



Title	血小板GPIIb/IIIaに対する新規拮抗薬、TAK-029の抗血栓作用に関する薬理学的研究
Author(s)	川村, 正起
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 乙第5323号
Issue Date	1998-03-25
DOI	10.11501/3137286
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/51516">http://hdl.handle.net/2115/51516</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	000000322476.pdf



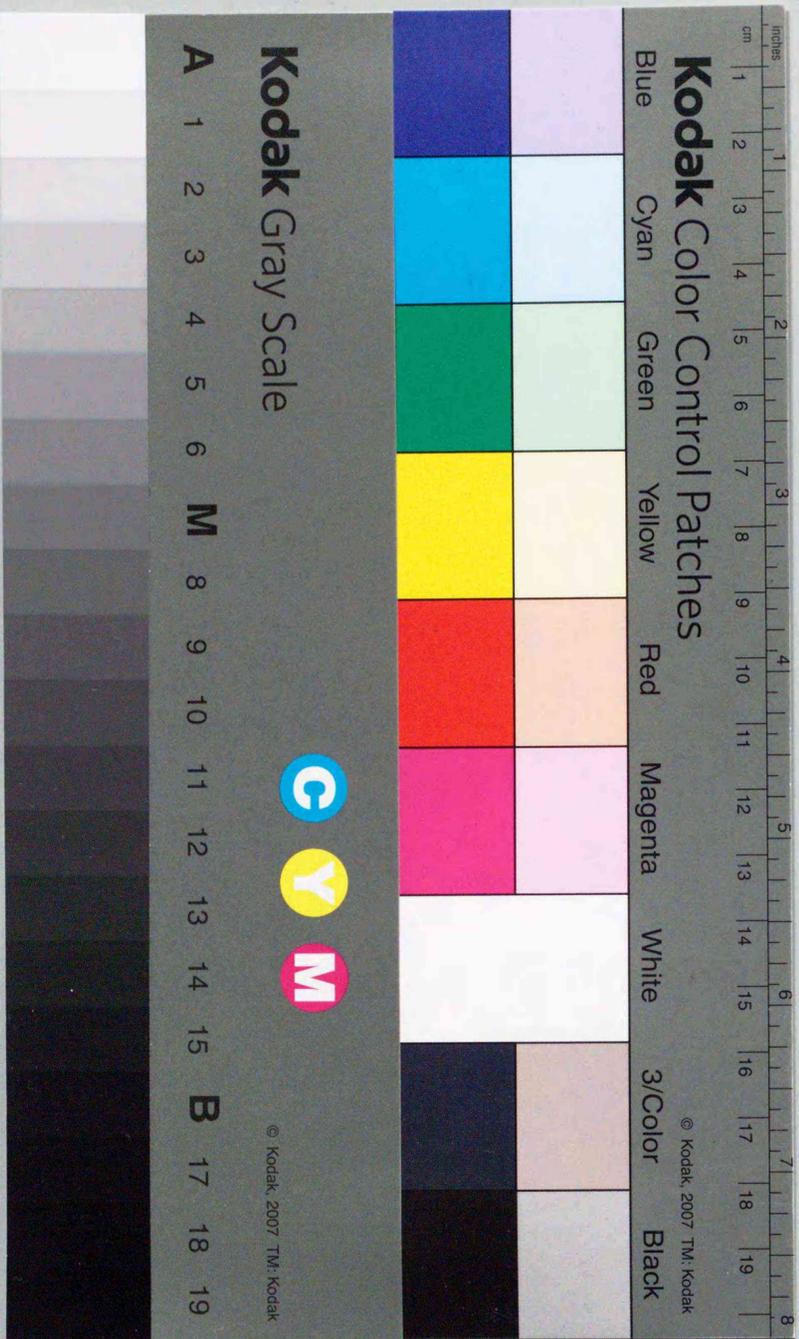
[Instructions for use](#)

血小板 GPIIb/IIIa に対する新規拮抗薬, TAK-029 の抗血栓作用に関する  
薬理学的研究

川村正起

血小板 GPIIb/IIIa に対する新規拮抗薬, TAK-029 の抗血栓作用に関する薬理学的研究

川村正起



①

血小板GPIIb/IIIaに対する新規拮抗薬, TAK-029の抗血栓作用に関する  
薬理学的研究

川村 正起

【略語】

AA	: アラキドン酸
APTT	: 活性部分トロンボプラスチン時間
BT	: 出血時間
CFRs	: 周期的血流量低下
GPIb-IX	: 糖蛋白 Ib-IX
GPIIb/IIIa	: 糖蛋白 IIb/IIIa
GRGDS	: グリシン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン
MBP	: 平均血圧
PAF	: 血小板活性化因子
PGE <sub>1</sub> -CD	: プロスタグランジンE <sub>1</sub> ・ $\alpha$ -シクロデキストリン包合体
PPP	: 乏血小板血漿
PRP	: 多血小板血漿
PT	: プロトロンビン時間
RGDF	: アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-フェニルアラニン
RGDS	: アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン
TRAP	: トロンビン受容体アゴニストペプチド
TXA <sub>2</sub>	: トロンボキサンA <sub>2</sub>
vWf	: フォンビルブランド因子

## 【目次】

	頁
I 緒論 .....	1
II 実験方法 .....	5
A 実験動物 .....	5
B 方法 .....	5
1 ヒト精製GPIIb/IIIaへのフィブリノーゲン及びvWfの結合実験法 .....	5
a GPIIb/IIIaの精製 .....	5
b 酵素免疫法を用いた結合実験 .....	6
2 ビトロネクチンへの培養ヒト血管内皮細胞の接着実験法 .....	7
3 血小板凝集実験法 .....	8
a <i>In vitro</i> 実験 .....	8
b <i>Ex vivo</i> 実験 .....	8
4 血小板粘着実験法 .....	9
a マイクロプレートを用いた <i>in vitro</i> 実験 .....	9
b ガラスビーズを用いた <i>ex vivo</i> 実験 .....	9
5 出血時間測定法 .....	10
6 血漿中TAK-029濃度測定法 .....	10
7 血栓モデル作成法 .....	11
a モルモット動静脈シャントモデル .....	11
b モルモット頸動脈バルーン傷害モデル .....	12
c モルモット脳底動脈血栓モデル .....	14
d イヌ冠動脈血栓モデル .....	15
C 使用薬物 .....	16
D 統計解析 .....	17
III 実験成績 .....	18
A TAK-029のGPIIb/IIIa阻害作用 .....	18
1 ヒト精製GPIIb/IIIaへのフィブリノーゲン及びvWf結合に対する作用 .....	18
2 ビトロネクチンへの培養ヒト血管内皮細胞の接着に及ぼす影響 .....	19
3 リストセチン凝集に及ぼす影響 .....	20

B	TAK-029の <i>in vitro</i> 血小板凝集及び粘着抑制作用 .....	21
1	各種血小板凝集惹起物質によるヒト血小板凝集に対する作用 .....	21
2	各種動物でのADP惹起血小板凝集に対する作用 .....	22
3	コラーゲン及びvWfへのモルモット血小板の粘着に対する作用 .....	23
C	モルモットでのTAK-029の <i>ex vivo</i> 血小板凝集、粘着抑制及び出血時間延長作用 .....	24
1	静脈内及び経口投与後の作用持続 .....	24
2	血漿中TAK-029濃度と血小板凝集抑制率及び出血時間との相関 .....	25
3	<i>Ex vivo</i> 血小板凝集及び出血時間に及ぼすTAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの効果 .....	26
4	<i>Ex vivo</i> 血小板粘着に対するTAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの作用 .....	29
D	TAK-029の抗血栓作用 .....	30
1	モルモット動静脈シャントモデルでのTAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの抗血栓作用 .....	30
2	モルモット頸動脈バルーン傷害モデルでのTAK-029、プロスタグランジンE <sub>1</sub> 及びアルガトロバンの抗血栓作用 .....	32
3	モルモット脳底動脈血栓モデルでのTAK-029の抗血栓作用 .....	36
4	イヌ冠動脈血栓モデルでのTAK-029の抗血栓作用 .....	39
IV	考察 .....	41
A	<i>In vitro</i> でのGPIIb/IIIa阻害及び血小板凝集抑制作用 .....	41
B	<i>Ex vivo</i> での血小板凝集抑制及び出血時間延長作用 .....	41
C	血小板粘着抑制及び出血時間延長作用 .....	42
D	各種血栓モデルでの抗血栓作用 .....	43
E	血栓症治療薬の現状とGPIIb/IIIa拮抗薬の有用性 .....	46
V	総括 .....	47
	謝辞 .....	49
	引用文献 .....	50
	英文抄録 .....	58

## I 緒論

冠状動脈及び脳主幹動脈での血栓形成は急性心筋梗塞及び急性脳梗塞など致死的な虚血性疾患の主因である (Davies & Thomas, 1985; Willerson *et al.*, 1986; Fuster *et al.*, 1992)。また、不安定狭心症、一過性脳虚血発作、末梢動脈閉塞症などの動脈血栓症はしばしば不可逆的な機能不全を引き起こす。これら血栓症の多くは動脈硬化巣を基盤として発生しており、本邦では食生活の欧米化及び平均寿命の延長に伴い、その発症頻度は増加している (居石と田中, 1989)。

動脈血栓の主体は血漿フィブリノーゲンが活性化した血小板を架橋して形成された血小板凝集塊である (Weiss *et al.*, 1987; Siess, 1989)。それゆえ、動脈血栓症治療薬としては以下に示すような血小板の活性化を抑制する種々の薬剤が用いられてきた (Ezratty & Loscalzo, 1991; Collier, 1992; Antiplatelet trialists' collaboration, 1994; Harker, 1994; Schror, 1995)。アスピリン及びチクロピジンは世界的に用いられてきた抗血小板薬であるが、両者の抗血栓効果は不完全であり、また下痢、消化器潰瘍、紫斑、白血球減少などの副作用も問題となっている (Gent *et al.*, 1989; Hass *et al.*, 1989)。近年、合成トロンビン阻害剤、トロンボキササン (TX) A<sub>2</sub>合成酵素阻害剤、セロトニン拮抗薬などが動脈血栓症治療薬として開発された。しかし、血小板の活性化はADP、トロンビン、TXA<sub>2</sub>、コラーゲン、セロトニンなど多くの生体内メディエータにより引き起こされるため、単一のメディエータを阻害するこれら薬剤の効果は不十分であった。一方、プロスタサイクリン、プロスタグランジン (PG) E<sub>1</sub>誘導体など、血小板内のcyclic AMP濃度の上昇を介して血小板の活性化を抑制する薬物も開発された。これらは*in vitro*においていずれのメディエータによる血小板凝集をも強力に抑制するが、血小板に対する特異性は低く、*in vivo*において十分な抗血小板作用を示す用量では血管拡張作用に起因した血圧低下、頭痛などを引き起こす。そのため、適用疾患はBuerger病や閉塞性動脈硬化症などの末梢循環障害に局限されている。以上の理由から、いずれのメディエータによる血小板凝集をも強力に抑制し、かつ血小板に対して特異性の高い薬剤の開発が待望されていた。

1966年、Caen *et al.*により血小板凝集能を欠く血小板無力症患者 (Glanzmann's thrombasthenia) が報告された。Nurden & Caen (1974) は、これらの患者の血小板膜に存

在する糖蛋白 (Glycoprotein: GP) IIb及びIIIaが健常人の10%以下であることを明らかにした。GPIIb/IIIaはビトロネクチン受容体 ( $\alpha_v\beta_3$ ) やフィブロネクチン受容体 ( $\alpha_5\beta_1$ ) と同じインテグリンファミリーに属する受容体である (Phillips *et al.*, 1988; Hynes, 1992)。生体内リガンドとしてはフィブリノーゲン、フォンビルブランド因子 (vWf) の他フィブロネクチン、ビトロネクチンなどが知られている (Plow *et al.*, 1985)。通常、血小板1個あたり約50,000のGPIIb-IIIaが存在し、その70%は細胞表面に、残りは開放小管系に存在する (Isenberg *et al.*, 1987)。GPIIb-IIIaは、148kDaのGPIIbと110kDaのGPIIIaのサブユニットからなり、血小板が活性化されるとCa依存性にヘテロダイマー複合体であるGPIIb/IIIaを形成する (Jennings & Phillips, 1982; Fujimura & Phillips, 1983)。現在、動脈血栓の形成におけるGPIIb/IIIaの役割に関しては図1に示す仮説が広く支持されている (Shattil, 1993; Meyer & Girma, 1993; Ruggeri, 1997)。すなわち、GPIIb/IIIaは主にvWfとの結合を介した血管壁への血小板の粘着反応、主にフィブリノーゲンとの結合を介した血小板の凝集反応の両者に関与している。特にGPIIb/IIIaへのフィブリノーゲンの結合はいずれの血小板活性化メディエータにより引き起こされる血小板凝集反応においても共通する最終段階である。それゆえ、GPIIb/IIIaを阻害する薬剤は強力な抗血栓作用を示すと予測されていた。実際、抗GPIIb/IIIaモノクローナル抗体がサル及びイヌを用いた動脈血栓モデルにおいて強力な抗血栓作用を示すこと (Coller *et al.*, 1989; Bates *et al.*, 1991)、さらに難治性不安定狭心症及びハイリスク冠動脈再建術施行患者を対象にした臨床試験においても有効であることが報告された (The EPIC Investigators, 1994; Simoons *et al.*, 1994; Topol *et al.*, 1994)。一方、フィブリノーゲンのGPIIb/IIIa結合部位に関する研究を基盤としてGPIIb/IIIa拮抗薬の研究が展開された。

フィブリノーゲンは $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ 鎖からなる分子量340,000の蛋白であり、ホモ2量体として血漿1 mlに2~4 mgの割合で含まれている。そのアミノ酸配列とGPIIb/IIIaへの結合能を解析した結果、フィブリノーゲン1分子中3箇所のGPIIb/IIIa結合部位、すなわちRGDF ( $\alpha$  95-98) 及びRGDS ( $\alpha$  572-575) 及びHHLGGAKQAGDV ( $\gamma$  400-411) が存在することが明らかとなった (Kloczewiak *et al.*, 1984; Pytela *et al.*, 1986; Farrell *et al.*, 1992)。同時にRGDS、RGDF、RGDVなどのRGD配列を有する種々のペプチドが合成され、これらが血小板凝集を抑制することが報告された (Cadroy *et al.*, 1989; Haskel *et al.*, 1989; Nichols *et al.*,

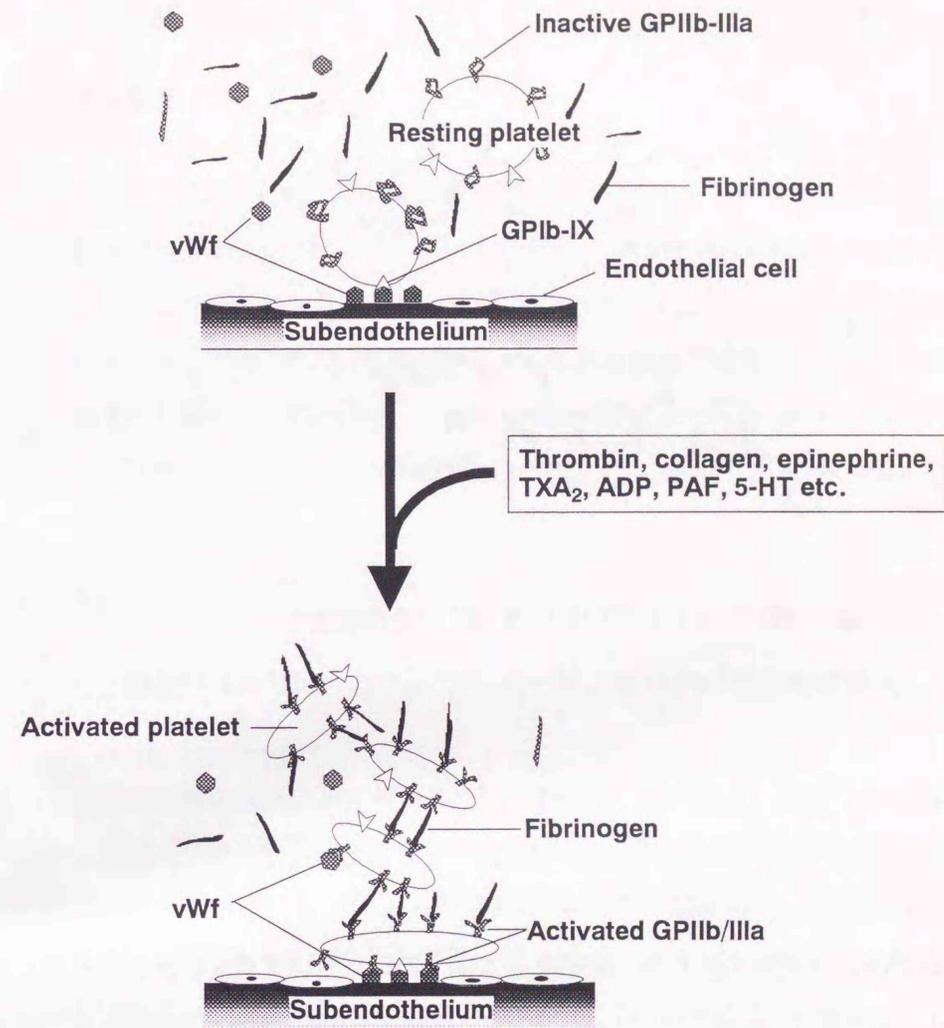
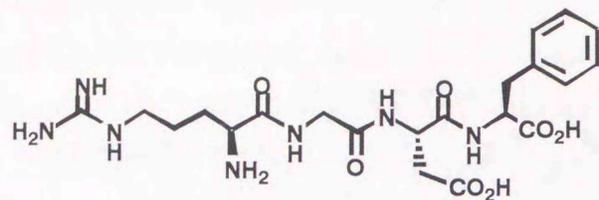


図1 動脈血栓形成機序

動脈血栓の形成は以下の①~⑥の段階を経て形成されると考えられている。①動脈硬化の亢進などにより血管内皮が傷害されると、内皮下組織に血漿フォンビルブランド因子 (vWf) が結合する。②vWfへのGPIb-IXの結合を介して血小板の接着及び活性化が生じる。③血小板の活性化と同時にGPIIb/IIIaの立体構造が変化する。④vWfへの活性化GPIIb/IIIaの結合を介して血小板が強固に粘着する。⑤血液の鬱滞や血小板の活性化に伴いトロンビン、コラーゲン、ADPなどが局所的に産生されて、血小板の活性化が加速される。⑥血漿フィブリノーゲンが活性化GPIIb/IIIa同士を架橋し (血小板の凝集)、血小板凝集塊が形成される。アスピリン、チクロピジンなど既知の抗血小板薬は血小板活性化物質の産生又は作用を阻害して血小板の活性化を抑制する。GPIIb/IIIa阻害薬は、活性化GPIIb/IIIaとvWf及びフィブリノーゲンとの結合を阻害して、血小板の粘着及び凝集を抑制する。

A



B

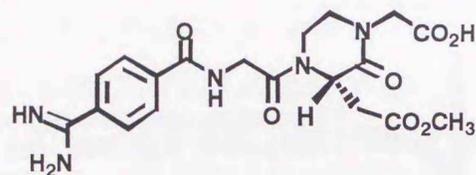


図2 RGDF (A) 及びTAK-029 (B) の化学構造式

1992; Barker *et al.*, 1992)。しかし、これらペプチド性拮抗薬の凝集抑制作用は弱く、また血中半減期も短いため *in vivo* で抗血栓作用を発現させるためには非常に高用量の静脈内投与が必要であった。

TAK-029はRGDFの化学構造を基に武田薬品工業(株)において合成された非ペプチド性のGPIIb/IIIa拮抗薬である(図2)。本研究では、初めにTAK-029のGPIIb/IIIa阻害作用、血小板凝集及び粘着抑制作用について検討した。次に、モルモットにおいて新たに作成した動静脈シャントモデル、頸動脈バルーン傷害モデル、光化学反応により惹起した脳底動脈血栓モデル及び既知の不安定狭心症モデルであるイヌ冠動脈血栓モデルを用いてTAK-029の抗血栓作用を検討した。また、抗血栓薬の副作用である出血時間の延長を既知の抗血栓薬と比較した。それらの結果から、本論文では血栓症治療薬としてのTAK-029の有用性について報告する。

なお本論文の内容は2編の論文として公表済みである(Kawamura *et al.*, 1996; Kawamura *et al.*, 1997)。

## II 実験方法

### A 実験動物

本研究では以下の実験動物を使用した。Hartley系モルモット(日本SLC)、ビーグル(東洋ビーグル)、カニクイザル(加商)、Sprague-Dawley系ラット(日本クレア)、ニュージーランド白色系ウサギ(北山ラベス)、チャイニーズハムスター(日本クレア)、ICRマウス(日本クレア)。これらは全て雄性を使用し、動物実験に関するガイドライン、*The guide for the care and use of laboratory animals* (NIH Publication No. 85-23, Revised 1985) に従い実験を行った。ヒト血小板は、健常男性ボランティアより採取した。

### B 方法

#### 1 ヒト精製GPIIb/IIIaへのフィブリノーゲン及びvWfの結合実験法

##### a GPIIb/IIIaの精製

ヒトGPIIb/IIIaの精製はFitzgerald *et al.* (1985)の方法に従い行った。輸血用濃縮血小板浮遊液(Intergen)を、4°C、1,000 x gで20分間遠心分離した。沈査を1% Triton X-100を含むTris緩衝液(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM APMSF, 10 nM leupeptin, 0.05% NaN<sub>3</sub>, pH 7.35)に懸濁した後、4°Cで12時間攪拌して血小板を溶解した。溶解液中の糖蛋白をTris緩衝液にて平衡化したconcanavalin A-Sepharose 4Bカラム(Pharmacia)へ吸着させた。0.5 Mのα-D-methylmannopyranosideにより糖蛋白を溶出させた後、溶出液を同様に平衡化したheparin-Sepharoseカラム(同)及びDEAE-Sepharoseカラム(同)、さらにSephacryl S-300 gel-filtrationカラム(同)を用いて順次ゲル濾過して、粗GPIIb/IIIa画分を調製した。次に、GRGDSを吸着させたCH-Sepharoseカラム(同)を用いて、粗GPIIb/IIIa画分中のGPIIb/IIIaを吸着させた。3 mMのRGDSでGPIIb/IIIaを溶出させた後、溶出液をTris緩衝液で4°C、2日間透析してRGDSを除去した。このようにして精製したGPIIb/IIIa溶液の蛋白濃度はBradford *et al.* (1976)の方法に従いCoomassie Brilliant Blue法を用いて測定した。

## b 酵素免疫法を用いた結合実験

固層化GPIIb/IIIaへのヒト血漿由来フィブリノーゲン及びフォンビルブランド因子(vWf)の結合実験はCharo *et al.* (1991)の方法に準じて行った。フィブリノーゲン及びvWfを0.1 MのNaHCO<sub>3</sub> (pH 8.4)にそれぞれ1 mg/mlとなるように溶解した後、Sulfo-NHS-ビオチン(最終濃度: 75 µg/ml)を添加した。30°Cで30分間反応させた後、Tris緩衝液(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.35)を用い4°Cで48時間透析した。ビオチンで標識したフィブリノーゲン及びvWf溶液は遠心式限外濾過チューブ(Centricon 100, Amicon)を用いて濃縮した。その後、それぞれの蛋白濃度を測定した。前項で調製したGPIIb/IIIaをTris緩衝液(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4)に1 µg/mlとなるように希釈した後、100 µlずつ96穴マイクロイムノプレートに分注して、4°Cにて48時間静置した。ウェル内の緩衝液を吸引除去した後、ブロッキング用のTris緩衝液(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 25% Block Ace (大日本製薬), 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4)を200 µlずつ加え、20°Cにて2時間静置した。洗浄用Tris緩衝液(50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10% Block Ace, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.4)でウェルを洗浄した後、同Tris緩衝液(80 µl)、被験薬(10 µl)、10 µlのビオチン標識フィブリノーゲン(最終濃度: 1 nM)又はビオチン標識vWf(最終濃度: 10 nM)を添加して、室温で16時間反応させた。洗浄後、同緩衝液にて1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ビオチン抗体を100 µlずつ添加し、20°Cで2時間反応させた。洗浄後、Diethanolamine緩衝液(10% diethanolamine, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 9.8)に溶解した

-nitrophenylphosphate (1 mg/ml)を100 µl添加して、室温にて30分間静置した。0.4 NのNaOHで反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー(MTP-32, コロナ電気)を用いて波長405 nmの吸光度を測定した。被験薬に代えて1 µMのフィブリノーゲン又は0.3 µMのvWfを添加した場合のビオチン標識フィブリノーゲン又はビオチン標識vWfの結合をそれぞれ非特異的結合として、被験薬の結合阻害率を算出した。

## 2 ビトロネクチンへの培養ヒト血管内皮細胞の接着実験法

実験には2~5代継代培養した正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(クラボウ)を用いた。コンフルエントに培養した細胞をリン酸緩衝液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)で洗浄した後、トリプシン(0.025%)及びEDTA(0.01%)を含む同緩衝液にて細胞を収穫した。10%ウシ胎児血清を含む同緩衝液に細胞を浮遊させた後、室温、120 x gにて15分間遠心して細胞ペレットを得た。ペレットをHepes(20 mM)を含む血管内皮細胞培養用基礎培地(E-GMUV, クラボウ)(pH 7.0)に懸濁した後、細胞数をコールターカウンター(COULTER Z1, コールタージャパン)を用いて測定した。細胞数は2.5x10<sup>5</sup>/mlとなるように調製した。0.05 Mの炭酸-重炭酸緩衝液(15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6)に溶解したヒト血漿由来ビトロネクチン(最終濃度: 100 µg/ml)を96穴マイクロイムノプレートに50 µlずつ添加して4°Cにて16時間放置した。リン酸緩衝液で洗浄した後、Hepes(20 mM)及びBSA(0.5%)を含む血管内皮細胞培養用基礎培地(pH 7.0)を70 µlずつ分注した。同培地で希釈した被験薬(10 µl)を加えた後、細胞浮遊液(20 µl)を添加し、37°Cで2時間放置した。各ウェルの溶液をゆっくりと吸引除去した後、200 µlのHepes緩衝液(20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0)を静かに加え、再び吸引除去した。この操作を3回繰り返した。接着した細胞数はβ-D-glucosaminase活性を測定することで定量した。すなわち、*p*-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide(3.75 mM)を含むクエン酸緩衝液(0.1 M citrate, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.25% Triton X-100, pH 5.5)を100 µlずつ加えた後、37°Cにて16時間振倒下に放置した。0.4 NのNaOHを100 µlずつ加えた後、マイクロプレートリーダーを用い、405 nmの吸光度を測定した。10 mMのGRGDSを添加した場合の吸光度を非特異的な細胞接着として接着抑制率を算出した。

### 3 血小板凝集実験法

#### a *In vitro*実験

ヒト及びイヌでは橈側皮静脈、サルでは大腿静脈より覚醒下で採血した。ウサギでは心臓、その他の動物では腹部大動脈よりペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) にて採血した。ヒト及びサルでは3.8%その他の小動物では3.15%のクエン酸3ナトリウム溶液を予め満たした注射筒を用いて、その9倍容量の全血を採取した。採血後、室温、1,000 x gで5~10秒間及び20分間遠心して、それぞれ多血小板血漿 (platelet rich plasma : PRP) 及び乏血小板血漿 (platelet poor plasma : PPP) を得た。PRP中の血小板数は、全自動血球計数装置 (Sysmex E4000, 東亜医用電子) を用いて測定した後、ヒト、サル及びイヌでは $30 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、ラットでは $50 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、その他の動物では $40 \times 10^4 / \mu\text{l}$ となるようにPPPを用いて希釈した。血小板凝集能は、8チャンネル血小板凝集能測定装置 (NBS HEMATRACER VI, 二光バイオサイエンス) を用いて、Born (1962) の方法に従い、比濁法にて測定した。すなわち、PRP (250  $\mu\text{l}$ ) をマイクロスターラの入ったキュベットに入れ、攪拌 (1,000 rpm) しながら37°Cで2分間予備加温した後、被験薬または生理食塩水 (25  $\mu\text{l}$ ) を添加した。さらにその2分後に生理食塩水に溶解したADPなどの血小板凝集惹起物質 (25  $\mu\text{l}$ ) を加え、血小板凝集により生じる透過度の変化を経時的に記録した。PRP及びPPPの透過度をそれぞれ0及び100%として凝集率を求めた。被験薬の代わりに生理食塩水を添加した時 (対照) の最大凝集率と被験薬添加時の最大凝集率の比から凝集抑制率を算出した。凝集惹起物質は対照において最大凝集を引き起こす最小濃度を用いた。

#### b *Ex vivo*実験

*In vitro*実験と同様に採血を行いPRP及びPPPを調製した。キュベットへは220  $\mu\text{l}$ のPRPを入れ、2分間の予備加温の後に20  $\mu\text{l}$ のADP又はコラーゲンを添加した。モルモットでは対照群、イヌでは被験薬投与前において最大凝集を惹起する最小濃度の血小板凝集惹起物質を用いた。モルモットの場合、週令、絶食状態、Lotなどにより凝集惹起物質に対する血小板の感受性に変化が認められたため、各実験ごとに2~3例の

動物を対照群として用いた。これら対照群及び被験薬投与前の血小板凝集率から抑制率を算出した。

### 4 血小板粘着実験法

#### a マイクロプレートを用いた*in vitro*実験

雄性Hartley系モルモット (体重: 350-450 g) を用いた。ヘパリンを生理食塩水で5 unit/mlとなるように希釈した後、全血9容に対してヘパリン溶液1容の割合で心臓採血した。PPP及びPRPの調製は前述の血小板凝集実験法に準じて行った。炭酸-重炭酸緩衝液 (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6) を用いてタイプIコラーゲン及びvWfをそれぞれ100  $\mu\text{g/ml}$ となるように溶解した。96穴マイクロイムノプレートに50  $\mu\text{l}$ ずつ分注して、4°Cで16時間放置した。Hepes-Tyrode緩衝液 (3.5 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.5 mM Glucose, 0.35% BSA, pH 7.35) にて洗浄した後、BSA (1%) を含む同緩衝液 (100  $\mu\text{l}$ ) を分注して、1時間、室温に放置した。洗浄後、生理食塩水に溶解した被験薬を25  $\mu\text{l}$ ずつ分注し、さらに調製したモルモットのPPP又はPRPを200  $\mu\text{l}$ ずつ添加した。室温に90分間放置した後、同緩衝液を用いて4回洗浄した。粘着した血小板数は、前述の血管内皮細胞の接着実験法と同様に $\beta$ -D-glucosaminidase活性を測定することにより定量した。血小板数と $\beta$ -D-glucosaminidase活性との相関を検討する目的で洗浄血小板を調製した。すなわち、PRPに $\text{PGE}_1$  (最終濃度: 1  $\mu\text{M}$ ) を加えて、1,000 x gで20分間遠心し、血小板ペレットを採取した。これをHepes-Tyrode緩衝液へ懸濁した後、再び $\text{PGE}_1$ を添加して遠心した。再び懸濁して、血小板浮遊液中の血小板数を自動血球計数装置を用いて測定した。その後、 $\beta$ -D-glucosaminidase活性を測定して血小板数との相関を算出した。

#### b ガラスビーズを用いた*ex vivo*実験

タイプIコラーゲンでコートしたガラスビーズを充填したカラム (プラビーズカラム, ISK) を用いた。被験薬を経口投与して2時間後にペントバルビタール麻酔下 (25 mg/kg, i.p.) で開腹して、腹部大静脈を露出させた。静脈に留置針 (20 G) を挿入し

た後、カラムを介して定速にて採血を行った。すなわち、シリンジインフュージョンポンプ (Model 2400-004, Harvard Apparatus) に6% EDTA溶液 (100  $\mu$ l) を含む注射筒を接続し、カラムを介して、2 ml/minの速度で30秒間採血し、その直後に同個体からカラムを介さずに同様に採血した。採血後、両血液サンプルの血小板数を自動血球計数装置を用いて測定し、ガラスビーズに粘着した血小板の割合及び被験薬による粘着抑制率を算出した。

## 5 出血時間測定法

モルモット及びイヌでの出血時間の測定は、Becker & Miller (1989) 及びCollen *et al.* (1994) の方法に従い、いずれもテンプレート法を用いて測定した。モルモットでは前日に左大腿及び下腿部を除毛クリーム (ディベール, 資生堂) を用いて脱毛した。ペントバルビタール麻酔下 (25 mg/kg, i.p.) で、大腿部にゴム製のカフ (ペンローズドレインチューブ, IMG) をかけ、40 mmHgの圧を血圧キャリブレーション装置 (XCALIBER, Bio-Tek) を用いて負荷した。その後、Simplat II R (Organon Teknika) を用いて2か所に切創を作成した。濾紙を用い30秒間隔で血液を吸引し、出血が止まるまでの時間を測定した。出血時間は最大30分間測定した。2か所の出血が止まるまでの時間の平均値を出血時間とした。イヌでは前腕橈側部を剃刀を用いて除毛した後、Simplat R (同上) を用いて切創を1か所作成し、モルモットの場合と同様に出血時間を測定した。

## 6 血漿中TAK-029濃度測定法

血漿サンプルは*ex vivo*血小板凝集実験で採取したPPPを用いた。100  $\mu$ lの血漿サンプルを蒸留水で5倍に希釈し、0.5 NのHCl (500  $\mu$ l) を加えてSilica-Cart C18 cartridge (和光純薬) へ注入した。同cartridgeを蒸留水 (3 ml) で洗浄した後、3 mlのリン酸カリウム溶液 (0.02 M) / アセトニトリル (20:80, v/v) によりTAK-029を溶出させた。溶出液を窒素ガスを用いて風乾させた後、300  $\mu$ lの蒸留水に溶解し、1,000 x gで5分間遠心分離して、上清を採取した。上清中のTAK-029濃度は逆層液体クロマトグラフィー (HPLCシステム, 島津製作所) を用いてカラムスイッチング法により測定し

た。予備分離用の1次カラム及び分析用の2次カラムともDevelosil ODS-UG-5 (野村化学) を用いた。移動相の組成は1次カラムではリン酸カリウム溶液 (0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{SO}_3\text{Na}$ , pH 3.0) / メタノール (88 : 12, v/v) 、2次カラムではリン酸カリウム溶液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02 M, pH 2.5) / メタノール (89 : 1, v/v) とした。最終的に238 nmの紫外吸収の面積を測定した。TAK-029を添加した正常血漿を用いて検量線を作成し、血漿サンプル中のTAK-029濃度を定量した。最小測定限界は5 ng/mlであった。

## 7 血栓モデル作成法

### a モルモット動静脈シャントモデル

雄性Hartley系モルモット (体重: 300-350 g) を用いた。ペントバルビタール麻酔下 (25 mg/kg, i.p.) で左頸動脈及び右頸静脈を剥離し、生理食塩水を満たしたポリエチレンチューブを用いてシャントを作成した (図3)。チューブ内には予め直径0.5 mmの綿糸を留置した。チューブの途中のシリコン接合部をクレンメを用いて止めて血流を遮断した。ヘパリン (50 unit/kg) を橈側皮静脈より投与した後、15分間血液を灌流した。その後、血流を遮断して、綿糸を取り出し、綿糸に付着した血栓の湿重量 (予め測定した綿糸の湿重量を引いた値) を計測した。同様の操作を新しい綿糸を留置した新しいチューブを用いて繰り返した。2回の血栓湿重量の合計を算出した。形成さ

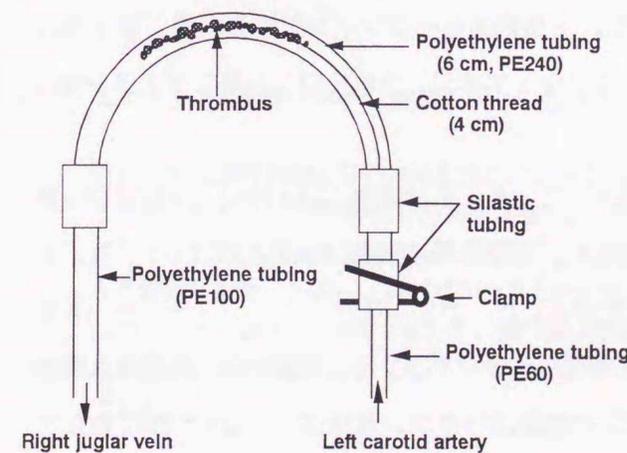


図3 モルモット動静脈シャントモデルの作成法

麻酔下で右頸静脈及び左頸動脈間にポリエチレンチューブ製のシャントを作成した。シャント内には綿糸を留置し、生理食塩水を満たした。クランプをはずして血液を15分間灌流した。綿糸に付着した血栓の湿重量を測定した。同様の操作を綿糸を留置した新しいチューブを用いて繰り返した。

れた血栓を組織学的に検討する目的で、血栓形成部位の綿糸を10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定した。パラフィン包埋後、薄切切片(3~5 $\mu$ m)を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色及びリンタングステン酸ヘマトキシリン染色を行った。

#### b モルモット頸動脈バルーン傷害モデル

雄性Hartley系モルモット(体重:300-350g)を用いた。ペントバルビタール麻酔下(25mg/kg, i.p.)で左頸動脈を剥離し、右頸静脈に被検薬投与用のカニューレを挿入した(図4)。開腹した後、血栓除去用バルーンカテーテル(Fogarty 2F, Baxter)を左総腸骨動脈より左頸動脈まで挿入した。バルーン内に250 $\mu$ lの空気を注入して膨らませ、内外頸動脈分岐部より大動脈までを擦過して血管内皮を傷害した。この操作を5回繰り返した。その後、0.7mmの血流測定用プローブ(Skalar)を傷害部に装着した。血流量は電磁血流計(MDL1401, Skalar)を用い、増幅器(1253A, 日本電気メディカルシステムズ)を介してポリグラフ(Recti Horiz 8K, 日本電気メディカルシステムズ)上に記録した。血流量の変化をプローブ装着後60分間観察し、血流が消失した場合を完全閉塞として閉塞時間を算出した。被検薬は全投与量の25%を1ml/kgの容量にてbolus投与し、直後より残りの75%を50 $\mu$ l/kg/hrの容量で60分間持続注入した。

内皮傷害部に形成される血栓像を組織学的に検討する目的で、実験終了後に腹部大静脈を切開し、左心室より生理食塩水を注入して血液を洗い流した後、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて灌流固定した。左頸動脈をパラフィン包埋した後、薄切切片(3~5 $\mu$ m)を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色及びリンタングステン酸ヘマトキシリン染色を行った。

手術を施さない別のモルモットを用いて、血小板凝集能、出血時間、血圧及び血液凝固系に及ぼす被検薬の影響を検討した。右頸静脈に薬物投与用のカニューレを、左頸動脈に血圧測定用のカニューレを挿入した。血圧は圧トランスジューサー(DX-360R, 日本光電)を用いて経時的に測定し、ポリグラフ上に記録した。持続注入開始30分後に出血時間を、60分後に腹部大動脈よりクエン酸採血(全血4.5mlに対して3.15%クエン酸3ナトリウム0.5ml)を行い、PRP及びPPPを採取して*ex vivo*血小板ADP

凝集抑制作用を検討した。また、自動血液凝固能測定装置(Biomatic B10, Sarstedt)を用いてプロトロンビン時間(PT)及び活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。すなわち、PPP(100 $\mu$ l)を37 $^{\circ}$ Cで3分間予備加温した後、トロンボプラスチン(200 $\mu$ l, 和光純薬)を添加することでPTを、PPP(100 $\mu$ l)と活性部分トロンボプラスチン(100 $\mu$ l, 和光純薬)を混和し、5分間予備加温した後、100 $\mu$ lの塩化カルシウム溶液(20mM CaCl<sub>2</sub>)を添加することでAPTTを測定した。

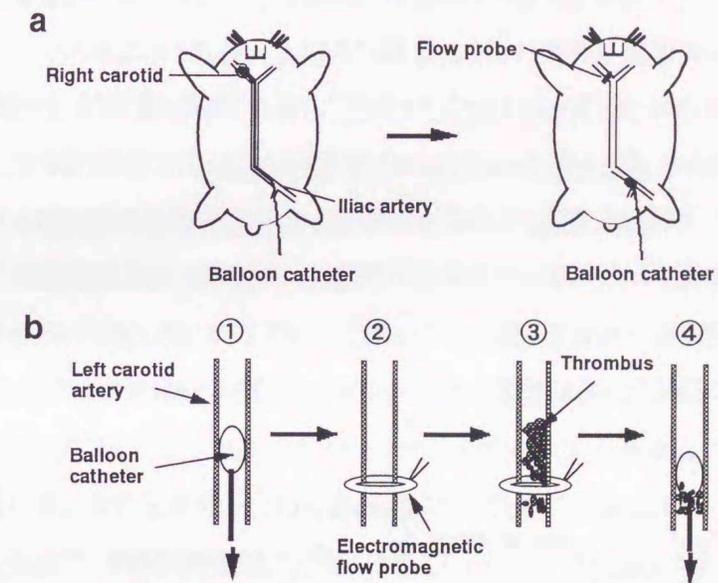


図4 モルモット頸動脈バルーン傷害モデルの作成法

麻酔下で左腸骨動脈より右総頸動脈にバルーンカテーテルを挿入した(a)。バルーンを膨らませ、擦過して頸動脈血管内皮を傷害した(b-①)。傷害後、電磁血流計プローブを装着して、頸動脈血流量を測定した(b-②)。5分以内に血栓閉塞により血流量が消失することを確認した後(b-③)、再びバルーンカテーテルを挿入して、血栓を除去した(b-④)。この①~④の操作を5回繰り返した。被検薬は最終の血栓除去操作の直前に全投与量の25%を静脈内bolus投与し、残りの75%を60分間で持続注入した。その後60分間、血流量を測定した。

### c モルモット脳底動脈血栓モデル

雄性Hartley系モルモット（体重：300-350g）を用いた。ペントバルビタール麻酔下（25mg/kg, p.o.）、人工呼吸下（5ml/beat, 30beat/min）で実験を行った（図5）。光化学反応による血管内皮傷害モデルの作成法はMatsuno *et al.* (1991) の方法に準じた。左総頸静脈に被検薬投与用のカニューレを挿入し、両側の頸動脈を結紮した。蝶形骨を露出させた後、歯科用ドリルを用いて直径約2mmの穴を開け、硬膜を破らないように脳幹上に位置する脳底動脈を露出させた。他方、前頭骨に直径約4mmの穴を開け錐体静脈を同様に露出させた。錐体静脈の血流量をレーザー血流計（FLO-N1, ニューロサイエンス）を用いて経時的に測定し、ポリグラフ上に記録した。錐体静脈血流量を脳血流量の指標とした。光源（L4887, 浜松ホトニクス）からの540nmの緑色光（ $5 \times 10^5$  lux）をガラスファイバーを介して脳底動脈に照射し、同時に生理食塩水に溶解したローズベンガル（10mg/kg）を1ml/kgの容量で静脈内投与した。脳血流量が投与前の50-60%まで減少したことを確認した後、TAK-029を1ml/kgの容量で投与した。脳血流量はTAK-029投与後60分間測定し、血流の消失を脳底動脈の完全閉塞とした。対照群ではTAK-029の代わりに生理食塩水を投与した。実験終了後、放血死させ光照射部の脳底動脈を脳幹部とともに摘出し、10%中性緩衝ホルマリンリン液に

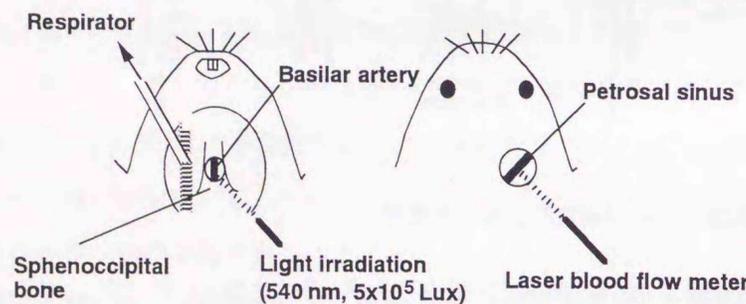


図5 光化学反応によるモルモット脳底動脈血栓モデルの作成法

麻酔下、人工呼吸下で蝶形骨に開けた2mm穴を介して脳底動脈に波長540nmの緑色光（ $5 \times 10^5$  lux）を照射した。同時にローズベンガルを静脈内投与し、光照射により局所的にラジカルを産生させて血管内皮を傷害した。前頭骨下の錐体静脈を露出させ、その血流量をレーザー血流計を用いて測定した。錐体静脈血流量を脳血流量の指標とした。

て固定した。パラフィン包埋後、薄切切片（3~5  $\mu$ m）を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

*Ex vivo*血小板凝集実験及び出血時間の測定は、手術を施さない別のモルモットを用いて、TAK-029投与前、投与5及び60分後に行った。

### d イヌ冠動脈血栓モデル

Folts *et al.* (1976) の方法に準じて作成した。ペントバルビタール麻酔下（25 mg/kg, i.v.）、人工呼吸下（15 ml/kg, 18 beats/min）で実験を行った。眼瞼反射の消失を指標に麻酔深度を確認し、適時麻酔を追加した。左大腿動脈及び左右大腿静脈に血圧測定用、エピネフリン持続注入用及びTAK-029投与用のカニューレをそれぞれ挿入した。左第6及び第7肋骨間を開胸し、さらに心嚢膜を切開して心臓を露出させた。左冠状動脈前下降枝を2-3cm剥離して直径1.5-2.0mmの電磁血流計プローブ（Skalar）を装着した。冠動脈血流量は電磁血流計（MDL1401, Skalar）を用いて、また全身血圧は圧トランスジューサーを用いて経時的に測定し、ポリグラフ上に記録した。その後、エピネフリンの持続注入（ $0.75 \mu$ g/kg/min,  $100 \mu$ l/kg/min）を開始した。持続注入60分後に血流計プローブの遠位端を鉗子を用いて傷害した後、プラスチック性のコンストリクターを装着した。血栓の形成による血流量の消失と血栓塊の流出による血流再開が繰り返し生じる現象、いわゆる周期的血流量低下（cyclic flow reductions: CFRs）が生じるまで、順次内径がより小さいコンストリクターに替えた。血栓塊の流出が自

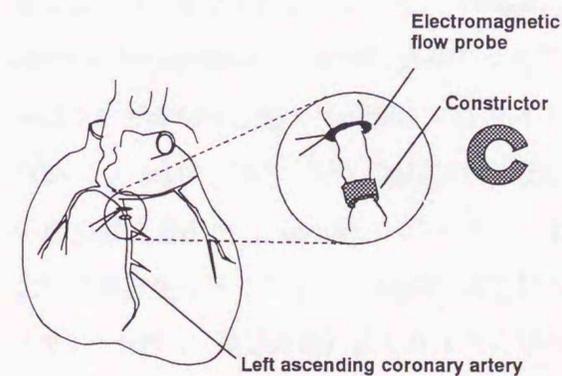


図6 イヌ冠動脈血栓モデルの作成法

左冠状動脈前下行枝を剥離して電磁血流計プローブ及び血管狭窄用のプラスチック製のコンストリクター（幅：1.5mm, 外径：3mm）を装着した。血管狭窄部位において血栓形成と流出が繰り返されることで生じる冠血流量の変化、いわゆるCFRsを経時的に記録した。

発的に生じない場合は、コンストリクターを振動させて人為的に血栓塊を流出させた。一連の実験ではCFRsが一定の頻度で生じることを30-60分間観察した後、TAK-029を静脈内投与した。

*Ex vivo*血小板凝集実験及び出血時間の測定は、手術を施さない別のイヌを用いてTAK-029静脈内投与前、投与5及び60分後に行った。

### C 使用薬物

TAK-029 (3-methyl hydrogen (s)-4-[N-(4-amidinobenzoyl) glycy]-2-oxo-1,3-piperazinediacetate) (図 2)、チクロピジン (5-(o-chlorobenzyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno [3,2-c] pyridine hydrochloride) 及びクロピドグレル (d-methyl(2-chlorophenyl)-5-(4,5,6,7-tetrahydrothieno) (3,2-c)-pyridinyl)acetate, hydrogensulfate) は武田薬品工業、創薬第1研究所において合成した。アスピリン、PGE<sub>1</sub>・ $\alpha$ -シクロデキストリン包合体 (PGE<sub>1</sub>・CD) 及びアルガトロバン ((2R,4R)-4-methyl-1-[N<sup>2</sup>-(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinolinesulfonyl)-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid monohydrate) はそれぞれ和光純薬、小野薬品工業及び第一製薬より購入した。その他、本実験において用いた試薬を以下に示す。(4-Amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride hydrochloride monohydrate (APMSF, Boehringer Mannheim)、leupeptin (Boehringer Mannheim)、Sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide (NHS)-ビオチン (Pierce)、ヒト血漿フィブリノーゲン (Sigma)、ヒト血漿vWf (Bachem)、RGDS (ペプチド研)、GRGDS (ペプチド研)、アルカリフォスファターゼ標識抗ビオチン抗体 (Sigma)、*p*-nitrophenylphosphate (BioRad)、ヒト血漿ビトロネクチン (Sigma)、トリプシン (クラボウ)、ウシ胎児血清 (大日本製薬)、ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma)、*p*-nitrophenyl *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (生化学工業)、リストセチン (Sigma)、抗ヒトGPIIbモノクローナル抗体 (HPL 7, 生化学工業)、正常マウスIgG (PP 100, Sigma)、ADP (Boehringer Mannheim)、タイプ I コラーゲン (Horm)、血小板活性化因子 (PAF, フナコシ)、アラキドン酸ナトリウム (Sigma)、トロンビン受容体アゴニストペプチド (TRAP, Bachem)、ヘパリンナトリウム (清水製薬)、PGE<sub>1</sub> (フナコシ)、ローズベンガル (和光純薬)、10%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬)。そ

の他の試薬はいずれも市販の特級を用いた。被検薬は経口投与する場合には5%アラビアゴムにて懸濁して、静脈内投与する場合には生理食塩水に溶解して投与した。また、チクロピジン及びクロピドグレルに関しては2日以上連日投与により作用が増強することが報告されている (Defreyn *et al.*, 1989 ; Herbert *et al.*, 1993)。それゆえ、チクロピジン及びクロピドグレルに関しては単回投与に加えて、1日1回、3日間の連日投与 (以下 $\times 3$ と表記) を行った。

### D 統計解析

実験より得られた数値は平均値 $\pm$ 標準誤差、 $n$ =例数として表記した。IC<sub>50</sub>値及びその信頼限界は最小2乗法により作成した回帰直線より算出した。平均値の比較についてはDunnettの多重比較検定を行い $p < 0.05$ を有意な差と判定した。相関係数の算出はMicrosoft Excel version 4.0を用いて算出した。

### III 実験成績

#### A TAK-029のGPIIb/IIIa阻害作用

##### 1 ヒト精製GPIIb/IIIaへのフィブリノーゲン及びvWfの結合に対する作用

ヒト精製GPIIb/IIIaへのビオチン標識フィブリノーゲンの結合に対するTAK-029、RGDS及びGRGDSの $IC_{50}$ 値はそれぞれ1.6 (1.4-1.8) nM、330 (270-410) nM及び190 (140-240) nMであり (括弧内は95%信頼限界値)、ビオチン標識vWfの結合に対する $IC_{50}$ 値はそれぞれ1.1 (0.91-1.3) nM、150 (120-210) nM及び70 (53-88) nMであった (図7)。

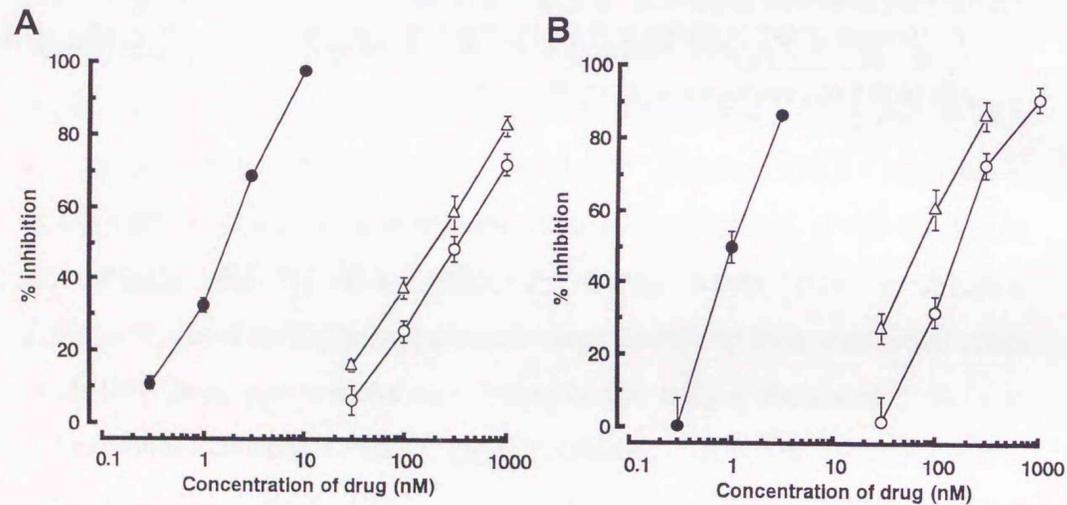


図7 ヒト精製GPIIb/IIIaへのビオチン標識フィブリノーゲン (A) 及びビオチン標識vWf (B) の結合に対するTAK-029(●)、RGDS(○)及びGRGDS(△)の阻害作用

阻害率はそれぞれ1  $\mu$ Mの非ビオチン標識フィブリノーゲン (A) 及び0.3  $\mu$ Mの非標識vWf (B) 添加時の抑制率を100%として算出した。n=3-6。

#### 2 ビトロネクチンへの培養ヒト血管内皮細胞の接着に及ぼす影響

ビトロネクチンへのヒト血管内皮細胞の接着はGPIIb/IIIaと同じ $\beta_3$ インテグリンファミリーに属するビトロネクチン受容体 ( $\alpha_v\beta_3$ ) を介して主に生じること、GRGDSはこの接着を阻害することが報告されている (Albelda *et al.*, 1989; Foster *et al.*, 1993)。TAK-029のGPIIb/IIIaに対する特異性を検討する目的で、ビトロネクチンへの培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の接着に及ぼすTAK-029及びGRGDSの作用を比較した (図8)。GRGDSは37 (18-79) nMの $IC_{50}$ 値にて内皮細胞の接着を抑制したが、TAK-029は1 mMの高濃度においても接着に影響を与えなかった (括弧内は95%信頼限界値)。

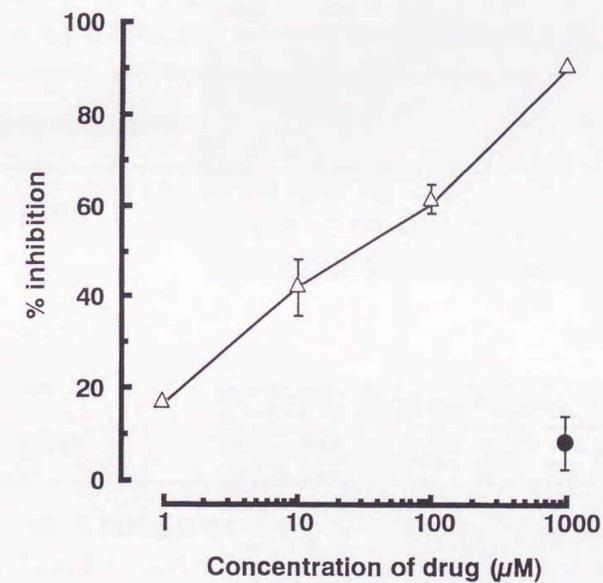


図8 ビトロネクチンへの培養ヒト血管内皮細胞の接着に及ぼすTAK-029 (●) 及びGRGDS (△) の影響

阻害率は10 mMのGRGDS添加時の抑制率を100%として算出した (n=3)。

### 3 リストセチン凝集に及ぼす影響

リストセチンは血小板膜上のGPIIb-IXと血漿中のvWfとの結合を介した血小板凝集を引き起こすこと、さらに両者の結合によりGPIIb/IIIaとフィブリノーゲンとの結合を介した二次的凝集が生じることが報告されている (Howard & Firkin, 1971 ; Kroll *et al.*, 1991)。抗GPIIb抗体であるHPL 7はリストセチンによるヒト血小板凝集を完全に抑制した (図9-A)。一方、TAK-029は30  $\mu$ Mの高濃度においてもリストセチン添加直後の凝集を抑制せず、二次的凝集のみを抑制した (図9-B)。TAK-029はGPIIb-IXとvWfの結合には影響を与えず、GPIIb/IIIaを介して生じる血小板凝集のみを特異的に抑制すると考えられた。

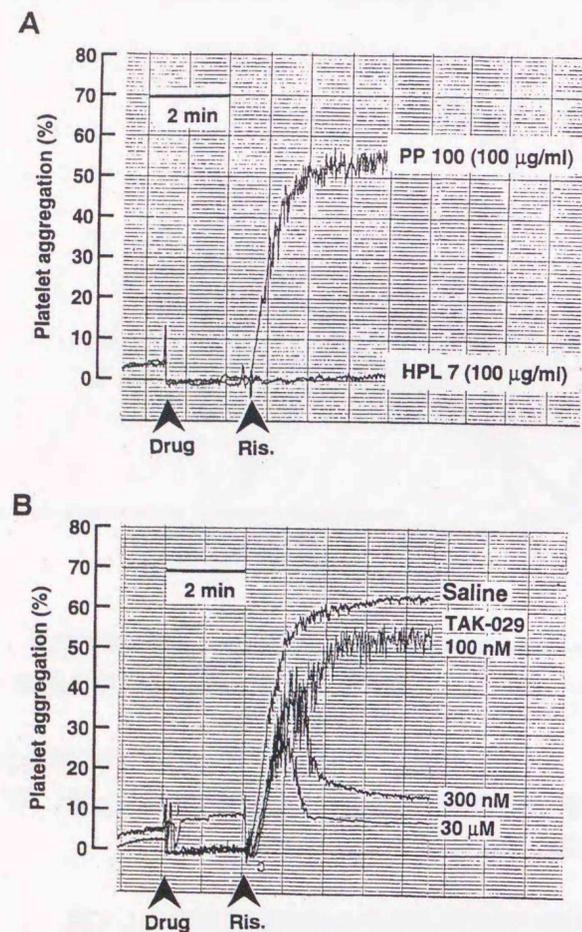


図9 リストセチンにより惹起したヒト血小板凝集に及ぼすTAK-029の影響

抗GPIIbモノクローナル抗体 (HPL 7) の影響 (A)。TAK-029の影響 (B)。被験薬 (Drug) 添加2分後にリストセチン (Ris, 最終濃度: 1.25 mg/ml) を加えた。PP, 正常マウスIgG。

### B TAK-029の *in vitro* 血小板凝集及び粘着抑制作用

#### 1 各種血小板凝集惹起物質によるヒト血小板凝集に対する作用

TAK-029はADP、コラーゲン、血小板活性化因子、アラキドン酸及びトロンビン受容体アゴニストペプチドによるヒト血小板凝集をほぼ同程度の $IC_{50}$ 値 (29~38 nM) で抑制した (表1)。TAK-029は血小板凝集反応の最終段階であるGPIIb/IIIaとフィブリノーゲンの結合を阻害するため (図7)、いずれの血小板凝集惹起物質による凝集をも非特異的に抑制したと考えられる。

表1 ADP、コラーゲン、血小板活性化因子 (PAF)、アラキドン酸 (AA) 及びトロンビン受容体アゴニストペプチド (TRAP) により惹起したヒト血小板凝集に対するTAK-029の抑制作用

Aggregating agent	n	$IC_{50}$ (nM)
ADP	8	31 (27-35)
Collagen	5	31 (25-39)
PAF	4	29 (20-45)
AA	3	38 (27-58)
TRAP	3	32 (24-41)

括弧内は95%信頼限界値を示す。以下に用いた各種凝集惹起物質の最終濃度を示す。ADP, 3-10  $\mu$ M; collagen, 1-2  $\mu$ g/ml; PAF, 3-10  $\mu$ M; AA, 0.75-1.0  $\mu$ M; TRAP, 10-30  $\mu$ M。

## 2 各種動物でのADP惹起血小板凝集に対する作用

TAK-029の血小板凝集抑制作用には顕著な種差が認められた(表2)。ヒトでのADP惹起血小板凝集に対する $IC_{50}$ 値を1とした場合の相対活性(括弧内)はモルモット(1/1.4)、サル(1/1.5)、イヌ(1/8.1)、マウス(1/21)、ハムスター(1/280)、ウサギ(1/1100)及びラット(<1/13000)であった。

表2 各種動物でのADP惹起血小板凝集に対するTAK-029の抑制作用

Species	n	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
Human	8	0.031 (0.027-0.035)
Guinea-pig	6	0.043 (0.023-0.050)
Monkey	9	0.046 (0.040-0.052)
Dog	4	0.25 (0.18-0.32)
Mouse	4	0.65 (0.56-0.75)
Hamster	4	8.7 (7.7-9.9)
Rabbit	4	34 (28-41)
Rat	3	>400

括弧内は95%信頼限界値を示す。以下に各種動物において用いたADPの最終濃度を示す。ヒト, 3-10  $\mu$ M; モルモット, 0.5-1.0  $\mu$ M; サル, 3-10  $\mu$ M; イヌ, 10  $\mu$ M; マウス, 10-12  $\mu$ M; ハムスター, 1  $\mu$ M; ウサギ, 50  $\mu$ M; ラット, 50  $\mu$ M。

## 3 コラーゲン及びvWfへのモルモット血小板の粘着に対する作用

十分量のADP及び $PGE_1$ の血小板粘着に及ぼす影響を検討した(図10-A)。コラーゲン及びvWfへの血小板の粘着はADP (10  $\mu$ M) 添加によりほとんど変化しなかった。一方、 $PGE_1$  (10  $\mu$ M) はコラーゲン及びvWfへの粘着反応を、それぞれ61及び34%抑制した。即ち、ADP非添加時においても血小板の活性化に依存した粘着反応が生じたと考えられた。TAK-029はコラーゲン及びvWfへの血小板の粘着を79 (67-92) nM及び260 (200-410) nMの $IC_{50}$ 値にて抑制した(括弧内は95%信頼限界値)(図10-B)。vWfへの血小板の粘着は高濃度のTAK-029 (3  $\mu$ M) によっても完全には抑制できず、抑制率は $64 \pm 1\%$ であった。即ち、コラーゲンへの血小板の粘着は主にGPIIb/IIIaを介して生じ、vWfへの粘着は一部GPIIb/IIIaを介さずに生じると考えられた。

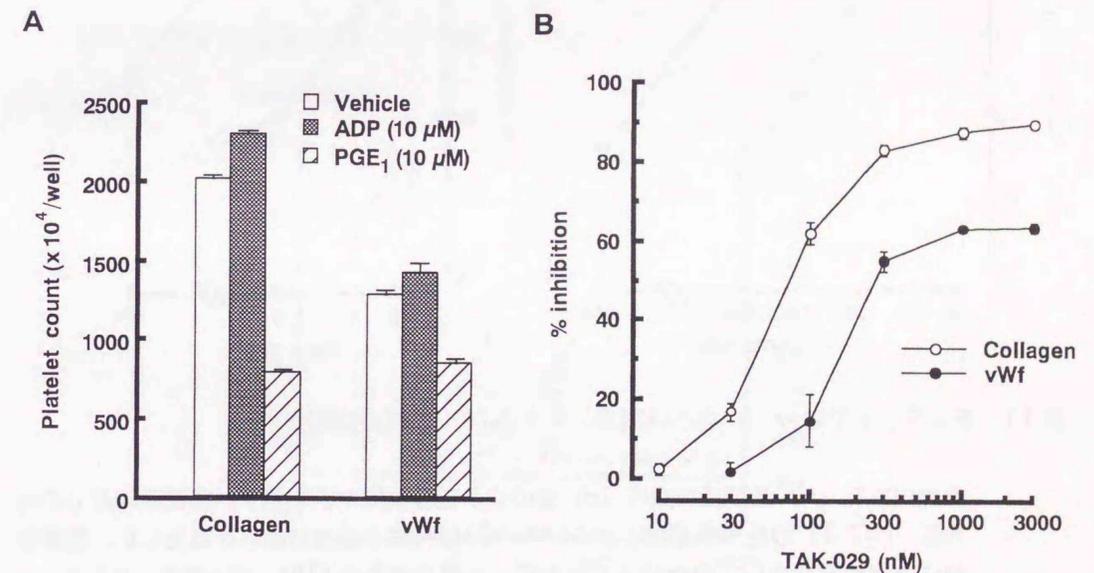


図10 コラーゲン及びvWfへのモルモット血小板の粘着に対するTAK-029の抑制作用

血小板の粘着に及ぼすADP及び $PGE_1$  (それぞれ最終濃度: 10  $\mu$ M) の影響 (A)。コラーゲン及びvWfへの血小板粘着に対するTAK-029の抑制作用 (B)。BではADP及び $PGE_1$ は添加しなかった。n=3 (A) 及びn=3-8 (B)。

C モルモットでのTAK-029の*ex vivo*血小板凝集、粘着抑制及び出血時間延長作用

1 静脈内及び経口投与後の作用持続

TAK-029は静脈内投与のみならず、経口投与によっても用量依存性にADPによる*ex vivo*血小板凝集を抑制した。TAK-029 (100  $\mu$ g/kg) の静脈内投与では投与1時間後まで、TAK-029 (10mg/kg) の経口投与では投与1時間後から8時間後までほぼ完全に凝集を抑制した。

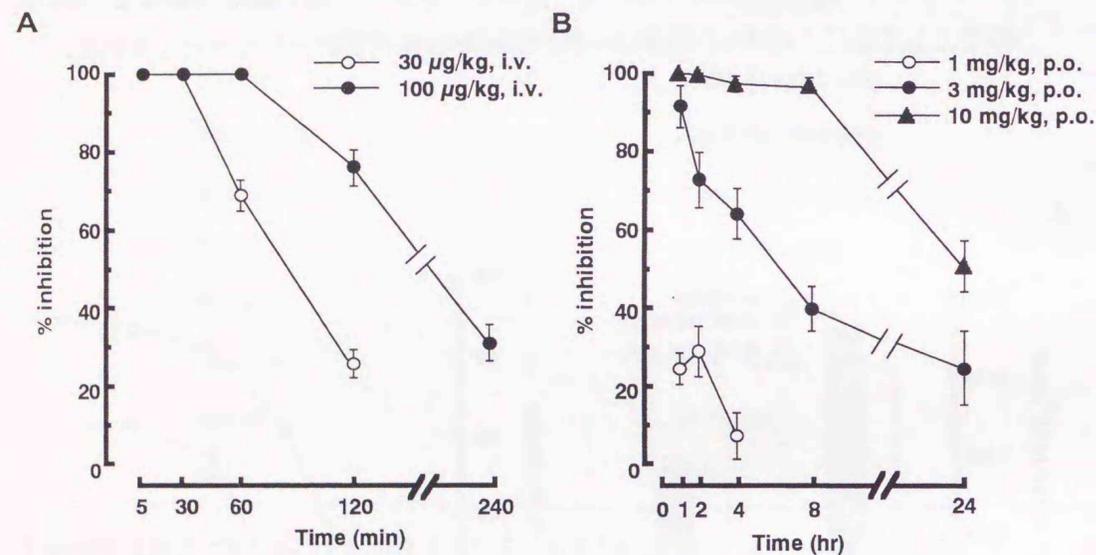


図11 モルモットでの*ex vivo*血小板凝集に対するTAK-029の抑制作用

静脈内投与 (A) 及び経口投与 (B) 後の血小板凝集抑制率を示す。各測定時点での対照群 (n=2-3) の血小板凝集率からTAK-029投与群の凝集抑制率を算出した。凝集惹起には対照群において最大凝集を引き起こす最小濃度のADP (最終濃度 : 0.5-1.0  $\mu$ M) を用いた。n=3-7。

2 血漿中TAK-029濃度と血小板凝集抑制率及び出血時間との相関

モルモットに種々の濃度のTAK-029 (1-30 mg/kg) を経口投与し、血漿中TAK-029濃度、ADPによる*ex vivo*血小板凝集に対する抑制率及び出血時間を同一個体で測定した。TAK-029を1、3、5、10及び30 mg/kgを経口投与した場合、投与120分後の血漿中TAK-029濃度は、それぞれ8.2 $\pm$ 1.7 ng/ml (n=6)、31 $\pm$ 7.5 ng/ml (n=6)、53 $\pm$ 1.8 ng/ml (n=3)、69 $\pm$ 15 ng/ml (n=4) 及び360 $\pm$ 48 ng/ml (n=3) であった。血漿中TAK-029濃度 (1-50 ng/ml) と凝集抑制率及び血漿中TAK-029濃度 (10-120 ng/ml) と出血時間の間には有意な相関が認められ、それぞれの相関係数は $r^2=0.790$  (F値=45.0, n=14, p<0.01) 及び $r^2=0.862$  (F値=93.4, n=17, p<0.01) であった。血小板凝集を50及び100%抑制するTAK-029の血漿中濃度はそれぞれ21及び50 ng/mlであり、出血時間を対照群 (216 $\pm$ 6 sec) の2及び3倍に延長するTAK-029濃度はそれぞれ33及び53 ng/mlであった。さらに、血漿中TAK-029濃度が100 ng/ml以上では、出血時間は対照群の5倍以上となった。

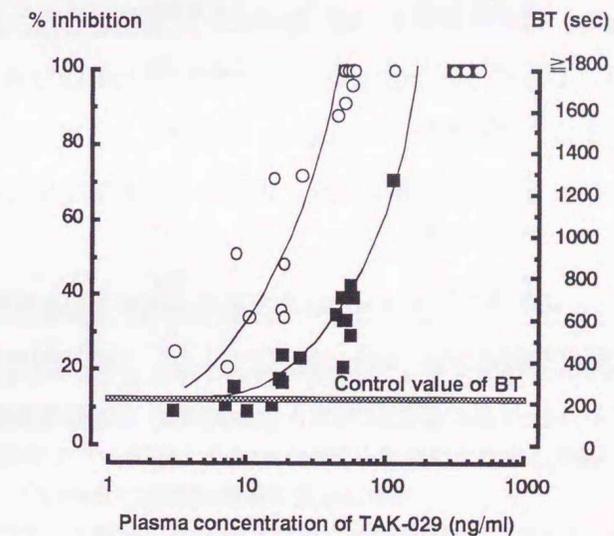


図12 モルモットでの血漿中TAK-029濃度と*ex vivo*血小板凝集抑制率及び出血時間との相関

種々の用量のTAK-029 (1-30 mg/kg) を経口投与した。投与90分後より出血時間 (BT : ■) の測定を開始し、120分後に採血を行い血小板凝集抑制率 (% inhibition : ○) 及び血漿中TAK-029濃度の測定を行った。対照群の血小板凝集率からTAK-029投与群の凝集抑制率を算出した。凝集惹起には対照群において最大凝集を引き起こす最小濃度のADP (最終濃度 : 0.8  $\mu$ M) を用いた。対照群の出血時間は216 $\pm$ 6 (n=31) であった。

3 *Ex vivo*血小板凝集及び出血時間に及ぼすTAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの効果

チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンはTAK-029とは異なり、血小板の活性化を抑制する。チクロピジン及びクロピドグレルの詳細な作用機序は未だ明らかではないが、血小板に特異的に作用していずれの血小板凝集惹起物質による凝集をも抑制する点でTAK-029と類似している (Defreyn *et al.*, 1989 ; Herbert *et al.*, 1993)。一方、アスピリンはシクロオキシゲナーゼ阻害作用によりTXA<sub>2</sub>の産生を阻害する。TAK-029とこれら薬物の*ex vivo*血小板凝集抑制及び出血時間延長作用を比較した。

TAK-029 (3 mg/kg) の経口投与によりADPによる血小板凝集は投与2時間後で73%抑制され、出血時間は投与90分後で対照群の1.7倍 (p<0.01) に延長した (表3)。さらに凝集をほぼ完全に抑制する用量 (10 mg/kg) では出血時間はさらに3.2倍に著明に延長した。チクロピジン (300 mg/kg/day x 3) は血小板凝集を57%抑制し、出血時間を延長させる傾向を示した。TAK-029 (3 mg/kg) とほぼ同程度の凝集抑制作用を示すクロピドグレル (100 mg/kg) は出血時間を1.8倍 (p<0.05) に延長させた。また、血小板凝集をほぼ完全に抑制する用量 (100 mg/kg/day x 3) では出血時間は2.6倍 (p<0.01) に延長した。一方、高用量のアスピリン (300 mg/kg) はADPによる凝集に影響を与えなかったが、コラーゲンによる血小板凝集を完全に抑制し、出血時間を2.1倍 (p<0.01) に延長させた。

表3のデータをもとにADPによる*ex vivo*血小板凝集抑制率と出血時間との関係を図13に示した。血小板凝集抑制率が50~99%の範囲において、TAK-029投与群とチクロピジン及びクロピドグレル投与群の凝集抑制率と出血時間との関係は類似していた。

表3 モルモットでのTAK-029, チクロピジン, クロピドグレル及びアスピリンによる*ex vivo*血小板凝集抑制及び出血時間延長作用

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Inhibition (%)	BT (sec) <sup>d</sup>
Control			216 ± 6 (31)
TAK-029	1	29 ± 6(12) <sup>a</sup>	240 ± 24 (11) **
	3	73 ± 7(13) <sup>a</sup>	361 ± 49 (12) **
	10	99 ± 0(8) <sup>a</sup>	689 ± 95 (9) **
Ticlopidine	300	17 ± 5(5) <sup>a</sup>	312 ± 27 (10)
	300 x 3 <sup>c</sup>	57 ± 5(11) <sup>a</sup>	351 ± 54 (5)
Clopidogrel	10	15 ± 4(5) <sup>a</sup>	—
	30	28 ± 8(5) <sup>a</sup>	201 ± 4 (5) *
	100	73 ± 8(5) <sup>a</sup>	390 ± 69 (5) **
	30 x 3 <sup>c</sup>	63 ± 8(5) <sup>a</sup>	291 ± 22 (5) **
	100 x 3 <sup>c</sup>	92 ± 2(4) <sup>a</sup>	563 ± 75 (4) **
Aspirin	10	34 ± 17(6) <sup>b</sup>	—
	30	56 ± 6(5) <sup>b</sup>	264 ± 16 (8)
	100	100 ± 0(4) <sup>b</sup>	343 ± 50 (8) **
	300	4 ± 2(5) <sup>a</sup>	459 ± 67 (8) **

<sup>a</sup> 経口投与2時間後のADPによる*ex vivo*血小板凝集に対する抑制率を示す。対照群の凝集率より各薬物投与群の凝集抑制率を算出した。

<sup>b</sup> 経口投与2時間後のコラーゲンによる*ex vivo*血小板凝集に対する抑制率を示す。対照群の凝集率よりアスピリン投与群の凝集抑制率を算出した。

<sup>c</sup> 3日間の連投を示す。最終投与90分後より出血時間を測定し、さらに2時間後に採血して血小板凝集率を測定した。

<sup>d</sup> 経口投与90分後の出血時間を示す。

血小板凝集惹起には対照群において最大凝集を引き起こす最小濃度のADP (最終濃度: 0.8-1.2 μM) 又はコラーゲン (最終濃度: 1.0-3.0 μg/ml) を用いた。\*及び\*\*は対照群と比較した場合の有意差 (それぞれp<0.05及びp<0.01) を、括弧内は例数を示す。

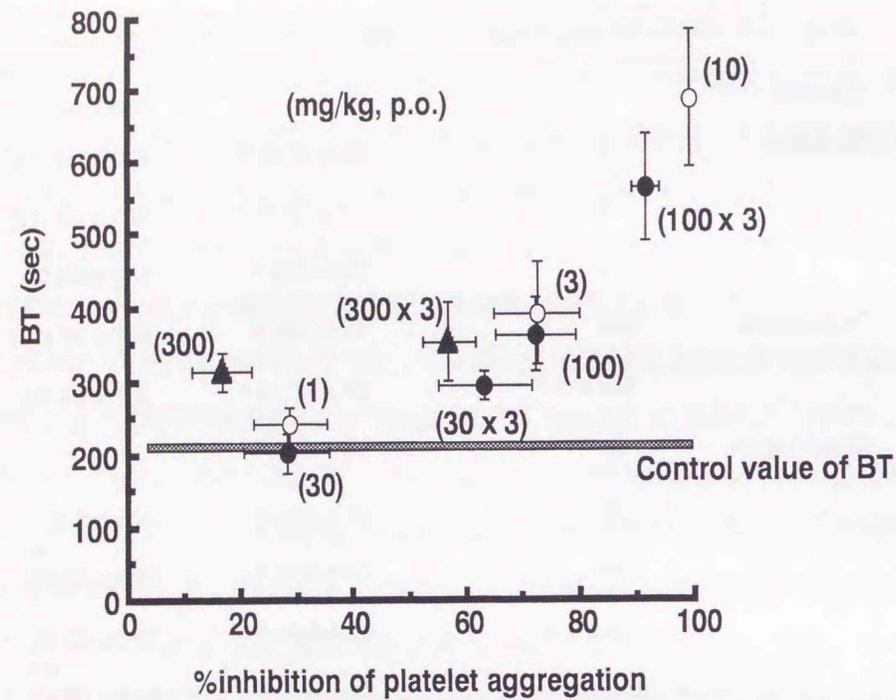


図 13 モルモットでのTAK-029 (○), チクロピジン (▲) 及びクロピドグレル (●) 経口投与後の血小板凝集抑制率と出血時間との関係

表3のデータに基づき作成した。チクロピジン及びクロピドグレルは単回投与に加えて1日1回3日間の連日投与 (x3) を行った。括弧内は各被験薬の用量 (mg/kg, p.o.) を示す。

#### 4 Ex vivo血小板粘着に対するTAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの作用

実験にはコラーゲンをコートしたガラスビーズを充填したカラムを用いた。カラムを通過させることで血液中の血小板はビーズに粘着し、対照群 (n=17) では血小板数は $37.7 \pm 1.6 \times 10^4 / \mu\text{l}$ から約80%減少し、 $7.4 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ となった。TAK-029の1, 3および10 mg/kgの経口投与は投与2時間後において、この血小板の粘着を用量依存性にそれぞれ $39 \pm 6\%$ 、 $75 \pm 4\%$ 及び $89 \pm 3\%$ 抑制した (図 14)。一方、チクロピジン (300 mg/kg/day x 3) 及びクロピドグレル (100 mg/kg) は粘着をそれぞれ $28 \pm 9\%$ 及び $37 \pm 9\%$ 抑制した。血小板凝集をほぼ完全に抑制する用量のクロピドグレル (100 mg/kg/day x 3) (表 3) によっても粘着抑制率は $43 \pm 13\%$ であった。また、コラーゲンによる血小板凝集を完全に抑制する高用量のアスピリン (300 mg/kg) (表 3) は粘着には影響を与えなかった。

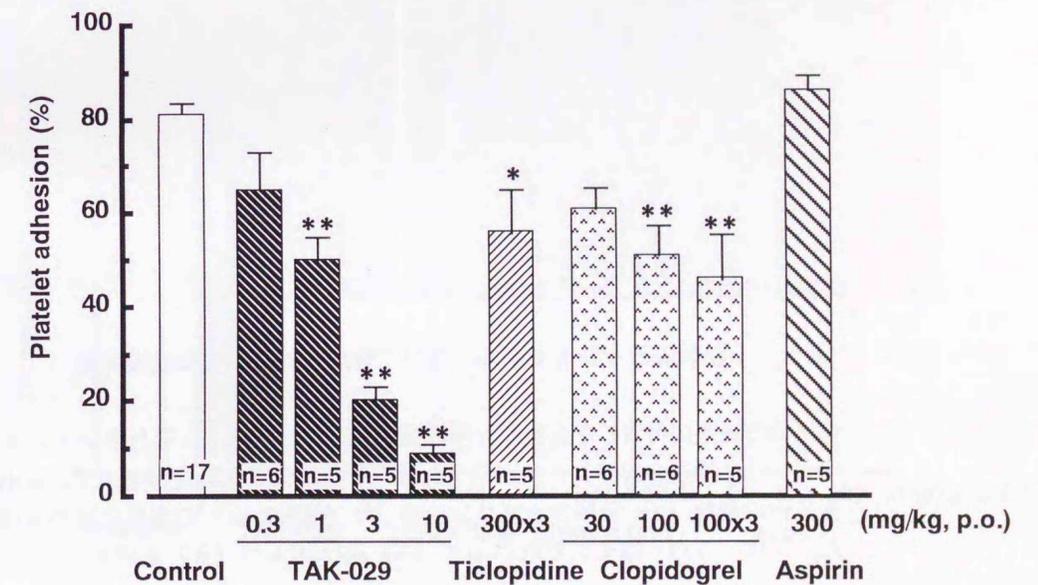


図 14 モルモットでのTAK-029, チクロピジン, クロピドグレル及びアスピリンのex vivo血小板粘着抑制作用

ガラスビーズを充填したカラムを介して採血した全血とカラムを介さずに採血した全血の血小板数から粘着した血小板の割合を算出した。経口投与2時間後に腹部大静脈へ留置針を挿入して採血した。x3は1日1回3日間の連日投与を示し、最終投与の2時間後に実験を行った。\*及び\*\*は対照群と比較した場合の有意差 (それぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$ ) を示す。

D TAK-029の抗血栓作用

1 モルモット動静脈シャントモデルでのTAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの抗血栓作用

シャント内の綿糸に付着した血栓の光学顕微鏡写真像を図15に示す。ヘマトキシリン-エオジン染色像から綿糸に付着した血栓は主に血小板凝集塊であった(図15-A)。リンタングステン酸ヘマトキシリン染色像から綿糸の周囲にはフィブリンの沈着も認められた(図15-B)。

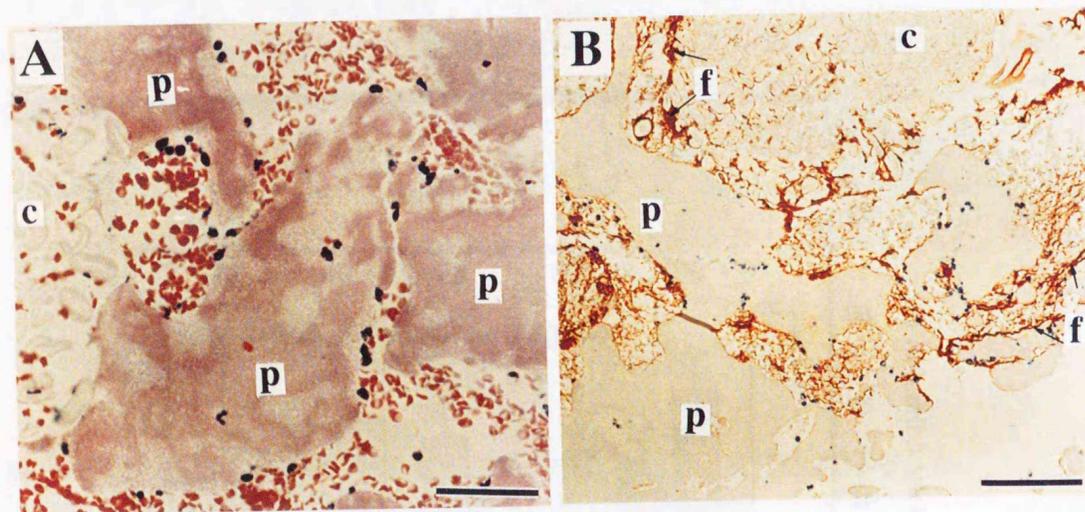


図15 モルモット動静脈シャントモデルにおいて形成された血栓の組織所見

対照群の綿糸に付着した血栓の光学顕微鏡像を示す。Aはヘマトキシリン-エオジン染色像をBはリンタングステン酸ヘマトキシリン染色像を示す。血小板主体の血栓(p)及びフィブリン沈着(f)が綿糸(c)の周囲に認められた。スケールバーはそれぞれ25 $\mu$ m(A)及び50 $\mu$ m(B)を示す。

本モデルを用いて、TAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの抗血栓作用を比較した(図16)。TAK-029(1、3及び10mg/kg)の経口投与は血栓形成をそれぞれ31 $\pm$ 9%、75 $\pm$ 9%及び78 $\pm$ 5%抑制した。チクロピジン(300mg/kg/day x3)及びクロピドグレル(100mg/kg)による血栓形成の抑制はそれぞれ58 $\pm$ 4%及び60 $\pm$ 10%で有意であった。血小板凝集をほぼ完全に抑制する用量のクロピドグレル(100mg/kg x3)(表3)による抑制率は64 $\pm$ 6%であり、同程度の凝集抑制作用を示すTAK-029(10mg/kg)と比較して弱かった。アスピリンも本血栓モデルでは有意な抑制作用を示し、100及び300mg/kgで血栓形成を49 $\pm$ 11%及び61 $\pm$ 6%(p<0.01)抑制した。

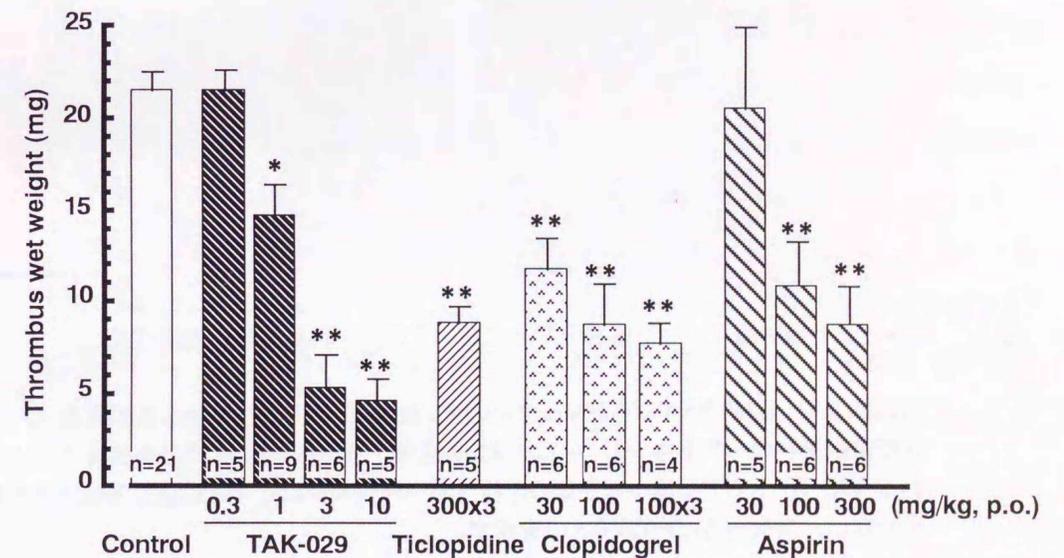


図16 モルモット動静脈シャントモデルでのTAK-029、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンの血栓形成抑制作用

縦軸はシャント内の綿糸へ付着した血栓の湿重量を示す。経口投与2時間後に動静脈シャントを開通させた。x3は1日1回3日間の連日投与を示し、最終投与の2時間後に実験を行った。\*及び\*\*は対照群と比較した場合の有意差(それぞれp<0.05及びp<0.01)を示す。

## 2 モルモット頸動脈バルーン傷害モデルでのTAK-029、プロスタグランジンE<sub>1</sub>及びアルガトロバンの抗血栓作用

頸動脈のバルーン傷害部に形成された血栓の光学顕微鏡写真像を図17に示す。傷害部の血管内皮は完全に剥離、消失していた(図17-A及びB)。対照群では血小板主体の血栓形成が認められた(図17-A)。TAK-029 (40  $\mu$ g/kg/hr) 投与群では血栓形成は全く認められなかった(図17-B)。

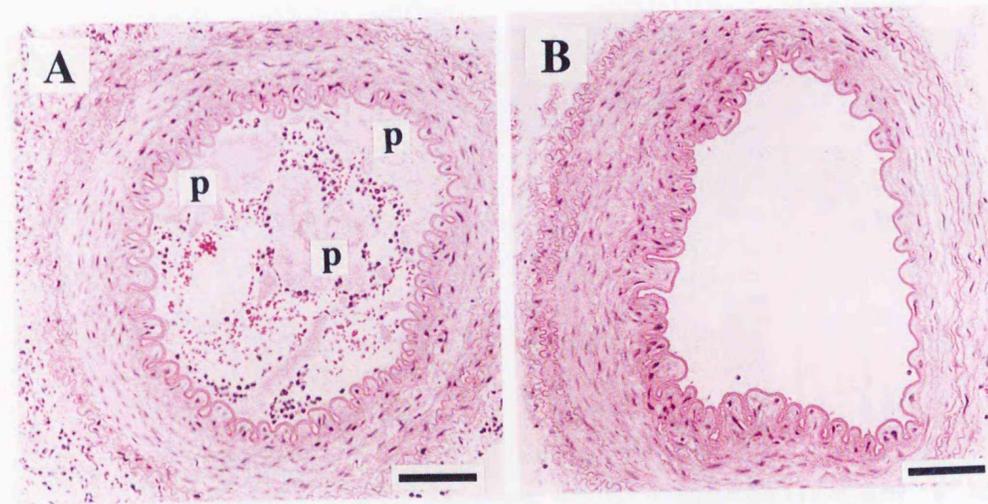


図17 モルモット頸動脈バルーン傷害モデルにおいて形成される血栓の組織所見

対照群 (A) 及びTAK-029 (40  $\mu$ g/kg/hr) 投与群 (B) から摘出した頸動脈(バルーン傷害部分)のヘマトキシリン-エオジン染色像。血管内皮はA、Bとも完全に消失している(A、B)。Aでは血小板主体の血栓(p)が認められる。Bでは血栓形成は全く認められない。スケールバーは80  $\mu$ mを示す。

本モデルを用いて、TAK-029の抗血栓作用をPGE<sub>1</sub>及び合成トロンビン阻害剤であるアルガトロバンと比較した(図18)。PGE<sub>1</sub>は生体内で非常に不安定であり、1回の肺循環によりその約30%が不活化されることが知られている(Golub *et al.*, 1975)。それゆえ、本実験ではPGE<sub>1</sub>の安定化胞合体であるPGE<sub>1</sub>·CDを用いた。

対照群のバルーン傷害前の頸動脈血流量は $3.5 \pm 0.5$  ml/min (n=6)であり、被検薬投与群との間で有意な差は認められなかった。対照群では、バルーン傷害後5分以内に全例で血栓形成による血流の消失が生じ、その後血栓の解離が観察された。傷害後60分間において血流が消失していた時間(閉塞時間)は $36.6 \pm 4.3$ 分であった。TAK-029 (12及び40  $\mu$ g/kg/hr)の静脈内投与は閉塞時間をそれぞれ $81 \pm 13\%$ 及び $94 \pm 4\%$  (p<0.01)減少させた。PGE<sub>1</sub>·CD (40  $\mu$ g/kg/hr)及びアルガトロバン (2.0及び20 mg/kg/hr)は有意な抗血栓作用を示さなかった。

同様の薬物投与プロトコールで血小板凝集、出血時間、血圧、PT及びAPTTに及ぼすこれら薬物の影響を検討した(表4)。TAK-029 (12及び40  $\mu$ g/kg/hr)はADPによる血小板凝集をそれぞれ $47 \pm 4$ 及び $91 \pm 7\%$ 抑制し、高用量のTAK-029 (40  $\mu$ g/kg/hr)は出血時間を2.3倍延長させた。TAK-029は血圧及び血液凝固時間に影響を与えなかった。PGE<sub>1</sub>·CD (40  $\mu$ g/kg/hr)は出血時間及びPT及びAPTTに影響を与えなかったが、血小板凝集を $20 \pm 6\%$ 抑制し、平均血圧を12~31% (p<0.01)低下させた。アルガトロバン (2.0及び20 mg/kg/hr)は血圧に影響を与えなかったが、出血時間をそれぞれ1.7及び2.7倍に、PTを2.3及び3.8倍に、APTTを2.2及び3.2倍に有意に (p<0.01)延長させた。

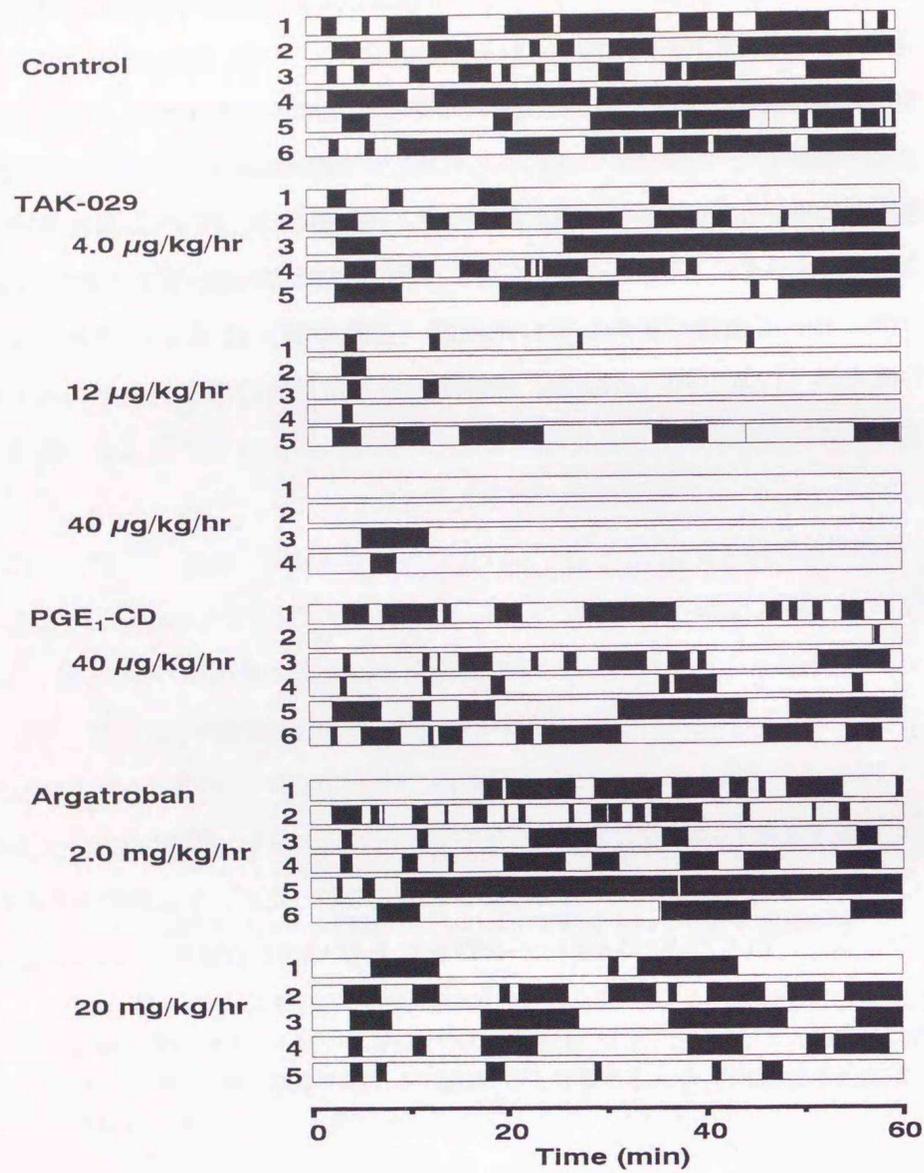


図18 モルモット頸動脈バルーン傷害モデルでのTAK-029, PGE<sub>1</sub>-CD及びアルガトロバンの血栓形成抑制作用

頸動脈内皮をバルーンカテーテルを用いて5回傷害した後、60分間頸動脈血流量を測定した。□は血流がある状態、■は血栓形成により血流が消失している状態を示す。各カラムはそれぞれ1個体を示す。被検薬は最終の内皮傷害直前に全量の25%をbolusで静脈内投与し、直後より残りの75%を1時間で持続注入した。

表4 モルモットでの血小板凝集、出血時間、血圧、プロトロンビン時間及び活性部分トロンボプラスチン時間に及ぼすTAK-029, PGE<sub>1</sub>-CD及びアルガトロバンの影響

Drug	Dose	Inhibition (%)	BT (sec)	MBP (mmHg)				PT (sec)	APTT (sec)
				0 min	5 min	15 min	30 min		
Control			219±15(15)		N.D.			26.0±0.7(5)	23.3±0.4(5)
TAK-029	12 µg/kg/hr	47±4(4)	225±19(4)		N.D.			N.D.	N.D.
	40 µg/kg/hr	91±7(4)	513±77(6)	66±3(5)	67±3(5)	66±3(5)	66±3(5)	24.3±0.5(6)	23.0±0.5(6)
PGE <sub>1</sub> -CD	40 µg/kg/hr	20±6(5)	240±61(5)	75±2(4)	52±4(4)	59±2(4)	65±2(4)	N.D.	N.D.
Argatroban	2.0 mg/kg/hr	N.D.	371±33(8)	68±11(4)	68±11(4)	70±9(4)	72±7(4)	58.9±2.4(8)	52.0±2.3(8)
	20 mg/kg/hr	N.D.	593±46(4)	68±4(4)	63±5(4)	63±3(4)	65±2(4)	97.7±2.0(4)	75.5±1.6(4)

バルーン傷害モデル(図18)と同様の薬物投与プロトコールに従って実験を行った。麻酔下で平均血圧(MBP)を経時的に測定した。薬物投与開始30分後に出血時間(BT)の測定を開始した。投与開始60分後に採血を行い、血小板凝集率(Inhibition)、プロトロンビン時間(PT)及び活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。対照群のADP凝集率より各薬物投与群の凝集抑制率を算出した。血小板凝集惹起には対照群において最大凝集を引き起こす最小濃度のADP(最終濃度:0.8-1.0 µM)を用いた。\*\*は対照群と比較した場合の有意差を、#は投与前値と比較した場合の有意差(ともにp<0.01)を示す。括弧内は例数を示す。

### 3 モルモット脳底動脈血栓モデルでのTAK-029の抗血栓作用

脳底動脈に形成された血栓の光学顕微鏡写真像を図19に示す。緑色光 ( $5 \times 10^5$  lux) を照射し、ローズベンガル (10 mg/kg, i.v.) を投与した対照群及びTAK-029 (100  $\mu$ g/kg, i.v.) 投与群では血管内皮は完全に消失していた (図19-B及びC)。対照群では血小板を主体とした血栓による血管の閉塞像が認められたが (図19-B)、TAK-029投与群では血栓形成は全く認められなかった (図19-C)。

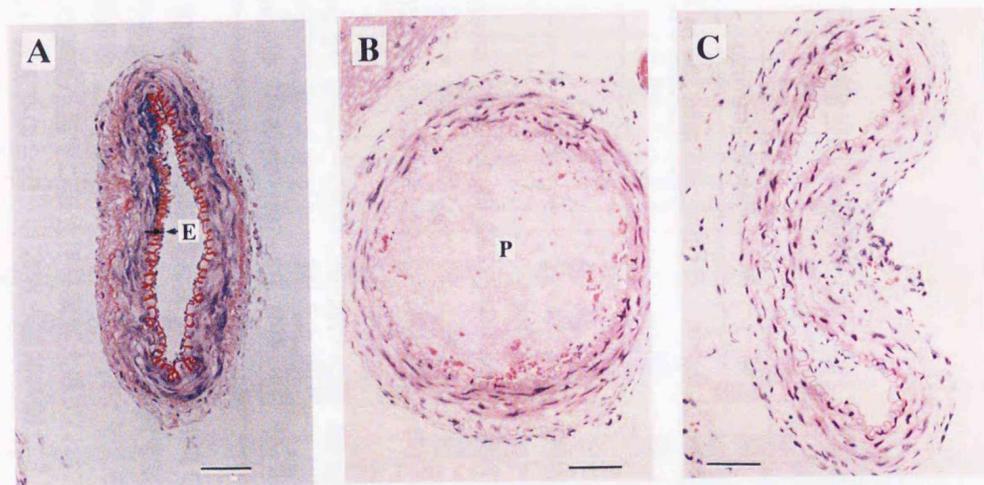


図19 モルモットでの脳底動脈血栓モデルにおいて形成された血栓の組織所見

正常群 (A)、対照群 (B) 及びTAK-029 (100  $\mu$ g/kg, i.v.) 投与群 (C) から抽出した脳底動脈 (緑色光照射部分) のヘマトキシリン-エオジン染色像。Aでは内腔側に血管内皮細胞層 (E) が認められる。B、Cでは血管内皮は完全に消失している。Bでは血小板を主体とした血栓 (P) による血管の閉塞像が認められるが、Cでは血栓形成は全く認められない。スケールバーは20  $\mu$ mを示す。

本モデルを用いて、TAK-029の抗血栓作用を検討した (図20)。対照群及びTAK-029投与群ではローズベンガル投与後10分以内に脳血流は40-50%減少した。対照群では8例中6例で生理食塩水投与後5分以内に脳底動脈の閉塞により脳血流量は完全に消失した。さらに、6例中5例では脳血流量の回復は認められなかった。対照群の血流消失時間は $45.2 \pm 8.6$ 分 (n=8) であった。TAK-029 (30  $\mu$ g/kg, i.v.) 群では5例中2例で脳血流量は60分間維持された。また、平均の血流消失時間は $23.4 \pm 8.6$ 分 (n=5) であり、対照群と比較して有意に ( $p < 0.01$ ) 短かった。高用量のTAK-029 (100  $\mu$ g/kg, i.v.) 投与群では4例中全例で血流の消失は認められなかった。

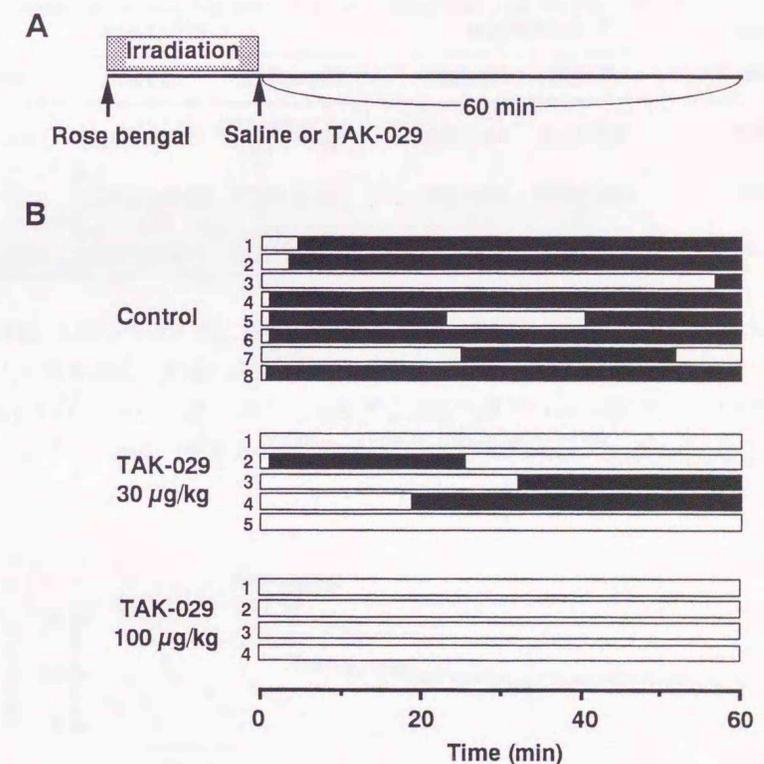


図20 モルモット脳底動脈血栓モデルでのTAK-029の抗血栓作用

実験プロトコール (A) 及び脳血流変化 (B) を示す。脳幹部の脳底動脈に緑色光 ( $5 \times 10^5$  lux) を照射し、同時にローズベンガル (10 mg/kg, i.v.) を投与した。錐体静脈血流量が40-50%低下した時点で生理食塩水又はTAK-029を静脈内投与し、その後60分間錐体静脈血流量を測定した。□は血流がある状態、■は血栓形成により血流が消失している状態を示す。各カラムはそれぞれ1個体を示す。

同様のプロトコールでTAK-029の血小板凝集抑制及び出血時間延長作用を検討した(表5)。TAK-029は30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (i.v.) 以上の用量において投与5分後のADP惹起血小板を完全に抑制し、同時に出血時間を4.5倍に著明に延長させた。TAK-029 (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) は投与60分後において血小板凝集を70%抑制したが、出血時間は正常値に回復していた。TAK-029 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) は投与60分後においても血小板凝集を完全に抑制し、出血時間を2.5倍に延長させた。

表5 モルモットでのTAK-029静脈内投与後の血小板凝集抑制及び出血時間延長作用

Dose $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.	% inhibition		BT (sec)		
	5 min	60 min	Baseline	5 min	60 min
10	68 $\pm$ 6(4)	14 $\pm$ 3(4)	197 $\pm$ 16(7)	230 $\pm$ 39(6)	185 $\pm$ 26(6)
30	100 $\pm$ 0(3)	70 $\pm$ 4(6)	197 $\pm$ 16(7)	894 $\pm$ 121(5) <sup>**</sup>	180 $\pm$ 24(4)
100	n.d.	100 $\pm$ 0(6)	197 $\pm$ 16(7)	>1800(3) <sup>**</sup>	490 $\pm$ 52(5) <sup>**</sup>

静脈内投与5及び60分後の*ex vivo*血小板凝集抑制率(% inhibition)及び出血時間(BT)を示す。対照群のADP凝集率より各薬物投与群の凝集抑制率を算出した。血小板凝集惹起には対照群において最大凝集を引き起こす最小濃度のADP(最終濃度: 0.8-1.0  $\mu\text{M}$ )を用いた。<sup>\*\*</sup>は投与前値と比較した場合の有意差( $p < 0.01$ )を、括弧内は例数を示す。

#### 4 イヌ冠動脈血栓モデルでのTAK-029の抗血栓作用

冠動脈血栓モデルでの冠動脈血流量変化の典型例を図21に示す。平均血圧はエピネフリン投与前及び投与60分後でそれぞれ121 $\pm$ 5及び148 $\pm$ 12mmHg (n=12)であり、冠動脈血流量はコンストラクター装着前及び後でそれぞれ22.4 $\pm$ 4.3及び9.3 $\pm$ 2.5 ml/minであった。TAK-029 (10, 30及び100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 静脈内投与群の投与前のCFRsの頻度はそれぞれ5.4 $\pm$ 1.1 (n=3)、4.7 $\pm$ 0.7 (n=4)及び4.8 $\pm$ 0.7 (n=5)であった。TAK-029は10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量ではCFRsに影響を与えなかったが、30及び100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ではそれぞれ投与後21.7 $\pm$ 6.6及び45.3 $\pm$ 5.3分間CFRsを完全に抑制した。

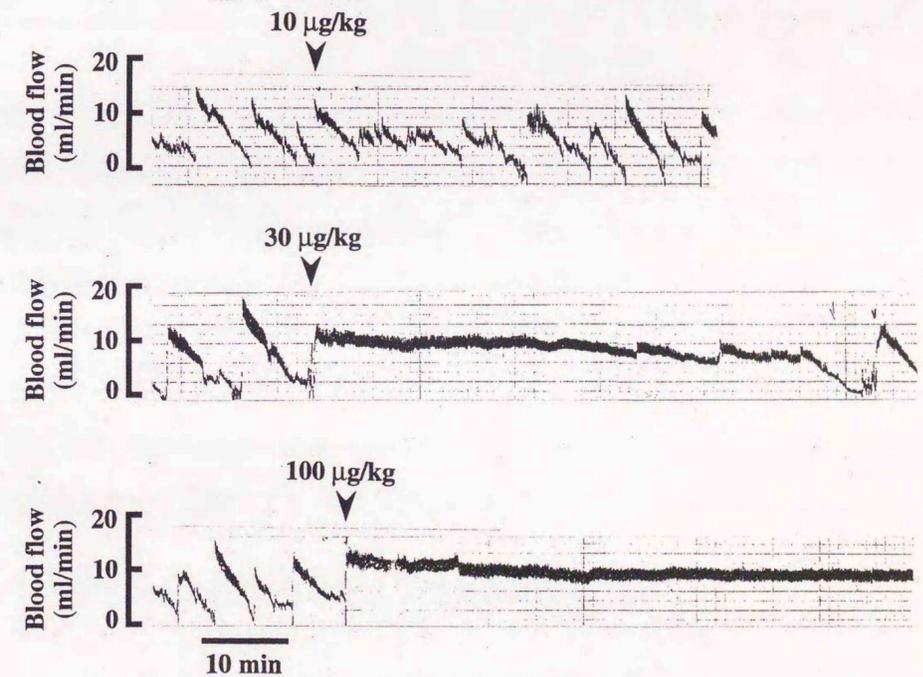


図21 イヌ冠動脈血栓モデルでのTAK-029の血栓形成抑制作用

冠動脈の血流量変化の典型例を示す。血管狭窄部に血栓が形成されることにより生じる血流量の低下と血栓の解離による血流の回復が繰り返して生じる現象、いわゆる周期的血流量低下(CFRs)が生じた。TAK-029 (30及び100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) はCFRsを消失させた。

同様のプロトコールでTAK-029の血小板凝集抑制及び出血時間延長作用を検討した(表6)。TAK-029は10、30及び100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で、投与5分後のADP惹起血小板をそれぞれ51 $\pm$ 17%、87 $\pm$ 8%及び100%抑制し、さらに60分後においても抑制はそれぞれ26 $\pm$ 8%、56 $\pm$ 21%及び89 $\pm$ 11%であった。TAK-029は10及び30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量では出血時間に影響を与えなかったが、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ では投与5分後で投与前値の3.6倍( $p<0.01$ )に延長させた。この延長は投与60分後には回復していた。

表6 イヌでのTAK-029静脈内投与後の血小板凝集抑制及び出血時間延長作用

Dose $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.	% inhibition		BT (sec)		
	5 min	60 min	Baseline	5 min	60 min
10	51 $\pm$ 17(3)	26 $\pm$ 8(3)	n.d.	n.d.	n.d.
30	87 $\pm$ 8(5)	56 $\pm$ 21(5)	200 $\pm$ 40(6)	290 $\pm$ 65(6)	215 $\pm$ 23(6)
100	100 $\pm$ 0(4)	89 $\pm$ 11(4)	158 $\pm$ 23(4)	563 $\pm$ 98(4) <sup>**</sup>	250 $\pm$ 36(3)

静脈内単回投与5及び60分後の*ex vivo*血小板凝集抑制率(% inhibition)及び出血時間(BT)を示す。TAK-029投与前の血小板凝集率より投与後の凝集抑制率を算出した。血小板凝集惹起には最大凝集を引き起こす最小濃度のADP(最終濃度:10-30  $\mu\text{M}$ )を用いた。<sup>\*\*</sup>は投与前値と比較した場合の有意差( $p<0.01$ )を、括弧内は例数を示す。

## IV 考察

### A *In vitro*でのGPIIb/IIIa阻害及び血小板凝集抑制作用

TAK-029はアスピリン、チクロピジンなど血小板の活性化を抑制する既知薬物とは異なり、GPIIb/IIIaへのvWf及びフィブリノーゲンの結合を阻害して、血小板凝集を強力に抑制した(図7及び表1)。TAK-029は血管内皮細胞に存在し、GPIIb/IIIaと同じ $\beta_3$ インテグリンファミリーに属するピトロネクチン受容体( $\alpha_v\beta_3$ )を阻害しなかった(図8)。また、TAK-029は血小板の接着に関与するGPIb-IXに対しても阻害作用を示さず、さらに血圧及び血液凝固系にも影響を与えなかった(図9及び表4)。すなわち、TAK-029はADP、コラーゲンなどいずれのメディエータによる凝集をも強力に抑制し、かつ血小板に対して特異性の高い新しいタイプの抗血小板薬であると考えられた。

TAK-029の血小板凝集抑制作用には大きな種差が認められ、ヒト、モルモット及びサルでの作用がもっとも強力であり、イヌでの作用はヒトの1/8.1、ラット及びウサギでの作用はそれぞれ1/1100及び1/13000以下であった(表2)。RGDSを含む他のGPIIb/IIIa拮抗薬に関してもヒトでの作用に比較してウサギ及びラットでの作用が大きく減弱することが報告されている(Harfenist *et al.*, 1988; Verhallen & Barth, 1991)。GPIIbの一次構造を比較した結果、ヒト及びラットのアミノ酸配列には約80%の相同性が認められており(Poncz & Newman, 1990)、この種差はGPIIIaの一次構造又はGPIIb/IIIaの3次構造の違いに起因している可能性が示唆されている(Cook *et al.*, 1994)。

### B *Ex vivo*での血小板凝集抑制及び出血時間延長作用

ペプチド及び蛋白性のGPIIb/IIIa阻害薬は経口吸収されないのに対して、TAK-029はモルモットにおいて経口投与によっても強力な血小板凝集阻害作用を示した(図11)。TAK-029はサル及びイヌにおいても経口投与により強力な血小板凝集抑制作用を示している(データには示さず)。経口投与が可能であることは不安定狭心症、末梢動脈閉塞症、一過性脳虚血発作などの慢性の動脈血栓症の治療薬として大きなメリットである。

临床上、抗血栓薬の有用性は効果と出血性副作用とのバランスにより評価される (Harker *et al.*, 1997)。現在、血栓症治療薬として用いられている経口抗血小板薬の中でチクロピジン是最も強力な薬物であり、臨床開発中のクロピドグレルはチクロピジンよりさらに強力な血小板凝集抑制作用を示す化合物である (Defreyn *et al.*, 1989; Herbert *et al.*, 1993)。临床上、チクロピジン及びクロピドグレルによる出血性副作用は大きな問題となっていない (Hass *et al.*, 1989; Gent *et al.*, 1989; CAPRIE Steering Committee, 1996)。本研究ではTAK-029の出血時間延長作用をこれら薬物と比較した。モルモットにおいてTAK-029は血小板凝集を50%抑制する用量では出血時間にほとんど影響を与えず、また完全に抑制する用量において出血時間を約3倍延長させた。凝集抑制率が50-99%の場合、抑制率と出血時間の関係はTAK-029投与群とチクロピジン及びクロピドグレル投与群では類似していた (図12)。それゆえ、この用量範囲ではTAK-029の出血性副作用の発現リスクは小さいと考えられる。血小板凝集を完全に抑制する高用量のチクロピジン及びクロピドグレルは下痢、白血球減少、紫斑など出血以外の副作用を引き起こすことから臨床的に使用されることはない (Hass *et al.*, 1989; Gent *et al.*, 1989; CAPRIE Steering Committee, 1996)。一方、モルモットにおいて、血小板凝集を完全に抑制する高用量のTAK-029は著明な出血時間の延長を示した (図12)。それゆえ、チクロピジンやクロピドグレルでは効果のない重症の血栓症患者に高用量のTAK-029を投与した場合、抗血栓作用とともに出血性副作用も発現する可能性が考えられる。

### C. 血小板粘着抑制及び出血時間延長作用

通常、血小板の接着はvWfとGPIb-IXとの結合により開始され、その後vWfへのGPIIb/IIIaの結合を介した強固な粘着が生じると考えられている (図1)。一方、コラーゲン、フィブリノネクチンなどの内皮下の細胞外マトリクス蛋白もRGD配列を有しており (Plow *et al.*, 1985; Ruoslahti & Pierschbacher, 1987)、vWfを介さない粘着が生じる可能性も示唆されている (Phillips *et al.*, 1988; Sixma *et al.*, 1995)。いずれの粘着反応が止血血栓の形成により関与しているのかは未だ明らかではない。モルモット血小板を用いた *in vitro*での血小板粘着実験において、TAK-029はvWfへの血小板粘着を抑制した ( $IC_{50}$ 値: 260 nM) (図10)。この作用は凝集抑制作用 ( $IC_{50}$ 値: 43 nM) (表2)の

約1/6であった。止血血栓の形成にvWfを介した血小板の粘着が関与していると仮定した場合、この結果はTAK-029が血小板凝集を完全に抑制する用量よりさらに高用量で激しい出血時間の延長を示したこと (図12)と合致する。临床上、vWf欠損患者では著明な出血時間延長が観察されており (Tschopp *et al.*, 1974)、vWfとGPIIb/IIIaを介した血小板の粘着が止血血栓に重要な役割を演じている可能性が考えられる。一方、TAK-029はコラーゲンへの血小板の粘着に対しては強力な抑制作用を示した ( $IC_{50}$ 値: 76 nM) (図10)。また、TAK-029は血小板凝集をほぼ完全に抑制する用量 (10 mg/kg, p.o.)で *ex vivo*での血小板粘着を約90%抑制した (表3及び図14)。 *Ex vivo*での粘着実験にはコラーゲンコートしたガラスビーズを用いており、この場合、TAK-029はvWfを介さない粘着を抑制したと考えられる。ほぼ同程度の血小板凝集抑制を示す用量で比較した場合、TAK-029の粘着抑制作用はチクロピジン及びクロピドグレルより強力であった。 *In vitro*での血小板粘着実験からコラーゲンへの血小板の粘着は主に血小板の活性化を介して生じると考えられた (図10-A)。通常、コラーゲンによる血小板凝集はシクロオキシゲナーゼの活性化に続くTXA<sub>2</sub>産生を介して生じる (Siess, 1989)。しかし、コラーゲン凝集を完全に抑制する高用量のアスピリン (300 mg/kg, p.o.)は粘着に影響を与えなかったことから (表3及び図14)、粘着反応時の血小板の活性化にはTXA<sub>2</sub>は関与していないと考えられる。最近、コラーゲンによる血小板活性化機構が種々報告されており (Sixma *et al.*, 1997)、チクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンでは抑制できない機構による血小板の活性化が粘着反応には関与している可能性が考えられる。

### D. 各種血栓モデルでの抗血栓作用

上述のようにTAK-029の抗血小板作用には種差が認められ、小動物ではモルモットでのみヒトと同程度の活性を示した。現在まで種々の血栓モデルが報告されているが、モルモットを用いた報告は非常に少ない (Badimon, 1997)。今回、モルモットを用いて動静脈シャントモデル (図3)、頸動脈バルーン傷害モデル (図4)及び光化学反応による脳底動脈血栓モデル (図5)を作成し、TAK-029の抗血栓作用を評価した。組織学的検討からいずれのモデルにおいても典型的な動脈血栓である血小板主体の血栓形成が認められた (図15, 17及び19)。

動静脈シャントモデルではヘパリンの投与により血液凝固系の活性化を部分的に抑制した条件下で実験を行った。しかし、シャント内に留置した綿糸には血小板凝集塊に加えてフィブリン沈着も認められたことから(図15)、シャント内で産生されたトロンビンによる血小板の活性化が血栓形成を引き起こした可能性が考えられた。トロンビンはTXA<sub>2</sub>の産生を介して血小板凝集を引き起こすことが知られており(Siess, 1989)、本モデルにおいてもコラーゲン凝集を完全に抑制するアスピリン(100 mg/kg, p.o.)は有意に血栓形成を抑制した(図16)。血小板凝集を29及び73%抑制する用量のTAK-029(1及び3 mg/kg, p.o.)は、血栓形成をそれぞれ31及び75%抑制した(表3及び図16)。一方、チクロピジン(300 mg/kg/day x 3, p.o.)及びクロピドグレル(100 mg/kg/day x 3, p.o.)は凝集をそれぞれ57及び92%抑制したが、血栓形成抑制作用は弱く、抑制率はそれぞれ28及び43%であった(表3及び図16)。前述のようにTAK-029はチクロピジン及びクロピドグレルより強力に血小板の粘着を抑制するため、より強力な抗血栓作用を示したと考えられる。

通常、頸動脈バルーン傷害モデルは、経皮的冠動脈再建術後の血管狭窄モデルとして用いられている。ラット及びウサギを用いた場合、傷害初期に血小板の粘着が認められるが、閉塞性の血栓形成は生じない(Schaub & Simmons, 1984; Kawamura *et al.*, 1993)。今回モルモットでは傷害後5分以内に血小板主体の血栓による血管閉塞が生じることを見いだした(図17)。本モデルにおいてPGE<sub>1</sub>の安定化製剤、PGE<sub>1</sub>・CDは顕著な血圧低下を引き起こす用量でも、抗血栓作用を示さなかった(図18)。すなわち、PGE<sub>1</sub>は血小板凝集を抑制する用量より低用量で血管弛緩を引き起こして、血圧を低下させたと考えられた。臨床的にも血圧低下を示さない用量のPGE<sub>1</sub>では抗血栓作用は認められないとの報告もなされており(Kleiman *et al.*, 1994)、末梢動脈閉塞症などでのPGE<sub>1</sub>の改善効果は主に血流増加作用に起因している可能性が高い。一方、選択的トロンビン阻害薬であるアルガトロバンは血液凝固時間及び出血時間を延長させる用量においても抗血栓作用を示さなかった(図18)。Jang *et al.* (1990)はイヌでの動脈移植モデルにおいてアルガトロバンが血栓形成を強力に抑制することを報告している。彼らのモデルでは組織因子を多く含む血管の外膜が直接血液成分と接触するために外因系の血液凝固系が活性化され、その結果産生されたトロンビンが血栓形成に深く関与した可能性が考えられ

る。臨床的に経皮的冠動脈再建術では十分量のヘパリンの投与が行われているが、急性期再閉塞は抑制できないとの報告もあり(Barnathan *et al.*, 1987; Chesebro *et al.*, 1987)、血管内皮傷害後の動脈血栓形成に対するトロンビン阻害剤の有効性は低いと考えられる。

1991年、Matsumo *et al.*は緑色光とローズベンガル色素との光化学反応を利用して、局所的にラジカルを産生させることで血管内皮を傷害し、血栓を形成させる方法を報告した。本法を利用したラット中大脳動脈血栓モデルは梗塞巣の定量も可能であり、脳血栓症治療薬の評価に用いられている(Kaku *et al.*, 1997)。しかし、ラットとは異なりモルモットの中脳動脈は眼下裂口付近にあり、走行及び太さには個体差が大きい。それゆえ、今回、脳底動脈を用いて血栓モデルを作成し、TAK-029の抗血栓作用を評価した。本モデルでは両側の頸動脈を結紮して脳内への血液流入を椎骨動脈に続く脳底動脈を介した経路のみとした。TAK-029は出血時間を4倍以上に著明に延長させる用量でのみ抗血栓作用を示した。脳血流量は流入する血液量が低下した場合においても自動安定能により定常状態を保つように調節されている。そのため、ある程度の脳底動脈の狭窄は脳血流量の低下として現れず、血栓形成がかなり進行した状態ではじめて脳血流量は低下すると考えられる。実際、対照群では血流量が40-50%低下した後、全例で5分以内に閉塞が認められており、血流量の低下が生じる段階では血栓形成がかなり進行した状態にあると考えられた。それゆえ、前述のバルーン傷害モデルと比較してTAK-029の薬効発現にはより高用量が必要であったと考えられる。一過性脳虚血発作や脳梗塞では多くの場合前兆がなく、血管の血栓性閉塞が完成した後に突然意識障害が発現する。本モデルはこれら疾患の病態と類似していた。本実験から、これら進行した血栓症に対してもTAK-029は改善効果を示すと考えられるが、同時に、出血性の副作用を伴う可能性がある。

モルモットの血栓モデルに加えて、イヌ冠動脈血栓モデルでのTAK-029の抗血栓作用を検討した。本モデルでは血栓形成と解離が繰り返される、いわゆる周期的冠血流量低下(CFRs)が観察される。このとき形成される血栓は血小板主体の動脈血栓であること、同様のCFRsは不安定狭心症患者の冠血管造影像でも確認されていることが報告されている(Folts *et al.*, 1976; Folts, 1991)。不安定狭心症はしばしば激しい狭心痛を伴

う疾患であり、また交感神経の緊張に起因した血漿中カテコールアミンレベルの上昇も報告されている (Karlsberg *et al.*, 1981)。エピネフリンは血小板凝集活性を有しており、これら患者では血小板の活性化が亢進していると考えられている (Fitzgerald *et al.*, 1986)。今回、エピネフリンを持続注入することでより狭心症発作に近いモデルを作成した。同様のモデルでアスピリン及びヘパリンが無効であることがすでに報告されている (Folts *et al.*, 1982; Folts & Rowe, 1988)。TAK-029は出血時間の延長を伴わない低用量からCFRsを抑制したことから (図21)、不安定狭心症に対する有効な治療薬として期待できる。

#### E. 血栓症治療薬の現状とGPIIb/IIIa拮抗薬の有用性

心筋梗塞及び脳梗塞に対するアスピリン及びチクロピジンの予防効果はいくつかの大規模な臨床試験により確認されている (Gent *et al.*, 1989; Antiplatelet Trialists Collaboration, 1994)。しかし、両薬剤は心筋梗塞及び脳梗塞への移行率を25-33%低下させたに過ぎず、また胃潰瘍、白血球減少症などの重篤な副作用を引き起こすことが報告された。最近、チクロピジンより強力かつ副作用が少ないクロピドグレルの大規模臨床試験が終了した。しかし、アスピリンとの2重盲験比較試験において、クロピドグレルは脳梗塞及び心筋梗塞の発症危険率を8.7%減少させたに過ぎなかった (CAPRIE Steering Committee, 1996)。これらの結果は既知の動脈血栓症治療薬の有効性が未だ不完全であることを示している。本研究の結果、TAK-029は血小板上のGPIIb/IIIaを阻害する全く新しいタイプの抗血小板薬であること、同程度の出血時間延長を示す用量で比較した場合、既知薬より強力な抗血栓作用を示すこと、さらに4つの異なる動脈血栓モデルにおいて有効であることが明らかとなった。これらのデータは、TAK-029を含むGPIIb/IIIa拮抗薬が難治性の動脈血栓症に対して有効な治療薬となる可能性を強く示唆するものである。

## V 総括

本研究では、血小板糖蛋白 (GP) IIb/IIIaに対する新規拮抗薬、TAK-029の*in vitro*及び*ex vivo*での抗血小板作用を検討し、さらにその抗血栓及び出血時間延長作用を各種動脈血栓モデルを用いて評価した。

1. TAK-029は精製ヒト血小板GPIIb/IIIaへのフィブリノーゲン及びフォンビルブランド因子 (vWf) の結合を強力に阻害して、種々の凝集惹起物質によるヒト血小板凝集を29-38 nMのIC<sub>50</sub>値にて抑制した。血小板凝集抑制作用はヒト、モルモット及びサルで強力であり、ウサギ及びラットでは弱かった。
2. TAK-029はヒト血管内皮細胞のビトロネクチンへの接着及びヒト血小板でのリストセチン凝集に影響を与えなかった。
3. TAK-029はコラーゲン及びvWfへのモルモット血小板の粘着を抑制した。それぞれIC<sub>50</sub>値は79及び260 nMであった。
4. モルモットにおいてTAK-029の静脈内及び経口投与はADPによる*ex vivo*血小板凝集を用量依存性に抑制した。凝集を50%抑制する血漿中TAK-029濃度及び出血時間を2倍に延長させる濃度はそれぞれ21及び33 ng/mlであった。血漿中TAK-029濃度が100 ng/ml以上の場合、出血時間は5倍以上に延長した。
5. モルモットでの経口投与実験において、TAK-029の血小板凝集抑制作用はチクロピジン及びクロピドグレルより10-100倍強力であった。凝集抑制率が50-99%の場合の抑制率と出血時間との関係は、TAK-029投与群とチクロピジン及びクロピドグレル投与群で類似していた。一方、TAK-029はコラーゲンコートしたガラスビーズへの*ex vivo*血小板粘着を用量依存性に抑制し、その作用はチクロピジン及びクロピドグレルより100-300倍強力であった。コラーゲン凝集を完全に抑制するアスピリンは粘着に影響を与えなかった。
6. モルモット動静脈シャントモデルにおいてTAK-029 (1及び3 mg/kg, p.o.) は出血時間延長をとまわずに血栓形成をそれぞれ31及び75%抑制した。同程度の出血時間延長を示す用量で比較した場合、TAK-029の抗血栓作用はチクロピジン、クロピドグレル及びアスピリンより強力であった。

7. モルモット頸動脈バルーン傷害モデルにおいてTAK-029 (12  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ , i.v.) は出血時間に影響を与えずに血栓形成を81%抑制した。プロスタグランジン $E_1$ ・ $\alpha$ -シクロデキストリン (PGE $_1$ -CD) (12  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ , i.v.) は血圧を有意に低下させたが抗血栓作用を示さなかった。トロンビン阻害剤であるアルガトロバン (20mg/kg/hr, i.v.) は出血時間及び血液凝固時間を2-3倍に延長させたが抗血栓作用を示さなかった。
8. モルモットでの光化学反応による脳底動脈血栓モデルにおいてTAK-029 (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) は4.5倍の出血時間延長を伴い血栓形成を48%抑制し、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (i.v.) では9倍以上の出血時間延長を伴い血栓形成を完全に抑制した。
9. イヌ冠状動脈を用いた不安定狭心症モデルにおいて、TAK-029 (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) は出血時間に影響を与えずに血栓形成を22分間抑制し、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (i.v.) では約4倍の出血時間延長を伴い血栓形成を45分間抑制した。
10. 以上の結果から、TAK-029は既知の抗血栓薬と比較して出血時間の著明な延長を伴わずにより強力な抗血栓作用を示すこと、さらにモルモット及びイヌを用いた4つの異なる動脈血栓モデルにおいて血栓形成を強力に抑制することが明らかとなった。TAK-029は血小板のGPIIb/IIIaを阻害する新しいタイプの抗血小板薬であり、難治性の動脈血栓症に対する有効な治療薬となる可能性が示唆された。

## 【謝辞】

終わりに臨み、本研究をまとめるに際し、終始懇切なご指導とご助言を賜りました 北海道大学 大学院 獣医学研究科 薬理学教室 教授 中里幸和 博士に心より感謝致します。草稿を御校閲頂きました北海道大学 大学院 獣医学研究科 生化学教室 教授 齊藤昌之 博士、同 生理学教室 教授 葉原芳昭 博士、同 薬理学教室 助教授 伊藤茂男 博士に深謝致します。本研究をまとめるに際し、ご激励を賜りました 恩師 北海道大学 名誉教授 大賀皓 博士に深謝致します。

本研究の機会を与えられました武田薬品工業株式会社 副社長 藤野政彦 博士、創薬研究本部 本部長 目黒寛司 博士、同 創薬研究所 II 所長 仲建彦 博士、同 創薬研究所 I 所長 池田衡 博士に感謝致します。本研究は創薬研究本部 シニアリサーチャー 西川浩平 博士、創薬研究所 II 主席研究員 寺下善一 博士のご指導のもとに遂行されたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。また、化合物を合成、提供して頂きました創薬研究本部 シニアリサーチャー 杉原弘禎 博士、医薬品化学研究所 主任研究員 福士英人 氏に感謝致します。本研究にご協力を賜りました、創薬研究所 II 主席研究員 井村良視 博士、同研究所員 辻典子 氏、開拓第2研究所 主任研究員 喜多俊文 氏、また循環薬理グループの諸氏に感謝致します。

## 【引用文献】

Albelda, S.M., Daise, M., Levine, E.M. & Buck, C.A. (1989) : Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J.Clin.Invest.*, 83, 1992-2002.

Antiplatelet trialists' collaboration. (1994) : Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy I: Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br.Med.J.*, 308, 81-106.

Badimon, L. (1997) : Models to study thrombotic disorders. *Thromb.Haemostas.*, 78, 667-671.

Barker, P.L., Bullens, S., Bunting, S., Burdick, D.J., Chan, K.S., Deisher, T., Eigenbrot, C., Gadek, T.R., Gantzos, R., Lipari, M.T., Muir, C.D., Napier, M.A., Pitti, R.M., Padua, A., Quan, C., Stanley, M., Struble, M., Tom, J.Y.K. & Burnier, J.P. (1992) : Cyclic RGD peptide analogues as antiplatelet antithrombotics. *J. Med. Chem.*, 35, 2040-2048.

Barnathan, E.S., Schwartz, J.S., Taylor, L., Laskey, W.K., Kleaveland, J.P., Kussmaul, W.G. & Hirshfeld, J.W. (1987) : Aspirin and dipyridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation*, 76, 125-134.

Bates, E.R., McGillem, M.J., Mickelson, J.K., Pitt, B. & Mancini, G.B.J. (1991) : A monoclonal antibody against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor complex prevents platelet aggregation and thrombosis in a canine model of coronary angioplasty. *Circulation*, 84, 2463-2469.

Becker, B.H. & Miller, J.L. (1989) : Effects of antiplatelet glycoprotein Ib antibody on hemostatic function in the guinea-pig. *Blood*, 74, 690-694.

Born, G.V.R. (1962) : Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J.Physiol.*, 162, 67-68.

Bradford, M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72, 246-254.

Cadroy, Y., Houghten, R.A. & Hanson, S.R. (1989) : RGDV peptides selectively inhibits platelet-dependent thrombus formation *in vivo*. *J.Clin.Invest.*, 84, 939-944.

Caen, J.P., Castaldi, P.A., Leclerc, J.C., Inceman, S., Larrieu, M.J., Probst, M. & Bernard, J. (1966) : Congenital bleeding disorder with long bleeding time and normal platelet count. I. Glanzmann's thrombasthenia (report of fifteen patients). *Am. J. Med.*, 41, 4-26.

CAPRIE steering committee. (1996) : A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE), *Lancet*, 348, 1329-1339.

Charo, I.F., Nannizzi, L., Phillips, D.R., Hsu, M.A. & Scarborough, R.M. (1991) : Inhibition of fibrinogen binding to GPIIb/IIIa by a GPIIIa peptide. *J.Biol.Chem.*, 266, 1415-1421.

Chesebro, J.H., Knatterud, G., Roberts, R., Borer, J., Cohen, L.S., Dalen, J., Dodge, H.T., Francis, C.K., Hillis, D., Ludbrook, P., Markis, J.E., Mueller, H., Passamani, E.R., Powers, E.R., Rao, A.K., Robertson, T., Ross, A., Ryan, T.J., Sobel, B.E., Willerson, J., Williams, D.O., Zaret, B.L. & Braunwald, E. (1987) : Thrombolysis in myocardial infarction (TAMI) trial, phase I: A comparizon between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. *Circulation* 1987, 76, 142-154.

Collen, D., Lu, H.R., Stassen, J.M., Vreys, I., Yasuda, T., Bunting, S. & Gold, H.K. (1994) : Antithrombotic effects and bleeding time prolongation with synthetic platelet GPIIb/IIIa inhibitors in animal models of platelet-mediated thrombosis. *Thromb.Haemostas.*, 71, 95-102.

Coller, B.S., Folts, J.D., Smith, S.R., Scudder, L.E. & Jordan, R. (1989) : Abolition of *in vivo* platelet thrombus formation in primates with monoclonal antibodies to the platelet GPIIb/IIIa receptor. *Circulation*, 80, 1766-1744.

Coller, B.S. (1992) : Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Ann.Rev.Med.*, 43, 171-180.

Cook, N.S., Kottirsch, G. & Zerwes, H.-G. (1994) : Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Drugs Future*, 19, 135-159.

Davies, M.J. & Thomas, A.C. (1985) : Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br.Heart J.*, 53, 363-373.

Defreyn, G., Bernat, A., Delebasse, D. & Maffrand, J.P. (1989) : Pharmacology of ticlopidine : a review. *Semi. Thromb. Haemost.*, 15, 159-166.

EPIC Investigators. (1994) : Prevention of ischemic complications in high-risk angioplasty by a chimeric monoclonal antibody c7E3 Fab fragment directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *New Engl. J. Med.*, 330, 956-961.

Ezratty, A.M. & Loscalzo, J. (1991) : New approaches to antiplatelet therapy. *Blood Coag. Fibrinol.*, 2, 317-327.

Farrell, D.H., Thiagarjan, P., Chung, D.W. & Davie, E.W. (1992) : Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89, 10729-10732.

Fitzgerald, L.A., Leung, B. & Phillips, D.R. (1985) : A method for purifying the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Anal.Biochem.*, 151, 169-177.

Fitzgerald, D.J., Roy, L., Catella, F. & Fitzgerald, G.A. (1986) : Platelet activation in unstable coronary disease. *New Engl. J. Med.*, 315, 983-989.

Folts, J.D., Crowell, E.B. & Rowe, G.G. (1976) : Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation*, 54, 365-370.

Folts, J.D., Gallagher, K. & Rowe, G.G. (1982) : Blood flow reductions in stenosed canine coronary arteries : Vasospasm or platelet aggregation? *Circulation*, 65, 248-255.

Folts, J.D. & Rowe, G.G. (1988) : Epinephrine reverses aspirin inhibition of in vivo platelet thrombus formation in stenosed dog coronary arteries. *Thromb.Res.*, 50, 507-516.

Folts, J. (1991) : An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation*, 83, IV-3-14.

Foster, M.R., Hornby, E.J., Brown, S., Kitchin, J., Hann, M., & Ward, P. (1993) : Improved potency and specificity of Arg-Gly-Asp (RGD) containing peptides as fibrinogen receptor blocking drugs. *Thromb. Res.*, 72, 231-245.

Fujimura, K. & Phillips, D.R. (1983) : Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membranes. *J.Biol.Chem.*, 258, 10247-10252.

Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J. & Chesebro, J.H. (1992) : The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *New Engl.J.Med.*, 326, 242-318.

Gent, M., Blakely, J.A., Easton J.D., Ellis, D.J., Hachinski, V.C., Harbison, J.W., Panak, E., Roberts, R.S., Sicurella, J., Turpie, A.G.G. & The CAST group. (1989) : The Canadian American ticlopidine study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet*, 1, 1215-1220.

Golub, M., Matsuno, M., Horton, R. (1975) : Metabolism of prostaglandins A<sub>1</sub> and E<sub>1</sub> in man. *J. Clin. Invest.*, 56, 838-846.

Harfenist, E.J., Packham, M.A. & Mustard, J.F. (1988) : Effects of the cell adhesion peptide, Arg-Gly-Asp-Ser, on responses of washed platelets from humans, rabbit and rats. *Blood*, 71, 132-136.

Harker, L.A. (1994) : New antithrombotic strategies for resistant thrombotic processes. *J.Clin.Pharmacol.*, 34, 3-16.

Harker, L.A., Hanson, S.R. & Kelly, A.B. (1997) : Antithrombotic benefits and hemorrhagic risks of direct thrombin antagonists. *Thromb.Haemostas.*, 74, 464-472.

Haskel, E.J., Adam, S.P., Feigen, L.P., Saffitz, J.E., Gorczynski, R.J., Sobel, B.E. & Abendschein, D.R. (1989) : Prevention of reocclusion platelet-rich thrombi in canine femoral arteries with a novel peptide antagonist of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors. *Circulation*, 80, 1775-1782.

Hass, W.K., Easton, J.D., Adams, Jr., H.P., Pryse-Phillips, W., Molony, B.A., Anderson, S. & Kamm, B., for the ticlopidine aspirin stroke study group. (1989) : A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. *New Engl. J. Med.*, 321, 501-507.

Herbert, J.M., Frehel, D., Vallee, E., Kieffer, G., Gouy, D., Berger, Y., Necciar, J., Defreyn, G. & Maffrand, J.P. (1993) : Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. *Cardiovasc.Drug Rev.*, 11, 180-198.

Howard, M.A. & Firkin, B.G. (1971) : Ristocetin - A new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thromb.Haemostas.*, 26, 362-369.

Hynes, R.O. (1992) : Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.

居石克夫, 田中健蔵. (1989) : 血栓症の疫学, p1-6 「血栓症/発生・背景・治療」, 藤巻道男, 風間睦美, 住吉昭信, 松田道生 編, メジカルビュー社, 東京.

Isenberg, W.M., McEver, R.P., Phillips, D.R., Shuman, M.A. & Bainton, D.F. (1987) : The platelet fibrinogen receptor : an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. *J.Cell Biol.*, 104, 1655-1663.

Jang, I.K., Gold, H.K., Ziskind, A.A., Leinbach, R.C., Fallon, J.R. & Collen, D. (1990) : Prevention of platelet-rich arterial thrombosis by selective thrombin inhibitor. *Circulation*, 81, 219-225.

Jennings, L.K. & Phillips, D.R. (1982) : Purification of glycoproteins IIb and IIIa from human platelet membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.*, 257, 10458-10463.

Kaku, S., Umemura, K., Mizuno, A., Kawasaki, T., Nakashima, M. (1997) : Evaluation of the disintegrin, triflavin, in a rat middle cerebral artery thrombosis model. *Eur.J.Pharmacol.*, 321, 301-305.

Karlsberg, R.P., Cryer, P.E. & Robert, R. (1981) : Serial plasma catecholamine response early in course of clinical acute myocardial infarction : Relationship to infarct extent and mortality. *Am. Heart J.*, 102, 24-29.

Kawamura, M., Terashita, Z., Okuda, H., Imura, Y., Shino, A., Nakao, M. & Nishikawa, K. (1993) : TCV-116, a novel angiotensin II receptor antagonist, prevents intimal thickening and impairment of vascular function after carotid injury in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266, 1664-1669.

Kawamura, M., Imura, Y., Moriya, N., Kita, S., Fukushi, H., Sugihara, H., Nishikawa, K. & Terashita, Z. (1996) : Antithrombotic effects of TAK-029, a novel GPIIb/IIIa antagonist, in guinea pigs : Comparative studies with ticlopidine, clopidogrel, aspirin, prostaglandin E<sub>1</sub> and argatroban. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 502-510.

Kawamura, M., Tsuji, N., Moriya, N. & Terashita, Z. (1997) : Effects of TAK-029, a novel GPIIb/IIIa antagonist, on arterial thrombosis in guinea pigs, dogs and monkeys. *Thromb. Res.*, 86, 275-285.

Kleiman, N.S., Tracy, R., Schaaff, L.J., Harris, S., Hill, R.D., Puleo, P. & Roberts, R. (1994) : Prostaglandin E<sub>1</sub> dose not accelerate rTPA-induced thrombolysis in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.*, 127, 738-743.

Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T.J. & Hawiger, J. (1984) : Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain. *Biochemistry*, 23, 1767-1774.

Kroll, M.H., Harris, T.S., Moake, J.L., Handin, R.I. & Schafer, A.I. (1991) : von Willebrand factor binding to platelet GPIb initiates signals for platelet activation. *J.Clin.Invest.*, 88, 1568-1573.

Matsuno, H., Uematsu, T., Nagashima, S. & Nakashima, M. (1991) : Photochemically-induced thrombosis model in rat femoral artery and evaluation of effects of heparin and tissue-type plasminogen activator with use of this model. *J. Pharmacol. Meth.*, 25, 303-318.

Meyer, D. & Girma, J.-P. (1993) : von Willebrand factor : structure and function. *Thromb. Haemostas.*, 70, 99-104.

Nichols, A.J., Ruffolo, R.R., Huffman, Jr, W.F., Poste, G. & Samanen, J. (1992) : Development of GPIIb/IIIa antagonists as antithrombotic drugs. *Trend in Pharmacol. Sci.*, 13, 413-417.

Nurden, A.T. & Caen, J.P. (1974) : An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br. J. Haematol.*, 28, 253-260.

Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V. & Fitzgerald, L.A. (1988) : The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood*, 71, 831-843.

Plow, E.F., McEver, R.P., Collier, B.S., Woods, V. L., Marguerie, G.A. & Ginsberg, M.H. (1985) : Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willbrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood*, 66, 724-727.

Poncz, M. & Newman, P.J. (1990) : Analysis of rodent platelet glycoprotein IIb : Evidence for evolutionarily conserved domains and alternative proteolytic processing. *Blood*, 75, 1282-1289.

Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ginsberg, M.H., Plow, E.F. & Ruoslahti, E. (1986) : Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa : Member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion molecules. *Science*, 231, 1559-1562.

Ruggeri, Z.M. (1997) : Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb. Haemostas.*, 78, 611-616.

Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D. (1987) : New perspectives in cell adhesion : RGD and integrins. *Science*, 238, 491-497.

Schaub, R.G. & Simmons, C.A. (1984) : Medial smooth muscle cell proliferation in the balloon injured rabbit aorta : Effect of a thiazole compound with platelet inhibitory activity. *Thromb.Haemostas.*, 51, 75-78.

Schorr, K. (1995) : Antiplatelet drugs. *Drugs*, 50, 7-28.

Shattil, S.J. (1993) : Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *Thromb.Haemostas.*, 70, 224-228.

Siess, W. (1989) : Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.*, 69, 58-178.

Simoons, M.L., Boer, M.J., van den Brand, M.J.B.M., van Miltenburg, A.J.M., Hooftje, J.C.A., Heyndrickx, G.R., van der Wicken, L.R., De Bono, D., Rutsch, W.R., Schaible, T.F., Weisman, H.F., Klootwijk, P., Nijssen, K.M., Stibbe, J., de Feyter, P.J. & the European Cooperative Study Group. (1994) : Randomized trial of a GPIIb/IIIa platelet receptor blocker in refractory unstable angina. *Circulation*, 89, 596-603.

Sixma, J.J., van Zanten, G.H., Saelman, E.U.M., Verkleij, M., Lankhof, H., Nieuwenhuis, H.K. & de Groot, P.G. (1995) : Platelet adhesion to collagen. *Thromb.Haemostas.*, 74, 454-459.

Sixma, J.J., van Zanten, G.H., Huizinga, E.G., van der Plas, R.M., Verkleij, M., Wu, Y.-P., Gros, P. & de Groot, P.G. (1997) : Platelet adhesion to collagen : an Update. *Thromb.Haemostas.*, 78, 434-438.

Topol, E., Califf, R.M., Weisman, H.F., Ellis, S.G., Tchong, J.E., Worley, S., Ivanhoe, R., George, B.S., Fintel, D., Weston, M., Sigmon, K., Anderson, K.M., Lee, K.L., Willerson, J.T. on behalf of The EPIC investigators. (1994) : Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis : results at six months. *Lancet*, 343, 881-886.

Tschopp, T.B., Weiss, H.J. & Baumgartner, H.R. (1974) : Decreased adhesion of platelets to subendothelium in von Willebrand's disease. *J.Lab.Clin.Med.*, 83, 296-300.

Verhallen, P.F.J. & Barth, M. (1991) : Species comparison of anti-aggregatory properties of three fibrinogen receptor antagonists : RGDS, echistatin and carboxy-terminal dodecapeptide of the fibrinogen gamma-chain. *Thromb. Haemostas.*, 65, 1144 (abst.)

Weiss, H.J., Baumgartner, H.R. & Turitto, V.T. (1987) : Regulation of platelet-fibrin thrombi on subendothelium. *Ann.NY Acad.Sci.*, 516, 380-397.

Willerson, J.J., Hills, L.D., Winniford, M. & Buja, L.M. (1986) : Speculation regarding mechanism responsible for acute ischemic heart disease syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 8, 245-250.

## 【英文抄録】

Pharmacological profiles of TAK-029, a novel antagonist to platelet GPIIb/IIIa, and its antithrombotic effects

Masaki Kawamura

In the present report, the *in vitro* and *ex vivo* antiplatelet profiles of TAK-029, a novel antagonist to platelet glycoprotein GPIIb/IIIa, were characterized and its antithrombotic and bleeding time (BT) prolonging effects were examined in various arterial thrombosis models.

1. TAK-029 potently inhibited the binding of fibrinogen and von Willebrand factor (vWf) to purified human GPIIb/IIIa, and human platelet aggregation induced by various aggregating agents with  $IC_{50}$  values of 29-38 nM. The *in vitro* antiplatelet effect of TAK-029 was potent in humans, guinea-pigs and monkeys, and was much less potent in rabbit and rat.
2. TAK-029 had no effects on the adhesion of human endothelial cells to vitronectin and human platelet agglutination induced by ristocetin.
3. TAK-029 inhibited the adhesion of guinea pig platelet to collagen and vWf, with the respective  $IC_{50}$  values of 79 and 260 nM.
4. In guinea pigs, both intravenous and oral administrations of TAK-029 inhibited ADP-induced *ex vivo* platelet aggregation in a dose-dependent manner. The plasma concentrations of TAK-029 that caused inhibition of ADP-induced *ex vivo* platelet aggregation by 50% and the concentration that prolonged BT to twice its control values were estimated at 21 and 33 ng/ml, respectively. When the plasma concentration was more than 100 ng/ml, the BT was prolonged to more than 5 times.
5. In guinea pigs, oral dose of TAK-029 inhibited ADP-induced *ex vivo* platelet aggregation 10-100 times more potent than ticlopidine and clopidogrel, respectively. TAK-029, ticlopidine and clopidogrel prolonged BT to the same extent, in parallel with their inhibition of *ex vivo* platelet aggregation within the range from 50% to 99%. TAK-029 inhibited *ex vivo* platelet adhesion to

collagen-coated glass beads in a dose-dependent manner, and its inhibitory effect was 100-300 times more potent than ticlopidine and clopidogrel. A high dose of aspirin inhibited collagen-induced platelet aggregation completely, but it had no effect on the platelet adhesion.

6. In an arteriovenous shunt model, TAK-029 at 1 and 3 mg/kg (p.o.) inhibited thrombus formation by 31 and 75%, respectively. TAK-029 inhibited thrombus formation more potent than ticlopidine, clopidogrel and aspirin at doses causing similar prolongation of BT.
7. In a balloon-injury induced carotid thrombosis model, TAK-029 at 12  $\mu$ g/kg/hr (i.v.) inhibited thrombus formation by 81% without prolongation of BT. Prostaglandin  $E_1$ - $\alpha$ -cyclodextrin at 40  $\mu$ g/kg/min (i.v.) decreased blood pressure significantly, but it had no effect on thrombus formation. Argatroban, a thrombin inhibitor, at 20 mg/kg/hr (i.v.) prolonged BT and blood coagulation time to 2-3 times their control values, respectively, but had no effect on thrombus formation.
8. In a photochemically-induced basilar thrombosis model, TAK-029 at 30  $\mu$ g/kg (i.v.) prevented the thrombotic occlusion significantly, and it prolonged BT to approximately 5 times the control value. TAK-029 at 100  $\mu$ g/kg (i.v.) prolonged BT to more than 9 times, and it prevented thrombotic occlusion for over 60 min.
9. In the dog coronary thrombosis model, an unstable angina model, TAK-029 at 30  $\mu$ g/kg (i.v.) inhibited the thrombus formation for 22 min without prolongation of BT. TAK-029 at 100  $\mu$ g/kg (i.v.) prolonged BT to approximately 4 times, and it prevented thrombus formation for over 45 times.
10. In summary, TAK-029 inhibited thrombus formation without severely prolonging the BT, in comparison with conventional antithrombotic agents in guinea pigs. Furthermore, TAK-029 inhibited the thrombus formation strongly in four different arterial thrombosis models in guinea pigs and dogs. TAK-029, a new type antithrombotic agent by inhibiting platelet GPIIb/IIIa, may be an effective drug in patients suffering from arterial thrombosis, which is refractory to the other antithrombotic agents.

