微小管阻害剤の血小板反応に対する作用

諸 井 将 明*

The effect of nocodazole, a microtubule inhibitor, on platelet reactions

Masaaki MOROI*

Key words: microtubule, nocodazole, platelet release reaction, taxol, MDA formation.

Nocodazole, a microtubule inhibitor, was tested for its effects on aggregation and release in human platelets. Nocodazole inhibited only the release reaction induced by ADP or ristocetin and inhibited the aggregation and release reaction induced by the other reagents tested (collagen, thrombin, adrenaline, polylysine, lectins [WGA and RCA], arachidonic acid, A23187, and PAF).

Nocodazole had no effect on the intracellular calcium release induced by thrombin which was measured by the decrease of the fluorescence of chlortetracycline. The drug inhibited the MDA generation of platelets induced by collagen, and it also inhibited the release of arachidonic acid from the phospholipids in the membrane.

From these results, nocodazole was indicated to inhibit the release reaction of platelets, and one of the steps inhibited by this drug was suggested to be at the level of the phospholipases.

はじめに

血小板の凝集放出機序に微小管が関与していることは電顕による観察およびコルヒチン等による阻害作用から示唆されてきた¹⁾が、コルヒチン等の微小管阻害剤はそのアルカロイド構造に由来する細胞障害作用を持つため、その血小

板作用には論議のあるところだった²⁾。そこでわれわれは、最近開発された合成阻害剤である Nocodazole (NZ) を用いてその血小板反応に対する作用を検討した。

I. 方 法

NZ とヒト PRP を 2 分間 preincubate した

* 自治医科大学医学部第二生化学〔〒329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1〕, The Second Department of Biochemistry, Jichi Medical School, Tochigi, Japan.

Table 1 Inhibition by Nocodazole

Stimulants	Aggregation	Release
ADP	—	+
collagen	+++	+++
thrombin	++	+++
adrenaline	—	+
polylysine	++	+++
WGA	++ *	ND
RCA ₁₂₀	++ *	ND
arachidonic acid	+	++
A23187	++ *	++
PAF	++ *	++

+++ , 50% inhibition at $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ ++ , 50% inhibition at about $40 \mu\text{g/ml}$ + , 50% inhibition at $\geq 60 \mu\text{g/ml}$ — , no inhibition at $80 \mu\text{g/ml}$

* , partial inhibition or inhibition of secondary aggregation

ND, not determined

後、凝集刺激物質を加え、クロノログ社のルミアグリゴメーターを用いて凝集および ATP 放出反応を測定した。Taxol (Tax) の作用は室温で 30~60 分 PRP と preincubate した後に測定した。

細胞内 Ca 遊離反応は Feinstein³⁾の方法によりクロロテトラサイクリン (CTC) の蛍光の減少により測定した。

Malon dialdehyde (MDA) 生成はコラーゲンと反応 4 分後に 10% TCA で反応を止めその上清を TBA と反応させ、553 nm の蛍光により測定した。

アラキドン酸 (AA) の遊離反応は ^{14}C -AA を取り込ませた血小板浮遊液をトロンビンと反応させた後クロロホルム/メタノールで脂質分画を抽出し、TLC 分離後各分画をかき取り、カウントすることにより測定した⁴⁾。

II. 結 果

NZ の各種凝集刺激剤による血小板凝集放出反応に対する作用を表 1 にまとめて示す。NZ はトロンビン、コラーゲン等による凝集および放出反応に対しては $60\sim 150 \mu\text{M}$ の濃度範囲で同様に阻害するが、ADP、リストセチンによる凝集反応は阻害せず、放出反応のみ阻害した。また、いわゆる 2 次凝集を示すものは 2 次凝集

Fig. 1 The effect of nocodazole on the MDA generation of platelets induced by collagen.

One milliliter of PRP was stimulated by collagen in the presence and absence of drugs and after 4 min the reaction was stopped by the addition of 10% TCA. The supernatant was separated and the amounts of MDA were measured by thiobarbituric acid method. Filled circles; control (solvent, DMSO, only), open circles: nocodazole treated, open triangles; $20 \mu\text{M}$ indomethacin treated; the bar indicates the value of MDA for nonstimulated platelets.

に対してのみ阻害作用を示した⁵⁾。

微小管の重合促進剤である Tax の ADP およびコラーゲンによる血小板放出反応に対する作用をみると、 $10\sim 50 \mu\text{M}$ の濃度で放出反応を促進することが観察された。

CTC の蛍光の減少は Ca の膜からの遊離に対応すると考えられているが、NZ はトロンビンによる CTC の蛍光の減少に対して何の作用も与えなかった。

PG 生成系に関係する 2 つの反応、すなわち MDA 生成と AA 代謝物の遊離反応は共に NZ によって阻害された。

III. 考 察

NZ によって血小板の放出反応が特異的に抑えられることは、NZ が ADP やリストセチンによる凝集に何の作用も示さないことから示唆される。またこの阻害作用が NZ の微小管に対する作用によるものであるということは、反対の作用を持つ Tax が放出反応を促進させるこ

と、また構造の異なる阻害剤コルヒチンも NZ 同様の作用を示すことなどからも支持される。

凝集刺激剤による細胞内 Ca の遊離機構は現在明らかではないが、Feinstein によって Ca の遊離は放出反応に先だって起こることが示されている³⁾。NZ はトロンビンによる Ca 遊離を抑えなかったため、NZ による放出反応阻害作用は Ca 遊離以降の過程に働いていると推測することができる。

放出反応に対する NZ の阻害作用が一部 AA 代謝物の遊離抑制によるものであることは、MDA 生成および AA 遊離を NZ が抑制することから示唆された。他の微小管阻害剤による血小板のホスホリパーゼおよびトロンボキサン生成系に対する阻害作用については報告がある⁶⁾。これらの阻害作用機構は明らかでないが、微小管破壊に起因する細胞膜構造の変化によると考えられる。しかしながら AA やイオノホアによる凝集放出反応を NZ が弱いながら阻害する事実は、トロンボキサン生成以降の段階にも NZ が働いている可能性を示唆している。

文 献

- 1) White, J.G.: Effects of colchicine and vinca alkaloids on human platelets I. Influence on

platelet microtubules and contractile function. Amer. J. Pathol., **53**; 281~291, 1968.

- 2) Ribbi-Jaffe, A. and Apitz-Castro, R.: The effect of colchicine on human blood platelets under conditions of short-term incubation Biochem. J., **178**; 449~454, 1979.
- 3) Feinstein, M.B.: Release of intracellular membrane-bound calcium precedes the onset of stimulus-induced exocytosis in platelets Biochem. Biophys. Res. Commun., **93**; 593~600, 1980.
- 4) Bills, T.K. Smith, J.B. and Silver, M.J.: Metabolism of [¹⁴C] arachidonic acid by human platelets. Biochim. Biophys. Acta, **424**; 303~314, 1976.
- 5) Jung, S.M, Yamazaki, H., Tetsuka, T. and Moroi, M.: Effect of nocodazole, a new microtubule inhibitor, on platelet aggregation and release. Thromb. Res., **23**; 401~410, 1981.
- 6) Shah, N.T., Karpen, C.W. & Panganamala, R.V.: *In vitro* effects of vincristine on arachidonic acid metabolism in human platelets and rat arterial tissue. Thromb. Res., **23**; 225~231, 1981.

●葉酸研究の完全なる集大成！

葉 酸 — 基礎と臨床

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀

専門医18氏分担執筆

A 5 判 484頁 図172 表104 定価9,800円(〒200円)