冠血管拡張薬モルシドミン代謝物による 血小板凝集抑制作用

西川 政勝* 遠藤登代志* 金森 正志*
日高 弘義* 藤原 元始**

Inhibition of platelet aggregation by a novel coronary vasodilator, molsidomine and its metabolites

Masakatsu NISHIKAWA*, Toyoshi ENDO*, Masashi KANAMORI*,
Hiroyoshi HIDAKA* and Motohatsu FUJIWARA**

Key words : platelet aggregation, molsidomine, guanylate cyclase,
antianginal agent, inhibition of platelet aggregation

The effects of a novel antianginal agent, molsidomine (N-ethoxycarbonyl-3-morpholinonydnonimine (SIN-10)) and its metabolites (3-morpholinonydnonimine (SIN-1), N-nitroso-N-morpholinoaminoacetonitrile (SIN-1A), cyanomethylenaminomorpholine (SIN-1C)) on human platelet aggregation and guanylate cyclase were investigated. SIN-10 and SIN-1C were weak inhibitors of platelet aggregation induced by collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and ADP (4 μM). SIN-1 and SIN-1A were 1,000 times more potent inhibitors of platelet aggregation than were SIN-10 and SIN-1C. The concentration of SIN-1 and SIN-1A producing 50% inhibition of the platelet aggregation induced by 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of collagen were 0.6 μM and 0.08 μM respectively. SIN-1A was about 10 times more potent inhibitor than SIN-1. Human platelet guanylate cyclase was markedly stimulated by SIN-1 and SIN-1A and half maximal stimulation by these agents were produced by 2 μM and 0.2 μM , respectively. SIN-10 and SIN-1C did not stimulate the guanylate cyclase activity at concentrations up to 10 mM.

We now report that the metabolites of SIN-10, such as SIN-1 and SIN-1A inhibit human platelet aggregation *in vitro* and also stimulate guanylate cyclase purified from human platelets. Inhibition of platelet aggregation by SIN-10 metabolites may account for a part of their beneficial effects in coronary artery disease.

* 三重大学医学部薬理学教室 (〒514 津市江戸橋 2-174), Department of Pharmacology, Mie University School of Medicine, Tsu, Japan.

** 京都大学医学部薬理学教室, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

Fig. 1 Chemical structures of molsidomine and its metabolites. Refer to the text for nomenclature of the compounds.

はじめに

虚血性心疾患の病態發生に、冠減少循環系における血小板の活性化が重要な因子の一つとなる可能性が報告されている^{1,2)}。Nitroglycerin や他の有機亜硝酸剤は、古くより狭心症の治療薬物として用いられている。最近、これらの薬物が *in vitro* において血小板凝集を抑制することが報告された³⁾。一方、メソイオン化合物の一種である Molsidomine (N-ethoxycarbonyl-3-morpholinosydnonimine) は生体内で血管拡張作用を有し^{4,5)}、狭心症の治療、予防薬として用いられてきたが、われわれは、Molsidomine 代謝物である SIN-1 (3-morpholinosydnonimine)、SIN-1A (N-nitroso-N-morpholinoaminoacetoneitrile) が *in vitro* において非常に強力な血小板凝集抑制作用を有し、血小板 guanylate cyclase の活性化作用のあることを発見したので報告する。

Molsidomine (SIN-10) は、主な代謝臓器である肝臓にて脱アシル化され、SIN-1 となり、さらに SIN-1 A、SIN-1 C (cyanomethylene

aminomorpholine) へと代謝される^{6,7)}。(以下 SIN-化合物)(**図 1**)

I. 材料と方法

SIN-10, SIN-1, SIN-1 A, SIN-1 C (武田薬品) は, 要時調整し実験操作中は遮光氷冷して用いた。

凝集実験：血小板凝集は、クエン酸加血(0.38 % trisodium citrate：ヒト全血＝1：9)より遠心分離(120 g, 15 分)し作成した多血小板血漿 (PRP)を用い、理化電機社製アグリゴメーター (RAM 41)にて、Born らの方法⁸⁾に従い測定した。PRP 0.27 ml に各濃度の薬物(生食で希釈) 0.03 ml を加え、37 °C 3 分間 preincubate した後に、適当量の各種凝集惹起物質を加え、生じた凝集反応を PRP を 0 %、乏血小板血漿 (PPP) を 100 % とした時の光透過度で記録した。

血小板 guanylate cyclase 活性：血小板 guanylate cyclase は、日高らの方法^{9,10)}に従い、ヒト血小板を超音波処理後、その可溶分画を、DEAE-セルロースカラムと Sepharose-6 B カラムを用いて、GTPase, PDE, lipoxidase を含まない酵素を精製し、用いた。Guanylate cyclase の活性は、日高らの方法に準じ^{9,10)}、³H-GTP を基質として測定した。また、血小板 cyclic-GMP phosphodiesterase 活性は、日高、浅野の方法^{11,12)}で ³H-cyclic GMP を基質として測定した。

II. 結 果

1. Molsidomine (SIN-10) およびその代謝物のヒト血小板凝集に及ぼす影響

図 2 は, collagen $1 \mu\text{g/ml}$, ADP $4 \mu\text{M}$ を凝集惹起物質として用いた場合の凝集曲線である. SIN-10 および SIN-1 C は, $100 \mu\text{M}$ の濃度でも, ほとんど凝集抑制作用を示さなかった. SIN-1 および SIN-1 A は, 濃度依存的に collagen 凝集, ADP 凝集を抑制した. collagen 凝集に対する 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は, SIN-1 $0.62 \mu\text{M}$, SIN-1 A $0.08 \mu\text{M}$ であり, ADP 凝集に対する IC_{50} は, SIN-1 $5.8 \mu\text{M}$, SIN-1 A $0.38 \mu\text{M}$ であった. すなわち, SIN-1 および

Fig. 2 Effects of SIN-compounds on human platelet aggregation induced by collagen (1 $\mu\text{g/ml}$) and ADP (4 μM). The figure beside each aggregation curve gives the final concentration (μM) of the compound.

SIN-1 A はともに非常に強力な血小板凝集阻害作用を有し、また、ニトロソ化合物である SIN-1 A は、約 10 倍、SIN-1 より血小板凝集阻害作用が強いことが判明した。他の凝集惹起物質(epinephrine, thrombin, A-23187, arachidonic acid)による血小板凝集についても同様であった。ただし、ristocetin 凝集に対しては、SIN-1 および SIN-1 A の抑制は認められなかった。

2. 血小板 guanylate cyclase 活性に対する SIN-化合物の影響

Nitroglycerin や Nitroprusside などのニトロ化合物は、血管を含めた平滑筋の cyclic GMP 合成酵素である guanylate cyclase 活性を増加

させる作用を有し、cyclic GMP 含量を増加させることが報告されており¹³⁻¹⁵⁾、これらニトロ化合物の作用機序の 1 つに考えられている。そこでわれわれは、SIN-化合物の血小板 guanylate cyclase 活性に対する影響を検討した。図 3 に示したように、血小板凝集抑制作用の弱い SIN-10 および SIN-1 C は、血小板 guanylate cyclase 活性には、全く作用しなかった。一方、SIN-1 および SIN-1 A は、血小板 guanylate cyclase 活性を約 3 倍上昇させることが明らかとなった。SIN-1 A の方が SIN-1 より低濃度で作用し、SIN-1 は SIN-1 A より約 10 倍高濃度を必要とすることが判明した。さらに、cyclic GMP 分解酵素である cyclic GMP phosphodiesterase,

Fig. 3 Effects of SIN-compounds on soluble guanylate cyclase activity from human platelets. Each point is the average of two determinations. Reaction mixtures contained 56 μ g of the enzyme.

cyclic AMP 系の adenylate cyclase, cyclic AMP phosphodiesterase には, SIN-化合物は, 効果がなかった。

III. 考 案

モルシドミンおよびその生体内代謝産物である SIN-1, SIN-1 A, SIN-1 C の化学構造—生物活性に関するわれわれの結果より, ニトロソ化合物である SIN-1 A が最も強力な作用を示し, 次いで NO がリング状の SIN-1 であった。NO を含まない SIN-1 C は, ほとんど作用がないことから SIN-化合物のニトロソ基が, 薬物の作用を論ずる上で重要と考えられる。また, モルシドミン代謝物である SIN-1 および SIN-1 A が, 血管拡張作用ばかりでなく⁴⁻⁵⁾, 非常に強力な血小板凝集抑制作用を有することは, 狭心症などの虚血性心疾患の予防, 治療上有益に作用する可能性を示唆する。作用機序として, guanylate cyclase の活性化による cyclic GMP 含量の増加が考えられるが, これのみで作用のすべてを説明できるか否かはさらに検討を要すると思われる。

文 献

- 1) Weiss, H. : Antiplatelet drugs—A new pharmacologic approach to the prevention of thrombosis. *Am. Heart J.*, **92**; 86~102, 1976.
- 2) Schafer, A. I. and Handin, R. I. : The role of platelets in thrombotic and vascular disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **22**; 31~52, 1979.
- 3) Andrew, I., Schafer, R., Alexander, R. W. and Handin, R. I. : Inhibition of platelet function by organic nitrate vasodilators. *Blood*, **55**; 649~654, 1980.
- 4) Hashimoto, K., Taira, H., Hirata, M. and Kokubun, M. : The mode hypotensive action of newly synthesized sydnonimine derivatives. *Arzneim-Forsch. (Drug Res.)*, **21**; 1329~1332, 1971.
- 5) Hirata, M. and Kikuchi, K. : Coronary collateral vasodilator action of N-ethoxycarbonyl-3-morpholinosydnonimine (SIN-10) in heart with chronic coronary insufficiency in dogs. *Jap. J. Pharmacol.*, **20**; 187~193, 1970.
- 6) Tanayama, S., Fujita, T., Shirakawa, Y. and Suzuoki, Z. : Metabolic fate of 5-ethoxycarbonyl-3-morpholinosydnonimine (SIN-10). *Jap. J. Pharmacol.*, **20**; 413~423, 1970.
- 7) Tanayama, S., Nakai, Y., Fujita, T. and Suzuoki, Z. : Biotransformation of molsidomine (N-ethoxycarbonyl-3-morpholinosydnonimine), a new anti-anginal agent, in rats. *Xenobiotica*, **4**; 175~191, 1974.
- 8) Born, G. V. R. : Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, **194**; 927~929, 1962.
- 9) Asano, T. and Hidaka, H. : Purification of guanylate cyclase from human platelets and effect of arachidonic acid peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**; 1332~1336, 1977.
- 10) Hidaka, H. and Asano, T. : Stimulation of human platelet guanylate cyclase by unsaturated fatty acid peroxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**; 3657~3661, 1977.
- 11) Hidaka, H. and Asano, T. : Human blood platelet 3, : 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Isolation of low-km and high-km phosphodiesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, **249**; 485~497, 1976.
- 12) Hidaka, H. and Asano, T. : Platelet cyclic

- 3' : 5'-nucleotide phosphodiesterase released by thrombin and calcium ionophore. J. Biol. Chem., **251**; 7508~7516, 1976.
- 13) Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B., Gruetter, D. Y., Kadowitz, P. J. and Ignarro, L. J. : Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. J. Cyclic Nucleotide Res., **5**; 211~224, 1979.
- 14) Böhme, E., Graf, H. and Schultz, G. : Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. Adv. Cyclic Nucleotide Res., **9**; 131~143, 1978.
- 15) Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad, F. : Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. J. Cyclic Nucleotide Res., **3**; 23~35, 1977.

● 周産(生)期感染症の臨床指針書！

妊婦・胎児・新生児の感染症

編集 日本周産(生)期医学研究会 専門医91氏分担執筆

B5判 289頁 図102 表175 定価9,800円(〒240円)

本書は周産(生)期医学の立場に立って問題の多い妊婦、胎児、新生児の感染症を再検討し、ウイルス、マイコプラズマ、原虫、細菌を含めて、新しく見出された疾患、従来より知られた感染症を現代の進歩したウイルス学、細菌学および免疫学より洗い直し、産婦人科医、小児科医の実地診療上必要な感染症の臨床指針書である。

●内容：〔妊婦の感染症〕1. 妊婦感染症、2. 化学療法、3. 産褥感染症、4. 妊婦慢性腎盂腎炎、〔胎児の感染症〕1. 胎児感染症の化学療法、2. 先天性トキソプラズマ症、3. サイトロメガロウィルス感染症、4. HBs抗原と垂直感染、5. B型肝炎ウィルスの垂直感染、6. B型肝炎ウィルスの母児間伝播、7. 前期破水、分娩遅延と未熟児感染症、8. 感染の母児相関、9. 新生児肺炎と産科的異常、10. 妊婦予防接種の胎児への影響、〔新生児の感染症〕1. 新生児感染症、2. 新生児と抗生物質、3. 新生児感染症の診断と治療、4. 先天性免疫不全症と新生児敗血症、5. 予後不良であった新生児細菌感染症、6. 未熟児室における感染症の集団発生、7. 新生児室内感染、8. 細菌培養と感受性検査、〔周産期感染症と免疫〕1. 妊婦の感染と免疫、2. 胎児感染と免疫、3. 新生児感染症と免疫、4. 初乳の免疫に関する役割。