

ヒト血小板アラキドン酸代謝からみた
抗血小板薬の作用機序に関する研究

1987年2月

武永 美津子

ヒト血小板アラキドン酸代謝からみた
抗血小板薬の作用機序に関する研究

1987年2月

千葉大学大学院薬学研究科

武永 美津子

目 次

序論	1
第一章 実験方法	9
1-1 ヒト血小板凝集能測定法	9
1-2 ヒト洗浄血小板浮遊液調製法	11
1-3 ヒト洗浄血小板刺激時に産生される アラキドン酸代謝産物の 高速液体クロマトグラフィーを用いての測定法	14
1-4 ヒト洗浄血小板での外因性 [^{14}C]アラキドン酸の 代謝産物の測定法	17
1-5 [^{14}C]アラキドン酸標識血小板液を用いて、 コラーゲン刺激時に遊離される [^{14}C]アラキドン酸及びその代謝産物の測定法	19
第二章 桂皮の主成分、cinnamic aldehyde (CA)の ヒト血小板凝集能及び アラキドン代謝におよぼす作用 (in vitro)	21
2-1 はじめに	21
2-2 多血小板血漿 (PRP)を用いた血小板凝集能に対する cinnamic aldehyde (CA)の作用	21

2-3	cinnamic aldehyde (CA)の洗浄血小板凝集能及び アラキドン酸代謝産物の産生におよぼす作用	24
2-4	cinnamic aldehyde (CA)のヒト洗浄血小板での 外因性 [14 C]アラキドン酸代謝に およぼす作用	28
2-5	[14 C]アラキドン酸標識血小板液を用いて コラーゲン刺激時の [14 C]アラキドン酸の遊離と その代謝におよぼすcinnamic aldehyde (CA)の作用	30
2-6	cinnamic aldehyde (CA)の血小板c-AMP, c-GMP 量 におよぼす作用	33
2-7	考察	35
第三章	栝楼仁の主成分、trichosanic acid (TCA)の ヒト血小板凝集能 及びアラキドン酸代謝におよぼす作用 (in vitro)	37
3-1	はじめに	37
3-2	多血小板血漿 (PRP)を用いた血小板凝集能に対する trichosanic acid (TCA)の作用 ーリノレン酸 (LNA)との比較ー	39
3-3	trichosanic acid (TCA)の洗浄血小板凝集能及び アラキドン酸代謝産物の産生におよぼす作用 ーリノレン酸 (LNA)との比較ー	41

3-4	trichosanic acid (TCA)のヒト洗淨血小板での 外因性 [¹⁴ C]アラキドン酸代謝におよぼす作用 ーリノレン酸 (LNA)との比較ー	46
3-5	考察	48
第四章	魚脂中に多量に含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA)の 血小板凝集能及び血小板アラキドン酸代謝に およぼす作用 (in vitro 及び ex vivo)	51
4-1	はじめに	51
4-2	EPAの血小板 12-リポキシゲナーゼ (12-L0)系 中間代謝産物である 12-hydroperoxyeicosapentaenoic acid (12-HPEPE)の 血小板凝集能及びセロトニン放出におよぼす作用	54
4-3	血小板凝集及びセロトニン放出抑制におよぼす AA及び EPA由来の5-, 12-, 15-hydroperoxidesの作用	59
4-4	in vitroの系における12-HPETE, 12-HPEPEの 血小板凝集抑制に対する相加効果	61
4-5	高純度に精製した EPAエチルエステルを投与した前後における、 ヒト血小板刺激時に産生される アラキドン酸ならびに EPA代謝産物の変動	64
4-6	考察	72

総括.....	76
謝辞.....	78
掲載雑誌目録.....	79
引用文献.....	81

序論

近年、食生活の質的・量的変化に伴い、脳卒中、動脈硬化、糖尿病など、いわゆる血栓性疾患に関連深い疾患が成人病の罹患率の上位を占めるようになってきた。¹⁾ 本研究ではこの血栓性疾患の発症および進展に重要な役割を演じると考えられる血小板に注目し、そのアラキドン酸代謝に的を絞って研究を進めてきた。

通常、血流中の血小板は凝集することなく流れており血栓形成は起こらない。そのために重要な役割を担っていると考えられているのが、血小板および血管壁で産生される“プロスタノイド”と呼ばれる一連の生理活性物質である。プロスタノイドは多価不飽和脂肪酸の一種であるアラキドン酸 (Arachidonic acid, AA, C20:4, ω -6) から産生されることが知られている。すなわち、血小板ではトロンボキサン_{A₂} (Thromboxane A₂, TXA₂) が産生され、一方血管壁からはプロスタサイクリン (PGI₂) が産生される。TXA₂は強力な血小板凝集、血管収縮作用を有する^{2) 3) 4)}のに対し、PGI₂はそれと全く反対に血小板凝集抑制、血管拡張作用を有する。⁵⁾ いずれの物質も不安定で、TXA₂は半減期30秒ほどでPGI₂は半減期5分ほどでそれぞれ不活性化されTXB₂、6-ketoPGF_{1 α} となる。従ってTXA₂とPGI₂のバランスは、血栓形成にきわめて重要と考えられる。

血小板の血栓形成に際しては、まず内皮細胞の損傷によりコラーゲンに富む内皮下組織が露出すると、ここに血小板の粘着がおこる。粘着反応により活性化された血小板から、アデノシン2リン酸 (ADP)、TXA₂、セロトニン等の血小板惹起物質が放出される。種々の刺激物質により血小板はさらに活性化され、形態を変えながら血管壁損傷部に血小板の凝集塊を形成する。さらに血小板から放出された凝固促進因子により、凝固系が活性化されてトロンピンが生成される。

このトロンピンによりフィブリノーゲンがフィブリンとなり、赤血球を取込みながら血栓が形成される。⁶⁾

血栓形成に至るまでの過程において、血小板で産生されるTXA₂と血管壁から産生されるPGI₂のバランスが重要であることは既に記したが、実際各種の動脈硬化症や血栓性疾患において血漿中TXB₂の増加、6-ketoPGF_{1α}の減少が報告されている。^{7) 8)} 従って、これら各種の疾患において血小板TXA₂産生の亢進が重要な役割を演じていると考えられるが、この血小板TXA₂産生の増加とそれに関連して生じる血小板凝集反応の亢進はどのようにして起こるのであろうか。これには、まずTXA₂産生の過程について詳しく述べる必要がある。

TXA₂の前駆体であるAAは、血小板の膜を構成しているリン脂質中に存在しており、血小板が種々の刺激因子により活性化されるのに伴い、血小板膜に存在するphospholipase A₂、ならびにphospholipase Cが活性化をうけAAが遊離する。遊離したAAはcyclooxygenase(CO)によってPGG₂を経てPGH₂に代謝される。PGH₂は非常に不安定な物質でただちにTX synthetaseによってTXA₂に変換される。産生されたTXA₂は血小板内のカルシウムプール(dense tubular system)からのカルシウム(Ca²⁺)動員を引起すが、このCa²⁺動員はこれにひき続く血小板の凝集、さらには放出反応において最も重要な因子であると考えられている。⁹⁾

(Fig. 1)

一方、遊離したAAはCO系のみならず、12-lipoxygenase(12-LO)系によっても代謝をうける。^{10) 11)} 12-LO系では、AAの12位にhydroperoxy基のついた12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid(12-HPETE)が産生され、ついで安定な代謝産物12-hydroxyeicosatetraenoic acid(12-HETE)となる。この12-LO系の中間代謝産物である12-HPETEは、TXA₂とは反対に血小板凝集抑制作用があるといわれ^{12) 13)}、血小板凝集反応の一つの調節因子として働いている可能性がある。

(Fig. 2)

また既述のごとく、血小板で産生されるTXA₂に対して、血管壁から産生されるPGI₂は強力な血小板凝集抑制作用を有するが、その機序としては次のように考え

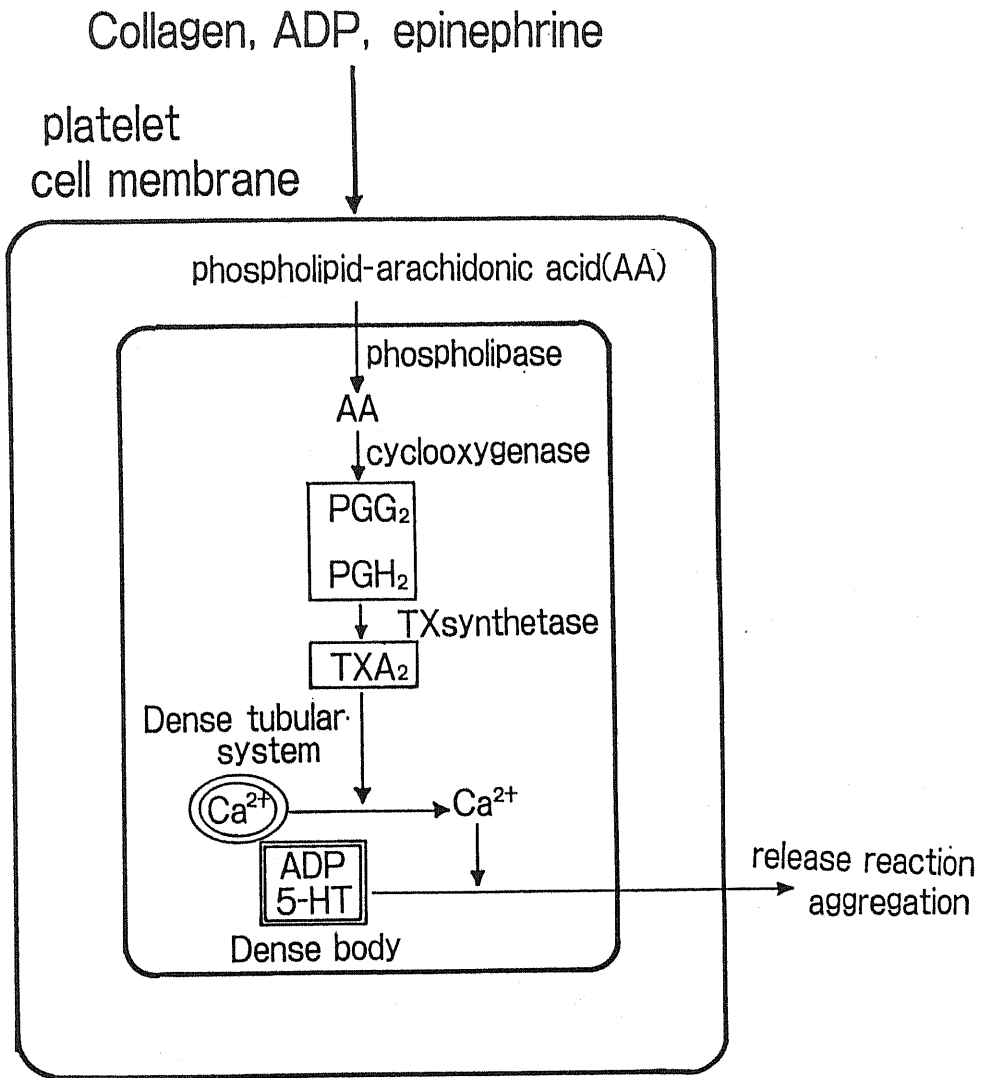


Fig.1 Mechanism of platelet activation and arachidonic acid (AA) metabolism.

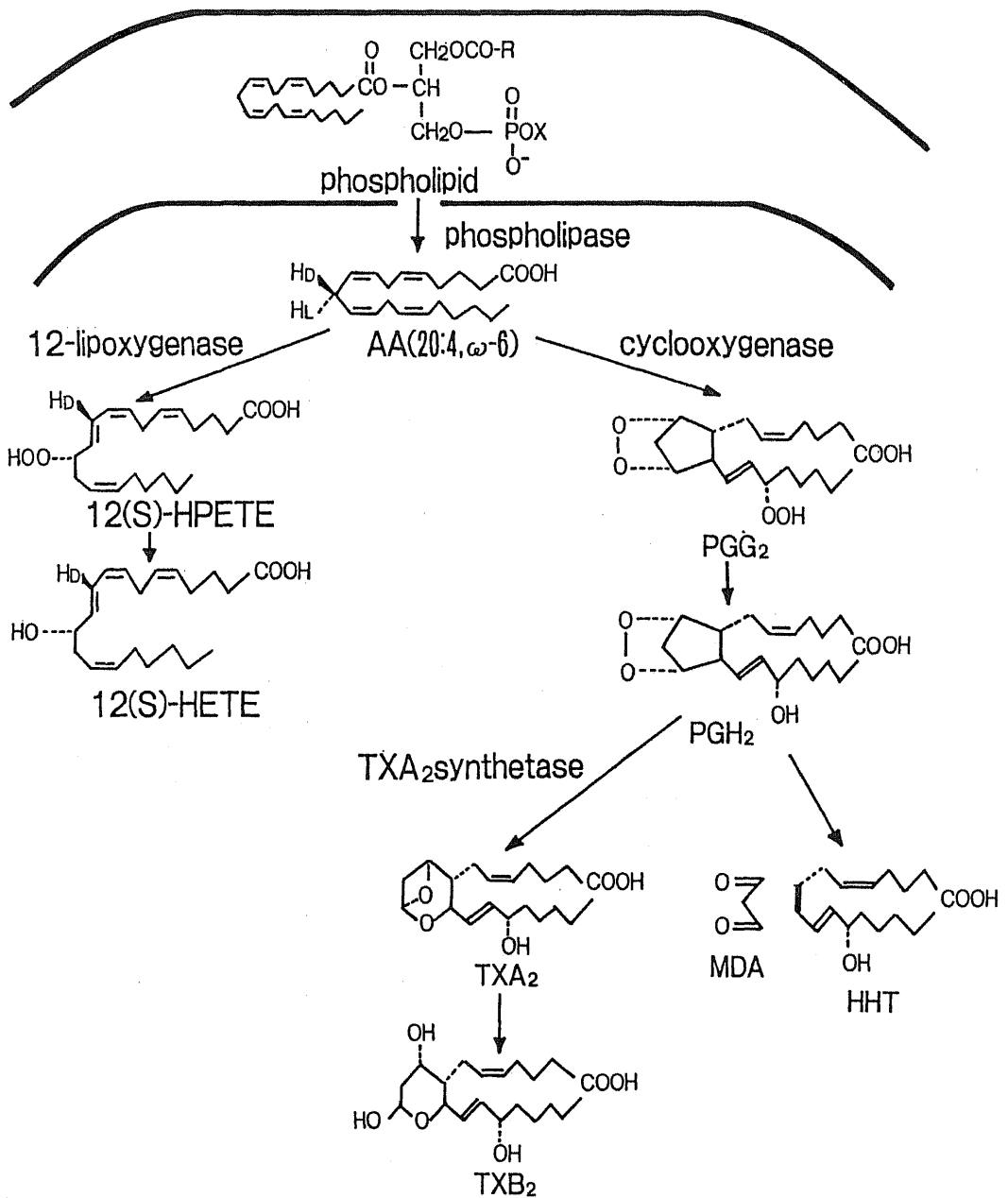


Fig.2 Metabolism of arachidonic acid (AA) in human platelets.

られている。 産生されたPGI₂が血小板膜に存在するPGI₂receptorに結合すると、adenylate cyclase が活性化されcyclic adenosine monophosphate (c-AMP)が adenosine triphosphate (ATP)より産生される。 このc-AMP は、TXA₂とは反対に血小板内でのCa²⁺ 動員を抑制し、Ca²⁺をCa²⁺貯蔵プールに押し戻す作用がある。¹⁴⁾ このためCa²⁺を必要とする種々の血小板内での反応、例えば血小板膜からのAA遊離を抑制し、結果としてTXA₂産生を低下させ、さらには凝集、放出反応に必要なCa²⁺を低下させることにより、血小板凝集能が低下するといわれている。¹⁵⁾ ちなみに、PGI₂の前駆体もTXA₂と同じくAAであり、CO反応後生成されたPGH₂から血管壁に存在するPGI₂ synthetase によって産生されるのである。

以上のように血栓症疾患の発症進展には、血小板内のAA代謝が重要な役割を示している。 このような観点から、TXA₂産生亢進に伴う血小板凝集亢進の是正の一手段として、血小板のAA代謝に影響を与えてTXA₂産生を低下させる薬物が注目を浴びるようになってきた。 ある種の薬物や食事で摂取する脂質の種類が、血小板のみに限らずヒト血管壁のプロスタノイド代謝にも大きな影響を与え、血小板凝集能を抑制しこれらの疾患の予防治療上重要な位置を占める可能性があり、興味深いと考える。 これらの薬物は抗血小板薬と呼ばれているが、抗血小板薬の最たるものはacetylsalicylic acid(aspirin) である。(Fig.3) 古くから、広く抗炎症薬として用いられてきたaspirin は抗血栓作用も合せ持つことがわかり、その作用機序としてPGの合成阻害、なかでもCOのserine位をアセチル化することにより強力なCO阻害作用を示すことが明らかとなった。¹⁶⁾

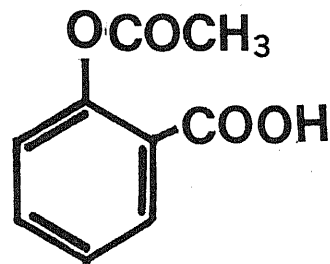


Fig.3 Structure of aspirin.

更に、非ステロイド性抗炎症薬の多くもCO阻害剤として働き、抗血小板作用もあわせもつことが明らかにされている。^{17) 18)}

このように、血小板AA代謝に影響を与え抗血小板作用、すなわち血小板凝集抑制作用をあらわす薬物は多い。簡単に分類すれば ①phospholipase A₂反応を抑制する^{14) 15) 19)} ②cyclooxygenase反応を抑制する(aspirin, indomethacin^{20) 21)} ③thromboxane synthetase反応を抑制する(imidazole, OKY-1581)^{22) 23) 24)} ということになる。

本研究では上述した既存の抗血小板薬以外にも抗血小板作用を有する薬物が存在すると考え、全く違った観点から種々の薬物を取りあげ研究してきた。すなわち、古来より長い間用いられている和漢生薬の主成分や、日常の食事摂取によって得られるような成分のなかに、ヒト血小板アラキドン酸代謝に影響をおよぼすことによって血小板凝集抑制作用を有し、血栓症疾患の発症・進展に対して予防的役割を積極的に担う可能性のあるものが存在するのではないか、aspirinに代わりうるような有用な薬物があるのではないか、という観点から研究を進めてきた。このような観点から、本論文では3つのものを取りあげた。1つは、桂(Cinnamomun Casia Blume)の樹皮(Cinnamomi Cortex)の主成分であるcinnamic aldehyde、2つめはキカラスウリ(Trichosanthes japonica)の種子(栝楼仁)の主成分であるtrichosanic acid、および3つめは魚脂中に多く含まれるeicosapentaenoic acid(EPA)である。

桂皮は桂枝湯、大青竜湯、温肺湯、桂枝人参湯等さまざまな漢方処方に用いられている和漢生薬である。循環系に関しては、末梢血管障害に有効との報告もある。最近、桂皮及びその主成分であるcinnamic aldehyde(CA)(Fig.4)に血小板凝集抑制作用のあることが明らかにされた。^{25) 26) 27)} しかし、その作用機序については全く不明であった。

栝楼仁の主成分trichosanic acid(TCA)は、炭素数18で二重結合を3ヶ有す

る多価不飽和脂肪酸である。²⁸⁾ (Fig.5)

近年みられる血栓性疾患の増加の一因に、動物性脂肪摂取の増加が取りざたされている。²⁹⁾

その意味でもこの植物性不飽和脂肪酸が、今ま

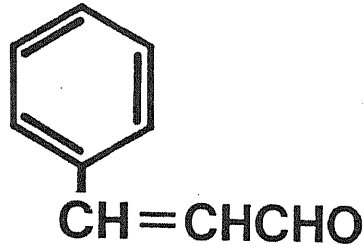


Fig.4

Structure of cinnamic aldehyde.
(CA)

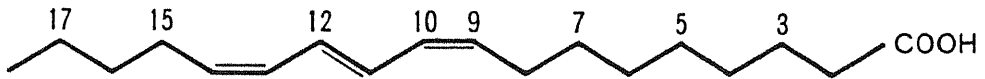


Fig.5 Structure of trichosanic acid.
(TCA)

で報告されているいくつかの多価不飽和脂肪酸と同様に、ヒト血小板凝集抑制作用を有し血栓症予防の一つの薬物となりうる可能性があるかどうか興味深いと思われる。

さらに別の種類の多価不飽和脂肪酸として、AAと同じく炭素数20ではあるが、二重結合がAAより一つ多いeicosapentaenoic acid (EPA, C₂₀;5, ω-3)をとりあげた。EPAは、海産動物とりわけ、魚脂中に多く存在する(Fig.6)。TCAと異なりEPA に関しては抗血小板作用のあることが明らかにされ、^{30) 31) 32) 33)}

^{34) 35) 36)}

またその作用機序についても、いくつかの仮説がすでに呈示されている。^{37) 38) 39) 40)}

本論文では、従来の報告に加え、EPA の12-L0 系代謝産物に注目し、EPAの12-L0 系代謝産物の血小板機能におよぼす作用、さらには実際

EPA 投与したヒトの血小板において産生されるEPA 代謝産物を測定することによって、EPA の12-L0 系代謝産物がEPA の抗血小板作用発現にはたす可能性について検討を加えた。

これらの薬物のヒト血小板AA代謝に及ぼす作用の研究を進めるにあたって、まずヒト血小板を用いて血小板凝集能およびその時産生される血小板プロスタノイドの代謝産物を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定する系を確立し、ついで各薬物の血小板凝集能およびAA代謝に及ぼす作用を明らかにし、各薬物の作用機作について検討を加えてきた。これらの研究が、これからの抗血小板薬にとって大きな示唆を与えるものとなれば幸いである。また一方で、これらの研究は血小板活性化機構の解明への多くの示唆を与えてくれるものと期待される。

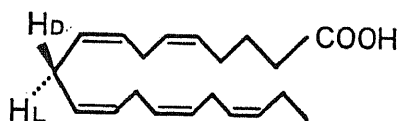


Fig.6 Structure of eicosapentaenoic acid.
(EPA)

第 1 章 実験方法

この章では、本研究を進めるにあたっての基本的な実験方法についてのみ記述した。その他の実験方法についてはその都度記述した。

尚、本研究に用いた血小板は、すべて二週間以上何の薬の服用のない健常人の空腹時採血によって得られた血小板を用いた。

1-1 ヒト血小板凝集能測定法

Bornらの方法⁴¹⁾ に準じて血小板凝集能の測定を行ない、凝集惹起剤添加による血小板刺激後の血小板浮遊液の光の透過度の変化から血小板凝集率を求めた。

本研究で用いた血小板浮遊液は、多血小板血漿 (platelet rich plasma; PRP) および洗浄血小板液である。次節で洗浄血小板液調製法について記述するので、ここではPRPの調製法およびPRPを用いた血小板凝集能測定法を中心に記す。

採血は採血量の1/10容の3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液をあらかじめ封入した真空採血管を用いて行った。採血後の血液は、ゆるやかに転倒混和後ただちに室温で10分間の遠心分離操作(150×g)を行いPRPを得た。ついで、さらに室温で15分間の遠心分離(1800×g)を行い乏血小板血漿(platelet poor plasma; PPP)を得た。

血小板数は、血小板カウンター(PC-603A, エルマ光学株式会社, 東京)を用いて測定し、PRPの血小板数をPPPを用いて $3 \times 10^5 / \mu\text{l}$ に調整した。

血小板凝集能は、血小板凝集計(4 channel aggregometer, NKK Hema tracer 1, 二光バイオサイエンス社, 東京)を用い、aggregometer cuvette中で血小板浮遊液(PRPあるいは洗浄血小板浮遊液)を37.5℃, 1000rpmでマグネットスターラーで混和しつつ測定した。血小板浮遊液の光の透過率を0%、PPPあるい

は洗浄血小板浮遊液に用いたbufferの光の透過率を 100%と設定した。凝集惹起剤を加えると、血小板の凝集と共に光の透過度が増してくる。この光の透過度の変化を記録計に描記させ、刺激後の最大凝集率をもって血小板凝集率とした (Fig. 1-1)。

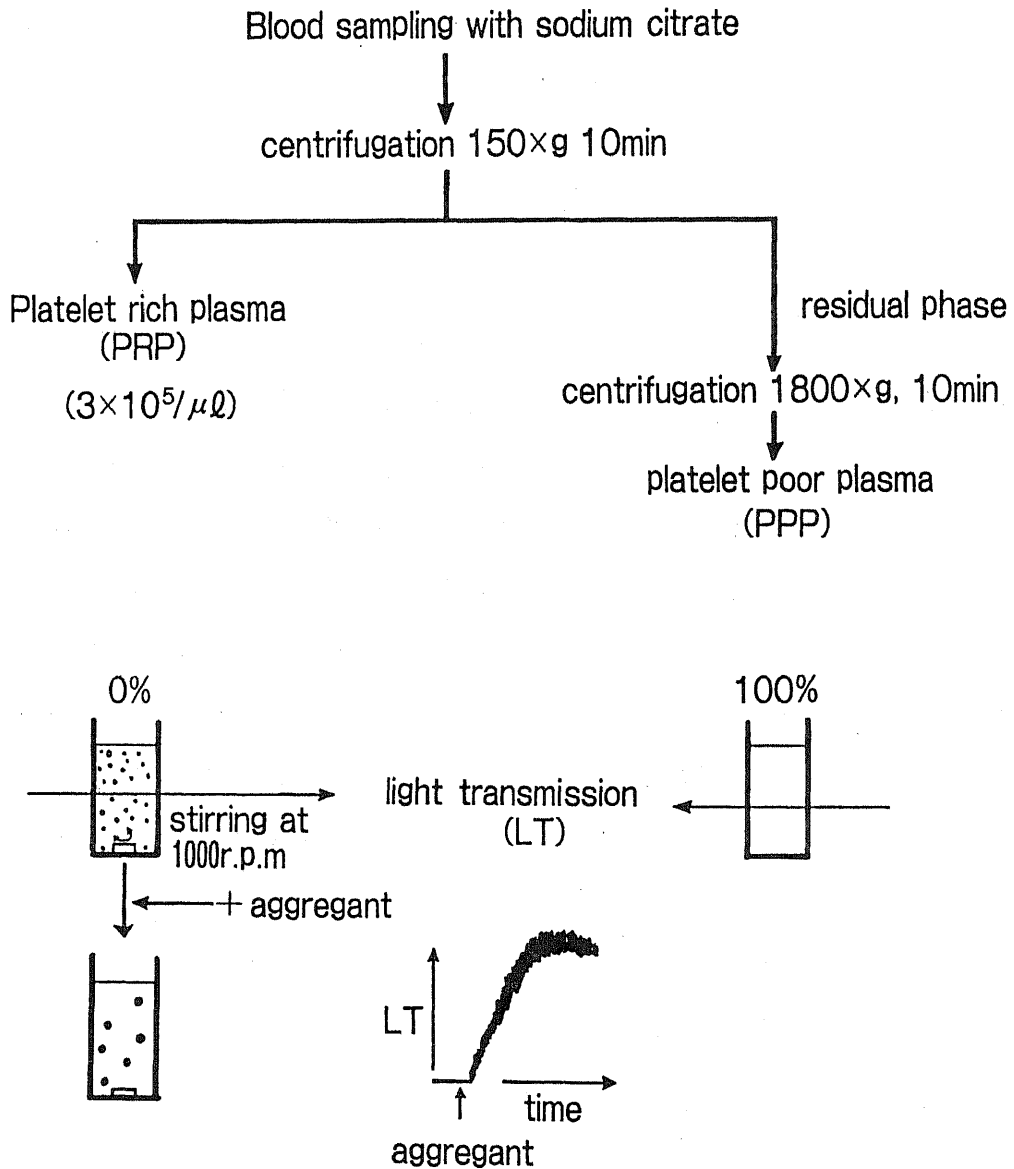


Fig.1-1 Platelet aggregation study of platelet rich plasma (PRP).

1-2 ヒト洗浄血小板浮遊液調製法

ヒト洗浄血小板浮遊液はRadomskiらの方法⁴²⁾を一部改良し、sodium prostaglandin I₂(PGI₂-Na)を用いたcytoprotection法によって調製した。今回用いた調製方法は我々が新たに確立したもので、従来法と比較して以下に詳述するように多くの利点がある。

すなわち、従来用いられていた洗浄血小板調製法は、Ca²⁺のキレート剤であるethylenediaminetetraacetic acid 2Na(EDTA-2Na)を用いた方法⁴³⁾が主流であったが、その欠点として調製操作中に血小板のCa²⁺レベルが著しく低下しており、トロンビンのような特定の凝集惹起剤を用いた時のみ凝集反応がみられ、他の惹起剤たとえばコラーゲンによる凝集はほとんどおこらないことが明らかにされている。トロンビンによる血小板凝集反応は、血小板内のAA代謝に対してはかなり非依存性の反応であり、強力なCO阻害剤であるaspirinによりあまり抑制されないことが報告されている。¹²⁾一方、コラーゲンによる血小板凝集反応はKaibuchiらにより明らかにされたように、血小板のAA代謝特にTXA₂産生に依存するところが大きいと考えられる。⁴⁴⁾従って、ある薬物の血小板AA代謝と血小板凝集能への影響を同時に解析することが可能となるためには、トロンビン以外の凝集惹起剤(例えばコラーゲン)で凝集を惹起することができ、なおかつ血小板機能をなるべく失わずに保持できるような洗浄血小板浮遊液の調製法の確立が不可欠であった。

1983年Radomskiらは、EDTAの代わりに血小板凝集抑制作用を有するPGI₂-Naを用いることによる洗浄血小板浮遊液の調製方法を報告した。⁴²⁾PGI₂は序論でも記したように、血小板膜に存在するadenylate cyclaseを活性化し、血小板内のc-AMP量を増加させる。増加したc-AMPは、血小板内でのCa²⁺動員を抑制し、Ca²⁺をその貯蔵プールに押しもどすため、血小板の活性化が起こらない。

この点を利用して洗浄血小板浮遊液を調製するわけである。著者はRadomskiらの用いているPGI₂-Na (2μg/ml)量を用いて洗浄血小板浮遊液を調製したが、確かに血小板浮遊液は調製できたものの100μg/mlという高濃度コラーゲンを加えても全く凝集反応がみられなかった。そこで、採血時ならびに遠心分離操作直前に加えるPGI₂-Na量を漸次減少させて洗浄血小板液調製の検討を行った。

また、用いるTyrode液に関してはCa²⁺の添加の有無が洗浄血小板の凝集にはほとんど影響を与えないことを明らかにした。さらに、用いるTyrode液に関しては10mMのN-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES)を加えると血小板凝集の最大凝集率が高くなることを見出だした。以上のような基礎検討を経て、以下の洗浄血小板浮遊液の調製法を確立した。

採血は採血量の1/10容の3.8w/v%クエン酸ナトリウム溶液に採血量1mlにつき0.1 μgのPGI₂-Na(小野薬品株式会社、大阪、50mM Tris-HCl buffer pH9.0に溶解)を加えたものをあらかじめ封入した真空採血管を用いて行った。採血後ゆるやかに転倒混和し、ただちに室温で10分間遠心分離操作を行ってPRPを得た。得られたPRPに0.1 μg/mlのPGI₂-Naを加え緩やかに混和後、室温にて10分間の遠心分離(900×g)を行う。上清の血漿(plasma)はdecantationによって除き、PGI₂-Na 0.1μg/mlを添加したTyrode-HEPES buffer(組成; NaCl 138 mM, KCl 2.69mM, MgCl₂·6H₂O 0.5mM, NaH₂PO₄·H₂O 0.36mM, NaHCO₃ 11.9 mM, glucose 5.56mM, HEPES 10mM)で血小板をゆるやかに浮遊させる。この血小板浮遊液を室温にて10分間の遠心分離(800×g)を行い、血小板を洗浄する。遠心分離後上清は除き、PGI₂-Naを添加しないTyrode-HEPES bufferで血小板を再浮遊させた。血小板カウンターにより血小板数を測定後、血小板数を5×10⁵/μl、実験によっては10⁶/μlに調整し、4℃に1時間以上放置後実験に供した(Fig.1-2)。洗浄血小板調製直後は操作中に添加したPGI₂-Naにより血小板のc-AMP含量が増加しているため血小板機能が低下しているが、時間の経

過とともに血小板c-AMP 含量は低下し、調製後約1時間以後で安定な凝集反応が認められた。

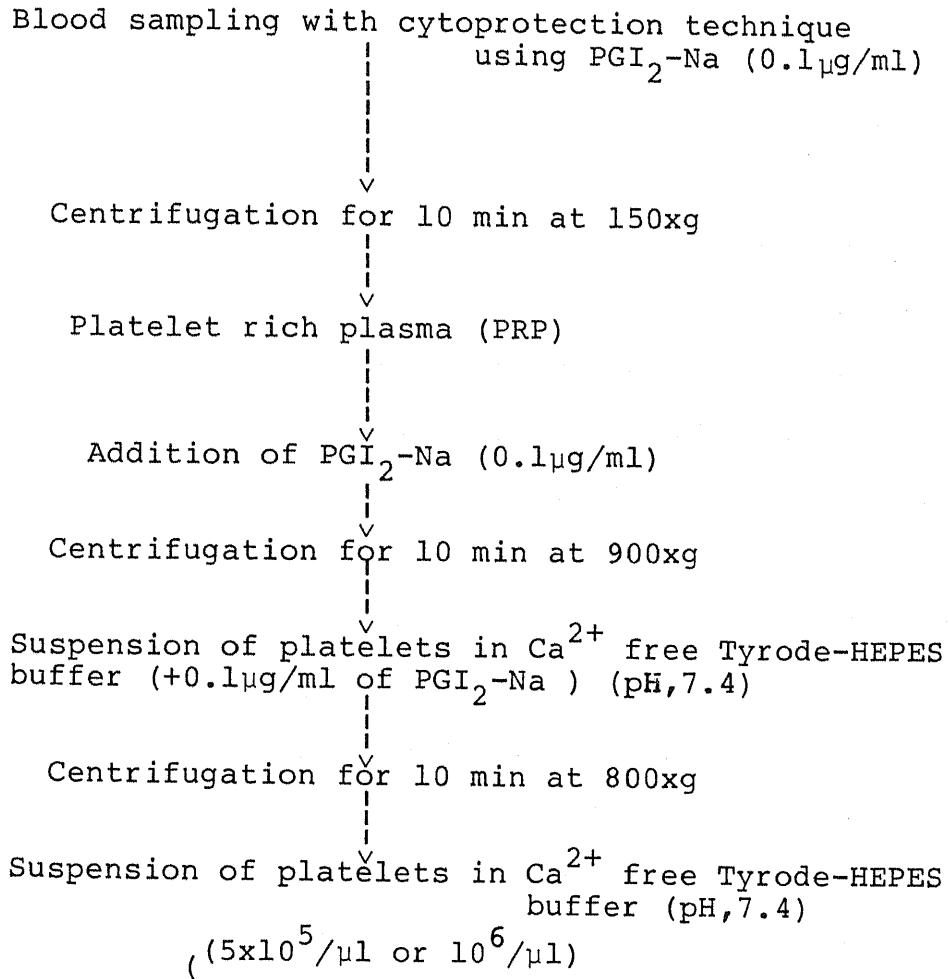


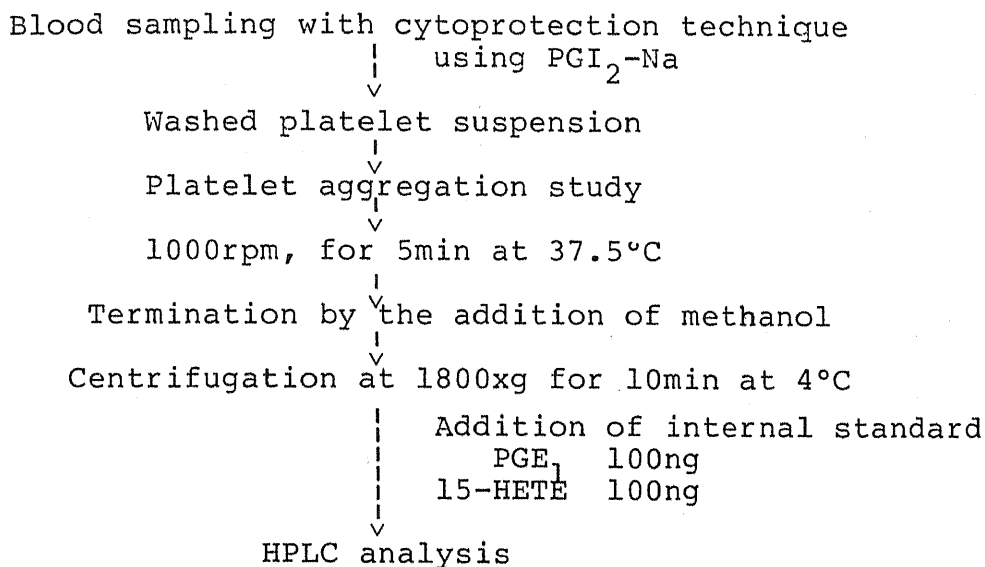
Fig.1-2 Preparation of washed human platelet suspension.

1-3 ヒト洗浄血小板刺激時に産生される アラキドン酸代謝産物の高速液体 クロマトグラフィーを用いての測定法

前記のような方法でヒト洗浄血小板浮遊液を調製後、まず血小板凝集計を用いてPRPと同様な方法でコラーゲンによる血小板凝集能を測定した。阻害剤で処理していない洗浄血小板をコラーゲンで刺激すると5分間以内に最大凝集が認められた。そこで血小板凝集反応を5分間とし、等量のメタノールを加え反応を停止後、Hiraiらの方法⁴⁵⁾に基づいて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、血小板で産生されたAA代謝産物の分離測定を行った(Fig.1-3)。メタノールで反応停止後、十分混和し、4℃にて10分間の遠心分離を行った。遠心分離後の上清に、内部標準物質として一定量の15-HETE、PGE₁を加えた。尚、これらはコラーゲン刺激の洗浄血小板では産生されないことをあらかじめ確認してある。

内部標準物質を含むサンプルのHPLC分析はultraviolet (UV)235nmの検出器(UVIDEC-100V, 日本分光株式会社, 東京)を装着した逆相(reverse phase, RP)-HPLCで15-HETEを内部標準物質としてHHT, 12-HETEの産生量を測定した。その際、ポンプとしてTri Rotor V chromatograph(日本分光)、カラムとしてはoctadecylsilica(ODS)カラム(Develosil, 5 μ m, 4.2 \times 150mm, 野村化学、愛知)を用い、移動相はアセトニトリル/メタノール/蒸溜水/酢酸(42:28:30:0.01, by volume)、流速1ml/minでカラム温度は30℃とした。このときTXB₂、PGE₁を含む画分を分取し、ODSミニカラム(C18-Bond Elut, Analytichem International, Harbor city, CA, USA)を用いて抽出後酢酸エチルで溶出させた。⁴⁶⁾

このTXB₂、PGE₁を含む酢酸エチル溶液をあらかじめYamauchiらの方法⁴⁷⁾で精製した9-anthryldiazomethane(ADAM, フナコシ薬品株式会社、東京)と室温、密



1. Reverse phase (RP)-HPLC
 - a. Collection of the fractions containing TXB₂ and PGE₁
 - b. Determination of HHT and 12-HETE using UV spectrophotometer
2. Derivatization of TXB₂ and PGE₁ (internal standard) with 9-anthryldiazomethane (ADAM)
3. GPC-HPLC
Purification of ADAM-labeled TXB₂ and PGE₁
4. Straight phase (SP)-HPLC
Determination of TXB₂

DATA processor; Chromatocorder 11 (SIC)

Fig.1-3

Procedure of the determination of arachidonic acid (AA) metabolites in stimulated washed human platelets.

封、暗所にて4時間反応させた。 gel permeation chromatography(GPC)カラム (PG pack-C, 7.5×500mm, 日本分光) で未反応のADAMと分離精製後、N₂ガスで蒸発乾固させ順相(straight phase, SP)-HPLC 分析に用いる移動相であるイソオクタン/酢酸エチル/エタノール/酢酸 (80:15:5:2, by volume) に再溶解した。 この溶液を蛍光光度計 (spectrofluorometer, FP-210, 日本分光) を装着したSP-HPLC に注入し、TXB₂-ADAM、PGE₁-ADAM を分離し、PGE₁を内部標準物質としてTXB₂の産生量を測定した。 その際、上述した移動相で流速 1ml/minとし、silicaカラム (Develosil 3μm, 4.2×150mm, 野村化学) を用いカラム温度は40℃とした。 この蛍光分析に用いたexcitation およびemission波長はそれぞれ 365nm、412nm であった(Fig.1-4)。 以上のような分析手段を用いて、薬物の血小板凝集能におよぼす作用のみならず、このとき産生された血小板AA代謝産物の産生に対する作用の検討が可能となった。

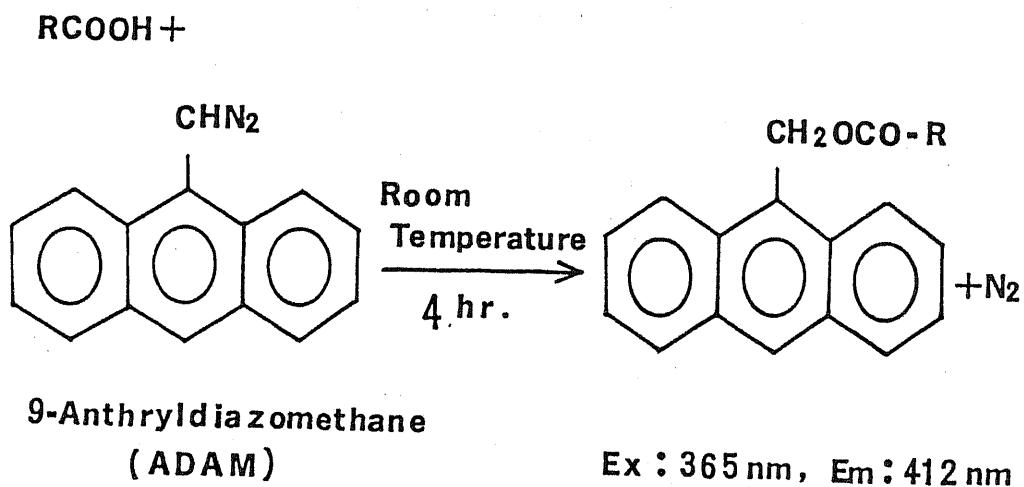


Fig.1-4 Derivatization of thromboxane with 9-anthryldiazomethane (ADAM).

尚、この時用いた溶媒はすべてHPLC純度の溶媒（和光純薬株式会社、大阪）を用いた。標準物質として用いたHHT、12-HETEはGoetzlらの方法⁴⁸⁾及びCampらの方法⁴⁹⁾に従い、ヒト血小板ホモジネートをAA（99% pure, Nucheck, Prep., Elysien, MN, USA）とインキュベーションすることによって生合成した。また15-HETEは、soybean lipoxygenase(Sigma Chemical Co., St.Louis.MO. USA)を用いてWongらの方法⁵¹⁾に従って生合成した。これらの物質はRP-あるいはSP-HPLCを用いてさらに精製し、gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)によって同定した。これら標準物質の濃度は、それぞれのモル吸光係数を用いspectrophotometryにて決定した。12-HETEと15-HETEに関しては30000, (at 235nm)⁴²⁾ HHTに関しては33000 (at 235nm)⁵³⁾を用いた。また標準物質として用いたTXB₂及びPGE₁は小野薬品株式会社より提供していただいた。

さらに、用いた薬物のいずれもこれらHPLC分析には何らの妨害は示さなかった。

1-4 ヒト洗浄血小板での外因性 [¹⁴C]アラキドン酸の代謝産物の測定法

薬物の血小板cyclooxygenase(CO)および12-lipoxygenase(12-L0)に対する作用を解析する方法には、洗浄血小板を用いる方法と各々の酵素自身を用いる方法の二通りがあるが、通常は前者の方法が用いられる。すなわち、ヒト洗浄血小板浮遊液に外因性の[¹⁴C]AAを加えると血小板内でただちにCO, 12-L0によって代謝を受け、それぞれCO系からは[¹⁴C]TXB₂と[¹⁴C]HHTが産生され、12-L0系からは[¹⁴C]12-HETEが産生される。この方法はこれら二つのAA代謝経路に及ぼす薬物の作用を検討するにはすぐれた解析手段ですでに幾多の報告がある。⁵⁴⁾⁵⁵⁾

ヒト洗浄血小板浮遊液 ($10^6/\mu\text{l}$)は、EDTAを用いた採血後調製した。⁴³⁾ この洗浄血小板浮遊液に $[1-^{14}\text{C}]$ アラキドン酸 ($[^{14}\text{C}]$ AA, 59.6mCi/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA) 0.1 μCi とAA 1 μg を加え5分間37.5 $^{\circ}\text{C}$ にてインキュベーションを行った。反応停止には2Mクエン酸を添加し酸性としたのち、酢酸エチルを加え各種代謝産物を抽出した。抽出液は N_2 ガスで蒸発乾燥後少量の酢酸エチルで再溶解し、silica gel G plate(60F254, Merck, Darmstadt, West Germany)に塗布し酢酸エチル/イソオクタン/酢酸/蒸溜水(110:50:20:100, by volume)の上層を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography; TLC)で分離した(Fig.1-5)。分離後、autoradiographyで各種代謝産物の位置を同定し、それぞれのスポットをかきとり、液体シンチレーションカウンター (LKB, Rack β , Turku, Finland)で測定した。

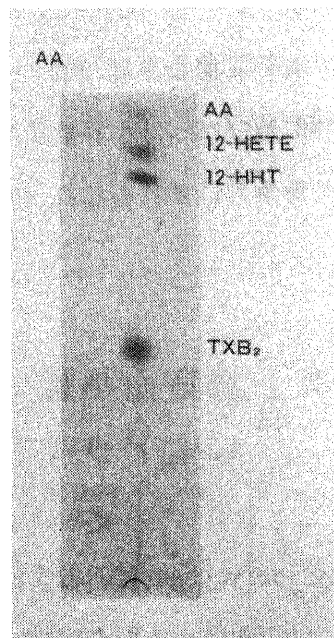


Fig.1-5

Autoradiograph of thin layer chromatography (TLC) of $[^{14}\text{C}]$ arachidonic acid ($[^{14}\text{C}]$ AA) metabolites of human platelets.

1-5 [^{14}C] アラキドン酸標識血小板液を用いてコラーゲン刺激時に遊離される [^{14}C] アラキドン酸およびその代謝産物の測定法

序論に述べたように、血小板でのAA代謝産物産生の律速段階は、膜リン脂質からのAAの遊離と考えられる。^{56) 57) 58)} すなわち、血小板の刺激に伴いphospholipase A₂ 及びC が活性化を受け、膜リン脂質に組込まれているAAが切出されて血小板に遊離し、ついでCOおよび12-LO により代謝されると考えられている。⁵⁹⁾

この血小板膜リン脂質からのAAの遊離に及ぼす各種薬剤の影響の検討は、抗血小板薬の作用機作解明の上できわめて重要と思われる。血小板膜リン脂質からのAAの遊離の測定には、通常放射性AAで標識した血小板が用いられる。⁶⁰⁾ すなわち [^{14}C] AAをヒト血小板膜リン脂質中に取込ませた標識血小板を調製後コラーゲンで刺激すると、血小板凝集反応と同時に膜リン脂質中に取込まれた [^{14}C] AAが遊離し、COおよび12-LO によって代謝を受け [^{14}C] TXB₂、 [^{14}C] HHT、および [^{14}C] 12-HETE が産生される。これらの [^{14}C] AA代謝産物の分析により、 [^{14}C] AAの遊離の測定が可能となる。

ヒト [^{14}C] AA標識血小板浮遊液 ($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$) の調製法は、既述のPGI₂-Na を用いた洗浄血小板液調製法とほぼ同じである。PRP 調製後、1 $\mu\text{Ci/ml}$ の [^{14}C] AA をPRP に加え60分間37.5°Cにてインキュベーションを行うことにより血小板膜リン脂質に [^{14}C] AA を取込ませた。以下既述のごとく操作を行い、 [^{14}C] AA 標識血小板浮遊液を調製した。

血小板凝集計を用いてaggregometer cuvette中に調製した [^{14}C] AA 標識血小板浮遊液 ($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$) を入れ、37.5°C, 1000rpm で混和下、凝集惹起剤を加えて

血小板凝集能を測定した。5分間の血小板凝集反応後、クロロホルム/メタノール (1:1, by volume) で反応を停止させ、Folch 液 {クロロホルム/メタノール (2:1, by volume) } を加えて抽出を行った。⁶¹⁾ サンプルを超音波処理後1時間の抽出操作を行い、10分間4℃にて遠心分離 (1800×g) を行った。上清に 1/5容の 0.9%NaClを加えゆるやかに混和後4℃にて10分間の遠心分離 (1800×g) を行った。上層の水、メタノールを含む層は、N₂ガスにより濃縮した後、2Mクエン酸を加えpH 3.5とし酢酸エチルで抽出した。この酢酸エチル層はN₂ガスで蒸溜乾固させた後、少量のFolch 液で再溶解させた。下層の有機層はそのままN₂ガスで蒸発乾固させた後、少量のFolch 液で再溶解した。上層および下層の抽出液を合せた後、既述のsilica plate に塗布後、TLC により展開しautoradiography にて同定し、各代謝産物の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

第2章 桂皮の主成分、cinnamic aldehyde (CA)のヒト血小板凝集能及びアラキドン酸代謝におよぼす作用 (in vitro)

2-1 はじめに

最初にとりあげたのは、古くより和漢生薬としてさまざまな処方に用いられてきた桂皮 (Cinnamomi Cortex) の主成分cinnamic aldehyde(CA)である。桂皮の主成分であるCAは、解熱作用^{62) 63)}、抗炎症作用^{64) 65)}、さらには血小板凝集抑制作用を有することが既に報告されている。^{25) 26) 27)} しかしながら、その作用機序に関してはほとんど報告がなく不明のままであった。そこで、本章では桂皮の主成分でありベンゼン環を有する構造をもつCAの、血小板凝集抑制作用について、ヒト血小板AA代謝からみた作用機序に関する研究成績について述べる。

2-2 多血小板血漿 (platelet rich plasma; PRP)を用いた血小板凝集能に対するcinnamic aldehyde (CA)の作用

【実験方法】

1-1に既述した方法に従いcinnamic aldehyde(CA, 和光純薬)の血小板凝集能におよぼす作用を検討した。CAはエタノールに溶解したが、PRP中のエタノール

ールの終濃度は 0.4%であった。 エタノールのみをPRP に加えて凝集惹起後5分間の凝集反応に全く変化のないことを確認した上で、CAの凝集抑制効果が最大となるプレインキュベーション時間を求めたところ3分間となったので、凝集惹起までのCAとPRP とのプレインキュベーション時間を3分間とした。

【結果】

Fig.2-1(a)に示したように、ADP(2.0 μ M; Sigma) を凝集惹起剤とした時cinnamic aldehyde(CA)は濃度依存的に血小板凝集能を抑制した。 ヒトPRP のADP凝集は、通常一次凝集と二次凝集とが存在する。⁶⁶⁾ AA代謝とりわけTXA₂産生への依存度が高いといわれる二次凝集に対してより強い抑制作用が見られた。

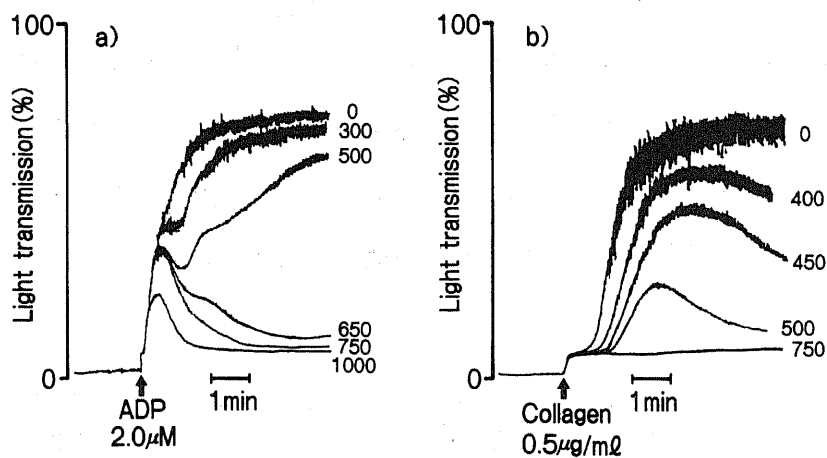


Fig.2-1 Effect of cinnamic aldehyde (CA) on (a)ADP (2.0 μ M) or (b) collagen (0.5 μ g/ml)-induced platelet aggregation of platelet rich plasma (PRP).

The platelets were preincubated with cinnamic aldehyde (CA) (the final concentration in μ M by each curve) for 3 min before the stimulation.

またコラーゲン (0.5 μ g/ml) を凝集惹起剤とした場合においても、ADP 凝集と同様にCAは濃度依存性の凝集抑制作用を示した。 CA添加濃度の増加とともに、凝集惹起までの“lag time”が延長しているのが特徴的である。 さらに750 μ M のCA添加ではコラーゲン凝集はほぼ完全に抑制された。(Fig.2-1(b))

一方、AA 400 μ Mあるいは 800 μ Mを凝集惹起剤とした時、前もって薬物を添加しないコントロールでは、いずれの濃度のAAによる凝集惹起でも最大凝集率にはほとんど変化なく平均して65%であった。 この時、cyclooxygenase(CO)阻害剤であるインドメタシン (indomethacine; IND, Sigma)10 μ Mで前処理すると、400 μ Mおよび 800 μ MのAA凝集は完全に抑制された。 しかしながら、IND のかわりに 100~ 750 μ MのCAで前処理した場合には、400 μ Mおよび 800 μ MのAAによる凝集は全く抑制されなかった。

(a)



CH=CHCHO

(b)



CH=CHCOOH

Fig.2-2 Structure of (a)cinnamic aldehyde and (b)cinnamic acid.

CAは反応液中でcinnamic acid (Fig.2-2)へと代謝されると考えられるので、cinnamic acid (和光純薬)についても同様にPRP 凝集について検討を加えた。

しかしながら、cinnamic acid の血小板凝集抑制作用はCAに比較しはるかに弱かった。 ちなみに、ADP (2.0 μ M) で凝集を惹起させた場合、1900 μ Mのcinnamic acidを加えてもわずかに7%の凝集抑制しか認められなかった。

2-3 cinnamic aldehyde (CA)の洗浄血小板凝集能 及びアラキドン酸代謝物の産生におよぼす作用

【実験方法】

1-2に既述した方法によりヒト洗浄血小板浮遊液 ($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$)を調製し、CAの洗浄血小板凝集およびAA代謝産物の産生におよぼす作用を検討した。2-2と同様、CAと血小板とのプレインキュベーション時間は3分間とした。

凝集反応後、等量のメタノールを加え産生された代謝産物を抽出し、1-3で既述した方法で血小板AA代謝産物を測定した。

【結果】

コラーゲン ($50 \mu\text{g/ml}$)による洗浄血小板凝集は、CA前処理によって濃度依存的に抑制され、 $300 \mu\text{M}$ のCAでほぼ完全な凝集の抑制が認められた (Fig.2-3)。

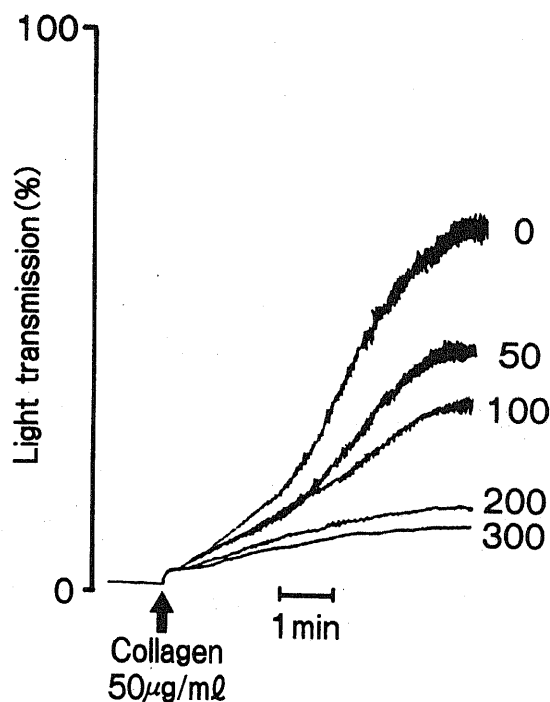


Fig.2-3

Effect of cinnamic aldehyde (CA) on collagen ($50 \mu\text{g/ml}$)-induced washed platelet aggregation.

The platelets were preincubated with cinnamic aldehyde (CA) (the final concentration in μM by each curve) for 3 min before the stimulation.

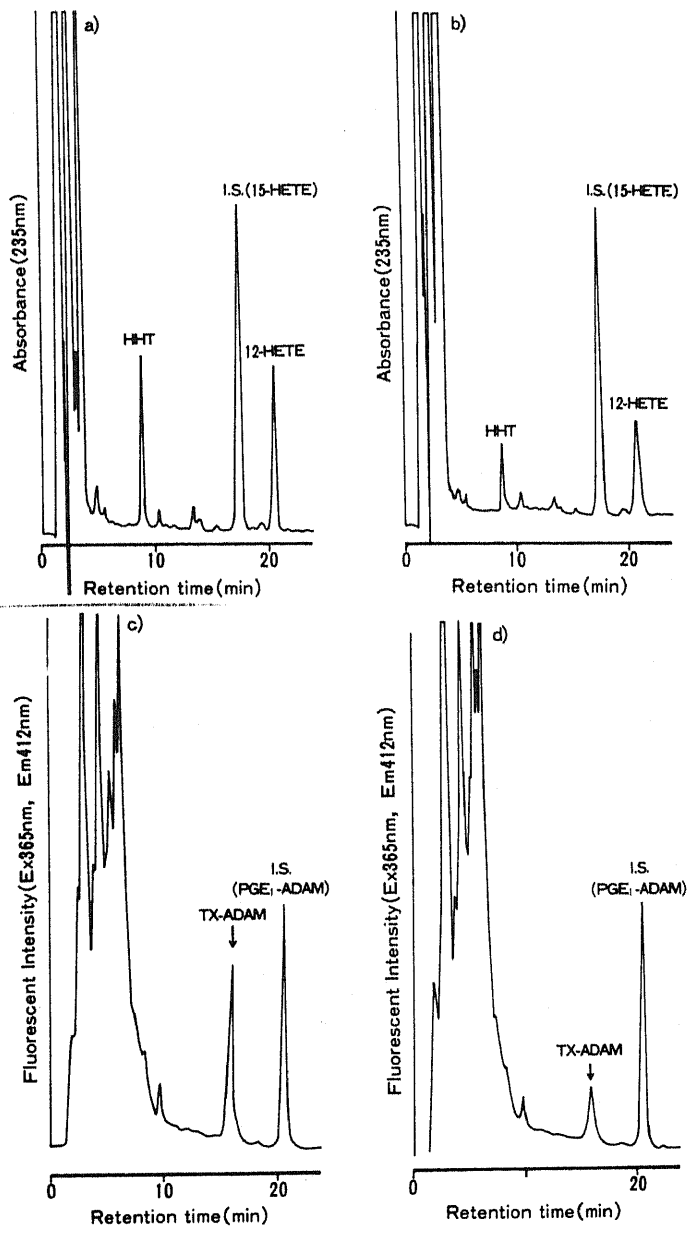


Fig.2-4 Chromatogram of arachidonic acid (AA) metabolites (HHT,12-HETE and TXB₂) produced by collagen (50 μ g/ml)-stimulated washed platelets.

Washed platelets ($5 \times 10^5 / \mu$ l) were stimulated by collagen (50 μ g/ml) in the absence (a,c) or presence (b,d) of cinnamic aldehyde (CA,100 μ M). Samples were analyzed by RP- or SP-HPLC. I.S. means internal standard.

Fig.2-4 には、この時產生された血小板AA代謝産物の分析の代表的なHPLCのクロマトグラムを示した。 FigureにはCA無添加およびCA 100 μ M前処理の血小板でのAA代謝産物の產生を示したが、CA 100 μ M前処理により、CA無添加時のコントロールに比べTXB₂、HHT、12-HETEの產生がいずれも低下している。

CA未処理血小板をコラーゲン(50 μ g/ml)で5分間刺激した際、產生されたTXB₂、HHT、12-HETEの量は、それぞれ280.2 \pm 10.4、193.4 \pm 7.25、303.7 \pm 17.4ng/5 \times 10⁸ platelets(means \pm S.D., n=3)であった。 つぎに、各種濃度のCAの血小板AA代謝産物の產生に及ぼす作用をFig.2-5に示した。 Figureに示した

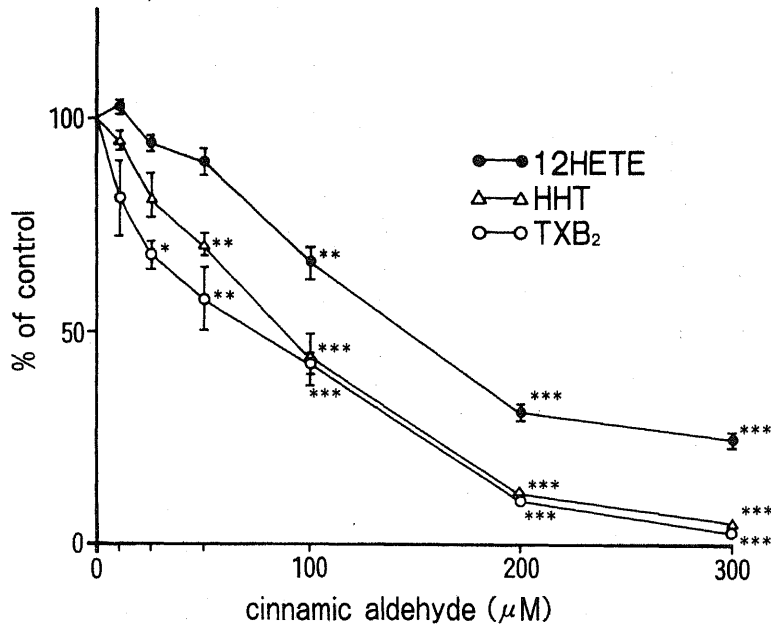


Fig.2-5 Effect of cinnamic aldehyde(CA) on the formation of arachidonic acid (AA) metabolites(TXB₂,HHT and 12-HETE in collagen(50 μ g/ml)-stimulated washed platelets.

Vertical bars mean standard deviations (S.D.). Significant difference represents *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

ように、CA前処理量の増加に伴いCO系代謝産物であるTXB₂とHHT、12-L0系代謝産物である12-HETEのすべての代謝産物が濃度依存的に抑制されていることが明らかとなった。さらに注目すべきことには、CAによる血小板凝集能の抑制と、TXA₂の安定な代謝産物であるTXB₂の産生低下との間には、正の相関関係が認められた(Fig.2-6)。

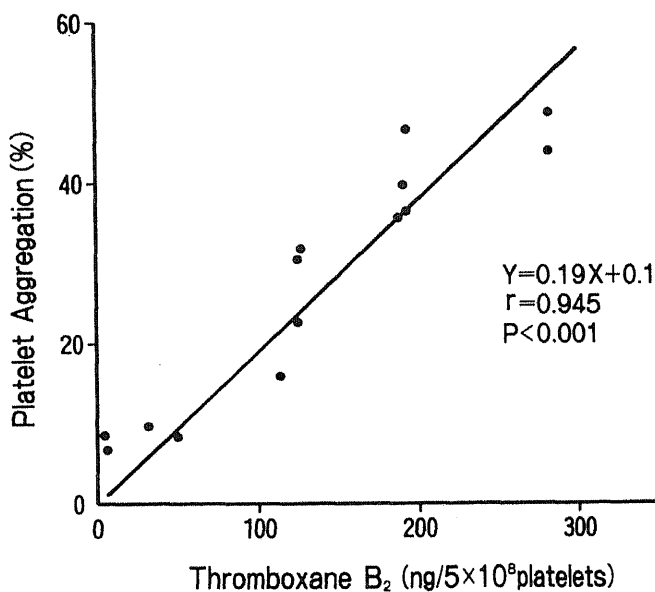


Fig.2-6 Correlation between thromboxane B₂ (TXB₂) formation and washed platelet aggregation induced by collagen (50μg/ml).

2-4 cinnamic aldehyde (CA)のヒト洗淨血小板 での外因性 [^{14}C]アラキドン酸代謝に およぼす作用

前節で述べたCAによるTXA₂産生の低下の機序を明らかにするため、まずTXA₂産生に参与する酵素であるcyclooxygenase(CO)系におよぼすCAの作用を検討した。

【実験方法】

1-4の方法に従って、ヒト洗淨血小板浮遊液をCAで3分間プレインキュベーション後 [^{14}C]AAおよびAAを加え5分間37.5℃にてインキュベーション後、抽出し [^{14}C]AA代謝産物をTLC およびautoradiography で分離同定し、放射活性を測定した。

【結果】

Table 2-1 に示したように、血小板を 0~ 300 μM のCAで前処理しても [^{14}C]AAからの [^{14}C]TXB₂および [^{14}C]12-HETE への代謝は何らの阻害作用を受けないとの成績が得られた。Table には示さなかったが、同じく [^{14}C]AAから [^{14}C]HHT への代謝もCAによって全く阻害を受けなかった。

Table 2-1

Effect of cinnamic aldehyde on the metabolism of exogenously added [^{14}C]arachidonic acid ([^{14}C]AA) in washed human platelets

Concentration of cinnamic aldehyde (μM)	[^{14}C]TXB ₂ (% of control)	[^{14}C]12-HETE (% of control)
0	100.0 \pm 8.90	100.0 \pm 0.10
10	97.0 \pm 3.82	102.0 \pm 1.80
50	95.4 \pm 3.60	101.4 \pm 9.40
100	106.8 \pm 8.62	111.6 \pm 9.24
200	97.3 \pm 4.80	104.9 \pm 5.91
300	95.0 \pm 6.60	109.6 \pm 8.74

Washed platelets ($10^6/\mu\text{l}$) were incubated with [^{14}C]AA and unlabeled AA for 5 min in the presence or absence of cinnamic aldehyde (CA). After incubation, AA metabolites were extracted and analyzed. Values are means \pm S.D. (standard deviations) obtained from three experiments.

2-5 $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸標識血小板液を用いて コラーゲン刺激時の $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸の 遊離とその代謝におよぼす cinnamic aldehyde (CA)の作用

既に述べたように、CAはコラーゲン刺激時のAA代謝産物の産生を抑制したが、その作用点はC0および12-L0のステップではなく、それより前のステップである可能性が考えられた。そこで、血小板活性化時にみられる膜リン脂質からのAA遊離におよぼすCAの作用について検討を加えた。

【実験方法】

1-5の方法に従い、 $[^{14}\text{C}]$ AAで標識した血小板浮遊液 ($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$)を調製しaggregometer cuvette中でCAと3分間プレインキュベーションしたのち、コラーゲン ($50 \mu\text{g/ml}$)を加え凝集を惹起させこの時の血小板凝集能を測定し、さらに $[^{14}\text{C}]$ AA遊離ならびに $[^{14}\text{C}]$ AA代謝産物の産生を測定した。

【結果】

血小板リン脂質画分に取り込まれた $[^{14}\text{C}]$ AAの放射活性は、 $34905.4 \pm 2123.8 \text{ dp m}/10^8 \text{ platelets}$ であった。CA無添加の場合、コラーゲン ($50 \mu\text{g/ml}$)刺激による血小板凝集率(%)、 $[^{14}\text{C}]$ AA遊離(%)、および $[^{14}\text{C}]$ TXB₂産生(%)はそれぞれ $67.3 \pm 2.31(\%)$ 、 $11.2 \pm 0.73(\%)$ 、および $2.56 \pm 0.419(\%)$ であった。

Table2-2に示したように、前処理に用いるCAの量の増加とともに、濃度依存的血小板凝集の抑制がみられただけでなく、 $[^{14}\text{C}]$ AA遊離の低下、 $[^{14}\text{C}]$ TXB₂産生の低下が認められた。この時、CAによる血小板凝集の低下と $[^{14}\text{C}]$ AA遊離の低下との間($r=0.994$)、また血小板凝集の低下と $[^{14}\text{C}]$ TXB₂産生の低下との間(r

Table 2-2

Effect of cinnamic aldehyde on release and metabolism of [^{14}C]arachidonic acid from human platelets pre-labeled with [^{14}C]arachidonic acid ([^{14}C]AA)

cinnamic aldehyde (μM)	platelet aggregation (%)	%release [^{14}C]AA	%formation of [^{14}C]TXB ₂
0	67.3 \pm 2.31	11.2 \pm 0.73	2.56 \pm 0.419
20	64.5 \pm 0.71	10.9 \pm 0.21	2.33 \pm 0.502
100	39.3 \pm 4.51*	6.10 \pm 0.58**	1.11 \pm 0.178***
200	16.0 \pm 1.41**	2.20 \pm 0.36***	0.33 \pm 0.127***
300	3.00 \pm 0***	1.03 \pm 0.07***	0.164 \pm 0.08***

After human platelets pre-labeled with [^{14}C]AA ($5 \times 10^5/\mu\text{l}$) were stimulated by collagen ($50\mu\text{g}/\text{ml}$), [^{14}C]AA and its metabolites were extracted and separated by TLC. And then the radioactivity of each was determined. The release of [^{14}C]AA from pre-labeled platelets stimulated by collagen was expressed as "% release of [^{14}C]AA", which equals the ratio of the radioactivity in AA plus its metabolites to the total radioactivity in stimulated platelets. The collagen-induced formation of [^{14}C]TXB₂ from pre-labeled platelets was expressed as "% formation of [^{14}C]TXB₂", which equals the ratio of the radioactivity in [^{14}C]TXB₂ to the total radioactivity in stimulated platelets. Values are means \pm S.D. (standard deviations) obtained from three experiments. Significant difference from control represents * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

=0.963) にはそれぞれ有意の正の相関関係が認められた。さらに、CAによる [^{14}C]AA遊離の低下と [^{14}C]TXB₂産生の低下との間にも有意の正の相関関係が認められた(Fig.2-7)。

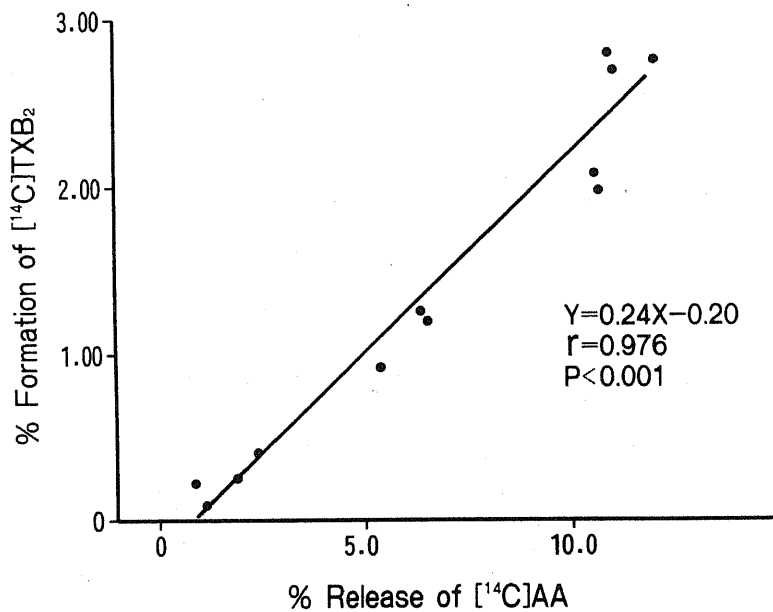


Fig.2-7 Correlation between % release of [^{14}C]AA and % formation of [^{14}C]TXB₂ from prelabeled platelets induced by collagen(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2-6 cinnamic aldehyde (CA)の血小板c-AMP c-GMP 量に及ぼす作用

血小板内のc-AMP あるいはc-GMP 量を増加させる薬物は、膜リン脂質からのAA遊離を抑制し、結果として血小板TXA₂産生の低下をもたらし、血小板凝集抑制作用を示すことが報告されている。^{14) 19) 67)} そこで、CAも血小板内cyclic nucleotides 量を増加させ膜リン脂質からのAA遊離を抑制している可能性があるのでCAの血小板cyclic nucleotides含量に及ぼす作用について検討を加えた。

【実験方法】

洗浄血小板浮遊液 (10⁶ / μ l)をCAと5分間30℃でインキュベーションした後、等量の0.1N HClを加え凍結融解を3回繰返し血小板内のc-AMP 及びc-GMP を抽出した。4℃にて20分間の遠心分離(1800 \times g)後、上清中のc-AMP、及びc-GMP をサクシニル化し、c-AMP、c-GMP 測定用 Kit (ヤマサ醤油株式会社、銚子)を用い、Kunitadaらの方法⁶⁸⁾ に従いc-AMP、及びc-GMP を測定した。

【結果】

Table 2-3に示した様に、CAを0~300 μ Mまで添加しても血小板c-AMP 及びc-GMP 量に対して何らの作用も及ぼさないことが判明した。また、洗浄血小板にPGI₂(1ng)を加えるとc-AMP 量が増加するが、その際CAを添加してもPGI₂によるc-AMP 量の増加反応は何らの影響も受けなかった。

Table 2-3

Effect of cinnamic aldehyde on basal levels of cyclic AMP and cyclic GMP in washed human platelets

cinnamic aldehyde (μM)	cyclic AMP ($\text{pmole}/10^9$ platelets)	cyclic GMP ($\text{pmole}/10^9$ platelets)
0	5.00 \pm 0.14	0.50 \pm 0.10
10	4.55 \pm 0.21	0.51 \pm 0.10
50	5.01 \pm 0.26	0.58 \pm 0.10
100	4.60 \pm 0.31	0.58 \pm 0.10
200	5.20 \pm 0.22	0.55 \pm 0.10
300	5.60 \pm 0.56	0.56 \pm 0.10

Washed platelets ($10^6/\mu\text{L}$) were incubated with various concentrations of cinnamic aldehyde (CA) for 5 min, and then assayed. Values are means \pm S.D. (standard deviations) obtained from three experiments.

2-7 考 察

今回の研究において、CAは PRPの ADP、及びコラーゲン凝集を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。この成績はKuboら、^{25) 26)} 桜川ら²⁷⁾の成績と一致する。CAは反応液中で cinnamic acidに代謝されると考えられている。しかしながら、今回明らかとなったように cinnamic acidは PRP凝集に対しCAと比較して抑制効果が著しく弱いことから、CA添加による凝集抑制の本体はCA自身であり、CAは cinnamic acidとなることにより、その作用が著しく減弱すると考えられた。Haradaらのモルモット摘出心筋を用いての研究でも同様のことが報告されている。⁶⁹⁾ すなわち彼等は、CAには筋変力作用及び変時作用に対して増強作用があるが、cinnamic acidにはそのような作用が認められないことを示している。

CAは ADP(2.0 μ M)による PRP凝集のなかで、AA代謝への依存性が高いといわれる二次凝集⁶⁶⁾をより強く抑制したことから、CAが血小板AA代謝に何らかの作用をおよぼしているのではないかと考えられた。そこで、本研究ではCAの血小板凝集抑制作用の機序を明らかにするために、洗浄血小板を用いてコラーゲン刺激(50 μ g/ml)時の血小板凝集能及びAA代謝に及ぼす作用の検討を行った。その結果、CAはコラーゲン刺激による血小板凝集を濃度依存的に抑制するのみならず、血小板AA代謝代謝産物であるTXB₂、HHTおよび12-HETEの産生をいずれも濃度依存的に抑制することが明らかになった。特に、CAによる血小板凝集能の抑制とTXB₂産生の低下との間には正の相関関係が認められた。TXB₂前駆体であるTXA₂は強力な血小板凝集作用を有していることから²⁾、CAによる血小板凝集能の抑制にはTXA₂の産生低下が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

それでは、CAによるTXA₂産生の低下はAA代謝のどのステップでおこっているのだろうか。4節で検討した洗浄血小板における外因性 [¹⁴C]AAの代謝に対し

て、CAは何らの阻害作用も示さなかった。また2節で触れたように、PRPを用いてのAA凝集に対して、CAは全く阻害作用を及ぼさなかった。これらの成績はCAがAAの血小板における二つの代謝経路であるC0系、12-L0系のいずれに対しても何らの作用を持たないことを示しており、CAによるTXA₂産生の抑制の作用点は、C0系および12-L0系より上位でのステップである可能性が大きいと考えられた。[¹⁴C]AA標識血小板を用いての実験では、添加するCA量の増加に伴いコラーゲン刺激による血小板凝集能は抑制されたが、[¹⁴C]AA遊離も低下し両者の間には正の相関関係が認められた。またCAによる[¹⁴C]AA遊離の低下と[¹⁴C]TXB₂産生の低下との間にも正の相関関係が認められた。以上の成績からCAによるTXA₂産生の低下は、C0以下の代謝経路の抑制ではなく、膜リン脂質からのAAの遊離の抑制による可能性が最も大きいと考えられた。

CAは膜リン脂質からのAA遊離を、どのような機序で抑えたのであろうか。血小板cyclic nucleotides量を増加させる薬物(PGE₁, PGI₂, Molsidomine)は血小板内のCa²⁺動員を低下させて膜からのAA遊離を抑制し、結果的にTXA₂産生を低下させて血小板凝集抑制作用を示すといわれる。^{14) 19) 67)} しかしながら、CAにはcyclic nucleotides量(c-AMP およびc-GMP 量)を増加させる作用は認められなかった。従って、CAがcyclic nucleotides を介して膜からのAA遊離を抑える可能性は少ないと思われる。

血小板が活性化をうけ膜リン脂質からAAが遊離するまでにはさまざまな反応を経なければならない。コラーゲン凝集の場合、血小板活性化物質であるコラーゲンが血小板膜のreceptorに結合するとphospholipase C の活性化に伴い、イノシトールリン脂質代謝回転、Ca²⁺動員が生じ、ついでphospholipase A₂の活性化を経てAAの遊離がおこると考えられている。^{70) 71) 72)} おそらくCAは、このような一連の血小板活性化のごく初期の段階のどこかを阻害していると思われる。しかしながら、この点については今後の研究の発展を待ちたい。

第3章 栝楼仁の主成分、trichosanic acid (TCA)のヒト血小板凝集能 及びアラキドン代謝におよぼす作用 (in vitro)

3-1 はじめに

序論でも述べたように、日本人の血栓性疾患の増加の一因として食生活の質的量的変化があることは否定しえない。特に食生活の欧米化に伴い、動物性脂肪の摂取の増加が著しいといわれる。²⁹⁾ 動物性脂肪の摂取の過多は血清コレステロールの増加をもたらすだけでなく、血小板凝集能を促進させることも知られており、動物性脂肪の摂取の増加と血栓性疾患の増加には相互に密接な関係があると考えられる。^{73) 74) 75)} そこで、食事で摂取する脂質の種類が問題となる。

この章でとりあげたのは、第1章と同じく和漢生薬の一つであるキカラスウリ (*Trichosanthes japonica*) の種子の栝楼仁である。栝楼仁は古来より虚血性心疾患、動脈硬化性疾患等の処方中の主構成生薬として用いられてきた。この生薬の主成分であるのがtrichosanic acid (TCA, C18:3, ω -5)であり多価不飽和脂肪酸の一つである。TCAは天然にはトリグリセリドに組込まれた形で存在し、投与後体内で水解されTCAが遊離されると考えられている。(Fig. 3-1) TCAは栝楼仁の主成分としてすでに同定されているが、²⁸⁾ その作用についてはほとんど不明で、特に血小板機能におよぼす作用についての報告は今まで全くない。

ところで、いくつかの多価不飽和脂肪酸は血小板凝集抑制作用を有することが

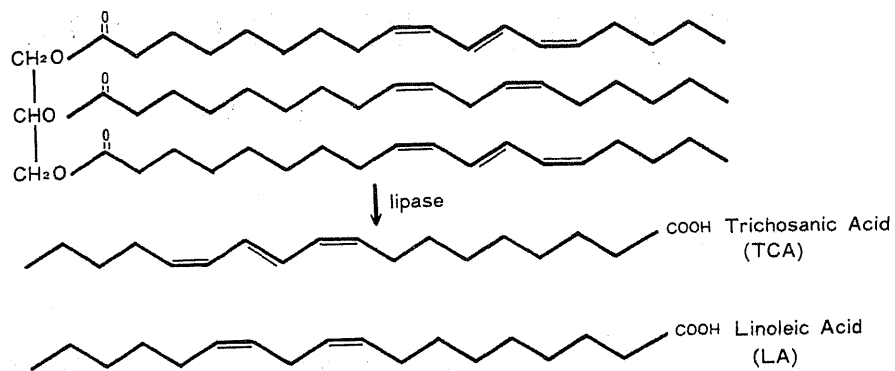


Fig.3-1 Major component (plant oil) of *Trichosanthes japonica*.

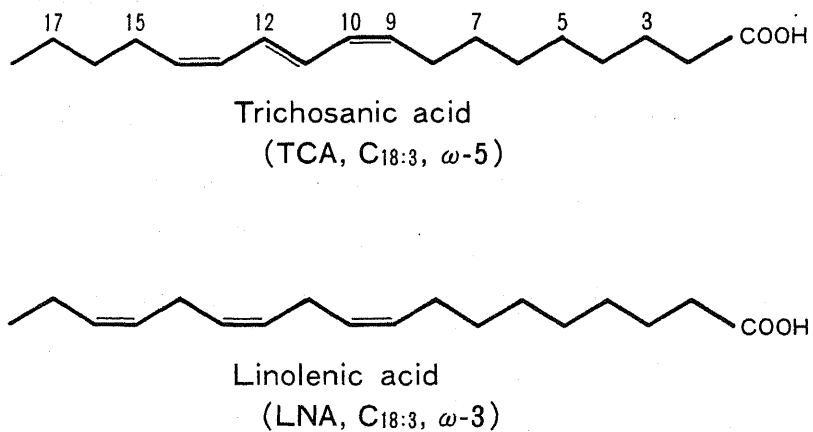


Fig.3-2 Structure of trichosanic acid (TCA) and linolenic acid (LNA).

知られており、^{76) 77) 78)} TCAもその可能性を秘めている。なかでも TCAと同じく C18:3の脂肪酸であるリノレン酸 (linolenic acid; LNA, ω -3)はすでに複数の研究者により、血小板凝集抑制作用がありその作用機序として血小板cyclo-oxygenase(CO) を阻害し、TXA₂産生を抑制することが報告されている。^{76) 78)}

(Fig. 3-2)

そこで本研究においては、TCA のヒト血小板凝集能およびAA代謝におよぼす作用を解明するにあたり、構造の類似した LNAを比較対象として用いた。

3-2 多血小板血漿 (platelet rich plasma; PRP) を用いた血小板凝集能に対する trichosanic acid (TCA)の作用 — リノレン酸 (LNA)との比較 —

【実験方法】

TCA (津村順天堂株式会社、東京) 及び LNA(Nucheck Prep.) は、エタノールに溶解して実験に用いた (終濃度; 0.4%)。エタノールのみを PRPに加えても、凝集惹起後5分間の凝集反応には全く変化がないことをあらかじめ確認した上で実験を行った。TCA 及び LNAが示す凝集抑制効果は、薬剤とのプレインキュベーション時間が3分のとき最大であるとの結果が得られたので以後、プレインキュベーションを3分間行い、その後凝集惹起剤を添加し、1-1の方法で血小板凝集能を測定した。

【結果】

ADP(1.0 μ M)、コラーゲン(0.5 μ g/ml) を凝集惹起剤とした時、TCAはいずれも濃度依存的に抑制した。TCA による代表的な凝集抑制パターンをFig. 3-3

(a), (b) に示した。ADP ($1.0\mu\text{M}$) を凝集惹起剤とした時、TCAは一次凝集、二次凝集のうち、一次凝集に比べ二次凝集をより強く抑制していた。また、コラーゲン ($0.5\mu\text{g/ml}$) を凝集惹起剤とした時、TCAによる凝集抑制は刺激後凝集が起こるまでの時間、すなわち“lag time”の延長を伴っていることが特徴的であった。LNAもADP ($1.0\mu\text{M}$)、コラーゲン ($0.5\mu\text{g/ml}$) 凝集に対して濃度依存性の抑制が認められた。Fig.3-3(c), (d)に示すように、LNAによる血小板凝集抑制パターンはTCAによるパターンとほぼ同様であった。

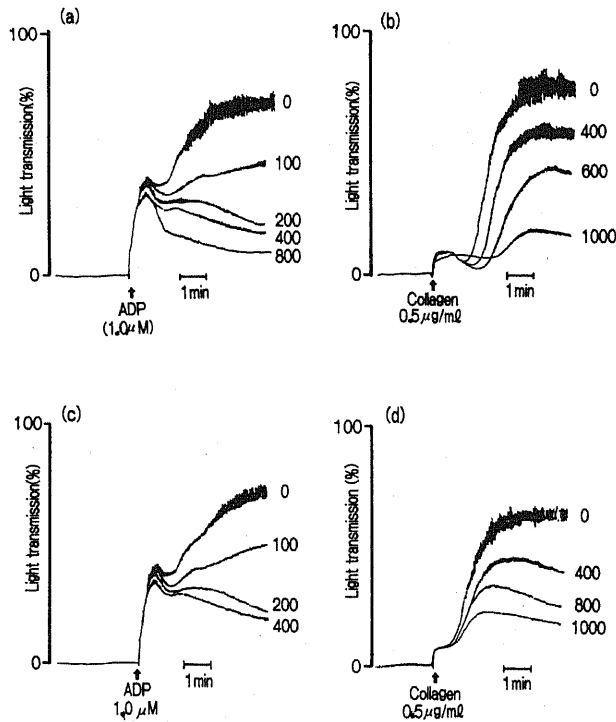


Fig.3-3 Effect of trichosanic acid (TCA) and linolenic acid (LNA) on platelet aggregation of platelet rich plasma (PRP).

The platelets were preincubated with either TCA (upper panel) or LNA (lower panel) (the final concentration in μM by each curve) for 3 min and stimulated by ADP ($1.0\mu\text{M}$) (a,c) or collagen ($0.5\mu\text{g/ml}$) (b,d).

3-3 trichosanic acid(TCA)の洗浄血小板凝集能 及びアラキドン酸代謝産物の産生に およぼす作用 ーリノレン酸 (LNA)との比較ー

【実験方法】

1-2に既述した方法に従い、ヒト洗浄血小板浮遊液($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$)を調製し、TCA および LNAの血小板凝集能におよぼす作用の検討を行い、さらに1-3の方法に従って、その時産生された血小板AA代謝産物の測定を行った。尚、血小板凝集能の測定にあたり、血小板と TCAあるいは LNAとのプレインキュベーション時間は前節と同様に3分間とした。

【結果】

TCA はコラーゲン ($50 \mu\text{g/ml}$) による洗浄血小板凝集に対し、濃度依存性の抑制作用を示した。(Fig. 3-4(a)) 最近、ある種の不飽和脂肪酸が血小板とのインキュベーションにより血小板凝集を惹起することが明らかにされた。⁷⁹⁾ しかし、今回著者の実験系において洗浄血小板と TCAのみをaggregometer cuvette中で最長10分間までインキュベーションしたが、TCAを $60 \mu\text{M}$ まで濃度を増加させても、全く血小板凝集は認められなかった。

LNA についても、コラーゲン ($50 \mu\text{g/ml}$) 凝集に対して濃度依存性の凝集抑制作用が認められた。(Fig. 3-4(b)) また洗浄血小板と LNAのみとのインキュベーションでは、TCAと同様、LNAを $60 \mu\text{M}$ まで濃度を増加させても少なくとも10分間のインキュベーションまで全く凝集反応はおこらなかった。

洗浄血小板におけるコラーゲン凝集に対する50%阻害に必要な濃度 (IC_{50}) は

TCAで $33.25 \pm 6.0 \mu\text{M}$, LNAで $28.3 \pm 2.83 \mu\text{M}$ (means \pm S. D., n=3)であり、

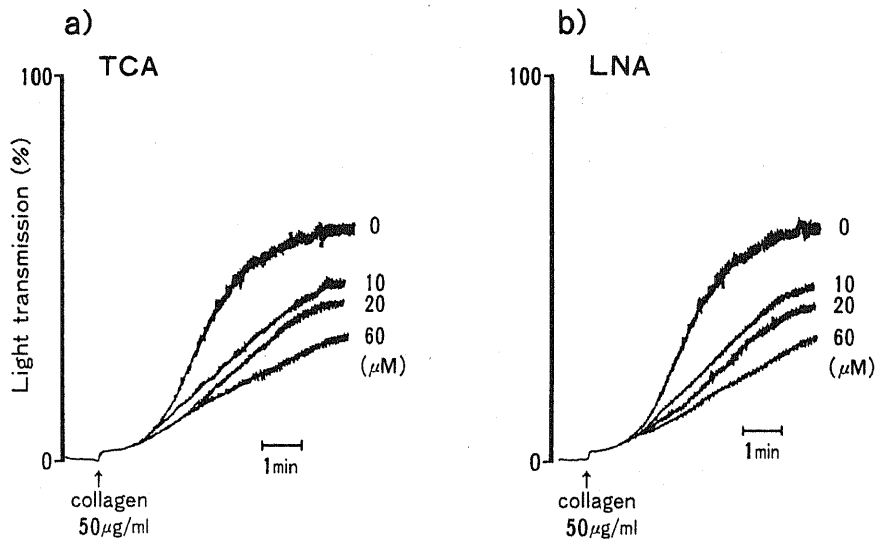


Fig.3-4 Effect of (a)trichosanic acid (TCA) and (b)linolenic acid (LNA) on collagen(50 μ g/ml)-induced washed platelet aggregation.

The platelets were preincubated with TCA or LNA (the final concentration in μ M by each curve) for 3 min and stimulated by collagen (50 μ g/ml).

両者の間には有意の差は認められなかった。

洗浄血小板浮遊液をコラーゲン (50 μ g/ml) で刺激し、凝集反応後HPLCを用いてその時産生されたAA代謝産物を測定した。その代表的なHPLCのクロマトグラムを Fig.3-5及び Fig.3-6に示した。二つのFigureから明らかなように、TCA 5 μ M前処理によってTXB₂、HHTの産生量が低下し、反対に 12-HETEの産生量が増加した。TCA前処理しない血小板を、コラーゲン (50 μ g/ml) で刺激したとき産生されたTXB₂、HHT、12-HETE量は、それぞれ 413.0 \pm 22.3、382.3 \pm 19.9、428.8 \pm 49.4ng/5 \times 10⁸ platelets (means \pm S.D., n=3)であった。次に添加する TCAの濃度の増加に伴うAA代謝産物の産生量の変動をFig.3-7(a)に示した。

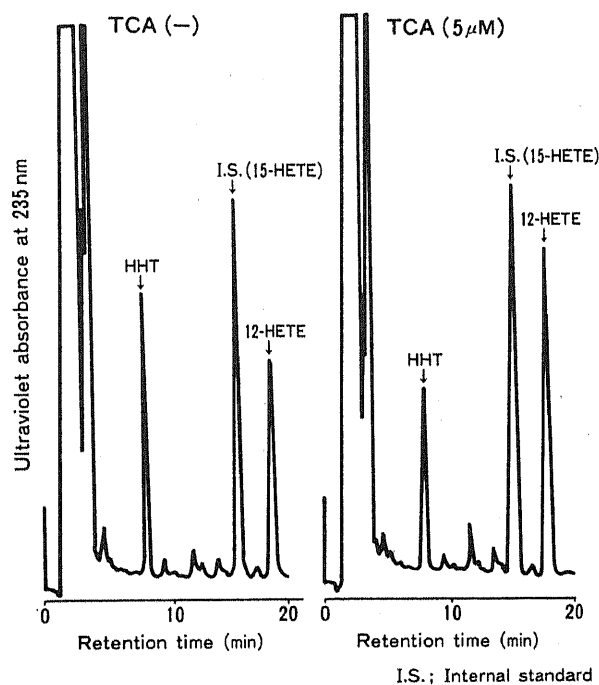


Fig.3-5 Chromatogram of HHT and 12-HETE produced by collagen (50 μ g/ml)-stimulated washed platelets.

Washed platelets ($5 \times 10^5 / \mu$ l) were stimulated by collagen (50 μ g/ml) in the absence (left) or presence (right) of trichosanic acid (TCA, 5 μ M). Samples were analyzed by RP-HPLC.

Fig.3-7(a)から明らかなように、CO系代謝産物であるTXB₂, HHTの産生は、TCAにより濃度依存的に抑制され、60 μ MのTCAでは、これらの代謝産物の産生がほぼ完全に抑えられた。さらに、TCAによる血小板凝集の低下とTXA₂の代謝産物であるTXB₂産生量の低下との間には正の相関関係が認められた。(Fig.3-8)

一方、12-LO系代謝産物である12-HETEの産生量は、TCAの比較的低濃度(約30 μ Mまで)では増加することが認められた。さらにTCAの濃度が増加すると、12-HETE産生量は次第に減少し、TCA 60 μ MではほとんどTCA無添加のレベルまで戻った。

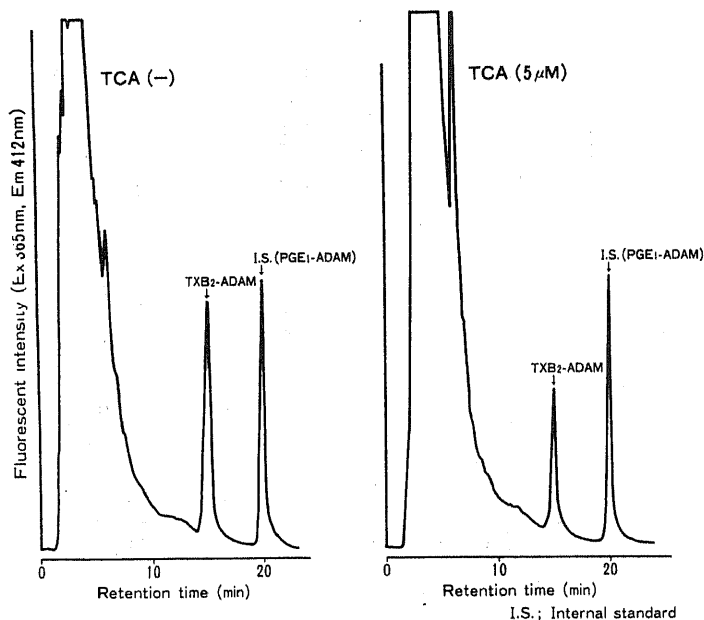


Fig.3-6 Chromatogram of ADAM-derivatized TXB₂ produced by collagen(50μg/ml) -stimulated washed platelets.

Samples in the absence (left) or presence (right) of trichosanic acid (TCA, 5μM) were analyzed by SP-HPLC.

LNAの、コラーゲン刺激時の血小板AA代謝産物の産生におよぼす作用について検討したところ、TCAとほぼ同様の成績が得られた。すなわちFig.3-7(b)に示すごとく、LNAもCO系代謝産物(TXB₂及びHHT)の産生を濃度依存的に抑制した。

また、LNAの比較的低濃度(約30μMまで)で12-HETEの産生は一過性に増加した。TCAのTXB₂、HHT産生に対するIC₅₀の値はそれぞれ6.50±0.94μM及び5.73±0.64μM(means±S.D., n=3)であり、LNAの対応するそれぞれのIC₅₀の値は7.46±0.55μM及び4.86±0.20μM(means±S.D., n=3)であった。このように、TXB₂産生及びHHT産生におよぼす抑制力価は、TCAとLNAのIC₅₀の値に有意差は認められなかった。

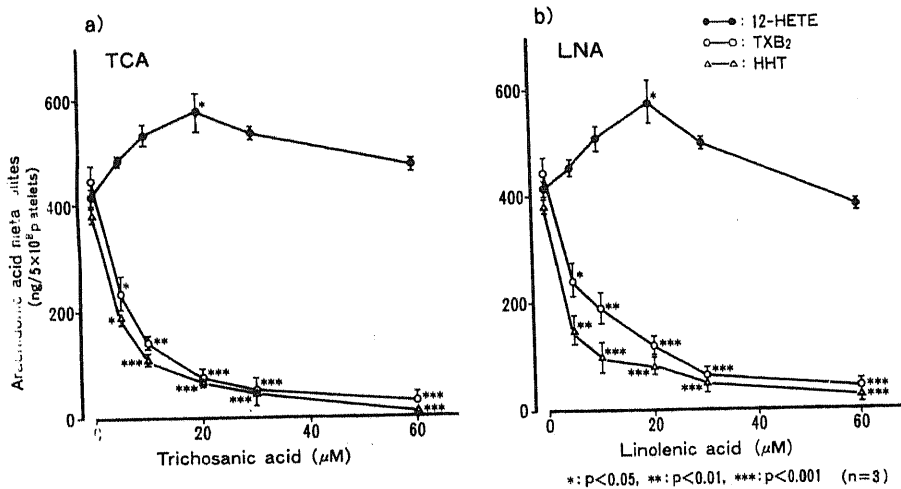


Fig.3-7 Effect of (a)trichosanic acid (TCA) and (b)linolenic acid (LNA) on the formation of arachidonic acid(AA) metabolites in collagen(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-stimulated washed platelets.

Vertical bars mean standard deviations(S.D.). Values are means \pm S.D. ng/5x10⁸ platelets obtained from three experiments. Significant difference from control represents *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

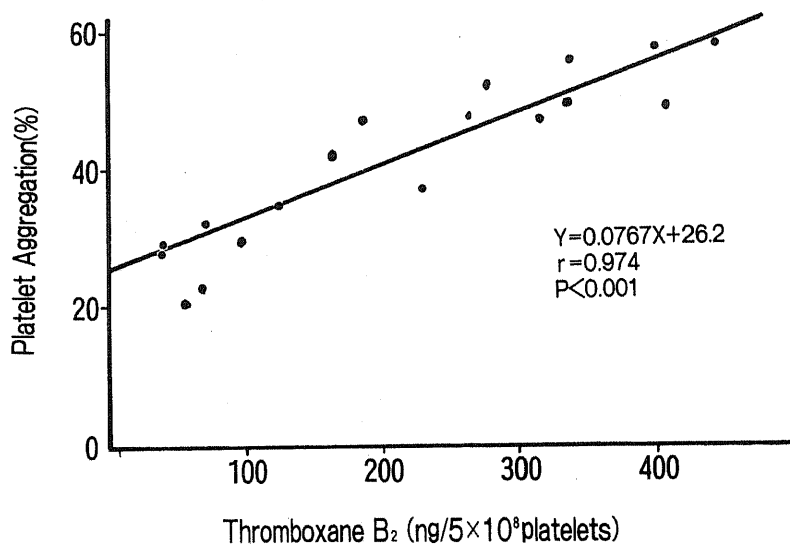


Fig.3-8 Correlation between thromboxane B₂ (TXB₂) formation and washed platelet aggregation induced by collagen (50μg/ml).

3-4 trichosanic acid (TCA)のヒト洗浄血小板での 外因性 [¹⁴C]アラキドン酸代謝におよぼす作用 ーリノレン酸 (LNA)との比較ー

TCAは血小板CO系に対して強い阻害作用を有する可能性が示唆されたが、この点についてさらに詳細に検討するため、洗浄血小板に外因性に添加した [¹⁴C]AAの代謝におよぼす TCAの作用について検討を加えた。

【実験方法】

外因性の [¹⁴C]AAを加える前に、TCAあるいは LNAと血小板とのインキュベーションを3分間行った。さらに1-4で既述した方法に従って実験を行い、 [¹⁴C]AA代謝産物を測定した。

【結果】

Fig.3-9(a)に結果を示した。TCAの添加濃度の増加に伴い、TCA100 μ MまでCO系代謝産物である [14 C]TXB₂及び [14 C] HHTの産生は、濃度依存的に低下した。しかし [14 C]AAから [14 C]12-HETE の産生は、逆にTCA100 μ Mまで濃度依存的に増加した。

一方、TCAの代わりに LNAを用いた場合もほぼ同様な成績が得られた。(Fig. 3-9(b))

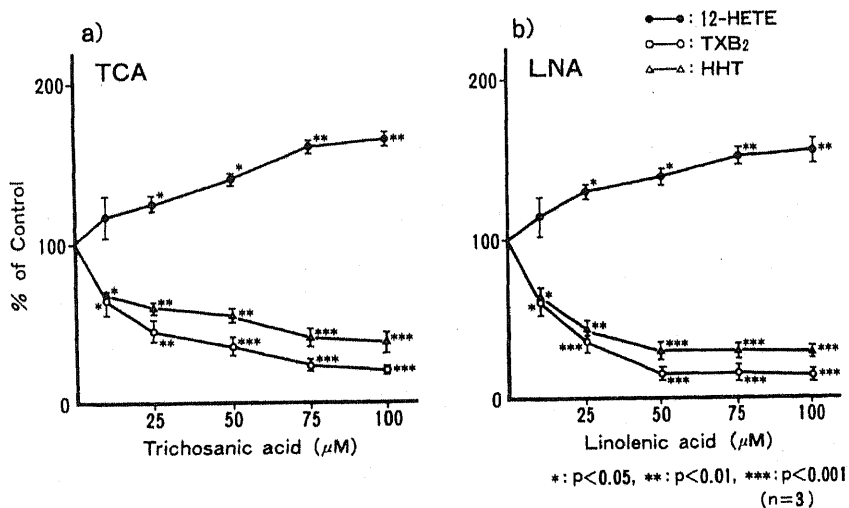


Fig.3-9 Effect of (a)trichosanic acid (TCA) and (b)linolenic acid (LNA) on the metabolism of exogenously added [14 C]arachidonic acid ([14 C]AA) in washed platelets.

Washed platelets ($10^6/\mu$ l) were incubated with [14 C]AA and unlabeled AA for 5 min in the absence or presence of TCA or LNA. After incubation, [14 C]AA metabolites were extracted and analyzed. Vertical bars mean standard deviations(S.D.) obtained from three experiments. Significant difference from control represents * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3-5 考 察

ある種の多価不飽和脂肪酸が血小板凝集抑制作用を有することは以前より明らかにされている^{76) 77) 78)} が、なかでも TCAと同じく C18:3である LNAについては、血小板凝集抑制作用を示すことが古くから知られておりその作用機序についても詳細に検討されている。^{76) 78)} そこで、血小板機能におよぼす作用についての報告が今まで全くない TCAの研究を進めるにあたって、構造の類似した LNAを比較対象とすることにより、TCAの血小板凝集及びAA代謝におよぼす作用がより一層明確になるのではないかと考え一連の研究を行った。

まず、ADP (1.0 μ M) 及びコラーゲン(0.5 μ g/ml) による PRP凝集に対して、TCA、LNA はいずれも濃度依存性の抑制を示し、しかも両者の血小板凝集抑制パターンはほぼ同様であったことから、TCAは LNAと同じく血小板凝集抑制作用を有することが明らかとなった。またこの時 LNAのみならず TCAは、AA代謝への依存性が高いといわれる ADP惹起の二次凝集⁶⁶⁾ を、一次凝集に比べより強く抑制した。このことは、TCAが血小板AA代謝に何らかの作用をおよぼしている可能性を示唆している。

そこで、3節以下においてTCAの血小板凝集抑制作用の機序を明らかにする目的で、洗浄血小板を用いて血小板凝集能及びAA代謝におよぼす作用をLNAの作用と比較し検討した。洗浄血小板を用いた場合においても、PRP凝集と同じく、TCAは LNAと同様にコラーゲン凝集を濃度依存的に抑制した。しかも注目すべきことには、血小板AA代謝産物のうちCO系のTXB₂、HHTの産生に対して、いずれも濃度依存性の抑制作用を示した。このとき血小板凝集能及びCO系代謝産物の産生に対する TCAのIC₅₀の値は、LNAのそれぞれに対するIC₅₀の値ときわめて近似しており、これら二つの多価不飽和脂肪酸がほぼ同等の力価をもって血小板凝集だけでなく、AA代謝に対し抑制作用を示す可能性が考えられた。また一方、

TCAによる血小板凝集の抑制とTXB₂産生の低下との間には正の相関関係が認められた。TXB₂の前駆体であるTXA₂は強力な血小板凝集作用を有することはすでによく知られており²⁾、血小板凝集に深く関わっている。⁸⁰⁾従って、TCA及びLNAによる血小板凝集の抑制作用の機序の一つとして、TXA₂産生の低下が非常に重要な因子として働いている可能性が示唆された。TCA及びLNAは、コラーゲン刺激時にみられる血小板膜リン脂質のAAすなわち内因性のAAから産生されるTXB₂、HHTの量を濃度依存的に抑制しただけでなく、外因性の[¹⁴C]AAを血小板に加えた時の[¹⁴C]TXB₂及び[¹⁴C]HHTへの代謝を濃度依存的に抑制した。従って、これら二つの多価不飽和脂肪酸は血小板CO系を抑えて結果的にAA代謝を抑えているのではないかと考えられた。ところでLNAについては既にPace-Asciakら⁸¹⁾、Zibohら⁸²⁾、Srivastavaら⁸³⁾により、LNAが血小板COを阻害することによってTXA₂産生を低下させ、血小板凝集抑制作用を示すことが明らかにされている。今回、TCAの血小板凝集能及び血小板AA代謝におよぼす作用は、LNAと比較して抑制パターン、抑制力価のいずれをとってもほぼ同じであった。以上の成績から、TCAの血小板凝集抑制作用発現の機序もLNAと同様に血小板COの阻害であり、このためTXA₂産生が低下したのであろうと思われる。

CO系代謝産物の産生が抑制されたのとは反対に、TCA及びLNAは血小板に外因性に加えた[¹⁴C]AAから[¹⁴C]12-HETEへの代謝を濃度依存的に増加させた。これは、おそらくTCA及びLNAがCOを抑制したため、代謝されなかった余剰の[¹⁴C]AAが12-LO系に流れ代謝されたものと考えられる。一方、コラーゲンで刺激した血小板では、この12-HETE産生の増加はTCA、LNAの比較的低濃度添加の時のみに認められ、添加する脂肪酸の濃度が増加するにつれ内因性AAからの12-HETE産生はそれ以上増加せずむしろ低下しTCA、LNA無添加のレベルまで戻った。

この場合、12-HETEの前駆体であるAAは、血小板膜リン脂質に存在していた内因性のAAでありコラーゲン刺激により膜リン脂質から遊離され12-LOで代謝され

たものである。この点が外因性に [¹⁴C]AAを添加した実験とは根本的に異なる点である。この二つの多価不飽和脂肪酸の高濃度添加によって、内因性AAからの 12-HETE産生の亢進が見られなくなった理由は未だ明らかではない。多価不飽和脂肪酸の一つであるリノール酸の高濃度では、COのみならず血小板膜リン脂質からのAA遊離を抑制するとの報告がある。⁸⁴⁾ 従って、高濃度の TCA及び、LNA もまた、血小板膜リン脂質からのAA遊離を抑制しているのではないかと考えられた。

TCA の構造は、9-cis、11-trans、15-cis不飽和脂肪酸であり、LNAは9、12、15-all cis 不飽和脂肪酸である。McIntyreらは、C18:2、C18:3を含む cis 多価不飽和脂肪酸はヒト血小板において血小板凝集抑制作用を示しTXB₂産生を低下させるが、trans多価不飽和脂肪酸ではそのような作用のないことを報告している。⁸⁵⁾ 今回著者は、TCAが二重結合を一つ含む trans多価不飽和脂肪酸であるにもかかわらず、all cis 不飽和脂肪酸である LNAとほぼ同等の力価をもって血小板凝集抑制作用を有していることを明らかにした。ここにMcIntyreらの成績との矛盾点が存在するが、この点については今後の研究を待たなければならない。

今回の成績から、TCAは血小板凝集抑制作用を有し、その力価は LNAとほぼ同等であることが明らかとなったが、これはおそらく LNAと同様血小板COを阻害するためと考えられた。血小板凝集抑制作用を有する TCAは、今後虚血性疾患の予防や治療上、有用なものになっていく可能性を秘めており、TCAを用いての *in vivo*の研究が必要と考えられる。

第4章 魚脂中に多量に含まれる エイコサペンタエン酸 (EPA)の 血小板凝集能及び 血小板アラキドン酸代謝に およぼす作用 (in vitro および ex vivo)

4-1 はじめに

強力な血小板凝集作用を有するTXA₂の前駆体であるAAは、血小板膜リン脂質中に存在する脂肪酸であることから、摂取する脂質の種類によっては血小板のAA代謝が影響をうけ血小板凝集抑制作用を示す可能性がある。本章で取上げたのは、和漢生薬から得られる薬物ではなく、自然界特に海獣類魚類の脂質中に多く含まれる多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid, EPA)である。EPAは近年、抗血栓、抗動脈硬化作用を有する薬物の一つとして注目をあびている。^{30) 31) 32) 33) 34) 35) 36) 86) 87) 88)} EPAの抗血小板作用については1970年代よりDyerbergらの、グリーンランドエスキモー人に関する疫学調査を中心に一連の報告がなされてきた。^{30) 31)} 彼等は、海獣類、魚類を多食するエスキモー人では欧米の白人に比べ著しく血栓性疾患の罹患率の低いことをあげ、その理由として海産動物中に多く含まれるEPAの摂取により血小板凝集能が低下している可能性を報告した。

EPAはAAと同様炭素数20であり、5つの二重結合を有する ω -3系の多価不飽和脂肪酸である。血小板では、AAと同じくC0及び12-L0によって代謝をうけるこ

とが知られている⁸⁹⁾ (Fig. 4-1)。すなわち、C0系からはTXA₃を経てTXB₃が産生される。またC0系からは、malondialdehydeと共に12-hydroxyheptadecatetraenoic acid(HHTE)も産生される。12-L0系からは、12-hydroperoxy-eicosapentaenoic acid(12-HPEPE)を経て12-hydroxyeicosapentaenoic acid(12-HEPE)が産生される。

EPAの抗血小板作用の機序としてはいくつか挙げられるが^{37) 38) 39) 40)}、EPAの代謝産物自身の血小板機能におよぼす作用についてはNeedlemanらによって、EPAのC0系代謝産物であるTXA₃は、AA由来のTXA₂と異なり血小板凝集促進作用をもたないことが挙げられてきた。³⁸⁾しかしながら、EPAの12-L0系代謝産物の血小板機能におよぼす作用については今まで全く報告がない。

ところで、EPAの血小板での代謝については、Hambergらによって明らかにされたように、主要な代謝産物はC0系代謝産物ではなく12-L0系代謝産物である。⁸⁹⁾Aharonyら¹²⁾、Siegelら¹³⁾は、AAの12-L0系の中間代謝産物である12-HPETEが血小板凝集抑制作用を示すことを明らかにしている。そこで、血小板におけるEPAの主要な代謝産物である12-L0系代謝産物が血小板機能に何らかの作用をおよぼすのではないかと考え以下の検討を行った。

まず、EPA及びAA由来の12-L0系代謝産物を生合成し、血小板機能におよぼす作用を検討した。次に、健常人に高純度に精製したEPAエチルエステル(EPA-E)を投与し、血小板膜リン脂質中のEPA量の変動、ならびに血小板刺激時のAA及びEPA代謝産物の産生量の変化から、EPAの抗血小板作用発現への12-L0系代謝産物の寄与の可能性を探った。

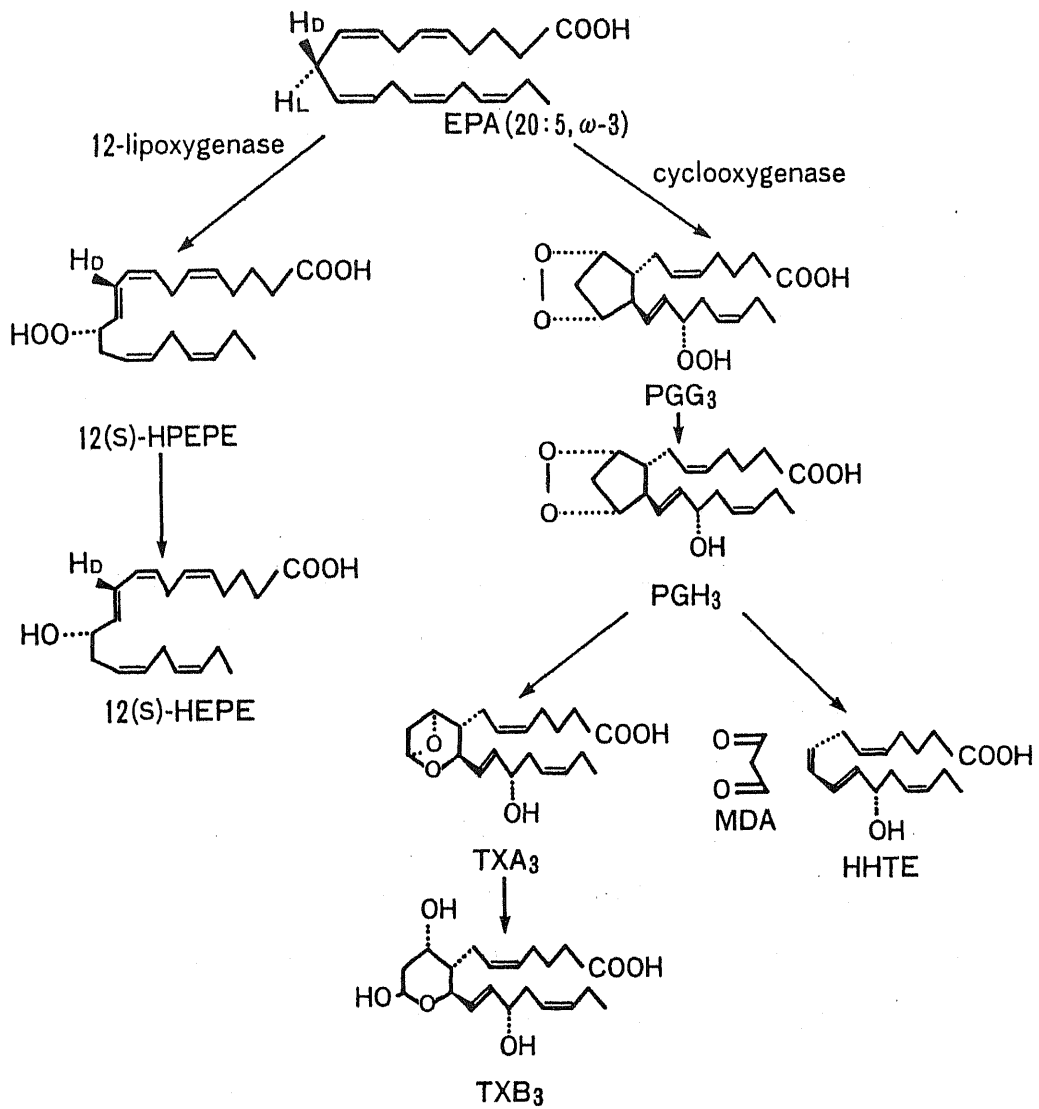


Fig.4-1 Metabolism of eicosapentaenoic acid (EPA) in human platelets.

4-2 EPAの血小板 12-リポキシゲナーゼ(L0)系 中間代謝産物である 12-hydroperoxyeicosapentaenoic acid (12-HPEPE)の血小板凝集能 及びセロトニン放出におよぼす作用

【実験方法】

AA及び EPA由来の 12-L0系代謝産物は、Goetzlらの方法⁴⁸⁾ に準じAA及びEPA(日本水産株式会社, 東京, purity>99%)を基質として、ヒト血小板ホモジネートとのインキュベーションにより生合成した。メタノールにて生成物を抽出後、逆相(RP)及び順相(SP)-HPLCにて分離精製し、AA由来の12-HPETE、EPA由来の12-HPEPEを得た。また、AA由来の12-HETE、EPA由来の12-HEPEはCampらの方法⁴⁹⁾ に準じ、NaBH₄によって12-HPETE及び12-HPEPEの還元反応により調製した後、SP-HPLCを用いて精製した。これらの物質はジアゾメタンによるメチル化反応後、トリメチルシリル化し⁵⁰⁾、gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)にて同定した。Fig.4-2には12-HEPEの mass spectrumを示した。

血小板凝集能及びセロトニン放出を測定するために、まずセロトニン標識洗浄血小板浮遊液($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$)をJerushalmyらの方法⁹⁰⁾ に準じて調製した。すなわち、PGI₂-Naを用いての採血後得られたヒト PRPに、[2-¹⁴C] 5-hydroxy-tryptamine binoxalate ([¹⁴C]5-HT、セロトニン、50mCi/mmol, New England Nuclear)を0.25 $\mu\text{Ci/ml}$ 加えて37.5 $^{\circ}\text{C}$ にて30分間インキュベーションすることによって、[¹⁴C]5-HTを血小板に取込ませた。ついで、1-5に既述した方法に従い [¹⁴C]5-HT標識血小板浮遊液($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$)を調製した。この [¹⁴C]5-HT標識血小板浮遊液をaggregometer cuvette中で、AA(5 μM)あるいはコラーゲン(10 $\mu\text{g/ml}$)の凝集惹起剤を加え血小板凝集能を測定後、Costaらの方法⁹¹⁾ に

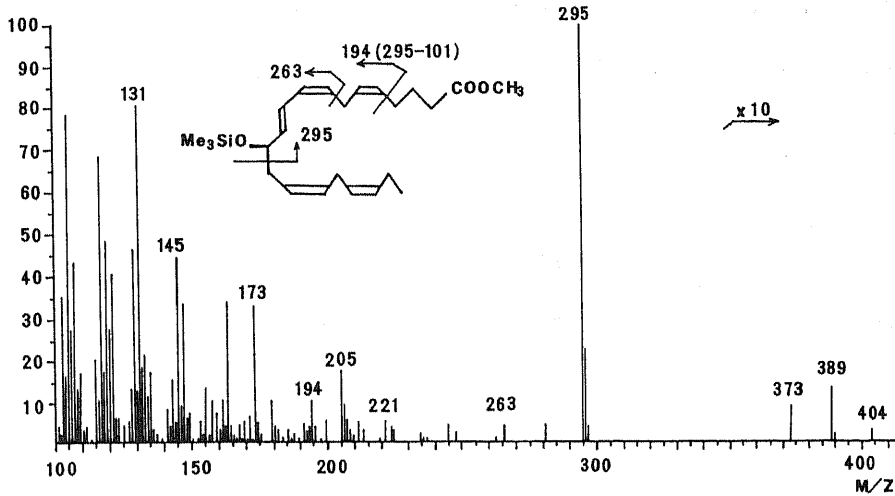


Fig.4-2 Mass spectrum of methylester trimethylsilyl derivative of 12-HEPE.

従ってホルムアルデヒド（終濃度； 1.5%）で反応停止させ、4℃にて20分間遠心分離（1800×g）後、上清の放射活性を測定することによりセロトニン放出率を算出した。

血小板凝集及び、セロトニン放出への最大抑制効果は、凝集惹起剤を加える直前に12-HPETE及び12-HPEPEを添加した場合に認められた。そこで今回の実験では、血小板凝集惹起の直前にこれら 12-hydroperoxides（エタノールに溶解，終濃度； 0.2%）を添加した。

【結果】

AA(5 μ M)を凝集惹起剤とした時、12-HPETE及び12-HPEPEのいずれも1~10 μ Mの濃度で血小板凝集を濃度依存的に抑制した。(Fig. 4-3) 12-HPETE、及び12-HPEPEは血小板凝集のみならず、セロトニン放出も濃度依存性の抑制作用を示した。(Fig.4-4(a)) 50%阻害に要する12-HPETE、及び12-HPEPEの濃度(IC₅₀)を算出すると、血小板凝集に対するIC₅₀の値は5.0 μ M(12-HPETE)と4.8 μ M(12-HPEPE)であり、またセロトニン放出に対するIC₅₀の値は1.8 μ M(12-HPETE)と1.5 μ M(12-HPEPE)であり、両者に有意の差は認められなかった。一方、安定

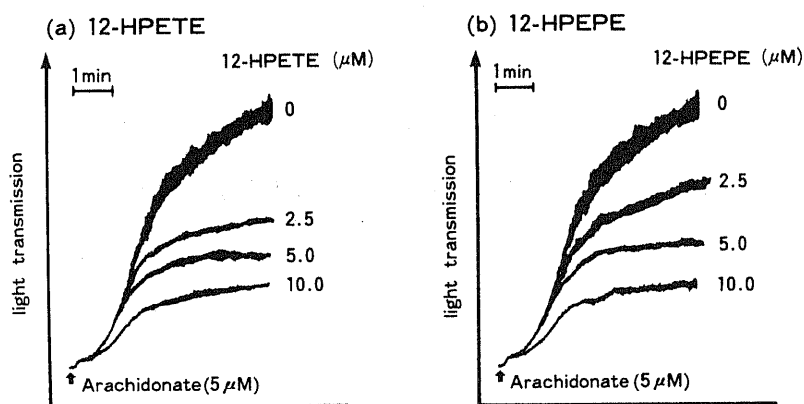


Fig.4-3 Effect of 12-HPETE and 12-HPEPE on AA (5 μ M)-induced washed platelet aggregation.

A suspension of washed human platelets ($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$) was stimulated by 5 μ M AA for 5 min in the absence or presence of (a) 12-HPETE or (b) 12-HPEPE (the final concentration in μ M by each curve).

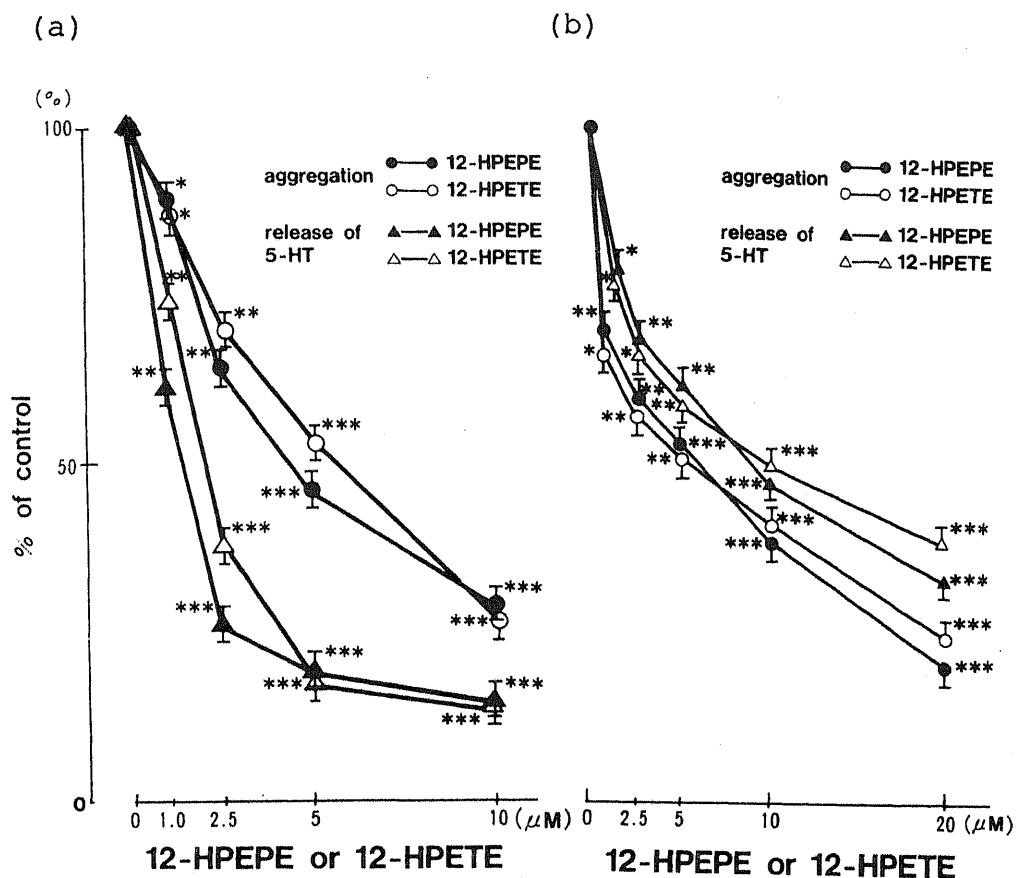


Fig.4-4 Effect of 12-HPETE and 12-HPEPE on (a)AA- or (b)collagen-induced washed platelet aggregation and 5-HT release.

A suspension of washed human platelets ($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$) was stimulated by $5 \mu\text{M}$ AA (a) or $10 \mu\text{g/ml}$ collagen (b) in the absence or presence of 12-hydroperoxides (12-HPETE or 12-HPEPE) for 5 min. Aggregation (o 12-HPETE, ● 12-HPEPE) and 5-HT release (Δ 12-HPETE, \blacktriangle 12-HPEPE) were expressed as % of control values (no hydroperoxides). Results were obtained in triplicate assay using the same bath of washed platelets and the data shown here are of one experiment representative of four. Each value was expressed as means + S.D. (standard deviations) % of platelet aggregation and 5-HT release. Significant difference from control represents *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

な 12-LO系の代謝産物である 12-HETE及び 12-HEPEの血小板機能におよぼす作用を検討したところ、血小板凝集に対する IC_{50} の値は $24\mu M$ (12-HETE)と $25\mu M$ (12-HEPE)であり、またセロトニン放出に対する IC_{50} の値は $8\mu M$ (12-HETE)と $7.5\mu M$ (12-HEPE)であった。 12-HETE及び 12-HEPEは、12-HPETE及び12-HPEPEと比較して、かなり血小板機能に対する抑制作用の弱いことが明らかとなった。 コラーゲン凝集 ($10\mu g/ml$) を凝集惹起剤とした場合も、12-HPETE及び12-HPEPE は血小板凝集及びセロトニン放出を濃度依存的に抑制した。(Fig. 4-4(b))

血小板凝集に対する IC_{50} の値は12-HPETEで $5.8\mu M$ 、12-HPEPEで $6.0\mu M$ であった。 またセロトニン放出に対する IC_{50} の値は12-HPETEで $9.3\mu M$ 、12-HPEPEで $9.5\mu M$ であった。 いずれの場合も、両者の間に有意差は認められなかった。 一方、12-HETE、12-HEPEの抑制効果はかなり弱く、12-HETE、12-HEPEのそれぞれの IC_{50} の値は、血小板凝集に対しては $28\mu M$ と $26\mu M$ 、セロトニン放出に対しては $48\mu M$ と $45\mu M$ であった。

12-HPETE及び12-HPEPEのAA凝集及びコラーゲン凝集に対する IC_{50} の値はほとんど同じであったが、セロトニン放出に関してはコラーゲンで凝集惹起した場合のほうが、AAで凝集を惹起した場合と比較して12-HPETE及び12-HPEPEの IC_{50} の値が高いという成績が得られた。

4-3 血小板凝集能及びセロトニン放出におよぼす AA及び EPA由来の5-, 12-, 15-hydroperoxides の作用

前節において EPA由来の12-HPEPEが、AA由来の12-HPETEとほぼ同等の力価をもって血小板機能（血小板凝集能及びセロトニン放出）を抑制することを明らかにした。これら両者の共通点は、その12位にhydroperoxy (-OOH)基が結合したモノヒドロペルオキシ酸であるという点にある。一方、12位にhydroxy (-OH)基の結合した12-hydroxidesは抑制作用がかなり弱いことから、血小板機能の抑制にはhydroperoxy基が重要な役割を果たしているものと考えられる。では、他の位置にhydroperoxy基の結合したAA及びEPA由来のモノヒドロペルオキシ酸の血小板機能におよぼす作用はいかなるものであろうか。そこで、12-hydroperoxidesの他にAA及びEPA由来の5位及び15位にhydroperoxy基を有するhydroperoxidesを生合成し、血小板機能におよぼす作用を検討した。

【実験方法】

5-HPETEと5-HPEPEは Shimizuらの方法⁹²⁾ に準じ、potatoから粗精製された5-lipoxygenaseを用いて、AA及びEPAとのインキュベーションによって生合成した。15-HPETEと15-HPEPEはWongらの方法⁵¹⁾ に準じ、soybean lipoxygenase (Sigma)を用いて、AA及びEPAとのインキュベーションによって生合成した。これらの物質は、RP及びSP-HPLCにより分離精製した。さらに、これらのhydroperoxidesの同定はCampらの方法⁴⁹⁾ に準じNaBH₄により還元し各々hydroxidesとした後、ジアソメタンによるメチル化反応後、トリメチルシリル化しGC-MSにより行った。Fig. 4-5には5-HEPEの、Fig. 4-6には15-HEPEのGC-MSのmass spectrumを示した。

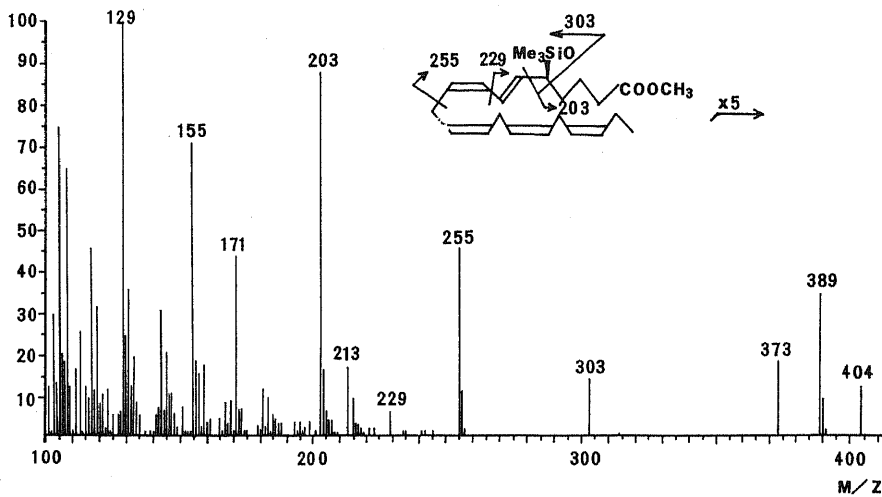


Fig.4-5 Mass spectrum of methylester trimethylsilyl derivative of 5-HEPE.

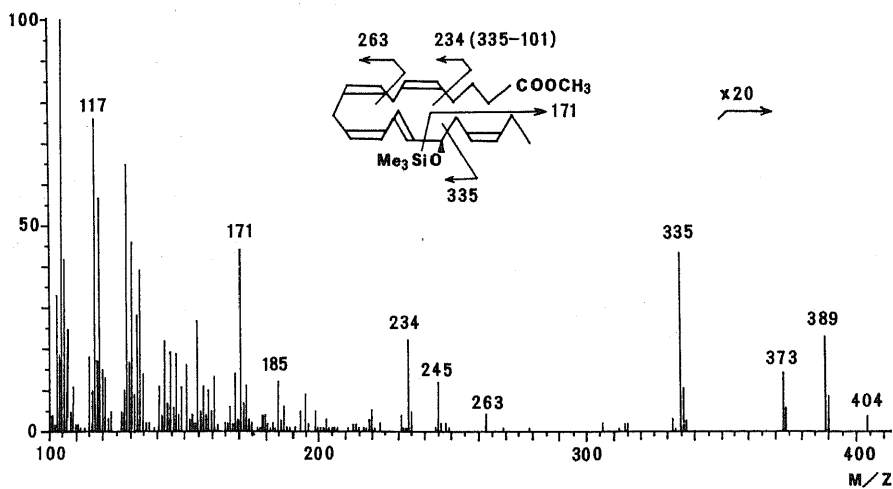


Fig.4-6 Mass spectrum of methylester trimethylsilyl derivative of 15-HEPE.

前節と同様に調製したセロトニン($[^{14}\text{C}]$ 5-HT)標識血小板浮遊液($5 \times 10^5 / \mu\text{l}$)を用いて、血小板機能(血小板凝集能及びセロトニン放出)におよぼす hydroperoxides の作用を検討した。

【結果】

いずれの5-及び 15-hydroperoxidesも血小板機能(血小板凝集およびセロトニン放出)を濃度依存的に抑制した。Table4-1には、血小板凝集及びセロトニン放出に対する50%阻害に必要なhydroperoxidesの濃度(IC_{50})を示した。各種hydroperoxidesの力価は、Tableに示した如く hydroperoxy基の結合する位置によって異なっており、12-, 15-, 5-位のhydroperoxidesの順に抑制作用は減弱した。興味深いことに、AA及び EPA由来のhydroperoxidesは、hydroperoxy基の位置が同じならば前駆体の脂肪酸の違いにかかわらず、ほぼ同等の抑制力価を有していた。

4-4 in vitroの系における12-HPETE, 12-HPEPEの血小板凝集抑制に対する相加効果

EPAの投与により、ヒトの血小板膜リン脂質中の EPA含量が増加することが報告されている。^{38) 39)} EPAの増加した血小板が活性化をうけると、膜リン脂質からAAのみならず EPAも遊離され、その結果AA由来の12-HPETEとともに、EPA由来の12-HPEPEが産生されることが考えられる。その際、これら 12-hydroperoxidesが共存すると両者の血小板機能におよぼす抑制作用は変化する可能性が考えられる。そこで、12-HPETEと12-HPEPEが同時に存在した時の血小板凝集能におよぼす作用について検討した。

Table 4-1

Ability of HPETE's and HPEPE's to inhibit washed human platelet aggregation and 5-HT release.

stimulant	hydro- peroxides	concentration of half maximal inhibition	
		aggregation (μM)	release of 5-HT (μM)
AA (5 μM)	5-HPETE	12.4 \pm 1.86]	3.5 \pm 0.61]
	12-HPETE	5.0 \pm 0.85]	1.8 \pm 0.30]
	15-HPETE	7.6 \pm 1.06]	2.4 \pm 0.39]
	5-HPEPE	13.8 \pm 2.76]	3.7 \pm 0.46]
	12-HPEPE	4.8 \pm 0.82]	1.5 \pm 0.29]
	15-HPEPE	9.2 \pm 1.47]	2.1 \pm 0.35]
collagen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	5-HPETE	12.3 \pm 2.02]	22.0 \pm 3.52]
	12-HPETE	5.8 \pm 1.07]	9.3 \pm 1.74]
	15-HPETE	8.7 \pm 1.39]	15.0 \pm 2.47]
	5-HPEPE	14.4 \pm 1.80]	24.0 \pm 4.44]
	12-HPEPE	6.0 \pm 1.00]	9.5 \pm 1.84]
	15-HPEPE	9.6 \pm 1.53]	16.0 \pm 2.64]

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

A suspension of washed human platelets ($5 \times 10^5/\mu\text{l}$) was stimulated by 5 μM AA or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ collagen in the presence of various hydroperoxides for 5 min and the maximal aggregation and 5-HT release were determined. Data are expressed as the concentration required for the half maximal inhibition of platelet aggregation and 5-HT release. Each value in the table is the result of four separate experiments and is expressed as means \pm S.D. (standard deviations) μM .

【実験方法】

血小板凝集に対して約50%の阻害作用を示す 12-hydroperoxidesの濃度は5 μ

Mであることから、12-hydroperoxidesの総量、すなわち12-HPETEと12-HPEPEの和を5 μ Mに保った条件で12-HPETE及び12-HPEPEのそれぞれの比率を変え血小板凝集能におよぼす作用を検討した。

【結果】

Table 4-2には、AA(5 μ M) による血小板凝集におよぼす12-HPETE及び12-HPEPE添加時の阻害 (%) を示した。12-HPETE及び12-HPEPEの比率を変化させても総量に変化がなければ、血小板凝集の抑制効果は常に一定であった。これは、12-HPETE、12-HPEPEはお互いに相加的に働くことを示している。コラーゲンを凝集惹起剤とした時も同様な成績が得られた。

Table 4-2

Additive effect of 12-HPETE and 12-HPEPE on AA-induced platelet aggregation.

12-HPETE (μ M)	12-HPEPE (μ M)	inhibition (%)
0	0	0
0	5	53 \pm 2.1
1	4	54 \pm 2.5
2	3	49 \pm 1.7
3	2	51 \pm 1.2
4	1	52 \pm 2.2
5	0	48 \pm 1.8

A suspension of washed human platelets ($5 \times 10^5 / \mu$ l) was stimulated by 5 μ M AA in the presence of 5 μ M of 12-HPETE, 12-HPEPE, or a mixture of both for 5 min and the maximal aggregation was determined. Each data was obtained from three separate experiments and expressed as means \pm S.D. (standard deviations) of % inhibition.

4-5 高純度に精製した EPAエチルエステルを 投与した前後における、ヒト血小板刺激時に 産生されるアラキドン酸(AA)ならびに エイコサペンタエン酸 (EPA)代謝産物の変動

前節までにおいて、in vitroの系で EPAのヒト血小板での主要な代謝産物である12-HPEPEには、AA由来の12-HPETEと同等の血小板凝集抑制作用のあることを明らかにした。そこで、EPA投与時の血小板凝集能低下の機序の一つとして12-HPEPE が関与するか否かを明らかにする目的で、健常人に一定期間高純度に精製した EPAエチルエステルを投与し、その前後において血小板刺激時に産生されるAA及び EPA由来の代謝産物の分析を行った。

【実験方法】

健常人男子11名に、ソフトカプセルに充填したEPA-エチルエステル(EPA-E, 300mg/cap., 純度; 90%, 日本水産株式会社)を3.6g/day、4週間服用させた。

服用前後において1-2に既述した方法に従って洗浄血小板浮遊液($10^6/\mu\text{l}$)を調製し、トロンビン(1U/ml, 持田製薬株式会社; 東京)または、コラーゲン(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で5分間刺激後、等量のメタノールを加え反応停止を行った。

Hirai らの方法⁴⁵⁾に基づいてAA及び EPAの代謝産物(プロスタノイド)をHPLCを用いて測定した。また、EPA-E投与前後における血小板リン脂質中のホスファチジルコリン(phosphatidylcholine, PC)、ホスファチジルエタノールアミン(phosphatidylethanolamine; PE)、ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol; PI)分画の脂肪酸構成の変動は、小沢らの方法⁹³⁾に従い次元薄層クロマトグラフィー(TLC)による分離後三フッ化ホウ素によるメチル化反応をへて、ガスクロマトグラフィーによって測定した。

【結果】

EPA-E投与前後での血小板刺激時に産生されるプロスタノイドは RP-及び SP-HPLCを用いて測定されたが、その際の代表的な RP-及び SP-HPLCのクロマトグラムを Fig. 4-7に示した。 RP-HPLCでは、AA代謝産物のうち HHTと 12-HETEが、また EPA代謝産物のうち HHTEと 12-HEPEが検出される。 EPA-E投与後の血小板刺激時のプロスタノイド産生は投与前と比べ、HHTと 12-HETEの産生低下と EPA代謝産物のうち 12-HEPEの産生増加が著しい(Fig. 4-7(a)(b))。 SP-HPLCでは TX (TXB₂+TXB₃)が検出されるが、EPA-E投与によりTXの産生は低下している(Fig. 4-7(c)(d))。さらに、TXB₂とTXB₃は RP-HPLCによって分離、測定される。EPA-E投与によりTXB₂の産生は低下するが、EPA-E投与前のTXB₃産生はTXB₂産生に比べかなり少量であり投与後の産生の増加もあまり顕著ではない(Fig. 4-7(e)(f))。EPA-E投与前後でのトロンビン (1U/ml)刺激時の血小板プロスタノイド産生をTable 4-3に示した。EPA-E投与前後にみられる、血小板刺激時に産生される各種プロスタノイドの主な変動としては、EPA代謝産物については 12-HEPE産生の著しい有意の増加であり、EPAのC0系代謝産物であるHHTEとTXB₃の産生増加はごくわずかであった。一方、産生されたAA代謝産物については EPA-E投与によりC0系代謝産物であるTXB₂と HHT産生が有意に低下した。また、12-HETE産生は EPA-E投与により低下したもののAAのC0系代謝産物の産生低下に比べごくわずかであった。EPA-E投与による血小板プロスタノイドの産生の変動に伴い、TXB₃/TXB₂の比、及び 12-HEPE/12-HETEの比は有意に増加した。EPA-E投与前後におけるコラーゲン (50μg/ml) 刺激時のプロスタノイド産生をTable 4-4に示したが、ほぼ同様の成績が得られた。

脂肪酸構成の変動をTable 4-5に示した。血小板リン脂質のうち、PC、PE、PIのいずれの画分においても EPA量は EPA-E投与により有意に増加した。AA量については、PC、PE画分は有意に低下したがPI画分では不変であった。

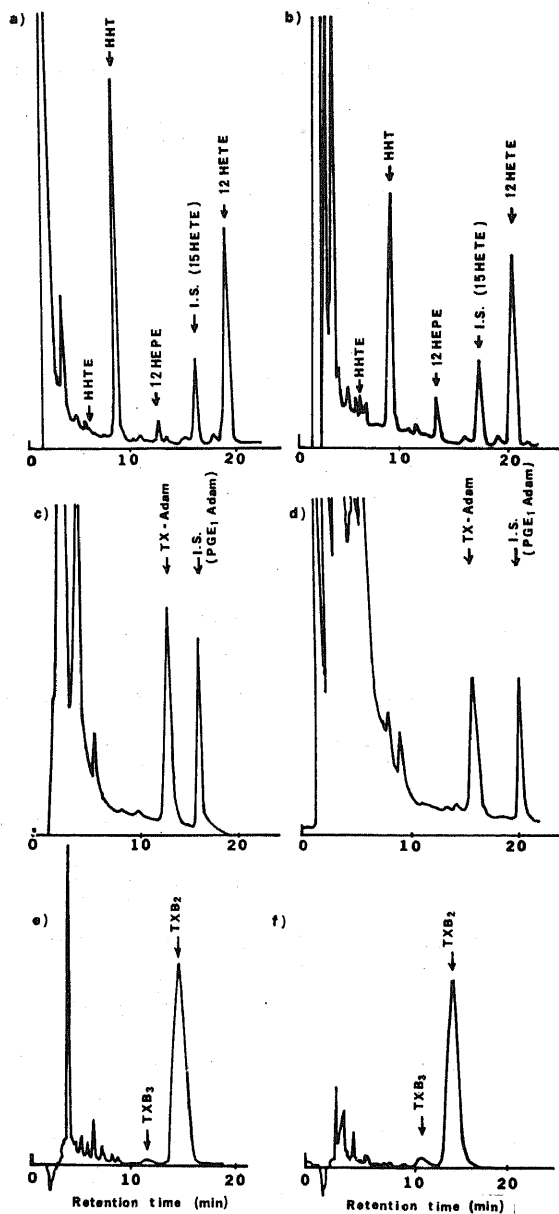


Fig.4-7 HPLC profiles of prostanoinds produced by thrombin(1U/ml)-stimulated platelets before (a,c,e) and after (b,d,f) 4 weeks ingestion of EPA-E (3.6g/day).

Table 4-3

Effect of 4 weeks ingestion of EPA-E (3.6g/day) on prostanoids formation in thrombin(1U/ml)-stimulated washed platelets.

	AA metabolites			EPA metabolites		
	HHT	TXB ₂	12-HETE	HHTE	TXB ₃	12-HEPE
before	1569.0 (242.7)	1442.9 (373.6)	927.9 (142.8)	16.7 (7.10)	15.3 (7.05)	65.9 (26.5)
after 4 W	1280.6 ^{***} (416.3)	981.8 ^{**} (344.4)	876.1 (223.3)	37.7 [*] (26.4)	29.0 (22.5)	209.4 ^{****} (110.5)
	TXB ₃ /TXB ₂			12-HEPE/12-HETE		
before	0.0106 (0.004)			0.072 (0.029)		
after 4 W	0.0280 ^{***} (0.014)			0.242 ^{****} (0.125)		

Each data was expressed as means \pm S.D. (standard deviations. (n=11) Values in parenthesis represent S.D..⁹ Prostanoids formation was expressed by ng/10⁹ platelets. *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01, ****p<0.001, paired t-test as compared to "before".

さらに血小板のPC, PE画分の EPA/AA比と、血小板の刺激時に産生されたTXB₃/TXB₂比、及び12-HPEPE/12-HETE比との間には、いずれも正の相関関係が認められた(Fig. 4-8及びFig. 4-9)。 Figureにはトロンビン (1U/ml)刺激の血小板における成績を示したが、同様の成績はコラーゲン (50 μ g/ml) 刺激の血小板においても認められた。

Table 4-4

Effect of 4 weeks ingestion of EPA-E (3.6g/day) on prostanoids formation in collagen(50 μ g/ml)-stimulated washed platelets.

	AA metabolites			EPA metabolites		
	HHT	TXB ₂	12-HETE	HHTE	TXB ₃	12-HEPE
before	623.3 (193.7)	463.0 (228.4)	760.8 (298.1)	4.23 (6.58)	1.63 (3.49)	26.3 (22.6)
after 4 W	468.0* (191.4)	257.5** (74.4)	679.2* (249.2)	5.61 (6.47)	4.84 (3.85)	151.7*** (71.3)
	TXB ₃ /TXB ₂			12-HEPE/12-HETE		
before	0.003 (0.008)			0.047 (0.059)		
after 4 W	0.019* (0.017)			0.239*** (0.098)		

Each data was expressed as means \pm S.D. (standard deviations. (n=11) Values in parenthesis represent S.D..⁹ Prostanoids formation was expressed by ng/10⁹ platelets. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, paired t-test as compared to "before".

Table 4-5

Effect of 4 weeks ingestion of EPA-E (3.6g/day) on fatty acids composition of platelet phospholipids.

Phosphatidylcholine (PC)			
	AA (20:4)	EPA (20:5)	EPA/AA
before	7.85±1.60	0.82±0.56	0.11±0.088
after 4W	6.38±0.18 ^{**}	1.96±0.77 ^{***}	0.30±0.14 ^{***}
Phosphatidylethanolamine (PE)			
	AA (20:4)	EPA (20:5)	EPA/AA
before	28.49±3.22	2.11±1.42	0.077±0.066
after 4W	25.67±2.53 ^{**}	4.48±1.73 ^{***}	0.175±0.086 ^{***}
Phosphatidylinositol (PI)			
	AA (20:4)	EPA (20:5)	EPA/AA
before	20.51±4.78	0.17±0.24	0.010±0.019
after 4W	20.58±7.03	0.41±0.14 ^{**}	0.022±0.009 [*]

Each value was expressed as means ± S.D. (standard deviations) mole %. (n=11)

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, paired t-test as compared to "before".

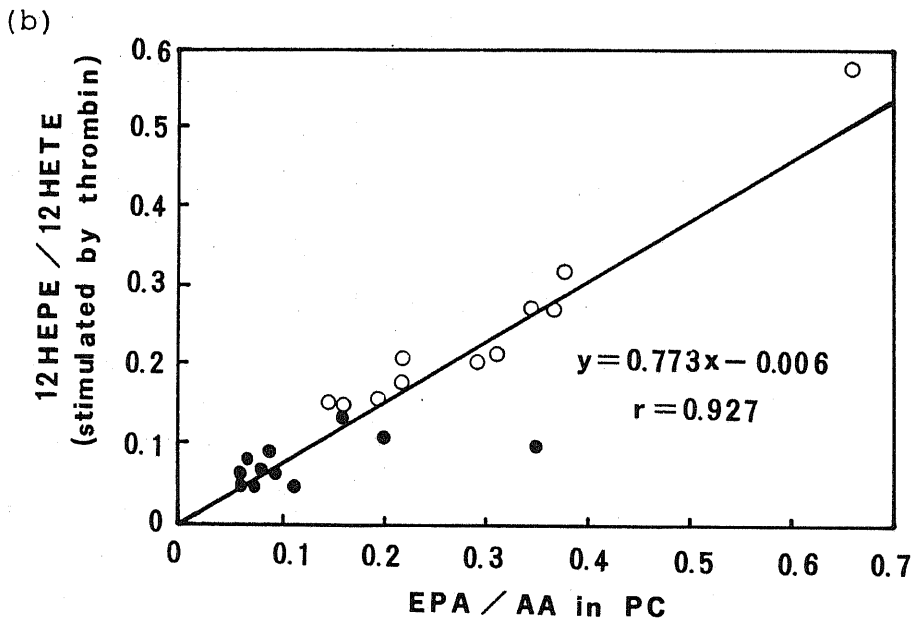
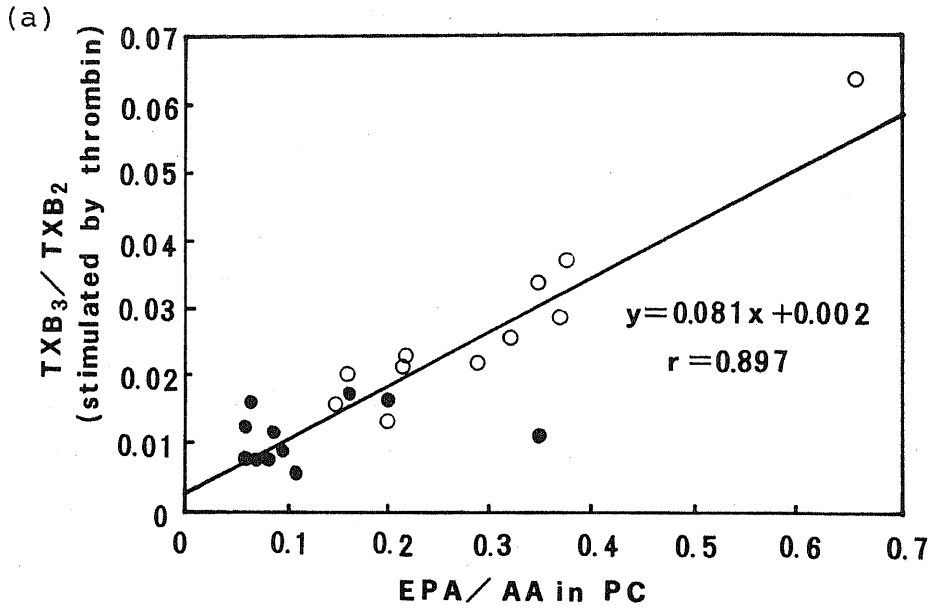


Fig.4-8 Correlation between the ratio of EPA/AA in PC fraction, and the ratio of (a) TXB₃/TXB₂ or (b) 12-HEPE/12-HETE in thrombin (IU/ml)-stimulated platelets.

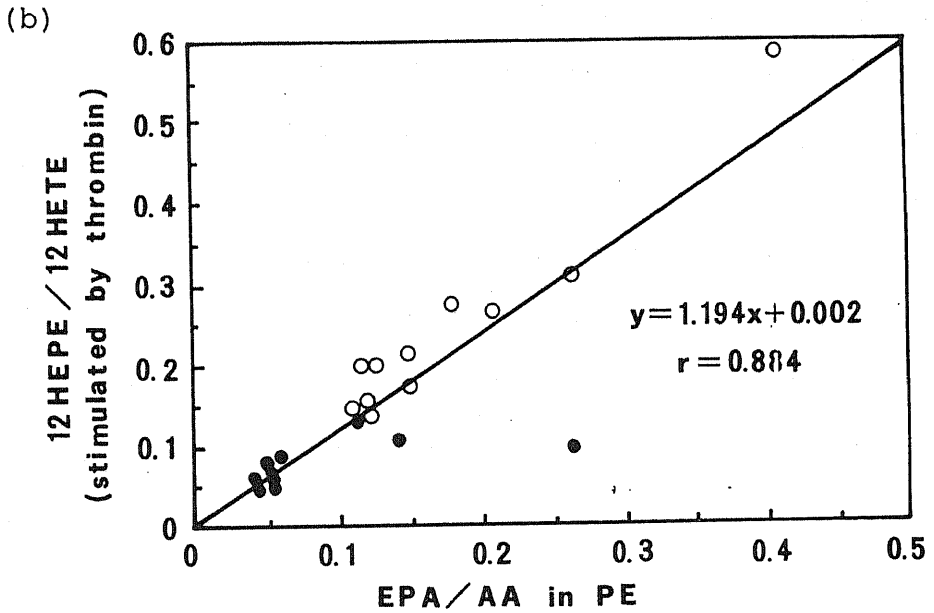
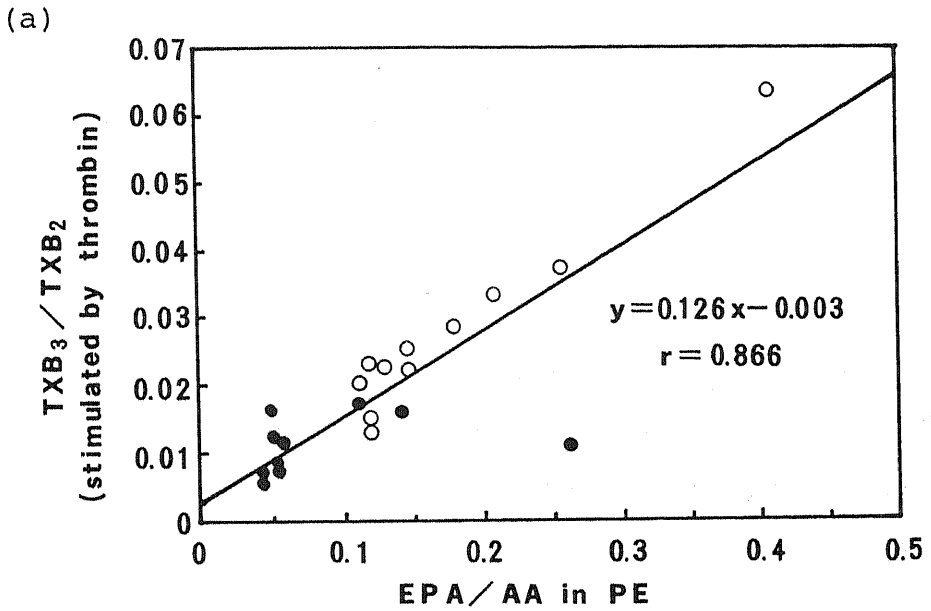


Fig.4-9 Correlation between the ratio of EPA/AA in PE fraction, and the ratio of (a) TXB₃/TXB₂ or (b) 12-HEPE/12-HETE in thrombin(IU/ml)-stimulated platelets.

4 - 6 考 察

AA由来の 12-L0系代謝産物である12-HPETEについては、血小板凝集反応及び、放出反応を抑制することが既に報告されている。^{12) 13)} 今回著者が行った *in vitro* の成績でも、生合成した12-HPETEはAA(5 μ M) 及びコラーゲン (10 μ g/ml) による凝集及びセロトニン放出に対し濃度依存性の抑制を示した。

今回の *in vitro* 実験で新たに明らかになったことのうち最も重要なことは、EPA の 12-L0系中間代謝産物である12-HPEPEもまた血小板凝集やセロトニン放出に対して濃度依存性の抑制作用を示し、しかもその抑制力価がAA由来の12-HPETEとほぼ同等であるということである。さらに、12-HPETE及び12-HPEPEの安定な代謝産物である 12-HETE及び 12-HEPEは 12-hydroperoxides (12-HPETE及び 12-HPEPE)に比べかなり抑制効果が弱いことも明らかになった。12-HETEが12-HPEPEと比較して、血小板機能に対する抑制効果が低いことは、Aharonyら¹²⁾ や Crosetら⁵³⁾ も報告している。彼等によれば、12-HETEの血小板凝集抑制の力価は12-HPETEに比べ 1/3から 1/4という。これらの成績から、12-hydroperoxidesが 12-hydroxidesへと代謝されることによりその抑制の活性が失われるということが推察される。今回、著者の実験でも 12-hydroperoxidesと血小板のプレインキュベーション時間が延長するのにもなって凝集抑制効果が低下することが認められた。これは、12-hydroperoxidesが反応液中で非常に不安定なため、ただちに 12-hydroxidesとなり、凝集抑制効果が低下したためと考えられる。

12-HPETEと12-HPEPEの血小板機能に対する抑制の力価はほぼ同等であったことから、構造的に二重結合の数は抑制効果を左右するための重要な因子にはなっていないと思われる。ところで、12-HPETE以外のAA由来の hydroperoxide、例えば15-HPETEについては血小板凝集抑制作用を示すことが報告されているが^{12) 94)}

、 hydroperoxy基の位置の違いが抑制効果に違いをもたらすのであろうか。この点を明らかにするため、12位の他に-OOH基を有するAA及び EPA由来のLO代謝産物を調製して血小板機能におよぼす作用について検討を加えた。ところで、hydroperoxidesの調製法としては、酵素的方法の他に自動酸化による方法⁹⁵⁾、ヘモグロピンを用いる酸化反応法⁹⁶⁾、一重項酸素を用いた方法⁹⁷⁾等が知られている。これらの非酵素的調製法を経て調製されたhydroperoxidesはラセミ体であり、これらのS-体とL-体の混合物であると考えられている。Crosetらは、血小板凝集抑制作用を発現するためにはhydroperoxidesがS-体であることが必要であると報告している。⁵³⁾ またS-体のみのhydroperoxidesは酵素的方法により調製されることが報告されている。^{92) 100)} 従って今回の実験では、S-体のhydroperoxidesを得るため、5-hydroperoxidesは Shimizuらの方法⁹²⁾ に準じ、potatoから粗精製された5-lipoxygenaseを用い、15-hydroperoxidesはWongらの方法⁵¹⁾ に準じ soybean 15-lipoxygenaseを用いて生合成し、その力価を比較した。その結果、hydroperoxy基の結合する位置によって血小板機能におよぼす抑制力価はかなり異なることが明らかとなった。すなわち、血小板の凝集放出反応におよぼすmonohydroperoxidesの抑制作用は hydroperoxyの位置によって左右されるが、二重結合の数によってはほとんど影響を受けないことが考えられた。すでに述べたように、血小板で産生される 12-hydroperoxidesが最も血小板機能におよぼす抑制効果が高かったことは興味深い成績と思われる。尚、AA由来の 12-HETEについては、5-HETEや 15-HETEより血小板凝集抑制作用が最も強いことが他の研究者により報告されており^{12) 53)}、著者の成績とも一致している。

EPA 投与により EPA含量の増加した血小板が活性化をうけると、膜リン脂質からAAのみならず EPAも遊離し 12-LOで代謝をうけ、それぞれ12-HPETE、12-HPEPEが産生されると考えられ^{38) 39) 89)}、両者が相互に影響しあう可能性が考えられる。そこで、12-HPETEと12-HPEPEのin vitroでの共存効果を検討したが、血小

板凝集抑制に及ぼす両者の作用は相加的であった。これら一連の *in vitro* の実験から、EPAの12-L0系中間代謝産物である12-HPEPEがAA由来の12-HPETEとほぼ同等の力価をもって血小板機能を抑制し、しかも12-HPEPEは12-HPETEと相加的に作用するとの成績を得た。

そこで、健常人に高純度に精製したEPA-Eソフトカプセルを一定期間服用させ投与前後における血小板でのリン脂質画分中のAA量及びEPA量、ならびに血小板活性化時に産生されるAA及びAA由来の代謝産物を測定し、*in vitro* の成績をもとにEPAの抗血小板作用発現の機序の一つとして12-HPEPEが関与する可能性を検討した。その結果、EPA-E投与により血小板リン脂質(PC, PE, PI)中のEPA含量が有意に増加するとともに、血小板活性化時に産生されるEPA代謝産物の総量は有意に増加したが、なかでも12-HPEPEの産生量の増加は著しかった。血小板のPC, PE画分のEPA/AA比と12-HPEPE/12-HPETE比との間にはいずれも正の相関関係が認められたが、このことはEPA-E投与により血小板膜リン脂質中のEPA量が増加するのに伴い、血小板の活性化により血小板膜リン脂質からAAのみならず、EPAも遊離しさらに代謝されることを示している。

一方、EPA-E投与により血小板リン脂質(PC, PE)中のAA含量は有意に低下し、これに伴い血小板活性化時に産生されるAA代謝産物の総量は有意に低下したが、なかでもTXB₂産生の低下が著しかった。EPA-E投与によりTXB₂、すなわちTXA₂の産生が低下した機序としては、TXA₂の前駆体であるAA量の低下⁹⁸⁾⁹⁹⁾、またEPA自身によるCOレベルでのAA代謝の阻害等が考えられる。³⁸⁾¹⁰⁰⁾ところで、EPAから産生されるTXA₃は、AA由来のTXA₂と異なり血小板凝集促進作用を持たずEPAの増加に伴いTXA₃産生が増加し、代わりにTXA₂産生が低下するために血小板凝集能の低下をもたらすとの仮説がNeedlemanらにより提唱されている。³⁸⁾ 今回の研究でもEPA-E投与後、TXB₃産生の増加とともにTXB₃/TXB₂比の有意の増加が認められた。しかしながら、TXB₃の産生量はAA由来のTXB₂産生量に比べEPA-

E 投与後においてもきわめて少量にとどまった。従って、EPAによる血小板凝集能低下の機序の一つとしてTXA₃産生の関与はあまり大きくないと考えられた。

EPA-E投与により、血小板活性化時に産生されるTXB₂量が著しく減少したのに対して、12-HETEと12-HEPE産生量の総和は減少するよりむしろ増加する傾向がみられた。EPA-E投与後、血小板活性化時に認められた12-HEPE産生の著しい増加は12-HPEPE産生の増加を意味している。in vitroの系において、12-HPEPEは血小板凝集抑制作用を示し、その抑制力価はAA由来の12-HPETEとほぼ同等であり両者はお互いに

相加的に作用することを先に明らかにした。従って、健康人へのEPA-E投与実験においてリン脂質画分のEPA含量の増加に伴い12-HEPEの産生増加がみられたことは、EPAの抗血小板作用発現の機序の一つとして12-HPEPEが関与している可能性を示している。

(Fig. 4-10)

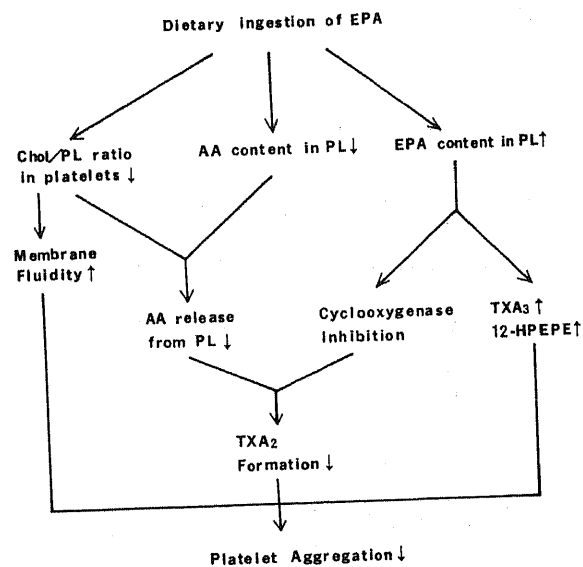


Fig. 4-10

Proposed mechanism of anti-aggregatory effect of dietary ingestion of EPA.

Chol;cholesterol, PL;phospholipids, TX;thromboxane, HPEPE;hydroperoxy-eicosapentaenoic acid

総 括

本研究では、アスピリンに代表される既存の抗血小板薬とは全く違った角度から血小板凝集能を抑制すると考えられる種々の薬物を取りあげ、それらの血小板AA代謝におよぼす作用を中心に研究を進め各薬物の抗血小板作用の機序の一端を明らかにしてきた。すなわち、和漢生薬成分であるcinnamic aldehyde と trichosanic acid 及び、食事で摂取される脂質の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) が、血小板AA代謝をかえることにより血小板凝集抑制作用を有することを明らかにするとともに、これらの薬物が将来、血栓性疾患の予防、あるいは治療上有効な薬物になっていく可能性を示唆した。本研究のまとめを、以下に要約した。

1) 今回新たにRadomskiらの方法を改良し、プロスタグランジン I_2 -Na 塩 (PG I_2 -Na) を用いたcytoprotection法により、血小板機能を保持したヒト洗浄血小板を調製する方法を確立し、各種薬物の血小板機能及びAA代謝におよぼす作用を検討することを可能にした。

2) 桂皮の主成分であるcinnamic aldehyde が、血小板凝集抑制作用を有しており強力な血小板凝集因子であるTXA $_2$ の産生を抑制することを明らかにした。cinnamic aldehyde によるTXA $_2$ 産生低下の機序としては、AAからのTXA $_2$ の産生にいたるcyclooxygenaseの阻害剤ではなく、むしろ血小板活性化に伴う膜リン脂質からのAA遊離の抑制が考えられた。

3) 栝楼仁の主成分であるtrichosanic acidが、同じくC18:3の多価不飽和脂肪酸であるリノレン酸と同様に、血小板凝集抑制作用を有していることを明らかに

した。trichosanic acidは、血小板活性化時に産生されるAA代謝産物のうち、cyclooxygenase系代謝産物であるTXB₂、HHTの量を濃度依存的に抑制し、抑制の力価についてはリノレン酸とほぼ同等であった。リノレン酸は、血小板cyclooxygenaseの抑制作用を有することが既に明らかにされている。今回の一連の成績より、trichosanic acidはリノレン酸と同様に、血小板cyclooxygenaseを阻害した結果TXA₂産生を低下させ、血小板凝集抑制作用を発現していると考えられた。

4) エイコサペンタエン酸(EPA)は抗血小板作用を有することが知られ、その作用機序に関してもいくつか報告されている。今回新たに、in vitroの系を用いてEPAの12-lipoxygenase系中間代謝産物である12-HPEPEが血小板凝集抑制作用を有していることを明らかにした。さらに高純度に精製したEPAエチルエステルソフトカプセルを健常人に一定期間投与したところ、血小板リン脂質中のEPA含量が増加するとともに、血小板の刺激にともない12-HEPEの著しい産生増加が認められた。以上に述べたin vitro及びex vivoの成績より、12-HPEPEはEPAによる抗血小板作用発現の機序の一つとして関与している可能性が考えられた。

謝 辞

本研究に際し、御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました恩師
千葉大学薬学部北川晴雄教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

また、本研究を通じて終始御指導、御助言を賜りました千葉大学医学部第二内
科吉田尚教授、田村泰講師、平井愛山医学博士、寺野隆医学博士に心から深く感
謝いたします。

さらに、本研究を通じて御協力いただきました千葉大学薬学部上野光一講師、
五十嵐隆助手、大森栄教務職員に深謝いたします。

各種プロスタノイドのGC-MS 分析では東京薬科大学中央分析センターの志田保
夫氏に、またHPLC分析では日本分光株式会社の山内芳夫、富田勉両氏に御指導を
いただき、ここに深謝いたします。 また、 cinnamic aldehydeの体内動態に関
して貴重な御助言をいただいた津村順天堂株式会社の油田正樹薬学博士に感謝い
たします。

最後に、多くの御鞭撻をいただいた千葉大学薬学部薬物学研究室、ならびに千
葉大学医学部第二内科内分泌研究室の方々に心から感謝致します。

掲載雑誌目録

第二章の内容は J. Pharm. Dyn., vol. 10に下記表題で印刷中である。

IN VITRO EFFECT OF CINNAMIC ALDEHYDE, A MAIN COMPONENT OF CINNAMOMI CORTEX, ON HUMAN PLATELET AGGREGATION AND ARACHIDONIC ACID METABOLISM

第三章の内容は Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research (Raven Press in New York) に下記表題で印刷中である。

IN VITRO EFFECT OF OCTADECATRIENOIC ACID ON HUMAN PLATELET FUNCTION

また、これらの内容は J. Pharm. Dyn. に下記表題で投稿中である。

IN VITRO EFFECT OF TRICHOSANIC ACID, A MAIN COMPONENT OF TRICHOSANTHES JAPONICA, ON PLATELET AGGREGATION AND ARACHIDONIC ACID METABOLISM IN HUMAN PLATELETS

第四章の4-2, 4-3, 4-4の内容については、Thromb. Res. vol. 37 pp. 373-384 (1986) に下記表題で掲載されたものである。

COMPARISON OF THE IN VITRO EFFECT OF EICOSAPENTAENOIC ACID (EPA)-DERIVED LIPOXYGENASE METABOLITES ON HUMAN PLATELET FUNCTION WITH THOSE OF ARACHIDONIC ACID

また、これらの内容は、下記表題で Prog. Lipid Res., vol. 25, pp. 461-466 (1986)の論文の中の一部として掲載されている。

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF EICOSAPENTAENOIC ACID (EPA) IN JAPAN

さらに、4-5の内容については、下記表題で *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research* に印刷中の論文の一部として掲載されている。

EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF HIGHLY PURIFIED EPA AND DHA ON HEMOSTATIC
FUNCTION IN HEALTHY SUBJECT

引用文献

- 1) 厚生統計協会編, 国民衛生の動向: 厚生 of 指標, vol. 33, pp. 86, 1986
- 2) Hamberg, M., Svensson, J. and Samuelsson, B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2994-2998, 1975
- 3) Needleman, P., Minkes, M. and Raz, A. Thromboxanes: Selective biosynthesis and distinct biological properties. *Science*, 193, 163-165, 1976
- 4) Samuelsson, B. The role of prostaglandin endoperoxides and thromboxanes as bioregulators. In: *Biochemical Aspects of Prostaglandins and Thromboxanes*. N. Kharash and J. Fried (Ed.) New York-London: Academic Press, 1977, pp. 133-154
- 5) Moncada, S., Bunting, S., Mullane, K., Thorogood, P. and Vane J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263, 663-665, 1976
- 6) 東原正明, 久米章司; 血小板凝集、血栓形成とプロスタグランディン関連物質, 日本臨床 (日本臨床社), vol. 43, pp. 555-562, 1985
- 7) Suehiro, A., Kakishita, E., and Nagai, K. The role of platelet hyperfunction in thrombus formation in hyperlipidemia. *Thromb. Res.*, 25, 331-339, 1982
- 8) Zumda, A., Dembinska-Kiec, A., Chytkomski, A. and Gryglewski, R. J. Experimental atherosclerosis in rabbits; platelet aggregation, thromboxane A₂ generation and anti-aggregatory potency of prostacyclin. *Prostaglandins*, 14, 1035-1042, 1977
- 9) Jerrad, J. M. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *American J. Pathol.*, 83, 283-298, 1976
- 10) Hamberg, M. and Samuelsson, B. Prostaglandin endoperoxides. Novel transformation of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3400-3404, 1974
- 11) Nugteren, D. H. Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 380, 299-307, 1975
- 12) Aharony, D., Smith, J. B. and Silver, M. J. Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoxygenase product-12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 718, 193-200, 1982
- 13) Siegel, M. I., McConnell, R. T., Abrahams, S. L., Porter, N. A. and Cuatrecasas, P. Regulation of arachidonate metabolism via lipoxygenase by 12-HPETE, the product of human platelet lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89, 1273-1280, 1979
- 14) Lapetina, E. G., Schmitges, C. J. and Chandrabone, K. and Cuatrecasas, P. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and prostacyclin inhibit membrane phospholipase activity in platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 828-835, 1977

- 15) Rittenhouse-Simmons, S. and Deykin, D. The activation by Ca^{2+} of platelet phospholipase A_2 : Effect of dibutyl cyclic adenosine monophosphate and 8-(N,N-diethylamino)-octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate. *Biochim. Biophys. Acta*, 543, 409-422, 1978
- 16) Roth, E. G., Stanford, N. and Majerus, P. W. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3073-3076, 1975
- 17) Humes, J. L., Winter, C. A., Sadowski, S. J. and Kuehl, F. A. Multiple sites on prostaglandin cyclooxygenase are in the action of nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2053-2056, 1981
- 18) Zucker, J. L. and Peterson, J. Effect of acetylsalicylic acid, other nonsteroidal anti-inflammatory agents, and dipyridamole on human blood platelets. *J. Lab. Clin. Med.*, 76, 66-75, 1970
- 19) Vigdahl, R. L., Marquins, N. R. and Tavormina, P. A. Platelet aggregation II. Adenyl cyclase, prostaglandin E_1 and calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 409-415, 1969
- 20) Livio, M., Maschio, A. D., Cerletti, C. and Gaetano, G. Indomethacine prevents the long lasting inhibitory effect of aspirin on human platelet cyclo-oxygenase activity. *Prostaglandins*, 23, 787-796, 1982
- 21) Cerletti, C., Livio, M. and Gaetano, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs react with two sites on platelet cyclo-oxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 714, 122-128, 1981
- 22) Needleman, P., Wyche, A. and Raz, A. Platelet and blood vessel arachidonate metabolism and interactions. *J. Clin. Invest.*, 63, 345-349, 1979
- 23) FitzGerald, G. A., Brash, A. R., Oates, J. A. and Pedersen, A. K. Endogenous prostacyclin biosynthesis and platelet function during selective inhibition of thromboxane synthase in man. *J. Clin. Invest.*, 71, 1336-1343, 1983
- 24) Nicolaou, K. C., Magolda, J. B., Smith, J. B., Aharony, D., Smith, E. F. and Lefer, A. M. Synthesis and biological properties of pinane-thromboxane A_2 , a selective inhibitor of coronary artery constriction, platelet aggregation, and thromboxane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 2566-2570, 1979
- 25) Kubo, M., Matsuda, H., Iida, S. and Arichi, S. 桂皮の血栓形成症候群への影響：第28回日本生薬学会要旨集，pp. 41, 1981
- 26) Kubo, M., Matsuda, H., Iida, S. and Arichi, S. Hemostasisに関する生薬の研究：日本薬学会第99年会要旨集，pp. 163, 1979
- 27) 桜川信男，和漢駆瘀血生薬と血液凝固，. 第51回臨床血液学会総会要旨集，vol. 23, pp. 388, 1981
- 28) 赤松金芳，“栝楼”，和漢薬（医歯薬出版），pp. 58-60, 1970
- 29) 厚生省保健医療局栄養課編，日本人の栄養所要量（第一出版），1984
- 30) Dyerberg, J., Bang, H. O., Stofferson, E., Moncada, S. and Vane, J. R. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*, ii, 117-119, 1978.
- 31) Dyerberg, J. and Bang, H. O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet*, ii, 433-435, 1979
- 32) Sinclair, H. M. Prevention of coronary heart disease: the role of essential fatty acids. *Postgraduate Medical J.*, 56, 579-584, 1980

- 33) Hirai, A., Hamazaki, T., Terano, T., Nishikawa, T., Tamura, Y., Kumagai, A. and Sajiki, J. Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese. *Lancet*, ii, 1132, 1980
- 34) Goodnight, JR., S.H., Harris, W.S. and Conner, W.E. The effect of dietary ω -3 fatty acids upon platelet composition and function in men: A prospective, controlled study. *Blood*, 58, 880-885, 1981
- 35) Terano, T., Hirai, A., Hamazaki, T., Kobayashi, S., Fujita, T., Tamura, Y. and Kumagai, A. Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis*, 46, 321-331, 1983
- 36) Tamura, Y., Hirai, A., Terano, T., Yoshida, S., Takenaga, M. and Kitagawa, H. Anti-thrombotic and anti-atherogenic action of eicosapentaenoic acid *Jap. Clin. J.*, in press
- 37) Gryglewski, R. J., Salmon, J. A., Ubatuba, F. B., Weatherly, B. C., Moncada, S. and Vane, J.R. Effect of all cis 5,8,11,14,17-EPA and PGH₃ on platelet aggregation, *Prostaglandins*, 18, 453-478, 1979
- 38) Needleman, P., Raz, A., Minkes, M. S., Ferredelli, J. A. and Sprecher, H. Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 944-948, 1979
- 39) Hirai, A., Terano, T., Hamazaki, T., Sajiki, J., Kondo, S., Ozawa, A., Fujita, T., Miyamoto, T., Tamura, Y. and Kumagai, A. The effect of the oral administration of fish oil concentrate on the release and the metabolism of [¹⁴C]arachidonic acid and [¹⁴C]eicosapentaenoic acid by human platelet. *Thromb. Res.*, 28, 285-298, 1982
- 40) Whitaker, M. O., Wyche, A., Fitzpatrick, F., Sprecker, H. and Needleman, P. Triene prostaglandins: Prostaglandin D3 and eicosapentaenoic acid as potential antithrombotic substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5919-5923, 1979
- 41) Born, G. V. R. and Gross, M. J. The aggregation of blood platelets. *J. Pharmacol.*, 168, 178-195, 1963
- 42) Radomski, M. and Moncada, S. An improved method for washing of human platelets with prostacyclin. *Thromb. Res.*, 30, 383-389, 1983
- 43) Minkes, M., Stanford, N., Chi, M. Y., Roth, G. J., Raz, A., Needleman, P. and Majerus, P. W. Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate inhibits the availability of arachidonate to prostaglandin synthetase in human platelet suspension. *J. Clin. Invest.*, 59, 449-454, 1977
- 44) Kaibuchi, K., Tsuda, T., Kikuchi, A., Tanimoto, T. and Takai, Y. Enhancement of collagen-induced phosphoinositide turnover by thromboxane A₂ analogue through Ca²⁺ mobilization in human platelets. *FEBS LETTERS*, 192, 104-108, 1985
- 45) Hirai, A., Terano, T., Takenaga, M., Kobayashi, S., Makuta, M., Ozawa, A., Fujita, T., Tamura, Y., Kitagawa, H., Kumagai, A. and Yoshida, S. Effect of supplementation of highly purified EPA and DHA on hemostatic function in healthy subject. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, Raven Press (New York), vol. 17, in press

- 46) Hirai, A., Tahara, K., Tamura, Y., Saito, H., Terano, T. and Yoshida, S. Involvement of 5-lipoxygenase metabolites in ACTH-stimulated corticosteroidgenesis in rat adrenal glands. *Prostaglandins*, 30, 749-767, 1985
- 47) Yamauchi, Y., Tomita, T., Senda, M., Hirai, A., Terano, T., Tamura, Y. and Yoshida, S. High performance liquid chromatographic analysis of arachidonic acid metabolites by pre-column derivatization using 9-anthryldiazomethane. *J.Chromatography*, 357, 199-205, 1986
- 48) Goetzl, E. J., Hill, H. R. and Gorman R. R. Unique aspects of the modulation of human neutrophil function by 12-L-hydroperoxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid. *Prostaglandins*, 19, 71-85, 1980
- 49) Camp, R. D. K., Mallet, A. I., Woollard, P. M., Brain, S. D., Black, A. K. and Graves, M. W. The identifications of hydroxy fatty acids in psoriatic skin. *Prostaglandins*, 26, 431-447, 1983
- 50) Saito, H., Hirai, A., Tamura, Y. and Yoshida, S. The 5-lipoxygenase products can modulate the synthesis of platelet-activating factor (alkyl-acetyl-GPC) in Ca-ionophore A23187-stimulated rat peritoneal macrophages. *Prostaglandin, Leukotriene and Medicine*, 18, 271-286, 1985
- 51) Wong, P. Y-K., Huges, R. and Lam, B. Lipoxene: A new group of trihydroxy pentaenes of eicosapentaenoic acid derived from porcine leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 763-772, 1985
- 52) Porter, N. A., Logan, J. and Kontoyiannidou, V. Preparation and purification of arachidonic acid hydroperoxides of biological importance *J. Org. Chem.*, 44, 3177-3181, 1979
- 53) Crocet, M. and Lagarde, M. Stereospecific inhibition of PGH₂-induced platelet aggregation by lipoxygenase products of icosanoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112, 878-883, 1983
- 54) Mower, R. L., Landolfi, R. and Steiner, M. Inhibition in vitro of platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavon. *Biochem. Pharmacol.*, 33, 357-363, 1984
- 55) Takenaga, M., Kitagawa, H., Hirai, A., Tamura, Y. and Yoshida, S. Mechanism of anti-platelet aggregating action of Dilazep. *J. Pharm. Dyn.*, 8, 77-83, 1985
- 56) Flower, R. J. and Blackwell, G. J. Importance of phospholipase A₂ in prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.*, 25, 285-291, 1968
- 57) Lands, W. E. M. and Samuelsson, B. Phospholipids precursors of prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 164, 426-429, 1968
- 58) Vogt, W. Role of phospholipase A₂ in prostaglandin formation. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 3, 89-95, 1978
- 59) Hamberg, M. and Samuelsson, B. Prostaglandin endoperoxides: Novel transformation of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3400-3404, 1974
- 60) Bills, T. K., Smith, J. B. and Silver, M. L. Metabolism of [¹⁴C]arachidonic acid by human platelet. *Biochim. Biophys. Acta*, 424, 303-314, 1976
- 61) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509, 1957

- 62) 張禮世, 桂の薬理作用, 日薬物誌, 35, 176-196, 1942
- 63) 野口衛, 解熱生薬の効力検定法について, 生薬雑誌, 21, 17-21, 1967
- 64) Koda, A. and Nagai, H. Examination on the therapeutics of nephritics by Chinese drugs. 和漢薬シンポジウム要旨集, 8, 13-19, 1974
- 65) Yagi, A., Nohara, A., Nishioka, I., Koda, K. and Tokubuchi, N. Chemical studies on aqueous extract of Cinnamomi Cortex and its therapeutic examination for experimental nephritis. 和漢薬シンポジウム要旨集, 13, 72-78, 1980
- 66) Weiss, H. J., Aledort, L. M. and Kochwa, S. The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man. J. Clin. Invest., 47, 2169-2174, 1968
- 67) Nishikawa, M., Kanamori, M. and Hidaka, H. Inhibition of platelet aggregation and stimulation of guanylate cyclase by an antianginal agent Molsidomine and its metabolites. J. Pharmacol. Exp. Ther., 220, 183-190, 1981
- 68) Kunitada, S. and Ui, M. The plasma cyclic AMP response to catecholamine as potentiated by phenolamine in rat. Eur. J. Pharmacol., 49, 169-176, 1978
- 69) Harada, M. and Saito, A. Pharmacological studies on Chinese cinnamon. IV. Effect of cinnamaldehyde on the isolated heart of guinea pigs and its catecholamine releasing effect from the adrenal gland of dogs. J. Pharm. Dyn., 1, 89-97, 1978
- 70) Billah, M. M. and Lapetina, E. G. Degradation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is insensitive to Ca^{2+} mobilization in stimulated platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun., 109, 217-222, 1982
- 71) Thompson, N. T. and Scrutton, M. C. Intracellular calcium fluxes in human platelets. Eur. J. Biochem., 147, 421-427, 1985
- 72) Lapetina, E. G. Inositide-dependent and independent mechanisms in platelet activation. In: Phosphoinositides and Receptor Mechanisms. pp. 271-286, 1986
- 73) Stuart, M. B., Gerrard, J. M. and White, J. G. Effect of cholesterol on production of thromboxane B_2 by platelets invitro. The New England J. of Medicine, 302, 6-10, 1980
- 74) Zahavi, J., Betteridge, J. D., Jones, N. A. G., Galton, D. J. and Kakkar, V. V. Enhanced in vivo platelet release reaction and malondialdehyde formation in patients with hyperlipidemia. The American J. of Medicine, 70, 59-64, 1981
- 75) Kramer, R. M., Jakubowski, J. A., Vaillancourt, R. and Deykin, D. Effect of membrane cholesterol on phospholipid metabolism in thrombin-stimulated platelets. J. Biol. Chem., 257, 6844-6849, 1982
- 76) Renaud, S., Kuba, K., Goulet, C., Lemire, Y. and Allard, C. Relationship between fatty-acid composition of platelets and platelet aggregation in rat and man. Circulation Res., 26, 553-564, 1970
- 77) Hornstra, G., Lewis, B., Chait, A., Turpeinen, O., Karvonen, M. J. and Vergroesen, A. J. Influence of dietary fat on platelet function in men. Lancet, i, 1155-1157, 1973
- 78) Gerrard, J. M., White, J. G. and Krivit, W. Labile aggregation stimulating substance, free fatty acids, and platelet aggregation. J. Lab. Clin. Med., 87, 73-82, 1976

- 79) Hashimoto, Y., Naito, C., Kume, H., Watanabe, T., Kawamura, M., Teramoto, T. and Oka, H. High concentrations of arachidonic acid induce platelet aggregation and serotonin release independent of prostaglandin endoperoxides and thromboxane A₂. *Biochim. Biophys. Acta*, 841, 283-291, 1985
- 80) Gorman, R. R. Biochemical and pharmacological evaluation of thromboxane synthetase inhibitors. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, Raven Press (New York), vol. 6. 417-425, 1980
- 81) Pace-Asciak, C. and Wolfe, L. S. Inhibition of prostaglandin synthesis by oleic, linoleic and linolenic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 784-787, 1968
- 82) Ziboh, V. A. Biosynthesis of prostaglandin E₂ in human skin: subcellular localization and inhibition by unsaturated fatty acids and anti-inflammatory drugs. *J. Lipid Res.*, 14, 377-384, 1973
- 83) Srivastava, K. C., Amasthi, K. K., Lindegard, P. and Timari, K. P. Effect of some saturated and unsaturated fatty acids on prostaglandin biosynthesis in washed human blood platelets from (1-¹⁴C)arachidonic acid. *Prostaglandins Leukotrienes and Medicine*, 8, 219-237, 1982
- 84) Valee, E., Gougat, J. and Ageron, M. Inhibition of platelet phospholipase-A₂ as a mechanism for the anti-aggregating effect of linoleic acid. *Agents and Actions*, 10, 57-62, 1980
- 85) MacIntyre, D. E., Hoover, R. L., Karnovsky, M. J. and Salzman, E. W. Cis-unsaturated fatty acids inhibit platelet function by perturbation of the platelet membrane. *Thrombos. Haemostas.*, 46, 276 (Abstr.), 1981
- 86) Schacky, C., Fisher, S. and Weber, P. C. Long-term effects of dietary marine ω-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J. Clin. Invest.*, 76, 1626-1631, 1985
- 87) Galloway, J. H., Gartwright, I. J., Woodcock, B. E., Greaves, M., Russell, R. G. G. and Preston, F. E. Effects of dietary fish oil supplementation on the fatty acid composition of the human platelet membrane; Demonstration of selectivity in the incorporation of eicosapentaenoic acid into membrane phospholipid pools. *Clinical Science*, 68, 449-454, 1985
- 88) Knapp, H. R., Reilly, I. A. G., Alessandrini, C. H. P. and FitzGerald, G. A. In vivo indexes of platelet and vascular function during fish-oil administration in patients with atherosclerosis. *New England J. Medicine*, 314, 937-943, 1986
- 89) Hamberg, M. Transformations of 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 618, 389-398, 1980
- 90) Jershalmy, Z. and Zucker, M. B. Some effects of fibrinogen degradation products (FDP) on blood platelets. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 15, 413-419, 1966
- 91) Costa, J. L. and Murphy, D. L. Platelet 5-HT uptake and release stopped rapid by formaldehyde. *Nature*, 255, 407-408, 1975
- 92) Schimizu, T., Radmark, O. and Samuelsson, B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A₄ synthesis from arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 689-693, 1984

- 93) 小沢昭夫、神保裕江、高橋治美、藤田孝夫、平井愛山、寺野隆、田村泰、吉田尚、薄層クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーを用いたヒト血小板リン脂質分画の高級脂肪酸の定量, 分析化学, 11, 707-711, 1985
- 94) Vericel, E. and Lagarde, M. 15-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid inhibits human platelet aggregation. *Lipids*, 15, 472-474, 1980
- 95) Porter, N.A., Wolf, R.A., Yarbrow, E.M. and Weenen, H. The autoxidation of arachidonic acid: Formation of the proposed SRS-A intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89, 1058-1064, 1979
- 96) Terao, J. and Matsushita, S. Analysis of hemoprotein catalyzed peroxidation products of arachidonic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 595-599, 1981
- 97) Hamberg, M. and Samuelsson, B. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, 242, 5329-5335, 1967
- 98) Siess, W., Roth, P., Scherer, B., Kurzman, T., Bohlig, B. and Weber, P.C. Platelet-membrane fatty acids, platelet aggregation, and thromboxane formation during a mackerel diet. *Lancet*, i, 441-444, 1980
- 99) Sanders, T.A.B., Vickers, M. and Haines, A.P. Effect of blood lipids and haemostasis of a supplement of cod-liver oil, rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, in healthy young man. *Clin. Sci.*, 61, 317-324, 1981
- 100) Culp, B.R., Titus, B.G. and Lands, W.E.M. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostaglandins and Medicine*, 3, 269-278, 1979