

氏 名（本籍）	瀬 川 和 仁（神奈川県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	甲第 137 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	イヌの血小板輸血の臨床応用に向けた基礎的研究
論文審査委員	（主査）土 屋 亮 （副査）浅 井 史 敏 久 末 正 晴

論 文 内 容 の 要 旨

血小板減少と血小板機能異常は止血障害の主要原因の 1 つであり、脳内など出血部位によっては命にかかわる危険性がある。そこで、人医療ではそのような致死性の出血を回避するために血小板輸血が行われている。

しかしながら、イヌをはじめとして獣医療では血小板輸血が実施されるのはごく一部の施設にとどまっている。その主な理由として、日本に動物の血液バンクが存在しないことが挙げられる。各診療施設で血小板製剤の作製や保存に取り組まなくてはならないため、実施は容易でない。

そして、獣医療における血小板製剤は、作製方法や保存方法に関する情報が少なく、さらにヒトのように適切な投与量を繰り返し輸血して血小板数を一定以上に維持するためには、数多くのドナーを確保しなくてはならない。したがって、血液バンクを持つ海外の獣医療でさえ、日常的な血小板輸血の実施は困難な状況にある。しかしながら、例えば血小板機能不全の動物に外科手術を実施する場合など、短期的な血小板輸血適用が有効な例も想定され、獣医療における血小板輸血技術の進歩と普及が望まれる。

そこで、本研究では、獣医療、特にイヌにおける血小板輸血の臨床応用に向けて、血小板製剤作製技術の改良や保存方法の基礎的検討を行った。

第 1 章 輸血用血小板濃厚液作製技術の改良

【緒論】

血小板輸血をもっとも効率的に行える血液製剤は、血小板濃厚液（Platelet concentrates; PC）である。イヌの PC 作製法については、Abrams-Ogg ら（Am J Vet Res. 1993）が報告している。その方法は、まず全血を 20-24 °C・1,000 G・4 分間遠心（弱遠心）して多血小板血漿（Platelet rich plasma; PRP）を分離し、次に PRP を 20-24 °C・2,000 G・10 分間遠心（強遠心）して PC を得るものである。

しかしこの方法では、強遠心によりパックされた血小板は強く活性化して互いに絡み合うために容易に再浮遊せず、そのことが、PC 作製における大きな障害要因となる。

そこで、PRP の強遠心前に血小板の活性化を可逆的に抑制する Prostaglandin E₁ (PGE₁) を添加することで問題の解決を試みた。同時に、こうして作製した PC 中の血小板が輸血の効力を保っているか否か確認した。

【方法】

PGE₁ 添加 PC の有用性を評価するため、血小板輸血前の PC 中の血小板凝集能、そして輸血された血小板の体内寿命及び機能を測定した。まず、血小板凝集能の評価では、PGE₁ 添加前後の血小板を用いて、PGE₁ の血小板機能抑制効果の可逆性を確認した。続いて、血小板輸血後の体内寿命測定では、事前に体外でビオチン標識したイヌ血小板を同一個体に輸血（返血）し、その後経時的に採血して、末梢血中ビオチン標識陽性血小板の消退をフローサイトメトリーにより評価した。その際、輸血 1 時間後を第 0 日目とし、その後、第 7 日目まで毎日同様の時刻に採血した。最後に、輸血後の血小板機能の評価では、同様にビオチン標識した血小板を輸血し、輸血 1、24 時間後に採血した。そして、採材した血小板をトロンビンで刺激し、それに対するビオチン標識陽性血小板の P-selectin 発現量をフローサイトメトリーにて評価した。

【結果】

PC 作製時の血小板の再浮遊に要する時間は、PGE₁ 添加により劇的に短縮された。また、PGE₁ 添加により血小板機能が抑制され、凝集能は著しい低値を示したが、PGE₁ を含まない血漿と入れ替えることで凝集能が回復した。

一方、PGE₁ 添加 PC として輸血された血小板の体内寿命は、PGE₁ を添加せず、また強遠心も加えない PRP として輸血された血小板のそれとほぼ同等であった。しかもその血小板は、輸血された後も活性化能を維持していることが、トロンビン刺激後の P-selectin 発現量増加により確認された。

【考察】

PC 作製時の PGE₁ 添加は、治療効果を維持したうえで作製効率を向上させる有用な改良と思われた（研究成果：Segawa et al. Effects of prostaglandin E₁ on the preparation of platelet concentrates in dogs. J Vet Intern Med. 2012）。

PGE₁ は容易に入手可能であり、静脈内投与が可能な製剤も販売されているため、PC 作製過程における PGE₁ 添加法は実現可能性が高い。

本研究では、PGE₁ が輸血後体内寿命を短縮させなかったが、作製直後の PC を輸血したため、保存による影響は不明である。したがって、当面はイヌの PGE₁ 添加 PC は新鮮な状態での使用に限定されるべきであり、今後の課題として保存による影響についての検討が必要と思われた。

第2章 輸血用血小板製剤冷蔵保存の検討

【緒論】

イヌの血小板製剤を臨床で広く利用するためには、製剤の作製方法に続き、その保存条件について検討する必要がある。現在、ヒトの血小板製剤は、冷蔵保存により輸血後体内寿命の短縮を認めることから、室温での保存が推奨されている。しかしながら、室温での保存は血小板の嫌氣的代謝による保存障害及び細菌増殖リスクの高さが懸念されている。

ヒトでは 2-3 日間隔の頻回な血小板輸血により患者の血小板数を一定以上に保つため、冷蔵保存による輸血後体内寿命の短縮は、上述した室温保存のデメリットより問題視されている。しかしながら、豊富な輸血用血液の供給体制を持たず、また経済的な制約も大きいイヌにおいては、そのような頻回輸血は困難であり、手術中の出血予防や緊急時の止血効果を目的とする単回ないしは短期間の投与が現実的である。

したがって、ヒトと比べて体表汚染が激しいイヌにおいては、輸血後体内寿命の短縮より、むしろ採血時の細菌汚染による輸血関連敗血症リスクの方が懸念されるべきかもしれない。そこで、室温保存したイヌの血小板製剤を対照とし、冷蔵保存したイヌの血小板製剤が、その保存条件から受ける影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

室温、冷蔵保存の影響を比較検討するため、イヌの PRP を 22 °C 及び 4 °C で 7 日間保存した。保存 1、7 日目に無菌的に採材し、血小板数、平均血小板容積 (Mean platelet volume; MPV)、円盤状血小板が全体に占める割合 (% discs)、また、代謝指標として遠心上清のグルコース濃度、乳酸濃度、重炭酸イオン濃度、pH、酸素分圧 (Partial pressure of oxygen; pO_2)、二酸化炭素分圧 (Partial pressure of carbon dioxide; pCO_2)、乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase; LDH) 活性、電解質濃度 (ナトリウムイオン濃度、カリウムイオン濃度)、さらに、血小板機能試験として血小板凝集能、血小板の形態反応 (低張ショック反応; Hypotonic shock response; HSR 及び球状化反応強度; Extent of shape change; ESC) を評価した。

以上の *in vitro* での検討とともに、*in vivo* では 1 日間冷蔵、7 日間室温あるいは冷蔵保存した PRP 中血小板の輸血後回収率及び体内寿命を測定し、両保存温度条件の影響を比較評価した。

【結果】

7 日間の冷蔵保存により一部の血小板が付着し合い血小板数は見かけ上減少し、MPV は増加した。顕微鏡下では血小板形態が冷蔵保存 1 日目から小型円盤状から大型球状に変化しており、% discs は低値を示した。また、代謝指標や凝集能は室温保存の場合より冷蔵保存の方で良好に維持されていた。血小板の形態反応は冷蔵保存の影響が大きく、HSR 及び ESC は低値を示した。

一方、*in vivo* では、輸血後回収率は保存温度による影響がみられなかったが、輸血後体内寿命の短縮は冷蔵保存でより明らかであった。

【考察】

イヌの血小板製剤を室温保存した結果、経時的な保存障害の進行により、代謝指標や凝集能などの *in vitro* における品質及び輸血後体内寿命などの *in vivo* における品質が新鮮血小板製剤と比較して低下していた。しかしながら、pH6.4 以上かつ輸血後体内寿命が新鮮血小板製剤を輸血した場合の 50% 以上など、ヒトの血小板製剤で要求される条件の一部は満たしていた。さらに、凝集能の不可逆的な障害など、血小板製剤として使用不可と思われるような結果はみられなかった。

一方、冷蔵保存では、血小板の代謝指標の変化は軽度であり、凝集能は室温保存と比較して良好に維持されていた。しかしながら、輸血効果持続性の点では、冷蔵保存により輸血後体内寿命が著しく短縮していた。

すなわち、室温保存と冷蔵保存を比較するとそれぞれ長所短所があり、ヒトのように長期的な輸血効果を図る場合は、輸血効果持続性に優れる室温保存の方が適している。しかしながら、イヌの血小板輸血では短期間の輸血効果を図ることが現実的である。したがって、保存中の細菌増殖リスク軽減効果も考慮すれば、イヌにおいては凝集能をより良好に維持している冷蔵保存の方が優れている場面もあると思われた。

今後は、第 1 章で確立した血小板製剤作製技術及び第 2 章で検討した保存技術を改良し、輸血効果の持続性を高めれば、イヌの血小板輸血がより実践的になると思われた。

さらに、そのような基礎的検討に加え、血小板異常症例への血小板輸血の適応を積極的に行い、その有効性を止血不良の改善や症例の転帰などから十分に検討していくことが必要である。

論文審査の結果の要旨

ヒトの医療において輸血はきわめて大きな位置を占め、輸血用血液製剤の確保は、国策的に推進されている。また、副作用発現リスクの軽減と血液の効率的使用等の観点から、現在の輸血は成分輸血が中心となっており、それに伴って各種血液製剤の作製と保存技術も大きく進歩している。

獣医療においても輸血の治療効果はヒトの医療の場合と変わるものではないが、血液の供給態勢が整わないために、輸血は一部の診療機関において、慢性的な血液不足の中で実施されている状況である。また、成分輸血の実施には特殊な装置や煩雑な血液製剤の分離操作が必要なために、獣医療ではいまだに全血輸血が中心と思われ、安全且つ効率的な輸血を実施するためには、早急な成分輸血への切り替えが望まれる。

本研究は、獣医療における成分輸血普及の一助とすることを目的に、血液製剤の中でも取り扱いが最も困難とされる血小板製剤の作製と保存技術を、イヌについて検討したものである。

第 1 章では、Abrams-Ogg らが報告したイヌの血小板濃厚液 (platelet concentrate ; PC) 作製法 (従来法) の改良に取り組んだ。

従来法による PC 作製法は、全血に弱い遠心操作を加えて多血小板血漿 (platelet rich plasma ; PRP)

を分離し、更にそれに強い遠心操作を加えて血小板を沈殿させてから、それを少量の血漿に再浮遊させるものである。血小板再浮遊は、沈殿した血小板塊を 30 分間静置した後に、バッグの外側からの手指による血小板集塊のもみほぐしと緩やかな振とう操作によって行うが、強遠心によって血小板は活性化して互いに絡み合っているため、その操作は容易ではない。

本研究では、PRP 強遠心の直前に、血小板の活性化抑制物質でしかもその効果が可逆的とされる Prostaglandin E₁ (PGE₁) を添加すること（改良法）で、血小板再浮遊困難性の解決を試みた。同時に、こうして作製した PC 中の血小板が、輸血の効力を保っているか否かも評価した。なお、PGE₁ は、過去においてヒトの血小板製剤作製の研究にも用いられた報告があり、また静脈内投与可能な治療用製剤が市販されていることから、臨床応用の可能性が高いものとして選択した。

強い遠心によって沈殿した血小板は、改良法ではきわめて容易に再浮遊できるようになった。この PC を輸血した場合の有効性を評価するため、*in vitro* 実験としては PC 中血小板の凝集能試験を行い、また *in vivo* 実験では輸血された PC 中血小板の体内寿命と機能を調べた。

まず *in vitro* 実験では、PGE₁ によって強力に抑制された血小板凝集能が、PGE₁ を含まない血漿に血小板を再浮遊させることによって回復することを確認した。この結果から、改良法により作製した PC をイヌに輸血した場合、受血犬の体内で PGE₁ は直ちに希釈され、血小板の機能が回復する可能性が示唆された。

また、*in vivo* 実験では、改良法で作製した PC 中血小板の輸血後体内寿命が、強い遠心操作を加えられていない PRP を輸血した場合と比較しても、ほぼ同等であることが確認された。

更に、改良法により作製した PC 中血小板の、輸血後の機能評価を試みた。これまでのところ、輸血され体内にある血小板の機能を、輸血に由来しない血小板と区分して評価する手法は確立されていない。そこで本研究では、PC 中血小板にビオチン標識を施してから輸血し、その 1 及び 24 時間後に末梢血を採取して、ビオチン陽性血小板と陰性血小板の機能を比較評価する方法を考案した。血小板の機能は、採取した血液中の血小板をトロンビンで刺激し、それにより血小板細胞表面に発現する P-selectin の量を、フローサイトメトリーにて評価した。P-selectin 量の測定には、FITC 標識抗ヒト P-selectin モノクローナル抗体を用いた。この実験により、改良法で作製後に輸血された PC 中血小板の機能は、もともと体内に存在する血小板のそれとほとんど差のないことが確認された。

以上のことから、イヌの PC 作製における PRP 強遠心直前の PGE₁ 添加は、血小板の輸血効果を失わずに PC の作製効率を向上させる有用な改良技術と思われた。

第 2 章では、輸血用血小板製剤の保存方法について検討した。

現在、ヒトの血小板製剤は、冷蔵保存すると血小板の輸血後体内寿命が短縮することから、室温での保存が推奨されている。しかしながら、室温保存については、血小板の嫌氣的代謝による保存障害及び細菌増殖リスクの高さが懸念されている。イヌはヒトと比べて体表汚染が激しい等の理由から、採血時の細菌汚染の可能性はヒトの場合よりも相当に高い。したがって、血液製剤の室温保存は安全

上きわめて大きなリスク因子となる。そこで本研究では、細菌増殖リスクを軽減させるために、イヌ血小板製剤の冷蔵保存が可能か否か検討した。

まず、冷蔵保存の影響を *in vitro* で把握するため、PRP を標準的な 22 °C と 4 °C で 7 日間保存し、保存 1 及び 7 日目の時点における血小板の数、形態（平均血小板容積、円盤状血小板の割合）、各種代謝指標（遠心上清のグルコース濃度、乳酸濃度、重炭酸イオン濃度、pH、酸素分圧、二酸化炭素分圧、乳酸脱水素酵素活性、ナトリウムイオン濃度、カリウムイオン濃度）及び機能（血小板凝集能、低張ショックに対する血小板の形態反応）を評価した。

7 日間の冷蔵保存により、一部の血小板が付着し合い血小板数は見かけ上減少し、平均血小板容積は増加した。円盤状血小板の割合は冷蔵保存 1 日目から減少し、血小板は大型球状に変化していた。一方、代謝指標や凝集能は室温保存より冷蔵保存の方が良好に維持されていた。逆に血小板の形態反応は、室温保存の方が明らかに良く維持されていた。

次に *in vivo* 実験では、1 日間及び 7 日間、室温あるいは冷蔵保存した PRP 中血小板の輸血後回収率及び体内寿命を測定した。その結果、輸血後回収率には保存温度による有意な影響は認められなかったが、輸血後体内寿命は冷蔵保存により明らかに短縮した。

以上の結果から、血小板製剤の輸血効果持続性の面では、イヌにおいてもヒトの場合と同様、室温の方が優れているが、輸血後短期間であれば十分な治療効果を発揮する可能性が示唆された。

前述のとおり採血時の細菌汚染リスクが高いイヌにおいては、細菌増殖リスク軽減の必要性はヒトの場合以上に大きい。また、イヌではヒトのような生涯あるいは長期にわたる繰り返しの血小板輸血は想定されず、外科手術を乗り切ることなど、短期集中的な効果を目的とした輸血が中心となる。したがってイヌの血小板輸血においては、効果持続性よりも安全面に配慮し、冷蔵血小板製剤を使用し、効果持続性に劣る点は短期の反復輸血によって補うことも、検討に値すると思われる。

本研究は製剤作製技術の困難性のために普及しないイヌの血小板輸血について、PGE₁ 添加という改良を加えてその問題点の一端を解決し、またその血小板製剤が治療上の有効性を維持していることであろうについて、*in vitro* での検討のみならず、*in vivo* では新しい手法を用いて評価した。

また、室温保存が標準とされる血小板製剤について、細菌増殖リスク軽減の観点から冷蔵保存の可能性について検討した。その結果、輸血効果持続性は劣るものの、血小板の代謝や凝集能は室温保存の場合よりよく維持されていることを示した。そして、ヒトの場合以上に細菌増殖リスクが危惧されるイヌの輸血においては、血小板製剤を冷蔵保存する選択肢もありうるという新たな見解を示した。この点は、今後獣医療における血小板輸血を普及させる中で、議論する意義があると思われる。

以上のことから本研究は、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績と判断した。