Eicosapentaenoic acid のヒト血小板凝集に 対する抑制機序の検討

原田 芳照* 田中 邦男* 鹿取 信*

Inhibitory mechanisms of eicosapentaenoic acid on human platelet aggregation

Yoshiteru HARADA*, Kunio TANAKA* and Makoto KATORI*

Key words: anti-aggregatory action, eicosapentaenoic acid (EPA),
arachidonic acid, thromboxane A_2 -induced aggregation,
human platelets

Human platelet aggregation induced by arachidonic acid (AA, $800\ \mu\text{M}$) and collagen ($1\ \mu\text{g/ml}$) was inhibited completely by $400\ \mu\text{M}$ of eicosapentaenoic acid (EPA). The acid also inhibited the secondary phase of ADP-induced ($3\ \mu\text{M}$) aggregation at the dose, but did not affect the primary phase of that up to $1.6\ \text{mM}$. These results consisted with the inhibitory effects of EPA on the biosynthesis of PG endoperoxide by sheep seminal vesicle microsomes and that of thromboxane (TX) A_2 by horse platelet microsomes, which both were bioassayed as rabbit aorta contracting activities.

The PGH_2 -induced ($0.8\text{--}3.2\ \mu\text{M}$) aggregation and the release reaction, measured as the ATP release, were not inhibited by indomethacin (IND $25\ \mu\text{M}$) and OKY-1581 ($10\ \mu\text{M}$). EPA significantly inhibited the PGH_2 -induced ($1.6\ \mu\text{M}$) aggregation at $100\ \mu\text{M}$, but did not abolish it even at $800\ \mu\text{M}$. These results suggest that PGH_2 itself can induce the aggregation without conversion to TXA_2 and the inhibitory effect of EPA on the PGH_2 -induced aggregation cannot be explained by the inhibition of TXA_2 synthetase. TXA_2 induced biphasic aggregation; a primary phase was reversible and not affected by IND, although a secondary phase was irreversible and inhibited by IND. The release reaction was also biphasic. EPA completely inhibited the secondary phase at $100\ \mu\text{M}$, and gradually inhibited the primary phase at higher than $200\ \mu\text{M}$.

These results suggest that EPA not only inhibit the AA metabolism, but also affect the action of the AA metabolites on human platelets.

* 北里大学医学部薬理〔〒228 相模原市北里 1-15-1〕, Department of Pharmacology, Kitasato University School of Medicine, Kanagawa, Japan.

はじめに

Eicosapentaenoic acid (EPA) の血小板凝集に対する抑制作用の機序を解明する目的でヒト血小板の凝集におけるアラキドン酸(AA)代謝産物の役割という観点から検討を行った。

I. 方 法

1. **PG endoperoxide** および **thromboxane (TX) A₂ 生合成**: PG endoperoxide はヒツジ精囊ミクロソーム (73 μ g 蛋白) と AA (5.2 n mole) を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 0.2 ml 中で2分間 22°C で反応させて産生した。TXA₂ はウマ血小板ミクロソーム (50 μ g 蛋白) と PGH₂ (568 p mole) を buffer 0.2 ml 中で2分間 0°C で反応させて産生した。EPA は基質を加える前に2分間酵素と preincubate した。生成産物は摘出ウサギ大動脈の収縮活性として直ちに測定した¹⁾。

2. **血小板凝集**: ヒトの多血小板血漿は1/10容の3.8% クエン酸ナトリウムを加えた血液か

ら調製した。凝集は37°Cで2分間多血小板血漿を保温した後 EPA を添加し、さらに2分後に凝集惹起物質を加え観察した。放出反応はルシフェリン・ルシフェラーゼを用い、凝集に伴う ATP 放出をルミアグリゴメーターで測定した²⁾。

II. 結 果

1. EPA は 130 μ M および 460 μ M で PG endoperoxide および TXA₂ 生合成をおおのほぼ完全に阻害した。

2. ADP 3 μ M による凝集は EPA 400 μ M で二次凝集のみ抑制された。一次凝集は1.6mM でも抑制されなかった (図1)。Collagen 1 μ g/ml による凝集は EPA 400 μ M により完全に抑制された。AA 800 μ M によって極めて強い凝集が起ったが、EPA 200 μ M により完全に抑制された。Indomethacin (IND) 10 μ M は ADP による二次凝集および collagen, AA による凝集を抑制した。以上の結果は EPA が PG endoperoxide あるいは TXA₂ 生合成を阻害することにより凝集を抑制している可能性を強く示唆

Fig. 1 Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on human platelet aggregation induced by ADP (3 μ M). EPA abolished the secondary phase, but did not inhibit the primary phase even at 1,600 μ M.

Table 1 Summary of inhibitory effects of indomethacin (IND) and EPA on human platelet aggregation induced by various agents. ↓: Effective at lower doses. (↓): Effective at higher doses.

		release reaction	IND	EPA
ADP	primary	—	no effect	no effect
	secondary	+	↓	↓
collagen		+	↓	↓
AA		+	↓	↓
PGH ₂		+	no effect	(↓)
TXA ₂	primary	+	no effect	(↓)
	secondary	+	↓	↓

する。

3. PGH₂ (0.8~3.2 μM) による凝集および放出反応は IND 25 μM および TXA₂ 生合成阻害薬である OKY-1581 (10 μM) によって抑制されなかった。PGH₂ 1.6 μM による凝集は EPA 100 μM によって明らかに抑制されたが、800 μM でも完全には抑制されなかった。これらの結果はこの量の PGH₂ による凝集は、PGH₂ 自身によって起っていることを示唆しており、EPA による凝集抑制は TXA₂ 合成酵素の阻害では説明できない。

4. TXA₂ は一次と二次を区別し得る凝集を起し、放出反応も二段階に分かれて起った。IND 25 μM は二次凝集とこれに伴う放出反応だけを抑制し、一次凝集には影響を与えなかった。このことは一次凝集が添加した TXA₂ により惹起され、二次凝集は新たに産生された AA 代謝物を介して起されることを示唆する。EPA 100 μM は二次凝集を完全に抑制し、さらに高濃度では一次凝集をも抑制した。

III. 考 察

EPA は IND によって抑制される AA 代謝が関与する凝集を強く抑制した。にさら PGH₂

および TXA₂ による IND で抑制されない凝集をもやや高濃度ではあるが抑制した(表 1)。このことは EPA が AA の代謝に影響を与えるだけではなく、Gryglewski ら³⁾によって示唆されたように AA 代謝産物のヒト血小板に対する作用という面にも影響を及ぼすことを示唆する。

文 献

- 1) Harada, Y., Tanaka, K. and Katori, M.: Non-specific antagonism against thromboxane A₂ of 7-ethoxycarbonyl-6, 8-dimethyl-4-hydroxy-methyl-1(2H)-phthalazinone (EG-626) in contraction of isolated smooth muscles. *Prostaglandins*, **17**; 957~966, 1979.
- 2) Feinman, R.D., J. Lubowsky, I.F. Charo and M.P. Zabinski.: The lumiaggregometer: A new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation. *J. Lab. Clin. Med.*, **90**; 125~129, 1977.
- 3) Gryglewski, R.J., J.A. Salmon, F.B. Ubatuba, B.C. Weatherly, S. Moncada and J.R. Vane.: Effects of all cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid and PGH₂ on platelet aggregation. *Prostaglandins*, **18**; 453~478, 1979.