

エンドトキシン血症犬の血小板減少における
血小板活性化因子(PAF)の関与

土 屋 亮

エンドトキシン血症犬の血小板減少における
血小板活性化因子（PAF）の関与

麻布大学 獣医学部

土屋 亮

[1995年6月]

目次

	ページ
緒論	1
第1章 血小板凝集試験に用いる試料の前処理法	3
第1節 犬PRPの最適遠心条件	4
1 材料および方法	4
1) 全章を通じて共通する事項	4
2) 本節の検討に関する事項	4
(1) 各回転速度での最も血小板回収率の高い遠心時間	5
(2) 回転速度と遠心時間の最適な組合せ	6
(3) 最適遠心条件で作製したPRPの血小板凝集	6
2 結果	8
1) 各回転速度での最も血小板回収率の高い遠心時間	8
2) 回転速度と遠心時間の最適の組合せ	11
3) 最適遠心条件で得られるPRPの血小板凝集	12
3 考察	13
第2節 凝集試験用血小板浮遊液の作製方法	14
1 材料および方法	14
1) 遠心洗浄による方法	14
(1) 原法の緩衝液に再浮遊させた血小板の場合	14
(2) 緩衝液の成分を修正した場合	15
① PPPの添加	15
② CaCl_2 (Ca^{2+})の添加	15
2) ゲルろ過による方法	15
(1) 血漿からの血小板分離状況の分光光度計による観察	15
① ろ液分画の吸光スペクトル	15
② 特定波長での連続的な吸光度変化	16
(2) ろ液中への血小板回収率と、回収されたゲルろ過血小板 (gel filtrated platelet; GFP)の容積	16
(3) GFPの凝集	16
① 緩衝液組成の改善	16
② CaCl_2 とフィブリノーゲン(Fbg)予備添加	17

2	結 果	17
1)	遠心洗淨血小板の凝集	17
(1)	原法の緩衝液に再浮遊させた血小板の場合	17
(2)	緩衝液の成分を修正した場合	18
①	PPP の添加	18
②	CaCl ₂ の添加	18
2)	GFP の凝集	20
(1)	PRP ゲルろ過による血漿からの血小板分離状況	20
①	吸光スペクトルの経時的変化	20
②	特定波長での連続的吸光度変化	21
(2)	GFP 浮遊液への血小板回収率と、回収された血小板の容積	22
(3)	GFP の凝集	23
①	緩衝液組成の改善	23
②	CaCl ₂ とフィブリノーゲン (Fbg) 予備添加	24
3	考 察	28
第 2 章 LPS 投与犬の血小板減少における PAF の関与		30
第 1 節 LPS 投与犬の血中 PAF 濃度		31
1	材料および方法	31
1)	LPS 大量投与群	31
2)	LPS 少量投与群	31
2	結 果	33
1)	LPS 大量投与群	33
(1)	血小板数	33
(2)	血中 PAF 濃度	33
2)	LPS 少量投与群	33
3	考 察	35
第 2 節 LPS 投与犬および PAF 投与犬の血液一般性状と 凝固・線溶系の変化		37
1	材料および方法	37
1)	実験群	37
(1)	LPS 投与 (I 群)	37
(2)	PAF 投与	38
①	単回投与 (II 群)	38
②	連続投与 (III 群)	38

(3) 対照 (IV群)	38
2) 血液検査項目	38
(1) 血液一般検査 (血球数算定および白血球分画)	38
(2) 凝固系・線溶系スクリーニング検査	38
① 凝固系	39
〔活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、 プロトロンビン時間 (PT)、および Fbg 濃度〕	
② 線溶系	39
〔フィブリン・Fbg 溶解産物 (FDP)〕	
2 結果	39
1) 臨床症状	39
2) 血小板数	41
3) 凝固・線溶系スクリーニング検査	41
(1) APTT、PT および Fbg 濃度	41
(2) FDP レベル	41
3) 白血球	48
(1) 総白血球数	48
(2) 白血球分画	48
3 考察	52
第3節 PAF 阻害剤による LPS 誘導血小板減少の抑制	55
1 材料および方法	55
1) PAF 阻害剤	56
2) 血小板 PAF 凝集に対する TCV-309 の特異的阻害効果	56
(1) in vitro で TCV-309 処理した血小板の場合	56
① 阻害効果の有無	56
② 阻害効果の PAF 特異性	56
(2) in vivo で TCV-309 処理した血小板の場合 (血小板凝集試験での検討)	57
① 阻害効果の有無	57
② 阻害効果の PAF 特異性	58
(3) TCV-309 の投与適量	58
3) TCV-309 前投与による LPS 誘導血小板減少の抑制	58
2 結果	58
1) 血小板 PAF 凝集に対する TCV-309 の阻害効果	58
(1) in vitro で TCV-309 処理した血小板の場合	58
① 阻害効果の有無	58

② 阻害効果の PAF 特異性	59
(2) in vivo で TCV-309 処理した血小板の場合	61
① 阻害効果の有無	61
② 阻害効果の PAF 特異性	61
(3) TCV-309 の投与適量	63
2) LPS 誘導血小板減少の TCV-309 による抑制	66
3 考 察	68
第 4 節 LPS 投与後再循環した血小板の PAF 脱感作	69
1 材料および方法	69
1) PRP を用いた、再循環血小板の PAF 凝集	69
2) GFP を用いた、循環血小板の PAF 凝集	69
2 結 果	70
1) PRP を用いた、循環血小板の PAF 凝集	70
2) GFP を用いた、循環血小板の PAF 凝集	71
3 考 察	72
総合考察	73
謝 辞	75
引用文献	76
英文要旨	88

緒 論

グラム陰性菌は、大腸菌群を始めその多くが動物の生活環境に常在し、動物は常に感染の機会に晒されている。感染経路も粘膜、外傷など非常に多様であり、本菌感染症は、各種動物に共通して最も一般的で、しかも被害の大きな疾患の一つである[Eberhart, Gentry, Green, Hardie, 工藤]。感染部位や程度によっては全身状態が急激に悪化するために、原因菌に感受性のある抗生物質を投与したり対症療法を施しても奏効せず、動物はしばしば死に至る[函城, Hardie 1990, 1985, Wessels]。その死因は主に、細菌の産生するエンドトキシン (Lipopolysaccharide; LPS) による敗血症性ショック (LPS ショック) といわれている[Green, Hinshow, Yamashita, Takekoshi, Fessler]。獣医領域では、子宮蓄膿症[Wessels]や乳房炎[工藤, 函城]などの生殖器疾患、あるいは出血性腸炎などの消化管疾患[Green, Wessels]で、動物が死亡するような重症例にしばしば遭遇する[Hall]。LPS ショックでは、血管や心筋の障害、低血圧[Hinshow, Doebber]、播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation; DIC) [Bregengard, Hardie]、あるいは低血糖症[Ceppi, Hardie, White]などが起こる。このうち DIC は、全身各所の微小血管内で血液が凝固して血液循環が障害され、同時に血小板や血液凝固因子が消費されて、いわゆる消費性血液凝固障害となって出血徴候を呈する疾患である[Green, Jain, 松田]。時には微小凝血塊が肺に集積[Pinckard]し、“ショック肺”と呼ばれる肺不全を起こす[Waterman]。これら DIC あるいはショック肺は、いずれも LPS が血中で増加すること (LPS 血症) による血小板の異常な活性化によって引き起こされるといわれている。活性化した血小板の放出物質はショックの引き金になりうる[McManus, McManus, Pinckard]ことから、血小板の活性化を制御することは、グラム陰性菌感染症を治療する上で重要なポイントの一つと考えられてきた[工藤]。しかしながら、LPS による血小板活性化メカニズムは未だ十分に解明されておらず、そのため、適切な対処法も確立されていない現状にある。

LPS 毒性の発現には、生体内でいく種類もの細胞による連鎖的な化学伝達系があると考えられており[Bosson, Bregengard, Gomez, Melby, Paloma, 里内, Yamashita]、近年その中間物質として、フォスフォコリンの 1 種「血小板活性化因子 (platelet activating factor; PAF) : Fig. 1」の関与が注目されてきた[Doebber]。

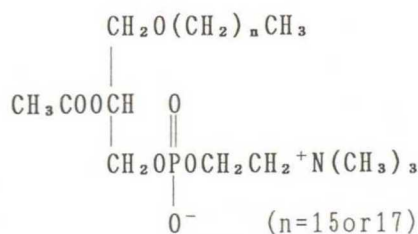


Fig. 1. Chemical composition of platelet activating factor (PAF; 1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

PAF は好中球や血管内皮細胞など多種類の細胞に対して刺激性を持ち、血小板もその主要な標的細胞の一つである[里内, Handley1990]。

すなわち、グラム陰性菌感染による病態の悪化に重要な役割を担う血小板の活性化には、LPS の刺激によって惹き起こされる細胞間の化学伝達網の一環として、PAF が関与していると考えられる[Yue]。したがって、LPS による血小板の活性化を制御するには、PAF の作用を考慮に入れることが必要である。しかし、PAF の血小板に与える刺激の強さは動物種により大きな差があるといわれており[Feingold, Meyers1985]、獣医領域でグラム陰性菌感染症の治療にこの新しい観点からアプローチするためには、実際の診療対象となる動物種別に、LPS による血小板過剰活性化における PAF の関与を確認しておく必要がある。

筆者は小動物診療の際しばしばグラム陰性菌による DIC と思われる犬の症例に遭遇し、その病態のうち、特に血小板反応における PAF の関与を明らかにしようと考えた。そこで、『犬のグラム陰性菌感染の際に見られる血小板の過剰活性化には PAF が関与する』という仮説を立て、その証明を試みた。

第 1 章

血小板凝集試験用試料の調整

血小板の活性化は、通常、最も基本的な方法として、血小板凝集試験を用いてスクリーニングされる。血小板はわずかな物理・化学的な刺激に反応してしまい[山崎]、血液の採取から凝集試験に用いるまでの試料の前処理が難しい [Catalfamo]。しかも各種刺激に対する血小板反応の感度には動物種差があり、とりわけ犬などの小動物では刺激に対する反応が鋭敏なため[Meyers1985]、前処理も動物種別に適当な方法を確率しておく必要がある[Clemons1983, Meyers1985]。しかしながら、それぞれの動物に適した具体的な前処理技術はまだ十分に確立されていない。従ってこの研究を進めるにあたり、犬血小板の凝集試験を行うための試料前処理方法から検討を始めた。

血小板凝集試験に用いる試料には ① 全血[Ingerman-Wojenski]、② 血小板のみを豊富に含む血漿(多血小板血漿; platelet rich plasma; PRP) [Catalfamo]、および ③ 血小板を緩衝液に浮遊させたもの[Mustard]、の 3 通りがある。このうち全血での凝集試験は、血小板の環境をできるだけ体内と同じに保つことを目的として使われている[Cardinal, Forsythe, Ingerman-Wojenski, Sharp]。一方、緩衝液に浮遊させるのは、血液中に含まれる血小板以外の成分による血小板凝集反応への影響を排除し、血小板単独の反応を調べることを目的に行われる[Timons, Walsh]。PRP は上記①と③の中間的な条件に位置し、白血球など、血小板以外の細胞による影響は除外される。血液中には血小板の代謝に影響を与える因子が多種類含まれており[Timons]、臨床例では、それらの影響も含めて体内での血小板の凝集機能を総合的に判定することが必要となる。そのため、通常、PRP あるいは全血が用いられる。逆に、今回筆者が LPS 誘導血小板減少における PAF 関与の確認を試みるように、血小板の活性化における特定物質の関与を研究するためには、むしろ血小板凝集に影響を与える血液中の他の諸因子を排除した方が望ましい。そこで、この研究では全血は用いず、PRP と、緩衝液中に浮遊させた血小板の 2 種類を用いることとした。

第 1 節

犬 PRP の調整条件

血小板は血液細胞の中で最も小型で比重が低いため、全血に適当な遠心操作を施すことによって血小板以外の細胞を沈殿させ、上清として PRP を得ることができる。血小板凝集試験にはこの PRP が最も多く用いられている。血小板を始め各種血液細胞の大きさや比重は動物種により異なっており、前述のとおり PRP を得るための遠心条件も動物種別に設定する必要がある [Catalfamo]。各種動物の血小板の研究を行う場合、この遠心条件の設定は研究施設ごとに工夫して行っているのが現状で、犬を例にとっても、文献により遠心の速度や時間の条件設定は多様である [Baudreaux, Catalfamo, Clemmons 1983, 1984, Gaunt, Jacobsen, 巨]。

そこで、効率的に犬の PRP を得る遠心条件を求め、さらにその PRP 中の血小板の凝集について検討した。

1 材料および方法

1) 全章を通じて共通する事項

実験犬は 1986 年 4 月から 1994 年 8 月までの間に、麻布大学生物科学総合研究所または獣医学部付属ベテリナリーアニマルセンター（1992 年 3 月までは同犬センター）において、獣医学部内科学第二講座が飼育したものをを用いた。種類、性、年齢、体重などは各章・各節の中でそれぞれ示す。なお犬の番号は、必要に応じて各節の中でそれぞれ設定する。これらの犬は、1 週間以上採血や血管または筋肉への注射、あるいは抗生物質や消炎剤などを投与しておらず、臨床的に健康で、末梢血中にミクロフィラリアを認めないものに限った。また、暑熱などのストレスが強く加わった犬も使用しなかった。血液の採取は、12 時間以上絶食させてから行った。採血にはすべて、プラスチックシリンジ（テルパック；Terumo 社）と内径 21 ゲージ（0.8 mm）、長さ 1.5 インチの使い捨て注射針（Terumo 社）を、また、試料前処理用遠心器には卓上型 SCT 5 BA（日立工機株）を用いた。

試薬類の製造元や規格は、各節の「材料および方法」の中で特に触れない限り、すべて和光純薬株の特級品である。

2) 本節の検討に関する事項

遠心による試料の分離状況は、回転半径を一定にした場合、回転速度と遠心時間の 2 つの条件に左右される。この実験では、回転速度は臨床検査室で日常使われる範囲の 600～3500 rpm まで 8 段階について比較することにした（Table 1）。遠心時間は、回転速度に応じて最短 1 分から最長 50 分まで表に示したとおり設定し、このすべての条件下での血小板分離効率を比較検討した。

Table 1. Whole blood centrifugal conditions for comparing platelet recovery to platelet rich plasma (PRP)

Spinning speed (rpm)	Gravitational ¹⁾ force (g)	Centrifugation time (min)							
		20	25	30	35	40	45	50	
600	120	20	25	30	35	40	45	50	
800	180	5	10	15	20	25	30	35	
1000	250	3	5	10	15	20			
1500	500	1	3	5	7	9			
2000	850	1	3	5	7	9			
2500	1200	1	2	3	4	5			
3000	1600	1	2	3					
3500	2000	1	2	3					

¹⁾ Calculated by using the radius of 14 cm (center of blood sample layers).

(1) 各回転速度での最も血小板回収率の高い遠心時間

Table 1 に示したすべての遠心条件で血小板回収率を求めるためには、血液を 40 本の試験管に用意しなければならない。一回分の採取血液でこの検討を一通り行うことは、実験に要する時間や血液量などの面から、困難である。そこでまず、1 回に採取した血液の使用は 1 種類の遠心速度に関する検討に限定し、それを繰り返すことによって、各遠心速度ごとに最も血小板回収率の高い遠心時間を求めた。

血液は、雑種犬 4 頭（雌雄各 2 頭、2~5 歳、体重 8~15 kg ; No. 1~4）から採取した。容量 10 または 20 ml のシリンジに、あらかじめ 3.8 % クエン酸 Na 液（緑十字社、赤沈用チトラール）を採取血液の 1/9 量吸引しておいた（採血量については後述）。次いで頸静脈から血液を採取し、クエン酸 Na 液と血液をシリンジ内で静かに混和して凝固阻止した（以後の記述においても、血小板凝集試験用は採血から凝固阻止まで同様に操作）。

回収率を求めるための PRP 分離操作は次のとおり行った。まず、前述の抗凝固処理血液を再度静かに混和して均質化し、全血中の血小板数を測定した後、内径 10 mm、長さ 74 mm のポリプロピレン試験管に 2 ml ずつ分注し、1 本ずつ遠心時間を変えて PRP を作製した。PRP は全血を入れたものと同じ規格の試験管に分離し、その量と血小板数を算定した。血小板数算定には、自動血球計数機 Sysmex F-800（東亜医用電子株）を用い（以下、血球数の算定はすべてこの機械を使用）、血小板回収率は次式から計算した。

$$\text{血小板回収率 (\%)} = \frac{\text{PRP 量 (ml)} \times P}{\text{全血量 (ml)} \times B} \times 100 \quad \left[\begin{array}{l} P = \text{PRP 中の血小板数} / \mu\text{l} \\ B = \text{全血中の血小板数} / \mu\text{l} \end{array} \right]$$

その後 1 週間以上の間隔を空けて、同一個体から繰り返して採血し、順次遠心速度を変更して同様の検討を行った。以上の手順によって、各回転速度別に最も血小板回収

率の良い遠心時間を求めた。採血量は、実験の都度、必要最小限（前述のとおり、1 種類の遠心時間の検討につき 2 ml；クエン酸 Na 液 1/10 容含む）となるよう適宜調節した。

(2) 回転速度と遠心時間の最適な組合せ

前実験では、血液サンプルは回転速度が変わる度に採取しなおしているため、Table 1 のすべての組合せでの血小板回収率を 1 つの試料で比較したことにはならない。そこで次に、1 回に採取した血液（同一試料）を前実験同様 2 ml ずつ 8 本に分注して、それぞれ異なる回転速度で PRP を作製し、各条件での血小板回収率を求めた。遠心時間は、前実験で得られた各回転速度で最も血小板回収率の高い時間 [結果 Table 3 参照] を用いた。この 8 種類の PRP 中への血小板回収率を比較し、Table 1 に示した回転速度と遠心時間の 40 種類の組合せ中で最適の条件を求めた。

(3) 最適遠心条件で作製した PRP の血小板凝集

上記検討の結果最適とされた遠心条件で作製した PRP が、血小板凝集試験に使用できるか否かを検討するために、20 頭の犬（ビーグル 14 雑種 6 頭、雄 5 雌 15 頭、7~15 Kg、2~10 歳）の PRP を用いて血小板凝集試験を行った。凝集惹起物質はクロノグ社のコラーゲン（馬の腱組織由来；最終濃度 6、10、20 $\mu\text{g/ml}$ ）、および Adenosin diphosphate（ADP；最終濃度 6、10、20 μM ）の 2 種類を、血小板凝集計は同社の 2 チャンネルルミアグリゴメーター C-550 型を用いた（以下、凝集試験は全てこの凝集計を使用）。

今回用いた血小板凝集試験の原理は、次に示すとおりである。

なお、PRP の対照として、PRP を分離した残りの血液を 3000rpm (1600g)・20 分遠心して作製した乏血小板血症 (platelet poor plasma；PPP) を用いた。

① PRP および PPP 500 μl を専用のキュベット (Fig. 2、a および d) に入れ、それぞれ血小板凝集計の所定の位置にセットする。凝集計にセットされた PRP は 37 $^{\circ}\text{C}$ に保ちながら、スターラー (1000 rpm) で攪拌される。

② 凝集計は、PRP の透光度を連続的に測定する赤外光の分光々度計であり、透光度は浮遊する血小板濃度と負相関する。凝集計はベースライン設定モードで、自動的に、PRP の透光度を透光率 0%、PPP のそれを透光率 100% に範囲設定する (図の縦軸)。

③ PRP にコラーゲンなどの血小板凝集惹起物質を添加すると、血小板は凝集して塊になる (図、試験管 a \rightarrow b \rightarrow c)。この凝集の進行に伴い、PRP の透光率は次第に上昇して、PPP のそれ (図、試験管 d) に近づく。PRP の透光率を連続的に記録すると、凝集惹起物質添加後は図中 e あるいは f のような曲線 (血小板凝集曲線) が描かれる (PRP は均質な液体ではなく固形物の浮遊液であるために、透光率には細かな振幅が生じる)。

凝集惹起物質添加直後、記録計は一時マイナス側に振れる。これは、凝集開始直前に血小板固有の円盤型を失って球型に変わり、しかも表面に多くの突起を出すことによって透光度が低下する現象（球状化）による。その後の血小板凝集は常に不可逆的（図中、曲線 e）ではなく、刺激の種類や強さによってはしばしば凝集状態から解離して、元の状態に戻る（図中、試験管 c' および曲線 e'）。

血小板凝集能を表す指標には、凝集惹起物質添加から球状化までの時間（Lag time）、透光率の最高値（最大凝集率）、あるいは最大凝集に達するまでの時間（BT/2）などがある。

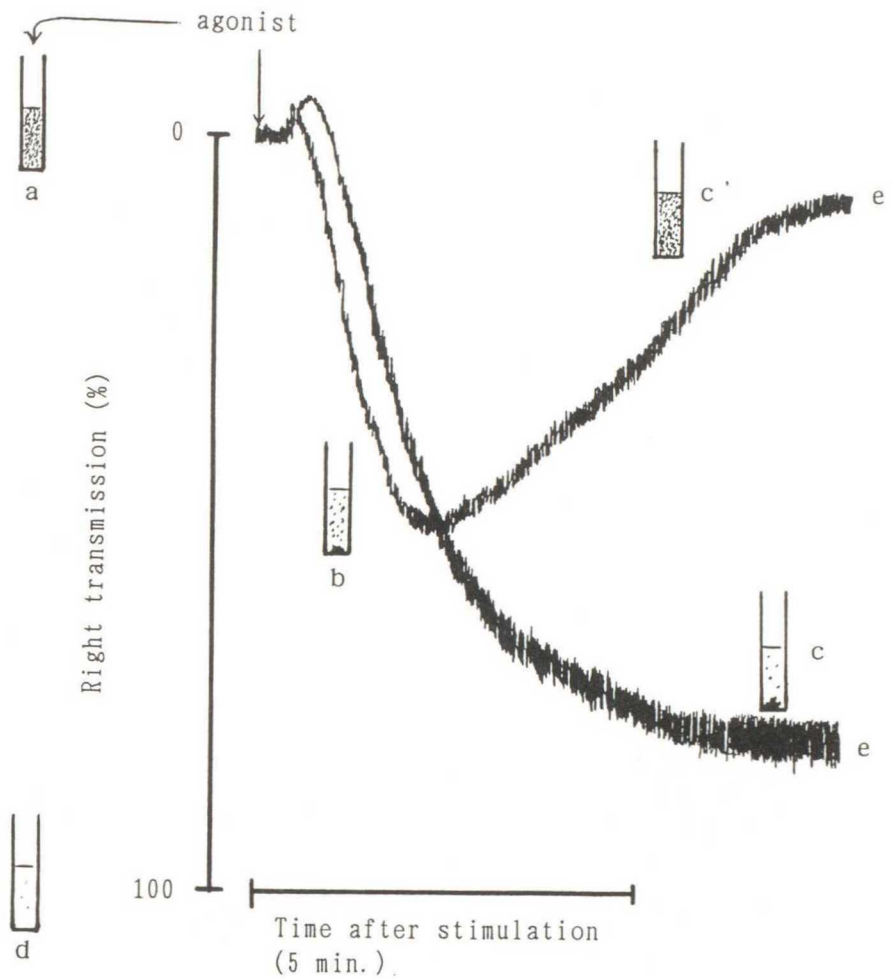


Fig. 2. A schema of platelet aggregation in platelet rich plasma by using photometric aggregometer.

Tube: a, platelet rich plasma (PRP); b, c and c', PRP changes after stimulation (aggregation); d, platelet poor plasma (PPP).

Aggregation line: e, irreversible; and e', reversible.

2 結果

1) 各回転速度での最も血小板回収率の高い遠心時間

各回転速度別に、異なる遠心時間で得られた PRP への血小板回収率を Table 2 に示した。また、Fig. 3 に各条件での血小板回収率平均値をプロットし、回転速度別に回収率曲線を描いた。当然ながら、遠心速度が高いほど短時間の遠心で高い血小板回収率が得られ、また、高速短時間遠心の方が低速長時間遠心より回収効率の高い傾向にあった。

なお、各遠心速度における最も血小板回収率の高い遠心時間は、Table 3 のとおりであった。

Table 2. Platelet recovery percentage of PRP at the different spinning speeds and the centrifugation times in four dogs

Spinning speed (rpm)	Dog No.	Centrifugation time ¹⁾						
		20 min.	25	30	35	40	45	50
600	1	66.8	67.8	64.7	64.8	61.3	56.1	56.0
	2	32.7	40.0	42.5	42.6	42.9	42.3	42.0
	3	24.0	26.3	30.1	36.9	34.7	34.9	33.1
	4	15.1	18.5	21.2	24.3	25.5	30.9	29.9
	mean	34.7	38.2	39.6	42.2	41.1	41.1	40.3
800	1	55.9	70.3	75.7	78.6	70.6	44.5	27.1
	2	12.8	19.2	25.3	33.0	37.1	35.7	35.3
	3	27.0	36.2	50.6	58.3	68.3	47.4	51.8
	4	20.2	27.7	36.2	49.2	49.3	52.7	43.3
	mean	29.0	38.4	47.0	54.8	56.3	45.1	39.4
1000	1	31.8	47.1	59.4	56.5	49.2	40.3	
	2	9.0	10.7	20.1	26.3	29.8	28.2	
	3	10.0	22.3	40.8	49.8	45.7	40.1	
	4	18.7	31.7	54.5	46.4	47.5	42.3	
	mean	17.4	28.0	43.7	44.8	43.1	37.7	
1500	1	24.2	52.9	66.3	45.9	39.1	31.3	
	2	22.5	51.4	60.8	61.6	59.9	48.3	
	3	14.7	38.9	45.3	43.7	43.7	38.3	
	4	25.4	28.2	32.6	36.6	36.0	29.8	
	mean	21.7	42.9	51.3	47.0	44.7	36.9	
2000	1	44.1	75.4	49.1	33.4	17.8		
	2	15.1	30.3	27.2	22.9	16.2		
	3	26.3	57.0	43.8	39.5	31.2		
	4	32.8	56.7	63.5	45.7	21.8		
	mean	29.6	54.9	45.9	35.4	21.8		
2500	1	63.9	77.0	60.8	54.0	12.7		
	2	67.3	73.5	41.0	42.8	35.4		
	3	32.9	52.0	56.6	45.8	30.4		
	4	36.2	68.7	55.7	58.2	44.6		
	mean	50.1	67.8	53.5	50.2	30.8		
3000	1	84.8	78.3	43.4				
	2	66.7	65.6	50.6				
	3	47.2	50.3	42.3				
	4	40.2	36.4	26.9				
	mean	59.7	57.7	40.8				
3500	1	93.8	62.1	29.2				
	2	70.8	46.8	37.0				
	3	60.1	43.8	35.4				
	4	62.0	43.9	37.5				
	mean	71.7	49.2	34.8				

¹⁾ Different centrifugation times were set at each spinning speed as shown in Table 1 (min.: shown on the first lines at each spinning speed). Blood samples were collected separately and repeatedly for each examination at the different spinning speeds.

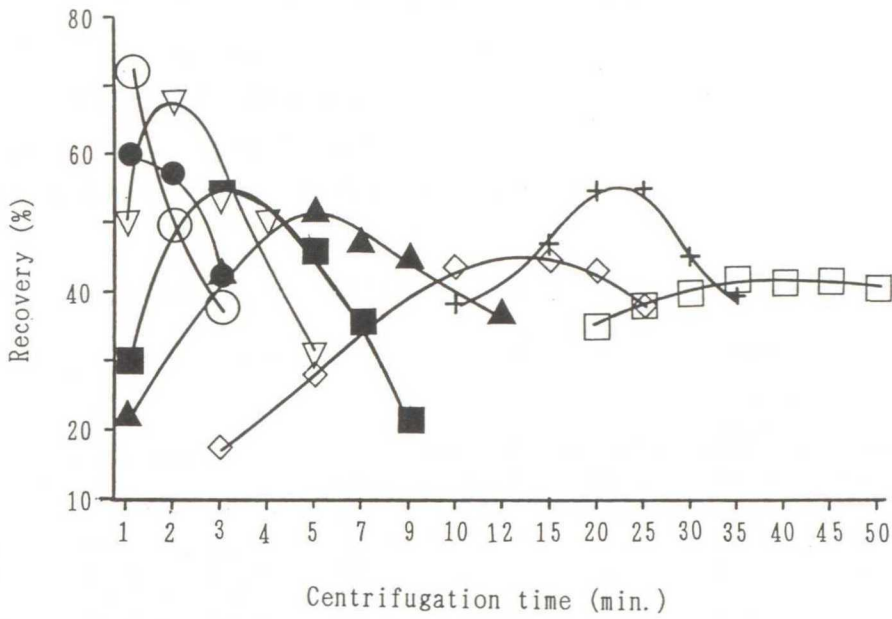


Fig. 3. Comparison of platelet recoveries of platelet rich plasma (PRP) at the different spinning speeds and centrifugation times.

The figure was drawn from Table 2.

The mean value of four dogs were plotted with the following marks at each spinning speed (rpm): □, 600; +, 800; ◇, 1000; ▲, 1500; ■, 2000; ▽, 2500; ●, 3000; and ○, 3500.

Table 3. The centrifugation times that the highest number of platelets were recovered at each spinning speed

	(minutes)							
	Spinning speed (rpm)							
	600	800	1000	1500	2000	2500	3000	3500
Centrifugation time	35	25	15	5	3	2	1	1

2) 回転速度と遠心時間の最適の組合せ

4頭の犬のそれぞれ1回の採取血液から、8種類の回転速度でPRPを作製した。回転速度別の血小板回収率は、Table 4のとおりであった。また各回転速度における回収率の4頭の平均値±標準偏差をFig. 4に示した。最も回収率の高い組合せは3500 rpm・1分で、平均血小板回収率は85.7%であった。そこで、この組合せを犬のPRPを作製するための最適遠心条件とした。

Table 4. Platelet recoveries at the eight spinning speeds

Dog No.	Spinning speed (rpm)							
	600	800	1000	1500	2000	2500	3000	3500
1	76.0	55.2	64.3	61.4	54.2	57.9	65.1	92.5
2	67.8	55.2	53.8	54.6	54.7	68.5	66.4	87.7
3	68.6	52.3	39.2	40.2	38.1	44.0	53.0	74.1
4	48.3	48.8	44.5	35.7	46.7	60.1	65.9	88.6
Mean	65.4	52.9	50.5	48.0	48.4	57.6	62.6	85.7
SD	12.1	3.0	11.0	12.0	7.8	10.2	6.4	8.0

SD: standard deviation (same in all the tables shown later).
 All blood samples collected were dispensed into eight test tubes, and PRPs were separated at the different centrifugal conditions. The centrifugation times shown in Table 3 were used at each spinning speed.

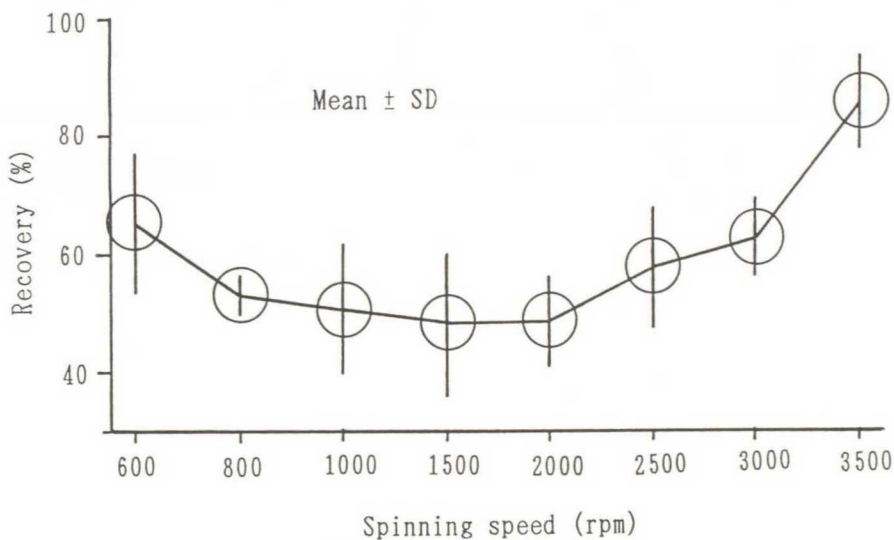


Fig. 4. Comparison of platelet recoveries at the different spinning speeds.

The figure was drawn from Table 4.

3) 最適遠心条件で得られる PRP の血小板凝集

Table 5 に PRP の Collagen および ADP 凝集試験の結果 (最大凝集率) を示した。いずれの刺激剤に対しても、刺激強度依存性に十分な強度の凝集が認められたことから、この PRP は血小板凝集試験に使用可能であった。

Table 5. Maximum aggregation ratio in PRP obtained by the optimum centrifugal condition, 3500 rpm · 1 min.

Dog No.	Collagen ($\mu\text{g/ml}$) ¹⁾			ADP (μM) ¹⁾		
	6	10	20	6	10	20
1	0 (%)	21	82	22	71	90
2	0	20	82	49	76	66
3	0	0	61	38	57	59
4	0	0	90	70	90	90
5	75	65	63	90	90	90
6	84	90	90	90	81	75
7	66	90	90	69	73	75
8	0	68	74	22	63	90
9	35	48	63	33	90	90
10	72	90	90	37	59	59
11	0	0	90	45	82	90
12	0	90	90	31	44	71
13	0	0	64	69	79	90
14	0	0	73	28	42	62
15	0	0	67	47	39	59
16	0	0	75	24	55	54
17	0	0	65	20	42	55
18	90	55	90	ND	ND	ND
19	0	0	61	ND	ND	ND
20	0	58	79	ND	ND	ND
Mean	21	35	77	46	67	74
SD	35	37	12	23	18	15

¹⁾ final concentration.

ND: not done.

3 考 察

PRP を作製する上で特に留意すべきことは、血小板を活性化させないで、できる限り効率良く全血から分離することである。特に小型動物を対象とする場合は採血量の制約が大きく、ヒトや牛などの場合よりも高い血小板回収効率が要求される。Nolte [Nolte] はリンフォプレップを用いた密度勾配比重遠心法で、犬の全血から血小板を分離して再び血漿に浮遊させ、単純な遠心よりも効率的に血小板を回収できることを報告している。しかし、現実的にはやはり一般的な単純遠心が妥当であろう。犬の PRP を調製するための遠心条件としては、これまで 180g・5 分 [Feingold]、200g・10 分 [Jacobsen]、あるいは 1800 rpm・15 分 [亘]、のような比較的 low gravity (速度) が多く用いられてきた。一方、複数回の遠心もしばしば用いられており、Catalfamo ら [Catalfamo] は、1800 rpm・1.5~2 分を 3 回、あるいは Baudreaux ら [Baudreaux] は 600~700g・2 分間を 3~4 回繰り返している。本節の緒論でも述べたとおり、犬の PRP 分離のための遠心条件はこのように多様である。

単回遠心を前提とした今回の検討では、比較した遠心条件のうち最も高速で短時間の 3500 rpm (2000g)・1 分で最も高い血小板回収率が得られた。

この条件はこれまで犬で用いられているものより高速であり、これによって得られる PRP には 2 つの問題が懸念された。1 つは、PRP 中の血小板が凝集試験に使用できるか否かである。そのためには血小板が未活性の状態、凝集能や放出能を保っていなければならない。Clemmons ら [Clemmons] は、比較的高速で短時間遠心の方が犬の血小板は大きさが偏らず、凝集機能も保持しやすいと述べている。ヒトの血小板でも 200 G の低速で 10 分間遠心すれば血小板 α 顆粒成分の放出が起ることから、血小板を用いた試験を行う上であまり低速・長時間遠心は好ましくないと言われている [Luzzatto]。今回最適条件とした比較的高速の遠心で得た PRP と、より低速の遠心で得た PRP のうち、どちらが凝集試験に適しているか比較したわけではないが、3500 rpm・1 分の遠心で得られる PRP は、Collagen、ADP いずれの刺激に対しても十分な強さの凝集を示した。

そこで以後、PRP 調製には本条件を用いることとした。

もう 1 つの問題は、大きさや比重の偏った血小板が回収される可能性である。大型で比重の高い血小板は顆粒成分を多く含み、各種刺激に対する反応も鋭敏といわれており [Jain]、高速遠心によってこれらが沈下して PRP 中に含まれないようでは、血小板凝集試験の結果は生体内の血小板反応を反映しないことになる。この点は次節で検討する。

第 2 節

凝集試験用血小板浮遊液の作製法

血小板凝集試験は通常、体内の血小板の凝集能がどのような状態にあるか、あるいは、何らかの物質が体内で血小板凝集能にどのような影響を及ぼしているかを推定するために行われる。体内の血小板反応を推定しようとする場合、血小板を取り巻く環境としてはできるだけ体内の条件に近い全血のままか [Ingerman-Wojensky, Sharp]、あるいは PRP のように血漿中に浮遊していることが理想的である [Mustard]。

しかし、血小板凝集試験に全血、PRP いずれかを用いる場合、これらの試料中には血小板反応に影響を与える成分が数多く含まれている [Timons]。またこれらの物質は生体の健康状態によって変動することから、血小板の凝集反応にどの程度影響を及ぼすか推測し難い。例えば炎症反応時に増加する C 反応性蛋白 [Miyazawa, Fiedel 1982, 1985] や Immunoglobulin G (IgG) [Wautier] などは血小板凝集を促進する作用があると推定されている。すなわち、全血や PRP を用いた血小板凝集試験の成績に異常が認められても、それが血小板自体の機能異常を示しているものか、あるいは、他の血球や血漿成分など血小板を取り巻く環境の変化によるものかは判別しにくい。したがって、今回のように特定の物質が血小板の活性化に関与しているか否かを調べる場合には、全血や PRP は必ずしも適当なサンプルとはいえない。このような場合、血小板を他の血液成分から分離し、成分既知の緩衝液に浮遊させて凝集能を調べるのが有効である。そこで、PRP 中の血小板を血漿から分離する方法を検討した。

1 材料および方法

1) 遠心洗浄血小板の凝集

(1) 原法の緩衝液に浮遊させた血小板の場合

クエン酸 Na 処理全血から分離した犬 PRP は、単純に遠心すると血小板が試験管底でペレット化するとともに強固に固まって、緩衝液を加えても再浮遊しないために、凝集試験には使用できない [Catalfamo]。そこで、遠心管の底に高濃度の牛血清アルブミン (BSA) を入れて血小板のペレット化を防ぐためのクッションとする、Walsh の密度勾配比重遠心法 [Walsh] を試みた。

まず 10 ml のクエン酸 Na 処理全血から PRP を分離した。

次いで、内径 15 mm・長さ 120 mm のポリプロピレン試験管の管底に Tyrode 緩衝液 (8.0 g NaCl、0.2 g KCl、0.065 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.184 g MgCl_2 、0.1 g NaHCO_3 、1.0 g Dextrose / l、 Ca^{2+} 不含; pH 7.35) に溶解した 45 % BSA (Sigma 社、grade III) 溶液 1 ml を入れ、その上に、PRP (通常 3~5 ml) を重層した。さらに、シリコン処理したガラス棒で PRP と BSA 両層の界面部を軽く混和して 1 cm 幅程度の BSA 密度勾配層を作り、2700 rpm (液層中央部で 1200 g) で 15 分遠心した。これ

により密度勾配層の内部には明瞭な白色の血小板層（層の厚さ 2~3 mm）が形成された。それより上の血漿層をピペットで除去した後、総量約 10 ml となるように Tyrode 緩衝液を加え、血小板を再浮遊させた。この洗浄操作を 2 度繰り返してから、同緩衝液で血小板数 $250 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ($\pm 20\%$ 以内) に調整した後、コラーゲンと ADP（添加量はそれぞれ、最終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 20 μM ）による凝集試験を行った。

また結果の項で述べるとおり、遠心洗浄した犬の血小板では凝集が得られないので、手技的な失宜による可能性を疑い、対照として、同じ操作で牛（麻布大学牛舎内で飼育されているホルスタイン種、雌、約 600 kg、年齢不詳）の洗浄血小板を作製して凝集試験を行った。

(2) 緩衝液の成分を修正した場合

① PRP の添加

血小板にとっておそらく理想的な環境である血漿 [Mustard] の組成に近づける目的で、緩衝液に PPP（第 1 節 材料と方法、2) - (3) 参照）を 1/10 量加えてから凝集試験を行った。

② CaCl_2 (Ca^{2+}) の添加

血小板の活性化経路には幾つかの刺激応答系が存在する [Kroll]。その中に Ca^{2+} を必要とする反応系があり、これは更に細胞質内顆粒に貯留している Ca^{2+} によって反応する系と、細胞外から細胞質内に流入する Ca^{2+} を必要とする系の 2 つに分けられる。後者の系の活性を調べるためには、血小板の浮遊する緩衝液に Ca^{2+} を加える必要がある。そこで、洗浄血小板の浮遊液に最終濃度 1 mM となるように CaCl_2 を添加してから、凝集試験を試みた。

2) ゲルろ過による方法

遠心洗浄法よりも血小板を刺激しないで分離できるといわれているゲルろ過法 [Lages] を試みた。ゲルろ過操作は、Catalfamo ら [Catalfamo] の法に準じ、孔径 44 μm のナイロンメッシュで底部を支えた内径 25 mm、長さ 25 cm のカラムにアセトン洗浄セファロース 4 B (Pharmasia 社) を約 15 cm の高さまで充填し、室温下にて Tangen HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N' -[2-ethanesulfonic acid]) 緩衝液 (Tangen HEPES buffer; THB) で平衡化した後、セファロース層の上に PRP を静かに重層した。最後に、上から同緩衝液を落差約 25 cm (流速: 約 2 ml/分) で追加しながら PRP をゲルろ過した。なお、当初用いた THB の組成は 147 mM NaCl、5 mM KCl、0.05 mM CaCl_2 、0.1 mM MgCl_2 、5 mM HEPES、5.5 mM Glucose、0.35 % 牛血清アルブミン; pH 7.4 である。

このゲルろ過によって、どの程度効率よく血小板が分離され、またそれが凝集試験に使用可能かどうか、次の手順で検討した。

(1) 血漿からの血小板分離状況の分光々度計による観察

① ろ液分画の吸光度スペクトル

血小板と血漿蛋白では吸光度スペクトルが異なるはずである。したがって、ゲルろ化

によって溶出する分画ごとに広い波長範囲で吸光度スペクトルと吸光度を測定すれば、各分画に両成分がそれぞれどの程度含まれているかをある程度推定できる。そこで、ゲルろ過開始後 1 分ごとのろ液分画について、それぞれ 200 から 800 nm までの波長範囲で吸光度スペクトルを測定した。分光光度計は日立(株) U2000 型を用い、同社の LC フローセル (セル容積 8 μ l) を接続した。流路内面はシリコナイズ (シリコンコーティング剤; 富士システムズ(株)) で処理した。

② 特定波長での連続的な吸光度変化

血小板に富む分画を確認するために、PRP ゲルろ過溶出液の吸光度を紫外部 (250 nm) と可視部 (520 nm) の 2 波長で連続測定 (吸光度モニタリング) した。PPP も、PRP と同じ条件でゲルろ過して 250 nm で吸光度モニタリングし、それぞれのゲルろ過溶出液の吸光度モニタリングパターンを比較した。

(2) 溶出液中への血小板回収率と、回収されたゲルろ過血小板 (gel filtrated platelet; GFP) の容積

10 頭の犬 (雑種 1 ビーグル 9 頭、雌・雄各 5 頭、2~10 歳、体重 8~13 kg; No. 1~10) の PRP を、原法と同じ 520 nm で吸光度モニタリングしながらゲルろ過して、吸光度の高い血小板に富む分画 (GFP 浮遊液) のみを採取した。

次に PRP および GFP 浮遊液の量と血小板数 (細胞濃度) とから血小板回収率を求めた。

なお、前節の考察で述べたとおり、ゲルろ過によって回収される血小板の大きさが偏っていると、GFP 凝集試験の成績も体内の血小板の凝集能をあまり反映しない。血小板の大きさは、前述の自動血球計数機による血小板数算定の際に平均容積 (Mean of platelet volume; MPV) として同時に測定されるので、全血と PRP 中血小板の MPV を 20 頭の犬について比較した。

(3) GFP の凝集

① 緩衝液の成分を改善した場合

結果の項で詳しく述べるが、現法の THB を用いて作製した GFP 浮遊液は凝集試験には不適當であった。

これを解決するために、緩衝液の組成改良を試みた。まず、今回用いた THB と、通常ヒト血小板のゲルろ過に用いる HEPES 緩衝液、あるいは Tyrode 緩衝液の組成 [Timmons] を比較した (Table 6)。これらの緩衝液の成分を分類すると、① Na・K (NaCl・KCl)、② Ca^{2+} ・ Mg^{2+} ($CaCl_2$ ・ $MgCl_2$)、③ 緩衝剤 (HEPES、 NaH_2PO_4 、あるいは NaH_2CO_3)、およびその他の 4 つの基本構成があり、3 種類の緩衝液は①~③の構成成分がのいずれかが異なっている。そこで、THB の組成を基本に、①~③の 3 つの基本構成を一部分ずつ他の 2 種類の緩衝液のそれに変更し、この「成分一部変更 THB」を用いて、PRP をゲルろ過した時の血小板回収効率と、その血小板の凝集を検討した。

② CaCl₂ と Fbg 予備添加

さらに、十分な血小板凝集能を確保するために、原法[Catalfamo]でも必要に応じて使用することが推奨されている CaCl₂ と Fbg を、コラーゲンあるいは ADP を添加する直前に添加し、GFP 凝集の改善効果を調べた。CaCl₂ は、改良 THB で 50 mM 液に溶解し、コラーゲンあるいは ADP 添加の 1 分前に試料の 1/50 量（最終濃度 1 mM）を添加した。Fbg は Sigma 社の精製犬 Fbg 粉末を GFP 浮遊液に 0.1 % 濃度となるように直接添加し、数分間膨潤させてから静かに混和して、10 分以内に凝集試験に用いた。

凝集惹起物質の添加量は、1) の遠心洗浄血小板での検討に準じた。

Table 6. Comparison of the components among the three different buffer solutions for platelet gel filtration

Composition	Buffer solution		
	Tangen HEPES	HEPES	Tyrode
① { NaCl (mM)	147	137	137
{ KCl	5	2.7	2.7
② { CaCl ₂	0.05		
{ MgCl ₂	0.1	1	1
③ { HEPES	5	3.5	
{ NaH ₂ PO ₄		3	
{ NaH ₂ CO ₃			12
Glucose	5.5	5.5	5.5
BSA (%)	0.35	0.35	0.35
pH	7.4	7.35	7.35

①～③： The components were divided into these three groups and others. These marks are used similarly in Table 9.

2 結果

1) 遠心洗浄血小板の凝集

(1) 原法の緩衝液に再浮遊させた血小板の場合

Tyrode 緩衝液に再浮遊させた洗浄犬血小板は、コラーゲンあるいは ADP 添加の何れの刺激でも凝集しなかった (Fig. 5 左)。

一方、同じ操作で作製した洗浄牛血小板は、Fig. 5 (右) のとおり良好な凝集が認められた。

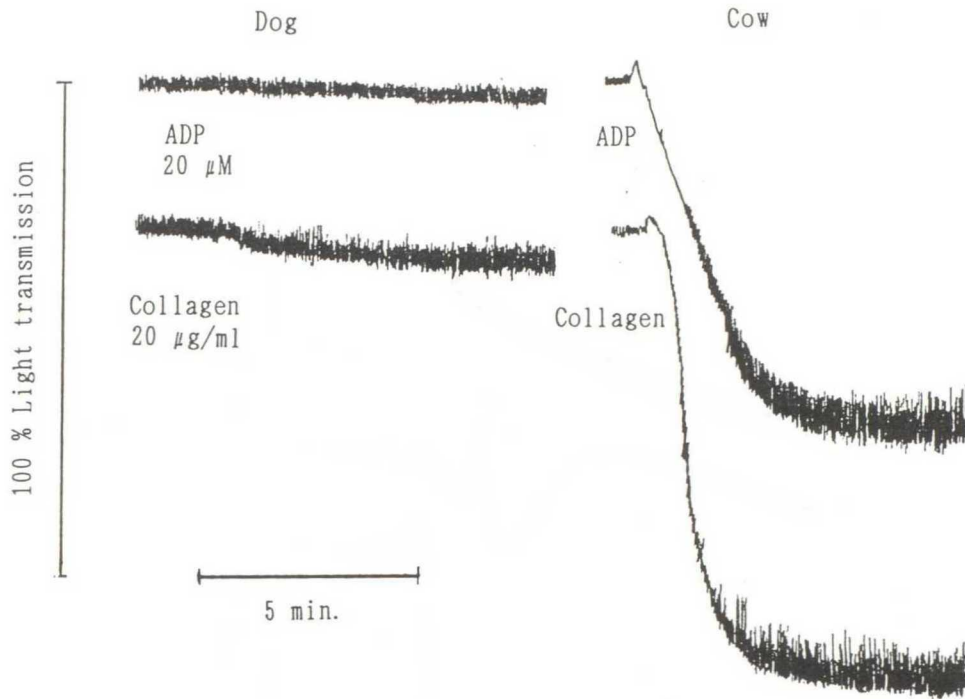


Fig. 5. Aggregation of washed platelets, induced by collagen or ADP, in a dog and a cow.

(2) 緩衝液の成分を修正した場合

① PPP の添加

洗浄血小板の浮遊液に PPP を加えてからの凝集試験のうち、コラーゲン凝集の結果を Fig. 6 に示した。すなわち、浮遊液に PPP を加えると、上段に示すように約 30 秒後からごく緩やかに凝集した。PPP 添加後にコラーゲン 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度) を添加したところ、中段に示すとおり速やかな球状化と可逆性凝集が認められた。すなわち、コラーゲンに対する感受性はある程度保たれていた。

ADP 刺激に対しては凝集しなかった。

② CaCl_2 (Ca^{2+}) の添加

洗浄血小板の浮遊液に CaCl_2 を添加したときの透光率の変化を Fig. 6 の下段に示した。 CaCl_2 添加のみで他に collagen あるいは ADP を添加しなくても、急激で強い血小板凝集が起った。

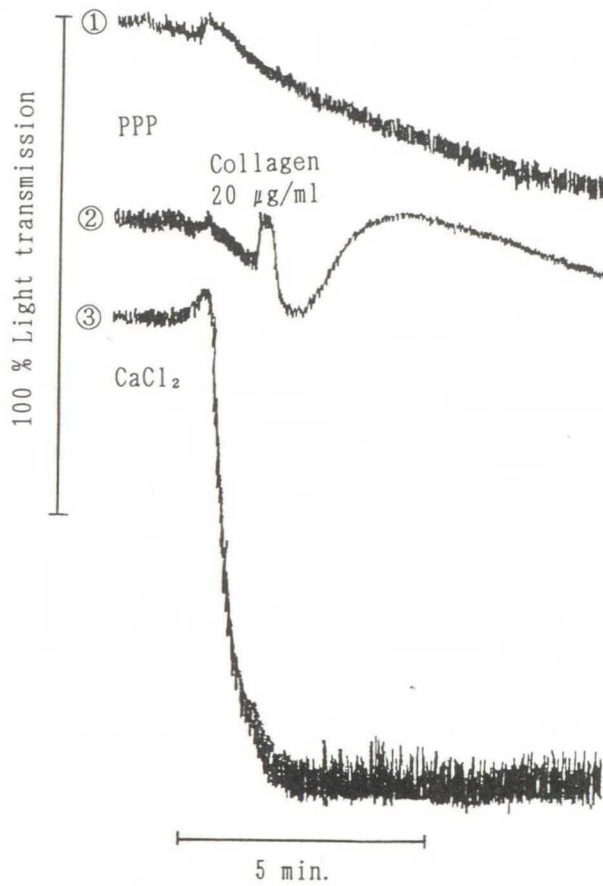


Fig. 6. Aggregation of platelets washed with platelet poor plasma (PPP) or CaCl₂ addition.

- ① Spontaneous aggregation by adding 1/10 volume of PPP obtained from same blood samples.
- ② Aggregation by adding PPP and collagen 20 µg/ml.
- ③ Spontaneous aggregation by adding CaCl₂ 1 mM (final concentration)

2) GFP の凝集

(1) PRP ゲルろ過による血漿からの血小板分離

① 吸光スペクトルの経時的变化

ゲルろ過溶出成分の経時的变化を表す代表的な波長スペクトル曲線をいくつか抜粋し、Fig. 7 に示した。ゲルろ過開始後 23 分を過ぎて（この間約 45 ml の緩衝液が溶出）紫外部から可視部まで広い範囲の波長を吸収する分画が観察され、速やかにろ過し終えた。その直後から紫外部領域の波長のみを吸収する分画が長時間に亘ってろ過された。

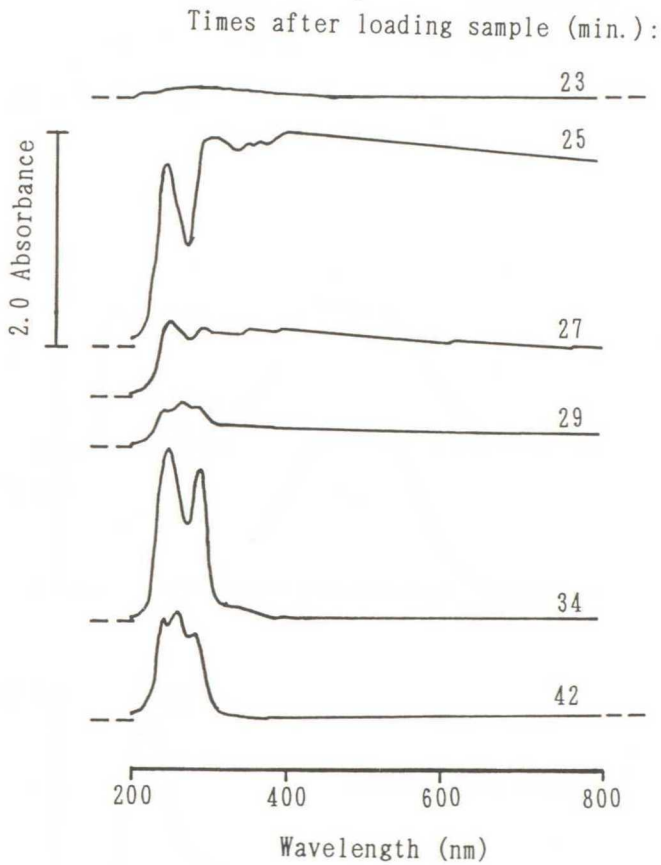


Fig. 7. A change of wavelength spectrum of PRP gel filtrate with time passage.

----: base line.

② 特定波長での連続的吸光度変化

PRP と PPP のゲルろ過溶出液の 250 nm での吸光度モニタリング図を Fig. 8 (上・中段) に示した。前半の短時間で終わる吸光度ピークは PRP の溶出液のみに、また後半の持続的な吸光度上昇は PRP と PPP のゲルろ過溶出液の双方で認められた。すなわち、前半のピークは血小板、後半のピークは血漿蛋白によるものであった。また、ろ液の血小板と血漿蛋白による 2 つのピークは一部重なりあっていることから、GFP 浮遊液中への血漿蛋白混入を避けるためには、血小板の回収を早目に切り上げることが必要である。

さらに、原法[Catalfamo]の 520 nm で PRP のろ液を吸光度モニタリングすると、Fig. 8 下段に示すとおり血漿蛋白による吸光度上昇は観察されないが、血小板に富む分画のピークは 250 nm の場合と同様に観察された。

そこで、この後の検討では、吸光度モニタリング波長を原法と同じ 520 nm とし、血漿蛋白の混入をできるだけ防ぐとともに GFP を高濃度を含む浮遊液を得るため、吸光度が 1.0 以上の分画のみを回収することにした。

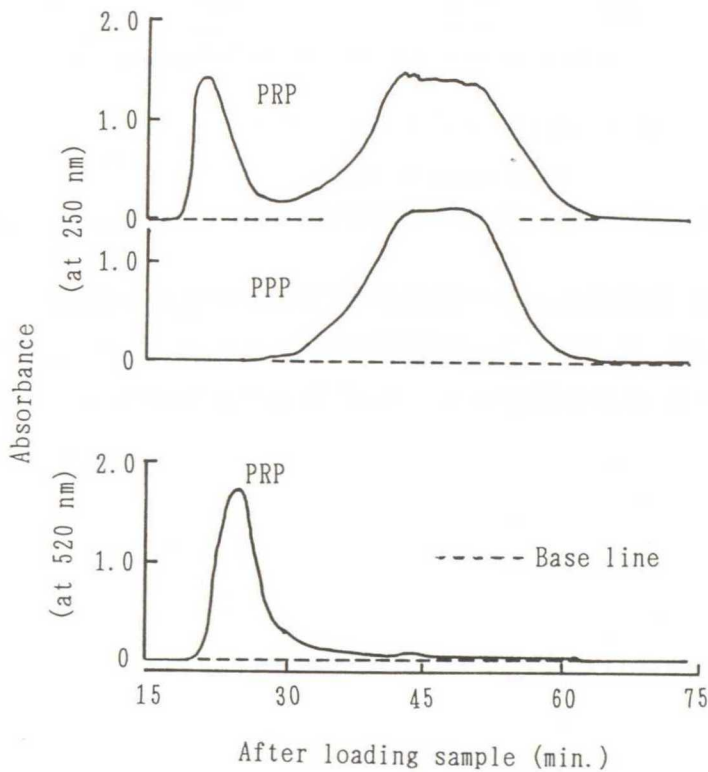


Fig. 8. Changes in absorbance with filtrating time of PRP and PPP gel filtrate at a visible or an ultraviolet wavelength.

Platelet rich fraction (gel filterated platelet suspension) was collected at an absorbance peak higher than 1.0 at 520 nm for aggregometry.

(2) GFP 浮遊液への血小板回収率と、回収された血小板の容積

PRP と GFP 浮遊液中の平均血小板容積、血小板数および回収率を Table 7 に示した。PRP 中血小板総数の約 67 % 以上が GFP 浮遊液中に回収され、その血小板数（濃度）も凝集試験に用いる必要な条件（ $\geq 200 \times 10^3/\mu\text{l}$ ）を満たしていた。

Table 7. Platelet recoveries by PRP gel filtration

Dog No.	PRP		GFP suspension		Platelet recovery
	Volume	Platelet count	Volume	Platelet count	
1	2.8 (ml)	645 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5.1 (ml)	240 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	67.8 (%)
2	4.0	898	7.2	428	85.8
3	4.0	500	5.3	356	94.3
4	3.5	884	5.6	502	90.9
5	4.0	772	6.5	356	74.9
6	3.5	790	6.0	367	78.3
7	3.0	822	5.5	309	68.9
8	4.0	656	5.9	320	72.0
9	3.3	718	5.8	283	69.3
10	4.7	776	7.0	358	67.0
Mean	3.7	746	6.0	352	76.9
SD	0.6	121	0.7	74	10.1

$$\text{Platelet recovery (\%)} = \frac{\text{GFP suspension volume} \times \text{G}}{\text{PRP volume} \times \text{P}} \times 100$$

(G, platelet count in GFP suspension; P, that in PRP)

また GFP の容積が全血や PRP 中血小板のそれと比較して偏りがあるか否か検討するために、全血、PRP および GFP 浮遊液中の MPV を Table 8 に示した。3 種類の試料中の MPV には有意差を認めなかった（対応のある 2 つの数値群の差の検定による）。

Table 8. Mean of platelet volume in whole blood, PRP and GFP suspension

Dog No.	Sample		
	Whole blood	PRP	GFP
1	8.6	8.8	9.1
2	7.9	7.7	8.1
3	7.7	7.6	7.6
4	8.4	7.8	8.3
5	9.0	9.0	9.4
6	8.7	9.1	10.1
7	8.6	8.1	9.7
8	8.2	7.9	8.3
9	8.3	8.2	8.2
10	7.3	7.0	7.2
Mean	8.3	8.1	8.6
SD	0.5	0.7	0.9

The no differences hypothesis was not rejected by student's paired t-test.

(3) GFP の凝集

① 緩衝液組成の改善

GFP 浮遊液を用いてコラーゲンと ADP による血小板凝集試験を行ったところ、いずれの刺激に対しても血小板は凝集しなかった。しかしコラーゲンなどを添加する前に PPP を加えると、両刺激に対して凝集するようになった。この場合は遠心洗浄血小板の場合のように、PPP あるいは CaCl_2 添加のみでの凝集は起らなかった（データは示さない）。

そこで、血小板が凝集するように THB の組成を一部変更して PRP をゲルろ過し、凝集試験を行った結果は、Table 9 のとおりであった。すなわち、①の $\text{NaCl} \cdot \text{KCl}$ 濃度を HEPES あるいは Tyrode 緩衝液のそれ (NaCl 137、 KCl 2.7 mM) に変えると、ゲルろ過効率が著しく低下し、凝集試験に必要な血小板数（濃度）を含む GFP 浮遊液は得られなかった。逆に、②の $\text{CaCl}_2 \cdot \text{MgCl}_2$ 濃度は、THB よりも他の 2 種類の緩衝液の方が適していた。特に MgCl_2 濃度が重要であり、これを 1nM に増やすことで十分な凝集が得られた。③の緩衝液を変更すると、ろ過効率の面では問題なかったが、凝集は CaCl_2 と MgCl_2 濃度を改良した THB を用いた時より低かった。

以上から THB の組成は、 CaCl_2 不添加、 MgCl_2 最終濃度 1mM に改めた（改良 THB）。

Table 9. Effect of the partial component modifications in Tangen HEPES buffer on platelet filtration and platelet aggregation in GFP suspension (GFP aggregation)

Modified components	Filtration	Aggregation
(Original)	(+)	(-)
Original + PPP ¹⁾	ND	(+)
① NaCl, KCl ²⁾	(-)	ND
② CaCl ₂ , MgCl ₂ ³⁾	(+)	(+)
③ Buffer bases ^{4 or 5)}	(+)	(-)

The components of Tangen HEPES buffer were partially modified by adding PPP¹⁾ or replacement with the components ①~③ in HEPES²⁻⁴⁾ or Tyrode buffer^{2, 3, 5)} as follows:

1) PPP was added into GFP suspension just before aggregometry;

2) 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl; 3) CaCl₂ free and 1 mM MgCl₂;

4) 3.5 mM HEPES and 3 mM NaH₂PO₄; 5) 12 mM NaH₂CO₃ (final conc.).

(+): good. (-): no or weak. ND: not done.

② CaCl₂ とフィブリノーゲン (Fbg) 予備添加

緩衝液を改良することで GFP の凝集は得られたが、コラーゲン凝集ではコラーゲン添加濃度との相関性 (刺激強度依存性) が低く (Fig. 9 左)、また ADP 凝集では、PRP で通常 100 % 近い最大凝集が得られる量 (最終濃度 20 μM) を添加しても最大凝集は 30 % 程度しか得られなかった (Fig. 10 左)。

そこで、CaCl₂ あるいは Fbg を凝集試験の直前に添加した時の効果は、次のとおりであった。

a CaCl₂ 添加: CaCl₂ 添加による GFP 凝集の改善効果はコラーゲン凝集で強く表れ、Fig. 9 下段に示すとおりコラーゲン刺激強度依存性の凝集が得られた。

ADP 凝集では、CaCl₂ 添加による影響を認めなかった。

b Fbg 添加: ADP 凝集では Fig. 10 右に示すとおり、凝集が強化された。コラーゲン凝集では影響を認めなかった。

以上の結果から、GFP の凝集試験を行う際は、コラーゲン凝集では CaCl₂ を、ADP 凝集では Fbg を上記の条件で予備添加することとした。ただし、データは示さないが、GFP は ADP 凝集能の失活が早く、ゲルろ過後 30 分以内に測定を終了する必要があった。

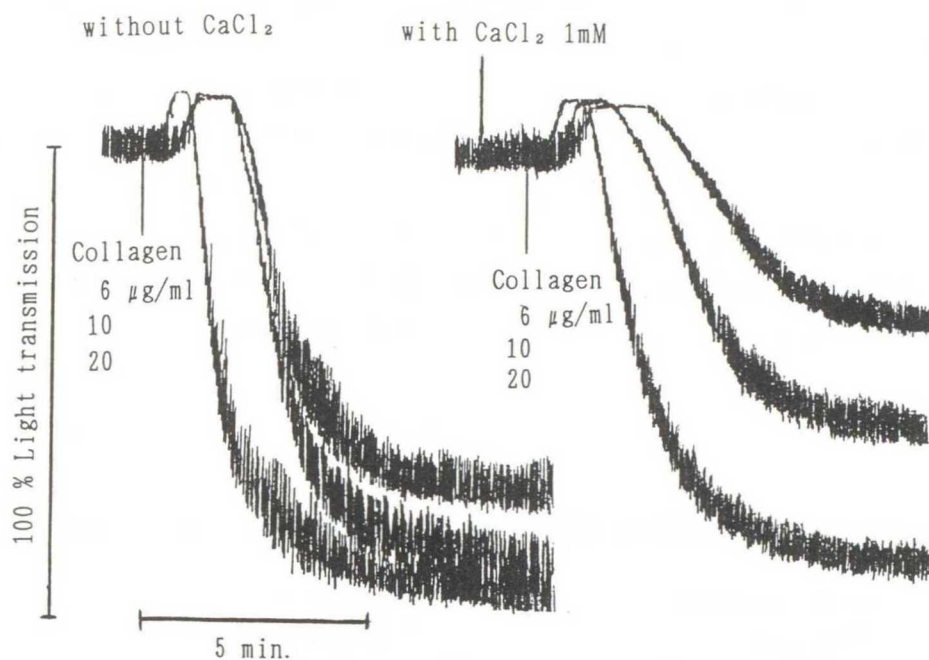


Fig. 9. Aggregation of gel filtrated platelet (GFP) induced by collagen stimulation with or without CaCl_2 .

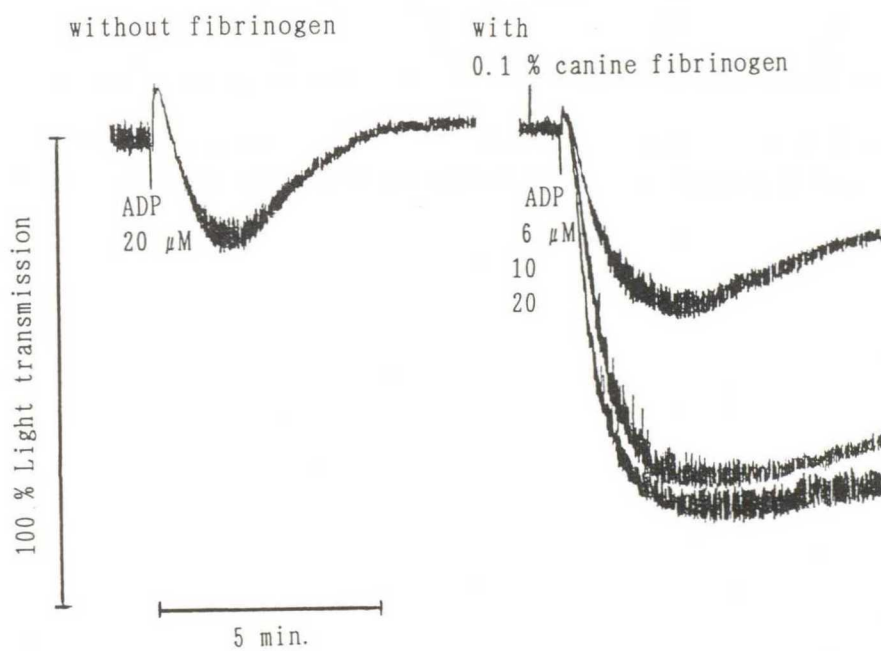


Fig. 10. Aggregation of GFP induced by ADP stimulation with or without fibrinogen.

Table 10 に改良法で作製した GFP の凝集試験成績（最大凝集率）を示した。

また、第 1 節 Table 5 に示した PRP 中の血小板凝集と、この GFP の凝集を比較するために、Fig. 11 に両試料のコラーゲンおよび ADP 凝集成績を最大凝集率で示した。コラーゲン、ADP いずれの凝集惹起物質に対しても、GFP の凝集力は PRP 中血小板と大差がなかった。

また、GFP からの ATP 放出も調べたところ、Fig. 12 のとおり、コラーゲンおよび ADP の何れの刺激に対しても凝集と同時に放出反応が確認され、血小板はゲルろ過操作を施しても遠心洗浄血小板の場合のように活性化しておらず、細胞内顆粒成分も保たれていた。

Table 10. Maximum platelet aggregation ratio in GFP suspensions

Dog No.	Collagen ($\mu\text{g/ml}$) ¹⁾			ADP (μM) ¹⁾		
	6	10	20	6	10	20
1	80 (%)	85	85	ND	ND	ND
2	35	60	92	ND	ND	ND
3	10	68	75	42	75	83
4	43	50	54	33	55	78
5	30	43	59	33	34	54
6	9	15	35	40	80	80
7	35	70	75	15	20	25
8	69	80	88	38	76	78
9	50	62	62	20	23	37
10	57	53	66	53	78	64
Mean	42	59	69	34	55	62
SD	23	20	18	12	25	22

¹⁾ final concentration. ND: not done (same in the following Tables).
GFP suspensions were obtained by using modified Tangen HEPES buffer.

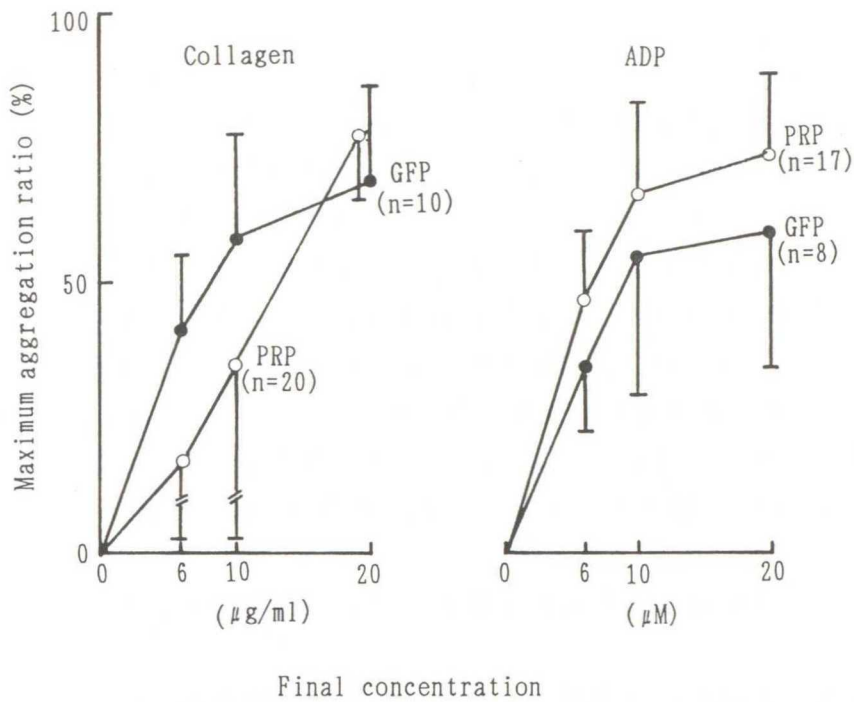


Fig. 11. Comparison of platelet aggregation in PRP and GFP.
 Mean \pm SD: drawn from Table 5 and Table 10.

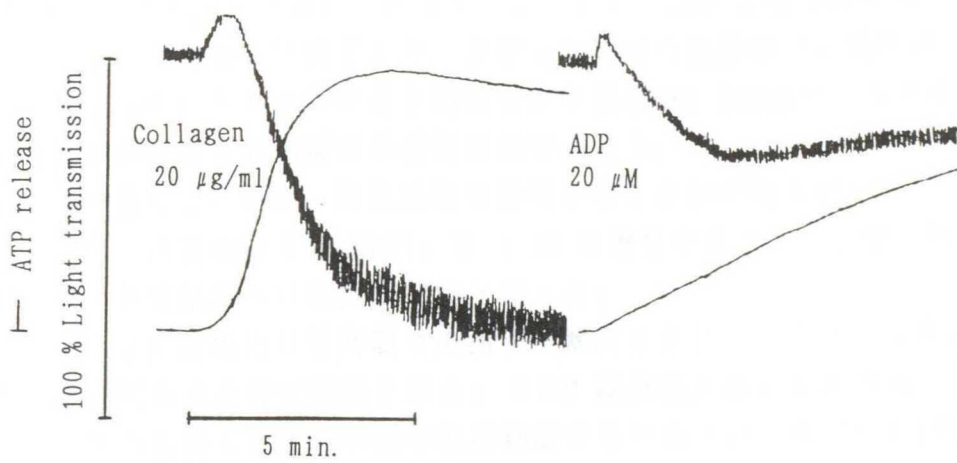


Fig. 12. Aggregation and ATP release of GFP induced by collagen and ADP stimulation.

3 考 察

全血や PRP を用いる場合と比べ、遠心洗浄やゲルろ過では前処理操作を通じての物理的刺激が余計に加わったり、あるいは血小板を取り巻く環境が血漿から人工的な緩衝液に変わるなど、血小板の未活性状態を保つ上で好ましくない負荷を幾重にもかけることになる。したがって信頼度の高い成績を得るためには、血小板自体をできる限り刺激しないで血漿から分離することが重要である。また血小板を浮遊させる緩衝液の組成や温度が、血小板の機能発揮に適していなければならない。とりわけ小動物の血小板は凝集試験に用いる前の前処理の段階で活性化しやすく凝集能を保ちにくいといわれており [Catalfamo]、今回の実験でも、牛と犬の洗浄血小板の凝集試験を比較してその点は強く感じられた。すなわち、犬の洗浄血小板は collagen および ADP いずれの添加刺激に対しても凝集せず、しかも CaCl_2 を添加したらそれだけで強い凝集を起こしてしまった。このことは、原法 [Walsh] の条件によって洗浄された犬血小板の内部ではすでに活性化が始っており、この活性化による血小板凝集は最終的に細胞外 Ca^{2+} を必要とすることを示唆している。

前述のとおり、血小板は各種刺激に非常に敏感で、採血から前処理を通じて不適当な取り扱い（手技的な失宜を含む）をすると容易に活性化し、凝集試験に使用する時にはすでに凝集能を喪失してしまう。犬洗浄血小板が凝集しないことも、ピペット操作などの失宜によって凝集能を失った可能性が考えられた。しかし、牛の洗浄血小板では比較的良好に凝集試験を行えたことから、犬の洗浄血小板が凝集しないのは試料の取り扱い手技に問題があるためではなく、この条件での洗浄が犬の血小板に不適なことが示された。

そこでゲルろ過法を検討した結果、前処理操作による活性化を起こさずに、凝集能を保った血小板を血漿から分離できた。ここで用いた緩衝液 (THB) の最も大きな特徴は $\text{Na} \cdot \text{K}$ 濃度が他の緩衝液より高いことであり、これらの濃度を他の緩衝液のそれと交換すると著しくゲルろ過効率が低下した。実際に正常犬の血漿中 Na 濃度は 141~152、 K は 4.7~6.2 mM/l とヒトや牛より高値であり [Altman, Kaneko]、おそらく他の 2 種類の緩衝液の浸透圧が犬血小板に不適切なのであろう。

また緩衝液組成が適していれば、凝集試験に使用することが可能と思われた。そこで検討した結果、THB の組成のうち MgCl_2 を 1 mM に増量することで、血小板の凝集は著しく改善され、凝集試験への使用が可能となった。

なお、GFP の ADP 凝集能は短時間で失活する傾向にあり、この点は今後犬の GFP を凝集試験に利用する時の難点となる。ADP 凝集能失活の原因は血小板自身が細胞内に持つ ADP を放出し、これが血小板を刺激するためといわれている [Mustard]。血漿中には ADP を脱りん酸化する酵素 (ADPase) が存在して、血小板などの細胞から少量ずつ放出される ADP を処理 (失活化) している [Mustard] ために、PRP 中血小板の ADP 凝集能低下は GFP 中のそれよりも遅い。すなわち、ADP 凝集が短時間で失活するのは緩衝液に浮遊させた血小板の特性であり、ヒトの GFP も ADP 凝集に用

いることができるのはゲルろ過後 1 時間以内といわれている [Mustard]。この解決策として、ADPase 様活性を持つアピラーゼ (EC 3.6.1.5) や creatine phosphate/creatine phosphokinase (EC 2.7.3.2) などの酵素を添加する方法がある [Lages, Mustard]。そこで筆者もアピラーゼ (Sigma 社) の添加を試みたが、よい結果は得られなかった。そのため、ADP 凝集試験を、ヒトの場合よりさらに厳しくゲルろ過後 30 分以内に終了することとし、ADP 凝集能の低下をできるだけ回避することにした。

この節の緒論で述べたとおり、全血、PRP および GFP 浮遊液は、血小板の機能試験に用いる上でそれぞれ利害得失がある。例えば、全血や PRP を用いた凝集試験は比較的体内の血小板の環境に近いために、実際に体内を循環している血小板の反応を反映しやすい。これに対して PAF のような単一の物質に対する血小板の凝集を調べる場合、血小板を血漿から分離して凝集試験に用いた方が、他の物質による影響を除外し PAF と血小板反応の直接的な関連性を観察しやすい。また、例えば PAF に脱感作した血小板は、PRP 中に浮遊させておくと脱感作状態から回復する [Henson] ともいわれており、そのため本研究の第 2 章第 4 節では GFP 浮遊液を用いた血小板凝集試験を実施している。

血小板を用いた検査あるいは研究の目的に応じて、これら試料の種類や凝集惹起物質の種類を適宜選択することで、多面的な血小板凝集能に関する検討が可能となる。犬の血小板凝集試験の試料として GFP を選択できることは、今後、犬の血小板凝集能に関する基礎研究や血小板関連疾病の研究を進める上で有意義である。

第 2 章

LPS 投与犬の血小板減少における PAF の関与

実験的に LPS を犬に投与すると、血小板は直ちに活性化して肺に集積し [Gutmann, Sostman]、そのため末梢血中の血小板数は消費性に減少する [Jain, 中間]。PRP に LPS そのものを添加しても血小板の凝集や放出が認められる [Kawaguchi, Meyers1982] が、その凝集はあまり強いものではない [Meyers1982]。したがって LPS 投与後の末梢血中血小板の減少には、LPS の直接的な血小板刺激よりも、LPS によって体内に生じる何らかの強い刺激が作用していると考えられる。本論文の緒論で述べたとおり、その刺激因子として PAF が推定されている。その根拠は、ラットやモルモットなどの実験動物に LPS を投与すると体内 PAF 濃度が増加すること [Doebber, Chang1987, 1990, Rylander]、ウサギに PAF を投与すると LPS を投与した時と同様血小板減少が起ること [Mcmanus1980]、また、その血小板減少あるいは DIC の発現は PAF 阻害剤で抑制されること [Yue] などが挙げられる。しかしながら、PAF 刺激に対する血小板の反応には非常に動物種差が大きく、たとえばマウスやラットの血小板は *in vitro* で PAF 刺激に対して凝集反応を示さない [Meyers1985] など、動物種によっては必ずしもこの推論があてはまらない。一方、犬の血小板は PAF に対する感受性が比較的強いといわれている [Taharoui]。柴ら [柴] は、犬についても LPS 投与後の血小板反応に PAF の関与を示唆している。そこで、緒論で述べたとおり、『犬のグラム陰性菌感染の際に見られる血小板の過剰活性化には PAF が関与する』という仮説を立て、それを証明しようと試みた。

上記のとおり、LPS を投与すると血小板の過剰活性化を反映して末梢血血小板数が減少することから、LPS 投与後の血小板減少は、体内での血小板過剰活性化の指標になり得る。そこで、次の 4 点を明らかにするための実験を順次行って、LPS 投与犬の血小板減少における PAF の関与を検討した。

- ① LPS を投与することによって体内に PAF が産生される (第 1 節)
- ② PAF を投与すると LPS 投与と同様に血小板減少が発現する (第 2 節)
- ③ LPS を投与しても、あらかじめ PAF の作用をブロックしておけば血小板減少が阻止あるいは抑制される (第 3 節)
- ④ LPS 投与後の血小板に、PAF に感作された形跡がある (第 4 節)

第 1 節

LPS 投与犬の血中 PAF 濃度

LPS を投与すると血小板が肺に集積するのは、肺局所で好中球や血管内皮細胞などが血小板刺激物質を産生するためであり、近年 PAF がその刺激物質と推定されている [warren]。PAF の関与を証明するためには、先ず、体内における PAF の増加を明らかにしておくべきである。PAF は肺局所のみならず、全身各所で多くの種類の細胞が産生する [Handley1990, 和久]。LPS 投与によって体内に産生された PAF は血中に放出され [徳村]、それによって血中 PAF 濃度は増加するはずである。

LPS 投与後の体内 PAF レベルの変化は、ラットやモルモットでの報告がほとんどであり [Chang1990, Rylander]、犬での報告は見受けられない。そこで、LPS 投与犬の血中 PAF 濃度を測定した。

1 材料および方法

1) LPS 大量投与群

LPS (Difco 社; E. coli、血清型 0127:B8 由来) を生理食塩水で 5 mg/ml に溶解後、1.5 ml ずつに小分けして -20°C で保存した。使用直前に必要量を解凍し、孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ の滅菌フィルターでろ過した。この液を、ペントバルビタール Na 30 mg/kg 静脈内注射で全身麻酔を施した 3 頭の雑種成犬 (雄 2 雌 1 頭、推定年齢 3~5 歳、体重 10~17 kg; No. 1~3) に、LPS として 1 mg/kg となるように撓側皮静脈から注射 (静注) し、投与前、投与 1 および 2 時間後に頸静脈から採血した。先ず、1 ml を採血してエチレンジアミン四酢酸 2 Na (EDTA 2 Na) で凝固阻止し、血球算定用とした。次いで、ヘパリン Na 液で内面を処理した注射器で 2 ml 採血し、これを用いてラジオイムノアッセイ (RIA) 法により PAF 濃度を測定した。RIA 測定試薬は Dupon 社の PAF RIA キットを、またガンマカウンターはアロカ (株) ARC-300 をそれぞれ用いた。

PAF の抽出・精製はキットのマニュアルに従って、Fig. 13 および Fig. 14 のとおり Bligh & Dyer 法で行い、精製後緩衝液に溶解した試料は、測定まで -20°C で凍結保存した。

抽出・精製の工程で用いるガラス器具はすべて、PAF の付着を防ぐためシリコンコーティング剤 (Sigmacoat; Sigma 社) で表面処理した。不純物を吸着除去するための DEAE セルロースは Brown 社製 (capacity 0.88 mEq/g) を用いた。

2) LPS 少量投与群

前述の LPS 5 mg/ml 液を必要量解凍し、生理食塩水で $400\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度に希釈後、滅菌フィルターでろ過した。この液を LPS として $40\ \mu\text{g}/\text{kg}$ となるよう、9 頭のビー

グル犬（雄 4 雌 5 頭、2～5 歳、体重 8～12 kg；No. 4～12）に静注し、これらを少量投与群とした。LPS 投与前、投与 10 分後、および 1 時間後に採血し、LPS 大量投与群と同様に PAF 濃度を測定した。

なおこの群の実験は、第 2 節、LPS 投与犬の血液性状などの検討（I 群）と同時に行った。

Blood 2ml
 + 20% Acetic acid 2ml (Inactivate acetylhydrolase and lyse cells)
 10% Acetic acid 4 ml (Decrease viscosity)
 Centrifuge 1 12,000g 45 min.
 Aspilate supernatant → Extract 1
 Pellet
 + Concentrated acetic acid 1 ml
 ← Shake vigorously for 15 - 20 sec.
 DW 9ml
 ← Mix
 Centrifuge 2 12,000g 30 min.
 Aspilate supernatant → Extract 2

Fig. 13. Procedure of PAF extraction

Apply the extracts to C-18 colum (Adsorb PAF)
 10% acetic acid 1ml × 2 (Rinse)
 Ethyl acetate 2ml × 3 (Remove acetic acid, water and some lipids)
 Methanol 6ml (Elute PAF)
 DEAE cellulose 0.1g (Remove contamination factors)
 + DW 2.4ml
 Chloroform 3ml
 ← Shake vigorously
 Centrifuge 100g 15min. (Phase out chloroform)
 Aspilate the chloroform layer (Isolation)
 N₂ gas (Dry down chloroform)
 Assay buffer 1ml (Reconstitute)

Fig. 14. Isolation and purification of PAF

2 結果

1) LPS 大量投与群

(1) 血小板数 (Table 12)

LPS 投与後 1 時間の平均血小板数は投与前値の 54.5 %、投与後 2 時間のそれは 69.2 % であった。

Table 12. Platelet counts in LPS large-dose injected dogs

Dog No.	($\times 10^3/\mu\text{l}$)		
	Pre	Stage 1 h	2 h
1	218	118	228
2	360	230	256
3	265	155	155

Stage: Pre, just before LPS injection (Same in Table 13);
and h, number of hours after LPS injection.

Dose of LPS is shown in Table 13.

(2) 血中 PAF 濃度

PAF 測定キット付属の標準液から作成した検量線を Fig. 15 に示した。ガンマ線量 (cpm 値) からの検量線作成は、ガンマカウンター内蔵のアロカカーブ計算式による自動計算で行った。すべてのスタンダード値がほぼ検量線上に乗り、また 2 重測定の誤差は 1 % 以内と、良好な検量線が描かれた。

Table 13 (左) および Fig. 16 (左) に、この群の測定成績を示した。各採血時点の血中 PAF 濃度は、LPS 投与前 24.6 ± 22.3 、投与 1 時間後 139.6 ± 25.5 、および 2 時間後 81.9 ± 41.8 pg/0.1 ml (平均値 \pm 標準偏差) であった。1 頭の犬 (No. 1) で LPS 投与前に 50.0 pg/0.1 ml という異常高値を認めたが、これを含めて統計処理しても、1 時間値は他の 2 回よりも有意に高かった。また、2 時間後の平均値も LPS 投与前値より高かったが、この両者間に統計的な有意差は認められなかった (対応のある 2 つの数値群の平均値の差の検定による)。

2) LPS 少量投与群

この群は第 2 節の実験と並行して行っており、血小板数などについては第 2 節で触れるので、ここでは血中 PAF 濃度についてのみ述べる。

血中 PAF 濃度は Table 13 および Fig. 16 (右) に示した。この群の血中 PAF 濃度は LPS 投与前 7.6 ± 9.2 、投与 10 分後 29.1 ± 27.0 、および 1 時間後 8.7

± 8.2pg/0.1ml (平均値±標準偏差)であった。投与後 10 分値は、大量投与群の投与後 1 時間値と比べると増加は軽度だったが、この群の他の 2 回の値よりも有意に高かった。

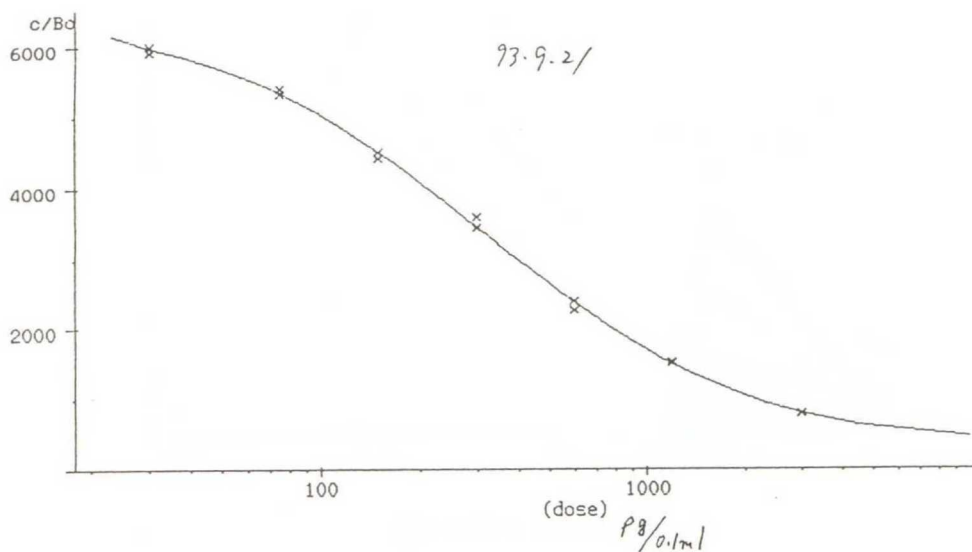


Fig. 15. A standard curve of PAF by radio-immunoassay

Table 13. Blood PAF concentrations in LPS injected dogs

LPS large-dose injected dogs ¹⁾			
Dog No.	Stage ³⁾		
	pre	1h	2h
1	50.0	110.3	46.4
2	8.4	156.6	127.9
3	15.3	152.0	71.3
mean	24.6	139.6	81.9
SD	22.3	25.5	41.8

(pg/0.1ml)

LPS small-dose injected dogs ²⁾			
Dog No.	Stage ³⁾		
	pre	10m	1h
4	9.7	74.4	3.2
5	0	14.2	0
6	0.6	22.4	7.7
7	21.5	20.4	14.7
8	0	7.9	3.0
9	0	0	1.6
10	7.0	9.8	9.3
11	6.0	44.9	13.3
12	23.5	68.3	25.8
mean	7.6	29.1	8.7
SD	9.2	27.0	8.2

Dose of LPS intravenous (IV) injection :

¹⁾ 1 mg/kg body weight (BW); ²⁾ 40 μg/kgBW.

³⁾ after LPS injection: m, minutes; h, hours.

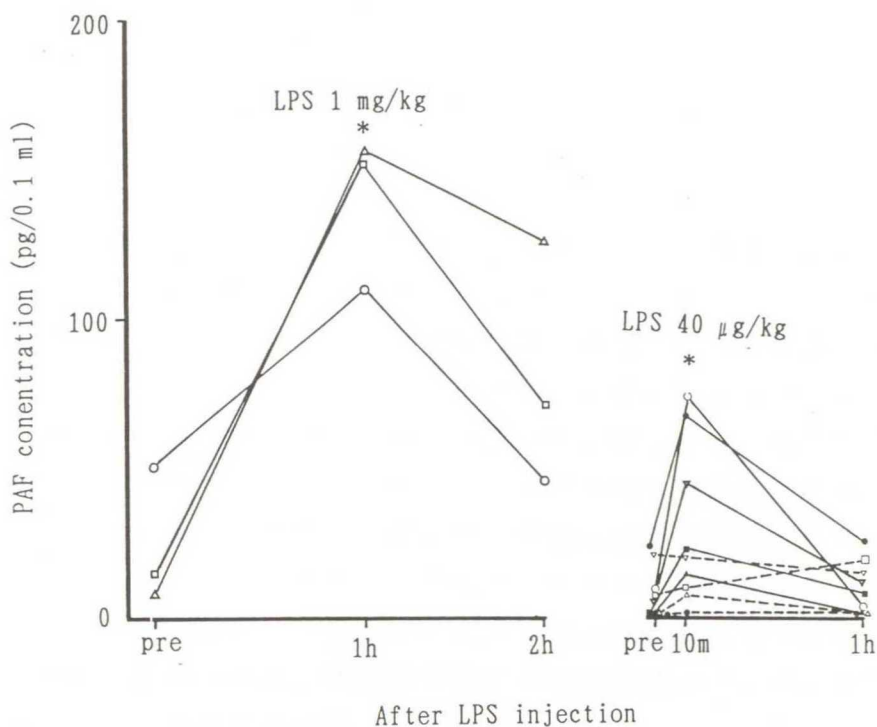


Fig. 16. Changes of blood PAF concentrations in LPS-injected dogs.

The figure was drawn from Table 13.

* $p < 0.05$ (by student's paired t-test between pre and the other stages).

3 考察

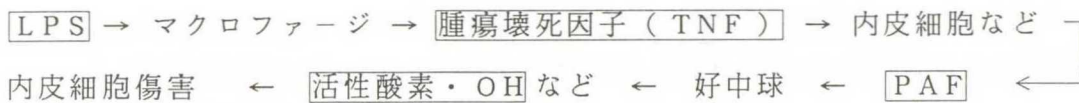
PAF の測定法には現在、洗浄ウサギ血小板の凝集反応を用いたバイオアッセイ法、高速液体クロマトグラフィー法、質量分析法、RIA 法、ラジオリセプターアッセイ法などが開発されている [里内, Stenzel, 中山, 中嶋]。何れの方法も一長一短がある [里内] が、今回の実験では唯一測定キットが市販されている RIA 法を用いた。標準液の測定値からは良好な検量線が描かれ、標準液 2 重測定間の誤差もほとんど認めなかったことから、サンプルの抽出・精製さえ良好であれば、再現性と感度の優れた測定法であることがわかった。しかし、上記のいずれの測定方法を用いるにしても、生体試料を分析する上で最も基本となる前処理 (PAF 精製) 法はまだ確立されていない [唐沢]。今回用いた Bligh & Dyer 法も本来、総脂質の抽出に標準的に用いられているものであり、全血のように共存物質の多い試料については十分に PAF の精製が行えないといわれている [中山]。したがって、ここに示した成績も相対的なものとして評価すべきである。例えば今回の成績の中で、LPS 大量投与群の 1 頭に、LPS 投与前 (Pre) の PAF 濃度が $50.0 \text{ pg}/0.1 \text{ ml}$ と異常に高い値が得られたり、少量投与群の中には LPS を投

与しても PAF 濃度の増加を認めない個体が存在したことなども、PAF 濃度測定の前処理技術に原因のあった可能性がある。

しかし、PAF 濃度の絶対値については疑問が残るが、LPS を犬に投与すると血中 PAF 濃度が有意に増加することは確認できた。また、そのピークは少量投与群の結果から LPS 投与後 1 時間以内と推定された。

一方、LPS 大量投与、少量投与両群の中で、血中 PAF 濃度が最も高かったのは大量投与群の投与後 1 時間値で、平均 139.6 pg/0.1 ml であった。この時の血小板数は、3 頭平均して投与前値の 58.8 % で、少量投与群の投与 10 分後の血小板数（LPS 投与前の平均 22.3 % まで減少；第 2 節 Table 15 から算出）より明らかに正常値に近かった。LPS 投与後の血小板減少に PAF が直接的に関与しているとすると、大量投与 1 時間後の血小板減少の方が、少量投与 10 分後のそれより高度となることが予想され、今回の成績には矛盾が感じられた。このような現象の起こる理由として、Henson ら [Henson1977] が実験的アナフィラキシーを起こしたウサギで証明している PAF 脱感作現象が挙げられる。すなわち、一旦 PAF によって活性化され可逆的に凝集した血小板が PAF に脱感作されたために、体内で PAF の増加が続いているにもかかわらず、凝集部から解離したことが考えられる。

PAF が体内で増加するメカニズムや細胞間の化学伝達系における PAF の役割に関して、里内らはグラム陰性菌による LPS ショックの際の内皮細胞傷害を例に次の様な推論を立てている [里内]。



LPS ショックの化学伝達因子として PAF が関与していることは、主に齧歯目の動物を用いた実験で、LPS 投与後の血中 PAF 濃度の増加や PAF 阻害剤によるショック死防止効果 [Terashita1987, 1987, 1992, Yue]、あるいは PAF を投与すると LPS を投与した場合と同様のショック死を起こす [Braquet] ことなどから確認されている。最近では犬についても、PAF 阻害剤によるショック防止効果に関する報告が認められる [Shiba]。また、里内らが示した上の図の化学伝達の順路だけでなく、PAF もまたマクロファージやリンパ球などを活性化させる性質を持ち、TNF その他のサイトカインの産生 [Hayashi, Salen] やアラキドン酸カスケードの活性化 [Yamanaka] を誘導すると見られている。すなわち体内に産生された PAF は、サイトカインやアラキドン酸代謝系など他の化学伝達系の活性化にも関与し、LPS に対する生体反応に複雑な役割を演じているらしい [Ferguson]。

PAF 刺激に対する血小板の凝集反応には動物種差がある [Feingold] といわれるが、この章の緒論で述べたとおり犬の血小板も強い反応を示すことから [Tahraoui]、LPS 投与後の犬の血中に PAF の有意な増加を認めたことは、LPS 誘導血小板減少に PAF が関与する可能性を示すものである。

第 2 節

LPS 投与犬および PAF 投与犬の血液一般性状と凝固・線溶系の変化

LPS 血症犬に発現する血小板減少が主として PAF の作用によるものであれば、PAF を犬に投与しても、血小板減少を再現できるはずである。Herman ら [Herman] は、フィルターループ法を用いて血液を体外循環させている犬に PAF を動脈注射して、体外循環フィルター圧が亢進したことを報告し、その原因は血小板がフィルター部に凝集するためであろうと述べている。すなわち犬に PAF を投与すると、血小板は活性化して、凝集しやすくなっていることを示している。本章の緒論で述べた Yue [Yue] のウサギでの実験と同様に、犬に LPS と PAF をそれぞれ投与して血小板数の変化を調べれば、LPS 血症犬の血小板減少に PAF が関与しているか否か判断する材料になる。すでに柴ら [柴] は、犬に PAF を投与して LPS 投与犬と同様に血小板および白血球数が減少したと述べているが、これは 4 mg/kg という大量の PAF を投与し、その 30 分後の血液から得られた成績である。おそらくこの条件では、すでに犬が多臓器不全に陥った後であり、血小板に対する PAF の直接的な刺激のみならず、全身各組織の傷害や高度の代謝異常に起因した二次的な反応を観察している可能性が高い。今回の実験では少量の LPS あるいは PAF を投与し、その直後から小刻みに血小板数を測定することによって、PAF の直接的な刺激に対する血小板の反応を観察しようとした。

また、犬に LPS を投与すると血小板数の他に凝固・線溶系、白血球数などが著しく変化することが知られている [Jain, 中間] ことから、凝固・線溶系のスクリーニング検査および白血球数測定も行って、LPS 投与犬と PAF 投与犬の間でこれら血液学的成分の変動に共通性があるか否か検討した。

1 材料および方法

1) 実験群

28 頭の犬を 4 群 (I ~ IV 群; 性、年齢、体重などは各群の説明の中でそれぞれ示す) に分け、LPS、PAF または生理食塩水を投与した (投与経路なども各群別に示す)。

なお、LPS 投与は血小板減少を起こし得るできるだけ少ない量 [中馬] に抑えた。また PAF については、単回投与する群と、少量ずつ連続注射する群の 2 つに分けた。

(1) LPS 投与 (I 群)

16 頭の犬 (雑種 2 ビーグル 14 頭、雌雄各 8 頭、1~7 歳、体重 7~15 Kg; No. 1~16) を用いた。ただし、ここでの No. 8~16 は、本章第 1 節の実験と同時にっており、第 1 節 LPS 少量投与群の犬 No. 4~12 である。すなわち LPS 投与量は 40 μ g/kg で、投与方法も第 1 節で述べたとおりである。

これらの犬を臨床観察しながら、投与前、投与 1、10 分、1、3、8 時間、および 1、2、3、5 日後に、橈側皮静脈または頸静脈から採血し、下記 2) のとおり、血小板数算

定その他の諸検査を行った（以下のⅡ～Ⅳ群においても、採血時期は異なるが、臨床観察を含め検査項目は全て同じ）。

(2) PAF 投与

① 単回投与（Ⅱ群）

6頭のビーグル犬（雌4雄2頭、10～13kg、1～3歳；No. 17～22）に市販のPAF製剤（牛心筋由来 1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine；Sigma社）を投与した。PAFの投与量は、3頭には0.5 μg/kg（これまで犬に全身投与した報告中で最小値[Yamanaka]）、また別の3頭には1.0 μg/kgとした。

まず、必要量（後述の投与量から計算）の本製剤をシリコン処理（Sigma社 Sigmacote 使用）したガラス小試験管に入れ、窒素ガスを吹きつけて溶媒のクロロホルムを除去し、PAFを乾固した。これに4℃に冷却した生理食塩水を、PAF濃度が10 μg/mlとなるように加え、激しい振盪と超音波洗浄器による衝撃を加えて管壁のPAFを生理食塩水中に取り込み、LPSの場合と同様にろ過滅菌した。そしてPAFの変性を防ぐため調整後も4℃に保ち、30分以内に静注した。

採血は投与前、投与0.5、1、2、3、4、5分、1、2時間、および1、2、3、5日後に行った。

② 連続投与（Ⅲ群）

3頭のビーグル犬（雌2雄1頭、2～4歳、体重9～11kg）に、次の手順により5 μg/kg/時の速度で90分間連続静注した。

注射用PAF溶液は、上記Ⅱ群の操作に準じ、滅菌生理食塩水に5 μg/mlの濃度に溶解させて用いた。

まず、犬の橈側皮静脈へ22Gの留置針（Terumo社）を装着した。次いで、PAF溶液を吸引したディスポーザブルシリンジ（Terumo社）を、延長チューブを介して上記の留置針と連結した。連続静注には連続注射装置（テルフュージョン STC-521；Terumo社）を用い、PAFの変性を防ぐため注射装置とともにアイスボックス内で10℃以下に保存し、そこから一定の流速（1 ml/kg/時；PAFとして上記の量になる）でPAF溶液を送りだした。

採血は、投与前、投与開始から10、30分、1、2、4、8時間、および1、2、3、5日後に行った。

(3) 対照（Ⅳ群）

3頭のビーグル犬（雌1雄2頭、2～4歳、10～13kg）に、Ⅲ群と同様の手順で生理食塩水を1 ml/kg/時の流速で90分間連続注射し、Ⅲ群と同じ間隔で採血した。

2) 血液検査項目

(1) 血液一般検査（血球数算定および白血球分画）

血液1 mlをEDTA 2 Na 1 mgで凝固阻止し、血球数（血小板、赤血球、および総白血球）を算定するとともに、塗抹標本をギムザ染色後鏡検して白血球百分比を求めた。

(2) 凝固系・線溶系スクリーニング検査

① 凝固系 [活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT)、および Fbg 濃度]

血液 2.25 ml と 3.8 % クエン酸 Na 0.25 ml を混和して凝固阻止 (操作法は第 1 章 PRP 作製に準ずる) し、3000 rpm・10 分遠心して血漿を分離した。この血漿を用いて自動血液凝固計 (Sysmex CA-100; 東亜医用電子株) で上記 3 項目の凝固系スクリーニング試験を行った。試薬はすべて、この機械の指定品を用いた。なお、Fbg 濃度測定はトロンビン時間法によるが、検量線は、あらかじめチロジン法で Fbg 濃度を確認した犬プール血漿を用いて作成した。

② 線溶系 [フィブリン・Fbg 溶解産物 (Fibrin・Fbg degradation products; FDP) 凝固・線溶系の同時亢進は、血清 FDP 濃度によって推定できる。

犬の FDP あるいは Fbg は、ヒトのものと交差免疫反応性があるために [友田, Green]、ヒト用のキットが半定量目的に用いられている [中馬]。そこで、ラテックス凝集式 FDP 濃度測定キット (帝国臓器株) FDPL テスト; 抗ヒト Fbg ウサギ抗体使用) を用い、血清中の FDP レベルを測定した。

この検査は、4 つの実験群のうち、I 群では No. 13~16 の 4 頭のみ、II 群では No. 20~22 の 3 頭のみ、III および IV 群では全個体について行った。

2 結果

1) 臨床症状

LPS または PAF を投与した各個体の臨床症状の概略を Table 14 に示した。対照の IV 群を除く各群の多くの個体で、元気消失または脱力が認められた。なお表中には示していないが、症状発現までの時間および症状の持続時間には群間で大きな差があった。LPS を投与した I 群の症状は投与数分後から発現し、元気消失などの症状が数 10 分間、個体によっては 1 時間以上続いた。これに対し、PAF 単回投与の II 群では、投与とはほぼ同時に元気消失し脱力状態となったが、わずか 1~2 分で回復した。なおこの群のうち、PAF 1 μ g/kg 投与の犬では 3 頭全てが元気消失したが、0.5 μ g/kg 投与犬では元気消失は 3 頭中 1 頭で認めたのみであった。元気消失の他、I 群では 16 頭中 7 頭に嘔吐、9 頭に頻回の排便または裏急後重、ときに水様性下痢を認めたのに対し、II 群では嘔吐、頻回排便などの消化管症状は認めず、流涎、鼻漏、徐脈 (50~60/分) が現れ、これらの症状も投与後数分間で消失した。全体的な臨床症状の強さも、LPS または PAF 単回投与の I、II 群間で比較すると、PAF 投与の方が LPS 投与の場合よりも軽度であった。

PAF を連続投与した III 群では、投与開始直後は症状を示さなかったが、3 頭とも 10~40 分経過した頃から徐々に元気消失と流涎を呈し、投与開始から 1 時間後には嘔吐と排便、さらには体温低下 (投与終了時、平均 37.0°C)、皮温不正、可視粘膜チアノーゼとともに沈鬱状態に陥った。この群の犬はいずれも他の群の犬より強い症状を示し、それが PAF 投与終了後も約 10 分間持続した。しかしこの群においても、投与終

了後から回復するまでに要する時間は、I群の犬がLPS投与から回復するまでに要する時間より短かった。

対照のIV群には症状を認めなかった。

Table 14. Clinical signs of LPS-or PAF-injected dogs

Group	Dog No.	Weakness	Vomiting	Evacuation, diarrhea or tenesmus	Salivation	Rhinorrhea	Bradycardia	Cyanosis	Hypothermia
I	1	+	++	+++					
	2	+	++	+++					
	3								
	4	+		+					
	5	+	+	+++					
	6	+	+	+					
	7				+				
	8			+					
	9	+		+++					
	10	+							
	11	+++							
	12	+		++					
	13	+							
	14	+	+						
	15								
	16	+	+	+					
II	17 ¹⁾								
	18 ¹⁾								
	19 ¹⁾	+			+				
	20 ²⁾	+		+	+		+		
	21 ²⁾	+			+	+	+		
	22 ²⁾	+			+	+	+		
III	23	+++	+	+	+			+	+
	24	+++	+	+	+			+	+
	25	++	+	+	+			+	+
IV	26								
	27								
	28								

Group I: LPS 40 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ was injected IV.

II: ¹⁾ PAF 0.5 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$, and ²⁾ 1.0 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ was injected IV.

III: PAF 5 $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{hour}$ was infused for 90 minutes.

IV: Control; physiological saline 0.1 ml/kgBW was infused for 90 minutes.

(These group numbers are used similarly in all the tables)
and the figures in this paragraph.

2) 血小板数

Table 15 に各群の血小板数を個体別・採血時点別に示した。さらに、Fig. 17 に経時の変化を折れ線グラフで表した。

I 群の血小板数は LPS 投与 1 分後に激減し、その減少は 10 分後まで持続した。1 時間後には投与前値の約 66 % まで回復したが、その後の回復は遅く、2 日から 5 日後にかけて徐々に正常値に戻った。

一方 II 群では、PAF 0.5 および 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与のいずれの個体においても投与 0.5 分後で減少傾向を示し、1 分後に最低値（投与前の平均 41.8 %）となった。しかし減少程度は I 群のそれに較べ軽度であった。そして、わずか 3 分後には、投与前値の約 72 % まで回復した。

III 群でも、PAF 投与開始から 10 分後に血小板数は減少した。しかしながら、最終的に PAF 投与総量が II 群の 7.5~15 倍になっているにもかかわらず、II 群と同程度の減少（1 時間値で投与前の平均 54.0 %）に止まり、LPS を投与した I 群のような著しい減少は示さなかった。

IV 群では特に変化を認めなかった。

3) 凝固・線溶系スクリーニング検査

(1) APTT、PT および Fbg 濃度

それぞれの成績を Table 16~18 に示した。

有意に変化したのは I 群（LPS 投与）の APTT と Fbg 濃度のみであった。そこで、この群のこれら 2 項目の推移（平均値±標準偏差；No. 9~16 の成績から計算）を Fig. 18 に示した。いずれの項目も、投与当日中には明らかな異常を認めず、Fbg 濃度は投与 2 日後をピークに増加し、APTT も 3 日後をピークに延長した。

(2) FDP レベル

FDP レベルの変化をラテックス凝集陽性となった希釈率（Titer）で示した（Table 19）。

FDP レベルは LPS を投与した I 群において、早い個体では LPS 投与 10 分後から 4 時間後をピークに明らかに上昇しており、Fbg 濃度測定によっては検知できなかった凝固・線溶系の亢進が認められた。

一方、PAF を連続投与した III 群の 1 頭でも 8 時間後および 1 日後に軽度上昇したが、対照の IV 群の 1 頭も同様に上昇したことから、PAF 投与による変化とはいえない。

Table 15. Platelet counts in LPS- or PAF-injected dogs

 $(\times 10^3/\mu\text{l})$

Group	Dog No.	Stage ¹⁾												
		pre	1m	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d		
I	1	350	ND	1	123	ND	ND	ND	99	102	156	192		
	2	224	ND	3	236	ND	ND	ND	216	214	231	297		
	3	426	ND	242	315	ND	ND	ND	175	256	279	341		
	4	375	ND	83	275	ND	ND	ND	242	311	296	317		
	5	270	ND	56	100	ND	ND	ND	179	163	156	227		
	6	310	ND	45	172	ND	ND	ND	168	160	205	243		
	7	269	ND	79	217	ND	ND	ND	201	208	233	265		
	8	312	ND	85	200	ND	ND	ND	195	195	194	198		
	9	325	35	78	225	241	203	201	226	219	209	275		
	10	411	25	61	302	298	201	211	266	268	308	334		
	11	274	110	110	238	250	231	298	332	452	434	475		
	12	396	35	48	288	305	185	150	121	112	175	328		
	13	313	10	59	201	200	210	150	158	113	191	270		
	14	343	7	31	154	166	237	194	158	152	200	259		
	15	337	266	188	281	257	284	224	224	260	282	324		
	16	266	15	26	97	100	139	128	112	123	184	232		
II	17	430	ND	324	324	384	388	316	378	421	368	427	391	336
	18	206	196	59	83	171	185	137	ND	ND	198	260	304	302
	19	381	ND	152	283	276	228	222	401	377	410	451	454	351
	20	317	ND	ND	ND	ND	ND	247	233	ND	234	334	350	279
	21	460	127	90	106	197	172	133	273	278	237	291	292	ND
	22	443	256	203	340	316	294	338	380	389	465	468	474	505
	III	23	363	179	186	206	179	427	400	309	331	318	376	
24		385	255	239	174	298	354	343	336	376	377	436		
25		319	275	238	195	296	329	310	255	311	339	331		
IV	26	289	311	281	281	323	336	334	338	345	335	ND		
	27	378	ND	355	350	348	333	373	369	352	361	447		
	28	321	ND	338	314	310	328	320	378	379	400	356		

¹⁾ After LPS or PAF injection or start of PAF infusion:

m, minutes; h, hours; and d, days.

(same in the following tables and the figures in this paragraph.)

Blood samples were collected at the different intervals shown on the first lines of each group.

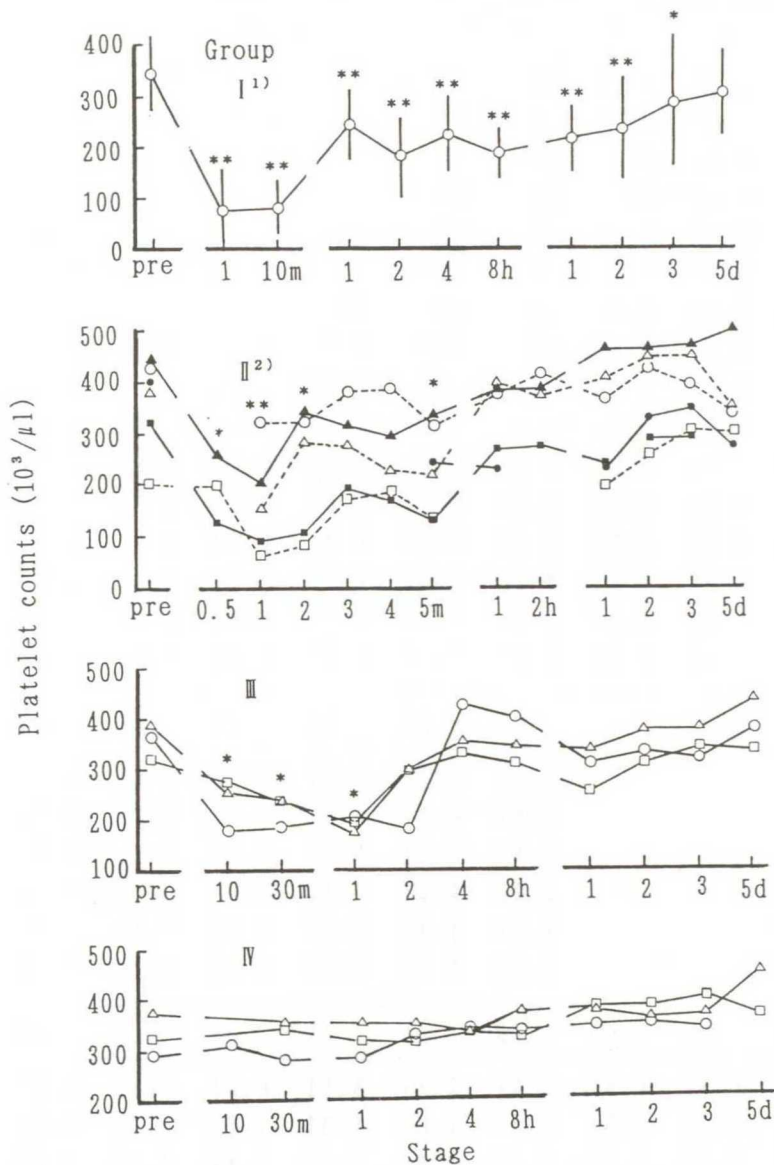


Fig. 17. Changes of platelet counts in LPS- or PAF-injected dogs.

The figure was drawn from Table 15. ¹⁾ mean \pm standard deviation.

²⁾ dose of PAF: --, $0.05 \mu\text{g}/\text{kgBW}$; and —, $1 \mu\text{g}/\text{kgBW}$.

** $P < 0.01$, and * $0.01 \leq P < 0.05$. (by student's paired t-test between pre and the other stages; same in the following figures)

Table 16. Activated partial thromboplastin times (APTT) in LPS- or PAF-injected dogs

		(Seconds)										
Group	Dog No.	Stage										
		pre	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d	10d
I	1	13.9	14.3	15.4	ND	ND	ND	14.6	16.8	ND	14.5	ND
	2	14.1	11.3	14.8	ND	ND	ND	18.8	22.2	ND	16.1	ND
	3	15.2	14.8	13.9	ND	ND	ND	ND	12.9	14.7	ND	ND
	4	13.1	13.1	12.9	ND	ND	ND	ND	21.9	17.9	ND	ND
	5	11.9	ND	12.5	ND	ND	ND	13.6	18.8	18.1	19.0	ND
	6	13.5	ND	ND	ND	ND	ND	13.7	18.1	16.8	15.8	ND
	7	14.5	ND	ND	ND	ND	ND	18.3	21.4	20.3	17.1	ND
	8	13.1	ND	13.1	12.8	ND	ND	14.1	16.4	16.0	17.9	ND
	9	16.1	ND	15.5	13.9	ND	ND	15.1	16.1	ND	ND	ND
	10	14.3	13.9	15.0	13.2	15.0	15.8	16.3	18.2	18.6	18.2	15.3
	11	15.2	14.9	14.4	14.1	15.0	15.1	17.8	22.7	23.7	19.1	16.9
	12	13.1	13.8	13.9	13.5	13.9	13.3	19.8	20.8	18.9	17.0	17.0
	13	12.5	12.1	13.1	13.5	13.0	12.1	17.5	19.8	22.7	18.0	15.4
	14	13.1	13.7	13.5	13.4	15.4	11.8	17.7	20.7	24.5	22.6	16.2
	15	13.9	12.3	13.4	12.8	12.3	12.6	15.6	20.7	22.6	23.4	14.1
	16	10.9	12.6	11.9	13.0	12.5	14.3	17.3	20.1	18.6	19.0	13.6
		pre	1h	4h	1d	2d	3d					
II	17	13.0	14.1	ND	13.8	12.9	12.8					
	18	14.0	13.7	14.6	14.1	13.9	13.3					
	19	13.9	13.8	13.8	15.0	13.0	14.4					
	20	12.8	13.9	ND	14.7	14.1	13.1					
	21	12.7	15.7	15.9	13.8	14.1	13.1					
	22	14.3	15.8	14.9	13.6	13.6	14.5					
			pre	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d
III	23	13.8	14.5	13.8	12.8	13.2	13.0	14.3	14.1	13.9	15.1	
	24	15.0	17.8	18.1	16.4	20.7	15.9	18.4	18.4	17.7	16.3	
	25	13.7	15.0	14.7	14.2	16.2	12.2	15.2	19.6	16.4	15.3	
IV	26	14.3	13.8	14.2	14.6	13.8	12.3	14.0	13.7	13.6	14.0	
	27	15.1	ND	15.1	13.3	14.6	14.4	15.3	12.5	13.8	14.9	
	28	10.8	ND	13.1	12.3	11.5	10.9	11.7	12.6	12.2	12.3	

Table 17. Prothrombin times in LPS- or PAF-injected dogs

		(Seconds)										
Group	Dog No.	Stage										
		pre	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d	10d
I	1	11.5	11.8	11.9	ND	ND	ND	11.7	10.3	ND	11.0	ND
	2	10.5	10.8	9.7	ND	ND	ND	10.1	9.9	ND	10.0	ND
	3	11.0	9.7	10.5	ND	ND	ND	ND	11.1	9.4	ND	ND
	4	7.6	8.5	8.1	ND	ND	ND	ND	8.4	10.1	ND	ND
	5	8.8	ND	8.7	ND	ND	ND	9.5	8.8	11.3	12.0	ND
	6	7.8	ND	ND	ND	ND	ND	9.9	8.9	8.9	10.5	ND
	7	9.5	ND	ND	ND	ND	ND	11.1	8.4	9.8	9.6	ND
	8	10.2	ND	10.5	8.5	ND	ND	9.8	10.1	11.0	9.8	ND
	9	9.9	ND	8.3	8.9	ND	ND	8.8	9.5	ND	ND	ND
	10	9.3	8.7	8.8	7.9	8.3	9.9	9.6	8.5	8.0	8.0	7.8
	11	10.4	8.6	9.3	10.1	7.8	9.1	11.0	9.7	8.9	8.6	8.1
	12	8.1	9.7	8.1	8.4	8.4	9.0	9.2	10.4	9.1	8.4	8.7
	13	9.9	9.3	10.0	8.8	10.3	9.4	10.0	10.8	10.1	8.5	10.9
	14	10.9	8.6	9.9	10.3	7.8	8.1	12.7	10.1	9.3	9.1	10.1
	15	8.1	8.4	10.1	9.5	10.0	8.8	9.8	8.0	9.5	8.0	7.7
	16	8.3	8.0	7.5	8.0	9.4	8.9	9.2	8.8	9.3	8.0	9.3
		pre	1h	4h	1d	2d	3d					
II	17	9.6	11.0	ND	10.1	9.9	9.8					
	18	13.8	16.5	15.7	12.3	14.8	14.7					
	19	10.6	12.9	9.9	11.1	12.5	13.1					
	20	12.8	13.9	ND	14.7	14.1	13.1					
	21	12.7	15.7	15.9	13.8	14.1	13.1					
	22	14.3	15.8	14.9	13.6	13.6	14.5					
		pre	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d	
III	23	8.3	8.9	9.5	8.4	8.8	9.3	9.0	9.9	9.2	8.7	
	24	11.7	11.6	11.4	10.8	10.6	11.1	10.3	10.8	10.1	11.0	
	25	10.6	10.7	10.3	10.2	10.5	10.8	11.0	10.3	9.6	9.4	
IV	26	10.8	9.1	8.9	11.3	10.6	11.5	9.3	10.1	9.0	10.5	
	27	8.2	ND	10.6	10.4	9.7	9.0	9.4	8.8	8.7	8.7	
	28	9.2	ND	9.4	9.3	9.8	9.8	8.3	9.5	9.0	8.9	

Table 18. Fibrinogen (Fbg) concentrations in LPS- or PAF-injected dogs

(mg/dl)

Group	Dog No.	Stage										
		pre	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d	10d
I	1	231	221	206	ND	ND	ND	256	261	ND	638	ND
	2	282	250	241	ND	ND	ND	583	775	ND	381	ND
	3	335	335	322	ND	ND	ND	ND	381	350	ND	ND
	4	282	256	248	ND	ND	ND	ND	363	338	ND	ND
	5	231	ND	258	ND	ND	ND	353	424	266	397	ND
	6	317	ND	ND	ND	ND	ND	626	604	450	419	ND
	7	282	ND	ND	ND	ND	ND	500	583	461	357	ND
	8	296	ND	220	241	ND	ND	493	381	312	245	ND
	9	225	ND	243	230	ND	ND	514	664	ND	ND	ND
	10	266	255	241	253	239	281	393	461	385	335	310
	11	215	220	235	241	212	305	467	389	284	341	333
	12	305	318	341	336	298	397	573	591	573	387	288
	13	285	262	213	243	273	312	479	600	604	399	303
	14	286	217	276	253	271	310	510	626	450	338	298
	15	298	273	253	241	263	292	555	626	514	363	276
	16	338	219	305	294	286	286	461	664	538	393	278
II		pre	1h	4h	1d	2d	3d					
	17	298	278	ND	280	265	279					
	18	255	281	298	276	303	320					
	19	308	294	263	294	281	273					
	20	281	290	ND	261	302	293					
	21	341	333	300	298	278	305					
	22	298	253	271	262	213	305					
III		pre	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d	
	23	283	305	293	276	311	281	299	298	313	340	
	24	370	367	385	357	357	360	347	288	353	322	
25	205	256	205	214	232	258	266	243	212	221		
IV	26	317	335	273	317	296	286	273	312	286	290	
	27	280	ND	357	335	305	314	298	276	238	250	
	28	353	ND	389	363	300	324	310	298	345	331	

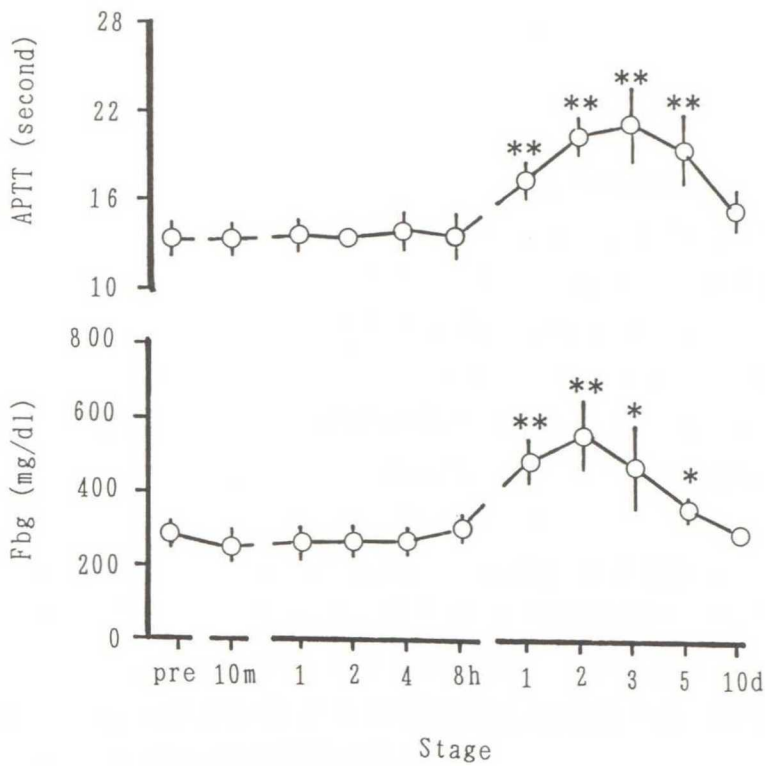


Fig. 18. Changes in APTT and Fbg concentrations in LPS-injected dogs.

Drawn from the data of dogs No. 10-16 (Group I) in Table 16 and Table 18.

Table 19. Serum FDP levels in LPS- or PAF-injected dogs.

(Positive latex agglutination; titers)

Group	Dog No.	Stage									
		pre	1m	10m	30m	1h	2h	4h	8h	1d	2d
I	13	-	-	-	ND	x5	x5	x10	x5	-	ND
	14	-	-	-	ND	-	x5	x5	x5	-	ND
	15	-	-	x5	ND	x5	x5	x10	x5	-	ND
	16	-	-	-	ND	-	x5	x10	x5	-	ND
II	20	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	-	ND
	21	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	-	ND
	22	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	-	ND
III	23	-	ND	-	-	-	-	-	x5	x5	-
	24	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	26	-	ND	-	-	-	-	-	x5	x5	-
	27	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-

-: undetected.

3) 白血球

(1) 総白血球数

各群の総白血球数を Table 20 および Fig. 19 に示した。

I 群ではほとんどの個体で LPS 投与 1 分後から総白血球数の減少が始り、血小板数と同様 10 分後には最低値（投与前の約 34 %）となり、4 時間後までそのまま低い値で推移した。8 時間を過ぎてからは逆に増加に転じて投与前値を大幅に上回る値を示し、投与 2 日後をピークにして、その後徐々に投与前値に戻った。

II 群では、個体によっては PAF 投与 0.5 分後から総白血球数が減少し始め、投与 5 分後には全個体が低値を示し、投与前値の平均 62 % となった。そして投与 1 時間後には増加に転じており、3 時間後には I 群の投与 1~2 日後と同様、投与前値より高い値を示したが、投与 1 日後には投与前の値に戻った。

III 群では、PAF 連続投与を開始 10 分後（この時点までで約 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の PAF を投与）には総白血球数が減少しており、投与を 1 時間継続した時点が最低値であった。投与終了から 30 分経過した時点（投与開始から 2 時間後）には、I、II 群と同様増加に転じており、投与終了から 2.5 時間経過した時点（投与開始から 4 時間後）には投与前の平均約 1.8 倍の高い値を示した。

I~III 群の白血球数の変動を比較すると、血小板数と同様、変化の表われる時間は異なるものの共通した変化曲線（一過性の減少およびそれに続く反動的な増加）が認められた。

なお、対照の IV 群には特に変化を認めなかった。

(2) 白血球分画

Table 21 に、I~III 群の LPS または PAF を投与する前 (pre)、総白血球数が最も減少した時点（I 群は投与 10 分後、II 群は同 1 分後、III 群は投与開始 1 時間後）および最も増加した時点（I 群は投与 2 日後、II 群は同 3 時間後、III 群は投与開始から 4 時間後）の白血球の分画を実数で示した（桿状核好中球、分葉核好中球、リンパ球、およびその他の 4 分画に分類）。また、Fig. 20 にそれら分画の累積棒グラフを示した。各群の白血球数変化はいずれも、主に分葉核好中球の増減によるものであり、I および III 群ではわずかな桿状核好中球増加を伴った。

Table 20. Leukocyte counts in LPS- or PAF-injected dogs

 $(\times 10^3/\mu\text{l})$

Group	Dog No.	Stage												
		pre	1m	10m	1h	2h	4h	8h	1d	2d	3d	5d		
I	1	10.7	ND	4.0	3.3	ND	ND	ND	25.1	25.6	14.9	9.3		
	2	12.1	ND	2.7	2.6	ND	ND	ND	23.7	21.9	11.3	10.3		
	3	7.2	ND	0.4	1.7	ND	ND	ND	19.1	20.1	10.5	10.7		
	4	8.6	ND	2.1	2.6	ND	ND	ND	1.5	17.1	10.3	8.7		
	5	7.8	ND	1.9	2.6	ND	ND	ND	17.6	23.2	10.0	9.1		
	6	7.7	ND	1.8	2.9	ND	ND	ND	26.4	18.3	10.6	9.4		
	7	11.9	ND	6.2	3.3	ND	ND	ND	18.8	23.6	12.0	8.7		
	8	8.0	ND	2.9	2.6	ND	ND	ND	25.7	24.3	9.7	8.6		
	9	12.1	4.7	4.3	2.9	3.8	2.9	7.6	26.2	38.8	24.5	11.0		
	10	11.1	3.0	2.6	3.1	2.6	3.9	6.5	26.1	31.5	17.0	14.6		
	11	13.2	6.6	6.5	6.1	4.3	5.1	10.3	30.3	36.9	10.0	10.3		
	12	11.5	7.3	2.4	3.1	2.1	3.3	16.7	31.7	42.8	25.4	9.7		
	13	12.5	8.3	6.2	2.3	2.0	4.6	8.1	20.6	33.0	17.5	10.6		
	14	7.7	3.0	2.7	1.3	1.4	1.6	4.0	10.2	17.3	12.1	10.7		
	15	10.5	10.4	6.2	2.8	2.6	8.9	18.9	28.2	30.1	14.8	9.8		
	16	8.0	3.2	3.2	1.9	1.4	2.3	10.4	21.9	27.6	13.6	10.5		
II	17	13.0	ND	9.2	9.6	9.0	8.0	7.5	9.6	15.6	11.8	12.6	11.6	13.7
	18	11.8	5.9	4.7	4.6	5.5	5.6	4.9	ND	ND	10.1	11.5	10.0	11.6
	19	13.2	ND	13.1	10.7	8.7	8.9	8.2	12.7	18.5	12.1	12.6	12.3	13.6
	20	12.3	ND	ND	ND	ND	ND	6.0	5.5	ND	15.3	12.2	12.3	13.1
	21	8.7	11.7	9.4	7.3	6.8	6.2	7.7	6.0	12.4	10.5	11.9	12.3	ND
	22	9.5	10.0	12.2	8.8	8.4	7.7	6.8	7.4	12.9	9.7	9.7	9.4	10.3
	III	23	11.4	7.6	6.3	4.8	8.8	22.2	25.2	17.3	11.9	9.5	13.4	
24		10.4	5.2	3.9	3.1	8.7	17.1	14.4	9.2	9.1	11.0	9.3		
25		7.9	4.9	4.2	3.8	6.2	15.1	13.5	8.4	9.0	8.8	9.2		
IV	26	13.2	13.8	13.9	14.4	12.7	11.4	10.4	10.7	11.7	12.2	17.3		
	27	11.3	ND	12.4	12.1	12.6	13.2	13.0	13.1	11.5	10.6	12.9		
	28	8.0	ND	9.5	9.9	12.7	13.9	12.5	10.4	8.7	9.4	9.3		

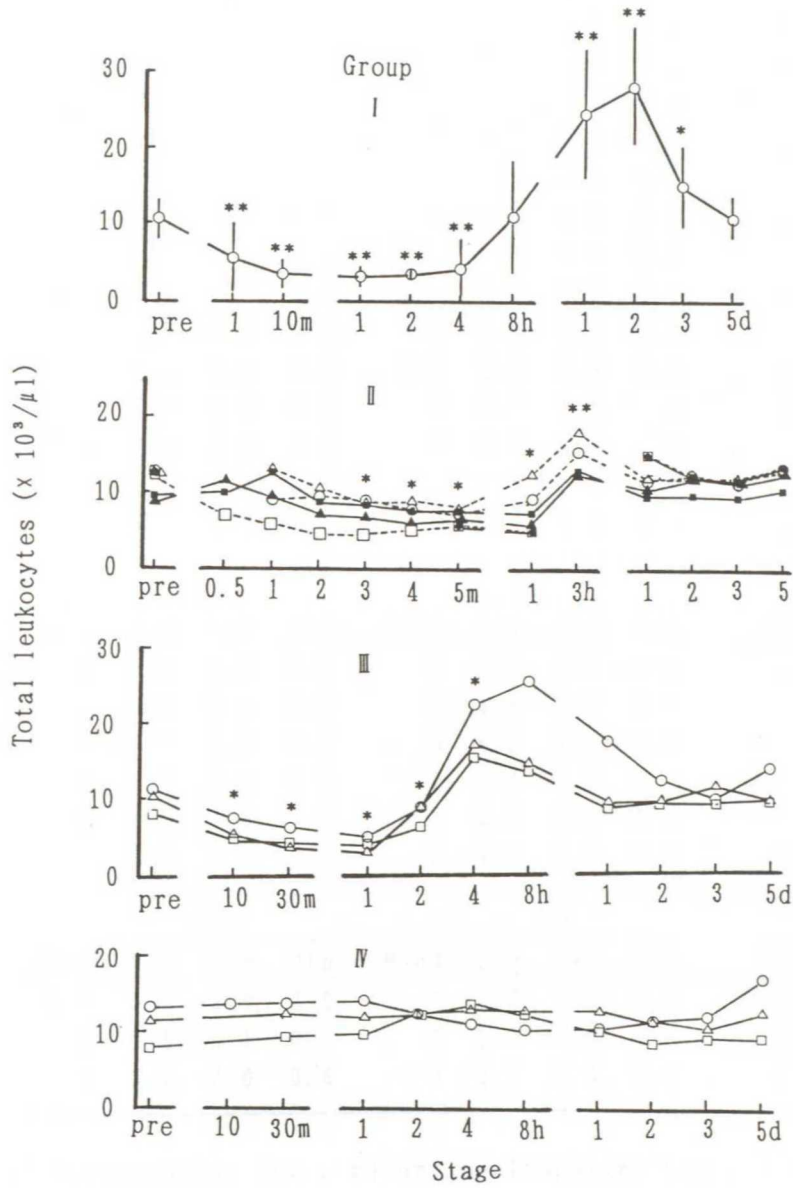


Fig. 19. Changes in total leukocyte counts in LPS- or PAF-injected dogs.

The figure was drawn from Table 20.

Table 21. Differentiated leukocyte counts in LPS- or PAF-injected dogs

(Absolute numbers; $\times 10^3/\mu\text{l}$)

Group	Dog No.	Stage ¹⁾											
		Pre				1h				2d			
		Band.	Seg.	Lym.	Oth.	Band.	Seg.	Lym.	Oth.	Band.	Seg.	Lym.	Oth.
I	1	0.1	7.4	2.1	1.1	0	0.7	2.5	0.1	0.4	19.5	4.7	0.8
	2	0.1	8.7	8.8	0.5	0	1.6	0.9	0.1	0	18.9	2.5	0.4
	3	0	4.2	2.5	0.4	0	0.1	1.6	0.1	0.2	15.8	3.5	0.6
	4	0	5.3	2.6	0.7	0	1.1	1.4	0.1	0.2	13.3	2.7	0.9
	5	0	4.6	2.9	0.6	0	0.9	1.6	0.2	0.5	18.7	2.9	1.2
	6	0.1	5.6	1.5	0.4	0	0.7	2.0	0.2	0.5	12.0	3.5	2.2
	7	0.1	7.1	4.3	0.4	0.1	0.5	2.6	0.1	0	17.4	5.3	0.8
	8	0	4.3	3.1	0.6	0	0.9	1.5	0.2	0.1	18.7	3.9	1.6
	9	0.1	8.7	2.8	0.5	0	0.8	1.9	0.2	0.4	27.8	8.7	1.9
	10	0.1	5.1	5.2	0.8	0.1	0.5	2.3	0.1	0.9	22.7	6.3	1.6
	11	0	6.5	4.4	2.2	0.2	1.2	4.4	0.3	0	34.1	0.9	1.8
	12	0.1	7.2	2.3	1.9	0.1	2.0	0.9	0.1	0.4	33.4	6.8	2.1
	13	0	7.9	3.7	0.8	0	0.7	1.5	0	0.3	26.4	5.1	1.2
	14	0	4.7	2.5	0.4	0	0.5	0.8	0	0	13.6	2.5	1.2
	15	0	7.6	2.2	0.7	0	1.3	1.4	0.1	0	26.0	2.1	2.0
	16	0	5.2	2.2	0.6	0	0.2	1.6	0.1	0.1	22.6	3.5	1.4
II		Pre				5m				3h			
		Band.	Seg.	Lym.	Oth.	Band.	Seg.	Lym.	Oth.	Band.	Seg.	Lym.	Oth.
	17	0	7.4	4.4	1.2	0	4.5	2.4	0.6	0.1	11.7	2.1	1.7
	18	0	8.0	3.3	0.5	0	2.6	2.2	0.1	ND	ND	ND	ND
	19	0.1	10.5	1.9	0.7	0	6.2	1.4	6.7	0	13.9	2.9	1.8
	20	0.1	8.7	2.4	1.2	0	4.1	1.7	0.2	ND	ND	ND	ND
	21	0	5.6	1.8	1.3	0.1	4.8	2.2	0.6	0	8.5	2.2	1.7
22	0	5.5	3.3	0.7	0	4.0	2.0	0.8	0.1	7.6	4.1	1.1	
III		Pre				1h				4h			
		Band.	Seg.	Lym.	Oth.	Band.	Seg.	Lym.	Oth.	Band.	Seg.	Lym.	Oth.
	23	0.1	6.8	3.9	0.6	0	3.4	1.4	0.1	0.7	18.2	1.9	1.0
24	0.1	7.5	2.1	0.7	0	1.7	1.2	0.2	0.1	13.9	1.5	0.9	
25	0	5.3	2.0	0.6	0	2.1	1.4	0.3	0.4	11.9	2.6	0.9	

Band., band neutrophils; Seg., mature neutrophils; Lym., lymphocytes; and Oth., other leukocytes including monocytes and eosinophils.

(These are same in Fig. 19.)

¹⁾ The following stages in each group: left (pre), before LPS or PAF injection; center, the highest mean in total leukocyte counts; and right, the lowest mean in total leukocyte counts.

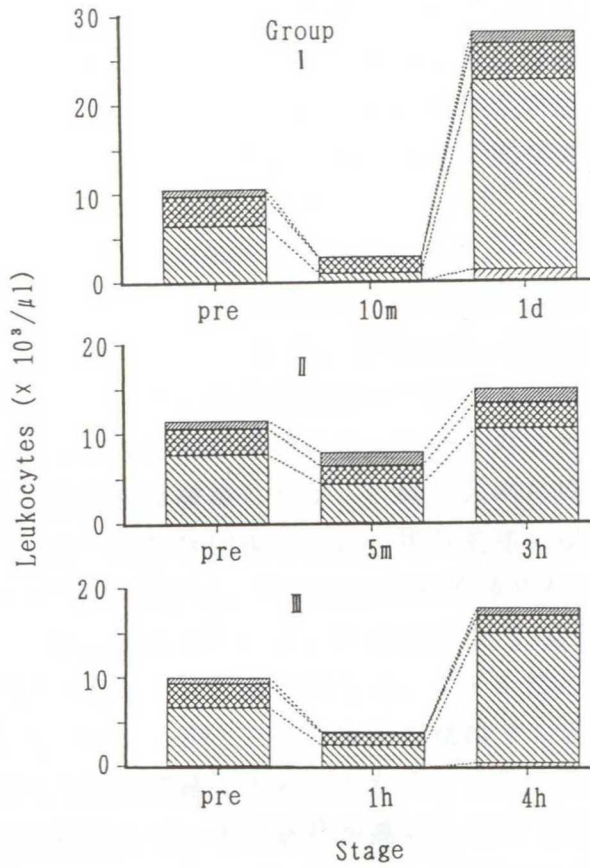






Fig. 20. Changes in differential leukocyte counts in LPS- or PAF-injected dogs.

Drawn from Table 21. , band neutrophils; , mature neutrophils; , lymphocytes; , others.

3 考 察

犬の LPS 誘導血小板減少に PAF が関与していることを証明する第 2 段階として、LPS 投与犬で見られる血液学的変化を、PAF の投与で再現できるかどうか検討した。PAF は化学構造の異なる分子種を含む混合集団[唐沢, 和久]で、構造がわずかに異

なるだけでその機能も著しく変化するといわれている[大野]。生体内からは、アルキル鎖長 $C_{16:0}$ (ヘキサデシル) と $C_{18:0}$ (オクタデシル) のものが主として検出される[村松, Oda]。今回用いた PAF は、 $C_{16:0}$ が 78 %、 $C_{18:0}$ が 22 % の混合物である。この合成 PAF 製剤は犬の血小板に対しても非常に強い凝集惹起性(第 3 節および第 4 節参照)を発揮する。さらに第 1 節の PAF 測定に用いた RIA キットには、 $C_{16:0}$ と $C_{18:0}$ PAF に対する抗体がともに含まれており、他の類縁構造物質との交差反応性もほとんどないとされている。このキットで LPS 投与犬の血中 PAF 濃度増加を認めた(第 1 節)ことは、今回用いた PAF 製剤が、LPS 投与犬の体内で産生される PAF と同様の化学構造であることを示している。

Gutman ら[Gutman]および Sostman ら[Sostman]は、 ^{125}I ラベル血小板を体内に戻した犬に LPS を投与して、その後の胸腹部の放射線量の推移から、LPS 投与による血小板の動態は 2 相性であると述べている。すなわち、投与直後の血小板は急激に肺に集積するが、この反応は可逆的で血小板はやがて肺から解離する。その後一部の血小板が、肝など腹部の組織に不可逆的に集積するというものである。今回の I 群の成績を見ると、LPS 投与直後血小板は激減したが、1 時間以内に投与前値の約 66 % まで急激に回復しながら、その後一気には回復せずに、投与前値に戻るまで数日を要した。おそらく初期の激減が 1 相目の反応で、そのため比較的速やかに回復傾向を示す。一方、その途中から容易に正常に戻らないのは、不可逆的な 2 相目の反応が起こっているためであろう。柴ら[柴]は犬に PAF を投与して、LPS 投与犬と同様に血小板および白血球数が減少したと述べているが、これは本節の緒論でも述べたとおり、大量の PAF を投与後 30 分経過した時の成績であることから、上記の LPS 投与犬で報告されている 2 相目以降の反応を観察している可能性が高い。この 2 相目の反応は、PAF によって引き起こされる二次的反応[Bessin, Giembycz, McManus, Yamanaka]と考えられている。PAF による血小板の二次的反応の存在を示すものとして、PAF を連続投与したラットで DIC を人為的に発症させたという報告[Stenzel]がある。本章の緒論で述べたとおり、ラット血小板は *in vitro* で PAF 刺激に対して凝集反応を示さないことから、DIC の発現は血小板が PAF 投与によって二次的反応を起こした結果と考えられている[Imanishi]。犬でも、LPS あるいは PAF を投与すると血中トロンボキサン A_2 などアラキドン酸代謝産物の増加することが知られている[Hardie1985, Otsuka, Yamanaka]。また本節の緒論で、体外血液循環させている犬に PAF を投与すると血液フィルター部で血小板が凝着するという報告に触れたが、この反応もアスピリンで抑制されることから、PAF 刺激に対する血小板の二次的反応としてアラキドン代謝系の関与が推定されている[Herman]。

本実験では、I、II 群では LPS あるいは PAF 投与直後から小刻みに採血し、第 1 相目の血小板数変化から観察するように計画した。その結果、PAF を投与した II 群においても、投与後の時期や血小板減少の程度には差があるが、LPS を投与した I 群と類似した 2 相性変化が認められた。白血球数の変動パターンも、血小板数と同様 LPS と PAF の反応は類似しており、LPS に誘導されて起る血液学的変化に PAF

の関与することが示唆された。

凝固・線溶系のスクリーニング検査では PAF 投与群（ⅡおよびⅢ群）に異常を認めなかったが、おそらく血小板の活性化が LPS 投与に比べて軽度で、かつ短時間であったために検知できなかったものと思われる。

PAF 投与群の血小板減少程度が軽いのは、当初、単回投与したⅡ群の PAF 投与量が少ないためと考え、Ⅱ群の 3 頭では PAF 投与量を 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に増量したが、臨床症状は少し強まったにも関わらず、血小板数の減少は同程度であった。そこで、90 分間かけて連続的に PAF を静注し（Ⅲ群）、投与総量を 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで増加させてみたが、やはり血小板減少の度合いはⅡ群と同程度であった。この時の臨床症状は LPS を投与したⅠ群の犬より明らかに重度であった。

Chang ら [Chang1987,1990] は、LPS を投与したラットの肺組織 PAF 濃度が、血中のその約 20 倍であったと述べている。また、Zimmerman ら [Zimmerman] は血管内皮細胞で産生された PAF はほとんど細胞膜に残り、この膜上 PAF と多型核白血球の細胞膜上 PAF リセプターが接触すると、白血球が血管に粘着すると述べている。これらの報告はいずれも、局所での PAF による血小板などへの刺激が著しく強いことを示唆している。今回のような全身投与では、肺局所での PAF と血小板の反応を再現するほど PAF 濃度を上げることはできないので、LPS 投与群と PAF 投与群の血小板減少程度に差が生じたことが考えられる。あるいは、LPS 投与犬の血小板減少に PAF が単独で関与しているのではなく、他の刺激との相乗作用の可能性 [Hwang] もある。小田ら [小田] は、LPS そのものか、あるいは LPS に誘導される他の細胞活性化物質が PAF の刺激作用を増強させると推察しており、LPS 投与後の PAF と他の細胞活性化物質の相互関係に関しては幾つかの報告がある。すなわち、LPS そのものと PAF [Salzer]、TNF と PAF [Rabinovic]、あるいはこれら 3 者間 [Sum]、その他、コラーゲン [Kojima]、IL-6 [Peng]、あるいはリューコトリエン [Satomi] など、複数の物質による同時作用が PAF の細胞刺激性を強め、血小板減少を始めとする激しい生体反応を引き起こすことが推定されている。したがって、PAF を単独で投与しても、必ずしも LPS 投与後のような変化を完全には再現せず、そのことが今回の LPS と PAF 投与犬の血小板減少程度の差として表れたとも考えられる。

なお、血小板と白血球数が変化し始める時期およびそれらの回復時期は、PAF を投与したⅡおよびⅢ群の方が、LPS を投与したⅠ群より早かった。このように LPS と PAF 投与による生体反応が異なる発現時期および消失時期を示すことは、血圧変動でも報告されている [Doebber]。おそらく、PAF を投与した場合は、LPS 投与後 PAF が産生されるまでの生体内化学伝達経路を経ずに直接 PAF による刺激が行われるためであり、投与された PAF の体内処理とともにその作用も速やかに消失することが考えられる。

第3節

PAF 阻害剤による LPS 誘導血小板減少の抑制

各種活性物質の生体反応への関与を調べる手段の一つに、特異的阻害剤がその活性物質による生体反応を阻害するか否かによって推定する方法がある。PAF の阻害剤も 1983 年に Imuraら [Imura] が初めて CV-3988 を報告して以来数多く開発され [寺沢]、それらの臨床応用に関する研究 [Danhausel-Riedl, Giembycz, Satomi, Terashita1987]、あるいは各種生理的反應や疾患における PAF の関与を調べる基礎的研究に利用されている [Billah, Braquet, Doebber, Golino, Hayashi, Herman, Imanishi, Ishida, Lopez-Parre, Pignol, Popovich, Razaul, Sun, Stenzel, Sybertz, Terashita1987, 1992, 寺沢, Yue]。

LPS による血小板減少が、PAF 阻害剤によって阻止あるいは抑制されることを確かめれば、LPS 誘導血小板減少における PAF の関与の有力な裏付けとなる。

この検討を行うためには、使用する阻害剤の効果が PAF に特異的なことが前提になる。一部の例外 [Billah] を除き、ほとんどの PAF 阻害剤は PAF に特異的なものとして開発されている [寺沢]。しかしながら、前述した PAF そのものに対する感受性と同様、PAF 阻害剤に対する細胞の感受性も動物種によって差が大きいため、その効果にも動物種差があるといわれている [Golino]。したがって、PAF の関与を調べる研究目的に阻害剤を用いる場合、研究の対象となる動物種および標的細胞に対する効果が特異的か否かを確認しておくことが必要である。

そこで PAF 阻害剤を用い、次の事柄を順次検討して、筆者の仮説の裏付けを試みた。

- 1) この実験で用いる PAF 阻害剤が、犬血小板の活性化を PAF 特異的に阻害するか
- 2) 犬血小板の PAF に対する反応を阻止するための、投与適量
- 3) この阻害剤の適量を前投与することによって、LPS 誘導血小板減少が抑制されるか

1 材料および方法

1) PAF 阻害剤

PAF と類縁の化学構造を持ち、リセプターブロッカーとして作用する PAF 阻害剤 TCV-309 [Terashita1992, Takatani]を用いた (Fig. 21; 武田薬品工業(株)からサンプル分与)。

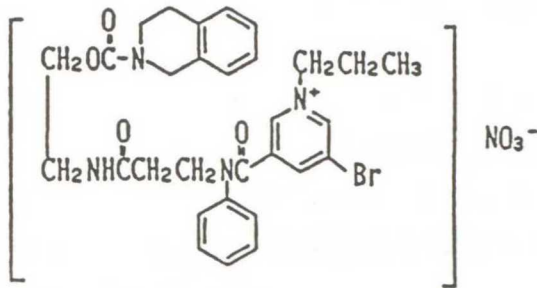


Fig. 21. Chemical structure of TCV-309

Chemical name: 3-Bromo-5-[N-phenyl-N-[2-[[2-(1,2,3,4-tetrahydro-2-isoquinolyl-carboxyloxy)ethyl]carbamoyl]ethyl]carbamoyl]-1-propylpyridinium nitrate.

Molecular formula: $C_{30}H_{34}BrN_5O_7$.

Molecular weight: 656.5.

2) 血小板 PAF 凝集に対する TCV-309 の特異的阻害効果

(1) in vitro で TCV-309 処理した血小板の場合

① 阻害効果の有無

1 頭のビーグル犬 (雌、1 歳、9 kg) から得た PRP に、異なる濃度の TCV-309 液 (0、3、30、および 300 μ M; 生理食塩水溶液) を 1/10 量予備添加 (最終濃度 0~30 μ M) した後、血小板の PAF 凝集試験を行った。PAF は本章第 1 節と同じ製品を用い、第 1 節と同様の操作で溶媒のクロロホルムを除去した後、BSA 0.25% 加生理食塩水に 4 μ g/ml 濃度で溶解した。これを 100 μ l ずつ小分けして -20°C で凍結保存し、凝集試験の直前に溶解して用いた。添加量は PRP 0.5 ml に対し、PAF 溶液 10 μ l (最終濃度 80 ng/ml) とした。

② 阻害効果の PAF 特異性

4 頭のビーグル犬 (雄 2、雌 2 頭、3~4 歳、体重 8~10 kg) から得た PRP に、前実験と同様の操作で最終濃度 30 μ M となるように TCV-309 を加え、血小板凝集試験

を行った。また、対照として生理食塩水を 1/10 量添加した PRP を用い、同時に各種凝集惹起物質による血小板凝集試験を行った。用いた凝集惹起物質の種類、それを選択した根拠および具体的使用方法などは次のとおりである。

a PAF : 調整法および添加量は上記①のとおり。

b Ca イオノフォア A23187 : ウサギ血小板を用いた研究から、PAF 刺激に対する細胞内刺激応答は主に Ca^{2+} チャンネル系を介しているといわれている [Mulphy, Yang]。A23187 はこの刺激応答系を特異的に活性化させる物質である。TCV-309 処理血小板がこの刺激で凝集すれば、細胞内の Ca^{2+} 依存性刺激応答能は保たれていることになる。それにもかかわらず血小板が PAF に反応しない場合は、TCV-309 によって PAF リセプターがブロックされていることを示す。

和光純薬(株)、生化学用試薬の A23187 を、エタノールに 5 mg/ml 濃度で溶解し、0.5 ml の PRP に 1 μ l (最終濃度 100 μ g/ml) 添加した。なお、1 μ l のエタノール添加は、血小板凝集にほとんど影響しないことを、あらかじめ確認しておいた。

c コラーゲン : 血小板の凝集反応全体をスクリーニングするために、ADP とともに一般的に用いられている。

第 1 章、第 2 節と同じ製剤 (クロノコラーゲン) を、最終濃度 20 μ g/ml 添加した。

d ADP : 第 1 章第 2 節と同じ製剤 (クロノ ADP) を、最終濃度 12 μ M 添加した。

e LPS : PAF とともにこの研究の主役的な物質で、LPS 血症では血小板が直接接触する物質であり、血小板刺激性も有することが知られている [Kawaguchi, Meyers1982]。

前述の LPS 製剤 (第 1 節、材料および方法参照) を 2 mg/ml 濃度になるように生理食塩水に溶解し、500 μ l の PRP (後述のクロノリウム試薬 50 μ l を含む) に 50 μ l (最終濃度約 200 μ g/ml) 添加した。

またこれらによる血小板の凝集試験に合わせて、血小板からの ATP 放出も調べた。

凝集試験を行う前にあらかじめ PRP 450 μ l に対してルシフェリン・ルシフェラーゼ試薬 (クロノリウム ; クロノログ社) を 50 μ l 添加しておいた。そして、凝集試験と同時に、血小板凝集計のルミネッセンス機能で ATP による蛍光発光パターンを観察して、ATP 放出レベルを半定量した。

(2) *in vivo* で TCV-309 処理した血小板の場合 (血小板凝集試験での検討)

① 阻害効果の有無

まず、何の処理も施していない 1 頭のビーグル犬 (雄、1 歳、体重 10 kg) から血小板凝集試験用に 1 回目の採血をした。次いで、その個体に TCV-309 を 3 μ g/kg 静注して、その 3~5 分後に 2 回目の採血をし、さらに 300 μ g/kg を追加静注して同様に 3 回目の採血をした。

以上をそれぞれ、未処理、TCV-309 3 μ g/kg、および 300 μ g/kg *in vivo* 処理血液とし、これらから PRP を作製して血小板の PAF 刺激に対する凝集 (PAF 凝集) 試験

を行った。

② 阻害効果の PAF 特異性

3 頭のビーグル犬 (雄 1 雌 2 頭、4~5 歳、体重 9~12 kg) に、TCV-309 を 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 静注した。その後 5 分以内に採血して PRP を作製し、(1) の *in vitro* 処理の場合と同様、PAF を含む 5 種類の惹起物質による血小板凝集試験を行って、TCV-309 *in vivo* 処理による血小板凝集阻害の PAF 特異性を調べた。

(3) TCV-309 の投与適量

24 頭の犬 (ビーグル 21 雑種 3 頭、雌 19 雄 5 頭、1~10 歳、体重 6~14 kg; No. 1~14) を 4 頭ずつ 6 群に分け、群ごとに異なる量 (1~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 6 段階) の TCV-309 を静注した。投与前、投与 5 分、同 1、4、8、24 時間後に採血して PRP を分離し、血小板の PAF 凝集反応を調べた。但し、投与量の少ない群では効果が早く消失するので、後半の採血を適宜省略した。そして TCV-309 の投与量と PAF 凝集阻害効果の強さおよびその持続時間との関係から、投与適量を求めた。

3) TCV-309 前投与による LPS 誘導血小板減少の抑制

前実験で得られた TCV-309 の適量 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注 (前投与; 3 mg/ml 液を 0.1 ml/kg) した直後 (3 分以内) のビーグル犬 5 頭 (雌 3 雄 2 頭、1~6 歳、体重 10~13 kg; No. 25~29) に、LPS 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注し、その前後の末梢血血小板数の変化を観察した。本章第 1 節の結果から、LPS 投与後 10 分以内に血小板数は最低値に達し、投与後 1 時間は血小板が再循環する回復過程にあったので、この実験での採血時期は LPS 投与前、投与 5 分後、および 1 時間後に設定した。

また対照として、生理食塩水 0.1 ml/kg を静注した直後の犬 6 頭 (ビーグル 4 雑種 2 頭、雄・雌各 3 頭、1~5 歳、体重 8~14 kg; No. 30~35) に対しても、上記の TCV-309 前投与群と同様に LPS を投与して、血小板数を算定した。

2 結果

1) 血小板 PAF 凝集に対する TCV-309 の阻害効果

(1) *in vitro* で TCV-309 処理した血小板の場合

① 阻害効果の有無

Fig. 22 に、異なる濃度の TCV-309 を PRP に予備添加 (*in vitro* 処理) した後の血小板 PAF 凝集パターンを示した。TCV-309 0.3 μM (最終濃度) で処理すると血小板の PAF 凝集は明らかに阻害されたが、PAF 刺激直後には球状化が起きていることから (凝集曲線 b)、ある程度は血小板活性化の生じていることがうかがえた。TCV-309 添加量の増加とともに血小板 PAF 凝集の抑制効果は強まり (凝集曲線 b~d)、最終濃度 30 μM を添加すると、PAF 添加直後の球状化もほとんど認められなくなった (凝集曲線 d)。

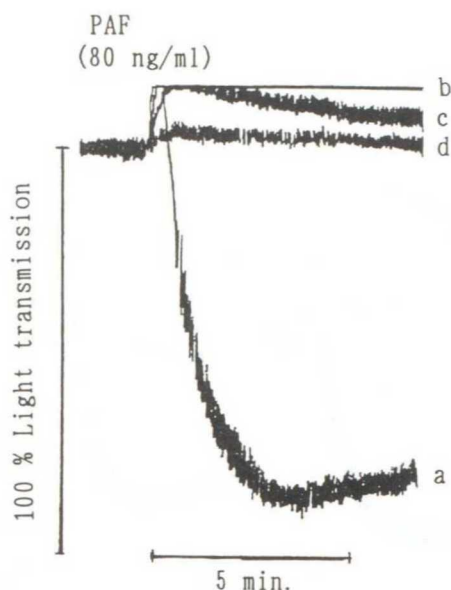


Fig. 22. Effect of TCV-309 in vitro treatment on PAF induced platelet aggregation.

The following doses of TCV-309 was added just before PAF stimulation:
 a, 0 (physiological saline); b, 0.3; c, 3; and d, 30 μM (final conc.).

② 阻害効果の PAF 特異性

Fig. 23 に、TCV-309 30 μM で in vitro 処理した PRP の、各種凝集惹起物質に対する血小板凝集と ATP 放出（蛍光発光）パターンを示した。LPS は生体内ならば致死量をはるかに越える高レベルの 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加したが、弱い血小板凝集に止まり、しかも ATP 放出は検出されなかった。TCV-309 で処理した PRP 中の血小板では、PAF 刺激による凝集および ATP 放出はいずれも阻害された。これに対して、PAF 以外の凝集惹起物質の刺激による凝集および放出反応では、いずれも TCV-309 処理の影響を認めなかった。この結果は 3 頭の犬に共通していた。

すなわち、Table 22 に示すとおり、TCV-309 による in vitro 処理は、犬血小板の PAF に対する凝集と ATP 放出の両反応を特異的に阻害した。

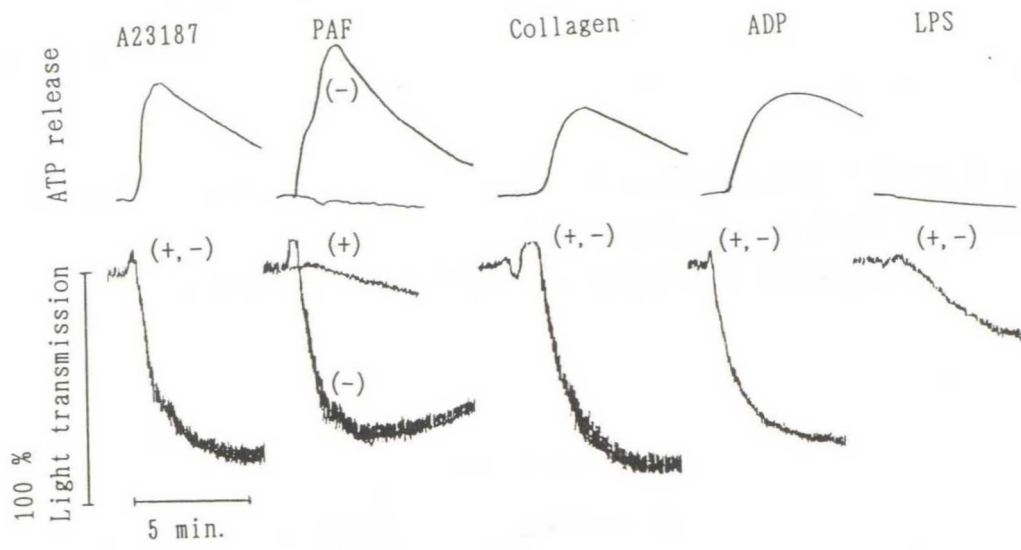


Fig. 23. Platelet aggregation and ATP release induced by several agonists with or without TCV-309 in vitro treatment.

(-), without TCV-309; (+), with TCV-309; and (+,-), with and without TCV-309.

TCV-309 30 μ M, the final concentration, was added to PRP just before aggregometry and ATP release test.

Table 22. Effect of TCV-309 in vitro treatment on platelet aggregation and ATP release in PRP

Agonist	Final concentration	without TCV-309		with TCV-309	
		Aggregation	ATP ¹⁾	Aggregation	ATP ¹⁾
A23187	(10 μ g/ml)	+	+	+	+
PAF	(80 ng/ml)	+	+	-	-
Collagen	(20 μ g/ml)	+	+	+	+
ADP	(12 μ M)	+	+	+	+
LPS	(200 μ g/ml)	±	-	±	-

¹⁾ ATP release.

(2) in vivo で TCV-309 処理した血小板の場合

① 阻害効果の有無

Fig. 24 に、未処理、TCV-309 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、および 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in vivo 処理血小板の PAF 凝集曲線を示した。

TCV-309 投与前（未処理）の犬の血小板は、PAF 刺激に対して強い凝集反応を示したが（凝集曲線 a）、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与によってそれは明らかに阻害され（凝集曲線 b）、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に投与量を増やすとその効果は更に増強された（凝集曲線 c）。

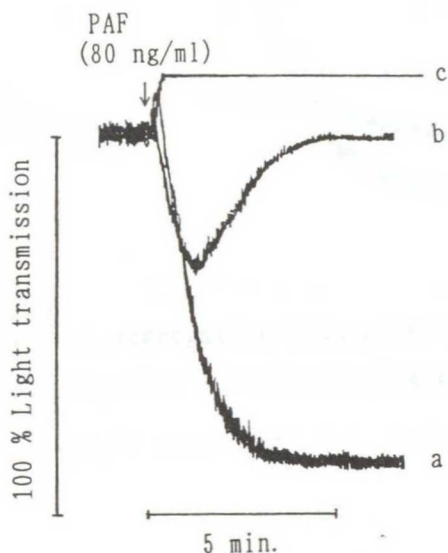


Fig. 24. Effect of TCV-309 in vivo treatment on PAF-induced platelet aggregation.

The following doses of TCV-309 was injected IV just before blood collection: a, 0; b, 3; c, 300 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$.

② 阻害効果の PAF 特異性

Fig. 25 に、TCV-309 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in vivo 処理血小板の各種凝集惹起物質に対する 1 例の凝集パターンを示した（ATP 放出試験は行わなかった）。Table 23 に要約して示したとおり、この処理による血小板凝集阻害効果も in vitro 処理の場合と同様、PAF に特異的であった。また、個々の成績は示さないが、この結果は 3 頭の犬に共通していた。

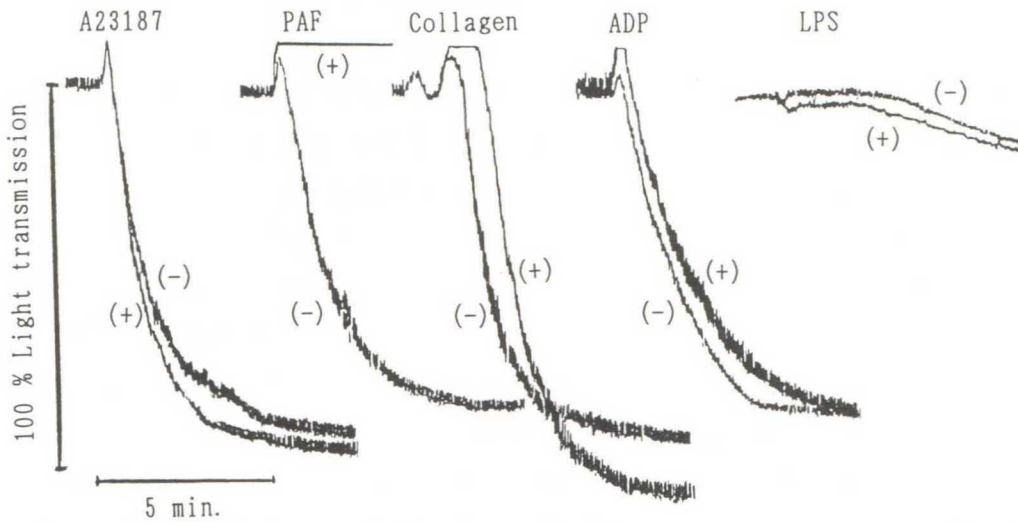


Fig. 25. Platelet aggregation induced by the agonists before and after TCV-309 administration (in vivo treatment).

TCV-309 300 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ injection: (-), before; (+), after.

Table 23. Effect of TCV-309 in vivo treatment on platelet aggregation in PRP

Agonist	TCV-309 in vivo treatment	
	Before	After
A23187	+	+
PAF	+	-
Collagen	+	+
ADP	+	+
LPS	±	±

Doses of the agonists were same in Table 22. TCV-309 300 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ was injected IV before blood collection.

(3) TCV-309 の投与適量

異なる量の TCV-309 (1~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与した犬の、投与前後の血小板 PAF 凝集 (最大凝集率) を Table 24 に示した。また TCV-309 による阻害効果を評価しやすくするため、Fig. 26 に Table 24 の成績を、投与前の成績との比に改めて示した。TCV-309 の効果は 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与から認められ、その量の投与 5 分後の血液から得た PRP 中の血小板は、4 頭すべてで PAF 凝集が弱かった。この効果の強さあるいは持続時間は TCV-309 の投与量に依存的であり、5 分後の最大凝集率は、TCV-309 を 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与した全個体で 0 % となった。100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与では、1 時間後にも効果が残存した。さらに 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、1 時間後も全個体で最大凝集率が 0 % と強い阻害効果が持続した。

Fig. 27 に TCV-309 を 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (図、左側) および 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 前投与 (図、右側) した 2 つの群のうち各 1 例の PAF 凝集パターンを示した。TCV-309 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも投与 5 分後には血小板 PAF 凝集の抑制が認められた (凝集曲線 b)。300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、TCV-309 投与 5 分後および 1 時間後のいずれにおいても、最大凝集率は 0 % 以下に抑制された (凝集曲線 d および e)。しかし凝集曲線の細部を見ると、TCV-309 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与 5 分後の PRP にはすでに明らかな球状化 (凝集曲線 d) が、また 1 時間後には、ベースラインは越えないが、凝集初期の可逆的曲線が観察された (凝集曲線 e)。すなわち、最大凝集率のみからは判断できないものの、凝集パターンを見ると、TCV-309 による効果は経時的に減弱していた。

検討した TCV-309 投与量の中では、最高の 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ が効果の強さおよびその持続時間の両面で最も優れた効果を示した。これ以上の増量も効果をより高めることが予想されたが、サンプルの量に限りがあることから、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与適量とした。

Table 24. PAF induced platelet aggregation in 24 dogs before and after TCV-309, different doses, injection

Maximum aggregation ratio in PRP (%)

Dose of TCV-309	Dog No.	Stage ¹⁾					
		Pre	5m	1h	4h	8h	24h
1 (μ g/kg)	1	90	85	98			
	2	80	50	70			
	3	92	100	87			
	4	84	100	98			
3	5	95	19	92			
	6	83	0	40			
	7	44	9	56			
	8	80	10	76			
10	9	91	15	91	95		
	10	94	1	93	100		
	11	90	0	88	86		
	12	77	12	83	82		
30	13	87	0	80	85		
	14	93	0	58	80		
	15	95	0	98	95		
	16	95	0	100	100		
100	17	90	0	19	93	100	
	18	91	0	0	99	90	
	19	62	0	4	88	100	
	20	91	0	13	100	73	
300	21	82	0	0	94	98	93
	22	100	0	0	97	92	80
	23	78	0	0	90	86	98
	24	90	0	0	100	100	75

¹⁾ After TCV-309 injection (in vivo treatment):

m, minutes; h, hours. (same in all the following tables and the figures in this paragraph)

Platelets in PRP were stimulated with PAF 80 ng/ml for final concentration.

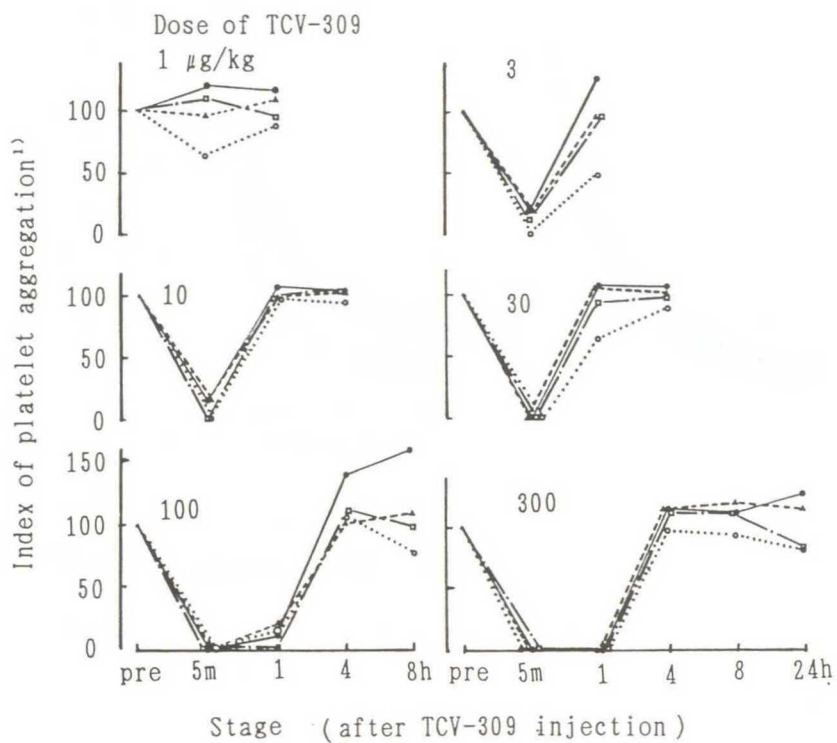


Fig. 26. Changes of PAF-induced platelet aggregation in 24 dogs injected IV with different doses of TCV-309.

The figure was drawn from Table 24.

¹) $\frac{\text{maximum aggregation ratio at each stage} \times 100}{\text{maximum aggregation ratio before TCV-309 injection}}$

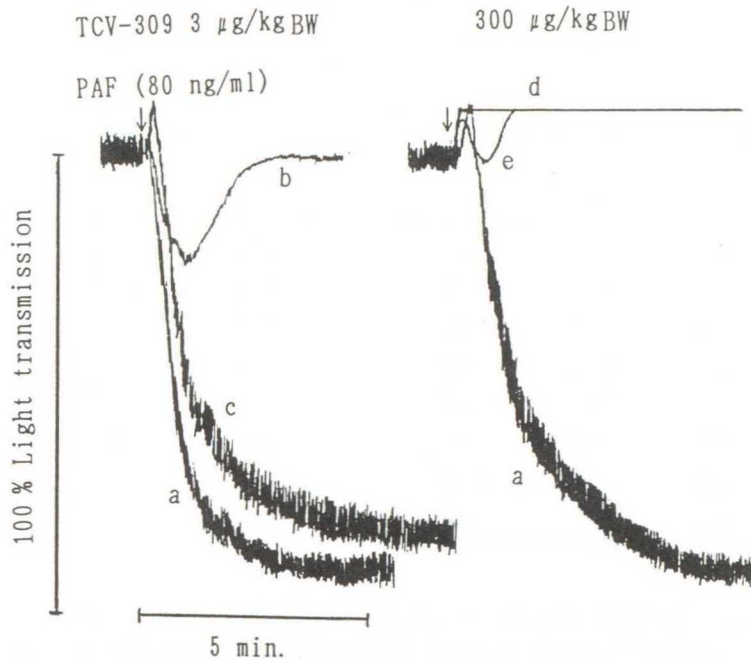


Fig. 27. Effect of previous TCV-309 injection on PAF-induced platelet aggregation.

a, pre injection; b and d, five minutes after TCV-309 injection;
c and e, one hour after injection.

2) LPS 誘導血小板減少の TCV-309 による抑制

TCV-309 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 前投与群および対照群に LPS 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を静注し、その前後の末梢血血小板数を Table 25 に示した。また、それぞれの成績を投与前値との比 (%) に直し、各群の処理後経過時間ごとに、その平均値と標準偏差を求めて Fig. 28 に示した。LPS 投与前と比べ、対照群では LPS 投与 5 分後に血小板数が平均して 16.0 % まで減少したが、TCV-309 前投与群では 2 頭 (No. 25 および 26) で血小板減少が著しく抑制され、4 頭の平均血小板減少率は 46.8 % であった。また、LPS 投与 1 時間後の血小板数も、対照群の平均 61.6 % に対し、TCV-309 前投与群では 87.0 % と回復が早かった。

Table 25. Changes of blood platelet counts before and after LPS injection in dogs with or without TCV-309 pretreatment

With TCV-309 pretreatment ¹⁾				Without TCV-309 pretreatment ²⁾			
Dog No.	Stage ³⁾			Dog No.	Stage ³⁾		
	pre	5 m	1 h		pre	5 m	1 h
25	299	246	272	30	350	30	123
26	426	242	315	31	216	30	239
27	200	110	238	32	316	40	172
28	360	48	288	33	274	56	100
29	219	59	201	34	296	77	225
Mean	301	141	262	35	395	63	275
SD	95	97	44	Mean	307	49	189
				SD	61	19	67

($\times 10^3/\mu\text{l}$)

¹⁾ TCV-309 300 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ was injected IV just before LPS 40 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ IV injection.

²⁾ Physiological saline was injected IV just before LPS injection.

³⁾ After LPS injection: m, minutes; h, hours.

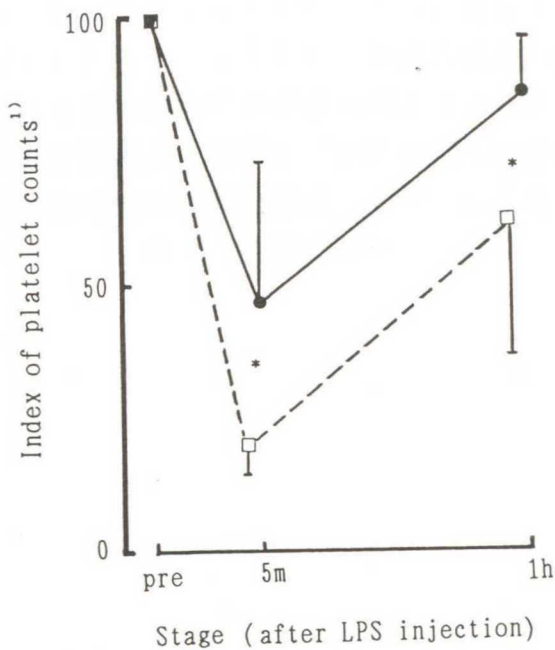


Fig. 28. Changes in platelet counts in LPS-injected dogs with or without TCV-309 pretreatment.

Mean \pm SD; drawn from Table 25.

●—●, with; and □—□, without TCV-309.

¹⁾ $\frac{\text{Platelet count in each stage} \times 100}{\text{Platelet count before LPS injection}}$

* $P < 0.05$ (by student's t-test between the groups)

3 考 察

LPS 毒性に対する PAF 阻害剤の効果を調べた報告は、ショック死の防止 [Terashita1987, 1992, Braquet]、血圧低下や循環動態の変化 [Doebber, Terashita1992]、あるいは実験的喘息発作における気管・気管支収縮の抑制 [Ishida, Popovich] などに関するものが多い。犬を対象にして PAF 阻害剤の効果を調べた報告も少なくない [Golino, Popovich, Shiba]。LPS 誘導血小板減少に関して柴ら [柴] は、PAF 阻害剤 CV-3988 の前投与が LPS 4 mg/kg 投与 30 分後の血小板減少を抑制したと述べている。しかしながら第 2 節の考察でも述べたとおり、この量の LPS を投与して 30 分後では、おそらく LPS の刺激から始った化学伝達が PAF を経てアラキドン酸代謝系など二次的反応にまでおよんでいる。またこの場合、犬は多臓器障害による致死的な状態に陥っており、循環不全 [Hinshow]、血液ガスや pH [Hardie1990, Sostman]、その他の血漿成分の著しい変化、凝固系の活性化 [中間] など、複雑な代謝反応を経た血小板反応を観察している可能性がある。今回は少量の LPS を投与し、その 5 分後から血小板数を観察しており、初期の成績は主に、体内で産生された PAF に対する血小板の直接的な反応を反映していると思われる。

今回、個体によって TCV-309 前投与が LPS 誘導血小板を十分に抑制しなかった (Table 25 参照) ことは、TCV-309 の効果不足によるものか、あるいは PAF 以外の血小板活性化刺激も同時に存在するためか、さらに検討する必要がある。

しかしながら、TCV-309 によって LPS 少量投与直後の血小板減少は有意に抑制され、しかもこの阻害剤による血小板活性化阻害効果が PAF に特異的なことも確認されたことから、LPS 誘導血小板減少における PAF の関与は重ねて裏付けられた。

今後、PAF と血小板代謝との関連性について、血小板の PAF レセプターや、血小板内刺激応答について詳しい検索が必要である。

第 4 節

LPS 投与後再循環した血小板の PAF 脱感作

本章第 1 節で、LPS 投与犬の血中 PAF 濃度の増加について述べた。血中 PAF 濃度は LPS 大量投与群の投与 1 時間後が最も高い値を示した。LPS 投与後の血小板減少が PAF のみによるものならば、測定した中で PAF 濃度の最も高い大量投与 1 時間後に、末梢血小板数は最も減少していると考えることが妥当である。しかし実際には、この時点で血小板数はすでに 50 % 以上まで回復しており（第 1 節 Table 2 参照）、少量投与群の 10 分値（第 2 節、Table 15 参照）よりも正常に近い値であった。すなわち抹消血血小板数は、単純に血中 PAF 濃度と相関しなかった。

LPS を投与すると、血小板は活性化して肺などに集積し、末梢血から一旦は消失する。しかしその活性化は可逆的で、血小板はやがて集積部から離れて（凝集から解離）再循環する [Gutman, Sostman]。第 2 節 LPS 大量投与群の投与 1 時間後のように、血中 PAF がまだ異常な高濃度を保っているにもかかわらず集積部から血小板が解離する理由の一つとして、Henson ら [Henson1976a, 1977] が述べている PAF 脱感作現象の存在が考えられる。PAF に脱感作した血小板は、PAF 刺激に対する感受性が特異的に低下する [Henson1976ab] といわれており、LPS 投与後再循環した血小板について PAF 脱感作現象を確認すれば、本論文の緒論に示した仮説を重ねて裏付けることができる。

そこで、LPS 投与後末梢血から一時消失しその後再循環した血小板を用いて凝集試験を行い、PAF 脱感作の確認を試みた。

1 材料および方法

1) PRP を用いた、再循環血小板の PAF 凝集

4 頭の犬（ビーグルおよび雑種各 2 頭、雌雄各 2 頭、2~10 歳、体重 8~13 kg; No. 1~4）に LPS を 40 μ g/kg 静注した。投与前および投与後 1 時間に採血し、PRP を分離して、血小板の PAF 凝集試験を行った。PRP への PAF 添加量は、第 3 節と同様、最終濃度 80 ng/ml とした。

2) GFP を用いた、再循環血小板の PAF 凝集

LPS 投与後、血小板が末梢血中に再循環してから採血して GFP を作製し、これを用いて凝集試験を行った。まず、2 頭のビーグル犬（いずれも雄、3 歳、体重 8 および 10 kg; No. 5~6）に、LPS を前実験と同様に投与した。投与後 40 分に採血して（血小板が脱感作状態から回復することを防ぐため、前実験より 20 分早めた）PRP を分離し、直ちに第 1 章第 2 節で示した方法で血小板をゲルろ過した。そしてこの GFP 浮遊液を用いて、血小板 PAF 凝集試験を行った。

2 結果

1) PRP を用いた、再循環血小板の PAF 凝集

Fig. 29 に、4 頭の犬の LPS 投与前および投与後の PRP を用いた血小板 PAF 凝集パターンを示した。このうち 3 頭 (No.1~3) では、LPS 投与 1 時間後も投与前と同等あるいはそれ以上の PAF 凝集を示した。これに対して No. 4 の犬の PRP には、投与 1 時間後にほとんど PAF 凝集を認めなかった。そこで、この PRP の血小板凝集能低下が PAF に特異的かどうかを調べるために、PAF 以外の 3 種類の凝集惹起物質 (A23187、コラーゲン、ADP ; 添加濃度は第 2 節と同じ) に対する凝集試験を行った。その結果、Fig. 30 に示したとおり、これらの 3 種類に対しては、LPS 投与前と同等の凝集が認められた。すなわち、LPS 投与後再循環した血小板が PAF に特異的に脱感作されている可能性がうかがえた。しかしながら脱感作の可能性を示唆する成績が得られたのは 4 例中この 1 例のみであった。

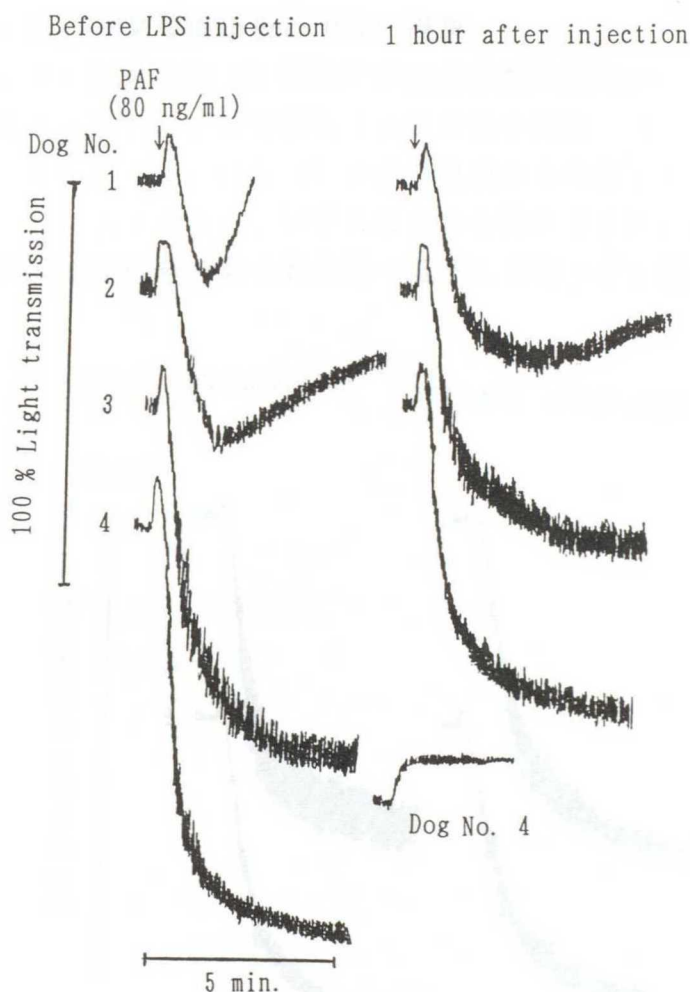


Fig. 29. PAF induced platelet aggregation in PRP before and after LPS injection in four dogs.

LPS 40 μ g/kgBW was injected IV.

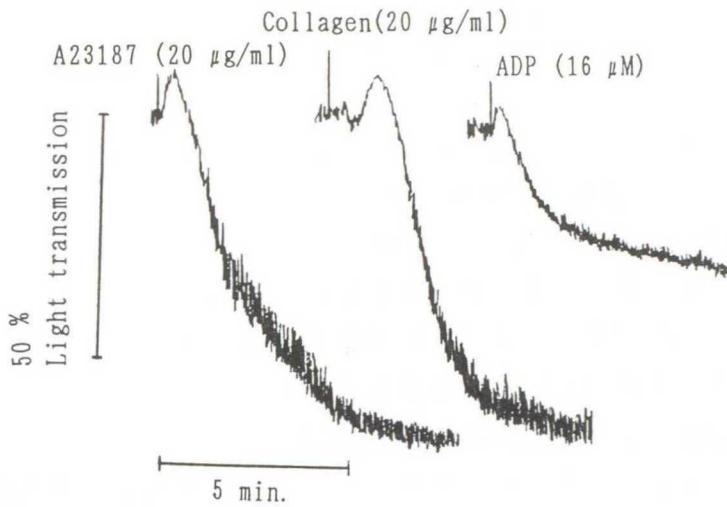


Fig. 30. Platelet aggregation induced by three agonists one hour after LPS injection in dog No. 4.

2) GFP を用いた、再循環血小板の PAF 凝集

2 頭の犬とも、LPS を投与 40 分後には血小板数が投与前の 50 % 以上まで回復しており（データは示さない）、凝集試験に必要な血小板数 ($\geq 20 \times 10^4 / \mu l$) は確保できた。そこで、LPS 投与前と投与 40 分後の血液から作製した GFP の PAF 凝集を実施した。Fig. 31 に示すとおり、いずれの犬から得た GFP においても、LPS 投与後の血小板 PAF 凝集は投与前のそれと比べ低下しておらず、脱感作は確認できなかった。

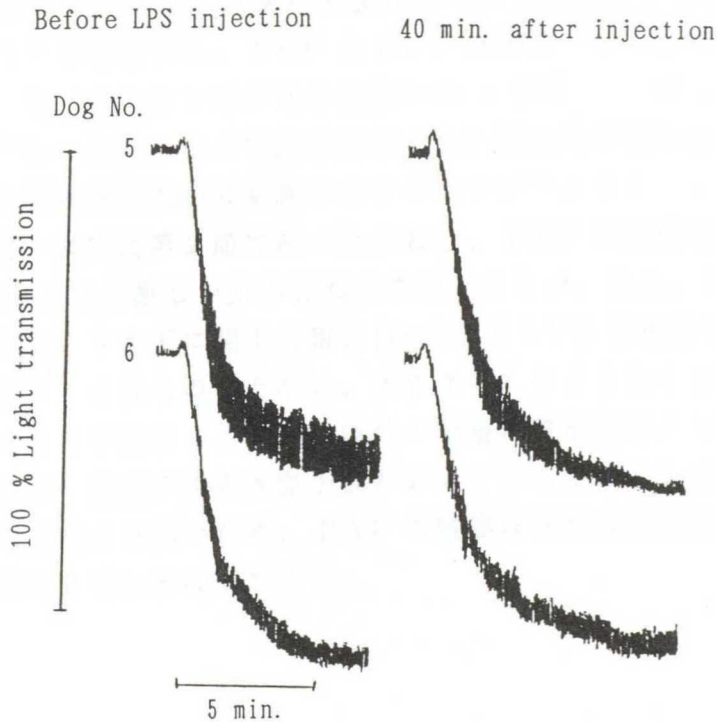


Fig. 31. PAF-induced GFP aggregation before and after LPS injection in two dogs.

3 考 察

PAF に反応性の細胞に対して *in vitro* で繰り返し PAF で刺激したり [Maridonneau-Parini]、 Ca^{2+} を含まない状態で PAF とともにインキュベートする [Henson1976a] と、その細胞は PAF に不応性となる。この変化は細胞が PAF に脱感作されるためといわれており、本節の緒論で述べたとおり、血小板に関しては Henson ら [Henson1977] が報告している。これは慢性 DIC などの際に見られる exhaust 状態の血小板 [Fong, Gaunt, Jacobsen, Pareti] とは異なり、PAF 刺激に対する細胞内の応答系が特異的に反応しなくなるらしい。Henson ら [Henson1976b] は細胞内の酵素、おそらく PAF 刺激に特異的に反応するセリンプロテアーゼの失活がこの PAF 脱感作の本態であろうと述べている。しかも、この酵素に対する特異的阻害剤はウサギ血小板の PAF 刺激に対する凝集と放出を阻害することから、これは PAF に対する血小板の刺激応答系の中でも必須の酵素と考えられている [Sugatani]。

in vivo でのウサギ血小板の PAF 脱感作も証明されている。すなわち、horse radish peroxidase を 2 回注射してアナフィラキシーショックを起こすと、血小板は一旦末梢血中から消失し、1 時間後には再循環する。その血小板は、PAF 刺激に特異的に放出反応の低下が認められるという [Henson1977]。筆者の仮説のように、LPS を投与した後の犬血小板の一過性減少も PAF 刺激に対する反応とすると、その後再循環した血小板が PAF に脱感作されている可能性は十分に考えられる。

第 1 章第 2 節で述べたとおり、血漿中には血小板の機能に影響を与える因子が数多く含まれている。ウサギに関する報告では、PAF に脱感作された血小板は、血漿から分離せずにおくと脱感作状態から回復するといわれている。そのために Henson らは、ウサギ血小板の *in vivo* での PAF 脱感作を証明するのに洗浄血小板を用いている [Henson1976]。そこで本実験でも、PRP と GFP 浮遊液の両方を用いて脱感作の証明を試みた。しかし、今回の条件では PRP を用いた 4 例中の 1 例にしか脱感作を示唆する成績は得られなかった。これまで血小板の PAF 脱感作が報告されているのは、PAF に対する血小板の感受性が最も高いウサギのアナフィラキシー状態についてのみである [Henson1977]。犬では第 2 節で述べたとおり、PAF 単独投与はウサギで報告されている [Yue, Mcmanus] ほど激しい血小板減少を起こさない。また、第 3 節で述べたとおり、PAF 阻害剤は、ウサギに関する報告 [Yue] ほど LPS 注射後の犬の血小板減少を強力には抑制しない。これらのことから、犬の LPS による血小板活性化には PAF が単独で作用しているのではなく、PAF 以外の刺激物質が同時に関与している可能性がある。つまり、LPS 血症の際の犬血小板が PAF から受ける刺激は、実験的アナフィラキシーウサギの場合より弱いため、PAF の脱感作状態は長続きせず、そのことが脱感作の確認を困難にしているのであろう。

総合考察

LPS は非常に多様な生体反応を招き、それらの反応の多くに PAF が関与するといわれている [Handley]。この論文で示した血液学的変化の他、胃腸 [Shiba]、心 [Watkins]、肺 [Christman]、腎 [Vemulapalli, Gomez] などの組織反応や、敗血症性ショック [Terashita1992] など、LPS ならびに PAF 関連と推定されている [Handley1990]。また PAF は、本来サイトカインなどととともに、グラム陰性菌感染症のみならず、色々な刺激に対する生体防御機構の化学的伝達を行っている [西平, Kasimir]。血液細胞に限ってみても、血小板の他、好中球 [Cromwell, Fradin, Jouvin-Marche]、好酸球 [Cromwell, Glembycz]、好塩基球 [Henson1976b, Mcmanus]、単球・マクロファージ [Camussi, Hayashi, Jouvin-Marche, Maridonneau-Parini, Pignol, Salen] の活性化あるいは走化因子作用、T-リンパ球の機能調節 [Dulioust] などに関与している。様々な刺激 [Gouvello, Tufano] に応じて多種類の細胞が産生・放出し [Cromwell, Fradin, Gouvello, Hernando]、しかもこれに反応する細胞の種類も上記の通り多様なことから、PAF は生命活動において非常に重要な物質と位置付けることができる [和久]。生体防御反応のみならず、妊娠においても、子宮内局所で PAF が産生され着床に重要な役割を果たし、その際、末梢血の血小板数減少も減少するといわれている。しかし通常、局所での PAF による直接的な刺激はそれほど深刻な血小板反応を招かず、生命が危険になるような全身的な PAF 関連の血小板過剰反応が想定されるのは、LPS 血症あるいはアナフィラキシーなど一部の疾病に限られる。

PAF が関与する疾病においても、PAF の多様な役割を考えると、臨床的にむやみにその作用を抑制するべきではない。グラム陰性菌の感染を確認し、その臨床症状から PAF 関連と思われる反応が過剰に現れていたり、あるいはそのような状態に陥る可能性の高い時に限り、PAF 制御という面から対処することが妥当である。理想的には、PAF の体内レベルと生体反応の強さとの相関関係を明らかにし、疾病動物の体内 PAF レベルに応じて対処することが望ましい。現状では PAF の体内レベルを測定することは技術的に容易ではない [里内] が、サンプルとしては、血液の他、糞便 [Bragger, Shanssade]、腹水、脳脊髄液 [Arditi]、気管支・肺胞洗浄液など多種類の生体材料が考えられ [中山]、簡易で正確な測定法の開発が望まれる。

本来細菌感染症では、看護、栄養補給、あるいは体液バランス調整などを通じて被感染動物の抵抗性を高めることが基本であり、これだけでは回復が期待できない場合に、原因療法として抗生剤の投与が行われる [Aronson]。さらに、生体反応が過剰でそれを放置すると病状を悪化する場合に限って、炎症など細胞反応の抑制を検討するべきである。この面での治療薬としてはこれまで、副腎皮質ホルモン剤、あるいはシクロオキシゲナーゼ阻害剤などの非ステロイド系消炎剤 [Gentry, Moore, Swange, Schleimer] が広く用いられてきた。PAF による血小板反応にはアラキドン酸代謝が二次的に関与する [Chao, Macconi] ことから、これらの薬品も、PAF による生体反応をある程度抑制する

といわれている [Camussi, Giembycz, Shanssade, Yamanaka]。しかし、PAF 阻害剤のように直接的に PAF の作用を抑制すれば、その効果の強さや即効性などの利点から、ショックや DIC にはより対処しやすくなるであろう [Braquet, Chignard, Terashita 1987, 1992, Yue]。

本研究では、グラム陰性菌感染犬の血小板活性化メカニズム解明という立場から、主に血小板の PAF に対する応答に焦点をあてた。PAF に対する応答細胞を血小板に限定しても、前述のとおりその活性化は DIC や血栓症のような血液凝固関連疾患に止まらず、他の組織への二次的な影響をおよぼし得る。例えば LPS 投与後血小板が一過性に集積する肺あるいは気管・気管支では、局所で血小板が過敏な組織反応に関与することが明らかにされている [Popovich, 矢ノ下]。血小板が肺から解離し、その後不可逆的に集積する肝などの臓器でも [Gutman, Sostman]、強い傷害を起こしている可能性が高い。したがって、血小板の過剰な活性化を制御することは、DIC などの血液凝固関連疾患のみならず、血小板活性化によって二次的に引き起こされるショック肺などの病的変化を防止する面からも意義がある。これまで獣医学領域においては、PAF を制御するという概念は定着していない [Brander]。

しかし医学領域では、PAF 産生を促す TNF や IL-6 などの体内物質 [Yoo]、あるいは逆に PAF によって産生の亢進される物質 [Salzer, Giembycz] も徐々に明らかにされ、また、PAF による血小板の細胞内応答 [Mulphy 1991, Slattery, Tahroui] や、その制御系 [Filep, Hampel] も解明されてきた。治療法についても、これらの多方面から LPS あるいは PAF の作用を制御することが研究されている [Bosson, Hanazawa, Handley, Hinshow, Shiba, Takekoshi]。したがって、今後グラム陰性菌感染症の治療に関して、PAF などの化学的活性物質制御法の進歩が予想される。

この領域の進歩には LPS に対する生体反応のメカニズム解明が不可欠である。その後、過剰な生体反応の制御法を確立することが順当である。PAF に関しては、動物種によりその感受性が大きく異なる [Golino, Meyers 1985] ことから、獣医臨床では対象動物ごとに PAF の関与を解明する必要がある。LPS による生体反応のメカニズムを解明しないまま、副腎皮質ホルモン剤や非ステロイド系消炎剤の効果に頼り続けるべきではない。

検討の結果、第 2 章で述べた 4 項目の検討のうち 3 項目 (① LPS 投与による体内での PAF 産生、② PAF 投与犬における、LPS 投与犬に類似した血小板減少症の発現、③ PAF 阻害剤による、LPS 誘導血小板減少の抑制) で、当初の仮説のとおり、LPS によって起こる血小板減少に PAF の関与することを支持する結果が得られた。したがってグラム陰性菌感染症の治療には、「PAF による血小板活性化をコントロールする」という概念が必要である。

なお今回の実験では、PAF を投与しても LPS 投与犬の場合ほど血小板減少が激しくなかったり (第 2 節)、あるいは PAF 阻害剤を予備投与しても、血小板減少の抑制は部分的な効果に止まった (第 3 節)。このことから、LPS による犬の血小板減少は PAF 単独ではなく、LPS に誘導されるなんらか他の因子が存在し、PAF と相乗的

に作用している可能性がある。PAFの他にどのような刺激が作用しているか、また、血小板の過剰活性化がどのような二次的反応を起こすか、さらには、どのように血小板の過剰活性化を制御するかなど、いずれも今後検討すべき課題である。

謝 辞

本研究は、麻布大学獣医学部内科学第二講座教授 小林好作 博士、ならびに同講座助教授 山田隆紹 博士 に終始ご指導をいただき、同講座に所属する大学院および学部学生諸氏の絶大な協力のもとに遂行した。

また、獣医学科の多くの先生方からご助言やご助力をいただき、さらに、生理学第一講座教授 松下博治 博士、病理学第一講座教授 野村靖夫博士、ならびに病理学第二講座助教授 藤瀬浩 博士には、懇切な論文校閲を賜った。

稿を終えるに当たり、諸先生ならびに学生諸氏に深い感謝の意を表わす。

引用文献

1. Arditi, M., Manogue, K. R., Caplan, M., Yagev, R. 1990. Cerebrospinal fluid cachectin/tumor necrosis factor- α and platelet activating factor concentrations and severity of bacterial meningitis in children. *J. Infect. Dis.* 162: 139-147.
2. Aronson, A. L. and Aucoin, D. P. 1989. Therapeutic considerations in medicine -Antimicrobial drugs- pp. 383-412. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine* 3rd. ed. (Ettinger, S. J. ed.) W. B. Saunders, Philadelphia.
3. Baudreaux, M. K., Dillon, A. R., and Spano, J. S. 1989. Enhanced platelet reactivity in heartworm-infected dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1544-1547.
4. Bessin, P., Bonnet, J., Appfel, D., Soulard, C., Desgroux, L., Pelas, I., and Benveniste, J. 1983. Acute circulatory collapse caused by platelet-activating factor (PAF-acether) in dogs. *Europ. J. Pharmacol.* 86: 403-413.
5. Billah, M. M., Chapman, R. W., Egan, R. W., Gilchrest, H., Piwinski, J. J., Sherwood, J., Siegel, M. I., West, R. E., and Kreutner, W. 1990. SCH 37370: A potent, orally active, dual antagonist of platelet activating factor and histamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252: 1090-1096.
6. Bosson, S., Kuenzig, M., and Schwartz, S. I. 1986. Increased survival with calcium antagonists in antibiotics-treated bacteremia. *Circulatory Shock* 19: 69-74.
7. Bragger, C. P., Nicholls, S., Murch, S. H., Stephens, S., and Macdonald, T. T. 1992. Tumor necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 339: 89-91.
8. Brander, G. C. Pugh, D. M., Bywater, R. J., Jenkins, W. L. eds. 1992. *Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics*, 5th ed., Bailliere Tindall, London.
9. Braquet, P., Paupert-Braquet, M., Bessin, P., and Vargaftig, B. B. 1987. Platelet-activating factor: A potential mediator of shock. *Adv. Prostagl. Thromb. Leukotr. Res.* 17: 822-827.
10. Bregengard, C., Nordfang, O., Wildgoose, P., Svendsen, O., Hedner, U., and Diness, U. 1993. The effect of two-domain tissue factor pathway inhibitor on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rabbits. *Blood Coag. and Fibr.* 4: 699-706.
11. Camussi, G., Tetta, C., Bussolino, F., and Baglioni, C. 1990. Antiinflammatory peptides (Antiflammins) inhibit synthesis of platelet-activating factor, neutrophil aggregation and chemotaxis, and intradermal inflammatory reactions. *J. Exper. Med.* 171: 913-927.
12. Cardinal, D. C. and Flower, R. J. 1980. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J. Pharmacol. Meth.* 3: 135-158.
13. Catalfamo, J. L. and Dodds, W. J. 1989. Isolation of platelets from laboratory animals. pp. 27-34. In: *Methods in Enzymology* Vol. 169; *Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion* Part A. (Hawiger, J. ed.)

14. Ceppi, E. D., Knowles, R. G., Carpenter, K. M., and Titheradge, M. A. 1992. Effect of treatment in vivo of rats with bacterial endotoxin on fructose 2,6-biphosphate metabolism and L-pyruvate kinase activity and flux in isolated liver cells. *Biochem. J.* 284: 761-766.
15. Chang, S., Fedderson, C. O., Henson, P. M., and Voelkel, M. F. 1987. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J. Clin. Invest.* 79: 1498-1509.
16. Chang, S. and Voelkel, N. F. 1990. The role of platelet-activating factor in endotoxic shock and lung injury. pp. 629-654. In: *Platelet-Activating Factor in Endotoxin and Immune Diseases* (Handley, D. A., Saunders, R. N., Houlihan, W. J. and Tomesch, J. C. eds.), MerceI Dikkel Inc., New York.
17. Chao, W., Olson, M. S. 1993. Platelet activating factor receptor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* 292: 6117-629.
18. Chignard, M., Keraly, C. L., Delautiey, D., Sebag, C., Bouloux, X., Motte, G., and Benveniste, J. 1989. Reduced sensitivity of human platelets to PAF-acether following ticropidine intake. *Haemostasis* 19: 213-218.
19. Christman, B. W. and Snapper, J. R. 1990. Role of PAF in endotoxin-induced lung dysfunction. pp.497-518. In: *Platelet-Activating Factor in Endotoxin and Immune Diseases* (Handley, D. A., Saunders, R. N., Houlihan, W. J. and Tomesch, J. C. eds.), MerceI Dekker Inc., New York.
20. Clemmons, R. M. Bliss, E. L., Dorsey-Lee, M. R., Seachord, C. L., and Meyers, K. M. 1983. Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food producing animals. *Thromb. Haemosttas.* 50: 838-843.
21. Clemmons, R. M., and Meyers, K. M. 1984. Acquisition and aggregation of canine blood platelets. Basic mechanisms of function and differences because of breed origin. *Am. J. Vet. Res.* 45: 137-144.
22. Cromwell, O., Wardlaw, A. J., Champion, A., Moqbel, R., Osei, D., and Kay, A. B. 1990. IgG-dependent generation of platelet-activating factor by normal and low density human eosinophils. *J. Immunol.* 145: 3862-3868.
23. Danhauser-Riedl, S., Felix, S. B., Honlihan, W. J., Zatterani, M., Steinhauser, G., Oberberg, D., Kalvelage, H., Busch, R., Rastetter, J., and Berde, W. E. 1991. Some antagonists of platelet activating factor are cytotoxic for human malignant cell lines. *Cancer Res.* 51: 43-48.
24. Doebber, T. W., Wu, M. S., Robbins, J. C., Choy, B. M., Chang, M. N., and Shen, T. Y. 1985. Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotention in rats. Studies with PAF-receptor antagonist kadsulenon. *Biochem. Biophys. Res. Commn.* 127: 799-808.
25. Dulioust, A., Duprez, V., Pitton, C., Salem, P., Hemar, A., Benreniste, J., and Thomas, Y. 1990. Immunoregulatory functions of paf-acether. III Down-regulation of CD-4⁺ T cells high-affinity IL-2 receptor expression. *J. Immunol.* 144: 3123-3129.

26. Eberhart, R. J., Natsuke, R. P., and Newbould, F. H. S.. 1979. Coliform mastitis: A review. *J. Dairy Sci.* 62: 1-22.
27. Eknoyan G., Wacksman, S. J., Glueck H. I. and Will, J. J. 1969. Platelet function in renal failure. *New Engl. J. Med.* 280: 677-681.
28. Erickson, P. R. and Herzberg, M. C. 1987. A collagen-like immunodeterminant on the surface of *Streptococcus Sanguis* induces platelet aggregation. *J. Immunol.* 138: 3360-3366.
29. Feingold, H. M., Pivacek, L. E., Melaragno, A. J., and Valeri, C. R. 1986. Coagulation assays and platelet aggregation patterns in human, baboon, and canine blood. *Am. J. Vet. Res.* 47: 2197-2199.
30. Fergason, J. B., Sass, P. M., Oronsky, A. L., and Kerwar, S. S. 1990. Platelet-activating factor or a platelet-activating factor antagonist decreases tumor necrosis factor- α in the plasma of mice treated with endotoxin. *J. Infect. Dis.* 162: 1081-1086.
31. Fessler, J. F. and Bottoms, G. D. 1988. Plasma endotoxin concentrations in experimental and clinical equine and canine subjects. *Vet. Surg.* 17: 32. (Scientific meeting abstract)
32. Fiedel, B. A., Simpson, R. M., and Gewurz, H. 1982. Activation of platelets by modified C-reactive protein. *Immunology* 45: 439-447.
33. Fiedel, B. 1985. Platelet agonist synergism by the acute phase reactant C-reactive protein. *Blood* 65: 264-269.
34. Filep, J. G., Herman, F., Kelemen, E., and Foldes-Filep, E. 1991. C-reactive protein inhibits binding of platelet-activating factor to human platelets. *Thromb. Res.* 61: 411-421.
35. Fong, J. S. C. and Kaplan, B. S. 1982. Impairment of platelet aggregation in hemolytic uremic syndrome: evidence for platelet "exhaustion." *Blood* 60: 564-570.
36. Forsythe, L. T., Jacson, M. L., and Meric, S. M. 1989. Whole blood platelet aggregation in uremic dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1754-1757.
37. Fradin, A., Zirrolli, J. A., Maclouf, J., Vausbinder, L., Henson, P. M., and Murphy, R. C. 1989. Platelet-activating factor and leukotriene biosynthesis in whole blood. A model for the study of transcellular arachidonate metabolism. *J. Immunol.* 143: 3680-3685.
38. Gaunt, S. D., Baker, D. C. and Babin, S. S. 1990. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia Platys* infection. *Am. J. Vet. Res.* 51: 290-293.
39. Gentry, P. A., Tremblay R. P. M., and Loss, M. L. 1989. Failure of aspirin to impair bovine platelet function. *Am. J. Vet. Res.* 50: 919-922.
40. Giembycz, M. A., Kroegel, C., and Barnes, P. J. 1990. Platelet activating factor stimulates cyclo-oxygenase activity in guinea pig eosinophils; concerted biosynthesis of thromboxan A₂ and E-series prostaglandins. *J. Immunol.* 144: 3489-3497.

41. Golino, P., Ambrosio, G., Ragni, M., Pascucci, I., Triggiani, M., Oriente, A., McNatt, J., Buja, L. M., Condorelli, M., Chiariello, M., and Willerson, J. T. 1993. Short-term and long-term role of platelet activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation* 88: 1205-1214.
42. Gomez, C., Paromo, J. A., Colucci, M., and Rocha, E. 1989. Effect of heparin and/or antithrombin III on the generation of endotoxin-induced plasminogen activator inhibitor. *Thromb. Haemost.* 62: 694-698.
43. Gouvello, S. L., Vivier, E., Debre, P., Thomas, Y., and Colard, O. 1992. CD2 triggering stimulates the formation of platelet-activating factor from alkyl-arachidonoyl-glycerophosphocholine in a human CD4⁺ T lymphocyte clone. *J. Immunol.* 149: 1289-1293.
44. Green, R. A. 1989. Hemostatic disorders: Coagulopathies and thrombotic disorders. pp. 2246-2264. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 3rd. ed. (Ettinger, S. J. ed.), B. W. Saunders, Philadelphia.
45. Gutmann, F. D., Murthy, V. S., Wojciechowski, M. T., Wurn, R. M., and Edzards, R. A. 1987. Transient pulmonary platelet sequestration during endotoxemia in dogs. *Circ. Shock.* 21: 185-195.
46. 函城 悦司. 1988. 壊疽性乳房炎とその対策. 獣医界 第130号: 20-26.
47. Hall, L. W. 1980. Shock. pp. 322-327. In: *Scientific Foundation of Veterinary Medicine* (Phillipson, A. T., Hall, L. W., and Pritchard, W. R. eds.), Heineman Medical Books, London.
48. Hampel, G., Watanabe, K., Weksler, B. B., and Jaffe, E. A. 1989. Selenium deficiency inhibits prostacyclin release and enhances production of platelet activating factor by human endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1006: 151-158.
49. Hanazawa, K., Aoki, H., Yoshioka, T., Matsuda, K., Tani, T., and Kodama, M. 1989. Novel mechanical assistance in the treatment of endotoxic and septicemic shock. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 35: 341-343.
50. Handley, D. A. 1990. Platelet activating factor as a mediator of endotoxin-related diseases. pp. 451-495. In: *Platelet-Activating Factor in Endotoxin and Immune Diseases* (Handley, D. A., Saunders, R. N., Houlihan, W. J., and Tomesch, J. C. eds.), Merck Dekkel Inc., New York.
51. Handley, D. A., Valen, R. G. V., Melden, M. K. and Saunders, R. N. 1984. Evaluation of dose and route effects of platelet activating factor-induced extravasation in the guinea pig. *Thromb. Haemostas.* 52: 34-36.
52. Hardie, E. M. 1990. Endotoxemia. pp. 494-497. In: *Infectious diseases of the dog and cat* (Greene, C. E. ed.), W. B. Saunders, Philadelphia.
53. Hardie, E.M., Rawlings, C. A. and Collins, L. G. 1985. Canine *Escherichia coli* peritonitis: Long-term survival with fluid, gentamicin sulfate, and flunixin meglumine treatment. *J. Am. Anim. Hosp. Assos.* 21: 691-699.

54. Hayashi, H., Kudo, I., Inoue, K., Onozaki, K., Tsushima, S., Nomura, H., and Nojima, S. 1985. Activation of guinea pig peritoneal macrophages by platelet activating factor (PAF) and its agonists. *J. Biochem.* 97: 1737-1745.
55. Henson, P. M. 1976a. Activation and desensitization of platelet by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. I Characteristics of the secretory response. *J. Exper. Med.* 143: 937-952.
56. Henson, P. M., and Oades, Z. G. 1976b. Activation of platelets by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. II The role of serine proteases, cyclic nucleotides, and contractile elements in PAF-induced secretion. *J. Exper. Med.* 143: 953-959.
57. Henson, P. M., and Pinckord, R. N. 1977. Basophil-derived platelet-activating factor (PAF) as an in vivo mediator of acute allergic reactions: Demonstration of specific desensitization of platelets to PAF during IgE-induced anaphylaxis in the rabbit. *J. Immunol.* 119: 2179-2184.
58. Herman, F., Magyer, K., and Filep, J. G. 1991. In vivo antiaggregatory action of platelet-activating factor in beagle dogs: role for prostacyclin. *Thromb. Haemostas.* 65: 296-299.
59. Hernando, P., Egido, J., Nicolas, R., and Gonzalez, E. 1991. IgA immune aggregates stimulate platelet-activating factor and superoxide anion production by human neutrophils. A comparison with IgG aggregates. *Lipids* 26: 1231-1235.
60. Hinshaw, L. B., Solomon, L. A., Freeny, P. C., and Reins, D. A. 1967. Endotoxin shock. - Hemodynamic and survival effects of methylprednisolone - *Arch. Surg.* 94: 61-66.
61. Hwang, S. B., Lan, M. M., and Shen, T. Y. 1985. Specific binding sites for platelet activating factor in human lung tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 972-979.
62. Imanishi, N., Komuro, Y., and Morooka, S. 1991. Effect of a selective PAF antagonist SM-10061 ((±)-cis-3,5-Cimethyl-2-(3-pyridyl) thiazolidin-4-one HCl) on experimental disseminated intravascular coagulation (DIC). *Lipids* 26: 1391-1395.
63. Imura, Y., Terashita, Z., and Nishikawa, K. 1986. Possible role of PAF in disseminated intravascular coagulation, evidence by use of PAF antagonist CV-3988. *Life Sci.* 39: 111-117.
64. Ingerman-Wojenski, C. M. and Silver, M. J. 1984. A quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood lumi-aggregometer. *Thromb. Haemostas.*, 51: 154-156.
65. Ishida, K., Thomson, R. J., Beattie, L. L. Wiggs, B., and Schellenberg, R. R. 1990. Inhibition of antigen-induced airway hyper responsiveness, but not acute hypoxia nor airway eosinophilia, by an antagonist of platelet-activating factor. *J. Immunol.* 144: 3907-3911.
66. Jacobsen, R. M., Murtaugh R. J., and Fertel, R. H. 1986. Platelet function in experimentally induced pancreatitis in the dog. *Thromb. Haemost.* 55: 197-200.
67. Jain, N. C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*, Lea & Febiger, Philadelphia.
68. Jouvin-Marche, E., Ninio, E., Beaurain, G., Tence, M., Niaudet, P., and Benveniste, J. 1984. Biosynthesis of PAF-acether (platelet-activating factor). VII Precursors of PAF and acetyltransferase activity in human leukocytes. *J. Immunol.* 133: 892-898.

69. 唐沢健, 野島庄七 1991. 抗PAF抗体調整とその応用. pp 516-523. In: 蛋白質核酸酵素 36. No. 3 (臨時増刊; 動物細胞におけるリン脂質代謝と病態), 共立出版, 東京.
70. Kasimir, S., Schonfeld, W., Alouf, J. E., and Konig, W. 1990. Effect of Staphylococcus Aureus delta-toxin on human granulocyte functions and platelet-activating-factor metabolism. *Infect. and Immun.* 58: 1653-1659.
71. Kawaguchi, Y. 1982. Ultrastructural study on the release reaction of the platelet -Release I. *Acta. Pathol. Jpn.* 32: 961-980.
72. Kojima, S., Sekiya, F., Inada, Y., Tsukada, T., and Saito Y. 1990. Cooperativity between platelet-activating factor and collagen in aggregation of bovine platelets, II. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 168: 1292-1296.
73. Kroll, M. H. and Schafer, A. I. 1989. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 74: 1181-1195.
74. 工藤 克典, 小岩 政照, 松尾 直樹, 南 保範, 星 明, 安藤 達哉, 川島 明夫. 1994. 急性乳房炎牛における血小板凝集能の変化とその治療方法. *家畜診療* 第 369 号: 7-13.
75. Lages, B., Scrutton, M. C., and Holmsen, H. 1975. Studies on gel-filtered human platelets: isolation and characterization in a medium containing no added Ca^{2+} , Mg^{2+} , or K^{+} . *J. Lab. Clin. Med.* 85: 811-823.
76. Lopez-Farre A., Bernabeu, F., Gomez-Garre, D., Cajal, S. R. Y., Braquet, P., and Lopez-Novoa, J. M. 1989. Platelet-activating factor antagonists treatment protects against postischemic acute renal failure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 328-333.
77. Macconi, D., Morzenti, G., Livio, M., Morelli, C., Cassina, G., and Remuzzi, G. 1985. Acetyl glycerylphosphorylcholine aggregates human platelets through two distinct pathways, both dependent on arachidonic acid metabolism. *Lab. Invest.* 52: 159-168.
78. Luzzatto, G. and Cella, G. 1992. Platelet-specific proteins in myeloproliferative disorders. *Acta Haematol.* 87: 216.
79. Maridonneau-Parini, I., Lagente, V., Lefort, J., Randon, J., Russo-Marie, F., and Vargaftig, B. B. 1985. Desensitization to PAF-induced bronchoconstriction and to activation of alveolar macrophages by repeated inhalations of PAF in the guinea pig. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 42-49.
80. 松田 保. 1991. D I C pp.220-222. In: 血小板 (山中学、山崎博男 編), 医学書院, 東京.
81. Mcmanus, L., Hanahan, D. J., Demopoulos, C. A., and Neal, P. 1980. Pathobiology of the intravenous infusion of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine, a synthetic platelet-activating factor (PAF), in the rabbit. *J. Immunol.* 124: 2919-2924.
82. McManus, L. M., Morley, C. A., Levine, S. P., and Pinckard, R. N. 1979. Platelet activating factor (PAF) induced release of platelet factor 4 (PF 4) in vitro and IgE anaphylaxis in the rabbit. *J. Immunol.* 123: 2835-2841.
83. Melby, J. C., Egdahl, R. H., and Spink, W. W. 1960. Secretion and metabolism of cortisol after injection of endotoxin. *J. Lab. & Clin. Med.* 56: 50-62.

84. Meyers, K. M. 1985. Pathobiology of animal platelets. pp. 131-165. In: *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* Vol. 30.
85. Meyers, K. M., Baehme, M., Inbar, O. 1982. Binding of ^{125}I labeled endotoxin to bovine, canine, and equine platelets and endotoxin-induced agglutination of canine platelets. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1721-1728.
86. Miyazawa, K., Kiyono, S., and Inoue, K. 1988. Modulation of stimulus-dependent human platelet activation by C-reactive protein modified with active oxygen species. *J. Immunol.* 141: 570-574.
87. Moore, J. N., Hardee, M. M. and Hardee, G. E. 1987. Modulation of arachidonic acid metabolism in endotoxic horses: Comparison of flunixin meglumine, phenilbutazone and a selective thromboxan synthetase inhibitor. *Am. J. Vet. Res.* 47: 110-113.
88. Mulphy, R. C. and Fitzpatrick F. A. eds. 1990. *Methods in Enzymology*, Vol. 187; Arachidonate Related Lipid Mediators, Academic Press, San Diego.
89. Mulphy, Y., Elmore, M., Kellie, S., and Westwick, J. 1991. The relationship between cytosolic Ca^{2+} , Sn-1, 2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-triphosphate elevation in platelet-activating factor-stimulated rabbit platelets. *Biochem. J.* 278: 255-261.
90. 村松敏夫. 1989. PAFの化学・分析方法 - 天然物からの半合成 pp.9-20. In: 現代化学・増刊 17; 血小板活性化因子 (和久敬蔵, 井上圭三編), 東京化学同人, 東京.
91. Mustard, F. J., Kinlough-Rathbone, R. L. and Packham, M. A. 1989. Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing. pp. 3-11. In: *Methods in Enzymology* Vol. 169. Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion. Part A (Hawiger, J. ed.), Academic Press, San Diego.
92. 中島茂 1990. PAFの測定法 pp. 449-455. In: 最新医学 45 (特; 血小板活性化因子).
93. 中間實徳, 田中幹郎, 春日敏郎, 小松孝義. 1984. エンドトキシン投与による犬の播種性血管内凝固症候群 (DIC) モデルの作製. *日獣会誌*, 37: 715-719.
94. 中山玲子, 斎藤国彦. 1989. PAFの化学・分析方法 - 検出・定量・分子種分析 pp.25-40. In: 現代化学・増刊 17; 血小板活性化因子 (和久敬蔵, 井上圭三編), 東京化学同人, 東京.
95. 西平順, 石橋輝雄. 1989. PAFの細胞生物学 - 受容体の検出・その性質 pp.87-88. In: 現代化学・増刊 17; 血小板活性化因子 (和久敬蔵, 井上圭三編), 東京化学同人, 東京.
96. Nolte, I., Niemann, C., Bowry, S. K., Becker, K., and Muller-Berghaus, G. 1988. Methode zur Isolierung von Thrombozyten aus Vollblut des Hundes mit einem Dichtegradienten (Ficoll-Metrizoat). *J. Vet. Med. A.* 35:, 683-690. (in Germany)
97. 小田真, 里内清, 斎藤國彦. 1991. PAFと疾患. pp. 363-370. In: 蛋白質核酸酵素 36. No. 3 (臨時増刊; 動物細胞におけるリン脂質代謝と病態), 共立出版, 東京.
98. Oda, M., Satouchi, K., Yasunaga, K., and Saito, K. 1985. Molecular species of platelet-activating factor generated by human neutrophils challenged with ionophore A23187. *J. Immunol.* 134: 1090-1093.

99. 大野雅二, 小林進. 1989. 受容体モデル - 受容体の認識する構造, pp.89-93. In: 現代化学・増刊 17; 血小板活性化因子 (和久敬蔵, 井上圭三編), 東京化学同人, 東京.
100. Otsuka, A., Masugi, F., Ogihara, T., Saeki, S., Nagano, M., Koyama, Y., Tabuchi, Y., and Kumahara, Y. 1985. Hypotensive mechanism of acetyl glyceryl ether phosphocholine (AGEPC) in dogs. Effects on hemodynamics and humoral factors. *Prostaglandins and Leukotriens and Medicine* 19: 25-35.
101. Paloma, M. J., Paramo, J. A., and Rocha, E. 1992. Effect of DDAVP on endotoxin-induced intravascular coagulation in rabbits. *Thromb. Haemost.* 68: 306-309.
102. Pareti, F. I., Capilanio, A., and Mannucci, P. M. 1976. Acquired storage pool disease in platelets during disseminated intravascular coagulation. *Blood* 46: 511-515.
103. Peng, J., Friese, P., George, J. N., Dale, G. L., and Burstein, S. A. 1994. Alteration of platelet function in dogs mediated by interleukin-6. *Blood* 83: 398-403.
104. Pignol, B., Henane, S., Sorlin, B., Rola-Plemszczynski, M., Mencia-Huerta, J., and Braquet, P. 1990. Effect of long-term treatment with platelet-activating factor on IL-1 and IL-2 production by rat spleen cells. *J. Immunol.* 145: 980-984.
105. Pinckerd, R. N., Halonen, M., Palmer, J. D., Butler, C., Shaw, J. O., and Henson, P. M. 1977. Intravascular aggregation and pulmonary sequestration of platelets during IgE-induced systemic anaphylaxis in the rabbit: Abrogation of lethal anaphylactic shock by platelet depletion. *J. Immunol.* 119: 2185-2193.
106. Popovich, K. J., Sheldon, G., Mack, M., Munoz, N. M., Denberg, P., Blake, J., White, S. R. and Leff, A. R. 1988. Role of platelets in contraction of canine tracheal muscle elicited by PAF in vitro. *J. Appl. Physiol.* 65: 914-920.
107. Rabinovic, R., Yue, T., Farhat, M., Smith, E. F., Esser, K. M., Slivjak, M., and Feuerstein, G. 1990. Platelet activating factor (PAF) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) interactions in endotoxemic shock: studies with BN 50739, a novel PAF antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 256-263.
108. Rezaul, K., Yanagi, S., Sada, K., Taniguchi, T., and Yamamura, H. 1994. Protein-tyrosine kinase p72^{src} is activated by platelet activating factor in platelets. *Thromb. Haemostas.* 72: 937-941.
109. Rylander, R., and Beijer, L. 1987. Inhalation of endotoxin stimulates alveolar macrophage production of platelet-activating factor. *Am. Rev. Resp. Dis.* 135: 83-86.
110. Salen, P., Deryckx, S., Dulioust, A., Vivier, E., Denizot, Y., Damais, C., Dinarello, C. A., and Thomas, Y. 1990. Immunoregulatory functions of paf-acether. IV. Enhancement of IL-1 production by muramyl dipeptide-stimulated monocytes. *J. Immunol.* 144: 1338-1344.
111. Salzer, W. L., and McCall, C. E. 1990. Primed stimulation of isolated perfused rabbit lung by endotoxin and platelet activating factor induces enhanced production of thromboxan and lung injury. *J. Clin. Invest.* 85: 1135-1143.

112. Satomi, N., Sakurai, A., Imura, F., Haranaka, R., and Haranaka, K. 1990. Preventive effect of several drugs against *Pseudomonas aeruginosa* infection and the toxicity of combined tumor necrosis factor with lipopolysaccharide: Relationship between lethality and the arachidonic cascade. *Biotherapy* 2: 227-234.
113. 里内清、小田真、斎藤国彦. 1987. 血小板活性化因子の測定法, *臨床免疫* 19 [suppl.12]: 233-240.
114. Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., and Dinarello, C. A. 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75: 40-47.
115. Schleimer, R. P., Davidson, D. A., Lichtenstein, L. M., and Adkinson, N. F. 1986. Selective inhibition of arachidonic acid metabolite release from human lung tissue by antiinflammatory steroids. *J. Immunol.* 136: 3006-3011.
116. Shanssade, S., Denizot, Y., Colobel, J. F., Benvensite, J., and Conterier, D. 1992. Paf-aceter in stool as intestinal inflammation. *Lancet* 339: 739.
117. Sharp, D. S., Beswick, A. D., O'Brien J. R., Renaud, S., Yarnell, J. W. G., and Elwood, P. C. 1990. The association of platelet and red cell count with platelet impedance changes in whole blood and light-scattering changes in platelet rich plasma: Evidence from the caerphilly collaborative heart disease study. *Thromb. Haemost.* 64: 211-215.
118. Shiba, T., Ikeda, M., Hara, A., Yoshida, H., Kanenko, H., and Takeuchi, S. 1990. Mechanism of acute gastrointestinal mucosal damage in endotoxic shock and the effect of fragmin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 16 (Suppl): 55-59.
119. 柴忠明、池田正視、吉田宏重、原彰夫、高木純人、堀順一、守山秀樹、竹内節夫. 1990. PAFとエンドトキシンショック -急性消化管粘膜病変・DICを含めて-. pp. 552-557. In: PAFと疾患;最新医学(特) 45, 最新医学社, 東京.
120. Slattery, C. W. and Beaumont D. O. 1989. Sheep platelets as a model for human platelets: Evidence for specific PAF (platelet activating factor) receptors. *Thromb. Res.* 55: 569-576.
121. Sostman, H. D., Zoghbi, S. S., Smith, G. J. W., Carbo, P., Neumann, R. D., Gottschalk, A., and Greenspan, R. H. 1983. Platelet kinetics and biodistribution in canine endotoxemia. *Invest. Radiol.* 18: 425-435.
122. Stenzel, J. C., and Heuer, H. O. 1990. Use of WEB 2086 and WEB 2170, as platelet activating factor antagonists. pp. 455-465. In: *Methods in Enzymology* 187. (Murphy, R.C., and Fitzpatrick, F.A. eds.), Academic Press, San Diego.
123. Sugatani, J., Miwa, M., and Hanahan, J. 1987. Platelet-activating factor stimulation of rabbit platelets is blocked by serine protease inhibitor (Chymotryptic protease inhibitor). *J. Biol.Chem.* 262: 5740-5747.
124. Sun, X., Hsueh, W., Torre-Amione, G. 1990. Effects of in vivo 'priming' on endotoxin-induced hypotension and tissue injury - The role of PAF and tumor necrosis factor. - *Am. J. Pathol.* 136: 949-956.

125. Swange, L. J., Bankemper, K. W., and Kong, L. I. 1989. Bacterial, rickettsial, protozoal and miscellaneous infections. pp. 265-297. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine (Ettinger, J. E. ed.), W. B. Saunders, Philadelphia.
126. Sybertz, E. J., Watkins, R. W., Baum, T., Pula, K., and Rivelli, M. 1984. Cardiac, coronary and peripheral vascular effects of acetyl glyceryl ether phospholylcholine in the anathetized dog. *J. Phamacol. Exp. Ther.* 232: 156-162.
127. Tahraoui, L., Floch, A., and Cavero, I. 1989. Functional validation of platelet-activating factor receptor sites characterized biochemically by a specific and reproducible [³H]platelet-activating factor binding in human platelets. *J. Phamacol. Exp. Ther.* 252: 1221-1227.
128. Takatani, M., Maezaki, N., Imura, Y., Terashita, Z., Nishikawa, K., and Tsushima, S. 1990. Platelet activating factor (PAF) antagonists: Development of a highly potent PAF antagonist, TCV-309. *Adv. Prost. Thromboxa. Leukotri. Res.* 21: 943-946.
129. Takekoshi, K., Kasai, K., Suzuki, Y., Sekiguchi, Y., Banda, N., Nakamura, T., and Shimoda, S. 1993. Effect of N⁶-nitro-L-arginine on shock induced by endotoxin and by platelet activating factor in dogs. *Europ. J. Pharmacl.* 250: 465-467.
130. 寺沢道夫. 1991. PAFアンタゴニスト. pp379-387. In: 蛋白質核酸酵素 36 No.3 (臨時増刊; 動物細胞におけるリン脂質代謝と病態), 共立出版, 東京.
131. Terashita, Z., Imura, Y., Shino, A., and Nishikawa, K. 1987. A lethal role of platelet activating factor in anaphylactic shock in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 378-383.
132. Terashita, Z., Imura, Y., Takanashi, M., Tsushima, S., and Nishikawa, K. 1987. CV-6209, a highly potent antagonist of platelet-activating factor in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242: 263-268.
133. Terashita, Z., Kawamura, M., Takatani, M., Tsushima, S., Imura, Y., and Nishikawa, K. 1992. Beneficial effects of TCV-309, a novel potent and selective platelet activating factor antagonist in endotoxin and anaphylactic shock in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 748-755.
134. Timmons, S. and Hawiger, J. 1989. Isolation of human platelets by albumin gradient and gel filtration. pp. 11-21. In: Methods in Enzymology Vol. 169. Platelets: Receptors, Adhesion, Secretion. Part A (Hawiger, J. ed.), Academic Press, San Diego.
135. 徳村彰、塚谷博昭. 1989. PAFの代謝 - 移行・分泌 pp.74-80. In: 現代化学・増刊 17; 血小板活性化因子 (和久敬蔵, 井上圭三編), 東京化学同人, 東京.
136. 友田勇. 1992. 臨床血液化学検査Ⅲ - 血漿蛋白 -, 学窓社, 東京.
137. Tufano, M. A., Tetta, C., Biancone, L., Iorio, E. L., Baroni, A., Giovane, A., and Camussi, G. 1992. Salmonella typhimurium porins stimulate platelet-activating factor synthesis by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 149: 1023-1030.
138. Vemulapalli, S., Chiu, P. J. S., and Barnett, A. 1984. Cardiovascular and renal action of platelet-activating factor in anesthetized dogs. *Hypertension* 6: 489-493.
139. 和久敬蔵, 井上圭三編. 1989. 血小板活性化因子; 現代化学・増刊 17, 東京化学同人, 東京.

140. Walsh, P. N. 1972. Albumin density gradient separation and washing of platelets and study of platelet coagulant activities. *British J. Haematol.* 22: 205-216.
141. Warren, J. S., Barton, P. A., Mandel, D. M., and Matrosic, K. 1990. Intrapulmonary tumor necrosis factor triggers local platelet-activating factor production in rat immune complex alveolitis. *Labr. Invest.* 63: 746-754.
142. 巨 敏広、武田浩一、後飯塚 僚、長谷川 篤彦. 1993. 犬糸状虫感染犬における血小板凝集能. *日獣会誌* 46: 42-45.
143. Waterman, A. E. 体液と電解質バランスの異常 pp. 341-369. In: *Canine Medicine and Therapeutics* 2nd ed. (Chandler E. A. Sutton, J. B., and Thompson, D. J. eds.; 小林好作, 大島慧 監訳), 興仁社, 東京.
144. Watkins, R. W., Braun, T., Pula, K., Sybertz, E. J., and Rivelli, M. 1985. Cardiac, coronary, and peripheral vascular effects of AGEPC in the anesthetized dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 156-162.
145. Wautier, J. L. Souchon, H. Solal, L. C. Peltier, A. P. and Cean, J. P. 1976. C₁ and human platelets III. Role of C₁ subcomponents in platelet aggregation induced by aggregated IgG. *Immunology* 31: 595-599.
146. Wessels, B. C., Gaffin, S. L., and Wells, M. T. 1989. Circulating plasma endotoxin (lipopolysaccharide) concentrations in healthy and hemorrhagic enteric dogs: Antiendotoxin immunotherapy in hemorrhagic enteric endotoxemia. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 23: 291-295.
147. Wessels, B. C. and Wells, M. T. 1989. Antiendotoxin immunotherapy for canine pyometra endotoxemia. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 25: 455-460
148. White G. L., White, G. S., Kosanke, S. D., Archer, L. T. and Hinshaw, L. B. 1982. Therapeutic effects of prednisolone sodium succinate vs dexamethasone in dogs subjected to *E. coli* septic shock. *JAVMA.* 18: 639-648.
149. 山中学 1979. 血小板 -基礎と臨床-, 科学評論社, 東京.
150. Yamanaka, S., Miura, K., Yukimura, T., Okumura, M., and Yamamoto, K. 1992. Putative mechanism of hypotensive action of platelet-activating factor in dogs. *Circul. Res.* 70: 893-901.
151. Yamashita, K., Fujinaga, T., Hagio, M. Miyamoto, T., Izumisawa, Y, and Kotani, T. 1994. Bioassay for interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-like activities in canine sera. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 103-107.
152. 山崎博男 1985. 血小板に関する検査. *Medical Technology* 13: 653-672.
153. Yang, J., and Tashjian, A. H. 1991. Platelet-activating factor affects cytosolic free calcium concentration and prolactin secretion in GH₄C₁ rat pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commn.* 174: 424-431.
154. 矢ノ下良平 1990. アラキドン酸カスケードとPAF, pp. 208-212. in: *日本臨床* 48 特; アラキドン酸カスケード関連物質.

155. Yoo, J., Schlondorff, D. and Neugarten, J., 1990. Thromboxan mediates the renal hemodynamic effects of platelet activating factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 743-748.
156. Yue, T., Farhat, M., Rabinovici, R., Perura, P. Y., Vogel, S. N., and Feuerstein, G. 1990. Protective effect of BN 50739, a new platelet-activating factor antagonist, in endotoxin-treated rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254: 976-981.
157. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Mehra, M., and Prescott, S. M. 1990. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: A novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell. Biol.* 110: 529-540.

THE ROLE OF PLATELET-ACTIVATING FACTOR (PAF) IN ENDOTOXIN (LPS)-INDUCED THROMBOCYTOPENIA IN DOGS.

Ryo Tsuchiya.

School of Veterinary Medicine, Azabu University.

ABSTRACT.

Animals with gram-negative bacterial infection often fall into some fatal conditions, including shock. It is well known that endotoxin (LPS) is mainly responsible for these conditions; however, its pathophysiological mechanism is unclear.

Platelet activation is one of the important vital reactions against LPS. Endotoxemic animals frequently develop disseminated intravascular coagulation (DIC) or shock lung due to excessive platelet activation. Therefore, appropriate control of platelet activation is very important in the treatment of severe gram-negative bacterial infection. The mechanism of LPS-induced platelet activation must be determined to establish a method for platelet control.

It is presumed that a number of chemical mediators are involved in LPS-induced vital reactions, including platelet activation. Recently, platelet-activating factor (PAF), a phosphocholine, has been recognized as an important mediator of LPS-induced vital reactions. PAF is a potent stimulator for many kinds of cells, including platelets.

Small animal clinicians often encounter thrombocytopenic patient dogs with gram-negative bacterial infection. LPS stimulates canine platelets *in vitro*; however, the reaction is weak. Possibly, another platelet stimuli must be produced in endotoxemic dogs. Therefore, the author hypothesized that PAF plays an important role in LPS-induced excessive platelet activation in dogs with gram-negative bacterial infection. Since intravascular platelet aggregation induced by some stimuli results in remarkably consumptive thrombocytopenia, the platelet count in peripheral blood may be a useful indicator of intravascular platelet activation.

Therefore, to verify the hypothesis, the author performed the following experiments and studied the role of PAF in LPS-induced thrombocytopenia in dogs.

I. Sample preparation for platelet aggregometry.

Platelet aggregometry is the most basic screening test of platelet reaction. Intact platelets must be isolated from blood for successful platelet aggregometry.

Therefore, sample preparation methods for platelet aggregometry were studied.

1) The optimum centrifugal condition to obtain platelet rich plasma (PRP).

The most common sample used in aggregometry is PRP obtained by centrifugation of whole blood. Since size and density of platelets are different among animal species, appropriate centrifugal conditions are needed for each animal species. Therefore, canine whole blood anticoagulated with 3.8 % sodium citrate solution was centrifuged at different spinning speeds and times.

The best recovery of platelets was obtained at 3,500 rpm centrifugation for 1 minute. Platelets in PRP, separated by this centrifugal condition, aggregated well to adenosine diphosphate (ADP) and collagen stimulation.

2) Platelet isolation from plasma.

It is known that platelets interact with several plasma components. Thus, to study the effects of some substances, e.g. PAF, on platelet reaction, platelets need to be isolated from plasma to avoid the effects of plasma components. Therefore, appropriate procedure for platelet isolation from PRP was studied.

Platelets washed by centrifugation with albumin gradient cushion could not be used in aggregometry because of spontaneous aggregation. In contrast, intact platelets were well isolated from plasma by gel filtration using Sepharose 4B and Tangen HEPES buffer solution. The platelets were aggregated by both ADP and collagen stimulation in a modified $MgCl_2$ buffer solution; the concentration of $MgCl_2$ was shifted to 1 mM.

II . The role of PAF in LPS-induced thrombocytopenia.

1) Blood PAF concentrations in LPS-injected dogs.

1 mg/kg body weight (BW) of LPS was injected intravenously (LPS large dose injection) into 3 mongrel dogs under general anesthesia. 40 $\mu g/kgBW$ of LPS was injected intravenously (LPS small dose injection) into another 9 beagles. Blood PAF concentrations before and after LPS injection were analyzed by radio-immunoassay.

PAF concentrations increased significantly ($P < 0.05$) in both the LPS large- and small-dose injected dogs.

2) Hematological changes in LPS- or PAF-injected dogs.

40 $\mu g/kgBW$ of LPS was injected intravenously (IV) into 16 beagle or mongrel dogs. 0.5 or 1 $\mu g/kgBW$ of PAF was injected IV into 6 beagles. PAF (5 $\mu g/kgBW/hour$ for 90 minutes) was infused into 3 beagles. As a control, physiological saline, 1 ml/kgBW/hour, was infused for 90 minutes into 3 beagles. Platelet and leukocyte counts were done before and after injection. Transient thrombocytopenia, leukopenia, and delayed rebound leukocytosis

were seen in the 3 treatment groups with either LPS or PAF injection. These changes in PAF-injected dogs were milder and recovered faster than those in LPS-injected dogs.

3) The suppressive effects of a PAF antagonist against LPS-induced thrombocytopenia.

At first, a specific effect of TCV-309 (a PAF antagonist provided by Takeda Chemical Industry Co.Ltd.) in vitro and in vivo on PAF stimulated platelet activation was confirmed by aggregometry and ATP-release test.

Secondly, the appropriate injection dose of TCV-309 was studied using platelet aggregometry by PAF stimulation. The appropriate IV injection dose of TCV-309 was 300 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$.

Finally, 40 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$ of LPS was injected IV into 11 beagle or mongrel dogs after pretreatment with TCV-309 (300 $\mu\text{g}/\text{kgBW}$). Blood platelets were counted before and after LPS injection.

LPS-induced thrombocytopenia was significantly ($P < 0.05$) suppressed by TCV-309 pretreatment.

4) Desensitization of platelets to PAF after LPS injection.

LPS induces severe thrombocytopenia in dogs; however, many platelets recirculate 1 hour after the injection. Therefore, desensitization of platelets to PAF was studied to confirm any evidence of PAF stimulation in platelets. Aggregometry of recirculated platelets using PRP or gel filtrated platelet suspension was performed in 6 beagles.

The disappearance of PAF stimulated platelet aggregation, which means desensitization to PAF, was found in only one case using PRP.

The results above; 1-3), strongly suggested that PAF was associated with LPS-induced thrombocytopenia. In conclusion, the hypothesis above was justified.

However, PAF injection could not induce severe thrombocytopenia as found in the LPS-injected dogs, and TCV-309 did not strongly suppress thrombocytopenia. Therefore, the author thought that some other factors may stimulate platelets synergically with PAF.