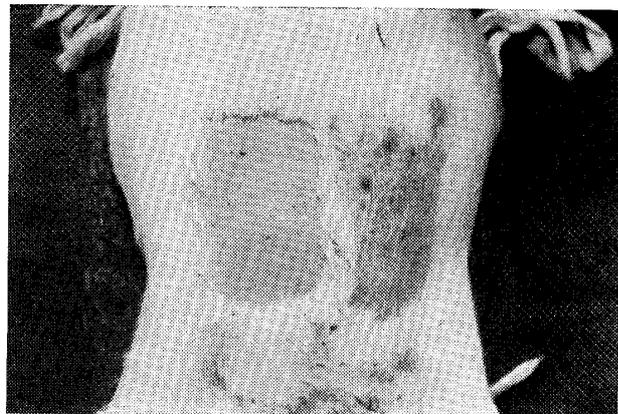
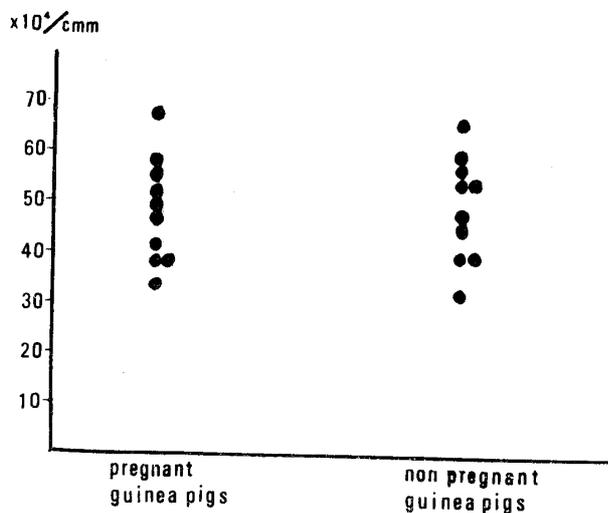


図3 Platelets count before injection of APS



両群それぞれ10例において血小板数を算定してみたが、妊娠群49.5±10.9万、非妊娠群51.2±11.2万で、両群の間に有意の差は認められなかった(図3)。

2. Prothrombin Time

妊娠群38.3±9.6秒、非妊娠群39.5±8.8秒であり、有意の差は認められなかった(表1)。

3. Partial Thromboplastin Time

妊娠群36.5±9.8秒、非妊娠群37.2±9.5秒であ

表1 Prothrombin Time (Quick One Stage)

	No. of Experiments	Mean (sec)	Range (sec)	S.D.
Pregnant	20	38.3	31.5~50.0	± 9.6
non-Pregnant	20	39.5	30.6~50.6	± 8.8

表2 Partial Thromboplastin Time (PTT)

	No. of Experiments	Mean (sec)	Range (sec)	S.D.
Pregnant	20	36.5	25.5~48.6	± 9.8
non-Pregnant	20	37.2	28.8~47.5	± 9.5

り、両群の間に有意差は認められなかった(表2)。

4. フィブリン平板法

これは検体中の Plasmin と Pro-activator の活性の総和を示すものであるが、妊娠群、非妊娠群各5例とも溶解面積は0であった。

5. Euglobulin Lysis Time

表3 Euglobulin Lysis Time

	No. of Experiments	Mean (min)	Range (min)	S.D.
Pregnant	10	195	70~300	±97
non-Pregnant	10	183	70~270	±81

表3に示す如く、妊娠群、非妊娠群とも測定値にバラツキが大きく、両群の間に有意差は認められない。線溶現象というものが、線溶系と抗プラスミン系との微妙なバランスの上に成り立ち、経時的に変化が激しいことを考えると、これは当然の結果といえよう。

6. 微小血管透過性

あらかじめモルモット腹部の毛を脱毛クリーム

写真5 非妊時の血管外色素漏出

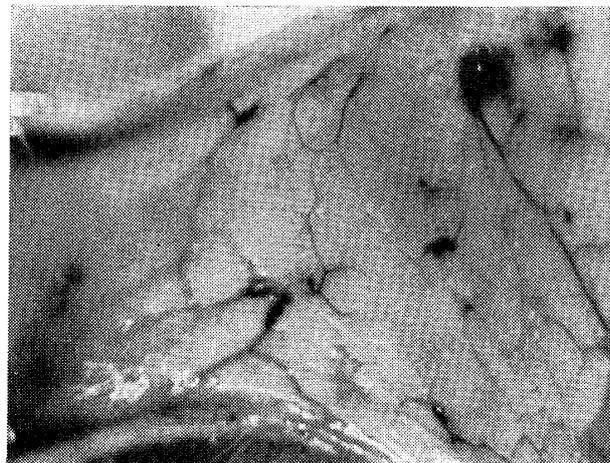
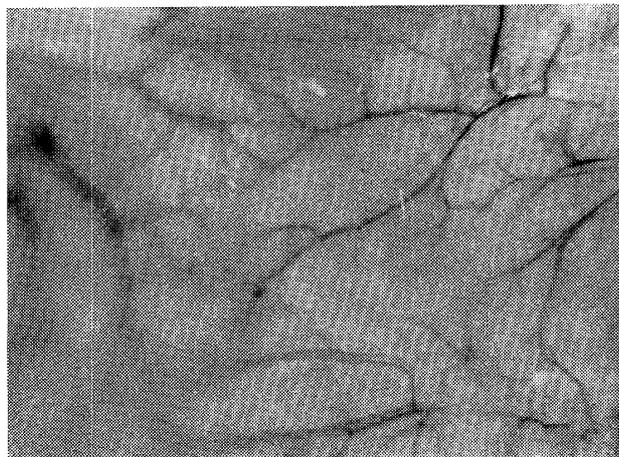


写真6 妊娠時の血管外色素漏出



で脱毛しておき **Bradykinin triacetate (Sigma)** の $10\mu\text{g/ml}$ 水溶液 0.1ml を正確に腹部皮内に注入し、同時に、心臓内に 0.5% **Evans blue** 1ml/kg を注入、10分後に腹部皮膚を剝離翻てんし、色素の血管外への透過を観察した。妊娠群、非妊群各10例について観察したところ、妊娠群では、非妊群に比し、色素の血管外への漏出が明らかに軽微であった(写真5, 6)。

考 案

血小板は、周知の如く、止血機構において重要な地位を占める細胞であり、単に凝固因子の担体として血液凝固に関与するだけでなく、細胞それ自体接触性がきわめて強く、その粘着、凝集は、止血、血栓形成への初期現象としてきわめて重要視されている。そして血小板増多症においては血栓症が頻発し、血小板の **critical level** 以下の減少は、ほとんど例外なく出血を招来する。

当然のことながら妊娠中に血小板減少症が合併することが懸念されるのであるが、1867年に **Barnes** が、妊娠に合併した血小板減少性紫斑病をはじめて報告して以来、本疾患と妊娠との合併例の報告は、国内、国外あわせても数十例にみたない。

しかしながら血小板減少性紫斑病はさほど稀な疾患ではなく、しかも若年の女性に多いとされている。従つて、本疾患が妊娠時に合併する機会もつと多くあつていい筈である。これには何か理

由があるのではないだろうか。前述の如く、最近、尾崎ら(1963)、野上ら(1964)は、この点に関して疑問を提示している。著者の今回の実験も、この疑問が端緒となつたものである。

そこでまず著者は、モルモットに血小板減少症を起させて、妊娠時、非妊時にそれぞれどのような影響が現われるかを知らうとした。

血小板減少を惹起せしめるには、その産生を減弱させる方法と、その破壊を亢進させる方法とが考えられるが、著者は、実験的に強い血小板減少を起しうる方法として、異種血小板抗体を用いて免疫学的に血小板減少を起させる方法を選んだ。

この実験的免疫血小板減少症の研究は、1905年 **Marino** が初めて家兎血小板を抗原として抗家兎血小板血清をつくり、これを家兎に注射して血小板減少症を起すことに成功して以来、多くの研究者による多数の報告があり、その大半は異種血小板抗体に関するものである。即ち、ある動物の血小板を異種動物に注射して得た抗体を、もとの動物に注射して発生させるのが異種血小板抗体による血小板減少症である。この種の血小板減少は抗体注射後直ちにはじまり、2~3日で元の数にもどり、その後一過性に増加し、7~10日で回復するとされている。しかし動物の種類によりこの経過には差がみられ、**Bedson** (1921) は、モルモットでは減少が3日後まで持続するとし、増沢(1941)は、同じくモルモットで、注射後24時間で95%に減少し、4日間持続したのち2週間で元にもどつたとしている。著者の成績では、20時間後に約91%になつており、増沢の成績とほぼ一致している。

今回の実験で作成した抗血清(**APS**)による血小板減少症も、異種血小板抗体によるものであり、古家(1960)が立証した如く、血小板が免疫学的機序により流血中ならびに各臓器において一斉に破壊されることにより惹起されたものと考えられる。

一方、周知の通り、本態性血小板減少性紫斑病は自己免疫疾患であるというのが現在の定説となつており、また、他の血小板減少性紫斑病も、抗

原抗体反応による血小板破壊がその原因となつているものが多い。このように考えてくると、妊娠時に血小板減少性紫斑病が少ないということは、妊娠時では、少くとも血小板抗体による血小板の破壊が起りにくいのではなからうかという疑問が生じてくる。そこで著者は、血小板抗体を妊娠モルモット、非妊モルモットに作用させ、その影響をみた。その結果、抗体の感作により、妊娠時、非妊時ともに顕著な血小板減少がみられたが、その減少率においては両者間に有意の差は認められなかつた。従つて、血小板抗体に対する血小板の抵抗は、妊娠時、非妊時を問わずあまり変化がないと考えられる。しかるに、抗体感作後の腹腔内漿膜や皮膚における出血症状は、妊娠時の場合は明かに軽微であつた。これは非常に興味深いことといえよう。

非妊時と同じ程度の血小板減少が起りながら妊娠時では出血傾向が少なかつたということは何に基因するのであろうか。

出血傾向にしても、血栓傾向にしても、それは、血小板、凝固系、線溶系、血管系が複雑に交互しあつて起るものであるが、著者は妊娠モルモット、非妊モルモットの血液性状等に関し、以上の各系列毎に若干の実験を行なつた。なお、妊娠モルモットの血液性状に関する研究の報告は著者の知るかぎりみられない。

まず、血小板数が妊娠時に圧倒的に多ければ、その減少率は非妊時と同じでも、絶対数としてかなり多くの血小板が生き残つていることになる。ところが著者の成績では、妊娠時と非妊時との間には血小板数において有意の差は認められなかつた。前述のごとく、妊娠モルモットの血小板数に関する報告がみあたらないので今回の成績と比較すべくもないが、ヒト妊娠時の血小板数に関する報告をみると諸家の成績は一致せず、Morら(1960)村上(1966)らは多少増加するといひ、Lutherら(1964)、Nilssonら(1967)らは変化がないという。一方、Wardら(1948)、Shaperら(1968)は減少すると報告している。

血液凝固能に関して著者は、外因性凝固因子、

内因性凝固因子をチェックする方法として、それぞれ Prothrombin Time, PTT を選んで実験してみたが、妊娠群と非妊群との間に有意差は認められなかつた。本実験の測定値がヒトの場合とかなり異なるのは、モルモット血漿に対する組織トロンボプラスチンとして Lyoplastin を、PTT 試薬として Cephaloplastin を用いたためであろうと思われる。

ヒト妊娠時の血液凝固能に関しては、かなりの数の報告があり、Lutherら(1964)、渡辺ら(1969)らの報告にみられるごとく、妊娠の末期に Prothrombin Time や PTT が、やや短縮するものが多い。また、フィブリノーゲンに関しては、ヒト妊娠時に明らかな増量が認められることは現在では諸家の認めるところである。

線維素溶解酵素系に関しても今回の実験では妊娠時と非妊娠時との間に有意差は認められなかつたが、元来、線溶現象そのものが経時的に変化がはげしく、今回の成績だけでは即断しがたい性格のものである。ヒト妊娠時の線溶系に関しては、近年多くの報告がみられるが、長沢(1969)のいうように、妊娠後期には線溶現象全体としてやや亢進がみられるが、非妊時に比してさらに強力な抗プラスミン系が作用し、微妙なバランスを保つているという意見が代表的である。

紫斑という一つの症状をきたす原因として、ひとつには血液性状、いま一つには血管壁の態度があげられよう。前者は、先に述べた血小板減少や凝固障害などであるが、これとて単独では紫斑を起しがたく、血管壁の態度、即ち、血管透過性の変化を無視してかかるわけにはいかない。

近年、血管透過機構に関する研究は急速に進歩し、その透過部位は主として Venule、即ち、毛細血管に接して静脈よりに位置する微小血管であることが明らかにされている。しかし、妊娠時にこの透過性がどのように変化するかはまだ明らかではない。

さて、血管透過度を研究するうえにおいて、その尺度を確定することが大切なのであるが、多くの研究者は、trypan blue, pontamin blue, Evans

blueなどの vital dye を用い、これらの色素が血清蛋白、特に Albumin と結合して血管外に透過し、透過亢進局所を青染することを利用して、その色調の強さ、その部の平均直径などを肉眼的に観察することによつて半定量的に追求してきた。これに対し新田ら (1963) は透過した色素を抽出して定量する方法を提案している。いずれにせよ、いまだ一般的な定量法は定まっていないが、著者は、透過した色素の色調の強さ、面積を肉眼的に半定量する方法をとつた。

先に述べた Venule は、組織学には内皮細胞、Pericyte, 基底膜から成り、内皮細胞は互いに密に相接し、いわゆる tight junction をなしている。そしてこれらの細胞間隙は、Bradykinin 等の permeability factor (PF) により一過性に開大するものと考えられている。そこで著者は、妊娠時、非妊時の血管に、透過性亢進という負荷を与えるため PF として Bradykinin を使用して実験し、前述の如く妊娠時では非妊時に比して微小血管の透過性が低下していることを認めた。このことが、妊娠時の出血傾向低下に大いに貢献しているものと推察される。

以上、妊娠時では、血小板抗体による血小板破壊は非妊時と同じように起りうるが、出現する出血症状は非妊時に比して軽微であり、これには微小血管の透過性低下が大きな要因となつているものと推論する。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導並びに御校閲

を賜つた恩師西村敏雄教授に深甚なる感謝の意を捧げます。

なお、本論文の要旨は、第24回日本産科婦人科学会総会において発表した。

文 献

- 古家 堯 (1960): 九州血液研究同好会誌, 10, 1.
 川野清子 (1952): 日血会誌, 15, 385.
 増沢恒一郎 (1941): 児科雑誌, 47, 683.
 村上 章 (1966): 弘前医学, 18, 246.
 長沢一磨 (1966): 弘前医学, 17, 542.
 中村家政 (1969): 皮膚科の臨床, 11, 106.
 野上保治, 神岡順次, 榊原 章 (1964): 産婦の世界, 16, 58.
 尾崎康晴, 山田幸生 (1963): 産と婦, 30, 1518.
 渡辺栄三, 立川卓男, 安永幸二郎 (1969): 臨床婦人科産科, 23, 749.
 Barnes, R. (1867): Brit. M.J., 2, 375.
 Bedson, S.P. (1921): J. Path. Bact., 24, 469.
 Luther, M.T. and Robert, D.L. (1964): Am. J. Obst. & Gynec., 90, 44.
 Marino (1905): Bedson, S.P. (1921) J. Path. Bact., 24, 469. より引用
 Mor, A., Yang, W., Schwarz, A. and Jones, W.C. (1960): Obstet. and Gynec., 16, 338.
 Nilsson, I., M. and Kullander, S. (1967): Acta Obst. et Gynec. Scandinav., 46, 273.
 Nitta, R., Hayashi, H. and Norimatsu, K. (1963): Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113, 185.
 Shaper, A.G., Kear, J., Macintosh, D.M., Kyobe, J. and Njama, D. (1968): J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlt., 75, 433.
 Ward, C.V. and Mac Arther, J.L. (1948): Am. J. Obst. & Gynec., 55, 600.

(No. 2761 昭49・3・12受付)