

イヌの輸血用血小板製剤作製法の開発

Technique to obtain Canine blood platelet preparations for transfusion.

土屋 亮

麻布大学

Ryo Tsuchiya

Azabu University

Abstract. Canine blood platelet preparations including platelet rich plasma (PRP) and platelet concentrate (PC) were prepared for transfusion. All the preparations were reinfused to the same individuals. Approximately 56 percent of the platelets in whole blood were recovered to PRP and the average survival time of the reinfused platelets in PRP was 7.06 days. Average recovery percentage of platelets from PRP to PC was approximately 63 % and the average survival time of the re-infused platelets in PC was 6.67 days, respectively. Resuspending procedure in PC was difficult and it was thought that platelet activation by strong centrifugation interfere the procedure. To prevent the platelet activation during the PC preparation and modify the recovery rate of the platelets, 1 μ M prostaglandin E1 was added to PRP before PC preparation. The platelets recovery percentage was drastically improved to 82.5 % and no significant difference was found among the platelet survival days of the three kinds of platelet preparations. In conclusion, PC transfusion therapy is available in dogs and PGE₁ should be useful for PC preparation.

1. 目的

現在の獣医学領域における輸血は全血輸血が中心であり、血液の有効利用と輸血副反応リスク軽減の両面から、できるだけ早く成分輸血に切り替える必要がある^{8,9)}。成分輸血用の血液製剤の中で血小板製剤は、作製が最も困難なものとされている。

血小板を輸注するための血液製剤として、全血、多血小板血漿 (PRP) 及び濃厚血小板液 (PC) が挙げられる。

犬では血小板輸血が有効と思われる症例は比較的多いが、おそらく実施例のほとんどにおいて、全血輸血が用いられている。全血輸血は上記の血液有効利用と輸血副反応リスク軽減の両面で問題になるとともに、十分量の血小板を補給する目的上からも好

ましくない⁵⁾。すなわち全血輸血は、1日当たりの限度量が22 ml/kgとされており、1回に血小板を補給できる量は、健康犬の血小板数の1/4程度に過ぎない。これでは体内寿命が1週間程度しかない血小板の補給量としては不十分である。これに対しPRPでは血小板濃度が全血のその2倍程度に増加する事から、1回の血漿輸血限度量 (15 ml/kg) で全血輸血1回分を大きく上回る血小板補給効果が得られる。又血漿の輸血は1日3回まで可能とされており、複数回PRPを輸血する事で、補給可能な血小板量は更に多くなる⁵⁾。しかしながら過剰な血漿輸血は、血栓症などの副反応を起こす事があり、症例によっては高いリスクを伴う。いっぽうPC輸血の場合は、血小板数はPRPの3倍程度に濃縮されるために最も大きな血小板補給効果が得られ、しかも血漿の輸注

量はより少量に抑えられるために血栓症発現リスクも抑制できる²⁾。

そこで我々は、犬の血小板製剤、特にPCの効率的な作製法と、輸注された血小板の体内寿命について検討した。

2. 方法

(1) 実験動物

実験犬には、麻布大学獣医臨床センター内小動物飼育施設で飼育された臨床的に健康なビーグル犬13頭（雄6頭，雌10頭；年齢4-10歳，体重8.5-9.5 kg）を用いた。

(2) PRP 輸血

抗凝固剤クエン酸リン酸デキストロース・アデニン1 (CPDA1)¹⁰⁾ の入った200 ml 輸血用血液バッグ（テルモ社）に頸静脈血を採取し，室温下，1,000G・3.5分間の遠心によってPRPを分離して⁴⁾，これを分離バッグ（テルモ社）に移した。この時のPRPの量とPRP中血小板数を測定し，あらかじめ測定しておいた全血中血小板からの回収率を求めた。

次に，このPRPを元の個体に自己輸血（戻し輸血）し，再輸注された血小板のその後の体内寿命を調べた。血小板体内寿命の測定法は，血小板ビオチンラベルとフローサイトメトリーを用いたHeilmanらの報告に準じた^{6,11)}。なお，実験犬の負担軽減のため，PRP作製によって生じた濃厚赤血球液は，PRPの前に戻し輸血した。

(3) PC 輸血

PC作製基本技術は，Allyson 及び Abram-Ogg らの報告に従った^{1,3)}。上記の方法によって作製したPRP8例を，15分間のレスティングタイムをおいた後，2,000 G・10分間遠心した。その後，血液分離スタンドにて，パックされた血小板と血小板再浮遊のための血漿を約20 ml 残し，それ以外の上清（乏血小板血漿；PPP）を分離バッグに移した。このPPPは濃厚赤血球液と混和し，上記のPRP輸血実験の場合と同様，PC輸血の前に戻し輸血した。血小板の入ったバッグは室温で60分間静置後，バッグの外側から手で攪拌し，血小板を再浮遊させた。このPCを戻し輸血して，再輸注血小板の体内寿命を，前項のPRP戻し輸血の場合と比較した。

なお，最初の2例については，バッグの底にパッ

クされた血小板の再浮遊操作を約10分間程度で終了するように比較的急いで行った。しかしながら，結果に示す理由により，その後の6例については再浮遊の操作を約30分間かけて極めて慎重に行った。

(4) PGE₁ 添加PRPからのPC作製

結果に示すとおり，PC輸血では血小板の回収率が低く，又，強遠心によってパックされた血小板の再浮遊にも相当の困難が伴った。これには強遠心による血小板活性化が関与しているものと考え，問題点を解決するため，可逆的な活性化阻害剤であるプロスタグランジンE₁ 1 μMを5例のPRPに添加してPCを作製した。この時の血小板回収率とPC戻し輸血後の血小板生存時間を，PGE₁を添加しない場合と比較した。

3. 結果と考察

(1) PRP 輸血

5例の全血における血小板数の平均は $28.78 \times 10^4/\mu\text{l}$ で，遠心によってPRPは約60～80mlが得られた。PRP中血小板数の平均は $40.56 \times 10^4/\mu\text{l}$ であり，全血からの血小板回収率は56.4%で，やや低率であった⁷⁾。又，PRP戻し輸血後の血小板の寿命は，平均7.06日であった（Fig 1）。

(2) PC 輸血

検討開始当初の2例は，輸血バッグの底にパックされた血小板の再浮遊を10分程度の間で急いで行ったが，これらを戻し輸血した後の血小板寿命はPRPの場合と比べて著しく短縮し，再輸注1時間後の時点でほとんどが末梢血中から消失していた（データ

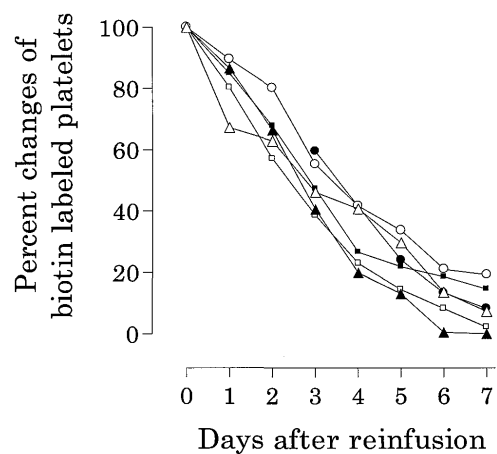


Fig. 1 Platelet survival curves after reinfusion of PC

Table 1. Comparison of platelet recovery percentages from PRP to PC with/without PGE₁.

Sample (un-paired)	Recovery percentage	
	without PGE ₁	with PGE ₁
1	53	55
2	72	86
3	65	95
4	59	78.2
5	79	98.2*
6	53	
Mean	63.5	82.5
Standard deviation	10.5	17.2

*not used in the experiment of platelet survival time.

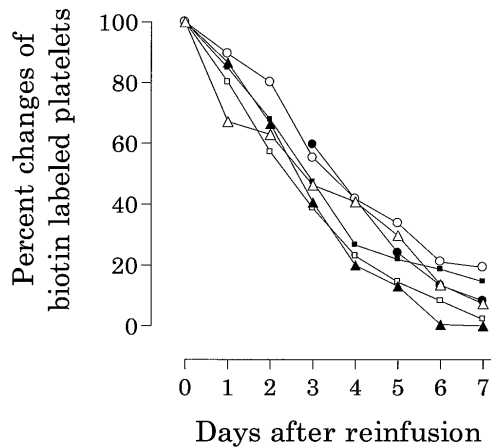


Fig. 2 Platelet survival curves after reinfusion of PC.

は示さない)。

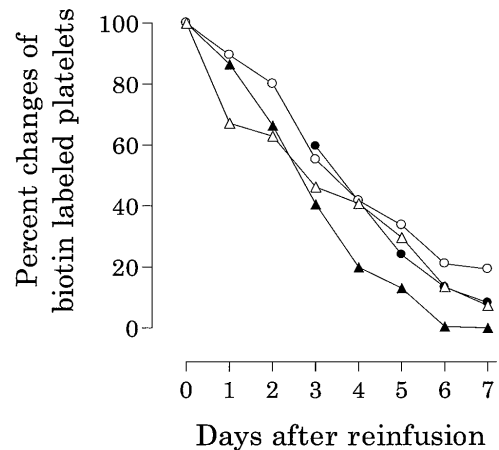
そこで、以後の6例においては30分間かけて、強い衝撃を加えないよう慎重に血小板を再浮遊させた。得られたPC中の血小板数は平均 $102.8 \times 10^4/\mu$ であり、PRPからの血小板回収率は63.5%と顕著に減少した (Table 1)。

このPC戻し輸血6例における血小板の寿命は平均6.67日 (Fig. 2) とPRP戻し輸血の場合とほぼ同等で、un-paired t検定によっても両者の間には有意な差は認められなかった。

以上の結果から、再浮遊の操作を極力慎重に行って血小板の活性化を防ぐ事が、PRP輸血と同等の血小板体内寿命を保つ上で重要と思われた。

(3) PGE₁添加PRPからのPC作製

4例のPRPにPGE₁を添加し、以下、上記と同様の

Fig. 3 Platelet survival curves after reinfusion of PGE₁ treated PC.

操作にてPCを作製した。これにより血小板回収率平均は82.5%に改善された (Table 1)。又、このPCを戻し輸血した時の血小板の体内寿命は6.8日 (Fig. 3) で、PGE₁不添加の場合とほぼ同等であった。この事から、PRPにPGE₁を添加する方法は、PC作製の効率化に有効なものと思われた。

4. 要約

犬の輸血用血小板製剤である多血小板血漿 (PRP) および血小板濃縮液 (PC) を作製し、それぞれを元の犬に戻した。この操作を通じて、血小板の回収率と輸血された血小板の生存時間を検討した。PRP作製では、全血中血小板総数の平均56%が回収され、また輸血された血小板の体内寿命は7.06日であった。いっぽう、PC作製においては、パックされた血小板の再浮遊操作に難航し、PRP中血小板の63.5%しかPC中に回収されなかったが、輸血された血小板の体内寿命は6.67日と、PRP輸血の場合とほぼ同等であった。

PC作製をより効率的に行うために、PRPにプロスタグランジンE₁を添加してPCを作製したところ、血小板回収率は82.5%まで著しく向上した。また、このPCを輸血した場合の血小板体内寿命も、PGE₁不添加のPCと同等であり、PC作製を効率的に行う上で、PGE₁添加は有効と思われた。

文 献

- 1) Abrams-Ogg ACG. *Am J Vet Res* 54, 635-642, 1993.

- 2) Abrams-Ogg ACG. *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 1401-1418, 2003.
- 3) Allyson K, Abrams-Ogg ACG, and Johnstone IB. *Am J Vet Res* 58: 1338-1347, 1997.
- 4) Catalfamo JL and Dodds WJ, *In: Methods in Enzymology*, Vol 169, Platelets; Receptors, Adhesion, Secretion. 27-34, 1989.
- 5) Feldman BF. *In: Kirk's Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice XIIIrd ed.* Bonagura JD Ed, 400-403, WB Saunders, Philadelphia, 2000.
- 6) Heilmann E, Hynes LA, Burstein SA et al. *Cytometry* 17: 287-293, 1994.
- 7) Nolte I and Mischke R. *Res Vet Sci* 58: 190-192, 1995.
- 8) Schneider A. *In: The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 25: 1245-1261, 1995.
- 9) Schneider A. *In: Veterinary Hematology* 5th ed, 827-832, 2000.
- 10) Scott EP and Slichter SJ. *Transfusion* 20: 489-497, 1980.
- 11) Tsuchiya R, Yagura H, Hachiya Y et al. *J Vet Med Sci* 65: 825-829, 2003.