

# Dilazepの血小板と好中球の機能ならびに代謝に対する阻害作用について

大熊 稔, 金地研二

京都大学医学部第一内科

## 1. 序 言

近年、腎組織によるアラキドン酸(AA)代謝が検討され、prostaglandin (PG)やthromboxane (TX)などのcyclo-oxygenase (CO)系代謝産物のみならず、とくに糸球体毛細血管でleukotriene (LT)やhydroxyicosatetraenoic acid (HETE)などのlipoxygenase (LO)系AA代謝産物が生成されることが明らかにされている<sup>1)</sup>。また動物においては或種の糸球体腎炎やnephrotoxic serumを用いた腎炎で、糸球体によるLTB<sub>4</sub>産生や12-HETE産生がそれぞれ著明に亢進していることや、LO系代謝産物はその産生部位にかかわりなく、腎機能とくに糸球体のそれに障害的な影響を与えることが報告されている<sup>1)</sup>。また炎症やアレルギーなどにおける意義で注目されるplateletactivating factor (PAF)を介する好中球や血小板などの炎症細胞と腎組織の相互反応において、PAFにより好中球や血小板が活性化されて生成・放出される物質(LTやTXなど)が腎組織を障害し糸球体透過性の亢進や蛋白尿をもたらすに至る可能性も示唆されている<sup>2)</sup>。

そこで、慢性腎炎患者における尿蛋白減少効果やcreatinine clearance増加効果で最近注目されるdilazep (DZ)<sup>3)</sup>の作用機序を明らかにする目的で、PAFによる血小板凝集に対するこの抗血小板剤の作用や、血小板のみならずLT産生で重要な意義を有する好中球のAA代謝などに及ぼすDZの作用を検討した。

## 2. 対象・方法

健康成人より採取した血液から多血小板血漿

(PRP)および乏血小板血漿(PPP)を分離し<sup>4)</sup>、PRPと各種濃度のDZを37°C、1分間反応させたのちPAFを添加し既報<sup>4)</sup>に準じて血小板凝集能を検討した。好中球および血小板の洗浄浮遊液は既報<sup>5)</sup>に準じて作成し、血小板はそのまま、または1 mM aspirin (ASA)と室温で15分incubate後(ASA-血小板)、好中球と混合して用に供した。好中球のAA代謝に及ぼすDZの効果は、その浮遊液(3×10<sup>7</sup>好中球/ml)に種々な濃度のDZを加えて37°C、3分間preincubateした後5 μM A23187のみ又はこれと20 μM AAを加えて37°C、5分間反応させ、既報<sup>5)</sup>に準じて反応産物を抽出し、逆相高速液クロ(RP-HPLC)でLO系代謝産物を定量して検討した。血小板と好中球のAA代謝を介する相互反応に及ぼすDZの作用は、血小板(45×10<sup>7</sup>/ml)と好中球(3×10<sup>7</sup>/ml)の混合浮遊液にDZを加え37°C、3分間preincubateし、60 μM AAと1 μM PAFを加えて37°C、5分間反応させた後上記の方法でAA代謝産物を定量して検討した(外因性AA代謝)。内因性AA代謝に対する検討は、ASA-血小板を用いて上記と同様に好中球と混合し、これにcytochalasin B (5 μg/ml)およびDZを加えてpreincubateしてから、10 μM FMLPとthrombin (5 u/ml)を添加し37°C、5分間反応させた後、前述の方法でAA代謝産物を測定することによった。

## 3. 成績

a) PAF凝集に対するDZの作用。0.5 μMおよび2 μMのPAFによる血小板凝集はDZ 10~30 μM以上でその濃度依存性に阻害され、最大

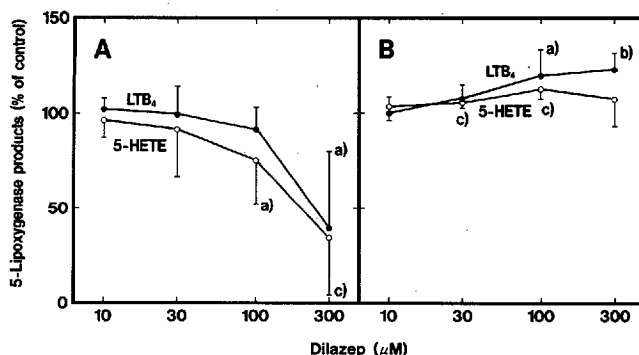


図1. 好中球の5-LO系AA代謝に対するDZの作用。AおよびBはそれぞれ5 μM A 23187 および20 μM AA+5 μM A 23187 を好中球と反応させたもの。M±SD, n=5~6; a), b), c) はそれぞれ対照 (DZ=0) と比較して p<0.05, p<0.02, p<0.01を示す。

凝集率(透光度の最大変化)を指標とした場合、凝集能の50%阻害に必要なDZ濃度(IC<sub>50</sub>)は、それぞれ201.2 ± 94.6 μM (M±SD, n=6)および403.3 ± 78.9 μMであった。

b) 好中球AA代謝に対するDZの作用。好中球とA 23187の反応により産生される5-LO系AA代謝産物を定量し、その内因性AA代謝に対するDZの作用を検討したところ、DZ非存在下(対照)におけるLTB<sub>4</sub>、5-HETEおよび5S, 12S-DiHETE (DiHETE)の産生量(ng/10<sup>7</sup>好中球; M±SD, n=5又は6;以下同様)はそれぞれ60.1 ± 13.8, 97.2 ± 29.3および4.7 ± 1.5であったが、DZの添加によりその濃度依存性に阻害効果が認められた(図1.A)。A 23187のみならずAAも添加した外因性AA代謝に対するDZの作用の検討では、対照におけるLTB<sub>4</sub>、5-HETEおよびDiHETE産生量はそれぞれ114.3 ± 11.2, 271.9 ± 33.8および9.1 ± 2.3であったが、300 μMまでのDZはLTB<sub>4</sub>に対し濃度依存性の産生亢進作用を示し、5-HETEに対しては100 μMまで亢進作用を呈した後それ以上の濃度では有意な作用は消失した(図1.B)。

c) 血小板/好中球 両血球のAA代謝に対するDZの作用。cytochalasin B存在下にASA-血小板と好中球の混合浮遊をFMLPと throm-

binで刺激して、両血球による内因性AA代謝に対するDZの作用を検討した。対照におけるLTB<sub>4</sub>、DiHETEおよび5-HETEの産生量はそれぞれ35.5 ± 12.3, 42.2 ± 16.1および5.9 ± 5.1であり、300 μMまでのDZはLTB<sub>4</sub>に対し濃度依存性の産生阻害作用を示したが、DiHETEに対しては低濃度(30 μMまで)では亢進作用を示し、さらに濃度を増加すると阻害作用が認められた(図2)。次に血小板/好中球混合液にPAFとAAを加えて両血球による外因性AA代謝に対するDZの作用を検討したところ、対照におけるLTB<sub>4</sub>、DiHETEおよび5-HETE産生量はそれぞれ84.5 ± 9.4, 57.1 ± 16.6および159.7 ± 24.4であり、100 μMまでのDZはこれらの代謝産物に対し濃度依存性に亢進作用を示したが、300 μMではその作用は消失した(図3)。

#### 4. 考察

近年、血小板機能阻害作用を有する薬剤の投与により慢性腎炎患者の糸球体機能の増悪を防止し、尿蛋白量の減少やcreatinine clearanceの増加など腎機能の改善を示唆する成績が報告されている<sup>3,6,7</sup>。しかし、このような抗血小板剤の作用機序、とくに慢性腎炎の糸球体病変/

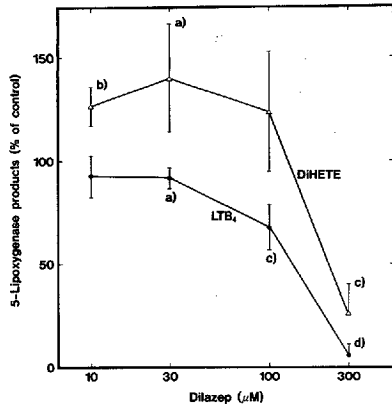


図2. 血小板/好中球による内因性AA代謝に及ぼすDZの作用。M±SD, n=5~6; a), b), c) は図1と同じでd)はp<0.001を示す。

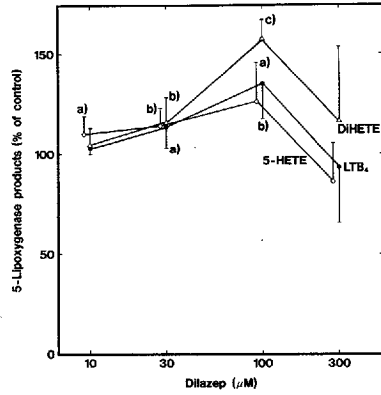


図3. 血小板/好中球による外因性AA代謝に及ぼすDZの作用。M±SD, n=6; a), p<0.05; b), p<0.01; d), p<0.001

機能に対する作用機序には不明な点が多い。DZについてもその投与により慢性腎炎患者の腎機能改善ないし悪化防止に有効な作用が示唆されている<sup>3)</sup>がその作用機序は不詳である。

DZの抗血小板作用については、PRP又は全血にin vitroでこれを加えると凝集阻害効果が認められその作用機序には膜安定化作用やadenosine transportの阻害作用が報告されている<sup>8,9)</sup>。DZはin vitroで受容体を介する刺激(thrombin, AA, collagen)による血小板の凝集と細胞質内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)上昇の両者を阻害し、Ca ionophore刺激では[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は阻害せず凝集のみ阻害することを明らかにした<sup>4)</sup>が、今回の検討でPAF-凝集もDZにより阻害されることが明らかとなった。DZのex vivo効果としては、その投与後血小板凝集能の阻害されることが知られている<sup>8)</sup>が、われわれはその投与後の血小板では投与前のそれに比し、thrombin, AAおよびcollagenによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇が有意に阻害されていることを明らかにした<sup>4)</sup>。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>は血小板のphospholipase A<sub>2</sub>の活性化や機能蛋白の磷酸化などによりその機能発現に重要な意義を有するので、この様な機序を介するDZの

抗血小板作用も推察される。

血小板のAA代謝に対するDZの作用では、外因性AA代謝に於てはCOを阻害せずLO系代謝を亢進するが、thrombin刺激による内因性AA代謝では両代謝系の反応産物を減少させることから燐脂質よりのAA浮遊(phospholipase A<sub>2</sub>作用)阻害作用が示唆された<sup>4)</sup>。血小板の内因性ならびに外因性AA代謝に対するこのようなDZの作用は、膜安定化作用を有するchlorpromazineの効果<sup>10)</sup>によく一致している。

好中球のLO系AA代謝産物、とくにLTは腎臓においても生成されることが明らかにされ、その病態(腎炎)への関与が検討されており<sup>11)</sup>、糸球体腎炎に対する病態生理的意義も推察されるので、好中球のLO系AA代謝のみならず血小板と好中球のこの代謝を介する相互反応に及ぼすDZの効果を検討した。DZは好中球単独および血小板/好中球混合でのLO系反応においても、外因性AA代謝を阻害することなくむしろ促進的効果を示したが、刺激により誘発される内因性AA代謝に対しては阻害効果が認められたことから、これらの血球のAA代謝カスケードにおけるLOよりも前の段階の反応、すなわち燐脂質よりAAを遊離させるphospholipaseに対する阻害効

果が示唆された。すでに *in vitro* において血小板が好中球の 5-LO 系 AA 代謝を亢進させること<sup>9)</sup>やこれら両血球が糸球体による LO 系代謝産物の生成を亢進させることが報告されている<sup>1)</sup>が、*in vivo* においてはこれらの両血球間や、血球と糸球体間の相互反応は極めて重要と考えられる。また、生体内における AA 代謝では、細胞膜に主として磷脂質として存在する内因性 AA 代謝の意義が大であるが、この代謝の律速段階は phospholipase A<sub>2</sub> による AA の遊離であり、これが DZ により阻害されることが推察される。

## 5. 結 論

正常人の血小板および好中球に対する DZ の *in vitro* における作用を検討し①DZ は PAF による血小板凝集を抑制し、②血小板と好中球の各単独ならびに両血球混在による LO 系 AA 代謝においては、外因性 AA 代謝を亢進させるが、内因性 AA 代謝ではその律速段階を阻害して LT などの生成を阻害することを明らかにした。

## 6. 参考文献

- 1) Ardaillou R., Band L. and Sraer J. : Leukotrienes and other lipoxygenase products of arachidonic acid synthesized in the kidney. *Am. J. Med.* 81; 12-22, 1986.
- 2) Schlondorff D. and Neuwirth R. : Platelet-activating factor and the kidney. *Am. J. Physiol.* 251; F 1-F 11, 1986.
- 3) 東條静夫, 本田西男, 柴田昌雄, 成田光陽, 宮原 正, 酒井 紀, 加藤暎一, 木田 寛, 折田義正, 石川兵衛, 原 耕平, 田中恒男, 高橋 浩: 慢性糸球体腎炎に対する AS-05 (Dilazep) の臨床評価-全国多施設協同二重盲検試験. *腎と透析* 20; 289-313, 1986.
- 4) 大熊 稔, 牛首文隆, 金地研二, 千先茂樹: 血小板の機能と抗血小板剤によるその阻害. *厚生省心身障害研究: 小児慢性腎炎の予防・管理・治療に関する研究. 昭和60年度研究業績報告書.* p. 19-22, 1986.
- 5) Kanaji K., Okuma M. and Uchino H. : Deficient induction of leukotriene synthesis in human neutrophils by lipoxygenase deficient platelets. *Blood* 67; 903-908, 1986.
- 6) Cameron J. S. : Platelets in glomerular disease. *Ann. Rev. Med.* 35; 175-180, 1984.
- 7) Donadio J.V. Jr., Anderson C.F., Michell J.C. III, Holley K.E., Ilstrup D.M., Fuster V. and Chesebro J.H. : Membranoproliferative glomerulonephritis: A prospective clinical trial of platelet-inhibitor therapy. *N. Engl. J. Med.* 310; 1421-1426, 1984.
- 8) 安永幸二郎, 神崎光也, 木村征夫: Dilazep hydrochloride の血小板凝集抑制作用. *内科宝函* 27; 99-107, 1980.
- 9) Dawicki D.D., Agarwal K.C. and Parks R.E. Jr. : Potentiation of the antiplatelet action of adenosine in whole blood by dipyridamole or dilazep and the cAMP phosphodiesterase inhibitor, RA 233. *Thromb. Res.* 43; 161-175, 1986.
- 10) Maclouf J., Baume H. de la, Levy-Toledano S. and Caen J.P. : Selective stimulation of human platelet lipoxygenase product 12-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid by chlorpromazine and 8-(N,N-diethylamino)-octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate. *Biochim. Biophys. Acta* 711; 377-385, 1982.



**検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用  
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



## 5. 結論

正常人の血小板および好中球に対する DZ の *in vitro* における作用を検討し DZ は PAF による血小板凝集を抑制し、血小板と好中球の各単独ならびに両血球混在による LO 系 AA 代謝においては、外因性 AA 代謝を亢進させるが、内因性 AA 代謝ではその律速段階を阻害して LT などの生成を阻害することを明らかにした。