血小板凝集におよぼす顆粒球エラスターゼの影響

滝 正志* 稲垣 稔* 富田 幸治* 三浦 琢磨*
 斉藤 伸夫* 上田 康信** 目黒 嵩*** 山田 兼雄***

Influence of granulocyte elastase-like proteinase (ELP) on platelet aggregation

Masashi TAKI*, Minoru INAGAKI*, Yukiharu TOMITA*,
 Takuma MIURA*, Nobuo SAITO*, Yasunobu UEDA**,
 Takashi MEGURO* and Kaneo YAMADA*

Key words: granulocyte elastase-like proteinase (ELP),
 platelet aggregation, thromboxane A₂

The influence of granulocyte elastase-like proteinase (ELP) on platelet aggregation was investigated by using the method in which agonist such as ADP, epinephrine, thrombin, collagen, arachidonic acid, A 23187 or ristocetin, cofactor such as fibrinogen or von Willebrand factor, or the suspended platelets in calcium free Hepes Tyrode albumin buffer was respectively incubated with ELP.

ELP treatment of agonists except collagen or thrombin resulted in no change of the ability to induce aggregation. On the other hand, the treated collagen showed the decrease of the ability, however, the treated thrombin showed the slight increase of the ability. ELP treatment of cofactor such as fibrinogen or vWF resulted in the decrease of the cofactor activity corresponding to the change of its molecular form. Platelet aggregation in ELP treated platelets was markedly decreased by agonist such as thrombin, collagen, epinephrine or ristocetin, while it was not as greatly decreased by arachidonic acid, ADP or A 23187.

These results demonstrated that the influence of ELP on platelet aggregation was mainly caused by direct inactivation of platelets. ELP also acted on cofactor such as fibrinogen or vWF and a part of agonist such as collagen or thrombin, and subsequently influenced upon the aggregation.

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

** 荻窪病院中検血液, Research Project of Haematology, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

*** 聖マリアンナ医科大学小児科, Department of Pediatrics, St. Marianna University, School of Medicine, Kanagawa, Japan.

目 的

顆粒球エラスターゼ (ELP) はエラスチン分解のみならず凝固線溶因子に種々の影響を与えることが知られている¹⁻³⁾. 今回の ELP 血小板凝集に与える影響について基礎的な検討を行なった.

I. 材料および方法

ELP: 永松等の方法^{4,5)}に従いクエン酸加全血より精製した. 血小板凝集・放出: Hepes Tyrode Albumin 溶液で洗浄した血小板浮遊液 (WP) を用いて比濁法による凝集を観察した. TXA₂ 放出は山崎等の方法⁶⁾, すなわち WP に agonist を作用させ 5 分後の medium に放出される TXA₂ を RIA で TXB₂ として測定した. ELP の作用: agonist (ADP, epinephrine, thrombin, collagen, arachidonic acid, A 23187, ristocetin), cofactor (fibrinogen, vWF), 血小板 (WP) それぞれに 1/10 容の ELP を経時的ならびに濃度別に作用させ血小板凝集を行なった.

II. 成 績

得られた ELP は 7% SDS-PAGE で single band で分子量約 3 万あった. なお ELP の単位は μ mol/min の ATLAV の amidolytic activity を 1U とした.

a) agonist に対する影響: ADP, epinephrine, アラキドン酸, A 23187, リストセチンに対する影響は認められなかったが, collagen に対しては凝集惹起能の低下が観察された. 一方, thrombin に対しては増強が観察され, この際 thrombin 時間の短縮としても認められた.

b) cofactor に対する影響: ELP 処理 fibrinogen の cofactor 活性は ELP の濃度, 作用時間に関連して低下した. この際凝固時間の延長, 5% SDS-PAGE 所見の僅かな分子量の減少 (非還元系), α , β , γ 鎖の順で減少そして消失 (還元系) する変化としても認められた. ELP 処理 vWF の cofactor 活性も同様に低下しこの際抗原の見かけ上の増加も認められた.

c) 血小板に対する影響: 血小板の凝集の強

Table 1 Platelet aggregations in ELP treated platelets by various agonists

Agonists	Aggregation (%)		Inactivation (%)
	ELP	Buffer	
ADP+Fg	37*	79*	53
Epinephrine+Fg	10	70	85
Thrombin	16	86	81
Collagen	1	30	97
Arachidonic Acid	49	65	26
A 23187	60	65	7
Ristocetin+vWF	1	71	98

ADP (2 μ M), Epinephrine (50 μ M), Thrombin (0.05 U/ml), Collagen (5 μ g/ml), Arachidonic acid (50 μ M), A 23187 (5 μ M), Ristocetin (1.2 mg/ml), Fg (0.1 mg/ml), vWF (0.1 U/ml).

Aggregation: maximum light transmission during 5 min.

Platelets were incubated with ELP (0.016 U/ml) for 30 min (*10 min) at 37°C before the addition of agonists.

Fig. 1 Platelet aggregation and thromboxane A₂ (TXA₂) release in ELP treated platelets by thrombin (0.1 U/ml)

10 min.: ELP treatment of platelets for 10 min. at 37°C

30 min.: ELP treatment of platelets for 30 min. at 37°C

さは thrombin, collagen, epinephrine, ristocetin で著しい低下, ADP, アラキドン酸で中等度の低下, A23187 で軽度の低下が ELP の濃度, 作用時間に関連して観察された (表 1). TXA₂ の放出は thrombin 凝集で ELP の濃度, 作用時間に関連して放出の著しい低下が認められたが (図 1), アラキドン酸凝集では全く低下が認められずむしろ control よりも強い放出が認め

られた。

III. 考 按

ELP は一部の agonist, cofactor そして血小板に作用して血小板凝集に強い影響を与えることが認められた。特に血小板に対して内因性のアラキドン酸代謝を活性化する thrombin, collagen 等の凝集が強く抑制されるのに対し、アラキドン酸凝集が比較的軽度の抑制であった。また TXA₂ の放出が thrombin 誘発で強い抑制が認められアラキドン酸誘発で全く抑制が認められなかった。以上のことより ELP は直接血小板膜に対して変化を与え、アラキドン酸より上位のレベルのアラキドン酸代謝を含めた初期血小板活性化を抑制する可能性が強く示唆された。

文 献

- 1) Schmidt, W., Egbring, R. and Havemann, K.: Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases from human granulocytes on isolated clotting factors. *Thromb. Res.*, **6**; 315~326, 1975.
- 2) Kopec, M., Bykowska, K., Lopaciuk, S., Jelenska, M., Kaczanowska, J., Sopata I. and Wojtecka, E.: Effects of neutral proteases from human leukocytes on structure and biological properties of human factor VIII. *Thromb. Haemostas.*, **43**(3); 211~217, 1980.
- 3) 三浦琢磨, 稲垣 稔, 滝 正志, 富田幸治, 斎藤伸夫, 目黒 嵩, 山田兼雄, 岡田芳男, 津田裕子: 顆粒球 elastase (ELP) の血中存在様式. *炎症*, **4**; 419~420, 1984.
- 4) Okada, Y., Tsuda, Y., Nagamatsu, Y. and Okamoto, U.: Convenient purification of human spleen fibrinolytic proteinase (SFP) and human leucocyte elastase by affinity chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**; 1528~1530, 1982.
- 5) Nagamatsu, Y., Okamoto, U., Tsuda, Y. and Okada, Y.: Human leukocyte elastase-like proteinase purified by affinity chromatography with Suc-L-Tyr-D-Leu-D-Val-pNA, and its identification with human spleen fibrinolytic proteinase. *Thromb. Haemostas.*, **51**(2); 243~247, 1984.
- 6) 山崎博男, 田上 憲次郎, 山口 敦美, 榊原千枝子, 山本正雅, 宗像純司, 川越 栄, 福田 純, 高野照夫, 早川弘一: 虚血性心疾患における血小板トロボキサン A₂ 合成能. *血液と脈管*, **14**(3); 354~356, 1983.

●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
B5判 337頁 図52 表120 定価9,800円(〒350円)

101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768