


論 文 要 旨

論 文 題 目

The Activity of Postclotting Thrombins on Platelet Activation was Identical to That of Native Thrombin

(クロット形成後トロンビンの血小板活性化作用は未反応遊離トロンビンのそれと同等であった)

氏名 曾 鋼 
(直筆)

「目的」 Francisらは、クロット内に活性を保持しているトロンビンが残存しているのを明らかにし、postclotting thrombin (bound thrombin)と命名した。しかしながら、このbound thrombinが血小板を活性化し、凝集を惹起するかは知られていない。そこで、本研究では、bound thrombinの血小板に対する作用を調べた。

「方法」 Doolittleらの方法により精製したrabbit fibrinogenとbovine thrombinを37℃で5分間反応させクロットを作製し、1 mg/ml ovalbumin加リン酸緩衝液を加え、3000rpm、15分間、4℃で遠心した。得られた上清中のトロンビンをintact thrombinとした。さらに、フィブリンクロット沈渣にovalbumin加リン酸緩衝液を加え、ガラス棒で機械的に破碎した後、遠心して上清を回収した。この上清中のトロンビンをbound thrombinとして実験に用いた。また未反応のトロンビンをnative

thrombinとし、調整方法の異なるこれら三種のトロンビンの血小板に対する作用を比較検討した。bound thrombin濃度はbovine thrombinに対する単クローナル抗体 (mAb GE12) およびラット抗トロンビンポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて測定し、各種トロンビンの濃度を調整した。血小板凝集能は、渡辺らの方法に従い調整した家兔洗浄血小板を用いて測定した。洗浄血小板の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は、Tsiénらの方法に従い、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2を用いて測定した。




「結果」最大血小板凝集率は、native thrombin、intact thrombin および bound thrombin濃度依存性に上昇したが、三者間に統計学的有意差はみられなかった。また、洗浄血小板の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は、各種トロンビンの濃度依存性に上昇したが、三者間に統計学的有意差はみられな

かった。さらに、合成トロンビンインヒビター、アルガトロバンによる各種トロンビンの血小板凝集能および細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対する抑制効果を調べた結果では、各種トロンビン間での抑制効果に有意差はみられなかった。

「考察」 bound thrombin は native および intact thrombin と同程度に血小板凝集能および細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇を惹起し、アルガトロバンにより抑制された。thrombin の活性部位の構造は、thrombin がフィブリン構造物と複合体を形成後も保持されており、bound thrombin が血小板膜上のトロンビン受容体を活性化するのが示唆された。

論文審査結果の要旨

(1)

| 報告番号 | 課程博 * 論文博 | 第 号 | 氏 名 | 會 鋼 |
|---|-----------------|-------------------|-----------|---|
| | | 平成 14 年 11 月 28 日 | | |
| 論文審査委員 | | 主査教授 | 田 中 龍 夫 |  |
| | | 副査教授 | 吉 井 興 志 孝 |  |
| | | 副査教授 | 久 木 田 一 朗 |  |
| (論 文 題 目) | | | | |
| The activity of postclotting thrombins on platelet activation was identical to that of native thrombin. (クロット形成後トロンビンの血小板活性化作用は未反応遊離トロンビンのそれと同等であった) | | | | |
| (論文審査結果の要旨) | | | | |
| 上記論文に対して、研究に至る背景と目的、論文の内容、特に、実験方法、手技と学術的水準、研究の成果とその意義について慎重に審査し、以下の審査結果を得た。 | | | | |
| 1. 研究の背景と目的 | | | | |
| トロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンに変換しクロットを形成後もフィブリンと結合しクロット内に存在するのが知られている。このフィブリンクロット内のトロンビン(クロット形成後トロンビン)は活性を保持しており、物理的な剪断力や線溶酵素的作用により、フィブリンクロットから遊離される。所属する講座のこれまでの研究により、クロット形成後トロンビンの構造等が明らかにされている。即ち、クロット形成後トロンビンは、トロンビンにフィブリンフラグメントが結合しており、フィブリンと弱く結合している intact thrombin と強く結合している bound thrombin の二種類が存在する。しかしながら、クロット形成後トロンビンの病態生理学的意義に関する報告は見られていない。本研究は、冠血管拡張術後の早期血管閉塞の原因である壁(内)血栓 | | | | |

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
2 要旨は800字・1200字以内にまとめること。
3 *印は記入しないこと。

論文審査結果の要旨

(2)

の再形成にクロット形成後トロンビンが関与するとの作業仮説に基づく一連の研究のひとつである。即ち、*in vitro* で物理的剪断力により作成したクロット形成後トロンビンの生物活性のうち、血小板に対する作用を未反応遊離トロンビンと比較検討するのを目的としている。

2. 論文の内容と水準

- 1) *in vitro* にて、物理的剪断力により遊離するクロット形成後トロンビン (intact 及び bound thrombin) を作成している。
- 2) クロット形成後トロンビンの正確な濃度測定をするために、bovine thrombin に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた enzyme-linked sorbent assay (ELISA)法を開発し、native、intact、及び bound thrombin の濃度を決定している。
- 3) 家兎耳介静脈より採血し、フィブリノーゲン及びフォンビルブランド因子を含まない家兎洗浄血小板を作成している。
- 4) 血小板凝集計を用いて、各種トロンビンによる家兎洗浄血小板の最大凝集率 (MAR) を測定し、濃度-反応曲線を作成している。
- 5) 分光蛍光光度計を用いて、各種トロンビンにより上昇した家兎洗浄血小板内遊離 Ca^{2+} 濃度を測定し、濃度-反応曲線を作成している。
- 6) 選択的合成トロンビンインヒビターであるアルガトロバンが、各種トロンビンによる最大凝集率及び洗浄血小板内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇を、濃度依存性に抑制するのを明らかにしている。

以上の内容は、これまでに知られていなかったクロット形成後トロンビンの血小板活性化作用を初めて示したものであり、止血凝固学的見地からは新しい知見であり、論文の内容は国際的水準であると思われる。

3. 研究成果の意義

クロット内から物理的剪断により遊離されるクロット形成後トロンビンは未反応遊離トロンビンと同等に血小板を活性化し凝集を惹起するのを明らかにしている。これらの結果より、クロット形成後トロンビンは血栓形成能力を有しており、冠血管拡張術による血栓の機械的破碎に際して、クロット内から遊離し、血栓再形成を促進する可能性を示したのは評価される。さらに、選択的合成トロンビンインヒビターであるアルガトロバンが濃度依存性に血小板凝集及び血小板内遊離 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制するのを示し、冠血管拡張術後の血栓再形成のメカニズムの解明に多大に寄与した。さらに、抗トロンビン剤が再血栓形成の防止策と成り得るのを示した点は評価される。以上の結果より、本研究は学位授与に充分値する内容であると判断する。