ウシ血小板凝集に際し放出される プラスミンインヒビター

下仲 基之* 萩原 啓実* 小嶋 聡一* 稲田 祐二*

Plasmin inhibitors released from bovine platelets during aggregation

Motoyuki SHIMONAKA*, Hiromi HAGIWARA*, Soichi KOJIMA*
and Yuji INADA*

Key words: plasmin inhibitor, platelet aggregation
thrombin, antifibrinolytic activity

An antifibrinolytic activity was found in the supernatant of washed platelet suspension in the process of platelet aggregation induced by thrombin, ADP and 5-hydroxytryptamine. The antifibrinolytic activity was closely associated with inhibitors in platelets, which specifically inhibited plasmin but not inhibited other proteases such as urokinase, thrombin and trypsin. One casein unit of plasmin activity was inhibited by the inhibitors released from approximately 10^8 platelets during the aggregation with thrombin. By the activity staining analysis, it was found that there are two kinds of plasmin inhibitors with the molecular weights of $\simeq 25,000$ and $\simeq 17,000$. These two inhibitors were stable after the treatment of the inhibitors with acid or denaturants, though the inhibitor with higher molecular weight lost the activity by dithiothreitol- and heat-treatments and two inhibitors lost also the activity by alkali-treatment. These inhibitors have been purified from the supernatant of aggregated platelets by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography, gel filtration and affinity adsorption to plasmin.

* 東京工業大学理学部化学科生物化学教室〔〒152 東京都目黒区大岡山 2-12-1〕, Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan.

はじめに

血小板をトロンビンその他の凝集惹起物質で刺激すると、凝集に際し血小板は種々の物質を放出することが知られている。それらの物質のなかには α_2 -アンチプラスミン等^{1,2)}の抗線溶活性を有するいくつかの物質が含まれている。本研究は、ウシ血小板をトロンビン等で凝集させた際に、従来知られているものとは全く異なっていると考えられる分子量およそ 25,000 および 17,000 のプラスミンインヒビターが血小板より放出されることを発見し³⁾、その物理化学的性質の検討を行なうとともに精製を試みたものである。

I. 方法

ウシ血液を遠心分離することにより洗浄血小板を得、これをカルシウム存在下でかくはんし、トロンビン等を加え凝集させる。その上清をプラスミンインヒビターを含むサンプルとし、これを硫安分画・イオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過・プラスミンセファロースにより精製した。プラスミン阻害活性は、合成基質 S-2251 あるいはフィブリン懸濁液を用いて測定し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった後リバースフィブリンオートグラフィーによりインヒビターの分子量の同定を行なった。

II. 結果

ウシ洗浄血小板 (5×10^8 個/ mL) に 10 mM のカルシウム存在下でトロンビン (0.5 I.U./ mL) を加えかくはんすると、経時的に凝集が観察され、それに相関的にプラスミンインヒビターの放出が認められた (図 1)。トロンビン以外の凝集惹起物質である ADP や 5-ヒドロキシトリプタミン等の場合も同様な放出が認められ、その放出は凝集惹起物質それぞれの濃度に依存した。このプラスミンインヒビターは、その他の蛋白質分解酵素であるトロンビン・トリプシン・ウロキナーゼ等の活性は阻害しなかった。このインヒビターの阻害活性の強さを合成基質およびフィブリン懸濁液により測定した

Fig. 1 Appearance of antifibrinolytic activity during platelet aggregation caused by thrombin (0.5 I.U./ mL). Curve A; platelet aggregation as measured with turbidity decrease of a platelet suspension (5×10^8 platelets/ mL), Curve B; inhibition of plasmin activity by the platelet suspension. The inhibitory activity obtained from the extract of platelets disrupted with sonication was taken as 100%.

Table 1 Stability of Plasmin Inhibitors

Treatment*	Plasmin	Inhibitor
	17,000	25,000
Heat (100°C)	±	—
1 M Acetic acid	+	+
1 M NaOH	—	—
6 M Urea	+	+
4 M Guanidine·HCl	+	+
4 mM Dithiothreitol	+	—

* The medium was treated as described above for 30 min at 37°C except for heat treatment. After the treatment, each medium was dialyzed and was subjected to reverse fibrin autography.

ところ、1 カゼイン単位のプラスミンは約 10^8 個の血小板より放出されるインヒビターによりその活性が消失させられることが確認された。電気泳動後活性染色を行なうことにより、このインヒビターは分子量およそ 25,000 および 17,000 の二種類のものであることがわかった。これら両者は酸・尿素・グアニジン処理に対しては安定であったが、熱・還元剤処理により前者が、またアルカリ処理により両者ともがそれぞれ失活した (表 1)。

このインヒビターを含むサンプルを、硫安分画(33~90%)を行なった後 DEAE セルロースカラムにかけ、その非結合分画をセファデックス G150 SF・G50 SF カラムによりゲル濾過し、さらにプラスミンセファロースを用い精製を行なった。その結果、電気泳動的に単一の標品が得られつつあり、現在さらにその精製度を向上させることを試みている。

文 献

1) Plow, E.F. and Collen, D.: The presence and

release of α_2 -antiplasmin from human platelets. Blood, **58**; 1069~1074, 1981.

2) Erickson, L.A., Ginsberg, M.H. and Loskutoff, D.J.: Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. J. Clin. Invest., **74**; 1465~1472, 1984.

3) Shimonaka, M., Kojima, S., Hagiwara, H. and Inada, Y.: Novel plasmin inhibitors released from bovine platelets during aggregation. Thromb. Res., **39**; 419~427, 1985.

●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)

日常の診療業務はいたるところに落とし穴の掘られている原野を進むようなものである。どんなに気をつけて歩いても、落とし穴に落ち込まないですむ保証はない。しかし、どこに落とし穴が隠されているか予め知っているのと知らないのでは、安全の程度が全く異なる。本書は、小児の日常診療の場に隠されている落とし穴の位置と迂回路を示す羅針盤である。

●内容：〔医療事故〕1.医療事故と医事紛争、2.医療過誤の実態と責任の所在、3.突然死の実態、4.最近における医事紛争の問題点と小児科領域における診療事故死、5.小児救急患者の実態、6.過敏性体質、7.臨床検査に伴う事故とその対策(その1)、8.臨床検査に伴う事故とその対策(その2)、9.注射に伴う事故とその対策、10.輸血に伴う事故とその対策、11.輸液に伴う事故とその対策、12.交換輸血に伴う事故とその対策、13.麻酔に伴う事故とその対策、14.小児外科手術に伴う事故とその対策、15.放射線照射に伴う障害とその対策、16.看護に伴う事故とその対策、〔救急処置〕1.急発症状と応急対策、2.救急疾患と緊急治療、3.救急医療。