血小板活性化における細胞内 pH とカルシウム

松野 一彦* 方波見文雄** 松宮 英視** 武田 宏司***
小山 稔*** 安部 圭祐*** 桜田 恵右*** 宮崎 保***

Changes of intracellular pH and calcium concerned in platelet activation

Kazuhiko MATSUNO*, Fumio KATABAMI**, Hidemi MATSUMIYA**
Hiroshi TAKEDA***, Minoru KOYAMA***, Keisuke ABE***,
Keisuke SAKURADA*** and Tamotsu MIYAZAKI***

Key words: intracellular pH, calcium, platelet activation, fura-2, thrombin

We have investigated the changes in intracellular pH (pHi) and cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) in platelet activation evoked by thrombin and thromboxane A_2 analogue, STA_2 . pH was measured with the new fluorescent dye, 2', 7'-bis(carboxyethyl) 5, 6-carboxyfluorescein (BCECF), and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was determined by the fluorescent Ca^{2+} indicator, fura-2. Resting pHi of human platelets averaged 7.03 ± 0.08 pH unit, which is similar to the values reported by others. There was an initial fall of 0.01–0.02 pH unit immediately after addition of thrombin. This was followed by an increase in pHi to between 0.07–0.18 pH unit above the resting level. The resting $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ level of around 100 nM was increased abruptly to 1–3 μM after stimulation with thrombin. Thrombin-induced platelet aggregation, increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and intracellular alkalinization were inhibited by removal of Na^+ or by treatment of platelet with Na^+/H^+ exchange inhibitor, amiloride.

STA_2 induced a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, however, it failed to cause a distinct alkalinization. Increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ and platelet aggregation evoked

* 北海道大学医学部附属病院検査部〔〒060 札幌市北区北 14 条西 5 丁目〕. Division of Laboratory Medicine, Hokkaido University Hospital, Sapporo, Japan.

** 同 臨床検査医学, Department of Laboratory Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan.

*** 同 第三内科, The Third Department of Internal Medicine, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan. 受付: 1987. 12. 20, 受理: 1988. 4. 2.

by STA₂ were observed even after removal of extracellular Na⁺. These results suggest that there may be another pathway in relation to platelet activation and Ca²⁺ mobilization independent of intracellular alkalinization.

はじめに

われわれは血小板活性化における細胞内 Ca²⁺ の重要性について報告してきた¹⁾²⁾. 最近血小板 pH と活性化との関連の報告がみられるが³⁻⁵⁾, その成績は必ずしも一致していない. 今回われわれは, thrombin と thromboxane A₂ のアナログである STA₂ により刺激した際の細胞内 pH (pHi) と細胞質遊離 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]cyt) の変化について検討した.

I. 方 法

1) pHi の測定: ACD 加血より作成した血小板浮遊液に終濃度 5μM BCECF/AM を添加し 37°C で 30 分間インキュベートする. 遠心後ペレットを Ca²⁺-free Hepes buffer (pH 7.4)

Fig. 1 Changes in intracellular pH stimulated with 0.5 U/ml thrombin (upper) and 1×10⁻⁷ M STA₂ (lower).

に再浮遊し, 外液 Ca²⁺ 濃度を調整後 assay に供した. 蛍光測定は 37°C にて励起波長 500nm, 蛍光波長 530nm で, 持続的 stirring をしない条件で行ない, nigericin-K⁺ 法にて calibration した.

2) [Ca²⁺]cyt の測定: われわれが既に報告した如く fura-2 を血小板に負荷して, 2 波長蛍光比を測定し⁶⁾, Grynkiewicz ら⁷⁾ の式により [Ca²⁺]cyt を算出した.

II. 結 果

健常人血小板の未刺激時の pHi は 7.03±

Fig. 2 Effects of removal of extracellular Na⁺ (middle) and amiloride (lower) on thrombin-induced changes in intracellular pH.

0.08 単位であった。thrombin で刺激すると直後に約0.01の酸性化がみられた後緩徐なアルカリ化がおこり未刺激時より0.07-0.18単位アルカリ側にシフトした(図1上)。このアルカリ化は外液 Na^+ を choline で置換し除去したり(図2中)、 Na^+/H^+ exchange inhibitor である amiloride の添加により抑制された(図2下)。外液 Na^+ の存在下では thrombin 刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ は著しく増加し強い凝集もみられたが、外液 Na^+ を除去すると $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加および凝集は軽度となった。一方 STA_2 刺激では直後の酸性化は認められたがアルカリ化はほとんどみられず(図1下)、外液 Na^+ を除去しての STA_2 刺激では十分な $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加と血小板凝集が認められた。

III. 考 察

thrombin 刺激直後の酸性化の後のアルカリ化は外液 Na^+ の除去や amiloride の添加により抑制されたことから、 Na^+/H^+ exchange を介した H^+ の排出によると考えられた。外液 Na^+ の除去により $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加と凝集が抑制されたことより、アルカリ化が Ca^{2+} 動員や活性化と関連する可能性があるが、両者の因果関係についてはなお詳細な検討が必要である。 STA_2 による活性化ではアルカリ化はみられず、外液 Na^+ の除去によっても $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 増加や凝集の著明な抑制がみられないことから、thrombin とは異なる活性化経路が推定された。

文 献

- 1) 松野一彦, 方波見文雄, 松宮英視: セカンドメッセンジャーとしての細胞質遊離カルシウムイオン. 臨床病理, **73** (臨); 25~37, 1987.
- 2) Matsuno, K., Katabami, F., Koyama, M., Abe, K., Sakurada, K., Miyazaki, T.: Platelet-activating factor (PAF)-induced intracellular Ca^{2+} mobilization in human platelets. Thrombos. Haemostas., **58**; 186, 1987.
- 3) Zavoico, G. B., Cragoe, E. J., Feinstein, M. B.: Regulation of intracellular pH in human platelets. J. Biol. Chem., **261**; 13160~13167, 1986.
- 4) Siffert, W., Akkerman, J. W. N.: Activation of sodium-proton exchange is prerequisite for Ca^{2+} mobilization in human platelets. Nature, **325**; 456~458, 1987.
- 5) Simpson, A. W. N., Rink, T. J.: Elevation of pHi is not an essential step in fura-2-loaded human platelets. FEBS Lett., **222**; 144~148, 1987.
- 6) 松野一彦, 方波見文雄, 松宮英視, 小山 稔, 桜田恵右, 宮崎 保: fura-2 蛍光2波長測定による血小板内カルシウムイオン濃度測定. 臨床病理, **35** (補): 163, 1987.
- 7) Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem., **260**; 3440~3450, 1985.