血小板凝集に及ぼす Cyclic AMP および Cyclic GMP 破壊酵素の影響*

山崎博男** 間下信昭*** 沼野藤江***
佐野忠弘*** 浅野富子**** 日高弘義****

Key words : Platelet aggregation, Cyclic AMP phosphodiesterase, Cyclic GMP phosphodiesterase, ADP-induced aggregation, Adrenaline-induced aggregation

緒言

近年血小板凝集に血小板中 cyclic AMP および cyclic GMP の動態が重視されている。すなわち Salzman らによれば¹⁾、血小板中 c-AMP レベルの低下で凝集がおり、c-GMP はこれと逆の動態を示すとされる。しかしこれには異論もある。一方これらの代謝にきわめて重要な破壊酵素である phosphodiesterase (以下 c-AMPPDE, c-GMPPDE) の血小板凝集における動態はあまり明らかでない。そこでこれらの酵素活性と凝集能との関連を検討した。

I. 対象および方法

男30例、女27例の健康者並びに各種疾患々々者、年齢16ないし77歳にて、前腕肘静脈よりプラスチック注射器にて citrate 血 (citrate 終濃度 0.38%) 20ml を採血、41例にて血小板多血漿 (PRP) を用いて、ADP 3, 10 μ M, adrenaline 0.1, 1 μ g/ml (いずれも終濃度) による血小板凝集能を、Chrono-Log 社血小板凝集計を用い吸光度法²⁾³⁾で測定した。また16例にて全血を用い、ADP 3, 10 μ M による血小板凝集能を screen filtration pressure (SFP) 法⁴⁾を用い測定した。この測定には Chapman 社製

Fig. 1 Parameters in platelet aggregation curve induced by ADP.

SFP apparatus を用いた。SFP 法で用いた血液も一部遠沈し PRP をえ、各 3ml ずつの PRP を c-AMPPDE, c-GMPPDE 活性測定のため、採取後直ちに冷凍保存した。

* Effect of cyclic AMP and cyclic GMP phosphodiesterase on platelet aggregation. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 29, 1975).

** 東京都臨床医学総合研究所 [〒113 東京都文京区本駒込 3-18], Hiroh YAMAZAKI: The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan 113.

*** 東京医科歯科大学第三内科, Nobuaki MASHIMO, Fujie NUMANO & Tadahiro SANO: The 3rd Department of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

**** 愛知県発達障害研究所, Tomiko ASANO & Hiroyoshi HIDAKA: Institute for Developmental Research, Aichi Prefecture Colony, Aichi, Japan.

Fig. 2 Correlation between platelet aggregability induced by ADP and adrenaline (slope, bp/a and b5/a from top to down) and cyclic AMP phosphodiesterase activity of human platelets.

吸光度法による血小板凝集能測定は、既報⁵⁾のごとく図1に示す parameter を測定した。すなわち凝集の速さに関するものとして初期凝集の角度(slope), これを同一検体の血小板無血漿 (PFP) 吸光度で補正した intensity of reaction (IR), 一次凝集最大値までの時間 (RT), この高さの半分に達するまでの時間($\frac{b}{2}T$), 凝集の大きさに関与するものとして一次凝集, 二次凝集, 5分後凝集の大きさ (それぞれ bp, bm, b5) である。われわれはこの大きさを PFP の吸光度 a で除し, %として表した。5分後凝集には一次凝集のみで終る反応では、一旦凝集した血小板凝集塊の解離の影響も含まれる。SFP 法による血小板凝集能は、SFP apparatus にて10秒間注射筒ピistonをおし、全血が $20 \times 20 \mu^2$ の網目をもつメッシュを流れる時、血小板凝集塊による網目の閉塞による灌流圧の最大値を SFP とした⁴⁾。

血小板中 c-AMPPDE, c-GMPPDE 活性測

Fig. 3 Correlation between platelet aggregability and cyclic GMP activity of human platelets.

定は日高, 渋谷法⁶⁾に従った。すなわち 3ml PRP を teflon homogenizer でホモゲナイズし、この一部を最終容量 0.5ml の assay mixture に加えた。Assay mixture は 32mM Tris 塩酸溶液 (pH 8.0) に 5 mM $MgCl_2$, 0.4 μM 3H -cyclic AMP または GMP を含む。ついで $30^\circ C$ 15分間 incubate 後、沸とう水中に3分間、つづいて snake venom 50 μg を加え、 $30^\circ C$, 10分間 incubate 後再び $100^\circ C$, 3分間ののち、遠沈で除蛋白し、その上清を Dowex 50 (H^+ form) カラムにアプライし、10ml の蒸留水で洗った。のち 3 N アンモニア水 1.5ml で 3H -nucleoside を溶出し、この放射活性を Beckman liquid scintillation counter (Model 233L) で計測した。本法によりアプライした 3H -nucleoside の 90ないし 95% が回収された。

使用薬剤: ADP (Sigma 社), adrenaline (三共), 3H -cyclic AMP または GMP (New England Nuclear 社), snake venom (Crotalus atrox, Sigma 社) を用いた。なお血小板数は

Coulter counter Model ZBI (Coulter 社) にて測定した。

II. 成 績

血小板 c-AMPPDE および c-GMP-PDE 活性は、 10^7 個血小板あたりのおおの 1.17 ないし 8.36, 4.16 ないし 24.39 pmol/min, 平均値および標準誤差は 3.92 ± 0.26 , 11.97 ± 0.89 と c-GMP-PDE 活性の方がはるかに高かった。同時に PFP 中活性を測定したが上記値の $1/30$ 以下であり、血清中の上記酵素活性は、この場合無視しうることを知った。なお PRP を遠沈し、沈渣にえた血小板について上記活性を測定したが、PRP を homogenize したサンプルを用い測定した値に比し変動が大きかった。

一方同じ PRP を用いて測定した血小板凝集能に関する測定値は、 $3\mu\text{M}$ ADP にて slope 51~86 (75.8 ± 2.1) 度, bp/a 9.6~66.2 (38.2 ± 3.4)%, b5/a 5.6~91.5 (37.7 ± 4.5)%, $10\mu\text{M}$ ADP にて slope 56~86 (79.9 ± 1.1) 度 bp/a 15.0~84.8 (47.4 ± 3.8)%, b5/a 10.0~95.8 (48.0 ± 4.7)%, $0.1\mu\text{g/ml}$ adrenaline にて slope 19~59 (39.2 ± 2.1) 度, bp/a 7.4~53.3 (17.1 ± 1.6)%, b5/a 7.0~90.9 (38.0 ± 5.1)%, $1\mu\text{g/ml}$ adrenaline にて slope 35~79 (61.3 ± 1.8) 度, bp/a 15.9~48.2 (29.0 ± 1.5)%, b5/a 5.7~100 (63.9 ± 4.3)% であった。

これら血小板凝集能 parameter と血小板 c-AMPPDE 活性との間の関係は、図 2 に示すごとくである。すなわち $10\mu\text{M}$ ADP による血小板凝集曲線 slope と c-AMPPDE 活性との間に相関係数 0.31 で推計学的有意 ($p < 0.001$) の正相関が見出された。bp/a, b5/a との間には有意の相関はなかった。 $3\mu\text{M}$ ADP による反応でも同様の傾向が見出された。一方 adrenaline $1\mu\text{g/ml}$, $0.1\mu\text{g/ml}$ による反応との間には、何らの関係も見出されなかった。血小板 c-GMP-PDE 活性との間の関係は図 3 に示すごとくであった。すなわち $10\mu\text{M}$ ADP による slope との間に相関係数 0.48 の有意 ($p < 0.001$) の正相関, bp/a との間に相関係数 0.28 の有意 ($p < 0.05$) の正相関が見出されたが、b5/a との間には有意の相関はなかった。 $3\mu\text{M}$ ADP による反

Fig. 4 Correlation between platelet aggregability measured by SFP method and cyclic AMP (○) and cyclic GMP (●) phosphodiesterase activity of human platelets.

応も同様の傾向を示した。また adrenaline $1\mu\text{g/ml}$ による反応については、slope, bp/a の間には有意の相関はなかったが、b5/a との間に相関係数 -0.38 の有意 ($p < 0.01$) の負の相関が見出された。また adrenaline $0.1\mu\text{g/ml}$ による反応でも同様の傾向がみられた。また図 4 に示すごとく、 $3\mu\text{M}$ ADP による SFP と c-GMP-PDE 活性との間に相関係数 -0.520 の有意 ($p < 0.05$) の負の相関が見出されたが、c-AMPPDE 活性との間には何らの相関もなかった。

III. 考 察

吸光度法による血小板凝集能の測定に当っては、反応の速度に関する parameter と、大きさに関する parameter を測定することができる。この二つの種類の parameter は共に平行して変動するとは限らず、その標本をえた対象により種々の特長を示す。例えば著者らは血栓症急性期において slope, IR, RT, b/2T で表さられる血小板凝集速度には健康者群との間に差はなかったが、b5/a で表さられる、主として二次凝集に関する凝集の大きさが有意に増大していることをみた⁵⁾。こうしたことから凝集の速度と大きさは、おのおの異った因子によって影響される可能性が考えられる。

一方近年血小板凝集機構における c-AMP, c-GMP の意義が重視されてきている。そこで著者らは血小板凝集機構をこの面から検討する目的で、c-AMP, c-GMP の代謝にきわめて重要である破壊酵素 PDE 活性の測定を行い、凝集の速度としての parameter として slope, 大きさの parameter として bp/a, b5/a との関連をみた。この結果 ADP による slope と c-AMPPDE, c-GMPPDE 活性との間に正相関, ADP による一次凝集の大きさと c-GMPPDE 活性との間に正相関, adrenaline による5分後凝集の大きさと c-GMPPDE 活性との間に負の相関が見出された。ADP による slope との正相関は c-AMPPDE 活性との相関係数 0.31 に対し, c-GMPPDE 活性とのそれは 0.48 と高かった。ADP の一次凝集の大きさと c-GMP-PDE 活性との相関係数は 0.28 と低かったのに対し, adrenaline による5分後凝集との相関係数は -0.38 とより高かった。このことは血栓症急性期における5分後凝集の増大⁵⁾, myeloproliferative disorders における5分後凝集の減少⁷⁾が ADP よりも adrenaline を用いたときわめて著明になることを考えると興味がある。

吸光度法による測定では ADP による5分後凝集と PDE 活性との間に関連はみられなかったが、全血を用いる SFP 法によって、c-GMP-PDE 活性との間に相関係数 -0.520 の負の相関をみとめた。SFP と吸光度法による5分後凝集との間には、相関係数 0.534 の相関があり、両者は血小板凝集能を表現しているが、しかし多少別の角度からみているのではないかと考えられる⁸⁾。これが本論文でみられた c-GMPPDE 活性との関連の吸光度法による場合との差を説明しうるかもしれない。あるいは全血を用いる SFP 法にては、遠沈による血小板の破壊、損傷の影響が吸光度法で PRP を用いる場合よりも少なく、これが血小板酵素活性測定値に反映されているのかもしれない。何れにもせよ血小板 c-AMP 並びに c-GMP 破壊酵素と凝集能との間にある種の相関が存在していることは、血小板凝集における c-AMP, c-GMP の役割りを考える上に興味深く、今後さらに例数を重ね、また臨床病態による分類に従い測定値を対比する

など、検討される必要があると考えられる。

結 論

57例の健康者並びに各種疾患々々にて、3, 10 μ M ADP, 0.1, 1 μ g/ml adrenaline による吸光度法を用いての血小板凝集の速度、一次凝集、5分後凝集の大きさ、あるいは 3 μ M ADP による SFP を測定した。同じ検体を用い血小板中 c-AMPPDE および c-GMPPDE 活性を測定し、上記凝集能の一部と酵素活性との間に推計学的有意の相関の存在することを認めた。

文 献

- 1) Salzman, E. W. : Cyclic AMP and platelet function. *New Eng. J. Med.*, **286** ; 358, 1972.
- 2) Born, G. V. R. : Quantative investigations into the aggregation of blood platelet. *J. Physiol.*, **162** ; 67, 1962.
- 3) O'Brien, J. R. : Platelet aggregation—Part II. Some results from a new method of study. *J. Clin. Path.*, **15** ; 452, 1962.
- 4) Swank, R. L. : Alteration of blood on storage: measurement of adhesiveness of 'aging' platelets and leukocytes and their removal by filtration. *New Eng. J. Med.*, **265** ; 728, 1961.
- 5) Yamazaki H., Takahashi, T. and Sano, T. : Hyperaggregability of platelets in thromboembolic disorders. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **34** ; 94, 1975.
- 6) Hidaka, H. and Shibuya, M. : A new assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase; its application to human serum. *Biochem. Med.*, **10** ; 301, 1974.
- 7) Nomura, T. and Onozawa, Y. : Platelet aggregation in myeloproliferative disorders. *Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl.*, **60** ; 247, 1974.
- 8) Yamazaki, H., Numano, F., Numano, F. and Shimamoto, T. : Estrogen and hyperaggregability of platelet measured by screen filtration pressure (SFP) method in Takayasu's disease. *Haemostasis*, **1** ; 285, 1972/73.

<ABSTRACT>

Effect of cyclic AMP and cyclic GMP
Phosphodiesterase on Platelet Aggregation

by

Hiroh YAMAZAKI, Nobuaki MASHIMO*
Fujie NUMANO*, Tadahiro SANO*,
Tomiko ASANO** and Hiroyoshi HIDAKA**

from

The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, *The 3rd Department of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, and** Institute for Developmental Research, Aichi Prefecture Colony, Aichi, Japan.

Recently, roles of cyclic AMP and cyclic GMP in platelets have been getting important on mechanisms of platelet aggregation. However, behaviours of c-AMP and c-GMP phosphodiesterase (PDE) in platelet aggregation are still unknown. So relationships between activities of c-AMPPDE and c-GMPPDE in platelets and platelet aggregability induced by ADP and adrenaline were observed using 57 human materials. Activities of c-AMPPDE and c-GMPPDE were measured by Hidaka and Shibuya method (Biochem. Med. 10 : 301, 1974). Using the same samples, platelet aggregabilities induced 3 and 10 μ M ADP and 0.1 and 1 μ g/ml of adrenaline were measured by an optical density method. In a platelet aggregation curve, slope of the curve and intensities of primary

aggregation and aggregation at 5 minutes after the addition of reagent were measured. In 16 cases, screen filtration pressures (SFP) induced by 3 μ M ADP were also measured.

Activities of c-AMPPDE and c-GMPPDE of platelets were 1.17-8.36 and 4.16-24.39 pmol/min/10⁷ platelets respectively. These means and standard errors were 3.92 ± 0.26 and 11.97 ± 0.89 pmol/min /10⁷ platelets respectively. There were statistically significant correlations between slope induced by 10 μ M ADP and c-AMPPDE or c-GMPPDE activities respectively ($p < 0.001$). These correlation coefficients (r) were 0.31 on c-AMPPDE and 0.48 on c-GMPPDE activities. Also a significant correlation between an activity of c-GMPPDE and an intensity of primary aggregation induced by 10 μ M ADP ($r = 0.28$, $p < 0.05$). Using 1 μ g/ml of adrenaline, there was a significant negative correlation between an activity of c-GMPPDE and an ntensity of 5 minutes aggregation ($r = -0.38$, $p < 0.01$). SFP showed a significant negative correlation to a c-GMPPDE activity ($r = -0.520$, $p < 0.05$). These results suggest important roles of c-AMPPDE and c-GMPPDE activities of platelets on platelet aggregation.