



ADP-induced disaggregation of platelet in early phase of its aggregation : An effect of nitric oxide

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: A.R.M., Gulam Sarwar メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1083

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 230号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏 名	A.R.M. Gulam Sarwar		
論文題目	ADP-induced disaggregation of platelet in early phase of its aggregation : An effect of nitric oxide (ADP による血小板凝集初期相における奇異的血小板解離、nitric oxide の効果)		

博士(医学) A. R. M. Gulam Sarwar

論文題目

ADP-induced disaggregation of platelet in early phase of its aggregation: An effect of nitric oxide

(ADP による血小板凝集初期相における奇異的血小板解離、nitric oxide の効果)

論文の内容の要旨

【目的】

糖尿病患者においては、血小板凝集能の亢進が頻繁に観察され、この事が糖尿病性細小血管障害の発症に関与している可能性が報告されている。強力な血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) である nitric oxide (NO) は、血小板の凝集と接着を阻害する。

我々は、血小板凝集のアゴニストとして知られている ADP が、血小板凝集に先行して逆に短時間の「血小板解離」を引き起こすことを見出した。そこでこの一見奇異な現象の起こる機序を解明するための実験を行った。とりわけ、血管内皮由来弛緩因子 (EDRF; nitric oxide) の関与について、NO 自身や NO 合成酵素に影響を与える基質を用いて検討した。

【方法】

健常人から得た血液を用いて全血凝集、および血小板凝集を検討した。全血凝集はインピーダンス法 (ChronoLog type 500 VS を用いる) によって測定し、ohms (Ω) で表した。platelet-rich plasma (PRP) を用いる血小板凝集は Dual Channel Aggregometer (Elma model PAT-2A) によって測定した。全血凝集、および血小板凝集のアゴニストとしては ADP ($10\mu\text{M}$) を用いた。その他、ヘモグロビン ($25, 250\mu\text{M}$)、monomethyl-L-arginine (LMMA: $1-7\text{mM}$)、sodium nitroprusside (1mM)、8-Bromo cyclic GMP (1mM) をそれぞれ添加した。

【結果】

1. 血小板凝集のアゴニストである ADP は、血小板凝集に先行して逆に短時間の血小板解離を引き起こした。この現象は全血凝集、および血小板凝集のいずれにおいても認められ、かつ検討したほぼ全対象者において再現性良く見られた。
2. Nitric oxide (NO) の合成阻害剤である LMMA を添加すると ADP による血小板解離は減弱した。LMMA による血小板解離減弱効果は特に全血凝集において顕著であった。
3. NO を消去するヘモグロビンもやはり、ADP による血小板解離を抑制した。
4. NO 供給源である sodium nitroprusside は、ADP と同様に血小板解離を促進した。
5. NO の細胞内メッセンジャーである GMP を血小板で増加させるために、8-Bromo cyclic GMP を添加したところ、ADP と同様に血小板解離が再現された。
6. NO 合成阻害剤は ADP による血小板凝集を抑制した。この効果は全血凝集において顕著であった。
7. 糖尿病患者では、ADP による血小板解離は健常人に比較して減弱しており、逆に血小板凝集は明らかに亢進していた。

【結論と考察】

血小板凝集のアゴニストである ADP が、血小板凝集に先行して逆に短時間の血小板解離を引き起こ

すことを初めて明らかにした。この現象は、NO の合成阻害剤や NO を消去するヘモグロビンによって減弱あるいは消失すること、逆に、NO 供給源や NO の細胞内メッセンジャーとなる8-Bromo cyclic GMP によって再現されたことより、NO を介して起こるものと推測される。また、この血小板解離現象は全血を用いた場合に、PRP を用いた場合よりも顕著であったことから、NO の由来は血小板のみならず、他の血球成分から遊離していたものも含まれているものと思われた。

論文審査の結果の要旨

糖尿病患者における血小板凝集能の亢進が糖尿病性細小血管障害の発症に関与している可能性が報告され、一方、強力な血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) である nitric oxide (NO) は、血小板の凝集と接着を阻害することが知られている。申請者らは血小板凝集のアゴニストとして知られている ADP が血小板凝集に先行して逆に短時間の「血小板解離」を引き起こすことを見出し、この一見奇異な現象の起こる機序を解明するための実験を行った。殊に、血管内皮由来弛緩因子 (EDRF ; nitric oxide) の関与について、NO 自身や NO 合成酵素に影響を与える基質を用いて検討した。

健常人から得た血液を用いて全血凝集、および血小板凝集を検討した。全血凝集はインピーダンス法により測定、platelet-rich plasma (PRP) を用いる血小板凝集は Dual Channel Aggregometer によって測定した。全血凝集、および血小板凝集のアゴニストとしては ADP ($10\mu\text{M}$) を用いた。この系に、ヘモグロビン ($25, 250\mu\text{M}$)、monomethyl-L-arginine (LMMA : $1\sim 7\text{mM}$)、sodium nitroprusside (1mM)、8-Bromocyclic GMP (1mM) などを添加した実験を行った。

その結果、血小板凝集のアゴニストである ADP は、血小板凝集に先行して逆に短時間の血小板解離を引き起こし、これは全血凝集、および血小板凝集のいずれにおいても認められた。この ADP による血小板解離は NO の合成阻害剤である LMMA を添加すると減弱した。LMMA による血小板解離減弱効果は特に全血凝集において顕著であった。NO を消去するヘモグロビンもやはり、ADP による血小板解離を抑制した。NO 供給源である sodium nitroprusside は、ADP と同様に血小板解離を促進した。NO の細胞内メッセンジャーである GMP を血小板で増加させるために8-Bromocyclic GMP を添加したところ、ADP と同様に血小板解離が再現された。NO 合成阻害剤の添加では ADP による血小板凝集を抑制し、この効果は全血凝集において顕著であった。糖尿病患者では ADP による血小板解離は健常人に比較して減弱しており、逆に血小板凝集は明らかに亢進していた。

本研究は血小板凝集のアゴニストである ADP が、血小板凝集に先行して逆に短時間の血小板解離を引き起こすことを初めて明らかにしたものである。この血小板解離現象の機序について本申請者は、NO の合成阻害剤や NO を消去するヘモグロビンによって減弱あるいは消失すること、逆に、NO 供給源や NO の細胞内メッセンジャーとなる8-Bromo cyclic GMP によって再現されたことにより、この解離は NO を介して起こるものと推測している。また、この血小板解離現象は全血を用いた場合に、PRP を用いた場合よりも顕著であったことから、NO の由来は血小板のみならず、他の血球成分から遊離していたものも含まれている可能性を示唆した。

本研究は血管内での血小板の凝集には血小板以外の物質 (例えば赤血球) 由来の NO も関与していることを明らかにしたものであり、糖尿病性細小血管障害の発症機序を解明する上で示唆を与える研究であると高く評価された。

申請者の発表に対し、次のような質疑が行われた。

1) ADP の添加量はどのようにして決めたのか

- 2) ヘモグロビンによる血小板解離抑制はヘモグロビン蛋白がインピーダンスに影響を与えたことによるのではないか
- 3) 赤血球による血小板解離抑制のメカニズムについて
- 4) platelet-rich plasma (PRP) 中の NO を測定したか
- 5) ADP の NOS に対する作用について
- 6) NO 自身の血小板凝集に対する作用について
- 7) 血小板解離時の電子顕微鏡的観察の有無について
- 8) 糖尿病患者における血小板解離減弱のメカニズムについて
- 9) 糖尿病患者における血小板凝集亢進のメカニズムについて
- 10) この知見を将来、臨床に応用する場合、どのような方法が考えられるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員が全員一致して評価した。

論文審査担当者 主査 教授 寺 尾 俊 彦

副査 教授 平 光 忠 久 副査 講師 大 西 一 功