

原 著

抗血小板薬シロスタゾールのアラキドン酸ナトリウム 惹起血小板凝集による薬効評価系の構築

依 田 茂 美¹⁾, 佐 藤 金 夫¹⁾, 尾 崎 由 基 男¹⁾

¹⁾ 山梨大学医学部臨床検査医学講座

要 旨: 【背景】シロスタゾールは cyclic AMP (cAMP) 分解酵素であるホスホジエステラーゼ阻害作用を持つ抗血小板剤であり, その血小板機能抑制作用を簡便かつ明確にモニタリングする方法を確立した。

【方法】1) シロスタゾールで血小板を前処理したのち, アラキドン酸ナトリウム (AA-Na), トロポンキサン A₂ アナログである U46619 などによって血小板を刺激して血小板凝集能を測定した。2) シロスタゾールの単回投与前後で採血し, AA-Na, U46619 による血小板凝集能を測定した。3) シロスタゾール存在下に AA-Na 刺激して血小板内 cAMP を測定した。4) シロスタゾール存在下で U46619 単独, U46619 + PGD₂ で血小板を刺激した。

【結果】1) シロスタゾールは種々の刺激による血小板凝集を抑制したが, AA-Na による血小板凝集を最も低濃度で抑制した。2) シロスタゾール服用後に 8 例中 7 例で AA-Na 刺激による血小板凝集が抑制されたが, U46619 刺激では 6 例中 1 例で抑制が見られたのみだった。3) AA-Na 刺激の有無にかかわらず, 血小板内 cAMP の増加はシロスタゾール濃度により依存していた。4) PGD₂ の存在によりシロスタゾールの血小板機能抑制作用が増強された。

【考察】AA-Na 刺激による血小板凝集能がシロスタゾールのモニタリングに適しており, 添加した AA-Na の代謝産物が何らかの関与をしていると考えられた。

キーワード シロスタゾール, アラキドン酸ナトリウム, 血小板凝集能, プロスタグランジン D₂, 抗血小板剤モニタリング

序 言

血小板は, 血管損傷部位などで凝集反応を起こすのみでなく, 活性化された血小板膜上に procoagulant activity を発現させ, 凝固系の促進にも関与する。このように血小板は生理的な止血過程に大きな役割を果たすが, また病的な血栓形成に重要な役割を果たしており, 多くの血栓形成性疾患において血小板機能亢進がその易血栓性の機序の一部と考えられている。現在,

心筋梗塞, 脳血管障害, 糖尿病などの血栓形成性疾患が治療上大きなチャレンジとなっているが, 入院加療の場合を除きこれらの疾患の一次予防, 二次予防に使われる薬剤のほとんどが抗血小板剤であることは, 血小板機能の重要性を証明するものといえる。

シロスタゾール (cilostazol; 商品名, プレタール Pletaal) は cyclic AMP (cAMP) 分解酵素であるホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase; PDE) 阻害作用を持つ抗血小板剤である^{1,2)}。下肢慢性動脈閉塞症の症状の改善を適応に 1988 年認可され, 2002 年には「脳梗塞 (心原性脳塞栓症を除く) 発症後の再発抑制」

〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110

受付: 2008 年 3 月 13 日

受理: 2008 年 4 月 23 日

の効能追加が認可された。血小板等の血液細胞では細胞内 cAMP が増加すると、細胞機能が抑制されることは広く知られている。cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素を活性化させることが cAMP による細胞機能抑制に関連することが明らかにされているが、この段階以降の機構はまだ良く解明されていない。PDE は cAMP を分解する酵素であり、PDE には PDE1 から PDE11 までのアイソザイムが知られているが、血小板には PDE3A, PDE5 が主として存在する。シロスタゾールは PDE3A を強力に阻害することにより、細胞内 cAMP 濃度を増加させ、血小板機能を抑制する。血小板のみならず、血管平滑筋細胞に存在する PDE3A, 脂肪細胞に存在する PDE3B に対してもシロスタゾールは高い親和性を示すため、血管においては拡張作用、また血管平滑筋に対しては増殖抑制作用等血小板抑制作用以外に多様な作用を示すことが知られている³⁾。

また抗血小板剤の重要な副作用としては出血があり、その場合血小板機能抑制作用が可逆的か非可逆的であるのかが問題になる。抗血小板剤の代表的なものであるアスピリンやチエノピリジン (チクロピジン, クロピドグレル) などは非可逆的に血小板機能を抑制するために、出血が予想される手術などの場合数日以上以上の休薬が必要であり、また出血事故の場合対応が困難な場合もあり得る。一方、シロスタゾールには出血の副作用が少ない点の特徴とも言え、出血時間の延長は起きない⁴⁾。また臨床でも (脳塞栓症患者) 抗血小板作用が血中濃度依存的に可逆的であることが認められている。

血栓性疾患の治療のために抗血小板剤を投与する際、その抗血小板剤が実際に投与された患者において血小板機能を抑制しているかどうかの評価、すなわち抗血小板薬のモニタリングは、病態の把握、抗血小板剤の有効性、また薬剤を患者が本当に服用しているのかどうか (コンプライアンス) の判定に重要である。特に最近アスピリンの無効例 (アスピリンレジスタンス) の存在が注目されており、抗血小板剤の使用時

のモニタリングの必要性が認識されつつある⁵⁾。一方、上述のように臨床的に有効性が広く知られているシロスタゾールは他の抗血小板剤に比較し、*ex vivo*での血小板機能抑制作用を明確に評価することが困難な薬剤であり、これまでモニタリングがされていなかった。この理由として、シロスタゾールは PDE3 阻害作用により抗血小板作用を発揮する薬剤であるが、体外に取り出した血小板細胞内 cAMP 濃度は低く、PDE3 を阻害しても元々非常に低いレベルの cAMP が余り増加しないためと考えられている。血管内皮の共存下で血小板凝集能を評価すると、血管内皮細胞から産生された PGI₂ の作用で、血小板内 cAMP が軽度増加するため、シロスタゾールによる PDE3 阻害効果が増強することが予測され、実際に臍帯静脈内皮細胞存在下の血小板凝集能測定で、生理的濃度のシロスタゾールが血小板凝集能を強力に抑制することが示されている⁶⁾。しかしながら、一般臨床の場で血管内皮細胞を用いた血小板凝集能測定は不可能であり、これまでシロスタゾールのモニタリングはまったく行われていなかった。

これまでの予備実験により著者らはアラキドン酸ナトリウム刺激血小板凝集能を用いると、シロスタゾールの抑制効果が *ex vivo*で評価できるのではないかと仮説に至った。本研究はシロスタゾールのモニタリングをアラキドン酸ナトリウム惹起血小板凝集能で測定する試みを評価し、またその機序について考察を加えるものである。

方 法

多血小板血漿の作成.

翼状針を用いて肘静脈より採血し、血液9容に3.8%クエン酸ナトリウム1容を混合して凝固を防いだ。この検体を1,200 rpmで10分間遠心して赤血球、白血球を除き、その上清として多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) を作成した。PRPを更に3,000 rpmで10分間遠心して血小板を除き、その上清として乏血小板

血漿 (platelet-poor plasma; PPP) を作成した。

洗浄血小板の作成.

PRPに輸血用 acid citrate dextrose 液と prostaglandin E1 をそれぞれ 15%, 1 μM になるよう加え, 試験管中の 50% BSA (Bovine serum albumin) の上に静かに重層した。3,000 rpm で 10 分間遠心して血小板を沈降させた後, 上層の血漿を捨てて, 血小板を HEPES バッファーにより再浮遊させた。Sephacrose CL-2B を充填したゲル濾過カラムに血小板浮遊液を通過させ, 分子量篩の効果を利用して血漿成分と細胞成分 (血小板) を分離した。この血小板を用い, 血小板数が 20 万/ μL , BSA 濃度が 0.4%, フィブリノゲン濃度が 0.5 mg/mL となるように調整して洗浄血小板浮遊液とした。

血小板凝集能の測定.

血小板凝集能は PA-200 血小板凝集計 (興和株式会社) を用い, PPP を透過率 100%, PRP を透過率 0% として設定し, 血小板凝集を評価した。PRP に各種濃度のシロスタゾール, プロスタグランジン I_2 (PGI_2), ペラプロストナトリウム (BPS), ミルリノン を 37°C で 3 分間孵置したのち, 血小板活性化剤として 0.15 ~ 1.2 mM アラキドン酸ナトリウム (AA-Na), 0.16 ~ 5 μM U46619 (トロンボキサン A_2 アナログ), 1 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ コラーゲン, 1 ~ 30 μM エピネフリン, 2 ~ 5 μM ADP (adenosine 5'-diphosphate) を PRP に加え, 血小板凝集能を 5 分間測定した。血小板の反応性は個人差があることから, 血小板活性化剤は二次凝集が起こる濃度を使用した。

ex vivo の実験では, インフォームドコンセントの得られた成人男性 8 名を対象としてプレタール 1 錠 (100 mg) の服用によりおこなった (本研究は山梨大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた)。服用前 30 分および服用 2 時間後に肘静脈より真空採血管を使用して採血し, クエン酸ナトリウム加血液より PRP, PPP, プレーン管より血清 (服用後のみ) を作成した。

0.15 ~ 1.2 mM アラキドン酸ナトリウム (AA-Na), 0.16 ~ 5 μM U46619 による血小板凝集能を測定した。U46619 はアラキドン酸が代謝されて生成する強い血小板活性化作用を持つトロンボキサン A_2 の安定化アナログであり, シロスタゾールがアラキドン酸の代謝に影響を与えるのか, あるいはトロンボキサン A_2 による細胞内活性化経路に影響を与えるのかを評価するために対照として用いた。血清は -80°C に凍結保存して, 株式会社ビー・エム・エルに依頼し, 血中シロスタゾール濃度を測定した。

細胞内サイクリック AMP (cAMP) の測定.

血漿には高濃度の cAMP が存在するため, cAMP 測定には洗浄血小板を用いた。洗浄血小板に 0.1 ~ 10 μM のシロスタゾールを 37°C で 3 分間孵置したのち, AA-Na 存在下 5 分間血小板凝集能を測定した。PRP の検体と異なり, 洗浄血小板では高濃度 AA-Na では細胞溶解が起きるため, AA-Na は 30 μM を用いた。対象として, AA-Na 非添加の検体も同様に作成した。測定終了後, 100°C で 5 分間加熱して血小板内の酵素を失活させ, -80°C で保存した。保存試料は Cyclic AMP Immunoassay (R&D Systems) kit を使用して⁷⁾, 添付プロトコルに従って濃度を測定した。

結 果

各種アゴニストに対する阻害作用の評価 (*in vitro*).

シロスタゾールによる血小板凝集の 50% 抑制濃度 (ID_{50}) は, AA-Na で $1.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$, U46619 で $14.3 \pm 3.3 \mu\text{M}$, コラーゲンで $7.6 \pm 8.6 \mu\text{M}$, エピネフリンで $5.6 \pm 2.0 \mu\text{M}$, ADP で $20.5 \pm 6.1 \mu\text{M}$ であった (図 1)。シロスタゾールの臨床用量は, 成人には 100 mg/日 2 回経口投与であるが, 100 mg 投与後の血中濃度は 2 ~ 3 時間後で 3 μM 程度であると報告されている⁸⁾。 *in vivo* で到達しうる濃度で血小板凝集能を抑制したのは, アゴニストとして AA-Na を

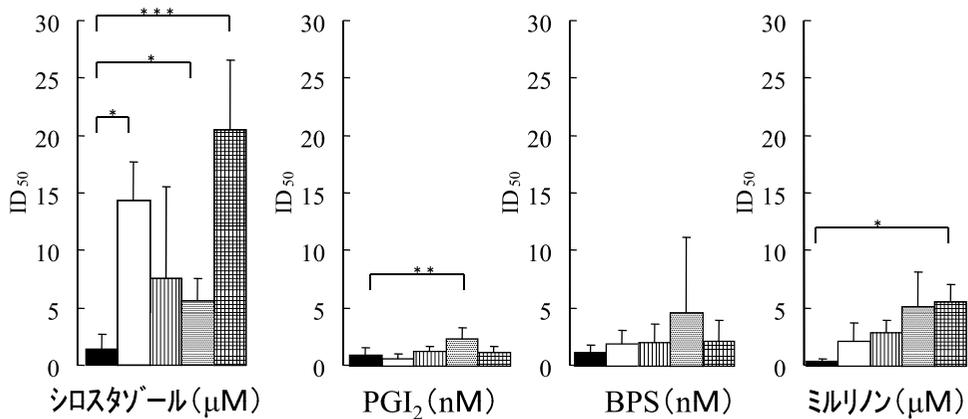


図1. 各種アゴニストに対する阻害作用の評価 (ID₅₀).

PRPにシロスタゾール, PGI₂, ベラプロストナトリウム (BPS), ミルリノンを加え, 37°C3分間孵置したのち, PA-200を用いて血小板凝集能を測定した. アゴニストとしてアラキドン酸ナトリウム (AA-Na), U46619, コラーゲン, エピネフリン, ADPを用いて, それぞれの反応を50%抑制するシロスタゾール濃度を算出した (n=3~12).

黒塗り: AA-Na, 白抜き: U46619, 縦棒: コラーゲン, 点: エピネフリン, 格子: ADP.

* p<0.05, ** p<0.02, *** p<0.0005

使用した場合のみであり, AA-Na惹起血小板凝集がシロスタゾールの薬効評価に使用しようと考えられた。

PGI₂, ベラプロストナトリウム, ミルリノンによる阻害作用の評価.

シロスタゾールはPDE3阻害により細胞内cAMP濃度を増加させると考えられている。よってシロスタゾールがAA-Naによる血小板凝集を強く抑制する機序として, AA-Naによる血小板活性化機構が細胞内cAMP増加に特に感受性が高い可能性があり, この仮説を評価する実験を次に行った。

PGI₂受容体を介した細胞内cAMP増加により血小板機能を抑制するPGI₂およびその安定化アナログとして臨床的に使用されているベラプロストナトリウム (BPS) の血小板凝集に対する影響を評価した (図1)。PGI₂による血小板凝集のID₅₀はAA-Naで1.0±0.7 nM, U46619で0.6±0.5 nM, コラーゲンで1.3±0.5 nM, エピネフリンで2.4±1.0 nM, ADPで1.2±0.5 nMであった。BPSによる血小板凝集能ID₅₀はAA-Naで1.2±0.7 nM, U46619で

2.0±1.2 nM, コラーゲンで2.1±1.6 nM, エピネフリンで4.6±6.6 nM, ADPで2.2±1.8 nMであった。PGI₂, BPSによるID₅₀はAA-Naと他のアゴニストとで同レベルであり, AA-Naだけが強く抑制されているとはいえなかった。

PDE3阻害剤のミルリノン⁹⁾による血小板凝集のID₅₀はAA-Naで0.4±0.2 μM, U46619で2.1±1.6 μM, コラーゲンで2.9±1.1 μM, エピネフリンで5.2±3.0 μM, ADPで5.6±1.5 μMであり (図1), シロスタゾールと同様にAA-Naによる血小板凝集が最も低濃度で抑制されていた。

ex vivoでの血小板凝集能の評価.

シロスタゾールの100 mg単回投与前後で採血し, 0.15~1.2 mM AA-Naおよび0.16~2.5 μM U46619による血小板凝集能を測定した (図2)。シロスタゾール服用後に8例中7例において0.15~0.6 mM AA-Na刺激による血小板凝集能がほぼ完全に抑制された。このうち, シロスタゾールの血中濃度を測定しえた5例では, 0.9~3.4 μM (1.8±1.0 μM)であった。抑制の見られなかった1例の血中濃度は

1.6 μM であった。同時に実施したU46619による血小板凝集能は8例中6例で評価できたが、5例ではどのU46619濃度でもシロスタゾール服用後に抑制が認められなかった。1例のみに

おいて0.63 ~ 1.25 μM U46619刺激においてシロスタゾール服用後に抑制が見られた。この1例は血中濃度の測定をおこなうことができなかった。

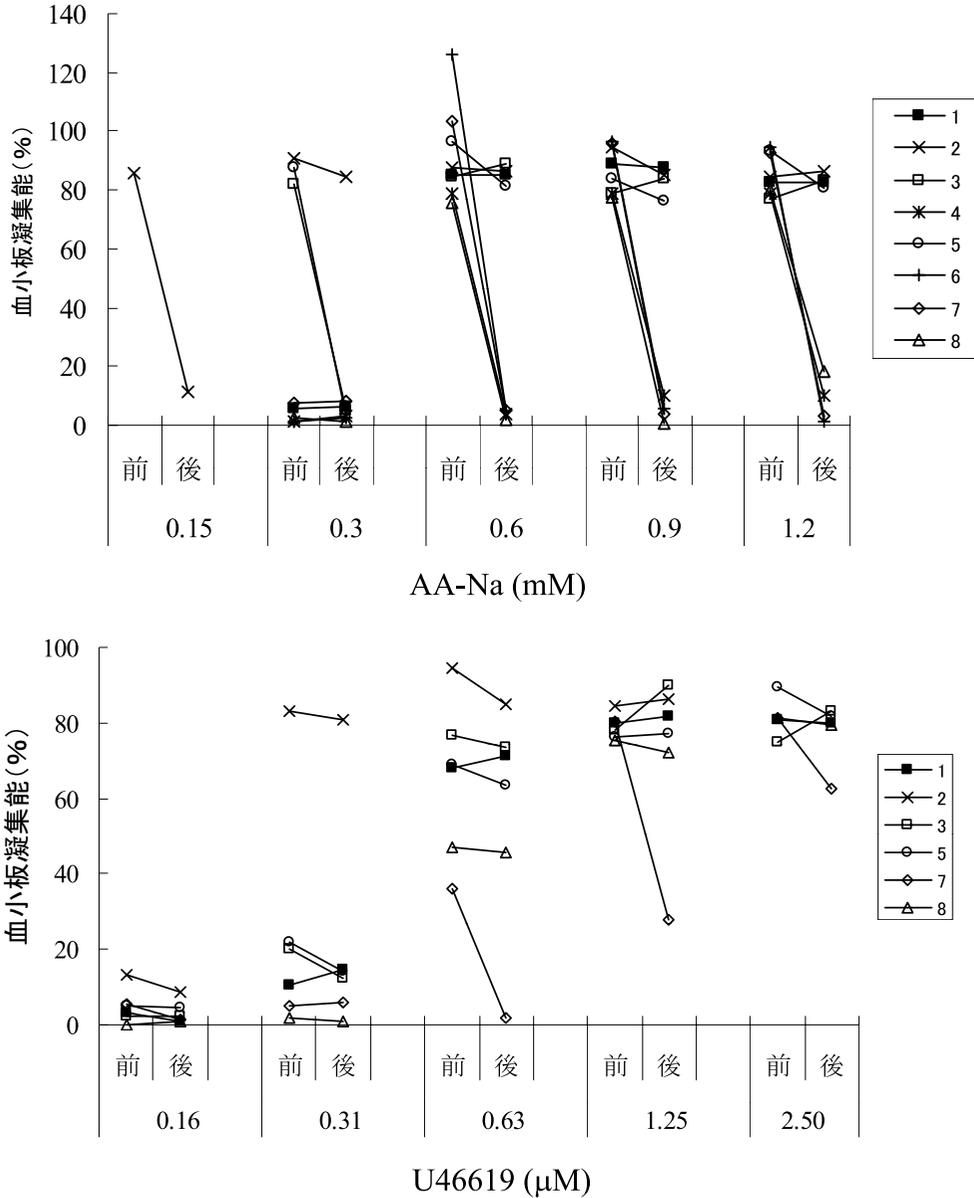


図2. *ex vivo*での血小板凝集能の評価。

プレタール 100 mg を服用した前後で静脈血を採取後、作成した PRP に種々の濃度のアラキドン酸ナトリウム (A) あるいは U46619 (B) を加え、血小板凝集能を測定した (A : n = 8, B : n = 6)。

シロスタゾール存在下での血小板内サイクリック AMP (cAMP) の評価.

未刺激時の血小板内 cAMP は 10^8 個の血小板あたり 4.5 ± 2.1 pmol であった。ここにシロスタゾールを 0.1, 1, $10 \mu\text{M}$ と 37°C で 3 分間前処理すると, 血小板内 cAMP は 4.6 ± 1.7 , 4.7 ± 2.5 , 6.9 ± 3.4 pmol/ 10^8 血小板と濃度依存的に増加した。また, シロスタゾール存在下に AA-Na で血小板を活性化させて細胞内 cAMP を測定したところ, シロスタゾールの濃度が増加するに従って 2.8 ± 0.8 , 2.6 ± 0.4 , 5.0 ± 2.5 , 8.8 ± 3.5 pmol/ 10^8 血小板 (それぞれシロスタゾール濃度は 0, 0.1, 1, $10 \mu\text{M}$) と増加していた (図 3)。しかし, 同一濃度のシロスタゾールにおいては AA-Na の有無にかかわらず血小板内の cAMP 濃度は同程度であり (図 3: 黒塗り vs 白抜き), AA-Na の添加によって更なる

cAMP の増加は認められなかった。

U46619 刺激に対するシロスタゾール抑制作用への prostaglandin D₂ (PGD₂) の影響.

AA-Na 刺激の場合のみシロスタゾールが強い抑制作用を示し, アラキドン酸の代謝産物のアナログである U-46619 刺激血小板凝集にはあまり抑制作用がないことから, アラキドン酸が何らかの代謝経路で細胞内 cAMP に影響を与えるとの仮定に達した。その候補としてアラキドン酸が非酵素的に代謝されて生成する PGD₂ を考え, U-46619 刺激に対するシロスタゾールの抑制への影響を評価した。PGD₂ $10 \mu\text{M}$ 存在下ではシロスタゾール 3 ~ $10 \mu\text{M}$ においてシロスタゾールの抑制効果が増強された (図 4)。

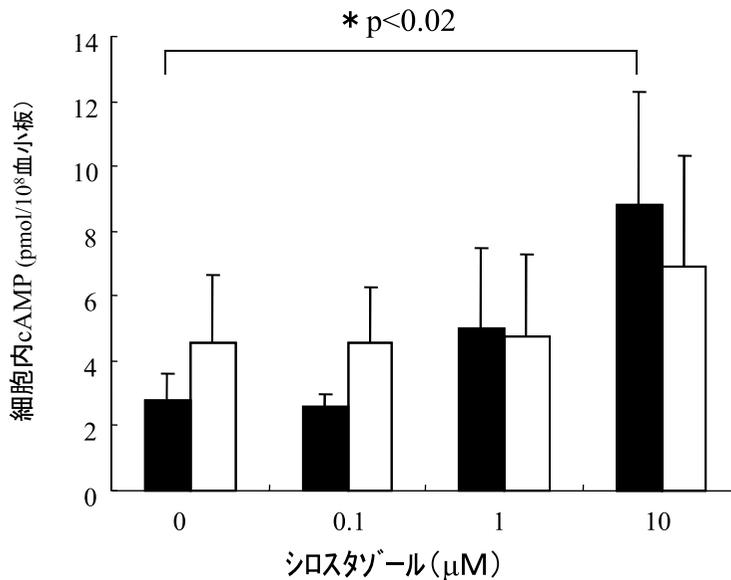


図 3. シロスタゾール存在下での血小板内サイクリック AMP の評価。洗浄血小板にシロスタゾールを加え, 3 分間孵置したのち, PA-200 を用いて血小板凝集能を測定した。アゴニストとしてアラキドン酸ナトリウム (AA-Na) を用いて血小板を刺激し, 5 分後に 100°C で 5 分間加熱して酵素を失活させた。サイクリック AMP 測定キットを使用して, これらの検体の細胞内サイクリック AMP 濃度を測定した。対照として AA-Na で刺激しない洗浄血小板を用いた ($n = 3 \sim 4$)。黒塗り: AA-Na 刺激あり, 白抜き: AA-Na 刺激なし。

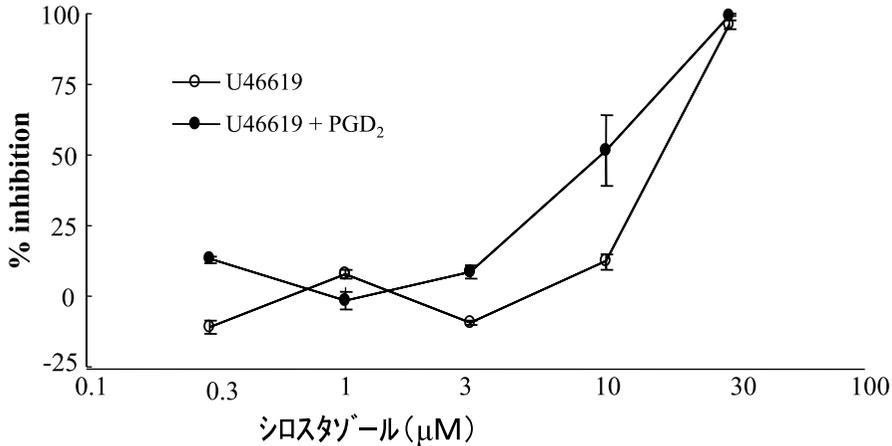


図4. U46619 刺激に対するシロスタゾール抑制作用への prostaglandin D₂ (PGD₂) の影響
PRP に種々の濃度のシロスタゾールと PGD₂ 10 μM を 37°C 3 分間孵置したのち、PA-200 を用いて血小板凝集能を測定した。アゴニストとして U46619 5 μM を用いた (n = 5)。
黒塗り：U46619 のみ、白抜き：U46619 + PGD₂。

考 察

シロスタゾールの血小板機能抑制作用については、これまで多数の報告があり、複数の検討に於いて種々の血小板機能活性化剤による血小板凝集をシロスタゾールが抑制するとされている^{10,11)}。一方シロスタゾールによる血小板機能抑制作用は *in vitro* においてもまた *ex vivo* でも弱く、評価するのが困難であるとの報告もあった。この説明として、シロスタゾールの作用機序は PDE3 阻害作用であるが、体外に取り出した血小板細胞内 cAMP 濃度は低く、PDE3 を阻害しても元々非常に低いレベルの cAMP が余り増加しないためと推定されていた。

このようにやや矛盾のある報告があることから、まず我々は *in vitro* でシロスタゾールの作用を評価して、これまで報告と比較することにした。シロスタゾールは ADP、トロンボキサン A₂ 類似化合物である U46619 による血小板凝集に対しては ID₅₀ が 14 ~ 20 μM であったが、AA-Na 刺激に対しては 1.4 μM と強く抑制作用を示した。コラーゲン、エピネフリン刺激では ID₅₀ は 5 ~ 7 μM とその中間値を示したが、これらのアゴニストの血小板活性化経路にアラキ

ドン酸が強く関連するためかもしれない。シロスタゾールは通常、100 mg を 1 日 2 回投与されるが、100 mg の服用で血中濃度は 3 μM 程度まで増加することから⁸⁾、AA-Na による ID₅₀ 値は血中到達濃度より少ない濃度であった。このことより、今回使用したアゴニストの中では AA-Na がシロスタゾールの薬効評価に最も適していると考えられた。シロスタゾールによる血小板機能抑制作用はアラキドン酸刺激、またはアラキドン酸代謝に関連するどこかの因子にあり、AA-Na 刺激を用いることによりシロスタゾールの薬効をモニタリングできるのではないかと考えた。

これまでも、アラキドン酸刺激による血小板凝集能に対してシロスタゾールの抑制作用を見た報告もあった¹¹⁾。しかし、以前のアラキドン酸刺激に用いられたアラキドン酸製剤は油性のものであり、DMSO またはエタノールを溶剤として用いるものであった。これを用いて血小板凝集を測定すると、凝集能の個人差が大きく、また全く血小板の反応が認められない場合もあり、抗血小板剤の評価には不適当とされていた。最近になり水溶性のアラキドン酸ナトリウム塩製剤 (AA-Na) が開発され、我々が血

血小板凝集能測定に用いたところ、再現性良く血小板凝集能が判定できることを見いだした。よって、シロスタゾールの薬効評価にAA-Naを用いる血小板凝集能が適当である可能性は、我々が初めて提唱するものといえる。

これまで述べた結果は *in vitro* のものであり、実際にシロスタゾールを服用後AA-Naによる血小板凝集能が抑制されてこそ、この方法がシロスタゾールのモニタリングに適していると主張できる。そこでまずシロスタゾール 100 mg 単回投与後の健常人におけるAA-Na、またU-46619による血小板凝集、および血中シロスタゾール濃度を評価した(図2A)。シロスタゾール服用後2時間で、8例中7例において、0.15~0.6 mM AA-Na 刺激による血小板凝集能がほぼ完全に抑制された。このうち、5例に於いて血中シロスタゾール濃度を測定したところ、0.9~3.4 μ Mであった。抑制の見られなかった1例の血中濃度は1.6 μ Mであり、この濃度より低い場合でもAA-Naによる血小板凝集が抑制されていたことから、抑制が認められなかった原因はシロスタゾールの血中濃度以外にあると考えられ、これからの検討課題と思われる。一方、U46619による血小板凝集能は5例において服用前後で血小板凝集能に差は認められず、1例に於いてのみ抑制が見られた(図2B)。以上の結果より、*ex vivo* においてもAA-Naによる血小板凝集能がシロスタゾールの薬効評価に適していると考えられた。

U46619はアラキドン酸が代謝されて生成する強い血小板活性化作用を持つトロンボキサン A_2 の安定化アナログである。血小板浮遊液に加えたAA-Naが血小板凝集を起こすためには、まずアラキドン酸(AA-Na)が血小板により代謝され、トロンボキサン A_2 が生成されることが必要であり、シロスタゾールがトロンボキサン A_2 による細胞内活性化経路に影響を与えるのならば、U-46619による血小板凝集もAA-Naと同様強く抑制されることが期待される。しかし、U-46619刺激の場合にはシロスタゾールによる血小板凝集能抑制が弱いことから、シロス

タゾールは血小板トロンボキサン A_2 受容体以下の信号伝達経路に強く働くのではなく、トロンボキサン A_2 以外の何らかのアラキドン酸代謝産物の影響で、シロスタゾールによるAA-Na刺激血小板凝集の抑制が増強することが示唆される。

つぎに我々はシロスタゾールのモニタリングにAA-Na惹起血小板凝集能測定が適している原因の探求を行った。シロスタゾールは、cAMPを分解する酵素であるPDE3阻害剤であり、その効果は細胞内cAMP増加を介すると思われる。そこで、細胞内cAMPを増加するprostaglandin I_2 (PGI_2)、及び PGI_2 受容体に作用する抗血小板剤ベラプロストナトリウム(BPS)の2剤を用い、種々の血小板活性化物質による血小板凝集能抑制を評価した(図1)。その結果2剤ともADP、コラーゲン、エピネフリン、AA-Naによる血小板凝集を同様のID₅₀で抑制し、シロスタゾールのようなAA-Naによる血小板凝集に対してのみ非常に強く抑制するという傾向を認めなかった。このことより、シロスタゾールのAA-Na惹起血小板凝集能に対する抑制作用が、単なる細胞内cAMP増加のみでは説明が付かないことが示唆される。

つぎにシロスタゾール同様PDE3を阻害するとされるミルリノンを用いて血小板凝集抑制作用を評価したところ⁹⁾、ID₅₀は異なるが、他の刺激剤と比較しAA-Naに対して最も強い抑制作用を示した(図1)。これらの結果より、シロスタゾールとミルリノンはAA-Na刺激血小板凝集に於いて、同様の抑制機序を持つことが示唆される。両者ともPDE3阻害効果を示す物質であるが、 PGI_2 の結果より考えこれらの物質による細胞内cAMP上昇とは直接関連がないことから、シロスタゾールとミルリノンがcAMP分解作用以外のPDE3機能を抑制するのか、または共通してPDE3以外のターゲットを持つことが推測される。

つぎにシロスタゾールがAA-Na刺激の場合にのみ強い抑制作用を示す機序に対して仮説を立て、その検討を行った。上述のようにシロス

タゾールは, *in vitro*, *ex vivo*での血小板機能抑制作用は強くなく, この理由としてPDE3阻害作用があっても元来細胞内cAMPはほとんどないため, cAMPが余り増加しないためと考えられていた。実際, 血管内皮細胞の共存下, または少量のPGI₂を加えると, シロスタゾールの抑制作用が増強される⁶⁾。そこでAA-Na刺激の場合には何らかの機序により細胞内cAMPがわずかに増加し, シロスタゾールによるPDE3阻害作用がより明確になるのではないかと仮説を立てたわけである。この仮説の根拠となる論文はWatanabe等が1982年に発表したものであり, PRP中でアラキドン酸よりprostaglandin D₂ (PGD₂)がアルブミン等により非酵素的に生成されるとの報告である¹²⁾。もし外部より投与したアラキドン酸の一部がPGD₂に変換されるならば, PGD₂が血小板上のPGD₂受容体と結合し, この信号伝達経路の下流に存在するadenylate cyclase活性化により細胞内cAMPを増加させることが推定される。細胞内cAMPがわずかでも増加すれば, シロスタゾールによるPDE3阻害効果が増強され, AA-Naによる血小板凝集が強く抑制されるはずである。

この仮説を証明するために, まず我々はAA-Na存在下, 非存在下に於いてのシロスタゾール投与による血小板内cAMP濃度への影響を測定した。図3のデータのようにBSA存在に浮遊した血小板cAMP濃度はAA-Naの有無にかかわらずシロスタゾールの濃度依存的に増加した。このことは我々の立てた仮説と矛盾するものであった。つぎに我々はPGD₂受容体刺激の作用を検討した。アラキドン酸はトロンボキサンA₂に代謝されるため, トロンボキサンA₂アナログであるU-46619とPGD₂を使用することでAA-Naと同様なシロスタゾールによる血小板反応の抑制が認められれば, AA-NaよりPGD₂が生成した間接証明となる。PGD₂投与によりPGD₂受容体に刺激を加えると, U46619による血小板凝集に対するシロスタゾールの抑制が増強されたことから(図4), 細胞内cAMP

はPGD₂受容体を介して増加し, そのことがシロスタゾールの血小板凝集能抑制を増強していると考えられた。この実験結果は我々の仮説を肯定する結果といえる。以上のようにアラキドン酸の一部がアルブミン等によりPGD₂に変換され, シロスタゾールの抑制作用を増強することを証明する試みは肯定, 否定の相反する結果となった。しかし, 仮説に否定的な結果となったAA-Na存在下でのcAMP濃度を検討した洗浄血小板の系ではBSAを加えてもアラキドン酸から十分量のPGD₂が産生されない可能性があり, 結論を出すためには更なる検討が必要と思われる。

以上のように我々はAA-Na刺激血小板凝集能測定がシロスタゾールの薬効判定に相当であるとのデータを得た。その機序としてはAA-Na存在下シロスタゾールがPDE3を阻害することによりcAMPが増加するだけでは説明ができず, アラキドン酸の代謝経路, および他の経路への阻害作用なども関係しているとも考えられ, これからの検討が必要である。

文 献

- 1) Yasunaga K, Mase K: Antiaggregatory effect of oral cilostazol and recovery of platelet aggregability in patients with cerebrovascular disease. *Arzneimittelforschung*. **35** (7A): 1189-1192, 1985.
- 2) Sudo T, Tachibana K, Toga K, *et al.*: Potent effects of novel anti-platelet aggregatory cilostamide analogues on recombinant cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme activity. *Biochem Pharmacol* **59**: 347-356, 2000.
- 3) Hayashi S, Morishita R, Matsushita H, *et al.*: Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. *Hypertension*. **35**: 237-243, 2000.
- 4) Wilhite DB, Comerota AJ, Schmieider FA, *et al.*: Managing PAD with multiple platelet inhibitors: The effect of combination therapy on bleeding time. *J Vasc Surg* **38**: 710-713, 2003.
- 5) Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA *et al.*: Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Amer J Cardiol* **88**, 230-235, 2001.
- 6) Igawa T, Tani T, Chijiwa T, *et al.* Potentiation of

- anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thromb Res* **57**: 617-623, 1990.
- 7) Kim H, Rhee SH, Kokkotou E, Na X, Savidge T, Moyer MP, Pothoulakis C, LaMont JT. Clostridium difficile toxin A regulates inducible cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis in colonocytes via reactive oxygen species and activation of p38 MAPK. *J Biol Chem*. 2005; **280** (22): 21237-21245.
 - 8) 2000年8月改訂 プレタール錠 100mg 添付文書.
 - 9) Evans DB.: Overview of cardiovascular physiologic and pharmacologic aspects of selective phosphodiesterase peak III inhibitors. *Am J Cardiol*. **63**: 9A-11A: 1989.
 - 10) Okuda Y, Kimura Y, Yamashita K : Cilostazol. *Cardiovascular Drug Reviews* **11**: 451-465, 1993.
 - 11) 豊田英樹, 西川政勝, 日高弘義, 白川茂: シロスタゾール. *現在医療* **25**: 3737-3742, 1981.
 - 12) Watanabe T, Narumiya S, Shimizu T, *et al.*: Characterization of the biosynthetic pathway of prostaglandin D2 in human platelet-rich plasma *J Biol Chem* **257**: 14847-14853, 1982.