



Title	血小板ATP放出反応の測定と解析
Author(s)	東, 照正
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34967">https://hdl.handle.net/11094/34967</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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)	東	照	正
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	6956	号
学位授与の日付	昭和	60年	7月4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	血小板ATP放出反応の測定と解析		
論文審査委員	(主査) 教 授 中馬 一郎		
	(副査) 教 授 中山 昭雄 教 授 和田 博		

## 論文内容の要旨

## (目的)

血小板からはATP, ADP, セロトニン等が放出される。この放出反応は凝集反応とともに、血栓形成・止血に大きな役割を果たすことが知られている。その全過程を連続的に追跡することは、血小板の放出反応機構を解明するためには基本的に重要であるが、方法論的な困難のために現在までは放出物質の最終総量を測定するに止まっていた。本研究では、血小板から放出されるATPをホタル・ルシフェラーゼ・ルミネッセンス法で連続測定し、ATP放出量曲線を求める方法について考察した。

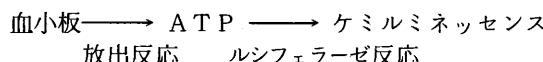
## (方法ならびに成績)

## ① 実験系の概要

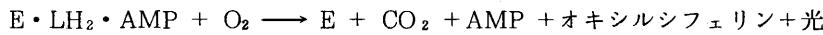
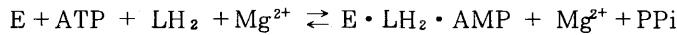
ケミルミネッセンス測定装置付き血小板凝集計（クロノログ社製ルミアグリゴーメータ）の測定セルに、ホタル・ルシフェラーゼ酵素系を混入した洗浄血小板浮遊液を入れ、コラーゲンを加えると血小板からATPが放出され、これを基質としてこの系は発光する。連続的に測定された発光強度曲線の全過程を以下のようにATP消費や生成物阻害を考慮して解析することで、血小板のATP放出量曲線を得ることができる。

## ② 放出ATP濃度の計算法

血小板からATPが放出されると測定セル内では次のような反応が進行する。



また、ルシフェラーゼ反応はミハエリスーメンテン型の酵素反応であり、次式で表現される。



(E: ルシフェラーゼ, LH<sub>2</sub>: ルンフェリン)

①の実験系では、ATP以外の基質が大過剰であること、生成物のオキシルシフェリンが非拮抗的阻害物質であること、放出ATP量(約10 μM)はミハエリス定数(Km: 150 μM)より充分小さいことを考慮すると、

$$C_t = S_t + I_t$$

$$v_t = \frac{V_{max} \cdot S_t}{K_m (1 + \frac{I_t}{K_i})}$$

となり、これから次式が導びかれる。

$$C_t = \frac{v_t}{V_{max}} (1 + \frac{I_t}{K_i}) + I_t$$

ここで、C<sub>t</sub> : 時間 t までに放出されたATP濃度

S<sub>t</sub> : 時間 t における測定セル内のATP濃度

I<sub>t</sub> : 時間 t におけるオキシルシフェリン濃度

v<sub>t</sub> : ルシフェラーゼ反応速度

V<sub>max</sub> : その最大速度

K<sub>m</sub> : ミハエリス定数

K<sub>i</sub> : 阻害定数

である。

したがって、あらかじめ既知濃度のATP溶液を使ってV<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>, K<sub>i</sub>を求めておけば、各時間の実測値v<sub>t</sub>とI<sub>t</sub>(時間 t までの v<sub>t</sub> の積分値)をこの式に代入することで、反応の全過程で放出ATPの濃度C<sub>t</sub>求めることができる。

### ③ 実験結果の検討

①の実験系で得られる発光強度曲線は、S字状に急上昇したあとATP消費と生成物阻害のため減衰傾向を示す。しかし、これから②の解析法で求められるATP放出量曲線ではこのようなことが起こらない。放出反応の途中で部分標本を採り、Devidの方法でATP量を定量すると、両方の結果は良く一致する。このことから、先に仮定した反応機構と、それに基づいて得られる補正曲線は、正しいATP放出量曲線を与えるものと考えることができる。

### (総括)

放出反応とともに血小板の重要な生理機能の一つに、凝集反応がある。その反応過程を凝集塊に取り込まれていない遊離血小板数の減少で追跡し、詳細な検討を加えてみると、指數関数的な減少経過をたどる場合と、そうでない場合がある。これは、血小板の内部環境と血漿成分等の外部環境が、凝集反応

速度のみならず、凝集反応機構にも影響をおよぼすことを示唆している。

放出反応においても、同様の速度論的検討を加えて放出反応機構を解明するためには、その全過程を定量的かつ連続的に追跡する、この解析法が有用な手段の一つとなるであろう。

#### 論文の審査結果の要旨

本研究は、従来、方法論的な困難のために、放出ATPの最終総量のみしか知ることのできなかった血小板ATP放出反応で、その全過程を追跡する解析法を、初めて提示したものである。また、この解析法の実用性については、充分の検討がなされている。したがって、放出反応機構の生理学的解明や、各種疾患における血小板機能の変化の把握など、将来、大いに利用できるものであり、医学の進歩に貢献するところ、少なくないものと認める。