

氏名(本籍)	主屋 亮 (長野県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第346号
学位授与の番号	学位規則第3号第2項該当
学位論文の要件	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
論文審査委員	(主査) 小林 好作 (副査) 松下 博治 野村 靖夫 藤瀬 浩

### 論文内容の要旨

グラム陰性菌に感染した動物は、しばしばショックなど致死的な状態に陥る。これは細菌の産生するエンドトキシン(LPS)の作用によるといわれている。しかしながら、LPSがどのようにして生体に致死的な反応を起こさせるか、そのメカニズムは十分に解明されていない。

LPSに対する生体反応として、血小板の活性化も重要なものの一つに挙げられる。すなわち動物がLPS血症に陥ると、血小板は過剰に活性化して、血管内凝固症候群(DIC)やショック肺などを引き起こす。したがって、LPS血症に陥る危険性のある重篤なグラム陰性菌感染症においては、血小板の制御が治療上重要なポイントとなる。この制御法を確立するためにはまず、LPSによって引き起こされる血小板活性化メカニズムを解明することが不可欠である。

血小板の活性に限らず、LPSによる生体反応には数々の中間的化学伝達物質の存在が考えられ、近年その一つとして、フォスフォコリンの一種、血小板活性化因子(PAF)が注目されてきた。この物質は多種類の細胞に対する刺激性を持ち、血小板もその主要な標的細胞の一つである。

小動物臨床分野においてはしばしば、犬のグラム陰性菌感染によるDICなど、血小板の過剰活性化症例に遭遇する。LPS自体も犬血小板に対して刺激性を持っているが、*in vitro* 実験でみる限りその刺激はそれ程強いものでないことから、LPSによって体内に産生される何らか別の血小板刺激因子の存在が考えられる。そこで、『犬のグラム陰性菌感染の際に見られる血小板活性化には、PAFが関与している』という仮説を立てた。

血小板が活性化して血管内で凝集すると、その結果として末梢血中の血小板数は消費性に著しく減少する。そのため血小板数の減少は、血小板活性化の指標となる。そこで上記仮説を裏付けるために、実験的LPS血症犬を用い、血小板減少の発現にPAFが関与することを証明しようとした。

研究成績の概要を以下に示す。

#### 1. 血小板凝集試験に用いる試料の前処理法

血小板反応の研究では、血小板凝集試験が最も基本的な血小板活性化のスクリーニング検査である。この試験を行うためには、血小板をできるだけ活性化させずに血液から分離する必要がある。そこで最初に、

試料前処理に関する基礎的検討を行った。

### 1) 多血小板血漿(血小板に富む血漿; PRP)を得るための遠心条件

凝集試験に用いる最も一般的なサンプルは、全血から遠心によって分離する PRP である。動物種によって血小板のサイズや比重に大きな違いがあるので、その遠心条件は動物種別に設定しなければならない。そこで、3.8%クエン酸 Na 液で凝固阻止した全血を、いろいろな速度と時間の組み合わせで遠心した。

血小板回収率が最も良かったのは、3,500 rpm (2000 g)・1分間で、平均71.7%が回収された。この PRP 中の血小板は、ADP およびコラーゲンによる刺激に対して十分な凝集反応を示した。

### 2) 血漿からの血小板分離

いくつかの血漿成分が、血小板反応に影響を与えるといわれている。したがって PAF が血小板にどのような影響を与えるか検討する場合には、誤差要因となる血漿成分による影響を取り除くことが必要である。そこで、血小板を PRP から分離し、緩衝液に再浮遊させる方法を検討した。

アルブミン密度勾配をクッションにした遠心洗浄で分離した血小板には自然凝集が起きてしまい、凝集試験に使用できなかった。これに対して、セファロース 4 B と Tangen HEPES 緩衝液を用いたゲルろ過法では、活性化していない血小板が効率的に分離され、さらにこの緩衝液の組成を一部改良 (MgCl<sub>2</sub> を 1 mM に変更) することによって、凝集試験にも使用できた。

## 2. LPS 投与犬の血小板減少における PAF の関与

### 1) LPS 投与犬の血中 PAF 濃度

全身麻酔した 3 頭の雑種犬に LPS を 1 mg/kg (大量投与群)、およびビーグル犬 9 頭に 40 μg/kg (少量投与群) を静注して、その前後の血中 PAF 濃度をラジオイムノアッセイ法で測定した。

その結果、両群ともに LPS 静注後の血中 PAF 濃度は有意に増加した。

### 2) LPS および PAF 投与犬の血液学的変化

16 頭の犬に LPS を 40 μg/kg、6 頭に PAF を 0.5 ないし 1 μg/kg 静脈注射 (単回投与) した。また、3 頭に PAF を 5 μg/kg/時、他の 3 頭 (対照群) に生理食塩水を 1 ml/kg/時の速度で、それぞれ 90 分間連続静注した。

LPS 投与群、PAF 単回、および PAF 連続投与の 3 群に共通して、血小板数と白血球数の減少、およびその後の反動的な白血球数増加が観察された。白血球増減の主体は成熟好中球であった。これらの変化は、PAF 投与犬の方が LPS 投与犬より軽度で、回復も速かった。

### 3) PAF 阻害剤による LPS 誘導血小板減少の抑制

PAF 阻害剤として武田製薬㈱が開発した TCV-309 を用いた。

まず、PAF に対する血小板の反応が、TCV-309 の *in vitro* および *in vivo* いずれの処理によっても特異的に阻害されることを、凝集試験および ATP 放出試験を用いて確認した。次いで、TCV-309 の投与適量を検討した。

最後に、適量の TCV-309 を前投与した犬 5 頭および生理食塩水を前投与した犬 6 頭 (対照) に、LPS 40 μg/kg を投与し、その前後の末梢血血小板数を測定した。その結果、TCV-309 前投与群の血小板減少は、対照群に比べ有意に抑制された。

#### 4) LPS 投与後再循環した血小板の PAF 脱感作

犬に LPS を投与すると、ほとんどの血小板は末梢血から一旦消失し、1 時間後には大半が再循環する。そこで次の手順によって、再循環血小板が PAF に感作された形跡 (PAF 脱感作) を確認しようと試みた。延べ 6 頭の犬に LPS を投与し、1 時間あるいは 40 分後に採血して、PRP ないしゲルろ過血小板を用いた PAF 凝集試験を行った。しかしながら、いずれのサンプルを用いても、PAF 脱感作を示す血小板の PAF 凝集能低下は確認できなかった。

以上のうち 1) ~ 3) の結果から、犬の LPS 血症における血小板減少すなわち血小板の活性化に PAF が関与していることはほぼ間違いなく、したがって、当初の仮説が正しいと考えた。

しかしながら、PAF 投与犬の血小板減少は LPS 投与犬のそれと比べて軽度であり、また、TCV-309 を前投与して、LPS による血小板減少が完全に阻止されないことから、血小板の過剰活性化は、PAF に対する反応のみではなく、他のなんらかの刺激物質との相乗作用によることが推察された。

### 論文審査の結果の要旨

獣医血液学の分野では、血小板に関する知見がきわめて乏しい。しかし臨床では血小板の機能異常に関係する病気が少なくない。なかでも血管内凝固症候群 (DIC) を引き起こすグラム陰性菌感染症にはしばしば遭遇する。これは細菌の産生するエンドトキシン (Lipopolysaccharide, 以下 LPS) が血小板を過剰に活性化させ、血小板を血管内で凝集させてしまう。結果として末梢血中の血小板数は消費性に著しく減少する。したがって、DIC のような LPS 血症に陥る危険性のある重篤なグラム陰性菌感染症においては、血小板の制御が治療上重要なポイントとなる。この制御法を確立するためにはまず、LPS によって引き起こされる血小板活性化のメカニズムを解明することが不可欠である。

著書は日常の小動物診療からこのことに着目した。しかし LPS 自体も犬血小板に対して刺激性をもっているが、*in vitro* 実験でみる限り、その刺激はそれほど強くないことを知り、LPS によって体内に産生されるなんらか別の血小板刺激因子の存在を考え、「犬のグラム陰性菌感染症の際にみられる血小板活性化には、血小板活性化因子 (PAF) が関与している」という仮説を立てた。PAF は多種類の細胞に対して刺激性をもち、血小板もその主要な標的細胞となっている。

上の仮説を裏付けるため、実験的に LPS 血症の犬を作り、以下の実験を行なっている。

#### 1. 血小板凝集試験に用いる試料の前処理法

血小板反応の研究では、血小板凝集試験が最も基本的な血小板活性化のスクリーニング検査である。この試験を行なうためには、血小板をできるだけ活性化させずに血液から分離する必要がある。そこで最初に、試料前処理に関する基礎的検討を行なった。

まず、クエン酸 Na 処理全血から血小板に富む血漿 (PRP) を分離するための最適遠心条件を求めた。PRP への血小板回収率が最も良かったのは 3,500 rpm (2000G) × 1 分で、平均 71.7% が回収された。この PRP 中の血小板は、ADP およびコラーゲンによる刺激にたいして十分な凝集反応を示した。

次に、血小板を血漿から分離し緩衝液に再浮遊させる方法を検討した。遠心洗浄した血小板は、その処

理中にすでに活性化してしまい、凝集試験に使用できなかった。そこで、ゲル濾過による分離を試みたところ、血小板は効率良く血漿から分離でき、さらに、血小板を再浮遊させる緩衝液の組成を部分的に改良することによって、凝集試験にも使用可能となった。

## 2. LPS投与犬の血小板減少における PAF の関与

### 1) LPS および PAF 投与実験

16頭に LPS 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、6頭に PAF を0.5ないし 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  静脈注射(単回投与)した。また、3頭に PAF を5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hour}$ 、他の3頭(対照群)に生理食塩水を 1  $\text{ml}/\text{kg}/\text{hour}$  の速度で、それぞれ90分間連続静注した。

LPS 投与、PAF 単回および連続投与の3群に共通して、血小板数と白血球数の減少、およびその後の反動的な白血球増加が観察された。

### 2) LPS 投与犬の血中 PAF 濃度

全身麻酔下の3頭に LPS 1  $\text{mg}/\text{kg}$  (大量投与群)、および無麻酔の9頭に 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (少量投与群)を静注し、その前後の血中 PAF 濃度を測定した。その結果、両群ともに LPS 静注後の PAF 濃度は有意に増加した。

### 3) PAF 阻害剤による LPS 誘導血小板減少の抑制

PAF 阻害剤が LPS 誘導血小板減少を阻害すれば、血小板反応における PAF 関与の一つの裏付けとなる。そこで阻害剤として TCY-309を用い、このことを証明しようとした。まず、血小板の PAF に対する TCY-309の特異的阻害効果を確認した。次いで、適量の TCY-309を前投与した5頭および生理食塩水を前投与した6頭(対照群)に、LPS 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与し、その前後の末梢血血小板数を測定した。その結果、TCY-309前投与群の血小板減少は、対照群に比べ有意に抑制された。

### 4) LPS 投与後再循環した血小板の PAF 脱感作

犬に LPS 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与すると、ほとんどの血小板は末梢血からいったん消失するが、1時間後には大半が再循環する。この血小板が PAF に感作されていることを確認できれば、これもまた PAF 関与の証拠となる。そこで、延べ6頭に LPS を投与し、1時間後の PRP ないしゲル濾過血小板で凝集試験を行なった。しかしながら期待したような PAF 脱感作は確認できなかった。

以上1)~3)の結果から、犬の LPS 血症における血小板減少に PAF が関与していることはほぼ間違いないことがわかった。しかし4)の成績を考慮すると、PAF が単独で血小板を活性化しているのではない可能性も高いと考えている。

この研究業績は、犬血小板について獣医血液学に新しい知見を加えるものであると同時に、グラム陰性菌感染症の診断と治療に貢献するところが大きい。よって博士(獣医学)の学位を授与するのにふさわしいと判定した。