

デクスメドミジンは α_2 アドレナリン受容体を介してヒト血小板由来マイクロパーティクル産生を増加させる

川本 修司 福田 和彦

目 的

選択的 α_2 アドレナリン受容体作動薬であるデクスメドミジン (dexmedetomidine, DEX) は、鎮静作用、鎮痛作用、抗不安作用などの薬理作用を示し、集中治療領域における患者の鎮静に幅広く用いられている¹⁾。しかし、臨床においてDEXが血小板機能へ影響することを示唆した報告は少なく、一貫した結論は未だ得られていない。ヒト血小板には α_2 アドレナリン受容体とイミダゾリン I_1 および I_2 受容体が存在し、DEXはこれらの受容体に対する親和性を有する^{2),3)}。これまで我々はDEXがヒト血小板に対して2つの異なる作用、すなわち α_2 アドレナリン受容体を介してcyclic adenosine monophosphate (cAMP) 産生を低下させることによる血小板機能増強作用と、イミダゾリン I_1 受容体を介してcyclic guanosine monophosphate (cGMP) 産生を増加させることによる血小板機能抑制作用を有し、DEXを長期大量投与する場合には、血小板に対する作用を考慮する必要があることを報告した⁴⁾。ヒト血小板由来マイクロパーティクル (platelet-derived microparticle, PMP) はプロコアグラント活性と強力な炎症促進作用を有する重要な機能粒子であり、止血作用だけでなく血栓症の病因となる動脈硬化病変の形成にも関連していることが報告されているが、DEXなどの鎮静薬がPMPに与える影響は不明である。今回、フローサイトメトリーを用いてPMP産生に対するDEXの作用を検討した。

方 法

本研究の施行に際し、京都大学医学部附属病院医の倫理委員会より承認を得た。2週間以上薬を服用していない同意を得た健康成人男性5名より、血小板を活

性化させないように注意しながら静脈血20 mLを採取して、3.8%クエン酸を10%ボリウム添加のうえ、160 gで10分間遠心し、上澄みを多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) として用いた。PRPをphosphate-buffered saline (PBS) で10倍に希釈し、DEX (1, 10, 100 ng/mL) および、選択的 α_2 アドレナリン受容体拮抗薬ヨヒンビン (yohimbine, YH) 10 μ Mを添加し30分室温に置いた。その後、1%ホルムアルデヒドを添加し、4℃で1時間固定、さらにPBSで2回洗浄を行った。次に、活性化非依存性の血小板・PMPに対する特異マーカーであるCD61、およびPMPに発現しているとされるAnnexin VをターゲットとしたPerCP (peridinin-chlorophyll protein complex) 標識抗CD61抗体、PE (phycoerythrin) 標識抗Annexin V抗体を加えて室温で1時間インキュベートした。PBSを添加し反応を停止させ、フローサイトメトリーによる測定を行った。まず前方、散乱光パターンによるゲーティングを行い、PerCP標識抗CD61抗体陽性集団のうち、PE標識抗Annexin V抗体陽性集団をPMP、陰性集団を血小板として同定し、血小板10,000個あたりのPMP生成数を測定して割合を比較した。統計解析にはprism 5.0 (GraphPad) を用い、群間の比較にはone-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用いた。Bonferroni検定により有意水準は5%未満とした。

結 果

対照群に対してDEX (10, 100 ng/mL) 群では有意にPMP産生が増加した。DEX 10 ng/mL群とDEX 100 ng/mL群間にも有意差を認め、その作用は濃度依存性に増強した。DEX 100 ng/mL群とDEX 100 ng/mL + YH群の間にも有意差を認め、PMP産生増加作

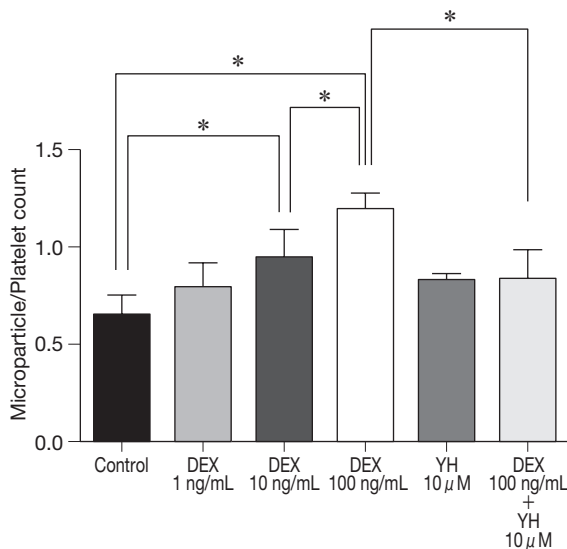


Fig. 1 Effect of dexmedetomidine (DEX; 1, 10, 100 ng/mL) on platelet-derived microparticle formation in platelets

Experiments were performed in the presence and absence of yohimbine (YH; 10 μM). The data are expressed as mean ± S.D. (n = 5).

* : $P < 0.05$. DEX enhanced platelet-derived microparticles formation in a dose-dependent and yohimbine-sensitive manner.

用はYH存在下で拮抗された (Fig. 1)。

考 察

PMPは血小板の活性化顆粒内容物の一部が血小板膜にくるまれたまま、ちぎれてできた膜小胞体である。血栓形成においてPMPはプロテインCや凝固因子に作用して凝固反応を促進するとされているが、最近の研究成果では糖尿病、急性心筋梗塞、脳血栓、抗リン脂質抗体症候群などでPMPが増加し、その機能は多岐にわたることが判明している⁵⁾。さらに、敗血症など、全身性炎症反応症候群においてもPMPは増加し、全身に散布されて重篤な炎症応答やサイトカインストームの促進作用を持つことが示されている⁶⁾。PMPはplatelet-activating factor (PAF)を豊富に含み、血小板、単球、血管内皮細胞と接着して存在することも示されており、PMPが他細胞の活性化因子になる可能性が考えられている⁷⁾。実際、活性化された血小板から産生されたPMPが血管内皮細胞を活性化してCD54やCD63など接着因子の発現を増強させると同時に、IL (interleukin) -1β, IL-6, IL-8など炎症性サイトカインを産生させることが示されている⁸⁾。また、PMPは、血栓症や血管病変の新しいマーカーとなると同時に、新たな抗血栓薬のターゲットとしても期待されているが、周術期関連因子のPMPに対す

る作用はよくわかっていない。

本研究は、DEXが*in vitro*においてα₂アドレナリン受容体を介してPMP産生を増加させることを初めて示したものであり、その結果はDEXがα₂アドレナリン受容体を介して血小板機能亢進作用を有しているというこれまでの我々の研究結果を補うものである。抗炎症作用も持つとされるDEXが、血小板を介してはむしろ炎症を惹起する可能性を示している。今回PMP産生増加を起こしたDEXの濃度は、臨床使用濃度 (<1 ng/mL) の約10倍という高濃度であり、通常の使用ではまず生じえない。しかし重篤な肝不全の患者や、context sensitive half-timeの延長した高齢者や低アルブミン血症の患者では生じうる濃度であるため⁹⁾、実際の臨床においてもPMP産生に影響を与える可能性はある。今後、PMPが上昇しているとされる種々の血栓性疾患患者や、凝固系が亢進しているICU重症患者の管理において、鎮静薬をはじめとする種々の薬剤によるPMP産生への影響と血栓形成や炎症促進作用との相互関係を解明することは、血栓傾向を呈する重症患者に対する、より慎重な薬剤の選択により、患者予後に影響を及ぼす可能性がある。フローサイトメトリーは、2つ以上の抗原を同時に測定でき、PMP測定における標準的方法とされている。しかし、測定できるPMPの大きさは500 nmが限界であり、PMPの中でも特に400~500 nm以下のものに対する作用は本実験では不明であるため、さらなる詳細な測定方法の開発も必要である。

結 論

DEXは*in vitro*においてα₂アドレナリン受容体を介してPMP産生を増加させる。

本論文の主旨は第44回日本集中治療医学会学術集会 (2017年、札幌) において発表した。

本稿の全ての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Kamibayashi T, Maze M. Clinical uses of alpha2 -adrenergic agonists. *Anesthesiology* 2000;93:1345-9.
- 2) Michel MC, Regan JW, Gerhardt MA, et al. Nonadrenergic [3H] idazoxan binding sites are physically distinct from alpha2-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 1990;37:65-8.
- 3) Piletz JE, Sletten K. Nonadrenergic imidazoline binding sites on human platelets. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;267: 1493-502.
- 4) Kawamoto S, Hirakata H, Sugita N, et al. Bidirectional effects of dexmedetomidine on human platelet functions

- in vitro. Eur J Pharmacol 2015;766:122-8.
- 5) Italiano JE Jr, Mairuhu AT, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. Curr Opin Hematol 2010;17:578-84.
 - 6) Barry OP, Praticò D, Savani RC, et al. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. J Clin Invest 1998;102:136-44.
 - 7) Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, et al. Platelet microparticles: a carrier of platelet-activating factor?. Biochem Biophys Res Commun 1996;218:940-4.
 - 8) Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, et al. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. Atherosclerosis 2001;158:277-87.
 - 9) Iirola T, Ihmsen H, Laitio R, et al. Population pharmacokinetics of dexmedetomidine during long-term sedation in intensive care patients. Br J Anaesth 2012;108:460-8.

Abstract

Dexmedetomidine increases human platelet-derived microparticles via the α_2 -adrenoceptor

Shuji Kawamoto, Kazuhiko Fukuda

Department of Anesthesia, Kyoto University Hospital

54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8507, Japan

Background: Dexmedetomidine (DEX) is a potent and highly selective agonist of the α_2 -adrenoceptor. Recent studies suggested that platelet-derived microparticles (PMPs) have procoagulant activity that was released from activated platelet membranes and might be involved in thrombogenesis. In the present study, we examined the effects of DEX on PMP generation in human platelets by flow cytometry. **Methods:** Platelet rich plasma was prepared from healthy male volunteers who had not taken any medication for at least for two weeks before blood collection. The platelet rich plasma was placed at room temperature for 30 min with or without DEX (1, 10, 100 ng/mL) without any stimulant ligands in the presence or absence of yohimbine (10 μ M), an α_2 -antagonist. PMPs were identified using flow cytometry by forward and side scatter intensity and by CD61 and Annexin V expression, and the percentage of PMP counts in platelets was calculated. All data were compared with one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's *post hoc* test. A *P* value less than 0.05 indicates statistical significance. **Result:** DEX (10, 100 ng/mL) increased PMP generation in a dose-dependent manner, and this effect was abolished by yohimbine. **Discussion:** Previously we reported that DEX has both enhancing and suppressing effects on human platelet functions *via* the α_2 -adrenoceptor and imidazoline 1-receptor, respectively. Although DEX enhanced platelet aggregation and P-selectin expression, its effects on PMP generation have not been examined. In this study, we found that DEX promoted PMP generation, and this response was abolished by yohimbine, indicating that DEX increases PMP generation *via* the α_2 -adrenoceptor. Although our study was performed *in vitro*, and the concentration of DEX that affected PMP generation was apparently higher than the usual therapeutic concentration range (<1 ng/mL), the elevated PMP counts induced by DEX may be responsible for the thrombotic tendency. **Conclusion:** DEX increases PMP generation *via* the α_2 -adrenoceptor in human platelets.

Key words: ①platelet, ②dexmedetomidine, ③platelet-derived microparticle

J Jpn Soc Intensive Care Med 2018;25:457-9.