

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
115 (1) 52-61 (1995)

新規ジヒドロピリジン誘導体 F-0401 の薬理作用
(第3報¹⁾) ウサギ血小板凝集抑制作用²⁾

加瀬則子,* 田村典彦, 山浦哲明, 大西治夫
富士レビオ(株) 医薬研究所

Pharmacological Profile of F-0401, a Novel Dihydropyridine Derivative.
III.¹⁾ The Anti-Aggregatory Action of F-0401 on Rabbit Platelets²⁾

Noriko KASE,* Norihiko TAMURA, Tetsuaki YAMAURA
and Haruo OHNISHI

Pharmaceuticals Research Laboratories, Fujirebio, Inc.,
51, Komiya-cho, Hachioji, Tokyo 192, Japan

(Received August 2, 1994)

F-0401 is a newly synthesized dihydropyridine derivative with both antagonistic activity on platelet-activating factor (PAF) and inhibitory action on thromboxane A₂(TXA₂) synthetase activity. In the present study, we examined the effects of F-0401 on platelet aggregations *in vitro* and *ex vivo* in rabbits. F-0401 prevented PAF-, arachidonic acid (AA)- and collagen-induced platelet aggregations *in vitro*, but did not prevent the aggregation by ADP. The inhibitory effect of F-0401 on the aggregation by PAF (IC₅₀ value: 3.4×10^{-6} M) or by the threshold amount of AA (IC₅₀ value: 4.3×10^{-6} M) had the same potency as that of CV-3988 (a PAF antagonist) and ozagrel a (TXA₂ synthetase inhibitor). *Ex vivo* studies also revealed that the anti-aggregatory effect occurred 1 h after the treatment of F-0401 (>10 mg/kg, *p.o.*) and this effect had a tendency to last for 6 h. Nicardipine prevented the platelet aggregation only by PAF (IC₅₀ value: 6.6×10^{-5} M) *in vitro*. However, the preventive effect was not seen *ex vivo*. On the other hand, neither nifedipine nor flunarizine showed any effect on the stimulant-induced platelet aggregation in rabbits. These results suggest that F-0401 has anti-aggregatory action, which is attributable to both PAF antagonistic action and TXA₂ synthetase inhibition *in vitro* and *ex vivo*.

Keywords—F-0401; dihydropyridine derivative; PAF antagonistic action; TXA₂ synthetase inhibition; anti-aggregatory effect; rabbit platelet

緒

言

新規合成ジヒドロピリジン (DHP) 誘導体F-0401((±)-(E)-3-[4-(1-imidazolyl)methylphenyl]-2-propen-1-yl methyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylate) は、イヌを用いた実験で、脳血管選択性に富む血管拡張作用¹⁾及び血流増加作用³⁾を示すことが知られており、脳血管障害治療薬としての応用が期待される Ca²⁺拮抗薬である。

近年、脳梗塞や一過性脳虚血発作などの脳血管障害では血管系の障害ばかりでなく、血小板が主体をなす血栓形成が病態に大きく関与していると考えられ、⁴⁾ その予防と治療に抗血小板

薬が有効とされている。⁵⁾ 抗血小板薬としては、アスピリンの評価が確立しているが、cyclo-oxygenase (CO) 阻害薬は thromboxane A₂ (TXA₂) 産生系のみならず、血小板凝集抑制作用を有する prostaglandin I₂ (PGI₂) の産生も抑制するいわゆる“アスピリンジレンマ”⁶⁾が問題とされることから、TXA₂ 合成酵素阻害薬の有用性が期待されている。特にオザグレルは、脳虚血症状の改善薬⁷⁾として臨床応用され、脳虚血における TXA₂ の関与を支持している。加えて近年、platelet-activating factor (PAF) 拮抗薬 BN52021 が、スナネズミの脳虚血再開通モデルにおいて、血流再開後の脳血流低下と虚血からくる行動障害の改善を早めたと報告⁸⁾されて以来、脳神経領域でも PAF が注目されるようになり、⁹⁾ PAF も脳虚血障害を進展させる因子として関与していることが示唆されている。¹⁰⁾ また、Ca²⁺ は血小板凝集においても重要な細胞内セカンドメッセンジャーであると考えられており、ベラパミル¹¹⁾を始めとした多くの Ca²⁺ 拮抗薬に抗血小板作用が報告されている。¹²⁻¹⁷⁾

F-0401 は、Ca²⁺ 拮抗作用発現量でウサギ血小板 [³H]PAF 結合阻害作用¹⁸⁾及び、ヒト血小板ミクロソーム TXA₂ 合成酵素阻害作用¹⁸⁾を発現することが知られており、血小板に対する作用が期待される。そこで今回、F-0401 の抗血小板作用を明確にするために、血小板惹起物質として PAF 及び arachidonic acid (AA) に加え、一般に汎用されるコラーゲン及び ADP を選び、ウサギ血小板凝集に対する抑制作用を *in vitro* 及び *ex vivo* で既存の Ca²⁺ 拮抗薬あるいは抗血小板薬と比較検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 実験動物 体重 1.8—2.8 kg の日本白色種雄性ウサギ（東京実験動物）を用いた。動物は実験に使用するまでの 1 週間、温度 22±2°C、湿度 55±10% の動物室で飼育し、飼料及び飲料水は自由摂取させた。

2. 使用薬物 被験薬として F-0401、ニフェジピン、塩酸ニカルジピン（ニカルジピン）、オザグレルナトリウム（オザグレル）、CV-3988（以上自社合成）、塩酸フルナリジン（フルナリジン、Sigma）、アスピリン（吉田製薬）及びパパベリン（和光純薬）を用いた。薬物及び試薬として platelet-activating factor (PAF, Avant polar lipid.), sodium arachidonate (AA, Sigma), コラーゲン、ADP（以上京都第一科学）クエン酸ナトリウム（和光純薬）、polyoxyethylene (60) hydrogenated castor oil (HCO-60, 日光ケミカルズ)、ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬) を用いた。

3. *In Vitro* 血小板凝集抑制作用 Born ら¹⁹⁾の方法に従って行った。すなわち、ウサギの頸動脈より 3.8% クエン酸ナトリウム 1 容に対し 9 容 (45 ml) を採血し、200×g, 20°C で 15 分間遠心分離した上清を多血小板血漿 (PRP) とした。さらにそれを 1500×g, 20°C で 10 分間遠心分離して乏血小板血漿 (PPP) を得た。PRP は自動血球計数器 (MEK-4150, 日本光電) にて血小板数を測定した。

被験薬溶液は PRP 200 μl に対し 10 μl を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、PAF (10 ng/ml, 最終濃度), AA (1 mM, 同), コラーゲン (5 μg/ml, 同) 又は ADP (5 μM, 同) を 10 μl 加え、凝集反応をアグリコメーター (PAT-4A, 二光バイオサイエンス) を用いて測定した。また、閾値レベル AA 凝集の実験では、各個体毎に凝集を惹起する AA の最少濃度を求めた後、同様な方法で被験薬の効果を検討した。

生理食塩液前処置群の最大凝集率を 100% とした時の被験薬処置群の最大凝集率で、抑制率を算出し単回帰直線 (Fieller 法) より IC₅₀ 値を算出した。

F-0401 及びニフェジピンは DMSO に溶解後、同量の HCO-60/エタノール (1:1) 溶液に混和し、CV-3988 はエタノールに、オザグレル、ニカルジピン、フルナリジン、アスピリン及びパペリンは精製水にそれぞれ溶解後、生理食塩液に希釈して用いた。溶媒の最終濃度はそれぞれ 0.5% とした。

4. *Ex Vivo* 血小板凝集抑制作用 ウサギは被験薬毎に投与 1 時間群、3 時間群及び 6 時間群に分け各群 5—6 匹とした。採血回数は、原則としてウサギ 1 個体につき被験薬投与前及び投与後の 2 回とし、あらかじめ 0.4 ml の 3.8% クエン酸を満たした注射器を用いて耳動脈より採血し (3.6 ml)、3 項と同様に PRP 及び PPP を得、血小板数を測定した。血小板凝集は PRP 200 μ l を 37°C で攪拌下、凝集惹起物質 10 μ l を添加し、3 項と同様に測定した。

被験薬はいずれも 5% アラビアゴム溶液に懸濁し、体重 1 kg 当たり 5 ml を経口投与した。また、対照群には 5% アラビアゴム溶液を同様に投与した。被験薬の効果は、被験薬投与 1, 3 及び 6 時間群毎に、被験薬投与前後の各凝集惹起物質による最大凝集率の変化から求め、抑制率は投与前の凝集率を 100% とした時の投与後の凝集率より算出した。注射針を刺したことによる血小板凝集への影響と、薬物の作用を区別するために、実験結果には、薬物投与前後で血小板数に変動のない動物の血小板凝集のみを示した。有意差の検定は、同一個体間では paired *t*-test で、被験薬間では Dunnett の多重比較を行い、危険率 5% 以下をもって有意とした。

結 果

1. *In Vitro* 血小板凝集抑制作用

(1) PAF 凝集に対する作用 F-0401 (3×10^{-7} — 1×10^{-4} M) は濃度依存的に PAF 凝集を抑制し、その効力は CV-3988 の 3 倍、ニカルジピンの 20 倍であった。一方ニフェジピン、フルナリジン (3×10^{-4} M) には明らかな抑制が認められなかった (Table I)。

(2) 1 mM AA 凝集に対する作用 F-0401 (3×10^{-5} — 3×10^{-4} M) は濃度依存的に 1 mM AA 凝集を抑制し、その効力はアスピリンの 1/2、オザグレルと同等であった。一方、ニカルジピン、ニフェジピン及びフルナリジン (3×10^{-4} M) には明らかな抑制が認められなかった (Table I)。

(3) コラーゲン凝集に対する作用 F-0401 (3×10^{-5} — 3×10^{-4} M) は濃度依存的にコラーゲン凝集を抑制し、その効力はアスピリンの 1/4、オザグレル及びパペリンとほぼ同等であっ

TABLE I. Effects of F-0401 and Reference Compounds on Platelet Aggregation in Rabbit PRP (*In Vitro*)

Compounds	IC ₅₀ (M)			
	PAF (10 ng/ml) ^{a)}	AA (1 mM) ^{a)}	Collagen (5 μ g/ml) ^{a)}	ADP (5 μ M) ^{a)}
F-0401	3.4×10^{-6}	1.5×10^{-4}	8.0×10^{-5}	$> 3.0 \times 10^{-4}$
Nicardipine	6.6×10^{-5}	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$
Nifedipine	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$
Flunarizine	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$
CV-3988	1.1×10^{-5}	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$	$> 3.0 \times 10^{-4}$
Ozagrel	$> 3.0 \times 10^{-4}$	2.2×10^{-4}	1.5×10^{-4}	$> 3.0 \times 10^{-4}$
Aspirin	—	5.4×10^{-5}	2.0×10^{-5}	—
Papaverine	—	—	8.9×10^{-5}	1.9×10^{-4}

Platelet activating factor (PAF), arachidonic acid (AA), collagen or ADP was added to PRP after incubation (10 min) with each compound at 37°C. a) concentration of each aggregator. —: no test. N=6—11.

た。一方、ニカルジピン、ニフェジピン及び、フルナリジン (3×10^{-4} M) には明らかな抑制が認められなかった (Table I).

(4) ADP 凝集に対する作用 パパペリン (3×10^{-5} — 3×10^{-4} M) は濃度依存的に ADP 凝集を抑制したが、F-0401 及びその他の薬物には 3×10^{-4} M でも明らかな抑制が認められなかった (Table I).

(5) 閾値レベル AA 凝集に対する作用 AA の血小板凝集惹起の閾値は 0.05—0.075 mM であった。F-0401 (3×10^{-7} — 3×10^{-5} M) は濃度依存的に閾値レベル AA 凝集を抑制し、その効力はアスピリンの 3 倍、オザグレルの 1/3 であった (Table II).

2. Ex Vivo 血小板凝集抑制作用

対照群の投与 1, 3 及び 6 時間後の PAF-, 1mM AA-, コラーゲン-, ADP- 及び閾値レベル AA-誘発血小板凝集は、それぞれ投与前値との間に差を認めなかった (Fig. 1—5).

(1) PAF 凝集に対する作用 F-0401 は 10mg/kg, *p.o.* で投与 3 時間後から、30mg/kg, *p.o.* で投与 1 時間後から、対照群に対し有意 ($p < 0.05$) な抑制作用を示した。その作用は投与 6 時間後でも持続しており、最大抑制率は各々 61.3 ± 10.0 (6 時間後) 及び $68.1 \pm 10.4\%$ (1 時間後) であった。アスピリン群 (100mg/kg, *p.o.*), オザグレル群 (30mg/kg, *p.o.*) 及びニカルジピン群 (1 及び 3 mg/kg, *p.o.*) には著明な抑制が認められなかった (Fig. 1).

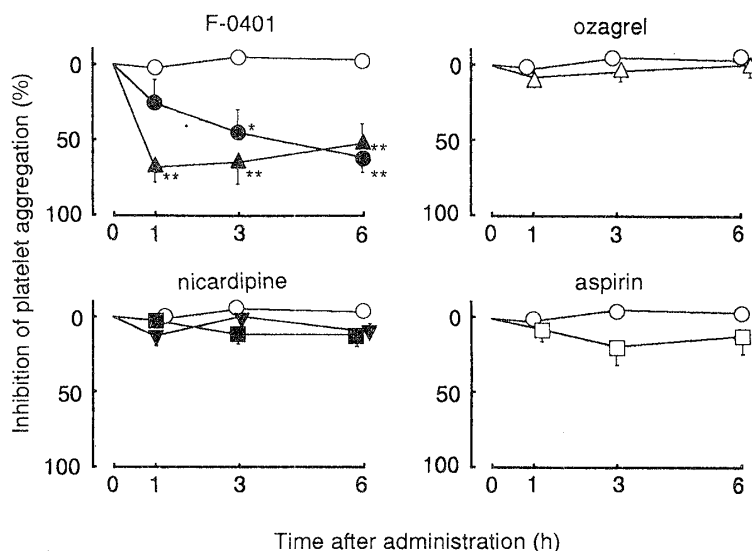


Fig. 1. Effects of F-0401 and Reference Compounds on *ex Vivo* Platelet Aggregation Induced by Platelet-activating Factor (10 ng/ml) in Rabbits

Each point shows the mean \pm S.E. of 5—6 rabbits. The value before administration of the drug is regarded as 100%. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ as compared with control group.

○, control; ●, F-0401, 10 mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30 mg/kg, *p.o.*; ■, nicardipine, 1 mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3 mg/kg, *p.o.*; △, ozagrel, 30 mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100 mg/kg, *p.o.*

TABLE II. Effects of F-0401, Ozagrel and Aspirin on Rabbit Platelet Aggregation Induced by Threshold Level (0.05—0.075 mM)-Arachidonic Acid (AA) *in Vitro*

Compounds	IC ₅₀ (M)
F-0401	4.3×10^{-6}
Ozagrel	1.1×10^{-6}
Aspirin	1.2×10^{-5}

AA was added to PRP after incubation (10 min) with each compound at 37°C. *N*=6.

(2) 1 mM AA 凝集に対する作用 F-0401 は 30 mg/kg, *p.o.* で投与 1 時間後から、対照群に対し有意 ($p < 0.05$) な抑制作用を示した。その作用は投与後 3 時間まで続き、最大抑制率は $29.2 \pm 6.5\%$ (1 時間後) であった。アスピリン群は投与後 1 時間から 6 時間まで、85% 以上の著明な抑制 ($p < 0.001$) を、オザグレル群では投与後 1 時間から 3 時間まで続く最大 $33.1 \pm 8.4\%$ (1 時間後, $p < 0.01$) の抑制を示した。ニカルジピン群には著明な抑制が認められなかった (Fig. 2)。

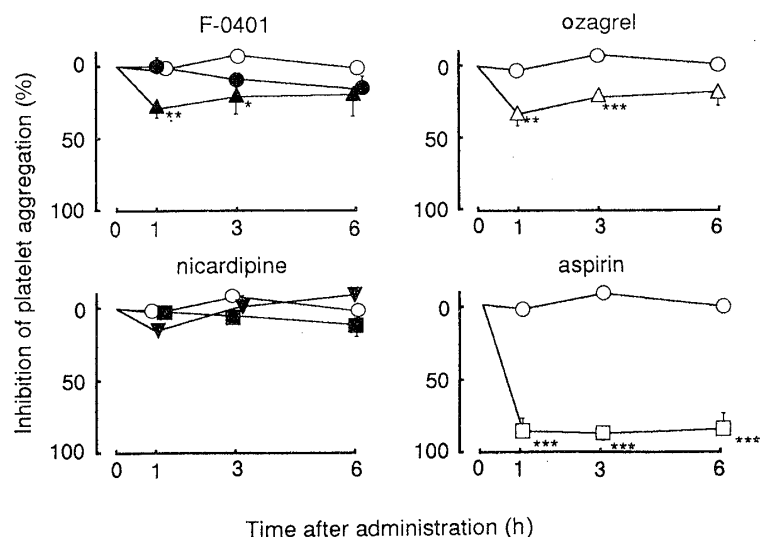


Fig. 2. Effects of F-0401 and Reference Compounds on *ex Vivo* Platelet Aggregation Induced by Arachidonic Acid (1 mM) in Rabbits

Each point shows the mean \pm S.E. of 5–6 rabbits. The value before administration of the drug is regarded as 100%. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ as compared with control group.

○, control; ●, F-0401, 10 mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30 mg/kg, *p.o.*; ■, nicardipine, 1 mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3 mg/kg, *p.o.*; △, ozagrel, 30 mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100 mg/kg, *p.o.*

(3) コラーゲン凝集に対する作用 F-0401 群で最大 25% 前後の抑制を示したが、対照群との間に有意差を認めなかった。一方、アスピリン群は投与後 1 時間から 6 時間まで、50% 前後の著明な抑制作用 ($p < 0.05$) を示し、オザグレル群は投与後 3 時間に $31.1 \pm 9.3\%$ の抑制を示した ($p < 0.01$)。ニカルジピン群には著明な抑制が認められなかった (Fig. 3)。

(4) ADP 凝集に対する作用 F-0401 群は最大 25% 前後の抑制を示したが、対照群との間に有意差を認めなかった。アスピリン群は、投与後 6 時間に $19.3 \pm 7.2\%$ ($p < 0.05$) の弱い抑制作用を示したが、ニカルジピン及びオザグレル群には抑制が認められなかった (Fig. 4)。

(5) 閾値レベル AA 凝集に対する作用 AA の血小板凝集惹起の閾値は 0.1–0.3 mM であった。

F-0401 は 10 mg/kg 及び 30 mg/kg, *p.o.* で、投与後 1 時間から抑制傾向を示し、最大抑制率は各々 $42.5 \pm 11.7\%$ (6 時間後, $p < 0.05$) 及び $50.8 \pm 15.1\%$ (3 時間後, $p < 0.05$) であった。アスピリン群は投与後 1 時間から 3 時間まで完全に、6 時間後でも $89.6 \pm 10.5\%$ の著明な抑制作用 ($p < 0.001$) を示した。また、オザグレル群には投与後 1 時間に最も強く ($84.7 \pm 13.3\%$, $p <$

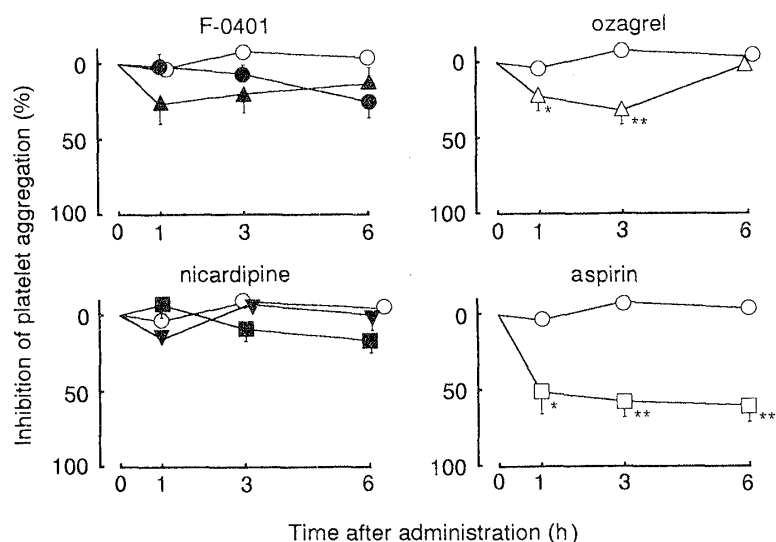


Fig. 3. Effects of F-0401 and Reference Compounds on *ex Vivo* Platelet Aggregation Induced by Collagen (5 µg/ml) in Rabbits

Each point shows the mean \pm S.E. of 5–6 rabbits. The value before administration of the drug is regarded as 100%. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ as compared with control group.

○, control; ●, F-0401, 10 mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30 mg/kg, *p.o.*; ■, nicardipine, 1 mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3 mg/kg, *p.o.*; △, ozagrel, 30 mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100 mg/kg, *p.o.*

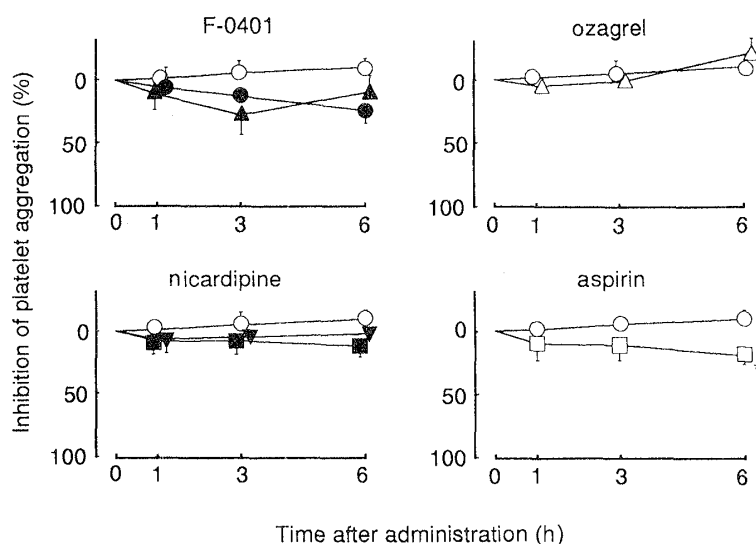


Fig. 4. Effects of F-0401 and Reference Compounds on *ex Vivo* Platelet Aggregation Induced by ADP (5 µM) in Rabbits

Each point shows the mean \pm S.E. of 5–6 rabbits. The value before administration of the drug is regarded as 100%. *, $p < 0.05$ as compared with control group.

○, control; ●, F-0401, 10 mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30 mg/kg, *p.o.*; ■, nicardipine, 1 mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3 mg/kg, *p.o.*; △, ozagrel, 30 mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100 mg/kg, *p.o.*

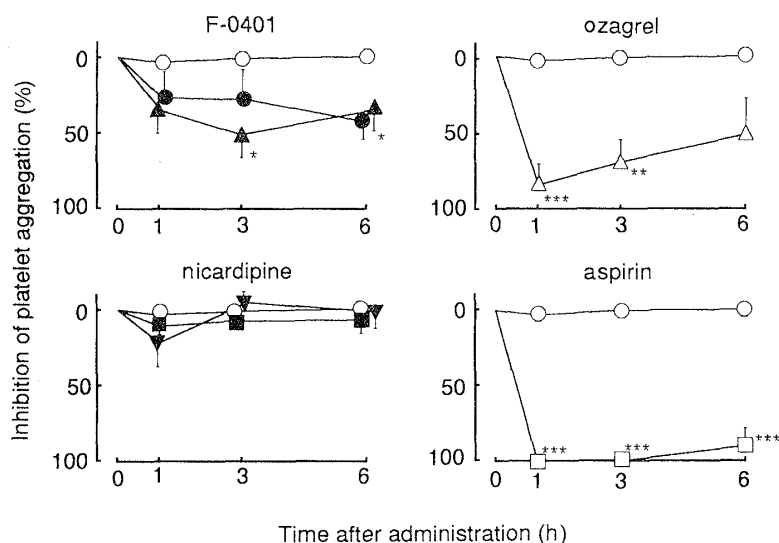


Fig. 5. Effects of F-0401 and Reference Compounds on *ex Vivo* Platelet Aggregation Induced by Threshold Amount (0.1–0.3 mM) of Arachidonic Acid in Rabbits

Each point shows the mean \pm S.E. of 5–6 rabbits. The value before administration of the drug is regarded as 100%. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ as compared with control group.

○, control; ●, F-0401, 10 mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30 mg/kg, *p.o.*; ■, nicardipine, 1 mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3 mg/kg, *p.o.*; △, ozagrel, 30 mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100 mg/kg, *p.o.*

0.001), 6 時間後でも有意ではないが $51.2 \pm 24.4\%$ の著明な抑制が認められたが、ニカルジピン群には明らかな抑制が認められなかった (Fig. 5).

考 察

1. *In Vitro* 血小板凝集抑制作用

F-0401 は PAF-, AA- 及びコラーゲン誘発の血小板凝集を抑制したが, ADP 凝集に対する抑制は認められなかった.

(1) PAF 凝集に対する作用 F-0401 の効力 (IC_{50} 値: $3.4 \times 10^{-6} M$) は, 代表的 PAF 拮抗薬 CV-3988 の約 3 倍と著明であった. 一方, Ca^{2+} 拮抗薬ニカルジピンには PAF 凝集抑制作用が認められたが, その効力は F-0401 の約 1/20 と弱く, ニフェジピン及びフルナリジンには作用が認められなかった. PAF による血小板凝集には, 細胞内への Ca^{2+} 流入が伴い, PAF 受容体と Ca^{2+} 流入機構に関連が示唆されているが,²⁰⁾ 今回の成績は, ラット心筋膜分画への [3H]-ニトレンジピン結合阻害作用¹⁸⁾ 及びウサギ大動脈 Ca^{2+} 収縮抑制作用²¹⁾ から求めた Ca^{2+} 拮抗作用の効力比 (F-0401 : ニカルジピン : ニフェジピン = 1 : 10 : 10) とは一致せず, ウサギ血小板 PAF 結合阻害作用¹⁸⁾ の効力順と良く一致した. このことは, F-0401 の PAF 凝集抑制作用が PAF 結合阻害作用により発現したことを示唆している. しかし, F-0401 の PAF 凝集抑制作用は, 他の薬物と同様に PAF 結合阻害作用 (K_i 値: $1.4 \times 10^{-8} M$)¹⁸⁾ の約 1/250 であり, 両者に大きな差があった. これは本凝集実験では PRP を, 結合実験では洗浄血小板を用いており, 両実験間で用いた PAF 濃度に約 300 倍の差があることによるものと思われる. PRP では, 血漿中のアルブミンの影響で PAF の活性が低下することが知られており,²²⁾ 洗浄血小板に比べ作用

発現に大量の PAF を必要とすると考えられる。

(2) AA 凝集に対する作用 AA は TXA₂ 産生を介して血小板を凝集させる代表的な物質で、その凝集は CO 阻害薬あるいは TXA₂ 合成酵素阻害薬によって抑制される。²³⁾ しかし、前者の場合は、AA が高濃度でも凝集を抑制するのに対し、後者では、TXA₂ 産生を完全に抑制しても、高濃度の AA による凝集を完全に抑制できず、閾値濃度の AA 凝集に対して、より強い抑制作用を示すとされる。²⁴⁾ その説明として TXA₂ 合成酵素を選択的に阻害すると、過剰に生成した PGH₂ が凝集反応に加担するためと考えられている。²⁴⁾ そこで、我々は高濃度 AA に加えて、閾値濃度の AA 凝集に対する作用を併せて検討した。その結果、TXA₂ 合成酵素阻害薬オザグレルは高濃度 AA 凝集よりも閾値濃度 AA 凝集に対し約 200 倍強い抑制作用を示した。一方 CO 阻害薬アスピリンでは、その比は 5 倍程度と小さかった。F-0401 もオザグレルと同様閾値濃度 AA 凝集に対し強い抑制作用 (IC₅₀ 値: 4.3×10^{-6} M) を示したことから、TXA₂ 合成酵素阻害作用 (IC₅₀ 値: 2.5×10^{-7} M)¹⁸⁾ により、AA 凝集抑制作用を発現していることが示唆された。また、TXA₂ 受容体にも Ca²⁺ 流入機構との関連が示唆されており、²⁵⁾ Ca²⁺ 拮抗薬の中には、TXA₂ 受容体拮抗作用を有するものが報告されているが、²⁶⁾ F-0401 は TXA₂ の安定なアナログである U46619 誘発の血小板凝集に影響を及ぼさず (未発表データ)、TXA₂ 受容体拮抗作用を有さないことを確認している。

(3) ADP 凝集に対する作用 ADP は、ヒト血小板では adenylate cyclase 阻害による一次凝集と TXA₂ 産生を介した二次凝集を引き起こすが、²⁷⁾ ウサギ血小板では一次凝集のみを惹起し、その凝集は phosphodiesterase (PDE) 阻害薬で著明に抑制されることが知られている。²⁸⁾ 今回の我々の成績でも、PDE 阻害薬パパベリンにのみ ADP 凝集抑制作用が認められ、アスピリンやオザグレルには明らかな抑制が認められなかった。F-0401 は 10^{-5} M で弱い cAMP 特異性 PDE 阻害作用を発現することが確認されているが、¹⁸⁾ 今回 ADP 凝集を抑制しなかったことから、F-0401 の血小板凝集作用には、PDE 阻害作用の関与はないものと思われる。

(4) コラーゲン凝集に対する作用 コラーゲンは血小板上の受容体に作用して、C キナーゼ系及び、Ca²⁺ 系を介して細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させ、それが TXA₂ 産生を促し、血小板凝集を惹起すると言われている。²⁹⁾ このコラーゲン凝集に対し、F-0401 はアスピリン及びオザグレルと同様に、高濃度 AA 凝集に対する作用と同等の効力で抑制作用を示した。また、他の Ca²⁺ 拮抗薬には著明な作用は見られなかったことから、F-0401 のコラーゲン凝集に対する抑制は、TXA₂ 合成酵素阻害作用による間接的なものと考えられる。

(5) Ca²⁺ 拮抗作用との関連 Ca²⁺ 拮抗薬の抗血小板作用の作用機序として、血小板には電位依存性の Ca²⁺ チャネルの存在が認められないことから、³⁰⁾ Ca²⁺ 拮抗作用以外の幾つかの可能性が挙げられているが、¹¹⁻¹⁷⁾ いずれもその抗血小板作用は、Ca²⁺ 拮抗作用に比べて極めて弱いとされる。我々の成績でも、ニカルジピンの PAF 凝集抑制作用の効力は、ウサギ大動脈標本における Ca²⁺ 拮抗作用²¹⁾ の約 1/10000 であった。それに対し、F-0401 の血小板凝集抑制作用は Ca²⁺ 拮抗作用の約 1/10 用量で発揮されることから、F-0401 は既存の Ca²⁺ 拮抗薬とは異なり、PAF 結合阻害及び TXA₂ 合成酵素阻害作用に起因する血小板凝集抑制作用が著明であることが示唆された。

なお、血小板は種により反応性が異なることが知られているが、³¹⁾ F-0401 のこの作用はヒト血小板でも再現されることを確認している (未発表データ)。

2. Ex Vivo 血小板凝集抑制作用

In vitro では血小板に著明な作用を示さない Ca²⁺ 拮抗薬でも、in vivo では血小板機能亢進を

伴った病態で、血小板凝集を抑制したと報告されている。^{14,17)} 血管拡張薬には、血圧を下げることで PGI_2 などの血小板凝集抑制因子を産生する作用があることから、³²⁾ Ca^{2+} 拮抗薬の作用も降圧作用の間接的影響と考えられている。¹⁷⁾ そこで、今回我々は、降圧作用を発現しない最大用量をウサギに経口投与し、*ex vivo* における F-0401 の血小板凝集抑制作用をニカルジピンと比較検討した。F-0401 は *in vitro* の成績を反映して、*ex vivo* においても $\text{PAF} > \text{閾値濃度 AA} > \text{高濃度 AA}$ 凝集の順に血小板凝集を有意に抑制した。また、F-0401 は有意ではないがコラーゲン及び ADP 凝集に対しても抑制傾向を示した。対照薬ではアスピリンとオザグレルに閾値濃度 AA、高濃度 AA 凝集及びコラーゲン凝集に対する抑制作用が認められた。なお、*in vitro* と *ex vivo* では採血方法が異なり、前者が頸動脈カニューレを装着しての全採血であるのに対し、後者は耳動脈に直接注射針を刺しての採血である。注射針を用いての採血は、採血した血液中の TXA_2 量が高値になることが報告されているが、³³⁾ 今回、両者の血小板数に差はなく、*ex vivo* でも血小板数が減少していないことを確認している。したがって、*in vitro* と *ex vivo* での AA 閾値濃度の違いは、薬効の評価に影響を与えるものではないと判断した。

一方、ニカルジピンの PAF 凝集抑制作用は、*ex vivo* では再現されなかった。また、CV-3988 の経口投与が無効であることは、予備試験段階で確認している。これらのことから、F-0401 は経口投与でも、降圧作用による間接的な作用ではなく、直接血小板に働いて凝集抑制を起こしていることが示唆された。本実験条件における F-0401 の血小板凝集抑制作用は、血小板凝集を完全に抑えるアスピリン程強力ではないが、*in vivo* で PAF 拮抗作用と TXA_2 合成酵素阻害作用を同時に発現したことを示唆している。

結 論

以上のことから、F-0401 は *in vitro* 及び *ex vivo* ウサギ血小板において PAF 結合阻害作用と TXA_2 合成酵素阻害作用に起因する血小板凝集抑制作用を有することが確認された。

謝辞 稿を終えるにあたり、本研究に協力して頂いた、千木良仁美氏、日浦京子氏に深謝致します。

引用文献及び注

- 1) 第2報：加瀬則子，山浦哲明，大西治夫，日薬理，**102**, 131 (1993).
- 2) 本論文の一部は第64回日本薬理学会総会（1991年3月神戸）にて発表した。
- 3) M. Hosono, K. Watanabe, Y. Hayashi, H. Ohnishi, *Jpn. J. Pharmacol.*, **55** (supp.), 67p (1991).
- 4) 松田 保，神経内科，**19**, 435 (1983).
- 5) The SALT Collaborative group, *Lancet*, **338**, 1345 (1991).
- 6) F. E. Preston, S. Whipps, C. A. Jackson, A. J. French, P. J. Wyld, C. J. Stoddard, *N. Engl. J. Med.*, **304**, 76 (1981).
- 7) 佐野圭司，半田 肇，鈴木重晴，浅野孝雄，田村 晃，米川泰弘，小野博久，橘 直矢，花岡一雄，医学のあゆみ，**138**, 455 (1986).
- 8) B. Spinnewyn, N. Blavet, F. Clostre, N. Bazan, P. Braquet, *Prostaglandins*, **34**, 337 (1987).
- 9) K. U. Frerichs, P. J. Lindsberg, J. M. Hallenbeck, G. Z. Feuerstein, *J. Neurosurg.*, **73**, 223 (1990).

- 10) K. U. Frerichs, G. Z. Feuerstein, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, **2**, 148 (1990).
- 11) Y. Ikeda, M. Kikuchi, K. Toyama, K. Watanabe, Y. Ando, *Thrombos. Haemostas.*, **45**, 158 (1981).
- 12) J. Mehta, P. Mehta, N. Ostrowski, F. Crews, *Thromb. Res.*, **30**, 469 (1983).
- 13) A. Shinjo, Y. Sasaki, M. Inamasu, T. Morita, *Thromb. Res.*, **13**, 941 (1978).
- 14) 川島祐彦, 久保田功, 八巻通安, 立木 楷, 安井昭二, 大沼沖雄, 宮沢光瑞, 基礎と臨床, **20**, 305 (1986).
- 15) H. Al-Mondhiry, J. O. Ballard, V. McGarvey, *Thromb. Res.*, **31**, 415 (1983).
- 16) J. E. Merriit, W. P. Armstrong, C. D. Benham, T. J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B. K. Leigh, S. A. McCarthy, K. E. Moores, T. J. Rink, *Biochem. J.*, **271**, 515 (1990).
- 17) T. Hiroki, T. Inoue, T. Yoshida, K. Arakawa, *Arzneim.-Forsch.*, **32**, 1572 (1982).
- 18) 加瀬則子, 高崎和彦, 東出康志, 田村典彦, 李 文昇, 山浦哲明, 大西治夫, 日薬理, **101**, 363 (1993).
- 19) G. V. R. Born, M. J. Cross, *J. Physiol (London)*, **168**, 178 (1963).
- 20) F. H. Valone, B. Johnson, *J. Immunol.*, **134**, 1120 (1985).
- 21) T. Yamaura, N. Kase, H. Kita, T. Uematsu, *Arzneim.-Forsch.*, **36**, 29 (1986).
- 22) A. Floch, I. Cavero, *Br. J. Pharmacol.*, **100**, 163 (1990).
- 23) M. J. Silver, J. B. Smith, C. Ingerman, J. J. Kocsis, *Prostaglandins*, **4**, 863 (1973).
- 24) 内藤 惇, 平工誠治, 久我哲郎, 応用薬理, **27**, 267 (1984).
- 25) Y. Kawahara, J. Yamanishi, Y. Furuta, K. Kaibuchi, Y. Takai, H. Fukuzaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 663 (1983).
- 26) G. J. Johnson, L. A. Leis, G. S. Francis, *Circulation*, **73**, 847 (1986).
- 27) J. B. Smith, C. Ingerman, J. J. Kocsis, M. J. Silver, *J. Clin. Invest.*, **52**, 965 (1973).
- 28) D. C. B. Mills, J. B. Smith, *Biochem. J.*, **121**, 185 (1971).
- 29) L. Grodzińska, E. Marcinkiewicz, *Pharmacol. Res. Commun.*, **11**, 133 (1979).
- 30) V. M. Doyle, U. T. Rüegg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 161 (1985).
- 31) 日高弘義 (編), “血小板の分子薬理—基礎と臨床,” 初版, 講談社サイエンティフィック編, 講談社, 東京, 1983, pp. 74—94.
- 32) 前田義春, 金山春洋, 長村吉郎, 林 謙宏, 岡島 泰, 川村恒博, 木谷輝夫, 和多田光朗, 中川雅夫, 伊地知浜夫, 血液と血管, **14**, 65 (1983).
- 33) P. Westlund, E. Granström, M. Kumlin, A. Nordenström, *Prostaglandins*, **31**, 929 (1986).