

---



---

 学 会 記 事
 

---



---

## 新潟血栓止血研究会10周年記念特別例会記録

日 時 平成2年10月27日

会 場 有壬記念館

## 前 言

新潟血栓止血研究会は、新潟地区の血小板・凝固・線溶の基礎、出血素因および各種血栓症の診断治療、再発防止に関する、内科系及び外科系の医師、研究者、検査技師の研究会として、昭和54年に発足し、年2回、新潟、長岡、高田などで開催されてきた。地区の病院のこの方面の検査レベルを上げるため、大抵の例会で臨床検査のワークショップも企画されてきた。平成2年、第20回

(10周年)を記念して、新潟、山梨地区におけるこの方面の最近の研究の現状、診療の進歩、10年間の業績を中心に発表されたものがこの記録である。松岡名誉教授も来港され、医師と医の道について御講話された。なお特別講演は京都大第一内科大熊稔教授による、“血小板機能異常症研究の進歩”であった。

終に、終始この会を御協賛して下さった株式会社ミドリ十字に厚く御礼申し上げます。(新潟血栓止血研究会事務局 服部 晃記)

## 1) 血小板機能異常症の診断と病態解析の進歩

新潟大学第一内科 布施 一郎・樋口 渉  
水戸 将郎・服部 晃  
柴田 昭

新潟県立新発田病院内科 竹重 富雄

 Development of Investigations about Platelet Activation Pathway and  
Recent Progress in Diagnosis of Platelet Dysfunctions

Ichiro FUSE, Wataru HIGUCHI, Masao MITO  
Akira HATTORI and Akira SHIBATA

*The First Department of Internal Medicine,  
Niigata University School of Medicine*

Reprint requests to: Ichiro FUSE, M.D.,  
the First Internal Medicine, Niigata  
University School of Medicine,  
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,  
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学第一内科

布施 一郎

Tomio TAKESHIGE

The Department of Internal Medicine,  
Shibata Prefectural Hospital

A review of recent progress in the investigations and analytical methods of platelet activation pathway, including signal transduction,  $Ca^{2+}$  mobilization, and arachidonate metabolism are described. The most striking developments in the research about platelet activation pathway are the presence of GTP-binding proteins (G-protein) in platelet membranes, which are coupled to thrombin, PAF or thromboxane  $A_2$  receptor. The role of G-protein in signal transduction are also described in this paper.

Key words: platelet activation pathway, platelet dysfunction, GTP-binding protein  
血小板活性化機構, 血小板機能異常症, G 蛋白

緒 言

血小板は種々の agonist に反応して粘着, 凝集, 放出という一連の反応を起こす事は良く知られている。近年, 血小板は単離が容易で, 活発な生化学的代謝を営んでいることから, 生物学あるいは生化学的分野での研究が盛んで, receptor 解析, signal transduction, Ca 動員機構など, すべての生物細胞に共通する細胞応答の代表的なモデルとしてますますその存在価値を増してきている。これらの研究の進歩から, 新しい type の血小板機能異常症が次々と発見され, 10年前には想像もできないような多種多様な検査法が今日では日常臨床に取り上げられつつあるのが現状である。ここでは, 現在までに判明している血小板活性化機構の概要と, それらの検査法を中心に紹介することとする。

I. 血小板活性化機構について (図 1)

血小板は thrombin, collagen, PAF (platelet activating factor), thromboxane  $A_2$  (以下  $TXA_2$ ) などの agonist 刺激を受けると凝集および放出反応をおこす。この細胞外から細胞内への刺激伝達経路 (signal transduction) の詳細な検討は, 血小板において最も精力的に行われており, 上記 agonist の receptor に, G 蛋白が couple していることが近年明らかにされてきている<sup>1)-3)</sup>。すなわち agonist と receptor との結合により, まず G 蛋白が活性化され, 次いで phospholipase C (以下 PLC) ないしは phospholipase  $A_2$  (以下  $PLA_2$ ) の活性化が起こり, 血小板の一連の生化学的代謝が進行する。血小板の凝集, 放出に関する key enzyme は前述の PLC,  $PLA_2$  であり, 前者はおもに血小板膜中の phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate

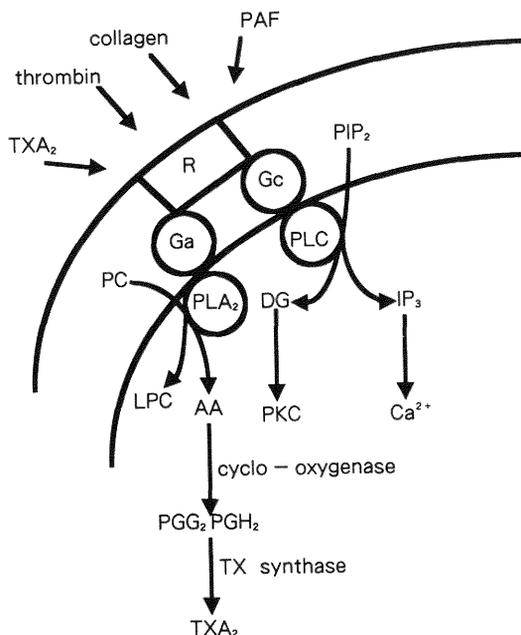


図 1 血小板活性化機構

PAF: platelet activating factor,  $TXA_2$ : thromboxane  $A_2$ , R: receptor, Ga, Gc: G-protein,  $PIP_2$ : phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, PLC: phospholipase C,  $PLA_2$ : phospholipase  $A_2$ , DG: diacylglycerol,  $IP_3$ : inositol-1, 4, 5-trisphosphate, PKC: protein kinase C, PC: phosphatidylcholine, LPC: lysophosphatidylcholine, AA: arachidonic acid,  $PGG_2$ ,  $PGH_2$ : prostaglandin  $G_2$ ,  $H_2$ .

( $PIP_2$ ) を水解し, second messenger として重要な diacylglycerol (DG) と, inositol-1, 4, 5-trisphosphate

(IP<sub>2</sub>)を産生する<sup>4)-6)</sup>. DGはprotein kinase Cを活性化する事で血小板機能を modify し, IP<sub>3</sub>は血小板内のCa動員を惹起する<sup>7)8)</sup>. PLA<sub>2</sub>は, 血小板膜中の磷脂質から遊離アラキドン酸を切り出す酵素として重要で, 切り出されたアラキドン酸はcyclo-oxygenaseによりPG endoperoxides (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>)に変換され, 更にTX synthaseの作用で, より強力な血小板凝集惹起物質であるTXA<sub>2</sub>に変換される.

## II. 血小板機能異常症 (血小板放出機構異常症) の診断に関する主な検査法

血小板機能異常症を診断するための第一歩は, まず凝集能検査であることは言うまでもない. この場合, 凝集惹起剤としてはADP, コラゲン, アラキドン酸, STA<sub>2</sub> (thromboxane analogue), 及びCa ionophoreであるA23187が重要で, これらに対する凝集能の反応態度の組合せから表1のごとく, およその異常部位の鑑別が可能である.

血小板放出機構異常症の異常部位を確定するための検査には大別して4種類がある(表2). その第一はアラキドン酸代謝異常の有無を調べる検査で, phospholipase

表1 血小板放出異常症の鑑別

凝集惹起剤	SPD		放出機構異常症			
	δ-SPD	α-SPD	PCO 欠損	TXs 欠損	TXA <sub>2</sub> 反応障害	Ca 動員障害
ADP (一次)	N	N	N	N	N	N
ADP (二次)	D	↓	D	D	D	D
コラゲン	↓	↓	↓	↓	↓	↓
アラキドン酸	N	N	↓	↓	↓	↓
STA <sub>2</sub> (thromboxane analogue)	N	N	N	N	↓	↓
A23187	↓	N/↓	↓	↓	↓	↓
その他	ATP 放出 ↓ ATP, ADP ↓ ATP/ADP ↓	β-TG ↓ PF-4 ↓	PGG <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> :N	PGG <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> : ↓	PGG <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> : ↓	PGG <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> : ↓

N: normal response

D: defective

表2 血小板放出機構異常症の検査法

### I) アラキドン酸代謝に関する検査

#### 1) Phospholipase A<sub>2</sub> 活性

<sup>14</sup>C-アラキドン酸をラベルした血小板を用いてその release を測定

#### 2) Cyclo-oxygenase and Thromboxane synthetase 活性

① <sup>14</sup>C-アラキドン酸で血小板を刺激→TLCで解析

② MDA 産生量測定

③ 刺激血小板上清中のTXB<sub>2</sub>→HPLC, RIAで測定

④ TX synthetase を独立して測定→<sup>14</sup>C-PGG<sub>2</sub>と血小板を孵置→TLC

### II) Ca 動員に関する検査

Quin 2, Fura 2, Aequorin 等を用いて解析

### III) PGG<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> Receptor に関する検査

[<sup>3</sup>H]-U46619, [<sup>125</sup>I] PTA-OH と血小板ないしは血小板膜との結合実験

### IV) PI 代謝ないしはG蛋白に関する検査

① [<sup>3</sup>H]-myo-inositol ラベルによる inositol phosphates の測定

② <sup>14</sup>C-アラキドン酸ラベルによる PA, DG の測定

③ <sup>32</sup>P ラベルによる 20k, 40(47)k 蛋白の磷酸化

④ NaF, GTPγS 刺激による上記代謝物の測定

A<sub>2</sub>, cyclo-oxygenase, thromboxane synthase 各々の酵素活性を独立して調べる方法と、アラキドン酸刺激で産生される TXB<sub>2</sub> ないしは MDA (malondialdehyde) を cyclo-oxygenase と thromboxane synthase 活性の総和として測定する方法がある。TXB<sub>2</sub> は radioimmunoassay (RIA) や HPLC<sup>9)</sup> で、MDA は TBA 法<sup>10)</sup> で測定する。後者の方が簡便で、アイソトープを使わないですむため、臨床的なスクリーニング検査として重要である。

血小板内 Ca 動員に関する検査には aequorin 法<sup>11)</sup>, Quin 2 法<sup>12)</sup>, Fura 2 法<sup>13)</sup> などがあるが、各々に長所短所があり、又、反映される Ca の部位や局在も違うので時宜に応じた選択が望まれる。

PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> receptor に関する検査は、今回省略するが、PI 代謝を調べる検査法の内、最も重要なものは PLC 活性の測定である。PLC 活性の測定には <sup>3</sup>H-myoinositol でラベルした血小板を用いて IP<sub>3</sub> 産生を見るか、<sup>14</sup>C-アラキドン酸でラベルした血小板を用いて DG, PA (phosphatidic acid) 産生を見る方法がある。又、最近ではラベルした血小板を用いずとも直接 RIA 法で IP<sub>3</sub> 産生を測定できるキットも市販されており、より簡単にこれらの検査が行えるようになってきた。蛋白質磷酸化に関しては、<sup>32</sup>P でラベルした血小板を用いて PKC の基質である 47K (40K) 蛋白や、Ca-calmodulin dependent protein kinase の基質である 20K 蛋白の磷酸化を SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で判定する方法が一般的に行われている。

又、近年にわかに注目を集めている G 蛋白の機能検査はまだ歴史が浅い事もあって一般的ではない。著者らは G 蛋白の活性化剤として NaF を用い、血小板において IP<sub>3</sub> や TXB<sub>2</sub> が産生されることを報告しており<sup>14)</sup>、慢性骨髄増殖症候群の血小板においては NaF に対する反応性が低下する例のあることも報告している<sup>15)</sup>。したがって、G 蛋白の機能異常や欠損が疑われる症例では、NaF 刺激後の TXB<sub>2</sub> や IP<sub>3</sub> 産生量を前述の方法で測定する事が有用と思われる。

## 終 わ り に

血小板の活性化機構を巡る研究は、現在日進月歩の勢いであり、障害部位の不明な血小板機能異常症もいずれはその詳細が明らかにされるものと思われる。今後の進展に期待したい。

## 参 考 文 献

- 1) **Agranoff, B.W., Murthy, P. and Seguin, E.B.:** Thrombin-induced phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylinositol bisphosphate in human platelets. *J Biol Chem*, **258**: 2076~2078, 1983.
- 2) **Watson, S.P., Reep, B., McConnell, R.T. and Lapetina, E.G.:** Collagen stimulates <sup>3</sup>H-inositol triphosphate formation in indomethacin-treated human platelets. *Biochem J*, **226**: 831~837, 1985.
- 3) **Billah, M.M. and Lapetina, E.G.:** Platelet activating factor stimulates metabolism of phosphoinositides in horse platelets. Possible relationship to Ca<sup>2+</sup> mobilization during stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**: 965~968, 1983.
- 4) **Nishizuka, Y.:** The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, **308**: 693~698, 1984.
- 5) **Berridge, M.J.:** Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J*, **220**: 345~360, 1984.
- 6) **Berridge, M.J. and Irvine, R.E.:** Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**: 315~321, 1984.
- 7) **O'Rourke, F.A., Halenda, S.P., Zavoico, G.B. and Feinstein, M.B.:** Inositol, 1, 4, 5-triphosphate releases Ca<sup>2+</sup> from a Ca<sup>2+</sup>-transporting membrane vesicle fraction from human platelets. *J Biol Chem*, **260**: 956~962, 1985.
- 8) **Adunyah, S.E. and Dean, W.L.:** Inositol triphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release from human platelet membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, **128**: 1274~1280, 1985.
- 9) **布施一郎:** 血小板アラキドン酸代謝の HPLC による解析. *新潟医学会誌*, **100(10)**: 614~621, 1986.
- 10) **Okuma, M., Steiner, M. and Baldini, M.:** Studies on lipid peroxides in platelets. I. Method of assay and effect of storage. *J Lab Clin Med*, **75**: 283~296, 1970.
- 11) **Johnson, P.C., Wane, J.A., Cliveden, P.B., Smith, M., Dvorak, A.M. and Salzman, E.W.:** Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein Aequorin. Comparison with

- Quin 2. *J Biol Chem*, **260**: 2069~2076, 1985.
- 12) **Tsien, R. Y.**: New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis and properties of phenotypic structures. *Biochemistry*, **19**: 2396~2404, 1980.
- 13) **Tsien, R. Y., Rink, T. J. and Poenie, M.**: Measurement of cytosolic free  $Ca^{2+}$  in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell calcium*, **6**: 145~157, 1985.
- 14) **Fuse, I. and Tai, H. H.**: Stimulation of arachidonic acid release and inositol-1, 4, 5-triphosphate formation are mediated by distinct G-proteins in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, **146**: 659~665, 1987.
- 15) **Fuse, I.**: NaF-induced platelet responses in patients with congenital platelet dysfunction and chronic myeloproliferative disorders. *Acta Haematologica JPN*, **53**(6): 146~159, 1990.
- 16) **Nakanishi, K., Ikeda, K., Hato, T., Imai, A., Kaneko, H., Murakami, A., Kuwashima, K., Kaido, H., Kondo, M., Hattori, A., Fujita, S. and Kobayashi, Y.**: Platelet cyclo-oxygenase deficiency in a Japanese. *Scand J Haematol*, **32**: 167~174, 1984.
- 17) 布施一郎, 服部 晃, 高橋芳右, 長山礼三, 滝沢慎一郎, 花野政晴, 小池 正, 柴田 昭: 血小板 cyclo-oxygenase 欠損症に関する研究. *日血会誌*, **47**(5): 102~110, 1984.
- 18) **Hattori, A. and Ihzumi, T.**: A morphological study on a familial release mechanism abnormality characterized by defective A23187-induced aggregation. *Acta Haematol Jpn*, **43**: 1115~1167, 1980.
- 19) **Hattori, A., Takahashi, H., Takahashi, M., Shibata, A.**: A new familial defect of platelet release mechanism (intracellular  $Ca^{2+}$  transport defect?) *Acta Haematol Jpn*, **44**: 969~972, 1981.
- 20) **Fuse, I., Hattori, A., Nagayama, R.**: Characterization of platelet cytoplasmic  $Ca^{2+}$  mobilization in patients with congenital cyclo-oxygenase deficiency and with defective aggregation to A23187. *Acta Haematologica JPN*, **52**(8): 1522~1533, 1989.
- 21) 服部 晃, 長山礼三, 布施一郎, 柴田 昭: 新しい血小板放出機構異常症 (トロンボキサン  $A_2$  不応症) の研究. *病態生理*, **7**: 577~579, 1988.