



## THE POTENTIAL ROLE OF PLATELET PAI-1 IN t-PA MEDIATED CLOT LYSIS OF PLATELET RICH PLASMA

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 芹沢, 清人 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1017">http://hdl.handle.net/10271/1017</a>

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 164号	学位授与年月日	平成 6年 3月25日
氏 名	芹 沢 清 人		
論文題目	<p>THE POTENTIAL ROLE OF PLATELET PAI-1 IN t-PA MEDIATED CLOT LYSIS OF PLATELET RICH PLASMA  (t-PA による多血小板血漿クロットの溶解における血小板内 PAI-1 の役割に関する研究)</p>		

医学博士 芹 沢 清 人

## 論文題目

### THE POTENTIAL ROLE OF PLATELET PAI-1 IN t-PA MEDIATED CLOT LYSIS OF PLATELET RICH PLASMA

(t-PA による多血小板血漿クロットの溶解における血小板内 PAI-1 の役割に関する研究)

## 論文の内容の要旨

〔はじめに〕血漿中のプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) は、組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) 活性を制御することにより線溶活性を決定する重要な因子である。PAI-1 は、血管内皮細胞で産生され血漿及び血小板内に存在する。血小板内の PAI-1 抗原量は血漿中の 10-20 倍であるにもかかわらず、血小板内の PAI-1 が血管内線溶活性にどのような影響を与えているのか不明である。そこで我々は、多血小板血漿 (PRP) 及び乏血小板血漿 (PPP) を用いて種々濃度の t-PA による溶解時間を測定した。さらに血栓溶解液中及び血小板内の PAI-1 のうち、活性型の PAI-1 抗原量を我々の確立した酵素免疫測定法 (EIA) を用いて計測し、血小板内 PAI-1 の t-PA による血栓溶解における役割を検討した。

〔方法〕クロットはマイクロタイタープレートに PRP あるいは PPP と t-PA を混和後ヒトトロンビン (最終濃度 1 U/ml) を加えることにより作成した。340nm の吸収を経時的に測定し最大値と最小値の中間の吸光度を示す時間を溶解時間とした。溶解液中の活性型 PAI-1 関連抗原量は EIA にて測定した。プロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) 及びテオフィリンにより血小板の活性化を抑制したうえで作成した血栓では、溶解液中の PAI-1 抗原量と、血小板内に残存する PAI-1 抗原量の各々を測定した。血小板内に残存する PAI-1 抗原量は、溶解液をトリトン-X で処理し遠心した後の上清をサンプルとして計測した。

### 〔結果〕

- (1) PRP クロットの溶解時間は、一本鎖、二本鎖 t-PA 共に PPP クロットより延長した。
- (2) PRP を PPP を用いて希釈し、PRP の相対的濃度と血栓溶解時間の関係を検討したところ PRP の濃度依存性に溶解時間が延長した。
- (3) 血小板の活性化を抑制すると、PRP クロットの溶解時間は PPP クロットとほぼ同じレベルまで短縮した。
- (4) 溶解液中の活性型 PAI-1 抗原量を EIA にて測定した。血漿に t-PA を加えるため PPP の溶解液中の PAI-1 は、ほとんどが t-PA-PAI-1 complex として存在した。一方 PRP の溶解液中では total PAI-1 量及び free-PAI-1 量が高値であった。
- (5) 血小板の活性化を抑制した場合、PRP 及び PPP の溶解液中の各抗原量はほぼ同じ値となった。さらに溶解液をトリトン-X で処理し、血小板を破壊すると total PAI-1 量が増加することにより、血小板中の PAI-1 の一部は活性型で存在していることが示唆された。

〔考察〕PRP クロットと PPP クロットの t-PA による溶解時間を比較すると PRP クロットが約 30% 延長しており、これは血小板数に依存していた。また PGE<sub>1</sub>、テオフィリンを加え、血小板の活性化を完全に抑制すると、この延長作用は消失した。次にクロット溶解液中の活性型 PAI-1 抗原量を EIA を用いて測定したところ、PRP クロット溶解液中では増加していた。従って、血小板内には

活性型の PAI-1 が存在し、血小板活性化に伴って放出され、t-PA を抑制することにより、PRP クロットの溶解時間を延長させることが明らかとなった。この PRP クロットにおける溶解時間の延長は血小板から放出された活性型の PAI-1 量よりはるかにまさる多量の t-PA を血栓に作用させるとほとんど認められなかった。しかし生体内においては多血小板血栓は血栓溶解療法に抵抗することが報告されているので、生理的状态もしくは血栓溶解療法施行時の血中 t-PA 濃度では、血小板から放出された活性型の PAI-1 により不活化されうると考えられる。本研究により、血栓内の血小板の存在は t-PA による血栓溶解を抑制し、この抑制効果は血小板内の活性型の PAI-1 がトロンビンによる凝集の際放出され t-PA 活性を抑制することによることが明かとなった。

### 論文審査の結果の要旨

血栓症の線溶療法、ことに組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) を用いた線溶療法において、動脈血栓と静脈血栓ではその効果に差があることが知られている。この両者の差異の一つに血栓内血小板数の多寡がある。そこで申請者は血小板の線溶現象に及ぼす影響について検討した。血小板にはプラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) が高濃度に存在することが知られているが、この血小板内の PAI-1 が t-PA の血栓溶解に及ぼす影響を中心に検討した。

多血小板血漿 (PRP) 及び乏血小板血漿 (PPP) に種々濃度の t-PA を加えた上でトロンビンにてクロットを作製し、クロットの溶解時間、溶解液中の活性型 PAI-1 関連抗原量を測定した。その結果一本鎖、二本鎖 t-PA を用いた場合のいずれでも、血小板を多く含むクロットほど溶解時間が延長した。また、血小板数が多いクロットほど、溶解液中には PAI-1 関連抗原量が多く認められた。

次にプロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) 及びテオフィリンにより血小板の活性化を抑制したうえで同様にクロットを作製し、溶解液中の PAI-1 関連抗原量を測定するとともに、溶解液中の血小板内に残存する PAI-1 関連抗原量を測定した。その結果、血小板の活性化を抑制したクロットでは溶解時間の延長はみられず、溶解液中の PAI-1 関連抗原量の増加はみられなかった。しかし、溶解液中の血小板をトリトン X で破壊すると PAI-1 関連抗原量が増加した。この PAI-1 は t-PA の結合能を有することから活性型 PAI-1 であることがわかった。

以上の成績から血小板内には活性型の PAI-1 が存在し、血栓形成時にはトロンビンによる凝集の際に放出され、t-PA 活性を抑制することが明らかとなった。この機序は多血小板血栓における血栓溶解療法抵抗性を説明し得るものである。

以上の論文の説明に対し審査委員から以下の質疑がなされた。

- 1) PAI-1 の active form と latent form の相違について
- 2) 血小板膜に t-PA receptor 及びそれに結合した t-PA は存在するか
- 3) 溶解液中の活性化プロテイン C に影響をうけないか
- 4) 加えたトロンビンが一本鎖 t-PA を不活性型二本鎖 t-PA にしないかどうか
- 5) プロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) 及びテオフィリンが血小板活性化を抑制する機序について
- 6) フィブリンだけの血栓と血小板を含む血栓の生理的条件下での血栓溶解時間の差について
- 7) XⅢa を介するフィブリンクロスリンクと血小板膜 GPⅡb/Ⅲa を介するフィブリン結合との血栓溶解における差について
- 8) 今後の血栓溶解療法の展望について

これらの質問に対し、申請者からおおむねの適切な回答が得られた。

本論文は血栓に存在する血小板の線溶現象に及ぼす影響、ことに PAI-1 の影響についてはじめて明らかにしたものであり、また本研究は今後の血栓溶解療法の改良に示唆を与えるものであると認められた。

論文審査担当者	主査	教授	寺	尾	俊	彦						
	副査	教授	大	野	龍	三	副査	教授	菅	野	剛	史
	副査	助教授	植	松	俊	彦	副査	助教授	小	出	幸	夫