

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	堀岡 希衣
-------	-----	-----	-------

学 位 論 文 題 目

Hypothermia-induced activation of the splenic platelet pool as a risk factor for
thrombotic disease in a mouse model.

(マウス低体温症モデルにおける脾臓内血小板活性化は血栓症の危険因子となる)

共 著 者 名

田中宏樹、磯崎翔太郎、奥田勝博、浅利優、塩野寛、小川勝洋、清水恵子

Journal of Thrombosis and Haemostasis

17巻：1762頁-1771頁、2019年.

研 究 目 的

低体温症は深部体温が35℃以下に低下することで惹き起こされる症状の総称である。低体温症における様々な機能障害について、低体温症の約10%に脳梗塞や脳出血といった血液凝固能障害を起因とする血管障害が合併し、救命困難となる症例が確認されている。しかし、低体温時の血液凝固能異常の機構については不明な点が多く、その解明が求められている。本研究では、低温刺激と血小板の関連に着目し、低体温症における血液凝固能異常の一端として、血小板の活性が生じるのか、また、血小板はどのような機序により活性化されるのかを明らかにすることを目的とした。

材 料 ・ 方 法

マウス低体温モデル：通常体温個体をコントロール群とし、-20℃の寒冷刺激を与え直腸温が15℃以下としたマウス低体温モデルを低体温群とした。これらのマウスから血液および臓器を採取し、末梢血中血小板数、血小板活性を示す血小板α顆粒由来蛋白質PPBP、PF4の血中濃度を測定した。また、各臓器中の血管内皮に接着した活性化血小板の存在について、病理組織学的に解析した。さらに、脾臓の組織環境が低体温における血小板活性化に関連するのかを解析するため、脾摘したマウスを作成し、同様の実験を行った。

脾臓の組織環境：血小板の接着に関与するvon Willebrand Factor (vWF) について、コントロール群と低体温群におけるVwf mRNA発現量、血漿中および各臓器のvWF濃度を解析した。

低体温時の血液凝固能：コントロール群、低体温群について、トロンビン時間（PT）および活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、D-ダイマーを測定し、各臓器について血栓の有無を病理組織学的に検索した。また、低温刺激を与えた後、遠赤外線による加温療法を行なったモデルを作成し、同様の項目について解析した。

成 績

マウス低体温モデル実験：コントロール群および低体温群において、末梢血血小板数、活性化血小板数に変化は認められなかったが、低体温群ではコントロール群に比して血漿中 PF4、PPBP が増加していた。また、病理組織学的解析では、低体温群にのみ、活性化血小板が脾臓に局限して確認された。一方、脾摘コントロール群と脾摘低体温群の比較において、末梢血血小板数、活性化血小板数、血漿中 PPBP、PF4 に変化は認められなかった。

脾臓の組織環境解析：低体温群の脾臓において *Vwf* mRNA 発現量および vWF タンパク量が有意に上昇していた。また、低体温群の血漿中 vWF 量も有意に上昇した。一方、肺、肝臓および腎臓では、vWF 発現の上昇は認められなかった。

低体温時の血液凝固能解析：低体温群および脾摘低体温群において APTT のみの延長が認められ、D-ダイマーの上昇は確認されなかった。しかし、低体温復温群では、D-ダイマーの上昇が認められ、APTT と PT が延長した。さらに、低体温復温群では、腎臓系球体内に微小血栓の存在が確認された。

考 案

低体温時に脾臓で認められた血小板活性化や血小板由来因子の上昇が、脾臓を摘出することにより末梢血中では認められなかった。従って、低体温時の血小板活性化は、脾臓に貯蔵された血小板に局限して生じることが明らかとなった。また、低体温時の脾臓では、vWF の発現が有意に上昇していたことから、脾臓における血小板活性化には、vWF が関与していることが示唆された。血小板が活性化し脱顆粒することで、血小板由来の凝固系因子が放出される。しかし、低温による内因系凝固因子活性が低下することにより凝固カスケードが抑制され、血液凝固は生じないと考えられる。一方、復温療法により体温が上昇すると、血小板の活性化により血漿中に増加した内因系凝固因子活性は回復し、凝固系カスケードが進行し、血栓形成を促進することが示唆された。

結 論

1. 低体温症の生体内では、脾臓に貯蔵された血小板に局限した活性化を認め、これらの現象には脾臓組織のvWF発現上昇が関与することが明らかとなった。
2. 低体温状態から復温することで、低体温時に放出された活性化血小板由来の凝固系因子が働き、血栓形成を亢進させることが判明した。

引 用 文 献

1. Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, Denis CV, Bergmeier W, Mayadas TN, von Andrian UH, Wagner DD, Stossel TP, Hartwig JH. The clearance mechanism of chilled blood platelets. *Cell*. 2003; 112: 87-97.
2. Wandall HH, Hoffmeister KM, Sorensen AL, Rumjantseva V, Clausen H, Hartwig JH, Slichter SJ. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4 degrees C-stored platelets. *Blood*. 2008; 111: 3249-56.
3. Baimukanova G, Miyazawa B, Potter DR, Gibb SL, Keating S, Danesh A, Beyer A, Dayter Y, Bruhn R, Muench MO, Cap AP, Norris PJ, Spinella P, Cohen M, Pati S. The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. *Transfusion*. 2016; 56: S52-S64.

参 考 論 文

1. Horioka K, Tanaka H, Isozaki S, Konishi H, Fujiya M, Okuda K, Asari M, Ogawa K, Hiroshi S, Shimizu K. Acute colchicine poisoning causes endotoxemia via the destruction of intestinal barrier function; The curative effect of endotoxin prevention. *Dig Dis Sci*. 2019 Jul 17. doi: 10.1007/s10620-019-05729-w.
2. Tanaka H, Horioka K, Yamamoto M, Asari M, Okuda K, Yamazaki K, Shimizu K, Ogawa K. Overproduction of thrombopoietin by *BRAFV600E*-mutated mouse hepatocytes and contribution of thrombopoietin to hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci*. 2019 Sep;110(9):2748-2759.