



Estrogen administration enhances thrombin generation in rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大橋, 涼太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1272

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 1 9 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 2 3 日
氏 名	大 橋 涼 太		
論文題目	Estrogen administration enhances thrombin generation in rats (エストロゲンの投与はラットにおけるトロンビン産生を亢進させる)		

論文題目

Estrogen administration enhances thrombin generation in rats
(エストロゲンの投与はラットにおけるトロンビン産生を亢進させる)

論文の内容の要旨

[はじめに]

近年日本における深部静脈血栓 (DVT)・肺塞栓症 (PTE) の発症頻度が増えている。DVT・PTE の発症機序は Virchow の 3 徴 (血流、血液、血管壁) および他の複数因子が関与していると考えられる。オランダでの疫学調査によると DVT・PTE の発症リスクは産褥期で 14 倍、妊娠中および経口避妊薬内服中で同じく 4 倍と報告されているが産褥期に血栓形成が促進される機序についてはまだ解明されていない。経口避妊薬にはエストロゲンが含有されている。また妊娠中には胎盤のジンチジウム細胞より大量のエストロゲンが産生されるため妊娠中は母体血中のエストロゲンは非常に高値となり分娩時に胎盤が排泄されると血中エストロゲンが急激に低下する。本研究では血中のエストロゲン濃度の上昇とその後の急激な消退が血液凝固能に変化を与え血栓形成に関与するという仮説をたてラットを用いた動物実験をおこなった。

[材料ならびに方法]

1) 内因性トロンビン産生能 (ETP) 測定法:

本研究においては血液中のトロンビン産生の指標として従来の割つ法である PT 法、aPTT 法でなく内因性トロンビン産生能 (ETP) を用いておこなった。ETP (mmOD/min) の測定法はまず 0.38% クエン酸採血したラット血漿に蛇毒由来のヘモコアグラーゼであるレプチラーゼを加えてフィブリンを除去し、さらに 0.22 μ mm のフィルターを使用し血小板を除去することで無フィブリノーゲン、無血小板血漿を作成し 37°C にてインキュベーションした後、トロンボプラスチン (100 mM CaCl₂ 添加) を加えて再度 37°C にてインキュベーションしてから合成基質 S-2238 を加え、プレートリーダーにて吸光度の変化を測定し ETP (mmOD/min) とした。

2) エストロゲン投与ラットにおける ETP の変動

8 週齢の雌 Sprague-Dawley ラット (n=6) に Estradiol dipropionate (EDP) 2mg/kg を皮下投与し、投与前・7・14・21・28・35 の各日に眼窩静脈より採血した。血中 Estradiol (E₂) 濃度および ETP (mmOD/min) を測定しコントロール群 (n=6) と比較した。ラット血中 E₂ 濃度測定は VIDAS エストラジオールアッセイキットおよび SPOTCHEM VIDAS SV-5010 を用いておこなった。

3) 低用量トロンビン投与による血栓誘発実験

EDP 投与群およびコントロール群において投与前・7・14・21・28・35 の各日において低用量 (500U/kg) のトロンビンを尾静脈より投与し血栓形成を誘発した。トロンビン投与後 3 分後にエーテル麻酔にて屠殺し右肺下葉を摘出、フィブリンの特異染色である phosphotungstic-acid hematoxylin (PTAH) 染色を施行した。光学顕微鏡下に 400 倍視野中の肺動脈内の血栓形成率を算出し比較検討した。

統計学的検討は Two factor ANOVA および Mann-Whitney U test をおこない p<0.05 をも

って有意差ありとした。

【結果】

- 1) EDP 投与群においては投与前血中 E_2 濃度 ($25.8 \pm 13.8 \text{ pg/ml}$) は投与後急激に上昇し投与後 7 日目には最大値 ($2671.1 \pm 568.1 \text{ pg/ml}$) となった。その後急激に低下し投与後 21 日目には投与前の値に復していた ($26.7 \pm 16.2 \text{ pg/ml}$)。投与前血中 ETP ($13.1 \pm 4.4 \text{ mmOD/min}$) は投与後有意に ($p < 0.01$) 上昇し 21 日目に最大値 ($27.5 \pm 12.5 \text{ mmOD/min}$) となり 35 日目には投与前の値に復していた ($12.1 \pm 7.5 \text{ mmOD/min}$)。
- 2) 肺動脈内の血栓形成率は EDP 投与群において投与後 21 日目に投与前 ($41.9 \pm 23.3\%$) より有意に上昇し ($76.2 \pm 3.1\%$)、28 日目には投与前の値に復していた ($42.7 \pm 20.1\%$)。

【考察】

トロンビン産生の過程において従来のクワット法である PT 法、aPTT 法では、非常に早い段階でクロットが形成されるためトロンビン産生の一部しか捕えられない。産生されたトロンビンの一部はアンチトロンビン III (ATIII) により不活化され、トロンビン・アンチトロンビン・コンプレックス (TAT) として測定される。 α_2 マクログロブリンと結合したトロンビンは合成基質法上で活性を有しこれを ETP (mmOD/min) として測定することにより全トロンビン産生の近似値を得ることができる。

本研究ではラットにおける過凝固状態の評価方法としてラット血漿における ETP (mmOD/min) の測定系を確立した。ラットにおいてエストロゲンの投与後に血中のトロンビン産生が亢進し、血栓誘発実験ではトロンビン産生の亢進した時期に一致して最も高い血栓形成率を示すことを確認した。このエストロゲン投与後の急激な変動は妊娠産褥期における特徴的なホルモン動態に類似している。本研究により妊娠産褥期における DVT・PTE 発症の機序としてエストロゲンの変動が血液凝固能を亢進させている可能性が示唆された。

【結論】

ラットにおいてエストロゲン投与後にトロンビン産生が亢進して易血栓形成性を示すことが確認された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、妊娠時及び産褥期に深部静脈血栓症 (DVT) 及び肺動脈血栓塞栓症 (PTE) が多く発症する機構に妊娠中に増加するエストロゲンが関与している可能性を検討するため、今回新規に確立した凝固活性測定法 (内因性トロンビン産生能: ETP) を用いて動物モデルでエストロゲンの影響を検討した。また低容量のトロンビンをラットの尾静脈より投与して肺動脈血栓を作成するモデルにおいてエストロゲンの血栓形成への影響を検討した。

【実験方法】

(1) 内因性トロンビン産生能 (ETP) の測定

クエン酸採血で得られたラット血漿をレプチラーゼで処理した後、 $0.22 \mu\text{m}$ のフィルターで血小板を除去して無フィブリノーゲン、無血小板血漿を調整し検体とした。トロンボプラスチン及び塩化カルシウム (100 mM) を添加した後合成基質である S-2238 を用いてトロンビン産生を定量し ETP とした。

(2) エストロゲン投与ラットにおける ETP の変動

8週齢の雌 Sprague-Dawley ラット (n=6) に Estradiol dipropionate (EDP) 2mg/kg を皮下投与し、投与前、及び投与後、7、14、21、28、35日に眼窩静脈より採血し検体とした。血中 Estradiol (E₂) 濃度および ETP を測定し対象群 (n=6) と比較した。ラット血中 E₂ 濃度測定は VIDAS エストラジオール測定キットを用いておこなった。

(3) 低用量トロンビン投与による血栓誘発実験

エストロゲン投与群および対象群において投与前、及び投与後、7、14、21、28、35日の各日において低用量 (500U/kg) のトロンビンを尾静脈より投与し血栓形成を誘発した。トロンビン投与3分後にエーテル麻酔にて屠殺し右肺下葉の血栓形成を検討した。血栓形成はフィブリンの特異染色である phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) 染色により確認し、光学顕微鏡下に 400 倍視野中の肺動脈内の血栓形成率を算出し比較検討した。Two factor ANOVA および Mann-Whitney U test により有意差検定を行った。

【実験結果】

(1) 血中 E₂ 濃度 (25.8 ± 13.8 pg/ml) は EDP 投与後 7 日目に最大値 (2671.1 ± 568.1 pg/ml) を示した後漸減し、21 日目には投与前値に復した (26.7 ± 16.2 pg/ml)。ETP (13.1 ± 4.4 mmOD/min) は EDP 投与後有意に ($p < 0.01$) 上昇し 21 日目に最大値 (27.5 ± 12.5 mmOD/min) となり 35 日目には投与前値に復した (12.1 ± 7.5 mmOD/min)。

(2) 肺動脈内の血栓形成率は EDP 投与群において投与後 21 日目に投与前 ($41.9 \pm 23.3\%$) より有意に高値を示した ($76.2 \pm 3.1\%$) が、28 日目では投与前の値とほぼ同じであった ($42.7 \pm 20.1\%$)。

以上、ラットにおいてエストロゲン投与により血中 E₂ 濃度が増加した後に血中のトロンビン産生能が亢進し、同一時期に血栓誘発実験でも高い血栓形成率を示したことから、エストロゲンが血液凝固能を亢進させているとした。またこれより妊娠産褥期における DVT・PTE 発症には妊娠末期に増加する血中エストロゲンが関与している可能性が示されたとしている。

本学位論文は動物実験においてエストロゲンが血液凝固能を亢進させる事を示すとともに、実際の血栓形成率も高まることを新規の測定方法を用いることにより証明した点で重要であり、また妊娠産褥期における血栓症予防法の確立につながる可能性を示したことが、審査委員会で高く評価された。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) ETP と他の凝固能測定方法の相関
- 2) ETP 値に最も強く影響する凝固因子は何か
- 3) ETP により血栓形成の予測は可能か
- 4) 無フィブリンノーゲン血漿の作成にレプチラーゼを使用するのは妥当か
- 5) エストロゲンにより血中濃度の変動する凝固・線溶系因子はあるか
- 6) プロゲステロンの影響はあるか
- 7) エストロゲン投与により体重等は変化していないか
- 8) エストロゲン濃度と ETP 値のピークが一致しない理由は何か
- 9) 肺動脈血栓形成率の評価方法は妥当か

- 1 0) ドロンビン静注による血栓形成モデルの妥当性
- 1 1) 妊娠ラットを用いる実験は可能か
- 1 2) 妊娠産褥期における血栓症発症の時期とエストロゲン濃度の関係
- 1 3) 妊娠産褥期における血栓症発症に対する循環動態の変化の影響

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦 野 哲 盟	
	副査	梅 村 和 夫	副査 今 野 弘 之