原発性血小板血症の自然凝集における アラキドン酸代謝の解析

布施 一郎* 竹重 富雄* 服部 晃* 滝沢慎一郎*
花野 政晴* 長山 礼三* 高橋 芳右* 柴田 昭*

Analysis of prostaglandins induced by spontaneous platelet aggregation in patients with primary thrombocythemia

Ichiro FUSE*, Tomio TAKESHIGE*, Akira HATTORI*,
Shinichiro TAKIZAWA*, Masaharu HANANO*, Reizo NAGAYAMA*,
Hoyu TAKAHASHI* and Akira SHIBATA*

Key words: primary thrombocythemia-spontaneous
platelet aggregation-TXB₂-PGD₂

The amounts of TXB₂ and PGD₂ which were produced during spontaneous platelet aggregation (SPA) in 3 patients with primary thrombocythemia (PTH) were measured. After platelet counts in platelet-rich plasma (PRP) were adjusted to $120 \times 10^4/\mu\text{l}$ with autologous platelet-poor plasma, SPA was induced by stirring at 1100 r.p.m. in a Lumi-aggregometer and the lag time was measured. The amounts of TXB₂ and PGD₂ produced in the aliquots of PRP were measured by HPLC, using 9-anthryl-diazomethane. As a control, the amounts of TXB₂ and PGD₂ which were produced by the reaction of platelets with arachidonate (0.2 mM, f. c.) were measured by similar method, using the platelets from 4 normal subjects (platelet count: $30 \times 10^4/\mu\text{l}$).

The amounts of TXB₂ and PGD₂ in normal subjects were 153.0 ± 18.9 , and 2.88 ± 0.36 ng/ 10^8 platelets (mean $\pm$ S. D.), respectively (TXB₂/D₂=43.4 to 68.3). The amounts of TXB₂ and PGD₂ in PTH were as follows: case 1, 48.5 and 0.37; case 2, 56.2 and 1.14; case 3, 53.6 and 0.93 (ng/ 10^8 platelets), respectively (TXB₂/D₂=131.1, 49.3, 57.6). In case 1, the amount of PGD₂ was decreased, and TXB₂/D₂ was significantly increased. In this case, it was also found that SPA occurred in a shorter lag time than in the other cases. It was

* 新潟大学医学部第一内科〔〒951 新潟市旭町通一番町〕, The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

suggested that the increased TXB_2/D_2 may play some role in the mechanism of SPA in patients with PTH.

緒 言

原発性血小板血症 (primary thrombocythemia : PTH) における血小板自然凝集 (spontaneous platelet aggregation : SPA) は血小板の放出反応を伴うことが知られているが、その際のアラキドン酸代謝、特に PGD_2 の関与については不明の点が多い。そこで、今回われわれは PTH 3 例における SPA の際のアラキドン酸代謝を解析し、興味ある知見を得たので報告する。

I. 方 法

PTH 3 例よりクエン酸加多血小板血漿 (PRP) を得、PRP の血小板数を $120 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整した後、lumi-aggregometer を用いて、1100 r. p. m. の stirring で SPA を惹起させた。SPA 出現までの lag time を測定し、凝集が plateau に達してから 5 分後の検体 4 回分を EDTA-2K 4.5 mM, indomethacin $10 \mu\text{M}$ (終濃度) で処置し反応を停止させた。これを、2000 G, 10 分 4°C にて遠心し、上清に含まれるアラキドン酸代謝物を C18 cartridge column で精製した後、9-anthryl-diazomethane のラベル化を行ない、HPLC にて分離検討した¹⁾。対照として 4 例の正常人 PRP を用い、血小板数を $30 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整した後、アラキドン酸 0.2 mM (終濃度) で刺激し、3 分後に同様の方法で検体を得、HPLC にて分析した。thromboxane B_2 (TXB_2) および PGD_2 産生量は external standard を用いて peak height を測定することによって算出した。また、PTH 3 例については、大熊らの方法²⁾により、PCO, PLO 活性も測定した。

II. 結 果

アラキドン酸 0.2 mM 刺激正常人 PRP および PHT (case 2) の SPA の際のアラキドン酸代謝物の chromatogram は図 1 のごとくで、

Fig. 1 HPLC chromatograms of metabolites induced by arachidonate in a normal subject and induced by SPA in a patient with primary thrombocythemia. upper panel: normal subject; lower panel: primary thrombocythemia. eluent: isooctane/EtOAc/EtOH/ CH_3COOH = 75 : 20 : 5 : 2 V/V/V/V. column: JASCO PG Pak 1. flow rate: 1.2 ml/min. detection: ex. 365 nm. em. 412 nm. (JASCO FP-210)

正常人 PRP でのアラキドン酸 0.2 mM 刺激による TXB_2 産生量は $153.0 \pm 18.9 \text{ ng}/10^8 \text{ pl.}$, PGD_2 産生量は $2.88 \pm 0.36 \text{ ng}/10^8 \text{ pl.}$ (mean $\pm$ S.D.) であり、 TXB_2/D_2 は 43.4~69.3 の範

Table 1 Hemostatic parameters in patients with primary thrombocythemia.

	case 1	case 2	case 3
platelet count ($\times 10^4/\mu L$)	167.0	103.4	229.1
lag time (min.)	2.5	8.2	8.0
TXB ₂ (ng/10 ⁸ pl.)	48.5	56.2	53.6
PGD ₂ (ng/10 ⁸ pl.)	0.37	1.14	0.93
TXB ₂ /D ₂	131.1	49.3	57.6
PCO (nM/10 ⁸ pl.)	0.99	1.25	0.99
PLO (nM/10 ⁸ pl.)	1.49	1.13	0.28

囲内にあった。PTH 3 例での TXB₂ および PGD₂ 産生量は表 1 のごとくで、TXB₂ 産生量は 48.5~53.6 ng/10⁸ pl. と正常人アラキドン酸刺激に比し低値であったが、ほぼ一定であった。PGD₂ 産生量は case 1 が他の 2 例に比して著減しており、TXB₂/D₂ も著増していた。SPA 出現までの lag time は case 1 が他の 2 例に比して著明に短縮していた。また、PCO、PLO 活性は case 3 の PLO 活性が半減している以外は正常であった。

III. 考案および結論

PTH の SPA における PGD₂ および TXB₂ 産生量は正常人 PRP のアラキドン酸刺激によるそれと比べて、両者共有意に低かった。また、case 1 では、他の 2 例に比して TXB₂ 産生量は同様でありながら、PGD₂ 産生量の有意の低下と TXB₂/D₂ の著明な上昇を認めた。この例での SPA 出現までの lag time は他の 2 例に比して著しく短縮しており、SPA 出現の機序の 1 つに TXB₂/D₂ の上昇が関与している可能性のあることが示唆された。PGD₂ は PGI₂ と

同様、強力な抗血小板作用を持つ物質であり、その合成酵素は血漿アルブミンにあること³⁾が報告されており、本例では血小板のみならず、PGD₂ 合成酵素活性の異常も合併しているのかもしれない。

文 献

- 1) Hatsumi M., Kimata, S. and Hirose, K.: 9-anthryl diazomethane derivatives of prostaglandins for performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography*, **253**; 271~275, 1982.
- 2) Takayama, H., Okuma, M. and Uchino, H.: A simple method for estimation of lipooxygenase and cyclo-oxygenase pathways in human platelets. The use of thiobarbituric acid reaction. *Thrombos. Haemostas.*, **44**(3); 111~114, 1980.
- 3) Watanabe, K., Narumiya, S., Shimizu, T. and Hayaishi O.: Characterization of the biosynthetic pathway of prostaglandin D₂ in human platelet rich plasma. *J. Biol. Chem.*, **257**; 14847~14853, 1982.