血小板の凝集およびアラキドン酸代謝に及ぼす
thromboxane 合成酵素阻害剤 (OKY-1581) 投与の効果

大熊 稔* 高山 博史* 内野 治人*
近藤 規元** 川崎 晃義** 稲川 寿夫**

Effects of intraveous injection of thromboxane
synthetase inhibitor (OKY-1581) on aggregation and
arachidonate metabolism of rabbit platelets

Minoru OKUMA*, Hiroshi TAKAYAMA*, Haruto UCHINO*,
Norimoto KONDO**, Teruyoshi KAWASAKI** and Toshio INAGAWA**

Key words: thromboxane synthetase inhibitor, OKY-1581, platelet
aggregation, aortic ring, prostacyclin (PGI₂)

Aggregation and ¹⁴C-arachidonic acid (AA) metabolism of rabbit platelets were studied before and after intravenous injection of a selective thromboxane (TX) synthetase inhibitor, OKY-1581 (1-3 mg/kg). Platelet aggregation induced by threshold concentrations of collagen and AA was inhibited for at least 3 hr after the injection, but ADP-induced aggregation was not. The inhibitory effect of OKY-1581 injection on platelet TX synthetase was demonstrated by thin-layer radiochromatographic quantitation of lipid products obtained by incubating ¹⁴C-AA with washed platelets prepared after the injection: decreased production of TXB₂ and hydroxyheptadecatrienoic acid associated with increased prostaglandin H₂. When platelet-rich plasma (PRP) was preincubated in aggregometer cuvettes at 37°C for 7 min with a rat aortic ring whose cyclo-oxygenase had been inhibited by aspirin injection, ADP-induced aggregation was inhibited in PRP prepared after the injection. This inhibitory effect of the aorta was hardly observed when platelet cyclo-oxygenase had been inhibited by indomethacin. When PRP prepared before the injection was employed, 2 aortic

* 京都大学医学部内科第一講座〔〒606 京都市左京区聖護院川原町54〕, The First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

** 小野薬品工業株式会社中央研究所〔〒618 大阪府三島郡本町桜井3-11〕, Research Institutes, Ono Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan.

rings were necessary to inhibit platelet aggregation. These results suggested that ADP-induced aggregation was inhibited by prostacyclin which had been generated from platelet-derived prostaglandin endoperoxides by the cyclo-oxygenase-inhibited aortic ring and that the inhibition of platelet TX synthetase by OKY-1581 injection enhanced ex vivo prostacyclin production by the aorta in PRP.

はじめに

近年各種の選択的 thromboxane (TX) 合成酵素阻害剤が開発され、その血小板あるいは血管組織の機能やアラキドン酸 (AA) 代謝に及ぼす作用が検討されてきた¹⁻⁴⁾。われわれは pyridine 誘導体で TX 合成酵素の強い阻害剤である OKY-1555³⁾の Na 塩 (OKY-1581) を動物に投与し、その前後に採取した血小板の機能や AA 代謝を検討した。さらに血管組織を薬剤投与前後の多血小板血漿 (PRP) と反応させ血管の血小板機能に及ぼす作用に対する本薬剤投与の効果を ex vivo で検討し興味ある知見を得たので報告する。

I. 実験材料および実験方法

血小板凝集は雄性家兎 (3~4.5 kg) から作成した citrated PRP (血小板数 30万/ μ l) につき、通常既報⁵⁾に準じて検討したが、血管組織を加えた実験では 0.4 ml の PRP を用いた。血管組織は雄性 Wistar 系ラット (300~350g) にアスピリン (Venopirin, ミドリ十字) を注射 (200 mg/kg, i.p.) 後30~60分に採取しその cyclo-oxygenase が阻害された下行大動脈⁶⁾で、2 mm ずつ等長に切断して用に供した。血小板による AA 代謝の検討には、洗滌血小板⁷⁾(4×10^8) に 14 C-AA (0.1 mM, 220,000 cpm, Amersham) と Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM を加えて 0.1 ml

Fig. 1 Platelet aggregation before and after OKY-1581 injection. Citrated PRP ($300 \times 10^3/\mu$ l) was prepared from blood of the same rabbit obtained before, 20 min, 3 hr and 6 hr after the injection (3 mg/kg). Arachidonic acid (AA, $\blacktriangledown$, final concentrations shown at the end of aggregation curve) and collagen (col, ∇ , 10 μ g/ml) were used as aggregating agents.

Fig. 2 ^{14}C -AA metabolism by platelets before and after OKY-1581 injection (3mg/kg). ^{14}C -AA was incubated with washed platelets prepared from blood of the same rabbit obtained at varying periods of time as indicated, and isolated lipid products were estimated by thin-layer radiochromatographic quantitation. Percent conversion to prostaglandin H_2 (PGH_2), hydroxyheptadecatrienoic acid (HHT) and thromboxane B_2 (TxB_2) was obtained by relating radioactivity of each product to the total radioactivity recovered.

Fig. 3 Effects of OKY-1581 injection on platelet/aorta interaction. PRP was prepared from blood obtained before (upper panels) and 10 min after (under panels) the injection [2 mg/kg in (A), 1 mg/kg in (B)]. Aortic rings (2 mm length each) were prepared from rats whose cyclooxygenase had been inhibited by aspirin injection. In each set of experiments, aortic rings prepared from the same rat were used. (A), A boiled (●) or intact (○) aortic ring was added to PRP of the same rabbit and preincubated in aggregometer cuvettes with stirring and $2.5 \mu\text{M}$ ADP-induced platelet aggregation was monitored. (B), After PRP of the same rabbit was preincubated with (○, one; ○○, two) or without the aortic rings as described in (A), subthreshold concentration of AA (0.2 mM) was added (▼) and then $2.5 \mu\text{M}$ ADP-induced platelet aggregation was monitored.

とし 24°C で30秒間反応させた後脂質を抽出し⁵⁾ LK5DF (Whatman) を用いて 4°C で薄層クロマトグラフィーを行った。溶媒には (A) ether/petroleum ether/acetic acid=85:15:0.1 および (B) ethyl acetate/isooctane/acetic acid/water=9:5:2:10 (v/v) の有機相を用い、autoradiography で検出されスポットを hydroxyheptadecatrienoic acid (HHT), prostaglandin H_2 (PGH_2) 又は TxB_2 (いずれも小野薬品) の

それ (沃度染色) と比較してこれらの反応産物を同定した。溶媒(A)は HHT と PGH_2 の分離に、(B)は TxB_2 の分離にそれぞれ用い、その生成量は全放射活性に対する百分率 (変換率) で検討した。ADP (Sigma), collagen (Horm), AA (半井化学) および indomethacin (住友化学) を使用した。

II. 実験成績および考察

OKY-1581 を静注 (1~3 mg/kg) し, その前後における血小板凝集能を同一家兎につき経時的に観察したところ, AAおよび collagen(とくに低濃度) による凝集は薬剤投与後著明に阻害され, 投与後6時間ではその効果が消失した。(6例検討中代表的1例の成績を図1に示す。) しかし ADP 凝集に対しては本剤投与は無効であった(図略)。また投薬前後の血小板による ^{14}C -AA 代謝を検討したところ, 図2のごとく投与後早期の血小板では PGH_2 の増加ならびに HHT と TXB_2 の低下が認められた。OKY-1555 と in vitro で incubate された血小板でも, OKY-1581 静注後における上記の変化と同様な血小板凝集や AA 代謝の変化が報告されており³⁾, OKY-1581 の静注により in vivo においても血小板の TX 合成酵素が阻害されて凝集が抑制されると考えられる。

アスピリン投与で cyclo-oxygenase を阻害した血管切片(1個)を PRP と凝集計のキューベット内で 37°C , 7分間反応させると, 沸騰水中で10分間熱処理した血管を用いた場合に比し ADP 凝集は阻害され, とくに OKY-1581 投与後の PRP で著明な阻害効果が認められた(図3, A)。AA 凝集でも同様であった(図略)。熱処理した血管の添加では血管を加えず PRP のみを攪拌した場合と同様に血小板凝集は阻害されず, indomethacin ($50\text{ }\mu\text{M}$) 処理で血小板の cyclo-oxygenase を阻害した PRP に血管を反応させた場合は凝集の阻害がほとんど観察されなかった(図略)ことから, 血小板由来の PG endoperoxides が血管で PGI_2 に変換され血小板凝集を阻害すると想定した Vane らの報告⁸⁾を支持する成績であった。

それ自体では血小板凝集を惹起し得ない低濃度の AA を PRP に加えた後 ADP を添加すると著明な凝集が惹起されるが, 1個または2個の前記の血管切片と予め反応させた PRP ではそのような凝集も阻害され, とくに OKY 投与後の PRP で著明な阻害効果が認められた(図3, B)。血小板で産生される PG endoperoxides が血管組織で利用されて PGI_2 に変換されるか

否かについては, 実験の材料や条件により異なる成績が報ぜられている^{8~10)}が, 予め血管組織と反応させた PRP に ADP を加えて生ずる凝集の強さを指標としてこの問題を検討したところ, OKY-1581 投与後の血小板で生成された PG endoperoxides が血管で PGI_2 に変換されるが, 投与前の PRP でも反応系に血管組織が充分量存在すれば上記の機序による PGI_2 産生の可能性が示唆された。

結 論

TX 合成酵素阻害剤(OKY-1581)を投与されたウサギ血小板では同酵素の阻害に基づく ^{14}C -AA 代謝の阻害と AA および collagen による凝集阻害が認められた(ADP 凝集には無影響)。OKY-1581 投与前または後の PRP に cyclo-oxygenase を阻害した血管組織を加えて反応させると, 投与後の血小板で生成された PG endoperoxides からの PGI_2 産生の方が投与前の血小板の場合より著明であるが, 投与前の PRP 中でも充分量の血管組織が存在すれば両組織の相互反応に基づく PGI_2 産生の可能性が示唆された。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金〔総合研究(A)「プロスタグランジン・トロンボキサン・ロイコトリエンの生合成と作用機作の基礎的研究」および一般研究(C)(#57570889)による支援を受けた。

文 献

- 1) Hammerström, S. and Diczfalusy, U.: Inhibition and properties of thromboxane synthetase. *Adv. Inflam. Res.*, **1**; 431~438, 1979.
- 2) Gorman, R.R.: Biochemical and pharmacological evaluation of thromboxane synthetase inhibitors. *Adv. PG. TX. Res.*, **6**; 417~425, 1980.
- 3) Miyamoto, T., Taniguchi, K., Tanouchi, T. and Hirata, F.: Selective inhibitor of thromboxane synthetase: pyridine and its derivatives. *Adv. PG. TX. Res.*, **6**; 443~445, 1980.
- 4) Vermeylen, J., Defreyn, G., Carreras, L.O., Machin, S.J., Van Schaeren, J. and Verstraete, M.: Thromboxane synthetase inhibition as antithrombotic strategy. *Lancet*, **1**;

- 1073~1075, 1981.
- 5) 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.
 - 6) 大熊 稔, 高山博史: 血小板凝集および血管のプロスタサイクリン産生に及ぼす Pantethine の効果. 動脈硬化, **9**; 709-711, 1981.
 - 7) Okuma, M. and Uchino, H.: Altered arachidonate metabolism by platelets in patients with myeloproliferative disorders. Blood, **54**; 1258~1271, 1979.
 - 8) Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S. and Vane, J.R.: Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. Prostaglandins, **12**; 897~913, 1976.
 - 9) Needleman, P., Wyche, A. and Raz, A.: Platelet and blood vessel arachidonate metabolism and interactions. J. Clin. Invest., **63**; 345~349, 1979.
 - 10) Marcus, A.J., Weksler, B.B., Jaffe, E.A. and Broekman, M.J.: Synthesis of prostacclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells. J. Clin. Invest., **66**; 979~986, 1980.

●自分で実際にやれる手術書!

植田小児外科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著

B 5 判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒240円)

知識として知っていることと、自分で実際巧くやれるということには随分開きがあるものである。僅かの小児外科の訓練をうけただけの一般外科医が、どんな症例なら自分でこなせるか、どんな症例なら専門医に転送しなければならないか、記述の重点を診療の実践面におき、高名なる著者が実地臨床に役立つことを念じて執筆した名著である。

●内容:〔総論〕1.新生児、乳幼児手術の術前、術中、術後管理、2.乳児手術の一般的注意、3.胃瘻造設の適応と手術法、4.結腸瘻造設の適応と手術法、5.新生児、乳児手術の死亡要因、〔各論〕1.新生児期手術概説、2.先天性食道閉鎖症、3.先天性食道狭窄症、4.噴門痙攣症、食道無弛緩症、5.横隔膜ヘルニア、6.直腸肛門奇形、7.後天性肛門疾患、8.ヒルシュスプルング病、9.臍帯ヘルニアまたは内臓脱出症、10.新生児腸閉塞症概説、11.十二指腸閉鎖および十二指腸狭窄、12.輪状臍、13.腸回転異常症または腸回転不全症、14.小腸閉鎖、15.胎便性イレウス、16.胎便性腸塞候群、17.腹膜炎および消化管穿孔、18.先天性肥厚性幽門狭窄症、19.腸重積症、20.消化管重複症、21.メッケル憩室、22.消化管のポリプ、23.低血糖症、臍島細胞腫、24.臍の胎生的遺残物、25.臍ヘルニア、26.鼠径ヘルニア、27.陰嚢水腫、28.停留率丸、29.先天性胆道閉鎖症、30.胆管嚢腫、31.漏斗胸、32.皮膚面に開口する種々なる先天性瘻、33.半陰陽、34.小児の悪性腫瘍、35.中枢神経系の奇形。