原 著

プロテアーゼインヒビターによる血小板
凝集抑制の機序

野村 孝* 左近 賢人* 淀井 省三* 小林 哲郎*
高橋 顕* 張 士文* 上林 純一* 藤本 高義*
神前 五郎* 佐々木 洋** 今岡 真義**

The mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitors
on platelet aggregation

Takashi NOMURA*, Masato SAKON*, Shozo YODOI*,
Tetsuro KOBAYASHI*, Akira TAKAHASHI*, S. W. Chang*,
Junichi KAMBAYASHI*, Takayoshi FUJIMOTO*, Goro KOSAKI*,
You SASAKI** and Shingi IMAOKA**

Key words: platelet aggregation, protease inhibitors, prostaglandin synthesis, thromboxane synthetase inhibitor

The inhibitory effect of protease inhibitors on platelet aggregation was investigated. The inhibitors tested were SBTI, leupeptin, aprotinin and FOY (a synthetic protease inhibitor).

They completely inhibited the secondary aggregation of platelets induced by ADP or epinephrine. They also completely inhibited the platelet aggregation induced by collagen, thrombin or sodium arachidonate. The mechanism of their inhibitory effect was investigated, utilizing radioactive arachidonic acid and prostaglandin H₂. All the protease inhibitors tested blocked the release of arachidonic acid from platelet phospholipids. SBTI and aprotinin inhibited the cellular synthesis of thromboxane B₂ from arachidonic acid but not from prostaglandin H₂, suggesting their inhibitory effect on cyclooxygenase. Leupeptin did not possess any effect on thromboxane synthesis either from arachidonic acid or from prostaglandin H₂. FOY exhibited selective inhibition on the formation of thromboxane B₂ both from arachidonic acid and from prostaglandin H₂, yielding higher amount of other stable end products of cyclooxygenase pathway. Therefore, FOY seemed to possess an inhibitory effect on thromboxane synthetase and this

* 大阪大学医学部第二外科 (〒553 大阪市福島区福島1-1-50), The Second Department of Surgery, Osaka University Medical School, Osaka, Japan.

** 大阪府立成人病センター外科, Department of Surgery, The Center for Adult Diseases, Osaka, Japan.

drug could be an ideal antiplatelet without suppressing the formation of a natural inhibitor of platelet aggregation; prostaglandin I_2 .

はじめに

Protease inhibitor (P.I.) による血小板凝集の抑制は血小板膜リン脂質よりの arachidonic acid (A.A.) 遊離あるいは A.A. 代謝に P.I. が関与する可能性を示唆する。われわれは P.I. の血小板凝集抑制の機序をこの2つの面より解明しようと試みたものである。用いた P.I. は次の4種である。①Soybean trypsin inhibitor (SBTI) ②leupeptin ③aprotinin ④ethyl-p(6-guanidinohexanoyloxy) benzoate methane sulphonate (FOY)。

I. 方法ならびに成績

1. P.I. による血小板凝集の抑制

正常人全血9容に3.8% trisodium citrate 1容で採血, 120g 10分間室温で遠沈して得た platelet rich plasma (PRP) を用い, aggregometer にて観察した。なお thrombin 凝集には Tangen¹⁾ の方法で得たゲルろ過血小板 (GFP) を用いた。ADP (終濃度 $3\mu\text{M}$) および epinephrine (終濃度 $8.3\mu\text{M}$) による2次凝集はいずれの P.I. によっても表1の濃度において完全に抑制された。ADP (終濃度 $1.5\mu\text{M}$), epinephrine (終濃度 $5\mu\text{M}$) による1次凝集は高濃度の P.I. によっても抑制は観察できなかった。collagen (終濃度 $1\mu\text{g/ml}$) sodium arachidonate (終濃度 0.9mM) thrombin (終濃度 0.1U/ml) による凝集はすべての P.I. によって抑制

された(表1)。

2. 血小板膜リン脂質プールからの A.A. 放出の抑制

PRP 1ml 当り $1\mu\text{Ci}$ の $[1-^{14}\text{C}]$ A.A. (56.5mCi/m mole) を加え 37°C 1時間 incubate した後 free A.A. を Sepharose 2B カラムクロマトグラフィーによって除いて得た ^{14}C -A.A.-GFP を用いて aggregometer 内で P.I. 存在下に thrombin (終濃度 0.1U/ml) 凝集を行なった。反応を4分後に冷メタノールで止め, 抽出した脂質を T.L.C. にて分画し, 各分画の放射活性の比を算出した。加えた labelled A.A. の15%が血小板内にとり込まれ血小板内の labelled A.A. の90.7%が P.L. プール中に認められた。thrombin 凝集時には9%の labelled A.A. が P.L. プールより放出され, 全放射活性の1.24%に相当する labelled thromboxane B_2 (TXB_2) が産生されたが, 凝集が, それぞれの P.I. によって完全に抑制された時には labelled A.A. の放出は1~3%に減じ, labelled TXB_2 の産生は0.2%以下と強く抑制された(表2)。

3. exogenous の ^{14}C -A.A. および ^{14}C -prostaglandin H_2 (PGH_2) の TXB_2 への転換に対する P.I. の効果

P.I. 存在下に ^{14}C -A.A. あるいは ^{14}C - PGH_2 を enzyme source としての洗浄血小板とともに incubate し, 生成物を T.L.C. により分画して放射活性の比率を算出した。A.A.→ TXB_2 の系では leupeptin は高濃度まで抑制を示さな

Table 1 Minimum concentration of protease inhibitors for complete inhibition against platelet aggregation induced by various agents.

	ADP ($3\mu\text{M}$)	collagen ($1\mu\text{g/ml}$)	epineph. ($8.3\mu\text{M}$)	A.A. (0.9mM)	thrombin* (0.1U/ml)
SBTI	$25\mu\text{M}$	$4.8\mu\text{M}$	$4.8\mu\text{M}$	$4.8\mu\text{M}$	$24\mu\text{M}$
FOY	$240\mu\text{M}$	$240\mu\text{M}$	$240\mu\text{M}$	$24\mu\text{M}$	$24\mu\text{M}$
aprotinin	$20\mu\text{M}$	$5\mu\text{M}$	$5\mu\text{M}$	$5\mu\text{M}$	$5\mu\text{M}$
leupeptin	$721\mu\text{M}$	$721\mu\text{M}$	$405\mu\text{M}$	$405\mu\text{M}$	$20\mu\text{M}$

* thrombin induced aggregation was per formed, using GFP.

Table 2 Inhibitory effect of protease inhibitors on the release of arachidonic acid and on the formation of its metabolites from platelet phospholipids.

Reaction mixtuae	Inhibitor*	Agg.	P.L.	A.A.	TxB ₂	others**
¹⁴ C-AA-GFP+saline	(-)	(-)	90.70%	1.50%	0.08%	7.72%
¹⁴ C-AA-GFP+Thr (0.1)	(-)	(+)	81.20%	7.20%	1.24%	10.36%
¹⁴ C-AA-GFP+Thr (0.1)	FOY	(-)	88.76%	2.76%	0.16%	8.32%
¹⁴ C-AA-GFP+Thr (0.1)	leupeptin	(-)	89.99%	2.55%	0.19%	7.27%
¹⁴ C-AA-GFP+Thr (0.1)	SBTI	(-)	89.49%	2.31%	0.09%	8.11%
¹⁴ C-AA-GFP+Thr (0.2)	(-)	(+)	60.27%	17.03%	4.90%	17.80%

* inhibitors: preincubated for 2 minutes.

** others: include HETE, HHT, PGF₂α, PGE₂, PGD₂ & unidentified zones.

い(図1A). SBTI, aprotinin は終濃度10mMにて TXB₂ および HHT+others (HHTのzoneに近接し分離できない PGH₂ その他を含む)の生成を完全に抑制した(図1B). FOYは終濃度10mMでTXB₂の生成をほぼ完全に抑制したが, HHT+othersの産生は完全には抑制されず, 他の派生産物であるPGE₂, D₂, F₂αは逆に増加した(図1C).

PGH₂→TXB₂の系ではFOYは終濃度10mMでTXB₂の生成を完全に抑制したが, 他のP.I.の抑制効果は著明ではなかった.

II. 考察および結論

血小板凝集および放出反応に対するP.I.の作用は多くの研究者によって論じられ²⁻⁵⁾, その機序も青木⁶⁾らによってリン脂質プールからのA.A.放出抑制によるのであろうと説明されている.

今回用いた4種のP.I.はいずれも血小板膜リン脂質プールからのA.A.放出を抑制することを青木の報告とは異なる方法(T.L.C.)によって確認することができた. また, これら4種のP.I.がA.A.凝集を完全に抑制することから, A.A.からTXA₂に至る経路の抑制をも行なう可能性が考えられた.

Exogenous A.A.のTXB₂への代謝過程において, SBTI, aprotininではTXB₂およびHHT+othersとも産生が強く抑えられたことおよび, またexogenous PGH₂のTXB₂への代謝のこの2つのP.I.による抑制が著明でないことから, この両者のcyclo oxygenaseに対

Fig. 1 End products from ¹⁴C-arachidonic acid in the presence of protease inhibitors.

する抑制が推定された。他方, FOY では HHT + others の産生が完全には抑制されず (おそらく PGH_2 が増加するためと考えられる) PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGE}_2\alpha$ がかえって増加すること, exogenous PGH_2 から TXB_2 への代謝が抑制されることから, thromboxane synthetase に対する阻害が推定される。

P.I. が血小板膜リン脂質プールより A.A. 放出を抑制するという事実は, 膵の phospholipase A の zymogen が trypsin で活性化される⁷⁾⁸⁾ ことと考えあわせ, 血小板の phospholipase も同様にその zymogen が, おそらく細胞膜に存在する未知の protease により活性化されるという可能性が考えられる。

文 献

- 1) Tangen, O., Berman, H.J. and Marfey, P.: Gel filtration; a new technique for separation of blood platelets from plasma. Thromb. Diath. Haemorrh., **25**; 268~274, 1971.
- 2) Salzman, E. W. and Chambers, D. A.: Inhibition of ADP induced platelet aggregation by substituted amino-acids. Nature, **204**; 698~700, 1964.
- 3) Mustard, J.F., Packham, M.A. and Senyi, A.: The effect of DFP on platelet function in vitro and in vivo. J. Lab. Clin. Med., **70**; 1003~1004, 1967.
- 4) Henson, P.M. and Oades, Z.G.: Activation of platelet by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. II. The role of serine proteases, cyclic nucleotides, and contractile elements in PAF-induced secretion. J. Exp. Med., **143**; 953~968, 1976.
- 5) Henson, P. M., Gould, D. and Becker, E. L.: Activation of stimulus specific serine esterases in the initiation of platelet secretion. I. Demonstration with organophosphorous inhibitors. J. Exp. Med., **144**; 1657~1673, 1976.
- 6) Aoki, N., Naito, K. and Yoshida, N.: Inhibition of platelet aggregation by protease inhibitors. Possible involvement of proteases in platelet aggregation. Blood, **52**; 1~12, 1978.
- 7) De Haas, G.H., Postema, N.M., Nieuwenhoizen, W. and Van Deenen, L.L.M.: Purification of phospholipase A from porcine pancreas. Biochim. Biophys. Acta, **159**; 103~117, 1968.
- 8) De Haas, G.H., Postema, N.M., Nieuwenhoizen, W. and Van Deenen, L.L.M.: Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas. Biochim. Biophys. Acta, **159**; 118~129, 1968.

●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
A 4 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