

学位論文題名

ドロペリドールによるラット脳

Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害機構に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的】ドロペリドールは、運動反射抑制、精神的無関心などの神経遮断作用を示すブチロフェノン系の神経遮断薬である。ドロペリドールとフェンタニルなどの強力なオピオイド鎮痛薬を併用することにより、神経遮断性麻酔（NLA 麻酔）を行うことができるため、静脈麻酔薬の一剤として用いられる。ドロペリドールが示す神経遮断作用は、ドパミン D_2 受容体を遮断する結果と考えられているが、ドロペリドールは、セロトニンやアドレナリン受容体とも高い親和性で結合し、その作用がドパミン D_2 受容体に対してのみ特異的であるというような厳密な作用機構ではないと考えられる。 Na^+ , K^+ -ATPase は、 Na^+ と K^+ の能動輸送を行う生体膜に広く分布し、ATP の加水分解エネルギーを用いて 3 個の Na^+ を細胞外へ、2 個の K^+ を細胞内へ輸送する。その機能は、細胞の体積、浸透圧、静止電位の維持や筋肉・神経組織の興奮活動の維持など、生体の恒常性維持に必須であり、安静時の代謝エネルギーの 30%はこの酵素によって消費されると計算されている。このような機能を持つ Na^+ , K^+ -ATPase をドロペリドールが阻害するという報告がされているが、その詳細は不明であることから、その阻害機構を明らかにすることを目的に本研究を行った。

【材料と方法】ラット全脳より得られた膜分画を Jorgensen らの方法に準じて部分精製した Na^+ , K^+ -ATPase を用いて、以下の実験を行った。(1)ドロペリドール、ドロペリドールよりも強力なドパミン D_2 受容体遮断薬であるスピペロンおよび Na^+ 濃度が、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性とその部分反応である Na^+ -ATPase 活性に与える影響を調べるため、酵素反応の結果生ずる無機リンを Chifflet らの方法で測定した。(2) ^{32}P をシンチレーションカウンターで測定することにより、ドロペリドールおよび Na^+ 濃度がリン酸化中間体(EP)形成量に与える影響を調べた。(3)EP の分解速度に対するドロペリドールの影響を調べた。(4)ドロペリドールの Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害作用が可逆的であるか否かを調べるため、活性回復試験を行った。

【結果と考察】

1、ドロペリドールによる Na^+ , K^+ -ATPase 活性の抑制機構について

ドロペリドールは Na^+ , K^+ -ATPase 活性と Na^+ -ATPase 活性を濃度依存性に抑制し、それぞれ 1.0 mM および 0.55 mM でその活性を完全に阻害した。その 50%活性阻害濃度はそれぞれ 0.42 mM および 0.22 mM であり、この結果は、 Na^+ -ATPase 活性が Na^+ , K^+ -ATPase 活

性よりも低濃度のドロペリドールによって活性が阻害されることを示し、ドロペリドールは Na^+, K^+ -ATPase 反応において Na^+ のみに依存して進行する前半の過程に強く影響することが示唆された。このため、 Na^+, K^+ -ATPase 反応の前半の反応における EP 形成過程が抑制されている可能性を考え、ドロペリドールの EP 形成に対する影響を調べた。しかし、 Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害するドロペリドールの濃度の範囲では EP の形成量には顕著な変化はなく、ドロペリドールは EP 形成を抑制することによって ATPase 活性を阻害するのではないことが明らかになった。ドロペリドールの Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する阻害作用は EP 形成以降であると考えられたので、 Mg^{2+} をキレートして新たな EP 形成を阻止することにより、ドロペリドールの EP 分解速度に対する影響を検討したところ、ドロペリドールは、濃度に依存して EP の分解速度を低下させた。この結果から、ドロペリドールは、EP からの脱リン酸化の速度を低下させることにより、ATPase 活性を抑制するものと推定された。スピペロンは、ドロペリドールと同じブチロフェノン系で、ドロペリドールより強いドパミン D_2 受容体遮断薬である。スピペロンは、ドロペリドールが Na^+, K^+ -ATPase 活性と Na^+ -ATPase 活性を抑制するよりさらに高濃度でも、両活性を顕著には阻害しなかった。この結果は、ドロペリドールの Na^+, K^+ -ATPase に対する阻害作用が、ドパミン D_2 受容体に結合して作用するのとは異なった機構で発現することを示唆した。

2、ドロペリドールによる Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害の生理的意義

臨床的にドロペリドールの作用は可逆的であることから、ドロペリドールの作用が可逆的であるか否かを *in vitro* で調べた。 Na^+, K^+ -ATPase 活性が阻害される濃度のドロペリドールにさらした後、その濃度を維持すると Na^+, K^+ -ATPase 活性の阻害は維持されたが、その濃度を希釈して低下させると、最初から希釈後の濃度におかれた場合と同じレベルまで活性は回復し、ドロペリドールによる Na^+, K^+ -ATPase 活性の阻害は可逆的であることが示唆された。ドロペリドールが Na^+ -ATPase 活性を Na^+, K^+ -ATPase 活性よりも低濃度で阻害することから、ドロペリドールは Na^+, K^+ -ATPase の Na^+ に対する親和性を変化させている可能性がある。そこで、ドロペリドールの Na^+, K^+ -ATPase 活性、 Na^+ -ATPase 活性 および EP 形成 に対する Na^+ 濃度依存性を検討した。その結果、いずれを指標にしても、50% 活性化する Na^+ 濃度を上昇させており、 Na^+ に対する親和性を低下させることが明らかになった。*in vitro* の実験においては、 Na^+ 濃度を十分高くして実験を行うことができるので、実験条件の設定の仕方によって Na^+ に対する親和性の低下が見かけ上の活性低下にならないようにすることができる。しかし、生体においては常に Na^+ に対する親和性の低下が問題にならない Na^+ 濃度が維持できるとは限らず、ドロペリドールによる Na^+ に対する親和性の低下によって Na^+, K^+ -ATPase 活性が低下する可能性もあることが示唆された。

【結論】ドロペリドールは、主に EP の脱リン酸化の速度を低下させることによって、 Na^+, K^+ -ATPase 活性を抑制し、その作用は可逆的である。また Na^+, K^+ -ATPase の Na^+ に対する親和性を低下させるため、生体内では、その結果として Na^+, K^+ -ATPase 活性が低下する可能性もある。より強力な D_2 受容体遮断薬であるスピペロンは Na^+, K^+ -ATPase 活性を顕著には抑制しないことから、ドロペリドールはドパミン D_2 受容体に対するのとは異なった機構で、 Na^+, K^+ -ATPase を抑制するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 福 島 和 昭
副 査 教 授 福 田 博

学 位 論 文 題 名

ドロペリドールによるラット脳

Na⁺, K⁺-ATPase 活性阻害機構に関する研究

主査、副査全員が一堂に会し、口頭にて論文審査を行った。まず、論文提出者に研究内容の概要の説明を求めた。提出者は以下の内容を明快に説明した。Na⁺,K⁺-ATPaseの機能は、細胞の体積、浸透圧、静止電位の維持や筋肉・神経組織の興奮活動の維持など、生体の恒常性維持に必須であり、安静時の代謝エネルギーの30%はこの酵素によって消費されると計算されているが、このような機能を持つNa⁺,K⁺-ATPaseを運動反射抑制、精神的無関心などの神経遮断作用を示すブチロフェノン系の神経遮断薬である、ドロペリドールが阻害するという報告がされているが、その詳細は不明であることから、その阻害機構を明らかにすることを目的に本研究を行った。

ラット全脳より得られた膜分画をJorgensenらの方法に準じて部分精製したNa⁺,K⁺-ATPaseを用いて、(1)ドロペリドール、ドロペリドールよりも強力なドパミンD2受容体遮断薬であるスピペロンおよびNa⁺濃度が、Na⁺,K⁺-ATPase活性とその部分反応であるNa⁺-ATPase活性に与える影響を調べるため、酵素反応の結果生ずる無機リンをChiffletらの方法で測定した。(2) 32Pをシンチレーションカウンターで測定することにより、ドロペリドールおよびNa⁺濃度がリン酸化中間体(EP)形成量に与える影響を調べた。(3) EPの分解速度に対するドロペリドールの影響を調べた。(4)ドロペリドールのNa⁺,K⁺-ATPase活性阻害作用が可逆的であるか否かを調べるため、活性回復試験を行った。

1、ドロペリドールによるNa⁺,K⁺-ATPase活性の抑制機構について

ドロペリドールはNa⁺,K⁺-ATPase活性とNa⁺-ATPase活性を濃度依存性に抑制した。その50%活性阻害濃度はそれぞれ0.42 mMおよび0.22 mMであり、この結果は、Na⁺-ATPase活性がNa⁺,K⁺-ATPase活性よりも低濃度のドロペリドールによって活性が阻害されることを示し、ドロペリドールはNa⁺,K⁺-ATPase反応においてNa⁺のみに依存して進行する前半の過程に強く影響することが示唆された。前半の反応におけるEP形成過程が抑制されている可能性を調べたが、EPの形成量には顕著な変化はなく、ドロペリドールはEP形成を抑制することによってATPase活性を阻害するのではないことが明らかになった。阻害作用はEP形成以降であると考えられたので、Mg²⁺をキレートして新たなEP形成を阻止することにより、ドロペリドールのEP分解速度に対する影響を検討したところ、ドロペリドールは、濃度に依存してEPの分解速度を低下させた。この結果から、ドロペリドールは、EPからの脱リン酸化の速度を低下させることにより、ATPase活性を抑制するものと推定された。スピペロン

は、ドロペリドールと同じブチロフェノン系で、ドロペリドールより強いドパミンD2受容体遮断薬である。スピペロンは、ドロペリドールがNa⁺,K⁺-ATPase活性とNa⁺-ATPase活性を抑制するよりさらに高濃度でも、両活性を顕著には阻害しなかった。この結果は、ドロペリドールのNa⁺,K⁺-ATPaseに対する阻害作用が、ドパミンD2受容体に結合して作用するのとは異なった機構で発現することを示唆した。

2、ドロペリドールによるNa⁺,K⁺-ATPase活性阻害の生理的意義

臨床的にドロペリドールの作用は可逆的であることから、ドロペリドールの作用が可逆的であるか否かを*in vitro*で調べた。Na⁺,K⁺-ATPase活性が阻害される濃度のドロペリドールにさらした後、その濃度を維持するとNa⁺,K⁺-ATPase活性の阻害は維持されたが、その濃度を希釈して低下させると、最初から希釈後の濃度におかれた場合と同じレベルまで活性は回復し、ドロペリドールによるNa⁺,K⁺-ATPase活性の阻害は可逆的であることが示唆された。ドロペリドールがNa⁺-ATPase活性をNa⁺,K⁺-ATPase活性よりも低濃度で阻害することから、ドロペリドールはNa⁺,K⁺-ATPaseのNa⁺に対する親和性を変化させている可能性がある。そこで、ドロペリドールのNa⁺,K⁺-ATPase活性、Na⁺-ATPase活性 およびEP形成 に対するNa⁺濃度依存性を検討した。その結果、いずれを指標にしても、50%活性化するNa⁺濃度を上昇させており、Na⁺に対する親和性を低下させることが明らかになった。*in vitro*の実験においては、Na⁺濃度を十分高くして実験を行うことができるので、実験条件の設定の仕方によってNa⁺に対する親和性の低下が見かけ上の活性低下にならないようにすることができる。しかし、生体においては常にNa⁺に対する親和性の低下が問題にならないNa⁺濃度が維持できるとは限らず、ドロペリドールによるNa⁺に対する親和性の低下によってNa⁺,K⁺-ATPase活性が低下する可能性もあることが示唆された。

これらの事実から、ドロペリドールは、主にEPの脱リン酸化の速度を低下させることによって、Na⁺,K⁺-ATPase活性を抑制し、その作用は可逆的である。またNa⁺,K⁺-ATPaseのNa⁺に対する親和性を低下させるため、生体内では、その結果としてNa⁺,K⁺-ATPase活性が低下する可能性もある。より強力なD2受容体遮断薬であるスピペロンはNa⁺,K⁺-ATPase活性を顕著には抑制しないことから、ドロペリドールはドパミンD2受容体に対するのとは異なった機構で、Na⁺,K⁺-ATPaseを抑制するものと考えられた。

このような趣旨の論文に対し、次のような質問がなされた。1) ドロペリドールのNa⁺,K⁺-ATPase活性阻害機構を調べるに至った経緯について 2) ドロペリドールの抗不整脈作用、 α blocker作用とNa⁺,K⁺-ATPase活性との関係について 3) 臨床的濃度との関係について 4) **神経遮断作用発現に対するNa⁺,K⁺-ATPase活性の関与について** 5) 全身麻酔薬との関係について 6) ドロペリドールのミネラル化の程度とクロールプロマジンのそれとの比較について 等、これらの質問に対し、申請者は明快な回答を行い、関連分野についても広く詳細な理解があることを認められた。以上の結果を総合し、合格とした。