

氏 名	西 尾 廣 昭 にし お ひろ あき
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 198 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	血小板膜におけるセロトニン輸送系に関する形態学的 および薬理学的研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 高 木 博 司 教 授 富 田 謙 吉 教 授 山 科 郁 男

論 文 内 容 の 要 旨

血小板は、神経終末部でのセロトニン (5 HT) の輸送および貯蔵機構に関する実験的モデルシステムとして、多くの研究者に利用されてきた。筆者は、従来より行なわれてきたウサギ血小板の分離調製条件の再検討を行ない、その生体内血流中での状態により近いと思われる正常血小板を分離できる条件を設定し、この方法で得られた血小板について、血小板微細構造の変化と血小板膜における 5 HT 輸送系との関係について検討し、次のような新知見を得た。

ウサギ正常血小板を走査型電子顕微鏡で観察する事により、その円盤状の外形を確認し、その表面に開放小管系の開口部を認めた。そして、この開口部構造はイオンエッチング処理によって、より明確に観察し得るようになった。また、透過型電子顕微鏡での観察により、ウサギ正常血小板においても、ヒト血小板と同様の周辺部帯状微小管 (CB-Mt) が存在する事を認めた。そして、ウサギ正常血小板を低温処理 (4℃) する事により、その微細構造が大きく変化する事、すなわち、多数の偽足様突起が出現し、CB-Mt が消失し、小胞、小管系が拡大化する事を、認めた。

血小板低温処理は、同時に、血小板の 5 HT 輸送系に対して、大きな影響を与えた。すなわち、血小板低温処理は、tyramine による血小板内在性 5 HT 遊離作用を抑制し、一方、血小板の 5 HT 能動取り込み活性をも抑制した。そして、この血小板低温処理による 5 HT 能動取り込み活性減少は、theophylline によって有意に回復されたが、Pluronic F 68 は、この低温処理の影響を増強した。また、血小板低温処理の 5 HT 能動取り込み活性に対する作用は、非競合型の抑制作用であった。以上の結果より、5 HT 輸送系に対する血小板低温処理の影響は、細胞膜のコンフォメーション変化を介して引き起こされるものである事が、示唆された。

以上の知見にもとづき、ウサギからの採血および血小板分離操作の際に低温処理を行わないで得た正常血小板を用いる事により、imipramine, desipramine, reserpine などの向精神薬に感受性の高い 5 HT 能動取り込み実験系を確立し、この系を向精神薬とくに抗うつ薬の薬効評価の一次スクリーニングに用い

うる事を示した。

Theophylline および prostaglandin E_1 は、この 5 HT 能動取り込み活性を増強した。このことから、5 HT 能動取り込み系への血小板 adenylate cyclase の関与が示唆された。

Colchicine および vinblastine は、低温処理の場合と同様に、血小板の CB-Mt を消失させたが、この場合は偽足様突起の形成は認められず、血小板はほぼ球形を呈した。この時、colchicine は、reserpine による 5 HT 遊離作用を抑制したが、tyramine による遊離作用は増強した。一方、5 HT 能動取り込み活性に対しては、colchicine および vinblastine は、低温処理の場合とは異なって軽度の抑制しか示さなかった。これらの結果は、CB-Mt の消失と 5 HT 輸送系とは本質的には無関係である事を示しており、むしろ、偽足様突起の形成といった細胞膜コンフォメーション変化を伴う血小板外形変化が、5 HT 輸送系に関連している可能性が示唆された。

Concanavalin A (Con A) は、血小板微細構造に対し、特徴的变化、すなわち、外形が不規則な突起を持った球体になり、小胞、小管系が再構成されて渦巻状となるような変化を引き起こし、同時に 5 HT 能動取り込みを強く抑制した。これらの Con A の作用は、 α -methyl-D-mannoside によって、ほぼ完全に拮抗された。さらに、Con A による 5 HT 能動取り込み抑制作用は、colchicine, vinblastine および sodium nitroprusside によって回復された。しかし、cytochalasin B は、むしろ Con A の作用を増強した。また、Con A による 5 HT 能動取り込み抑制作用は、theophylline および dibutyryl-cyclic-AMP によっても、ほぼ完全に回復された。しかし、Con A による血小板形態変化は、theophylline によっても無影響であった。種々の糖結合特異性を持つレクチン (Con A, E-PHA, lentil-PHA および WGA) の血小板 5 HT 能動取り込み系に対する作用の違いによって、レクチンによる抑制作用の発現に、糖結合特異性が存在する事が認められた。以上の考察にもとづいて、Con A による血小板 5 HT 能動取り込み抑制作用に関して、流動膜モザイクモデルの立場に依った作業仮説モデルを作成した。

論文審査の結果の要旨

本論文はウサギ血小板膜におけるセロトニン輸送系とくにセロトニンの能動的取り込み系について電子顕微鏡を用いて形態学的に研究すると共に、薬物の作用について追究したものである。

著者はまずウサギ血小板の分離調製条件の再検討を行ない、血液を採血後低温処理を行なうと多数の偽足様突起が出現し、電顕で観察すると微小管系が消失し、小管系が拡大するなど形態上大きな変化をもたらし、同時にセロトニンの血小板への能動的取り込み機能が抑制されることを明らかにした。この血小板低温処理によるセロトニン取り込み抑制は非イオン性界面活性剤プルロニック F 68 添加により増強された。プルロニック F 68 は細胞膜のコンホメーションを変化させて血小板機能に影響を与えると報告されている物質であり、これらの知見から低温処理による血小板膜のセロトニン輸送系への抑制は細胞膜のコンホメーション変化により引き起こされることが示唆された。

そこで採血後低温処理を行わないで分離した血小板について、イミプラミン、デンプラミン、レセルピンなどの向精神薬のセロトニン取り込み抑制作用をしらべたところ、低温処理した血小板に比べてより低濃度すなわち $10^{-7}M$ の薬物添加により取り込み抑制がみられることが分った。この濃度は脳シナプトゾ

ーム画分や脳スライス標本での取り込み抑制濃度に大体匹敵する。従って、低温処理しないで分離したウサギ血小板は向精神薬とくに抗うつ薬の薬効試験法の一つとして用い得ることを明らかにした。

また著者はテオフィリンおよびプロスタグランジン E_1 がセロトニン取り込み活性を増大する事実から、アデニレート・サイクラーゼが取り込み機能に関与することを示唆した。

次に、糖結合特異性の異なる数種のレクチンの血小板セロトニン取り込み能に対する抑制作用をしらべた結果、レクチンによるセロトニン取り込み抑制には糖結合特異性の存在すること、またその抑制機序はおそらくレクチンとレセプターの結合が膜のコンホメーション変化をおこした結果おこるものと推論した。またレクチンのうちとくにセロトニン取り込み抑制作用の強かったコンカナバリンAの作用はコルヒチン、ビンブラスチンにより拮抗された事実から、血小板微小管系が関与していることを指適した。これらの知見にもとづき著者はコンカナバリンAの作用機構について流動モザイクモデルの立場に立った作業仮説を作成した。

以上の知見はウサギ血小板膜のセロトニン輸送系について形態学的ならびに薬理学的に有意義な新知見を提供した。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。