

氏名(本籍) 佐々木 靖彦

学位の種類 薬学博士

学位記番号 薬第 309 号

学位授与年月日 平成 2 年 11 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 デノパミンの強心作用機構の研究

(主査)

論文審査委員 教授 佐藤 進 教授 鈴木 康男

教授 大泉 康

論文内容要旨

デノパミン ((-)-(R)-1-(p-hydroxyphenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenethyl)amino]ethanol, den) は、新しく開発された経口強心薬である。従来、経口強心薬としてはジギタリスが主に用いられて来たが、強心作用と不整脈などの副作用との開きが小さい為、臨床上用量設定が難しく問題があった。一方、ドーパミンやドブタミン等のカテコールアミンも強心薬として用いられているが、いずれも静脈内投与でしか有効でない。それに対して、den は血圧に影響する事なしに持続的な強心作用を発現し、しかも心拍数や心筋酸素消費増加作用が弱く、さらには不整脈誘発作用が極めて弱い強心薬である。しかも、薬効量で耐性が発現しないといった特徴もある。

これらの薬理学的特徴には、den の極めて高い β_1 選択性と partial agonist 的性質が関与しているものと思われる。そこでこれら薬理作用機構の解明を目的として生化学的検討を行った。

1. 薬理学的検討

灌流ウサギ心臓標品に den を $100 \mu\text{g}$ (灌流液中での終濃度: 400 ng/ml , $1.3 \times 10^{-6} \text{ M}$) を作用させると顕著な強心作用 ($dP/dt \text{ max}$ の増加) を示し、この作用はプロプラノロール ($15 \times 10^{-6} \text{ M}$) で完全に抑制された (1)。この事は、den が β -受容体作動薬である事を示唆している。

更に、ペントバルビタール ($8 \sim 16 \times 10^{-4} \text{ M}$) を作用させるか、あるいは前負荷-後負荷を繰り返す事によって収縮力を約75%まで減少させた不全心臓でも、den は $3.17 \mu\text{g}$ (灌流液中での終濃度: 13 ng/ml , $4 \times 10^{-8} \text{ M}$) 以上で心収縮性を元のレベルに回復させた (1)。

一方、犬の灌流心臓標品を用いて虚血-再灌流処置で $dP/dt \text{ max}$ を元の約40%減少させた不全心臓に対しても、den は $317 \mu\text{g}$ (灌流液中での終濃度: 264 ng/ml , $8.3 \times 10^{-7} \text{ M}$) で、 $dP/dt \text{ max}$ をほぼ元のレベルに回復させた (3)。

又、ランゲンドルフ法で灌流したモルモット心臓標品を用いた実験では、den ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$) による強心作用 ($dP/dt \text{ max}$, 心収縮力) がイソプロテレノール (iso, 10^{-7} M) と同じ時、den は iso と比べて心拍数の増加が少なく、しかも陽性弛緩促進作用が弱かった (5)。

2. 生化学的検討

犬の灌流心臓標品を用いて虚血-再灌流処置で $dP/dt \text{ max}$ を元の約40%減少させた不全心臓に、den を $317 \mu\text{g}$ ($8 \times 10^{-7} \text{ M}$) させた後、心筋細胞膜である sarcolemmal vesicles (SL) を調製し、SL 機能 [ATP 依存性 Ca^{2+} -取り込み能, アデニレートサイクラーゼ活性 (AC 活性), SL 蛋白へのリン酸化能] と SL の総蛋白量 (蛋白収量) に及ぼす影響をみた。その結果、虚血-再

灌流処置の不全心臓から調製したSLでは、SL機能とSLの総蛋白量の低下が見られた(2, 3)。しかし、denを作用する事によって、低下したdP/dt maxの回復と共にSL機能及びSLの蛋白収量が、いずれもほぼ元のレベルへ回復した(3, 4)。denによってSL機能及びSL蛋白の収量が改善したのは、denがdP/dt maxを改善した為と考えられるが、他方、denによるSL機能の改善効果が薬理的改善効果を導いたとも考えられる。

一方、正常犬の心臓から調製したSLを用いて、in vitroでdenのAC活性化に対する作用を見たところ、isoは最大で約56%の活性化作用を示したのに対し、denは最大約14%と僅かな作用しか示さなかった(2, 3)。この事は、denがpartial agonist的性質のある事を示唆している。

ところで、 β -受容体作動薬による強心作用の発現には、心筋内のcAMPレベルの増加とcAMP-依存性プロテインキナーゼ(cAMP-PK)の活性化が密接に関係していると言われている。そこで、den(3×10^{-6} M)による心筋cAMP増加作用を、灌流モルモット心臓標本を用いて、強心作用が同じiso(10^{-7} M)と比べた結果、心筋ホモジネート及びそれを遠心分離(100,000xg, 10min)して得た沈澱画分でのcAMPレベルは、isoに比べてdenでは有意に低かった(5, 6)。しかし、心筋ホモジネートの遠心分離上清をLi₂SO₄塩析(20~84%)して得た沈澱画分では、denによるcAMP増加作用はisoによるそれとほぼ同程度であった(6)。この結果は、この画分に於けるcAMPの増加が強心作用の発現と関連している事を示唆している。

一方、Li₂SO₄塩析後の上清画分に於ては、isoで顕著なcAMPレベルの増加が見られたのに対して、denでは僅かであった(6)。又、心筋ホモジネート上清に於けるcAMP-PK活性について、den(3×10^{-6} M)と強心作用が同じiso(10^{-7} M)とを比べたところ、isoに比べてdenの方が低かった(6)。

β -受容体作動薬による耐性発現の機作は、 β -受容体がリン酸化される為で、それにはcAMP-PKによるリン酸化を介したheterologous desensitization(異型脱感作)と、cAMP非依存性 β -受容体キナーゼ(β -ARK)によるリン酸化を介したhomologous desensitization(相同性脱感作)があるとされている。そして、 β -ARKによる β -受容体のリン酸化作用は、ACの活性化作用と非常に良く相関していると言われている。ところで、denによる心筋ホモジネートでのcAMP増加作用が、強心作用が同じisoに比べて低く、しかもcAMP-PKの活性化作用もisoに比べて低かったと言う上記の結果は、denでは異型脱感作が起り難い事を示唆している。更に、in vitroで、SLでのACの活性化作用がisoに比べてdenで低かった事から、相同性脱感作もisoに比べて起り難い事が示唆される。

又、不整脈誘発作用と心筋内cAMP増加作用との間には、正の相関があるとされている。心筋ホモジネート画分、特に心筋ホモジネートの遠心分離上清をLi₂SO₄塩析(20~84%)して得た上清画分でのcAMPの増加が、isoでは顕著であったのに対しdenでは僅かであった。この事と

denでは不整脈誘発作用が弱い事との間に何らかの関係が有ると思われる。

一方、 ^{32}P -灌流モルモット心筋標品を用いて、強心作用が同じ条件下で、iso (10^{-7}M) と den ($3\times 10^{-6}\text{M}$) による心筋蛋白へのリン酸化反応を見た結果、これらの薬剤で5つの心筋蛋白 (C-蛋白, トロポニン-I, ミオシン軽鎖, SL蛋白, フォスフォランバン) へのリン酸化反応が亢進した。しかし、その中でトロポニン-Iとフォスフォランバンへのリン酸化反応は、iso に比べて den では有意に低かった (5)。トロポニン-Iとフォスフォランバンへのリン酸化反応の亢進は、心筋の弛緩速度と関係すると言われている。陽性弛緩促進作用が、強心作用が同じく iso に比べて den で弱いのは、弛緩と関係する心筋蛋白 (トロポニン-Iとフォスフォランバン) へのリン酸化の程度が den では低い為と考えられる。

ところで、灌流ウサギ心臓標品を用いた正常又は不全心臓モデル (バルビタール誘発あるいは前負荷-後負荷誘発) で、den ($100\mu\text{g}$, 灌流液中での終濃度: 400ng/ml , $1.3\times 10^{-6}\text{M}$) は、強心作用を発現する条件で、高エネルギー磷酸化体 (CP, ATP, ADP) 及び解糖系中間体 (G-6-P, F-6-P, F-1, 6-DP, α -GP, ジヒドロキシアセトン磷酸, ピルビン酸, 乳酸) 量に影響を及ぼさなかった (1)。一方、灌流モルモット心臓標品を用いた実験で、den ($3\times 10^{-6}\text{M}$) によるグリコーゲンフォスホリラーゼの活性化作用を見た結果、iso (10^{-7}M) は顕著な作用を示したのに対して、den では有意な作用ではなかった (6)。グリコーゲンフォスホリラーゼの活性化は、筋肉組織では乳酸の産生増加に結びつく事を考えると、den が強心作用発現時、乳酸量をあまり変動させなかったのは、グリコーゲンフォスホリラーゼの活性化作用が弱かった為と思われる。

以上の結果、den は iso と異なり、強心機能に直結した心筋細胞内のコンパートメント [心筋ホモジネートの遠心分離上清を Li_2SO_4 塩析 (20~84%) して得た沈澱画分] で効率良く cAMP を増加させる事により、強心作用を効果的に発現させ、同時に耐性の発現が少なく、かつ不整脈の誘発作用も弱いという特徴を与える事になると考えられる。

審査結果の要旨

ジギタリスはその強心作用を期待しうっ血性心不全の治療薬として繁用されているが、副作用である重篤な不整脈を惹起する用量との間隔が狭く、臨床使用上の難点となっている。近年、心筋の興奮-収縮連関における重要な知見が集積されるに伴って、ジギタリスに代替し得る新しい強心薬の開発の要望は急速に高まっている。

Denopamine はジギタリスに代替し得る強心薬として、最も早くその開発に成功したものの一つである。本論文は動物実験における denopamine の強心作用について解析したもので、現在臨床的にその有効性が確認されるに至ったものである。

論文要旨は薬理学的および生化学的検討とからなり、以下に概略される。

① Denopamine は各種動物の灌流心臓標本において心収縮力増大作用を有し、実験的心不全における心収縮力減退を改善させることを示した。また、イソプロテレノール (β 受容体作動薬) との比較実験により、denopamine は心拍数の増大作用と陽性弛緩促進作用が比較的軽度な作用をもつ部分的 β 作動薬であるという薬理学的特徴を明確にした。

② イヌ心筋細胞の sarcolemmal vesicle (SL) での SL 機能 (ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み能, アデニレート・サイクラーゼ活性, SL 蛋白へのりん酸化能) と SL 総蛋白量は、心臓灌流標本の虚血-再灌流処置心不全で低下するが、これらの低下効果は denopamine の投与によりいずれも回復される。また、正常イヌ心筋 SL でのアデニレート・サイクラーゼ活性は denopamine により上昇する。

③ 灌流モルモット心臓ホモジネート各分画の cyclic AMP レベルは denopamine によって上昇するが、他の各分画と異なり、遠心分離上清の Li_2SO_4 塩析沈澱分画における cyclic AMP 上昇作用は isoproterenol と同等である。これらの結果から denopamine の強心作用と密接に関連する cyclic AMP 上昇作用を惹起する心筋細胞内のコンパートメントの存在を示唆した。

④ Denopamine は灌流モルモット心筋標本での心筋蛋白のりん酸化反応を亢進することを示した。また、トロポニン-I とフォスフォランパンへのりん酸化反応の亢進作用は isoproterenol に比し低活性であることを示し、denopamine の軽度の陽性弛緩促進作用との関連性を示した。

本研究論文で得られた知見は、denopamine の臨床使用上に有用な情報を提供するばかりでなく、心筋収縮における cyclic AMP-Ca 動態に関する新知見を含んでいる。

以上、本研究内容は学位論文として価値あるものと判断する。