HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット及びウサギ脳Na,K-ATPase活性に対するbufadienolidesの作用［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	李, 加
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13060号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70760
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Li_Jia_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　李　加

学　位　論　文　題　名

ラット及びウサギ脳 Na,K-ATPase 活性に対する bufadienolides の作用

Na,K-ATPase は動物細胞に広く存在する酵素であり，細胞内の 1 分子の ATP の加水分解と共役して 3 分子の Na^+を細胞内から細胞外へ，2 分子の K^+を細胞外から細胞内に輸送する．その結果，細胞の容積，浸透圧及び含水量の調節，神経や筋肉細胞の興奮性の維持，グルコースやアミノ酸の二次能動輸送などの機能を担う．

Na,K-ATPase の反応機構は Post-Albers の反応機構と呼ばれ，ATP 加水分解中に，2 種類のリン酸化反応中間体 E1P と E2P を形成する．ジギタリスや ouabain などの強心作用薬は Na,K-ATPase の特異的な阻害薬とされ，細胞の外側から，Na,K-ATPase に結合して Ouabain-E2P として安定化させる．その結果，脱リン酸化は抑制されて無機リンの放出量が減少するため，ATPase 活性が抑制される．

ジギタリスのような強心配糖体は臨床的には強心薬として使用される．陽性変力作用により心不全を改善し，結果として利尿作用も示す．その機構は以下のように確立されている．Na,K-ATPase の阻害により細胞外への Na^+輸送が抑制されると，細胞内の Na^+濃度が上昇して細胞内外の Na^+の濃度勾配が小さくなる．その結果，Na^+の濃度勾配を利用して Ca^{2+}を細胞外に輸送する Na/Ca 交換系による Ca^{2+}の排出が減少する．心筋細胞内の Ca^{2+}濃度が上昇すると心筋の収縮力が増大する．

漢方薬のセンソは，シナヒキガエル又はヘリグロヒキガエルの毒腺の分泌物を集めたものであり，成分や作用機構は長らく不明であった．現在では，約 100 種類の強心配糖体が抽出され，bufadienolides と命名されている．主要成分として，bufalin，cinobufagin，cinobufotalin（3 種をまとめる際は bufadienolides とする）などを含む．

センソは強心作用や利尿作用を示し，心不全や浮腫の治療に使用される．センソの主要成分である bufadienlides は Na,K-ATPase 活性を抑制するとの報告があるが，詳細は不明な点が多い．そこで，Na,K-ATPase 活性に対する bufadienlides の作用と作用機構を詳細に明らかにすることを目的に，Na,K-ATPase に対する作用機構の確立されている ouabain と比較した．

Na,K-ATPase は，ウサギ及びラット脳から精製した Na,K-ATPase を使用した．測定した ATPase 活性の 99%以上が ouabain 感受性の活性，すなわち Na,K-ATPase 活性であった．活性測定は 160 mM NaCl，16 mM KCl，5 mM $MgCl_2$，2.5 mM ATP を添加して行い，ATP の加水分解により生じた無機リンを Chifflet 法で発色させて分光光度計で定量した．活性に対する bufadienolides 及び ouabain の作用は，各実験で示した濃度の bufadienolides あるいは ouabain を反応液に添加して活性を測定することにより確認した．また，Na,K-ATPase 活性の Na^+，K^+，Mg^{2+}，ATP の濃度依存性に関する実験は，上記の 160 mM NaCl，16 mM KCl，5 mM $MgCl_2$，2.5 mM ATP のかわりに，実験に示した濃度の NaCl， KCl， $MgCl_2$ あるいは ATP を添加することにより，行った．さらに，最大活性の 50%阻害濃度に相当する bufadienolides 及び ouabain を反応液に添加して実験を行い，Na,K-ATPase 活性の Na^+，K^+，Mg^{2+}，ATP の濃度依存性に対する bufadienolides 及び ouabain の効果を検討した．

ウサギ及びラット脳 Na,K-ATPase 活性は，いずれも bufadienlides の濃度に依存して抑制された．Bufadienolides はウサギ脳 Na,K-ATPase 活性に対する cinobufotalin を除いて，ouabain よりも強い阻害作用を示した．阻害作用は bufalin が最も強く， cinobufagin， cinobufotalin の順序であった．また，ラット脳 Na,K-ATPase 活性はウサギと比較して低濃度で阻害された．

センソは生体に対する作用が強く，中国でも最近は単独で使用されることは少ないとされている．ジギタリス類や ouabain は安全域が狭く投与量と投与方法に注意が必要な薬物であるが，センソはさらに強い作用を示すことが ，ouabain よりも強い Na,K-ATPase 活性阻害作用により示唆された．

ウサギ及びラット脳 Na,K-ATPase 活性の Na^+，K^+，Mg^{2+}及び ATP 濃度依存性に対する bufadienolides 及び ouabain の効果を測定した．Bufadienolides 及び ouabain の有無にかかわらず，Na,K-ATPase 活性は Na^+，K^+，Mg^{2+}及び ATP 濃度依存性に増加して最大値を示したが， IC_{50} 値に相当する bufadienolides 及び ouabain 存在下では最大活性は低下した． Bufadienolides 及び ouabain 存在下では，Na^+，Mg^{2+}及び ATP 濃度の $K_{0.5}$ 値は非存在下と比較していずれも減少したが，K^+濃度の $K_{0.5}$ 値は増加した．すなわち，bufadienolides 及び ouabain 存在下では Na^+，Mg^{2+}及び ATP に対する親和性は増加し，K^+に対する親和性は低下することを示唆する．

Ouabain によるこれらの結果はすでに報告されている結果と一致する．本研究結果は，bufadienlides は ouabain と同様の作用機構により Na,K-ATPase 活性を抑制することを示す． Ouabain は Na,K-ATPase の反応機構において E2P に親和性が高く，結合すると E2P を安定化して脱リン酸化を阻害し、ATPase 活性を抑制することは確立されている．また，ジギタリスや ouabain は心筋の Na,K-ATPase

活性を阻害することによって強心作用を示すことも確立されている．これらの結果は，センソの作用である強心作用や利尿作用は， bufadienolides の Na,K-ATPase に対するジギタリスと同様の作用機序により発現することを示唆する．

本研究結果は，bufadienolides は ouabain と同様の作用機構で，ouabain よりも強い Na,K-ATPase 活性阻害作用を示すこと，センソによる強心作用及び利尿作用は，ジギタリス類と同様の作用機構であることを示唆した．