血小板とトロンビンまたはアラキドン酸との反応による TBA 反応陽性物質の臨床的意義—特に糖尿病について

高山 博史* 大熊 稔* 赤沢 好温** 内野 治人*

The clinical significance of TBA reactive substances produced
by the reaction of the platelets with thrombin or
arachidonate, especially on diabetic patients

Hiroshi TAKAYAMA*, Minoru OKUMA*,
Yoshiharu AKAZAWA** and Haruto UCHINO*

Key words: thiobarbituric acid reactive substance, thrombin,
arachidonic acid, diabetes mellitus

Thrombin-induced thiobarbituric-acid reactive substance (Th-TBARS) formation by platelets was investigated under various experimental conditions. When aspirinized-platelets were incubated with thrombin, Th-TBARS was not detected under any experimental conditions examined. Therefore, thiobarbituric-acid reactive substance (TBARS) formation from endogenous arachidonic acid (AA) was shown not to contain TBARS via the lipoxygenase (PLO) pathway but to be derived from the cyclooxygenase (PCO) pathway. The estimations of PCO and PLO pathway by the measurement of exogenous AA-induced TBARS, the measurement of Th-TBARS and platelet aggregation study by the Born's method were performed in the patients with diabetes mellitus (DM, n=22). Th-TBARS was significantly increased in DM patients ($p<0.001$) as compared with normal control (n=23). Neither PCO nor PLO activity of diabetic patients was significantly different from normal controls. These data suggest that the mechanism of increase in Th-TBARS formation in DM patients could be ascribed to the increased AA liberation from the platelet membrane. There were no specific relationships between any two of the presence of retinopathy, the increased platelet aggregation and the increased Th-TBARS formation in DM patients.

* 京都大学医学部第一内科 [〒606 京都市左京区聖護院川原町54], The First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

** 国立京都病院内分泌代謝疾患センター, Endocrin and metabolism Center, Kyoto, National Hospital, Kyoto, Japan.

はじめに

ヒト血小板は、トロンビン (Th) などの凝集剤との反応により、その膜磷脂質から、ホスホリパーゼ (PLase) の作用を経て、アラキドン酸 (AA) を遊離する。AA は、さらに血小板のサイクロオキシゲナーゼ (PCO), および、リポキシゲナーゼ (PLO) により代謝され、種々の生理作用を有する代謝産物に変換される¹⁾。近年、これら AA 代謝の検討が、種々の血管性疾患の病態との関連において、血小板機能の検討と共に試みられるようになった。われわれは、すでに AA と洗浄血小板との反応で生成されるチオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS) を測定することによる、簡便な PCO, または、PLO 代謝活性の測定法を報告してきた²⁾。ここでは、血小板膜磷脂質から由来する内因性 AA 代謝をも検討する目的で、Th と血小板との反応による TBARS (Th-TBARS) 生成の基礎的検討を行ない、さらに糖尿病 (DM) 患者の血小板について、これらの方法を用いた AA 代謝の検討と血小板凝集能の測定を行なった。

I. 実験材料および方法

1. 血液採取と洗浄血小板の作製

健康人または、患者から既報³⁾に準じて静脈血を採取し、洗浄血小板を作製した。

2. Th との反応による TBARS 生成

$1.0-9.0 \times 10^8$ の洗浄血小板に、種々の pH の緩衝液²⁾ (50 mM) を含む生食水と、終濃度 10 u/ml の Th を添加し (全体量 0.5 ml), 37°C にて種々の時間反応させた。TBA 試薬⁴⁾ を等量添加して反応を終らせ、以下既報²⁾に準じて比色定量し、TBARS の量を nmol マロンデアルデヒド (MDA) 量として表わした。なおアスピリンにて PCO を完全に阻害する場合は、既報²⁾に準じて行なった。

3. PCO および PLO 代謝活性の測定

既報²⁾に準じて行なった。

4. 血小板凝集能

血小板多血漿および、血小板乏血漿を既報²⁾に準じて作製した後、血小板凝集計 (Sienco 社) を用い、血小板の自然凝集を観察した。さら

Fig. 1 Th-TBARS formation as a function of incubation time. Washed platelets (3×10^8) were incubated with 10 u/ml Th at pH 7.4 and 37°C for various periods of time. The amount of TBARS was determined as described previously²⁾.

に、ADP, エピネフリン, AA による血小板凝集能を観察し、その判定を既報³⁾に準じて行なった。

5. 対象とした患者および正常人

採血前 2 週間以内に薬物投与を受けていない DM 患者および正常人を対象とした。DM 患者は全員で 22 名 (男 : 女 = 7 : 15, 年齢 46~80 歳) であり、今回 Th-TBARS の対照とした正常人は、23 名 (男 : 女 = 14 : 9, 年齢 19~65 歳) であった。

II. 結果と考察

洗浄血小板と Th との反応による TBARS 生成の結果を図 1 に示す。反応時間 1 分まで、TBARS 生成は急速に増加し、その後漸増、やがて反応時間 10 分間程で最大値に達した。このような TBARS 生成は、示適 pH が 7.4 前後であり、その生成量は血小板数に比例した (図略)。同様な検討を PCO を阻害した洗浄血小板を使って行なったところ、いかなる反応条件にても TBARS は検出されなかった。したがって、Th-TBARS 生成は PCO 系の MDA 生成のみを反映していることが明らかとなった。以下、Th-TBARS 測定は洗浄血小板 (2×10^8 コ) を pH 7.4 にて終濃度 10 u/ml の Th と 37°C にて 10 分間反応させることとした。この Th-TBA

Fig. 2 Platelet aggregation of DM patients. SPA, ADP, Ep and AA represent spontaneous platelet aggregation, adenosine diphosphate, epinephrine and arachidonate, respectively.

RS 測定とすでに報告した TBA 反応を用いる方法による PCO と PLO の代謝活性の測定を DM 患者に試みた。DM 患者の血小板凝集能は正常または、亢進のいずれかを示した(図 2)。網膜症の合併の有無により凝集能に有意な差を認めなかった。すでに、DM 患者においては、血小板の凝集能が亢進し、血栓形成の一因となりうる事が報告され^{6,7)}、さらに AA 代謝の亢進^{7,8)}も示唆されている。今回の検討でも、DM 患者全体および網膜症合併群では Th-TBARS が正常と比べ有意 (おのおの, $p < 0.001$, $p < 0.02$) に高いことを認めた (図 3)。しかしながら、PCO と PLO 代謝活性は DM 患者および網膜症合併群共に正常人と比べ有意な差がなかった(図略)。したがって、これらの DM 患者においては、Th との反応により血小板の膜磷脂質から PLase により、AA が放出される過程の亢進による、内因性 AA 代謝の亢進が明らかとなった。この事実を裏づける類似の報告が、われわれと異なる方法を用いて、諸家^{9,10)}よりなされている。

DM 患者における凝集能および、AA 網膜症の合併との関連においては、直接的な因果関係を認めなかった。このことは、DM 患者における血栓症の発症、進展に血小板の機能亢進は関

M ± SD; (), n

*, $p < 0.001$; **, $p < 0.02$

1), patients with retinopathy

2), patients with the increased platelet aggregation

Fig. 3 Th-TBARS formation of DM patients and normal controls. Washed platelets (2×10^8) were incubated with 10u/ml Th at pH 7.4 and 37°C for 10 minutes. The amount of TBARS was determined as described previously²⁾.

与するも、その機序は、単一でないことを示唆する。

文 献

- 1) Marcus, A.J.: The role of lipids in platelet function: with particular reference to the arachidonic acid pathway. *J. Lipid Res.*, **19**: 793~826, 1978.
- 2) Takayama, H., Okuma, M. and Uchino, H.: A simple method for estimation of lipoxygenase and cyclo-oxygenase pathways in human platelets—the use of thiobarbituric acid reaction. *Thrombos Haemostas*, **44**: 111~114, 1980.
- 3) Okuma, M. and Uchino, H.: Altered arachidonate metabolism by platelets in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, **54**: 1258~1271, 1979.
- 4) Placer, Z.A., Cushman, L.L. and Johnson, B.C.: Estimation of product of lipid peroxidation (Malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.*, **16**: 359~364, 1966.
- 5) Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Okuma, M.,

- Hayaishi, O.: Solubilization and resolution of thromboxane synthesizing system from microsomes of bovine blood platelets. *J. Biol. Chem.*, **252**; 5871~5874, 1977.
- 6) Kwaan, H.C, Colwell, J.A., Cruz, S., Suwanwela, H. and Dobbie, J.G.: Increased platelet aggregation in diabetes mellitus. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**; 236-246, 1972.
- 7) Colwell, J.A. and Halushka, P.V.: Platelet function in diabetes mellitus. *Br. J. Haem.*, **44**; 521~526, 1980.
- 8) Ziboh, V.A., Maruto, H., Lord, J., Cagle, W.D. and Lucky, W.: Increased biosynthesis of thromboxane A_2 by diabetic platelets. *Eur. J. Clin. Invest.*, **9**; 223~228, 1979.
- 9) Lagarde, M., Burtin, M., Berciaud, P., Blanc, M., Velardo, B. and Dechavanne, M.: Increase of platelet thromboxane A_2 formation and of its plasmatic half-life in diabetes mellitus. *Thromb. Res.*, **19**; 823~830, 1980.
- 10) Takeda, H., Maeda, H., Fukushima, H., Nakamura, N. and Uzawa, H.: Increased platelet phospholipase activity in diabetic subjects. *Thromb. Res.*, **24**; 131~141, 1981.

●白血病治療の理論と実際！

白血病の化学療法—基礎と臨床—

編集 滋賀医科大学学長 脇坂行一 専門医28名分担執筆
A 5 判 292頁 図60 表42 定価5,800円(〒200円)

白血病，とくに急性白血病といえは，輸血以外になすすべもなく手をこまねいて見ているのが実情であった。しかし近年，白血病の化学療法が進歩し，白血病の治療についても一縷の光明が顕われてきた。本書は白血病の化学療法の理論と実際に焦点をしぼり，第一線の研究者による熱心な討議をまとめたものである。我国の白血病の治療指針書である。

●内容：〔白血病細胞の増殖異常と核酸代謝〕1. Leukemogenesisと白血病細胞のRNA dependent DNA polymerase 活性，2. 白血病細胞のDNA合成系酵素活性と代謝調節，3. ヒトリンパ球におけるpyrimidine合成の調節，4. 急性白血病経過中の芽球動態とDNA合成能，5. ヒトリンパ性白血病細胞のgenetic transcription，6. 白血病細胞におけるRNA合成，7. Radioautographyによる白血病細胞増殖異常の解析，8. Non-dividing compartmentに属する白血病細胞の意義，〔抗白血病剤の作用機序と臨床効果〕1. 抗白血病剤の投与経路による効果の差異とその機序，2. 白血病細胞におけるcytosine arabinosideとcyclophosphamideの作用機序，3. 抗白血病剤の殺細胞作用に及ぼす濃度因子と作用時間，4. 急性白血病的寛解導入，維持ならびに寛解強化療法について，5. 骨髄内白血病細胞の動態の解析による白血病化学療法，6. 慢性骨髄性白血病的治療と予後，7. 白血病治療中の白血病細胞減少曲線について。