Thrombasthenia 血小板の Cytoskeletal Proteins の異常について

池田 康夫* 佐藤 邦彦* 吉井 陽子* 半田 誠*
今井 道代* 外山 圭助* 山本美保子** 渡辺 清明**
安藤 泰彦**

Altered cytoskeletal structures of thrombasthenic platelets

Yasuo IKEDA*, Kunihiro SATO*, Yohko YOSHII*, Makoto HANDA*,
Michio IMAI*, Keisuke TOYAMA*, Mihoko YAMAMOTO**,
Kiyooki WATANABE** and Yasuhiko ANDO**

Key words: cytoskeletal protein, thrombasthenia

The changes in cytoskeletal structures of thrombasthenic platelets were investigated following thrombin activation. Non-stimulated platelets from normal subjects and thrombasthenic patients yielded essentially the same amount of Triton-precipitated cytoskeletal proteins. When platelets were treated with thrombin at various concentrations, the amount of protein in Triton-precipitates was increased both in normal and thrombasthenic subjects; less degree in the latter. The Triton-insoluble materials from non-stimulated, normal and thrombasthenic platelets showed essentially similar polypeptide composition on SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis; three prominent bands of molecular weight 43,000, 200,000 and 250,000 respectively. A distinct difference was, however, observed in polypeptide composition of cytoskeletons between thrombin-stimulated normal and thrombasthenic platelets. While polypeptides of molecular weight 43,000, 52,000, 56,000, 200,000 and 250,000 were increased after control platelets were stimulated with thrombin, cytoskeletal proteins of thrombin-activated thrombasthenic platelets showed no increase in the amount of polypeptides of molecular weight of 52,000 and 56,000. These findings may suggest the altered cytoskeletal structures of thrombasthenic platelets.

* 慶応義塾大学医学部内科〔〒160 東京都新宿区信濃町35〕, Department of Hematology Keio University, School of Medicine, Tokyo, Japan.

** 同 中検, Department of Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

はじめに

血小板凝集を欠如する thrombasthenia 血小板の解析はまだなお解明されていない血小板凝集機序を明らかにするのに重要な手掛りを与える。これまで thrombasthenia 血小板の異常については数多くの報告がなされているが、その中で血小板膜糖蛋白 GPIIb, IIIa の欠如, または減少, α -actinin の減少などはとくに重要である^{1,2)}。

最近, Phillips らはトロンビンにより凝集した血小板より分離した cytoskeletal proteins (CSP) に GPIIb, IIIa が含まれていることを報告し, これらの糖蛋白が血小板凝集過程に重要な役割を果していることを報告した³⁾。

そこで今回, われわれは thrombasthenia 血小板の CSP について検討を加え, 興味ある知見を得たので報告する。

I. 方 法

血小板の分離: 健常成人より 3.8% クエン酸ソーダ 1 容, 血液 9 容の割合で採血した後, 70 g, 15分遠沈して PRP を得, 1 mM EDTA を含む 20 mM tris-buffered saline (TES) で 2 回洗浄した後, 血小板を TES に $8-10 \times 10^8/\text{ml}$ の濃度で浮遊した。

CSP の分離: 血小板 CSP の分離は Phillips らの方法に従った³⁾, 血小板浮遊液に hirudin を含む Triton-extracting buffer (2% Triton X-100, 10 mM EGTA, 100 mM tris, pH 7.4) を等量加え, 5 分室温放置後, 7,000 g 5 分遠沈。

得られたペレットを TES と Triton-extracting buffer の等量混合液で一回洗浄し, CSP を分離した。蛋白濃度の測定は Lowry の方法を用いた⁴⁾。

Polyacrylamide gel electrophoresis: CSP の蛋白組成の検討は Laemmli の方法に準じ⁵⁾, 5~20% の gradient を有する slab gel を用いた SDS-polyacrylamide gel electrophoresis で行った。

Thrombasthenia 2 症例の血小板機能スクリーニング検査の結果は表 1 に示すごとくである。

II. 結 果

正常血小板では非刺激時, 血小板蛋白の 8.8% が Triton 不溶性の CSP として分離され, 主として actin, myosin, actin-binding protein より成っている。正常血小板を $0.1-1.0 \text{ u/ml}$ のトロンビンと 30 分反応させた後, hirudin を含む Triton-extracting buffer を加えて, CSP を分離すると Triton 不溶性の CSP 量はトロンビン $0.1, 0.5, 1.0 \text{ u/ml}$ でそれぞれ 12.5%, 13.8%, 15.5% と増加した。その組成では actin, myosin, actin-binding protein の増加の他, 分子量約 52,000, 56,000 のポリペプチドの出現がみられる。

2 例の thrombasthenia 血小板で同様の検討を行った。非刺激時血小板の CSP 量はそれぞれ全血小板蛋白量の 8.2%, 9.0% と正常血小板と比べ差異はなく, またその蛋白組成にも異常は認められなかった。しかし, トロンビンによ

Table 1 Case presentations

	Case Y.N.	Case S.Y.
Age, sex	20 y/o, female	49y/o, male
Platelet count	$15.9 \times 10^4/\mu\text{l}$	$40.2 \times 10^4/\mu\text{l}$
Ivy bleeding time	>15 min.	>15 min.
Clot retraction	absent	absent
Extent of platelet aggregation by ADP (20 μM)	0%	8%
Epinephrine (10 $\mu\text{g/ml}$)	0	0
Collagen (4 $\mu\text{g/ml}$)	0	0
Ristocetin (1.5 mg/ml)	50	56
Platelet membrane GP IIb, GP IIIa	reduced	reduced

Table 2 Triton-precipitates of normal or thrombasthenic platelets following thrombin-activation

	non-stimulated	Thrombin (u/ml)		
		0.1	0.5	1.0
Control	8.8%	12.5%	13.8%	15.5%
Case Y.N.	8.2%	9.5	...	12.9
Case S.Y.	9.0%	10.8	11.3	11.9

(% of total platelet proteins)

る刺激時, thrombasthenia 血小板では CSP 量の増加は正常血小板に比べ軽度であり, 0.1 u/ml で9.5%, 10.8%, 1.0 u/ml 12.9%, 11.9%であった(表2). さらにその蛋白組成を Laemmli の方法による slab gel を用いた SDS-polyacrylamide gel electrophoresis で分析すると actin, myosin, actin-binding proteins の増加は トロンビン刺激後, 正常血小板同様認められるが, 分子量52,000, 56,000のポリペプチドの出現が認められなかった(図1).

III. 考 按

血小板の triton 不溶性蛋白は actin, myosin などを含む cytoskeletal proteins として同定され, 血小板の粘着, 凝集などの機能と関連して最近注目されている. Phillips らは cytoskeletal proteins と血小板膜糖蛋白 GPIIb, IIIa が凝集した血小板において連結していることを示し, 血小板膜と血小板内構造蛋白の direct interaction について報告した³⁾. トロンビン刺激後, Triton 不溶性蛋白として得られる cytoskeletal proteins において actin, myosin, actin-binding protein の増加の他, 分子量52,000, 56,000 のポリペプチドの出現がみられた事実は Phillips の得た結果と良く一致している. Phillips らは, このうち actin, myosin の増加にとくに注目して述べており, 分子量52,000, 56,000のポリペプチドの出現の事実を記載しているに過ぎず, そのポリペプチドの同定もなされていない.

トロンビン添加後の CSP 増加は, PGE₁ や dibutyryl cAMP で dose dependent に抑制されるが, その際の蛋白組成に特徴的な変化はな

Fig. 1

く56,000のポリペプチドを初め, 全ての構成蛋白の増加が一様に抑制される. しかし thrombasthenia 血小板ではトロンビン添加後, 分子量52,000, 56,000のポリペプチドの出現がみられず, 本ペプチドが thrombasthenia 血小板の凝集欠如と何らかの関係を有する可能性が示唆される. このペプチドの同定はまだなされていないが, 培養した chick fibroblast の CSP にも認められることから, どの細胞にもみられる基本的な構造蛋白である可能性もあり⁶⁾, 今後, その生理的意義も含めて検討していきたい.

文 献

- 1) Hagen, I., et al.: Immunochemical evidence for protein abnormalities in platelets from patients with Glanzmann's thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. *J. Clin. Invest.*, **65**; 722~731, 1980.
- 2) Gerrard, J.M., et al.: α -actinin deficiency in thrombasthenia: possible identification of α -actinin as glycoprotein III. *Am. J. Pathol.*, **94**; 509~528, 1979.

- 3) Phillips, D.R., et al.: Identification of membrane proteins mediating the interaction of human platelets. J. Cell Biol., **86**; 77~86, 1980.
- 4) Lowry, O.H., et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**; 265~275, 1951.
- 5) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural

proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature (Lond.), **227**; 680~685, 1970.

- 6) Gonen, A., et al.: Cell adhesion and acquisition of detergent resistance by the cytoskeleton of cultured chick fibroblasts. Biochem. Biophys. Acta, **552**; 307~321, 1979.

●日常診療の落とし穴と安全性を示す！

小児の医療事故と救急処置

編集 日本大学小児科教授 馬場一雄 専門医50氏分担執筆
B 5 判 337頁 図52 表120 定価9,800円(〒240円)

日常の診療業務はいたるところに落とし穴の掘られている原野を進むようなものである。どんなに気をつけて歩いても、落とし穴に落ち込まないですむ保証はない。しかし、どこに落とし穴が隠されているか予め知っているのと知らないのとでは、安全の程度が全く異なる。本書は、小児の日常診療の場に隠されている落とし穴の位置と迂回路を示す羅針盤である。

●内容：〔医療事故〕1.医療事故と医事紛争，2.医療過誤の実態と責任の所在，3.突然死の実態，4.最近における医事紛争の問題点と小児科領域における診療事故死，5.小児救急患者の実態，6.過敏性体質，7.臨床検査に伴う事故とその対策(その1)，8.臨床検査に伴う事故とその対策(その2)，9.注射に伴う事故とその対策，10.輸血に伴う事故とその対策，11.輸液に伴う事故とその対策，12.交換輸血に伴う事故とその対策，13.麻酔に伴う事故とその対策，14.小児外科手術に伴う事故とその対策，15.放射線照射に伴う障害とその対策，16.看護に伴う事故とその対策，〔救急処置〕1.急発症状と応急対策，2.救急疾患と緊急治療，3.救急医療。