

ADP惹起ウサギを用いたミズ乾燥粉末の血小板凝集能測定試験

武庫川女子大学 薬学部薬理学第一研究室
高橋雄太, 木元容子

試験目的

ミズ乾燥粉末は線溶系の活性作用を有することで、日本のみならず世界でサプリメント素材として流通している。その利用者の多くは、凝固能が亢進していたり、血圧や血糖値が高い患者が多く、様々な医薬品を併用していると推測される。そこで、本試験は、これまでに明らかにされていないミズ乾燥粉末と抗血小板凝集薬との併用時の安全性についての指標を得るべく、ADP惹起ウサギを用い、血小板に対するミズ乾燥粉末の影響測定試験を実施した。

試験概要

- ①試験実施場所 武庫川女子大学薬学部薬理第一教室（試験担当者：高橋雄太、木元容子）
②試験試料 ミズ乾燥粉末（ワキ製薬株式会社より提供）
③試験方法 3.2%クエン酸2mLに対して、ウサギの耳介静脈より血液を18mL採血する
④被験動物 日本白色ウサギ

被験 No.	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11
体重	3.45kg	3.55kg	3.50kg	3.50kg	3.45kg	3.40kg	3.35kg	3.55kg	3.05kg	3.35kg	3.15kg

⑤多血小板血漿と欠血小板血漿の調整

得られた血漿を室温、200xgにて10分間遠心分離を行い上清を分摂。これを多血小板血漿（PRP）とする。さらに残渣を室温、1600xgにて10分間遠心分離を行い上清を分摂。これを欠血小板血漿（PPP）とする。

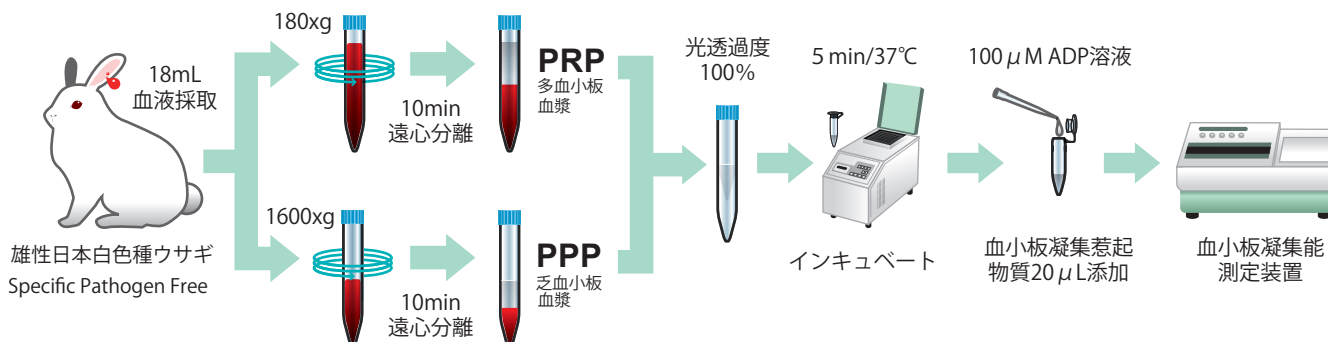
⑥測定器及び原理

Platelet Aggregation Analyzer（東京光電製）を用い、PPPの透過光を100%、PRPの透過光を0%とし、凝集惹起物質を添加後、PRPにおける透過光を10分間測定する。その結果を基に、血小板凝集率曲線を表示し最大凝集率及び凝集曲線下面積を自動的に測定する。

⑦測定

右表の通り、CaCl₂溶液、試薬溶液、PRPを測定用キュベット（スターラー入）に添加し、装置にセットする。装置の設定通りに、37°Cで穏やかに攪拌し5分間放置する。その後、血小板惹起物質として100/ μ M濃度のADP溶液20 μ Lを添加し、血小板凝集能を測定する。

・ 試薬単独		・ 試薬併用	
200mM CaCl ₂ 溶液	2 μ L	200mM CaCl ₂ 溶液	2 μ L
	(最終濃度2mM)	試薬溶液A or 溶媒	2 μ L
試薬溶液 or 溶媒	2 μ L	試薬溶液B or 溶媒	2 μ L
PRP	196 μ L	PRP	194 μ L
全量	200 μ L	全量	200 μ L

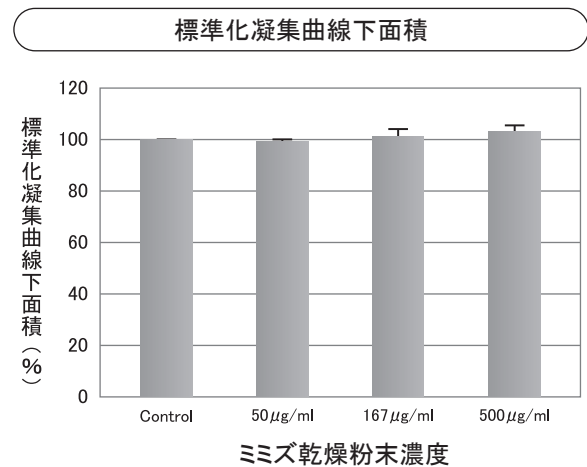
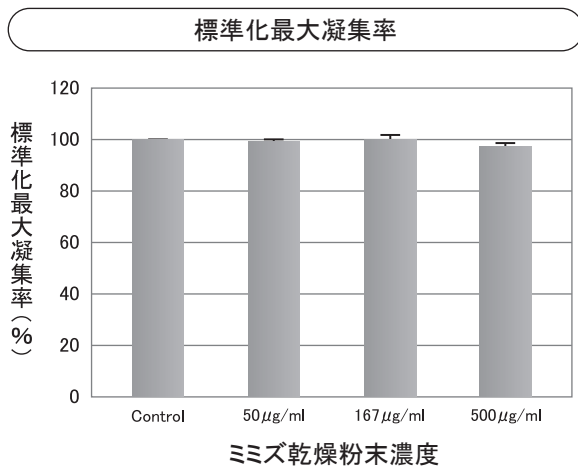


試験結果①(ADP惹起ウサギ血小板凝集に及ぼすミズ乾燥粉末単独投与の影響)

ミズ乾燥粉末の1日最大摂取量である240mgを、体重60kgの一般成人が一度に摂取し、血液中に全量が分散した場合の血中濃度を50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と仮定した。実験動物とヒトとの細胞感受性の差を考慮し、最大濃度を10倍に設定し実験を行った結果、ADP 惹起ウサギ血小板に対して影響を及ぼさないことが明らかとなった。

最大凝集率				
	Control	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	167 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	67.6	68.1	67.1	66.9
	65.9	65.5	67.4	64.6
	76.6	75.5	76.5	74.8
Mean	70.0	69.7	70.3	68.8
SD	5.8	5.2	5.3	5.4
SE	3.3	3.0	3.1	3.1

凝集曲線下面積				
	Control	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	167 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	22000	21611	21212	23116
	25679	26275	27287	27020
	38202	37486	38410	38086
Mean	28627	28457	28970	29407
SD	8494	8159	8722	7766
SE	4904	4711	5035	4484



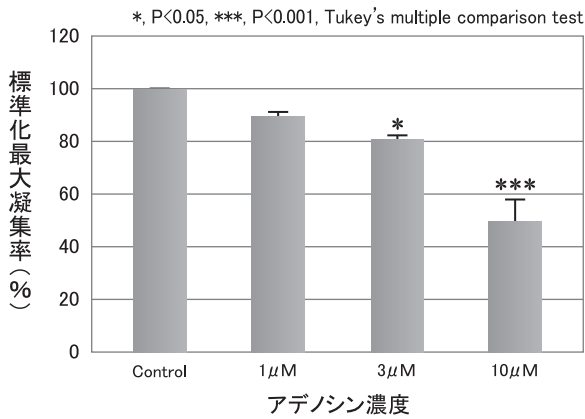
試験結果②(ADP惹起ウサギ血小板凝集に及ぼすアデノシン単独投与の影響)

アデノシン1 μM , 3 μM 及び10 μM がADP惹起ウサギ血小板凝集に及ぼす影響を検討した。アデノシンは、血小板凝集を濃度依存的に抑制し、最大凝集率では3 μM 以上、凝集曲線下面積では10 μM の濃度において、有意な結晶板行政抑制作用を示すことが確認された。

最大凝集率				
	Control	1 μM	3 μM	10 μM
	64.5	59.5	52.3	37.4
	50.2	44.8	41.3	19.5
	59.8	52.9	48.0	34.7
Mean	58.1	52.4	47.2	30.5
SD	7.3	7.4	5.6	9.7
SE	4.2	4.3	3.2	5.6

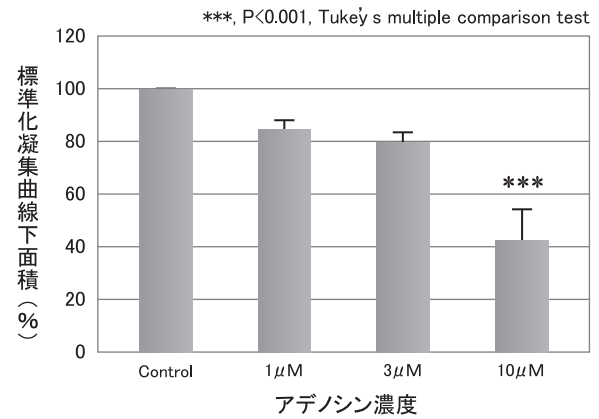
凝集曲線下面積				
	Control	1 μM	3 μM	10 μM
	32777	30549	26687	18460
	22047	18960	18759	5217
	29589	24953	22229	14160
Mean	28138	24820	22559	12612
SD	5510	5796	3974	6756
SE	3181	3346	2295	3900

標準化最大凝集率



	Control	1 μ M	3 μ M	10 μ M
	100	92.3	81.2	57.9
	100	89.7	82.3	39.3
	100	88.2	80.0	57.6
Mean	100	90.1	81.2	51.6
SD	0	2.1	1.1	10.7
SE	0	1.2	0.7	6.2

標準化凝集曲線下面積



	Control	1 μ M	3 μ M	10 μ M
	100	93.1	81.4	56.2
	100	86.3	84.2	23.9
	100	83.9	74.9	47.4
Mean	100	87.8	80.1	42.5
SD	0	4.8	5.0	16.7
SE	0	2.8	3.0	9.6

試験結果③(ADP惹起ウサギ血小板凝集に及ぼすミズ乾燥粉末とアデノシン併用投与の影響)

アデノシン1 μMおよびミズ乾燥粉末50 μg/mLを単独投与ならびに併用した場合のADP惹起ウサギ血小板凝集に及ぼす影響を検討した。アデノシン1 μMおよびミズ乾燥粉末50 μg/mLを併用した場合は、ADP惹起ウサギ血小板凝集に対して有意な影響を及ぼさなかった。

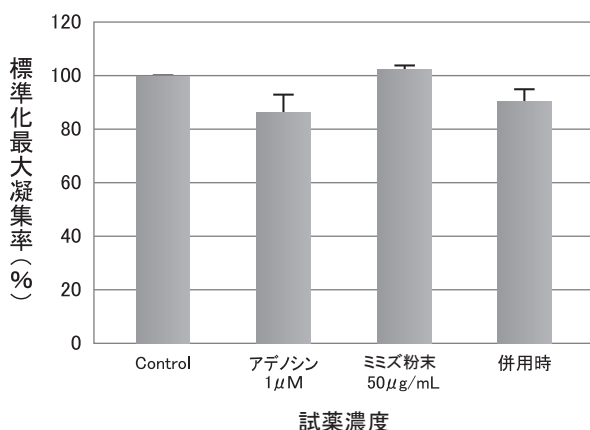
最大凝集率

	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 50 μ g/mL	併用時
	66.3	61.3	67.0	60.2
	58.0	58.2	59.2	55.8
	56.2	41.2	57.1	42.3
	70.9	69.2	73.8	71.8
	44.3	36.6	48.5	40.5
Mean	59.1	53.3	61.1	54.1
SD	10.3	13.8	9.7	13.0
SE	4.6	6.2	4.3	5.8

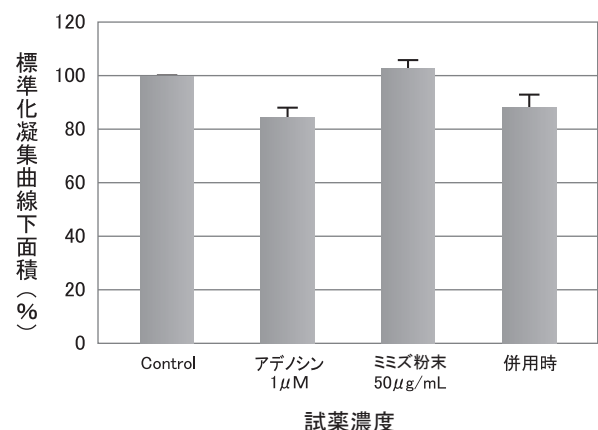
凝集曲線下面積

	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 50 μ g/mL	併用時
	29189	25906	28810	23646
	25649	25560	26220	24252
	26410	16548	26608	17572
	35744	34269	37138	36285
	19745	15443	22668	18256
Mean	27347	23545	28289	24002
SD	5819	7734	5415	7507
SE	2602	3459	2422	3357

標準化最大凝集率



標準化凝集曲線下面積



	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 50 μ g/mL	併用時
	100	93.0	101.0	90.8
	100	100	102.0	96.1
	100	74.0	102.0	75.9
	100	97.5	104.0	101.0
	100	83.5	110.0	91.9
Mean	100	89.7	104.0	91.2
SD	0	10.8	4.0	9.5
SE	0	4.9	2.0	4.2

	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 50 μ g/mL	併用時
	100	88.2	98.8	80.0
	100	100.0	102.0	95.0
	100	64.4	102.0	67.0
	100	95.9	104.0	102.0
	100	80.0	117.0	94.0
Mean	100	85.7	105.0	87.5
SD	0	14.2	7.0	13.9
SE	0	6.3	3.0	6.2

試験結果④ (ADP惹起ウサギ血小板凝集に及ぼすミズ乾燥粉末10日量とアデノシン併用投与の影響)

アデノシン1 μ Mおよびミズ乾燥粉末500 μ g/mLを単独投与ならびに併用した場合のADP惹起ウサギ血小板凝集に及ぼす影響を検討した。アデノシン1 μ Mおよびミズ乾燥粉末500 μ g/mLを併用した場合は、ADP惹起ウサギ血小板凝集に対して有意な影響を及ぼさなかった。

最大凝集率

<最大凝集率>

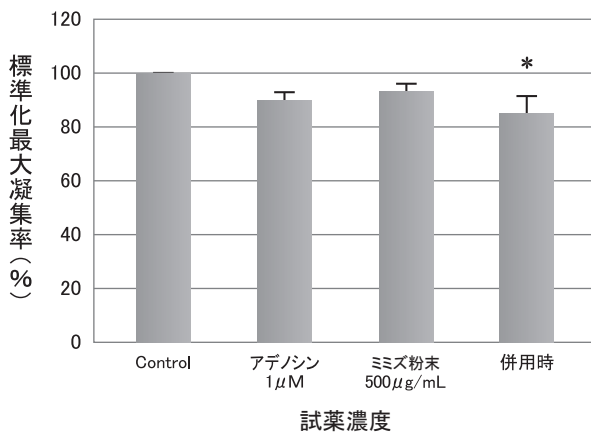
	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 500 μ g/mL	併用時
	72.4	57.5	58.3	48.3
	57.1	55.4	55.4	48.4
	74.1	71.5	72.8	70.5
	68.8	65.9	64.3	58.7
	58.4	51.4	58.2	56.2
Mean	66.2	60.3	61.8	56.4
SD	7.9	8.2	7.0	9.1
SE	3.5	3.7	3.1	4.1

凝集曲線下面積

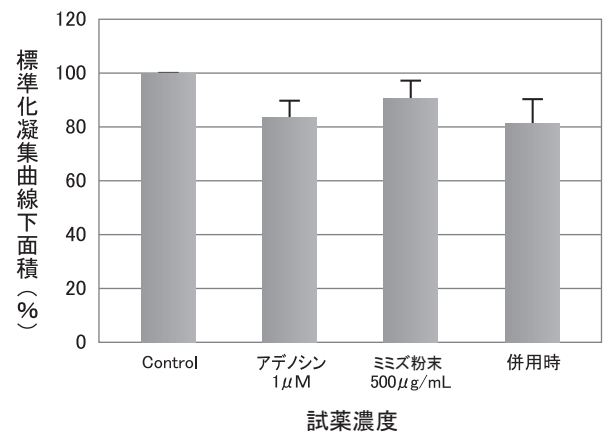
<凝集曲線下面積>

	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 500 μ g/mL	併用時
	29531	15902	18197	13024
	19181	16152	18363	15000
	36938	35296	36629	35632
	32430	31050	30407	27666
	26072	21335	26011	27152
Mean	28830	23947	25921	23695
SD	6706	8826	7931	9483
SE	2999	3947	3547	4241

標準化最大凝集率



標準化凝集曲線下面積



<標準化最大凝集率>

	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 500 μ g/mL	併用時
	100	81.0	81.0	67.3
	100	97.1	97.0	84.7
	100	96.4	98.2	95.0
	100	95.9	93.5	85.4
	100	88.5	100.0	94.9
Mean	100	91.8	94.0	85.5
SD	0	7.0	7.6	11.3
SE	0	3.1	3.4	5.1

<標準化凝集曲線下面積>

	Control	アデノシン 1 μ M	ミズ粉末 500 μ g/mL	併用時
	100	57.0	63.0	46.0
	100	84.2	95.7	78.2
	100	95.5	99.2	96.5
	100	95.9	93.8	85.4
	100	82.0	100.0	102.0
Mean	100	82.9	90.3	81.6
SD	0	15.8	15.0	22.0
SE	0	7.1	7.0	9.8

終わりに

ミミズ乾燥粉末の in vivo 試験について検討した結果、ミミズ乾燥粉末が未変化のまま、全て血中に移行すると仮定した十分量の in vitro 試験において、血小板凝集能に影響が見られないことが明らかになった。今回の in vitro 試験によって、in vivo 試験にて経口投与した場合も影響はないであろうと予想される。従って in vivo 試験は、実施の必要なしと結論付けた。

追記

アデノシンを実験に使用した理由について、アデノシンは生体内に存在する強力な血小板凝集抑制物質であり、臨床的には血液中アデノシンの赤血球、血管壁への再取込み抑制作用により血液中アデノシン濃度を上昇させ、血小板のアデニル酸シクラーゼ活性を増強し、血小板内cAMPの合成を促進するジピリダモール（商品名ペルサンチン）が抗血小板薬として使用されている。今回の in vitro における実験データは、生体内におけるジピリダモールとミミズ乾燥粉末との併用効果を反映するものと考えられることからアデノシンを用いた。

ADP惹起ウサギ血小板凝集とは、ウサギ血小板懸濁液にアデノシン二リン酸（ADP）を添加することによって惹起させたウサギの血小板凝集を指す。実験的に血小板凝集を惹起させるため、血小板凝集惹起物質の添加が不可欠であった。一般的にはADPの他に、トロンピンやコラーゲンも用いるが、今回は、ADPを採用した。

今回、実施したアデノシンおよびミミズ乾燥粉末の血小板凝集に及ぼす効果を判定する指標として、「血小板の最大凝集率」と「血小板凝集曲線下面積」を用いた。これらの相違点は、前者は、凝集抑制作用の絶対値が重要視されるもので、凝集抑制作用の持続性は反映されないことが特徴である。一方、後者は、凝集抑制作用の絶対値と持続性の両方が反映される指標である。今回の実験結果は、ミミズ乾燥粉末500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が「血小板の最大凝集率」を指標とした場合のみ、アデノシンの血小板凝集抑制作用を統計学的に有意に増強したことを示唆している。また、同じ用量でも「血小板凝集曲線下面積」を指標とした場合、効果は認められなかった。但し、ミミズ乾燥粉末500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、体重60kgの成人がミミズ乾燥粉末の1日摂取量である240mgを一度に服用し、なおかつ、未変化体のまま100%吸収されて血中に移行したことを想定した濃度（50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）よりさらに10倍濃い濃度であることと、統計学的に有意差が認められたものの、その差は極めて小さく、おそらく、実験データのバラツキが小さかったことが原因であると考えられる（実験データのバラツキ、すなわち、標準偏差が小さいほど有意差が付きやすいため）。結論として、ミミズ乾燥粉末の常用量は、ジピリダモールのような血中アデノシン濃度を上昇させる抗血小板薬と併用しても、患者の血小板凝集に影響を及ぼさないものと予想される。

武庫川女子大学薬学部薬理学第一研究室 高橋 雄太