



| | |
|--------------|--|
| 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 | 大阪大学, 1982, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33441 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | | | | |
|---------|--|------|-----|-----------|
| 氏名・(本籍) | 大 | 原 | 重 | 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ビ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關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ビンと、血管内皮細胞で産生されるプロスタサイクリン (PGI₂) 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VII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、血小板にトロンビンを、次いで 5 分後にヒルディンを添加し、

$^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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、 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ の血小板への結合

トロンビン刺激による $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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、フィブロネクチンを添加して $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ の結合に対する PGI₂ の制御について

PGI₂ を、トロンビンによる血小板の活性化前後、および $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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。PGI₂ は濃度依存性にトロンビン刺激による血小板への $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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、PGI₂ 添加によって血小板から $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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 PGI₂ 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 $^{125}\text{I}-\text{vWF}$ 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) PGI₂ 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 を解離させる働きを有している。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 との結合を促進する。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 PGI₂ 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ビンと、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、微量のトロンビ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。