

学位論文題名

Effects of Nonionic Contrast Media on Platelet Aggregation: Assessment by Particle Counting With Laser-Light Scattering

(血小板凝集における非イオン性造影剤の効果：  
散乱光による粒子計測法を用いて)

学位論文内容の要旨

非イオン性造影剤の使用頻度の増加とともに血栓性合併症の増加が指摘されはじめた。1987年に Robertson は、イオン性造影剤に比べて非イオン性造影剤の抗凝固作用が弱いために血栓形成の可能性があるとして報告した。血小板凝集能の検査法には、吸光度法、インピーダンス法、粒子数算定法、shear-induced platelet aggregation (SIPA) 法などがある。臨床では、この中で吸光度法が最もよく用いられてきた。しかし、吸光度法は数千個～数万個の血小板からなる巨大な凝集塊が形成されて初めて吸光度の低下がみられるため、凝集塊形成と光透過性の相関が悪く、また小凝集塊の検出ができないなどの難点がある。Ozaki らは、直進する光が細かい粒子に当たった際に生じる散乱光の強度は粒子径の二乗に比例するという特性を用いて、新しい測定法(粒子計測法)を開発した。検出感度は30個程度の血小板からなる微小凝集塊(直径 $10\mu\text{m}$ )が下限であり、血小板凝集の初期過程の解析検討に有効で、わずかな血小板活性化を感度良く検出できる。これまでの研究ではイオン性、非イオン性造影剤間での比較はいくつか行なわれているが、臨床上主に使用されている非イオン性造影剤の比較検討はされたことがない。今回我々は、左室造影前後に大動脈内より採血し、血小板凝集に対する3種類の非イオン性低浸透圧性造影剤による影響を粒子計測法で検討した。また血小板活性化に及ぼす造影剤の影響は血小板が活性化したときに表面上に発現するP-selectinをflow cytometryで測定した。

対象、方法

1998年4月より10月までの間に当科で左室造影を施行した症例より無作為に37症例を抽出した。造影剤としては、Ioxilan、Iomeprol、Iohexolを用いた。

1. 各種血液検査に及ぼす影響の評価

造影検査前後で、赤血球数(RBC)、ヘマトクリット(Ht)、白血球数(WBC)、GOT、GPT、LDH、CPK、BUNCrを測定し比較検討した。

2. 血液凝集に及ぼす影響の評価

左室造影の直前と造影終了後3分以内の2点でカテーテルを用いて大動脈内より採取した。血液検体は3.8%クエン酸ナトリウム入りの試験管に採取した。血液検体を1000rpmで遠心し

た上清を platelet rich plasma (PRP) とした。またそれを 3000rpm で 10 分間遠心し platelet poor plasma (PPP) とした。PRP を PPP で希釈し PRP の血小板数を 20 万/mm<sup>3</sup> に調節した。それぞれの PRP に ADP を添加し (0.3、1、3、5  $\mu$ M)、血小板凝集能を Ozaki らの方法により Kowa PA-200 にて測定した。凝集塊は、その大きさから、小凝集(Small) : 5~10 個の血小板塊、中凝集(Middle) : 10~100 個の血小板塊、大凝集(Large) : 100~1000 個の血小板塊の 3 段階に分けた。

### 3. 血小板活性化に及ぼす影響の評価

健常人から PRP を調整後、各種造影剤 16mg/ml で incubate 後 flow cytometry により P-selectin を測定した。

### 結果と考察

各群を構成する患者の年齢、造影剤使用量に有意な差はなかった。各種血液検査に及ぼす影響の評価でも、造影検査前後でそれぞれのパラメーターについて優位な変化は認められなかった。血液凝集に及ぼす影響の評価では ADP(0.5  $\mu$ M)添加時の血小板凝集は、散乱光を用いた粒子計測法では、造影剤使用前後の血小板凝集の変化率で見ると小中大凝集の 3 つのカテゴリにおいて Ioxilan と Iomeprol は、使用前より低下する傾向が認められたが Iohexol は、特に中大凝集で使用後に凝集が増加していた。吸光度による凝集では、Ioxilan と Iomeprol は凝集が低下していた。ADP(3  $\mu$ M)添加時の血小板凝集は、Ioxilan は、大中小凝集のいずれにおいても使用前より低下していた。Iomeprol は、小中凝集ではほぼ変わらないが、大凝集では増加していた。Iohexol は、小凝集では変わらないが中大凝集では増加しており、吸光度による凝集は有意に増加していた。ADP(5  $\mu$ M)添加時の血小板凝集は、Ioxilan と Iomeprol は、小中大凝集のいずれも使用前で変化がなかったが Iohexol は、凝集が増加する傾向が認められた。以上の結果から、Ioxilan と Iomeprol は、通常の使用量において血小板凝集を有意に抑制することが示された。一方、Iohexol にはこのような効果は認められなかった。フローサイトメトリーを用いた P-selectin 発現量測定による血小板活性化の度合いに関する検討では、Iohexol の血小板活性化作用が他の 2 剤より大きい傾向を示した。

イオン性及び非イオン性低浸透圧性造影剤の登場により、従来のイオン性造影剤の高浸透圧に起因する副作用が減少し、造影検査をより安全に施行できるようになった。しかし最近では、非イオン性低浸透圧造影剤の使用頻度が増すにつれて、血管造影中の血栓性合併症の増加が報告されている。その原因として非イオン性造影剤は、イオン性の従来の高浸透圧造影剤や低浸透圧性造影剤に比較して抗凝固作用が弱いためとする様々な研究報告がなされている。これまでの研究ではイオン性、非イオン性造影剤間での比較はいくつかなされている。しかし、各種造影剤間での差を血小板凝集能を濁度法で評価した研究はあるものの、より鋭敏な散乱光を用いた粒子計測法による血小板凝集能の測定での比較検討はなされたことがない。今回我々は、心臓血管造影において左室造影前後にカテーテルを用いて大動脈内より採血し、それぞれの血小板凝集能について散乱光を用いた粒子計測法で測定し、血小板凝集に対する 3 種類の非イオン性低浸透圧性造影剤による影響を検討した。これまでの研究では採血針を用いて採取しており 19 ゲージ程度の針を用いた血小板凝集の測定では通常より高値に出ることがわかっている、採取に当たっては心カテーテル検査に使用したシースを用いて採取し血小板凝集に与える影響

を少なくすることに配慮した。検討の結果、Ioxilan (Imagenil)と Iomeprol (Iomeron)には、通常使用量で有意な血小板凝集抑制作用を有することが示された。Iohexol (Omnipaque) では、血小板凝集は、他の2剤に比較し増加することが確認された。p-selectin 発現量の検討から、Iohexol (Omnipaque) においては、血小板活性化作用も他の2剤に比較し強いことが確認された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 坂 和 男

副 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

## Effects of Nonionic Contrast Media on Platelet Aggregation: Assessment by Particle Counting With Laser-Light Scattering

(血小板凝集における非イオン性造影剤の効果：  
散乱光による粒子計測法を用いて)

非イオン性造影剤の使用頻度の増加とともに血栓性合併症の増加が指摘されはじめた。1987年に Robertson は、非イオン性造影剤は、イオン性造影剤に比べて抗凝固作用が弱いために、血栓形成の可能性があるとして報告した。血小板凝集能の検査法には、吸光度法、インピーダンス法などがある。臨床では、この中で吸光度法が最もよく用いられてきた。しかし、吸光度法は数千個～数万個の血小板からなる巨大な凝集塊が形成されて初めて吸光度の低下がみられるため、凝集塊形成と光透過性の相関が悪く、また小凝集塊の検出ができないなどの難点がある。Ozaki らは、直進する光が細かい粒子に当たった際に生じる散乱光の強度は粒子径の二乗に比例するという特性を用いて、新しい測定法（粒子計測法）を開発した。これまでの研究ではイオン性、非イオン性造影剤間での比較はいくつか行なわれているが、临床上主に使用されている非イオン性造影剤の製剤間の比較検討はされることがない。今回我々は、左室造影前後に大動脈内より採血し、血小板凝集に対する3種類の非イオン性低浸透圧性造影剤による影響を粒子計測法で検討した。また血小板活性化に及ぼす造影剤の影響は血小板が活性化したときに表面上に発現する P-selectin を flow cytometry で測定した。1998年4月より10月までの間に当科で左室造影を施行した症例より無作為に37症例を抽出した。造影剤としては、Ioxilan、Iomeprol、Iohexol を用いた。

各群を構成する患者の年齢、造影剤使用量に有意な差はなかった。各種血液検査に及ぼす影響の評価でも、造影検査前後でそれぞれのパラメーターについて優位な変化は認められなかった。血液凝集に及ぼす影響の評価では ADP(0.5  $\mu$ M)添加時の血小板凝集は、散乱光を用いた粒子計測法では、造影剤使用前後の血小板凝集の変化率で見ると小中大凝集の3つのカテゴリーにおいて Ioxilan と Iomeprol は、使用前より低下する傾向が認められたが Iohexol は、特に中大凝集で使用後に凝集が増加していた。吸光度による凝集では、Ioxilan と Iomeprol は凝集が低下してい

た。ADP(3  $\mu$ M)添加時の血小板凝集は、Ioxilan は、大中小凝集のいずれにおいても使用前より低下していた。Iomeprol は、小中凝集ではほぼ変わらないが、大凝集では増加していた。Iohexol は、小凝集では変わらないが中大凝集では増加しており、吸光度による凝集は有意に増加していた。ADP(5  $\mu$ M)添加時の血小板凝集は、Ioxilan と Iomeprol は、小中大凝集のいずれも使用前後で変化がなかったが Iohexol は、凝集が増加する傾向が認められた。以上の結果から、Ioxilan と Iomeprol は、通常の使用量において血小板凝集を有意に抑制することが示された。一方、Iohexol にはこの様な効果は認められなかった。フローサイトメトリーを用いた P-selectin 発現量測定による血小板活性化の度合いに関する検討では、iohexol の血小板活性化作用が他の 2 剤より大きい傾向を示した。これまでの研究ではイオン性、非イオン性造影剤間での比較はいくつかなされている。しかし、各種造影剤間での血小板凝集能の差を濁度法で評価した研究はあるものの、より鋭敏な散乱光を用いた粒子計測法による血小板凝集能の測定での比較検討はなされたことがない。今回我々は、心臓血管造影において左室造影前後にカテーテルを用いて大動脈内より採血し、それぞれの血小板凝集能について散乱光を用いた粒子計測法で測定し、血小板凝集に対する 3 種類の非イオン性低浸透圧性造影剤による影響を検討した。検討の結果、Ioxilan (Imagenil)と Iomeprol (Iomeron)には、通常使用量で有意な血小板凝集抑制作用を有することが示された。Iohexol (Omnipaque) では、血小板凝集は、他の 2 剤に比較し増加することが確認された。p-selectin 発現量の検討から、Iohexol (Omnipaque)は、血小板活性化作用も他の 2 剤に比較し強いことが確認された。

主査(宮坂教授)から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約 15 分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、副査の安田教授からイオン性、非イオン性造影剤と血小板凝集抑制の関連における差(特に臨床における副作用の頻度や化学構造など)に関するについての質問があった。次いで副査の北島教授からイオン性、非イオン性造影剤と血小板凝集抑制の主原因、腎機能に関する影響について質問があった。最後に主査(宮坂教授)から血小板凝集惹起剤として使用した ADP と日内変動と血栓症との関連、これらの造影剤の臨床応用に関する質問があった。これらの研究を踏まえた上で申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切に回答し得た。

この論文は、散乱光を用いた粒子計測法といった新しい手法を用いて非イオン性造影剤間の血小板凝集抑制作用の差を明らかにしさらにフローサイトメトリーを用いて血小板表面の P-Selectin の発現を検討し造影剤による血小板活性化機序の解明に示唆と方向性を与えた点で高く評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。