原 著

p-Aminobenzoic acid-N-mannoside sodium salt
(K-MAP) の血液レオロジーに及ぼす影響について

久米 章司* 荻家 利承** 堺 隆弘**
山中 學*** 岡 博****

Effect of p-aminobenzoic acid-N-mannoside
sodium salt (K-MAP) on hemorheology

Shoji KUME*, Toshitsugu KARIYA**, Takahiro SAKAI***,
Manabu YAMANAKA***, and Hiroshi OKA****

Key words: p-Aminobenzoic acid-N-mannoside sodium
salt (K-MAP), hemorheology, blood visco-
sity, hemolysis

P-Aminobenzoic acid-N-mannoside sodium salt (K-MAP) has anti-thrombotic action in the several thrombosis models. This drug attenuates platelet aggregation and release reaction through increasing platelet cAMP levels by raising the PGD₂ level in platelets and PGI₂ level in the vessel wall.

We investigated the effect of K-MAP on hemorheology using rat blood. K-MAP effectively lowered whole blood viscosity, but had no effect on hematocrit or the fibrinogen level. K-MAP increased erythrocyte deformability, as evaluated by the inhibition of hemolysis under vertical mixing pressure, and the blood filtrability.

These results suggest that the improvement of hemorheology by K-MAP results in the anti-thrombotic effect.

* 山梨医科大学中央検査部〔〒409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110〕, Central Clinical Laboratory, Yamanashi Medical College, Yamanashi, Japan.

** 佐賀医科大学内科, Internal Medicine, Saga Medical College, Saga, Japan.

*** 東京大学医学部臨床検査医学, Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

**** 東京大学医学部第一内科, First Internal Medicine, School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan. 受付: 1986.11.27. 受理: 1987.10.20.

緒 言

血栓形成には血流、血管壁および血液性状の3つの変化が関与することは古く Virchow により指摘されている。以来現在までに数多くの知見が得られてきており、中でも血栓形成の初期像において血小板は重要な役割を果たすと考えられている¹⁻⁵⁾。しかし心筋梗塞などの動脈硬化性疾患や糖尿病等による微小循環系の血栓成立には、血小板のみならず血液粘度などの血液レオロジーも重要と考えられている⁶⁾。すなわち、単位時間内の血流量は一般に血管内径の4乗に比例し、また血圧に比例すると共に血液粘度に逆比例するので、血流障害部への血流量増加はまず血管拡張により期待される。しかし動脈硬化性疾患などの場合には、血管の拡張は困難であり、代わりに薬物による血液粘度の低下が招来されるなら、レオロジー的には血管拡張剤と同じ効果が期待される⁷⁾。血液粘度に影響を与える要因にはヘマトクリット値⁸⁾、フィブリノーゲン濃度⁹⁾ および赤血球の変形能⁹⁾ などがあげられる。

新しい合成化合物である p-Aminobenzoic acid-N-mannoside sodium salt (K-MAP, 図1) は、血小板および血管壁の両方に作用して抗血小板作用を発揮し¹⁰⁾、その作用にもとづくと考えられる *in vivo* での抗血栓効果がすでに確認されている¹¹⁾。

本研究では、K-MAP の抗血栓効果機序解明の一つとして、血液レオロジー に対する K-MAP の効果を検討したのでその効果を報告する。

I. 実験材料および方法

静岡実験動物協会より購入した Wistar 系雄性ラット(体重約 250g)を用いた。用いたラットはあらかじめ一夜絶食させた。K-MAP および ticlopidine (パナルジン, 第一製薬)は蒸留水に溶解もしくは懸濁させ、所定濃度を 10ml/kg の容量で強制経口投与した。対照群のラットには、同容量の蒸留水のみを投与した。薬物投与の3時間後に、エーテル麻酔下で腹部大動脈または腹部大静脈よりヘパリン採血 (Na 塩,

Chemical Structure :

Molecular Formula : $C_{13}H_{16}NO_7Na$

Molecular Weight : 321

Fig. 1 Structure of K-MAP

和光純薬, 500 U/ml 生理的食塩水 1/20 容量)を行い、できるだけ速やかに以下の操作および測定を行った。

<全血粘度の測定>

バイオレオライザー回転粘度計(東京計器)を用い、37°C の恒温条件下にて血液 0.5 ml を使用した¹²⁾。回転数は 10, 20 および 50 rpm で測定した。これはおのおの 75, 150 および 375 sec⁻¹ のずり速度に相当した。なお測定試料の経時的变化が大きいため、測定は採血後 1 時間を厳守した。

<ヘマトクリット (Ht) 値の測定>

ヘパリン加採血液の微量を用いて、コールターカウンター (Model ZBI, Coulter Counter, USA) により算出した赤血球数および平均容積よりヘマトクリット値 (%) を測定した。

<血漿フィブリノーゲンの定量>

等量の硫酸プロタミン溶液 (400 μg/ml 生理的食塩水, 和光純薬) にて被験血液中のヘパリンを中和後、フィブリノーゲン測定用試薬 (デイド社-AHS, USA) を用いてトロニン時間法¹³⁾にて測定した。

<赤血球変形能の測定>

1) 外力負荷による機械的溶血法

9.8mm×105mm のガラス製試験管に 2 ml の生理的食塩水を採り、これにヘパリン加採血液 0.2 ml を加え、ゆるやかに混和した。これをさらに Thermo-mixer (Model TM 105 Thermo-nics, Japan) で、室温下、20秒間傾斜位置で攪拌した。直ちに、400 G, 5 分間 (室温) 遠心分離し、上清中のヘモグロビン量を吸光度 540 nm で測定した。また、生理食塩水の代わりに蒸留水を用いて同様の操作を行って完全に溶血させた場合のヘモグロビン吸光度を 100 とし、

Table 1 Effects of K-MAP on Whole Blood Viscosity, Hematocrit (Ht) and Fibrinogen in Rats

	Blood Viscosity (c.p.) ^{a)}			Ht (%)	Fibrinogen (mg/dL)
	75 sec ⁻¹	150 sec ⁻¹	375 sec ⁻¹		
Control	7.82±0.34	6.31±0.32	4.68±0.26	48.3±0.9	192.0±5.6
K-MAP (300 mg/kg)	6.48±0.71*	5.21±0.62*	3.84±0.30*	47.4±0.6	192.3±4.5
Ticlopidine (300 mg/kg)	5.38±0.71**	4.40±0.59**	3.44±0.29**	48.0±0.8	193.3±6.7

^{a)} c.p.: centi poise

*p<0.05, **p<0.01

Values are shown as mean±S.D. (n=3)

Values are shown as mean±S.D. (n = 3).

Fig. 2 Inhibitory Effect of K-MAP on Erythrocyte Hemolysis by Vertical Mixing Pressure

被検体の溶血率を算出した。

2) 血液濾過速度を指標とする方法

Schmid-Schonbein らの方法を原法とする Reid らの方法¹⁴⁾により行った。水柱 20 cm の陰圧下に血液約 1.5ml を Nuclepore membrane filter (General Electric 社 pore size 5 μm) で濾過し、定常速度に達してから 1 分間に濾過される血液の量を測定し、赤血球変形能の指標とした。

II. 結 果

1. ラット血液粘度およびヘモレオロジー的因子におよぼす K-MAP の効果

液体の流動性はずり応力 (τ) とずり速度 (γ) で規定され、ずり速度 (γ) と粘度 (η) の関係は

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma}$$

で表わされ、水や血清では、粘度はずり速度の如何にかかわらず一定の値をとる。

しかし、血液の流動性は上式に従わず、ずり速度の変化により、粘度が異なることが知られている。したがって、血液においては種々のずり速度における粘度を測定しなくてはならない¹²⁾。この観点から、表 1 に示す 3 種のずり速度における粘度を測定した。K-MAP の 300 mg/kg 経口投与によりいずれのずり速度においても対照群と比べ有意の全血粘度低下が認められた。この時、粘度に影響を与えられとされる要因のうち、Ht および フィブリノーゲン量は対照群との間に有意な差は認められなかった。一方、K-MAP と同様に抗血栓効果を有す

る ticlopidine はずり速度の小さいときには K-MAP より強い効果がみられたが、ずり速度が大きくなると K-MAP とほぼ同程度の効果であった。

2. 赤血球変形能に対する K-MAP の効果

血液粘度に影響を与える諸要因のうち、Ht およびフィブリノーゲン量に対して K-MAP は前述の如く影響をあたえないので、もう一つの要因である赤血球変形能に対する効果を検討した。赤血球変形能の測定は、赤血球膜の外力刺激による溶血に対して、膜の柔軟性を示すと思われる機械的溶血法と、一般的に用いられている濾過速度法による。

その結果を図2(機械的溶血法)と図3(濾過速度法)に示した。図2では、採血直後の新鮮血と、採血後3時間室温保存した血液とについて溶血度を測定した。3時間保存血では、新鮮血と比べて機械的溶血度の急激な増加がみられたが、これは3時間の保存中に赤血球膜の柔軟性が低下したと考えられる。K-MAP は、新鮮血および3時間保存血ともに機械的溶血を抑制し、その抑制効果は投与量依存的であった。また投与量 300 mg/kg で K-MAP は ticlopidine と同程度の溶血抑制効果を示した。図3は Nuclepore membrane filter の濾過速度を、対照群 (K-MAP 無投与群) と K-MAP 群 (300 mg/kg 投与群) とで比較したものであり、K-MAP の投与により濾過速度の有意な上昇が認められた。

III. 考 察

K-MAP は、血小板に対して直接その凝集および放出反応を抑制するとともに、血管壁に対しては血小板凝集抑制作用を有する PGI_2 (prostaglandin) 産生を増加させることにより抗血小板作用を発揮することが報告¹⁰⁾されている。またこの作用と関連して *in vivo* での抗血栓効果もいくつかの血栓モデル動物を用いて確認されている¹¹⁾。

今回、われわれは K-MAP の抗血栓効果について、血液レオロジー学的検討を行い興味ある知見を得た。すなわち K-MAP の投与により全血粘度は低下した。血液粘度は主としてへ

Fig. 3 Effect of K-MAP on Blood Filtrability through Micropore Membrane Filter

マトクリット値 (Ht)、血漿フィブリノーゲン濃度および赤血球変形能に依存するが、K-MAP は Ht およびフィブリノーゲン濃度には全く影響せず、赤血球変形能のみを増大させる作用を有する事が判明した。今回、赤血球変形能の測定は、機械的溶血法と濾過速度法により検討したが、これらの方法では膜の柔軟性ないしは変形力を測定できると同時に、血管狭窄部等での乱血流による外力負荷に対する赤血球の抵抗性を推定できると思われる。今回得られた結果は、K-MAP が赤血球膜の柔軟性もしくは安定性を増強することを示すものであり、このことは臨床的には、血管狭窄部での血流維持ならびに乱血流による赤血球の破壊防止に K-MAP は有用な効果を発揮するものと推定される。特にずり速度が 375 sec^{-1} と高い場合は ticlopidine と同程度の粘度の低下が認められ、このずり速度がほぼ artery 又は capillary での状態を示すと考えられる¹²⁾ ことから、K-MAP はより細小血管において、その効果が期待される。赤血球変形能は細胞内 ATP レベル、 Ca^{++} イオン濃度、外液 pH、浸透圧などの諸因子により調節¹⁵⁾されており、これら因子に対する K-MAP の影響は現在検討中である。ticlopidine は血小板凝集阻害作用とともに赤血球変形

能を高めて抗血栓効果を示すことが知られているが^{16,17)}、本実験において K-MAP は ticlopidine とほぼ同等の血液レオロジーの改善効果が認められた。K-MAP は、動物実験並びに臨床使用において何らの副作用も認められておらず、極めて安全性の高い薬剤であり、その抗血栓効果発現機序において、血小板への直接機能抑制のみならず、血管壁の PGI₂ 産生増強作用も有していることと合わせて、赤血球にも作用して血液レオロジー改善効果を有することは、本剤の大きな特徴の 1 つと言えよう。

以上、K-MAP は、各種の作用発現機序により抗血栓効果が発揮されると考えられ、臨床上有用な治療、予防効果が期待される。

結 語

K-MAP の血液レオロジーに及ぼす影響をラット血液を用いて検討し、以下の成績を得た。

1. K-MAP はヘマトクリット値、血漿フィブリノーゲン値には影響を与えず全血粘度を低下させた。この効果は高ずり速度で ticlopidine と同等の効果が得られた。

2. K-MAP は新鮮血および 3 時間保存血いづれにおいても、機械的溶血を抑制した。この効果は濃度依存的であり、ticlopidine とほぼ同程度の効果を示した。さらに Nuclepore membrane の濾過速度においても K-MAP の投与により明らかな上昇が認められた。

以上より、K-MAP は、血小板ならびに血管壁の両方に作用して抗血小板作用を表すのみならず、赤血球にも作用して血液レオロジーを改善して抗血栓効果を発揮することが示された。

文 献

- 1) 小林紀夫, 前川 正: 血小板よりみた血栓症の成因. 脈管学, **14**(7); 575~579, 1974.
- 2) 山中 学: 血小板機能と血栓の形成. (村上元孝: 血栓症—基礎と臨床—), 日本メディカルセンター, 東京, 1975. 21.
- 3) 久米章司, 山中 学, 荻家利承, 田部 章: 血小板の代謝系と血栓形成. 日本臨牀, **40**(3); 683~604, 1982.
- 4) 安永幸二郎: 抗血小板療法. 総合臨牀, **30**(1);

2751~2756, 1981.

- 5) 山中 学: 抗血小板療法. 総合臨牀, **32**(3); 493~497, 1983.
- 6) 岡 小天: レオロジーより見た微小循環の最近の諸問題. 臨床皮膚科, **30**; 503~505, 1976.
- 7) Matsuda, T.: Effects of antiplatelet therapy and drugs which affect viscosity of blood. Progress in Medicine, **3**(4); 521~528, 1983.
- 8) Matsuda, T. and Murakami, M.: Relationship between fibrinogen and blood viscosity. Thromb. Res., **8** (suppl. 2); 25~33, 1976.
- 9) Chien, S., Usami, S., Dellenback, R.J. and Gregersen, M.I.: Blood viscosity: Influence of erythrocyte deformation. Science, **157**; 827~829, 1967.
- 10) Takahata, K., Kume, S., Yamanaka, M., Kariya, T., Tanabe, A., Ohasni, T., Oka H. and Oda, T.: Effect of p-Aminobenzoic acid-N-mannoside sodium salt (K-MAP) on human platelets—with a special reference to prostaglandin metabolism. Blood & Vessel, **13**(3); 73, 1982.
- 11) 高畑京也, 久米章司, 山中 学, 荻家利承, 田部 章, 岡 博: p-アミノ安息香酸-マンノシッド Na 塩 (K-MAP) の抗血栓効果について. 日本血液学会雑誌, **46**(2); 515, 1983.
- 12) 川越裕也: DIC と血液粘度. 臨床病理, **28**(10); 830~835, 1978.
- 13) Clauss, A.: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol., **17**; 237~246, 1957.
- 14) Reid, H.L., Lock, P.J., Dormandy, J.A. and Dormandy, T.L.: A simple method for measuring erythrocyte deformability. J. Clin. Pathol., **29**; 855~858, 1976.
- 15) 神戸芳則, 佐賀真悟, 中尾 真: 赤血球膜の分子構成と形態変化. 蛋白質・核酸・酵素, **28**(5); 531~542, 1983.
- 16) 安孫子雍史, 芦田伸一郎, 小野信悦, 石原正直: チクロピジンの血液レオロジー的作用と実験的末梢動脈閉塞症に対する改善作用. 循環器科, **6**(5); 393, 1979.
- 17) 伴 一郎, 塩野谷恵彦: Ticlopidine の末梢循環障害患者に対する臨床応用に関する研究. 血管, **5**(2); 19~27, 1982.