

## 二三の実験動物における血小板ADP凝集のエピネフリンによる増強

弘田晋一\*・中条正樹\*・吉田 勝\*・林 隆敏\*\*  
竹野 一\*・斎藤俊之\*

平成4年6月30日受付

### Potentialiation by Epinephrine of ADP-induced Platelet Aggregation in Experimental Animals.

Shin-ichi HIROTA\*, Masaki CHUJO\*, Masaru YOSHIDA\*, Takatoshi HAYASHI\*\*,  
Kazu TAKENO\* and Toshiyuki SAITO\*

The potentiation by epinephrine ( $2.3\mu\text{M}$ ) of ADP ( $2.8\mu\text{M}$ )-induced platelet aggregation was studied in some experimental animals of guinea pigs, rats, dogs and cats. Platelet-rich plasma and platelet-poor plasma were prepared by the differential centrifugation of whole blood anticoagulated with sodium citrate (3.8%). The aggregation was measured photometrically, by the use of Sienco or NBS-Nikou Platelet Aggregometer. In the guinea pigs, the maximal rate (Agslope) and maximal degree (Agmax) of the aggregation were significantly increased by epinephrine of ADP-induced platelet aggregation. In the rats, the parameters were not much changed, but the late partial dissociation was markedly suppressed by epinephrine. In the dogs and cats, the Agmax, rather than Agslope, was insignificantly increased by epinephrine. All the effects of epinephrine were partially or wholly blocked by yohimbine ( $2.0\mu\text{M}$ ).

These results suggest that the effect of epinephrine on ADP-induced platelet aggregation is mediated by  $\alpha_2$ -adrenoceptors in some experimental animals as in humans.

血小板はコラーゲン、ADP、トロンピンなどの諸種の  
内因性物質によって凝集するが、その反応性には動物の  
種類によってかなりの差異が認められている<sup>1,3,5,11,13)</sup>。な  
かでも交感神経アミンであるエピネフリンに対してヒト  
血小板は用量依存性に凝集し、この反応は $\alpha_2$ 遮断薬であ

るヨヒンビンによってブロックされることから $\alpha_2$ アドレ  
ナリン性受容体の関与が示唆されている<sup>7)</sup>。一方、ヒト以  
外の動物の血小板ではエピネフリンによって必ずしも凝  
集は起こらない<sup>5,7,8,11)</sup>。しかし、ヒト以外の動物の血小板  
においてもエピネフリンがADP凝集を増強することが

\* 鳥取大学農学部家畜薬理学講座

\* *Department of Veterinary Pharmacology, Faculty of Agriculture, Tottori University*

\*\* 鳥取大学農学部附属家畜病院

\*\* *Animal Hospital, Faculty of Agriculture, Tottori University*

見出されている<sup>1,12)</sup>。さらに、エピネフリンに対する血小板の凝集反応における種差に関する知見は諸種の薬物中毒やストレスにおける交感神経緊張に伴う血中カテコールアミンの上昇<sup>9,10)</sup>の影響を理解するうえで重要である。

本研究は、モルモットなどの実験動物の血小板についてADP凝集のエピネフリンによる増強とヨヒンビンによる拮抗を検討した。

### 材料および方法

#### (1) 供試動物

モルモット：ハートレー系，体重340—750g，雌雄の別なく用いた。

ラット：ウィスター系，体重140—240g，雌雄の別なく用いた。

イヌ：雑種，体重8.2—12.5kg，雌雄の別なく用いた。

ネコ：雑種，体重4.0kg前後，雌雄の別なく用いた。

#### (2) 採血法

血液凝固を防止するため3.8%クエン酸ソーダを採血量と1：9容になるように前以って注射器に採り，採血した。モルモットではエーテルによる軽麻酔下で，背位に保定し，心臓穿刺により採血した。通常5mlが得られた。ラットではエーテル麻酔下で開腹し，腹部大静脈に留置針を刺入し，通常3—4mlを採血した。

イヌおよびネコでは頸静脈より通常10mlを採血した。

#### (3) 血小板血しょうの調製

多血小板血しょう (PRP) はクエン酸ソーダ加血液を1,100回転/分で7分間遠心し，その上層液として分離した。一方，乏血小板血しょう (PPP) はクエン酸ソーダ加血液を2,500回転/分で25分間遠心し，その上層液として分離した。

#### (4) 血小板凝集の測定

血小板凝集の測定はBORNの方法<sup>2)</sup>に準じて行った。測定機器としてはSIENCO社製dual sample aggregometer (Model DP-247-D) またはNBS二光社製NBS HEMA TRACER 801 (Model PAC-100/200) を用いた。すなわち，PRPおよびPPPをそれぞれ250 $\mu$ l をキューベット (7 $\phi$ ×50mm) に入れ，37°Cで1,000rpmで攪拌下で吸光度がそれぞれ0%，100%になる様に調整した。薬液は5 $\mu$ l の容量でPRPに添加した。終濃度は2.8 $\mu$ M ADP，2.3 $\mu$ M エピネフリン，2.0 $\mu$ M ヨヒンビンとした。なお，エピネフリンおよびヨヒンビンを併用する場合にはADP添加前1—2分間前処置した。

また，これらの実験は採血後4時間以内に終了するこ

ととした。

#### (5) 血小板凝集曲線の指標

Oude EGBRINKらの記載<sup>15)</sup>に準じて最大凝集速度 (Agslope) と最大凝集度 (Agmax) を測定した。なお凝集惹起時間 (AIT) は本研究におけるADP凝集では発現しないので省略した。

統計上の有意性検定はSTUDENTのpaired t testによった。

#### (6) 試薬

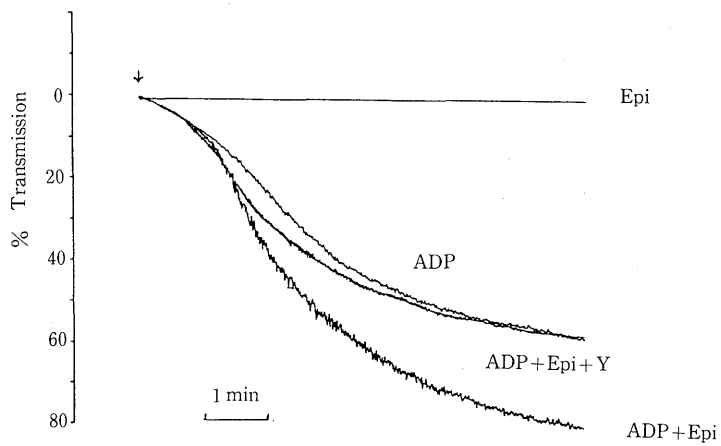
ADP (Sigma)，エピネフリン (Bosmin，第一製薬)，塩酸ヨヒンビン (和光純薬) を用いた。これらの試薬はTris緩衝 (pH 7.4) 塩化ナトリウム溶液 (等張) に溶解した。

### 成 績

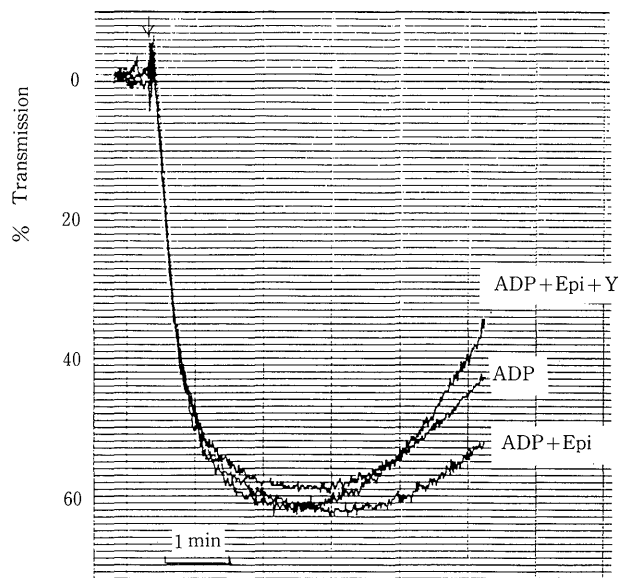
モルモット血小板ではFig. 1aに示すように2.3 $\mu$ M エピネフリン単独では血小板凝集は生じなかった。一方2.8 $\mu$ M ADPによるモルモット血小板凝集のAgmaxは57%に達し，その後の血小板の再解離がみられないことから非可逆性の血小板凝集が得られた。このモルモットにおけるADPによる血小板凝集は2.3 $\mu$ M エピネフリンの併用によりAgslopeとAgmax共に有意に増強された (Table 1)。さらに，エピネフリンによるADP凝集の増強は2.0 $\mu$ M ヨヒンビンによって完全に拮抗された。

ラット血小板においてもエピネフリン単独では血小板凝集は生じなかった。2.8 $\mu$ M ADPによるラット血小板凝集はAgmaxが60%に達するが，それに続いてかなりの血小板の再解離がみられ，その凝集には可逆性すなわち1次性の性質のものが含まれている (Fig. 1b)。しかも，2.3 $\mu$ M エピネフリンの併用によるADP血小板凝集の増強は僅かであり，統計的にも有意ではなかった (Table 1)。しかし，Fig. 1bに示されるようにADP凝集ピーク後の血小板の再解離がエピネフリンの併用によって強く抑制された。さらにこのエピネフリンの血小板再解離に対する抑制は2.0 $\mu$ M ヨヒンビンによって明らかに拮抗された。

イヌ血小板においてもFig. 1cに示されるようにエピネフリン単独では血小板凝集は生じなかった。2.8 $\mu$ M ADPによるイヌ血小板凝集はモルモットの成績と類似した凝集を示した。さらにADPによるイヌ血小板凝集は2.3 $\mu$ M エピネフリンの併用によって増強され，この増強も2.0 $\mu$ M ヨヒンビンによって部分的に拮抗される傾向がみられた (Fig. 1c)。しかし，これらの成績には統計的有意性は見出せなかった (Table 1)。



a) Guinea pigs



b) Rats

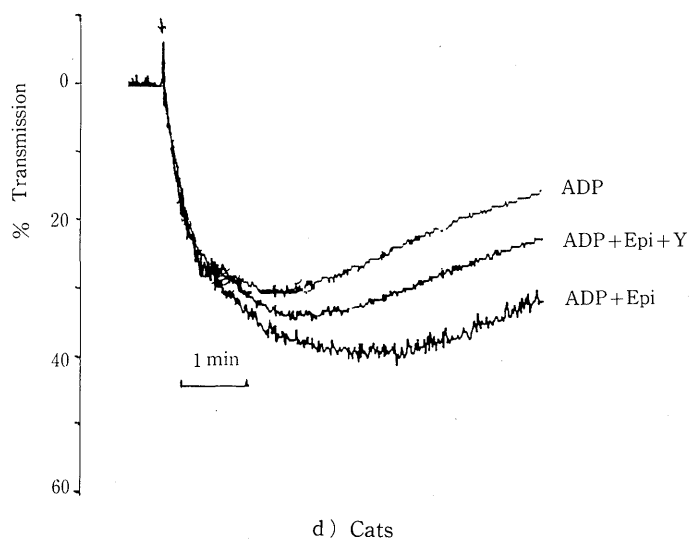
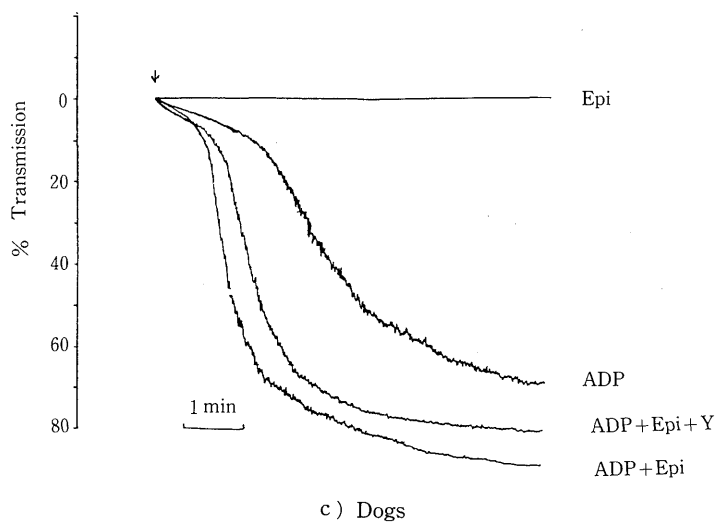


Fig. 1 Potentiation by epinephrine of ADP-induced platelet aggregation and the inhibition by yohimbine. Final concentrations;  $2.3\mu\text{M}$  epinephrine (Epi);  $2.8\mu\text{M}$  ADP;  $2.0\mu\text{M}$  yohimbine (Y).

Table 1 Potentiation by epinephrine (Epi) of the ADP-induced platelet aggregation and its inhibition by yohimbine (Y).

Animals	Index	ADP	ADP+Epi	ADP+Epi+Y
Guinea pigs	Agslope	63±28 (17)	74±21 (17)**	60±26 (8)
	Agmax	52±13 (17)	69±11 (17)***	53±16 (8)
Rats	Agslope	54±31 (8)	56±30 (8)	46±35 (3)
	Agmax	36±18 (8)	38±18 (8)	30±21 (3)
Dogs	Agslope	46±41 (5)	77±19 (5)	59±33 (5)
	Agmax	44±20 (5)	69±13 (5)	57±17 (5)
Cats	Agslope	72±2 (6)	73±3 (6)	70±5 (5)
	Agmax	26±10 (6)	53±10 (6)	43±9 (5)

Agslope, the maximal rate, and Agmax, the maximal degree of platelet aggregation. Mean±SD (n). \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001 in ADP vs ADP+Epi (Paired t test).

ネコ血小板においてもエピネフリン単独では血小板凝集は生じなかった。ADPによるネコ血小板凝集はラットのそれとむしろ類似した凝集曲線を示した (Fig. 1d)。

しかし、ネコにおけるADP血小板凝集は2.3μMエピネフリンの併用によってAgslopeよりもAgmaxが増強され、その増強は2.0μMヨヒンビンによって部分的であるが拮抗される傾向がみられた (Fig. 1d)。しかしこれらの成績においても統計的有意差は見出せなかった。

#### 考 察

ヒトなどの霊長類以外の動物ではエピネフリン単独作用による血小板凝集は生じないという従来の成績<sup>6,7,8,11)</sup>のとおり、本研究においてもいずれの実験動物においてもエピネフリン単独による血小板凝集はみとめられなかった。しかし、RAOら (1988)<sup>10)</sup>は、ヒト血小板においてもエピネフリンに対して凝集反応を示さない例を見出し、それらの個体では血小板のエピネフリン受容体が正常人に比して著しく減少しているという興味ある報告をしている。このような理由は、前述のヒト以外の動物でエピネフリン単独での血小板凝集の欠如をも説明出来るかも知れない。

本研究成績を2.8μM ADPによる血小板凝集反応でみる限りその感度は各実験動物間で著しい差異はないように思われる。しかし、血小板凝集曲線からみるとモルモットとイヌでは非可逆性、すなわち2次性の凝集を示し、ラットとネコでは可逆性、すなわち1次性の凝集を示した。一方、ヒト血小板ではADP濃度によって凝集の性質が変わり、すなわち低濃度では1次性の凝集を示すが、高濃度になるにつれて2次性の凝集を示すことが知られ

ている。

さらに本研究においてはADP凝集へのエピネフリンの影響についても各実験動物間でかなりのバラツキがみとめられた。なかでもモルモット血小板ではエピネフリンによるADP凝集の増強は統計的にも有意であった。しかし、ラット、イヌ、ネコでは傾向としてはみとめられるが、有意性は見出せなかった。しかし、ラット血小板ではADPによる凝集血小板の再解離がエピネフリンによって強く抑制された。しかもこれらのADP凝集に対するエピネフリンのいずれの増強効果もα<sub>2</sub>遮断薬であるヨヒンビンによって部分的または完全に拮抗されるように思われる。従ってこれらの成績からヒト以外の動物の血小板にもα<sub>2</sub>受容体の存在が示唆される。

ヒト血小板における研究<sup>4,6)</sup>はエピネフリンによるADP凝集の増強が血小板ADP受容体の増加によるのではなく、ADPに対する受容体の親和性の増加によることが示唆されている。さらにその結果として細胞外Caの流入や細胞内Caの動員による細胞内Caイオンの増加が報告されている<sup>10)</sup>。このようにエピネフリンの血小板への効果がADPの作用を介して発見することより、エピネフリンは直接の血小板凝集物質というよりもADPに対する増強物質またはモジュレーターと考えられている<sup>3,6,13)</sup>。また血小板α<sub>2</sub>受容体自体が血中カテコールアミンによって調節されていることから<sup>9,10)</sup>、エピネフリンに対する血小板の反応性はストレスなどの交感神経緊張を伴う影響を検討するうえで興味のある課題である。

#### 文 献

1) Bondy G.S. and Gentry P.A.: Characterization

- of the normal bovine platelet aggregation response. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92C**, 67-72 (1989)
- 2) Born G.V.R. and Cross M.J.: The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.*, **168**, 178-195 (1963)
  - 3) Calkins J., Lane K.P., LoSasso B. and Thurber L.E.: Comparative study of platelet aggregation in various species. *J. Med.* **5**, 292-296 (1974)
  - 4) Colman R.W.: Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation. *FASEB J.*, **4**, 1425-1435 (1990)
  - 5) Dodds W.J.: *Platelets: A Multidisciplinary Approach*. Raven Press, New York (1978) pp. 45-49
  - 6) Figures W.R., Searce L.M., Wachtfogel Y., Chen J., Colman R.F. and Colman R.W.: Platelet ADP receptor and  $\alpha_2$ -adrenoceptor interaction. *J. Biol. Chem.*, **13**, 5981-5986 (1986)
  - 7) Grant J.A. and Scrutton M.C.: Novel  $\alpha_2$ -adrenoceptors primarily responsible for inducing human platelet aggregation. *Nature*, **277**, 659-661 (1979)
  - 8) 日高弘義：血小板の分子薬理学—基礎と臨床，講談社，東京（1989）p. 111
  - 9) Hollister A.S., Fitzgerald G.A., Nadeau H.J., Robertson D.: Acute reduction in human platelet  $\alpha_2$ -adrenoceptor affinity for agonist by endogenous and exogenous catecholamines. *J. Clin. Invest.* **72**, 1478-1505 (1983)
  - 10) Hollister A.S., Onrot J., Lonce S., Nadeau H. J. and Robertson D.: Plasma catecholamine modulation of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist affinity and sensitivity in normotensive and hypertensive human platelets. *J. Clin. Invest.*, **77**, 1416-1421 (1986)
  - 11) Hwang D.H.: *The Platelets: Physiology and Pharmacology*. Academic Press, New York (1985) pp. 289-305
  - 12) Kinlough-Rathbone R.L. and Mustard J.F.: *Platelet Responses and Metabolism Volume 1*. CRC Press, Boca Taton (1986) pp. 193-234
  - 13) Meyers K.M.: *Platelet Responses and Metabolism Volume 1*. CRC Press Inc., Florida (1986) pp. 209-234
  - 14) Olblich C., Aepfelbacher M. and Siess W.: Epinephrine potentiates calcium mobilization and activation of protein kinases in platelets stimulated by ADP through a mechanism unrelated to phospholipase C. *Cellular Signalling*, **1**, 483-492 (1989)
  - 15) Oude Egbrink M.G.A., Tangelder G.J., Slaaf D.W., Velzen S.W. and Reneman R.S.: Influence of hypercapnia and hypoxia on rabbit platelet aggregation. *Thromb. Res.*, **57**, 863-875 (1990)
  - 16) Rao A.K., Willis J., Kowalska M.A. Wachtfogel Y.T. and Colman R.W.: Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine. Studies of a familial platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor defect. *Blood*, **71**, 494-501 (1988)