Microvessel における血小板凝集抑制活性について

—単離糸球体を用いての検討—

長村 吉朗* 金山 春洋* 林 謙宏* 前田 義春*
岡嶋 泰* 木谷 輝夫* 前田 正明*
和多田光朗* 中川 雅夫* 伊地知浜夫*

Inhibitory activity of microvessel on the platelet
aggregation with special reference
to isolated glomeruli

Kichiro OSAMURA*, Haruhiro KANAYAMA*, Kenhiro RIN*,
Yoshiharu MAEDA*, Yasushi OKAJIMA*, Teruo KITANI*,
Masaaki MAEDA*, Mitsuro WATADA*, Masao
NAKAGAWA* and Hamao IJICHI*

Key words : platelet aggregation, isolated glomeruli,
microvessel, prostaglandins

Inhibitory activity of microvessel for ADP induced platelet aggregation was investigated using the glomeruli isolated from rat kidney. The activity recovered in the incubation medium was increased during the incubation with A. A. for 10~20 min. And this activity was highly correlated with the number of incubated glomeruli. When indomethacin was added to the incubation medium, this activity was decreased, but was not inhibited by 15-HPAA addition. Half time of this activity in the medium was approximately 20 min at room temperature. ^{14}C -A. A. incubated with isolated glomeruli was converted to several PGs which were identified as PGD_2 , E_2 and TxB_2 (A_2) by thin-layer chromatography. They are the major products synthesized by rat isolated glomeruli, although the main PGs synthesized in large vessel as aorta was identified as PGI_2 . And these products could not be detected when indomethacin was added. From these results it was concluded that the prostaglandin synthesis in the vessel wall might be different from each other in the localization and size of vessels in various many organs, and might be related to the functional aspect of vessel wall.

* 京都府立医科大学第二内科 [〒 602 京都市上京区河原町広小路上ル梶井町 465], Second Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

はじめに

ラット大動脈壁に認められる主な血小板凝集抑制活性は PGI_2 に由来することを著者らは確認し、血管作動性の薬剤その他がこの産生に促進的に作用することを既に報告した¹⁾が、今回は Microvessel の1つのモデルとして単離糸球体を用いて、その血小板凝集抑制活性につき検討を加えた。

I. 方 法

エーテル麻酔下で脱血死させた wister 系雄ラットの摘出腎より Fong ら²⁾の方法に準じて糸球体を単離した。すなわち腎皮質を homogenize しこれを 88 μmesh にて濾過後 120g, 75 秒間遠沈し、沈渣を強く攪拌し再度遠沈を加える操作を6回反復後糸球体を単離し、その純度は98%以上を示した。

この単離糸球体を KRP 中に一定量浮遊させ、これに 100 $\mu\text{g/ml}$ の Arachidonic Acid (A. A.) を添加、さらにそれぞれの薬剤を加え室温にて 120 回/min の振盪下で保生した。これを 1,000g, 1 分間遠沈後 0.45 μ Millipore filter にて濾過し、この濾液をヒト platelet rich plasma (PRP) に添加し、これによる血小板の ADP 凝集に対する抑制率より濾液中の血小板凝集抑制活性を求めた。

また糸球体より産生される PGs については約3万個の単離糸球体の KRP 浮遊液に 1 μCi の ^{14}C -AA (S. A. 58.4 mCi/mmol) を添加、室温 30 分間振盪保生後の上清について溶媒系として酢酸エチル；イソオクタン；酸素；蒸留水 (110 : 50 : 20 : 100) を用い TLC にて展開し radioscanner により放射能の分布につき検討した。

II. 結 果

単離糸球体数の増加に伴い保生液中に出現する血小板に対する凝集抑制活性は増大し両者はよく相関した。なお糸球体の濃度が 12,000 個/ ml の場合には本実験系における凝集抑制活性の検出に相当と考えられたので、以下の実験ではこの濃度を用いた。また図1のごとく A. A.

Fig. 1 Time course of inhibitory activity of incubation medium for platelet aggregation.

を添加した保生系での凝集抑制活性の産生は非添加時に比し大であり、保生時間が30分以上になると、本活性の産生は低下した。また、A. A. のかわりに phospholipase A_2 の活性化をもたらし Ca-ionophor 1 μM を添加した系でも凝集抑制活性の産生増加を認めた。したがって以後実験系には A. A. 100 $\mu\text{g/ml}$ を添加した。またこの保生液の血小板凝集抑制活性の経時変化は室温放置10分後には低下傾向を示し、その半減時間は20分前後であった。

次に単離糸球体での PG 産生に及ぼす種々の阻害剤の影響を検討すると、図2aに示す indomethacin (Ind.) の添加、終濃度 8×10^{-5} g/ml, では本活の産生は有意に低下したが完全阻害はみられなかった。他方 PGI_2 synthetase の阻害剤である 15-Hydroperoxy arachidonic acid (15-HPAA), 終濃度 2×10^{-5} g/ml 添加時にも図2bのごとく有意の抑制は認めず、大動脈の場合とは異なる成績を得た。この原因を解明するため大動脈輪あるいは単離糸球体の保生液に ^{14}C -A A 添加後保生液を TLC により展開し生成物を検討すると、図3上のごとく前者との保生時には PGI_2 の代謝産物である 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ の Rf に一致する peak を認めたが、図中段に示す単離糸球体では PGD_2 , E_2 および TxB_2 の Rf に一

Fig. 2 Effect of indomethacin (a) and 15-HPAA (b) on the PGs synthesis in isolated glomeruli.

Fig. 3 TLC radioscanning pattern.

致する peak を認めたが 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ に相当する peak を認めなかった。また図下段に示すごとく Ind. 添加時にはこれらの peak は消失した。

III. 考 案

腎における PG 産生に関する報告は散見³⁾ されるが、皮質における PG 産生は髄質に比しきわめて低値とされ⁴⁾ 単離糸球体についての報告^{5)~7)} は少ない。Whorton ら³⁾ はウサギの腎皮質に含まれる主な PGs は I_2 であり E_2 および D_2 も認めると報告し、Sraer ら⁵⁾⁶⁾ はラットの単離糸球体では PGI_2 に比べ E_2 の産生が多いと報告した。

今回私共の検討では、保生液に A. A. の添加時および Ca-ionophore 添加により A. A. の遊離を増強させた場合、保生液の上清における本活性の増強を認め、この活性が Ind. 添加により有意に阻止されることよりこの活性は PGs に由来すると考えられるが、 PGI_2 synthetase の阻害剤である 15-HPAA により阻止されないこと、また本活性の半減期は室温にて 20 分前後であることより、 PGI_2 に起因するものとは考え難く、TLC での成績からも PGI_2 の関与は否定し得る。他方、TLC による成績に示されるごとく PGE_2 , D_2 等の関与が強く示唆される。すなわち、少なくとも腎糸球体における PG 産生能は D_2 , E_2 が主体を占め、大動脈におけるごとき著明な PGI_2 の産生はみられず、A. A.

代謝からみた場合臓器血管を含めて血管の A. A. 代謝における部位的差異は明確に存在するものと考えられ, cyclooxygenase pathway のみならず lipooxygenase pathway を含めて, これらの代謝産物の生成物を異にすることは血管の反応性などの機能的側面のみならず, 器質的病変の出現過程にも関与し, その生化学的背景として今後大いに解明されるべき問題を含むものと考えられる。

また PGD_2 の生理活性についての知見は未だ充分ではないが, ラットの脳の主要な PG は D_2 とされ腎ではその合成酵素の活性は低いとされている⁸⁾ が, 糸球体でも PGD_2 が PG の主体を占め, 血栓性疾患では血小板の PGD_2 レセプターの減少が報告⁹⁾ されているので, 今後糸球体機能との関連において追求すべき問題と考える。

文 献

- 1) 川村恒博: 動脈壁 prostacyclin 生成に及ぼす諸薬剤の影響に関する実験的研究. J. Kyoto Pref. Univ. Med., **90**(2); 125~138, 1981.
- 2) Fong, J.S.C. and Drumond, K.N.: Method for preparation of glomeruli for metabolic studies. J. Lab. Clin. Med., **71**; 1034~1039, 1968.
- 3) Whorton, R.R., et al.: Regional differences in prostacyclin formation by the kidney. Biochem. Biophys. Acta, **529**; 176~180, 1978.
- 4) 岡原 猛, 他: 腎とプロスタグランディン. 代謝, **18**(4); 353~361, 1981.
- 5) Sraer, J., et al.: Prostaglandin synthesis by isolated rat renal glomeruli. Molec. Cell. Endocrinol., **16**; 29~37, 1979.
- 6) Sraer, J., et al.: Prostaglandin synthesis by rat isolated glomeruli and glomerular cultured cell. Int. J. Biochem., **12**; 203~207, 1980.
- 7) Hassid, A., et al.: Prostaglandin synthesis in isolated rat kidney glomeruli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**; 1155~1159, 1979.
- 8) 清水孝雄, 他: プロスタグランディンとその周辺—最近の進歩. 現代医療, **12**; 833~845, 1980.
- 9) Cooper, B., et al.: Platelet resistance to prostaglandin D_2 in patients with myeloproliferative disorders. Blood, **52**; 618~626, 1978.

●代謝と酵素の異常を総まとめ！

赤血球酵素の基礎と臨床

編集 東京大学内科教授 三輪史朗 専門医38氏分担執筆

A 5 判 411 頁 図147 表97 定価8,800円(〒200円)