

Title	血漿von Willebrand因子に対する血小板レセプターのトロンビンおよびプロスタサイクリンによる影響
Author(s)	大原, 重和
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33441
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	^{おお} 大 ^{ほら} 原 ^{しげ} 重 ^{かず} 和
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5801 号
学位授与の日付	昭和57年10月6日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	血漿 von Willebrand 因子に対する血小板レセプターのトロンピンおよびプロスタサイクリンによる影響
論文審査委員	(主査) 教授 神前 五郎 (副査) 教授 木谷 照夫 教授 藤井 節郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

血管壁に損傷が加わると、この部位で血小板は活性化され、粘着、凝集、放出、血餅退縮という一連の反応がおこり血栓形成にいたり止血される。この血小板の止血作用に von Willebrand 因子(vWF)が重要な役割りを果していることが、von Willebrand 病の研究で明らかにされつつある。即ち von Willebrand 病は vWF の低下、欠如が原因で損傷血管壁への血小板粘着が障害され出血傾向を示すことが明らかにされた。しかし、vWF と血小板との相互関係についてはまだ充分解明されていない。近年、Kao らはリストセチンが血小板に作用すると、vWF は高い親和性をもって血小板あたり 3.1×10^4 個結合し(但しこの値は、vWF の分子量を 1.1×10^6 と仮定したときのものである)、この結合が血小板のリストセチン凝集と相関することを明らかにした。しかし、リストセチンは臨床診断には有用であるが非生理的物質である。そこで本研究は生体内で vWF と血小板との反応がいかにして惹起され又制御されているかを知るために、血管損傷部位で生成されるトロンピンと、血管内皮細胞で産生されるプロスタサイクリン (PGI_2) を用いて、vWF と血小板との結合について検討したものである。

〔方法ならびに成績〕

実験に用いた vWF は、濃縮第Ⅷ因子製剤より Sodetz らの方法で純化し、さらにアフィニティ・カラムを用いて、フィブリノゲン、フィブロネクチンを除去した。血小板は薬物摂取をしていない健康人より採血し、多血小板血漿を作製し、アルブミン濃度勾配による遠沈とゲルろ過法により血漿蛋白から分離し、実験に用いた。実験は、血小板にトロンピンを、次いで5分後にヒルディンを添加し、

^{125}I -vWF を添加して室温にて静置後、血小板浮遊液を比重 1.029 の油層の上に重層、遠沈して水層とペレットに分離し、それぞれの放射活性を測定した。即ち、水層の放射活性値は遊離の vWF 量を示し、ペレットのそれは血小板に結合した vWF 量を示す。

(1) vWF の純度

純化した vWF は、還元下で 5% SDS-PAGE にて単一の蛋白質バンドが得られた。又、 ^{125}I -vWF も蛋白質バンドに一致して、単一の放射活性ピークを示した。

(2) トロンビン刺激による ^{125}I -vWF の血小板への結合

トロンビン刺激による ^{125}I -vWF の結合は濃度依存性でトロンビン 0.01u/ml から有意の結合がみられ、0.05u/ml で最大の結合を示した。又、この結合は 30 分後に平衡状態に達した。過量の vWF、フィブリノゲン、フィブロンectin を添加して ^{125}I -vWF の結合の特異性をみると、vWF のみがこの結合を抑制した。リストセチンによる ^{125}I -vWF の結合は、グルタルアルデヒド固定血小板や、EDTA 含有緩衝液による洗浄血小板においてもみられたが、トロンビン刺激による ^{125}I -vWF の結合はこれらの血小板ではみられず、代謝活性の存在する血小板にのみみられ、キレート剤に感受性があった。トロンビン刺激により ^{125}I -vWF が結合した血小板を、還元下で 5% SDS-PAGE を行うと、コントロールの ^{125}I -vWF と同じ放射活性パターンが得られた。

(3) トロンビン刺激による血小板への ^{125}I -vWF の結合に対する PGI_2 の制御について

PGI_2 を、トロンビンによる血小板の活性化前後、および ^{125}I -vWF の結合が平衡状態に達した後に反応系へ添加して、その作用を検討した。 PGI_2 は濃度依存性にトロンビン刺激による血小板への ^{125}I -vWF の結合を抑制し、その効果は 1~10nM の濃度で観察された。また結合が平衡に達した後でも、 PGI_2 添加によって血小板から ^{125}I -vWF の解離がみられた。同様に反応系に dibutyryl c-AMP を添加した場合も PGI_2 と同様の結果を得た。

〔総括〕

(1) 低濃度トロンビン (0.01~0.05u/ml) の刺激によって、血小板に濃度依存性の ^{125}I -vWF の結合がみられた。この結合は、代謝活性の存在する血小板にのみ観察された。またこの結合は、特異性、飽和性という面からレセプターの概念を満足するものであった。

(2) PGI_2 はトロンビン刺激による血小板の vWF に対するレセプターの露呈を抑制し、さらにすでに結合した vWF を解離さす働きを有している。これらの作用は、dibutyryl c-AMP によっても再現されることより血小板内 c-AMP が vWF に対するレセプターの制御に関与していることが推察された。

(3) 血管損傷部位で発生した微量のトロンビンは血小板に作用し vWF との結合を促がす。この結合から血小板粘着、凝集、放出、血餅退縮と反応が進むが、一方では血管壁で産生される PGI_2 が過剰な血栓形成を抑制し、ここに一定の平衡化が保たれているものと想像される。

論文の審査結果の要旨

本研究は、血管損傷部位で生成されるトロンピンと、血管内皮細胞で産生されるプロスタサイクリンを用いて、血漿 von Willebrand 因子 (vW因子) と血小板との相互関係を検討したところ、微量のトロンピンによって血小板に vW因子に対するレセプターが出現し、vW因子が血小板に結合して止血に役立つものと考えられ、プロスタサイクリンがこれに拮抗することを明らかにしたものであって、価値ある研究と考えられる。