

少量の Epinephrine はズリ応力による血小板の凝集を亢進させる

Low Concentrations of Epinephrine Can Augment Shear Stress-Induced Platelet Aggregation

後藤 信哉
池田 康夫*¹
高橋 栄一
半田 誠*²
半田俊之介

Shinya GOTO
Yasuo IKEDA*¹
Eiichi TAKAHASHI
Makoto HANDA*²
Shunnosuke HANDA

Abstract

Platelet aggregation induced by shear stress is distinct from that induced by an agonist such as ADP or collagen. The physiological significance of shear-induced platelet aggregation was investigated by measuring the effects of the presence of physiological concentrations of epinephrine. Blood samples were taken from 10 normal volunteers who had received no drugs known to interfere with platelet functions for 1 month preceding the study. Blood was mixed with 1/10 volume of 3.1% sodium citrate solution. Platelet-rich plasma and platelet-poor plasma were prepared by centrifugation at 100 g for 15 min and 2,000 g for 15 min, respectively. The platelet count of platelet-rich plasma was adjusted to $3 \times 10^5/\mu\text{l}$. Shear-induced platelet aggregation in platelet-rich plasma was determined using a modified cone and plate viscometer controlled by a personal computer system. The intensity of light transmission was continuously recorded. The percent platelet aggregation was calculated according to the Lambert-Beer equation. Platelet aggregation occurred under both low (12 dyn/cm²) and high (108 dyn/cm²) shear stress. More significant aggregation was observed under high shear stress. The maximum percent platelet aggregation was $44.7 \pm 13.4\%$, which increased to $53.3 \pm 10.0\%$ in the presence of 10 pg/ml epinephrine. With 100 pg/ml of epinephrine, shear-induced platelet aggregation induced by 12 dyn/cm² shear significantly increased, but the effects on shear-induced platelet aggregation of 108 dyn/cm² shear were not uniform. Shear-induced platelet aggregation is enhanced by physiological concentrations of epinephrine, which may be a cause of arterial thrombotic occlusion in sympathomimetic states.

Key Words

platelet, shear stress-induced aggregation, epinephrine, arterial thrombosis

はじめに

アデノシン、コラーゲンなどのアゴニストにより惹起される血小板の凝集に加えて、血流によるズリ応力刺激により血小板凝集が惹起されることが明らかにされた¹⁻³⁾。アゴニストにより惹起される血小板の凝集は流血中のフィブリノーゲンが血小板膜の GPIIb/IIIa に結合することにより仲介され、aspirin がこの凝集を抑制することが知られている⁴⁾。一方、ズリ応力により

惹起される凝集は、負荷されるズリ応力の大きさにより凝集機序が異なる。すなわち 10 dyn/cm² 程度の比較的低いズリ応力（低ズリ）により惹起される血小板の凝集は、アデノシン、コラーゲン等により惹起される凝集と同様に流血中のフィブリノーゲンが血小板膜 GPIIb/IIIa に結合することにより仲介されるが、80 dyn/cm² 以上の比較的高いズリ応力（高ズリ）により惹起される凝集は、流血中の von Willebrand factor (vWf) が血小板膜の GPIb と GPIIb/IIIa に結合すること

慶應義塾大学医学部 呼吸循環内科, *¹血液感染リウマチ内科, *²同・輸血センター: 〒160 東京都新宿区信濃町 35
Cardiopulmonary Division and *¹Division of Hematology, *²Department of Medicine and Blood Center, Keio University School of Medicine: Shinanomachi 35, Shinjuku-ku, Tokyo 160

Received for publication April 21, 1993; accepted December 13, 1993 (Ref. No. 39-PS150)

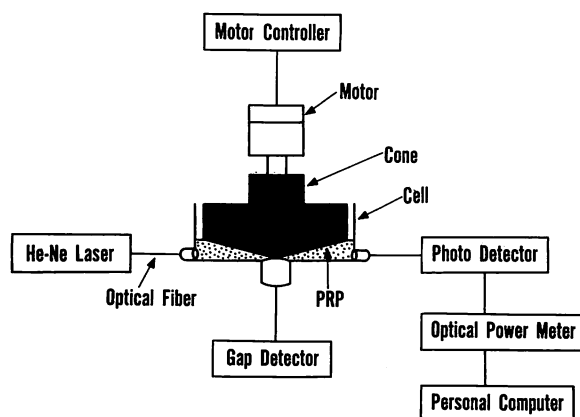


Fig. 1 Instrumentation¹²⁾

A modified cone-plate viscometer was adjusted to measure platelet aggregation by the intensity of light transmission. PRP=platelet-rich plasma; He-Ne=helium-neon

により仲介される²⁾。この凝集は aspirin の影響を受けない⁵⁾。動物の冠動脈血栓モデルを用いた実験により、aspirin⁶⁾、vWf と GPIb の結合を抑制する薬物⁷⁾もしくはモノクローナル抗体⁸⁾のいずれも抗血栓作用を有することが示されており、実際の動脈血栓形成には両方の血小板凝集機序が関与していると想定される。

急性心筋梗塞の発症頻度は午後または夕方より早朝もしくは午前中に多いことが知られ、交感神経緊張の日内変動との関連が推定されている⁹⁾。アデノシン、コラーゲンなどのアゴニストにより惹起される血小板の凝集は、epinephrine 濃度が増加すると亢進することが知られており、心筋梗塞発症頻度の日内変動との関連が推定された¹⁰⁾。ズリ応力による凝集に関しても、低ズリ、高ズリ応力をおのおの単相性に負荷したさいに惹起される凝集が少量の epinephrine により容量依存性に亢進することをすでに報告した¹¹⁾。生体における血流は拍動流であり、生体内で血小板に負荷させるズリ応力刺激は時間とともに変化すると推定される。本研究では異なった機序で凝集を惹起することが知られる低ズリ (12 dyn/cm²)、高ズリ (108 dyn/cm²) 応力を連続的に血小板に負荷したさいに惹起される 2 相性の血小板凝集に及ぼす少量 epinephrine の効果を検討した。

対象と方法

1. 対象

年齢 25–31 歳の健常成人 10 例を対象とした。対象はいずれも慶應義塾大学病院に勤務する医師で、過去に出血または血栓性疾患の既往を有さず、1 ヶ月以内に

aspirin などの血小板機能に影響を与えることが知られている薬物の服用歴を有していなかった。

2. 検体の採取

安静坐位にて肘静脈より採血した。血漿中の epinephrine 濃度の変動を減らすために、採血時刻は午前 10 時前後とし、また採血前 30 分以上安静を保つように注意した。3.1% クエン酸ナトリウムにより抗凝固処理をしたのち、100 g、15 分間の遠沈により多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) を作成した。PRP を採取した残りの検体に対して 2,000 g、10 分間の遠沈を行い乏血小板血漿 (platelet-poor plasma: PPP) を作成した。PRP を PPP で薄めることにより PRP の血小板数を $30 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調節した。

3. 装置

Fig. 1 に計測装置を示した。円錐平板粘度計の原理を応用して回転数をコンピューター制御し、検体に任意のズリ応力を負荷することを可能とした装置を用いた。本装置の詳細はすでに報告した¹²⁾。検体には側面からレーザー光を照射し、透過光量を 1 秒ごとにコンピューターに入力した。Fig. 2 に血小板凝集率の算出法を示した。PPP、PRP およびズリ応力下の PRP の透過光量の変化から Lambert-Beer の法則を用いて血小板の凝集率を算出した。

4. 実験プロトコール

PRP 450 μl に生理食塩水 50 μl を添加し対照とした。Fig. 2 に点線で示したように、ズリ応力を連続的に変化させ凝集動態を記録した。生理食塩水の代わりに epinephrine (ポスミン) 溶液を添加した。Epinephrine 終濃度を 10 pg/ml、100 pg/ml 増加させ同様の計測を行い対照と比較した。

5. 統計解析

結果を平均±標準偏差として示した。2 群間の比較にあたっては Student's paired *t*-test を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

結果

1. 対照群の凝集動態

Fig. 3 に対照群および epinephrine 添加後の凝集動態

を示した。ズリ応力を、図に示すように連続的に変化させたところ、12 dyn/cm²、108 dyn/cm²で透光量が増加し、血小板の凝集が示唆された。12 dyn/cm²における凝集は可逆的で、ズリ応力を増加させると一度解離した。108 dyn/cm²による凝集は12 dyn/cm²のズリ応力による凝集よりも強固であった。対照群の血小板の最大パーセント凝集率は44.7±13.4%であった。対照群の血漿に含まれていた epinephrine 濃度は5例では50 pg/ml、5例では30 pg/ml (40±10 pg/ml)であった。

2. Epinephrine 添加後の凝集動態

Fig. 3 に示したように、epinephrine 濃度を10 pg/ml 上昇させると108 dyn/cm²のズリ応力による凝集は亢進した。108 dyn/cm²による血小板の最大パーセント凝集率は53.3±10.0%に増加した ($p < 0.01$)。Epinephrine 濃度を100 pg/ml 上昇させると12 dyn/cm²による凝集は増加した。12 dyn/cm²のズリ応力による凝集が著しく亢進した検体では、108 dyn/cm²のズリ応力による凝集はむしろ減弱した。このため、100 pg/ml の epinephrine が108 dyn/cm²による凝集に与える影響は、一定の傾向を示さなかった。

考 案

血流のズリ応力刺激はアデノシン、コラーゲンなどのアゴニストによる刺激よりも生理的な血小板凝集刺激である。血流が Newtonian flow であると仮定すると、正常動脈では100–500/sec の、狭窄冠動脈ではその数十倍のズリ速度が負荷されると計算されている¹³⁾。われわれは低ズリ (12 dyn/cm²)、および高ズリ (108 dyn/cm²) 応力負荷により血小板は凝集すること、両者の凝集機序が異なることを報告した²⁾。動脈硬化性に狭窄した冠動脈における血流は乱流となっており、かつ動脈血流は拍動流であるため、流血中で血小板に負荷されるズリ応力は単相性ではなく経時的に変動すると推定される。現段階では個々の血小板について、流血中で受けるズリ応力の変動様式を *ex vivo* で再現することは困難である。

本研究では凝集曲線が2相性となるように低ズリ、高ズリ応力を連続的に変化させる条件²⁾を用いて、ズリ応力が変動する系での血小板の凝集動態に及ぼす少量の epinephrine の効果を検討した。低ズリ、高ズリ応力をおのおの単相性に負荷させた系では少量の epineph-

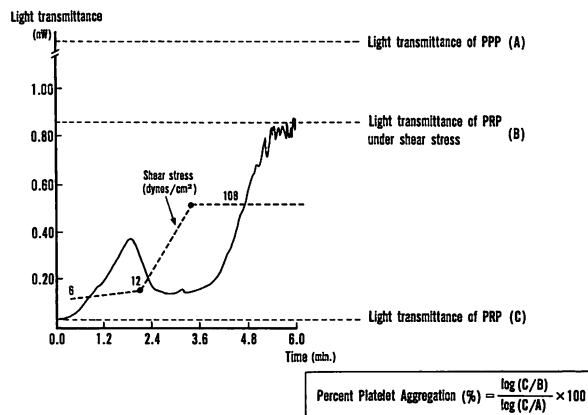


Fig. 2 Data analysis

The intensity of light transmission through platelet-rich plasma (PRP) under the shear force indicated by the dotted line was measured every second. The percentage of aggregated platelets was calculated by the Lambert-Beer equation.

PPP=platelet-poor plasma

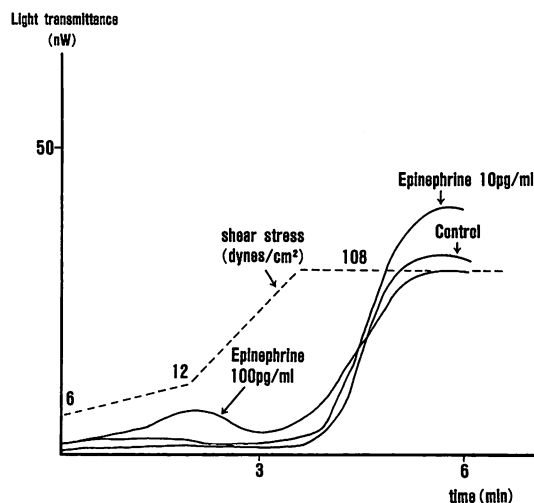


Fig. 3 Effects of epinephrine on shear-induced platelet aggregation

The effects of a low concentration of epinephrine on the intensity of light transmission through platelet-rich plasma under the shear force indicated by the dotted line. Aggregation occurred under both low (12 dyn/cm²) and high (108 dyn/cm²) shear force. 10 pg/ml of epinephrine enhanced the maximum platelet aggregation induced by high shear force.

rine は血小板膜糖たんぱく GPIb の vWf への反応性を亢進させることによりズリ応力による血小板凝集を亢進させることをすでに報告¹⁴⁾したが、本研究で用いた条件では、日常生活中に交感神経刺激により惹起される程度のわずかな epinephrine 濃度の増加により、ズリ応力による血小板の凝集が亢進することを確認するとともに、低ズリ応力による凝集が著しく亢進した症例では、それに続く高ズリ応力による凝集がむしろ抑制されることを明らかにすることができた。外部からの

刺激のみでなく、凝集の亢進そのものが引き続く凝集に影響を与えることを示唆した。ズリ刺激から血小板凝集に至る細胞内情報伝達経路を考えるうえで興味深いと考えた。

Epinephrine はそれ自体が血小板の凝集を惹起するのみでなく、少量を前投与することによりアデノシン、コラーゲンなどによる凝集を亢進させることが知られていた¹⁵⁾。交感神経活性の高い深夜-早朝に急性心筋梗塞の発症が多いこと⁹⁾、深夜-早朝の血漿中 epinephrine, norepinephrine 濃度が上昇していたこと、この時間に採取した血小板のアデノシン, epinephrine に対する反応性が亢進していたこと¹⁰⁾などから、交感神経緊張による血小板の反応性の亢進と急性心筋梗塞発症の関連が推論された。動物実験では内皮細胞損傷と狭窄を伴う冠動脈の血小板血栓による閉塞が epinephrine 投与により促進されることが明らかにされ、臨床的観察を裏付けた⁶⁾。臨床例および動物実験で観察した冠動脈の血栓は血流中で生じる現象であり、血小板から放出されるアデノシン, セロトニンなどが近傍の血小板を活性化させる血小板凝集計による静止系での観察とは、著しく条件が異なっていた。本研究で用いたズリ応力による凝集系では、流れのある系での血栓形成により近い条件を再現できたと考えられる。この系を用いて血流中での血小板凝集もまた静止系と同様、少量の epinephrine により亢進することを確認できた。

Epinephrine 濃度を 10 pg/ml 増加させると、ズリ応力による凝集は亢進したが、さらに増加させたときの結果は症例により異なった。結果の個体差の原因として血漿 epinephrine 濃度の差、血小板表面の epinephrine 受容体の数と親和性の差、細胞内情報伝達機構の個体差

などが考えられる。本研究では対象からの採血条件を一定としたため、血漿中の epinephrine 濃度に大きなバラツキがみられず、採血時の血漿中 epinephrine と結果の関係は明らかではなかった。Epinephrine 受容体については検討していない。予備実験で血小板表面に α_2 受容体を有しない特発性血小板血症患者から分離した血小板では、ズリ応力による凝集が惹起されないことを確認している(未発表データ)、 α_2 受容体とズリ応力による凝集には関連があると推定されるが、正常者での α_2 受容体の個体差と epinephrine の効果の関係は不明である。細胞内情報伝達機構については今後の検討課題である。

本研究は多血小板血漿を対象として、血小板凝集動態のみに注目した研究である。実際の動脈血栓の形成にあたってはフィブリン形成に至る凝固系の関与、あるいは血管内皮細胞の関与が想定される。活性化された凝固因子、内皮細胞から分泌されるさまざまな生理活性物質は、血小板の反応性にも影響を与える可能性も考えられる。交感神経刺激と動脈血栓症の関連を完全に理解するためには交感神経刺激が内皮細胞機能、凝固機能に及ぼす役割、さらにこれらの因子の相互作用を明らかにする必要がある。

結 論

交感神経緊張時により日常生活中に起こりうる程度の epinephrine 濃度のわずかな上昇により、ズリ応力により惹起される血小板凝集は亢進した。Epinephrine 濃度を増し、低ズリ応力による凝集が著しく亢進した症例では高ズリ応力による凝集はむしろ減弱した。交感神経の緊張と動脈血栓症の関連を示唆した。

要 約

血小板は血流のズリ応力刺激によりアゴニスト刺激による凝集とは異なる機序で凝集する。ズリ応力による血小板凝集の生理的意義を考察するために少量の epinephrine の効果を検討した。健康成人 10 人より安静坐位にて採血し、 $30 \times 10^4/\mu\text{l}$ の血小板を含む多血小板血漿と血小板をほとんど含まない乏血小板血漿を作成した。円錐平板回転粘度計の原理を応用し、検体に任意のズリ応力を負荷することを可能とした装置を用いて、多血小板血漿に $0-108 \text{ dyn/cm}^2$ のズリ応力を連続的に負荷した。ズリ応力負荷中の血小板凝集動態を光学的に観察し、ズリ応力負荷による血小板の最大パーセント凝集率を算出した。

多血小板血漿に負荷するズリ応力を変化させたところ、 12 dyn/cm^2 および 108 dyn/cm^2 のズリ応力により血小板が凝集して凝集曲線は 2 峰性となった。 108 dyn/cm^2 のズリ応力により惹起される凝集がより強固であった。対照群の血小板の最大パーセント凝集率は $44.7 \pm 13.4\%$ であっ

た。Epinephrine を添加して終濃度を 10 pg/ml 増加させると、最大パーセント凝集率は $53.3 \pm 10.0\%$ に増加した。Epinephrine 終濃度を 100 pg/ml としたときには、 12 dyn/cm^2 のズリ応力による凝集が亢進した。 12 dyn/cm^2 による凝集の亢進が著しい症例では 108 dyn/cm^2 による凝集がむしろ減弱したため、100 pg/ml の epinephrine が血小板の最大パーセント凝集率に及ぼす効果には有意差を認めなかった。

交感神経緊張時に生体内で日常的に起こりうる程度の epinephrine 濃度のわずかな増加により、ズリ応力による血小板凝集は亢進した。この現象は交感神経緊張時の動脈血栓発症と関連すると推論された。

J Cardiol 1994; 24: 237-241

文 献

- 1) O'Brien JR : Shear-induced platelet aggregation. *Lancet* 1990; **335** : 711-713
- 2) Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I, Sakai K, Ruggeri ZM : The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; **87** : 1234-1240
- 3) Moake JL, Turner NA, Stethopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD : Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest* 1986; **78** : 1456-1461
- 4) Kroll MH, Schafer AI : Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; **74** : 1181-1195
- 5) Hardwick RA, Hellums JD, Peterson DM, Morke JL : The effects of SIPA, PGE1, PGI2 and theophyllin on the response of platelets subjected to shear stress. *Blood* 1981; **56** : 678-682
- 6) Roux SP, Sakariassen KS, Turitto VT, Baumgartner HR: Effect of aspirin and epinephrine on experimentally induced thrombogenesis in dogs. *Arterioscler Thromb* 1991; **11** : 1182-1191
- 7) Stony J, Phillips M, Brands C, Moake J, Adelman B : Aurintricarboxylic acid in a canine model of coronary artery thrombosis. *Circulation* 1990; **81** : 1106-1114
- 8) Bellinger DA, Nichols TC, Read MS, Reddick RL, Lamb MA, Brinkhous KM, Evatt BL, Griggs T : Prevention of occlusive coronary artery thrombosis by a murine monoclonal antibody to porcine von Willebrand factor. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 1987; **84** : 8100-8104
- 9) Willich SN, Linderer T, Wegscheider K, Leizorovicz A, Alamercury I, Schroder R, the ISAM Study Group : Increased morning incidence of myocardial infarction in the ISAM study : Absence with prior β -adrenergic blockade. *Circulation* 1989; **80** : 853-858
- 10) Tofler GH, Brezinski D, Schafer AI, Czeisler CA, Rutherford JD, Willich SN, Gleason RE, Williams GH, Muller JE : Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. *N Engl J Med* 1987; **316** : 1514-1518
- 11) Goto S, Ikeda Y, Handa M, Takahashi E, Yoshioka A, Fujimura Y, Fukuyama M, Handa S, Ogawa S : Epinephrine augments von Willebrand factor dependent shear-induced platelet aggregation. *Circulation* 1992; **86** : 1859-1863
- 12) Fukuyama M, Sakai K, Itagaki I, Kawano K, Murata M, Kawai Y, Watanabe K, Handa M, Ikeda Y : Continuous measurement of shear-induced platelet aggregation. *Thromb Res* 1989; **54** : 253-260
- 13) 岡 小天 : 循環。バイオレオロジー，第 4 版，裳華房，東京，1984，pp31-48
- 14) Goto S, Handa S, Takahashi E, Ogawa S, Handa M, Fukuyama M, Ikeda Y : Epinephrine causes platelet membrane glycoprotein (GP) Ib/IX complex more reactive to von Willebrand factor under shear stress. *Circulation* (submitting)
- 15) Ardlie NG, Glew G, Schwartz CJ : Influence of catecholamines on nucleotide-induced platelet aggregation. *Nature* 1966; **5060** : 415-417