◆原 著◆

ラット赤血球変形能, 血液粘度および血栓形成に対する beraprost sodium (TRK-100) の作用

平 野 哲 也*¹ 西 村 志 眞*¹ 深 津 祐 子*¹
亀 岡 加代子*¹ 山 口 美津子*¹ 山 田 尚 弘*¹
遠 藤 孝*¹ 西 尾 伸太郎*¹ 梅 津 照 彦*²

Effect of Beraprost Sodium (TRK-100) on Erythrocyte Deformability, Blood Viscosity and Thrombus Formation in Rats

Tetsuya HIRANO*, Shima NISHIMURA*, Yuko FUKATSU*,
Kayoko KAMEOKA*, Mitsuko YAMAGUCHI*, Naohiro YAMADA*,
Takashi ENDOH*, Shintaro NISHIO* and
Teruhiko UMETSU*²

Key words: beraprost sodium, erythrocyte deformability, blood viscosity, femoral artery occlusion, venous thrombosis

Stable prostacyclin (PGI₂) analogue, beraprost sodium (sodium (±)-(1R*, 2R*, 3aS*, 8bS*)-2, 3, 3a, 8b-tetrahydro-2-hydroxy-1- [(E)-(3S*)-3-hydroxy-4-methyl-1-octen-6-ynyl] -1H-cyclopenta [b] benzofuran-5-butyrate, TRK-100) had been reported to inhibit aggregation of platelets and dilate blood vessels. In this report, the effect of beraprost sodium (beraprost) on haemorheological parameters such as erythrocyte deformability and blood viscosity, and activity of blood coagulation system such as activated partial thromboplastin time and prothrombin time were measured in normal rats. Effect of orally administered beraprost on experimentally induced disorders of peripheral circulation such as femoral artery occlusion and venous thrombosis model in rats were assessed.

Erythrocyte deformability was increased by beraprost from the concentration of 23.8 up to 2380nM in vitro (Fig. 1), and from 176 up to 560μg/kg/day after 7days consecutive administration to normal rats ex vivo (Fig. 2).

Occlusion of rat femoral artery by insertion of polyethylene tube induces reproducible lesions in the toe (Fig. 7) and elevation of blood and plasma viscosity (Tab. 1). Blood viscosity of normal rats was not affected by beraprost up to 10μM in vitro (Fig. 3) or up to 100μg/kg ex vivo (Fig. 4). However, at the dose of 30μg/kg, beraprost normalized blood

*¹ 東レ株式会社基礎研究所薬理研究室〔〒248 神奈川県鎌倉市手広1111〕; Basic Reserch Laboratories, Toray Industries Inc., Kanagawa 248, Japan.

*² 科研製薬株式会社中央研究所薬理研究部〔〒113 東京都文京区本駒込2-28-8〕; Pharmacological Laboratory, Kaken Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo 113, Japan. 受付: 1989.8.10, 受理: 1990.3.14.

viscosity of femoral artery occluded rats (Fig. 8).

In the model of stasis induced venous thrombosis, beraprost decreased the weight of thrombus in the inferior vena cava of rats. The effect was dose-dependent at range from 30 to 100 $\mu\text{g/kg}$ (Fig. 9). It, however, showed no effects on blood coagulation system of rats *ex vivo* at the dose which decreased thrombus weight (Fig. 6), and at the concentration range of 23.8 nM to 23.8 μM in human plasma *in vitro* (Fig. 5).

Above results suggest that beraprost may contribute to the improvement of haemorrhological impairment and prevention of thrombus formation in the disorder of peripheral circulation.

緒 言

Prostacyclin (PGI_2) には血小板凝集抑制作用や血管拡張作用があることが知られており, 臨床において末梢循環障害などの疾患に対して治療効果が認められているが, 化学的に不安定なため, 使いにくい欠点がある.

安定でかつ経口投与可能な PGI_2 誘導体である beraprost sodium (sodium (±)-(1R*, 2R*, 3aS*, 8bS*)-2, 3, 3a, 8b-tetrahydro-2-hydroxy-1-[(E)-(3S*)-3-hydroxy-4-methyl-1-octen-6-ynyl]-1H-cyclopenta[b]benzofuran-5-butylate, TRK-100)¹⁾ には PGI_2 と同様な抗血小板作用²⁾ および血管拡張作用³⁾ が認められ, 血小板が関与する血栓症モデルに対する効果も既に報告されている⁴⁾.

今回, beraprost sodium (beraprost) の血液レオロジーおよび血液凝固活性に対する作用並びに末梢循環障害モデルにおける作用を検討したので報告する.

I. 材料および方法

1. 薬物および動物

In vitro では beraprost を生理食塩水に, *ex vivo* では蒸留水に溶解して, 対照にはそれぞれの溶媒を投与した. *Ex vivo* および *in vivo* では薬物はすべて経口投与した.

動物は Wistar 系の雄性ラット, 200~300 g (静岡県実験動物農業協同組合) を用いた.

2. 赤血球変形能の測定

測定は山口らの方法⁵⁾ に準じて行った. すなわち赤血球以外の血球および血漿の影響を避け

るため, クエン酸加血を用い, これを遠心して血漿およびバフィーコートを除いた後, 生理食塩水を加えて赤血球を洗浄する操作を3回行った. この洗浄赤血球を生理食塩水に再浮遊させ, ヘマトクリット 20% の浮遊液を調製し, 赤血球浮遊液 0.5 ml がフィルター (pore size: 3 μm , NucleporeTM) を通過する時間を測定した. なお, 測定は安定した値が得られる採血後2時間以内に行った.

生理食塩水 0.5 ml のフィルター通過時間を赤血球浮遊液の通過時間で除して得られた値を赤血球変形能の指標とした.

2. 1. *In vitro* *In vitro* の試験では beraprost を添加して 25°C⁶⁾, 5 分間, 孵置した赤血球浮遊液を測定に用いた.

2. 2. *Ex vivo* 蒸留水あるいは beraprost を 1, 2, 4, 7 ppm の濃度で飲水に混入して7日間投与し, 頸静脈より投与前および投与7日目に採血して変形能を測定した. 7日目の測定値を投与前の値で除した値を赤血球変形能の変化として評価した.

3. 血液粘度の測定

血液粘度の測定は cone-plate 型粘度計 (cone type: 0.8°, 東京計器)⁷⁾ にて 37°C で, 高ずり (150 sec^{-1}) および低ずり速度 (18.75 sec^{-1}) の2種のずり速度で測定した. 血漿粘度は高ずり速度で測定した.

3. 1. *In vitro* 頸静脈より採血したヘパリン加血に beraprost を添加し, 37°C, 10 分間, 孵置した後, 粘度を測定した.

3. 2. *Ex vivo* 30, 100 $\mu\text{g/kg}$ の beraprost を投与し, 30 分後に採血して測定した.

4. 血液凝固活性の測定

クエン酸加血を 1,500 g×10 分間遠心して得られた血漿について活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) およびプロトロンビン時間 (PT) を測定し、それぞれ内因系および外因系の凝固活性の指標とした。

4. 1. *In vitro* *In vitro* の試験では健康な志願者より午前中に採血した静脈血より分離した血漿を用い、beraprost 23.8, 238 nM, 2.38, 23.8 μ M, および heparin 0.1 (APTT) あるいは 1 U/ml (PT) を加え、37°C, 5 分間孵置して凝固活性測定キット (小野薬品) を用い用手法にて測定した。

4. 2. *Ex vivo* 使用した薬物は beraprost 30, 100, 300 μ g/kg, ticlopidine 100, 300 mg/kg, warfarin 1, 3 mg/kg で、それぞれ採血の 0.5, 5, 18 時間前に、対照群には蒸留水を採血の 30 分前に投与した。なお、ここで採用した投与時間は beraprost²⁾ および ticlopidine⁸⁾ では血小板凝集が最大となる時間を、warfarin はビタミン K 依存性凝固因子抑制が最大になる時間⁹⁾ を基にした。

血液凝固活性はキットおよび測定装置 (東亜医用電子, CA-4000) を用いて測定した。PT の測定に際して上限値を 45 秒に設定し、これを越える値を 45 秒として扱った。

5. 病態モデルにおける検討

5. 1. 動脈閉塞モデルの作成および測定 森田らの方法¹⁰⁾ に準じてモデルを作成した。すなわちラットの大腿動脈に polyethylene tube を逆行性に挿入して大腿動脈を閉塞した。偽手術群には tube の挿入を行わず、その他の操作を同様に行った。

30 μ g/kg の beraprost を手術直前に投与し、その後は 1 日 2 回ずつ投与した。粘度の測定は投与後 30 分に採取した血液および血漿で行ったが、その後は 1, 2, 3, 5, 7 日目の 1 回目の投与後に行った。血液は高ずりおよび低ずり速度で、血漿は高ずり速度のみで粘度を測定した。

5. 2. 静脈血栓症モデルの作成および測定 Bernat ら¹¹⁾ の方法に準じてモデルを作成した。ウレタン麻酔 (1 g/kg, 腹腔内投与) した

ラットの下部大静脈を左腎静脈分岐部の末梢側で結紮し、さらに左右腸腰、右精囊静脈を結紮した。3 時間後、大静脈の鬱血部に生成した血栓の乾燥重量を測定した。

薬物は *ex vivo* の血液凝固活性の測定 (4.2 項) と同様に投与した。

6. 統計処理

測定値は分散分析後 Student's t-test によって検定したが、対応のある値は paired t-test で、不等分散の場合は Wilcoxon test で検定した。本文中の検定結果は特に断りのないものは Student's t-test で検定したことを示す。

II. 結 果

1. 赤血球変形能に対する作用

1. 1. *In vitro* 23.8~2380 nM の beraprost によってラット赤血球変形能は有意に ($P<0.05$, paired t-test) 上昇した (図 1)。

1. 2. *Ex vivo* ラットの飲水中に beraprost を添加して 7 日間投与すると赤血球変形能は改善し、特に 2, 4, 7 ppm 投与群は対照群と比べて有意 ($P<0.05$, Wilcoxon test) であった。

Fig. 1 The effect of beraprost sodium on erythrocyte deformability in rats *in vitro*. Beraprost sodium or saline (control; open column) was added to 20% erythrocyte suspension at the concentration indicated and incubated at 25°C for 5 min. Erythrocyte deformability was measured by filtration method, with 5 μ m pore filter. Each value represents mean $\pm$ S.E. of 8 experiments. Statistically different from control by paired t-test (* $P<0.05$).

なお, beraprost 1, 2, 4, 7 ppm 飲水中投与群の実際の平均投与量は飲水量と体重から算出するとそれぞれ 100, 176, 352, 560 $\mu\text{g/kg/day}$ であった (図 2)。

2. 血液粘度に対する作用

2. 1. *In vitro* 1, 10 μM の beraprost の添加ではいずれのずり速度におけるラットの血液粘度にも影響を与えなかった (図 3)。

2. 2. *Ex vivo* 30, 100 $\mu\text{g/kg}$ の beraprost の投与によって血液粘度は影響を受けなかった (図 4a, 4b)。

3. 血液凝固活性に対する作用

3. 1. *In vitro* 健康な志願者血漿の APTT および PT による血液凝固活性の測定はヒト血小板凝集 (ADP 2.5 μM) を 50% 抑制する beraprost の濃度 (3.3 μM)²⁾ より多い用

量でも影響されなかった (図 5a, 5b)。

3. 2. *Ex vivo* ラット血小板凝集を約 70% 抑制する 300 $\mu\text{g/kg}$ の beraprost²⁾ では APTT は有意に ($P < 0.05$) 延長した。また, warfarin ($P < 0.01$) 投与でも有意に延長し, 300 mg/kg の ticlopidine の投与で有意に ($P < 0.05$) 短縮した (図 6a)。PT は warfarin の投与で有意に ($P < 0.01$, Wilcoxon test) 延長されたが, 他の群には変化は見られなかった (図 6b)。

なお, beraprost および ticlopidine による APTT の有意な変化はいずれも正常値の範囲内であった。

4. 病態モデル動物に対する作用

4. 1. 大腿動脈閉塞モデルに対する作用
大腿動脈を polyethylene tube で閉塞すると図 7 に示するような後肢指先の壊死が比較的再現性

Fig. 2 The effect of beraprost sodium on erythrocyte deformability in rats *ex vivo*.

Beraprost sodium was orally administered for 7 days by addition to drinking water at the concentration of 0, 1, 2, 4, and 7 ppm. The dose calculated from water intake and body weight was 0 (control; open column), 100, 176, 352, and 560 $\mu\text{g/kg/day}$ respectively. Blood was collected before and after 7 day administration for measurement of erythrocyte deformability. Using 20% of erythrocyte suspension, erythrocyte deformability was measured by filtration method, with 5 μm pore filter.

Ordinate shows the relative erythrocyte deformability, vs. the value on the first day. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 8 or 9 experiments. Statistically different from control by Wilcoxon test (* $P < 0.05$).

Fig. 3 The effect of beraprost sodium on blood viscosity of normal rats *in vitro*.

One and 10 μM of beraprost sodium were added to anti-coagulated blood and incubated at 37°C for 10 min. Blood viscosity was assessed by cone-plate type viscosimeter at low (Low; 18.75 sec^{-1}) and high (High; 150 sec^{-1}) shear rate. Left (a) and right (b) panels show the effect of beraprost sodium at the dose of 1 μM and 10 μM respectively.

Each value represents mean $\pm$ S.E. of 6 (a) and 3 (b) experiments.

Fig. 4 The effect of beraprost sodium on blood viscosity of normal rats *ex vivo*. Beraprost sodium, at the dose of 30 μ g/kg (closed column), 100 μ g/kg (hatched column) and distilled water (control; open column) were administered orally, and blood was collected with heparin as anticoagulant 30 min after administration. Blood viscosity was measured by cone-plate type viscosimeter at low (Low; 18.75 sec^{-1}) and high (High; 150 sec^{-1}) shear rate. Each value represents mean $\pm$ S.E. of 6 experiments.

Fig. 5 The effect of beraprost sodium and heparin on activated thromboplastin time (APTT; a) and prothrombin time (PT; b) of human plasma, *in vitro*. Blood was collected from median cubital vein and anticoagulated with each drug at 37°C, 5 min before measurement of PT and APTT. Each value represents mean $\pm$ S.E. of 10 experiments. Statistically different from control value by Student's t-test (* $P < 0.01$).

Fig. 6 The effect of beraprost sodium, warfarin, and ticlopidine on activated thromboplastin time (APTT; a), and prothrombin time (PT; b) of normal rats, *ex vivo*.

Blood was collected from carotid artery with trisodium citrate as anti-coagulant, 0.5, 5, and 18 hr after beraprost sodium, warfarin, and ticlopidine administration, respectively.

Each value represents mean $\pm$ S.E. of 10 experiments. Statistically different from control value by (a) Student's t-test or (b) Wilcoxon test (** $P < 0.05$, * $P < 0.01$).

よく観察された。これと並行して血液および血漿粘度が上昇したが、その上昇の割合は閉塞群の方が偽手術群より大きかった。いずれの粘度についても偽手術群と無処置群の間には差は見られなかったが、閉塞群と無処置群と比較すると有意差 ($P < 0.01$) が認められ、特に血液粘度については偽手術群あるいは無処置群と閉塞群との間に、血漿粘度については無処置群と閉塞群との間に有意差 ($P < 0.01$) が認められた (表 1)。

大腿動脈の閉塞で生じる血液粘度上昇は

beraprost 投与で抑制され、低ずり速度 (図 8a) では 5 日目に、高ずり (図 8b) では 2, 3, 5 日目に対照群との間に有意差が見られた ($P < 0.05$)。それに対して血漿粘度は beraprost 投与で変化しなかった (図 8c)。

4. 2. 静脈血栓症モデルに対する作用 静脈血栓症モデルでは beraprost は 30, 100 $\mu\text{g/kg}$ の範囲で用量に依存して血栓形成を抑制し、100 $\mu\text{g/kg}$ では対照群と比較して有意 ($P < 0.01$) であったが、この作用は 300 $\mu\text{g/kg}$ では減弱して 30 $\mu\text{g/kg}$ と同水準にとどまった。

その他, ticlopidine および warfarin 投与群はいずれの用量においても有意に ($P < 0.01$) 血栓形成を抑制した (図9). しかし, いずれの薬物でも血栓の生成抑制は完全ではなかった. なお, 静脈結紮の手術中, warfarin 投与群のみに出血傾向が観察された.

Fig. 7 The picture of left toe with lesions and right normal toe, 7 days after femoral artery occlusion of the rat. Occlusion was induced by insertion of polyethylene tube to femoral artery. In the occluded paw, reproducible lesions in the toe were observed.

III. 考 察

末梢循環障害では血液レオロジーが悪化¹²⁾し, これが病態の悪化にも関与すると考えられている. 血液レオロジーの変化に血液粘度は重要な因子で¹³⁾, 血漿粘度, 赤血球などの血球成分¹⁴⁾, 血漿蛋白と血球の相互作用¹⁵⁾, ヘマトクリットなど¹⁶⁾ がこれに影響を与えることが知られている.

In vitro で beraprost は洗浄赤血球の変形能を改善したが, この作用は PGI_2 ¹⁷⁾ でも報告されており, PGI_2 と同様に赤血球に対して直接作用した結果であると推測される. さらに赤血球変形能改善作用は *ex vivo* においても見られたことから, beraprost の他の薬理作用^{2,3,4)} と同様に経口投与で有効である可能性を示している.

赤血球変形能は赤血球の内部粘性, 膜の粘性や形態で規定され¹³⁾, 変形能の上昇で血液粘度が低下するとされているが, beraprost は正常動物では変形能を改善するにもかかわらず血液粘度を改善しなかった. この理由は, 正常動物はもともと赤血球変形能が十分に高く, この

Table 1 Change in blood and plasma viscosity after femoral artery occlusion.
a) blood viscosity

Treatment		Days after occlusion			
		0	1	2	3
Normal rats	L	7.08±0.26			
	H	4.00±0.13			
Sham-operated	L		7.82±0.36	7.16±0.15	7.07±0.20
	H		4.12±0.11	4.03±4.03	3.94±0.05
Occluded rats	L		9.42±0.28**	9.50±0.52**	8.66±0.33**
	H		5.27±0.13**	5.16±0.14**	5.02±0.15**

b) plasma viscosity

Treatment		Days after occlusion			
		0	1	2	3
Normal rats		1.53±0.02			
Sham-operated			1.46±0.09	1.39±0.03	1.56±0.01
Occluded rats			1.91±0.06*	1.89±0.08*	2.05±0.05*

Occlusion was induced by insertion of polyethylene tube into femoral artery and blood was collected with heparin as anticoagulant. Blood viscosity was measured by cone-plate type viscosimeter at low (L; 18.75 sec^{-1}) and high (H; 150 sec^{-1}) shear rate and plasma viscosity was measured at high shear rate.

Each value represents mean±S.E. (mPa.s) of 8 experiments. Statistically different from normal (*), or normal and sham operated rats(**) by Student's t-test ($P < 0.01$).

Fig. 8 The effect of beraprost sodium on blood and plasma viscosity of femoral artery occluded rats.

Beraprost sodium (30 μ g/kg; closed column) or distilled water (control; hatched column) was administered orally before and after femoral artery occlusion, twice a day, for 7 days (non-occluded control; open column). Blood was collected 30 min after administration at 1, 2, 3, 5, and 7 days after occlusion with heparin as anticoagulant. Blood viscosity was measured by cone-plate type viscosimeter at a low (a; 18.75 sec⁻¹) and high (b; 150 sec⁻¹) shear rate. Plasma viscosity was also determined at high (c) shear rate.

Each value represents mean $\pm$ S.E. of 5 to 8 (a, b), and 3 to 4 (c) experiments. Statistically different from control by Student's t-test (* $P < 0.05$).

ような状態では beraprost の変形能上昇の作用が小さいために血液粘度を改善するに至らなかったと考えられる。しかし、赤血球洗浄の操作および再浮遊する溶媒によって赤血球変形能への影響も考えられるので、この点についてはさらに検討を要すると思われる。

森田らはウサギの polyethylene tube による末梢循環障害モデルで血液粘度の上昇を報告しているが¹⁰⁾、今回同様に作成したラットの動脈

閉塞モデルにおいても血液粘度の上昇が確認できた。この病態モデルに beraprost を投与した結果、高ずりおよび低ずり速度の血液粘度上昇を抑制したが、低ずりの血液粘度改善作用は弱く、血漿粘度の上昇を抑制しなかった。高ずり速度の血液粘度は主に赤血球内部粘性を、低ずり速度では赤血球膜の粘弾性や形態を反映する¹³⁾ こと、今回測定しなかったが、ラットのヘマトクリットは beraprost の 200 μ g/kg の

Fig. 9 The effect of beraprost sodium, warfarin, and ticlopidine on thrombus weight of experimental venous thrombosis in rats.

Haemostasis was induced by the method of Bernat et. al. and blood was collected from carotid artery with trisodium citrate, 0.5, 5, and 18hr after administration of beraprost sodium, warfarin, and ticlopidine respectively. Each value represents mean $\pm$ S.E. of 10 animals. Statistically different from control value by Student's t-test (** $P < 0.01$).

連続投与でも影響されず¹⁸⁾、健康人でも 150 $\mu\text{g}/\text{body}$ の連投でヘマトクリットに変化が見られないこと¹⁹⁾ などから beraprost は赤血球の内部粘性を変えることにより、赤血球変形能を改善して血液粘度を減少させるものと考えられる。

既述のような理由で正常動物の血液粘度改善は見られなかったが、病態モデルで血液粘度の改善が見られた。この改善に赤血球変形能が関与する理由として、動脈閉塞による血液粘度の上昇に赤血球変形能の悪化の寄与が大きい可能性が挙げられ、beraprost の作用が反映され易かったと考えられる。

本モデルで見られるような血漿粘度上昇に血漿タンパク濃度上昇の関与もあることが知られており⁶⁾、血漿タンパクと赤血球の相互作用、特に赤血球集合が粘度に反映される¹⁶⁾。したがって、本モデルの血液粘度上昇に血漿タンパクの増加を介して赤血球集合が増加している可能性も考えられる。しかし、beraprost が血漿の粘度上昇を改善しないことや、結果は示さないが、赤血球集合の指標と考えられる低ずり速度における血液粘度の高ずり速度における血液粘

度に対する比⁶⁾ には投与群と対照群の間に差がみられなかったことから、血液粘度改善作用の機序に赤血球集合の寄与は少ないと考えられる。

動脈閉塞などの末梢循環障害では血管内皮や組織の障害とともに、血中に過酸化脂質などの細胞障害性の物質が遊離され、白血球機能亢進なども起こることから、これらを介する血液レオロジーの悪化が考えられており²⁰⁾、本モデルにおいても同様なレオロジー悪化の機序が考えられる。PGI₂ には細胞保護²¹⁾ や白血球機能抑制作用²²⁾ が認められるので、beraprost にも同様な作用が期待される。このことから今回得られた beraprost の血液レオロジー改善作用は単に赤血球変形能の改善のみを介するものではなく、細胞保護や白血球機能抑制作用などが関与している可能性も考えられる。

静脈血栓症モデルの血栓形成に対して抗凝固薬の warfarin が強い抑制効果を示したことは本モデルの血栓形成に血液凝固系の関与が大きいことを示している。しかし、beraprost は血栓生成抑制効果が見られる用量では血液凝固系に影響を与えず、手術中の出血傾向も見られな

かったので, その血栓生成抑制作用には凝固系以外に対する作用の関与が大きいと考えられる。

この静脈血栓症モデルでは aspirin などの抗血小板薬の効果が見られず, 実験的な血小板減少症で検討しても, 血栓生成を抑制しないことから, 血小板の寄与が少ないとされている¹¹⁾。しかし最近, 血小板減少症をより強く発現した動物や血小板無力症ラットで本モデルを作成した報告では血栓の生成が抑制されている²³⁾。ためこの静脈血栓症モデルの血栓生成に血小板が関与することを否定することはできない。さらに抗血小板薬である beraprost や ticlopidine に効果が見られたことから本モデルの血栓生成過程に血小板の関与が大きいことは間違いないと思われる。しかし, 血栓生成抑制作用が認められた用量では beraprost の血小板凝集抑制作用は十分ではない²⁾ ことから抗血小板作用のみでは効果を説明できない。

この静脈血栓症モデルでは血管を周囲組織から剝離する操作による侵襲によって血栓が生成しやすく, 侵襲が少ない状態で鬱血を起こした場合に血栓が生成しにくい, 血管を予め障害してモデルを作成することが多い²⁴⁾。このようなことから, このモデル作成に血管障害が必要であると考えられている。血管障害が起こるとその部位に白血球が集合することなどから, このモデルの血栓生成にも白血球が関与しているとされている²⁵⁾。さらにこのモデルに効果があった ticlopidine の作用機序の一つにも白血球に対する作用が挙げられている¹¹⁾。また, PGI₂ の白血球機能抑制作用²²⁾ や細胞保護作用²¹⁾ が PGI₂ 誘導体の beraprost にも期待されることから, 本モデルにおける beraprost の効果に白血球に対する作用および細胞保護作用の寄与が考えられる。しかし, 先に述べた強度の血小板減少症ラットでは白血球数の変化はないにもかかわらず血栓生成が抑制される²³⁾ ので, 本モデルにおける白血球や細胞保護作用の寄与の程度をさらに詳しく検討する必要がある。また, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の beraprost の投与で血栓重量の抑制が 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より弱まったのは, この用量では無麻酔ラットの血圧をあまり低下

させないが, 麻酔下では低下させる²⁶⁾ ので, 静脈結紮部の鬱血が強まったためと考えられる。

ラットの血液凝固系に対しては beraprost は APTT を 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で若干延長したが, このような作用は *in vitro* では見られないため, 血液凝固系に關与する血小板因子の放出が血小板機能と同時に抑制された可能性が考えられる。また, 臨床で予分される beraprost の用量 (1 回量 20~40 μg を 1 日 3 回, 約 1~2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) の 1 回量で 1.5 倍以上の 200 $\mu\text{g}/\text{body}$ (約 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) のヒトへの投与でも内因系の血液凝固活性の指標である Ca 再加時間が若干延長した (100 $\mu\text{g}/\text{body}$ ではほとんど延長が見られない)²⁷⁾ が, ラットの場合と同様に正常値の範囲内であった。ラットと同様にヒトでも内因系の凝固系が若干延長される²⁷⁾ ことからラットの 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ およびヒトの 200 $\mu\text{g}/\text{body}$ の血中濃度のピーク (ラット約 60 ng/ml , 外挿値²⁸⁾, ヒト 0.9 ng/ml ²⁷⁾) は血液凝固系にほぼ同等の影響を与えると考えられる。ヒトへの通常の投与量では今回ヒト血漿で *in vitro* において検討した 23.8 nM (10 ng/ml) 以上の beraprost が血中に現れることはないと考えられ, 直接血漿成分に作用するのではなく内因系の血液凝固系に關与する血小板放出因子などを介した作用であると推測される。今回の検討で 300 mg/kg の ticlopidine で APTT の若干の短縮が認められたが, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の beraprost で APTT が若干延長した理由と同様に今後の詳細な検討が必要であろう。

IV. 結 論

正常ラットの赤血球変形能を beraprost は上昇させ, 動脈閉塞モデルにおいて血液粘度を改善し, 静脈血栓症モデルの血栓形成を抑制した。

血液粘度改善は主に beraprost の直接作用による赤血球変形能改善作用に基づき, 血栓形成抑制は主に抗血小板作用によるものと思われる。

また, これらの作用に加え, PGI₂ に認められるような細胞保護や白血球機能抑制作用など

の作用の関与も推測され、末梢循環障害などによる血栓性あるいは閉塞性の疾患の治療に有効である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ohno, K., Nagase, H., Nishiyama, H., and Nishio, S.: Stereoselective synthesis of 5, 6, 7-trinor-4, 8-inter-m-phenylene-PGI₂ derivatives and their inhibitory activities to human platelet aggregation. *Adv. Prostagland. Thromb. Leuko. Res.*, **15**: 279~281, 1985
- 2) Nishio, S., Matsuura, H., Kanai, N., Fukatsu, Y., Hirano, T., Nishikawa, N., Kameoka, K., and Umetsu, T.: The in vitro and ex vivo antiplatelet effect of TRK-100, a stable prostacyclin analog, in several species. *Jap. J. Pharmacol.*, **47**: 1~10, 1988.
- 3) Akiba, T., Miyazaki, M., and Toda, N.: Vasodilator actions of TRK-100, a new prostaglandin I₂ analogue. *Br. J. Pharmac.*, **89**: 703~711, 1986.
- 4) Umetsu, T., Murata, T., Tanaka, Y., Osada, E., and Nishio, S.: Antithrombotic effect of TRK-100, a novel, stable PGI₂ analogue. *Jap. J. Pharmacol.*, **43**: 81~90, 1987.
- 5) 山口 寛, 長田鉄也, 清水 隆, 石丸 新, 古川欽一: PGI₂ 誘導体 (TRK-100) の生体内レオロジーに対する影響. 血液と脈管, **20**: 147~151, 1989.
- 6) Bull, B. S., Chien, S., Dormandy, J. A., Kiesewetter, H., and Lewis, S. M.: Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin. Hemorheol.*, **6**: 439~453, 1986.
- 7) 磯貝行秀: 血液粘度計. 検査と技術, **10**: 1017~1023, 1982.
- 8) Panak, E., Maffrand, J. P., Picard-Fraire, C., Vallee, E., Blanchard, J., and Roncucci, R.: Ticlopidine: A promise for the prevention and treatment of thrombosis and its complications. *Haemostasis*, **13**: pp1~54, 1983.
- 9) Vainieri, H., and Wingard, Jr. L. B.: Effect of warfarin on the kinetics of the vitamin K-dependent clotting factors in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **201**: 507~517, 1977.
- 10) Morita, A., Kamoshita, K., Ito, T., Naito, Y., Akiyama, K., and Kobayashi, S.: Beneficial effect of sodium salt of 17,(R)-methyl-20-isopropylidenecarbacyclin on experimentally-induced ischemic hind limb lesions and blood viscosity. *Arzneim.-Forsch. Drug Res.*, **36**: 680~683, 1986.
- 11) Bernat, A., Uallee, E., Maffrand, J. P., and Roncucci, R.: Antithrombotic effect of ticlopidine in a platelet-independent model of venous thrombosis. *Thromb. Res.*, **37**: 279~285, 1985.
- 12) Forconi, S., Guerrini, M., Rossi, C., and Pecchi, S.: Local increase of blood viscosity during cold-induced Raynaud's phenomenon. *VASA*, **8**: 116~120, 1979.
- 13) Chien, S.: Determinants of blood viscosity and red cell deformability. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **41**: 7~12, 1981.
- 14) Alderman, M. J., Ridge, A., Morey, A. A., Ryall, R. G., and Walsh, J. A.: Effect of total leukocyte count on whole blood filterability in patients with peripheral vascular disease. *J. Clin. Pathol.*, **34**: 163~166, 1981.
- 15) Chien, S., Usami, S., Dellenback, R. J., and Gregersen, M. I.: Shear-dependent interaction of plasma proteins with erythrocyte in blood rheology. *Amer. J. Physiol.*, **219**: 143~153, 1970.
- 16) 磯貝行秀: 赤血球の集合と変形. 医用電子と生体工学, **19**: 189~497, 1981.
- 17) Kovacs, I. B., and O'Gray, J.: Prostacyclin increases filterability of normal and rigidified human red blood cells in vitro. *Agents and Actions*, **14**: 306~310, 1984.
- 18) 斎藤勝弘, 伊藤 亮, 工藤南雄, 北川 登, 疋田精一, 西村千春, 奥田敏明, 青山行雄, 中村俊之, 北田繁樹, 大川哲司, 竹村圭子, 吉中一朗: Beraprost sodium のラットにおける3ヵ月間経口投与亜急性毒性試験. 基礎と臨床, **23**: 3412~3454, 1989.
- 19) Kato, R., Uji, Y., and Matsumoto, K.: Phase I study of beraprost sodium (TRK-100), a prostacyclin derivative-Repeated oral administration study for 10days. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **20**: 529~539, 1989.
- 20) 三木正之, 美濃 真: 赤血球におけるラジカル反応とラジカルスカベンジャーとしてのビタミン E. (大柳善彦, 吉川敏一編: フリーラジカルの臨床 Vol. 2), 日本医学館, 東京, 1987, p149.

- 21) 沼野藤夫: プロスタサイクリンの組織保護作用. 医学のあゆみ, **125**: 250~252, 1983.
- 22) Moncada, S.: Biology and therapeutic potential of prostacyclin. *Stroke*, **14**: 157~168, 1983.
- 23) Bernat, A., Vallee, E., Maffrand, J. P., and Gordon, J. L.: The role of platelets and ADP in experimental thrombosis induced by venous stasis in the rat. *Tromb. Res.*, **52**: 65~70, 1988.
- 24) 臼井由行: 動静脈血栓の器質化の差異に関する研究. 血管, **10**: 61~68, 1988.
- 25) Schaub, R. G., Simmons, C. A., Koets, M., and Stewart, G. J.: Early events in the formation of a venous thrombosis following local trauma and stasis. *Thromb. Haemost.*, **50**: 68, 1983.
- 26) Hirsh, J., Hull, R. D., and Raskob, G. E.: Epidemiology and pathogenesis of venous thrombosis. *J. Amer. Coll. Cardiol.*, **8**: 104B~113B, 1986.
- 27) Kato, R., Uji, Y., and Matsumoto, K.: Phase I study of beraprost sodium (TRK-100), a prostacyclin derivative-Single oral administration study. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **20**: 515~527, 1989.
- 28) Matsumoto, K., Tajima, A., Hirano, Y., and Ohno, K.: Pharmacokinetics and biotransformation of beraprost sodium I: Plasma level profile of beraprost sodium in rat. *Xenobio. Metabol. Dispos.*, **4**: 713~725, 1989.