



Title	Platelet microparticle : a carrier of platelet-activating factor. The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation
Author(s)	岩本, 伸一
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41237
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 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	岩 本 伸 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 9 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 7 月 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Platelet microparticle: a carrier of platelet-activating factor. The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation. (血小板活性化因子の担体としての血小板マイクロパーティクルとその放出機構の検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 松 田 暉 教 授 金 倉 讓

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

血小板は種々の刺激により形態変化及び分泌反応が惹起されるが、その際に直径0.2-0.5 μm の細胞膜成分よりなるマイクロパーティクル (MP) が遊離される。また、活性化血小板からは platelet-activating factor (PAF) が血中に放出されることが知られている。本研究の目的は PAF が分子として放出されているのか、あるいは MP を担体として放出されるのか検討することにより、PAF の全く新しい放出様式の可能性を探ることである。

[方法]

(1) トロンピン+コラーゲンの同時刺激による血小板からの MP 放出と PAF 産生：健康人末梢血よりプロスタグランディン I_2 存在下に 2 回洗浄操作を行い洗浄血小板を調製した。1 mM Ca^{2+} 存在下に、thrombin (0.5 U/ml) と collagen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で同時刺激し 37°C、10 分間反応させた。5 mM EGTA を加え 4°C にて反応停止させ、14,000 g 1 分遠心操作を行い血小板分画を得た。その上清を更に 4°C にて 100,000 g で 150 分間遠心し、その pellet (MP 分画)、及び上清を得た。各分画 (血小板分画, MP 分画, 上清) について抗 GP IIb/IIIa 抗体 (NNKY 1-32) を用いて免疫染色を行い、flowcytometer にて血小板と MP を同定した。同時に各分画より Bligh and Dyer 法にて脂質抽出を行った。PAF の定量は家兎洗浄血小板を用いた bioassay 法にて行った。PAF の同定は、1 mM aspirin にて血小板凝集が抑制されず、抗 PAF 剤 (50 nM E5880) により血小板凝集が抑制されることにより行った。(2) ずり応力刺激による MP 放出と PAF 産生：洗浄血小板に 1 mM Ca^{2+} , von Willebrand Factor (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), fibrinogen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、各々 108, 12 dyne/cm² の shear-stress を cone and plate type viscometer を用いて、3 または 6 分間負荷した。その後(1)と同様の操作にて遠心操作を行い、血小板分画, MP 分画, 上清の免疫染色を行い、既知の濃度の control beads を用いて MP の定量を行った。各分画の PAF 定量、定性は(1)と同様に bioassay 法にて行った。MP/血小板の体積比を FACS can Research software を用いて算出し、各分画の PAF 量分布から体積あたりの PAF 量を推定した。

[成績]

(1) 3×10^8 個の血小板より10分間に産生された総 PAF 量は 2.5×10^{-11} mol であった。血小板より放出されたものは 4.6×10^{-12} mol (18.4%) であった。MP 中には 4.0×10^{-12} mol の PAF が存在し、放出された PAF の87%に相当していた。なお、凝集反応はすべて50 nM の E5880によって完全に抑制され aspirin には抑制されなかった。また MP に結合した PAF は0.1%アルブミン洗浄にても除去されなかった。

(2) 3分間の shear-stress 負荷 (108 dyne/cm^2) では 3×10^8 個の血小板内に PAF は産生されていたが (2.4×10^{-15} mol), 放出は認められなかった。6分間の shear-stress 負荷 (108 dyne/cm^2) では血小板より 3.7×10^{-15} mol の PAF が産生され、そのうち 0.5×10^{-15} mol が放出されており、放出された PAF の80% (0.4×10^{-15} mol) が MP を担体として放出されていた。MP は3分から6分にかけて倍増した (MP/control beads ratio: 3 min=0.85, 6 min=1.64)。12 dyne/cm^2 の shear-stress 負荷にては PAF 産生, MP 放出共に認められなかった。software の解析から MP/血小板の体積比は 1/116.47であり PAF 量分布と比較して MP 上の PAF は血小板に比して30倍濃縮されていた。

[総括]

トロンビンとコラーゲンの同時刺激により血小板から放出された PAF の87%が MP に結合していた。更に、より生理的刺激であるはずり応力下での血小板凝集でも放出された PAF の80%が MP に結合していた。この知見は PAF の放出機構における全く新しい概念を提唱するものである。

論文審査の結果の要旨

血小板は刺激時、形態変化が惹起されマイクロパーティクルという直径0.2-0.5 μm の微粒子が放出されることが知られている。

本研究は、マイクロパーティクルが血小板活性化因子 (PAF) の放出担体として機能していることを示したものである。刺激としてトロンビンとコラーゲンの同時刺激及びずり応力刺激を用いた。両刺激ともに PAF を放出産生していたが、放出された PAF の各々87%, 80%が超遠心操作にて分離されたマイクロパーティクル分画に存在していた。このことから PAF は放出時、マイクロパーティクルに結合して放出されるものと考えられた。またこのマイクロパーティクル結合 PAF は free form の PAF 同様、アセチルヒドロラーゼによる水解をうけていた。さらにマイクロパーティクルと血小板の体積比と PAF の分布比から PAF は放出時、マイクロパーティクルに30倍濃縮されて放出されることが解明された。本研究は free form で放出され则认为られていた lipid mediator の放出機構における新しい概念を提唱するものであり学位に値すると思われる。