

血中カテコールアミン測定値に及ぼす血小板の影響 国立循環器病センター臨床検査部

辻 哲・北野博司・片山善章・松山辰男

【はじめに】

血中カテコールアミン (CA) の測定には従来よりヘパリンあるいはEDTA採血が一般に用いられており、CAの不安定性を理由に低温下での迅速な血漿分離の必要性が強調されてきた^{1, 2)}。一方血栓や血小板研究の分野においては、血小板が大量のCAを含有しておりその活性化や凝集に際して多様な生理活性物質とともにCAが放出されることが知られている³⁾。

今回、我々はEDTA血漿、血清および血小板のノルアドレナリン (NA), アドレナリン (A), ドーパミン (DA) を定量し、生理的、薬理的刺激時の経時変動を観察することにより血清、血漿、血小板のCA値の間に存在する関係を明らかにした。さらに検体の採取・保存法の相違によってCA値がどのように変動するかを示した。これらの結果から血中CA検体に対する最良の取扱法および留意点について考察した。

【方 法】

採血法としてEDTA採血と普通採血を用いた。EDTA添加血は採血後直ちに冷却遠心し血漿を凍結した。普通採血の場合は15分間室温にて凝固を完了させた後、冷却遠心し血清を凍結した。血小板CA検体に関しては血小板が凝集することにより放出されるCAが全て血漿中に濃縮されるものとして以下の手順にて調整した。すなわち、EDTA添加血から全血血小板数 \times (100/100-Ht)のPRPを作製した。次いでこれを遠心後上清を完全に除去し、0.02N塩酸を添加して同容量に復した後混和、超音波処理で血小板を破碎して凍結した。

血小板凝集抑制剤の効果に関しては健康成人に対してチクロピジンまたはアスピリンを投与して調べた。一回当りの投与量は前者で200mg、後者で330mgとし昼、夜、朝、の各食後に計3回投与し血清、血漿および血小板のCA値の変動をみた。採血時間は投与前、一回目の投与後2時間および24時間後の3点とし、各点で立位と仰臥安静30分後の採血を行った。グルカゴン負荷試験は患者を安静仰臥位に保った状態で実施した。安静後30分に投

与前値としての採血を行った後グルカゴン1mgを静注し、以後3, 6, 15, 30分後に採血した。

CAの測定には全自動カテコラミン分析器 (HLC-8030, 東ソー) を用いた⁴⁾。本装置は試料として検体を過塩素酸で除蛋白した上清を用い、高速液体クロマトグラフィーと蛍光検出を組み合わせた原理に基づいている。蛍光反応はポストカラムにて行われ、反応試薬としてジフェニルエチレンジアミン^{5, 6)} (DPE) が用いられている。

【結 果】

1) 血清、血漿、全血の保存

図1にEDTA血漿、ヘパリン血漿、血清+EDTAおよび血清を4℃で冷蔵保存した時のCA値の変動を示す。NA, A, DAともに血漿よりも血清の値が高かった。NA, Aはヘパリン血漿、血清および血清+EDTAの値が少なくとも6日間安定であったのに対しEDTA血漿では採血日以降測定値の減少がみられた。普通採血による全血をそのまま4℃で保存したところ、異なる2例において少なくとも24時間はNA, A, DA共に安定であった。さらに4℃(氷水中)、23℃(室温)、30℃(恒温水槽)で普通採血の全血を保存した時のCA値の変動を検討した。この実験における時間0は採血直後に即座に4℃で冷却遠心し、上清を試料としたもので凝固過程は未だ進行中である。検討された全ての温度で0hと1hの間でNA値の急激な増加が観察され、その後NA値は下降傾向を示し保存温度が高いほど急速に減少した。Aに関しては初期の急速な上昇は認められず、4℃と23℃の場合0~2hの間で比較的緩やかな一時的増加あるいは不変で推移したが、30℃の場合は暫減傾向を示した。2h以降はNAと同様に温度依存性に減少した。

図1 血清、血清+EDTA、EDTA血漿およびヘパリン血漿中 CA 値の 4℃ 保存における変動

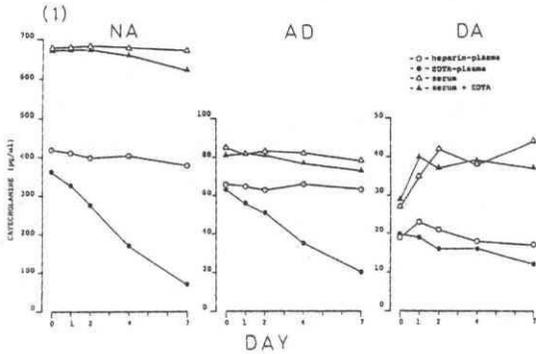
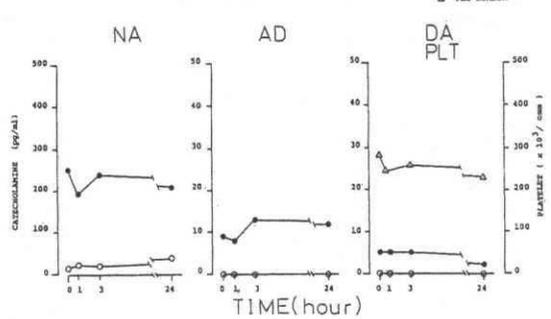


図3 洗浄血小板における CA の保存

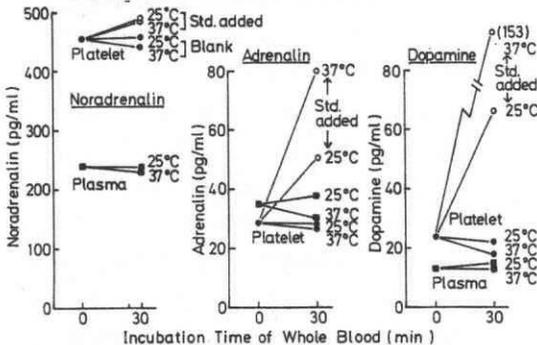
洗浄血小板における CA の保持



2) 血漿と血小板の間の CA の往来

血小板と血漿との間で CA の往来が存在するか否かについて検討した。EDTA 全血に全血 1 ml 当り 1000 pg になるように NA, A, DA の標準品を添加し、25℃ および 37℃ で 30 分間インキュベーションを行った。同一 EDTA 血漿に標準品を添加せずに同一操作をした検体を対照として血小板および血漿中の CA 値の変動を調べた。その結果を図 2 に示す。対照検体の NA, A, DA 値は 25℃ では血漿 (■) および血小板 (●) ともにほとんど不変であったが、37℃ では全体に若干の減少が認められた。これに対して標準品を添加した検体の血小板中 CA 濃度 (○) は全て増加を示し、インキュベーション温度が高いほど増加量も大きくなる傾向が認められた。また NA, A の増加量が同程度であるのに対して、DA の増加量はそれらを大きく凌ぐものであった。なお、インキュベーション前後での血小板数の減少はほとんどなかった。

図2 Changes in Values of Catecholamines in Platelet with Incubation of Whole Blood(EDTA) in Which Catecholamine Standards are added



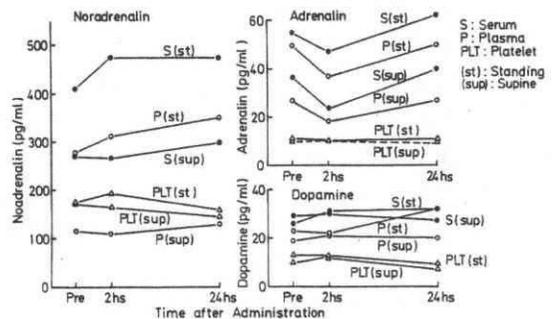
血小板を 37℃ で等張緩衝液中でインキュベーションして血小板からの CA のリークの有無を観察したところ、24 時間までほとんど放出されることはなかった (図 3)。このとき血小板の崩壊もみられなかった。

3) 抗血小板剤の影響

互いに薬理機序の異なる血小板凝集抑制剤であるチクロピジンとアスピリンを健常者に投与し、血清、血小板および血漿中の CA 濃度の変動を調べた。アスピリンの結果を図 4 に示す。両薬剤とも投与前後で CA 値の大きな変動を導くことはなかった。NA, A に関しては血清および血漿値が臥位と立位の間で大きく異なるのに対し、血小板値は両体位間で極めて良い一致性を示した。DA に関しては立位と臥位の間で血漿、血清および血小板の測定値が非常によく一致した。すなわち両体位間で DA は NA や A と異なり全く変動しないことが示された。

また採血ポイントあるいは立位、臥位の区別を問わず、血漿と血小板の CA 値の和が血清値とほぼ等しくなることも示された。

図4 Changes in Values of Catecholamines in Serum, Plasma and Platelet after Administration of Aspirin

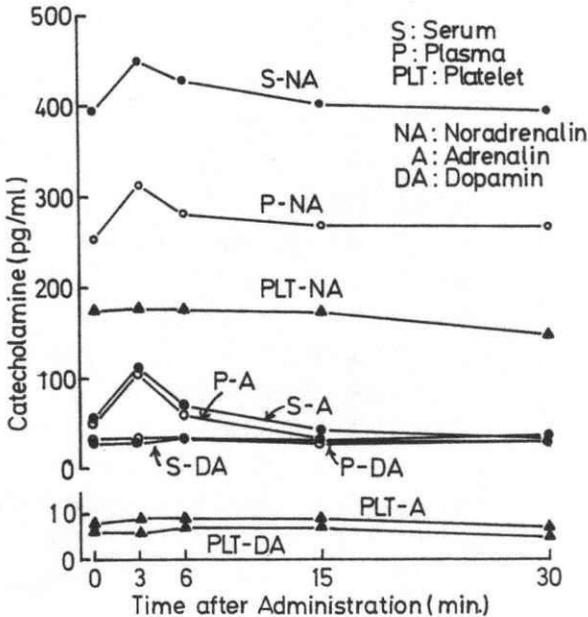


4) ゲルガゴン負荷による変動

ゲルガゴン負荷による血清、血漿および血小板中の CA 値の変動を観察した (図 5)。血小板値は NA, A, DA ともに全く変動しなかった。また血清および血漿の DA 値が不変であったのに対し、NA, A では血清、血漿ともに 3 分でピークを形成したのち即座に下降し前値付近に安定した。このとき血清値は血漿値とよく一致した変動を示した。図には示さなかったが、

我々はこの他にもう一例のグルカゴン負荷のデータを得ており、その症例でも図5と全く同様の変動が観察された。

図5 Changes in Values of Catecholamines in Serum, Plasma and Platelet after Administration of Glucagon



【考 察】

今回の検討を行うに当たっての我々の当初の目的は、血中CA定量における最良の採血、保存条件の検索にあった。従来より血中においてCAは極めて不安定な成分であり、その取扱いには大きな注意を払うべきことが諸家により報告されている^{1, 2)}。そのため従来より推奨されているEDTA採血法を中心において検討を計画した。ところが得られたデータを見るかぎり血中CAが以外にも低温下で安定であることが判明した。結果で示したように氷冷下においては全血ですら安定であることが示された。採血直後に4℃で遠心分離を行った場合、血清部分に必ずフィブリン塊が生じる。フィブリン塊内部には大量の血小板が取り込まれており、その活性化によって内部に含有される血清は外部の血清に比べて高濃度のCAを取り込んでいる。データとして示さなかったがこの事実については確認済みである。

また図1で血清よりもEDTA血漿の方が不安定であったことも全く予想外の結果であったが、この原因については現時点では不明である。もっとも、採血後迅速に血漿を分離凍結し定量に当って溶解して前処理に供するまでの経過の中で、血漿が溶解した状態にある時間は

多く見積もっても1時間を越えることはなく、完全な検体管理下では定量値の信頼性が損なわれる可能性はないと考えられる。

ヘパリン採血に関してはヘパリンが基本的に血小板凝集を抑制する能力を有しないことから慎重に考慮する必要がある。しかしながら最近の我々の経験では、メーカーによっては37℃で数時間インキュベーションしても血小板の凝集しない採血管もあり、今後検討の余地を残している。

図4, 5のデータをよく観察すると種々の採血条件や薬物負荷のいかにかわからず、NA, A, DAの全てに関して血清値が血漿値と血小板値の和にほぼ等しいという関係を有することが明らかである。さらに生理的、薬理的刺激のもとで血小板値は全く変動することがなく、このため血清値と血漿値はパラレルに変化することも示された。すなわち血中CAの測定に際して検体は血漿、血清のどちらでもよく、課題は両者における独自の正常値設定である。

一方、血小板値がほぼ不変であることから血漿値こそがCAの真の動きを反映しているという議論も成り立つと考えられる。しかしながら図2に示されるように、少なくともin vitroにおいては血漿と血小板の間でCAの往来がありうると考えられ、今回のデータを大きく上回るような変動があった場合にはin vivoにおける血小板値も変化する可能性がある。さらに血小板中CAの起源が血漿CAであることから、血清値こそが真の血中CA値であると結論することもできる。以上に述べた議論には推察の域を出ない部分が多く、血漿と血清のどちらがより妥当かという問題に関する結論を見いだすためには、今回の検討成績のみでは症例の幅、数ともあまりにも貧困である。ともかく現時点では、血漿値と血清値は絶対的に全く等しい変動を示し、ともに臨床上有用であるとのみ結論することができる。

従来より血中CA値は種々の精神的、肉体的ストレスや穿刺などにより変動する可能性があるといわれてきた。しかしながら図4では採血の度に穿刺したにもかかわらず立位、臥位ともに各採血時点で有意の変動を示さなかった。この検討成績は健康な病院職員から得られたものであるが、同じような日常生活を送り採血にもよく慣れている個人の場合、CA値の日差変動はあまり大きなものではないかもしれない。図5においても、患者に検査の内容をよく説明し不安を取り除くことにより、全て穿刺採血を行ったにもかかわらず安定で妥当なデータを得ることができた。

血中CAの測定にとって最も肝要な留意点は血小板の

処遇にある。EDTA血漿の場合では血小板を完全に除去するために遠心分離を血漿が完全に清透となるまで行う必要がある。わずかでも濁りが残っているときは血小板CAの影響が残る。また遠心に際してブレーキを解除し、ブレーキング時の血小板の巻き上げを防ぐことにより簡便に血小板を取り除くことができる。血清の場合はこれと反対である。採血後室温に15-20分間放置し凝固を完全に達成してから冷却遠心を行う。この時血小板の凝集およびCAの放出は終了しており、血小板CAの血清中への移行もすでに完了している。前述したように遠心後フィブリンクロットが生成しているときは要注意で、このクロット内の血清を完全に絞り出して混和し再度遠心する必要がある。今までCA定量における血小板の影響についてはあまり話題にされておらず、この問題を押さえるだけでデータの信頼性は飛躍的に改善されると考える。

CAの測定法としてHPLCが導入されて以来、THI蛍光検出法と電気化学検出法が広く普及しているが、DAに関して考えると前者は原理的にDAにたいする感度が低く、後者は特異性に難点があるために事実上信頼しうる定量法が存在しなかった。今回用いた分析装置HPLC-8030は新しい蛍光ラベル化剤ジフェニルエチレンジアミン(DPE)を使用することによりNA, AはもちろんDAに関して高感度な上に極めて簡便で高い処理能力を有する装置であった。

【結 語】

血液中のCAは以外にも安定であった。測定にはEDTA血漿と血清のどちらかを選択することが可能であるが、血清と血漿のどちらが妥当であるかについては今後に残される問題である。血中CA測定値の信頼性を保証するためには血小板の取扱いが最も重要であった。血中CAの個人における日差、日内変動は余り顕著ではなく、また穿刺による影響も大きなものではなかった。

<文献>

- 1) 大和谷厚, 和田 博ほか: 臨床医. 8: 1300-1305, (1982)
- 2) 増山善明ほか: 昭和56年厚生省循環機研究委託費による研究報告. 56指-7 高血圧症における神経機構に関する研究.
- 3) Gordon, J. L. 編, 山中 学監訳: 血小板-生理と病態, P187-190 日本メディカルセンター出版部. 東京 (1978)
- 4) 辻 潮, 中西豊文, 中井一吉ほか: 臨床検査機器・

試薬. 11: 635-641. (1988)

5) Nohta, H., Mitui, H., Ohkura, Y. et al.: Anal. Chim. Acta. 165:171-176(1984)

6) Nohta, H., Mitui, H., Ohkura, Y. et al.: Anal. Sci. 2:303-308(1986)