

強心配糖体のコリンエステラーゼ活性に及ぼす影響

第1報 強心配糖体と猫の非特異的コリンエステラーゼ

篠原 護

札幌医科大学薬理学教室 (主任 田辺教授)

Effects of Cardiac Glycosides on Cholinesterase Activity

I. Cardiac Glycosides and Nonspecific Cholinesterase of Cat

By

MAMORU SHINOHARA

Department of Pharmacology, Sapporo University of Medicine

(Chief: Prof. T. TANABE)

強心配糖体の作用機転についての研究成果は数十年來多数報告されて来たが、まだその解明の段階には到達していない。しかし近年薬理学及び生物化学の実験方法の進歩に伴ない、強心配糖体の研究にもこれ等の方法が採用されて新知見が次々と報告されるに至つた。即ち物質代謝面からの研究^{1)~5)}や、Tracer⁶⁾として同位元素を使用した研究等がこの方面に最も大きな成果をもたらしつつある。

しかしながら以上諸氏の実験成績を綜合して考察しても、強心配糖体の持つ特有の治療作用、並びに中毒作用は遺憾ながら充分にその発現機構が、証明されたとはいえない。

そこで私は、心臓活動に種々の調整的役割を果すのみならず神経機能にも基本的な作用を果している Acetylcholine (以下 ACh と略記) の代謝の上に強心配糖体が如何に影響を及ぼすかを観察することは、強心配糖体の作用機序解明の上に有力且つ必要な方法であることに着目し、本研究を企図した。

迷走神経様作用物質としての ACh の生体作用、特に心臓作用の分析に当つては諸家の意見が一致していなかつたが、現在では ACh の作用の多相性は其の濃度によるという意見に傾いている。しかしながら生体内に適用した ACh はその適用濃度の儘生体に作用するのでなくて、直ちに生体内に存在する Cholinesterase (以下 ChE と略記) により加水分解されるから、実際に作用する ACh の濃度は ChE の ACh 分解能力、即ち ChE の活性に大巾に左右されるのであろう。また ACh は非常に不安定な物質で取り扱ひ方が難しく、またその定量法が著しく繁雑でしかも誤差も大きい等の点からして、ACh 代謝の研究に当つては ACh と表裏一体の関係にある ChE を取扱う方が便利であらう。それにより ChE の活性から逆に生体内の或る部位における ACh の濃度をほぼつかかひ知ることが出来る。私はこの

ような見地から強心配糖体の ChE 活性に及ぼす影響を実験的に観察した。

ChE は ACh を生体内で加水分解する酵素として発見されて以來 ACh とともにその生理学的意義が詳細に研究されて来た。そして Hawes 及び Alles^{7), 8)} はさらに ChE には Choline の Ester のみを分解する特異的 ChE と非 Choline の Ester をも分解する非特異的 ChE の2種の有ることを見出した。その後の研究^{9), 10)} によつて前者は主として神経組織及び赤血球内に、後者は肝臓及び血清中に存在して、おのおの異なつた生理的意義を持つてゐることが判明した。

猫の各種臓器内 ChE の両者の鑑別は既に Koelle¹¹⁾ が組織化学的に研究しているところである。即ち彼は肝臓及び血清には非特異的 ChE のみが、また血球、中枢神経系、横紋筋及び平滑筋等には特異的 ChE が局在していることを報告した。

私は Koelle のこの鑑別結果に準拠して、強心配糖体の ChE 活性に及ぼす影響を血清、血球及び臓器のおのおのについて別々に研究することにした。先ず非特異的 ChE である猫血清 ChE に対する強心配糖体の影響について実験を行つたので、ここにその結果を報告する。

実験方法

実験動物は 2~4 kg の猫を用い、Urethane を以て麻酔し、猫固定台に背位に固定し、一側後肢の股動脈にカニューレを挿入し、強心配糖体の注射に用い、さらに他側後肢の股動脈を切開して露出し、採血した。

強心配糖体としては Digitoxin (Merk), g-Strophanthin (British Drug Houses) 及び Convallatoxin (L. Light) を使用した。Digitoxin は 1:1,000 のアルコール溶液を調整して置き、注射直前に Ringer 液で最終濃度 1:10,000 に

稀釈したものを注射した。g-Strophanthin は 1:1,000 の水溶液を調整しておき、注射直前に Ringer 液で 1:20,000 の最終濃度にしたものを注射した。Convallatoxin は 1:1,000 のアルコール溶液を調製しておき、注射直前に 1:20,000 の最終濃度に Ringer 液で稀釈したものを注射した。

以上これ等の強心配糖体溶液は何れも 5 分間隔で注射し、その注射量は概ね 10 回の注射で心臓停止が起るように頭初から決めておいた。また注射速度は可及的に一定にした。

対照実験には上記の強心配糖体の溶媒として用いたアルコールのリンゲル溶液のみを 5 分間隔で 0.5 cc/kg 宛注射した。

採血は約 1 cc を強心配糖体投与群、対照群ともに同一の条件で行い、正確に 10 分間隔で行った。従つて偶数回目の注射が行われた直後に採血することになった。採血の際溶血の起きないように特に注意を払った。即ち股動脈を予め切断してクレンメで挟んでおき採血時にそれをゆるめて静かに管壁を伝わらすようにして試験管に採血した。採血した血液は直ちに遠心沈澱し血清を分離しこれを下記の処方 Ringer 液で正確に 10 倍に稀釈した。Ringer 液の処

方は 0.9 g/dl NaCl を 100 cc, 1.22 g/dl CaCl₂ を 2 cc, 1.15 g/dl KCl を 2 cc, 及び 1.3 g/dl NaHCO₃ を 20 cc 混合したものである。

この血清稀釈液の ChE 活性を調べたのであるが、その活性測定は Ammon 氏¹²⁾法にならつて Warburg 検圧計を用いて行つた。

基質液としては ACh を上記処方 Ringer 液で溶解した溶液を用いた。猫血清の ChE は非特異的 ChE であるから、検圧計容器内の ChE の濃度を高くする必要があり、従つてその最終濃度が 0.025 M となるようにしたものを主室に 1.5 cc 入れた。酵素源としての血清は上記の Ringer 稀釈液であり、その 0.5 cc を副室に入れた。

これ等の基質及び血清の両液を予め CO₂:N₂=5:95 の割合の混合ガスで飽和してその pH を正確に 7.4 に維持せしめた。次いでこれ等の液の入つた容器と検圧計とを連結してそのガス腔に混合ガスを充した。容器を先ず 37°C の恒温槽中にて振盪して平衡に達せしめた後に、血清稀釈液を主室に洗いこみ、後 10 分毎に検圧計目盛りを読み、直線的に上昇することを確かめながら 30 分間で測定を終了した。このようにして得られた測定値は容器内での ACh の自己

第 1 表 アルコール・リンゲル溶液の猫血清 ChE 活性に及ぼす影響

動物番号	性別	体重 (kg)	致死量	注射前値	注 射 回 数					
					2	4	6	8	10	12
1	♀	3.2	—	4.05	4.05	4.05	4.05	3.95	4.15	4.05
2	♂	3.4	—	5.25	5.25	5.25	5.25	5.15	5.15	5.25
3	♂	4.5	—	2.70	2.70	2.80	2.70	2.65	2.70	2.80
4	♂	3.0	—	2.80	2.85	2.80	2.80	2.85	2.80	2.80
5	♂	2.5	—	4.00	3.95	4.05	4.05	3.95	3.95	4.00
平均				3.76	3.76	3.79	3.77	3.71	3.75	3.78

実験数値は ACh 分解による CO₂ 産生量を cmm で現わしたものである。

第 2 表 Digitoxin の猫血清 ChE に及ぼす影響

動物番号	性別	体重 (kg)	致死量 (mg/kg)	注射前値	注 射 回 数					
					2	4	6	8	10	12
101	♂	3.3	0.466	4.15	4.30	4.60	4.15	3.85	3.70	
102	♂	2.8	0.428	3.75	4.00	4.20	3.65	3.20		
103	♂	2.5	0.400	4.00	4.20	4.40	3.65	3.40		
104	♂	2.8	0.470	4.10	4.35	4.45	4.00	3.80	3.30	
105	♂	3.2	0.446	4.00	4.30	4.40	3.95	3.70	3.50	
平均			0.442	4.00	4.23	4.41	3.86	3.59		

実験数値は ACh 分解による CO₂ 産生量を cmm で現わしたものである。

分解値をも含むものであるから、私は温度気圧計の容器の主室に上記 ACh 溶液の 1.5 cc, 副室に 0.5 cc の Ringer 液を入れて、同様に自己分解値を求めて、上記の測定値を補正した。このようにすると ChE が ACh を分解して放出せしめた CO₂ の容量は次の式から計算的に得られる。

$$x = h \cdot k$$

但し h は検圧計目盛りの読み、 k は容器恒数で

$$k = \frac{V_G \cdot \frac{273}{273+T} + V_f \alpha}{10}$$

V_G : 検圧計のガス腔容積 (cc)

V_f : 容器の液体容積 (cc)

α : アンゼン氏吸収係数

T : 恒温槽温度 (°C)

x : 放出ガス容積 (cmm)

実験成績

1. 対照群: 対照実験としては、10% アルコール・リンゲル溶液の 0.5 cc/kg 宛を猫の股静脈内から 5 分おきに注射し注射回数を 12 回に達せしめた。そして注射前と注射開始後 10 分おきに採血した。故に偶数回目の注射が終了

した直後に採血したことになる。おのおのについて ChE 活性を測定した成績は第 1 表に示す如くである。

この表の各例の成績につきそれぞれ注射前値と注射後の値を比較するために、これを推計学の T -test を用いて検査したところが両者間に有意の差は認められなかつた。それ故本報告の以後の実験結果において、強心配糖体の溶媒として用いたアルコール・リンゲル液の ChE 活性に及ぼす影響は無視出来ることが判明した。

2. Digitoxin 注射群: Digitoxin 注射による猫血清 ChE の活性の変化は第 2 表に示したとおりであるが、この有意性を検定すると、注射前値と注射回数が 4 回の時の ChE 値の差については

$$t = \frac{44.1 - 40.0}{\sqrt{4 \times \frac{9.5}{4} + 4 \times \frac{8.2}{4}}} \cdot \sqrt{\frac{5 \times 5(5+5-2)}{5+5}} = 3.162 \dots$$

$$t = 3.162 \dots > 2.306$$

で有意の活性の増加が認められる。

また注射回数 8 回の時の活性と注射前のそれとを比較すると

第 3 表 g-Strophanthin の猫血清 ChE に及ぼす影響

動物番号	性別	体重 (kg)	致死量 (mg/kg)	注射前値	注 射 回 数					
					2	4	6	8	10	12
201	♂	2.7	0.082	3.87	4.07	4.08	4.38			
202	♂	3.0	0.130	4.00	4.17	4.21	4.34	4.13	4.34	4.34
203	♂	2.3	0.098	4.00	4.00	4.40	4.40	4.54		
204	♂	4.0	0.100	4.20	4.20	4.31	4.48	4.48		
205	♂	3.0	0.090	4.30	4.31	4.50	4.44	4.60		
平均			0.100	4.07	4.15	4.30	4.41	4.43		

実験数値は ACh 分解による CO₂ 産生量 cmm で現わしたものである。

第 4 表 Convallatoxin の猫血清 ChE に及ぼす影響

動物番号	性別	体重 (kg)	致死量 (mg/kg)	注射前値	注 射 回 数					
					2	4	6	8	10	12
301	♂	2.5	0.088	3.43	3.44	3.60	3.80	3.95		
302	♂	3.7	0.073	3.50	3.85	4.00	4.20			
303	♂	3.3	0.072	3.50	3.73	4.10	4.35	4.40		
304	♂	3.8	0.063	4.00	4.20	4.50	4.65	4.80		
305	♂	3.5	0.070	3.60	3.74	3.92	4.05	4.20		
平均			0.073	3.60	3.80	4.02	4.21	4.34		

実験数値は ACh 分解による CO 産生量を cmm で現わしたものである。

$$t = \frac{35.9 - 40.0}{\sqrt{4 \times \frac{9.5}{4} + 4 \times \frac{24.78}{4}}} \cdot \sqrt{\frac{5 \times 5 (5 + 5 - 2)}{5 + 5}}$$

$$= 3.162 \dots > 2.306$$

で有意の減少が認められた。

3. **g-Strophanthin 注射群**: g-Strophanthin 注射による猫血清 ChE 活性の変化は第 3 表に示したとおりである。即ち注射回数増加に伴い ChE 活性は増加の傾向を示す。注射回数 8 回の場合と注射前の場合の ChE 活性の間の差の有意性を検討すると

$$t = \frac{44.3 - 40.7}{\sqrt{4 \times \frac{11.96}{4} + 3 \times \frac{13.35}{3}}} \cdot \sqrt{\frac{5 \times 5 (5 + 5 - 2)}{5 + 5}}$$

$$= 3.106 \dots > 2.365$$

となり両者間には有意の差があり従つて 8 回目注射後における活性増加は確かである。

4. **Convallatoxin 注射群**: Convallatoxin 注射による猫血清 ChE 活性の変化は第 4 表に示したとおりである。即ち注射回数増加に伴い ChE 活性は増加の傾向を示している。注射回数 8 回の場合と注射前の場合の活性との間の差の有意性を検すると

$$t = \frac{43.4 - 36.0}{\sqrt{4 \times \frac{20.9}{4} + 3 \times \frac{38.69}{3}}} \cdot \sqrt{\frac{5 \times 4 (5 + 4 - 2)}{5 + 4}}$$

$$= 3.94 \dots > 2.365$$

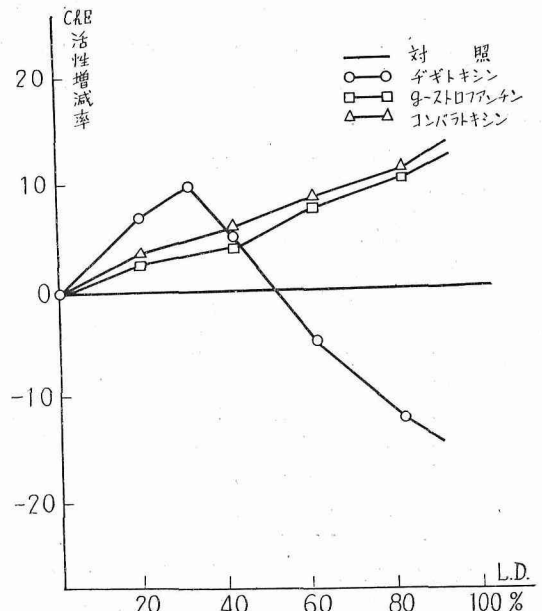
となり、両者間には有意の差があり、即ち ChE 活性の増加が認められる。

總括並びに考案

以上の実験結果を総合すると、Digitoxin, g-Strophanthin 及び Convallatoxin の 3 者は猫血清 ChE に対して必ずしも同一効果を及ぼすとはいわれぬ成績となつた。

今実験結果の項に記載した実験数値を総括して、各種強心配糖体の注射量と猫血清 ChE の活性率 (注射前の値を零とし、これよりの増減率を以て示す) 変化を図示すると第 1 図の如くである。即ち本図における縦軸は ChE 活性の変化をその注射前値の百分比で現わし、横軸は強心配糖体の注射量をその実際の致死量から逆算して致死量の百分比で現わしたものである。

対照群即ちアルコール・リンゲル溶液のみの注射では、猫血清 ChE 活性に何等認めるべき変化も起らなかつた。これは換言すると、本実験で使用した強心配糖体の溶媒であるアルコール・リンゲル溶液の猫血清 ChE に対する影響は無視出来ることを意味している。この点については既に Gomori & Coutinho¹²⁾ が ChE の組織化学的検索法によつて、組織をアルコール処理すると多くの Esterase は不活



第 1 図 強心配糖体と猫血清 ChE との関係

性になるが ChE のみはその活性を失なわないことを報告しているが、私の実験結果も彼等の所見を裏付けている結果となつた。

さらに私は本実験の頭初から失血による血清 ChE 活性の変化について注意深く観察したが、本実験における如く採血総量が 10cc 前後である場合には血清 ChE 活性は採血量によつて何等の影響をも受けないことを確めた。

Digitoxin 注射群は注射開始とともに ChE の活性率の上昇を示し、この上昇は注射量の増加とともに著明になり致死量の約 30% が注射される頃には活性率は最高に達した。この時の活性は注射前値に比して平均 10% 増であつた。次いで注射量が増すと ChE 活性は逆に漸次低下し、注射量が 50% 位の時には活性は注射前値に復し、注射量がそれ以上になるに従つて益々低下し死亡直前の活性は注射前値より平均 12% 減であつた。

g-Strophanthin 注射群では注射開始後直ちに活性率の上昇が認められ、これは死亡直前まで継続した。死亡直前の最高活性は注射前値の 10% 増であつた。この結果から Digitoxin と g-Strophanthin とではその作用態度が異なつてゐることが想像される。

Convallatoxin 注射群は g-Strophanthin の場合と全く同様の結果を招来した。

私はこの実験の経過中に聴診的に実験猫の心臓状態を観察したが、この所見と ChE 活性に関する所見とを比較対照した結果から、Digitoxin とよつて惹起された徐脈及び房室分離の現象は時期的に血清 ChE 活性の抑制開始時と略

々一致して始つていることが推定された。しかし *g-Strophanthin* 及び *Convallatoxin* では房室分離の時期と血清 *ChE* 活性の増加との間に一定の関係を見出すことは困難であつた。

強心配糖体と血清 (非特異的) *ChE* との関係を追究した報告は文献上には見当たらないので、私の実験結果と他の学者の成績とを比較検討することは出来ないが、ここに *ChE* と心臓活動との関係については考察を行う必要がある。

従来 *ChE* は *ACh* の神経生理学的意義と関連してその興味を喚起されたために、*ChE* に関する生理学的、薬理学的研究の主力は神経生理に関連したものであつた。しかるに *ChE* が特異的、非特異的 *ChE* に酵素化学的見地より分類されるに及び、*Ach* の分解作用にその何れが主要な役割をなしているかについて研究が行われるに至つた。Sawyer & Hollinshead¹⁴⁾ は筋肉、神経系のように *Ach* の生理的に分泌される場所には特異的 *ChE* のみが存在することを認め、猫の頸部交感神経節のように両 *ChE* が存在するところでは節前線維が切断されて変性を起すと特異的 *ChE* の方は消失するが非特異的 *ChE* の方は消失しないことを認めた。さらに Mendel & Rudney¹⁵⁾⁻¹⁸⁾ 及び Nachmansohn & Rothenberg¹⁹⁾ は薬理学的に *Ach* と酷似した作用を持つ *Acetyl-β-methylcholine* は特異的 *ChE* のみによつて分解されることを認めた。また Mendel & Rudney^{15), 16)}, Alles & Hawes⁷⁾ 等は両 *ChE* の活性の最高値を示す基質濃度を追究した結果、生体内の *Ach* のように稀薄な濃度においては特異的 *ChE* が *ACh* の分解に重要な役割を果していると主張した。さらにまた Hawkins & Gunter²⁰⁾ は *ChE* 阻害剤を用いて非特異的 *ChE* を完全に抑制しても何等著明な症状が現われず、組織の特異的 *ChE* を阻害して始めて種々の症状が出ることを認めた。さらに Koelle²¹⁾, Mazur & Bodansky²²⁾, Nachmansohn & Feld²³⁾ は DFP を用いて同様の事実を確認した。

以上の諸報告から見ても神経系及び筋肉における *ACh* 代謝に直接的関係を有しているのは特異的 *ChE* であり、その意味においては非特異的 *ChE* は生理的意義が少ないということとは疑のないところである。しかもほぼ類似の機序で心臓活動に影響を及ぼす数種の強心配糖体が猫血清 *ChE*—非特異的 *ChE*—にそれぞれ異なつた効果を及ぼすことから、私は心臓活動と血清 *ChE* 活性との間に直接的な関連のないこと、及び強心配糖体は血清 *ChE* を介してその強心作用を発揮するものではないことを本実験により確認出来たと信ずる。

結 論

1. 猫に *Digitoxin*, *g-Strophanthin* 及び *Convalla-*

toxin の一定量宛を注射しながら一定時間間隔で採血し、その血清の *ChE* 活性を Ammon 氏法で測定した。

2. *Digitoxin* は投与量の増加に伴なつて血清 *ChE* の活性を増し、30% LD が注射された時に活性は一旦最高に達し、次いで増量とともに活性は漸次抑制されて活性曲線は急激に低下して行つた。

3. *g-Strophanthin* 及び *Convallatoxin* は注射開始後から血清 *ChE* の活性を促進し死亡直前まで注射量の増加と平行して活性増加が認められた。

4. 要するに血清 *ChE* 活性に及ぼす作用の上から見ると *Digitoxin* は *g-Strophanthin* または *Convallatoxin* とは異なつた態度を取つた。従つて強心配糖体の心臓作用が非特異的な血清 *ChE* の活性に及ぼす作用と関連を有するか否かは不明である。

(昭和 30. 7. 5 受付)

文 献

- 1) Wollenberger, A.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **97**, pt. 2, 311 (1949).
- 2) Wollenberger, A.: *Science* **113**, 64 (1951).
- 3) Wollenberger, A. & Karsch, M. L.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **105**, 477 (1952).
- 4) Wollenberger, A.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **219**, 408 (1953).
- 5) Helmreich, E. u. Nowy, H.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **213**, 411 (1951).
- 6) Fischer, C.S., Sjoerdsma, A. & Johnson, R.: *Circulation* **5**, 496 (1952).
- 7) Alles, G. A. & Hawes, R. C.: *J. Biol. Chem.* **133**, 375 (1940).
- 8) Hawes, R. C. & Alles, G. A.: *J. Lab. Clin. Med.* **26**, 845 (1941).
- 9) Augustinsson, K. B.: *Acta physiol. Scandinav.* **15**, Suppl. 52 (1948).
- 10) Whittaker, V. P.: *Physiol. Rev.* **31**, 312 (1951).
- 11) Koelle, G. B.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **100**, 158 (1950).
- 12) Ammon, R.: *Pflügers Arch.* **233**, 486 (1934).
- 13) Gomori, G. & Coutinho, H. B.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **83**, 809 (1953).
- 14) Sawyer, C. H. & Hollinshead, W. H.: *J. Neurophysiol.* **8**, 137 (1945).
- 15) Mendel, B., Mandell, D. B. & Rudney, H.: *Biochem. J.* **37**, 473 (1943).
- 16) Mendel, B. & Rudney, H.: *Biochem. J.* **37**, 59 (1943).
- 17) Mendel, B. & Rudney, H.: *Science* **98**, 201 (1943).
- 18) Mendel, B. & Rudney, H.: *Science* **100**, 499 (1944).

- 19) Nachmansohn, D. & Rothenberg, M. A. : J. Biol. Chem. **158**, 653 (1945).
20) Hawkins, R. D. & Gunter, T. M. : Biochem. J. **40**, 192 (1946).
21) Koelle, G. B. : J. Pharmacol. Exp. Therap. **87**, 421 (1946).
22) Mazur, A. & Bodansky, O. : J. Biol. Chem. **163**, 261 (1946).
23) Nachmansohn, D. & Feld, E. A. : J. Biol. Chem. **171**, 715 (1947).

Summary

A definite dose of digitoxin, g-strophanthin or convallatoxin was injected every five minutes into vein of cat till heart standstill occurred. Cholinesterase activity was determined by manometric techniques on serial samples of cat serum obtained every ten minutes.

Digitoxin produced an acceleration of cholinesterase activity in small doses and an inhibition in large doses. G-strophanthin and convallatoxin accelerated the cholinesterase activity parallel with the increase of doses administered, without producing an inhibition of cholinesterase until heart standstill occurred. It is, therefore, concluded that digitoxin exerts a different effect on serum cholinesterase as compared to g-strophanthin or convallatoxin. But, it is unknown whether the effect of cardiac glycosides on nonspecific serum cholinesterase is related with the heart action or not.

(Received July 5, 1955)