ウシ血小板 α 顆粒を用いての血管透過性に関する電顕的研究

干川就可* 井村 穰二* 芦原 義弘* 白沢健二郎*

Electron microscopic studies on the vascular permeability response produced by α -granule extract from bovine platelets

Nariyoshi HOSHIKAWA*, Joji IMURA*, Yoshihiro ASHIHARA*
and Kenjiro SHIRASAWA*

Key words: bovine platelet, platelet α -granule extract, vascular permeability factor, antihistamine (H_1 & H_2), early permeability response

The fine structure of vascular permeability was studied on the dorsal skin of rabbits by a single intradermal injection of the extract, cationic protein, obtained from α -granules of bovine platelets after separation as subcellular fractions.

As early as 1~0 min., the ferritin particle, used as a tracer, frequently leaked out through the junctional gaps of postcapillary venular endothelium into the perivascular connective tissue. At this period, however, mild exudation also occurred even in the sites of small veins and capillaries.

At 3~5 min., inflammatory cells already infiltrated into the vessel wall or surrounding tissue. With the lapse of time, the inflammatory cells increased in number and strands of fibrin appeared in the connective tissue by 3 hours.

Neither exudation of ferritin particles nor cellular migration appeared in the vessels of control rabbits given isotonic phosphate buffered saline. Such ferritin exudation and cell migration from the vessels were scarcely inhibited in the animals pretreated with histamine H_1 - and H_2 -receptor antagonists before the injection of extract.

In conclusion, the α -granule extract from bovine platelets has vascular permeability factor(s) as described in that from human platelets and causes early permeability response.

* 杏林大学医学部病理学〔〒181 東京都三鷹市新川 6-20-2〕, Department of Pathology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan.

はじめに

血栓形成に主役を演ずる血小板が炎症に直接関与する可能性を指摘されるようになったのは比較的最近のことである¹⁻³⁾。

Nachmanら³⁾は、人の血小板 α 顆粒抽出液を用い家兎皮膚の血管に透過性を増強することを形態学的に証明した。本実験の目的は牛血小板の α 顆粒成分に血管透過能があるか否かを微細構造的に検索することにある。

I. 実験材料および方法

抗凝固剤を添加した牛血液から多血小板血漿

を分離し⁴⁾、その沈渣を ultrasonication により均等質化し、連続蔗糖勾配法⁵⁾およびUrografin 勾配法⁶⁾により α 顆粒分画を得た。この α 顆粒分画を酸抽出し^{2,3)}塩基性蛋白抽出液を得た。血管透過性に関しては、本抽出液を抗ヒスタミン非処置群、あるいはヒスタミン H_1 (chlorpheniramine maleate, 腹腔内 10 mg/kg) あるいはヒスタミン H_2 receptor 拮抗剤 (cimetidine, 静脈内 50 mg/kg) 処置群家兎のあらかじめ剃毛した背皮内に 0.1 mL (蛋白質含量200~250 μ g/mL) 宛注射した。その5分前に標識剤として0.5%の濃度の Evans blue 溶液 (1.0 mL/kg), あるいは, ferritin 溶液 (Miles Lab.

Fig. 1: One min, after injection of the extract, ferritin particles leak out from the junctional gaps (arrows) of endothelial cells in the post-capillary venule (a), capillary (b), and small vein (c), a: $\times 52,000$ b: $\times 41,000$ c: $\times 52,000$

Fig. 2-a: At 3 min. a large portion of a neutrophilic leukocyte already migrates into the wall of a postcapillary venule. A small portion, however, is still in the dilated vascular lumen. $\times 5,000$

Fig. 2-b: At 3 hours, many leukocytes are seen in the edematous connective tissue surrounding a postcapillary venule. Large amounts of fibrin are scattered throughout. $\times 4,000$

Inc.) (20 mg/kg) を耳静脈より注入した. 対照群には抽出液を稀釈した磷酸緩衝生食水を用いた. 各溶液の注入後, 0分から3時間まで経時的に皮膚を採取し, 電顕的観察を行った.

II. 実験成績

対照群家兎では皮膚血管および結合織に特記すべき変化は認められなかった.

ヒスタミン拮抗剤非処置群では, 0~1分で既に postcapillary venule を主とした血管内皮接合部から ferritin 粒子の浸出があり, 毛細

血管でも一部に浸出を認めた. また, 小静脈においても内皮接合部に離開をきたしているものもみられた (図 1a-c). 3分では多核白血球を主とする炎症性細胞の内皮間への遊走が開始されていた (図 2-a). 15~30分では, 血管腔内の血小板, 白血球の集簇が強く, 浮腫の強い結合織内へもこれら細胞は浸潤していた. 1~3時間では, 極めて強い細胞浸潤は線維素の析出を伴っていた (図 2-b).

拮抗剤処置群でも非処置群とほぼ同様で, 透過性の抑制を認めなかった.

III. 総括および考案

牛血小板 α 顆粒の抽出液には人の血小板のそれと同様に強い血管透過性亢進能のあることが確認された。しかし、人の抽出液にみられた二相性反応と異なり、ヒスタミン receptor 拮抗剤により抑制されず、Wilhelm⁷⁾ のいう早期反応に相当する反応を示した。透過性の亢進が増強する3分以降においては白血球から放出される因子および肥満細胞からのヒスタミン因子の関与が示唆される。しかしながら、Wechsler⁸⁾ も指摘することく、抽出液が C_3 に直接作用し白血球に強い走化性を誘発する可能性がある。以上から損傷部に集積する血小板が、 α 顆粒成分とともに活性化血小板からの PGE_2 などの関与⁹⁾ も加わって、炎症性細胞の一つとして働くことが示唆される。

文 献

- 1) Packham, M.A., Nishizawa, E.E. and Mustard, J.F.: Response of platelets to tissue injury. *Biochem. Pharmacol.*, **17** (Suppl.); 171~184, 1968.
- 2) Nachman, R.L., Weksler, B. and Ferris, B.: Increased vascular permeability produced by human platelet granule cationic extract. *J. Clin. Invest.*, **49**; 274~281, 1972.
- 3) Nachman, R.L. and Weksler, B.: The platelet as an inflammatory cell. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **201**; 131~137, 1972.
- 4) Itoh, M., Nishimura, Y., Takenaka, O. and Inada, Y.: Measurement of the rate of clot retraction. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **31**; 452~456, 1974.
- 5) Marcus, A.J., Zucker-Franklin, D., Safier, L.B. and Ullman, H.L.: Studies on human platelet granules and membranes. *J. Clin. Invest.*, **45**; 14~26, 1966.
- 6) Da Prada, M. and Pletscher, A.: Isolated 5-hydroxytryptamine organelles of rabbit blood platelets; Physiological properties and drug-induced changes. *Br. J. Pharmacol.*, **34**; 591~597, 1968.
- 7) Wilhelm, D.L.: Chemical mediators (Zweifach, B.W., Grant, L. and McCluskey, R.T.: The inflammatory process), Academic Press, New York, 1973, p. 251.
- 8) Weksler, B.B. and Coupland, C.E.: Platelet-dependent generation of chemotactic activity in serum. *J. Exp. Med.*, **137**; 1419~1429, 1973.
- 9) Silver, M.J., Smith, J.B. and Ingberman, C.M.: Blood platelets and the inflammatory process. *Agents Actions*, **4**; 233~240, 1974.

血液細胞の分化と増殖—基礎と臨床

編集 自治医科大学学長 中尾喜久 自治医科大学教授 高久史麿

専門医21氏分担執筆

A5判 251頁 図126 表47 定価4,800円(千200円)