

# 博士學位論文

外気温変動に基づく環境ストレスにより誘発される  
血小板および凝固・線溶系の異常に関する基礎的研究

川 畑 篤 史

# 博士学位論文

外気温変動に基づく環境ストレスにより誘発される  
血小板および凝固・線溶系の異常に関する基礎的研究

平成 6 年 12 月

川 畑 篤 史

# 目次

緒論	1
第1章 SARTストレス動物における血小板の量的変動	3
I 緒言	3
II 実験材料ならびに実験方法	3
1. 実験動物およびストレスの負荷方法	3
2. 採血と血液学的検査	4
3. 骨髄巨核球数の測定	4
4. 出血時間の測定	5
5. 脾臓摘出	5
6. 化学的除神経	5
7. 統計学的処理法	5
III 実験結果	6
1. 種々のストレスを負荷したマウスの血液学的諸変化	6
2. マウスの血小板数ならびに骨髄巨核球数におよぼす種々の ストレスの影響	7
3. SARTストレス負荷期間中ならびに負荷中止後の血小板数 および骨髄巨核球数の経日変化	8
4. SARTストレスによる血小板数減少におよぼす脾臓摘出の影響	8
5. SARTストレスマウスにおける出血時間の延長	11
IV 考察	11
V 小括	13
第2章 SARTストレス動物における血小板の機能的変化	14
I 緒言	14
II 実験材料ならびに実験方法	14
1. 実験動物およびストレスの負荷方法	14
2. 採血と多血小板血漿の調製	14
3. Collagen 溶液の調製	15

4. In vitro 血小板凝集能の測定	15
5. In vivo 血小板凝集能の測定	15
6. 血小板凝集能と ATP 放出能の同時測定	16
7. 血小板中 adenine nucleotides 量の測定	16
8. 血小板の serotonin 放出能と含量の測定	17
9. 洗浄血小板の凝集能の測定	17
10. 血小板中の蛋白質および cholesterol 量の測定	18
11. 循環血中の凝集血小板の検出	18
Ⅲ 実験結果	18
1. ストレス負荷に伴うラット血小板数の変化	18
2. In vitro 血小板凝集能の変化	18
3. In vivo 血小板凝集能の変化	22
4. 血小板の adenine nucleotides 放出能と含量	22
5. 血小板の serotonin 放出能と含量	25
6. 洗浄血小板の凝集能	25
7. 血小板構成成分量	27
8. 循環血中凝集血小板の検出	27
Ⅳ 考察	28
Ⅴ 小括	31
第3章 SART ストレス動物における血液凝固・線溶系の異常	32
Ⅰ 緒言	32
Ⅱ 実験材料ならびに実験方法	32
1. 実験動物とストレスの負荷方法	32
2. 乏血小板血漿の調製	32
3. 血漿凝固時間の測定	32
4. 血漿 fibrinogen 量の測定	33
5. Euglobulin 溶解時間 (ELT) の測定	33
6. 血液凝固第Ⅷ因子 (FVIII:C), antithrombin Ⅲ (ATIII) および α <sub>2</sub> -plasmin inhibitor (α <sub>2</sub> -PI) 活性の測定	33
7. 血液濃縮・希釈の検討	34

8. 薬物投与法	34
III 実験結果	35
1. ストレスによる凝固・線溶系の変化	35
2. 血液濃縮・希釈の検討	37
3. ストレス負荷に伴う血漿 fibrinogen 量および ELT の経日変化	37
4. SART ストレス動物の止血系異常におよぼす薬物の作用	38
1) 血漿 fibrinogen 量の減少に対する tranexamic acid の効果	38
2) Alprazolam の作用	38
IV 考察	41
V 小括	43
第4章 SART ストレス動物の止血異常発現における活性酸素の関与	45
I 緒言	45
II 実験材料ならびに実験方法	46
1. 実験動物とストレス負荷方法	46
2. 採血	46
3. 血漿 fibrinogen 量ならびに FVIII:C 活性の測定	46
4. 薬物投与法	46
5. 血漿中過酸化脂質量の測定	47
6. 組織中過酸化脂質量の測定	47
III 実験結果	48
1. ラットおよびマウスにおいて SART ストレスにより誘発される 血小板数, 血漿 fibrinogen 量および FVIII:C 活性の変化の比較	48
2. Superoxide dismutase (SOD) の効果	48
3. Catalase の効果	50
4. Allopurinol の効果	51
5. 血漿ならびに組織中過酸化脂質量の変化	53
IV 考察	54
V 小括	56
総括	57
引用文献	61

略語一覽表	70
謝辭	

## 結 論

多くの疾病像は侵襲原因と生体反応の合作といえる。侵襲に対する自律神経の過剰興奮と臓器傷害の関係が Reilly によって明らかにされ、下垂体-副腎系を中心とした Selye のストレス学説が発表されて以来、侵襲原因に対し自律神経系-内分泌系は生体の homeostasis を維持するために機能する一方で、疾病現象の形成に関与すると考えられている<sup>1, 2)</sup>。いわゆるストレス病以外の疾病についても、その発現あるいは進行過程において何らかの形でストレス性因子の影響を受けている事が指摘されつつある。日本の死因別死亡率で上位を占めるのは、癌、脳血管疾患、心疾患などの成人病である。後2者はいずれも血栓性疾患であり、また、癌や肝障害などの基礎疾患を背景に何らかの trigger が作用して播種性血管内凝固症候群 (DIC) が発現することが知られている。これら止血系の異常が少なくとも一部関与すると考えられる疾患あるいは病態についてもストレスとの係わりが指摘されている。

いわゆるストレスには様々なものがあり、これら全てが必ずしも同一の生体反応を惹起するとは限らず、ストレスの種類によって異なった反応が生じることもある。近年、社会の複雑化に伴い、心理・社会的ストレスが問題視されている一方で、環境ストレスが生体に与える影響も依然重要な問題であり、未解明な点も多い。気温変動は最も一般的な環境ストレスの1つであるが、長期に亘る気温変動の生体に及ぼす影響を系統的に調べた研究は少ない。Bull and Morton<sup>3)</sup> の英国での疫学的研究によると、脳血管障害や冠動脈障害などの血栓性疾患による死亡率は気温変動が激しくなるにつれて増加する。このことから長期の気温変動と止血機構との間に何らかの関係が存在する可能性が考えられるが、実験動物を用いた基礎的な研究による検討はほとんど行われていない。

喜多ら<sup>4)</sup>は、実験動物の環境温度を数日間一定のスケジュールに従って室温と低温に繰り返し変化させることによって様々な生理機能異常が観察されることを報告し、この環境ストレスを SART (specific alternation of rhythm in temperature) ストレスと名付けて系統的な研究を行った。この SART ストレス動物では、現在までに神経系<sup>5-7)</sup>、消化器系<sup>8)</sup>、循環器系<sup>9-12)</sup>、血液系<sup>13)</sup>などに様々な特徴的異常が認められている。

本研究では、既に多くの生理的および生化学的情報が得られている SART ストレス動物を用いて、長期に亘る気温変動に基づく環境ストレスと止血系との関係についての基礎的検討を行い、以下にその成果を詳述した。



# 第1章 SART ストレス動物における血小板の量的変動

## I 緒言

ストレスによって様々な生体反応が惹起されるが、その1つに血液学的変化が知られている<sup>1,5)</sup>。白血球系では好酸球数の減少は最も典型的なストレス反応であり、リンパ球数の減少や好中球数の増加などもストレス時によく認められる。また、臨床において認められる相対的多血症には、ストレス多血症とよばれるものもある。このように、血液学的所見は生体のストレス状態を示唆する1つの指標ともなりうる。

SART ストレス動物では、持続的低血圧<sup>9)</sup>、局所血流量の変化<sup>9, 12)</sup>、心電図異常<sup>10, 11)</sup>、脳波異常<sup>16)</sup>、行動異常<sup>17)</sup> および痛覚過敏<sup>18)</sup>などの生理機能変化のほか、脳内諸部位における acetylcholine<sup>5)</sup>、noradrenaline、dopamine<sup>6)</sup> および serotonin<sup>7)</sup> 含量の変化などの神経伝達物質の異常も認められている。SART ストレスによって惹起されるこれらの諸変化の多くは、一般的な急性ストレスによる変化とは異なっている。SART ストレス動物では、副腎肥大、胸腺萎縮<sup>13, 14)</sup>などのほか、血液系に関しても、赤血球ならびに好中球数の増加、リンパ球ならびに好酸球数の減少などの一般的なストレス変化が報告されている<sup>13)</sup>。本章では SART ストレス動物の血液学的特徴を探る目的で、手始めに種々のタイプのストレスを負荷した動物との比較の観点から血液検査を行った。その結果、血小板数の減少が SART ストレス動物で特徴的に認められたので、この現象についてさらに詳細な検討を行った。

## II 実験材料ならびに実験方法

### 1. 実験動物およびストレスの負荷方法

実験動物として体重 20-25 g の ddY 系雄性マウス（日本 SLC.）を使用した。

SART ストレス：Hata ら<sup>19)</sup>の方法に従い、24℃と4℃に気温を維持した飼育室のそれぞれにケージを用意し、午前9時から午後4時までは1時間毎にこの2つのケージ間にマウスを交互に移し替え、午後4時から翌朝午前9時までの間は低温側のケ

ージでマウスを飼育した。この操作を数日間繰り返した後、ストレス負荷の最終日の午前11時にストレスを解除し、このマウスを30-60分間室温に放置した後、実験に供した。特に述べない場合は、ストレス負荷期間を7日間とした。

低温ストレス：マウスを4℃の環境下で1時間、2日間あるいは5日間継続して飼育した。

拘束水浸ストレス (RWIS)：マウスを金網製シリンダー内に拘束し、15℃の水中に立位に胸骨剣状突起の位置まで1時間浸漬させた。

電気ショックストレス：マウスを電気刺激用ケージに入れ、床グリッドより3 mA、1秒間の電気刺激を5秒毎に30分間与えることによりストレスを負荷した。この操作を1回のみ行った場合を急性負荷、1日1回宛5日間行う場合を慢性負荷とした。

拘束ストレス：マウスを金網製シリンダー内に拘束し、午後6時から翌朝午前9時までの15時間を室温で放置した。慢性ストレス実験では、この操作を5日間繰り返したマウスを用いた。対照群には、同様のスケジュールで絶食絶水のみを行った。

## 2. 採血と血液学的検査

エーテル軽麻酔下でマウスの心臓より血液を採取した。赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリットの測定はCoulter counter (model SP, Coulter Electronics)により行った。また全血比重は硫酸銅法<sup>15)</sup>により調べた。マウスの血小板はヒトに比べて数が非常に多く、また小さいため、Coulter counterを用いず目視法により血小板数を測定した。この場合、マウスの尾をその先端より1 cmの位置で切断し、浸出する血液をマイクロピペットで採取し、Brecher and Cronkite<sup>20)</sup>法に従って位相差顕微鏡下で血小板数を算定した。なお、日内変動を考慮して、採血はいずれの場合も午前11時から12時の間に行った。

## 3. 骨髄巨核球数の測定

マウスの左右両大腿骨を摘出し、野村<sup>21)</sup>の方法に準じて骨髄巨核球数を測定した。すなわち、大腿骨の両端を切断し、骨髄を1 mlの5% EDTA-2Na溶液中に洗い出した。この細胞浮遊液を均一化した後、0.025%ゲンチアナ紫で染色し、Fuchs-Rosenthal 計算板を用いて光学顕微鏡下で巨核球数を測定した。この計数操作

を3回繰り返して平均し、大腿骨1本あたりの総巨核球数を算出した。さらに、左右大腿骨の総巨核球数の平均値を求め、これを各マウスの骨髄巨核球数とした。

#### 4. 出血時間の測定

O'Neil<sup>22)</sup>の方法に従って、無麻酔下でマウスの出血時間を測定した。すなわち、マウスを不透明のプラスチック製シリンダー内に固定し、37℃に保温した0.9%生理食塩水中に尾部のみを浸した。5分の安静期間後、鋭利なカミソリで尾をその先端より1 cmの所で切断し、完全に止血するまでの時間を測定した。なお、30秒以内の再出血のない場合を完全止血とした。

#### 5. 脾臓摘出

ペントバルビタール麻酔下でマウスの腹側部より脾臓を露出し、主血管を縫合糸で縛ったのち脾臓を摘出した。偽手術は脾臓を露出するまでとした。予備実験において、血小板数の増加は摘脾後7-9日で最大かつ安定して認められた。そこで、非ストレスマウスの血小板数測定は手術の8日後とし、SARTストレス群では手術の2日後より6日間のストレス負荷を行った。

#### 6. 化学的除神経

マウスに6-hydroxydopamine (Sigma) 50 mg/kgを腹腔内投与し、その3時間後<sup>12)</sup>に出血時間を測定した。

#### 7. 統計学的処理法

得られた結果は平均値と標準誤差で示し、群間の統計学的有意差の有無の判定はStudentの対応のないt検定あるいはNewman-Keuls検定により行った。いずれの場合も $P < 0.05$ の時、有意とした。

### III 実験結果

#### 1. 種々のストレスを負荷したマウスの血液学的諸変化

SART ストレスマウスの血液学的所見を一般的によく用いられる短期のストレスを負荷したマウスのそれと比較して Fig.1 に示した。赤血球数とヘマトクリットは2日間の低温ストレスを除くいずれのストレス負荷によっても有意に増加していた。ヘモグロビン量および全血比重は低温ストレスや拘束ストレスでは有意な変化を示さなかったが、SART ストレス、RWIS および絶食絶水によって有意に増加していた。白血球数は SART および低温ストレスを除く他のストレス負荷群で著しく減少していた。血小板数については低温および拘束ストレスにより増加が見られたのに対し、SART ストレスおよび RWIS によっては逆に減少が認められた。

このように、SART ストレスマウスでは白血球総数の無変化と血小板数の減少が特徴的であった。

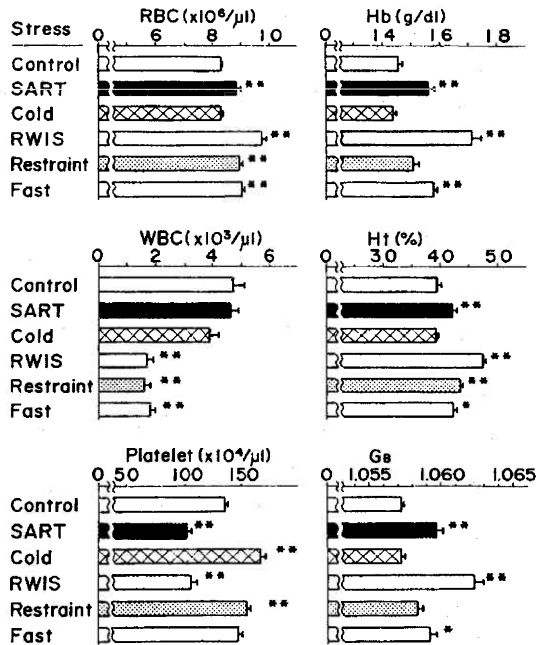


Fig. 1. Hematological profiles in stressed mice. n=7-13. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

## 2. マウスの血小板数ならびに骨髄巨核球数におよぼす種々のストレスの影響

種々のストレスによる血小板数の変化についてさらに詳細に検討した結果を Fig.2 に示した。急性ストレスでは、RWIS による血小板数の減少、電気ショックおよび拘束による増加が見られたが、1時間の低温ストレスおよび絶食絶水では有意な変化は認められなかった。一方、慢性的負荷では SART ストレスによる減少と2日間の低温ストレスによる増加が認められたが、他のストレスでは有意な血小板数の変化は見られなかった。

次いで、血小板産生系に変化が生じているか否かを検討する目的で、種々の慢性ストレスを負荷したマウスの骨髄巨核球数を調べた。Table 1 に示したように、SART ストレスマウスでは巨核球数が40%以上も増加していたが、他のストレスマウスでは有意な変化は認められなかった。

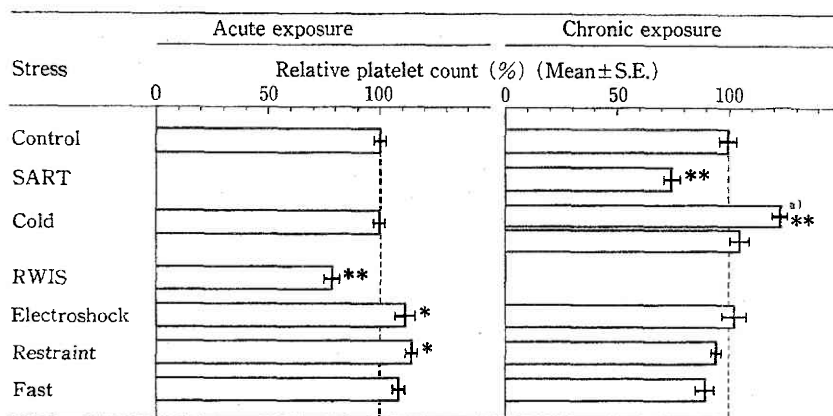


Fig. 2. Platelet counts in mice exposed to various types of stress. Acute stress was produced by exposure within 1 day, and chronic stress was produced by repeated or continuous exposure for 5-7 days, except for a), being exposure for 2 days. Control value:  $135.9 \pm 3.3$  and  $141.8 \pm 5.0 \times 10^4/\mu\text{l}$  in acute and chronic experiments, respectively.  $n = 6-10$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Table 1. Megakaryocyte counts in mice exposed to various types of chronic stress

Stress	Megakaryocyte count ( $\times 10^3/\text{femur}$ )	Change (%)
Control	6.92 $\pm$ 0.33	
SART	9.95 $\pm$ 0.32**	43.8
Cold 2-day exposure	6.61 $\pm$ 0.49	-4.5
5-day exposure	7.24 $\pm$ 0.79	4.6
Electroshock	7.58 $\pm$ 0.69	9.5
Restraint	6.27 $\pm$ 0.60	-9.4
Fast	6.54 $\pm$ 0.59	-5.5

Mice were exposed to stress for 5-7 days, unless otherwise noted. n = 16 (control group) or 6-9 (stressed group). \*\*P<0.01.

### 3. SART ストレス負荷期間中ならびに負荷中止後の血小板数および骨髄巨核球数の経日変化

Fig.3 に SART ストレス負荷に伴う血小板数と巨核球数の経日変化を示した。マウスの血小板数はストレス負荷開始3日後まではほとんど変化しなかったが、5日後より有意に減少し、7日後に最小値を示した。その後、この血小板数の減少は少なくとも14日後までは持続していた。一方、巨核球数は5日後より有意に増加し始め、7日後にプラトーに達した後、この値が少なくとも14日後までは維持されていた。すなわち、ストレス負荷期間中血小板数と巨核球数の変化の発現は並行していた。

Fig.4 はストレス負荷中止後の血小板数の回復過程を示している。マウスの血小板数は RWIS および SART ストレスいずれの負荷によっても 25-30% 減少していたが、ストレス負荷中止後、RWIS 負荷マウスの血小板数は3時間で正常レベルにまで回復していたのに対し、SART ストレスマウスでは5日経過後もなお有意な減少状態が持続していた。

### 4. SART ストレスによる血小板数減少におよぼす脾臓摘出の影響

Fig.5 に示されるように、摘脾後非ストレスマウスの血小板数に著明な増加が認められた (P<0.01 vs. control) が、偽手術では有意な変化はみられなかった。摘脾後の

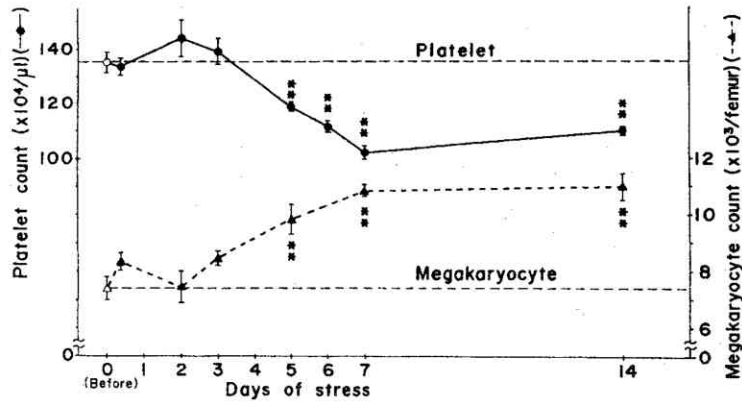


Fig. 3. Time courses of SART stress-induced changes in platelet and megakaryocyte counts in mice.  $n = 7-10$ .  $**P < 0.01$  vs. the initial level.

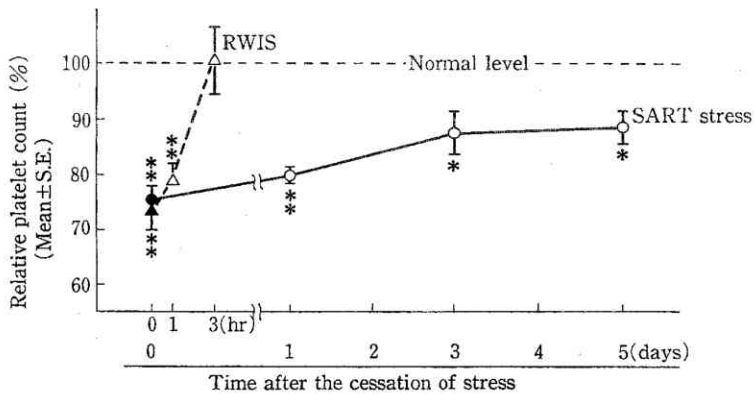


Fig. 4. Recovery from decreased platelet counts in mice after the cessation of SART stress and RWIS. Closed symbols, stressed values; open symbols, values after cessation of stress. Normal value:  $141.8 \pm 5.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ .  $n = 4-10$ .  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs. the normal value.

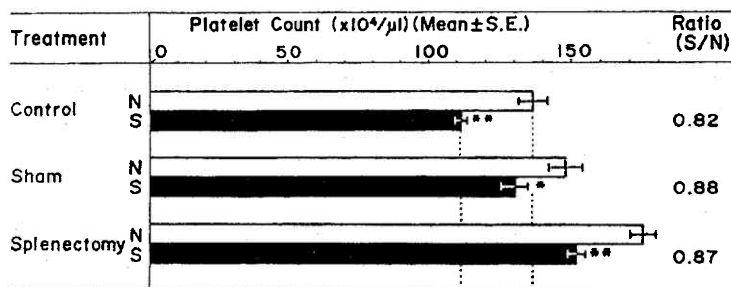


Fig. 5. Influence of splenectomy on decreased platelet count in SART-stressed mice. N, non-stress; S, SART stress.  $n = 7-10$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. the respective non-stressed groups.

Table 2. Influences of SART stress, RWIS and 6-hydroxydopamine treatment on bleeding time in mice

Treatment	Bleeding time (s)	Change (%)
Control	55.2 $\pm$ 4.1	
SART	130.5 $\pm$ 9.1 **	136.4
RWIS	66.1 $\pm$ 7.0	36.6
6-OH-DA	72.4 $\pm$ 13.8 *	52.9

6-OH-DA: Mice received an i.p. injection with 50 mg/kg of 6-hydroxydopamine 3 h before the measurement.  $n = 19$  (control group) and 7-8 (treated group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



ストレス、非ストレス両群間の血小板数の比（0.87）は偽手術後のそれ（0.88）とほぼ同じであった。すなわち、SART ストレスマウスにおける血小板数の減少は摘脾によっては阻止されなかった。

#### 5. SART ストレスマウスにおける出血時間の延長

マウスの出血時間におよぼすSART ストレスの影響を調べ、Table 2 に示した。SART ストレスマウスの出血時間は非ストレスマウスのそれに比べ、2倍以上に著しく延長していた。SART ストレスと同程度の血小板数減少を惹起するRWISを負荷したマウスでは出血時間の延長傾向が認められたが、有意ではなかった。また、SART ストレスと同程度の体表面血流量の増加をもたらすことが報告<sup>12)</sup>されている。6-hydroxydopamine 50 mg/kgの投与により52.9%の有意な出血時間延長が認められた。

### IV 考 察

血液検査の結果、SART ストレスマウスでは赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリットおよび全血比重の増加が認められたが、これらの変化は他の短期間のストレス負荷マウスにおいても見られたことより、多くのストレスに共通の変化であると考えられる。一般にストレスの際には血液濃縮がおこることが多い<sup>15)</sup>とされているが、上記の事実はSART ストレスマウスにおいてもそのような現象が生じている可能性を示唆するものである。一方、血小板数はSART ストレスおよびRWIS負荷マウスで減少していたのに対し、電気ショック、拘束、絶食絶水などの急性ストレスや2日間の低温ストレス負荷では増加していたことなどから、血小板数の変化はストレスの種類によって異なるものと推察される。

ヒトでは運動や情動ストレスなどの急性負荷により一時的に血小板数が増加するとの報告<sup>23-27)</sup>が多い。これはストレスによる血中 epinephrine 濃度の増大を介して脾臓にプールされている血小板が遊離されたためであると説明されている<sup>24)</sup>。また、ヒト<sup>28)</sup>やラット<sup>29)</sup>では epinephrine の静注により血小板数が増加することも報告されている。これらのことより、今回認められた急性ストレスによる血小板数の増加に

についても epinephrine を介した脾臓プールからの血小板の遊離が関与している可能性が考えられる。一方、SART ストレスマウスにおける血小板数減少は摘脾によって阻止されなかったこと、またこの動物では血中 epinephrine 濃度の増大が報告されている<sup>30)</sup> ことなどから、epinephrine - 脾臓系以外の機序が関与しているものと思われる。

血小板数の減少を惹起するストレスとしては長期の低酸素負荷<sup>31)</sup> や磁場<sup>32)</sup>、急性の低体温<sup>33)</sup> などの特殊なものが報告されているのみである。この低体温による血小板数減少は門脈での凝集血小板の蓄積を伴う消費性のものであるとされている。本研究での RWIS の水温は 15℃ に設定したため体温がかなり低下（負荷中止直後で 18-20℃）していたことより、このストレスによる血小板数の減少には低体温が関与しているのではないかと考えられる。一方、SART ストレスマウスでは少なくとも採血時に体温の下降は認められなかったことより、低体温の直接的な影響は考え難い。

循環血中の血小板数は骨髄における血小板の産生、脾臓などにおける蓄積あるいは破壊、血管内での粘着・凝集による消費などによって調節されている。摘脾実験の結果より、SART ストレスによる血小板数減少に脾臓機能の変化が関与している可能性は少ないと考えられる。一方、血小板産生細胞である骨髄巨核球数は SART ストレスにより著しく増加した。通常、巨核球数の増加は血小板産生能の亢進を示唆するとされていることより、血小板産生系の変化が SART ストレスマウスの血小板数減少の原因とは考え難く、むしろ代償的な現象といえるのかもしれない。しかし、ストレス負荷過程の血小板と巨核球数の変化がほぼ同時進行していたことより、巨核球からの血小板の遊離能の低下などが生じている可能性も否定できない。いずれにせよこのストレスによる血小板数減少にはより複雑な機序が関与していると考えられ、血管内血小板消費なども含めた総合的な検討が必要であろう。

SART ストレス負荷に伴う血小板数減少の経日変化は SART ストレス動物における他の生理的異常のそれ<sup>9, 10)</sup> に概ね類似しているが、変化の発現には若干時間を要するようである。また、SART ストレスによる血小板数減少は RWIS によるそれに比べて、ストレス負荷中止後の回復にもかなりの時間を要し、持続的であった。

SART ストレスによる血小板数の減少は 30% 程度であったのに対し、出血時間は 2 倍以上にも著しく延長していた。同程度の血小板数減少がみられた RWIS 負荷マウスでの延長が 36.5% であったことより、SART ストレスマウスでは血小板数以外の

因子が関係している可能性が考えられる。SART ストレスマウスでは体表面血流量に著明な増加が認められている<sup>1,2)</sup>が、同程度の血流量増加を惹起する 6-hydroxy-dopamine 50 mg/kg の投与<sup>1,2)</sup>によっても 52.9% の出血時間延長がみられたことより、ストレスによる血流量増加が増強因子として関与している可能性も考慮する必要があると思われる。また、血小板機能や凝固・線溶活性など他の止血機能についても検討を要すると思われるが、これらについては次章以降で述べる。

## V 小 括

- 1) 種々のストレスを負荷したマウスの血液学的所見を比較したところ、SART ストレスマウスでは血小板数減少が特徴的であった。
- 2) 骨髄巨核球数は SART ストレスによって著しく増加していたが、他の慢性ストレスでは変化しなかった。
- 3) SART ストレス負荷に伴う血小板数減少ならびに巨核球数増加はいずれもストレス負荷開始 5 日後以降より認められ、14 日間継続負荷しても持続していた。また、ストレス負荷中止後 5 日経過しても減少した血小板数は回復しなかった。
- 4) SART ストレスによる血小板数減少は摘脾によって阻止されなかった。
- 5) 出血時間は SART ストレスにより 2 倍以上に延長した。

以上の結果より、SART ストレスマウスでは血小板数減少を伴う出血傾向を有していることが、1 つの特徴と考えられる。また、この血小板数減少の発現に骨髄巨核球の産生能および脾臓機能の変化が関与している可能性は少なく、血管内血小板消費の増加など他の要因の関与が大きいと考えられる。さらに、出血時間の著明な延長は血小板数減少のみによっては説明し難く、血小板機能や凝固・線溶活性など止血機構全体についての検討を要することが示唆された。

## 第2章 SART ストレス動物における血小板の機能的変化

### I 緒言

ストレスによる血小板の機能的変化については特にヒトでの研究が多いが、報告されている結果は必ずしも一定の方向性を有していない<sup>34)</sup>。急性の精神的ストレスや運動負荷により、血小板凝集能の亢進、低下のいずれもが報告されている<sup>25-27, 34-37)</sup>。一方、実験動物を用いてストレスと血小板機能の関係を詳細に調べた研究は少ない。Yoshihara et al.<sup>33)</sup> は麻酔下のイヌの体温を強制的に低下させると、血小板数の減少を伴う凝集能の一時的な低下がみられることを報告しているが、より生理的な条件下でのストレス、特に慢性型ストレスについての情報はほとんど得られていない。

前章において、気温変動に基づく慢性型環境ストレスの1種である SART ストレスを負荷したマウスでは、血小板数減少を伴う出血時間の著しい延長が認められることを示した。しかし、この出血傾向は血小板数変化のみでは説明し難く、血小板の機能変化その他の要因が関与する可能性を示唆した。そこで本章では、血小板の機能面におよぼす SART ストレスの影響をラットを用いて調べ、特徴的な所見が得られたので以下にその詳細を記した。

### II 実験材料ならびに実験方法

#### 1. 実験動物およびストレスの負荷方法

実験動物として体重 200-250 g の Wistar 系雄性ラット（日本 SLC.）を使用した。SART ストレスの負荷は、第1章で述べたマウスの負荷条件のうち、低温側の温度設定を -3 °C にして行った<sup>19)</sup>。なお、採血および in vivo 実験はすべて午前 11 時 30 分から 12 時の間に開始した。

#### 2. 採血と多血小板血漿の調製

ペントバルビタール (40 mg/kg) 麻酔下でラットを開腹し、腹大動脈より 5 ml（最

終容量)の血液を1/10容量の3.13%クエン酸Naを含むプラスチック製シリンジ中に採取した。得られた血液中の血小板数は Brecher and Cronkite<sup>20)</sup>法で算定した後、直ちに160gで10分間遠心して多血小板血漿 (PRP)を採取し、さらに残りの血液あるいはPRPの一部を1,700gで10分間遠心することにより乏血小板血漿 (PPP)を得た。PRP中の血小板数が $4 \times 10^8$  cells/mlとなるように各ラットのPRPを同一個体のPPPで希釈し、30分間静置して安定させた後、実験に供した。なお、上記の操作はすべて室温で行った。

### 3. Collagen 溶液の調製

In vitro 実験用 collagen 溶液は井下ら<sup>38)</sup>の方法を改良して調製した。すなわち、ウシアキレス腱由来のI型 collagen (ナカライテスク) 100 mg を15 ml の0.03 N HCl 中に懸濁し、氷冷しながら40分間ホモジナイズした後、4°C、1,300 g で5分間遠心して上澄を採取し4°Cで保存した。使用時、この保存溶液を0.003 N HCl を含む0.9% NaCl 溶液で適当な濃度に希釈した。この collagen 保存溶液は作製後1カ月以上経過してもなお安定した活性を示した。

In vivo 実験用 collagen 溶液は松村ら<sup>39)</sup>の方法に従って調製した。即ち、仔ウシ皮膚由来のI型 collagen (Sigma) 102 mg を40 ml の0.9% NaCl 溶液に添加し、4°Cで15時間攪拌しながら溶解した後、1,000 g、4°Cで遠心して上澄を採取し、実験に使用した。

上記両 collagen 溶液中のタンパク量はいずれも Lowry ら<sup>40)</sup>の方法により測定した。

### 4. In vitro 血小板凝集能の測定

In vitro 凝集能は Born<sup>41)</sup>の比濁法に準じて、血小板凝集計 (CAF-100, 日本分光) を用いて測定した。PRP 475  $\mu$ l をグラスキューベットに入れ、37°C、1,000 rpm で攪拌しながら2分間インキュベートした後、ADP (Sigma) または collagen 溶液 25  $\mu$ l を添加し、光透過度の相対的変化を記録した。

### 5. In vivo 血小板凝集能の測定

Innocenti ら<sup>42)</sup>の方法を若干修正して行った。ペントバルビタール (40 mg/kg) 麻酔下で気管切開したラットの左頸動脈に250 U/ml のヘパリン (清水製薬) を満たした

ポリエチレンチューブ（外径 1 mm）を挿入し，このカニューレより血液をマイクロピペットで 10  $\mu$ l ずつ採取し，血小板数を算定した．安静状態で最初の採血を行った後，右大腿静脈より ADP または collagen を直接注入した．この場合，ADP は 2 秒以内で全量を急速注入し，また collagen は 0.5 mg/kg/min の一定速度で注入した．各刺激剤注入終了後採血を 3 回繰り返すを行い，循環血中の血小板数の経時変化を調べた．刺激剤注入後の血小板数は注入前の値に対するパーセントで表示し，循環血中血小板数の相対的減少の大きさを in vivo 血小板凝集能の指標とした．

## 6. 血小板凝集能と ATP 放出能の同時測定

Feinman ら<sup>43)</sup>の方法に準じて行った．PRP 425  $\mu$ l に 40 mg/ml のルシフェリン-ルシフェラーゼ (Sigma) 溶液 50  $\mu$ l を添加し，1,000 rpm で混合しながら 37°C で 2 分間インキュベートした後，collagen 溶液 25  $\mu$ l を添加し，光透過度および発光強度の変化をルミアグリゴメーター (CAF-100, 日本分光) を用いて同時測定した．反応終了後，ATP 標準液を添加して基準発光量を測定した．

## 7. 血小板中 adenine nucleotides 量の測定

Holmsen ら<sup>44)</sup>の方法に従って行った．すなわち，PRP 0.5 ml に同容量の EDTA-ethanol 混液 (0.1 M EDTA : 99.5% ethanol = 1 : 9, pH 7.4) を添加し，血小板中の adenine nucleotides を抽出し，4°C，12,000 g で 15 分間遠心後，上澄の一部 (20  $\mu$ l) を，0.04 mM ホスホエノールピルビン酸 (和光純薬)，5.2 mM KCl, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>，2 U/ml ピルビン酸キナーゼ (オリエンタル酵母) および 8 mM トリス-マレイ酸緩衝液 (pH 7.6) からなる ホスホエノールピルビン酸-ピルビン酸キナーゼ (PEP-PK) 溶液 3 ml と混合し，37°C で 30 分間インキュベートすることにより ADP を ATP に変換した．反応混液を 80°C で 6 分間加熱して反応を終了させ，10 mg/ml の firefly lantern extract (Sigma) 溶液と希釈試料溶液との反応による発光量を測定し，総 adenine nucleotides (ATP+ADP) 量を調べた．別途，酵素を熱失活させた (80°C，20 分間) PEP-PK 溶液と試料溶液を同様にインキュベート後，発光量を測定することにより ATP 量を調べ，先の総 adenine nucleotides 量との差より ADP 量を算出した．

## 8. 血小板の serotonin 放出能と含量の測定

Drummond and Gordon<sup>45)</sup> の方法に準じて、PRP 475  $\mu$ l に collagen 溶液 25  $\mu$ l (最終濃度 = 10  $\mu$ g/ml) を添加し、1,000 rpm で混合しながら 37°C で 5 分間インキュベートした後、10 mM EDTA 溶液 50  $\mu$ l の添加により反応を終了させ、直ちに 4°C、12,000 g で 2 分間遠心した。上澄および沈渣にそれぞれ 100% トリクロロ酢酸を添加して除蛋白後、0.5%  $\alpha$ -フタルアルデヒドと 10 N HCl との混液 (1:10) 2 ml を添加し、100°C で 10 分間加熱した。冷却後、両試料にそれぞれクロロホルム 2 ml を加えて非特異的蛍光物質を除去し、水相について蛍光強度を測定 (EX 360 nm, EM 475 nm) することにより、collagen との反応によって放出された serotonin 量 (A) と血小板中に残存していた serotonin 量 (B) を算出した。Serotonin の放出率 (C) は次式より算出した。

$$C (\%) = A/(A+B) \times 100$$

一方、血小板の serotonin 含量については、別途 PRP に 10 mM EDTA を添加して 2 分間遠心 (4°C、12,000 g) 後、沈渣中の serotonin 量を上記と同様の方法で測定することにより調べた。

## 9. 洗浄血小板の凝集能の測定

洗浄血小板は異なった 2 方法 (下記 A および B) により作製した。

洗浄法 A: Tomita ら<sup>46)</sup> により改良された Baenziger and Majerus<sup>47)</sup> の方法に従い、5 ml の洗浄液 (0.113 M NaCl, 4.3 mM  $K_2HPO_4$ , 4.3 mM  $Na_2HPO_4$ , 24.4 mM  $NaH_2PO_4$ , 5.5 mM glucose および 1 mM EDTA, pH 6.5) で血小板 (ラット 1 匹分) を洗浄し、得られた pellet を血小板数が  $4 \times 10^8$  cells/ml となるよう再浮遊液 (0.14 M NaCl および 5 mM glucose を含む 15 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) 中に懸濁した。この血小板浮遊液に 1.5 mM  $CaCl_2$  を添加し、collagen 凝集能を測定した。なお、この方法で洗浄された血小板は ADP 刺激によって凝集しない。

洗浄法 B: 田上<sup>48)</sup> により改良された Mustard ら<sup>49)</sup> の方法に準じて、ADP により凝集しうる洗浄血小板を作製した。すなわち、3 U/ml の apyrase を含む HEPES-Tyrode 液 (pH 6.7) で血小板を 3 回洗浄した後、apyrase を含まない HEPES-Tyrode 液 (pH 7.4) 中に再懸濁した。この洗浄血小板浮遊液に 1.5 mM  $CaCl_2$  および 0.4 mg/ml の fibrinogen を添加した後、collagen および ADP 刺激による凝集能を測定した。

## 10. 血小板中の蛋白質および cholesterol 量の測定

上記洗浄法 A により作製した洗浄血小板を freeze-thawing し、蛋白量を Lowry ら<sup>40)</sup> の方法により、また total cholesterol 量を酵素法 (COD-DAOS 法)<sup>50)</sup> により測定した。

## 11. 循環血中の凝集血小板の検出

Martins ら<sup>51)</sup> により改良された Wu and Hoak<sup>52)</sup> の方法に従い、高濃度 EDTA により血中凝集血小板を解離させた場合と、formalin によりその解離を阻止した場合の血小板数の差より循環血中凝集血小板の存在の程度を調べた。すなわち、無麻酔下でラットの尾動脈より血液を採取し、その一部を 12 mM EDTA を含む phosphate-buffered saline (EDTA-PBS, pH 7.4), 9 容量で希釈し、残りの一部を 0.2% formalin を含む EDTA-PBS, 9 容量で希釈した。両サンプルを室温で 15 分間放置した後、saline でさらに 120 倍に希釈し、位相差顕微鏡下で遊離血小板数を算定した。循環血中凝集血小板の存在は、用いた希釈液中の formalin の有無による遊離血小板数の違い、あるいはその比から推定した。

その他、記載のないものについては第 1 章と同じ方法で行った。

# III 実験結果

## 1. ストレス負荷に伴うラットの血小板数の変化

Fig.6 にストレス負荷に伴うラットの血小板数の経日変化を示した。ラットの血小板数は、ストレス負荷開始 5 日後より有意に減少し、7 日後に最低値に達した後、このレベルが少なくとも 1 週間持続した。このような経日変化は、第 1 章で示したマウスでの結果とほぼ一致しており、種差は認められなかった。

## 2. In vitro 血小板凝集能の変化

ストレス負荷および非負荷ラットより得られた血小板の in vitro での typical な



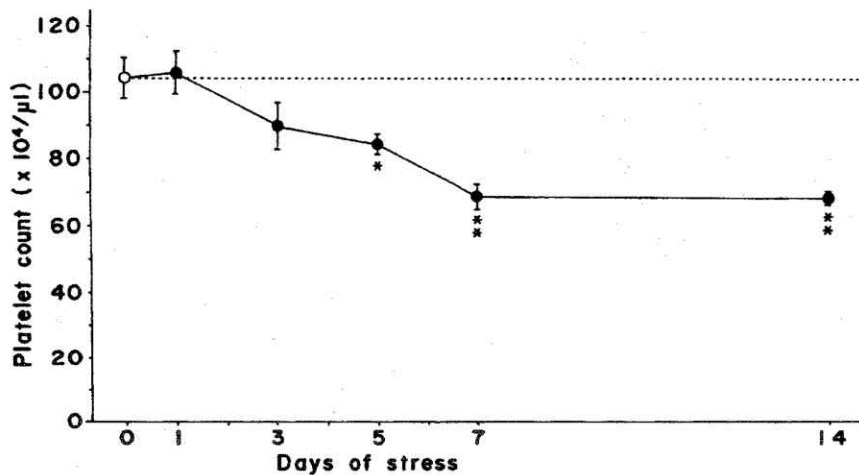


Fig. 6. Time-related changes in platelet count in rats during SART stress. n = 9-11.  
\*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. the initial level.

ADP 凝集曲線を Fig.7 に示した. PRP に 3-10  $\mu$  M の ADP を添加することにより, 非ストレスラットでは濃度依存的に可逆的な血小板凝集が認められた. ストレスラットの血小板凝集はいずれの ADP 濃度でも非ストレスラットのそれに比べて明らかに小さかった. Fig.8 は多数例からの結果をまとめたものであるが, ADP 3-10  $\mu$  M の濃度範囲では血小板の最大凝集率はいずれもストレス群の方が非ストレス群に比べて有意に小さく, ストレス負荷による ADP 凝集能の低下が示唆された.

Collagen 刺激による typical な凝集曲線を Fig.9 に示した. 非ストレスラットにおいて, collagen は 3-30  $\mu$  g/ml の濃度範囲で血小板の shape change とそれに続く不可逆的な凝集を惹起した. ストレスラットの血小板は, 3  $\mu$  g/ml の collagen により shape change のみを示し, 凝集しなかった. 5  $\mu$  g/ml 以上では血小板凝集が認められたが, 非ストレスラットの場合に比べて程度は弱かった. Fig.10 は collagen 刺激による血小板凝集能を, 最大凝集率, 凝集発現までの lag time および shape change の大きさを指標として, ストレス, 非ストレス両群間で比較したものである. Collagen 3-30  $\mu$  g/ml の添加により, 最大凝集率は濃度依存的に増大したが, 3-10  $\mu$  g/ml の濃度範囲でストレス群の最大凝集率は非ストレス群に比べて明らかに小さかった.

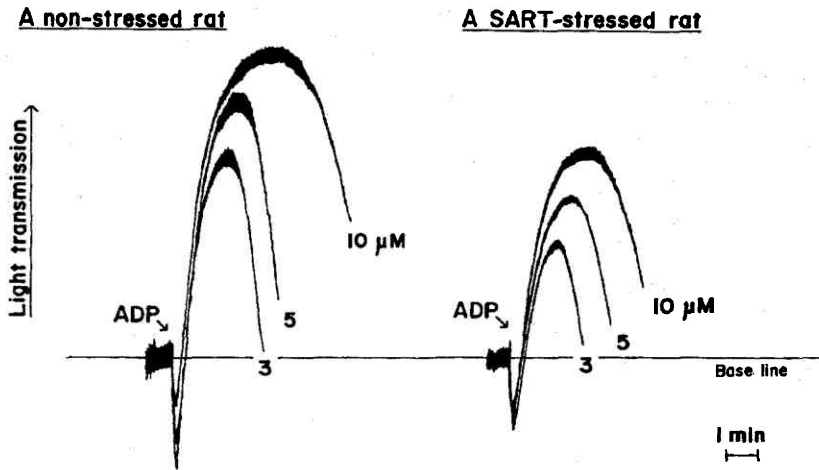


Fig. 7. Typical curves for ADP-induced platelet aggregation in non-stressed and SART-stressed rats.

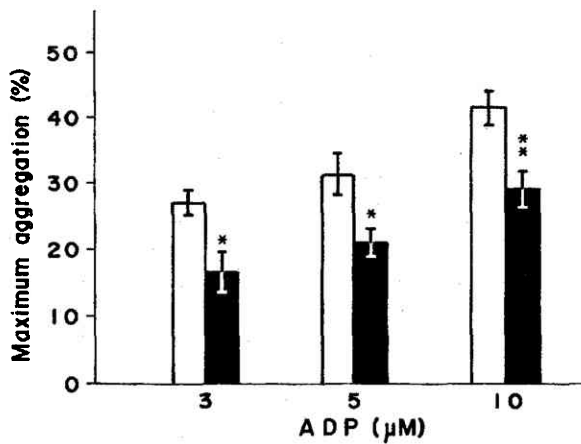


Fig. 8. In vitro platelet aggregation induced by ADP in non-stressed and SART-stressed rats. Open column, non-stress; closed column, SART stress.  $n = 8$  or  $9$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

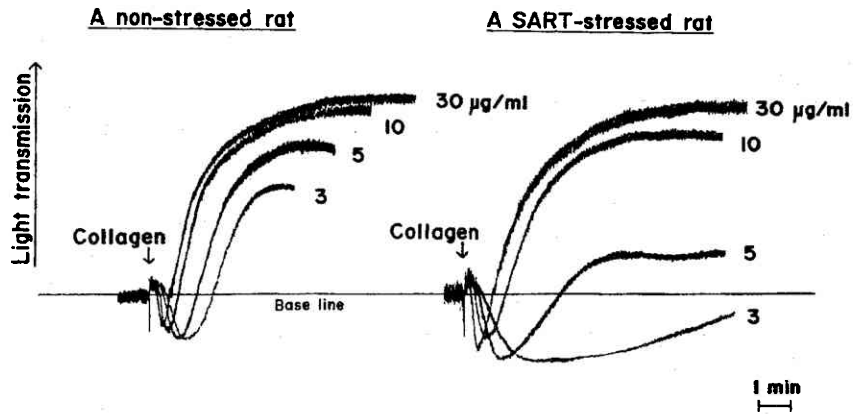


Fig. 9. Typical curves for collagen-induced platelet aggregation in non-stressed and SART-stressed rats.

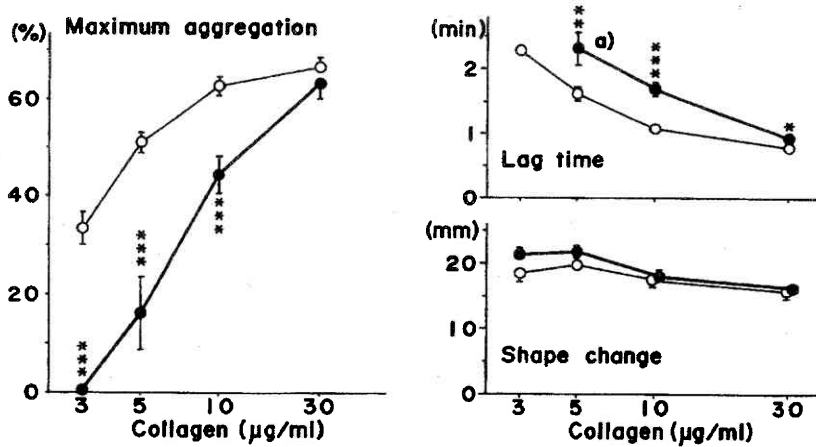


Fig. 10. In vitro platelet aggregation induced by collagen in non-stressed and SART-stressed rats. Open circle, non-stress; closed circle, SART stress. n = 9-12.

a) the mean with S.E. from rats showing aggregation (4 rats out of 10).

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Lag time は collagen 濃度  $5-30 \mu\text{g/ml}$  の範囲で、いずれもストレス群において有意に延長していた。一方、shape change については、今回用いた collagen の濃度範囲では両群間に有意な差は認められなかった。

### 3. In vivo 血小板凝集能の変化

Fig.11 は in vivo での ADP 凝集能を調べた結果である。ADP  $0.2 \text{ mg/kg}$  の急速静注により、非ストレスラットの血小板数は 20 秒後には静注前の約 30% に減少したが、60 秒後にはほぼ完全に回復していた。ストレスラットにおいても同様の傾向が認められたが、20 秒後の血小板数は静注前の約 56% であり、非ストレスラットに比べて減少の程度は有意に小さかった。ADP の投与量を  $1 \text{ mg/kg}$  に増量すると、20 秒後の減少率は非ストレス群では  $0.2 \text{ mg/kg}$  の場合と同程度であったが、ストレス群では減少率が大きくなり、非ストレス群との間に有意な差が認められなくなった。

Fig.12 は in vivo collagen 凝集能を示している。Collagen  $0.5 \text{ mg/kg}$  の注入により、非ストレスラットの血小板数は徐々に減少し、3 分後には注入前の約 45% となった。その後、この血小板数減少は若干の回復傾向が認められたものの、注入 10 分後においても持続していた。ストレスラットでは、同用量の collagen 注入により 1 分後に血小板数は約 80% に減少したが、その後、それ以上の減少は認められず、このレベルが持続した。注入 3 および 10 分後の血小板数はいずれもストレス群の方が非ストレス群に比べて有意に多く、ストレスによる in vivo collagen 凝集能の低下が示唆された。Collagen 濃度を  $1 \text{ mg/kg}$  に増量すると、血小板数は注入前の 10% 以下にまで極度に減少し、両群間で減少の程度に大きな差は認められなくなった。

### 4. 血小板の adenine nucleotides 放出能と含量

Fig.13 は、同時記録した collagen 刺激による血小板の ATP 放出および凝集曲線の typical なパターンを示している。ストレスラットにおける collagen  $3$  および  $5 \mu\text{g/ml}$  の添加による血小板の ATP 放出能および凝集能は、非ストレスラットのそれらに比べていずれも明らかに小さかった。Fig.14 は、ATP 放出の最大値および最大凝集率を指標として多数例より得られた結果をまとめたものである。Collagen  $3$  および  $5 \mu\text{g/ml}$  の濃度範囲では、ストレス群の放出能および凝集能はいずれも非ストレス群のそれらに比べて有意に低下していた。

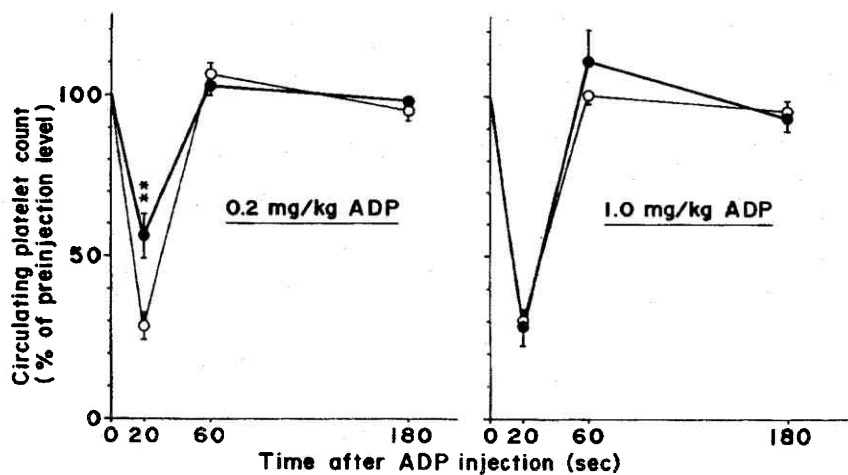


Fig. 11. In vivo platelet aggregation induced by rapid intravenous injection of ADP in non-stressed and SART-stressed rats. Open circle, non-stress; closed circle, SART stress. n = 5 or 11. \*\*P<0.01 vs. the corresponding non-stressed value.

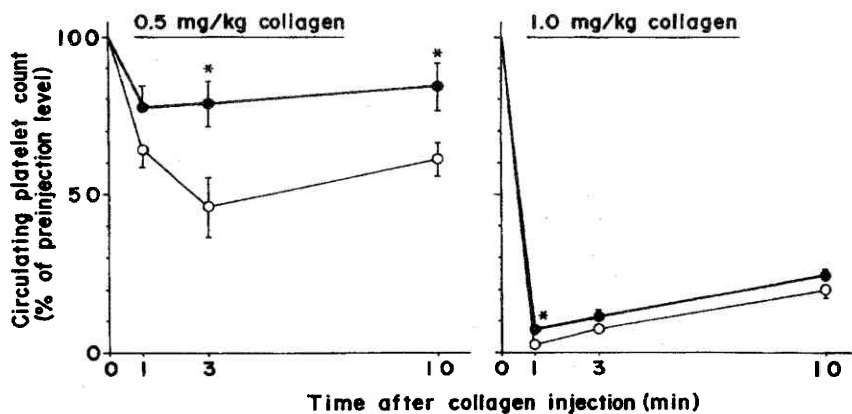


Fig. 12. In vivo platelet aggregation induced by intravenous injection of collagen in non-stressed and SART-stressed rats. Open circle, non-stress; closed circle, SART stress. n = 4-7. \*P<0.05 vs. the corresponding non-stressed value.

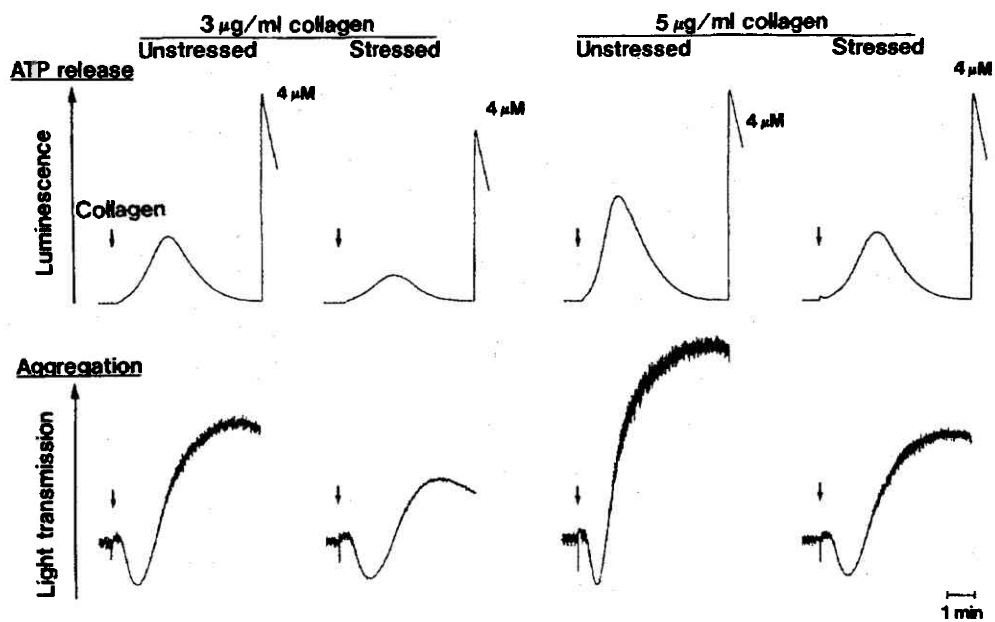


Fig. 13. Simultaneous typical recordings of platelet aggregation and ATP release in non-stressed and SART-stressed rats. Authentic ATP ( $4 \mu\text{M}$ ) was added for calibration of luminescence, after the reaction completely finished.

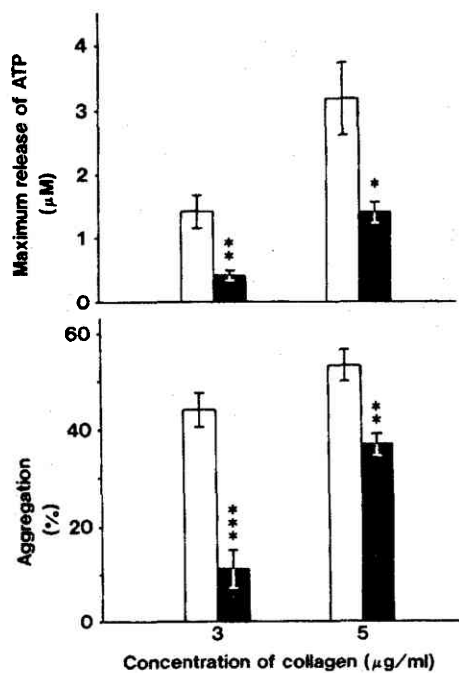


Fig. 14. Deficiency of collagen-induced aggregation and ATP release in platelets from SART-stressed rats. Open column, non-stress; closed column, SART stress.  $n = 7-9$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

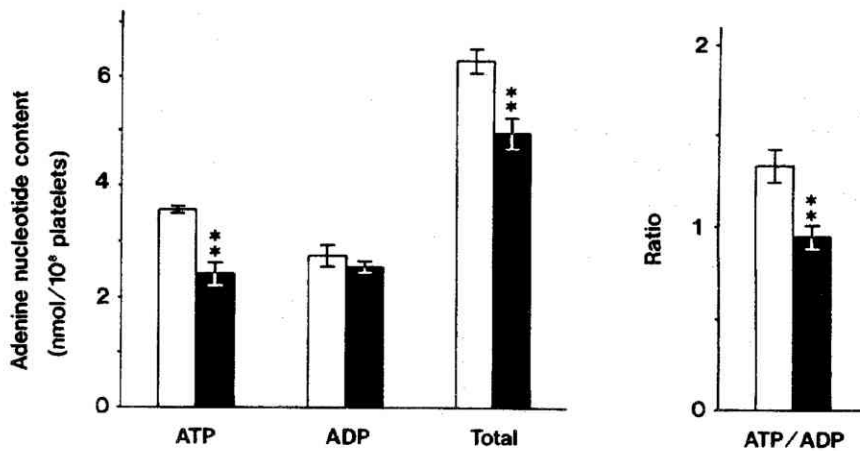


Fig. 15. Adenine nucleotide contents in platelets from non-stressed and SART-stressed rats. Open column, non-stress; closed column, SART stress.  $n = 6$ . \*\* $P < 0.01$ .

血小板中 adenine nucleotides 量については、Fig.15 にみられるように、ストレスにより ATP 量の有意な低下が認められたが、ADP 量には変化はみられず、ATP/ADP 比は有意に低下した。

## 5. 血小板の serotonin 放出能と含量

Fig.16 に示されるように、collagen  $10 \mu\text{g/ml}$  の添加によって血小板から放出される serotonin の量は、ストレス負荷ラットでは著しく減少しており、また、相対的な放出量を示す放出率についても有意な低下が認められた。さらに、刺激を与えていない静止血小板中の serotonin 量もストレスにより有意に減少していた。

## 6. 洗浄血小板の凝集能

Table 3 は異なった 2 方法で洗浄した血小板の凝集能を調べた結果である。ADP 凝集が起こらない A の方法で作製した洗浄血小板の collagen 凝集能、ADP 凝集が保持されている B の方法で洗浄した血小板の ADP および collagen 凝集能のいずれにもストレス群と非ストレス群で有意な差は認められなかった。

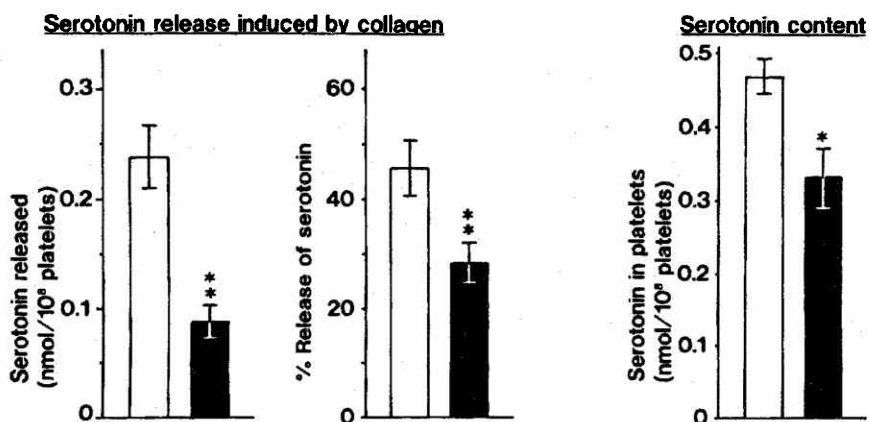


Fig. 16. Serotonin release and content in platelets from non-stressed and SART-stressed rats. Open column, non-stress; closed column, SART stress. Platelets were stimulated by 10  $\mu$ g/ml of collagen. n = 8 or 9. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

Table 3. Aggregability of washed platelets from non-stressed and SART-stressed rats

Agonists	Maximum aggregation (%)	
	Non-stress	SART stress
A) Collagen ( $\mu$ g/ml)		
1	25.6 $\pm$ 3.5	28.3 $\pm$ 2.1
3	47.2 $\pm$ 4.4	52.1 $\pm$ 4.8
10	75.0 $\pm$ 5.1	76.5 $\pm$ 3.3
B) ADP ( $\mu$ M)		
1	30.0 $\pm$ 6.2	30.6 $\pm$ 6.7
3	51.3 $\pm$ 5.2	44.9 $\pm$ 4.2
10	54.4 $\pm$ 2.4	54.8 $\pm$ 5.5
Collagen ( $\mu$ g/ml)		
0.3	12.0 $\pm$ 6.7	21.5 $\pm$ 9.6
1	55.8 $\pm$ 8.2	55.7 $\pm$ 6.9
3	79.4 $\pm$ 1.6	75.7 $\pm$ 4.2

A) Platelets were washed essentially according to the method of Baenziger and Majerus<sup>47)</sup>, and stimulated with collagen in the presence of 1.5 mM Ca. n = 7-9. B) Washed platelets prepared essentially by the method of Mustard et al.<sup>49)</sup> were stimulated with ADP or collagen in the presence of 1.5 mM Ca and 0.4 mg/ml fibrinogen. n = 5 or 6.



Table 4. Protein and cholesterol content in platelets from non-stressed and SART-stressed rats

	Non-stress	SART stress
Total protein ( $\mu\text{g}/10^8$ cells)	121.3 $\pm$ 1.9	116.6 $\pm$ 3.5
Total cholesterol ( $\mu\text{g}/10^8$ cells)	5.88 $\pm$ 0.16	5.91 $\pm$ 0.20
(Cholesterol/Protein) x 100	4.85 $\pm$ 0.12	5.07 $\pm$ 0.10

n = 11 (non-stress) and 8 (SART stress).

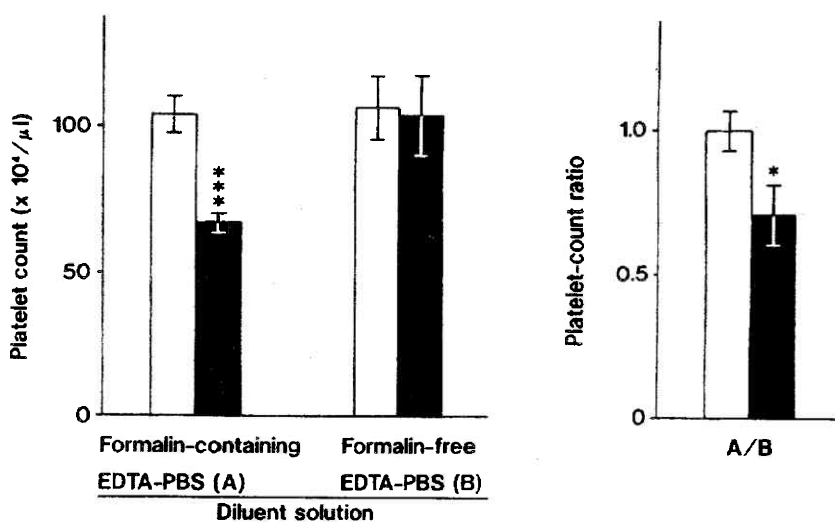


Fig. 17. Detection of circulating platelet aggregates in SART-stressed rats. Open column, non-stress; closed column, SART stress. n = 6. \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

## 7. 血小板構成成分量

Table 4 に血小板中の蛋白量, cholesterol 量および両者の含量比を示した. いずれについてもストレス, 非ストレス両群間に有意な差は認められなかった.

## 8. 循環血中凝集血小板の検出

Fig.17にみられるように, 採取した血液を formalin 含有 EDTA-PBS で希釈した場合, ストレスラットでは非ストレスラットに比べて遊離血小板数が少なかったが,

formalin を含まない EDTA-PBS で希釈すると両群の血小板数に差が認められなかった。希釈液中の formalin の有無による遊離血小板数の変化の度合いを反映する血小板数比は、非ストレスラットではほぼ 1.0 であったのに対し、ストレスラットでは 0.7 前後となり、有意に低下していた。このことは、ストレスにより循環血中に高濃度 EDTA により解離しうる凝集血小板が出現したことを意味している。

#### IV 考 察

SART ストレス動物では、摘出腸管の acetylcholine 反応性低下が認められる<sup>8)</sup>が、これを指標としてストレスの至適負荷条件を検討した報告<sup>1,9)</sup>によると、室温側は常に 24℃ に設定し、低温側をマウスでは 4℃ であったのをラットでは -3℃ に、モルモットでは 0℃ にすることでいずれの動物においても同様の变化を認めている。本章でのラットにおける血小板数減少の度合いはマウスの場合と同様、約 30% であり、またストレス負荷に伴う経日変化もマウスでのパターンと一致していたことより、止血系に関しても低温側を -3℃ に変更してストレス負荷することでラットにマウスと同様の变化を惹起できることが確認された。

SART ストレスラットでは、血小板数減少のほか、PRP 中での *in vitro* 血小板凝集能の低下が認められ、さらに、*in vivo* でも凝集能が低下していることが明かとなり、SART ストレス動物における出血傾向には血小板の量的減少のみならず質的变化が大きく関与していることが示唆された。一方、循環血中に高濃度 EDTA によって解離しうる凝集血小板が出現しており、一見矛盾する結果が得られた。

ヒトの血小板凝集能の変化は、様々な病態時<sup>53, 54)</sup>や栄養状態の変化<sup>55)</sup>などによって誘発される。急性ストレスによる血小板凝集能変化も調べられているが、一定の方向性はなく亢進、低下のいずれもが報告されている<sup>26-27, 34-37)</sup>。血栓性疾患や DIC などの患者の血小板凝集能を調べた Yamazaki ら<sup>54)</sup>の臨床研究によると、血栓症の進行、治療過程のある時期や DIC 患者では血小板凝集能の明らかな低下が認められる。土屋ら<sup>56)</sup>は、実験的に作成した微小循環傷害モデルを用いた研究結果から DIC の発現あるいは発達過程におけるストレス性要因の重要性を主張している。

SART ストレスラットにおいて血小板凝集能の低下と同時に循環血中に凝集血小板が検出されたことは、この動物がマイルドな DIC 様状態にあることを意味するのかもしれない。すなわち、何らかの理由で血管内の血小板が活性化され、消費が促進されて血小板数が減少し、疲弊血小板の出現あるいは反応性の高い若い血小板が優先的に消費されて老弱血小板が相対的に多くなることにより、結果として血小板凝集能が低下した可能性が考えられる。

SART ストレスラットでは血小板凝集能の低下とともに、collagen 刺激による ATP および serotonin 放出能の低下が認められた。また、静止血小板中の ATP および serotonin 量にも減少が認められたことより、放出能の低下の一因として濃染顆粒内物質の含量低下が考えられる。しかし、serotonin の含量に対する相対的な放出量を算出した放出率にも有意な低下が認められたことは、ストレスによって放出機能自体も低下したことを示唆している。さらに、SART ストレスラットでは放出反応を伴わない ADP 凝集能も低下していたことより、ストレスによる凝集能の低下が放出能低下の二次的な変化とは考え難い。

SART ストレスラットの血小板中 ATP および serotonin 量が減少していたことは、前述の仮説、すなわちストレスによって血管内で血小板の消費が亢進した結果、疲弊あるいは老弱血小板が増加している可能性を支持する結果である。しかし、ADP 量は SART ストレスによって変化せず、その結果、ATP/ADP 比は有意に低下した。血小板濃染顆粒内物質は刺激に伴って非選択的に放出される<sup>57)</sup>ので、ADP のみが異なった挙動を示すとは考え難い。Yamazaki ら<sup>54)</sup>は、DIC 患者の血小板では ATP および ADP 含量がいずれも有意に低下しており、ATP/ADP 比はむしろ上昇することを報告している。すなわち、種差を考慮する必要はあるが、SART ストレスラットの血小板の特徴は、DIC 患者において認められるいわゆる疲弊あるいは老弱血小板の特徴とは必ずしも一致しなかった。血小板中の serotonin はそのほとんどが濃染顆粒内に局在するのに対し、ATP は 1/3、ADP は 2/3 が濃染顆粒内に、残りの adenine nucleotides はそのほとんどがエネルギー代謝に関連して細胞質に存在する<sup>57, 58)</sup>。細胞質内の ATP は、*in vitro* において、血小板の starvation (栄養成分欠損) や血小板の活性化などによって減少することが報告されている<sup>57)</sup>が、前者では ADP 量の増加を伴うのに対し、後者では ADP 量は変化しない。このことより、SART ストレスラットでは血管内で放出反応を伴わないマイルドな血小板の活性化が起こり、その結果、

細胞質中の ATP 量が減少した可能性が考えられる。SART ストレスラットにおいて、高濃度 EDTA によって解離しうるマイルドに凝集した血小板が出現していたことは、このような考えを支持する知見である。

血小板はそれ自身では serotonin を産生することはできず、血漿中の serotonin を能動輸送によって濃染顆粒内に取り込むことにより、血中に存在する serotonin のほとんどを含有している<sup>57)</sup>。このことから、血小板中 serotonin 量減少の原因として、血小板の放出反応の亢進のほかに、全身の臓器プールから血中への serotonin の供給量の減少や serotonin の取り込み機能の低下が考えられる。前者の可能性を支持するものとして、SART ストレスラットの脳内 serotonin 量の減少が報告されている<sup>7)</sup>が、現時点ではこれと関連づける明確な証拠は得られておらず、将来の課題としたい。

PRP 中での血小板凝集能がストレスによって明らかに低下していたにも関わらず、洗浄血小板の凝集能が全く変化していなかったことは驚くべき結果である。Tomita ら<sup>59)</sup>は、同じ洗浄法を用いて脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP) における血小板の collagen および ADP 凝集能の低下を報告し、血小板自体の機能障害を証明しているが、SART ストレスラットで同様の証拠を得ることはできなかった。このことは、SART ストレスラットにおける血小板の PRP 中での凝集能および放出能の低下や *in vivo* 凝集能の低下は血小板自体の本質的な機能障害に基づくものではなく、血漿環境の変化あるいは洗浄によって除去されうる血小板膜表面上の変化が原因である可能性を示唆している。換言すれば、SART ストレスラットの血小板は凝集能低下をきたすほどの不可逆的な障害は有していないと考えられ、前述のストレスによる血小板中 ATP 量の減少が、過度の血小板の疲弊を意味する濃染顆粒内での減少を反映したものではない可能性を支持する結果ともいえる。また、血小板中の蛋白量やコレステロール量がストレスによって変化しなかったこともこれと矛盾しない。血小板機能に影響する血漿中因子として脂質量やその構成成分比の変化<sup>55, 60)</sup>が知られているが、SART ストレス動物では血清中のほとんどの脂質量が減少しており<sup>13)</sup>、これが凝集能低下に寄与している可能性も考えられる。また、血漿中や血小板膜表面上に付着している fibrinogen の量が凝集能に影響する<sup>49, 61)</sup>ことも考えられるが、この点については次章で若干触れることとする。

以上を総合すると、SART ストレスラットでは刺激に対する血小板の凝集能、放出能などの機能低下が認められる一方、血管内では何らかの刺激によって血小板が活

性化されており、マイルドな DIC 様状態にある可能性が考えられる。また、ストレスによる血小板機能の低下は、血小板自体の本質的な異常に基づくものではなく、血漿環境や血小板膜表面上の変化が関与している可能性が示唆された。

## V 小 括

- 1) SART ストレスラットにおいてもマウスの場合と同様の血小板数減少が観察され、種差は認められなかった。
- 2) PRP 中での *in vitro* 血小板凝集能、放出能はストレスにより低下し、また、*in vivo* 凝集能にも明らかな低下が認められた。
- 3) SART ストレスラットでは血小板中の ATP 量と serotonin 量が減少していたが、ADP 量には変化は認められなかった。
- 4) 洗浄血小板の凝集能はストレスによって変化しなかった。
- 5) 血小板中の蛋白量およびコレステロール量はストレスによって変化しなかった。
- 6) SART ストレスラットでは循環血中に高濃度 EDTA によって解離しうる凝集血小板が出現していた。

以上の結果より、SART ストレスラットでは刺激に対する血小板の凝集能、放出能などの機能が低下している一方で、血管内では血小板が何らかの刺激によって活性化されている可能性が示唆された。また、ストレスによる血小板機能の低下は、血小板自体の本質的な障害に基づくものではなく、血漿環境や血小板膜表面上の変化が関与していることが推察された。

## 第3章 SART ストレス動物における血液凝固・線溶系の異常

### I 緒言

ヒトにおいて、短時間の運動負荷や急性の精神的ストレスなどによって血液凝固・線溶系が活性化されることは、多くの臨床研究<sup>25, 62, 63)</sup>によって既に指摘されている。しかし、実験動物を用いた同様の報告<sup>64)</sup>は少なく、また、ストレスを長期間負荷した場合の血液凝固・線溶系の変化についてはほとんど調べられていない。

第1, 2章において認められた SART ストレス動物の血小板の量的ならびに機能的変化の特徴から、この動物はマイルドな DIC 様状態にある可能性が示唆された。本章ではさらに止血機構の全体像を明らかにする目的で、SART ストレスラットの血液凝固・線溶系の特徴を調べることにした。

さらに、SART ストレスによる止血機構の諸異常の発現と中枢神経系との接点を求める目的で、抗不安薬 alprazolam の効果についても検討した。

### II 実験材料ならびに実験方法

#### 1. 実験動物とストレスの負荷方法

実験動物として体重 20-25 g の ddY 系雄性マウスあるいは 200-250 g の Wistar 系雄性ラット（日本 SLC.）を使用し、SART ストレスの負荷は前章と同じ方法で行った。

#### 2. 乏血小板血漿の調整

前章に記した方法でラットより採取したクエン酸加血液を 4℃, 1,700 g で 10 分間遠心することにより、乏血小板血漿 (PPP) を得た。

#### 3. 血漿凝固時間の測定

内因性凝固活性を反映する活性化部分 thromboplastin 時間 (APTT), 外因性凝固活性

を反映する prothrombin 時間 (PT) および主に血漿 fibrinogen 濃度の変化を反映する thrombin 時間 (TT) を指標とした。

APTT の測定<sup>15)</sup> : ウサギ脳由来リン脂質およびエラジン酸を含む APTT 試薬 (和光純薬) 0.1 ml と PPP 0.1 ml を混合し, 37°C で 5 分間インキュベート後, プレインキュベートした 37°C の 0.02 M CaCl<sub>2</sub> 溶液 0.1 ml を添加し, 攪拌しながら fibrin 塊が析出するまでの時間を測定した。

PT の測定<sup>15)</sup> : Quick の 1 段階法に従い, ウサギ脳由来 thromboplastin と CaCl<sub>2</sub> を含む PT 試薬 (和光純薬) 0.2 ml と PPP 0.1 ml を混合し, 37°C で fibrin 塊析出までの時間を測定した。

TT の測定<sup>15)</sup> : 25 U/ml のウシ由来 thrombin (Sigma) 0.1 ml と PPP 0.1 ml を混合し, 37°C で fibrin 析出時間を測定した。

#### 4. 血漿 fibrinogen 量の測定

Tomikawa ら<sup>65)</sup> の方法に従い, 6.8 mM CaCl<sub>2</sub> と 0.32 mM tranexamic acid (Aldrich) を含む 0.9% NaCl 溶液 5 ml と PPP 50 μl を混合し, 37°C で 1 時間インキュベートすることにより血漿中の fibrinogen を fibrin に変換した後, この fibrin 塊の蛋白量を Lowry ら<sup>40)</sup> の方法により測定し, 血漿 fibrinogen 量とした。

#### 5. Euglobulin 溶解時間 (ELT) の測定

Kluft ら<sup>66)</sup> の方法に準じて PPP より作成した euglobulin 分画を用いて, ELT を Gallimore ら<sup>67)</sup> の方法に従って測定し, 線溶活性の指標とした。すなわち, PPP を氷冷蒸留水で希釈 (1:20) し, 2% 酢酸を添加することにより pH を 5.9 に調整した。これを氷冷下 1 時間放置後, 沈殿する euglobulin 分画を採取し, 0.12 M 酢酸緩衝液 (pH 7.4) で再度溶解した。37°C の水浴中で, この euglobulin 溶液にウシ由来 thrombin を添加し, 析出する fibrin 塊が完全に消失するまでの時間を測定し, ELT とした。

#### 6. 血液凝固第Ⅷ因子 (FVIII:C), antithrombin III (ATIII) および α<sub>2</sub>-plasmin inhibitor (α<sub>2</sub>-PI) 活性の測定

内因性凝固系に属する FVIII:C, 抗 thrombin 因子の ATIII および抗 plasmin 因子の α<sub>2</sub>-PI 活性は, それぞれ発色合成基質を利用したアッセイキット, Testzyme VIII,

ATIII および APL（以上 Kabi Vitrum AB）を用いて分光光学的方法により測定した。なお、FVIII:C 活性の測定はその不安定性を考慮し、採血後 30 分以内に行った。結果は、正常ヒト血漿凍結乾燥品の希釈列の各因子活性を測定し、正常ヒト血漿に対するサンプルのパーセント活性として表示した。

## 7. 血液濃縮・希釈の検討

血液の凝固・線溶に関わる各因子の血中濃度や活性は、血液が濃縮あるいは希釈されることによっても変化する。SART ストレスによってマウスでは、赤血球数の増加やヘマトクリット値の上昇が認められることから、血液濃縮が起こっている可能性を第 1 章で指摘した。本章ではラットでこの点を確認するため、赤血球数、白血球数およびヘマトクリットを第 1 章に記した方法で測定した。また、血漿蛋白濃度を Lowry ら<sup>40)</sup>の方法で測定し、さらに、血漿 fibrinogen 量の蛋白量に対する比を算出した。

## 8. 薬物投与方法

Tranexamic acid (Aldrich) は生理食塩液に溶解し、単回投与実験では採血の 30 分前に 1 回のみ、反復投与実験ではストレス負荷開始日より採血前日まで 1 日 1 回宛計 7 回ラットに腹腔内投与した。

Alprazolam（武田薬品工業）は 0.5% CMC-Na 溶液中に懸濁してマウスあるいはラットに経口投与した。単回投与による効果を調べる実験では、非ストレス動物、SART ストレス動物ともに alprazolam を各測定の前 1 時間前に投与した。反復投与実験では 1 日 1 回宛計 7 回薬物を投与し、最終投与の翌日に各測定を行った。SART ストレス動物についても同様に、ストレス負荷開始日より負荷終了前日までの連日計 7 回の薬物投与を行った。

その他、記載のないものについては前章までと同様の方法で行った。



### III 実験結果

#### 1. ストレスによる凝固・線溶系の変化

Fig.18 にストレス, 非ストレス両ラットの血漿凝固時間, fibrinogen 量および ELT を示した. SART ストレスラットでは, 内因性凝固活性を反映する APTT に僅かながら有意な延長が認められたが, 外因性凝固活性の指標である PT は非ストレスラットのそれと同程度であった. TT はストレスにより著しく延長した. また, これと関連の深い fibrinogen 量に明らかな減少が認められた. 一方, 線溶活性の指標である ELT はストレスにより明らかに短縮した.

Table 5 には, 両ラットの FVIII:C, ATIII および  $\alpha_2$ -PI 活性を正常ヒト血漿の各因子活性のパーセントとして示した. ATIII および  $\alpha_2$ -PI 活性についてはラット, ヒト間で大きな種差は認められなかったが, FVIII:C 活性はラットではヒトの 3 倍以上

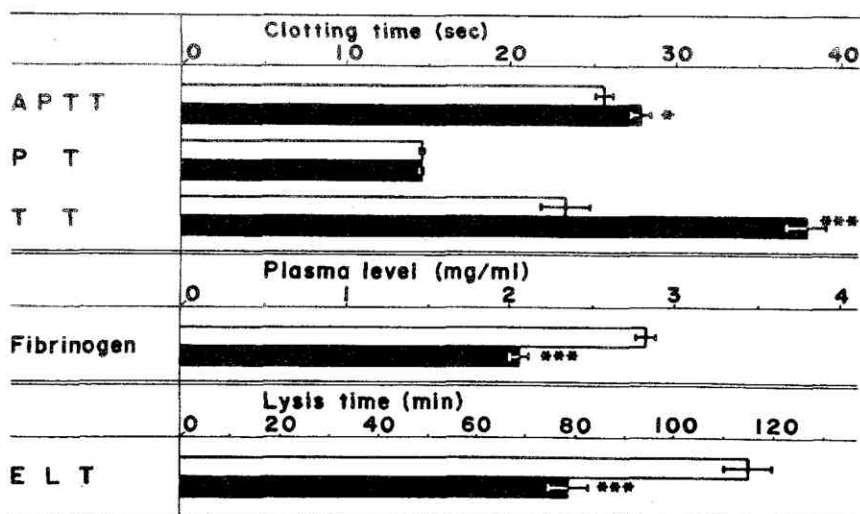


Fig. 18. Hemostatic parameters in SART-stressed rats. Open column, non-stress; closed column, SART stress. APTT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time; TT, thrombin time; ELT, euglobulin clot lysis time.  $n = 11-16$  (APTT, PT and ELT) and  $5-10$  (TT and fibrinogen). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

の値となった。これは FVIII:C 欠乏血漿を利用した凝固法により調べられた Lewis ら<sup>68)</sup> の結果とよく一致しており、ラットの特徴といえるかのもしれない。SART ストレスラットにおいては、内因性凝固系に関与する因子の1つである FVIII:C 活性が、非ストレスラットに比べて明らかに低下していた。一方、ATIII および  $\alpha_2$ -PI 活性にはいずれもストレスによる有意な変化は認められなかった。

Table 5. Coagulation factor VIII:C, antithrombin III and  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor activities in SART-stressed rat plasma

	Non-stress	SART stress
FVIII:C	318.9 ± 14.7 (7)	230.8 ± 20.8 (8)***
ATIII	121.9 ± 5.9 (13)	130.8 ± 7.0 (13)
$\alpha_2$ -PI	120.7 ± 3.9 (12)	111.5 ± 4.0 (12)

The activity of factor VIII:coagulant (FVIII:C), antithrombin III (ATIII) and  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor ( $\alpha_2$ -PI) was expressed as a percentage of that of normal human plasma. Parentheses indicate the number of rats employed. \*\*\*P<0.001.

Table 6. Evaluation of hemoconcentration or hemodilution under SART stress

	Non-stress	SART stress
RBC (x 10 <sup>6</sup> /μl)	6.61 ± 0.12	7.40 ± 0.23**
WBC (x 10 <sup>3</sup> /μl)	6.00 ± 0.48	6.46 ± 0.49
Ht (%)	41.4 ± 0.6	44.4 ± 1.0*
Plasma protein (mg/ml)	57.3 ± 1.7	56.7 ± 1.1
Fibrinogen/Plasma protein (x 10 <sup>-2</sup> )	3.86 ± 0.13	2.50 ± 0.13***

RBC, red blood cell; WBC, white blood cell; Ht, hematocrit. n = 9-12. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

## 2. 血液濃縮・希釈の検討

Table 6 にみられるように、ラットにおいてもストレスにより赤血球数の増加およびヘマトクリットの上昇が認められたが、白血球数は無変化であり、マウスの場合と同じ結果が得られた。また、血漿蛋白濃度には全く変化はみられず、ストレスにより血液濃縮が起こっているか否かは明言できないが、少なくとも血液希釈は起こっていないようである。さらに、血漿 fibrinogen と蛋白量との比はストレスにより明らかに低下しており、血漿蛋白の中で fibrinogen が特異的に減少していることが確認された。

## 3. ストレス負荷に伴う血漿 fibrinogen 量および ELT の経日変化

Fig.19 に示したように、血漿 fibrinogen 量は SART ストレス負荷開始 3 日後まではほとんど変化せず、ほぼ正常レベルにあったが、5 日後に急激に減少し、以後ストレスを負荷し続けると少なくとも 1 週間はそのレベルが維持されていた。

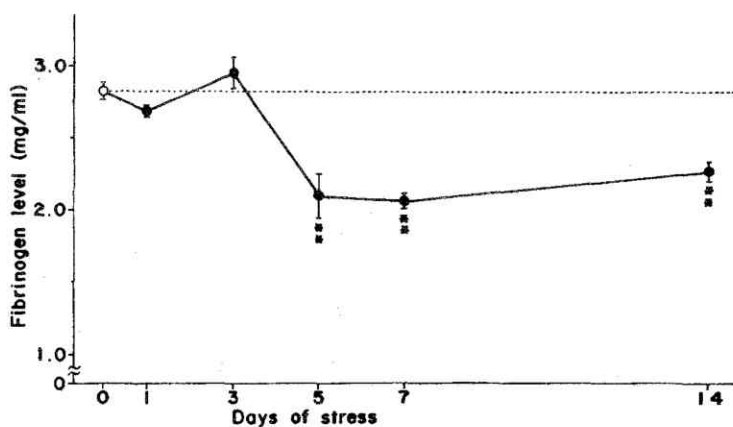


Fig. 19. Time-related change in plasma fibrinogen level in rats during SART stress. n = 4-10. \*\*P<0.01 vs. the initial level.

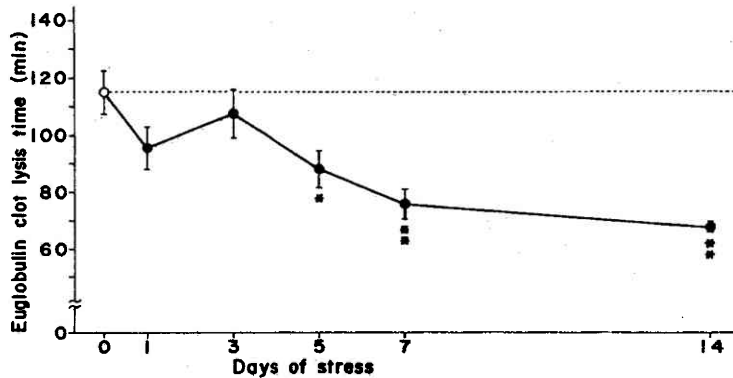


Fig. 20. Time-related change in euglobulin clot lysis time in rats during SART stress. n = 8-11. \*P<0.05, \*\*<0.01 vs. the initial level.

Fig.20 は ELT についての結果である。ELT は、ストレス負荷開始 1 日後に短縮傾向を示したが、3 日後には負荷前値に戻っていた。その後、ELT は 5 日後より有意に短縮しはじめ、7 日後さらに短縮し、少なくとも 14 日後までは回復しなかった。

#### 4. SART ストレス動物の止血系異常におよぼす薬物の作用

##### 1) 血漿 fibrinogen 量の減少に対する tranexamic acid の効果

Table 7 にその結果を示した。Tranexamic acid (50-500 mg/kg) の単回投与によっては、非ストレス、ストレスいずれのラットにおいても血漿 fibrinogen 量に対する有意な影響は認められなかった。一方、tranexamic acid 500 mg/kg を 7 日間反復投与した場合、非ストレスラットでは無影響であったが、ストレスによる fibrinogen 量の減少は有意に抑制された。

##### 2) Alprazolam の作用

マウスの血小板数ならびに巨核球数におよぼす alprazolam の効果を Fig.21 に示した。Alprazolam 1 および 2 mg/kg/day の反復投与は非ストレスマウスの血小板数には無影響であったが、ストレスによる血小板数減少を阻止する傾向を示した。また、ストレスによる巨核球数の増加は alprazolam の反復投与により用量依存的に阻止された。

Table 7. Effect of tranexamic acid on the decrease in plasma fibrinogen level in SART-stressed rats

Treatment (mg/kg × times)	Fibrinogen level (mg/ml)	
	Non-stress	SART stress
Control	2.96 ± 0.09	2.03 ± 0.05
Tranexamic acid		
50 × 1	3.19 ± 0.10	2.00 ± 0.16
100 × 1	3.14 ± 0.16	2.26 ± 0.19
500 × 1	3.14 ± 0.11	2.13 ± 0.15
Control	2.92 ± 0.06	2.13 ± 0.07
Tranexamic acid		
100 × 7		2.14 ± 0.18
500 × 7	3.08 ± 0.12	2.75 ± 0.13**

n = 9-14 (control group) and 4-10 (dosed group). \*\*P<0.01 vs. the SART-stressed control.

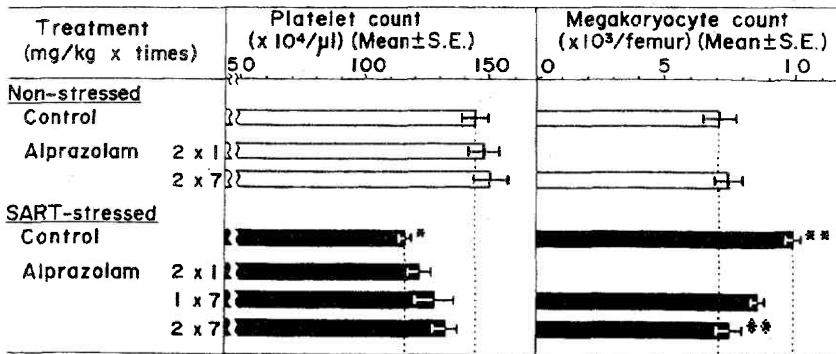
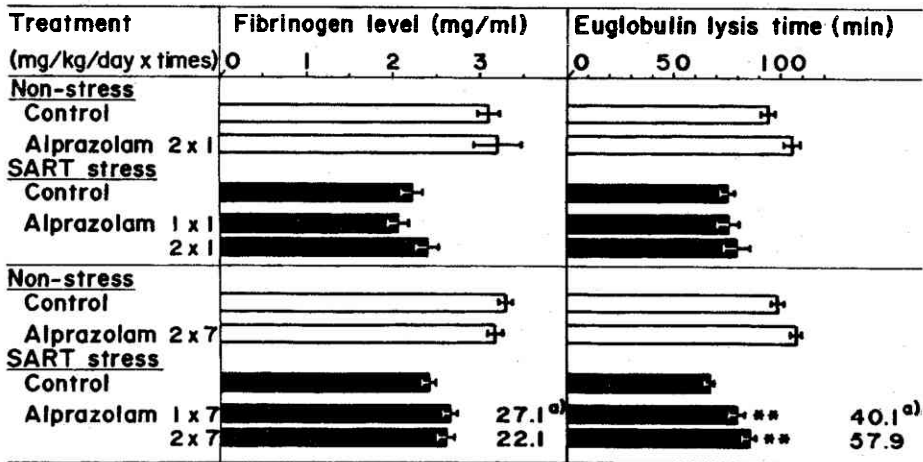


Fig. 21. Effect of alprazolam on SART stress-induced changes in platelet and megakaryocyte counts in mice. n = 5-8. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. the non-stressed control, ‡‡‡P<0.01 vs. the SART-stressed control.

**Table 8.** Effect of alprazolam on SART stress-induced prolongation of bleeding time in mice

Drug and dose (mg/kg x times)	Bleeding time (sec) (Mean ± S.E.)		Inhibition (%)
	Non-stress	SART stress	
Control	60.2 ± 2.9	130.5 ± 6.1**	
Alprazolam 2 x 1	66.4 ± 5.6	115.0 ± 12.8	22.0
1 x 7		110.6 ± 11.8	28.2
2 x 7	59.2 ± 6.5	85.0 ± 9.9*	64.8

% Inhibition = [(control value - dosed value) in SART-stressed groups] / (difference between non- and SART-stressed control values) x 100. Route: p.o. n = 22 (control group) and 5-13 (dosed group). \*\*P < 0.01 vs. the non-stressed control; \*P < 0.05 vs. the SART-stressed control.



**Fig. 22.** Effect of alprazolam on the alterations in plasma fibrinogen level and fibrinolytic activity in SART-stressed rats. a), % inhibition. n = 4 or 5 (single administration) and 7-9 (repeated administration). \*\*P < 0.01 vs. the SART-stressed control.

マウスの出血時間におよぼす alprazolam の効果を Table 8 に示した。Alprazolam は、2 mg/kg の単回投与ではマウスの出血時間に有意な影響を与えなかったが、反復投与すると非ストレスマウスに無影響な用量（2 mg/kg）でストレスによる出血時間の延長を有意に阻止した。

非ストレス、ストレス両ラットの血漿 fibrinogen 量および ELT におよぼす alprazolam の効果を調べた結果を Fig.22 に示した。Alprazolam (1-2 mg/kg) は単回投与では無効であったが、反復投与によりストレスによる ELT の短縮を用量依存的に阻止した。一方、fibrinogen 量の減少に対しては、alprazolam は今回用いた用量では無効であった。

#### IV 考 察

SART ストレスラットにおいて APTT ならびに TT の有意な延長、血漿 fibrinogen 量の減少および ELT の短縮が認められ、さらに FVIII:C 活性が低下していたことより、この動物では血漿の凝固活性、特に内因性凝固系の活性が低下していることと線溶系が活性化されている可能性が示唆された。第 1, 2 章において述べた血小板数の減少や血小板凝集能の低下を考慮すると、SART ストレス動物では止血機構が全体として出血傾向を助長する方向に変化していることが明らかとなった。

ヒトにおいて、短時間の運動<sup>25, 62, 63)</sup>、低酸素負荷<sup>60)</sup>、急性情動ストレス<sup>25)</sup>などによって内因性凝固系および線溶系が活性化されることが報告されている。これは、交感神経系がストレスによって興奮し、血中 epinephrine 濃度が上昇することによって FVIII:C および組織型 plasminogen activator (TPA) が血中に遊離されるためであることが証明されている。ヒトを短時間低温に暴露することによっても線溶亢進が認められる<sup>70)</sup>こと、さらに SART ストレスラットでは血中 epinephrine 濃度の上昇が報告されている<sup>30)</sup>ことから、SART ストレスによる線溶系の亢進は血中 epinephrine 濃度の上昇により説明できるかもしれない。しかし、SART ストレスによる ELT の短縮は、ストレス負荷開始 1 日後にその傾向は認められたものの有意ではなく、5 日後になってはじめて明らかとなったことを考慮すると、急性時の変化がそのまま持続して

いるとは考えられず、より複雑な機序が関与するものと考えられる。一方、FVIII:C 活性は SART ストレスによりむしろ低下しており、血中 epinephrine 濃度の上昇とは矛盾した変化といえる。

慢性型ストレス時、凝固・線溶系にどのような変化が認められるかはあまり調べられていないが、Palmlblad ら<sup>71)</sup>は、ヒトに数日間徹夜させるというストレスを負荷することによって FVIII:C のほか第 V、IX 因子などの内因性凝固系因子の活性が低下したが、線溶活性は変化しなかったと報告している。Chohan ら<sup>72)</sup>は、ラットを長期間騒音ストレスに暴露し、出血時間の短縮、fibrinogen 量の増加、APTT の延長などを認めている。このように慢性型ストレスによる血液凝固・線溶系の変化は、急性ストレス時の変化ほど単純ではなく、ストレスの種類によって様々である。しかし、慢性型ストレスの一種である SART ストレスラットで APTT の延長および FVIII:C 活性の低下が認められたことより、内因性凝固活性の低下は慢性型ストレス時の共通の変化といえるのかもしれない。

SART ストレスラットにおいて認められた最も劇的な変化は TT の延長であった。TT は血漿 fibrinogen 量の変化の指標としてよく用いられるが、ATIII 活性の変化などによっても左右される<sup>15)</sup>。しかし、SART ストレスによって ATIII 活性は変化しなかったことより、TT の延長はストレスによる fibrinogen 量の減少のみを反映したものと考えられる。血漿 fibrinogen 量の減少は、血液凝固系の活性化（2次線溶）および plasmin による分解（1次線溶）などによって起こりうる<sup>15)</sup>。SART ストレス負荷に伴う fibrinogen 量と ELT の経日変化がほぼ並行していたこと、さらに、ストレスによる fibrinogen 量の減少が tranexamic acid の連日投与により有意に抑制されたことより、この fibrinogen 量減少の一部は 1次線溶によるものである可能性が考えられる。しかし、tranexamic acid が、DIC 患者における fibrinogen 量の減少を抑制し、出血傾向を改善したとの臨床報告<sup>73)</sup>もあり、2次線溶の関与も十分考えられる。

第 1、2 章では血小板系に関する知見より、SART ストレス動物がマイルドな DIC 様状態にある可能性を指摘したが、本章における血液凝固・線溶系に関する所見もこれとは矛盾しない結果といえる。DIC 患者の止血系所見<sup>74, 75)</sup>はその重症度によって異なり、DIC の前段階あるいは準備状態とよばれるマイルドなものや、凝固系と線溶系が共に活性化されてうまくバランスがとれている代償性のものである。SART ストレス動物は、臨床における致命的ないわゆる DIC ではないが、その傾向にある



と考えるのが現時点での妥当な解釈であろう。また、第2章において、SART ストレスによる血小板凝集能低下の原因として血漿環境の変化や血小板の膜表面上の変化が関与する可能性を指摘したが、血漿中や血小板膜表面上に付着して存在する fibrinogen が血小板凝集時に重要な役割を果たしている<sup>49, 61)</sup>ことを考慮すると、SART ストレス動物での血漿 fibrinogen 量減少は血小板の機能変化との関連性を考える上においても興味深い。

先にも述べたように、交感神経の活性化により血中に TPA が遊離されてくることから、線溶活性の調節が中枢神経系により行われている可能性が指摘されている<sup>25, 76)</sup>。ラットの視床下部正中隆起 (median eminence) を電気刺激すると線溶亢進がみられるとの報告<sup>77)</sup>や、イヌを低体温にすることによって誘発される線溶亢進が chlorpromazine の投与によって阻止されるとの報告<sup>33)</sup>は、中枢神経系と線溶系との関係を示唆するものである。本章において、抗不安薬 alprazolam の反復投与がストレスによる止血系の異常の多くを阻止する傾向を示したことは、これらの異常の発現過程における中枢神経系の役割を考える上で興味深い。しかし、Alprazolam は血小板活性化因子 (PAF) に対する拮抗作用を有しており<sup>78)</sup>、また、PAF が TPA を遊離させるとの報告<sup>79)</sup>もあることから、ストレスによる線溶亢進に対する alprazolam の阻止効果が中枢性のものであるか末梢性のものであるかは断言できない。一方、マウスの血小板は少なくとも *in vitro* では PAF に反応しない<sup>80)</sup>ことより、少なくともマウスの血小板数減少に対する阻止効果を抗 PAF 作用のみで説明することは出来ない。このことから、SART ストレス動物において認められる種々の止血異常の発現には中枢 - 自律神経系が少なくとも一部関与しているのではないかと考えられる。

## V 小 括

- 1) SART ストレスラットでは、APTT ならびに TT の延長、血漿 fibrinogen 量の減少、ELT の短縮が認められたが、PT は変化していなかった。さらに、FVIII:C 活性も低下していたが、ATIII および  $\alpha_2$ -PI 活性に変化は認められなかった。
- 2) SART ストレスラットでは、血液希釈は生じていないと考えられた。

- 3) 血漿 fibrinogen 量の減少および ELT の短縮は，ストレス負荷開始 5 日後より認められ，少なくとも 14 日後まではこれらの変化は持続していた。
- 4) ストレスによる血漿 fibrinogen 量の減少は，tranexamic acid の連日投与により有意に抑制された。
- 5) Alprazolam の反復投与は，ストレス動物における血小板数減少，骨髓巨核球数増加および ELT 短縮を抑制する傾向を示した。

以上より，SART ストレス動物では内因性凝固活性が低下しているが，外因性凝固系は変化していないこと，さらに，線溶活性が亢進していることが示唆された。また，上記知見は変化の程度は小さいが，SART ストレス動物がマイルドな DIC 様状態にあるとの第 1，2 章での仮説とも矛盾しないものであった。さらに，抗不安薬 alprazolam がストレスによる変化を正常化したことより，これら止血機構の異常の発現に中枢神経系が一部関与している可能性が示唆された。

## 第4章 SART ストレス動物の止血異常発現における 活性酸素の関与

### I 緒言

血栓性疾患やDICなどの止血機構の異常が関係すると考えられる病態の発現あるいは発達に、ストレス性因子が関与する可能性が指摘されている<sup>3, 26, 36, 37, 56, 70, 81-83</sup>。このうち気温変動に基づく環境ストレスと止血異常との関係については、ヒトを実験的に短時間低温に暴露すると線溶亢進<sup>70</sup>、血小板数増加、赤血球数増加、血液粘度上昇、血圧上昇<sup>82</sup>などが一過性に認められることや、ヒツジを過度の高温に急激に暴露するとDICを発現して死亡する<sup>83</sup>ことなどが報告されている。しかし、長期間反復して起こる気温変動の止血系への影響はこれまでほとんど解っていなかった。第1-3章において著者は、数日間の反復低温暴露により、実験動物が徐々にマイルドなDIC様症状を呈するようになることを明らかにした。これをそのままヒトに外挿するわけにはいかないが、気温変動の激しい時期や地域では血栓性疾患による死亡率が高くなるとの疫学的報告<sup>83</sup>との関連性を考えると興味深い知見といえる。

臨床において、DICはショック時や癌、肝障害などの基礎疾患の上に何らかのtriggerが作用して発現する。Yoshikawaら<sup>84-86</sup>は、DICモデルとしてよく用いられるエンドトキシンショックの発現に活性酸素が関与することを示唆している。また、土屋ら<sup>86</sup>は、ストレス性電気刺激により微小循環障害をおこした臓器から採取した局所血にDIC様の変化を見だし、その変化の発現にフリーラジカルが重要な役割を果たすこと示している。これらのことより、SARTストレス動物において認められるDIC様症状の発現あるいは進行過程においてもフリーラジカルが何らかの役割を担っている可能性が考えられる。

そこで本章では、SARTストレスにより誘発される止血系の異常の発現にフリーラジカルが関与するか否かを検討する目的で、活性酸素の補集剤および生成阻害剤の効果調べることにした。すなわち、ラジカル補集剤として superoxide dismutase (SOD) と catalase、また xanthine oxidase 経路を介するラジカル生成阻害剤として allopurinol を使用し、これらをストレス負荷期間中反復投与した場合の止血系への影

響を検討した。なお本実験系においては、SARTストレス動物における止血系の異常の指標として、ストレスによる変化の幅が比較的大きく、かつ安定していた3つの典型的な変化、すなわち血小板数の減少、血漿 fibrinogen 量の減少および FVIII:C 活性の低下を用いることとした。

さらに、生体内でフリーラジカルが過剰に生成されると脂質の過酸化が起こり生体に様々な悪影響をおよぼすことが考えられる。そこで、SARTストレス動物の血漿中および組織内の過酸化脂質量を測定し、非ストレス動物のそれらと比較検討した。

## II 実験材料ならびに実験方法

### 1. 実験動物とストレス負荷方法

体重 20-25 g の ddY 系雄性マウスならびに体重 200-250 g の Wistar 系雄性ラット（日本 SLC.）を使用し、SART ストレスの負荷はそれぞれ第 1, 2 章に記載の方法で行った。

### 2. 採血

ペントバルビタール麻酔下で開腹したマウスおよびラットの腹大動脈よりそれぞれ 0.5 および 5 ml（最終容量）の血液を 1/10 容量の 3.13% クエン酸 Na を含むシリンジ内に採取した。

### 3. 血漿 fibrinogen 量ならびに FVIII:C 活性の測定

血小板数算定後、クエン酸加血を 1,700 g で 10 分間遠心することにより乏血小板血漿 (PPP) を採取した。この PPP 中の fibrinogen を本章では簡易的に thrombin 時間法<sup>15)</sup>によりアッセイキット（フィブリノーゲン B テストワコー，和光純薬）を用いて定量し、また、FVIII:C 活性を第 3 章に記載した方法で測定した。

### 4. 薬物投与方法

Superoxide anion ( $O_2^-$ ) および hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) の補集剤としてそれぞ

れウシ赤血球由来 SOD (Sigma) およびウシ肝臓由来 catalase (Sigma) を、また xanthine oxidase 阻害剤として allopurinol (和光純薬) を使用した。SOD は生理食塩水に溶解し、ストレス負荷開始日から採血前日までの 7 日間、午前 9 時と午後 4 時の 1 日 2 回宛計 14 回マウスに皮下投与した。Catalase は原液を生理食塩液で希釈し、SOD と同じスケジュールで投与した。Allopurinol は 0.5% CMC-Na 溶液に懸濁し、ストレス負荷期間中毎日 1 日 1 回宛計 7 回マウスに経口投与した。また、非ストレスマウスに対しても同様のスケジュールで各薬物を投与した。なお、対照群のマウスには各薬物の溶媒のみを投与した。

## 5. 血漿中過酸化脂質量の測定

Yagi<sup>8,7)</sup> に従い、血漿中のチオバルビツール酸反応性物質 (thiobarbituric acid-reactive substances; TBARS) を蛍光分光光度法により定量し、脂質過酸化の指標とした。すなわち、20 倍希釈した PPP 0.5 ml に phosphotungstic acid を添加することにより血漿脂質を蛋白とともに沈殿させた後、沈渣に蒸留水 4 ml および 0.335% thiobarbituric acid 1 ml を添加し 95 °C で 1 時間反応させた。この反応生成物 (蛍光物質) を 5 ml の n-butanol で抽出し、蛍光強度を励起波長 515 nm、蛍光波長 553 nm で測定した。なお結果は、血漿 1 ml あたりの malondialdehyde 量 (nmol) として示した。

## 6. 組織中過酸化脂質量の測定

動物 (ラットおよびマウス) を断頭により致死させ、全脳、心臓、肺および十二指腸をすばやく摘出し、生理食塩水で洗浄後、湿重量を測定した。次いで、Ohkawa<sup>8,8)</sup> の方法に準じて、各組織を 9 容量の 1.15% KCl 溶液中でホモジナイズし、この一部 (0.2 ml) を 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml および 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5 ml と混合した。これに 0.8% thiobarbituric acid 1.5 ml および 蒸留水 0.6 ml を添加し 95 °C で 1 時間反応させ、反応生成物を n-butanol と pyridine の混液 (15:1) で抽出後、上記 5. と同条件で蛍光測定を行った。結果は、湿重量 (g) あたりの malondialdehyde 量 (nmol) として示した。

その他、記載のないものについては前章までと同様の方法で行った。

### Ⅲ 実験結果

#### 1. ラットおよびマウスにおいて SART ストレスにより誘発される血小板数、血漿 fibrinogen 量および FVIII:C 活性の変化の比較

Fig.23 は止血系の異常をラットとマウスで比べたものである。各パラメーターの絶対値は両動物種間でかなり異なっていたが、SART ストレスによる血小板数、fibrinogen 量および FVIII:C 活性の変化の大きさは、それぞれ 22-26%、34-37% および 27-32% で、種差はほとんど認められなかった。

#### 2. Superoxide dismutase (SOD) の効果

Fig.24 は、SOD を 1 日 2 回宛 7 日間反復皮下投与した場合の血小板数への影響を示している。SOD 30,000 U/kg の反復投与は、非ストレスマウスでは何ら影響を示さなかったが、ストレスによる血小板数の減少を有意に抑制した。また、ストレスによる変化に対する薬物の阻止効果の程度を意味する S/N 比（ストレス群の非ストレス群の値に対する比）は、対照群では 0.8 であったのが SOD 30,000 U/kg 処置群では

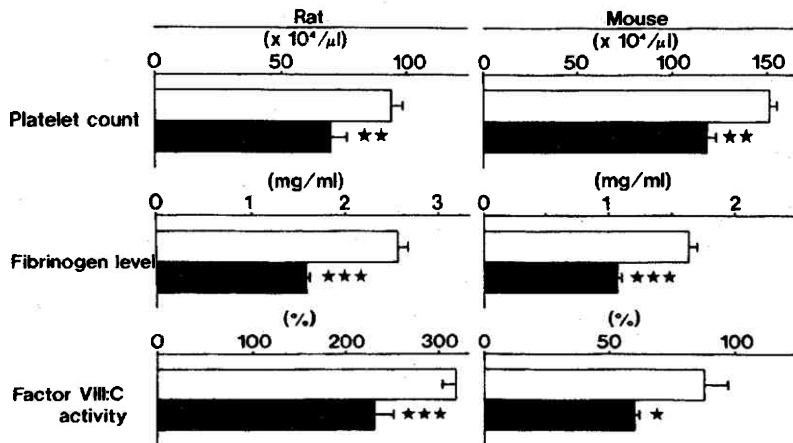


Fig. 23. Platelet count, fibrinogen level and coagulation factor VIII:C activity in rats and mice exposed to SART stress. Open column, non-stress; closed column, SART stress. n = 5-8 (rat) and 6 (mouse). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

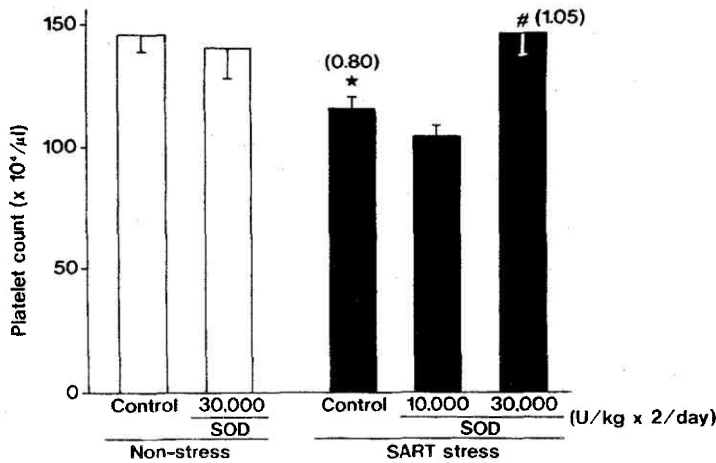


Fig. 24. Effect of repeated treatment with superoxide dismutase on SART stress-induced thrombocytopenia in mice. Superoxide dismutase (SOD) was administered s.c. twice a day during 7-day exposure to stress. Figures in parentheses indicate the ratio, stress/non-stress. n = 11 (control group) and 5 or 6 (dosed group). \*P<0.05 vs. the non-stressed control; #P<0.05 vs. the SART-stressed control.

Table 9. Effect of repeated treatment with superoxide dismutase on decreases in plasma fibrinogen level and factor VIII:C activity in SART-stressed mice.

(U/kg x 2/day)	Fibrinogen level (mg/ml)		
	Non-stress (N)	Stress (S)	Ratio (S/N)
Control	1.90 ± 0.07	1.36 ± 0.09**	0.72
SOD 10,000		1.26 ± 0.08	
SOD 30,000	2.44 ± 0.20**	2.08 ± 0.09##	0.85

(U/kg x 2/day)	Factor VIII:C activity (%)		
	Non-stress (N)	Stress (S)	Ratio (S/N)
Control	82.0 ± 2.7	62.9 ± 4.0*	0.77
SOD 10,000		65.2 ± 5.4	
SOD 30,000	95.6 ± 8.7	90.2 ± 8.5##	0.95

Superoxide dismutase (SOD) was administered s.c. twice a day during 7-day exposure to stress. n = 8-11 (control group) and 5 or 6 (dosed group). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. the non-stressed control; ##P<0.01 vs. the SART-stressed control.

1.05 となった。すなわち、SART ストレスマウスにおける血小板数の減少は SOD の反復投与により完全に阻止された。

Table 9 に、血漿 fibrinogen 量および FVIII:C 活性に対する SOD の効果を示した。SOD 30,000 U/kg の反復投与により非ストレス、ストレス両マウスの血漿 fibrinogen 量は有意に増加したが、対照群では 0.72 であった S/N 比が 0.85 に上昇した。また、同用量の SOD によっては、非ストレスマウスの FVIII:C 活性は有意な影響をうけなかったが、ストレスによる同活性の低下は有意に阻止され、S/N 比は 0.77 から 0.95 に上昇した。

なお、SOD は 10,000 U/kg の用量ではいずれのパラメーターに対しても有意な影響をおよぼさなかった。

### 3. Catalase の効果

Fig.25 にみられるように、catalase は、4,000 および 40,000 U/kg の用量で SART ストレスマウスの血小板数を増加させる傾向を示し、S/N 比を上昇させた。

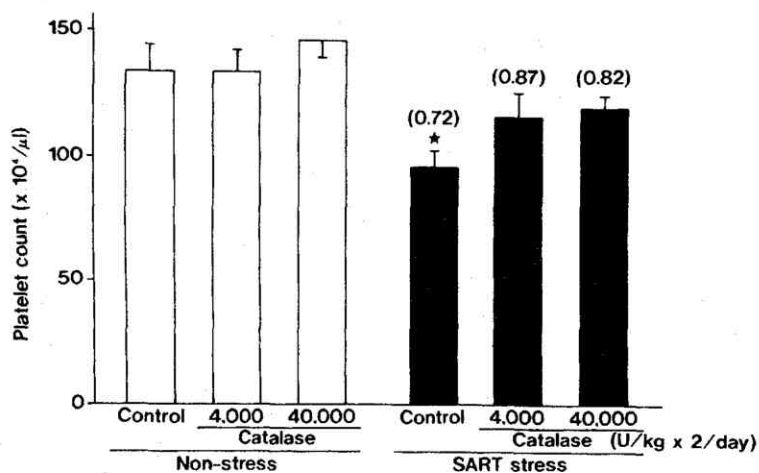


Fig. 25. Effect of repeated treatment with catalase on SART stress-induced thrombocytopenia in mice. Catalase was administered s.c. twice a day during 7-day exposure to stress. Figures in parentheses indicate the ratio, stress/non-stress. n = 5-7.

\*P<0.01 vs. the non-stressed control.



Table 10. Effect of repeated treatment with catalase on decreases in plasma fibrinogen level and factor VIII:C activity in SART-stressed mice.

(U/kg × 2/day)	Fibrinogen level (mg/ml)		Ratio (S/N)
	Non-stress (N)	Stress (S)	
Control	1.44 ± 0.05	1.07 ± 0.06**	0.74
Catalase 4,000	1.42 ± 0.05	1.22 ± 0.10	0.86
40,000	1.58 ± 0.05	1.31 ± 0.05##	0.83

(U/kg × 2/day)	Factor VIII:C activity (%)		Ratio (S/N)
	Non-stress (N)	Stress (S)	
Control	71.1 ± 3.6	54.8 ± 3.0**	0.77
Catalase 4,000	64.8 ± 3.3	51.2 ± 3.5	0.79
40,000	71.8 ± 2.6	60.4 ± 2.7	0.84

Catalase was administered s.c. twice a day during 7-day exposure to stress. n = 9-12 (control group) and 5-8 (dosed group). \*\*P<0.01 vs. the non-stressed control; ##P<0.01 vs. the SART-stressed control.

Table 10 は fibrinogen 量と FVIII:C 活性への影響を調べた結果であるが、catalase 40,000 U/kg の反復投与は、ストレスラットの fibrinogen 量のみを有意に増加させた。一方、FVIII:C 活性については、catalase の投与により S/N 比は若干上昇したものの有意ではなかった。

#### 4. Allopurinol の効果

Fig.26 に示したように、allopurinol の連日経口投与では、非ストレスマウスにおいては有意な影響は認められなかったが、ストレスによる血小板数の減少が有意に抑制され、S/N 比は 0.70 から 0.86 にまで上昇した。

Table 11 は非ストレス、ストレス両マウスの fibrinogen 量と FVIII:C 活性におよぼす allopurinol の効果を示したものである。Allopurinol は、10 mg/kg では有意な影響を示さなかったが、20 mg/kg ではストレスマウスのみならず非ストレスマウスの両パラメーターをも著しく増加させ、ストレスによる変化に対する特異的な阻止効果はあまり認められなかった。

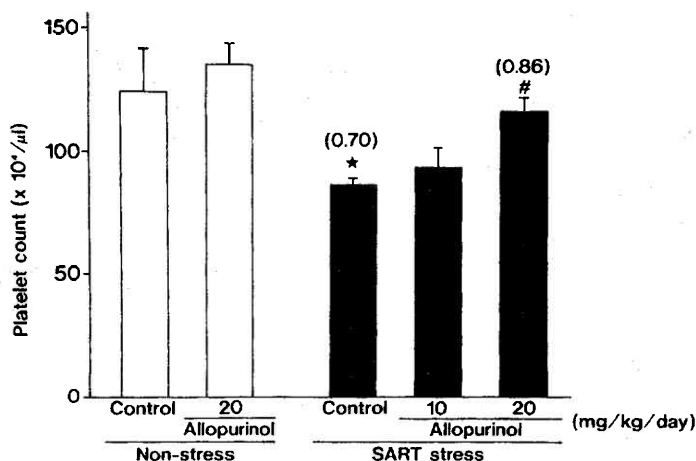


Fig. 26. Effect of repeated treatment with allopurinol on SART stress-induced thrombocytopenia in mice. Allopurinol was administered orally once a day during 7-day exposure to stress. Figures in parentheses indicate the ratio, stress/non-stress.  $n = 6$ . \* $P < 0.05$  vs. the non-stressed control; # $P < 0.05$  vs. the SART-stressed control.

Table 11. Effect of repeated treatment with allopurinol on decreases in plasma fibrinogen level and factor VIII:C activity in SART-stressed mice.

(mg/kg/day)	Fibrinogen level (mg/ml)		
	Non-stress (N)	Stress (S)	Ratio (S/N)
Control	1.66 ± 0.04	1.26 ± 0.06**	0.76
Allopurinol 10		1.54 ± 0.09	
20	2.45 ± 0.17**	1.87 ± 0.17##	0.76
(mg/kg/day)	Factor VIII:C activity (%)		
	Non-stress (N)	Stress (S)	Ratio (S/N)
Control	84.2 ± 4.0	66.4 ± 3.5*	0.79
Allopurinol 10		75.3 ± 4.8	
20	107.9 ± 9.9**	93.0 ± 6.0##	0.86

Allopurinol was administered s.c. once a day during 7-day exposure to stress.  $n = 15-16$  (control group) and 9-10 (dosed group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. the non-stressed control; ## $P < 0.01$  vs. the SART-stressed control.

## 5. 血漿ならびに組織中過酸化脂質量の変化

SART ストレスを負荷したラットとマウスの血漿および組織中の脂質過酸化の程度を、TBARS 値を指標として Fig.27 に示した。血漿 TBARS 値については、ラットおよびマウスのいずれにおいてもストレス、非ストレス両群間で有意な差は認められず、血中では脂質の過酸化は生じていないことが示唆された。一方、組織では、脳、肺および十二指腸の TBARS 値はストレスによって変化しなかったが、心臓の TBARS 値はラット、マウスいずれにおいても有意に増加しており、ストレスの影響は臓器によって異なっていた。

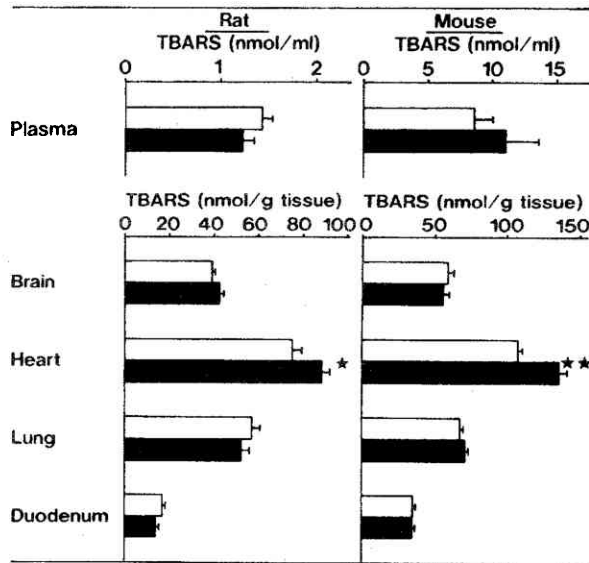


Fig. 27. Plasma and tissue lipid peroxide levels in rats and mice exposed to SART stress. Open column, non-stress; closed column, SART stress. TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) values were expressed as malondialdehyde concentrations.  $n = 7-9$  (plasma TBARS) and 5 or 6 (tissue TBARS). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

## IV 考 察

本章において得られた結果より、SART ストレスによる止血系の異常の発現あるいは発達過程において、生体内でのフリーラジカルの過剰生成が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

SOD の反復投与がストレスによる血小板数の減少および FVIII:C 活性の低下を特異的に阻止したこと、さらに、ストレスマウスにおける fibrinogen 量の SOD による増加の程度が、非ストレスマウスにおけるそれに比べ大きかったことから、SART ストレスによるこれらの異常の発現への superoxide anion の関与が示唆される。また、SOD が非ストレスマウスの fibrinogen 量をも有意に増加させたことは、マウスでは生理的条件下（非ストレス状態）においても superoxide が常に生成されており、これが血中の fibrinogen を減少させる方向に作用していることを思わせる結果である。一方、catalase もストレスマウスにおける血小板数や fibrinogen 量の減少を抑制する傾向を示したが、SOD の効果に比べるとあまり顕著ではなかった。このことより、ストレスによる止血系の異常発現における hydrogen peroxide の役割は superoxide anion に比べると小さいと考えられるが、これを結論づけるには違った角度からの新たな検討を要すると思われる。

Allopurinol が SART ストレスマウスにおける血小板数の減少を阻止したことは、このストレス変化の発現に xanthine oxidase 経路を介して産生されるフリーラジカルが関与することを示唆する結果といえる。一方、allopurinol はストレスマウスのみならず、非ストレスマウスの fibrinogen 量および FVIII:C 活性を著しく増大させ、両マウス間で効果の程度にあまり差は認められなかったことより、全てのパラメーターのストレス変化に xanthine oxidase 経路を介するフリーラジカル生成のみが関与するとは考え難く、他の経路によるラジカル産生についても考慮する必要があるように思われる。また、マウスの血中 xanthine oxidase 活性は、ラットやヒトのそれに比べてはるかに高いとの報告<sup>8,9)</sup>を考慮すると、マウスでは生理的条件下（非ストレス下）においても xanthine oxidase 経路を介してかなりのフリーラジカルが生成され、fibrinogen や FVIII:C などの凝固因子を減少させる方向に作用しているのではないかと考えられる。

土屋ら<sup>56)</sup>は、ラットの胃粘膜に断続的な電気刺激を与えることにより微小循環障害を惹起すると、局所血にDIC様の変化が認められることを報告している。鈴木ら<sup>90)</sup>は、同じ微小循環障害モデルを用い、障害局所において xanthine oxidase 活性や myeloperoxidase 活性の上昇とともに好中球の活性酸素生成能の上昇を認めている。また、Kuroseら<sup>91)</sup>によれば、SOD および allopurinol は同モデルの障害部位の局所血にみられる TPA 活性の上昇を阻止する。これらの報告は、“自律神経系（特に交感神経系）の断続的過緊張 → 断続的な局所虚血 → フリーラジカルの局所的過剰生成 → 血管内皮の障害 → 局所血における DIC 様変化”という一連の生体内反応を実験的に証明したものと見える。本章において著者が得た知見は、SART ストレス動物では同様の現象が全身的に生じている可能性を示唆している。すなわち、反復して起こる環境温度の急変により自律神経系、特に交感神経系の過緊張と緊張低下が繰り返されて、様々な臓器において断続的な循環障害、つまり虚血 - 再環流が起こる。これにより xanthine oxidase 系をはじめとするラジカル産生系が活性化され、生体の処理能力を越えて生成される過剰のフリーラジカルによって血管内皮が障害される結果、血小板の粘着・凝集や凝固・線溶系の活性化などの DIC 様の変化が全身的に起こるのではないかと考えられる。換言すれば、本研究は前述の局所循環障害モデルで提唱された一連の生体反応が、長期の環境ストレスによって全身性に徐々に進行する可能性を示唆しており、臨床との接点を求める上で重要な所見といえる。

DIC モデルとしてよく用いられるラットのエンドトキシンショックの発現が、SOD、catalase および allopurinol によって抑制されることが報告されている<sup>85, 86)</sup>。また、このモデルでは血中の過酸化脂質量に増加が認められる<sup>84)</sup>が、この変化は止血系パラメーターの激変に比べると軽微である。SART ストレス動物における止血系の変化の程度はいずれも 20-30% であり、エンドトキシンショック時ほどの致命的なものではないことを考慮すると、この動物では血中の脂質過酸化を増加させるほどの活性酸素は生じていないのではないかと考えられる。しかし、SART ストレス動物では血清中のほとんどの脂質量自体がかなり減少している<sup>13)</sup>ことから、たとえ相対的に脂質過酸化が進行していても絶対量の増加として捉えることができなかつた可能性も考えられる。

ラットおよびマウスの組織中過酸化脂質量は、脳、肺および十二指腸ではストレスによって変化しなかつたが、心臓では有意に増加していた。SART ストレス動物で

は心電図異常が報告されている<sup>10)</sup>ことを考慮すると、この心臓での脂質過酸化の進行は非常に興味深い。虚血性心疾患では心臓における脂質の過酸化が重要な役割を果たしている可能性が指摘されている<sup>8,2)</sup>。また、気温変動の程度と心疾患による死亡率との間に相関性が認められている<sup>3)</sup>。これらのことから、気温変動によって生体内で産生されるフリーラジカルが、止血系の異常を惹起するとともに、心臓における脂質過酸化を促進し、心疾患の増悪因子として作用する可能性が示唆される。このように、SARTストレス動物は長期の気温変動と心疾患の関係を明らかにする上においても有用なモデルとなりうるのではないかと考えられる。

## V 小 括

- 1) SARTストレスの負荷は、ラット、マウスいずれにおいても同程度の血小板数、血漿 fibrinogen 量および FVIII:C 活性の減少を誘発した。
- 2) SOD 30,000 U/kg の反復投与は、ストレスによる血小板数および血漿 fibrinogen 量の減少ならびに FVIII:C 活性の低下を抑制した。
- 3) Catalase (4,000-40,000 U/kg) にもストレスによる上記変化を抑制する傾向が認められたが、SOD の効果ほど顕著ではなかった。
- 4) Allopurinol (20 mg/kg) の連日投与は、ストレスによる血小板数の減少を抑制したが、fibrinogen 量および FVIII:C 活性については非ストレス、ストレス両マウス同様に増大させた。
- 5) SART ストレスラットおよびマウスでは、血漿中過酸化脂質量は変化していなかったが、心臓の組織中過酸化脂質量は有意に増加していた。

以上の結果より、SART ストレスにより xanthine oxidase 経路およびその他の経路を介するフリーラジカル、特に superoxide anion の生成が促進され、これが止血系の異常の発現に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。また、SART ストレス動物は気温変動と虚血性心疾患の関係を解明する上で有用なモデルとなりうることが示唆された。

## 総 括

循環器系疾患は、その発現あるいは進行過程においてストレスの影響を大きく受けている。例えば、“タイプ A” とよばれるストレス状態に陥りやすい行動パターンを示す性格のヒトは冠動脈障害にかかりやすい<sup>9,3)</sup>。また、脳血管障害や心疾患による死亡率は気温変動の大きい時期、地域で高い<sup>3)</sup>。これらの知見をもとにストレスの血行力学的 (hemodynamic) 影響や血液性状、特に止血機構への影響が多くの臨床研究により調べられてきたが、そのほとんどは簡単な急性ストレス時の一過性の変化を捉えたものである。疾病との関係を明らかにするためには、より長期の慢性ストレスが生体におよぼす影響を調べる必要があるが、ヒトでの研究には限界があり、実験動物を用いた基礎的な研究に頼らざるを得ない。実験動物に長期のストレスを負荷する場合、最も問題となるのは“馴れ”であるが、SART ストレス動物では馴れの現象による変化の消失がみられず、様々な生理的、生化学的変化が長期に亘って持続しており、この動物は生体におよぼす慢性ストレスの影響を調べる上で有用なモデルとなりうる。今回著者は、この SART ストレス動物が止血機構に様々な異常 (Table 12) を有していることを見だし、慢性ストレス、特に長期に亘る気温変動と止血系との関係の一端を明らかにすることができた。

SART ストレス動物では、出血時間の著しい延長とともに血小板数の減少および骨髄巨核球の増加が持続的に認められた。1時間の RWIS 負荷によっても同程度の血小板数減少が認められたが、この変化は一過性であり、また出血時間の著明な延長を伴っていなかった。一方、他の急性ストレスの多くは血小板数をむしろ増加させ、また SART ストレス以外の慢性型ストレスは血小板数および巨核球数に影響をおよぼさなかった。すなわち、この出血傾向を伴う血小板数の減少は SART ストレス動物の特徴的变化と考えられた。また、SART ストレス動物における血小板数減少が摘脾によって阻止されなかったこと、さらに骨髄巨核球数はストレスによりむしろ増加していたことから、この血小板数減少の発現には脾臓機能や血小板産生能の変化よりもむしろ血管内血小板消費の亢進など他の要因の関与が大きいと考えられた。

血小板の機能面では、SART ストレス動物では ADP および collagen 刺激に対する凝集能の低下が *in vivo* および PRP 中において認められ、さらに放出能の低下も認め

Table 12. Summary of hemostatic profiles in SART-stressed animals

Parameters	SART stressed		DIC
	mouse	rat	human
Bleeding time	↑		↑
-----			
<b>Platelet</b>			
Platelet count	↓	↓	↓
Megakaryocyte count	↑		
<b>Aggregation</b>			
In vivo		↓	
In vitro (using PRP)		↓	↓
(after washing)		→	
<b>Secretion (in vitro, using PRP)</b>			
ATP		↓	
Serotonin		↓	
<b>Content</b>			
ATP		↓	↓
ADP		→	↓
Serotonin		↓	
Circulating platelet aggregates		↑	↑
-----			
<b>Coagulation-Fibrinolysis</b>			
APTT		↑	↑
PT		→	↑
TT	↑	↑	↑
Fibrinogen	↓	↓	↓
Factor VIII:C	↓	↓	↓
ATIII		→	↓
<b>ELT</b>			
α <sub>2</sub> -PI		→	↓

↑ , increased or prolonged; ↓ , decreased or shortened; → , no change.



られた。また、血小板中の ATP および serotonin 量は減少していたが、ADP 量に変化は認められなかった。一方、循環血中に高濃度 EDTA によって解離しうる凝集血小板が検出されたことより、SART ストレス動物では血管内で血小板が何らかの刺激によって活性化されており、マイルドな DIC 様状態にある可能性が考えられた。しかし、洗浄血小板の凝集能はストレスによって変化していなかったことから、疲弊あるいは老弱血小板といった本質的な機能障害をもつ血小板が増加したとは考え難く、血漿環境や血小板膜表面上の変化などが *in vivo* や PRP 中での血小板の機能低下に関係しているのではないかと考えられた。

SART ストレス動物の凝固・線溶系においては、APTT および TT の延長、血漿 fibrinogen 量の減少、FVIII:C 活性の低下などが認められ、この動物では血漿の凝固活性、特に内因性凝固活性が低下していることが明らかとなった。また、ELT はストレスによって短縮しており、線溶活性の亢進も示唆された。

Table 12 は、SART ストレスによって誘発される止血機構の上記変化をまとめたものであるが、これらの所見はこの動物がマイルドな DIC 様状態にある可能性を示唆するものといえる。DIC の発現あるいは進行過程において活性酸素が重要な役割を果たすことが報告されている<sup>84-86)</sup>が、今回、ラジカル補集剤である SOD や catalase の反復投与がストレスによる止血系の異常の発現を抑制し、また xanthine oxidase 阻害剤である allopurinol にも一部同様の効果が認められたことから、SART ストレス動物がマイルドな DIC 様症状を呈するまでの段階においてもフリーラジカルが何らかの役割を担っている可能性が考えられる。このことは、“自律神経系の断続的過緊張 → 断続的な局所虚血 → フリーラジカルの局所的過剰生成 → 血管内皮の障害 → 局所血における DIC 様変化”という局所循環障害モデルで提唱された一連の生体反応<sup>56)</sup>が、SART ストレスによって徐々に全身性に進行する可能性を示唆するものといえる。すなわち、反復して起こる環境温度の急変により自律神経系、特に交感神経系の過緊張と緊張低下が交互に繰り返されて、様々な臓器において断続的な循環障害、つまり虚血-再環流がおこる。これにより xanthine oxidase 系をはじめとするラジカル産生系が活性化され、過剰に生成されたフリーラジカルが血管内皮細胞を損傷する結果、血小板や凝固・線溶系の活性化といった DIC 様の変化が全身的に起こるのではないかと考えられる。

さらに、SART ストレス動物では、血中の過酸化脂質量には変化はみられなかつ

たが、心臓の組織中過酸化脂質量が有意に増加していた。SARTストレス動物では心電図異常が認められている<sup>10)</sup>こと、また心臓における脂質過酸化が虚血性心疾患の発現に一部関与するとされている<sup>92)</sup>ことを考慮すると、この動物は長期の気温変動と心疾患との関係を明らかにする上において有用なモデルとなりうるのではないかと考えられる。

## 引用文献

- 1) 亀山 茂：ストレスとはなにか. 歯界展望 **75**, 786-790 (1990)
- 2) 土屋雅春, 末松 誠, 中村正彦, 浅古 寛：ストレスと消化器疾患－Reilly 現象からみた出血性消化器病変の形成機序. 歯界展望 **75**, 805-815 (1990)
- 3) Bull, G.M. and Morton, J.: Environment, temperature and death rates. *Age Ageing* **7**, 210-224 (1978)
- 4) 喜多富太郎, 秦 多恵子, 米田良三, 尾陰多津子：環境温度リズムの変更によるストレス（SARTストレス）とマウス・ラットの生体機能変化. 日薬理誌 **71**, 195-210 (1975)
- 5) Hata, T., Kita, T., Higashiguchi, T. and Ichida, S.: Total acetylcholine content, and activities of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in brain and duodenum of SART-stressed (repeated cold-stressed) rat. *Japan. J. Pharmacol.* **41**, 475-485 (1986)
- 6) Hata, T., Kita, T., Kamanaka, Y., Honda, S., Kakehi, K., Kawabata, A. and Itoh, E.: Catecholamine levels in the brain of SART (repeated cold)-stressed rats. *J. Auton. Pharmacol.*, **7**, 257-266 (1987)
- 7) Hata, T., Itoh, E. and Kawabata, A.: Changes in CNS levels of serotonin and its metabolite in SART-stressed (repeatedly cold-stressed) rats. *Japan. J. Pharmacol.* **56**, 101-104 (1991)
- 8) Hata, T., Kita, T., Iida, J., Yoshida, H., Uchida, S. and Ishida, S.: Decrease of ACh response in isolated duodenum from repeated cold stressed (SART stressed) mice. *J. Pharm. Dyn.* **1**, 338-340 (1978)
- 9) 秦 多恵子, 喜多富太郎, 浪松昭夫, 伊藤栄次, 小田泰雄：SART stress 負荷ラットにおける血圧・血流の異常とそれに及ぼす Neurotropin その他の薬物作用. 日薬理誌 **79**, 335-342 (1982)
- 10) 秦 多恵子, 喜多富太郎, 伊藤栄次, 浪松昭夫：SART stress (repeated cold stress) マウスの ECG 変化とそれに対する Neurotropin などの作用. 日薬理誌 **79**, 487-492 (1982)

- 11) Kita, T., Hata, T., Itoh, E. and Harada, N.: Methacholine- and Adrenaline-induced arrhythmias in repeatedly cold-stressed mice. *Japan. J. Pharmacol.* **35**, 327-329 (1984)
- 12) Hata, T., Kita, T., Kawabata, A., Itoh, E. and Nishimura, Y.: Changes of tissue blood flow in mice loaded with SART (repeated cold) stress or restraint and water immersion stress and the effect of administered Neurotrophin. *Japan. J. Pharmacol.* **41**, 69-79 (1986)
- 13) 米田良三, 菅原國一, 喜多富太郎, 秦多恵子, 飯田順子, 石田定広, 大場康寛 : SART ストレス動物の臓器および血液臨床化学的所見と牛痘ウイルス接種ウサギの炎症皮膚抽出物 (Neurotrophin<sup>®</sup>) の作用. *応用薬理* **18**, 587-596 (1979)
- 14) 青沼 繁, 小浜靖弘, 陳 英俊, 屋敷伸治, 江川 宏 : Ephedrine-isopropylantipyrene の浮腫および血管透過性亢進に対する影響. *薬誌* **96**, 1313-1321 (1976)
- 15) 古沢新平, 磯部淳一 : 「新臨床検査技師講座 10 臨床血液学」 上田 智, 吉野二男, 清水加代子 編, 医学書院, 東京 (1986)
- 16) Hata, T., Nishimura, Y., Kita, T., Kawabata, A. and Itoh, E.: Electrocardiogram in rats loaded with SART stress (repeated cold stress). *Japan. J. Pharmacol.* **45**, 365-372 (1987)
- 17) Hata, T., Nishimura, Y., Kita, T., Itoh, E. and Kawabata, A.: The abnormal open-field behavior of SART-stressed rats and effects of some drugs on it. *Japan. J. Pharmacol.* **48**, 479-490 (1988)
- 18) Kita, T., Hata, T., Iida, J., Yoneda, R. and Ishida, S.: Decrease in pain threshold in SART stressed mice. *Japan. J. Pharmacol.* **29**, 479-482 (1979)
- 19) Hata, T., Kita, T., Itoh, E. and Harada, N.: Experimental studies on optimal conditions of loading SART stress (repeated cold stress) upon animals. *Japan. J. Psychosom. Med.* **24**, 257-266 (1984)
- 20) Brecher, G. and Cronkite, E.P.: Morphology and enumeration of human blood platelets. *J. Appl. Physiol.* **3**, 365-385 (1950)
- 21) 野村武雄 : 骨髓巨核球の分化. *日血会誌* **37**, 627-637 (1974)
- 22) O'Neil, C.: Examination of the causes of early pregnancy-associated thrombocytopenia in mice. *J. Reprod. Fertil.* **73**, 567-577 (1985)
- 23) Sarajas, H.S.S., Kontinen, A. and Frick, M.H.: Thrombocytosis evoked by exercise.

- Nature **192**, 721–722 (1961)
- 24) Libre, E.P., Cowan, D.H., Watkins, S.P., Shulman, N.R.: Relationships between spleen, platelets and factor VIII levels. *Blood* **31**, 358–368 (1968)
  - 25) Cash, J.D.: Platelets, fibrinolysis and stress. *Thromb. Diath. Haemorrh. [Suppl.]* No.**51**, 93–104 (1972)
  - 26) Haft, J.I.: Catecholamines, stress, platelets and coronary artery disease. *In Platelets, Prostaglandins and Cardiovascular Disease*, Edited by Mehta, J. and Mehta, P.F., p.265–277, Futura, New York (1981)
  - 27) Ohri, V.C., Chatterji, J.C., Das, B.K., Akhtar, M., Tewari, S.C., Bhattacharji, P. and Behl, A.: Effect of submaximal exercise on haematocrit, platelet count, platelet aggregation and blood fibrinogen levels. *J. Sports Med.* **23**, 127–130 (1983)
  - 28) Lande, K., Gjesdal, K., Fonstelién, E., Kjeldsen, E. and Eide, I.: Effects of adrenaline infusion on platelet number, volume and release reaction. *Thromb. Haemostas.* **54**, 450–453 (1985)
  - 29) Nordoy, A. and Rorvik, T.O.: Some effects of adrenaline on rat platelets in vitro and in vivo. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. [Suppl.]* **84**, 151–158 (1965)
  - 30) Hata, T., Itoh, E., Kamanaka, Y., Kawabata, A. and Honda, S.: Plasma catecholamine levels in SART-stressed rats and effects of drugs on stress-induced alteration in plasma and brain catecholamine levels. *J. Auton. Pharmacol.* **11**, 15–25 (1991)
  - 31) Jackson, C.W. and Edwards, C.C.: Biphasic thrombopoietic response to severe hypobaric hypoxia. *Br. J. Haematol.* **35**, 233–244 (1977)
  - 32) Gorczynska, E. and Wegrzynowicz, R.: The effect of magnetic fields on platelets, blood coagulation and fibrinolysis in guinea pigs. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **15**, 459–468 (1983)
  - 33) Yoshihara, H., Yamamoto, T. and Mihara, H.: Changes in coagulation and fibrinolysis occurring in dogs during hypothermia. *Thromb. Res.* **37**, 503–512 (1985)
  - 34) Baltrusch, H.J.F., Aulmann, H.M., Andres, J. and Stangel, W.: Stress, personality and platelet behavior. *Int. J. Psychophysiol.* **7**, 124–127 (1989)
  - 35) Pegrum, G.D., Harrison, K.M., Shaw, S., Haselton, A. and Wolff, S.: Effect of prolonged exercise on platelet adhesiveness. *Nature* **213**, 301–302 (1967)

- 36) Siess, W., Lorenz, R., Roth, P. and Weber, P.C.: Plasma catecholamines, platelet aggregation and associated thromboxane formation after physical exercise, smoking or norepinephrine infusion. *Circulation* **66**, 44-48 (1982)
- 37) Levine, S.P., Towell, B.L., Suarez, A.M., Knieriem, L.K., Harris, M.M. and George, J.N.: Platelet activation and secretion associated with emotional stress. *Circulation* **71**, 129-1134 (1985)
- 38) 井下勝男, 今岡真義, 小川睦子, 笹隈富治子, 石井啓子, 神前五郎: 血小板凝集能測定用 collagen suspension について. *血液と脈管* **7**, 719-726 (1976)
- 39) 松村晴希, 寺下善一, 西川浩平, 今井祥雄: ラットにおけるコラーゲン誘発心電図変化に及ぼすトロンボキサン合成酵素阻害剤 CV-4151 の改善作用. *日薬理誌* **87**, 397-404 (1986)
- 40) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
- 41) Born, G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**, 927-929 (1962)
- 42) Innocenti, I.R., Poggi, A. and de Gaetano, G.: Platelet aggregation and haemolysis induced in rats by intravenous infusion of ADP - Effect of potentially antithrombotic drugs. *Scand. J. Haemat.* **13**, 331-337 (1974)
- 43) Feinman, R.D., Lubowsky, J., Charo, I.F. and Zabinski, M.P.: The lumi-agregometer: A new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *J. Lab. Clin. Med.* **90**, 125-129 (1977)
- 44) Holmsen, H. Storm, E. and Day, H.J.: Determination of ATP and ADP in blood platelets: A modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal. Biochem.* **46**, 489-501 (1972)
- 45) Drummond, A.H. and Gordon, J.L.: Rapid, sensitive microassay for platelet 5-HT. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **31**, 366-367 (1974)
- 46) Tomita, T., Umegaki, K. and Hayashi, E.: Basic aggregation properties of washed rat platelets: Correlation between aggregation, phospholipid degradation, malondialdehyde, and thromboxane formation. *J. Pharmacol. Methods*, **10**, 31-44, 1983.
- 47) Baenziger, N.L. and Majerus, P.W.: Isolation of human platelets and platelet surface

- membranes. *Methods Enzymol.* **31**, 149-155 (1974)
- 48) 田上憲次郎：血小板の分離と洗浄. 検査と技術 **12**, 1105-1112 (1984)
- 49) Mustard, J.F., Perry, D.W., Ardlie, N.G. and Packham, M.A.: Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br. J. Haematol.* **22**, 193-204 (1972)
- 50) 白井敏明, 佐々木禎一, 高坂 彰：「新臨床検査技師講座9 臨床化学」上田 智, 吉野二男, 清水加代子 編, 医学書院, 東京 (1985)
- 51) Martins, M.A., Martins, P.M.R.S., Castro Faria Neto, M.H.C., Bozza, P.T., Dias, P.M.F.L., Cordeiro, R.S.B. and Boris Vargaftig, B.: Intravenous injections of PAF-acether induce platelet aggregation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **149**, 89-96 (1988)
- 52) Wu, K.K. and Hoak, J.C.: A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet* **2**, 924-926 (1974)
- 53) Bensoussan, D., Levy-Toledano, S., Passa, P., Caen, J. and Canivet, J.: Platelet hyperaggregation and increased plasma level of von Willebrand factor in diabetics with retinopathy. *Diabetologia*, **11**, 307-312 (1975)
- 54) Yamazaki, H., Motomiya, T., Watanabe, C., Miyagawa, N., Yahara, Y., Okawa, Y. and Onozawa, Y.: Consumption of larger platelets with decrease in adenine nucleotide content in thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and postoperative state. *Thromb. Res.* **18**, 77-88 (1980)
- 55) McGreger, L., Morazain, R. and Renaud, S.: Platelet functions and fatty acid composition of platelet phospholipids in spontaneously hypertensive rats fed saturated or poly unsaturated fats. *Atherosclerosis* **38**, 129-136 (1981)
- 56) 土屋雅春, 末松 誠, 三浦総一郎, 永田博司：侵襲時生体反応としての微小循環障害 - DIC (播種性血管内凝固症候群) の今日的理解. 生体の科学 **36**, 211-216 (1985)
- 57) Holmsen, H.: Platelet metabolism and activation. *Sem. Hematol.* **22**, 219-240 (1985)
- 58) Holmsen, H., Day, H.J. and Storm, E.: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets VI. Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **186**, 254-266 (1969)
- 59) Tomita, T., Umegaki, K. and Hayashi, E.: Hypoaggregability of washed platelets from stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). *Stroke* **15**, 70-75 (1984)

- 60) 末広 謙, 魚本智子, 西田恭治, 小山哲司, 中島督夫, 木村信彦, 垣下栄三, 永井清保: 高脂血症およびこれに伴う動脈硬化の血栓症発現における血小板の関与について. *血液と脈管* **13**, 269-272 (1982)
- 61) Belitser, N.V., Anischuk, M.G., Veklich, Y.I., Pozdnyakova, T.M., Gorkun, O.V. and Medved, L.V.: Fibrinogen-containing membran-associated structures arising at the surfaces of ADP-stimulated blood platelets. *Thromb. Res.* **59**, 327-338 (1990)
- 62) Mannucci, P.M., Gagnatelli, G. and D'alonzo, R.: Stress and blood coagulation. *Thromb. Diath. Haemorrh. [Suppl.] No.51*, 105-113 (1972)
- 63) Colwell, J.A.: Effects of exercise on platelet function, coagulation and fibrinolysis. *Diabetes Metab. Rev.* **1**, 501-512 (1986)
- 64) Wisniewski, K., Moniuszko-Jakoniuk, J., Buczko, W. and Braszko, J.: The effect of post-exercise activation of fibrinolytic and kinin-forming enzymes on the action and tissue distribution of certain drugs (I). *Acta Physiol. Pol.* **25**, 483-490 (1974)
- 65) Tomikawa, M., Ogawa, H. and Abiko, Y.: Experimental model of pulmonary thrombosis in rat. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **31**, 86-102 (1974)
- 66) Klüft, C., Brakman, P. and Veldhuyzen-Stolk, E.C.: Screening of fibrinolytic activity in plasma euglobulin fractions on the fibrin plate. *In Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombosis*, Edited by Davidson, J.F., Samana, M.M. and Desnoyers, P.C., Vol.2, p.57-65, Raven Press, New York (1976)
- 67) Gallimore, M.J., Tyler, H.M. and Shaw, J.T.B.: The measurement of fibrinolysis in the rat. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **26**, 295-310 (1971)
- 68) Lewis, J.H., Van Thiel, D.H., Hasiba, U., Spero, J.A. and Gavaler, J.: Comparative hematology and coagulation: Studies on rodentia (rats). *Comp. Biochem. Physiol.* **82A**, 211-215 (1985)
- 69) O'Brodovich, H.M., Andrew, M., Gray, G.W. and Coates, G.: Hypoxia alters blood coagulation during acute decompression in humans. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **56**, 666-670 (1984)
- 70) Mangum, M., Haymes, E.M. and Lipner, H.: Coagulation and fibrinolytic responses to exercise and cold exposure. *Aviat. Space Environ. Med.* **55**, 291-295 (1984)
- 71) Palmblad, J., Blomback, M., Egberg, N., Froberg, J., Karlsson, C.G. and Levi, L.:



- Experimentally induced stress in man: Effects on blood coagulation and fibrinolysis. *J. Psychosom. Res.* **21**, 87-92 (1977)
- 72) Chohan, I.S., Singh, I. and Rai, R.M.: Influence of noise on blood coagulation. *Thromb. Haemostas.* **51**, 22-23 (1984)
- 73) Takeda, A., Takada, Y., Mori, T. and Sakaguchi, S.: Prevention of severe bleeding by tranexamic acid in a patient with disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.* **58**, 101-108 (1990)
- 74) 前川 正 : 播種性血管内凝固症候群. 織田敏次, 阿部 裕, 中川昌一, 滝島 任, 堀内淑彦, 鎮目和夫, 古川俊之, 祖父江逸郎, 内野治人, 尾前照雄 編 「内科セミナー BLD4 出血・凝固異常」 p.231-267, 永井書店, 大阪 (1984)
- 75) 渡辺清明 : 出血異常診断の手順. *Medicina* **23**, 252-257 (1986)
- 76) Prowse, C.V. and MacGregor, I.R.: Regulation of the plasminogen activator level in blood. *In* Tissue-Type Plasminogen Activator (t-PA): Physiological and Clinical Aspects Vol. II, Edited by Kluft, C., p.49-68, CRC Press, Boca Raton, Florida (1988)
- 77) Prowse, C.V., Dow, R.C. and Fink, G.: A hypothalamic-pituitary system that stimulates the release of plasminogen activator in the rat. *Brain Res.* **299**, 133-138 (1984)
- 78) Kornecki, E., Ehrlich, Y.H., and Lenox, R.H.: Platelet-activating factor-induced aggregation of human platelets specifically inhibited by triazolobenzodiazepines. *Science* **226**, 1454-1456 (1984)
- 79) Emeis, J.J. and Kluft, C.: PAF-acether-induced release of tissue-type plasminogen activator from vessel walls. *Blood* **66**, 86-91 (1985)
- 80) Namm, D.H., Tadepalli, A.S. and High, J.A.: Species specificity of the platelet response to 1-o-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Thromb. Res.* **25**, 341-350 (1982)
- 81) Bull, G.M., Brozovic, M., Chakrabarti, R., Meade, T.W., Morton, J., North, W.R.S. and Stirling, Y.: Relationship of air temperature to various chemical, haematological, and haemostatic variables. *J. Clin. Pathol.* **32**, 16-20 (1979)
- 82) Keatinge, W.R., Coleshaw, S.R.K., Cotter, F., Mattock, M., Murphy, M. and Chelliah, R.: Increases in platelet and red cell counts, blood viscosity, and arterial pressure during mild surface cooling: factors in mortality from coronary and cerebral thrombosis

- in winter. *Br. Med. J.* **289**, 1405–1408 (1984)
- 83) Mustafa, M.K.Y., Khogali, M., Elkhatib, G., Attia, M., Gumaa, K., El-Din, A.N., Mahmoud, N.A. and Al-Adnani, M.: Sequential pathophysiological changes during heat stress and cooling in sheep. *In Thermal Physiology*, Edited by Hales, J.R.S., Raven Press, New York (1984)
- 84) Yoshikawa, T., Murakami, M., Furukawa, Y., Kato, H., Takemura, S. and Kondo, M.: Lipid peroxidation and experimental disseminated intravascular coagulation in rats induced by endotoxin. *Thromb. Haemostas.* **49**, 214–216 (1983)
- 85) Yoshikawa, T., Murakami, M., Yoshida, N., Seto, O. and Kondo, M.: Effects of superoxide dismutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb. Haemostas.* **50**, 869–872 (1983)
- 86) Yoshikawa, T., Murakami, M., Seto, O., Karimi, Y., Takemura, T., Tanigawa, T., Sugino, S. and Kondo, M.: Effects of superoxide dismutase and catalase and catalase on endotoxin shock. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **1**, 165–170 (1986)
- 87) Yagi, K.: A simple fluorometric assay of lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**, 212–216 (1976)
- 88) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351–358 (1979)
- 89) Al-Khaldidi, U.A.S. and Chaglassian, T.H.: The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.* **97**, 318–320 (1965)
- 90) 鈴木雅之, 末松 誠, 三浦総一郎, 永田博司, 森下鉄夫, 織田正也, 土屋雅春 : 急性胃粘膜病変時の活性酸素産生における xanthine oxidase 系および好中球の役割. *日消誌* **85**, 835–842 (1988)
- 91) Kurose, I., Suematsu, M., Miura, S., Suzuki, M., Nagata, H., Morishita, T., Sekizuka, E. and Tsuchiya, M.: Involvement of superoxide anion and platelet-activating factor in increased tissue-type plasminogen activator during rat gastric microvascular damages. *Thromb. Res.* **62**, 241–248 (1991)
- 92) Meerson, F.Z., Kagan, V.E., Kozlov, Y.P., Belkina, L.M. and Arkhipenko, Y.V.: The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res. Cardiol.* **77**, 465–485 (1982)

- 93) Friedman, M., Byers, S.O., Diamant, J. and Rosenman, R.H.: Plasma catecholamine response of coronary-prone subjects (Type A) to a specific challenge. *Metabolism* 24, 205-210 (1975)

## 略語一覽表

DIC	disseminated intravascular coagulation
SART	specific alternation of rhythm in temperature
RWIS	restraint and water immersion stress
PAF	platelet-activating factor
PRP	platelet-rich plasma
PPP	platelet-poor plasma
PEP-PK	phosphoenolpyruvate-pyruvate kinase
PBS	phosphate-buffered saline
SHRSP	stroke-prone spontaneously hypertensive rat
APTT	activated partial thromboplastin time
PT	prothrombin time
TT	thrombin time
ELT	euglobulin clot lysis time
FVIII:C	coagulation factor VIII: coagulant
ATIII	antithrombin III
$\alpha_2$ -PI	$\alpha_2$ -plasmin inhibitor
TPA	tissue-type plasminogen activator
SOD	superoxide dismutase
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究の実施において終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました近畿大学薬学部 秦 多恵子 教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に着手し、遂行するにあたり御激励を賜りました近畿大学 喜多富太郎 名誉教授ならびに近畿大学薬学部 高木博司 元教授に心より感謝致します。

さらに、本研究に御協力頂きました近畿大学薬学部薬理学教室 伊藤栄次 博士ならびに同教室の諸氏に深謝致します。