

土屋 亮 学位申請論文

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の関与

[論文要旨]

1995 (平成 7) 年 6 月

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。

血小板の活性化に限らず、LPS による生体反応には数々の中間的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、血小板活性化の一指標となる。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、3500 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4B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(MgCl₂を1mM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1mg/kg(大量投与群)、およびビーグル犬9頭に40μg/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40μg/kg、6頭にPAFを0.5ないし1μg/kg静脈注射(単

回投与)した。また、3頭にPAFを5 μ g/kg/時、他の3頭(対照群)に生理食塩水を1ml/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(株)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 μ g/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を前投与しても、LPSによる血小板減少が完全には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。