原 著

血栓形成における血小板反応性の役割
——自然発症高血圧ラット (SHR) での観察成績——間下 信昭* 松原 修** 本宮 武司*** 菊谷 典久***
榊原千枝子*** 渡辺 節子*** 山崎 博男***The role of platelet reactivity in thrombogenesis: Observation
on platelet behavior in spontaneously hypertensive rats (SHR)Nobuaki MASHIMO*, Osamu MATSUBARA**, Takeshi MOTOMIYA***,
Norihiisa KIKUTANI***, Chieko SAKAKIBARA***,
Setsuko WATANABE*** and Hiroh YAMAZAKI***

Key words : platelet aggregation, SHR, pulmonary thromboembolism,
platelet exhaustion, hypertensive vascular injury

Platelet aggregation is an important phenomenon in the first step of thrombogenesis. When platelets aggregate, ADP and other platelet aggregating and vasoactive substances may release. We reported that an injection of ADP caused pulmonary thromboembolism in rats associated with transient effects including thrombocytopenia, apnea, arrhythmia, rise in central venous pressure and fall in arterial blood pressure, while these changes were less severe in SHR. In this study, platelet aggregability and thrombogenic tendency in response to ADP were analysed in SHRs in comparison with those in the control rats. 30 Wistar rats (control) and 30 SHRs (20—30 weeks old) were used. Blood samples were taken from carotid artery cannula for an analysis of platelet count, platelet volume and platelet aggregation by ADP. ADP (1 mg/kg) was injected rapidly into the jugular vein of anesthetized rats. After ADP injection, blood samples were taken at 30 sec, 3, 10, 20 and 30 min. ECG and respiration were recorded continuously. Before ADP injection, platelet count (control; 53.1, SHR; $53.0 \times 10^4/\mu\text{l}$), the mode related platelet volume (control; 2.6, SHR; $2.7\mu^3$) and platelet ADP content (control; 2.4, SHR; $2.7\mu\text{moles}/10^{11}\text{pl.}$) were not different between the two groups. Maximum intensity of ADP ($10\mu\text{M}$) aggregation was significantly lower in SHR ($39.4 \pm 4.8\%$) than in the control ($50.3 \pm 5.1\%$) ($p < 0.05$). After the injection, platelet count decreased to 59.7 % of preinjection

* 横浜南共済病院第一内科 [〒236 横浜市金沢区六浦町500], 1st Department of Internal Medicine, Yokohama South Mutual aid Association's Hospital, Yokohama, Japan.

** 東京医科歯科大学医学部病理, Department of Pathology, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine, Tokyo, Japan.

*** 東京都臨床医学総合研究所循環器, Division of Cardiovascular Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

level at 30 sec ($p<0.01$) and returned to 93.8% at 3 min in the control; 90.5% at 30 sec ($p<0.01$) and 74.9% at 3 min in SHR. Platelet ADP content decreased to 61% at 10 min in the control, while little change in SHR. Arrhythmia and apnea observed after ADP injection were significantly longer continued in the control ($p<0.01$). Histological study revealed that pulmonary microvasculature was frequently filled with platelet thrombi in the control and seldom in SHR. The lower incidence in pulmonary microthromboembolism in SHR might be related to its in vitro hypoaggregability of platelet due to the insufficient release reaction. The lower response of platelet might be explained by exhaustion under hypertensive stress, though further investigation is required.

序 言

血管障害とそれに伴う血栓形成において血小板と血管壁の相互反応が重要である¹⁾。さきにわれわれは ADP を Wistar ラットに 1 回静注後に、血小板数減少とともに無呼吸、不整脈などの心肺機能障害が出現し、肺に血小板血栓が発生することを観察し、実験的肺血栓モデルとして有用であることを報告した²⁾³⁾。さらに自然発症高血圧ラット (SHR) で同様の実験を行うと、血小板数減少と心肺機能障害が軽微な傾向にあることを認めた³⁾。今回は、正常 Wistar ラットと SHR にみられた ADP 静注による反応の差を血小板機能との関連のもとに検討した。

I. 対象および方法

体重約 300 g の雄性 SHR 30 匹および対照として体重約 500 g の Wistar 種の雄ラット 30 匹を使用した。両群とも生後 20~30 週で、SHR は食塩水を飲料水として 10~20 週間投与し、尾動脈血圧測定にて 200 mmHg 以上の高血圧を呈したものを使用した。

1) in vitro 実験：対照ラットおよび SHR にウレタン 750 mg/kg 腹腔内麻酔下で頸動脈にカニューレを挿入し、血液 9 ml を 3.8% クエン酸ソーダ 1 ml 入りのプラスチック注射器に採取し、遠沈により PRP および PPP を作製した。PRP 中の血小板数を 300,000/ μ l になるように PPP にて希釈した。血小板凝集能は ADP (Sigma 社製) 10 μ M, 3 μ M (終濃度) および コラーゲン (Holmon-Chemie 社製) 30 μ g/ml (終濃度) を加え、Sienco 社製凝集計を用いて

観察記録した。

2) in vivo 実験：すでに報告したように³⁾、対照ラットおよび SHR をウレタン 750 mg/kg 腹腔内麻酔下に固定、気管切開を行いカニューレを挿入し自発呼吸を許した。一側の頸動脈および頸静脈にそれぞれ 3 F カテーテルを挿入し、動脈圧および中心静脈圧を測定した。同時に心電図および呼吸曲線を観察記録した。

ADP 1 mg/kg を中心静脈に急速注入し、投与前、投与後 30 秒, 3, 10, 20, 30 分に頸動脈カテーテルより血液 0.9 ml を 3.8% クエン酸ソーダ 0.1 ml 入りのプラスチック注射器にとり、室温静置して PRP を分離し、Coulter Counter ZBI にて血小板数を、Coulter Channelyzer にて血小板容積分布を測定した。また一部検体は血小板 ADP, ATP 含有量測定に供した。方法は Holmsen らの方法に準じ⁴⁾、各試料に等量のエタノール・EDTA 液を加えて抽出し、firefly luciferase 法を用いて、SAI 社製 ATP-Photometer にて測定した。また肺標本をヘマトキシリン・エオジンにて染色し、組織学的検討を加えた。

II. 結 果

1) ADP 静注前の血小板機能

表 1 に示すように、ADP 静注前、血小板数は対照 $53.1 \pm 28.5 \times 10^4 / \mu$ l ($\bar{X} \pm S.D.$)、SHR $53.0 \pm 14.5 \times 10^4 / \mu$ l、血小板容積最頻値は対照 2.6 ± 0.6 、SHR $2.7 \pm 0.8 \mu^3$ 、血小板 ADP・ATP 含有量はそれぞれ対照 2.4 ± 0.7 , 5.1 ± 1.2 、SHR 2.7 ± 0.4 , $5.4 \pm 1.0 \mu$ moles/ 10^{11} 血小板と両者間に有意の差を認めなかった。しか

Table 1 Change in platelet count and cardiopulmonary functions after ADP injection in the SHR and the control rats.**Changes after ADP injection**(Mean $\pm$ S.D.)

	before	30 sec.	3 min.	10 min	20 min.	30 min.
SHR						
pl. count	53.0 $\pm$ 14.5 $\times 10^4 / \mu\text{g}$	90.5 $\pm$ 11.3% [★]	74.9 $\pm$ 17.9%	100.1 $\pm$ 21.3%	83.8 $\pm$ 8.8%	84.0 $\pm$ 24.0%
heart rate	378.6 $\pm$ 33.9/min.	68.0 $\pm$ 14.5% [★]	98.7 $\pm$ 5.4%	97.3 $\pm$ 9.4%	92.7 $\pm$ 10.1%	84.5 $\pm$ 9.1%
respiratory rate	96.0 $\pm$ 30.1/min.	106.3 $\pm$ 29.6% [※]	108.7 $\pm$ 15.2%	92.3 $\pm$ 19.8%	77.6 $\pm$ 17.5%	71.5 $\pm$ 19.4%
arterial blood pressure	127.3 $\pm$ 11.9 mmHg	69.3 $\pm$ 14.1% [※]	86.0 $\pm$ 11.9%	88.0 $\pm$ 11.2%	78.8 $\pm$ 20.3%	75.7 $\pm$ 16.0%
central venous pressure	0	1.0 $\pm$ 1.4 cmH ₂ O [★]	0	0	0	0
pl. ADP content	2.7 $\pm$ 0.4 $\mu\text{moles} / 10^6 \text{ pl.}$	—	88%	107%	—	92%
pl. ATP content	5.4 $\pm$ 1.0 $\mu\text{moles} / 10^6 \text{ pl.}$	—	102%	98%	—	106%
Control						
pl. count	53.1 $\pm$ 28.5 $\times 10^4 / \mu\text{g}$	59.7 $\pm$ 22.4%	93.8 $\pm$ 15.4%	93.6 $\pm$ 25.3%	92.3 $\pm$ 33.4%	101.7 $\pm$ 25.1%
heart rate	336.7 $\pm$ 44.5/min.	35.9 $\pm$ 15.7%	100.4 $\pm$ 10.3%	95.6 $\pm$ 7.5%	94.0 $\pm$ 5.5%	99.8 $\pm$ 11.9%
respiratory rate	108.0 $\pm$ 27.3/min.	65.5 $\pm$ 55.0%	100.9 $\pm$ 13.3%	90.4 $\pm$ 12.4%	91.3 $\pm$ 35.4%	92.3 $\pm$ 23.9%
arterial blood pressure	85.7 $\pm$ 24.9 mmHg	46.7 $\pm$ 23.3%	95.1 $\pm$ 29.4%	92.8 $\pm$ 24.5%	89.9 $\pm$ 19.0%	95.9 $\pm$ 22.1%
central venous pressure	0	9.4 $\pm$ 5.2 cmH ₂ O	1.4 $\pm$ 3.1 cmH ₂ O	2.0 $\pm$ 3.1 cmH ₂ O	0	0
pl. ADP content	2.4 $\pm$ 0.7 $\mu\text{moles} / 10^6 \text{ pl.}$	—	68%	61%	—	44%
pl. ATP content	5.1 $\pm$ 1.2 $\mu\text{moles} / 10^6 \text{ pl.}$	—	98%	88%	—	83%

★ $P < 0.01$ ※ $P < 0.05$

し血小板凝集能は図1のごとく、最大凝集率はADP $3 \mu\text{M}$ にて対照44.7 $\pm$ 3.8%, SHR 30.2 $\pm$ 6.7%, ADP $10 \mu\text{M}$ にて対照50.3 $\pm$ 5.1%, SHR 39.4 $\pm$ 4.8%とSHRにて有意 ($p < 0.05$)の低下を認めた。コラーゲン $30 \mu\text{g/ml}$ にては、対照、SHRともほとんど凝集を認めなかった。

2) ADP 静注後の血小板および心肺機能の変化

表1に示すように、ADP 静注後血小板数は対照にて30秒後に前値の59.7 $\pm$ 22.4%, 3分後93.8 $\pm$ 15.4%, SHRにて30秒後90.5 $\pm$ 11.3%, 3分後74.9 $\pm$ 17.9%と対照で30秒後に有意の ($p < 0.01$) 減少が認められた。心電図、呼吸の変化は表1、図2に示すように、対照でADP 静注後2～5秒にて房室伝導障害や心室性期外収縮などの不整脈が出現し、呼吸は約10秒間の促進の後に無呼吸が約10秒間続いた。SHRではこれらの程度は有意に軽度であった。すなわ

ち不整脈の持続は対照34.5 $\pm$ 14.9秒、SHR 12.4 $\pm$ 5.3秒であり、無呼吸持続は対照9.8 $\pm$ 14.0秒、SHR 1.1 $\pm$ 1.4秒であった。30秒後の動脈圧は対照にて前値の46.7 $\pm$ 23.3%とSHR 69.3 $\pm$ 14.1%に比し著明に低下していた。中心静脈圧の上昇は対照にて9.4 $\pm$ 5.2 cmH₂O、SHR 1.0 $\pm$ 1.4 cmH₂Oと有意差をみた。これらの心肺機能の変化はいずれも血小板減少に伴って見られた。血小板ADP・ATP含有量は対照にてADP 静注後減少する傾向にあり、とくにADPで著明であった。SHRでは両者とも有意の低下は認められなかった。肺の組織学的検索では対照で細動脈に血栓が高頻度に認められたが、SHRでは血栓の頻度はきわめて少かった。

III. 考 案

この実験でSHRにおいてADP 静注による

Fig. 1 Platelet aggregation curves induced by ADP 10 μ M, 3 μ M and collagen 30 μ g/ml (final concentration) in the SHR and the control rats.

肺血栓の発生は血小板数減少や心肺機能障害と同様に、対照ラットに比し有意に軽微であったことが認められた。一方 SHR と対照ラットの間に静注前の血小板数、血小板容積、血小板 ADP・ATP 含有量において有意差を認めなかったが、血小板凝集能は SHR にて有意に低く、永岡らの報告に一致する⁵⁾。この血小板の反応性の差が ADP 静注による血小板血栓の出現に強い影響を与える可能性が考えられる。

ADP 静注後において対照ラットに比し SHR では血小板 ADP 含有量の減少が軽度であり、*in vitro* における SHR の血小板凝集能低下と比例するような成績を得た。さらに 14 C-セロトニンを用いた血小板放出機能検査でも SHR 血小板にてセロトニンの放出抑制傾向を認めている⁶⁾。このことから SHR 血小板からの放出機転が何らかの形で障害され、凝集能低下を来したと考えられる。この原因として SHR のもつ遺

Fig. 2 Recordings of ECG and respiration after ADP (1 mg/kg) injection into the SHR and the control rats.

伝的素因や高血圧またはその二次的変化による血小板の exhaustion の可能性が考えられる。

結 語

SHR と対照 Wistar ラット両群間に血小板数、血小板容積分布、血小板 ADP・ATP 含有量の差を認めなかったが、ADP による血小板凝集能は SHR にて低かった。ADP 1 mg/kg を静注後対照群では著明な血小板数減少、血小板 ADP 含有量の減少とともに、強い不整脈、無呼吸などの心肺機能障害が出現し、肺に血小板血栓を認めた。SHR ではこれらの現象は有意に軽微であり、また静注後の血小板 ADP 含有量の減少は著明でなく、血小板放出反応低下が示唆された。このことから、ADP 静注による肺血栓の出現には血小板凝集能・放出能の変化が反映されと考えられ、その原因として、SHR における遺伝的素因や高血圧 またはこれに基く血管障害による血小板の exhaustion の可能性の存在が考えられた。

文 献

- 1) Mustard, J. F. and Packham, M. A.: The role of blood platelets in atherosclerosis and the complication of atherosclerosis. *Thromb. Diathes. haemorrh.*, **33**; 444~456, 1975.
- 2) Kobayashi, I., Yamazaki, H. and Didish-eim, P.: Cardiopulmonary dysfunctions caused by ADP-induced platelet aggregation. *Jpn. Circ. J.*, **39**; 675~682, 1975.
- 3) 間下信昭, 小林逸郎, 本宮武司, 山崎博男: 実験的肺塞栓モデルにおける高血圧の影響 (SHR での観察成績). *血液と脈管*, **9**; 526~531, 1978.
- 4) Holmsen, H., Storm, E. and Day, H. J.: Determination of ATP and ADP in blood platelets: a modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal. Biochem.*, **46**; 489~501, 1972.
- 5) Nagaoka, A., Sudo, K., Orita, S., Kikuchi, K. and Aramaki, Y.: Hematological studies on the spontaneously hypertensive rats with special reference to the development of thrombosis. *Jpn. Circ. J.*, **35**; 1379~1390, 1971.
- 6) Mashimo, N., Sunaga, T., Kikutani, N., Matsubara, O., Motomiya, T. and Yamazaki, H.: Platelet hypoaggregability and decrease in thrombogenic tendency in spontaneously hypertensive rat (SHR). *Proceeding of the third international symposium on spontaneously hypertensive rat and related studies.* (in press), 1978.

●血小板研究のすべてを網羅して体系化!

血 小 板 — 基礎と臨床 —

編集 東京大学教授 山中 學 専門医44氏分担執筆
A4判 447頁 図159 表74 定価8,800円(〒240円)

☎101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京7-102026
電話 03-252-7768