骨髓増殖性疾患に見出された血小板と白血球の アラキドン酸代謝異常について

高山 博史* 大熊 稔* 内野 治人*

Altered arachidonate metabolism of platelets and leukocytes in myeloproliferative disorders

Hiroshi TAKAYAMA*, Minoru OKUMA* and Haruto UNICHO*

Key words: Arachidonic acid, platelet, leukocyte, lipoxygenase,
myeloproliferative disorders

The arachidonic acid (AA) metabolism of leukocytes as well as platelets was studied in 5 patients with myeloproliferative disorders. When the leukocyte preparations from normal controls, whose polymorphonuclear neutrophil (PM-NN) purity was more than 90%, were incubated with AA and A 23187, the distinct peaks of leukotriene B₄ (LTB₄) and hydroxyeicosatetraenoic acids (H-ETEs) were constantly detected using reversed phase high-performance liquid chromatography. However, we found the lack of LTB₄ synthesis as well as the deficient production of 5-HETE in two patients with chronic myeloid leukemia (CML). Although the PMNN purity of their leukocyte preparations was 55% and 56%, it was likely that such an abnormality of CML leukocytes was derived from the 5-lipoxygenase deficiency of patient's PMNNs, because the formation of 5-lipoxygenase metabolites was observed in experiments with normal PMNNs mixed with CML leukocytes and leukocytes of the CML patient had good response to A 23187. Platelet lipoxygenase deficiencies were found in one patient with CML and one with polycythemia vera (PV). Thrombin-induced malondialdehyde formation by their platelets was increased. On the other hand, the 5-lipoxygenase deficiency of PMNN was found neither in two patients with PV nor in one with essential thrombocythemia.

* 京都大学医学部第一内科〔〒006 京都市左京区聖護院川原町 54〕, First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto, University, Kyoto, Japan.

はじめに

血小板と白血球のアラキドン酸(AA)代謝および、その相互反応は、止血や血栓形成ならびに炎症等の機序に重要な役割を有していると考えられている¹⁾²⁾。今回われわれは、正常人および骨髓増殖性疾患患者における白血球と血小板のAA代謝の検討を行ない、興味ある所見を見出したので報告する。

I. 方 法

対象としたのは、正常人9名および、慢性骨髄性白血病(CML)患者2名、真性多血症(PV)患者2名、本態性血小板血症(ET)患者1名の計14名である。血小板のcyclo-oxygenase(PCO)系代謝および、12-lipoxygenase(PLO)系代謝活性の測定と、トロンビンとの反応によるmalondialdehyde(Th-MDA)生成の測定は、既報³⁾⁴⁾に準じて行なった。白血球は、クエン酸加血液より、遠沈による多血小板血漿の除去、および、デキストランによる赤血球の除去を行ない、Ficoll-isopaqueによる遠沈、さらにNH₄Clで溶血処理した後、生食で2回洗浄することにより分離した。白血球のlipoxygenase系AA代謝の検討は、Samuelsson等⁵⁾の変法により、高速液体クロマトグラフィーを用いて行なった。白血球の代謝産物の同定はGC-MS法⁶⁻⁸⁾により行なった。

II. 結果と考察

正常人の白血球(多核好中球>90%)をpH 7.4にて0.2 mM AAおよび、10 μ M A 23187と5分間反応させると、leukotriene B₄(LTB₄)、5-hydroxyeicosatetraenoic acid(5-HETE)、15-HETE、12-HETEの生成が認められた(図1)。CML患者(YN)の白血球(多核好中球; 56%)のAA代謝の検討を行なったところ、LTB₄と5-HETEの生成がほとんど認められなかったが、15-HETEの生成は正常範囲(M $\pm$ 2SD)内に認められた(表1)。また、この患者のPLO活性は欠損しており、PCO活性はやや低値であ

ったが、Th-MDAは高値であった。このような白血球の5-lipoxygenase系代謝異常の疑われたCML患者の白血球と、正常人の白血球を種々の割合で混合し、その代謝を検討したところ、正常人の白血球の比率に応じて、LTB₄および5-HETEの生成の増加が認められた。

このことから、CML患者(YN)の多核好中球は、5-lipoxygenase系代謝異常をもつことが明らかとなった。また、このような白血球はA 23187に対する反応性を示したことから、A 23187に対する反応欠除よりも5-lipoxygenase活性の低下によるものであることが示唆された。その他の患者における白血球と血小板のAA代謝の結果を表1に示した。白血球の5-lipoxygenaseの異常はCML患者だけに認められ、PVやETの患者には認められなかった。また、

(): Normal range (M $\pm$ 2SD)

PMNN purity > 90%

Fig. 1 Arachidonate metabolism of platelets and leukocytes in a normal control subject.

PLO: platelet lipoxygenase, PCO: platelet cyclo-oxygenase, Th-MDA: thrombin-induced malondialdehyde formation by platelets, PGB₂: prostaglandin B₂, LTB₄: leukotriene B₄, HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid, PMNN: polymorphonuclear neutrophil.

Table 1 Arachidonate metabolism by leukocytes and platelets in myeloproliferative disorders

Name	Age (yr)	Sex	Diag	PMNN purity	LTB ₄	5-HETE	15-HETE	PLO	PCO	Th-MDA
					(corrected arbitrary units*)			(nmols MDA)		
TH	39	M	CML	55%	0	30.5	206.5	1.68	0.71	0.67
YN	45	M	CML	56%	0	32.7	82.6	0	0.43	1.22
YF	61	M	PV	90%	74.1	818.4	40.0	0.06	0.36	1.09
KT	62	M	PV	93%	162.1	1167.6	108.8	1.36	1.08	1.02
OO	72	F	ET	91%	155.3	312.6	25.9	1.44	0.55	0.81
Normal range, M $\pm$ 2 SD (n)					127.3	715.8	120.0	1.17	0.79	0.60
					$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
					66.2 (9)	431.2 (9)	100.6 (9)	0.68 (31)	0.30 (31)	0.48 (31)

* $\frac{\text{The area of each peak on RP-HPLC chromatogram}}{\text{The area of internal standard (Prostaglandin B}_2\text{; } 150 \mu\text{g}/10^7 \text{ leukocytes)}} \times 100 \times \frac{90}{\text{PMNN purity}}$
 CML, chronic myeloid leukemia; PV, polycythemia vera; ET, essential thrombocythemia. Other abbreviations are the same as those in Fig. 1.

PLO 代謝異常は、PV 患者にも認められ、白血球の場合と異なることが明らかとなった。最近、Borgeat 等⁹⁾により血小板と白血球の lipoxygenase レベルでの相互反応が存在することが報告されており、これらの患者における AA 代謝異常はこの方面の研究によいモデルとなると共に、患者の病態の解明や診断に寄与するものと思われる。

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) Palmblad, J., Malmsteen, CL, Udén, A.M, Radmark, O., Engstedt, L., and Samuelsson, B.: Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood*, **58**; 658~661, 1981.
- 3) 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.
- 4) Okuma, M., Takayama, H. and Uchino, H.: Subnormal platelet response to thromboxane A₂ in a patient with chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.*, **51**; 469~477, 1982.
- 5) Borgeat, P. and Samuelsson, B.: Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: Effects of ionophore A23187. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**; 2148~2152, 1979.
- 6) Borgeat, P. and Samuelsson, B.: Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **254**; 2643~2646, 1979.
- 7) Borgeat, P., Hamberg, M., and Samuelsson, B.: Transformation of arachidonic acid and homo- γ -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **251**; 7816~7820, 1976.
- 8) Yoshimoto, T., Miyamoto, Y., Ochi, K. and Yamamoto, S.: Arachidonate 12-lipoxygenase of porcine leukocyte with activity for 5-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **713**; 638~646, 1982.
- 9) Maclouf, J., de Lacroix, B.F., and Borgeat, P.: Stimulation of leukotriene biosynthesis in human blood leukocytes by platelet-derived 12-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**; 6042~6046, 1982.