



Title	血小板凝集及び血小板内トロンボキサン生成に対するプロテアーゼインヒビターの抑制の機序
Author(s)	野村, 孝
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32658
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	野村孝
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4898 号
学位授与の日付	昭和 55 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	血小板凝集及び血小板内トロンボキサン生成に対するプロテアーゼインヒビターの抑制の機序
論文審査委員	(主査) 教授 神前 五郎 (副査) 教授 天野 恒久 教授 和田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

protease inhibitor (P. I.) による血小板凝集の抑制は血小板膜リン脂質よりの arachidonic acid (A. A.) 遊離と, A. A. 代謝に P. I. が関与する可能性を示唆する。本研究は P. I. の血小板凝集抑制の機序を A. A. 代謝の面から解明しようとしたものである。用いた P. I. は次の 4 種である。① soybean trypsin inhibitor (SBTI) ② leupeptin ③ aprotinin ④ ethyl-p-(6-guanidino-hexanoyloxy) benzoate methane sulphonate (FOY)

〔方法ならびに成績〕

(1) P. I. による血小板凝集の抑制

正常人全血 9 容に 3.8% trisodium citrate 1 容で採血, 120g 10 分間室温で遠沈して得た platelet rich plasma (PRP) を用い, aggregometer (Sienco 社) にて観察した。尚 thrombin 凝集には Tangen の方法で得たゲルろ過血小板 (GFP) を用いた。ADP (終濃度 $3 \mu\text{M}$) 及び epinephrine (終濃度 $8.3 \mu\text{M}$) による 2 次凝集はいずれの P. I. によっても表 I の濃度において完全に抑制された。ADP (終濃度 $1.5 \mu\text{M}$), epinephrine (終濃度 $5 \mu\text{M}$) による 1 次凝集はいずれの P. I. によっても, またその高濃度によっても抑制は見られなかった。collagen (終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), sodium arachidonate (終濃度 0.9mM), thrombin (終濃度 $0.1 \text{IU}/\text{ml}$) による凝集はすべて, P. I. によって抑制された (表 I)。

(2) 血小板リン脂質プールからの A. A. 放出の抑制

PRP 1ml 当り $1 \mu\text{Ci}$ の [$1-^{14}\text{C}$] A. A. ($56.5 \text{mCi}/\text{m mol}$) を加え 37°C 1 時間 incubate し, free

(表 I) 各種inducerによる血小板凝集の完全抑制に必要なP.I.の最小濃度。

	ADP (3 μ M)	collagen (1 μ g/ml)	epineph. (8.3 μ M)	A. A. (0.9mM)	thrombin* (0.1U/ml)
S B T I	24 μ M	4.8 μ M	4.8 μ M	4.8 μ M	24 μ M
F O Y	240 μ M	240 μ M	240 μ M	24 μ M	24 μ M
aprotinin	20 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M
leup ptin	721 μ M	721 μ M	405 μ M	405 μ M	20 μ M

* thrombin induced aggregation was performed, using GFP.

A. A. を Sepharose 2B カラムクロマトグラフィーによって除いて得た 14 C-A. A.-GFP を用いて aggregometer 内で P. I. 存在下に thrombin (終濃度 0.1U/ml) 及び collagen (終濃度 10~20 μ g/ml) 凝集を行なった。反応を 4 分後に冷メタノールで止め、抽出した脂質を T. L. C にて分画し、各分画の比放射活性を算出した。加えた labelled A. A. の 15% が血小板内にとり込まれ血小板内の labelled A. A. の 90.7% が P. L. プール中に認められた。thrombin 凝集時には 9% の labelled A. A. が P. L. プールより放出され、1.24% の labelled thromboxane B₂ (TXB₂) が産生されたが、凝集がそれぞれの P. I. によって完全に抑制された時には labelled A. A. の放出は 1~3% に減じ、labelled TXB₂ の産生は 0.2% 以下と強く抑制された。collagen 凝集時にもほぼ同様の結果を得た。

(3) exogenous の 14 C-A. A. 及び 14 C-prostaglandin H₂ (PGH₂) の TXB₂ への転換に対する P. I. の効果。

P. I. 存在下に 14 C-A. A. あるいは 14 C-PGH₂ を洗浄血小板とともに incubate し、生成物を T. L. C. により分画して比放射活性を算出した。A. A. → TXB₂ の系では leupeptin は高濃度 (終濃度 100mM) まで抑制を示さず、SBTI, aprotinin は終濃度 10mM にて TXB₂ 及び HHT+others (HHT の zone に近接し分離できない PGH₂ その他を含む。) の生成を完全に抑制した。FOY は終濃度 10mM で TXB₂ の生成を完全に抑制したが、HHT+others の産生は完全には抑制されず、他の終末産物である PGE₂, D₂, F_{2 α} はかえって増加した。PGH₂ → TXB₂ の系では FOY は終濃度 10mM で TXB₂ の生成を完全に抑制したが、他の P. I. は著明な効果を示さなかった。

[総括]

(1) ADP, epinephrine の 1 次凝集は、各 P. I. の高濃度でも抑制されなかった。また ADP, epinephrine の 2 次凝集, collagen, thrombin, sodium arachidonate による凝集はいずれの P. I. によっても完全に抑制された。

(2) 血小板リン脂質プールからの A. A. 放出はいずれの P. I. によっても抑制された。

(3) exogenous A. A. の TXB₂ への代謝は aprotinin, SBTI, FOY, によって完全に抑制された。leupeptin は高濃度まで抑制を示さなかった。FOY を用いたときは同時に PGE₂, D₂, F_{2 α} の増加がみられた。HHT+others の産生は SBTI, aprotinin で完全に抑制されたが、FOY では HHT+others (おそらく PGH₂ と考えられる) の産生は抑制されなかった。

- (4) exogenous PGH₂のTXB₂への代謝はFOYで抑制されたが、aprotinin, SBTIでは著明でなかった。
- (5) 上述の結果から、P. I.の血小板凝集抑制機序はリン脂質プールよりのA. A.放出抑制と、A. A.に至る経路の抑制の2つが考えられ、後者に関してはaprotininとSBTIはcyclooxygenase, FOYはthromboxane synthetaseに対する阻害が推定された。
- (6) P. I.がリン脂質プールよりA. A.放出を抑制する事実は、膵のphospholipase Aのzymogenがtrypsinで活性化されることと考え合せ、血小板のphospholipase A₂も同様にzymogenがおそらく細胞膜に存在する未知のproteaseにより活性化されるという可能性が考えられる。
- (7) thromboxane synthetaseを特異的に阻害するimidazole及び1'(isopropyl-2-indolyl)-3-pyridyl-3-ketone (L8027)は血小板のA. A.凝集を阻害するが、他のinducerによる凝集を阻害しない。FOYはA. A.の放出及びthromboxane synthetaseの双方を阻害し、A. A.以外のinducerによる凝集をも阻害することから、これらの凝集の抑制にはthromboxane synthetaseの抑制のみでは不十分であり、A. A.放出の抑制作用をも有するFOYが血小板凝集抑制剤として有用である可能性を示している。

論文の審査結果の要旨

本研究は蛋白分解酵素阻害剤の血小板凝集抑制機序をアラキドン酸代謝の面から検討したもので、用いたロイペプチン、他3種類の蛋白分解酵素阻害剤はいずれも血小板膜リン脂質からのアラキドン酸放出を抑制し、加うるにSBTI及びアプロチニンがcyclooxygenaseに対する抑制効果を、またFOYはthromboxane synthetaseに対する抑制効果をもつことを明らかにしたものである。