◆ 原 著 ◆

ラウリン酸ナトリウム誘発モルモット末梢動脈閉塞モデル に対する抗血小板薬 pamicogrel の作用

嶋澤雅光^{*1}, 三宅由季^{*2}, 山口高史^{*3}横田耕一^{*3}, 洲加本孝幸^{*2}, 原 英彰^{*1}

ラウリン酸誘発モルモット末梢動脈閉塞モデルに対する pamicogrel (KBT-3022) の治療効果を検討する目的で、ラウリン酸ナトリウムの大腿動脈内投与後の皮膚潰瘍の進展及び大腿部皮膚温度の低下に対する作用を検討し、ticlopidine, acetylsalicylic acid (ASA) および cilostazol の作用と比較した。Pamicogrel (0.1, 0.3 および 1 mg/kg, p.o.) はラウリン酸ナトリウム動脈内投与 1 時間後より 1 日 1 回 2 週間経口投与することにより溶媒投与群と比較して用量依存的に処置側後肢の皮膚潰瘍の進展を抑制した。また、ラウリン酸ナトリウム投与 1 および 3 日後の処置側大腿部皮膚温の低下を pamicogrel は 1 mg/kg 投与群において有意に抑制した。Ticlopidine (100 および 300 mg/kg, p.o.) も同様に溶媒投与群と比較して用量依存的に皮膚潰瘍の進展を抑制した。一方、ticlopidine はラウリン酸ナトリウム投与 1 日後に 100 mg/kg の用量において大腿部皮膚温の低下を有意に抑制したが、3 日後および 300 mg/kg の用量においては明らかな作用を示さなかった。ASA は皮膚潰瘍の進展を 10 mg/kg においてラウリン酸ナトリウム投与 3 日後に、30 mg/kg において 3, 7 および 10 日後に溶媒投与群と比較して有意に増悪させたが、100 mg/kg の用量では明らかな作用を示さなかった。大腿部皮膚温は ASA 30 mg/kg の 3 日後のみ有意に低下を増強させた。Cilostazol (10 および 30 mg/kg, p.o.) は今回検討した用量において皮膚潰瘍および大腿部皮膚温に対して溶媒投与群と比較して明らかな作用を示さなかった。

以上の結果から、pamicogrel はラウリン酸誘発モルモット末梢動脈閉塞モデルにおいて著明な治療効果を示すことが明らかとなった。

Key words: antiplatelet drug, arterial occlusive disease, guinea pig, pamicogrel, skin temperature

緒 言

血小板の活性化は動脈血栓症などの病態において重要な役割を演じていることから、acetylsalicylic acid (ASA) を含む種々の抗血小板薬が開発され血栓症の治療に広く使用されている。ASA の抗血小板作用は血小板の cyclooxygenase-1 (COX-1) 抑制作用により強力な血小板活性化及び血管収縮因子である thromboxan A₂ (TxA₂) の産生を抑制する作用に

基づいている。一方、ASA はその COX-1 阻害作用により血管内皮細胞からの prostacyclin (PGI₂) 産生も抑制する。PGI₂ は強力な血管拡張因子であり、さらに血小板凝集抑制を有することから ASA による血栓形成の抑制作用が減弱されることが指摘されている¹⁾。さらに、ASA は胃腸管における COX-1 を阻害することによる prostaglandin (PG) 産生の抑制及び ASA の胃粘膜への直接的な刺激により胃腸管障害および出血を発現することが知られている^{2) 3)}。

¹ 岐阜薬科大学生体機能分子学講座 [〒 502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1]

¹ Department of Biofunctional Molecules, Gifu Pharmaceutical University, [5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585 Japan]
Tel: 058-237-3931 Fax: 058-237-5979 e-mail: shimazawa@gifu-pu.ac.jp

² 日本オルガノン株式会社薬事業本部 [〒 530-0003 大阪市北区堂島 1-6-20 堂島アバンザ 14F]

² Nippon Organon K.K., Regulatory Affairs [Dojima Avanza 14F 1-6-20 Dojima, Kita-ku Osaka 530-0003 Japan]

³ 日本オルガノン株式会社医薬開発本部 [〒 530-0003 大阪市北区堂島 1-6-20 堂島アバンザ 14F]

³ Nippon Organon K.K., Clinical Development [Dojima Avanza 14F 1-6-20 Dojima, Kita-ku Osaka 530-0003 Japan]

受付: 2004 年 12 月 24 日 受理: 2005 年 1 月 29 日

これらのことから, より選択的に血小板の COX を阻害し, 胃粘膜障害を発現しない抗血小板薬の開発が望まれている。

Ethyl 2-[4, 5-bis (4-methoxyphenyl) thiazol-2-yl] pyrrol-1-ylacetate (pamicogrel; KBT-3022) は慢性動脈閉塞症 [閉塞性動脈硬化症 (ASO) および Burger 病 (TAO)] 治療薬開発を目的に開発された新規に合成された抗血小板薬である。Pamicogrel とその主要活性代謝物 desethyl-pamicogrel は COX および 5-lipoxygenase 阻害作用を有し, pamicogrel は経口投与により血管壁の PGI_2 よりも選択的に血小板の TXA_2 産生を抑制し, さらに十分な抗血小板作用及び抗血栓作用が認められる投与量において ASA に認められるような胃腸管障害を殆ど示さないことが報告されている⁴⁾⁻⁶⁾。さらに pamicogrel は種々の動物種における動脈血栓モデルにおいて血栓形成を抑制することが報告されている⁷⁾⁻⁹⁾。また, モルモットの赤血球変形能, 血液粘度及び血液濾過能など血液流動性を改善することが報告されている¹⁰⁾。これらの作用に基づき, pamicogrel は他の抗血小板薬よりも強い抗血栓作用が期待される。しかし, pamicogrel の慢性動脈閉塞モデルに対する治療効果については検討されていない。

そこで, pamicogrel の慢性動脈閉塞症に対する治療効果を明らかにする目的でラウリン酸誘発モルモット末梢動脈閉塞モデルに対する pamicogrel の治療効果について検討し, ticlopidine, ASA および cilostazol の作用と比較検討した。

実験材料および方法

1. 使用薬物

ラウリン酸ナトリウム (東京化成, 東京) は生理的食塩液 (大塚製薬, 徳島) を加え, 37°C に加温して溶解させ 10 mg/ml とした。Pamicogrel (日本オルガノン, 大阪), ticlopidine (日本オルガノン, 大阪), acetylsalicylic acid (ASA, 和

光純薬, 大阪) および cilostazol (日本オルガノン, 大阪) は 0.5% ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (Tween 80, 和光純薬, 大阪) 溶液に投与液量が 5 ml/kg になるように懸濁した (乳鉢で投与容量の Tween 80 とともにすりつぶし, 蒸留水で最終濃度を 0.5% とした)。Collagen (モリヤ産業, 東京) および ADP (エム・シー・メディカル, 東京) はそれぞれ付属の SKF バッファーおよび生理的食塩液に溶解した。被験薬または溶媒 (0.5% Tween 80 溶液) の経口投与はラウリン酸ナトリウム投与 1 時間後より開始し, その翌日から 1 日一回の間隔で 14 日間投与した。

今回の試験は実験規模が大きかったために 2 回 [Experiment 1 (Exp. 1) 及び Experiment 2 (Exp. 2)] に分けて実施した。従って, Exp. 1 及び Exp. 2 のそれぞれに対照群を設けた。さらに, Exp. 2 には陽性対照として pamicogrel 1 mg/kg , p.o. 投与群を組み入れた。

2. ラウリン酸誘発モルモット末梢動脈閉塞モデル

モルモットをペントバルビタール麻酔下 (ネンブタール, アボットラボラトリーズ, 40 mg/kg , i.p.) で保温パッドに固定し, 右大腿動脈を傷つけないように露出させ大腿動脈の中樞側をクレンメで止め血流を停止させ, その末梢側に注射針を順行性に刺入しラウリン酸ナトリウム (10 mg/ml in saline, 0.1 ml at 37°C) を投与した (Fig. 1A)。注射針刺入部位はアロンアルファ (東亜合成株式会社) により閉じ, ラウリン酸ナトリウム投与の 5 分後にクレンメを外し再開通させた。最後に切開部を縫合し翌日より大腿部の皮膚温度を温度センサー (THR D, 芝浦電子製作所) を使用し Animal Blanket Controller (ATB-1100, 日本光電) を介して経時的に観察した。皮膚潰瘍の進展はオペ後 3, 7, 10 および 14 日目にデジタルカメラ (PowerShot 600, Canon) を用いて写真撮影 (左右, 甲および裏方向の計 4 箇所撮影) を行い, 全ての試験終了

Fig. 1 Schematic diagram of laurate injection into femoral artery (A) and criteria for lesion score of whole paw and lower leg (B) in guinea pig.

Fig. 2 Representative photographs of ischemic lesion 14 days after sodium laurate injection. A: Sham, B: Vehicle, C: Pamicogrel at 0.3 mg/kg/day, p.o., D: Pamicogrel at 1 mg/kg/day, p.o., E: Ticlopidine at 300 mg/gk/day, p.o.

後にブラインドで3人の判定者が別々に写真判定し、2人以上一致した場合、その判定結果を採用した。また、3人とも一致しなかった場合はその中間のスコアを判定結果とした。皮膚潰瘍の判定基準は下記のとおり、潰瘍の進展の度合いを11段階に分類した (Fig. 1B)。

Grade 0: 変化なし。

Grade 1: 爪の変色が爪あるいは足の局所に限局される。

Grade 2: 爪の脱落。

Grade 3: 皮膚の変色が指部におよぶ。

Grade 4: 指部の壊死および脱落。

Grade 5: 皮膚の変色が足蹠の中足骨またはその末梢におよぶ。

Grade 6: 足蹠の中足骨またはその末梢の壊死および脱落。

Grade 7: 皮膚の変色が足全体 (whole paw) におよぶ。

Grade 8: 足全体 (whole paw) におよぶ壊死および脱落。

Grade 9: 皮膚の変色が脚 (leg) におよぶ。

Grade 10: 壊死および脱落が脚におよぶ。

3. 血小板凝集能

皮膚潰瘍の観察期間の最終日の薬物投与3時間後にモルモットをエーテル麻酔下に腹部大動脈に動脈留置針を挿入し、そこから1/10容3.8% クエン酸ナトリウム溶液の入った採血管に9/10容の血液を採取した。そのクエン酸加血を室温で $100 \times g$ 、10分間遠心し多血小板血漿 (platelet rich plasma ; PRP) を得た。その沈渣をさらに $1500 \times g$ 、10分間遠心し乏血小板血漿 (platelet poor plasma ; PPP) を得た。得られたPRPはPPPを用いて血小板数が 5×10^8 cells/ml となるように希釈した。

血小板凝集能の測定は、Bornの比濁法に従って血小板凝集能測定装置 (NBS Hematracer 1 PAT-4A) を用いて透過性の変化を測定することにより行った。すなわち、PRPを血小板凝

集能測定装置中で 37°C 、1分間インキュベーションし、コラーゲン ($10 \mu\text{g/ml}$) またはADP ($2 \mu\text{M}$) を添加し、血小板凝集を惹起させた。5分間測定を行いそのとき得られた最大透過度を血小板の凝集率とした。

4. 血小板数、血球数およびヘマトクリット値の測定

血小板凝集能の採血時に動脈留置針よりEDTA・2K採血管に2ml採血しローリングミキサーでよく攪拌した。次に自動希釈装置 (東亜医用電子, AD-241) を用いて血液を希釈液 (東亜医用電子, セルパックCPK-310A) で希釈した。白血球測定用は一段階希釈 (500倍)、赤血球、血小板およびヘマトクリット値測定用は一段階希釈 (500倍) 後さらに二段階希釈 (100倍) した。白血球測定用には溶血剤 (クイックライザ, 東亜医用電子) 3滴を滴下し、攪拌後30秒以上放置し、自動血球測定装置 (東亜医用電子, F-800) を用いて血球数、血小板数およびヘマトクリット値を測定した。

5. 統計処理

皮膚温度は、ラウリン酸処置側の大腿部皮膚温度と反対側の皮膚温度の差で表し、ラウリン酸ナトリウム投与後の各時間においてそれぞれ溶媒投与群と偽処置群は一元配置分散分析後、t検定を、溶媒投与群と各被験薬投与群はそれぞれ一元配置分散分析後、Dunnett検定を行った。血小板凝集能および血液パラメーターも同様に溶媒投与群と偽処置群は一元配置分散分析後、t検定を、溶媒投与群と各被験薬投与群はそれぞれ一元配置分散分析後、Dunnett検定を行った。皮膚潰瘍の判定については溶媒投与群と各被験薬投与群でそれぞれ繰り返し測定の分散分析を行った。その結果、有意であると見なされた薬物群については、さらに各時間においてそれぞれ一元配置分散分析後、Dunnett検定を行った。有意水準は5%未満を有意とし、5%および1%未満に分けて表示した。

Table 1 Effects of pamicogrel, ticlopidine, ASA and cilostazol on the progression of sodium laurate-induced arterial occlusive disease in guinea pigs

Drugs	Dose (mg/kg, p.o.)	n	Grade of lesion				day
			3rd	7th	10th	14th	
Experiment 1							
Sham	-	12	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	0.0 – 0.0	
Control	-	12	5.1 – 0.8	6.7 – 0.9	8.0 – 0.9	8.3 – 1.0	
Pamicogrel	0.1	12	2.7 – 0.7 *	3.5 – 0.8 *	4.2 – 1.0 *	4.5 – 1.0 *	
	0.3	12	1.3 – 0.5 **	1.8 – 0.7 **	2.8 – 1.0 **	3.4 – 1.0 **	
	1	12	0.3 – 0.3 **	0.5 – 0.5 **	0.7 – 0.7 **	0.7 – 0.7 **	
Ticlopidine	100	12	2.8 – 0.8	3.7 – 0.9 *	4.3 – 1.0 *	4.8 – 1.1 *	
	300	12	1.3 – 0.6 **	3.0 – 0.9 *	3.4 – 1.1 **	3.6 – 1.2 **	
Experiment 2							
Control	-	12	3.3 – 0.5	6.2 – 0.5	7.3 – 0.6	8.1 – 0.5	
ASA	10	12	5.1 – 0.4 *	7.1 – 0.3	8.3 – 0.4	8.8 – 0.5	
	30	12	5.3 – 0.3 *	8.0 – 0.3 *	9.3 – 0.3 *	9.5 – 0.2	
	100	12	2.8 – 0.7	5.0 – 0.8	6.8 – 0.8	7.3 – 0.8	
Cilostazol	10	12	4.7 – 0.6	7.4 – 0.7	8.5 – 0.6	9.1 – 0.5	
	30	12	3.7 – 0.6	6.3 – 0.7	8.2 – 0.6	8.6 – 0.4	
Pmicogrel	1	12	1.9 – 0.7	2.8 – 1.0 **	3.1 – 1.1 **	3.4 – 1.3 **	

Drugs were orally administered 1 hr and once a day for 14 days after sodium laurate injection. Data were expressed as mean $\pm$ S.E. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control (one-way ANOVA followed by Dunnett's test). In the two-way ANOVA with repeated measures, there was significant difference between control and pamicogrel groups, between control and ticlopidine groups, and between control and ASA groups. However, there was no significant difference between control and cilostazol groups.

成 績

1. 皮膚潰瘍に対する作用

Fig. 2 および Table 1 に示すように、溶媒投与群においてラウリン酸ナトリウム投与後時間経過に伴って皮膚潰瘍病変の進行が認められ、その病変の進行は 10 日後にほぼプラトーに達した。それに対して pamicogrel (0.1, 0.3 および 1 mg/kg, p.o.) 投与群は用量依存的に皮膚潰瘍の進展を抑制した。Ticlopidine (100 および 300 mg/kg, p.o.) 投与群も同様に用量依存的に皮膚潰瘍の進展を抑制した。ASA は皮膚潰瘍の進展を 10 mg/kg においてラウリン酸ナトリウム投与 3 日後に、30 mg/kg において 3, 7 および 10 日後に溶媒投与群と比較して有意に増悪させたが、100 mg/kg の用量では明らかな作用を示さなかった。Cilostazol (10 および 30 mg/kg, p.o.) は今回検討した用量において皮膚潰瘍の

進展に対して溶媒投与群と比較して明らかな作用を示さなかった。一方、ラウリン酸ナトリウムの代わりに生理的食塩液を動脈内投与した偽手術 (sham) 群の後肢の皮膚には全く変化は認められなかった。

2. 皮膚温に対する作用

大腿部の皮膚温度は溶媒投与群においてラウリン酸ナトリウム処置側が反対側と比較して 1 および 3 日後において低値を示した (Table 2)。その皮膚温の低下は 7 日以降には sham の水準まで回復した。Pamicogrel (0.1, 0.3 および 1 mg/kg, p.o.) 投与群は溶媒投与群と比較してラウリン酸ナトリウム処置 1 および 3 日後の皮膚温の低下を抑制し、1 mg/kg 投与群において有意差が認められた。Ticlopidine (100 および 300 mg/kg, p.o.) 投与群も同様に皮膚温の低下を抑制する傾向が認められたが、100 mg/kg

Table 2 Effects of pamicogrel, ticlopidine, ASA and cilostazol on the skin temperature of the thigh in guinea pigs

Drugs	Dose (mg/kg, p.o.)	Skin temperature of the thigh (△□℃)										
		1st		3rd		7th		10th		14th		day
Experiment 1												
Sham	-	-0.13	- 0.04 **	-0.13	- 0.05 **	-0.15	- 0.04	-0.13	- 0.04	-0.07	- 0.05	
Control	-	-0.71	- 0.13	-0.49	- 0.08	-0.19	- 0.08	-0.11	- 0.07	-0.10	- 0.05	
Pamicogrel	0.1	-0.40	- 0.10	-0.30	- 0.09	-0.18	- 0.07	-0.28	- 0.05	-0.14	- 0.07	
	0.3	-0.49	- 0.10	-0.25	- 0.08	-0.07	- 0.07	-0.25	- 0.07	-0.26	- 0.04	
	1	-0.24	- 0.05 **	-0.22	- 0.06 *	-0.20	- 0.04	-0.13	- 0.04	-0.16	- 0.05	
Ticlopidine	100	-0.27	- 0.12 *	-0.28	- 0.06	-0.14	- 0.05	-0.16	- 0.06	-0.10	- 0.07	
	300	-0.32	- 0.13	-0.28	- 0.07	-0.17	- 0.09	-0.16	- 0.06	-0.22	- 0.07	
Experiment 2												
Control	-	-1.26	- 0.13	-0.60	- 0.10	-0.28	- 0.11	-0.04	- 0.07	-0.01	- 0.07	
ASA	10	-1.42	- 0.16	-0.81	- 0.12	-0.46	- 0.10	-0.15	- 0.07	-0.13	- 0.05	
	30	-1.51	- 0.15	-1.08	- 0.12 *	-0.36	- 0.09	-0.03	- 0.08	-0.07	- 0.08	
	100	-1.43	- 0.19	-0.76	- 0.19	-0.48	- 0.07	-0.13	- 0.05	-0.13	- 0.05	
Cilostazol	10	-1.26	- 0.17	-0.99	- 0.13	-0.48	- 0.10	-0.07	- 0.05	-0.07	- 0.06	
	30	-1.54	- 0.19	-0.98	- 0.17	-0.35	- 0.11	-0.09	- 0.08	-0.06	- 0.06	
Pamicogrel	1	-0.77	- 0.14 *	-0.34	- 0.08	-0.35	- 0.09	-0.08	- 0.06	-0.13	- 0.06	

Drugs were orally administered 1 hr and once a day for 14 days after sodium laurate injection. Data were expressed as mean ± S.E. n=12, * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control (one-way ANOVA followed by Dunnett's test or t-test).

投与群の 1 日後に有意差が認められたのみであった。ASA は 30 mg/kg 投与群の 3 日後のみに有意な皮膚温低下増強作用が認められた。Cilostazol (10 および 30 mg/kg, p.o.) は今回検討した用量において大腿部皮膚温に対して溶媒投与群と比較して明らかな作用を示さなかった。一方, sham 群は処置側が反対側よりも低い傾向を示したがその変化はわずかなものであった。

3. 血小板凝集能に対する作用

ラウリン酸ナトリウム投与 14 日後の血液パラメーターおよび血小板凝集能に対する pamicogrel, ticlopidine, ASA および cilostazol の影響を Table 3 に示す。Pamicogrel は collagen (10 µg/ml) 凝集を 1 mg/kg, p.o. 投与群において溶媒投与群と比較して有意に抑制した。一方, ADP 凝集については明らかな作用を示さなかった。Ticlopidine は ADP 凝集を 300 mg/kg, p.o. 投与群において有意に抑制したが, collagen 凝

集には明らかな作用を示さなかった。ASA は 100 mg/kg, p.o. 投与群において collagen 凝集を有意に抑制したが, ADP 凝集には明らかな作用を示さなかった。Cilostazol は今回検討した用量において collagen および ADP 凝集に対して明らかな作用を示さなかった。また, 今回使用した薬物は連日投与 2 週間後において血小板数, 赤血球数, 白血球数およびヘマトクリット値に全く影響を与えなかった。

考 案

Pamicogrel は種々の血栓モデルにおいて非常に強力な抗血栓作用を示すことが明らかとなっている⁷⁻⁹⁾。しかし, それらの作用は全て予防効果であり, 治療効果については全く検討されていない。特に, 臨床において慢性動脈閉塞症の治療効果は薬物の効果を判定する上で重要な判定基準であることから動物実験において末梢動脈閉塞モデルにおける治療効果を検討する必

Table 3 Effects of pamicogrel, ticlopidine, ASA and cilostazol on the hematological parameter and the platelet aggregation in guinea pigs

Drugs	Dose (mg/kg, p.o.)	Platelets (10 ⁴ cells/mm ³)	Erythrocytes (10 ⁴ cells/mm ³)	Leukocytes (10 ² cells/mm ³)	Hematocrit (%)	Platelet aggregation (%)	
						Collagen 10□g/ml	ADP 2□M
Experiment 1							
Sham	-	67.4 ± 2.7 (n=12)	522.8 ± 14.0 (n=12)	65.8 ± 6.8 (n=12)	43.9 ± 1.1 (n=12)	76.4 ± 1.6 (n=12)	69.8 ± 1.7 (n=12)
Control	-	77.1 ± 4.1 (n=12)	502.9 ± 26.1 (n=12)	60.4 ± 6.5 (n=12)	44.1 ± 2.1 (n=12)	74.0 ± 2.2 (n=11)	67.8 ± 2.6 (n=11)
Pamicogrel	0.1	75.5 ± 4.6 (n=12)	480.9 ± 17.8 (n=12)	59.5 ± 6.0 (n=12)	41.4 ± 1.2 (n=12)	78.7 ± 1.1 (n=12)	67.0 ± 2.5 (n=12)
	0.3	80.6 ± 4.7 (n=12)	486.5 ± 12.3 (n=12)	59.9 ± 5.3 (n=12)	41.3 ± 0.9 (n=12)	77.2 ± 1.7 (n=10)	67.9 ± 2.1 (n=10)
	1	76.6 ± 3.9 (n=12)	508.3 ± 13.3 (n=12)	68.7 ± 6.6 (n=12)	43.1 ± 0.9 (n=12)	56.4 ± 7.3 *	69.0 ± 1.8 (n=12)
Ticlopidine	100	75.0 ± 3.7 (n=12)	451.4 ± 19.5 (n=12)	67.9 ± 7.4 (n=12)	40.6 ± 1.1 (n=12)	75.9 ± 2.1 (n=12)	61.2 ± 3.1 (n=12)
	300	81.4 ± 3.5 (n=12)	470.0 ± 19.0 (n=12)	59.8 ± 5.2 (n=12)	41.3 ± 1.1 (n=12)	75.0 ± 1.5 (n=12)	49.8 ± 1.8 ** (n=12)
Experiment 2							
Control	-	82.1 ± 2.5 (n=12)	462.0 ± 17.6 (n=12)	41.8 ± 3.2 (n=12)	40.1 ± 0.9 (n=12)	76.7 ± 1.8 (n=12)	73.6 ± 2.9 (n=12)
ASA	10	84.5 ± 5.0 (n=12)	476.3 ± 17.2 (n=12)	39.3 ± 3.0 (n=12)	40.8 ± 1.0 (n=12)	74.5 ± 1.5 (n=12)	70.6 ± 1.5 (n=12)
	30	75.6 ± 3.3 (n=12)	474.3 ± 9.6 (n=12)	43.3 ± 5.4 (n=12)	40.2 ± 0.7 (n=12)	74.5 ± 2.0 (n=11)	70.1 ± 2.5 (n=11)
	100	81.9 ± 3.8 (n=11)	452.0 ± 16.0 (n=11)	38.8 ± 2.2 (n=11)	40.2 ± 1.1 (n=11)	60.9 ± 4.1 ** (n=12)	67.9 ± 2.3 (n=12)
Cilostazol	10	77.3 ± 4.9 (n=12)	455.8 ± 16.3 (n=12)	39.5 ± 3.1 (n=12)	39.0 ± 1.3 (n=12)	74.2 ± 1.1 (n=11)	75.5 ± 1.9 (n=11)
	30	84.3 ± 4.3 (n=12)	476.3 ± 27.4 (n=12)	47.5 ± 3.7 (n=12)	40.8 ± 1.9 (n=12)	73.2 ± 1.4 (n=12)	71.5 ± 2.0 (n=12)
Pamicogrel	1	73.2 ± 5.5 (n=12)	467.7 ± 18.0 (n=12)	40.3 ± 3.8 (n=12)	39.9 ± 1.1 (n=12)	63.9 ± 2.4 ** (n=11)	69.4 ± 1.8 (n=11)

Drugs were orally administered 1 hr and once a day for 14 days after sodium laurate injection. Data were expressed as mean $\pm$ S.E. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control (one-way ANOVA followed by Dunnett's test or t-test).

要がある。

末梢動脈閉塞モデルは、主にラットにおいてラウリン酸または乳酸の動脈内投与モデルおよび酢酸の皮内投与モデルが報告されている¹¹⁾⁻¹³⁾。モルモットにおいてもラットと同様にラウリン酸の大腿動脈内投与によるモデルが報告されている¹⁴⁾。ラウリン酸は陰イオン性界面活性剤であり、大腿動脈より順行性に投与することにより投与部位より末梢の血管内皮細胞を傷害させ、慢性的な循環障害を誘発することができる。この末梢循環不全により大腿部の皮膚温度の低下、後肢の循環不全による変色に続き、壊死脱落が起こる。これらの病態は血管内皮細胞傷害とそれに伴う血小板凝集による血栓形成により惹起されることから、少なくとも部分的にヒトの慢性動脈閉塞症の病態と類似すると考えられ、薬物の有効性を予測するために有用なモデルの一つであると考えられる¹¹⁾。そこで今回、

モルモット末梢動脈閉塞モデルを用いた pamicogrel の治療効果について ticlopidine, ASA および cilostazol を対照薬として検討した。

溶媒投与群においてラウリン酸ナトリウム動脈内投与後、時間経過に伴って皮膚潰瘍病変の進行が認められた。一方、ラウリン酸ナトリウムの代わりに生理的食塩液を投与した sham 群では 14 日間の観察期間中において処置側後肢に病変は全く認められなかった。大腿部の皮膚温度は溶媒投与群においてラウリン酸ナトリウム処置側が反対側と比較して 1 および 3 日後では低値を示した。その皮膚温の低下は時間経過に伴い回復する傾向を示した。一方、sham 群ではその皮膚温低下は僅かであった。したがって、本試験におけるラウリン酸ナトリウム投与による皮膚潰瘍の進展および大腿部皮膚温度の低下は手術等による障害ではなくラウリン酸ナトリウムの投与によると考えられる。

Pamicogrel は用量依存的に皮膚潰瘍の進展を抑制した。また, pamicogrel は 1 および 3 日後の大腿部皮膚温度の低下を抑制する傾向を示し 1 mg/kg 投与群において 1 および 3 日後の皮膚温度の低下を有意に抑制した。Pamicogrel は collagen 凝集を抑制したことから, この pamicogrel の作用には抗血小板および抗血栓作用が関与すると考えられる。

Ticlopidine も同様に用量依存的に皮膚潰瘍の進展を抑制した。また, 大腿部皮膚温度の低下に関しても同様に抑制する傾向を示したが, 100 mg/kg 投与群の 1 日後のみ有意であった。Ticlopidine は既にモルモット末梢動脈閉塞モデルにおいて治療効果を示すことが報告されており, その作用は今回の成績とほぼ一致するものであった¹¹⁾。Ticlopidine は ADP 凝集を抑制したことから, 本モデルにおける ADP 凝集の関与が示唆される。

ASA は 10 mg/kg, p.o. 投与群において 3 日後に, 30 mg/kg, p.o. 投与群において 3, 7 および 10 日後に溶媒投与群と比較して皮膚潰瘍病変を増悪させたが, 100 mg/kg, p.o. 投与群においては明らかな差は認められなかった。また, ASA は 30 mg/kg, p.o. 投与群において皮膚温度の低下を有意に増強させた。これは ASA が同用量において皮膚潰瘍を悪化させた結果と一致した。本試験において Exp. 1 及び Exp. 2 それぞれに対照群の障害の経過が異なっていた。また, Exp. 2 における pamicogrel 1 mg/kg の皮膚潰瘍に対する結果は有意差は認められたが Exp. 1 の結果より少し弱かった。この違いの原因は明らかではないが, 実施した時期または別々の時期に入荷した動物の反応性の違いによる可能性が考えられる。

本試験において ASA (100 mg/kg, p.o.) と pamicogrel (1 mg/kg, p.o.) の collagen 誘発血小板凝集に対する抑制作用はほぼ同等であった。これらの結果は Yokota らにより既に報告されている結果と一致するものであった⁵⁾。しかし, 今回の検討で collagen 凝集に対する両薬剤の抑

制作用がこれまでの報告より弱かったのは使用したコラーゲン濃度が高かったためであると考えられる。一方, 皮膚潰瘍に対する効果は pamicogrel が有意な保護作用を示したのに対して, ASA は無効あるいは一部の用量で有意な増悪作用を示した。この結果は, 1) pamicogrel が血小板の cyclooxygenase (COX) を血管内皮細胞の COX よりも選択的に抑制する⁶⁾, 2) pamicogrel が血液流動性及び赤血球変形能を改善する¹⁰⁾ など ASA には無い pamicogrel の特性に起因することが示唆される。さらに, ASA はモルモット末梢動脈閉塞モデルにおいて治療効果を示さないことが既に報告されており¹⁴⁾, 本研究において ASA の低用量により皮膚潰瘍の進展を促進させた機序については明らかではないが, 高用量の 100 mg/kg, p.o. 投与群に関しては溶媒投与群と比較して明らかな作用が認められなかったことから, その報告と一致する。一方, thromboxan A₂ (TXA₂) 受容体拮抗薬はモルモット末梢動脈閉塞モデルにおいて著明な治療効果を示すことが報告されていることから, 本モデルにおいて TXA₂ が重要な役割を果たしていると考えられる^{11) 14)}。したがって, ASA が本モデルにおいて無効である理由としてはアスピリンジレンマと称される血管内皮細胞内の cyclooxygenase-1 (COX-1) を抑制することによる prostacyclin (PGI₂) の産生抑制により血管収縮および血小板凝集を逆に増強してしまった結果によるかもしれない。Pamicogrel は ASA と同様に COX 阻害作用を有するが, その作用は血小板選択的であることから TXA₂ 受容体拮抗薬と同様な著明な治療効果が得られたものと考えられる⁴⁾。

一方, cilostazol は今回検討した用量において皮膚潰瘍の進展および大腿部皮膚温度に対して明らかな作用を示さなかった。Cilostazol は 14 日後の血小板凝集を抑制しなかったことから, 今回検討した薬物の用量が低かったか, あるいは動物種差が考えられる。

以上の結果から, pamicogrel はモルモット末

梢動脈閉塞モデルにおいて著明な治療効果を示すことが明らかとなった。これらの結果から pamicogrel が臨床において慢性動脈閉塞症の治療薬としての有用性が期待できる。

文 献

- 1) Roth G J and Calverley DC: Aspirin, platelets, and thrombosis: theory and practice. *Blood* **83** : 885-898, 1994.
- 2) Graham DY: The relationship between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and peptic ulcer disease. *Gastroenterol Clin North Am* **19** : 171, 1990.
- 3) Gabriel SE, Jaakkimainen L and Bombardier C: Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: A meta-analysis. *Ann Intern Med* **115** : 787, 1991.
- 4) Yamashita A, Matsuo K, Yokota K, Ito K and Nurimoto S: Anti-platelet effect and mode of action of a new anti-platelet agent KBT-3022. *Eur J Pharmacol* **183** : 340, 1990.
- 5) Yokota K, Yamamoto N, Morimoto Y, Yamashita A and Oda M.: Effect of KBT-3022, a new diphenylthiazole derivative, on platelet functions. *J Pharm Pharmacol* **47** : 768-774, 1995.
- 6) Matsuo K, Yokota K, Yamashita A and Oda M: The mechanism of action of KBT-3022, a new antiplatelet agent. *Gen Pharmacol* **28** : 229-235, 1997.
- 7) Yokota K, Yamashita A and Oda M: Anti-thrombotic activity of KBT-3022 in experimental models of thrombosis. *Jpn J Pharmacol* **68** : 201-206, 1995.
- 8) Shimazawa M, Takiguchi Y, Umemura K, Kondo K and Nakashima M.: Antithrombotic effects in a rat model of aspirin-insensitive arterial thrombosis of desethyl KBT-3022, the main active metabolite of a new antiplatelet agent, KBT-3022. *Eur J Pharmacol* **328** : 183-189, 1997.
- 9) Shimazawa M, Takiguchi Y, Umemura K and Nakashima M: Antithrombotic effects of KBT-3022, a novel antiplatelet agent, in an arterial thrombosis model in the guinea-pig. *Drug Dev Res* **40** : 217-222, 1997.
- 10) Yamamoto N, Yokota K, Yamashita A and Oda M: The effects of KBT-3022, a new anti-platelet agent, on hemorheological properties in guinea pigs. *Thromb Haemost* **73** : 118-121, 1995.
- 11) Ashida S, Ishihara M, Ogawa H and Abiko Y: Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats. *Thrombosis Res* **18** : 55-67, 1980.
- 12) 岩本政博, 原 剛, 小河秀正, 富川宗博: Argipidine (MD-805) の末梢動脈閉塞症モデルに対する予防効果, 薬理と治療 **14** : Suppl. 5, 903-911, 1986.
- 13) Nishio S, Yamaguchi M, Yamada N, Uenishi N, Kageyama Y and Umetsu T: Effect of beraprost sodium (TRK-100) on acetic acid-induced skin ulcer. *Res. Com in Chem. Pathology and Pharmacol* **64** : 381-393, 1989.
- 14) Shirakura S, Higo K, Takeda M and Karasawa A: Antithrombotic effects of KW-3635, a thromboxane A₂-receptor antagonist, in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol* **65** : 93-98, 1994.

Effect of pamicogrel, a new antiplatelet drug, on the progression of sodium laurate-induced arterial occlusive disease in guinea pigs

Masamitsu SHIMAZAWA^{*1}, Yuki MIYAKE^{*2}, Takafumi YAMAGUCHI^{*3}

Koichi YOKOTA^{*3}, Takayuki SUKAMOTO^{*2}, Hideaki HARA^{*1}

Key words: antiplatelet drug, arterial occlusive disease, guinea pig, pamicogrel, skin temperature

We examined the protective effect of pamicogrel, a new antiplatelet drug, on the sodium laurate-induced peripheral arterial occlusive disease of posterior limb in the guinea-pig, and compared its effect with those of acetylsalicylic acid, ticlopidine and cilostazol. In the control group given saline alone, the sodium laurate injection at 1mg/leg into the right femoral artery caused an ischemic change in the peripheral posterior limb followed by appearance of violet color around the whole paw, edema, gangrene, mummification and falling off of fingers, whole paw and lower leg after 3 to 14 days. Decrease of the skin temperature at the site of sodium laurate injection was significantly inhibited as compared with that of the control group on days 1 and 3. Oral administration of pamicogrel (0.1, 0.3 and 1 mg/kg, p.o.) and ticlopidine (100 and 300 mg/kg, p.o.) 1 hr after the injection of sodium laurate and successively once a day over a period of 14 days dose-dependently inhibited the development of ischemic lesion in the posterior limb and decrease the skin temperature of the ipsilateral thigh. In contrast, acetylsalicylic acid given at 10 and 30 mg/kg (p.o.) significantly exacerbated the development of ischemic lesion in the ipsilateral limb on day 3, and on days 3, 7 and 10, respectively, but not at 100 mg/kg (p.o.). On the other hand, cilostazol (10 and 30 mg/kg, p.o.) had little preventive effect on the progression of ischemic lesion and the decrease of skin temperature of the ipsilateral thigh.

These observations suggest that pamicogrel can be clinically effective against chronic arterial occlusive diseases.