膜作用性薬物の血小板機能修飾機構に関する生物物理化学的研究

北河修治

新潟薬科大学, 〒950-21 新潟市上新栄町 5-13-2

**Studies Based on Biophysical Chemistry on the Mechanisms
of Modification of Platelet Functions
by Membrane Reactive Compounds**

Shuji KITAGAWA

Niigata College of Pharmacy, Kamishin'ei-cho, Niigata, 950-21, Japan

(Received March 10, 1994)

Physico-chemical properties of the blood platelets and their membrane were investigated by fluorescence analysis and electron spin resonance spectrometry. Fluorescence analysis using diphenylhexatriene and its ionic derivatives revealed that the inner membrane compartment of the platelets is more fluid than the outer layer of the plasma membrane. Further, the relationship between the increase in membrane fluidity by membrane reactive compounds such as alcohols and their inhibitory effects on platelet function was clarified. These compounds seem to inhibit platelet function due to stimulation of adenylate cyclase, which is mediated by perturbation of the central region of the membrane lipid bilayer.

The effects of monovalent cations and anions on platelet function was also examined and their mechanisms were studied. It was indicated that monovalent cations such as alkali metal cations modify platelet aggregation by changing fibrinogen binding. On the other hand, monovalent anions modified platelet function by quite different mechanism.

Furthermore, generation of hydroxyl radicals by platelets and its enhancement accompanied with the activation of platelets were revealed. It was inhibited by inhibitors of platelet activation such as forskolin and phenolic antioxidants.

Keywords—membrane fluidity; blood platelets; fluorescence; ESR; adenylate cyclase; hydroxyl radical

1. はじめに

多くの薬物が、生体膜に存在する受容体や輸送系あるいは種々の酵素系に作用することによって、その作用を発現することが知られている。このような生体膜を標的とする薬物の作用機構について、近年における生化学的側面からの研究の進歩は目覚ましいものがあるのに対して、物理化学的側面からの研究は遅れているのが現状である。ところで、膜作用性薬物の作用は、受容体等との特異的な相互作用と、生体膜に対する非特異的な物理化学的相互作用を介した作用の両者があいまって発現するものと考えられる。したがって、薬物による生体膜脂質二重層の流動性や表面電位の修飾、解離性薬物と膜蛋白質や脂質二重層との静電的相互作用、あ

本総説は、平成6年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

るいは薬物と細胞内で産生されるフリーラジカルとの相互作用等の物理化学的な相互作用は、薬物の作用発現の過程で重要な役割をはたしているものと考えられる。そこで、著者らは、蛍光分析法や電子スピン共鳴法を利用して膜流動性等の生体膜物性の詳細を明らかにすると共に、アルコール等の膜作用性薬物の生体膜系に及ぼす影響を観察し、物理化学的側面より作用機構の詳細を明らかにすることを考え、研究を行ってきた。

膜作用性薬物の作用機構は多くの生体膜系で共通点を有すると考えられるが、著者らは主として血小板を対象として研究を行ってきた。これは、(1) 血小板が既に膜構造及び組成の解明された系であり、膜作用性薬物の作用機構の解明に適する系であること、(2) 血小板膜物性の詳細を明らかにし、膜作用性薬物の血小板に対する作用機構を解明することは、血小板が関与する種々の疾患の発症を防止するための抗血小板薬の開発上も重要であること等による。すなわち、血小板は、血管壁の傷害を修復する止血血栓の形成に深く関与しており、¹⁾ それが thrombocyte (栓球) という名の由来にもなっているが、一方、近年これとは逆に、心筋梗塞や脳梗塞を招く動脈血栓の形成^{1,2)} や、種々の炎症反応³⁾ あるいは癌の転移過程⁴⁾ でも重要な役割を演じていることが明らかにされている。そのため抗血小板薬の開発研究が活発に進められているのは、よく知られているところである。^{5,6)}

本総説は、これまでの著者らの研究成果をまとめたものである。研究は主としてホルスタイン種ウシ血小板を対象として行ったものであるが、これは、ウシ血小板が分離後も活性が比較的安定であること、トロンボキサン A_2 による凝集がなく、血小板の活性化過程におけるシクロオキシゲナーゼ代謝物の関与を考えなくてすむため、⁷⁾ 薬物の作用機構の検討が他のホ乳類の血小板に比べて容易であること等による。本総説は、血小板の機能発現上重要であると考えられる血小板膜流動性の特性や血小板からの活性酸素種の産生を明らかにするとともに、膜作用性薬物のモデル化合物として、アルコール、脂肪酸、アルキルトリメチルアンモニウム、アルカリ金属イオン、ハロゲンイオン及びフェノール化合物等を取りあげ、その血小板機能修飾機構を明らかにすることを目的として行った研究の成果をまとめたものである。

2. 血小板膜の流動性と膜作用性薬物の機能修飾機構

2.1. 血小板膜流動性の非対称性 血小板膜を初めとする生体膜では、膜脂質二重層の内層でリン脂質組成が非対称的であることが知られている。⁸⁻¹⁰⁾ また、その非対称的なリン脂質の分布が、血液凝固反応やエキソサイトーシス等の膜融合反応を初めとする種々の細胞機能の発現や細胞の安定性に非常に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。⁸⁻¹⁰⁾ ところで、血小板膜や赤血球膜において細胞質膜外層の主要リン脂質成分として存在するスフィンゴミエリンやホスファチジルコリンのアシル鎖は、主として飽和脂肪酸やモノ不飽和脂肪酸で構成されている。¹¹⁾ 一方、細胞質側に多く存在するホスファチジルセリンやホスファチジリエタノールアミン等のリン脂質はアシル鎖としてアラキドン酸等の多価不飽和脂肪酸に富むことが知られている。¹¹⁾ このことは、膜の流動性もまた膜の内外層で非対称的である可能性を示唆している。そこで、Fig. 1 に示すジフェニルヘキサトリエン (DPH) 誘導体等の蛍光プローブを利用し、各プローブの膜での局在性を明らかにすると共に、蛍光パラメータを測定することによってその実証を試みた。

そのため、まず DPH 及びその誘導体の血小板への結合と細胞質側への取り込みについて観察した。¹²⁾ これらのプローブは、いずれも水溶液中では無蛍光であり、膜に結合して初めて蛍光を発する。Fig. 2 及び 3 にそれぞれ示す蛍光強度及び細胞質側への取り込みについての実験結果から、四級アンモニウムイオン性のプローブである DPH のトリメチルアンモニウム誘導

Fig. 1. Chemical Structures of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), Its Trimethylammonium Derivative (TMA-DPH) and Propionic Acid Derivative (DPH-PA)

体 (TMA-DPH) は, Fig. 4 に示すように, まず細胞質膜の外層に結合した後, 細胞質膜をゆっくりと透過して細胞質側へと移行し, 平衡状態では負の表面電位を有する細胞質側に主として存在することを明らかにした. また, Fig. 2 及び 3 に示すように, 細胞質側への移行は温度に顕著に依存することが分かった. さらに, このような細胞質側への取り込みに呼応して, Fig. 5 に示すような蛍光異方性の顕著な減少が観察されることから, TMA-DPH の細胞質側における結合部位は細胞質膜外層の初期における結合部位よりも, より流動性に富んでいることが示唆された.

一方, 構造的に高い膜透過性を有することが予想される陰イオン性の DPH-PA は, 負の表面電位を有する細胞質側との静電的反発により, Fig. 4 に示すように, 主として細胞質膜の外層に存在するものと考えられる. また, 非極性の DPH は膜脂質二重層の中央部付近に存在するものと考えられる. このような局在性の異なる非極性及び陰イオン性プローブを用いた実験結果並びに低張処理によって得た血小板膜や, 膜より抽出した脂質より構成したリポソ-

Fig. 2. Time Courses of Change in Fluorescence Intensity of TMA-DPH

○—○, 37°C; ●---●, 25°C; □---□, 15°C. Data are means $\pm$ S.D. for four experiments.

Fig. 3. Transbilayer Incorporation of TMA-DPH

○—○, 37°C; ●---●, 25°C; □---□, 15°C. Data are means $\pm$ S.D. for four experiments.

Fig. 4. Possible Localizations of DPH and Its Derivatives

ムにおける DPH とその誘導体の蛍光パラメータの測定結果も総合して、血小板膜の細胞質側の流動性は細胞質膜外層の流動性よりも高いと結論した。¹²⁾

このように DPH とその誘導体、特に TMA-DPH を用いて示された膜流動性の非対称性は他の四級アンモニウム性蛍光プローブを用いても観察することができる。著者らはピレンのブチルトリメチルアンモニウム誘導体を用いても同様な結果を得ている。¹³⁾ このプローブは DPH 誘導体とは異なり、蛍光異方性ではなく、

蛍光スペクトルの変化より膜流動性の観察を行うものである。Fig. 6 に示すように、高い膜流動性の指標である excimer に由来する band は、プローブの添加初期には認められないが、120 分インキュベーション後のスペクトルの観察結果に見られるように、細胞質側へのプローブの取り込みに伴って長波長側に出現する。このことは、血小板膜の細胞質側は相対的に軟い状態にあるという上述の DPH 誘導体による実験結果を支持している。¹³⁾

前述したように、血小板において細胞質膜の外層を構成するリン脂質のアシル鎖は主として飽和脂肪酸あるいはモノ不飽和脂肪酸よりなり、逆に細胞質側のリン脂質はアラキドン酸等の多価不飽和脂肪酸に富んでいる。¹¹⁾ また、細胞質膜の外層に大量に存在するスフィンゴミエリンは、それ自身、膜を硬くすることに貢献することが知られている。¹⁴⁾ さらに、赤血球膜での研究でコレステロールが細胞質膜の外層に、より多く存在することが示唆されている。^{15,16)} 以上のことを考え合わせると、本研究で明らかにした膜流動性の非対称性は理にかなったものであると考えられる。また、細胞質側が相対的に流動性が高いという結果は電子スピン共鳴法等によって赤血球膜で報告されている知見とも合致している。¹⁷⁾ このような膜流動性の非対称性は細胞質側は種々の酵素反応や膜融合反応が営まれる場所であること、逆に細胞質膜外層は外界との障壁として働くことを考えると理にかなっている。現在さらに顆粒膜の流動性についても観察を行っている。

ところで、添加初期と平衡状態で存在部位が大きく異なる TMA-DPH 等の四級アンモニウム性蛍光プローブを用いることによって細胞の活性化等に伴う細胞質膜の外層あるいは内層における膜物性変化を観察することができる。例えば、Table I に示すように、血小板懸濁液に添

Fig. 5. Time Courses of Change in Fluorescence Anisotropy of TMA-DPH

○—○, 37°C; ●—●, 25°C; □—□, 15°C. Data are means $\pm$ S.D. for four experiments.

加直後には細胞質膜の外層に存在する TMA-DPH の蛍光強度は、 $2\mu\text{M}$ の Ca^{2+} イオノホア、イオノマイシンの添加に伴って 1 分以内に約 2 倍に増大する。¹²⁾ 増加率は刺激剤の強さ及び濃度に依存している。一方、イオノマイシンを添加しても、陰イオン性の DPH-PA と非極性の DPH の蛍光強度は、ほとんど変化しなかった。またイオノマイシンの添加による TMA-DPH の蛍光強度の増大に伴って、このプローブの蛍光異方性がわずかに減少した。¹²⁾ アルブミン抽出法による検討の結果、イオノマイシン処理によって、TMA-DPH の細胞質への取り込み量は変化していないことが分かった。このことは、TMA-DPH の新しい結合部位が血小板細胞質膜外層に出現していることを示唆している。これは血小板の活性化に伴うホスファチジルセリンの外層への出現⁸⁻¹⁰⁾ と対応している可能性が考えられる。また、蛍光異方性の減少は、流動性に富むリン脂質の出現に伴って、細胞質膜外層の流動性が増大した可能性を示している。このことも、血小板活性化後の血小板膜表面での血液凝固の進展⁸⁻¹⁰⁾ を考えると反応の進行に好都合なことであると考えられる。

2.2. 膜作用性両親媒性薬物の血小板膜流動性に及ぼす影響と血小板機能阻害機構

ところで、脂肪酸やアルコール等の両親媒性化合物が種々の細胞機能を修飾することが知られている。¹⁸⁻²⁰⁾ そこで、著者らは、これらの物質の血小板機能に及ぼす影響について観察を行った。²¹⁻³²⁾ Fig. 7 に α -リノレン酸の例³⁰⁾ を示すように、これらの物質は Ca^{2+} イオノホア以外の刺激剤による血小板の凝集反応をほぼ同じ濃度域で阻害した。また著者らが検討を行った短鎖及び中鎖飽和脂肪酸、^{22,25)} シス型長鎖モノ不飽和脂肪酸、^{24,28)} アルコール、^{23,29)} アルキルトリメチルアンモニウム、²⁶⁾ 一価フェノール^{27,29)} 等の物質は、いずれもその油／水分配係数に依存

Fig. 6. Fluorescence Spectra of 1-Pyrenebutyltrimethylammonium at 37°C

(a) after 2 min incubation; (b) after 120 min incubation. —, spectrum of whole probes in platelet suspension; ----, spectrum of probes in cytoplasmic side; ····, difference spectrum.

TABLE I. Effects of $2\mu\text{M}$ Ionomycin on Fluorescence Intensities and Anisotropies of DPH and Its Derivatives in Bovine Platelets

Probe	% fluorescence intensity ^{a)}	% fluorescence anisotropy ^{a)}
TMA-DPH	188.9 ± 13.5 (8) ^{b)}	97.9 ± 1.3 (8) ^{b)}
DPH-PA	90.2 ± 28.3 (12)	100.3 ± 1.2 (12)
DPH	96.7 ± 13.2 (9)	100.4 ± 5.0 (9)

a) Percentage values in the presence of ionomycin of those in the absence of ionomycin are listed. Data are means $\pm$ S.D. for the numbers of replicate experiments shown in parentheses. b) $p < 0.001$.

Fig. 7. Effect of α -Linolenic Acid on Platelet Aggregation Induced by $10\mu\text{M}$ ADP, 0.25 unit/ml Thrombin, 2 nM PAF and $0.2\mu\text{M}$ A 23187

して、ADP等の刺激剤の添加に伴う血小板の凝集反応を阻害することが分かった。ADPによる凝集反応に対するアルキルアルコールの阻害作用についての例²³⁾をFig. 8及び式(1)に示す。

$$\log(1/\text{IC}_{50})(\text{M}^{-1}) = 1.00 \log P_{\text{oct}} + 0.18 \quad (1)$$

($n=4, r=0.997$)

ただし、 IC_{50} は凝集を50%阻害するアルキルアルコールの濃度を、 P_{oct} はアルキルアルコールの*n*-オクチルアルコール/水分配係数を、*n*はアルキルアルコール数、*r*は相関係数をそれぞれ示す。

上述の分配係数への依存性よりも、これらの物質は膜脂質二重層との非特異的な相互作用を介して細胞機能を修飾している可能性が高く、特に、これらの物質による膜脂質二重層の流動性の変化が種々の細胞機能に対する修飾機構に関係している可能性が従来より指摘されてきた。¹⁸⁻²⁰⁾そこで、そのことを血小板において実証するために、まず脂肪酸やアルコールによる膜物性の変化と血小板機能修飾作用との関係について明らかにすることを試みた。²¹⁻³²⁾その

結果、Fig. 9に α -リノレン酸の例を示すように、DPHの蛍光異方性（あるいは蛍光偏光度）の減少で示される膜流動性の上昇と血小板の機能である凝集反応の阻害率の増大とが非常によく対応していることから、両者の相関が示された。^{21,23-25,28-32)}このような膜作用性両親媒性化合物による血小板膜の perturbation と血小板機能阻害との関連性は、以下に述べるように、いく

Fig. 8. Relation between Partition Coefficients P_{oct} Values, of *n*-Alkyl Alcohols and Their Inhibitory Effects on $10\mu\text{M}$ ADP-induced Aggregation, Expressed as Reciprocals of Their Concentrations Causing 50% Inhibition, $1/\text{IC}_{50}$ Values

Data are means $\pm$ S.D. for four experiments.

Fig. 9. Effects of α -Linolenic Acid on Cyclic AMP Contents, 10μ M ADP-Induced Aggregation and Fluorescence Anisotropy of DPH

○—○, cyclic AMP contents; ●----●, relative aggregation; □---□, fluorescence anisotropy. Data on cyclic AMP are means $\pm$ S.D. for four experiments, data on aggregation are those for three experiments and data on fluorescence anisotropy are those for seven or eight experiments. a) $p < 0.001$.

TABLE II. Compounds Which Modify Platelet Function due to Change in Membrane Fluidity

Compound	Fluidity	Aggregation	Reference
Cholesterol	↓	↑	33), 34), 35)
Ca ²⁺	↓	↑	36)
cis-Long-chain unsaturated fatty acids	↑	↓	21), 24), 30)
Alcohols	↑	↓	23), 29), 31)
Monohydric phenols	↑	↓	32)

↑, increase; ↓, decrease.

つかの系において膜の流動性と血小板機能との間に相関性が認められることにより、より強く支持される。すなわち、Table II に示すように、Shattil らにより、血小板へのコレステロールの付加は膜の流動性を減少させ、³³⁾ 一方、凝集能の増加をもたらすことが報告されている。³⁴⁾ 佐藤らも同様な結果を報告している。³⁵⁾ また、Sauerheber らは、凝集に必須な陽イオンである Ca²⁺ の付加が膜の流動性の減少をもたらすことを報告している。³⁶⁾ 以上の報告並びにシス型長鎖不飽和脂肪酸、^{21, 24, 25, 28, 30)} アルコール、^{23, 29, 31)} 一価フェノール³²⁾ に関する著者らの研究結果は、いずれも、膜が相対的に硬い方が血小板の凝集能が大であることを示している。

次に、これらの物質が、血小板膜流動性の増加を介して、どのような機構で血小板機能の障害をもたらすかを明らかにするために、まず血小板の機能発現をもたらすことが知られている細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に対して、これらの物質がどのような影響を及ぼすかを、蛍光プローブ Fura-2 を用いて調べた。^{26-28, 30)} その結果、Fig. 10 に α -リノレン酸の例を示すように、血小板機能の障害は、刺激剤の添加に伴う細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇をこれらの物質が障害することによって生じること、また、この Ca²⁺ 濃度上昇の障害は、細胞外 Ca²⁺ の存在下、非存在下のいずれにおいてもほぼ同程度に生じることから、 α -リノレン酸等は膜流動性の増大を介して、何らかの機構で細胞内 Ca²⁺ 移動、細胞外からの Ca²⁺ 流入のいずれもによる細胞内の Ca²⁺

Fig. 10. Effects of α -Linolenic Acid on Increase in Cytoplasmic Ca^{2+} Concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Induced by $10 \mu\text{M}$ ADP

(a) in the presence of 0.5 mM external CaCl_2 ; (b) in the presence of 1 mM EDTA with no added CaCl_2 .

濃度上昇を阻害し、血小板の機能阻害をもたらすことが示唆された。^{26-28,30)}

そこで、次に膜流動性の増大がどのような機構で細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の阻害をもたらすかを解明することを試みた。血小板の Ca^{2+} 濃度は、イノシトールリン脂質代謝系を初めとするいくつかの酵素系によって制御されていることが知られている。^{37,38)} 著者らはその中で、膜流動性の変化によってその活性が変化することが他の細胞系において明らかにされているアデニル酸シクラーゼ^{18,39)}に着目し、検討を行った。Fig. 9 にテオフィリンの存在下での細胞内サイクリック AMP 濃度に及ぼす α -リノレン酸の影響について示すように、シス型長鎖不飽和脂肪酸³⁰⁾ アルコール³¹⁾ 一価フェノール³²⁾等の物質は、いずれも膜流動性の増加作用と呼応して、刺激剤の非存在下、細胞内サイクリック AMP 濃度を増加させること、また、これらの物質による膜流動性の増加の程度と細胞内のサイクリック AMP 濃度の上昇の程度とが、よく対応していることも分かった。³⁰⁻³²⁾ 以上の結果は、Fig. 11 に示すようにアルコールやシス型長鎖不飽和脂肪酸等の膜流動性の上昇を引き起こす物質が、共通して膜酵素アデニル酸シクラーゼの活性を増大することによって細胞内サイクリック AMP 濃度を増加させ、刺激に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を阻害し、その結果、血小板の主要な機能である凝集反応を阻害することが明らかとなった。

ところで、これらの物質による膜流動性の増加は膜全体にわたって均一に起こるのではなく、物質によって膜の特定の部分に生じる可能性があり、そのことがこれらの物質の細胞膜機能に対する影響の及ぼし方を決定づけている可能性が考えられる。そこで、著者らは 2.1 で検討した蛍光プローブを用いて、これらの物質が血小板膜脂質二重層のどの部分の流動性に主として影響を及ぼすのかについて検討を行った。^{31,32)} そのため、各蛍光プローブの膜脂質二重層での存在する深さの違いを利用した。すなわち、Fig. 1 に示したプローブの中で、非極性の DPH は、Fig. 4 に示すように、脂質二重層の中央部付近に存在し、^{40,41)} この付近の流動性の探

Fig. 11. Possible Inhibitory Mechanism of Amphiphilic Compounds Such as Alcohols on Platelet Function: Stimulation of Adenylate Cyclase Induced by Perturbation of Lipid Bilayer with Consequent Inhibition of Increase in Cytoplasmic Ca^{2+}

R, receptor; G, GTP-binding protein; AC, adenylate cyclase; DTS, dense tubular system.

素プローブとして用いられている。一方, DPH のイオン性誘導体は, Fig. 4 に示すように, いずれも解離基の存在のために, 蛍光発色団が膜脂質二重層の界面部付近に存在し, この付近の流動性の探索プローブとして用いることができる。このうち, TMA-DPH については, 2.1 で明らかにしたように, 血小板懸濁液にプローブを添加した直後の細胞質膜の外層にのみプローブが存在する状態と, 平衡状態に達した後, 細胞質膜外層に存在するプローブをアルブミンによって洗浄除去することによって逆に細胞質側にのみプローブが存在する状態とを, それぞれ別々に作り出すことができる。著者は, このように四級アンモニウムイオン性蛍光プローブを細胞質膜外層及び細胞質側それぞれの界面部付近の流動性の探索プローブとして利用できることを考察し, 利用した。その結果, Fig. 12 に *n*-ヘキシルアルコールの例について示すように, アルコールやフェノール誘導体については, 膜脂質二重層の中央部付近の流動性の探索プローブである DPH の蛍光異方性のみに顕著な減少が見られることから, これらの物質は血小板膜脂質二重層の中央部付近の流動性を上昇させることによってアデニル酸シクラーゼの活性を増大していることが示唆された。^{31,32)}

著者らは, このような両親媒性化合物による膜酵素の活性変化と蛍光異方性変化との間に共通の直線関係が成立することをアルコール (アルキルアルコール及びベンジルアルコール) について, ウサギ小腸刷子縁膜を対象として明らかにしている。⁴²⁾

ところで, このような両親媒性薬物との相互作用の機構の解明は, 血小板に留まらず, ニオイ物質と嗅細胞の受容膜脂質層との相互作用⁴³⁾を初め, 他の生体膜系での相互作用の機構を明らかにする上においても有用である。また, シス型長鎖不飽和脂肪酸やアルキルアルコールを初め上述の血小板において検討した両親媒性薬物の多くが皮膚において薬物の吸収促進剤として働くことが明らかにされており, 薬物透過のバリアーとなっている角質層脂質の流動性の改善が, その作用機構として提唱されている。^{44,45)} 著者らも, 現在その作用機構について検討中であり, 血小板における作用機構との共通性を明らかにしつつある。⁴⁶⁾

2.3. 高濃度両親媒性薬物による非特異的な血小板の活性化 さらに, 著者らは, 非生理的な現象ではあるが, 高濃度のシス型長鎖不飽和脂肪酸と血小板との相互作用について検討し, lysis を引き起こす直前の濃度において, リノール酸等のシス型長鎖不飽和脂肪酸は, さらに著しい膜の perturbation を生じ, そのため大量の Ca^{2+} の細胞内への流入を招き, 上述の阻害作用とは逆に, シス型長鎖不飽和脂肪酸それ自体が血小板の凝集反応を生じることも明らかにした。⁴⁷⁾ このような現象は他の多くの両親媒性化合物に共通して生じるものであることも確認しており, 血小板の活性化が細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇によって生じることを示す一例であると

Fig. 12. Effects of *n*-Hexyl Alcohol on Fluorescence Anisotropies of DPH and Its Ionic Derivatives

○—○, DPH; ●---●, DPH-PA; □---□, TMA-DPH in the outer leaflet; ■---■, TMA-DPH in the inner membrane compartment. Data are means $\pm$ S.D. for eight experiments. a) $p < 0.05$, b) $p < 0.001$.

考えられる。

3. イオンの血小板機能修飾機構

膜作用性の解離性薬物の血小板機能修飾機構を明らかにする上において、アルカリ金属イオンやアルキルアンモニウムイオンあるいはハロゲンイオン等の陽イオン及び陰イオンの血小板機能修飾機構を明らかにすることは基礎的知見として重要である。そこで著者らは、まず血小板の凝集能が、メディウムのイオン種によって大きく異なることを明らかにし、その機構について検討した。

3.1. 一価陽イオンの血小板機能修飾機構

例えば、Table III に示すように、血小板の ADP 凝集はアルカリ金属イオンメディウムにおいては、 K^+ , Rb^+ , Cs^+ メディウム中では進行しやすく、逆に Na^+ や Li^+ メディウム中では進行しにくい。⁴⁸⁾ 同様に、四級アンモニウムイオン中での血小板の凝集能も各々の四級アンモニウムイオンによって大きく異なり、Table III に見られるように、アルキル鎖が長くなるほど、また、ベンゼン環の数が増すほど凝集能は低下する。⁴⁸⁾ さらに、これらの陽イオンの影響は Ca^{2+} 濃度が高い場合には小さくなる。⁴⁸⁾ これらのイオンの作用は一般に細胞内への侵入後の細胞内部での作用や膜電位変化で説明されがちであるが、^{49,50)} 著者らは、その作用の多くは血小板とこれらのイオンとの細胞外における静電的な相互作用に基づいて説明できることを明らかにした。^{48,51)} すなわち、アルカリ金属イオン等の一価陽イオンについては、Lineweaver-Burk プロット及び Dixon プロットの解析より、細胞外の Ca^{2+} と静電的に拮抗することによって、その作用を発現することを明らかにした。⁴⁸⁾

TABLE III. $10\mu M$ ADP-Induced Aggregation of Bovine Platelets in Media Containing 135 mM Concentrations of Chloride Salts of Monovalent Cations in the Presence of $200\mu M$ or 5 mM $CaCl_2$

Cation	Relative aggregation ^{a)}	
	$200\mu M$ $CaCl_2$	5 mM $CaCl_2$
Li^+	31.6 ± 12.1	77.4 ± 3.6
Na^+	27.8 ± 7.3	71.4 ± 1.1
K^+	100	100
Rb^+	103.8 ± 13.2	105.7 ± 8.9
Cs^+	87.3 ± 3.3	95.6 ± 1.0
Choline	103.5 ± 3.5	93.4 ± 9.2
TMA ^{b)}	86.6 ± 4.0	115.5 ± 7.0
TEA ^{c)}	73.0 ± 2.6	103.6 ± 3.0
TBA ^{d)}	13.9 ± 0.7	36.6 ± 0.2
TMBA ^{e)}	43.0 ± 0.7	81.5 ± 1.4
DDA ^{f)}	12.5 ± 0.2	35.9 ± 0.5

a) The rate of aggregation in KCl medium at each $CaCl_2$ concentration was defined as 100. Values are means $\pm$ S.D. for three experiments. b) TMA, tetramethylammonium. c) TEA, tetraethylammonium. d) TBA, tetrabutylammonium. e) TMBA, trimethylbenzylammonium. f) DDA, dimethyldibenzylammonium.

Fig. 13. Increase in Cytoplasmic Ca^{2+} Concentration, $[Ca^{2+}]_i$, Induced by $10\mu M$ ADP in Na^+ - and K^+ -Enriched Media

(a) in the presence of 0.5 mM external $CaCl_2$; (b) in the presence of 1 mM EDTA with no added $CaCl_2$.

一方, Fig. 13 に示すように, これらの陽イオンは ADP 等の刺激剤の添加に及ぼす細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇には影響しないことも明らかにした (ただし, 刺激剤がトロンビンの場合には, トロンビンの酵素活性がメディウムのイオン組成に顕著に依存するため, 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇もイオン種によって大きく変化する). また, Fig. 14 に ADP によって誘起されるフィブリノーゲンの結合に及ぼす Na^+ 及び K^+ の影響について示すように, これらの陽イオンは血小板どうしの凝集を生じるために必要である細胞外でのフィブリノーゲンの血小板への結合を修飾することによって, 血小板の凝集に影響を及ぼすことを明らかにした.⁵¹⁾ すなわち, Na^+ , K^+ メディウム中での ADP 刺激血小板に対するフィブリノーゲンの結合定数は, それぞれ, $4.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $5.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり, 大きな差異はないが, 結合部位数は, それぞれ, 12500/血小板, 49900/血小板と, メディウム陽イオン種によって大きく異なり, このことが血小板の凝集能の相違をもたらしているものと考えられる.⁵¹⁾

Ca^{2+} は血小板凝集反応において種々のプロセスで必要であることが知られているが, 細胞外においても比較的高濃度の Ca^{2+} が血小板とフィブリノーゲンとの結合に必要であることが明らかにされている (血小板のフィブリノーゲン受容体蛋白質である糖蛋白質 IIb-IIa 複合体に対して, 1 mM の Ca^{2+} の存在によりフィブリノーゲンの結合が飽和する⁵²⁾). したがって, これらの一価陽イオンは, 細胞外において, Ca^{2+} と静電的に拮抗することによって血小板とフィブリノーゲンとの結合に影響を及ぼし, その結果, 血小板の凝集反応を修飾するものと考えられる. テトラブチルアンモニウム等の四級アンモニウムイオンについても同様な機構で血小板凝集に影響を及ぼすものと考えられる.

3.2. 一価陰イオンの血小板機能修飾機構

一方, 血小板の凝集能はメディウムの陰イオンによっても大きな影響を受ける. すなわち, Table IV に血小板の ADP 凝集に及ぼす Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , ClO_4^- の影響について示すように, 各メディウム中での凝集は $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$ の順に進行しやすい.^{48, 53)} また, 上述の陽イオンの場合とは異なり, 陰イオンの影響は Ca^{2+} 濃度を増加させてもほぼ同様に観察される. このような陰イオンメディウム中での凝集能の大小は蛍光プローブ, 2-p-トルイジンナフタレン-6-スルホン酸 (TNS) を用いて調べた血小板膜の表面荷電の変化とよく一致しており, SCN^- のように表面荷電を大きく変化させるイオンほど血小板の凝集を抑制するこ

Fig. 14. Scatchard Plot of Fibrinogen Binding to ADP-Stimulated Platelets in Na^+ - and K^+ -Enriched Media

○, Na^+ ; ●, K^+ . r , molecules of fibrinogen bound per platelet; C_f , concentration of unbound fibrinogen (M).

TABLE IV. 10 μM ADP-Induced Aggregation of Bovine Platelets in Media Containing 135 mM Concentrations of Potassium Salts of Monovalent Anions in the Presence of 200 μM or 5 mM CaCl_2

Anion	Relative aggregation ^{a)}	
	200 μM CaCl_2	5 mM CaCl_2
Cl^-	100	100
Br^-	82.1 $\pm$ 5.0	99.4 $\pm$ 1.4
I^-	50.3 $\pm$ 5.6	60.5 $\pm$ 7.0
SCN^-	19.5 $\pm$ 3.4	21.4 $\pm$ 1.2
ClO_4^-	30.8 $\pm$ 1.8	29.2 $\pm$ 1.0

a) The rate of aggregation in KCl medium at each CaCl_2 concentration was defined as 100. Values are means $\pm$ S.D. for three experiments.

Fig. 15. Increase in Cytoplasmic Ca^{2+} Concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Induced by $10\mu\text{M}$ ADP in Cl^- and SCN^- -Enriched Media

(a) in the presence of 0.5 mM external CaCl_2 ; (b) in the presence of 1 mM EDTA with no added CaCl_2 .

とが分かった。⁴⁸⁾ また, Fig. 15 に示す Fura-2 を用いた実験結果より, SCN^- 等による凝集の抑制は ADP 等の刺激剤の添加に伴う細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇を抑制することによって生じることが分かった。⁵¹⁾ したがって, これらの一価陰イオンの血小板機能修飾機構は, 上述の一価陽イオンとは大きく異なり, 血小板膜脂質二重層に結合することにより, 膜表面荷電を変化させ, 何らかの機構で血小板の情報伝達システムに影響を及ぼすことによって, 細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を修飾し, 作用しているものと考えられる。

3.3. 細胞内におけるイオンの血小板機能修飾機構 一方, 細胞内においても, そのイオン環境が細胞機能制御酵素系の活性調節に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。実際近年, Na^+/H^+ 交換輸送系を介した細胞内の pH 変化が血小板を初めとする種々の細胞の活性制御因子であることが提唱されてきた。^{54,55)} そこで, 著者らはナイジェリシンやグラミジシン等のイオノホアを利用して, 細胞内のイオン環境を変化させることにより, これらのイオンの影響について観察を行った。その結果, 細胞内の H^+ や Na^+ が血小板凝集に対して阻害作用を示すこと,^{56,57)} この中で Na^+ は刺激剤の添加に伴う細胞内で Ca^{2+} 濃度の増加を阻害することによって凝集を阻害することを明らかにした。⁵⁷⁾

4. 血小板からの活性酸素の産生とフェノール性薬物の作用

4.1. 血小板からの活性酸素の産生 近年, 活性酸素が生体膜や DNA に作用することによって, 種々の疾患を引き起こす原因となっていることが明らかにされてきた。^{58,59)} これに関連して, 以前から, 炎症時に血小板から活性酸素種が産生され, これが血管損傷をもたらし, 疾患の拡大につながっているという可能性が指摘されていた。^{3,60)} そこで, 著者らはこの点に注目し, 血小板から活性酸素種が産生されていることを DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide) を用いてスピントラッピング法により実証することを試みた。⁶¹⁾ その結果, Fig. 16 に示すように, 静止時においても強度比 1:2:2:1 の四本線からなるシグナルが観察されること, また, このシグナルの強度はトロンビンなどの血小板刺激物質の添加に伴って著しく増大することが明らかとなった。このシグナルは DMPO-OH に特有なものであり, このことから, 血小板からのヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の産生が示された。⁶¹⁾ また, この $\cdot\text{OH}$ の産生は, Fig. 16 に示すように, トロンビンや Ca^{2+} イオノホアなどの強い刺激剤を添加した際に著しく, ADP などの比較的弱い刺激剤を添加した際には, その産生量は比較的小であった。⁶¹⁾ さらに Fig. 17 にトロンビンの例を示すように, 刺激剤の濃度及び血小板の活性化に呼応して産生量が増大す

Fig. 16. ESR Spectra of Active Oxygen Species Generated in Platelets

(a) with no stimulant; (b) 50 μM ADP; (c) 2 unit/ml thrombin; (d) 4 μM ionomycin; (e) 2 unit/ml thrombin with 50 μM forskolin. Signals on either side of each ESR spectrum are the third and fourth signals ($\Delta H_{3-4} = 8.69 \text{ mT}$) due to standard manganese (II) ion doped in MgO powder.

ることが分かった。⁶¹⁾ また, Fig. 16 にアデニル酸シクラーゼ活性化物質フォスコリンを添加した場合の例を示すように, 血小板活性化阻害剤の添加によってこの $\cdot\text{OH}$ の産生は阻害された。⁶¹⁾

4.2. フェノール性薬物による活性酸素消去と血小板機能阻害 また, Table V に示すように, 著者らが酸化還元電位に依存して活性酸素消去能を有することを明らかにしている⁶²⁾ ピロカテコール等のフェノール化合物が, この $\cdot\text{OH}$ の産生を阻害することも明らかとなった。⁶¹⁾ さらに, 著者らは, 活性酸素の産生と密接な関係があると思われるアラキドン酸によるウサギ血小板の凝集反応に対して, ピロカテコール等の二価フェノールが, 酸化還元電位及び疎水性に依存して阻害作用を示すことも明らかにした。⁶³⁾

Larsen らによる *in vitro* 及び *in vivo* における実験結果は, 血小板の活性化が内皮細胞の損傷, 剥離をもたらすことを示しているが,⁶⁰⁾ 上述の著者らの実験結果は, 血小板から産生される $\cdot\text{OH}$ がこの過程で重要な役割を果たしている可能性を示唆している。血小板から遊離されるトロンボキサン A_2 やセロトニンとともに, この $\cdot\text{OH}$ が喘息等のアレルギー性の炎症の発症に

Fig. 17. Effects of Thrombin Concentration on Signal Intensity Due to DMPO-OH and Aggregation Rate of Platelets

The aggregation rate with 8 unit/ml thrombin was defined as 1.0. Data are means $\pm$ S.D. for three experiments.

TABLE V. Effects of 1 mM Dihydric Phenols on Signal Intensity Due to DMPO-OH in Bovine Platelet Suspension Activated by 2 unit/ml Thrombin

Compound	Percent signal intensity ^{a)}
None	100
Pyrocatechol	40.8 $\pm$ 7.0
Hydroquinone	75.6 $\pm$ 12.6
Protocatechuic acid	38.8 $\pm$ 5.8

a) Data are means $\pm$ S.D. for three experiments.

も重要な役割を果たしている可能性が考えられる。³⁾

一方、 $\cdot\text{OH}$ 自身が血小板の活性化に関与している可能性も考えられるが、その役割は未だ明らかでない。トロンボキサン A_2 の産生に依存しないウシ血小板の凝集反応に対して $\cdot\text{OH}$ 消去能を有する二価及び多価フェノール化合物が、その油／水分配係数に比して、より強い阻害作用を示すことよりも、³²⁾ 血小板の活性化自身に対しても $\cdot\text{OH}$ が関与している可能性が考えられる。

5. おわりに

以上のように、血小板膜の流動性の非対称性や血小板からの $\cdot\text{OH}$ の産生について明らかにするとともに、膜作用性両親媒性薬物の血小板への作用機構について物理化学的立場から明らかにすることができた。一般の薬物においても特異的な作用と、ここで明らかにした非特異的な作用とがあいまって、その薬理作用を発現しているものと考えられる。しかしながら、今後解明しなければならない点が多々残されている。例えば、シス型長鎖不飽和脂肪酸の *in vivo* における作用機構と、著者らが明らかにした *in vitro* における作用機構との関係は未だ明らかでないのが現状であり、今後解明していかなければならない問題の1つである。

謝辞 本研究は、矢島治明学長、平田寛孝教授を初めとします新潟薬科大学の方々、亀谷富士夫名誉教授、小林（遠藤）順子修士、小谷一夫修士、臼井功二修士を初めとします徳島大学薬学部の方々のご支援とご協力によって行うことができたものです。ここに厚く御礼申し上げます。また、ESR を用いて共同研究いただきました桜井 弘京都薬科大学教授と、たえず暖かくご激励いただきました中垣正幸京都大学名誉教授、宮嶋孝一郎京都大学教授、並びに蛍光分析に関して貴重なご意見を賜りました中西 守名古屋市立大学教授に深謝します。また、研究費の一部は文部省科学研究費によりました。ここに記して深く感謝致します。

引用文献

- 1) M. B. Zucker, *Sci. Am.*, **242**, 86 (1980).
- 2) J. F. Mustard, M. A. Packham, *Thrombos. Diathes. Haematol.*, **33**, 444 (1975).
- 3) C. P. Page, *Agents Actions Suppl.*, **28**, 75 (1989).
- 4) 鶴尾 隆, 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 2818 (1990).
- 5) 日高弘義 (編), “血小板の分子薬理,” 講談社, 東京, 1983, pp. 193—206.
- 6) M. A. Packham, *Thromb. Haemostas.*, **50**, 610 (1983).
- 7) P. A. Gentry, R. R. M. Tremblay, M. Th. Ropss, *Am. J. Vet. Res.*, **50**, 919 (1989).
- 8) R. F. A. Zwaal, H. C. Hemker, *Haemostasis*, **11**, 12 (1982).
- 9) A. J. Shroit, R. F. A. Zwaal, *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 313 (1991).
- 10) A. Zachowski, *Biochem. J.*, **294**, 1 (1993).
- 11) J. M. Naughton, A. J. Sinclair, K. O'Dea, M. S. Steel, *Biochim. Biophys. Acta*, **962**, 166 (1988).
- 12) S. Kitagawa, M. Matsubayashi, K. Kotani, K. Usui, F. Kametani, *J. Membrane Biol.*, **119**, 221 (1991).
- 13) S. Kitagawa, M. Takegaki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1107**, 231 (1992).
- 14) B. Deuticke, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **78**, 1 (1977).
- 15) K. A. Fisher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 173 (1976).

- 16) J. E. Hale, F. Schroeder, *Eur. J. Biochem.*, **122**, 649 (1982).
- 17) K. Tanaka, S. Ohnishi, *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 218 (1976).
- 18) C. D. Stubbs, A. D. Smith, *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 89 (1984).
- 19) J. H. Chin, D. B. Goldstein, "Membrane Fluidity," Vol. 3, ed. by R. C. Aloia, J. M. Boggs, Academic Press, New York, 1985, pp. 1—38.
- 20) C. Le Grimellec, G. Friedlander, E. H. El Yandouzi, P. Zlatkine, M.-C. Giocondi, *Kidney Int.*, **42**, 825 (1992).
- 21) S. Kitagawa, J. Endo, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **798**, 210 (1984).
- 22) S. Kitagawa, H. Nishitama, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 197 (1984).
- 23) S. Kitagawa, T. Shinohara, F. Kametani, *J. Membrane Biol.*, **79**, 97 (1984).
- 24) S. Kitagawa, J. Endo, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **818**, 391 (1985).
- 25) 北河修治, 膜 (総説), **10**, 153 (1985).
- 26) S. Kitagawa, M. Ishida, K. Kotani, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **905**, 75 (1987).
- 27) S. Kitagawa, Y. Ito, Y. Oda, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **1011**, 52 (1989).
- 28) S. Kitagawa, "The Pharmacological Effects of Lipids III," ed. by J. J. Kabara, The American Chemists' Society, Champaign, 1989, pp. 54—63.
- 29) S. Kitagawa, F. Kametani, K. Tsuchiya, H. Sakurai, *Biochim. Biophys. Acta*, **1027**, 123 (1990).
- 30) S. Kitagawa, K. Kotani, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **1054**, 114 (1990).
- 31) S. Kitagawa, H. Hirata, *Biochim. Biophys. Acta*, **1112**, 14 (1992).
- 32) S. Kitagawa, M. Orinaka, H. Hirata, *Biochim. Biophys. Acta*, **1179**, 277 (1993).
- 33) S. J. Shattil, R. A. Cooper, *Biochemistry*, **15**, 4832 (1976).
- 34) S. J. Shattil, R. Anaya-Galindo, J. Bennett, R. W. Colman, R. A. Cooper, *J. Clin. Invest.*, **55**, 636 (1975).
- 35) T. Sato, H. Maegawa, M. Kometani, T. Fujii, *Thromb. Res.*, **40**, 59 (1985).
- 36) R. D. Sauerheber, T. S. Zimmerman, J. A. Esgate, W. P. VanderLaan, L. M. Gordon, *J. Membrane Biol.*, **52**, 201 (1980).
- 37) T. J. Hallam, T. J. Rink, "Platelets in Biology and Pathology III," ed. by D. E. MacIntyre, J. L. Gordon, Elsevier, Amsterdam, 1987, pp. 353—372.
- 38) W. Siess, *Physiol. Rev.*, **69**, 58 (1989).
- 39) G. Friedlander, C. Le Grimellec, M.-C. Giocondi, C. Amiel, *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 341 (1987).
- 40) J.-G. Kuhry, P. Fonteneau, G. Duportail, C. Maechling, G. Laustriat, *Cell Biophys.*, **5**, 129 (1983).
- 41) P. J. Trotter, J. Storch, *Biochim. Biophys. Acta*, **982**, 131 (1989).
- 42) S. Kitagawa, Y. Sugaya, H. Hirata, *Biochim. Biophys. Acta*, submitted.
- 43) 栗原堅三, サイエンス, **20**, 58 (1990).
- 44) K. A. Walters, "Transdermal Drug Delivery," ed. by J. Hadgraft, R. H. Guy, Dekker, New York, 1989, pp. 197—246.
- 45) K. R. Brain, K. A. Walters, *Drugs Pharm. Sci.*, **59**, 389 (1993).
- 46) S. Kitagawa, M. Sawada, H. Hirata, *Int. J. Pharm.*, **98**, 203 (1993).

- 47) S. Kitagawa, J. Endo, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 17 (1984).
- 48) S. Kitagawa, H. Seki, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **840**, 371 (1985).
- 49) M. L. Steer, A. Wood, *J. Biol. Chem.*, **256**, 9990 (1981).
- 50) L. T. Friedhoff, E. Kim, M. Priddle, M. Sonenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 832 (1981).
- 51) S. Kitagawa, K. Usui, *Biochim. Biophys. Acta*, submitted.
- 52) S. J. Shattil, "Platelet Membrane Receptors," ed. by G. A. Jamieson, *Prog. Clin. Biol. Res.*, Vol. 283, Alan R. Liss, New York, 1988, pp. 345—380.
- 53) S. Kitagawa, Y. Hongu, F. Kametani, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1371 (1982).
- 54) J. D. Sweatt, S. L. Johnson, E. J. Cragoe, Jr., L. E. Limbird, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12910 (1985).
- 55) W. Siffert, J. W. N. Akkerman, *Nature* (London), **325**, 456 (1987).
- 56) S. Kitagawa, M. Awai, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **930**, 48 (1987).
- 57) S. Kitagawa, K. Usui, F. Kametani, *Biochim. Biophys. Acta*, **1011**, 117 (1989).
- 58) 大柳善彦, "活性酸素と病気," 化学同人, 京都, 1989.
- 59) 小沢俊彦, 薬誌, **110**, 617 (1990).
- 60) T. Larsen, M. B. Sørensen, R. Olsen, L. Jorgensen, *In Vitro Cell. Devel. Biol.*, **25**, 276 (1989).
- 61) S. Kitagawa, H. Fujisawa, F. Kametani, H. Sakurai, *Free Rad. Res. Commun.*, **15**, 319 (1992).
- 62) S. Kitagawa, H. Fujisawa, H. Sakurai, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 304 (1992).
- 63) S. Kitagawa, H. Fujisawa, S. Baba, F. Kametani, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1062 (1991).