ラット血小板のコラーゲン凝集に対する アスピリンの抑制効果 ——血漿成分の有無による抑制効果の変化——

後藤 啓* 田嶋 義高* 坂本 隆弘* 宮本 誠二*
岡田 政久* 船津 昭信* 大橋 高明*

The inhibitory effect of aspirin on collagen induced aggregation of rat platelets —The influence of plasma—

Akira GOTO*, Yoshitaka TAJIMA*, Takahiro SAKAMOTO*,
Seiji MIYAMOTO*, Masahisa OKADA*, Akinobu FUNATSU*
and Kohmei OHHASHI*

Key words: aspirin, collagen, rat platelet aggregation

We investigated the inhibitory effect of aspirin on collagen induced platelet aggregation using rat PRP (platelet rich plasma) and GFP (gel filtered platelet). In the case of PRP, low concentration of collagen induced aggregation was inhibited by aspirin but when collagen concentration was increased, aggregation was observed in spite of the presence of aspirin. On the contrary, in the case of GFP, collagen induced aggregation was always inhibited by aspirin regardless of the collagen concentration. But when rat plasma was added to GFP, the inhibitory effect of aspirin on collagen induced aggregation decreased in a plasma dose dependent manner. These studies suggest that plasma factor(s) are essential for the aspirin noninhibited aggregation which is induced by high concentration of collagen.

目 的

血小板のコラーゲンによる凝集は、アスピリンによりトロンボキサン A_2 の合成を完全に阻害しても、高濃度のコラーゲンで凝集を惹起し

た場合には、凝集抑制はほとんど観察されることが知られている^{1)~4)}。しかし、この事実はすべて PRP (多血小板血漿) を用いての報告であるので、今回われわれは、この PRP のアスピリンにて阻止されない凝集に血漿成分が関

* 飼化学及血清療法研究所〔〒860 熊本市清水町大窪 668〕, The Chemo-sero-therapeutic Research Institute, Kumamoto, Japan. 受付: 1988.1.10. 受理: 1988.2.8.

Fig. 1 Collagen induced aggregation of rat PRP (—) and GFP (.....)

●; control ○; 1 mM aspirin

与している可能性を検討する目的で、ラット PRP とともに、PRP から血漿成分を除いた GFP (ゲル濾過血小板) を用い、血漿成分の有無によるアスピリンのコラーゲン凝集に対する抑制効果の違いについて検討した。

I. 方法

PRP は、ラット (Wistar, ♂, 体重250 g ~ 300 g) の腹部大動脈からクエン酸採血 (3.8% クエン酸 Na 1/10 容) により常法に従い調製した。GFP は、PRP を Sepharose 2B によりゲル濾過することにより調製した⁵⁾。溶出液は、Tyrode-HEPES 緩衝液 (0.1% グルコース, 0.35% BSA 含有, pH 7.3) を用いた。血小板凝集能は Born の方法に従ったアグリゴメータ Hema Tracer I (NKK 社製) を用いて測定し、最大透過率をその凝集能の指標とした。測定に際し、PRP の場合 3 mM CaCl_2 , GFP の場合 2 mM CaCl_2 を加えた後、凝集を惹起させた。血小板数は PRP, GFP どちらの場合も $75 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整して実験に用いた。コラーゲンは Hormon-chemie 社製を用い、ラットフィブリノーゲンは Kazal のグリシン沈澱法に準じて調製した⁶⁾。

Fig. 2-1 Effect of plasma on collagen (10 µg/ml) induced aggregation of rat GFP in the presence of 1 mM aspirin

II. 成績

PRP を用いた場合、低濃度のコラーゲン (5 µg/ml) による凝集に対してはアスピリンによる抑制効果が観察されたが、コラーゲンの濃度を上げていくと抑制効果は観察されなくなった。(図 1 実線) ところが PRP から血漿成分を除いた GFP を用いた場合には、コラーゲンの濃度に関係なくアスピリンにより凝集は常に

抑制された。(図 1 点線)そこでこの GFP に血漿を加えて高濃度のコラーゲンによって凝集を惹起すると、アスピリンによる抑制効果は弱まり、加える血漿の容量依存的に凝集の回復してくることが観察された。(図 2-1) また、血漿のかわりに同じタンパク濃度の BSA を加えても凝集の回復は観察されなかった。又、血漿のかわりにラットフィブリノーゲンを加えても凝集の回復は観察されなかった。(図 2-2)

結 論

GFP の場合にはアスピリンによりコラーゲン凝集は常に抑制されるが、PRP の場合には GFP で凝集が抑制された高濃度のコラーゲンに対し凝集が生じる。また、アスピリンによりコラーゲン凝集が抑制される GFP に血漿を加えていくとその凝集が回復する。以上の事実より、PRP の高濃度コラーゲンによるアスピリンにて阻害されない凝集には、血漿成分の関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Emms, H., Lewis, G.P.: The roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A_2 and adenosine diphosphate in collagen-induced aggregation in man and the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **87**; 109~115, 1986.
- 2) Best, L.C., Holland, T.K., Jones, P.B.B. and Russell, R.G.G.: The interrelationship between thromboxane biosynthesis, aggregation and 5-hydroxytryptamine secretion in human platelets in vitro. *Thrombos. Haemostas.* (Stuttgart), **43**; 38~40, 1980.
- 3) Butler, K D., Maguire, E.D., Smith, J.R.,

Fig. 2-2 Effect of fibrinogen on collagen (10 $\mu\text{g/ml}$) induced aggregation of rat GFP in the presence of 1 mM aspirin

Turnbull, A.A., Wallis, R.B. and White, A. M.: Prolongation of rat tail bleeding time caused by oral doses of a thromboxane synthetase inhibitor which have little effect on platelet aggregation. *Thrombos. Haemostas.* (Stuttgart), **47**; 46~49, 1982.

- 4) Raffaele De Caterina, Daniela Giannessi, Paolo Gazzetti and Walter Bernini. Inhibition of platelet aggregation and thromboxane B_2 production during aspirin treatment; Dependence on the dose of the aggregating agent. *Thrombos. Res.*, **37**; 337~342, 1985.
- 5) 山中 学: 血小板の分離. 続生化学実験講座 8 血液(下); 829~834, 1987.
- 6) Louis, A., Kazal, Sheldon Amsel, Orin Miller, P. and Tocantins, L.M.: The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **113**; 989~994, 1963.