OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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ーターの抑制の機序
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【15】

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 μM)及びepinephrine(終濃度8.3 μM）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 μM），epinephrine（終濃度5 μM）による1次凝集はいずれのP.I.によっても，またそれの高濃度によっても抑制は見られなかった。collagen（終濃度1 μg /mℓ），sodium arachidonate（終濃度0.9mM），thrombin（終濃度0.1U/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 μCiの〔1-^{14}C〕A.A.（56.5mCi/m mol）を加え37℃ 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 μM)	collagen (1 μg/mℓ)	epineph. (8.3μM)	A.A. (0.9mM)	thrombin* (0.1U/mℓ)
SBTI	24μM	4.8μM	4.8μM	4.8μM	24μM
FOY	240μM	240μM	240μM	24μM	24μM
aprotinin	20μM	5 μM	5 μM	5 μM	5 μM
leup ptin	721μM	721μM	405μM	405μM	20μM

* 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10～20μg/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 B_2(TXB_2)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 TXB_2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 H_2(PGH_2)のTXB_2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-PGH_2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.→TXB_2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TXB_2及びHHT＋others（HHTのzoneに近接し分離できないPGH_2その他を含む。）の生成を完全に抑制した。FOYは終濃度10mMでTXB_2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PGE_2, D_2, $F_{2\alpha}$, はかえって増加した。PGH_2→TXB_2の系ではFOYは終濃度10mMでTXB_2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TXB_2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PGE_2, D_2, $F_{2\alpha}$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PGH_2と考えられる）の産生は抑制されなかった。

(4) exogenous PGH_2のTXB_2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 A_2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の抑制のみでは不充分であり，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及びアプロチニンは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。