

Isosorbide Dinitrate の全血凝集に対する抑制効果

Inhibitory Effect of Isosorbide Dinitrate on Whole Blood Aggregation

吉本 裕
末廣 謙
日笠 聡
瀬戸 孝宏*
奥 憲一*
垣下 榮三

Hiroshi YOSHIMOTO, MD
Akira SUEHIRO, MD
Satoshi HIGASA, MD
Takahiro SETO, MD*
Ken-ichi OKU, MD*
Eizo KAKISHITA, MD

Abstract

Isosorbide dinitrate (ISDN) has an inhibitory effect on platelet aggregation through the generation of nitric oxide (NO). We examined the effect of ISDN on whole blood aggregation using an impedance aggregometer. Blood samples were obtained from 16 patients with acute myocardial infarction and 4 patients with angina pectoris before and after an intravenous administration of ISDN during coronary arteriography. Whole blood obtained from normal healthy donors was used for an *in vitro* study.

Whole blood aggregation after administration of ISDN was significantly inhibited compared to that before administration (36.1 ± 8.3 vs $43.7 \pm 8.4 \Omega$, $p < 0.001$), and cyclic guanine monophosphate (c-GMP) concentration increased (5.56 ± 2.0 vs 5.14 ± 1.86 p mol/ml, $p < 0.05$). The inhibitory effect of ISDN was also observed in the *in vitro* study, in which the effective concentration of ISDN corresponded to the blood level of ISDN ($\geq 10^{-7}$ mol) in the clinical setting. The inhibitory effect of ISDN was diminished by the addition of methylene blue or N^G -monomethyl-L-arginine monoacetate in the *in vivo* and *in vitro* studies. The concentration of c-GMP was increased by the addition of ISDN to platelets and white blood cell suspended plasma compared to the control (1.93 ± 0.50 vs 1.77 ± 0.42 p mol/ml, $p < 0.05$), but there was no significant difference when ISDN was added to platelet-rich plasma.

These results suggest that ISDN inhibits whole blood aggregation through NO generation and white blood cells are important in the mechanism of ISDN action.

Key Words

Nitrates (isosorbide dinitrate), Blood aggregation (nitric oxide), Impedance aggregometer

はじめに

Isosorbide dinitrate (ISDN) は、虚血性心疾患によく用いられる治療薬の一つである。その主な作用は虚血冠動脈血管を弛緩させることであるが、この作用は一酸化窒素 (nitric oxide: NO) の生成を介したものであると報告されている¹⁾。ISDN にはこの他に血小板の凝集抑制作用があり²⁾、実験動物に ISDN を投与することによ

り、多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) を用いた検討においても血小板凝集が抑制されると報告されている³⁾。 *in vitro* の実験でも、多血小板血漿を用いた血小板凝集が ISDN により抑制されると報告されている⁴⁾。これら ISDN の血小板抑制作用も NO を介したものと考えられるが、多血小板血漿を用いたこれらの検討では、血液中において重要な NO 生成部位である白血球細胞⁵⁾が含まれていない。ISDN の血小板に対する

兵庫医科大学 第二内科：〒663 西宮市武庫川町 1-1; *阪和記念病院 内科，大阪

The Second Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya; *Division of Internal Medicine, Hanwa Memorial Hospital, Osaka

Address for reprints: YOSHIMOTO H, MD, The Second Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Mukogawa-cho 1-1, Nishinomiya 663

Manuscript received December 12, 1996; accepted December 26, 1996

Selected abbreviations and acronyms

c-GMP=cyclic guanine monophosphate
ISDN=isosorbide dinitrate
L-NMMA=N ^G -monomethyl-L-arginine monoacetate
MB=methylene blue
NO=nitric oxide
PRP=platelet-rich plasma
sGC=soluble guanylate cyclase

影響を *in vitro* で生体内に近い状態で検討するには、その反応系における血小板以外の細胞、ことに白血球系細胞の存在意義を検討することが重要である。

今回、我々は血小板以外の細胞が存在する条件下、すなわちインピーダンス凝集計⁶⁾による全血凝集に対する ISDN の効果を、冠動脈疾患患者に対する冠動脈造影時の ISDN の静脈内投与前後における変化、および *in vitro* における ISDN 添加による影響から検討した。

対象と方法

対象は急性心筋梗塞 16 例 (男 13 例, 女 3 例, 平均年齢 64.2 ± 11.3 歳) および狭心症の 4 例 (男 3 例, 女 1 例, 平均年齢 63.5 ± 2.7 歳) で、ISDN の効果の検討は発症時より 3 ヶ月以上経過した慢性期において、冠動脈造影検査を施行した時に行った。鼠径部より動脈カテーテルを冠動脈まで挿入後、造影剤注入前に ISDN 5 mg を静脈内に投与前および投与後 1 分に、肘静脈より採取した血液を 1/10 量の sodium citrate で抗凝固したそれぞれの全血 150 μ l に、Tyrode buffer 150 μ l を加えて検体とした。この検体に回転攪拌を与えながらコラーゲン (10 μ g/ml) を添加し、インピーダンス凝集計を用いて 15 分間の最大インピーダンスの変化 (Ω : オーム値) を記録し、投与前および投与後 1 分の Ω 値について比較検討した。更に soluble guanylate cyclase (sGC) 活性阻害薬である methylene blue (MB; 10^{-5} mol), あるいは NO 合成酵素阻害薬である N^G-monomethyl-L-arginine monoacetate (L-NMMA; 10^{-5} mol) を、それぞれ ISDN 投与後 1 分の全血検体に加え、コラーゲン (10 μ g/ml) 添加後の 15 分までのインピーダンスの変化も観察した。また、ISDN 投与前後の血中 ISDN 濃度の測定はガスクロマトグラフ法⁷⁾で、また NO 生成の指標としての cyclic guanine monophosphate (c-GMP)

については、超音波を用いて検体中の血球を破碎後、1,500 \times g, 15 分間遠沈し、その上清中の c-GMP 濃度を放射免疫測定法 (radioimmunoassay)⁸⁾ でそれぞれ測定した。

in vitro における検討では、健常人より 1/10 量の sodium citrate で抗凝固して得た全血 150 μ l に、Tyrode buffer 120 μ l を加えて検体とした。この検体に、ISDN (終濃度: 2×10^{-6} – 2×10^{-8} mol) を 30 μ l 加え、3 分間、37°C, 1,000 rpm にて攪拌後、コラーゲン (10 μ g/ml) を 33 μ l 添加した後、15 分間のインピーダンスの変化を観察し、対照群 (ISDN 未添加群) と比較検討した。更に MB (10^{-5} mol) または L-NMMA (10^{-5} mol) をそれぞれ ISDN と同時添加し、コラーゲン (10 μ g/ml) 添加後の 15 分までのインピーダンスの変化も観察し、対照群および ISDN 単独添加群と比較検討した。

また、*in vitro* において ISDN 添加による細胞内 c-GMP 濃度の変化は、NO と結合してその作用を阻害するヘモグロビンの影響⁹⁾ を除外するため、赤血球を除去した検体を作製して検討した。検体としては、健常人より得た全血を 150 \times g, 10 分間遠沈し、その上清を採取して PRP を作製した。また、これとは別に 6% dextran と metrizoic acid を用いて赤血球除去血、すなわち血小板と白血球の浮遊血漿を作製した。その方法は、6% dextran 2 ml と metrizoic acid 1 ml の混和液の上に、1/10 量の sodium citrate で抗凝固した全血 5 ml を静かに重ねておき、1 時間室温下に静置し、その上清を採取して血小板と白血球の浮遊血漿を得た。これらの検体に ISDN (2×10^{-7} mol) を添加し、3 分間、37°C, 1,000 rpm にて攪拌後、超音波により血球を破碎し、1,500 \times g, 15 分間遠沈した上清中の c-GMP 濃度を放射免疫測定法にて測定し、対照群と比較検討した。

結 果

冠動脈疾患患者に ISDN 5 mg を投与した 1 分後の ISDN の血中濃度は、 10^{-7} mol 以上に上昇した (Fig. 1-左)。全血インピーダンス凝集は、ISDN 投与後 1 分では、投与前と比較し、有意に Ω 値の低下が認められた (Fig. 1-中)、このことは ISDN により全血凝集抑制がみられたことを意味する。また、ISDN 投与後の c-GMP 濃度は投与前に比べ有意に増加した (Fig. 1-右)。更に、ISDN 投与 1 分後に採血して得た全血検体に MB または L-NMMA を添加すると、Fig. 1-中で認められた

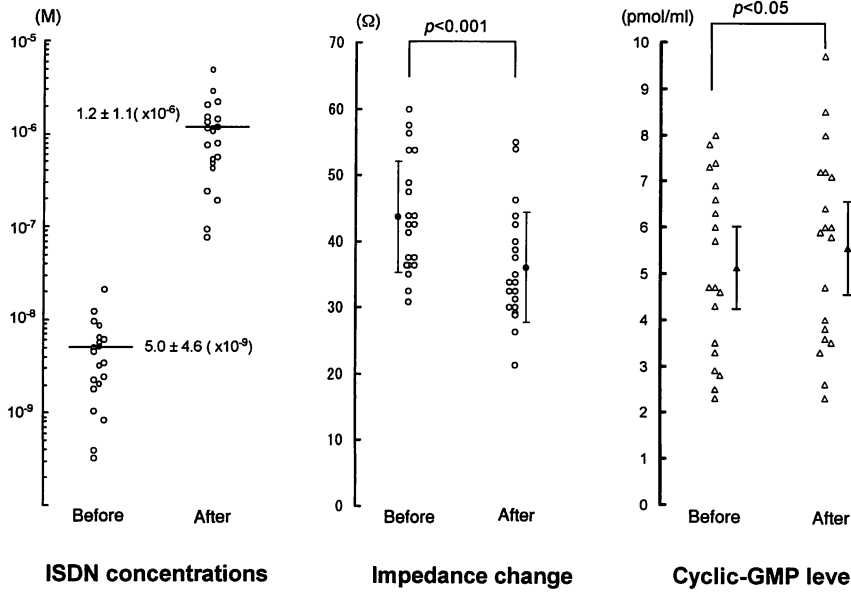


Fig. 1 ISDN concentrations (*left*), impedance change (*middle*) and c-GMP levels (*right*) in blood obtained before and 1 min after intravenous infusion of ISDN (5 mg) in patients with ischemic heart disease
The vertical bar and solid symbol represent the mean ± standard deviation (SD).

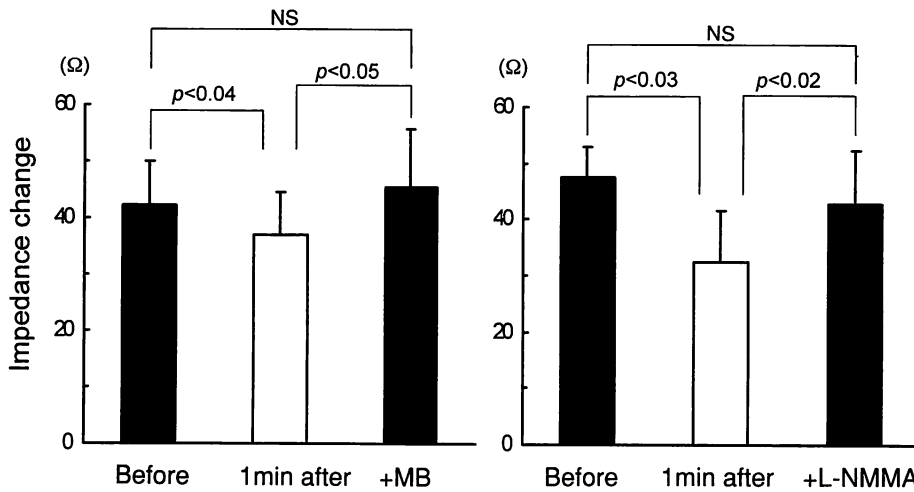


Fig. 2 Effect of MB (10^{-5} mol) or L-NMMA (10^{-5} mol) on whole blood aggregation induced by collagen ($10 \mu\text{g/ml}$) measured using an impedance aggregometer
Whole blood samples were obtained from patients with ischemic heart disease at 1 min after intravenous infusion of isosorbide dinitrate (5 mg). Each value represents the mean ± SD of 4–5 experiments.
NS = not significant. Other abbreviation as in Fig. 1.

ISDN による Ω 値の低下, つまり凝集抑制効果は消失した (Fig. 2).

一方, *in vitro* の検討では, 健常人より得た全血に $2 \times 10^{-6}, 2 \times 10^{-7}$ mol の ISDN を添加すると, 凝集の抑制が認められたが, 2×10^{-8} mol の ISDN では抑制効果が認められなかった (Fig. 3). この凝集抑制効果を示した ISDN の濃度は, 冠動脈疾患患者に ISDN を投与し

て凝集抑制が認められた血中濃度にほぼ相当した. また, 凝集抑制効果が認められた ISDN 濃度 ($2 \times 10^{-6}, 2 \times 10^{-7}$ mol) に MB あるいは L-NMMA を同時添加した場合には, ISDN による全血凝集抑制効果は消失した (Fig. 4). 更に, PRP に 2×10^{-7} mol の ISDN を添加しても, 対照群と比較して NO 生成の指標である c-GMP 濃度の変化はみられなかったが, 血小板と白血球の浮

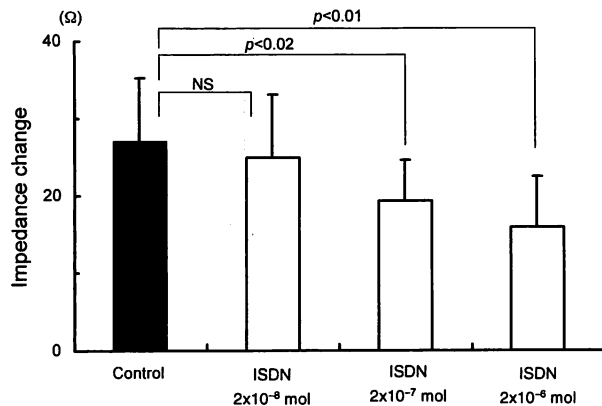


Fig. 3 Effect of the addition of ISDN on whole blood aggregation induced by collagen (10 µg/ml) measured using an impedance aggregometer

Whole blood samples were obtained from normal volunteers. Each value represents the mean ± SD of 4–9 experiments. Abbreviations as in Figs. 1, 2.

遊血漿に ISDN (2×10^{-7} mol) を添加することにより c-GMP 濃度の有意な増加が認められた (Fig. 5).

考 察

ISDN は虚血性心疾患や鬱血性心不全の治療に広く用いられているが^{10,11)}、これは ISDN が血管弛緩作用と血小板凝集抑制作用を有することによる。これらの作用機序は、ISDN から生成される NO によるものと考えられている¹⁾。

NO は内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor) として最も重要なものの一つであり、血管内皮弛緩作用と血小板凝集抑制作用を有する^{12,13)}。NO の血小板に対する作用は、NO が血小板細胞内の c-GMP 生成酵素である sGC を活性化し、c-GMP 濃度を上昇させることにより、血小板凝集抑制効果を示すことにある^{14,15)}。一方、流血中において活性化された好中球や単核球などの白血球細胞が、NO 様因子を放出することにより、血小板凝集を抑制すること¹⁶⁾や、血小板凝集がヒト洗浄好中球を添加することにより抑制されることも報告されている¹⁷⁾。更に、NO は血管内皮細胞膜表面への白血球の接着を阻害することも報告されている¹⁸⁾。したがって、NO は生体内において血小板と白血球が関与する血栓形成に重要な役割を果たしていることが想定される。

今回、我々は ISDN の全血凝集に対する効果を *in vivo*, *in vitro* の両面から検討した。これまでの ISDN の血小板凝集に対する影響に関する検討の殆どは、PRP

を用いたものであった。しかし、上述のように、血小板に対する NO 生成を介した影響を観察する場合、その反応系に白血球細胞系が存在することが必要となる。そこで、我々はインピーダンス凝集計を用い、全血中における凝集反応を検討した。この方法では反応系に NO の重要な生成場所の一つである白血球が含まれており、ISDN の効果あるいは NO 生成の影響をみる実験としては、より生理的条件に近いものと考えられる。

冠動脈疾患患者に対し、冠動脈造影時、ISDN を投与した後の全血凝集は、投与前と比較して有意に抑制されており、ISDN 静脈内投与後の血中 ISDN 濃度は 10^{-7} mol 以上に上昇していた。そこで *in vitro* の実験で、健常人より得た全血に同程度の濃度の ISDN を添加したところ、全血凝集は有意に抑制されることが確認された。これまでの報告にある *in vitro* で血小板凝集抑制に必要な ISDN 濃度は、今回の我々が用いたものより高濃度であり¹⁹⁾、実際は生体内で抑制効果があるか否か疑問であった。これは、これまでの報告にある検討は PRP を用いたもので、PRP には NO の重要な生成場所である白血球が含まれていないことと関連していると思われる。一方、今回 ISDN を投与した冠動脈疾患患者において、投与後の c-GMP 濃度は投与前よりも有意に増加した。細胞内 c-GMP 濃度はその生成酵素である sGC 活性化により上昇すること、また NO は sGC 活性化作用を有することから、ISDN 投与により c-GMP 濃度の上昇が認められたことは、ISDN により NO 生成亢進が惹起されたことを示す。したがって ISDN による凝集抑制効果の発現は、NO 生成を介したものであると想定される。そこで、これを確認するために NO 阻害薬を用いて検討を加えた。

冠動脈疾患患者で ISDN 投与後の全血に MB あるいは L-NMMA を加えると、ISDN 投与による全血凝集抑制効果は阻害された。更に、健常人より得た全血を用いた *in vitro* の検討においても、MB あるいは L-NMMA を全血凝集抑制効果が認められた濃度 (2×10^{-6} , 2×10^{-7} mol) の ISDN と同時に添加することにより、ISDN の凝集抑制効果は阻害されることが確認された。MB は c-GMP を増加させる sGC の阻害薬であり、NO を生成し血小板凝集を抑制する nitroglycerin の作用を阻害することが知られている²⁰⁾。また、L-NMMA は NO 合成酵素阻害薬であり、NO の合成基質である L-arginine

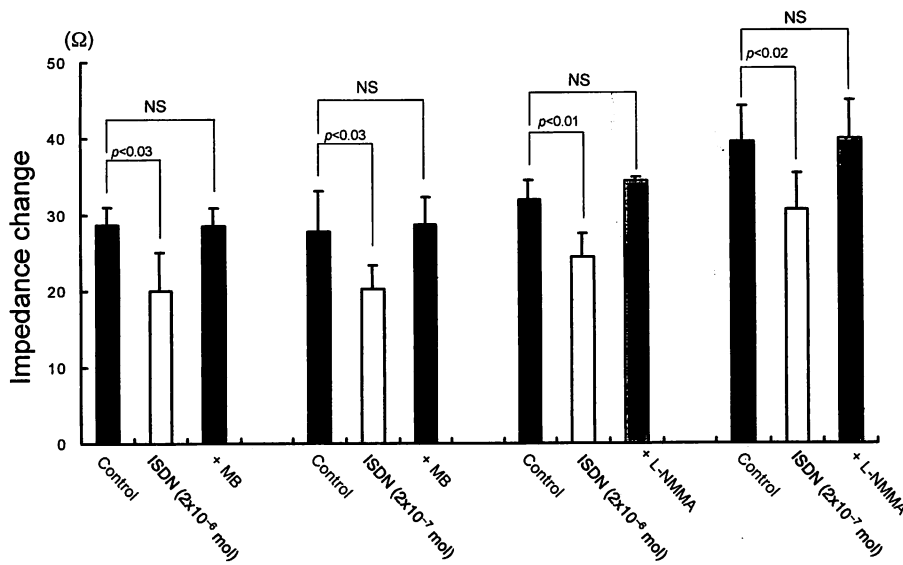


Fig. 4 Effect of MB (10^{-5} mol) or L-NMMA (10^{-5} mol) on whole blood aggregation induced by collagen ($10 \mu\text{g/ml}$) measured using an impedance aggregometer

Whole blood samples were obtained from normal volunteers. Each value represents the mean \pm SD of 4–6 experiments. Abbreviations as in Figs. 1, 2.

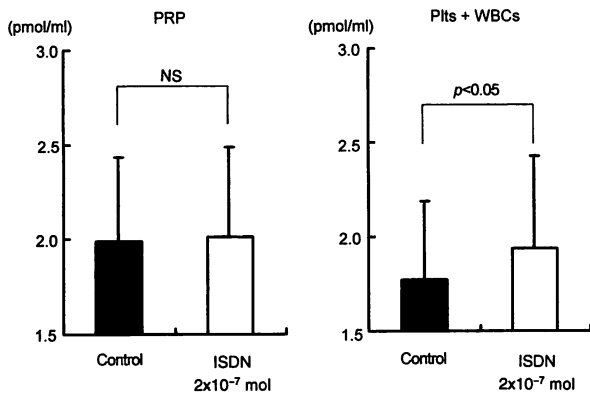


Fig. 5 Effect of ISDN (2×10^{-7} mol) on c-GMP concentration in platelet-rich plasma (PRP) (left) and platelets and white blood cells suspension (Plts+WBCs) (right)

Blood samples were obtained from normal volunteers. Each value represents the mean \pm SD of 6–7 experiments. Abbreviations as in Figs. 1, 2.

から NO への変換を阻害する²¹⁾。これらの阻害薬が全血インピーダンス凝集において ISDN の凝集抑制作用を阻害することより、ISDN は全血コラーゲン凝集において、NO を生成して凝集抑制効果を示すことが更に明らかとなった。

また、全血インピーダンス凝集においては、白血球の電極への粘着が、凝集反応開始の第一段階として重要であるといわれている²²⁾。今回の *in vitro* の検討で、PRP においては NO 生成の指標である c-GMP 濃度は

ISDN 添加で有意な増加はみられなかったが、白血球が反応系に存在する場合、すなわち血小板と白血球の浮遊血漿である赤血球除去血では、有意な増加が認められた。全血中での NO 生成部位としては、上述のように白血球が重要であるが、血小板における NO 生成もある²³⁾。このことから、今回の我々の検討で、PRP に ISDN を添加した場合でも、ある程度 c-GMP 濃度上昇のあることが期待されたが、結果としては有意な変化は認められなかった。これは PRP における c-GMP 濃度の変化が感度以下の軽微なものであったことを示す一方、PRP を用いたこれまでの報告で、凝集抑制を示す ISDN 濃度はごく高濃度であったことも関連する。また、このことより ISDN の全血凝集抑制効果には、血小板だけではなく、白血球が重要な役割を果たしていると思われた。

結 語

冠動脈疾患患者に対し、冠動脈造影時、ISDN 投与により全血凝集は有意に抑制され、この作用は NO 生成を介したものであることが明らかとなった。また、この時の血中濃度 (10^{-7} mol) に相当する ISDN を *in vitro* で全血に添加することにより、凝集抑制が認められた。更に ISDN により c-GMP 上昇が認められ、これら ISDN の効果は NO 阻害薬の添加により消失した。一

方, 反応系に白血球系細胞を含まない場合, ISDN の効果を認めなかった。これらの成績より, ISDN によ

る全血凝集抑制には, 白血球を介した NO の関与が重要であると想定された。

要 約

Isosorbide dinitrate (ISDN) が血小板凝集を抑制するとの報告があり, この効果は一酸化窒素 (NO) に関係するといわれている。我々は冠動脈造影時の ISDN 投与前後における全血凝集の変化をインピーダンス凝集計を用いて観察するとともに, *in vitro* における ISDN の効果を検討した。

対象は急性心筋梗塞 16 例, 狭心症 4 例で, 慢性期における冠動脈造影を施行した例である。

ISDN 投与後の全血凝集は, 投与前と比較して有意に抑制された (36.1 ± 8.3 vs $43.7 \pm 8.4 \Omega$, $p < 0.001$)。c-GMP 濃度は, ISDN 投与前 (5.14 ± 1.86 p mol/ml) と比較し, 投与後 (5.56 ± 2.0 p mol/ml) では有意に増加を認めた ($p < 0.05$)。 *in vitro* の ISDN 添加においても全血凝集は抑制され, その濃度は臨床症例で凝集抑制が認められた血中濃度 (10^{-7} mol 以上) に相当した。臨床症例および *in vitro* の検討において, methylene blue あるいは N^G -monomethyl-L-arginine monoacetate を添加すると, ISDN の全血凝集抑制効果は阻害された。また, *in vitro* での ISDN 添加時の血小板と白血球の浮遊血漿での c-GMP 濃度は, 対照群と比較し, 有意な増加を認めた (1.93 ± 0.5 vs 1.77 ± 0.42 p mol/ml, $p < 0.05$) が, 多血小板血漿では有意差を認めなかった。

以上より, ISDN には全血凝集抑制効果があり, この反応には白血球を介した NO 生成が関与していると想定された。

J Cardiol 1997; 29: 195-201

文 献

- Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA: Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; **218**: 739-749
- Sinzinger H, Virgolini I, O'Gray J, Rauscha F, Fitscha P: Modification of platelet function by isosorbide dinitrate in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 1992; **65**: 323-335
- Martonra PA: Comparison of the effects of molsidomine, nitroglycerin and isosorbide dinitrate on experimentally induced coronary artery thrombosis in the dog. *Basic Res Cardiol* 1984; **79**: 503-512
- De Caterina R, Lombardi M, Bernini W, Mazzone A, Giannessi D, Moscarelli E, Weiss M, Lazzarini G: Inhibition of platelet function during in vivo infusion of isosorbide mononitrates: Relationship between plasma drug concentration and hemodynamic effects. *Am Heart J* 1992; **119**: 855-862
- Martin W, Villiani MG, Jothianandan D, Furchgott FR: Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; **232**: 708-716
- Cardinal CD, Flower JR: The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1980; **3**: 135-158
- 杉山 正, 安田公夫, 古沢玉彦, 吉岡史郎, 山添喜久雄, 今枝憲重, 水上勇三: Isosorbide dinitrate に関する研究 (第一報): キャピラリーカラムを用いたガスクロマトグラフィーによる isosorbide dinitrate の血中濃度測定法。 *薬誌* 1986; **106**: 1017-1020
- Honma M, Satoh T, Takezawa J, Ui M: An ultrasensitive method for cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochem Mol Med* 1977; **18**: 257-273
- Goretski J, Hollocher TC: Trapping of nitric oxide production during denitrication by extracellular hemoglobin. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2316-2323
- Rackley CE: Role of isosorbide dinitrate in patients with unstable angina pectoris. *Am Heart J* 1985; **110**: 269-272
- Parmley WW: Role of isosorbide dinitrate in management of chronic congestive heart failure. *Am Heart J* 1985; **110**: 264-268
- Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA: Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1987; **90**: 687-692
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327**: 524-526
- Doni MG, Whittle BJR, Palmer RMJ, Moncada S: Action of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture. *Eur J Pharmacol* 1988; **151**: 19-25
- Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ: Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-

- monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 1981; **57** : 946–955
- 16) Salvemini D, De Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR : Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86** : 6328–6332
- 17) Faint RW, Mackie IJ, Machin SJ : Platelet aggregation is inhibited by a nitric oxide-like factor released from human neutrophils in vitro. *Br J Haematol* 1991; **77** : 539–545
- 18) Patric P, Jules YTL, Lucie L, Yahye M, David W : Endothelium-derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; **14** : 331–335
- 19) De Caterina R, Giannesi D, Crea F, Chierchia S, Bernini W, Gazzetti P, L'Abbate A : Inhibition of platelet function by injectable isosorbide dinitrate. *Am J Cardiol* 1984; **53** : 1683–1687
- 20) Johnstone MT, Lam JYT, Lacoste L, Baribeau J, Thérroux P, Waters D : Methylene blue inhibits the antithrombotic effect of nitroglycerin. *J Am Coll Cardiol* 1993; **21** : 255–259
- 21) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; **43** : 109–142
- 22) Lehmann K, Groscurth P, Vollenweider I, Von Felten A, Rhyner K : Morphologic alterations of blood cells in the impedance aggregometer. *Blood Cells Mol Dis* 1985; **11** : 325–336
- 23) Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S : An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87** : 5193–5197