

血小板の機能と抗血小板剤によるその阻害

大熊 稔, 牛首文隆, 金地研二, 千先茂樹

京都大学医学部第一内科

1. 序 言

種々な刺激により誘発される血小板の主な機能には、粘着、放出反応、凝集および凝固促進作用があるが、近年血小板の腎病変への関与が示唆されるとともに、血小板の機能と腎疾患に関する種々な研究が報告されている¹⁾。一般に血小板機能の発現に際しては、種々な刺激が血小板の膜上の受容体に作用し何らかのシグナルを生成させてこれが血小板内に伝達され、その機能を誘発ないし調節するものと考えられている²⁾。何れにせよ、刺激が作用すると、血小板の細胞質内の Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇し、また protein kinase C を活性化して血小板内の特定蛋白が磷酸化され収縮蛋白 (actomyosin) の作動や放出反応が誘発されるが、このような血小板機能は一般に ATP から adenylate cyclase により生成され、phosphodiesterase により分解される cyclic AMP により抑制される。

抗血小板剤には多種類のものが存在するが、血小板機能の発現 (活性化) に至る上記の反応過程における阻害作用の部位により表 1 の如く分類することができる。近年、抗血小板剤の腎疾患に対する有効性が示唆されるに至っている³⁾ ので、今回はその機序の解明に資する目的で若干の抗血小板剤について血小板の機能や代謝に及ぼす効果を比較検討した。

2. 対象・方法

採血前 2 週間以上薬剤使用歴の無い健康成人の多血小板血漿 (PRP) 及び乏血小板血漿 (PPP) を用いて既報⁴⁾ に準じて血小板凝集および ATP 放出を検討した。 $[Ca^{2+}]_i$ の測定は quin 2 を用いる Hallam らの方法⁵⁾ と、ae-quinorin を用いる Johnson らの方法⁶⁾ で行った。

表 1. 抗血小板剤の分類

1. Inhibitor of platelet adhesion
dextran, high concentrations of penicillins (carbenicillin, benzylpenicillin, ticarcillin)
2. Inhibitor of platelet aggregation
 - a. Membrane level
 - 1) Receptor antagonist:
ADP/ATP; 5HT/ketanserin; fibrinogen/
PGI₂/ticlopidine; epinephrine/phentolamine;
TXA₂/ONO-11120, 13-APA, BM13.177
 - 2) Stabilizer:
diazepam, bencyclane, procaine, chlorpromazine
 - b. Cytoplasmic Ca^{++} level
 - 1) Phosphodiesterase inhibitor: dipyridamole, theophylline, papaverine, cilostamide, trapidil, pentoxifylline
 - 2) Adenylate cyclase activator: PGI₂ [thrombin, angiotensin II, bradykinin, captopril, nitroglycerin, nifedipine, dipyridamole]*
PGD₂, PGE₁, ticlopidine
 - 3) Inhibitor of TXA₂ synthesis
 - a) Cyclo-oxygenase inhibitor: aspirin, indomethacin, ibuprofen, phenylbutazone
 - b) TX synthetase inhibitor: OKY1581, OKY046, dazoxiben
 - c) Phospholipase inhibitor: chlorpromazine, mepacrine, propranolol
 - 4) Ca^{++} antagonist
 - a) Ca^{++} entry blocker: verapamil, nifedipine, diltiazem
 - b) Calmodulin inhibitor: trifluoperazine, W7, chlorpromazine
 - c) Intracellular Ca^{++} antagonist: TMB8

*[], enhance PGI₂ synthesis

血小板によるアラキドン酸 (AA) 代謝の検討は、血小板と種々の凝集剤との反応により生成される AA 代謝産物を、TBA 法⁴⁾ で測定するか、高速液体クロマトグラフィーで分離した hydroxy-heptadecatrienoic acid (HHT) および 12-hydroxyicosatetraenoic acid (12-HETE) を定量⁷⁾ してそれぞれ血小板の cyclo-oxygenase 系および lipoxigenase 系代謝活性の指標とする方法によった。ウサギやラットは既報⁸⁾ に準じて使用した。

3. 成 績

a) ONO-11120. TXA₂ 受容体拮抗剤である ONO-11120 を in vitro で PRP に加えて

37℃で1分間反応させると, ADPやepinephrineによる二次凝集と collagen, AAおよびSTA₂ [thromboxane (TX)A₂の安定な類縁体] による凝集やこれらの刺激による放出反応は全て阻害されたがA 23187 (Ca ionophore)による凝集への阻害作用は殆んど認められなかった。またONO-11120はその添加濃度 (0.1~0.5 μM) 依存性にSTA₂による血小板[Ca²⁺]_i上昇を阻害したが, thrombinやCa ionophore (ionomycin)による[Ca²⁺]_i上昇に対する阻害効果は認められなかった(データ省略)。

b) dilazep, dilazep (コメリアン)を健康成人に100 mg 1回経口投与し, 3時間後に採取した血小板の各種凝集剤による凝集能と[Ca²⁺]_i上昇を投与前のそれらと比較したところ, 投与後の血小板では両者に対する阻害効果が認められた(図1)。種々の濃度の dilazep を aequorin 負

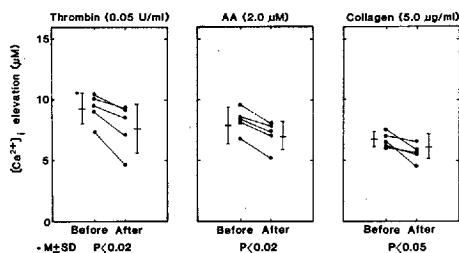


図1. thrombin, AAおよび collagen による [Ca²⁺]_i上昇に対する dilazep 経口投与の効果。dilazep 100 mg を 1 回投与し 3 時間後(after)と投与前(before)のデータを示す。

荷した血小板に in vitro で加えて, 各種の刺激による血小板凝集および[Ca²⁺]_i上昇に対するその作用を検討したところ(図2), thrombin, AAおよび collagen では dilazep の添加濃度依存性に両者に対する阻害効果が認められたが, A 23187 刺激に際しては[Ca²⁺]_i上昇は阻害されず凝集のみが dilazep の濃度依存性に阻害されることが明らかとなった。[Ca²⁺]_i上昇には血小板外液中の Ca²⁺が血小板の細胞質内へ流入したもの(influx)と, 血小板内Ca貯留部位(暗調小管系など)より細胞質内へ遊離(release)されたものの関与することが明らかにされているので, medium 中に Ca²⁺を加えた場合と E

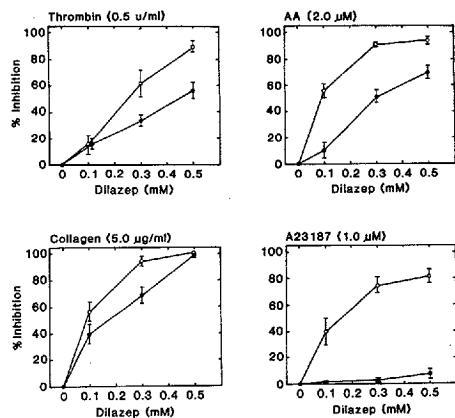


図2. 各種刺激による血小板の凝集(○)および [Ca²⁺]_i 上昇(●)に対する dilazep の阻害効果。dilazep と 37℃ 1 分間反応させた aequorin 負荷血小板を使用し, M±SD (n=4) を示す。

GTAでこれを chelate した条件下で各種刺激による[Ca²⁺]_i上昇に対する dilazep の効果を検討したところ, thrombin および AA 刺激に際しては, Ca²⁺の influx も release もともに dilazep により阻害されるに対し, A 23187 刺激では, dilazep は Ca²⁺の両動態に対し全く影響しないことが明らかとなった(図略)。各種濃度の dilazep と in vitro で反応させた血小板に thrombin または AA を添加し, 血小板の内因性 AA および外因性 AA の代謝に及ぼす本薬剤の効果を検討したところ, AA 添加では何如なる濃度(≥1mM)の dilazep も HHT および 12-HE TE の産生をも阻害しないにもかかわらず, thrombin 刺激では dilazep の濃度依存性に両代謝産物の産生が阻害され, 0.3mM 以上では 12-HE TE より HHT の産生が有意に強く阻害された。また, 0.1~0.6mM dilazep は, AA 添加での 12-HE TE 産生を有意に亢進させた(図略)。

c) OKY-1581. TX 合成酵素の特異的阻害剤である OKY-1581 を in vitro でヒト PRP に加え各種の刺激による血小板凝集に対する阻害効果を検討したところ(図3), collagen および AA による凝集は低濃度の OKY-1581 で強く阻害されたが, ADP や epinephrine による凝集の場合は比較的高濃度の本剤を用いても二次凝集のみが軽度阻害されるに過ぎず, とくに epi-

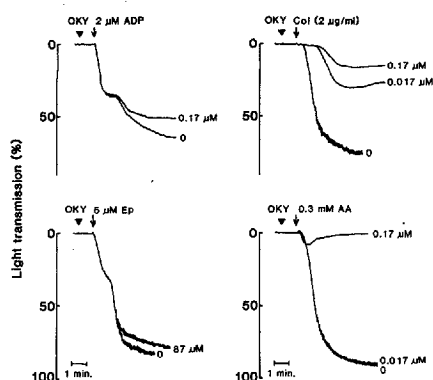


図3. ヒト血小板凝集に対するOKY-1581の効果

nephrine凝集に対する阻害効果は殆んど認められなかった。本剤(3 mg/kg)をウサギに静注し、その前後に経時的に採取したPRPの血小板凝集能から *ex vivo*での効果を検討したところ、投与後3時間迄はAA-凝集およびcollagen-凝集に対する阻害効果を認めたが、6時間後ではその効果を認めなかった(図略)。OKY-1581の静注後10分で採取した血小板のTX合成酵素活性は阻害されていたが、その様な血小板を含有するPRPに、予めaspirinを腹腔内に注射してcyclo-oxygenase活性を阻害したラット大動脈の輪状切片を加えて血小板凝集計のセル内で37℃、7分間攪拌した後ADPを加えて惹起される凝集を観察したところ、凝集は誘発されなかったが、PRPに大動脈切片を加えない場合や、indomethacinを加えて血小板のcyclo-oxygenaseを阻害したPRPを用いた場合はADP-凝集が認められた(図略)。

4. 考 察

糸球体病変における血小板の関与や、本症患者に対する抗血小板剤投与の効果が報告され、腎疾患の治療に抗血小板剤の投与が期待されているが、腎病変に関与する血小板機能については未だ充分解明されておらず、主として血小板より放出される物質の関与が推察されている³⁾。血小板のcyclo-oxygenaseによりAAから生成されるTXA₂は血小板機能、とくにその放出反応を誘発する重要なAA代謝産物であり、そ

の受容体との反応を介して作用すると考えられている。ONO-11120はTXA₂とその受容体との反応を阻害するので、thrombinやCa ionophoreによる[Ca²⁺]_iの上昇は阻害せず、TXA₂の作用で誘発される血小板機能のみを特異的に阻害することが確認された。aspirinはcyclo-oxygenaseを阻害するため各種のprostaglandin(PG)やTXの生成を全て阻害し、その投与に際しては血小板ではTXA₂やPG endoperoxidesを介する血小板機能の阻害のみならず、血管組織でのPGI₂産生なども阻害される。aspirinはcyclo-oxygenaseをアセチル化して不可逆的に阻害するため酵素蛋白を新生し得ない血小板での阻害効果は永久的である。したがってaspirin摂取後の末梢血中の血小板cyclo-oxygenase活性はその後新生された血小板によるもので、その一回服用(50 mg~1g)のみでも8~10日間に及ぶ阻害効果が認められた⁹⁾。aspirin以外のcyclo-oxygenase阻害剤(indomethacinなど)の効果は一過性であり、その投与後24時間では血小板に対する阻害効果は殆んど認められなかった(データ省略)。したがって血小板のみのcyclo-oxygenase阻害効果を期待する場合はaspirinの間欠的投与が好適と考えられる。TX合成酵素の選択的阻害剤・OKY-1581は*in vitro*でヒト血小板と反応してcollagenおよびAAによる凝集を比較的好く阻害したが、ADPやepinephrineによる凝集に対しては、二次凝集に対してのみ弱い阻害作用を認めるに過ぎない。これには刺激により生成されるPGH₂による凝集機序が想定され、さらにepinephrineによるPGH₂凝集の亢進作用も考慮されるべきであろう。血小板で産生されたPGH₂が血管のPGI₂合成酵素に利用されてPGI₂に変換されることが血漿中でも示された(ウサギのPRPと血管組織の混合実験)が、PGH₂はヒトの血漿中ではPGD₂にも変換されるので、TX合成酵素阻害剤のヒトへの投与に際しては血小板機能阻害作用の強いPGI₂やPGD₂が上記の機序で生成され抗血小板効果を増強することが期待出来る。しかしPGH₂自体が血小板機能を誘発させるのでこの点からはOKY-1581

の抗血小板効果が減弱される可能性がある。 TXA_2 受容体拮抗剤ではこの様な PGH_2 の蓄積に由来する多彩な作用は考えられない。

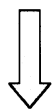
dilazep の血小板機能阻害機序を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対する作用を中心に検討したところ、その 1 回 (100mg) 投与後 3 時間の血小板において、thrombin, AA および collagen による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が有意に抑制されていることが見出された。そこで種々な濃度の dilazep を *in vitro* で血小板と反応させてさらに詳細に検討したところ、thrombin, AA および collagen の如く血小板膜上の受容体を介して作用する刺激による血小板凝集や $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は共に dilazep により阻害されるが、受容体を介さず膜の透過性を高めて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる Ca ionophore の刺激では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は dilazep により阻害されないにも拘らず凝集は阻害されることが明らかとなった。したがって dilazep には血小板膜に対する作用から各種の刺激に対する受容体を非特異的に変化させてその機能を阻害するとともに、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇以後の血小板活性化機構をも阻害する作用機序が示唆された。また dilazep 処理血小板による AA 代謝産物の産生態度からこの薬剤は cyclo-oxygenase を阻害せず、lipoxygenase 系代謝の亢進作用が認められると共に、thrombin 刺激による血小板磷脂質からの AA 遊離を阻害することも明らかとなった。これらの成績は血小板の cyclo-oxygenase 系代謝は阻害せず各種の刺激による AA 遊離や放出反応を阻害する膜安定化剤 (chlorpromazine など) についての諸家の成績と一致しており、dilazep は種々な刺激による血小板の活性化を抑制するものと考えられる。

5. 結 論

各種の抗血小板剤のうち、 TXA_2 受容体拮抗剤・ONO-11120、cyclo-oxygenase 阻害剤・aspirin・indomethacin、TX 合成酵素阻害剤・OKY-1581、および膜安定化剤と言われる dilazep につき、血小板の機能や代謝に及ぼす作用を比較検討し、各薬剤の特徴的な抗血小板効果を報告した。

6. 参考文献

- 1) Remuzzi, G., Mecca, G., and de Gaetano, G. (ed.): Hemostasis, Prostaglandins, and Renal Disease. Raven Press, New York, 1980.
- 2) Vermeylen, J., Badenhurst, P. N., Deckmyn, H. and Arnout, J.: Normal mechanisms of platelet function. Clin. Haematol. 12; 107-151, 1983.
- 3) Cameron, J. S.: Platelets in glomerular disease. Ann. Rev. Med. 35; 175-180, 1984.
- 4) Okuma, M., Takayama, H. and Uchino, H.: Subnormal platelet response to thromboxane A_2 in a patient with chronic myeloid leukaemia. Brit. J. Haematol. 51; 469-477, 1982.
- 5) Hallam, T. J., Sanchez, A. and Rink, T. J.: Stimulus-response coupling in human platelets. Changes evoked by platelet-activating factor in cytoplasmic free calcium monitored with the fluorescent calcium indicator quin 2. Biochem. J. 218; 819-827, 1984.
- 6) Johnson, P. C., Ware, J. A., Cliveden, P. B., Smith, M., Dvorak, A. M. and Salzman, E. W.: Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein aequorin. Comparison with Quin 2. J. Biol. Chem. 260; 2069-2076, 1985.
- 7) Kanaji, K., Okuma, M. and Uchino, H.: Deficient induction of leukotriene synthesis in human neutrophils by lipoxygenase deficient platelets. Blood in press, 1986.
- 8) Okuma, M., Takayama, H. and Uchino, H.: Generation of prostacyclin-like substance and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats. Prostaglandins 19; 527-536, 1980.
- 9) Takayama, H., Okuma, M. and Uchino, H.: The recovery of platelet malondialdehyde production after a single intake of aspirin-The effect of dosage. Thromb. Haemostas. 48; 13-17, 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

各種の抗血小板剤のうち, TXA₂ 受容体拮抗剤・ONO・11120, cyclo-oxygenase 阻害剤・aspirin・indomethacin, TX 合成酵素阻害剤・OKY-1581, および膜安定化剤と言われる dilazep につき, 血小板の機能や代謝に及ぼす作用を比較検討し, 各薬剤の特徴的な抗血小板効果を報告した。