

## 論文内容の要旨

末梢血液による血小板造血の評価：マウスを用いた基礎的検討  
(外川亮, 古和田周吾)  
(岩手医学雑誌 69 巻, 4 号 平成 29 年 10 月掲載)

### I. 研究目的

血小板減少症の原因を評価する時に、末梢血液中の新生血小板の割合は、鑑別診断の重要な手がかりとなる。しかし、現行のフローサイトメトリー (FCM) による網状血小板比率の測定の疾患特異性は低い。

最近我々は、新生血小板に autophagy が生じていることを見いだした。今回、血小板中の autophagosome 形成率を FCM で検出する方法を考案し、マウス血小板減少モデルで新生血小板の検出におけるその有用性を検証した。

### II. 研究対象ならび方法

1. マウス血小板減少モデルの作成  
雄の 8 週齢 C57BL6 マウスへ家兎抗マウス血小板血清 anti-platelet serum (APS) を投与し一過性に血小板減少を誘導した。投与 72 時間後より新生血小板の急激な産生が生じた。
2. RNA 陽性血小板比率および autophagosome 陽性血小板比率の測定  
上記モデルにおいて、経時的に末梢血液を採取し、RNA を Thiazole orange (TO) (Becton-Dickinson, 東京) または Autophagosome を Cyto-ID® (Enzo laboratory Science, 米国) で染色した。さらに、血小板標識用の PE 標識抗マウス CD41 抗体 (Becton-Dickinson, 東京) を加え、フローサイトメトリーで、RNA 陽性血小板、autophagosome 陽性血小板比率を求めた。また赤血球標識用の APC-Cy7 標識抗マウス Ter119 抗体 (Becton-Dickinson, 東京) を加えて、大型血小板と赤血球を厳密に分離し解析した。
3. 生体内での RNA 陽性血小板および autophagosome 陽性血小板の陽性持続時間の解析  
APS 投与後の新生血小板が高値の時期に、マウス静脈へ Dylight649 標識抗マウス GPIIb 抗体 (Emflet Analytics, 独逸) を投与し、生体内で新生血小板を標識した。その後経時的に採血し TO 染色あるいは Cyto-ID® 染色を行い、GPIIb 陽性血小板中のそれぞれの陽性率を測定し、血小板産生後の TO 染色性あるいは Cyto-ID® 染色性の持続時間の評価を行った。

### Ⅲ. 研究結果

1. 従来の T0 染色法 (RNA 陽性血小板比率) の方法を改良し, 抗マウス赤血球抗体を用いて FCM 上で赤血球を分離することにより, より厳密に新生血小板分画を同定することができた.
2. Cyto-ID® 染色による血小板 Autophagosome 形成率は, T0 染色法 (RNA 陽性率) と同じように, 新生血小板産生時期に亢進した. これにより血小板 Autophagosome 形成率は新生血小板を反映している事が示された.
3. 生体内で新生血小板を標識して経時的に採血し血小板の両者の染色性を検討した結果, 新生血小板の Cyto-ID® 染色性は 24 時間以内に消失し, 一方 T0 染色性は 48 時間まで持続した. これらから, Cyto-ID® 染色による血小板 Autophagosome 形成率はより, 新生血小板に特異的でその同定に適した方法であることが示された.

### Ⅳ. 結 語

マウスの血小板減少モデルを用いて, 従来用いられてきた網状血小板比率の測定における問題点を明らかにし, より時間特異性の高い血小板 autophagosome 形成率を測定する方法を考案した. 今後ヒト検体へ適用した場合に, 血小板減少症の原因疾患の鑑別に有用な可能性が示唆された.

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 古山 和道 (生化学講座：分子医化学分野)  
副査 准教授 中村 豊 (内科学講座：呼吸器・アレルギー・膠原病内科分野)  
副査 准教授 遠藤 幹也 (小児科学講座)

血小板は骨髄から末梢血中に放出された後も成熟する事が知られつつあるが、末梢血中における血小板の成熟過程については不明な点が多い。本研究論文はマウスの末梢血中の血小板の大きさと血小板内の残存 RNA あるいはオートファゴソームの有無に着目し、Flow Cytometry (FCM) により新生血小板の同定が可能かどうかを検証した論文である。残存 RNA の存在は新生血小板の重要な特徴だが、新生血小板ではオートファゴソームも検出され、それは残存 RNA よりも早期に消失する事を明らかにした。さらに、FCM 上、新生血小板は赤血球と類似の大きさの細胞として検出される事が多いために、従来は血小板として検出されていなかった可能性が高い事を明らかにし、赤血球特異的細胞表面マーカーを発現する細胞を除外する事により、新生血小板を効率良く検出する方法を確立した。本論文は、マウス末梢血中における新生血小板の同定方法を初めて確立したものであり、学位に値する論文である。

### 試験・試問の結果の要旨

新生血小板にオートファゴソームが存在する意義、新生血小板の検出が可能になる事が臨床的にどのように役立つか、動脈血と静脈血における新生血小板の割合や形状の違い、網状血小板とオートファゴソーム陽性細胞の割合の差、などについて試問を行ない、いずれも適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、作成された学位論文において、剽窃・盗作などの研究不正がないことを確認した。

### 参考論文

- 1) 臍帯血移植が成功した先天性心疾患合併成人急性リンパ性白血病 (古和田周吾, 他 9 名と共著) 臨床血液, 57 巻, 8 号 (2016) : p1011-1017.
- 2) 赤血球の動態と貧血の発症機序 (外川亮, 他 2 名と共著) 日本臨床, 75 巻, 増刊号 1 (2017) : p45-50.
- 3) 造血器疾患における画像診断の : 画像診断に何を求めるか (藤島行輝, 他 3 名と共著) 臨床画像, 10 巻, 32 号 (2016) : p1060-1069.