

特 集

Ca 拮抗薬の赤血球膜に対する作用

阿 部 博 子*

はじめに

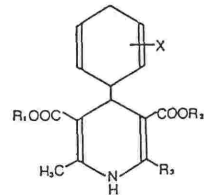
近年、Ca 拮抗薬が心臓血管系のみならず、他の臓器に対しても作用を示し、しかもその作用は細胞内への Ca 流入抑制という Ca 拮抗薬本来の作用とは異なる可能性が推測されている。1981年に Peck ら¹⁾ は Ca 拮抗薬、nifedipine が実験的虚血性肝障害の抑制作用を示すことを見出し、更にその後四塩化炭素などによる肝障害も抑制されることが報告²⁾ されている。また飯田ら³⁾ は dihydropyridine 系 Ca 拮抗薬による肝細胞障害の抑制作用は Ca^{2+} が細胞内に流入した後でも認められることを報告している。従って、これらの薬物には Ca 拮抗薬としての作用以外に膜保護あるいは膜安定化作用など膜に対する直接的な作用のある可能性が推測されるが、その詳細については殆ど検討されていない。

私共はこれまでに各種薬物の生体膜に対する作用を赤血球を用いて様々な角度から検討してきているが^{4,5,6)}、今回 dihydropyridine 系 Ca 拮抗薬の赤血球溶血現象や変形能などに対する作用を検討し、興味ある結果⁷⁾ を得たので紹介したい。

I. 溶血活性

dihydropyridine 系 Ca 拮抗薬として図 1 に示す構造式をもつ nimodipine, nicardipine, isopropylmethyl-6-carbamoyloxymethyl-4-(2,3-dichlorophenyl)-1,4-dihydro-2-methyl-3,5-pyridine-dicarboxylate (NB818) の 3 種類を用いて、赤血球の溶血活性を観察した。溶血活性は各種濃度の nicardipine, nimodipine, NB818 を含む等張緩衝液に赤血球浮遊液 (40%V/V) を添加し、室温あ

るいは 37 度で 20 分間インキュベートして、その後直ちに遠心し、その上清の吸光度を 540 nm で測定することによって観察した。その結果、nimodipine, nicardipine, NB818 いずれも $10^{-5}M$



	X	R ₁	R ₂	R ₃
Nimodipine	3-NO ₂	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	CH ₃
Nicardipine	3-NO ₂	CH ₃	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃)CH ₂ -C ₆ H ₄	CH ₃
NB-818	2,3-Cl ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ OCONH ₂

図 1 本研究で使用した Ca 拮抗薬の構造式

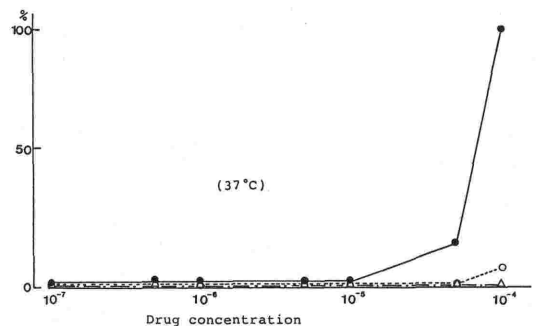
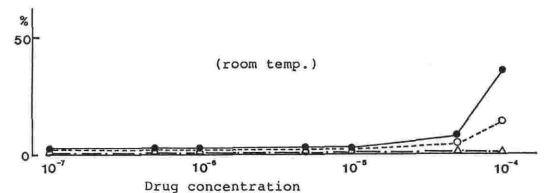


図 2 溶血活性

*近畿大学東洋医学研究所

以下の濃度では溶血は誘導されず, NB818 および nifedipine では $5 \times 10^{-4}M$ で軽度の溶血活性を示した. しかし nimodipine では全く溶血活性はみられなかった. $10^{-4}M$ での溶血活性は NB818 > nifedipine > nimodipine の順であり, 構造式の違いによって赤血球膜に対する親和性がかなり異なる可能性が推測される (図2).

II. 赤血球膜保護作用

一般に高濃度で赤血球の溶血現象を誘導する薬物であっても, 低濃度では逆に溶血保護作用を示すことが植物性配糖体などでしばしば認められる. nimodipine, nifedipine, NB818 はいずれも $5 \times 10^{-4}M$ 以上の濃度では明らかな溶血活性を示すが, $10^{-6} \sim 10^{-5}M$ の濃度では逆に著明な低張溶血保護作用を示している. 低張溶血保護作用は等張液として 10 mM の磷酸緩衝液中に 154 mM の NaCl を含むものを用い, 低張液としては 56 mM の NaCl を含むものを使用して観察した. 図3に示す溶血抑制率は等張緩衝液中でインキュベートしたものを対照として以下の式で計算されたものである.

$\%inhibition = 100 - 100x$ (O. D. test sample heated or in hypotonic soln - O. D. test sample unheated or in isotonic soln) / (O. D. control sample heated or in hypotonic soln - O. D. control sample unheated or in isotonic soln).

nimodipine, nifedipine, NB818 の $10^{-6}M$ における溶血抑制率はそれぞれ 20, 40, 48% で, nifedipine および NB818 では著明な抑制効果が認められ, 溶血活性の強いもの程抑制率は強いことが明らかである (図3).

ところが熱溶血保護作用に対してはいずれの Ca 拮抗薬も抑制作用を示さず, $10^{-6}M$ 以上の濃度ではむしろ溶血促進作用が認められている (図4).

低張溶血保護作用のメカニズムは現在のところ, 膜脂質層に薬物が貫入することによって, 体積と膜表面積の比が増大し, その結果浸透圧変化に対して抵抗性をもつことになるものと考えられている. 従って, これらの Ca 拮抗剤は膜の脂質層にかなり親和性をもつことが推測される.

熱溶血に対する抑制作用は赤血球を $54.5^{\circ}C$ で 20分間インキュベートした場合の溶血 (対照) に

対する抑制効果のみであり, 一般に膜蛋白の安定化作用を示すような薬物が抑制効果を示すものと考えられている. 従って dihydropyridine 系の Ca 拮抗薬には膜蛋白の安定化作用はないものと考えられる.

III. 赤血球の形態変化

赤血球の形態に対する様々な薬物の影響は古くから知られており, Sheetz と Singer⁷⁾ は薬物による赤血球の形態変化を外方突出 (echinocytosis) と内方陥没 (凹) (stomatocytosis) に分け, 外方突出は赤血球膜の脂質二重層の外層に薬物 (陰イオン性の薬物であることが多い) が貫入した場合にみられ, 内方陥没は内層に薬物 (陽イオン性の

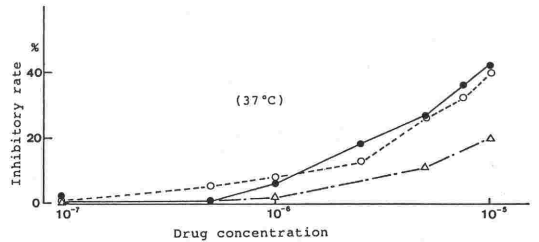
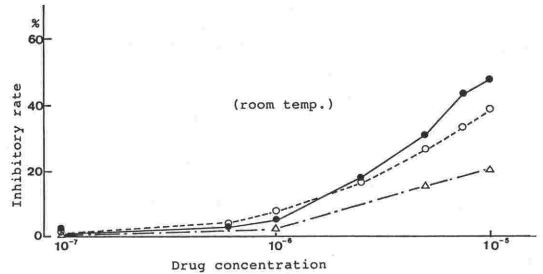


図3 低張溶血に対する Ca 拮抗薬の作用

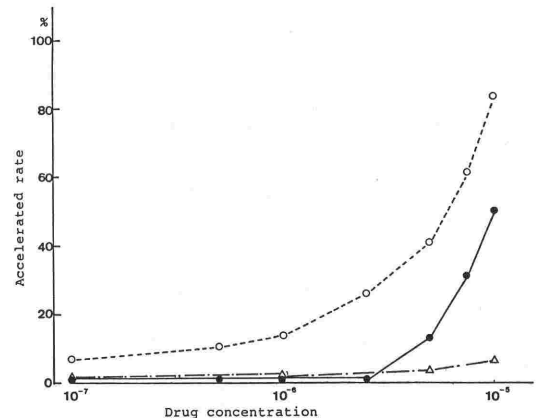


図4 熱溶血に対する Ca 拮抗薬の作用

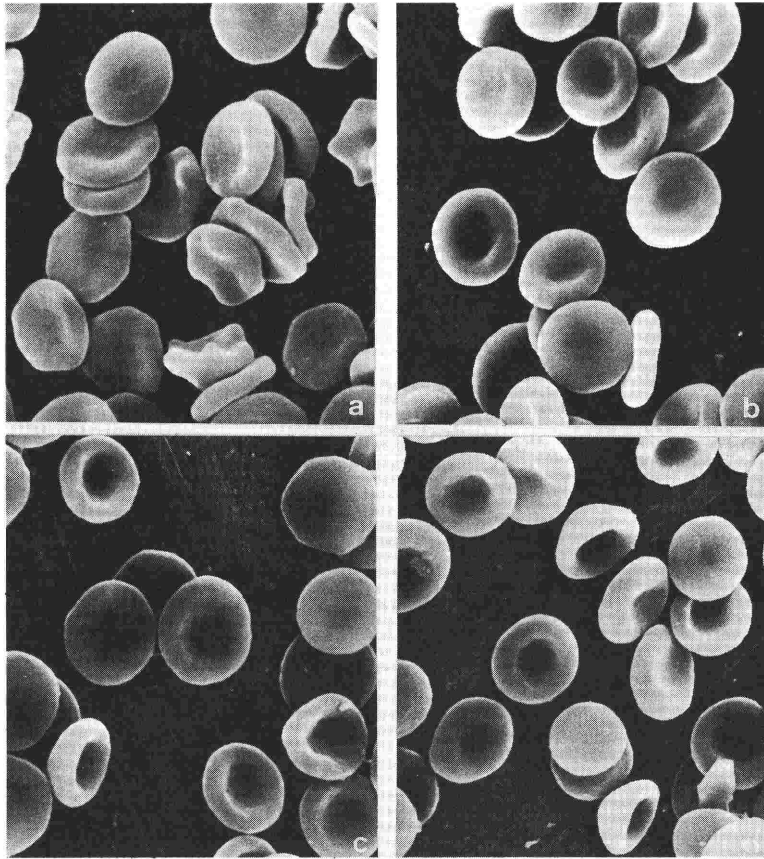


図5 赤血球形態に及ぼすCa拮抗薬の作用(走査電顕像)
a; 対照(インキュベーション30分後), b; nimodipine 添加,
c; nifedipine 添加, d; NB818 添加

薬物であることが多い)が貫入した場合に生じるという仮説をたてている。dihydropyridine系Ca拮抗薬の場合、図5に見られるように、各Ca拮抗剤を含む等張溶液中で赤血球を30分間インキュベートすると、いずれのCa拮抗剤にも内包陥没状の赤血球が認められるようになる。従って、SheetzとSingerの仮説によれば、これらのCa拮抗薬は脂質二重層の内層に貫入しているものと推測される。しかし現在、この仮説に対しては異論⁸⁾も多く、赤血球の形態変化には Ca^{2+} 濃度、カルモデュリン、細胞骨格系などがより重要な役割を果たしていると言われている。本研究では、Caを含まない外液を使用しているため、赤血球内のCa濃度の上昇は考えられない。従ってCa拮抗薬による赤血球の形態変化は細胞骨格系を含む膜系に対する作用の結果であると考えられる。

IV. 赤血球変形能に対する作用

赤血球変形能は微小循環における血液の流動性を支配する重要な因子の一つとして注目されている。赤血球変形能の測定方法には、viscometry, filtration method, resistive pulse spectroscopy, diffractometric techniqueなどいくつかの方法があるが、本研究ではNagasawa⁹⁾によるキャピラリーを用いた極めて簡便なcapillary tube centrifugal methodによって測定している。capillary tube centrifugal methodは100 μ lのmicro pipetteの最下層に1%グルタルアルデヒド液を置き、中間層に燐酸緩衝液を、最上層に採血直後の全血30 μ lを重層してヘマトクリット用遠心器で約20秒遠心する。最下層に集まったグルタルアルデヒドで固定された赤血球を位相差顕微

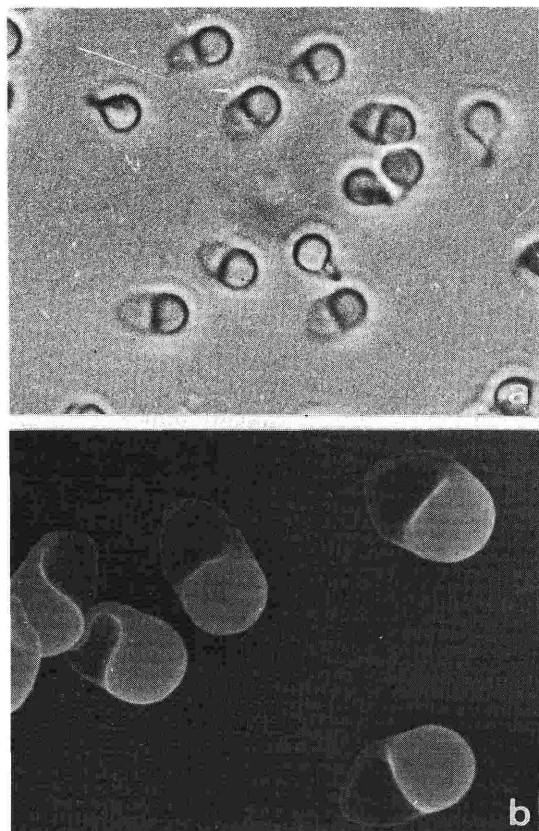


図6 遠心力によって変形した赤血球
a; 位相差顕微鏡, b; 走査電顕像

鏡あるいは走査電子顕微鏡で観察すると、図6に見られるような形態を示す。この変形した赤血球の長径を計測して変形能とした。

本研究で使用したCa拮抗薬はいずれも10分のインキュベートで明らかな変形能の増加をもたらした。特にNB818では $10^{-6}M$ ですでに著明な変形能の増加を示しており、濃度が $5 \times 10^{-5}M$ と高くなると逆に有意の変形の増加がみられなくなった。nicardipine, nimodipineにおいても同様に赤血球変形能の増加が認められるが、その最低濃度はNB818より高く、nicardipineで $5 \times 10^{-6}M$, nimodipineで $5 \times 10^{-6}M$ であった(表1)。また平均赤血球容積(MCV)についてはいずれのCa拮抗薬でも全く変化は認められていない。

本研究での赤血球変形能は変形した赤血球の長径を測定しているため、これらのCa拮抗薬による変形能の増加は、低張溶血抑制作用および赤血球の形態変化の項で述べたように、薬物が膜に貫入した結果、膜の表面積が増加したことによる可能性も考えられる。しかしこれらのCa拮抗薬による変形能の増加はDose-dependentではなく、濃度が高くなると逆に変形能は低下していることを考慮すると、表面積の増加によるというよりむしろ細胞骨格系を含む膜の物性的変化による可能性が高いように思われる。

表1 赤血球変形能に対するCa拮抗薬の作用

Drugs	Dose (M)	Deformability (um)		MCV (um ³)	
		10 min	30 min	10 min	30 min
Control		7.28±0.08	7.25±0.08	54.83±0.60	55.83±0.60
Nimodipine	10^{-5}	7.83±0.07**	7.90±0.07**	55.33±0.84	56.17±0.68
	5×10^{-5}	8.04±0.08**	7.97±0.06**	55.33±0.84	55.83±0.06
	10^{-4}	7.30±0.06	7.45±0.07*	55.17±0.76	55.67±0.93
Nicardipine	10^{-6}	7.39±0.06	7.65±0.06**	55.17±0.76	55.83±0.60
	5×10^{-6}	7.83±0.07**	7.88±0.08**	54.83±0.68	55.83±0.60
	10^{-5}	7.49±0.06*	7.67±0.08**	55.00±0.62	55.50±0.61
NB-818	10^{-6}	7.52±0.06*	7.71±0.08**	55.33±0.73	55.83±0.60
	5×10^{-6}	7.51±0.07*	7.76±0.07**	54.83±0.60	55.83±0.60
	10^{-5}	7.43±0.06	7.37±0.06	54.83±0.60	55.67±0.61

*p<0.05, **p<0.001: vs Control

おわりに

現在のところ以上に示した Ca 拮抗薬による赤血球に対する作用のメカニズムやそれぞれの現象の相互関係については明らかではないが、dihydropyridine 系 Ca 拮抗剤が Ca^{2+} の細胞内流入を抑制する作用の他に、生体膜系に直接作用して様々な作用をもたらす可能性は大きいと思われる。その作用が必ずしも生体にとって望ましい作用であるか否かは現在のところ不明であるが、その点についての検討も含めて、今後更に詳細な作用メカニズムの研究が望まれる。

文 献

- 1) Peck, R. C., Lefer, A. M.: Protective effect of nifedipine in the hypoxic perfused cat liver. *Agents Actions* 11:421-424, 1981.
- 2) 松田春甫, 飯田吉隆, 川口城司他: 四塩化炭素肝障害に対する Ca 拮抗剤 (Nicardipine) の影響. *薬理と治療* 13 (Suppl. 6):275-277, 1985.
- 3) 飯田吉隆, 高梨日出雄, 松田春甫他: Ca 拮抗薬の肝障害に対する抑制効果—肝障害におけるカルモジュリン, C-kinase 系の関与—. *肝臓* 30:850-854.
- 4) Abe, H., Sakaguchi, M., Konishi, H. et al.: The effects of saikosaponins on biological membranes. 1. The relationship between the structures of saikosaponins and hemolytic activity. *Planta Medica* 34:160-166, 1978.
- 5) Abe, H., Odashima, S., Arichi, S.: The effects of saikosaponins on biological membranes. 2. Changes in electron spin resonance spectra from spin-labelled erythrocyte and erythrocyte ghost membranes. *Planta Medica* 34:287-290, 1978.
- 6) Abe, H., Sakaguchi, M., Anno, M. et al.: Erythrocyte membrane stabilization by plant saponins and sapogenins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316:262-265, 1981.
- 7) Sheez, M. P., Singer, S. J.: Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Nat Acad Sci* 71:4457-4461, 1974.
- 8) 神部芳則, 佐藤慎悟, 中尾 真: 赤血球膜の分子構成と形態変化. *蛋白核酸酵素* 28:531-541, 1983.
- 9) Nagasawa, T., Sarai, A., Kojima, S.: A capillarytube centrifugal for the measurement of cellular deformability. *Osaka CityMed J* 26:1-6, 1980.