

## Activation of platelets upon contact with a vitamin E-coated/ non-coated surface

北里大学医療衛生学部

塚尾 浩, 小久保 謙一, 高橋 治子, 永里 美菜, 遠藤 貴典, 飯塚 直人,  
新保 年弘, 廣瀬 稔, 小林 弘祐

*Hiroshi TSUKAO, Kenichi KOKUBO, Haruko TAKAHASHI, Mina NAGASATO,  
Takanori ENDO, Naoto IIZUKA, Toshihiro SHINBO, Minoru HIROSE, Hirosuke KOBAYASHI*



### 1. はじめに

長期血液透析患者は血管障害が充進しており, これらの疾患の原因として, 血液透析による酸化ストレスの増加や血小板の活性化が考えられている<sup>1)</sup>。近年, 酸化ストレス低減と生体適合性の向上を目的として, ビタミンEをコートした透析膜が開発された。そして, 臨床研究により, 透析患者の酸化ストレスが低減されることが報告されている。しかし, 血小板に与える影響については明らかにされていない。本研究では, 透析患者の血小板活性化に着目し, ビタミンEコート透析膜が血小板に与える影響を明らかにすることを目的とした。

### 2. スーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)刺激による血小板活性化測定

ブタ血液から多血小板血漿 (PRP) および白血球を含むPRP (LPRP) を作製し, O<sub>2</sub><sup>-</sup>を介した血小板の活性化について検討し, その結果準備したPRP, LPRPではO<sub>2</sub><sup>-</sup>により血小板が活性化すること, fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) によって白血球から発生したO<sub>2</sub><sup>-</sup>が血小板を活性化することが確認できた<sup>2)</sup>。以上より, この試料を用いることで, ビタミンEコート膜が白血球や血小板へ与える影響を検討できると考えられた。

本受賞レポートの対象論文はJ Artif Organ誌に掲載されています。Tsukao H, Kokubo K, Takahashi H, et al. J Artif Organs 16: 193-205, 2013

#### ■ 著者連絡先

北里大学医療衛生学部  
(〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1)  
E-mail. tsukao@kitasato.u.ac.jp

### 3. 透析器を用いた循環実験

PRP, LPRPを, 2種の透析膜 (非コート膜, ビタミンEコート膜) に循環させた。そして, Pセレクトインの発現量を測定し, 活性化している血小板の割合を算出した。また循環後のビタミンEコート膜の抗酸化力をFRAP (ferric reducing antioxidant power) 分析<sup>3)</sup>で測定した。

ビタミンEコート膜にPRPを循環させると, 血小板活性化率が増加した。白血球が共存しても (LPRPにおいても) 血小板の活性化率はPRPと同程度であった。一方, 非コート膜では, 白血球が共存すると (LPRP), 有意に血小板活性化率が増加した。白血球の共存下では, ビタミンEコート膜, 非コート膜で血小板の活性化率は同程度であった<sup>2)</sup>。

これらの結果より, ビタミンEコート膜は白血球を介した血小板活性化を抑制していることが示唆された。一方, ビタミンE自体は血小板活性化の抑制効果を持つ<sup>4)</sup>にもかかわらず, ビタミンEコート膜は血小板を活性化させていた。この原因として, ビタミンEコート膜の抗酸化能がなくなってしまう可能性と, 酸化したビタミンEが直接血小板を活性化している可能性が考えられた。PRP, LPRPと接触した後の抗酸化能は有意に低下していたが, 膜の抗酸化能は十分に残っていた<sup>2)</sup>ので, 酸化されたコート表面による血小板の直接的活性化が生じた可能性があると考えた。

### 4. 酸化されたビタミンEコート表面による血小板の活性化の検討

そこで, ポリプロピレン製の96穴マイクロプレートの表面にビタミンEを塗布し, 塗布した状態の還元型ビタミンEコート表面とそれを過酸化水素および紫外線で酸化させた酸化型ビタミンEコート表面を作製し, それぞれにPRP

を接触させて、 $O_2^-$ 濃度と血小板の活性化について比較した。また、35 mmのガラスボトムディッシュを用いて、同様に還元型ビタミンEコート表面と酸化型ビタミンEコート表面を作製し、血小板に活性酸素種(ROS)に特異的に反応する蛍光試薬を入れて、それぞれのビタミンEコート表面に接触させ、血小板内でのROSの産生を蛍光顕微鏡にて観察した。

酸化型ビタミンEコート表面では還元型ビタミンEコート表面に比べ、 $O_2^-$ 放出量と血小板活性化率が有意に高かった<sup>2)</sup>。このとき、還元型ビタミンEコート表面には、凝集した血小板は少なく、付着している血小板内において蛍光は観察されなかった。一方、酸化型ビタミンEコート表面では、凝集している血小板が観察され、血小板内でのROS産生を示す蛍光も観察された<sup>2)</sup>。これらから、酸化されたビタミンEコート表面は、直接血小板を活性化することが分かった。

## 5. コートされたビタミンEと血小板及び白血球の相互作用

透析器を用いた循環実験から、ビタミンEコート膜は、白血球の活性化による血小板の活性化をほとんど起こさないが、酸化されたビタミンEが、直接血小板を活性化している可能性が示された。ビタミンEを塗布したビタミンEコート表面を作製して、酸化されたビタミンEコート表面が血小板に及ぼす影響を調べたところ、酸化されたビタミンEコート表面は、血小板を活性化させることが分かった。

ビタミンEコート膜では、 $O_2^-$ を介した血小板活性化がほとんど見られないが、一方で、コートされたビタミンE自身が酸化され、その酸化されたビタミンEが直接血小板を活性化してしまうと考えられた。血液中にビタミンCのような抗酸化物質が十分に存在していれば、酸化されたビタミンEは還元されるが、抗酸化物質が十分でない、酸

化された状態のままとなってしまう。

ビタミンEコート膜を使用すると、血液中の過酸化脂質の量や酸化ストレスマーカー値が小さくなるのが臨床でも確認されているが、血小板に対しては、ビタミンEの有効な効果が臨床において得られていない。この理由として、患者の抗酸化能が十分でない場合に、酸化されたビタミンEを還元できず、ビタミンEの血小板に対する有効な効果が、酸化されたビタミンEの存在により弱められてしまっていることが考えられた。

## 6. 結 語

ビタミンEコート膜では、白血球や白血球由来の $O_2^-$ に起因する血小板の活性化は抑制されたが、酸化されたビタミンEは直接血小板を活性化してしまうと考えられた。

### 利益相反の開示

本研究の一部は旭化成メディカル株式会社からの研究助成、透析器の提供を受けて実施した。

小林 弘祐, 小久保 謙一: 旭化成メディカル株式会社  
その他の著者には規定されたCOIはない。

### 文 献

- 1) Lam JY, Latour JG, Lesperance J, et al: Platelet aggregation, coronary artery disease progression and future coronary events. *Am J Cardiol* **73**: 333-8, 1994
- 2) Tsukao H, Kokubo K, Takahashi H, et al: Activation of platelets upon contact with a vitamin E-coated/non-coated surface. *J Artif Organs* **16**: 193-205, 2013
- 3) Floridi A, Piroddi M, Pilolli F, et al: Analysis method and characterization of the antioxidant capacity of vitamin E-interactive polysulfone hemodialyzers. *Acta Biomater* **5**: 2974-82, 2009
- 4) Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, et al: alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation* **94**: 2434-40, 1996