

## 鹿児島県で発生した牛の血腫に関する臨床血液学的研究 (IV)

### —血小板の電子顕微鏡的検索—

阿久沢正夫・大藺浩之・永吉貴子・森園 充・安田宣紘<sup>\*1</sup>・松元光春<sup>\*2</sup>

(家畜内科学研究室・<sup>\*1</sup>家畜病理学研究室・<sup>\*2</sup>家畜解剖学研究室)

平成2年8月8日 受理

## Clinical Hematological Studies in Cattle with Hematomas in Kagoshima Prefecture (IV) — Electron microscopic study in platelets —

Masao AKUZAWA, Hiroyuki OZONO, Takako NAGAYOSHI, Mitsuru MORIZONO,  
Nobuhiro YASUDA<sup>\*1</sup>, Mitsuharu MATSUMOTO,<sup>\*2</sup>

(Laboratory of Veterinary Medicine, <sup>\*1</sup>Laboratory of Veterinary Pathology,

<sup>\*2</sup>Laboratory of Veterinary Anatomy)

### 結 言

血小板は流血中では円盤状の形態を保ち、機能の発現に重要な役割を持つ血小板膜に包まれて、内部には微細線維 (microfilaments) や微小管 (microtubules) が認められる。微小管は偽足形成に、また微細線維は血小板の収縮、偽足形成、血餅退縮に関与している。血小板の中心部には $\alpha$ 顆粒 ( $\alpha$  granules), 濃染顆粒 (dense granules), ミトコンドリア, 開放小管系, 暗調小管系, グリコーゲン顆粒などが認められる。 $\alpha$ 顆粒は中等度の電子密度を持ち、光学顕微鏡でアズール顆粒として認められるものと一致し、フィブリノーゲン, 血小板第4因子, フィブロネクチン, 増殖因子, などを含む。濃染顆粒は $\alpha$ 顆粒より小型で、限界膜内に極めて高電子密度の芯 (core) が認められ、セロトニン, ADP, ATP,  $\text{Ca}^{++}$ , などを含む。開放小管系は血小板内部の全域に分布し、平坦な面で外部と連絡して内・外の交通路となっている。暗調小管系は微小管の近くに存在して、細胞質内 $\text{Ca}^{++}$ が貯蔵されている。

血管壁が損傷を受けたとき最初に修復に関与するのは血小板で、血管内皮剥離面に粘着し、円盤状から球形にまた細胞質突起、偽足形成など形態変化を起こしながら凝集し、損傷などによる刺激で活性化されると血小板は $\alpha$ および濃染顆粒の内容を、開放小管系を通じて血小板外に放出し、血小板の粘着と凝集を促進する。互いに凝集粘着して形成された血小板凝集塊 (一次血栓) は、止血や血栓形成に重要な役割を果たす。これは止血の重要な第1段階である。凝集により形態変化した血小板では、顆粒が中

心部へ集まり、微小管の束により取り囲まれる。これらの顆粒は開放小管系と結合し、顆粒内容が開放小管系を通じて血小板外に放出される。この現象は放出反応と呼ばれる。放出は、濃染顆粒の放出、 $\alpha$ 顆粒の放出、小胞様構造からのライソゾーム酵素の放出が知られている。凝集は血小板が互いに付着しあうことで、血小板は傷害血管壁に粘着した後形態が変化し、放出反応を起こしながら凝集する<sup>3,4,8)</sup>。

これまでの著者らの検索から、鹿児島県の黒毛和種牛に多発する治癒困難な血腫は、血小板の凝集能低下が主要な発生原因であることが示された<sup>1)</sup>。さらに、血小板の凝集能低下は、血小板の内部に含まれる貯蔵物質 (storage pool) が少ない場合 (storage pool deficiency), または貯蔵物質は存在するが放出されない場合 (release deficiency) が原因と考えられている<sup>10)</sup>。この貯蔵物質の欠乏している疾患がSPD (storage pool disease) であるが、細胞内の貯蔵部位である $\alpha$ 顆粒が欠乏しているのは $\alpha$ -SPD、濃染顆粒が欠乏しているのは $\delta$ -SPDと呼ばれる<sup>12)</sup>。これまでの検索から、血腫牛では血小板中の濃染顆粒に貯蔵される物質のセロトニン量が正常牛よりも低値であるため、 $\delta$ -SPDであることが示唆された<sup>2)</sup>。

本研究では、コラーゲンと反応させる前と反応後の血小板の構造について、正常牛と血腫牛とについて、電子顕微鏡的に比較検討したので、その結果を報告する。

### 材 料 と 方 法

動物は県内の農家で飼育される黒毛和種牛で、血腫が存在するかあるいは血腫の既往歴があり大顆粒

性好酸球を持つ8頭（血腫牛）と、対照として血腫の既往歴がなく臨床的に正常で通常の大きさの好酸球顆粒を持つ5頭（正常牛）を用いた。

採血は頸静脈から行い、血液は生理食塩液で溶解した3.2%クエン酸Na液と9:1の比率で混合し凝固防止した後、ポリプロピレン遠沈管内で180×gで10分間遠沈し、上清中の血球層直上に密接して浮遊する白雲状の血小板層を吸引してPRP（多血小板血漿）を採取した。

血小板の形態は、静止相はPRPを、またコラーゲンと反応後の形態変化はPRPに馬の臍コラーゲンの1mg/ml溶液（Hormon-Chemie社）を終濃度90.9μg/mlとなるように加えて10分間反応後を、それぞれ血腫牛と正常牛について観察した。電子顕微鏡用試料の作製は、PRPに等量の0.1%グルタルアルデヒド（0.1Mカコシル酸緩衝液）を加えて、2,400rpmで10分間遠沈し、上清を除去した後試験管の底にある血小板pelletに3%グルタルアルデヒドを静かに重層した。室温で3時間固定した後、血小板pelletを取り出して1mm角に細切り、カコシル酸緩衝液（pH7.4）で洗浄後、1%オスミウム酸（0.1Mカコシル酸緩衝液）で約3時間後固定した。常法により上昇アルコール脱水後、QY-1で置換し、Epon812で包埋して、58℃で2日間重合させた。超薄切片を作製した後、酢酸ウラニルとクエン酸鉛により2重染色して、透過型電子顕微鏡（JEOL 100C）で観察した。

撮影した電子顕微鏡写真により、血小板300個中に含まれる濃染顆粒、α顆粒、小胞（membrane limited vesicles）の値を計測し、血小板1個に含まれる各構造の数を算定した。また、画像分析装置（Nikon, Cosumozone IS）により、各検体の血小板の面積を測定し、血腫牛と正常牛を比較した。

## 結 果

### 1. 電子顕微鏡による検索

#### (1) 静止相

血腫牛と正常牛の血小板は、いずれも円形あるいは楕円形で形および大きさにおいて血腫牛と正常牛の違いは認められなかった。血小板の内部構造では、ミトコンドリアの数は、血腫牛と正常牛で差はみられなかった。血小板内の顆粒は、α顆粒は中等度で一様な電子密度を持ち、円形あるいは楕円形の構造で、血腫牛と正常牛で形、数ともに違いはみられなかった。濃染顆粒は正常牛では円形で、内部は明るくその中に極めて高電子密度の芯（core）を持つ構造で、

通称牛眼（bulls-eye）といわれ、正常牛では典型的な濃染顆粒の存在が認められたが、血腫牛の血小板では正常牛と同様な構造は認められなかった。正常牛では濃染顆粒と同様な構造で内部に芯（core）のない小胞（membrane limited vesicles）が存在したが、血腫牛では極めて少なかった。開放小管系は正常牛、血腫牛ともに認められなかった。微小管、グリコーゲン顆粒、暗調小管系、ミトコンドリアは、血腫牛と正常牛でほぼ同様に認められた（Fig. 1, 2, 3）。

#### (2) コラーゲンと10分間反応させた後の所見

正常牛では円形のままあるいは偽足を出して形態変化しているものなどさまざまであり、内部構造も大部分の血小板では消失していた。一部の血小板では、α顆粒など内部構造が存在していた（Fig. 4）。

血腫牛では、一部の血小板に凝集像がみられ、その周囲に軽度に変化を起こした血小板が認められたが、大部分の血小板は形態変化は観察されず、静止相の血小板と同様の像を示した。

### 2. 血小板面積の比較

各牛の試料毎に血小板面積を測定して、平均値と標準偏差を求めた（Table 1）。血腫牛は個体差がみられたが、血腫牛と正常牛の比較では、有意な差はみられなかった。

Table 1. Platelet profile areas in the hematoma and the control cattle

	No.	Counted platelets	Profile areas (μm <sup>2</sup> )	
			Mean	±SD
Normal cattle	1	105	2.800	0.974
	2	105	3.182	1.345
	3	94	2.839	0.884
	4	77	2.769	1.359
	5	107	2.884	0.783
Mean			2.900	1.087
Hematoma cattle	1	74	2.617	0.961
	2	88	3.469	1.302
	3	89	2.492	0.751
	4	127	3.120	1.087
	5	85	2.830	0.900
	6	93	2.709	0.785
Mean			2.873	0.964

### 3. 血小板内の顆粒数の比較

各牛の血小板160-300個を観察し、内部に含まれるα顆粒、濃染顆粒、小胞（membrane limited vesicles）の数を調べ、その平均値を求めた（Table 2）。濃染顆粒の数は正常牛では血小板1切片当たり0.31であったが、血腫牛では正常牛の濃染顆粒と類似の構造は

認められず有意な差がみられた。一方、 $\alpha$ 顆粒は正常牛の平均が3.90、血腫牛では3.91で両者に差はなかった。また、小胞 (membrane limited vesicles) は、正常牛が0.34であったのに対して、血腫牛では0.09と濃染顆粒と同様に有意な差がみられた。

Table 2. Numbers of granules per platelets in the hematoma and the control cattle

	No.	$\alpha$	Dense	Vesicle
Normal cattle	1	3.18	0.23	0.34
	2	4.72	0.47	0.38
	3	3.98	0.31	0.38
	4	4.22	0.37	0.29
	5	3.70	0.21	0.33
Mean		3.96	0.32	0.34
$\pm$ SD		0.64	0.12	0.04
Hematoma cattle	1	3.52	0.00	0.06
	2	4.38	0.00	0.11
	3	3.76	0.00	0.10
	4	3.84	0.00	0.10
	5	3.86	0.00	0.09
	6	4.37	0.00	0.09
Mean		3.95	0.00*	0.09*
$\pm$ SD		0.38	0.00	0.02

\* :  $p < 0.05$ , Dense : dense granules,  $\alpha$  :  $\alpha$  granules, Vesicle : membrane limited vesicles

## 考 察

これまでの研究から、血腫牛は、血小板のコラーゲン凝集能の低下、血小板の放出能の低下、血小板中のセロトニン含量の低下からSPDであることが示唆された<sup>2)</sup>。本研究で、血腫牛の血小板中には、濃染顆粒が認められなかったことは、SPDであることを裏付ける所見であった<sup>6)</sup>。SPDには、血小板中の $\alpha$ 顆粒が少ない $\alpha$ -SPDと、濃染顆粒の少ない $\delta$ -SPDおよび $\alpha$ 顆粒と濃染顆粒がともに少ない $\alpha$ ,  $\delta$ -SPDの存在が知られているが<sup>9)</sup>、血腫牛では、 $\alpha$ 顆粒数は正常牛と同程度に認められ、 $\delta$ -SPDであることが確認された。

血小板の面積は、血腫牛と正常牛とで差はみられなかった。電子顕微鏡的に比較した場合、血腫牛の病態に類似するChediak-Higashi症候群の牛の血小板は、正常牛よりやや小さい<sup>6)</sup>、あるいは差がない<sup>7)</sup>と一定の傾向がみられない。血小板の大きさは電顕試料の作製時の操作による大きさの変化、あるいは測定方法の違いなども影響していることが考えられた。

本研究では正常牛、血腫牛のいずれにおいても血小板細胞質内に開放小管系が認められず、牛では開

放小管系が認められないという報告<sup>6)</sup>と一致していた。細胞質内の小胞 (membrane limited vesicles) は、牛の血小板に特有な構造で、濃染顆粒の芯 (core) を含んでいない部位の断面であるか、または貯蔵物質の放出と取り込みに関与する開放小管系の横断面であるか<sup>7)</sup>確定されていない。本研究でも正常牛には小胞 (membrane limited vesicles) が認められるが血腫牛では有意に少なく、濃染顆粒と傾向が同じであるため、両者の密接な関係が示唆された。

$\delta$ -SPDに含まれるChediak-Higashi症候群の牛の血小板では、濃染顆粒の数が正常牛の45%<sup>7)</sup>、2%<sup>5)</sup>、1%<sup>6)</sup>などさまざまであった。本研究では、血腫牛の血小板には正常牛の濃染顆粒に類似する構造は認められなかった。しかし、濃染顆粒からの放出は血小板凝集に不可欠であり<sup>11)</sup>、著者らのこれまでの研究から血腫牛の血小板は軽度ながらコラーゲンにより凝集することから<sup>1)</sup>、濃染顆粒の存在が少数であるか、あるいは存在していても構造が正常とは異なっていると推測された。

コラーゲン凝集と10分間反応させた後の血小板形態は、正常牛では血小板の形態変化、内容の消失が認められた。血腫牛では、一部の血小板に凝集像が認められたが、それ以外の部分では凝集や形態変化はみられず静止相と同様な像を示し、血小板凝集測定により血腫牛ではコラーゲン凝集率が低いことと一致する所見であった<sup>1)</sup>。

## 要 約

治療困難な血腫の発生する黒毛和種牛の血小板について電子顕微鏡で観察した結果、血腫牛の血小板では内部に含まれる顆粒のうち濃染顆粒が認められなかった。黒毛和種牛は開放小管系が認められず、小胞 (membrane limited vesicles) が存在しており、他の種類の牛の報告と一致していた。この小胞の数は血腫牛では正常牛より有意に少なく、濃染顆粒との関連が推測された。濃染顆粒の内部に含まれる物質 (storage pool) は血小板放出に必要であるが、これまでの研究から血腫牛ではこの物質が欠乏しているために凝集能が低いと考えられ、SPD(storage pool disease) であることが示唆された。本研究で認められた濃染顆粒の欠乏から、コラーゲン凝集の低下と濃染顆粒の欠乏との関連が裏付けられ、血腫牛は $\delta$ -SPDであることが確認された。血小板の面積は正常牛と血腫牛で差は認められなかった。

**謝辞** 本研究の遂行に当たり多忙な日常業務の中でご助力を頂いた曾於農業共済組合獣医師岡本光司と原田道夫両氏、本学農学部獣医学科家畜内科学研究室東迫恵子氏と附属家畜病院技官益山貢二氏に心からお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) 阿久沢正夫・安田宣紘・小野和則・日高敏雅・佐々木 悟・森園 充：黒毛和種肥育牛に多発する皮下血腫。日獣会誌，**40**，9-12 (1987)
- 2) 阿久沢正夫・森園 充・安田宣紘・佐々木 悟・薄窪郁郎・明里宏文・永吉貴子：鹿児島県で発生した牛の血腫に関する臨床血液学的研究(Ⅲ)，血小板コラーゲン凝集能低下，鹿大農学術報告，**40**，129-137 (1990)
- 3) Hardisty, R. M. and Caen, F. P. : Disorders of platelet function. pp. 365-392. In : *Haemostasis and thrombosis*. 2nd. ed. Bloom, A. L. and Thomas, D. P. (eds.), Churchill Livingstone, London (1987)
- 4) 久米章司・東原正明・橋本佳明・高畑京也：血小板の放出反応と凝集反応との関連。血小板1984-血小板放出反応一，蔵本 淳，大熊 稔，風間睦美，日高弘義，山崎博男 (編)，81-92 (1984)
- 5) Meyers, K. M., Holmsen, H., Seachord, C. L., Hopkins, G. E., Borchard, R. E. and Padgett, G. A. : Storage pool deficiency in platelets from Chediak-Higashi cattle. *Am. J. Physiol.*, **237**, R239-R248 (1979)
- 6) Meyers, K. M., Hopkins, G., Holmsen, H., Benson, K. and Prieur, D. J. : Ultrastructure of resting and activated storage pool deficient platelets from animals with the Chediak-Higashi syndrome. *Am. J. Pathol.*, **106**, 364-377 (1982)
- 7) Prieur, D. J., Holland, J. M., Bell, T. G. and Young, D. M. : Ultrastructural and morphometric studies of platelets from cattle with the Chediak-Higashi syndrome. *Lab. Invest.*, **35**, 197-204 (1976)
- 8) 高久史磨・高田明和 (編) : 血液，医学書院，東京 (1987)
- 9) 塚田理康：血小板放出異常症。血小板1984-血小板放出反応一，蔵本 淳，大熊 稔，風間睦美，日高弘義，山崎博男 (編)，159-179 (1984)
- 10) Valli, V. E. O. : Inherited platelet-function defects. In : *Pathology of domestic animals* Vol. 3 (3rd ed), Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C. and Palmer, N. (eds) p. 170, Academic Press, Inc., N. Y.
- 11) Weiss, H. J. and Ames, R. P. : Ultrastructural findings in storage pool disease and aspirin-like defects of platelets. *Am. J. Pathol.*, **71**, 447-466 (1973)
- 12) Weiss, H. J., Witte, L. D., Kaplan, K. L., Lages, B. A., Chernoff, A., Nossel, H. L., Goodman, D. S. and Baumgartner, H. R. : Heterogeneity in storage pool deficiency : Studies on granule-bound substances in 18 patients including variants deficient in  $\alpha$ -granules, platelet Factor 4,  $\beta$ -thromboglobulin and platelet-derived growth factor. *Blood*, **54**, 1296-1319 (1979)

## Summary

In platelets of the cattle with large and persistent hematomas, no dense granules could be seen electron microscopically. Not open canalicular systems but membrane limited vesicles were observed in platelets of Japanese black cattle, which agreed with the conclusions of the reports in other breeds of cattle. The membrane limited vesicles were significantly fewer in the cattle with hematomas than those in the normal ones, which suggested an intimate relationship with the dense granules. Substances contained in the dense granules are necessary for the platelet-aggregation, hence the suggestion that the hematoma cattle must have been affected by a SPD (storage pool disease) happening due to a deficiency of the substances. Present study proved the hematomas of the cattle as  $\delta$ -SPD judging from the relationship with the impaired collagen-induced aggregation, and the virtual absence of dense granules.

There was no difference in the platelet profile areas between the normal and the hematoma cattle.

---

### Explanation of figures

- Fig. 1. Platelets in a normal cattle.  $\alpha$  granules, dense granules and membrane limited vesicles were seen.  
V : membrane limited vesicles. Bar= $3\mu\text{m}$
- Fig. 2 A platelet in a normal cattle. D : dense granules, A :  $\alpha$  granules, G : glycogen, Mt : microtubules.  
Bar= $8\mu\text{m}$
- Fig. 3 Platelets in a hematoma cattle. There was no dense granule and membrane limited vesicles.  
 $\alpha$  granules were seen the same as those in normal platelets. Bar= $8\mu\text{m}$
- Fig. 4 Platelets in a normal cattle aggregated by the reaction with collagen. Structures in the platelets were released and disappeared. Bar= $8\mu\text{m}$

