血小板セロトニンpump-leak輸送系にかんする研究 (第 2 報)

慶応義塾大学医学部内科学教室 (指導 笹本 浩教授)

奥 田 稔

PUMP-LEAK TRANSPORT SYSTEM OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE IN HUMAN BLOOD PLATELETS

Minoru OKUDA

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

(Director: Prof. Hiroshi Sasamoto)

概要 血小板 5HT 輸送系の特質および調節機構につき、さらにその詳細を解明するため各種代謝阻害薬の効果およびleak potentialの変動を中心に研究を行なった。能動輸送 (pump) は 2,4-DNP, oligomycin, IAA, ouabainのいずれによつても抑制を受けるがとくに前二者の脱共役薬においてその効果が著明で、呼吸性エネルギー代謝の重要性が確認された。一方アミンの受動的な動き (leak) は明らかに濃度勾配依存性で、外界濃度の変動に応じて急速にactivationされる。単一方向内向束、外向束および正味移動束の測定により定常平衡状態、とりこみ、放出におけるこのpump-leak輸送系機構の詳細が明らかとなつた。この輸送系を介し血小板 5HT は外界と活発なexchangeを行ない、膜内外のdynamic equilibrium濃度が保持されていると結論された。

緒 言

循環系に存在する5-hydroxytryptamine (5HT) は産生細胞周辺の微小血管床をのぞき、その全量がcarrierである血小板にとりこまれていて有効濃度の遊離型は血漿中に存在しない。強力な血管平滑筋収縮作用を有し、しかも常時流血中に存在するにもかかわらず、その生理的意義づけが困難とされてきた主たる理由である¹⁾²⁾³⁾。

血小板膜の異化、破壊に伴う一般的な放出現象の一環として5HTが血漿中に遊離することはよく知られているが⁴⁾、この放出による5HTの血管作動効果は従来過大評価されてきたきらいがある。すなわち血栓形成などを例にしても、一定数の血小板よりその含有量の一部が瞬時的に遊離

されるにすぎず有効濃度達成の可能性はmonoamine oxidase(MAO)活性の高い肺などではきわめて少ないとしなければならない。

われわれは血管平滑筋の特異的receptorにおけるこのアミンの有効濃度がどのような過程、機構で達成されるかを解明する目的で“intact”血小板の5HT膜透過について研究を行なつてきた。この輸送系に及ぼすanoxia効果についてはすでに報告¹⁾³⁾したが、本報では各種代謝阻害薬効果およびleak potentialの変動を中心にさらに詳細な検討を行なった。この輸送系の特質および調節機構につき興味ある知見を得たので報告する。

実験方法および材料

採血法、血小板の分離ならびに浮遊液 (Ca^{++} -

free Krebs-Ringer) の作成, incubation, 試料処理法, 蛍光分光分析法による化学的 5HT 定量, liquid scintillation counter による ^{14}C -5HT の測定, luciferin-luciferase 系による ATP 量の測定, 血小板算定および位相差像検鏡法はすでに詳細を報告^{11,14)}したごとく行なつた. 一般的な器具および試薬についても同じである. 代謝阻害薬は oligomycin (Sigma Chemical Co.), ouabain (K & K Laboratories INC.), 2,4-dinitrophenol および iodoacetic acid (Fisher Chemical Co.) を使用した. ^{14}C -labeled 5HT 貯蔵液は specific activity が $1\mu\text{C}/1.233\mu\text{M}$ となるように調製した. preincubation または incubation は 5HT の種々な medium 最終濃度 ($123.3\text{ nM/ml} \times 1/2^n$, $n = 0, 1, \dots, 10$) で行なわれたが, isotope を tracer とした場合すべてこの specific activity が厳密に保持された.

Net uptake (正味とりこみ量) の測定: 技術的な詳細はすでに報告¹³⁾した通りであるので省略する. とりこみ量についても, 以下に述べる種々な移動束にかんしても各代謝阻害薬の pump 抑制効果は同一血小板 (one batch) について同

一実験内においてのみ比較された.

Unidirectional influx (単一方向内向束), unidirectional outflux (単一方向外向束) ならびに net outward flux (正味外向性移動束) の測定²⁾:

Fig. 1 の flowsheet に示されるごとくに行なつた. 単一方向内向束の測定では血小板は最初 non-radioactive 5HT (123.3 nM/ml) で preincubation され, 次に ^{14}C -labeled 5HT で incubation が行なわれた. したがって単一方向内向束は non-radioactive な血小板 (preloaded) に新たにとりこまれる放射能量または incubation media より減少する放射能量で与えられる. 単一方向外向束の測定はこの逆の組合せで行なわれた. すなわち ^{14}C -labeled 5HT で preincubation され, incubation は non-radioactive 5HT で行なわれた. 単一方向外向束はしたがって血小板 (prelabeled) より減少する放射能量または incubation media に出現する放射能量で与えられる. 正味外向性移動束は上記反対方向の二つの単一方向束の差であり, 放出量 (release) と同義である. この移動束は preincubation および incubation をともに ^{14}C -labeled 5HT で行ない, 血小板または incubation media の放射能量の増減を測定することによって与えられる.

Differential centrifugation による細胞成分の

Fig. 1. Flowsheet for measurements of unidirectional influx and outflux.

Fig. 2. Flowsheet for evaluating the effect of 2,4-DNP on the active translocation of 5HT by platelet granules.

分画: Fig. 2のflowsheetに示されるごとくone batchの血小板を二等分し, 一方を2,4-DNP (10^{-3} M)を含むmediumで60分間incubationを行ないlabelした. 他方は2,4-DNPをのぞいた同一mediumでlabelしcontrolとした. homogenizationは溶媒を0.25M sucrose (EDTA-2Na 0.01 M⁵⁾)とした以外はすでに報告¹⁾した方法と同じである. 分画された顆粒および膜成分はice-cold 0.25M sucroseで1回洗った後, 放射能が測定された.

結 果

血小板ATP量と5HT正味とりこみ率:

Table 1に示されるようにとりこみ開始時の血小板ATP全体量と単位時間のアミンとりこみ量との間にはみかけ上, 相関関係は実証されなかつた. Table 1より明らかなように, とりこみ率はmedium濃度すなわち濃度勾配と相関性を示した. すなわち両medium濃度群におけるとりこみ率は, $20.0 \text{ nM} \pm 3.46$ および $13.0 \text{ nM} \pm 2.28/10^9$ 血小板/60分で統計学上有意の差を認める ($P < 0.001$). なお後群においては濃度勾配 (leak potential) はとりこみ開始時において前群の2倍であることから, pumpは相対的により大きなエネルギーinputを必要としている¹⁾.

各種代謝阻害薬によるpump阻害効果の比較:

濃度勾配に逆らつての物質の動きはentropyの減少と自由エネルギーの増大を伴う吸エルゴン反応であり, したがって他の多くの生理的現象と

同じく直接のエネルギー源は解糖や呼吸で得られるATP⁶⁾であろうと推測されるが, 上記に示された成績のように, またanoxia時の解糖促進による結果¹³⁾で見られたようにその実証は容易ではない. この点を追求する目的で, 作用機序の異なる二つの呼吸鎖リン酸化脱共役薬, 解糖阻害薬および膜ATPaseの特異的阻害薬のpumpに及ぼす影響について比較実験を行なつた.

2,4-DNPが呼吸鎖における共役段階で高エネルギー中間体を加水分解することによつてATPの合成を阻害するのに比し, oligomycinは高エネルギー

Fig. 3. Comparative effects of various metabolic inhibitors on the net uptake of 5HT. The platelets were suspended in calcium-free Krebs-Ringer solution, pH 7.40 and divided into several batches. They were added 2,4-DNP 10^{-3} M, oligomycin $100 \mu\text{g/ml}$, IAA 10^{-3} M and ouabain 10^{-4} M, respectively. One batch receiving no metabolic inhibitors served as a control. After 30 min preincubation at 37°C in air, ^{14}C -labeled 5HT was added to each media in concentration of 61.6 nMoles/ml . The radioactivity of the platelets at zero time (less than 250–300 c.p.m.) was subtracted from subsequent determinations.

Table 1. Uptake rate as functions of ATP and medium concentration of 5HT.

Initial ATP Content nMoles/ 10^9 Platelets	Net Uptake of 5HT, nMoles/ 10^9 Platelets /60 minutes	
	Medium Concentration of 5HT 123.3 nMoles/ml 61.6 nMoles/ml	
1	53.0	18.9
2	48.9	20.0
3	47.0	19.3
4	72.6	21.1
5	59.0	23.0
6	56.1	24.1
7	32.4	17.1
8	50.2	18.3
9	55.9	27.2
10	69.4	18.0
11	42.2	18.9
12	44.6	13.8
Mean	52.6	20.0
S.D.	10.71	3.46

ギー中間体(状態)はintactのままで次のエネルギー転移段階X~Piを阻害することによってATP合成を抑止する⁷⁾. pumpの直接のエネルギー源がATPであるか否かを決定する上においてこの作用機序の違いは本質的な点であることを強調しておく. iodoacetic acid (IAA) は Embden-Meyerhof回路において3-phosphoglycerdehyde dehydrogenaseを阻害し¹⁾, 3-diphosphoglycerateへの転化を特異的に抑止する⁶⁾. 次にouabainであるがこの強心配糖体は上記代謝阻害薬と異なり、解糖および呼吸によるATP産生を低下させずにその膜での利用(加水分解)を阻害する⁶⁾.

Fig. 3に示されるごとく5HTとりこみはいずれの場合も著明な抑制を受けている. 脱共役薬の附加では、とりこみのinitial rateは著明に阻害されるが60分前後で定常平衡状態(steady-state equilibrium)が達成されている事実は、pumpがintactな解糖によりエネルギーの供給を受けていることを示すものである. 2,4-DNPによって阻害されるのみでなく、oligomycinによっても同じく阻害を受ける事実は直接のエネルギー源が高エネルギー中間体である可能性を否定する証拠⁷⁾と考えられる.

IAA附加ではpumpのinitial rateはほとんど抑制されておらず、約30分のtime lagがある. TCA回路における酸化反応の進行および呼吸鎖への連結によって一定時間pumpにエネルギーの供給が続くためと解される. 30分以後では全エネルギー代謝の抑止のためpumpはunsteady stateに陥りアミンの放出現象が起こっていることに注目したい.

Ouabain附加ではpumpはcontrolに比し一定の割合で抑制を受けている. ouabainにより阻害される血小板の膜ATPaseが細胞全体のATPaseの約30%であるという報告⁹⁾は本実験により示されたpump阻害度とほぼ一致する成績である.

正味外向性移動束 (net outward flux; 放出 release): pump-leak輸送系に基づくこのアミンの血小板膜での動きはpumpおよびleakそれぞれ

Fig. 4. Correlation between the radioactivity and 5HT concentration. The net outward flux in c.p.m. (×—×) was shown to correlate with that measured chemically (●—●). The dotted line represents incubations in cold (0°C).

の種々な単一方向移動束 (unidirectional fluxes) で構成されている¹²⁾ (Fig. 13参照). 受動的な正味外向束は単一方向外向束(Mo)とrandomな分子運動による単一方向内向束(Mi)で与えられ、能動的な正味内向束は単一方向内向束(Mi)とrandomな分子運動による単一方向外向束(Mo)で与えられている. 血小板の場合にはこれら正味外向束および内向束はそれぞれ単一方向外向束と単一方向内向束と同義とみなしてよい(後述). 最終的な正味の5HTの膜の出入りはこれら二つの正味移動束 (Mnet, passiveおよびMnet, active) の差で決定されている. 定常平衡状態ではこの差は0である (medium濃度 123.3nM/ml; Fig. 5, 6, 9, Table 3参照). なお、血小板にはmonoamine oxidase活性はないと報告¹⁴⁾されているが、移動束および濃度勾配を規定する上で血小板5HT濃度(Ci)が膜透過以外の因子の影響を受けないことを確認しなければならない. Fig. 4に示されるごとく移動束を表わす放射能カウントが化学的に測定した5HT量と相関する事実は濃度(Ci,

Fig. 5. Activation of net outward flux by various medium concentrations of 5HT. The prelabeled platelets were incubated in standard Krebs-Ringer media containing various 5HT concentrations, all of which had the same specific activity of $1 \mu\text{Ci}/1.233 \mu\text{M}$.

Fig. 6. Dependency of the rate of net outward flux on concentration gradients. The rates were determined at various concentrations of the medium 5HT. The results of six experiments are depicted with mean $\pm$ 1 S.D. The ordinate represents the net outward flux/60 min in percent of the platelet 5HT which initially labeled.

Co) が移動束によつてのみ変動されることを実証するものであり、代謝性濃度変動がないことを示している。

以下、種々な条件でのアミン放出機構について報告する。

(1) 濃度勾配の影響: Fig. 5 に示されるごとく濃度勾配が $40/1$ (medium濃度 123.3 nM/ml) では, pumpとleakは拮抗状態にあり正味外向性移動束は見られず60分時では僅かながら正味のとりこみが起こっていることが多い (Table 3 参照). medium濃度を減少し leak potentialを増大させるとこの拮抗状態が破れ, 放出速度および放出量は相対的に増加している. Fig. 6 はいろいろな濃度勾配における放出量/60分 (平均値 $\pm$ 1 S.D.) である. このように放出率は明らかに濃度勾配依存性を示し, medium濃度 0 において放出率は最大である。

(2) 代謝阻害薬の影響: Table 2 は厳密な実験条件下 (one batch血小板) における各種阻害薬の放出に及ぼす影響を比較した成績である. 濃度勾配はすべてにおいて同一であるからこれらの阻害薬による放出量/60分の増加はpumpの阻害に起因する. 各種阻害薬の有効性 (放出率増加) がとりこみにおけるpump阻害度と同じ順序である点 (Fig. 3 参照), ならびに阻害薬濃度と放出率との間には明らかな相関性が存する事実に注目さ

Table 2. Comparative effects* of metabolic inhibitors in different concentrations on release rate of 5HT.

	Release in % of Initial/60min
Control	40
No Glucose	55
2,4-Dinitrophenol	10 ⁻⁵ M 49
	10 ⁻⁴ M 52
	10 ⁻³ M 67
Oligomycin	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 52
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 64
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 80
Iodoacetic acid	10 ⁻⁵ M 54
	10 ⁻⁴ M 63
	10 ⁻³ M 70
Ouabain	10 ⁻⁵ M 43
	10 ⁻⁴ M 53
	10 ⁻³ M 53

*The experiment was carried out with one batch of platelets.

Fig. 7. Effect of 2,4-dinitrophenol on the net outward flux. The incubation media contained 2,4-DNP 10^{-3} M, 10^{-4} M and 10^{-5} M, respectively. The control received no inhibitors.

Fig. 8. Effect of oligomycin on the net outward flux. The incubation media contained oligomycin in concentrations of 5 µg and 10 µg/ml, respectively. The control received no inhibitors.

りたい。Fig. 7は2,4-DNP附加の影響をtime courseについて調べたものである。急速な放出のinitial rate, 以後のslow rateおよび新しい定常平衡状態の存在はとりこみにおけるこの脱共役薬効果の特徴と本質的に全く同じである。Fig. 8に示されるごとくoligomycin附加による放出量の増加およびそのkineticsの特徴は2,4-DNPの場合と同様である。とりこみの場合と同じく、この二つの脱共役薬がともに有効な事実はpumpのエネルギー源がATPであることを指向するものである⁶⁾⁷⁾。

(3) cell-medium容積比の影響：放出によって初期の濃度勾配は低下し(diffuse down), pumpとleak成分の平衡の上に新しい濃度勾配が

Fig. 9. Influence of cell-medium ratio (v/v) on the net outward flux. A unit number of the labeled platelets were suspended in 1.0ml, 10 ml and 40ml of the standard Krebs-Ringer medium containing no 5HT, respectively. The solid line shows increase in the rate and magnitude of the release. The dotted line represents the results from control experiments in which all of the medium contained 123.3 nMoles/ml of 5HT at initial.

与えられるわけであるが、この新しい平衡状態は cell-medium 比を変えることにより人為的に自由に変化させることができる。medium 容積 1.0 ml で行なわれたこれまでの実験に比し、medium 容積が充分大きい条件のもとでは (i.e. 10 ml, 40 ml) 一定量の放出による leak potential の低下は相対的に僅少のはずである。他方 pump はエネルギー代謝の有限性のため制約性があり、ある大きさ以上の leak potential に対しては拮抗性が保持できなくなる。この場合には放出の継続による potential の一層の低下で代償されると考えられる。Fig. 9, 10 はこの関係を実証した成績である。すなわち放出率および放出量は medium 容積の増加 (10 倍および 40 倍) につれて相関的に増大しており、定常平衡状態はそれぞれ異なつたレベルで与えられている (Fig. 9)。medium 濃度を 123.3 nM/ml に固定した control 実験 (点線) では血小板 5 HT 量は一定で容積比とは無関係である。この場合は容

積比が変わっても濃度勾配は同じであるためである。Fig. 10 は与えられた medium 容積で達成した定常平衡状態が medium 容積の増大によつて維持されなくなり、pump と leak が新しい拮抗点に達するまで放出がさらに起こることを示したものである。0°C での control 実験ではこの容積比に対する依存性が失われていることに注目されたい (Fig. 10 点線)。

単方向移動束：血小板ではこのアミンの細胞内濃度は外界の濃度よりはるかに高いので、確率的分子運動による膜透過 (能動的単方向外向束および受動的単方向内向束) は比較的に negligible と考えられる¹⁰⁾。したがつて受動的および能動的的正味移動束は downhill な単方向外向束と uphill な単方向内向束によつて与えられているとして差しつかえない。Fig. 11, 12 は medium 濃度をいろいろに変えて、これら pump および leak

Fig. 10. Influence of cell-medium ratio on steady-state equilibrium. The platelets were suspended in 1.0 ml volume of the standard medium in duplicates. At 60 min incubation, each one of the duplicate was added 39 ml of the fresh, standard medium. The dotted line represents control experiments carried out in cold (0°C).

Fig. 11. Unidirectional influx. Unidirectional influx was determined by incubating the pre-loaded, non-radioactive platelets for 1 hour in the media containing ^{14}C -labeled 5HT in various concentrations. The result from one experiment done in parallel with outflux measurements (Fig. 12) was depicted. The rate of the influxes, spontaneous (O—O) and with 2,4-DNP 10^{-3}M (x—x) is shown to decrease as the medium concentration decreases. Of note is a sigmoid nature of the kinetic curves.

Fig. 12. Unidirectional outflux. Unidirectional outflux was measured by incubating the pre-labeled platelets for 1 hour in the media containing non-radioactive 5HT in various concentrations. The outflux (O—O) was increased by addition of 2,4-DNP, 10^{-3} M (x—x). Of note is disappearance of the sigmoid nature by this inhibitor.

成分を同一血小板につき測定したものである。

Medium濃度が 123.3 nM/mlの場合、血小板 5HT 輸送系は濃度勾配^{40/11}を維持して定常平衡状態にあることはこれまで繰り返し実証してきたところである (Fig. 5, 6, 9, Table 3 参照)。この leak potential では血小板 5HT 濃度は一定に保たれ正味移動束は起こっていないが、Fig. 11, 12より明らかなことは輸送系が dynamic な state にあり、完全に counterbalance した単一方向内向束および外向束が生じている事実である (Table 3, $0\% \pm 7.2$)。

次に medium 濃度 0 の場合であるが、単一方向内向束は停止しており (Fig. 11)、膜透過は単一方向外向束 (leak) のみで与えられている (Fig. 12)。この場合正味外向性移動束が単一方向外向束と同義になる点に注意されたい (Table 3, $38\% \pm 7.4$)。これら単一方向移動束の kinetics について特異的なことは medium 濃度の減少とともに移動

Table 3. Effects of medium concentration of 5HT and 2,4-DNP on release rate of the amine.

5HT nMoles/ml of Medium	123.3	0	0
2,4-DNP in Medium	0	0	10^{-3} M
Release/60 min in % of Initial Platelet 5HT Mean $\pm$ 1 S.D.	0 ± 7.2	38 ± 7.4	65 ± 9.1
	(7)	(12)	(8)

() = No. of Experiments

Table 4. Effect of 2,4-DNP on the active translocation of 5HT.

	Radioactivity in percent of the controls		
	Soluble cytoplasmic fraction	15,000 $\times$ G precipitates: granules (mitochondria)	42,200 $\times$ G precipitates: membranes
Exp. 1	43	28	trace
Exp. 2	45	11	trace
Exp. 3	49	14	trace
Exp. 4	40	10	trace

束が sigmoid な curve を描いて減少する事実である。Fig. 12にみられるように単一方向外向束についてとくに顕著である。このように Michaelis-Menton type kinetics と一致しない例は赤血球の Na, K pump などいろいろな物質の膜透過について近年指摘されるようになったことである¹¹⁾。きわめて低い medium 濃度では膜と接触するアミン分子の統計学的な頻度に依存するようになるためである¹⁰⁾。medium 濃度約 3.8 nM/ml を境とする sigmoid 性は pump 依存性の消失とこの低 medium 濃度への依存性の結果であると考えられる。

2,4-DNP, 10^{-3} M の附加は単一方向内向束を阻害し (Fig. 11)、単一方向外向束を増大させるとともにその濃度勾配依存性を完全に消失させた (Fig. 12)。したがって正味移動束 (内向束-外向束) は増加する (Table 3, $65\% \pm 9.1$)。

顆粒 (ミトコンドリア) 分画によるエネルギー代謝依存性 5HT とりこみ: 14 C-labeled 5HT の顆粒分画中への分布についての知見はすでに報告¹⁾したが、この intracellular transport (細胞内輸送) がいかなる機構で行なわれるかは明らかにされなかつた。Table 4 は 2,4-DNP, 10^{-3} M 附加によるこの細胞内輸送の阻害率を示したものである。呼吸性 ATP 産生の阻害が homocellular な能動輸送を抑制するばかりでなく、この細胞内輸送をも顕著に阻害していることは注目に値する。顆粒分

画による5HTとりこみがエネルギー代謝依存性であることはTable 4に示された結果より明らかであるが、この機構が厳密な意味で能動輸送であるとする保証はない。顆粒内での5HT濃度およびその化学的性状、たとえばミトコンドリアmatrixでの豊富に存在するnucleotides(陰イオン)とのイオン結合の可能性にかんし確立された知見がなく、現段階では活動度勾配に逆らつての膜透過であるか否か決定できないためである。ミトコンドリアによる他の陽イオン(Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , H^+ など)のエネルギー依存性とりこみについても同様の問題点⁷⁾があり、能動輸送と定義する代りにactive ion translocationという概念が用いられている(Lehninger⁷⁾)。ミトコンドリア膜におけるイオンtranslocationと呼吸鎖リン酸化の共役機構の詳細な研究の進展に伴ない、細胞膜pumpのエネルギー代謝調節機構としての面が改めて取り上げられその意義が近年とくに強調されている⁷⁾。

解糖系の存在する細胞質内へのとりこみ阻害(平均56% 1 h^{-1})に比し、呼吸性エネルギー代謝の場合である顆粒(ミトコンドリア)分画への5HT translocationが平均84% 1 h^{-1} の阻害を受ける事実(Table 4)は5HT pumpへのrespirationの関与、さらにはその逆の代謝調節におけるpumpの重要性を示唆するものである。

考 察

これまでに明らかにされた知見から、血小板5HT濃縮機構はUssingの定義にしたがわない、濃度勾配に逆らつた能動輸送によるものであると断定してさしつかえない。

すなわち実際に測定した単一方向内向束(Mi)、外向束(Mo)および血小板内外の5HT濃度をあてはめるといずれの実測値においてもUssingの式¹²⁾ ($\text{Mo}/\text{Mi} = a_i/a_o \cdot e^{ZF E/RT}$)は満足されない。Fはファラデー定数、Rはガス定数、Tは絶対温度、Zは荷電数(5HTでは+1)である。Eは膜電位差を表わす。ai, aoは活動度であるがpH 7.4でのin vitro実験ではもちろん、生体内においても実測される5HT濃度Ci, Coとおきかえる

ことができる。なぜならば、(1) 生理的pH範囲ではこのアミンの測鎖、アミノ基はほぼ100%イオン化($-\text{NH}_2^+$)していること¹⁾、(2) 本研究で示されたこのアミンの易動度、とくに濃度勾配によりactivationされる外向きの動き、および(3) このアミンの水溶性細胞質分画に分布している割合¹⁾、からこの1価の陽イオンが確かに真の溶液に近い状態にあると結論できるからである。血小板5HT濃度に代謝性変化、i.e. MAOによる酸化がない¹⁴⁾ことは確認された通りである(Fig. 4)。また血小板内の陰イオン、i.e. ATPその他のnucleotidesとのイオン結合またはDonnan効果による活動度減少の可能性は、熱力学的濃縮機構に代わるものとして過去に提唱¹³⁾されたことがあるが、本研究で示された5HT易動度からも支持されないごとく、その後この仮説は否定¹⁾されてい

Fig. 13は本研究で解明されたとりこみ、放出および定常平衡状態における5HT輸送系の機構を図式的に示したものである。実測した内向き(pump成分)と外向き(leak成分)の動きを次の一般式にあてはめて解説したい。

$$\frac{dC^*}{dt} = k_1 \text{Co}^* - k_2 \text{Ci}^*$$

ここで内向き、外向きと定義した移動束は厳密には能動および受動の正味移動束をさすが、実際的にはCiがはるかにCoより大きいのでuphillな単一方向内向束とdownhillな単一方向外向束としてさしつかえない(Fig. 13)。¹⁴C-labeled 5HTでも透過性は変わらないと仮定し、tracer濃度をC*とするとこの式は任意の時間tでの血小板内tracer濃度の変化 dC^*/dt が入ってくる量 $k_1 \text{Co}^*$ から出て行く量 $k_2 \text{Ci}^*$ を差し引いたものに等しいことを示している。 k_1 および k_2 はそれぞれ sec^{-1} の内向束および外向束に対する比移動係数で、5HT膜透過性¹⁾i.e. 脂質溶解性(0.055)、分子量(176.2)、荷電(+1)、血小板膜特異性などにより決定されている。

まず定常平衡状態(steady-state equilibrium, Fig. 13)であるが、この状態では $dC^*/dt = 0$ で正味

Fig. 13. Diagram to characterize pump-leak modes of 5HT fluxes.

の出入りがなく、したがって上式は $k_1Co^* = k_2Ci^*$ となる。実際に測定された単一方向内向束、外向束の値は相等しく (Fig. 11, 12), 上式は実測値についても明らかに成立する。

次に放出 (release (I), (II), Fig. 13) であるが大別して二つの機構, すなわち leak potential の増大によるものと pump 活動度の低下によるものが考えられる。いずれの場合でも上式は $k_1Co^* < k_2Ci^*$ となり, 出て行く量が入って来る量より大きく血小板内濃度は減少する ($dC^*/dt < 0$)。

Leak potential の増大による放出 (release (I)) は leak 成分に有限性の pump が拮抗できなくなことを示している。濃度勾配の無限性に比し代謝エネルギー依存性の pump が種々な要因で i.e. ATP 再生系の反応速度で制約を受けるためである。この失均衡の結果放出が起こるのであるが, 最初与えられた leak potential は新しい定常平衡状態に達するまで diffuse down される。実験的には medium 濃度または cell-medium 容積比を繰り返し減少させることによつて血小板 5HT のほとんど全量を放出させることが可能であつた (Fig. 9,

10). 生体内での MAO 活性の高い臓器組織, 換言すれば外界の遊離型アミン濃度が null の場¹⁾における intact 血小板よりの放出機構を示唆するものと考えられる。

Pump 活動度の低下による放出 (release (II)) であるが, 血小板エネルギー代謝の特質¹⁾³⁾⁴⁾¹⁴⁾¹⁷⁾に基づき pump の制約は, (1) 呼吸性エネルギー代謝の阻害 (2,4-DNP, oligomycin, anoxia); (2) 解糖の阻害 (IAA); (3) 膜 ATPase の阻害 (ouabain) が考えられる。ここで注意すべきは脱共役薬による呼吸鎖リン酸化の阻害または anoxia では Embden-Meyerhof 回路での ATP 再生系が intact であること, および IAA による解糖の阻害は究極的には血小板の全エネルギー代謝の停止をもたらす点である。作用機序の異なる二つの脱共役薬による pump 阻害は放出の initial rate および量の著明な増大と一定時間後の定常平衡状態の達成で特徴づけられる。1 分子のグルコースが乳酸に至る過程で生成される ATP は 2 分子であり, 解糖 + TCA 回路 + 呼吸鎖リン酸化の連結で炭酸ガスと水にまで分解する過程で生成され

るATPは38分子である事実⁶⁾から上記のpump阻害上の特質はよく説明される。すなわち急速なエネルギー供給の減少とその後の解糖系による代償によるものである。oligomycinによつても阻害される事実からpumpの直接のエネルギー源が高エネルギー中間体でないことは明かである(前述)。

IAA附加によるpump阻害にtime lagが観察されること、および一定時間後の血小板5HT濃度のunsteady-stateは上記の説明からよく理解されることである。

いわゆる陽イオン転移ATPaseは神経、血小板、赤血球、心筋、腎臓その他の細胞、組織の膜で見出され研究されてきた⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁶⁾。このATPaseはATPに特異的に作用しこの高エネルギーリン酸化合物を加水分解する。多くの場合 Na^+ と K^+ の共存で至適の活性が得られ、ouabainで特異的に阻害される。1価の陽イオンとしての5HTが Na^+ または K^+ と共役して輸送される可能性¹⁵⁾については現在のところ推測の域を出ないが、血小板のouabain感受性、Na, K依存性ATPaseが全体の約30%⁹⁾であることとouabainによる5HT pump阻害度が一致する事実はこれらイオン相互の密接な関連性を示唆するものと考えられる。循環系および臓器組織の酸素濃度は生体内では常に変動している。血小板の外部環境の変化は直ちに血小板のエネルギー代謝様式および状態に反映されと考えられる。この場合leak potentialは一定範囲にあつても、pump活動度の低下で以上に述べられたようなrelease(II)の機構で継続的な放出が起こりうることを指摘したい。

とりこみ(uptake, Fig.13)の場合は $dC^*/dt > 0$ で $k_1\text{Co}^* > k_2\text{Ci}^*$ となる。すなわち出て行く量より入ってくる量が大きく、5HTは血小板内に濃縮される。5HT産生細胞周辺の毛細血管では血漿中に一定量の遊離型5HTが存在しており、したがつてleak potentialは血小板pump活動度より相対的に十分小さいと考えられる。腸管微小循環床におけるとりこみ機構をよく説明するものであ

る。

ATPが5HT pumpの直接のエネルギー源であるか否かについて直接的証明法、i.e.巨大神経細胞または可逆的溶血法による赤血球ghostにATPをとりこませる法¹¹⁾などは血小板においては技術的に行ないえないが、これまで述べてきた代謝阻害によるpump抑制効果からの状況証拠はすべてATPであることを指向⁶⁾⁷⁾⁸⁾¹¹⁾している。

Pumpによる浸透圧の仕事に伴つた血小板ATP含有量の低下を実証しえなかつたことは(Table 1), ATP説に対する反証ではなくATP利用系と再生系が定常平衡状態にあるためと解釈されるべきである。たとえば好气的状態ではもちろん、anoxiaさらにはanoxia+解糖の阻害(IAA)によつてもATP含有量の低下を伴わない筋収縮がおこることは周知⁶⁾の事実であるが、乳酸説またはクレアチニンリン酸説は現在終止符が打たれており、ATPが収縮の直接のエネルギー源¹⁶⁾であるとの決定に異議をはさむ者はない。これは筋でのATP再生系がPasteur効果、Lohman反応(クレアチニンリン酸+ADP $\rightleftharpoons$ ATP+クレアチニン)を介して定常平衡状態に保持されるためとされている⁶⁾。筋でのエネルギー代謝様式は本質的には呼吸鎖リン酸化を中心とする好气的なものであり、そのfacultative性による代償は一時的であるに過ぎないが、これに反し血小板でのエネルギー代謝は本質的にfacultative性¹³⁾¹⁷⁾でありその代償能は筋よりはるかに大きいと考えられる。血小板ATP濃度が骨格筋と比肩しうるきわめて高い値(10mM¹⁴⁾)である事実は血小板においてもATP利用系(i.e. 5HT pump)と再生系とが熱力学的に容易に平衡しうることを示唆している。

本実験操作で分画された顆粒成分はミトコンドリアのみでなく他の細胞内膜構造物(α および γ 顆粒¹⁵⁾)も含まれるわけであるが、顆粒成分による5HTとりこみが脱共役薬で抑止される事実はこの細胞内輸送がエネルギー代謝依存性であることの証明であり、したがつて主として呼吸鎖リ

ン酸化の局在の場であるミトコンドリアによるものであると考えられる。ミトコンドリアmatrixのTCA回路および内膜の呼吸鎖リン酸化の代謝基質の多くが陰イオンであること、およびこの1価陽イオンのactive translocationによる代謝効果⁷⁾についてはすでに指摘したところである。血小板5HT輸送系が呼吸性エネルギー代謝に依存性であるとともに、逆にその調節機構としての一面を有していることは興味深いことである。

本研究で解明された5HT輸送系、とくにその放出機構はintact血小板膜を介するものであり、thrombin¹⁸⁾をはじめとする一連の血小板破壊因子¹⁴⁾¹⁹⁾による放出現象とは異質である点を強調したい。最近Crawford²⁰⁾は肺におけるin vivo 5HT代謝の研究を行ない、肺動静脈間の微小循環床においてintact血小板よりこのアミンの放出がおこることを実証している。

結 論

どのような機構でこの生体アミンの血管作動性有効濃度が達成されるかは従来不明とされてきた。

本研究はcarrier血小板に濃縮された5HTが、膜輸送系を介し外界濃度と動的な平衡状態に保たれる機構を明らかにしたものである。すなわち種々な濃度勾配におけるleak成分のactivationおよびpumpに対する各種代謝阻害薬；2,4-DNP, oligomycin, IAA, ouabain効果の検討から血小板膜でのこのアミンの動きがpump-leak輸送機構によるものであると結論された。なおこれら代謝阻害薬効果より導かれる状況証拠はpumpの直接のエネルギー源がATPであることを指向する。定常平衡状態、放出、とりこみにおける能動적および受動的なアミンの動きはそれぞれuphillとdownhillな単一方向移動束を測定することにより分析され、これらの状態における輸送系の機構の詳細が解明された。

文 献

- 1) 奥田稔：血小板セロトニンpumpおよびATP代謝におよぼすanoxiaの影響，日内会誌，57：750，1968。—2) Okuda, M. and Nemerson, Y.:

- The permeability of human platelets to 5-hydroxytryptamine., Amer. J. Physiol. in press. —3) Okuda, M. and Nemerson, Y.: The influence of aerobic and anaerobic incubations on the uptake of serotonin by blood platelets., Biochem. Pharmacol. 17: 1473, 1968. —4) Marcus, A.J. and Zucker, M.B.: The Physiology of Blood Platelets, Grund & Stratton, INC., New York and London, 1965. —5) Chernyak, N.B.: Processes of formation and utilization of energy in human blood platelets. Clin. chim. Acta 12: 244, 1965. —6) Lehninger, A.L.: Bioenergetics, W.A. Benjamin, INC., New York. Amsterdam, 1965. —7) Lehninger, A.L.: The Mitochondrion, W.A. Benjamin, INC. New York. Amsterdam, 1964. —8) Skou, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane, Physiol. Rev. 45: 596, 1965. —9) Aledort, L.M., Troup, S.B. and Weed, R.I.: Human platelet ATPase activities: Relationship of localization to function. J. clin. Invest. 45: 980, 1966. —10) Ruch, T.C. and Patton, H.D.: Physiology and Biophysics, 19th edition, Section IX W.B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1965. —11) Hoffman, J.F.: The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. Amer. J. Med. 41: 666, 1966. —12) Ussing, H.H.: The distinction by means of tracers between active transport and diffusion. Acta Physiol. Scand. 19: 43, 1949. —13) Stacey, R. S.: Uptake of 5-hydroxytryptamine by platelets. Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 16: 284, 1961. —14) 奥田稔：血小板ATP正常値に関する研究—Luciferin-luciferase系によるATP測定法，慶応医学，45: 264, 1968. —15) Weissbach, H. and Redfield, B.G.: Factors affecting the uptake of 5-hydroxytryptamine by human platelets in an inorganic medium. J. biol. Chem. 235: 3287, 1960. —16) Szent-Györgyi, A. G.: Structural and functional aspects of myosin. Advances in Enzymology 16: 313, 1955. —17) Waller, H. D., Löhr, G.W., Grignani, F. and Gross, R.: Über der Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten. Thromb. Diath. Haem. 3: 520, 1959. —18) Gaitner, J.R., Jackson, D.P. and Maynert, E.W.: The action of thrombin on platelet 5-hydroxytryptamine. Bull. Johns Hopkins Hosp. 111: 185, 1962. —19) Bridges, J.M., Baldini, M., Fichera, C. and Dameshek, W.: Effect of anti-platelet antibodies on the in vitro uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets. Nature 197: 364, 1963. —20) Crawford, N.: The lungs and serotonin metabolism: A study of the pulmonary arteriovenous levels of plasma free and platelet-bound serotonin in man. Clin. chim. Acta 12: 264, 1965.