

原 著

エストロゲンによるトロンビン誘発血小板凝集への影響

長沢 洋* 福武 勝博*
 Mario G. Baldini** M. Steiner**

Effect of estrogen platelet aggregation induced by thrombin

Hiroshi NAGASAWA*, Katsuhiro FUKUTAKE*,
 Mario G. Baldini** and M. Steiner**

Key words : estrogen and other steroides, antithrombin III,
 thrombin, platelet aggregation

Although the question whether oral contraceptives are casually involved in thromboembolic disorders remains a very contested issue, a growing number of studies show that a state of hypercoagulability does exist in users of oral contraceptives, and there seems to be general agreement that factors II, VII, X and fibrinogen are increased and antithrombin III (AT III) decreased. Reduction in the level of this inhibitor in this case has been repeatedly confirmed both by coagulant and immunological methods. Many familial cases of thromboembolic disorders due to AT III deficiency have been reported and one of authors showed hyper sensitivity of platelet to thrombin. The recent observation by Fukutake and Nagasawa et al. showed the reduction of AT III measured by coagulant and immunological methods after the addition of estrogen to the plasma in vitro.

Our test system was consisted with platelet, AT III and thrombin. It was set up as next; Platelet was suspended in Ca-free Tyrode buffer and platelet aggregation was induced by ovine thrombin (0.01 NIH unit) containing lowest activity which can produce 100% aggregation. And this 100% aggregability of platelet was suppressed to 0—5% by the addition of AT III with lowest concentration (0.06u) 2 min prior to thrombin. Platelet aggregation was measured as optical transmission based on Born's method, and purified in highest degree materials were used. This aggregation curve as a control for the next study almost nothing in aggregability.

When 17β estradiol dissolved in Tyrode buffer containing 0.05% ethanol was added to platelet suspension previously, platelet aggregation was increased up to 100% in a dose dependent manner. This effect was observed by the addition of estrogen 1.25×10^{-7} — 1.25×10^{-10} M in final concentration.

The same effect was also observed by the addition of estradiol, progesteron,

* 東京医科大学臨床病理 [〒160 東京都新宿区西新宿6—7—1], Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan.

** Division of Hematologic Research, Brown University, Rhode Island, U.S.A.

testosterone, cortisone and cholesterol which are all classified as a steroid group. There seemed to be no difference in the effect between these steroids. Not only estrogen but also all other samples could not produce any platelet aggregation in another system consisted with only platelet nor platelet and thrombin.

Our in vitro test system is similar to the mechanism of hemostasis on the blood coagulation in the body. The results interpret the mechanism of thromboembolic disorders due to the administration of oral contraceptives through the inhibition of neutralizing activity in AT-III against thrombin, and this phenomenon produce predominance of thrombin resulting platelet aggregation.

はじめに

経口避妊薬服用者に血栓症が多発することが1969年 Poller ら¹⁾により始めて統計的に明らかにされて以来 Fagerhol²⁾, von Kaulla³⁾を始め多くの研究者により estrogen と血液凝固亢進状態との関連について究明が続けられてきた。しかしまだ明解な結論を得るに至らず多くの議論がなされているが、経口避妊薬服用者では Antithrombin III (AT III) レベルは一般に低下している²⁻⁵⁾という点では意見の一致をみている。

一方、先天的 AT III 欠乏家系に血栓症の多発がみられることが報告されており⁶⁻¹⁰⁾, さらに Carvalho¹⁰⁾ らはこの患者に thrombin による血小板凝集能が亢進していることをみだし, AT III の低下が thrombin による血小板凝集の亢進を招くことを示した。

また、1975年福武ら¹¹⁾は試験管内にて脱フィブリン血漿に estrogen を添加した時 AT III の凝固活性と免疫活性がともに消失し, estrogen が直接 AT III を中和することを報告した。そこでわれわれは服用した estrogen が血中の AT III を中和し AT III レベルを低下させ thrombin 優位の状態が容易に形成され血小板凝集が引き起こされるのではないかと考え, AT III, thrombin および血小板が存在する反応系に estrogen を試験管内で添加しその血小板凝集に及ぼす影響を調べた。

I. 試剤および方法

1) 血小板浮遊液は少なくとも2週間以上薬剤投与の既往のない健康成人よりクエン酸ナトリウム血として採血し遠心にて多血小板血漿を

得、3回洗浄した後 Ca フリー Tyrode buffer に再浮遊させ $40 \times 10^4 / \mu l$ になるよう調製した。

2) AT III は Abildgaard¹²⁾ 法により加熱脱フィブリン血漿より分離しさらに等電点分画カラムを用いて単離し 0.15M NaCl を含む 0.1M phosphate buffer, pH 7.4 にて透析を行い 2 unit/mg protein の活性をもつ試剤を得た。この試剤は polyacrylamide gel, SDS gel および免疫電気泳動にて1本のバンドを示した。

3) thrombin は Park Davis 社の bovine thrombin より dundblad 法¹³⁾を用いて2度クロマトグラフィーを行い最後に得た2つの thrombin 活性を持つピークのうち強い活性を示す分画を集め 0.15M NaCl 加 0.1M Tris buffer pH 7.4 にて透析した。この試剤は SDS gel 電気泳動にて1本のバンドを呈し, 2,200 NIH unit/mg protein の活性を示し, -20°C にて保存し使用直前に溶解し用いた。しかしこの製剤は使用直前の検定にて 390 NIH unit/mg protein の活性を示した。

4) estrogen およびその他の Steroid は Sigma 社の合成製剤を用い、沸騰 ethanol にて溶解した後 Ca フリー Tyrode buffer にて希釈した。希釈溶液に含まれる ethanol は常に 0.05% になるよう調製した。

5) 研究に用いた test system は AT III により抑制された thrombin 誘発血小板凝集を対照としこれに estrogen 溶液を添加した時その凝集能に及ぼす影響を Borne¹⁴⁾ の方法に基く血小板凝集計を用いて測定した。用いた AT III と thrombin の濃度は次のように決定した。始めに 0.4 ml の血小板浮遊液と各種濃度の thrombin 溶液 10 μl を用意し 100% の血小板凝集を得る thrombin の最少必要量を求めたところ 0.01

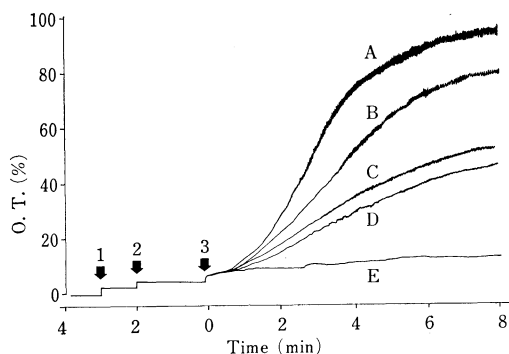


Fig. 1 Effect of 17β estradiol on antithrombin III-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation. To 0.4ml platelet suspension ($4 \times 10^5/\mu\text{l}$), were added at 1 $10\mu\text{l}$ 17β estradiol solution, at 2 $10\mu\text{l}$ antithrombin III (0.06 unit absolutely) and at 3 $10\mu\text{l}$ thrombin (0.01 NIH unit absolutely). The concentration of 17β estradiol varied, A; $1.25 \times 10^{-7}\text{M}$, B; $1.25 \times 10^{-8}\text{M}$, C; $1.25 \times 10^{-9}\text{M}$, D; $1.25 \times 10^{-10}\text{M}$ and E; buffer (final concentration).

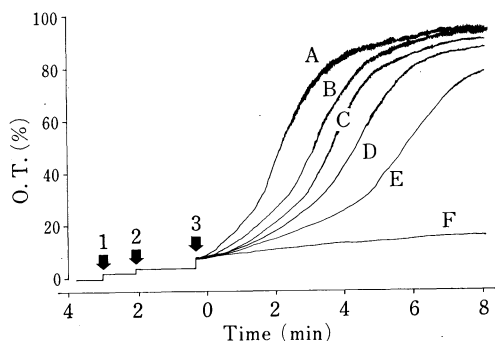


Fig. 2 Effect of various steroid compounds on antithrombin III inhibition of thrombin induced platelet aggregation. See Fig. 1 for arrows of 1, 2, 3. A; ethinyl estradiol, B; progesterone, C; testosterone, D; cortisone, E; cholesterol, F; solvent only, each at a concentration of $1.25 \times 10^{-7}\text{M}$

NIH unit との結果を得た。次に $10\mu\text{l}$ の各種濃度の AT III 溶液を 0.01 単位の thrombin 添加の 2 分前に血小板浮遊液に加え凝集能を 0~5% にまで抑制する最少必要量を求めたところ 0.06 単位との結果を得た。すなわち血小板凝集のほとんど欠除した AT III, thrombin, 血小板を含む反応系を用意し対照とした (図 1—E)。

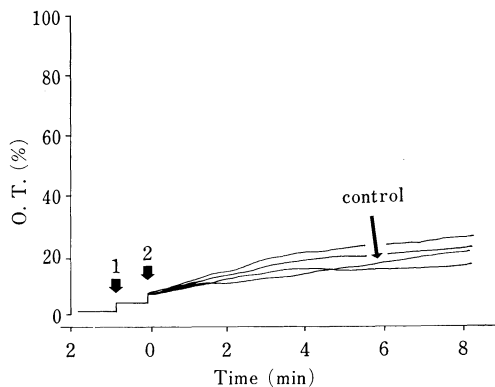


Fig. 3 Effect of estrogen on thrombin induced platelet aggregation without antithrombin III. To 0.4ml platelet suspension were added at 1 $10\mu\text{l}$ of 17β estradiol solution of the following concentration: 1.25×10^{-7} , 1.25×10^{-8} , $1.25 \times 10^{-9}\text{M}$ in final concentration, at 2 $10\mu\text{l}$ of thrombin (0.002 unit absolutely).

この反応系に estrogen 溶液を添加し (図 1 の矢印 1) 凝集能の変化より estrogen の影響を測定した。

II. 成 績

1) 図 1 に示すごとく 17β estradiol を血小板浮遊液に添加した時では対照 E に比し著明な血小板凝集の増大がみられ、この時の血小板凝集に対する増大効果は添加した estrogen の終濃度 $1.25 \times 10^{-10}\text{M} \sim 1.25 \times 10^{-7}\text{M}$ にみられ、血小板凝集の増大と estrogen 濃度との間に dose response のあることが観察された。

2) ethinyl estradiol, progesterone, testosterone, cortisone, cholesterol の各溶液を終濃度 $1.25 \times 10^{-7}\text{M}$ になるよう調製し血小板浮遊液に添加したところ図 2 に示すごとく全例に血小板凝集の増大がみられ steroid の種類による差はほとんどみられなかった。

3) 一方図 3 の control に示すごとく, AT III を加えることなく低濃度の thrombin のみを用いて前述の対照 (図 1 の E) と同様な血小板凝集曲線が得られるが、この反応系に estrogen を添加したところ血小板凝集の増大は全くみられなかった。また estrogen 溶液のみを血小板浮遊液に添加した時にも同様に血小板凝集はみ

られなかった。

III. 考 察

本研究に用いた test system は ATⅢ と thrombin の量的バランスにより血小板凝集が起きない状態を対照としており血液凝固における homeostasis に似た状態を in vitro にて表現しようとしたものである。図1の対照 E は ATⅢ が thrombin をほとんど即時的に中和しているが ATⅢ の代りに albumin 溶液を添加した時には中和作用はみられず非特異的反応によるものではないと思われ、ATⅢ : thrombin の比が 0.06u : 0.01u と ATⅢ が thrombin に対して量的に過剰なため即時反応に近い中和態度を呈したものである。またこの反応態度は Eike¹⁴⁾ の報告と一致しているが微量の thrombin が形成されるような局所の障害を考える時 ATⅢ の thrombin に対する中和態度としては興味深い。

図1の成績は 17β estradiol が ATⅢ の thrombin に対する中和作用を阻害していることを示しており、また血小板凝集に影響を与える estrogen 濃度は estrogen を含む経口避妊薬服用時の血中濃度に近似している。図2の実験に用いた各種の試剤は steroid group に属し全て化学構造が類似しているがいずれも同程度の血小板凝集の増大を起すことを示している。この成績は progesterone 単体による経口避妊薬また男性用避妊薬としての androgene の投与も血栓形成を招く危険があること、また cortico steroid 投与時に経験する出血傾向を軽減させる効果の原因をも示唆しており興味深い。一方 ATⅢ を含まない反応系である図3では血小板凝集の増大はみられない。この成績は estrogen が ATⅢ を中和することにより反応系に thrombin 優位の状態を形成し血小板凝集を増大せしめていることを示唆している。

結 論

estrogen は ATⅢ の thrombin に対する中和作用を阻害し結果として thrombin 優位の状態が血小板凝集を誘発させるものと思われる。この血小板凝集の増大効果は終濃度 1.25×10^{-7} ~

1.25×10^{-10} M の estrogen にて観察された。同様の効果は steroid group に属するほとんど全ての steroid にみられた。

文 献

- 1) Poller, J. and Thomson, J.M.: Sequential oral contraception and clotting factors. Br. Med. J., 2; 822~823, 1969.
- 2) Fagerhol, M. K. and Abildgaard, V.: Immunological studies on human antithrombin III. Influence of age, sex and use of oral contraceptives on serum concentrations. Scand. J. hematol., 7; 10~17, 1970.
- 3) von Kaulla, F. and von Kaulla, K.N.: Oral contraceptives and low antithrombin III activity. Lancet, 1; 36, 1970.
- 4) Kaulla, E. von, Droegemueller, W., Aoki, N. and von Kaulla, K. N.: Antithrombin III depression and thrombin generation acceleration in women taking oral contraceptives. Am. J. Obstet. Gynec., 109; 868~873, 1971.
- 5) Gital, S.A. and Wessler, S.: Plasma antithrombin III; a quantitative assay of biological activity. Thromb. Res., 7; 5~16, 1975.
- 6) Ewa Marciniak, Farley Claude, H., De-Simone, Philip, A.: Familial thrombosis due to antithrombin III deficiency. Blood, 43; 219~231, 1974.
- 7) Geoffrey Mendelsohn, Edward D. Gomperts and Dennis Gurwitz: Sevier antithrombin III deficiency in an infant associated with multiple arterial and venous thrombosis. Thrombos. Haemostas. (stuttgart.), 36; 495~502, 1976.
- 8) Ole Resmus Ødegård, Ulrich Abildgaard: Antifactor Xa activity in thrombophilia, studies in a family with At-III deficiency. Scand. J. Haematol., 18; 86~90, 1977.
- 9) Stathakis, N.E., Papayannis, A.G., Antonopoulos, M. and Gardikas, C.: Familial thrombosis due to antithrombin III deficiency in a greek family. Acta haemat., 57; 47~54, 1977.
- 10) Angelina Carvalho and Leonard Ellman:

- Hereditary antithrombin III deficiency, effect of antithrombin III deficiency on platelet function. The American J. Med., 61; 179~183, 1976.
- 11) Fujimaki, M., Nagasawa, H., Konishi, S., Kato, M. and Fukutake, K.: Inhibitory effect of estrogen on antithrombin III. Acta Haem. Jap., 40; 227~231, 1977.
- 12) Abildgaard, U.: Purification of two progressive antithrombin of human plasma. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 19; 190~195, 1967.
- 13) Roger L. Lundblad, Lawrence C. Uhteg, Christine N. Vogol, Henry S. Kingdon and Kenneth G. Mann: Preparation and partial characterization of two forms of bovine thrombin. 66; 482~489, 1975.
- 14) Born, G.V.R. and Cross, M.J.: The aggregation of blood platelets. J. Physiol., 168; 178~185, 1963.
- 15) Eika, C. and Abildgaard, U.: Inhibition of thrombin induced aggregation of human platelet by antithrombin III. Scand. J. Haemat., 7; 460~464, 1970.

●自分で実際にやれる手術書！

植田小児外科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著
B5判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒240円)

知識として知っていることと、自分で実際巧くやれるということには随分開きがあるものである。僅かの小児外科の訓練をうけただけの一般外科医が、どんな症例なら自分でこなせるか、どんな症例なら専門医に転送しなければならないか、記述の重点を診療の実際面におき、高名なる著者が実地臨床に役立つことを念じて執筆した名著である。

●内容：〔総論〕1. 新生児、乳幼児手術の術前、術中、術後管理、2. 乳児手術の一般的注意、3. 胃瘻造設の適応と手術法、4. 結腸瘻造設の適応と手術法、5. 新生児、乳児手術の死亡要因、〔各論〕1. 新生児期手術概説、2. 先天性食道閉鎖症、3. 先天性食道狭窄症、4. 噴門痙攣症、食道無弛緩症、5. 横隔膜ヘルニア、6. 直腸肛門奇形、7. 後天性肛門疾患、8. ヒルシュスブルグ病、9. 臍帯ヘルニアまたは内臓脱出症、10. 新生児腸閉塞症概説、11. 十二指腸閉鎖および十二指腸狭窄、12. 輪状臍、13. 腸回転異常症または腸回転不全症、14. 小腸閉鎖、15. 胎便性イレウス、16. 胎便栓塞症候群、17. 腹膜炎および消化管穿孔、18. 先天性肥厚性幽門狭窄症、19. 腸重積症、20. 消化管重複症、21. メッケル憩室、22. 消化管のポリープ、23. 低血糖症、膵島細胞腫、24. 臍の胎生的遺残物、25. 臍ヘルニア、26. 鼠径ヘルニア、27. 陰嚢水腫、28. 停留率丸、29. 先天性胆道閉鎖症、30. 胆管囊腫、31. 漏斗胸、32. 皮膚面に開口する種々なる先天性瘻、33. 半陰陽、34. 小児の悪性腫瘍、35. 中枢神経系の奇形。