Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Alpha2-adrenoceptors and platelet function in patients with variant angina

楠井，晶子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1990-01-10
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙1369
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001369

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔 138 〕

氏名・（本籍）	楠井晶子（くすい あきこ）（兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1124号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成2年1月10日
学位論文題目	ALPHA$_2$ −ADRENOCEPTORS AND PLATELET FUNCTION IN PATIENTS WITH VARIANT ANGINA （異型狭心症患者の血小板α_2アドレナリン受容体機能）
審査委員	主査 教授 福﨑 恒 教授 中村和夫 教授 田中千賀子

論文内容の要旨

【緒言】 異型狭心症では冠動脈攣縮が心筋虚血発作の原因であることが明らかにされているが，冠動脈攣縮の発生機序はなお不明である。異型狭心症患者ではエピネフリン投与や寒冷昇圧試験によるαアドレナリン受容体刺激が冠動脈攣縮を誘発し，またこの反応は非選択的αアドレナリン受容体遮断薬であるphentolamineなどの前投与によって抑制されることが報告されている。最近選択的α_1アドレナリン受容体遮断薬prazosinの前投与ではこの反応は抑制されないという報告もある。一方冠動脈硬化症や虚血性心疾患の心筋虚血発作の発現と進展に血小板が重要な役割を果たしていることが多く報告されている。実際，種々の虚血性心疾患で血小板凝集能および放出反応の亢進，血小板由来のthromboxane A_2の血中濃度の増加が認められている。我々の研究室では異型狭心症患者においてエピネフリンに対する血小板凝集能の亢進を既に報告した。血小板にはα_2アドレナリン受容体が分布し，その刺激は血小板を活性化して凝集，放出反応を生じる。本研究では異型狭心症を含む種々の虚血性心疾患患者の血小板αアドレナリン受容体機能を血小板のエピネフリン凝集能に加えてradio-ligand binding assayを用いて検討した。

【方法】 対象は虚血性心疾患患者22名（平均57歳，男性20名，女性2名）と同年令層の健常者13名（平均58歳，男性12名，女性1名）の計35名で，非選択性α antagonist ligandである^{3}H-dihydro-ergocryptine（DHE）を用いて血小板α adrenoceptor binding assayと血小板エピネフリン凝集能検査を行った。虚血性心疾患の内訳は急性心筋梗塞6名（発症4日以内），労作狭心症9名，異型狭心症7名である。冠動脈造影検査で労作狭心症では9例全例，異型狭心症では7例中2例に70%以上の有意な冠動脈狭窄病変を認めたが，異型狭心症の残りの5例は軽度の冠狭窄かまたは正常冠動脈で

あった。採血は血小板作動薬を1週間以上服用していない条件下で，しかも12時間以上絶食し狭心発作のない状態で行い，同時に血小板数，血清総コレステロール値，中性脂肪値も測定した。糖尿病，高血圧，腎臓病，心不全，脳血管障害急性期，閉塞性末梢動脈疾患を有する患者は除外した。さらに上記の対象以外に健常者7名と異型狭心症6名を対象として，α_2アドレナリン受容体選択性のある^{3}H-rauwol-scineを用いて血小板α adrenoceptorのradioreceptor binding assayを行った。

粗血小板膜作成：Newmanらの方法を一部改変し，血小板膜標品を作成した。即ち，12時間以上の絶食後採血したクエン酸加血液を380 g ×10分遠沈し，多血小板血漿（PRP）を得た。このPRPをさらに16,000 g ×10分間遠心分離して得たpelletをwashing buffer（50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 20mM EDTA, pH7.35）で懸濁後16,000 g ×10分間遠心分離した。同様の洗浄操作を2回操り返し，得られたpelletをhypotonic lysing buffer（5 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH7.5）で懸濁後Polytron PT 10 homogenizerでホモジナイズし粗血小板膜標品を得た。蛋白濃度はLowry法で測定した。

Radioreceptor binding assay：αアドレナリン受容体標識の放射性ligandとして非選択性αブロッカーである^{3}H-DHE（specific activity 26.5－30.5 Ci／mmol）と選択的α_2ブロッカーである^{3}H-rauwolscine（α-isomer yohimbine）（71.4Ci／mmol）を用いた。各々Hoffman及びMotulskyらの方法に準じてassayを行った。粗血小板膜標品（0.1－0.4mg protein／mmol）と種々の異なる濃度（1－12nM）の^{3}H-DHEまたは^{3}H-rauwolscineとincubation buffer（50mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH7.50, 0.1mg／ml bovine serum albumin）を混和し，^{3}H-DHEの場合には60分間，^{3}H-rauwolscineでは30分間25℃でインキュベートした。冷却したincubation bufferを加えて反応を終了させた後，減圧下にWhatmann GF／Cガラス繊維濾紙に吸着させ濾過を行い，受容体に結合したligandと遊離ligandを分離した。濾紙を乾燥後，液体シンチレーターの存在下で^{3}Hをβカウンターで計測した。Ligandと受容体の特異的結合量からα antagonistである10μM phentolamine存在下の非特異的結合量を差し引いて求めた。Scatchard解析より受容体の最大結合部位数（Bmax）と受容体への親和性を表す解離定数（Kd）を求めた。

血小板凝集能：Bornの方法に従ってクエン酸加血液から多血小板血漿（PRP）と乏血小板血漿（PPP）を作成した。血小板凝集惹起物質として種々の異なる濃度のl－エピネフリンを用いdual sample aggregometerで血小板凝集曲線を描いて血小板凝集能を判定した。即ち凝集度はPRPの場合を0％，PPPの場合を100％とした時の透光率で表した。血小板凝集能は明かな二次凝集を生じるエピネフリンの最小閾値濃度を比較し評価した。

【結果】^{3}H-DHE assayの健常者群，急性心筋梗塞群，労作狭心症群，異型狭心症群の粗血小板膜αアドレナリン受容体数（Bmax）はそれぞれ233±44 fmol／mg protein, 226±53 fmol／mg protein, 252±58 fmol／mg protein 348±48 fmol／mg proteinであった。Kd値は各々2.05±1.40nM, 0.98±0.46nM, 1.59±0.37nM, 1.49±0.66nMであった。急性心筋梗塞群と労作狭心症群のBmax値は健常者群と有意な差はなかったが，異型狭心症群では健常者に比し49％のBmax値

の有意な増加（P＜0.001）を認めた。また異型狭心症のBmax値は他の虚血性心疾患群に比べても有意に増加していた（P＜0.005）。一方Kd値は4群間に有意な差は認められなかった。また血小板のエピネフリン凝集は異型狭心症群では他3群に比較し有意に亢進していた。血小板の^{3}H－DHEのBmaxとエピネフリン凝集閾値濃度の負の対数の間には正の相関が認められた（r＝0.483，P＜0.05）が，Kd値と血小板凝集閾値の間には相関を認めなかった（r＝0.115，P＞0.2)。異型狭心症群では冠動脈病変の有無によってBmax値およびエピネフリン凝集能に有意差は認められなかった。虚血性心疾患各群の血小板数，血清コレステロール値，中性脂肪値は，労作狭心症での中性脂肪の高値を除いて健常者と比べて有意差を示さなかった。また血小板数，血清コレステロール値，中性脂肪値と^{3}H－DHEのBmaxおよびKd値の間には有意な相関は認められなかった。次に選択性α_2受容体遮断薬である^{3}H-rauwolscineを用いたreceptor assayでは健常者群および異型狭心症群のBmax値はそれぞれ122±29 fmol／mg protein, 191±64 fmol／mg proteinであり，Kd値はそれぞれ5.02+3.59nM, 5.39+2.89nMであった。異型狭心症群では健常者群に比べて57%のBmaxの増加を示したが，Kd値に有意差は認められなかった。同一対象者の血小板を用いて^{3}H－DHEと^{3}H-rauwolscine binding assayの比較検討を行った。両者のBmax，Kd値は各々有意な正の相関を示した（r＝0.911，P＜0.005：r＝0.787，P＜0.05）。

【考察】異型狭心症患者ではエピネフリンによる血小板凝集能が著明に亢進していた。また^{3}H－DHEと^{3}H-rauwolscineを使ったreceptor binding assayで，同年令層の健常者および他の虚血性心疾患群に比べて血小板膜のαアドレナリン受容体数の有意な増加を認めたが，受容体への親和性には変化を認めなかった。この結果は異型狭心症患者の血小板がエピネフリンに対して凝集能亢進を示すことを説明するのに役立つ所見である。血小板表面のα受容体の変化が異型狭心症における病態の原因となる一次的な受容体機能異常なのか，または一過性の神経・体液異常に基づく二次的な変化なのかは本研究では明かでない。組織のホルモン受容体はその作用ホルモンの血中濃度による調整を受けている。異型狭心症患者の血中および尿中カテコラミン濃度に有意な増減はないことが報告されており，また血中カテコラミン濃度と血小板αアドレナリン受容体の数および親和性の間にも相関はないとの報告がなされている。以上よりこの血小板αアドレナリン受容体の変化は血中カテコラミンによる二次的な変化とは考えがたい。高脂血症も血小板機能に影響を及ぼすが，血中コレステロール値，中性脂肪値と血小板αアドレナリン受容体数および親和性に相関はなく，冠動脈病変の有無も血小板αアドレナリン受容体の状態に影響をあたえなかった。異型狭心症患者の血小板αアドレナリン受容体数の増加と血小板凝集能亢進は血小板膜のα_2アドレナリン受容体の一次的な異常を反映しているのかもしれない。αアドレナリン刺激は血小板凝集や血管収縮などの様々な反応をひきおこす。自律神経刺激やノルエピネフリン注入により引きおこされる冠動脈収縮は節後性α_2アドレナリン受容体刺激によって生じ，太い冠動脈のみならず細い冠動脈のtoneの調節にも重要な役割をになっていることが知られている。冠攣縮発生の機序に自律神経系の機能亢進の関与が推測されているが，血小板のαアドレナリン受容体の変化が心血管系のαアドレナリン受容体の変化を表しているのか否かはまだ

明確になっていない。

【結語】異型狭心症患者の血小板は，健常者および他の虚血症心疾患患者と比較して，α_2アドレナリン受容体数の増加を示し，血小板のエピネフリン凝集能の亢進に関与していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

近年，狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患（IHD）の病態に与る要因として，冠動脈攣縮（Spasm）の関与が重視されている。なかでも異型狭心症（VAP）の発作がspamによることは冠動脈造影法でも確認されている。

このspasmの発現機序に関しては，緒説があるが交感神経刺激のうちα受容体刺激の関与が重視されている。

本申請者は，このような観点からVAPを含む各種IHD患者群及び健常者群の血小板のエピネフリン凝集に加えて，血小板αアドレナリン受容体機能を比較検討し，VAPの病態をより鮮明にするべく本研究を企図した。

［**対象と方法**］対象は急性心筋梗塞（AMI）6例，労作狭心症（EAP）9例，VAP 7例からなるIHD計22例と，同年齢層の対照健者13名である。これらに対し非選択性α-antagonist ligandである^{3}H-dihydroergocryptine（DHE）を用いて血小板α-adrenoceptor binding assay及び血小板エピネフリン凝集能の検査を行なった。更に上述の対象とは別個に健常者7名とVAP患者6例を対象として，α_2アドレナリン受容体選択性のある^{3}H-rauwolscineを用いて血小板のα-adrenocepterのradiorecepter binding assayを行った。血小板膜の作成はNewmanらの方法を一部改変して行なった。また両binding assayは，それぞれHoffman及びMotulskyらの方法で行なった。Scatchard解析より受容体の最大結合部位数（Bmax)と受容体への親和性を表す解離定数（Kd)を求めた。

血小板凝集能は，明らかな二次凝集を生じるエピネフリンの最小閾値濃度を比較して評価した。

［結果］①AMI群とEAP群のBmax値は健常群と比べ有意差はなかった。VAP群では健常者群に比しBmax値の有意の増加がみられた。また，VAP群のBmax値は他のIHD値と比べても有意に高値を示した。②一方，Kd値は4群間で有意差をみなかった。③血小板のエピネフリン凝集は，VAP群では他の3群と比較し有意に亢進していた。④血小板の^{3}H-DHEのBmaxとエピネフリン凝集閾値濃度の負の対数の間には正の相関がみられたが，Kd値と血小板凝集閾集の間には相関は認められなかった。⑤選択性α_2受容体遮断薬である^{3}H-rauwolscineを用いたreceptor assayでも，VAP群は健常者群に比べてBmaxの有意の増加を示したが，Kd値には差がなかった。⑥同一対象者の血小板を用い^{3}H－DHEと^{3}H-rauwolscine binding assayの比較検討を行なったところ，両者のBmax，Kd値は各々有意な正の相関を示した。

以上の成績より，ＶＡＰ患者の血小板は，健常者及び他のＩＨＤ患者と比較して，α_2アドレナリン受容体数の増加を示し，これが同群の血小板凝集能の亢進に関与していることが明確にされた。冠攣縮発生の機序に自律神経系機能異常の関与が推測されているが，ＶＡＰ群の血小板でみられたαアドレナリン受容体数の増加が冠動脈においても該当するか否か，更に血小板凝集能亢進が冠動脈の攣縮を誘起するか否かなどの問題は未だ解明されていない。しかし，本研究は冠動脈攣縮を主要病変とするＶＡＰ患者における自律神経異常の存在を血小板におけるα-adrenoceptorの異常の面から立証したもので本疾患の病態解明上価値ある集積とみなされる。依って，本研究者は医学博士の学位を得る資格を有するものと認めた。