

氏 名（本籍） 橋 本 博 雄

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 2 4 8 6 号

学位授与年月日 平 成 5 年 2 月 2 4 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 4 8 年 3 月 2 7 日
東北大学医学部薬学科卒業

学位論文題目 Differential antagonism of the negative inotropic effect of gentamicin by calcium ions, Bay K 8644 and isoprenaline in canine ventricular muscle : comparison with cobalt ions.
(イヌ心室筋におけるゲンタマイシンの陰性変力作用に対するカルシウムイオン、Bay K 8644 およびイソプレナリンの性格の異なる拮抗作用：コバルトイオンとの比較)

(主 査)

論文審査委員 教授 平 則 夫 教授 西 山 明 徳

教授 白 土 邦 男

論文内容要旨

アミノグリコシド系抗生物質 gentamicin (GM) は Ca 拮抗作用を有することが知られており、運動神経終末では Ca チャンネルの外孔近傍に位置する Ca^{2+} の結合部位で Ca^{2+} と競合すると考えられている。心筋においても GM は結合部位における Ca^{2+} との競合により Ca 拮抗作用をあらわすことが示唆されているが、厳密な解析はなされていない。本研究ではこの点を詳細に検討するために、Ca チャンネルにおける Ca^{2+} 流入を促進する 3 種類の物質 (Ca^{2+} , Bay K 8644 および isoprenaline (Iso)) と GM との相互作用の様式を、摘出イヌ心室筋を用いて解析した。Bay K 8644 の陽性変力作用 (Ca^{2+} 流入促進作用) は Ca チャンネルの開孔時間を延長させることに基づき、Iso のそれは Ca チャンネルの開孔確率を上昇させることに基づく。比較のために、Ca チャンネルの外孔近傍で Ca^{2+} と結合部位を競合することが知られている Co^{2+} と、 Ca^{2+} または Iso との相互作用についても検討した。

実験は以下のように行なった。麻酔した雌雄雑種成犬より右心室肉柱を摘出し、Krebs-Henseleit 溶液中に懸垂した。標本に約 500 mg の静止張力をかけ、5 ms 幅、0.5 Hz の頻度で電気刺激し、収縮を惹起した。一個体から得た右心室より 4 ないし 8 本の肉柱を同時に懸垂し、そのうち 1 本は常に対照として用いた。対照群においては、外液 Ca^{2+} 濃度を $2.55 \times 10^{-3} \text{M}$ として GM の陰性変力作用の濃度応答曲線を得た。他の群においては、外液 Ca^{2+} 濃度を様々に変化させるか、それを $2.55 \times 10^{-3} \text{M}$ として Bay K 8644 または Iso を添加した後に、同様に GM の濃度応答曲線を得た。 Co^{2+} についても標本を HEPES 緩衝液中に懸垂した他は GM の場合と同様に行なった。これらの薬物の陰性変力作用は、それらを添加する直前の収縮力に対する抑制率で表わした。また Ca^{2+} の陽性変力作用の EC_{50} 値を求める実験も行なったが、この場合の標本は HEPES 緩衝液中に懸垂した。

GM ($10^{-4} - 10^{-2} \text{M}$) は濃度依存性に心筋収縮力の抑制を起こした。この作用は速やかにあらわれ、洗浄により速やかに消失した。外液 Ca^{2+} 濃度を 2.55×10^{-3} から $1.25 \times 10^{-3} \text{M}$ へ減少させると収縮力は低下し、逆に 5.05 および $7.55 \times 10^{-3} \text{M}$ まで増加させると収縮力は増加した。GM の陰性変力作用の濃度応答曲線は外液 Ca^{2+} の濃度に依存して右側へ平行移動した。GM の作用の IC_{50} 値は外液 Ca^{2+} の約 6 倍の増加により約 3 倍増加した。このとき Ca^{2+} を GM の拮抗物質と仮定してプロットした Schild 回帰直線の傾きは -1.17 ($r = -0.79$)、 Ca^{2+} の pA_2 値は 2.29 (Kca 値は $5.13 \times 10^{-3} \text{M}$) であった。

Bay K 8644 ($10^{-7} - 10^{-5} \text{M}$) により収縮力は濃度依存性に増加した。GM の濃度応答曲線は Bay K 8644 の濃度に依存して右へ移動したが、GM の IC_{50} 値は Bay K 8644 の濃度を 100 倍増加

させても約2倍増加したのみであった。

Iso (10^{-7} – 10^{-5} M) によっても収縮力は濃度依存性に増加した。GM の濃度応答曲線は Iso の濃度に依存して右へ平行移動したが、GM の IC_{50} 値は Iso の濃度を100倍増加させても約1.5倍増加したのみであった。

Co^{2+} (10^{-4} – 10^{-2} M) も GM と同様濃度依存性に収縮力の抑制を起し、その作用の発現は速く、洗浄により速やかに消失した。外液 Ca^{2+} を1.25から 7.55×10^{-3} M まで増加させると、 Co^{2+} の陰性変力作用の濃度応答曲線は右へ平行移動した。 Co^{2+} 作用の IC_{50} 値は外液 Ca^{2+} の6倍の増加により約5倍増加し、このとき Schild 回帰直線の傾きは -1.11 ($r = -0.86$)、 Ca^{2+} の pA_2 値は2.60 (Kca 値は 2.51×10^{-3} M) であった。一方 Co^{2+} の濃度応答曲線は Iso (10^{-7} – 10^{-5} M) によりわずかに右へ移動したのみであった。

最後に外液 Ca^{2+} を 6.4×10^{-4} から 1.25×10^{-2} M まで変化させて、 Ca^{2+} の陽性変力作用の濃度応答曲線を作成すると、 EC_{50} 値は 2.88×10^{-3} M であった。

以上のように、GM は作用発現と洗浄による作用消失の速い陰性変力作用をあらわし、この作用は Co^{2+} のそれと類似していた。GM と Ca^{2+} との拮抗より得られた Schild 回帰直線の傾きはおおよそ1であることが判明し、このことより GM と Ca^{2+} は競合的拮抗を示すことが明らかとなった。 Co^{2+} と Ca^{2+} との拮抗より得られた Schild 回帰直線の傾きもおおよそ1であり、 Co^{2+} も明らかに Ca^{2+} と競合的拮抗を示した。GM はその構造上正の電荷を有することから、本薬物も Co^{2+} と同様 Ca^{2+} と結合部位において競合することにより作用をあらわしていることが示唆される。GM と Ca^{2+} との拮抗より得られた pA_2 値と、 Co^{2+} と Ca^{2+} との拮抗より得られた pA_2 値の差異が0.5以内であったことも、これら三者の結合部位が同一である可能性を支持する。また、 Ca^{2+} の陽性変力作用の EC_{50} 値と、上記2つの pA_2 値より得られる Kca 値が近似していることから、同結合部位の50%を Ca^{2+} が飽和させたときに Ca^{2+} の最大陽性変力作用の $1/2$ の陽性変力作用があらわれることが示唆される。

審査結果の要旨

Ca拮抗作用を有する物質は有機化合物と無機化合物に大別され、それぞれ作用点が異なる。Co²⁺などの無機Ca拮抗物質はCaチャンネル近傍のCa²⁺結合部位において、Ca²⁺と競合することによりCa拮抗作用をあらわすことが知られている。アミノグリコシド系抗生物質のgentamicin (GM)も拮抗作用を示し、心筋において無機Ca拮抗物質と類似した機序によりこの作用を発現することを示唆している論文があるが、厳密な解析はなされていない。本論文提出者はこの点を詳細に検討するために、CaチャンネルにおけるCa²⁺流入を促進する3種類の物質とGMとの相互作用の様式を、摘出イヌ心室筋を用いてCo²⁺と比較しつつ解析した。GMとCo²⁺は濃度依存性に収縮張力を抑制した。GMの濃度応答曲線は外液Ca²⁺濃度の増加により右へ平行移動し、このときCa²⁺をGMの拮抗物質と仮定してプロットしたSchild回帰直線の傾きは-1, 17, Ca²⁺のpA₂値は2.29であった。GMの濃度応答曲線はBay K 8644およびisoprenalineによりわずかに右へ移動したのみであった。Co²⁺の濃度応答曲線も外液Ca²⁺の増加により右へ平行移動し、このときSchild回帰直線の傾きは-1, 11, Ca²⁺のpA₂値は2.60であった。Co²⁺の濃度応答曲線はisoprenalineによってわずかに右へ移動したのみであった。一方、Ca²⁺の陽性変力作用の濃度応答曲線よりEC₅₀値を求めると2.88×10⁻³Mであり、この値はGMまたはCo²⁺とCa²⁺との拮抗から求めたpA₂値より得たK_c値、5.13×10⁻³および2.51×10⁻³Mと近似していた。これらの研究より、GMはCo²⁺と同様に、CaチャンネルのCa²⁺結合部位においてCa²⁺と競合することによりCa拮抗作用をあらわしている可能性が非常に強いことを、定量的な解析を以て示すことができた。またこの解析により、Caチャンネルに存在するCa²⁺結合部位の50%をCa²⁺が飽和させたときに細胞外Ca²⁺の最大陽性変力作用の1/2の同作用が発現することも示唆することができた。

上述のような、Caチャンネルに存在するCa²⁺結合部位に関するこれらの定量的解析は学位に値すると考えられる。