Kodak Gray Scale
Kodak Color Control Patches
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black

新規ジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の創薬と薬理学的特徴の解析

－特に副作用軽減と抗血小板作用を目指して－

加瀬則子

－目次－

緒言　1

第１編　副作用軽減を目指したジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の創薬と薬理　5

　第１章　FRC-8411の選出　7

　第２章　FRC-8411の薬理学的特徴の解析　19

第２編　抗血小板作用を有するジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の創薬と薬理　28

　第１章　F-0401の選出　29

　第２章　F-0401の薬理学的特徴の解析－ウサギ血小板凝集抑制作用－　35

　第３章　F-0401の薬理学的特徴の解析－イヌ摘出血管に対する作用－　48

　第４章　F-0401の薬理学的特徴の解析－作用機作－　60

第３編　総括　76

謝辞　84

参考文献　85

緒言

わが国の死因の第一位は「悪性新生物」であるが、第二位、第三位は循環器系疾患である「虚血性心疾患」と「脳血管性疾患」であり、この後者二つを合わせると「悪性新生物」よりはるかに多くなる1)。また、高血圧は直接あるいは間接に心疾患、脳血管疾患の主要な危険因子となり、加齢と共に増加することが知られている。急速に高齢化社会へと移行しているわが国においては、これら循環器系疾患の占める割合が益々高くなると予想されている。特にわが国では欧米諸国と異なり、どの地域でも脳卒中の発症率が心筋梗塞より3～6倍高く2)、高血圧を初めとした循環器系疾患に対する適切な管理と治療が重要であり、死亡率の低下と共に、高齢化社会の最大の社会問題のひとつである「寝たきり」、「痴呆」防止が急務であると考えられる。高血圧は病的に動脈内圧が高いことにより、標的臓器としての心血管系に合併症を起こす疾患であり、降圧療法の目的は単に血圧を下げるに止まらず、それら合併症の改善と予防にある。そこで厚生省では、数年前から薬物療法に加えて大々的に減塩キャンペーンを行い、食事療法による血圧コントロールを試みた結果、この20～30年の間に、日本人の血圧水準は著しく低下している2)。しかし、食塩摂取過剰による農村型高血圧の減少により最高血圧は低下したものの、最低血圧は依然として高く、農村型高血圧に代わり、生活環境の欧米化による肥満やストレスの増加などによる都市型の高血圧が増えているとされ、わが国の推定高血圧患者は依然2000万人を越えると言われている1)。また、降圧療法により、それまでは大部分が死の転帰をとっていた重症や悪性の高血圧、それに基づく出血性の脳卒中あるいは心不全などの直接的な圧負荷による合併症は予防できることが明らかとなったが、動脈硬化性疾患である脳梗塞や心筋梗塞などの一次予防については効果が明らかではない。動脈硬化を誘発する因子としては、高血圧の他に、高コレステロール血症、高血糖、喫煙などが挙げられるが、虚血性疾患が減少しにくい理由として、降圧療法の第一選択薬あるいは第二選択薬として汎用されたサイアザイド系利尿薬3, 4, 5)やβブロッカー6, 7)の中に脂質代謝あるいは糖代謝に悪影響を及ぼし、動脈硬化の危険因子を増大する副作用を有する薬物があることが考えられる。従って高血圧の治療薬としては、このような

代謝系に悪影響を及ぼさない薬剤が望まれている。

一方、脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患は、降圧療法だけでは防げないとも言われている8)。動脈硬化の発症には、血管壁のみならず、血流及び血液成分の変化が関与しており、高血圧、高コレステロール血症及び喫煙は血管のアテローム変性による肥厚を、高血糖は血液粘度の増加による血流の変化を起こし、血液成分では、血小板の機能亢進が重要と考えられている9)。特に血小板は、血小板を主体とした二次血栓を形成すると共に、血小板活性化によってもたらされる増殖因子が血管平滑筋細胞を増殖し、血管の肥厚にも関与していることから、抗血小板薬には血管の肥厚と二次血栓の形成に対する抑制効果が期待される10) 。

以上のことから、「代謝系に対して悪影響を及ぼさない降圧剤」及び「血管拡張作用に加え、抗血小板作用を併せ持つ薬剤」の開発は「高血圧」の治療や「動脈硬化」の進展予防を通じて、「虚血性心疾患」や「脳血管性疾患」といった重篤な合併症の予防に寄与すると思われる。

一方、細胞内Ca^{2+}は殆ど全ての細胞において、その機能の制御に基本的な役割を果している。Ca拮抗薬は元々1969年 Fleckenstein により、冠血管拡張薬開発の過程に提唱された概念11) であり、その後すぐに降圧薬としての有効性が確認された。血圧は心拍出量と総末梢血管抵抗の積で表され、高血圧症の9割を占める本態性高血圧症の血圧の上昇は総末梢血管抵抗の増加によるとされている。血管平滑筋細胞の収縮・弛緩にはCa^{2+}がセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしており、細胞内Ca^{2+}濃度の増加がトリガーとなり、血管の収縮が引き起こされる。本態性高血圧患者では、細胞内Ca^{2+}濃度が増加しているために細動脈の緊張度が高く、総末梢血管抵抗が増加していると考えられている12) 。従って、心筋及び動脈平滑筋細胞膜のCa^{2+}チャネルに選択的に作用し、細胞内への過剰なCa^{2+}の流入を阻止するCa拮抗薬は、高血圧の治療薬として合目的であるといえる。また、Ca拮抗薬には、サイアザイド系薬物に見られるような代謝系への悪影響は報告されていない13) 。

Ca拮抗薬は構造の違いから、6種類に分類されているが、代表的なものとして、フェニルアルキルアミン(PPA) 系、ベンゾチアゼピン(BZT) 系、ジヒドロピリジン(DHP) 系の3つが挙げられる。Ca拮抗薬は、主に電位依存性のL型Ca^{2+}チャネルに作用するが、それぞれのCa拮抗薬のチャネルに対する親和性が異なることなどから、臓器特異性が発現するとされている。降圧薬としては、心臓に対する抑制作用が少なく、血管に選択的に作用する薬剤が望ましい。

そこで著者らは、血管に選択的に作用するDHP骨格のエステル側鎖を変換させることにより、様々なタイプの化合物を合成し、医薬品としての可能性を探索すべく研究を開始した。その結果、優れた降圧作用を有する FRC-8411((±)-(E)-3-phenyl-2-propen-1-yl methyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyrydinedicarboxylate, Fig.1)を見出すことに成功した。

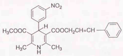


Fig.1 Chemical structure of FRC-8411.

また、動脈硬化の進展に係わる様々な細胞の活性化においてCa^{2+}が重要な役割を果たすことから、降圧作用を介した間接的な作用の他に、Ca拮抗薬が動脈硬化の進展を直接抑制する可能性があり、動脈硬化の治療薬となり得るのではないかと期待されている。現在のところ動脈硬化は①血管内皮細胞の傷害、②続いて起こる血管透過性亢進と内皮細胞への血小板の粘着と凝集、③凝集した血小板の放出する増殖因子による中膜平滑筋細胞の内膜への移行と増殖、さらに血管壁へ侵入した単球マクロファージによる大量の脂肪の貪食による泡沫細胞の形成と蓄積、④血管壁へのCa^{2+}の沈着、によって形成されると考えられている。Ca^{2+}はこれら動脈硬化の進展に関与する血管平滑筋、内皮細胞、単球マクロファージ、血小板などの多くの細胞の細胞内セカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている14) 。従って、Ca拮抗薬に抗動脈硬化作用が期待され、1981年ニフェジピンによる高コレステロール食負荷ウサギを用いた実験

的動脈硬化に対する抑制作用をはじめとする多くのCa拮抗薬の抗動脈硬化作用が検討されてきた15-19)。しかし、その効果は報告によりまちまちで、効果ありとする薬剤でも、その投与量は常用量（降圧量）の数十倍という大量であることが知られている。特に動脈硬化の進展に重要な役割を果たす血小板に対するCa拮抗薬の効果は、報告によって一定しない。そこで、著者らは良好な血管拡張作用を有するDHP誘導体に、より積極的な抗血小板作用を併せ持たせることを試みた。その結果、DHP骨格のエステル側鎖にイミダゾール環を導入した化合物F-0401((±)-(E)-3-[4-(1-imidazolyl)methylphenyl]-2-propen-1-yl methyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylate, Fig.2)に優れた抗血小板作用を見出した。

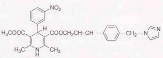


Fig.2 Chemical structure of F-0401.

本研究では、第１編で、既存のCa拮抗薬の副作用軽減を目指した降圧薬FRC-8411 について、第２編では、血管拡張作用と、抗血小板作用を併せ持ったDHP 系Ca拮抗薬 F-0401 について、それぞれの選出の経緯とその薬理作用の特徴を既存のCa拮抗薬と比較検討した結果について述べる。

第１編　副作用軽減を目指したジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の創薬と薬理

序論

Ca拮抗薬は、強力な冠血管拡張作用を有する狭心症治療薬として、最初に塩酸ベラパミル（ベラパミル、 PPA系）が、続いて塩酸ジルチアゼム（ジルチアゼム、BZT系）、ニフェジピン（DHP系、いずれもFig.3)の順に上市され、特にスパズムによる異型狭心症に著効を示した20) ことから、世界的に使用されるようになった。

これらのCa拮抗薬は、いずれも電位依存性Ｌ型Ca^{2+}チャネルに作用し、Ca^{2+}の細胞内流入を抑制することによって薬効を現すが、構造によってそれぞれ結合部位が異なり、PPA系は心臓の心刺激伝導系に作用し、抗不整脈薬として使用されている。また、ジルチアゼム及びニフェジピンは、重症高血圧患者の血圧のコントロールに効果を発揮し、患者の予後を改善したことから、降圧薬として注目されるようになった。しかし、降圧薬として用いた場合に、BZT 系化合物であるジルチアゼムは心臓に強く作用し、徐脈や房室ブロックなどを引き起こすことが問題とされている21,22)。　一方、典型的な冠動脈拡張薬であるニフェジピンは、血管に選択的に作用し、心臓抑制による重篤な副作用を起こさないことが認められた。それ以来、血管選択性の高い薬剤の開発を目指して、DHP 誘導体の研究が行われるようになった。しかし、ニフェジピンや塩酸ニカルジピン（ニカルジピン、 Fig.3）に代表される初期のDHP 誘導体は、作用発現が急激で強力なために、血圧低下によるめまいや反射性交感神経興奮に基づく頻脈などの副作用が問題とされている。また、降圧作用の持続時間が短いこと等の問題を有している23) 。

そこで我々は、作用発現が緩徐で持続性に優れた降圧作用を有し、かつ安全性の高い薬剤の開発を目指し、血管に選択的に作用するDHP系化合物ニフェジピン及びニカルジピンをプロトタイプとし、様々な化合物を合成し検索を行った。その結果、新規DHP誘導体 FRC-8411 を見出した24) 。

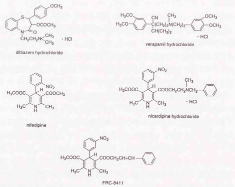


Fig.3 Chemical structure of FRC-8411 and reference compounds.

本研究では、初めにFRC-8411選出までの経緯（第１章）を、次にFRC-8411の降圧薬としての特徴を明らかにするために、各種高血圧モデル動物における降圧作用を、降圧薬として用いられているCa拮抗薬ニフェジピン、ニカルジピン及びジルチアゼムと比較検討した結果を、また、薬物の結晶型の違いにより、生物学的利用率の異なることが知られていることから、FRC-8411の結晶型の違いと降圧作用との関係を併せて検討した結果（第２章）について述べる。

第１章　FRC-8411の選出

第１節　序論

DHP 誘導体ニフェジピン及びニカルジピンをプロトタイプとして化合物を合成し、第一世代のCa拮抗薬の欠点を克服した薬物の開発を目指して検索を行った。選出方法として、初めに自然発症高血圧ラットを用い、静脈内投与において作用発現が緩徐で持続性に優れた降圧作用を有し、かつ消化管からの吸収性に優れた化合物を選択し（１次スクリーニング）、次に、それらの心臓に対する作用を正常血圧ラットの血圧と心拍数の変化から判定して、心臓抑制作用の弱い化合物を選出し（２次スクリーニング）、最後にマウスを用いた静脈内投与におけるLD_{50}値を確認し（３次スクリーニング）、安全性の高い化合物の選出を試みた。

第２節　実験方法

１．実験動物

ddy 系マウス（日本エスエルシー）、Wistar系ラット（日本チャールス・リバー）、自然発症高血圧ラット(SHR, 日本チャールス・リバー）いずれも雄性動物を用いた。

２．使用薬物

被験薬としてD-05以下全38化合物及びニフェジピン、塩酸ニカルジピン（ニカルジピン、以上自社合成）、塩酸ジルチアゼム（ジルチアゼム、室町化学）を用いた。

その他薬物として、α－クロラロース及びウレタン（以上和光純薬）、polyoxyethylene(60)hydrogenated castor oil(HCO-60,日光ケミカルズ）を用いた。

３．SHR における降圧作用

平均血圧140mmHg 以上のSHR(12～22週齢)を用いた。SHRは中尾ら[25] の方法に従い、エーテル麻酔下、薬物投与用ポリエチレンカニューレを尾静脈ある

いは十二指腸内に、血圧測定用ポリエチレンカニューレを尾動脈を介して腹大動脈に、それぞれ挿入し、ケージに拘束した。麻酔覚醒後、全身血圧を観血的に、圧トランスジューサー（MPU-05, 日本光電）及び圧歪みアンプ（AP-601G, 日本光電）を介して測定した。同時に血圧脈波に瞬時心拍ユニット(AT-601G, 日本光電）を同調させて心拍数を測定した。被験薬はHCO-60に溶解後生理食塩液にて希釈し、30μg/kgを静脈内投与し、5%アラビアゴム溶液に懸濁し、1mg/kg（体重1kg あたり2ml)を十二指腸内に投与した。

4．麻酔正常血圧ラットの血圧、心拍数に及ぼす効果

体重250 ～400gの正常血圧ラットを用い、α－クロラロース及びウレタン(80mg+500mg/kg）の腹腔内投与によって麻酔した。血圧及び心拍数は3.と同様に測定した。被験薬は、3.と同様に溶解し、予め尾静脈内に挿入したポリエチレンカニューレを介して順次高用量を累積的に投与した。心拍数(HR)を50 beats/min減少させる薬物量(ED_{50})、収縮期圧(SBP) 及び拡張期圧(DBP) を20mmHg下げる薬物量(ED_{20})を求め、その比(HR ED_{50}/DBP ED_{20}, SBP ED_{20}/DBP ED_{20}) をもって心臓抑制作用の指標とした。

5．マウスにおける急性毒性

体重15～30g のマウスを用い、被験薬は3.と同様に溶解し、尾静脈より投与した。up and down 法により、静脈内投与の急性毒性量(LD_{50})を求めた。

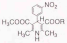
第３節　実験結果

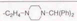
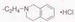
(1)SHRにおける降圧作用

対照薬ニフェジピン及びニカルジピンは30μg/kg *i.v.* 投与で、最大降圧（Max∆MBP）は19及び58 mmHg で1 分以内にpeakに達し、15分以内に半減する降圧作用を示した。

KAD-5, DS-1401(Table 1), D-34, D-37(Table 2), FRC-8411, D-61(Table 3), D-46, D-51, D-29, D-73及びD-77(Table 4) に最大降圧40mmHg以上で、peakが1.2 分以上であり、かつ作用が半減するまでの時間が20分以上である著明な降圧作用が認められた。

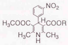
Table 1 Hypotensive effects of several compounds (30μg/kg *i.v.*) in spontaneously hypertensive rats(SHR)



Compound	Structure R	Max△MBP (-mmHg)	Peak (min)	T 1/2 (min)
KAD-5		47	4.9	52
KEMN-1		45	1.3	17
KEMN-5	$-C_2H_4-SPh$	53	1.2	14
DS-1401	$-C_4H_8-SPh$	60	1.3	25
Nifedipine	$-CH_3$	19	0.9	12
Nicardipine	$-C_2H_4N(CH_3)CH_2Ph$	58	0.6	10

MBP:mean blood pressure, Peak:time reaching to maximum response, T1/2:half life of the response

Table 2 Hypotensive effects of several compounds (30 μg/kg *i.v.*) in spontaneously hypertensive rats(SHR)

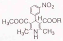

NO2
H3COOC
COOR
H3C
N
H
CH3

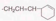
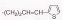
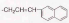
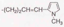
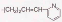
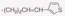
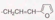
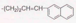
Compound	Structure R	Max△MBP (-mmHg)	Peak (min)	T 1/2 (min)
D-32	$-CH_2CH{=}CH_2$	68	0.3	3
D-33	$-CH_2C{\equiv}CH$	55	0.3	1.5
D-36	$-C_2H_4C{\equiv}CH$	34	0.3	1.3
D-34	$-CH_2CH{=}CHCH{=}CHCH_3$	71.7	1.4	43.3
D-37	$-C_6H_{13}$	54.3	1.3	20.3
D-15	$-CH_2CH{=}CHC_3H_7$	50	0.4	8
D-39	$-C_2H_4CH{=}CHC_2H_5$	55	1.0	4
D-42	$-CH_2CH{=}CHCH{=}CHC_2H_5$	50	1.5	14
D-44	$-CH_2CH{=}CHCH{=}CHPh$	53	2.3	16

MBP:mean blood pressure, Peak:time reaching to maximum response, T1/2:half life of the response

---

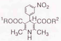
Table 3 Hypotensive effects of several compounds (30 μg/kg *i.v.*) in spontaneously hypertensive rats(SHR)


NO2
H3COOC
COOR
H3C
N
H
CH3

Compound	Structure R	Max△MBP (-mmHg)	Peak (min)	T 1/2 (min)
FRC-8411	$-CH_2CH{=}CHPh$	45.0	1.7	24.3
D-28	$-(CH_2)_2CH{=}CHPh$	63.3	1.3	16
D-04	$-CH_2CH{=}CPh_2$	12	13.0	0
D-05	$-C_2H_4CH{=}CPh_2$	20	2.5	30
D-45		57.5	2.3	15.5
D-61		60	1.6	20
D-71		25	5.0	30
D-50	 -(CH2)2CH=CH- N CH3	35	0.8	3
D-30		20	0.2	5
D-64		47	1.5	10
D-47		50	0.8	18
D-66		50	3.0	17

MBP:mean blood pressure, Peak:time reaching to maximum response, T1/2:half life of the response

Table 4 Hypotensive effects of several compounds (30 μg/kg *i.v.*) in spontaneously hypertensive rats(SHR)



Compound	Structure		Max△MBP (-mmHg)	Peak (min)	T 1/2 (min)
	R^1	R^2			
FRC-8411	$-CH_3$	$-CH_2CH=CHPh$	45.0	1.7	24.3
D-27	$-CH_3$	$-CH_2C(Ph)=CHPh$	5	0	0
D-06	$-CH_3$	$-CH_2CH=C(CH_3)Ph$	44	1.0	6.5
D-46	$-CH_3$	$-CH(CH_3)CH=CHPh$	75	5.0	130<
D-51	$-CH_3$	$-CH(Ph)CH=CHPh$	45	56.0	240<
D-29	$-CH_3$	$-CH_2C(CH_3)=CHPh$	50	1.8	27
D-54	$-C_2H_5$	$-CH_2CH=CHPh$	50	2.5	12
D-53	$-(CH_2)_2OCH_3$	$-CH_2CH=CHPh$	35	2.0	5
D-73	$-CH(CH_3)CH=CHPh$	$-CH_2CH=CHPh$	67	48	120<
D-77	$-(CH_2)_2OPh$	$-CH_2CH=CHPh$	43	7.0	45
D-59	$-(CH_2)_2SC_2H_5$	$-CH_2CH=CHPh$	28	5	120
D-72	$-(CH_2)_2SPh$	$-CH_2CH=CHPh$	35	10	90<
D-79	$-(CH_2)_2N(CH_3)_2$	$-CH_2CH=CHPh$	15	1.0	-
D-80	$-CH_2CH=CHPh$	$-CH_2CH=CHPh$	32	27	90<

MBP:mean blood pressure, Peak:time reaching to maximum response, T1/2:half life of the response

---

また、KAD-5,D-34,FRC-8411,D-46,D-51,D-29及びD-77には1mg/kg *i.d.*で、30mmHg以上の降圧作用が認められ、その*i.d./i.v.*は0.5 以上であった(Table 5）。

(2）麻酔正常血圧ラットの血圧、心拍数に及ぼす効果

対照薬ジルチアゼムのHR ED_{50} /DBP ED_{20}, SBP ED_{20}/DBP ED_{20}は1.6 及び6.5 であった。

それに対し、KAD-5,D-34及びFRC-8411はその値が両者とも10以上と心臓抑制作用が弱いことが認められた(Table 6）。

Table 5 Hypotensive effects of several compounds(30 μg/kg *i.v.* and 1 mg/kg *i.d.*)in spontaneously hypertensive rats(SHR)

Compound	Max △ MBP (-mmHg)		Ratio *i.d./i.v.*
	30 μg/kg *i.v.*	1 mg /kg *i.d.*	
KAD-5	47	33	0.70
DS-1401	60	20	0.33
D-34	71.7	65	0.91
D-37	54.3	25	0.46
FRC-8411	45	30	0.67
D-61	60	25	0.42
D-46	75	89	1.19
D-51	45	82	1.82
D-29	50	65	1.30
D-73	67	5	0.08
D-77	43	48	1.12

MBP:mean blood pressure.

Table 6 Effects of several compounds on diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP) and heart rate(HR) in anesthetized normotensive rats

Compound	HR ED$_{50}$ / DBP ED$_{20}$	SBP ED$_{20}$ / DBP ED$_{20}$
KAD-5	20.6	10.9
D-34	57.3	209.4
FRC-8411	67,7	277.2
D-46	5.8	6.9
D-51	3.0	1.9
D-29	9.1	19.2
D-77	3.3	10.5
Diltiazem	1.6	6.5

DBP ED$_{20}$:dose causing 20mmHg reduction of DBP, SBP ED$_{20}$:dose causing 20mmHg reduction of SBP, HR ED$_{50}$:dose causing 50 beats/min reduction of HR.

Table 7 LD$_{50}$ values of several compounds in mice

Compound	LD$_{50}$ value (mg/kg *i. v.*)
KAD-5	8.2
D-34	20
FRC-8411	> 150
Nifedipine	5
Nicardipine	10

(3) マウス急性毒性

静脈内投与における、対照薬ニフェジピン、ニカルジピンのLD$_{50}$値は、10mg/kg以下であった。

それに対し、FRC-8411のLD$_{50}$値は150mg/kg以上とその差が著明であった(Table 7)。

第4節　考察

DHP系Ca拮抗薬ニカルジピンをプロトタイプとして、DHP 環の3位のエステル残基に様々な基を導入し、発現が緩徐で、持続時間が長い降圧作用を示し、心臓抑制作用が弱くかつ安全性に優れた化合物の創製を目指し検索を行った。

1. スクリーニング方法の開発

スクリーニングとしては、操作が簡便で効果判定の容易な方法で、各スクリーニング毎に化合物がふるい分けられる系であることが望まれる。

1) 1次スクリーニング

1次スクリーニングとしては、麻酔の影響が排除でき、一匹の動物で複数の化合物の効果判定が可能であることから、中尾らの方法に準じてエーテル麻酔下にカニュレーションを施し、ケージに拘束したラットを用い、麻酔覚醒後に化合物をカニューレを介して静脈内投与し、平均血圧の変化を観察した。

ニフェジピン、ニカルジピンの作用を確認したところ、両薬物ともに作用発現が急激で、持続時間が短く、用量依存的な降圧作用を示し、40mmHgの降圧作用が得られる薬物用量(ED$_{40}$)はそれぞれ124.2 及び10.5μg/kg *i.v.* であった。以上のことから、探索化合物の投与量は30μg/kgと規定し、降圧作用の「効力」は最大降圧（Max Δ MBP）を、作用発現の「緩徐性」は最大降圧に達するまでの時間（peak）を、作用の「持続」は最大降圧が1/2 になるまでの時間(T1/2)を、それぞれの指標とした。ニフェジピン及びニカルジピンの peak は1 分以内、T1/2は15分以内であったことから、MaxΔMBPが40mmHg以上でpeakが1.2 分以上かつT1/2が20分以上を基準として、「効力」があり「緩徐」で「持続」的な降圧作用を有する化合物の選出を行った。さらにそれらの消化管

からの吸収能を評価する目的で、予め十二指腸内に装着したカニューレを介して化合物を投与(1mg/kg)してMaxΔMBP値を求め、静脈内投与における効果との解離の小さいもの　即ちMaxΔMBPの*i.d./i.v.* 比の大きい(0.5以上）化合物を「消化管吸収能」が高い化合物として選出した。

2)２次スクリーニング

１次スクリーニングにおいて基準を満たし選出された化合物について、心臓に対する抑制作用の弱い化合物を選出する目的で２次スクリーニングを設定した。即ち正常血圧ラットに化合物を静脈内投与し、血圧と心拍数へ影響する用量の差から、心臓に対する抑制作用の強弱の判定を試みた。血圧表示には、収縮期圧（最高血圧）及び拡張期圧（最低血圧）があるが、収縮期圧は心臓のポンプ機能を反映し、拡張期圧は血管の緊張状態を反映すると考えられる。そこで化合物を累積的に投与し、心拍数(HR)を50 beats/min下げる薬物量(ED_{50})、収縮期圧(SBP）及び拡張期圧(DBP）を20mmHg下げる薬物量(ED_{20})を求め、その比(HR ED_{50}/DBP ED_{20}，SBP ED_{20}/DBP ED_{20}）が大きいほど「血管拡張作用」が強く、小さいほど「心臓抑制作用」が強いことを示す指標とした。ジルチアゼムの作用を検討したところ、HR ED_{50}/DBP ED_{20}，SBP ED_{20}/DBP ED_{20} が1.6 及び6.5 と小さいことが確認された。そこで、その値が両者とも10以上を基準として、「心臓抑制作用が弱い」化合物の選出を試みた。

3)３次スクリーニング

生体に用いた時の総合的な安全性を予測する目的で、２次スクリーニングで選出された化合物の静脈内投与におけるLD_{50}値を、マウスを用いて検討し、より安全性の高い化合物の選出を試みた。

２．スクリーニング結果

1)１次スクリーニング（降圧作用）

静脈内投与で「効力」「緩徐性」「持続」の３つの基準を満たし、かつ「消化管吸収能」を有する化合物の選出を目指して探索を行った。

化合物としては、ニフェジピンの光に対する不安定さが、ニトロ基の位置が２位であることに起因していることから、ニトロ基は３位とし、DHP 骨格の３位エステル残基を主に変換した化合物（約200 個）について探索を行った。本研究では、代表的なものについて結果を示した。

初めに①ニカルジピンの構造を参考にDHP 環の３位エステル残基に窒素を導入した化合物（KEMN-1,KAD-5）からは KAD-5を選出した(Table 1）。構造のオリジナリティを期待した含イオウ化合物（KEMN-5，DS-1401)では、吸収能が低い傾向が見出された（Table 5)。

次に、３位エステル側鎖の炭素数を伸長させると持続性は増すが、消化管からの吸収能が低下することが知られていることから、膜の透過性を高めることで、それらを克服できるのではないかと考え、不飽和炭化水素を導入した化合物群の探索を行った。②不飽和炭化水素を導入した化合物群(Table 2）からはD-34を選出した。ここでは、二重結合(D-32,-15,-38,-39)あるいは三重結合(D-33,36）を１つ有する化合物群に比べ、共役ジエン結合を有する化合物(D-34,-42,-44)の方が緩徐性に優れ、特にD-34は炭素数が同じ飽和炭化水素化合物(D-37)に比べ、効力、持続性、吸収性に優れている傾向が見出された。また、末端にフェニル基を有する(D-44)と緩徐性が増す傾向が顕著であった。そこで、③二重結合に芳香族環を導入した化合物群(Table 3）の探索を試み、末端の芳香族基としてフェニル基を有するFRC-8411を選出した。共役ジエン構造の末端二重結合を中性の芳香族基に変換した化合物(FRC-8411,D-71,D-61)はいずれも、緩徐性が増加し、塩基性の芳香族基の場合(D-50,-30)には、緩徐性、持続性ともに低下する傾向が認められた。

さらにFRC-8411の周辺化合物の探索(Table 4）から、④シンナミル基のα、β及びγ位にメチルあるいはフェニル基を導入した化合物群(D-27,～-51)からはD-29,-46,-51を選出した。これらの消化管吸収能が顕著であった。また、導入した位置によって作用が大きく異なり、α位に導入した化合物（D-46,-51）では、特に持続の長いことが見出された。さらに⑤３位をシンナミルエステル基に固定し、DHP 骨格５位エステル側鎖としてバルキーな基を導入した化合物群からはD-77を選出した。５位の変換は、緩徐性と持続性を増すが、効力が弱い傾向が見出された(Table 4）。

以上より、含窒素化合物(KAD-5）、共役ジエン構造を有する化合物(D-34)、

シンナミルエステル基を有する化合物(FRC-8411,D-29,-46,-51, D-77）の７化合物を選出し、以下のスクリーニングを行った。

2)２次スクリーニング（心臓抑制作用）

心臓抑制作用が弱い化合物として、KAD-5, D-34 及びFRC-8411の３化合物を選出した。

シンナミルエステル基を有する化合物群の内、α位にメチルあるいはフェニル基を導入した化合物（D-46,-51）、DHP 骨格５位エステル側鎖として末端に二重結合とフェニル基を導入した化合物（D-77）は、心臓抑制作用が強く、これらは、いずれも、１次スクリーニングにおいて強力で、緩徐性、持続性が特に顕著であったことから、その降圧作用が主に心臓抑制作用に起因していることが示唆された。

3)３次スクリーニング（マウスLD_{50}）

さらにKAD-5,FRC-8411及びD-34の安全性の評価を行ったところ、FRC-8411は150mg/kg以上と安全性の高いことが著明であった。

以上のことから、シンナミルエステル基を有する化合物 FRC-8411 を緩徐で、持続的な降圧作用を示し、心臓抑制作用が少なくかつ安全性の高い化合物として選出した。

第２章　FRC-8411の薬理学的特徴の解析

第１節　序論

降圧薬の候補として選出した新規ジヒドロピリジン誘導体 FRC-8411 の薬理作用を、第一世代のCa拮抗薬ニフェジピン、ニカルジピン及びジルチアゼムと比較検討した。

第２節　実験方法

１．実験動物

ddy 系マウス（日本エスエルシー）、Wistar系ラット（日本チャールス・リバー）、自然発症高血圧ラット(SHR, 日本チャールス・リバー）、日本白色種ウサギ（東京実験動物）及びHartley 系モルモット（日本エスエルシー）を用いた。

２．使用薬物

被験薬としてFRC-8411及びニフェジピン、塩酸ニカルジピン（ニカルジピン、以上自社合成）、塩酸ジルチアゼム（ジルチアゼム、室町化学）及びベラパミル（室町化学）を用いた。

その他薬物として、deoxycorticosterone acetate(DOCA,Sigma)、ethylene glycol bis(β-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA, ナカライテスク)、α－クロラロース及びウレタン(以上和光純薬)、ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール、大日本製薬)、polyoxyethylene(60) hydrogenated castor oil(HCO-60,日光ケミカルズ)を用いた。

３．高血圧モデルラットにおける降圧作用(経口投与)

正常血圧ラットとしてWistar系ラット(NR,10～14週齢）を、高血圧ラットとしてSHR(12～22週齢）、２腎１クリップ型腎性高血圧ラット（RHR)及びDOCA-食塩高血圧ラット(DHR）を用いた。RHR は、NR(6週齢）の左腎動脈をスリット幅 0.2mmでクリップして作製した。DHR はNR(6週齢）の左腎を摘出後、週１回DOCA(10mg/kg *s.c.*)を投与し、1%食塩水を与えて作製した。RHR 、DHR 共に

1か月以上経過し収縮期圧が160mmHg 以上の個体を用いた。

使用前一晩絶食したラットを予め10分間38～40℃の予熱箱に入れ保温した後、ラットの収縮期圧を非観血式血圧測定装置（PE-300, Narco）を用いて測定した。同時に血圧脈波に瞬時心拍ユニットを同調させて、心拍数を測定した。

被験薬は5%アラビアゴム溶液に懸濁し、ラットの体重1kg 当たり 5mlを経口投与した。測定は被験薬投与前及び投与後1, 3, 7, 及び24時間に行った。対照群には、5%アラビアゴム溶液を投与した。

４．麻酔正常血圧ラットの血圧、心拍数及び心電図に及ぼす効果

体重250 ～400gの正常血圧ラットを用い、α－クロラロース及びウレタン（80mg+500mg/kg）の腹腔内投与によって麻酔した。血圧及び心拍数は第１編、第１章、第２節、3. の方法に準じて測定した。

被験薬は、HCO-60に溶解後生理食塩液にて希釈し、順次高用量を、予め尾静脈内に挿入したポリエチレンカニューレを介して投与した。心拍数(HR)を50 beats/min減少させる薬物量(ED_{50})、拡張期圧(DBP）を20mmHg下げる薬物量(ED_{20})を求め、その比(HR ED_{50}/DBP ED_{20})をもって心臓抑制作用の指標とした。

また、同様に処置したラットの心電図を第Ⅱ誘導により高感度ACアンプ(AB-631G, 日本光電)を介して記録し、PQインターバルを測定した。被験薬は、予め頸静脈内に挿入したポリエチレンカニューレを介して投与した。

５．Ca拮抗作用

(1) 摘出ウサギ胸部大動脈標本

体重2.5 ～3kg のウサギを用い、ペントバルビタールナトリウム（35mg/kg *i.v.*）で麻酔後、速やかに胸部大動脈を摘出し、螺旋状標本を作製した。

標本は、混合ガス(95% O_2+5% CO_2）を通気し、37℃に保った30mlのKrebs-Henseleit 液(KH 液, 118.4mM NaCl, 4.7mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1.2mM $MgSO_4$, 1.2mM KH_2PO_4, 25.0mM $NaHCO_3$、11.7mM グルコース）中に2gの負荷を掛けて懸垂した。収縮力はストレンゲージ(TB-612T, 日本光電）を用いて等尺性に測定した。

標本をKH液中で60分間安定させた後、Ca^{2+}を除去したKH液（0.1mM EGTA添加

Ca^{2+}除去KH液）中に80分、更に等張性にNa^+ をK^+ で置換し、Ca^{2+}を除去した80mMKCl 液(80mMKCl-Ca^{2+} 除去KH液, 43.1mMNaCl, 80mMKCl, 1.2mM$MgSO_4$, 1.2mMKH_2PO_4, 25mM $NaHCO_3$, 11.7mM グルコース）中にて30分間放置後、$CaCl_2$(0.01～3mM)を累積的に適用し、濃度反応曲線を得た。その後、標本をCa^{2+}除去KH液にて洗浄し、80mM KCl- Ca^{2+}除去液中にて30分間放置、更に被験薬を30分間処置した後、再び$CaCl_2$ の濃度反応曲線を得た。被験薬１濃度につき１標本を用いて実験を行い、定法[26,27] に従いpA_2 値を求めた後、全濃度のpA_2 値の平均値±標準誤差を算出した。被験薬は、HCO-60に溶解後、精製水にて希釈して使用した。

(2) 摘出モルモット盲腸紐標本

体重250～300gのモルモットより速やかに盲腸紐を摘出した。標本は、混合ガス(95% O_2+5% CO_2）を通気し、32℃に保った30mlのKH液中に、0.5gの負荷を掛けて懸垂した。収縮力はアイソトニックトランスジューサー(TD-112S, 日本光電）を用いて等張性に測定した。

標本をKH液中で40分間、Ca^{2+}除去KH液で40分間安定させた後、a)と同様に濃度反応曲線を求め、pA_2 値を算出した。被験薬はa)と同様に溶解した。

第３節　実験結果

(1) 高血圧モデルラットにおける降圧作用（経口投与）

SHRにおいて、FRC-8411は経口投与後１～３時間にピークを有し、７時間まで続く、緩徐で持続的な降圧作用を示した。その作用は用量依存的で低用量及び高用量においても緩徐性及び持続性は失われなかった（Fig.4)。

FRC-8411 はRHR 及びDHR でも、SHR と同様に緩徐で持続的な降圧作用を示したのに対し、対照薬の降圧作用のピークは投与後１時間で、持続も短い傾向が見られた（Fig.5)。また、FRC-8411の降圧作用は高血圧ラット(SHR）では、正常血圧ラット(NR)に対する作用の15.8倍強く、対照薬に比し、高血圧ラットに対する選択性が高かった（Table 8 ）。

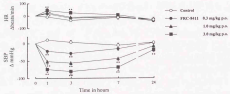


Fig. 4 Effects of FRC-8411 on systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Each value indicates the mean ± S.E. of 10 animals.
*: p<0.05, **: p<0.01 as compared with the control.

Table 8 Effects of FRC-8411 and reference compounds on systolic blood pressure(SBP) in normotensive rats(NR), spontaneously hypertensive rats(SHR), renal hypertensive rats(RHR) and DOCA-salt hypertensive rats(DHR)

Compound	ED_{20}	ED_{40} (mg/kg *p.o.*)			Ratio
	NR	SHR	RHR	DHR	NR/SHR
FRC-8411	6.3	0.4	0.7	0.8	15.8
Nifedipine	5.7	1.5	1.6	1.4	3.8
Nicardipine	3.5	3.5	2.6	2.3	1.0
Diltiazem	44.6	22.2	31.4	31.8	2.0

ED_{20} or ED_{40} : dose causing 20 or 40mmHg reduction of SBP at 1h after oral administration.

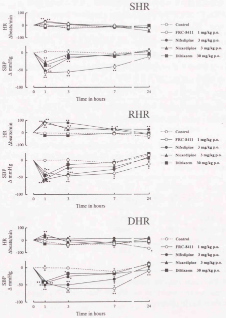


Fig. 5 Effects of FRC-8411 and reference compounds on systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) in spontaneously hypertensive rats (SHR), renal hypertensive rats (RHR) and DOCA-salt hypertensive rats (DHR). Each value indicates the mean ± S.E. of 10 animals.
*: p<0.05, **: p<0.01 as compared with the control.

(2) 麻酔正常血圧ラットの血圧、心拍数及び心電図に及ぼす効果

FRC-8411、ニフェジピン及びニカルジピンはいずれも、用量依存的に拡張期圧を下げ、心拍数を減少させたが、降圧作用の方が低用量から発現した。降圧作用に対する心拍数減少作用は、FRC-8411が最も弱く、心拍数を50beats/min減少させるためには、拡張期圧を20mmHg下げる薬物量の27.9倍量が必要であった。一方ジルチアゼムの作用は、降圧作用に比し心拍数減少作用の方が強く、より低用量から発現した（Table 9 ）。

また、ベラパミル、ジルチアゼム及びニカルジピンはラットの心電図に影響を与え、PQインターバルを延長させたが、FRC-8411及びニフェジピンは最高用量(3mg/kg *i.v.*）でも心電図に影響を及ぼさなかった（Table 9)。

Table 9 Effects of FRC-8411 and reference compounds on diastolic blood pressure (DBP), heart rate(HR) and PQ interval of ECG in anesthetized normotensive rats

Compound	DBP ED_{20} (μg/kg *i.v.*)	HR ED_{50} (μg/kg *i.v.*)	$\frac{\text{HR } ED_{50}}{\text{DBP } ED_{20}}$	PQ interval ED_{20} (μg/kg *i.v.*)
FRC-8411	11.6	323.6	27.9	>3000
Nifedipine	182.3	>3000	> 16.5	>3000
Nicardipine	19.8	169.8	8.6	322.8
Diltiazem	477.2	192.2	0.4	1644.4
Verapamil	—	—	—	154.7

DBP ED_{20}:dose causing 20mmHg reduction of DBP, HR ED_{50}:dose causing 50 beats/min reduction of HR, PQ interval ED_{20}:dose causing 20% increase in PQ interval.

(3)Ca 拮抗作用

FRC-8411のCa^{2+}収縮に対するpA_2 は、ウサギ胸部大動脈、モルモット盲腸紐でそれぞれ8.4 及び7.1 と、大動脈標本における作用の方が強かった。それに対し、対照薬のpA_2 は、全て盲腸紐＞大動脈であった（Table 10）。

Table 10 Effects of FRC-8411 and reference compounds on $CaCl_2$-induced contraction in K^+ -depolarized guinea pig taenia coli and rabbit aorta

Compound	pA_2 Taenia coli	pA_2 Aorta	Ratio Taenia coli/Aorta
FRC-8411	7.1 ±0.2(11)	8.4±0.2 (7)	20.0
Nifedipine	9.8 ±0.1(10)	9.3±0.2(10)	0.3
Nicardipine	10.7 ±0.2 (8)	9.7±0.2 (8)	0.1
Diltiazem	7.4 ±0.2(10)	6.6±0.2 (9)	0.2

Test compounds were added to the bath 30min before the cumulative treatment with $CaCl_2$. Each value represents the mean±S.E. The figure in parantheses indicates the number of experiments.

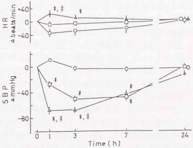


Fig. 6 Effects of FRC-8411 crystal form I and II on systolic blood pressure(SBP) and heart rate(HR) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Each value indicates the mean±S.E. of 15 animals. ○:control, □: FRC-8411 form I (2mg/kg *p.o.*), △: FRC-8411 form II(2mg/kg *p.o.*). *:$p<0.05$ as compared with the control. #:$p<0.05$ as compared with form I.

3．結晶型による降圧作用様式の違い

FRC-8411結晶型Ⅰ（融点140 ℃）及びⅡ（融点121 ℃）いずれも 2mg/kg *p.o.*は，投与後７時間まで続く持続的な降圧作用を示した（Fig.６ ）。

しかし、その作用を経時的に見ると、結晶型Ⅰ型は投与後３時間に、Ⅱ型は１時間に作用のピークがあり、作用発現までの時間が異なっていた。また、作用強度もⅠ型よりⅡ型の方が強かった（Fig.６ ）。

第４節　考察

(1)FRC-8411 の薬理作用

FRC-8411の降圧作用を、第一世代のCa拮抗薬であるニフェジピン及びニカルジピン及びジルチアゼムと比較検討した。高血圧モデルとしては、本態性高血圧症モデルとしてSHR を、腎性高血圧症モデルとしてRHR を、体液貯留型高血圧症モデルとしてDHR をそれぞれ用いた。SHR では、第一世代のCa拮抗薬はいずれも作用発現が急激で投与後３時間には回復する短い降圧作用を示したのに対し、FRC-8411は経口投与においても、静脈内投与時と同様に、緩徐で持続的な降圧作用を示し、その作用は用量依存性を保っていた。これらの作用は、RHR, DHRでも同様の傾向を示したが、いずれの薬物でも持続時間が伸びる傾向が見られた。これらの動物では、腎機能が低下しており、薬物の排泄率が低下していることが知られており、それが持続時間が延びたことに影響しているのかも知れない。また、FRC-8411の降圧作用は正常血圧ラットに比べ、高血圧ラットに対する作用の方が強く、高血圧動物に対する感受性が高かった。青木ら12) は、高血圧の進展と維持に、血管平滑筋細胞へのCa^{2+}の異常な流入が重要な役割を果たしており、高血圧動物では細胞内Ca^{2+}が異常に増加していると報告している。この説に従えば、血管のCa^{2+}流入を選択的に阻害する薬物は、高血圧動物に対し選択的な降圧作用を示すと予想される。FRC-8411は、他薬に比べより血管選択性が高くなり、高血圧選択性が高くなったのかも知れない。

また、スクリーニングでは収縮期圧についても計測したが、副作用として問題とされるのが、心拍数の減少であることから、ここでは、心拍数減少作用を心臓抑制作用とし、拡張期圧の低下を血管拡張作用とし、収縮期圧についての検討は行わなかった。検討の結果、ジルチアゼム及びカルジピンは心臓に対する作用が強く、同時に正常血圧ラットと高血圧ラットで降圧作用の効力に差がなく、高血圧動物に対する選択性に乏しかった。このことは、血管選択性の高いCa拮抗薬の方が、高血圧選択的に作用するという説を支持していると思われる。また、臨床の場においては、正常血圧を下げにくいことを意味しており、FRC-8411はより安全性の高いものと言えよう。一方のジルチアゼムとニカルジピンは、抗不整脈薬ベラパミルに見られる、心電図PQインターバルの延長を起こし、心刺激伝導系にも作用を及ぼすことが示唆された。これら心臓に対する抑制作用は、ジルチアゼムを降圧剤として使用した場合には徐脈や房室ブロック、心不全などを引き起こすとして問題とされている。FRC-8411はPQインターバルにも影響を及ぼさず、心臓に対する抑制作用が弱いので、この点でもより安全性の高い薬物と言えよう。

FRC-8411は、ウサギ大動脈及びモルモット盲腸紐標本におけるCa^{2+}収縮反応曲線を右に平行移動させ、その作用はモルモット盲腸紐よりウサギ大動脈標本において強かった。対照に用いたCa拮抗薬の作用が、いずれもモルモット盲腸紐標本における作用の方が強かったことから、FRC-8411は消化管平滑筋に比べ、血管平滑筋に対する選択性が高いことを示している。Ca拮抗の副作用のひとつに、便秘が挙げられていることから、消化管平滑筋に対する抑制作用の少ないことは、副作用軽減の意味から有用性が高いものと思われる。

(2) 結晶型による降圧作用の違い

粉体のＸ線解析により、FRC-8411には２つの結晶型が存在することが認められている。SHR に粒子径が同一で結晶型が異なる２種類のFRC-8411を経口投与すると、いずれも降圧作用を示したがその作用を経時的に見ると、作用発現までの時間が異なり、Ⅱ型は作用発現が急激で作用強度も強かった。そこで、投与後３時間にピークを有するⅠ型を選んだ。また、静脈内投与すると作用に差が見られなかったことから、経口投与における作用の違いは、ラットの消化管内における結晶型の溶解性の違いによるものである可能性が示唆された。

以上のことから、FRC-8411は高血圧動物に対し選択的で、緩徐で持続性に富む降圧作用を示し、心臓抑制作用が弱く、副作用の少ない新規Ca拮抗薬であることが認められた。

第２編　抗血小板作用を有するジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の創薬と薬理

序論

Ca拮抗薬は、その血管拡張作用により、主として虚血性心疾患や高血圧の治療薬として用いられてきた。一方、脳梗塞や一過性脳虚血発作などの脳血管障害では血管系の機能が変化しているだけでなく、血小板が主体を成す血栓形成が病態に大きく関与していると考えられ、その予防と治療に抗血小板薬が有効とされている。Ca^{2+}は血小板凝集においても重要な細胞内セカンドメッセンジャーであると考えられており、多くのCa拮抗薬に抗血小板作用が報告されているが、評価が一定しない。

一方、代表的な抗血小板薬としては、シクロオキシゲナーゼ(CO)を阻害して、強力な血小板凝集惹起物であるトロンボキサンA_2(TXA_2)の産生を抑えるアスピリンの評価が確立しているが、CO阻害薬はTXA_2産生系のみならず、凝集抑制作用を有するプロスタグランジンI_2(PGI_2)の産生も抑制するいわゆる"アスピリンジレンマ"が問題とされる28)。そのため、TXA_2産生を特異的に抑制するTXA_2合成酵素阻害薬に抗血小板薬としての有用性が期待されている。

そこで著者らは、血管拡張作用を有するDHP誘導体に、血小板凝集抑制作用を併せ持たせることを目的に、TXA_2合成酵素阻害作用を有する構造を導入した種々化合物を合成し29)、検索を試みた結果、DHP骨格のエステル側鎖にイミダゾール環を有するF-0401を見い出した。

本研究では初めに、F-0401を選出した経緯（第１章）を、次に、血小板凝集抑制作用（第２章）、血管拡張作用（第３章）を、最後にその作用機序（第４章）について検討した。

第１章　F-0401の選出

第１節　序論

多くのTXA_2合成酵素阻害薬に関する研究の結果、イミダゾール或いはピリジン等の含窒素芳香族複素環式基の構造自体で、その作用を発現すること30)が知られており、その誘導体であるオザグレルナトリウム（オザグレル，小野薬品工業，Fig.７）が血小板凝集抑制作用を有するものとして、すでに上市されている。オザグレルはTXA_2合成酵素の阻害を介して、血小板凝集を抑制すると共に、血管攣縮を抑制することにより、クモ膜下出血後の脳血管攣縮とそれに伴う脳虚血障害の改善及び脳血栓症に有効とされている31)。

そこで著者らは、Ca拮抗作用に基づく血管拡張作用に、TXA_2合成酵素阻害による血小板凝集抑制作用を併せ持たせることを意図して、主にDHP骨格のエステル側鎖に含窒素芳香族複素環式基を導入した化合物を合成し、ウサギ大動脈標本のKCl収縮に対する弛緩作用（血管拡張作用）、ウサギ血小板のコラーゲン凝集に対する抑制作用（TXA_2合成酵素阻害による血小板凝集抑制作用の指標）を調べ、両作用を併せ持つ化合物の検索を行った。

第２節　実験方法

1.実験動物

体重2.1 ～2.7kg の日本白色種雄性ウサギ（日本医科学動物）を用いた。

2.使用薬物

被験薬として、N-06他13化合物及びニフェジピン、ニカルジピン及びFRC-8411（以上、自社合成）を用いた。薬物及び試薬としてコラーゲン（京都第一化学）、クエン酸ナトリウム(和光純薬）、polyoxyethylene (60) hydrogenated castor oil(HCO-60,日光ケミカルズ）、ジメチルスルホキシド(DMSO,和光純薬)、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール，大日本製薬）を用いた。

3. ウサギ大動脈KC1収縮弛緩作用

ウサギをペントバルビタールナトリウム(35mg/kg *i.v.*)にて麻酔後、頸動脈を切断放血致死せしめ、直ちに胸部大動脈を摘出し、螺旋状標本を作製した。標本は混合ガス(95%O_2+5%CO_2)を通気し、37℃に保った30mlのKrebs-Henseleit 液（KH液，第１編に準じる）中に懸垂した。収縮力はアイソメトリックトランスジューサー(TB-651T, 日本光電）を用い等尺性に測定し、張力用アンプ（EF-651G,日本光電)を介して記録した。静止時の張力負荷は2gとした。

標本はKH液中で60-120分間安定した後、30mM KC1を適用し収縮を得、収縮が安定したところで被験薬（最終溶媒濃度 0.01%）を加え、90分後の反応から下降法にて弛緩率を求めた。

4. ウサギ血小板凝集抑制作用

Bornら32) の方法に従って行った。すなわち、ウサギの頸動脈より3.8%クエン酸ナトリム1容に対し9容(45ml）を採血し、200×g 、20℃で15分間遠心分離した上清を多血小板血漿(PRP)とした。更にそれを1500×g 、20℃で10分間遠心分離して乏血小板血漿(PPP)を得た。PRPは自動血球計数器(MEK-4150,日本光電）にて血小板数を測定した。

凝集反応はPRP 200μ1に対し生理食塩液又は被験薬溶液10μ1を加え、37℃で10分間インキュベートした後、コラーゲン(5μg/ml, 最終濃度）を10μ1加え、アグリコメーター(PAT-4A,二光バイオサイエンス)を用いて測定した。

生理食塩液処置群の最大凝集率を100%とした時の被験薬処置群の最大凝集率を求め、被験薬による抑制率を算出した。

被験薬及びニフェジピンはDMSOに溶解後、同量のHCO-60/エタノール(1:1)溶液に混和し、ニカルジピンは精製水に溶解後、それぞれ生理食塩液に希釈して用いた。溶媒の最終濃度はそれぞれ0.5%とした。

第３節　実験結果

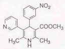
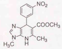
1. ウサギ大動脈KC1収縮弛緩作用

10^{-6}MでF-0401, CAP-04,05,20,25に50%以上の弛緩作用が認められた。一方、対照薬であるニフェジピン、ニカルジピン及びFRC-8411の弛緩はそれぞれ91.1, 100 及び83.9%と著明であった（Table 11,12)。

2. ウサギ血小板凝集抑制作用

10^{-4}MでF-0401には50%以上のコラーゲン凝集抑制作用が認められた。一方、対照薬であるニフェジピン、ニカルジピン及びFRC-8411の抑制率はそれぞれ14.6, 17.3, 14.4%と著明ではなかった（Table 11,12)。

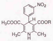
Table 11 Pharmacological effects of several compounds

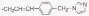
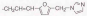
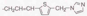
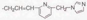
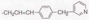
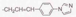
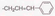
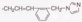
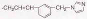
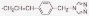
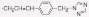
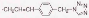
Compound	Structure	Relaxation(%) 1)	Inhibition(%) 2)
N-06		40	19.1
DIP-01		0	0
Nifedipine		91.1	14.6
Nicardipine		100	17.3

1) : Relaxation (%) of isolated rabbit aorta by the compound (10^{-6} M) under KCl (30 mM)-induced contraction. Each value was represented 90 min after the compound administration. N = 2 - 3.

2) : Inhibitory effects of the compound (10^{-4} M) on collagen (5 μg/ml)-induced platelet aggregation in rabbit PRP. Collagen was added to PRP after incubation (10 min) with each compound.

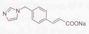
Table 12 Pharmacological effects of several compounds



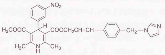
Compound	Structure R	Relaxation(%) [1]	Inhibition(%) [2]
F-0401		62.1	55.1
CAP-04		76.4	35
05		69.4	32.3
25		88.3	22.5
02		39.7	23.5
03		35.3	33.2
FRC-8411		83.9	14.4
D-31PE		15.3	16.1
CAP-20		68.8	32.3
21		37.8	29.5
09		48.2	11.1
10		0	6
11		0	7

1) : Relaxation (%) of isolated rabbit aorta by the compound (10^{-6} M) under KCl (30 mM)-induced contraction. Each value was represented 90 min after the compound administration. N = 2 - 3.

2) : Inhibitory effects of the compound (10^{-4} M) on collagen (5 μg/ml)-induced platelet aggregation in rabbit PRP. Collagen was added to PRP after incubation (10 min) with each compound.



Sodium ozagrel



F-0401

Fig. 7 Chemical structure of F-0401 and Sodium ozagrel.

第４節　考察

血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を併せ持つ化合物の創薬を目指し、DHP環にTXA_2合成阻害作用を有することが知られている含窒素芳香族複素環式基を導入した化合物の検索を行った。

DHP環上３位に直接、含窒素芳香族複素環式基であるピリジル基を導入したN-06には、血管拡張作用は認められたが、血小板凝集抑制作用は見出されず、また、イミダゾリル基を縮合したDIP-01には、いずれの作用も確認されなかった。

そこで、血小板凝集抑制作用を高める目的で、TXA_2合成酵阻害剤であるオザグレルの構造を参考に選出したいくつかの構造をDHP環上３位に配したエステル残基として導入した。その結果、イミダゾリルメチルシンナミル基を導入した化合物(F-0401)にKCl収縮弛緩作用と同時にコラーゲン凝集抑制作用が認められた。また、①シンナミル基のフェニル基の代わりにフリーリ基(CAP-04)、

チエニル基(CAP-05)及びピリジル基(CAP-25)を導入した化合物にはKCl収縮弛緩作用のみが認められ、②イミダゾリル基の代わりにピリジル基を導入した化合物(CAP-02)及びメチル基のない化合物(CAP-03)は両作用が弱く、シンナミル基の二重結合部位にピリジル基を導入した化合物(D-31PE)には両作用とも認められなかった。③イミダゾリル基の配置はフェニル基の2位(CAP-20)、3位(CAP-21)に比し、4位(F-0401)の場合にコラーゲン凝集抑制作用が強く、④イミダゾリル基の代わりにトリアゾリル基(CAP-09,10) 及びテトラゾリル基(CAP-11)を導入すると両作用とも低下した。

以上のことから、DHP環上3位エステル残基にシンナミル基を配し、そのフェニル基の4位にイミダゾリルメチル基を導入した構造を有するF-0401が血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を併せ持つ化合物として見出された。この構造は、オザグレル (sodium-(E)-4-[p-(1H-imidazol-1-ylmethyl) phenyl]-2-propenoic acid)の構造の一部をそのままDHP環上に組み込んだ構造であり、それぞれの持つ作用が損なわれずに発現しているものと予想された。また、第1編で延べたように良好な降圧作用を有するFRC-8411のシンナミル基のフェニル基に、イミダゾリルメチル基を導入した構造でもあり、FRC-8411にはない血小板凝集抑制作用が付加された形であるとも言える。

第2章　F-0401の薬理学的特徴の解析－ウサギ血小板凝集抑制作用－

第1節　序論

TXA_2合成酵素阻害作用を発揮することが知られているイミダゾール環を、そのエステル側鎖に有する新規DHP誘導体 F-0401 に血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を見出した。

本研究では、F-0401の血小板に対する作用を明確にするために、ウサギ血小板凝集に対する抑制作用を*in vitro*及び*ex vivo*で、主に既存のDHP誘導体Ca拮抗薬であるニフェジピン及びニカルジピンと、あるいは抗血小板薬のシクロオキシゲナーゼ阻害薬アスピリン及びTXA_2合成酵素阻害薬オザグレルと比較検討を行った。

第2節　実験方法

1.実験動物

体重1.8－2.8kgの日本白色種雄性ウサギ（東京実験動物)を用いた。

2.使用薬物

被験薬としてF-0401、ニフェジピン、ニカルジピン、オザグレル（オザグレルナトリウム）、 CV-3988（以上自社合成）、アスピリン（吉田製薬)を用いた。薬物及び試薬としてplatelet-activating factor(PAF, Avant polar lipid.）、アラキドン酸ナトリウム(AA,Sigma)、コラーゲン、 ADP（以上京都第一化学）、クエン酸ナトリウム（和光純薬）、polyoxyethylene（60）hydrogenated castor oil(HCO-60,日光ケミカルズ）、ジメチルスルホキシド(DMSO,和光純薬)を用いた。

3.*in vitro*血小板凝集抑制作用

Bornら32) の方法に従って行った（第1章に準じる）。

凝集反応はPRP 200μlに対し生理食塩液又は被験薬10μlを加え、37℃で10分間インキュベートした後、PAF(10ng/ml, 最終濃度）、AA(1mM,同）、コラーゲン(5μg/ml, 同）又はADP(5μM,同)を10μl加え、アグリコメーター

(PAT-4A, 二光バイオサイエンス)を用いて測定した。また、閾値レベルAA凝集の実験では、各個体毎に凝集を惹起するAAの最少濃度を求めた後、同様な方法で被験薬の効果を検討した。

生理食塩液処置群の最大凝集率を100%とした時の被験薬処置群の最大凝集率で抑制率を算出し、単回帰直線(Fieller法）よりIC_{50}値を算出した。

F-0401及びニフェジピンはDMSOに溶解後、同量のHCO-60/エタノール(1:1)溶液に混和し、CV-3988はエタノールに、オザグレル、ニカルジピン、アスピリンは精製水に溶解後、それぞれ生理食塩液に希釈して用いた。溶媒の最終濃度はそれぞれ0.5%とした。

4．*ex vivo*血小板凝集抑制作用

ウサギは被験薬毎に投与１、３及び６時間群に分け各群５～６匹とした。採血回数は、原則としてウサギ１個体につき被験薬投与前及び投与後の２回とし、あらかじめ0.4 mlの3.8%クエン酸を満たした注射筒を用いて耳動脈より採血し（3.6 ml）、PRP及びPPPを得た後、３項に従い、凝集惹起物質による反応を観察した。

被験薬はいずれも5%アラビアゴム溶液に懸濁し、体重1kg当たり5 mlを経口投与した。また、対照群には5%アラビアゴム溶液を同様に投与した。１、３及び６時間群とも、被験薬投与前の各凝集惹起物質による最大凝集に対する被験薬投与による抑制率を求めた。注射針を刺入したことによる血小板凝集への影響と薬物の作用を区別するために、実験結果には、薬物投与前後で血小板数に変動のない動物の血小板凝集のみを採用した。有意差の検定は、同一個体間ではpaired t-testで、被験薬間ではDunnettの多重比較を行い、危険率5%以下をもって有意とした。

第３節　実験結果

１．*in vitro*血小板凝集抑制作用

(1)閾値レベルAA凝集に対する作用

AAの血小板凝集惹起の閾値は0.05－0.075mMであった。F-0401(3×10^{-7}～3×10^{-5}M)は、閾値レベルAA凝集を抑制し、その効力はアスピリンの約3倍、オザグレルの約1/3であった（Table 13）。

Table 13　Effects of F-0401, ozagrel and aspirin on rabbit platelet aggregation induced by threshold level(0.05-0.075mM)-arachidonic acid(AA)

Compound	IC_{50}(M)
F-0401	4.3×10^{-6}
Ozagrel	1.1×10^{-6}
Aspirin	1.2×10^{-5}

AA was added to PRP after incubation(10 min) with each compound at 37 ℃. N = 6.

(2)PAF凝集に対する作用

F-0401(3×10^{-7}～1×10^{-4}M)はPAF凝集を抑制し、その効力はCV-3988の約3倍、ニカルジピンの約20倍であった。一方ニフェジピン(3×10^{-4}M)には明らかな抑制が認められなかった（Table 14）。

(3)1mM AA凝集に対する作用

F-0401(3×10^{-5}～3×10^{-4}M)は1mM AA 凝集を抑制し、その効力はアスピリンの約1/2 、オザグレルと同等であった。一方、ニカルジピン、ニフェジピン(3×10^{-4}M)には明らかな抑制が認められなかった（Table 14）。

Table 14 Effects of F-0401 and reference compounds on platelet aggregation in rabbit PRP

	IC_{50}(M)			
Compound	PAF (10ng/ml)	AA (1mM)	Collagen (5μg/ml)	ADP (5 μM)
F-0401	3.4×10^{-6}	1.5×10^{-4}	8.0×10^{-5}	$>3.0 \times 10^{-4}$
Nicardipine	6.6×10^{-5}	$>3.0 \times 10^{-4}$	$>3.0 \times 10^{-4}$	$>3.0 \times 10^{-4}$
Nifedipine	$>3.0 \times 10^{-4}$	$>3.0 \times 10^{-4}$	$>3.0 \times 10^{-4}$	$>3.0 \times 10^{-4}$
CV-3988	1.1×10^{-5}	$>3.0 \times 10^{-4}$	$>3.0 \times 10^{-4}$	$>3.0 \times 10^{-4}$
Ozagrel	$>3.0 \times 10^{-4}$	2.2×10^{-4}	1.5×10^{-4}	$>3.0 \times 10^{-4}$
Aspirin	—	5.4×10^{-5}	2.5×10^{-5}	$>3.0 \times 10^{-4}$

Platelet activating factor(PAF), arachidonic acid(AA), collagen or ADP was added to PRP after incubation(10min) with each compound at 37℃. — : no test. N=6-11.

(4)コラーゲン凝集に対する作用

F-0401(3×10^{-5}～3×10^{-4}M)はコラーゲン凝集を抑制し、その効力はアスピリンの約1/4 、オザグレルとほぼ同等であった。一方、ニカルジピン、ニフェジピン(3×10^{-4}M)には明らかな抑制が認められなかった（Table 14）。

(5)ADP凝集に対する作用

F-0401及びその他の薬物に3×10^{-4}M でも明らかな抑制が認められなかった（Table 14）。

2．*ex vivo*血小板凝集抑制作用

対照群の投与１、３及び６時間後の閾値レベルAA, PAF, 1mM AA, コラーゲン及びADPによって誘発される血小板凝集は、それぞれ投与前値との間に差を認めなかった（Fig.8-12）。

(1) 閾値レベルAA凝集に対する作用

AAの血小板凝集惹起の閾値は0.1～0.3mMであった。 F-0401は10mg/kg及び30mg/kg,*p.o.*で、投与後１時間から抑制傾向を示し、最大抑制率は各々42.5±11.7（６時間後, $p<0.05$)及び50.8±15.1% （３時間後, $p<0.05$)であった。アスピリン群は投与後１時間から３時間まで完全に、６時間後でも89.6±10.5%の著明な抑制作用($p<0.001$)を示した(Fig.8）。また、オザグレル群には投与後１時間に最も強く(84.7±13.3%, $p<0.001$）、６時間後でも有意ではないが51.2±24.4% の著明な抑制が認められたが、ニカルジピン群には明らかな抑制が認められなかった(Fig.8）。

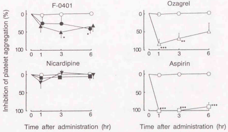


Fig. 8 Effects of F-0401 and reference compounds on *ex vivo* platelet aggregation induced by threshold amount(0.1-0.3mM) of arachidonic acid in rabbits. Each point shows the mean±S.E. of 5-6 rabbits. The value before administration of the compound is regarded as 100%. *:$p<0.05$, **:$p<0.01$, ***:$p<0.001$ as compared with control group.
○. control; ●, F-0401, 10mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30mg/kg, *p.o.*;
■, nicardipine, 1mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3mg/kg, *p.o.*;
△, ozagrel, 30mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100mg/kg, *p.o.* ;

(2) PAF凝集に対する作用

F-0401は10mg/kg, *p.o.*で投与3時間後から、30mg/kg, *p.o.*で投与１時間後から、対照薬に対し有意($p<0.05$)な抑制作用を示した。その作用は投与６時間後でも持続しており、最大抑制率は各々61.3±10.0（６時間後）及び68.1±10.4%（１時間後）であった。アスピリン群(100mg/kg, *p.o.*）、オザグレル群(30mg/kg, *p.o.*）及びニカルジピン群(1及び3mg/kg, *p.o.*）には著明な抑制が認められなかった(Fig.9）。

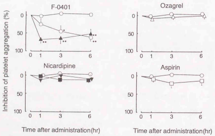


Fig. 9 Effects of F-0401 and reference compounds on *ex vivo* platelet aggregation induced by platelet-activating factor(10ng/ml) in rabbits. Each point shows the mean ±S.E. of 5-6 rabbits. The value before administration of the compound is regarded as 100%. *:$p<0.05$, **:$p<0.01$ as compared with control group.
○. control; ●, F-0401, 10mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30mg/kg, *p.o.*;
■. nicardipine, 1mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3mg/kg, *p.o.*;
△. ozagrel, 30mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100mg/kg, *p.o.*;

---

(3) 1mM AA凝集に対する作用

F-0401は30mg/kg, *p.o.*で投与１時間後から、対照群に対し有意（$p<0.05$）な抑制作用を示し、その作用は投与後３時間まで継続した。最大抑制率は29.2±6.5%（１時間後）であった。アスピリン群は投与後１時間から６時間まで、85%以上の著明な抑制($p<0.001$)を、オザグレル群では投与後１時間から３時間まで続く最大33.1±8.4%（１時間後, $p<0.01$)の抑制を示した。ニカルジピン群には著明な抑制が認められなかった(Fig.10)。

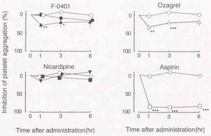


Fig.10 Effects of F-0401 and reference compounds on *ex vivo* platelet aggregation induced by arachidonic acid(1mM) in rabbits. Each point shows the mean±S.E. of 5-6 rabbits. The value before administration of the compound is regarded as 100%. *:$p<0.05$, **:$p<0.01$, ***:$p<0.001$ as compared with control group.
○. control; ●, F-0401, 10mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30mg/kg, *p.o.*;
■. nicardipine, 1mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3mg/kg, *p.o.*;
△. ozagrel, 30mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100mg/kg, *p.o.*;

(4) コラーゲン凝集に対する作用

F-0401群で最大約25%の抑制を示したが、対照群との間に有意差を認めなかった。一方、アスピリン群は投与後1時間から6時間まで、50%前後の著明な抑制作用($p<0.05$)を示し、オザグレル群は投与後3時間に31.1±9.3%の抑制を示した($p<0.01$)。ニカルジピン群には著明な抑制が認められなかった(Fig.11)。

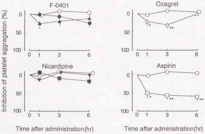


Fig.11 Effects of F-0401 and reference compounds on *ex vivo* platelet aggregation induced by collagen(5 μg/ml) in rabbits. Each point shows the mean ±S.E. of 5-6 rabbits. The value before administration of the compound is regarded as 100%. *:$p<0.05$, **:$p<0.01$, as compared with control group.
○, control; ●, F-0401, 10mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30mg/kg, *p.o.*;
■, nicardipine, 1mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3mg/kg, *p.o.*;
△, ozagrel, 30mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100mg/kg, *p.o.*;

(5) ADP凝集に対する作用

F-0401群は最大約25%の抑制を示したが、対照群との間に有意差を認めなかった。アスピリン群は、投与後6時間に19.3±7.2% ($p<0.05$)の弱い抑制作用を示したが、ニカルジピン及びオザグレル群には抑制が認められなかった(Fig.12)。

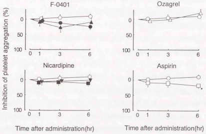


Fig.12 Effects of F-0401 and reference compounds on *ex vivo* platelet aggregation induced by ADP(5μM) in rabbits. Each point shows the mean±S.E. of 5-6 rabbits. The value before administration of the compound is regarded as 100%. *:$p<0.05$ as compared with control group.
○, control; ●, F-0401, 10mg/kg, *p.o.*; ▲, F-0401, 30mg/kg, *p.o.*;
■, nicardipine, 1mg/kg, *p.o.*; ▼, nicardipine, 3mg/kg, *p.o.*;
△, ozagrel, 30mg/kg, *p.o.*; □, aspirin, 100mg/kg, *p.o.*;

第４節　考察

1. *in vitro*血小板凝集抑制作用

　血管に損傷が起こり内皮細胞が剥離し、膠原線維（collagen fiber）などの内皮下組織が露出すると、血小板はこれに粘着し、形態変化をきたし、ADP などの内容物の放出が起こり、血小板が互いに凝集して血小板血栓を形成する。このようにして、血小板は生理的止血及び病的血栓形成における中心的役割を担っている。血小板の活性化を促す物質としては、エピネフリン、コラーゲン、トロンビン、セロトニン、ADP、TXA_2、PAFなどが知られているが、本研究では、F-0401がTXA_2合成酵素阻害作用を期待して合成されたことから、TXA_2に依存した凝集を惹起するAAと、TXA_2と同じように病的な血栓形成に関与する強力な血小板凝集惹起物であるPAF、生理的なリガンドとしてコラーゲンやADPを選び出し、それらによって引き起こされる血小板凝集に対する抑制作用の有無をウサギ血小板を用いて検討した。

　F-0401はAA、PAF及びコラーゲン誘発血小板凝集を抑制したが，ADP凝集に対する抑制は認められなかった。

(1)AA 凝集に対する作用

　AAはTXA_2産生を介して血小板を凝集させる代表的な物質で、その凝集はCO阻害薬あるいはTXA_2合成酵素阻害薬によって抑制される33)　。しかし、前者の場合は、AAが高濃度でも凝集を抑制するのに対し、後者では、TXA_2産生を完全に抑制しても、高濃度のAAによる凝集を完全に抑制できず、閾値濃度のAA凝集に対して、より強い抑制作用を示すとされる。その説明としてTXA_2合成酵素を選択的に阻害すると、過剰に生成したPGH_2が凝集反応に加担するためと考えられている34)　。そこで、我々は高濃度AAに加えて、閾値濃度のAA凝集に対する作用を併せて検討した。その結果、TXA_2合成酵素阻害薬オザグレルは高濃度AA凝集よりも閾値濃度AA凝集に対し約200倍強い抑制作用を示した。一方CO阻害薬アスピリンでは、その比は5倍程度と小さかった。F-0401もオザグレルと同様閾値濃度AA凝集に対し強い抑制作用を示した。F-0401はTXA_2依存性の強い血小板凝集を抑制することが明らかとなった。また、TXA_2受容体にもCa^{2+}流入機構との関連が示唆されており35)　、一部のCa拮抗薬がTXA_2受容体拮抗作用を有することが報告されている36)　が、F-0401はTXA_2の安定なアナログであるU46619誘発の血小板凝集に影響を及ぼさず（未発表データ）、TXA_2受容体拮抗作用を示さないことが確認されている。

(2)PAF凝集に対する作用

　F-0401はPAF凝集を強く抑制し、その効力は代表的PAF拮抗薬CV-3988(武田薬品開発)の約３倍と著明であった。この現象はDHP誘導体の薬理作用としては他に報告がなく、新しい発見である。

　PAFはその名が示すように血小板や好中球などに作用し、極めて強く細胞を活性化するリン脂質であり、炎症反応ばかりでなく、虚血による組織損傷の増悪因子として作動している可能性が示唆されている37)　。PAFによる血小板凝集には、細胞内へのCa^{2+}流入が伴い、PAF受容体とCa^{2+}流入機構に関連のあることが示唆されている38)　。また、PAF 受容体は三量体GTP結合蛋白に共役していて、受容体刺激は直接Ca^{2+}チャネルを開口する一方、ホスホリパーゼCを活性化して細胞膜のホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP_2)の分解を促し、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP_3)と1,2-ジアシルグリセロール(DG)を産生する。IP_3 は細胞内Ca^{2+}貯蔵部位（血小板ではdense tubular system、DTS)からCa^{2+}を動員し、DTS の枯渇はCa^{2+}チャネルを開口することによって細胞外からのCa^{2+}流入を促す。また、DGはCa^{2+}依存性プロテインキナーゼ（Cキナーゼ）の活性化を介して、Ca^{2+}流入に関与すると言われている39)　。従って、Ca^{2+}の流入を抑えることによって、PAF 凝集が抑制されることも考えられる。しかし、血小板にはＬ型Ca^{2+}チャネルが存在しないことから、いわゆるCa拮抗作用ではPAF凝集に対する抑制作用を期待することはできない。しかし、ベラパミル及びジルチアゼムには弱いPAF拮抗作用が報告40)　されていること、本研究においても、ニカルジピンにもF-0401の約1/20と弱いながらもPAF凝集抑制作用が認められたことなどから、F-0401のPAF凝集抑制作用にも部分的にはPAF拮抗作用あるいはＬ型Ca^{2+}チャネル以外のCa^{2+}動態に対する何らかの作用によって引き起こされている可能性が考えられる。

　その後の研究により、F-0401は二種類の光学異性体が存在するが、各々の薬理活性が異なりPAF凝集抑制作用はS体のみに、Ca拮抗作用はR体のみに存在

することが明らかとなった。このことは、F-0401のPAF凝集抑制作用がCa拮抗作用とは独立して発現していることを示しており、S体の立体構造がPAF受容体に結合しやすいコンフォメーションである可能性が考えられる。

以上、F-0401のPAF凝集抑制作用はPAF拮抗作用に基づくものであることが示唆された。

(3) コラーゲン凝集に対する作用

コラーゲンは血小板の受容体に作用して、Cキナーゼ系およびCa^{2+}系を介して細胞内Ca^{2+}濃度を上昇させ、それがTXA_2産生を促し、血小板凝集を惹起する[41] と言われている。このコラーゲン凝集に対し、F-0401はアスピリン及びオザグレルと同様に、高濃度AA凝集に対する作用と同等の効力で抑制作用を示した。また、他のCa拮抗薬には著明な作用が確認されなかったことから、F-0401のコラーゲン凝集に対する抑制は、Ca拮抗作用とは無関係に、TXA_2の産生抑制による可能性が考えられる。

(4)ADP凝集に対する作用

ADPは、ヒト血小板ではadenylate cyclase 阻害による一次凝集とTXA_2産生を介した二次凝集を引き起こす[42] が、ウサギ血小板では一次凝集のみを惹起し、その凝集はphosphodiesterase(PDE)阻害薬で著明に抑制されることが知られている[43] 。今回の我々の成績でも、F-0401及びアスピリンやオザグレルに明らかな抑制は認められなかった。

(5)Ca拮抗作用との関連

Ca 拮抗薬には血小板凝集抑制作用が報告されているが、その作用機序として、L型Ca^{2+}チャネルに対する作用以外のいくつかの可能性（膜安定化作用など）が挙げられている[44-50]。そのため、いずれのCa拮抗薬も、その抗血小板作用はL型Ca^{2+}チャネル拮抗作用に比べて極めて弱いと言われている。我々の成績でも、ニカルジピンのPAF凝集抑制作用の効力は、ウサギ大動脈標本におけるCa拮抗作用の約1/10000であった。それに対し、F-0401の閾値濃度AA凝集及びPAF 凝集抑制作用は、ウサギ大動脈KCl収縮を抑制する用量で発現しうることから、F-0401は既存のCa拮抗薬とは異なり、著明な血小板凝集抑制作用を有するDHP誘導体であると言える。なお、血小板の反応性は種により異なることが知られている[51] が、 F-0401の抗血小板作用はヒトでも再現され（未発表データ）、ヒトでの効果はウサギのそれと一致するものと考えられる。

2. *ex vivo*血小板凝集抑制作用

*in vitro*では、臨床用量をはるかに超えた大量を用いなければ血小板に著明な作用を示さないCa拮抗薬でも、*in vivo*では血小板機能亢進を伴った病態下で、血小板凝集を抑制したと報告されている[47,50]。血管拡張薬には、血圧を低下させることでPGI_2やNOなどの血小板凝集抑制因子を産生する作用があることから、Ca拮抗薬の作用も降圧作用の間接的影響と考えられている[52,53]。そこで、今回我々は、降圧作用を発現しない最大用量をウサギに経口投与し、*ex vivo*におけるF-0401の血小板凝集抑制作用をニカルジピンと比較検討した。F-0401 は*in vitro*の成績を反映して、*ex vivo*においてもPAF ＞閾値濃度AA＞高濃度AA凝集の順に血小板凝集を有意に抑制した。また、F-0401は有意ではないがコラーゲン凝集に対しても抑制傾向を示した。対照薬ではアスピリンとオザグレルに閾値濃度AA、高濃度AA凝集及びコラーゲン凝集に対する抑制作用が認められた。一方、ニカルジピンのPAF凝集抑制作用は、*ex vivo*では再現されなかった。また、CV-3988の経口投与が無効であることは、予備試験段階で確認している。

以上のことから、F-0401は経口投与でも、降圧作用による間接的な作用ではなく、直接血小板に働いて凝集抑制を発現することが明らかとなった。

第３章　F-0401の薬理学的特徴の解析－イヌ摘出血管に対する作用－

第１節　序論

血管平滑筋の収縮蛋白は細胞内Ca^{2+}の増加が誘因となって活性化され、収縮がはじまる。細胞内遊離Ca^{2+}量を変動させる原因として(1) 細胞外からのCa^{2+}流入と(2) 細胞内貯蔵部位からの放出とがあり、これらは細胞膜や細胞内小器官の状態によって制御されている。細胞外からのCa^{2+}流入は(1) 膜に局在する電位依存性のチャネルまたは(2) 薬物受容体に依存するチャネルを介して行われる。また、細胞内のCa^{2+}貯蔵部位は細胞膜の内側に結合したもの、細胞内小器官に取り込まれたものなどがあり多様である。血管の部位または動物種によって、脱分極の深さや膜に局在する受容体が異なること、細胞内Ca貯蔵部位が異なることなどから、細胞内Ca^{2+}量の変動の仕方も多様である。従って、血管の部位によって、薬物反応も多様性に富んでいる。

電位依存性のCa^{2+}チャネルにはＬ、Ｔ、Ｎ、Ｐ及びＱの５つが存在し、血管にはＬ及びＴ型の分布が報告されている54) が、Ca拮抗薬は主にＬ型Ca^{2+}チャネルに作用して、細胞へのCa^{2+}流入を阻止する事によって血管平滑筋を拡張させる代表的な薬物である55) 。中でもDHP 誘導体は血管平滑筋に対する選択性が高いことが知られている。そこで、本研究では、DHP誘導体であるF-0401の血管拡張作用の特性を明らかにすることを目的に、イヌ摘出脳血管および各種末梢血管標本を用い、各種収縮反応に対する抑制作用を脳血管に選択性に作用することが知られている既存のCa拮抗薬と比較検討した。

第２節　実験方法

１．実験動物

体重7～13kgの雌雄雑種成犬を用いた（武田化製場）。

２．使用薬物

被験薬としてF-0401、ニカルジピン、ニモジピン（以上自社合成）及び塩酸フルナリジン（フルナリジン，Sigma)を用いた。

その他薬物として、ペントバルビタ－ルナトリウム（ネンブタール，大日本製薬）、硫酸セロトニンクレアチニン(5-HT，和光純薬）、プロスタグランジン$F_{2\alpha}$($PGF_{2\alpha}$，フナコシ）、ethylene glycol bis (β-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA，ナカライテスク）、dimethyl sulfoxide(DMSO,和光純薬）、polyoxyethylene(60) hydrogenated castor oil(HCO-60，日光ケミカルズ）を用いた。

被験薬はDMSOに溶解後、同量のHCO-60/エタノール(1:1) 溶液を添加混合し、精製水で希釈して用いた。なお、溶媒の最終濃度は各々0.5%とした。

３．摘出血管標本における収縮反応

雑種成犬を、ペントバルビタールナトリウム(25～30mg/kg,i.v.）にて麻酔後、頸動脈に挿入したカニューレより放血致死させ、直ちに脳底動脈（外径0.5～0.8mm)、中大脳動脈(0.5～0.7mm)、椎骨動脈(1.0～1.3mm)、内頸動脈(0.8～1.0mm)、冠動脈(0.6～0.9mm)、腎動脈(1.5～2.0mm)、上腸間膜動脈(2.0～3.0mm)及び大腿動脈(2.0～3.0mm)のいずれかを摘出し、リング状標本を作成した。標本は混合ガス($95\%O_2+5\%CO_2$) を通気し、37℃に保った30mlのKrebs-Henseleit液(KH液，第１編に準じる）中に懸垂した。収縮はアイソメトリックトランスジューサー(TB-651T，日本光電）を用いて測定し、張力用アンプ(EF-601G，日本光電)を介してペン書きレコーダー(U-634，日本電子)上に記録した。静止時の張力負荷は脳底動脈、中大脳動脈及び冠動脈では0.5g、他は1.5gとした。

(1) KCl収縮

各標本はKH液中で60～120分間安定させ、30mM KClによる収縮反応を2～3回得た後、KCl(最終濃度として10～56mM) を累積的に適用し、濃度反応曲線を得た。ついで、被験薬を加えて120分間前処置し（途中60分後に被験薬を含め栄養液を交換）、再び濃度反応曲線を得た。反応は、56mMのKClによる収縮を100%として収縮率に変換した。

(2) $CaCl_2$ 収縮

脳底動脈標本はKH液中で60～90分間安定させ、30mM KClによる収縮反応を２

～３回得た後、$CaCl_2$ を除去したKH液(EGTA 0.1mM 含有）中に30分、更に等張性にNa^+ をK^+ で置換し、$CaCl_2$ を除去した50mM KCl液（73.1mMNaCl, 50.0mMKCl, 1.2mM$MgSO_4$, 1.2mMKH_2PO_4, 25.0mM$NaHCO_3$, 11.7mMグルコース）中にて30分間放置後、$CaCl_2$ （最終濃度として3×10^{-6}～10^{-3}M)を累積的に適用し、濃度反応曲線を得た。標本をCa^{2+}除去KH液にて洗浄し、30分放置後被験薬を含むCa^{2+}除去50mM KCl液にて120分間処置（途中60分後に被験薬を含め栄養液を交換）した後、再び濃度反応曲線を得た。反応は、1×10^{-3}Mの$CaCl_2$ による収縮を100%として収縮率に変換した。

(3) 5-HT収縮

脳底動脈標本はKH液中で60～90分間安定させ、30mM KClによる収縮反応を２～３回得た後、5-HT(最終濃度として1×10^{-9}～1×10^{-6}M)を累積的に添加し、濃度反応曲線を得た。標本洗浄後、被験薬を加え、120分間前処置（途中60分後に被験薬を含め栄養液を交換）した後、再び5-HTによる濃度反応曲線を得た。反応は、1×10^{-6}Mの5-HTによる収縮を100%として収縮率に変換した。

(4)$PGF_{2\alpha}$収縮

脳底動脈標本はKH液中で60～90分間安定させ、30mM KClによる収縮反応を２～３回得た後、$PGF_{2\alpha}$（最終濃度として3×10^{-8}～3×10^{-5}M)を累積的に添加し、濃度反応曲線を得た。標本洗浄後、被験薬を加え120分間前処置（途中60分後に被験薬を含め栄養液を交換）した後、再び $PGF_{2\alpha}$による濃度反応曲線を得た。反応は、3×10^{-5}Mの $PGF_{2\alpha}$による収縮を100%として収縮率に変換した。

KCl, 5-HT 及び$PGF_{2\alpha}$収縮におけるpD'_2値はそれぞれの最大反応に対する抑制が50%に近い濃度より算出[26] した。$CaCl_2$ 収縮におけるpA_2値は常法[26, 27]に従い３濃度から算出し、平均値±標準誤差で表した。有意差検定はStudentの2標本のt-検定ソフト(統計解析、Muscot YDK Co. Ltd.)を用いて算出した。

第３節　実験結果

(1) KCl収縮に対する作用

F-0401は、冠、上腸間膜、腎及び大腿動脈の末梢血管(Fig. 13) 及び脳底、中大脳、内頸及び椎骨動脈の脳支配血管(Fig. 14) のいずれの動脈においても濃度に依存してKCl収縮を抑制した。

F-0401の各動脈におけるpD'_2値は頭蓋内血管（中大脳動脈、脳底動脈）では8.3及びび8.1で末梢動脈（冠、腎、大腿、上腸間膜動脈、6.9 ～5.5)あるい

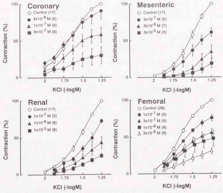


Fig. 13 Effects of F-0401 on KCl-induced contraction in the isolated canine coronary, renal, mesenteric and femoral arteries. F-0401 was applied for 120 min before the KCl treatment. Each point represents the mean ± S.E. The value on parentheses indicates the number of preparations.

は頭蓋外の脳支配血管（内頸動脈; 5.7 、椎骨動脈; 5.6)より明らかに高値を示した。

この頭蓋内血管（脳底動脈）におけるF-0401の効力はニカルジピンの1/6 、ニモジピンの1/3 、フルナリジンの10倍であった(Table 15)。

また、大腿動脈のpD'_2値を１とし、脳底動脈に対する脳血管選択性を求めるとF-0401(126) が最も大きく、次いでフルナリジン(32)、ニカルジピン(5) 及びニモジピン(3)の順であった。同様に脳支配血管における頭蓋内血管の選択性（脳底動脈のpD'_2／内頸動脈のpD'_2）は、F-0401(252)及びフルナリジン(63)がニカルジピン(3)及びニモジピン(2)に比べ明らかな高値を示した。

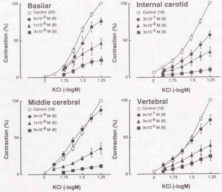


Fig. 14 Effects of F-0401 on KCl-induced contraction in the isolated canine basilar, middle cerebral, internal carotid and vertebral arteries. F-0401 was applied for 120 min before the KCl treatment. Each point represents the mean ± S.E. The value in parentheses indicates the number of preparations.

Table 15 pD'_2 values of F-0401 and reference compounds on KCl-induced contraction of isolated canine arteries

Artery	pD'_2 value			
	F-0401	Nicardipine	Nimodipine	Flunarizine
Coronary	6.9±0.2	8.6±0.1	8.1±0.2	5.9±0.1
Renal	5.9±0.2	7.9±0.2	8.2±0.1	5.5±0.1
Mesenteric	5.5±0.2	7.9±0.1	8.1±0.2	4.3±0.1
Femoral	6.0±0.2	8.2±0.2	8.2±0.1	5.6±0.1
Basilar	8.1±0.1	8.9±0.1	8.6±0.1	7.1±0.2
Middle cerebral	8.3±0.2	8.8±0.1	8.8±0.1	6.7±0.1
Internal carotid	5.7±0.1	8.5±0.2	8.4±0.2	5.3±0.1
Vertebral	5.6±0.1	8.3±0.1	8.1±0.2	4.4±0.2

Arteries were treated with test compound 120 min before the addition of KCl. Each value represents the mean±S.E. of 6～8 experiments.

(2) $CaCl_2$ 収縮

F-0401(3×10^{-9}～3×10^{-8}M)は濃度に依存して脳底動脈標本の$CaCl_2$ 収縮反応曲線を右に平行移動(slope 1.16)させた(Fig.15)。

同様にニカルジピン(3×10^{-10} ～3×10^{-9}M)、ニモジピン(1×10^{-9} ～1×10^{-8}M)及びフルナリジン(1×10^{-8} ～1×10^{-8}M)も各々$CaCl_2$ 収縮反応曲線を右に平行移動させた。

F-0401の効力はニカルジピンの1/13、ニモジピンの1/10、フルナリジンの3倍であった(Table 16)。

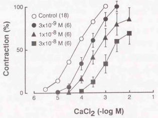


Fig. 15 Effects of F-0401 on $CaCl_2$-induced contraction in the depolarized canine basilar arteries. F-0401 was applied for 120 min before the $CaCl_2$ treatment. Each point represents the mean ± S.E. The value in parentheses indicates the number of preparations.

Table 16 pA_2 values of F-0401 and reference compounds on $CaCl_2$-induced contraction in depolarized canine basilar arteries

Compound	n	pA_2
F-0401	18	8.9±0.1
Nicardipine	18	10.0±0.1
Nimodipine	18	9.9±0.1
Flunarizine	18	8.4±0.1

Arteries were treated with test compound 120 min before the addition of $CaCl_2$. Each value represents the mean±S.E.

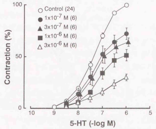


Fig. 16 Effects of F-0401 on 5-HT-induced contraction in the depolarized canine basilar arteries. F-0401 was applied for 120 min before the 5-HT treatment. Each point represents the mean ± S.E. The value in parentheses indicates the number of preparations.

(3) 5-HT収縮

F-0401(1×10^{-7}～3×10^{-6}M)は濃度に依存して5-HT収縮を抑制した(Fig. 16)。

同様にニカルジピン(3×10^{-9}～3×10^{-8}M)、ニモジピン(1×10^{-8}～1×10^{-7}M)及びフルナリジン(1×10^{-7}～1×10^{-6}M)も各々5-HT収縮を抑制した。 F-0401の効力はニカルジピンの1/80、ニモジピンの1/30及びフルナリジンの1/3であった(Table 17) 。

(4)$PGF_{2\alpha}$収縮

F-0401(3×10^{-5}M)はニカルジピン，ニモジピン及びフルナリジン（いずれも3×10^{-5}M)と同様、脳底動脈標本における $PGF_{2\alpha}$収縮反応曲線をわずかに右へ移動させたが有意ではなく、いずれもpD'_2が4.5以下と軽微であった(Table 17, Fig.17)。

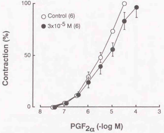


Fig. 17 Effects of F-0401 on PGF2α-induced contraction in the depolarized canine basilar arteries. F-0401 was applied for 120 min before the PGF2α treatment. Each point represents the mean ± S.E. of 6 experiments. The value in parentheses indicates the number of preparations.

Table 17 pD'_2 values of F-0401 and reference compounds on KCl, 5-HT and $PGF_2\alpha$-induced contractions in isolated canine basilar arteries

	pD'_2 value		
Compound	KCl	5-HT	$PGF_2\alpha$
F-0401	8.1±0.1	5.9±0.1	<4.5
Nicardipine	8.9±0.1	7.8±0.1	<4.5
Nimodipine	8.6±0.1	7.4±0.1	<4.5
Flunarizine	7.1±0.1	6.3±0.2	<4.5

Arteries were treated with test compound 120 min before the addition of KCl, 5-HT and $PGF_2\alpha$. Each value represents the mean± S.E. of 6 ~8 experiments.

第4節　考察

F-0401の血管拡張作用を明らかにすべく、イヌ摘出血管標本を用い既存のCa拮抗薬と比較検討を行った。

脳支配血管として脳底、中大脳、椎骨及び内頸動脈を、末梢血管として冠、腎、上腸間膜及び大腿動脈を用いKCl収縮に対する作用を検討し、その作用強度より血管部位別選択性を推定した。その結果、F-0401のpD'_2値は頭蓋内血管（脳底及び中大脳動脈）で8.1～8.3、頭蓋外血管（内頸及び椎骨動脈）では5.6～5.7、その他の末梢血管では5.5～6.9であり、F-0401のKCl収縮抑制作用は、頭蓋内血管において明らかに強く発現した。既存のCa拮抗薬と比較するとF- 0401 の頭蓋内血管（脳底動脈）における効力はニカルジピンの1/6 、ニモジピンの1/3でフルナリジンの10倍とDHP誘導体としては強いものではなかった。しかし、脳血管と末梢血管における効力比（脳底動脈pD'_2／大腿動脈pD'_2）を求めるとF-0401のそれはフルナリジンの4倍、ニカルジピンの25倍、ニモジピンの40倍となり、F-0401は脳血管に対する選択性が著しく高いことが明らかとなった。対照薬はいずれも脳循環改善薬として臨床応用されているCa拮抗薬で、ピペラジン誘導体のフルナリジンはCa^{2+}チャネルに作用し[^{3}H]ニトレンジピン結合を抑制するがDHP誘導体とは異なる部位に結合する54) こと、心筋のスローチャネルには作用しない55) など、DHP誘導体とは異なった作用形態を示すことが知られている。また、その血管拡張作用は*in vitro*56) 及び*in vivo*57) で、脳血管に高い選択性を示すとされている。一方、DHP誘導体のニカルジピン58) 、ニモジピン59) は*in vivo*では脳血流を選択的に増加させるが、*in vitro*のKCl収縮抑制作用は脳血管で末梢血管の２～３倍と報告60, 61) されており、本成績と一致している。

これらのことを考え合わせると、既存のCa拮抗薬に比べF-0401の脳血管選択性が極めて高いことが判断できる。

血管平滑筋のKCl収縮は、膜の脱分極に伴う電位依存性Ca^{2+}チャネルの開口によるCa^{2+}の細胞内への流入に依存する51) 。そこで、脳底動脈標本におけるF-0401のCa^{2+}チャネルを介した外液Ca^{2+}流入機構への作用を明確にするために、KCl脱分極下$CaCl_2$収縮に対する作用を調べ、さらに5-HT及び $PGF_{2\alpha}$収縮とあわせてKCl収縮の場合と比較検討した。その結果、F-0401は

$CaCl_2$収縮を強く抑制し、KCl収縮に対するF-0401の成績とよく一致した。$CaCl_2$はCa^{2+}チャネルに結合して反応を起こすわけではないので、$CaCl_2$とCa拮抗薬は厳密には競合的拮抗関係にはならない62) が、F-0401は既存のCa拮抗薬と同様に$CaCl_2$収縮曲線を右に平行移動させ、見かけ上競合的拮抗作用を示した。また、その効力はニカルジピンの1/10であった。これらのことから、F-0401は脳血管でも電位依存性Ca^{2+}チャネルを抑制していることが明らかになった。

F-0401は、他のCa拮抗薬と同様に電位依存性Ca^{2+}チャネルに作用してKCl収縮を抑制するにも係わらず、頭蓋内血管に対する選択性が他のCa拮抗薬に比較して著しく高かった。この理由として、血管の部位により、収縮に要するCa^{2+}動員や、Ca^{2+}チャネルの種類が異なること等が考えられる。KClや$CaCl_2$刺激により細胞内に流入したCa^{2+}は、細胞内貯蔵部位のCa^{2+}誘導性Ca^{2+}チャネルを開口させてCa^{2+}遊離(CICR)を促し63) 、血管を収縮させるが、血管の部位によりCICRの関与に差がある64) とされている。特に脳血管は、平滑筋細胞の小胞体が発達し、細胞内貯蔵Ca^{2+}が多い65) とされ、中山ら64) によれば、頭蓋内血管では、収縮に際しCICRの果たす役割が大きい可能性が示唆されている。これらのことから、F-0401はCICRに対し、既存のCa拮抗薬と異なる作用を及ぼしている可能性も考えられる。

一方、F-0401は5-HT収縮を抑制したがその作用は$pD'_2$5.9 と軽微であった。5-HTの収縮に必要なCa^{2+}は受容体作動性Ca^{2+}チャネルを介した外液Ca^{2+}流入と、細胞内貯蔵部位からのCa^{2+}遊離が関与している66) と考えられている。血管の部位により5-HT収縮に関与するCa^{2+}動態にも差があり、DHP誘導体が末梢血管より脳血管において強く5-HT収縮抑制することから、脳底動脈での5-HT収縮には細胞外Ca^{2+}が、末梢血管では細胞内貯蔵部位からのCa^{2+}遊離が大きく関与する67) と考えられている。Towart61) はニモジピンの脳血管における5-HT収縮抑制作用は、受容体作動性Ca^{2+}チャネルの抑制を介していると報告している。この受容体作動性Ca^{2+}チャネルは、電位依存性のCa^{2+}チャネルのように構造が解明されているわけでなく68) 、その実体は今だ不明である。一方、細胞内貯蔵部位からのCa^{2+}遊離は、5-HT受容体刺激を介するホスファチジルイノシトール代謝回転の活性化を通じて起こり、イノシトール三リン酸によって開口する

Ca^{2+}チャネルを通して誘導される(IICR)69) とされ、CICRとは異なったチャネルを介する70) ことが知られている。今回、我々の成績では、既存のCa拮抗薬にはKCl収縮に対する作用の約1/10の効力で5-HT収縮に対する抑制作用が認められたのに対し、F-0401の効力はKCl収縮に対する作用の約1/100と弱く、既存のCa拮抗薬と異なる傾向を示した。このことから、F-0401は、既存のCa拮抗薬とは異なり、受容体作動性Ca^{2+}チャネルあるいはIICRには作用しにくい可能性が示唆される。この差が脳血管選択性に関与するかどうかについては、今後の研究に期待される。

また、 $PGF_{2\alpha}$収縮も5-HTと同様に受容体作動性Ca^{2+}チャネルを介した細胞外Ca^{2+}流入と細胞内貯蔵部位からのCa^{2+}遊離が関与する66) と考えられており、ニカルジピンはCa^{2+}除去液中での $PGF_{2\alpha}$収縮を抑制することから、受容体作動性Ca^{2+}チャネルのみならず貯蔵部位からのCa^{2+}遊離をも抑制する60) と報告されている。しかしながら、今回の我々の実験では、F-0401を含むいずれのCa拮抗薬にも著明な抑制作用が認められなかったことから、 $PGF_{2\alpha}$収縮は5-HTとは異なるCa^{2+}動態を示す可能性も示唆される。

今回の成績から判断すると、F-0401は主に電位依存性Ca^{2+}チャネルを阻害して血管拡張作用を示すが、受容体作動性Ca^{2+}チャネルには作用しにくく、細胞内のCa^{2+}動態に対して既存のCa拮抗薬と異なる作用を示す可能性が示唆された。

以上、F-0401は既存のCa拮抗薬に比し、頭蓋内血管(脳底動脈及び中大脳動脈)に対し著しく高い選択性を有する血管拡張薬であり、その作用は主に電位依存性Ｌ型Ca^{2+}チャネル阻害作用に基づくものであることが明らかとなった。

第４章　F-0401の薬理学的特徴の解析－作用機作－

第１節　序論

F-0401は脳血管に高い選択性を有する血管拡張作用を有し、その作用は主に電位依存性Ｌ型Ca^{2+}チャネル阻害作用に基づくものと予想された。この電位依存性Ｌ型Ca^{2+}チャネルには、DHP誘導体が高い親和性を持って結合することから、本研究では[^{3}H]ニトレンジピンの結合に対する阻害作用を検討することで、F-0401の電位依存性Ｌ型Ca^{2+}チャネルに対する阻害作用を検討した。また、併せて消化管平滑筋と血管平滑筋におけるCaCl$_2$ 収縮に対する抑制作用を検討し、 Ca拮抗作用の血管に対する選択性についても検討した。

さらに、F-0401は血小板凝集の中でも特にPAF、閾値濃度AA凝集を抑制したことから、[^{3}H]PAF結合に対する阻害作用を検討するとともに、アラキドン酸代謝経路の各酵素に対する阻害作用を併せて検討し、F-0401の血小板凝集抑制作用の作用機序を検討した。

第２節　実験方法

１．実験動物

日本白色種ウサギ（東京実験動物）、Sprague-Dawley系ラット（日本チャールス・リバー）及びHartley系モルモット（日本エスエルシー）、いずれも雄性動物を用いた。

２．使用薬物

被験薬としてF-0401及びニカルジピン、ニトレンジピン、ニモジピン、CV-3988、オザグレルナトリウム（オザグレル，以上自社合成）、フルナリジン(Sigma)、1-o-hexadecyl-2-o-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine(PAF, Bachem Feinchemikaline)、インドメタシン、 3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX，以上Sigma)、AA-861（和光純薬)、ジピリダモール（みどり化学）及び臭化p-ブロモフェナシル(BPB,ナカライテスク)を用いた。

標識化合物は、[5-methyl-^{3}H]nitrendipine([^{3}H]ニトレンジピン，2,701GBq/mmol)、 hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-phosphorylcholine,1-o-[hexadecyl-1',-2'-^{3}H(N)]([^{3}H]PAF, 2,097.9GBq/mmol）、[1-^{14}C] アラキドン酸([^{14}C]AA, 1.9GBq/mmol)、 [2,8-^{3}H]cyclic AMP([^{3}H]cAMP, 1,128.5GBq/mmol)、[8-^{3}H]cyclic GMP([^{3}H]cGMP, 210.9GBq/mmol, 以上NEN Research Products)を用いた。薬物及び試薬として、フッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF, Boehringer Mannheim), tris(hydroxymethyl)aminomethane（トリス，和光純薬)、 Clear-SolⅠ(ナカライテスク）、牛血清アルブミン(BSA, 脂肪酸除去，オリエンタル酵母）、 ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本製薬）、 ethylene glycol bis（β-amino-ethyl-ether)-N,N, N',N'-tetraacetic acid(EGTA,ナカライテスク）、ヒト血小板ミクロソーム(Eldan Technologies)、ホスホリパーゼA$_2$（*Naja mocambique mocambique*, acidic isoenzyme, Sigma）、 1-acyl-2-(N-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)aminocaproyl phosphatidyl choline（C$_6$-NBD-PC, Avanti polorlipids）、 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA）、ヘマチン、トリプトファン、グルタチオン（以上和光純薬）、ヒツジ精嚢腺ミクロソーム(RAN, Biochem）、アラキドン酸(AA, Sigma）、プロスタグランジン(PG)E$_2$（フナコシ）、ゼラチン(Sigma）、ヘパリン（小玉）、カルモジュリン除去ホスホジエステラーゼ（カルモジュリン除去PDE,ウシ心臓由来,Boehringer Mannheim）、cyclic AMP(cAMP）、cyclic GMP(cGMP)、5'－ヌクレオチダーゼ（以上Sigma ）、カルモジュリン(Boehringer Mannheim）、ジメチルスルホキシド（DMSO, 和光純薬）、polyoxyethylene(60) hydrogenated castor oil(HCO-60, 日光ケミカルズ）を用いた。

３．DHP受容体結合性

(1) 膜標品の調製

Miuraら71) の方法を一部改変して行った。すなわち体重300～400gのラットより速やかに心臓を摘出し、氷冷生理食塩液で洗浄後、細切した心室をGlossmann ら72) の方法に従い10倍量の0.1mM PMSFを含む0.32M ショ糖中で、ポリトロン(PT10TSK, KINEMATIKA) を用いホモジナイズした。ホモジネートは4℃で1,000×g,10分間遠心した。この上清をナイロンメッシュを通して浮遊物を除いた後、4℃で48,000×g,20分間遠心分離し、沈殿を50mMトリス塩酸緩

衝液(pH7.4)で洗浄し、再度、同様に遠心分離した。得られた沈殿を湿重量100mg当たり1mlの50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して膜標品とし、−80℃に保存して３日以内に使用した。

(2) 受容体結合阻害作用

Miuraら71) の方法に従って行った。すなわち被験薬、1nM$[^3H]$ニトレンジピン及び膜標品を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)1mlを振盪下、25℃でインキュベートした。反応は50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4) で２倍に希釈した膜標品100μlを添加することで開始した。60分後、氷冷した50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)3mlを加え、直ちにWhatman GF/Bグラスフィルターで吸引濾過した。同緩衝液で４回洗浄したのち、フィルターにClear-Sol I 8mlを加え液体シンチレーションカウンター(LSC-1000, Aloka) で放射活性を測定した。1×10^{-5}Mのニトレンジピン存在下での結合量を非特異的結合量とし、全結合量から非特異的結合量を差し引いた値を特異的結合量とした。$[^3H]$ニトレンジピンの調製、添加は消灯下で、結合反応は遮光下で行った。被験薬は、DMSOに溶解した後、精製水で希釈し緩衝液に加えた。DMSOの最終濃度は0.5%とした。

4. Platelet-activating factor(PAF)受容体結合性

(1) 血小板の調製

体重2.5～2.8kgのウサギを用い、頸動脈より採取した血液を、3.8%クエン酸ナトリウム: 血液が1:9 の割合なるように混合し、20℃ 100×g, 15分間遠心分離して多血小板血漿を得た。さらにこれを20℃ 800×g, 6分間遠心分離して沈殿させた血小板を40mlの洗浄液(4mM KH_2PO_4, 6mM Na_2HPO_4, 100mM NaCl, 0.1% グルコース, 45mMクエン酸ナトリウム, pH6.5)で２回洗浄した後、1×10^8 個/ml になるように反応液 (10mM KH_2PO_4, 0.9% NaCl, 0.1% BSA, 0.9mM $CaCl_2$, pH7.1) に浮遊させ、血小板浮遊液として実験に用いた。

(2) 受容体結合阻害作用

Valone73) の方法に従って行った。すなわち、微量遠沈管に被験薬及び$[^3H]$PAF(35.0 fmol/tube)を各々5μlずつ分注し、血小板浮遊液1mlを添加した。23℃の水浴中で120回/分振盪しながら10分間反応をさせた。

反応終了後直ちに１分間の遠心分離によって血小板を沈殿させた。上清および沈殿の放射活性を測定し、$[^3H]$PAFの血小板への結合量を求めた。1×10^{-7}MのPAF存在下での結合量を非特異的結合量とし、全結合量から非特異的結合量を差し引いて特異的結合量を求めた。

被験薬はDMSOに溶解後、等量のHCO-60/エタノール(1:1) 溶液を添加混合し、精製水で希釈して用いた。溶媒の最終濃度はそれぞれ0.05% 以下とした。

5. Ca拮抗作用

(1) 摘出ウサギ胸部大動脈標本

体重2.5 ～3.0kg のウサギを用いペントバルビタールナトリウム35mg/kg *i.v.*で麻酔後、速やかに胸部大動脈を摘出し、螺旋状標本を作製した。以下第１編第２節第５項と同様に被験薬1濃度につき１標本を用いて実験を行い、定法26, 27) に従いpA_2値を求めた後、全濃度のpA_2 値の平均値±標準誤差を算出した。被験薬は、DMSOに溶解後、等量のHCO-60/エタノール(1:1)溶液を添加混合し、精製水にて希釈して使用した。溶媒の最終濃度はそれぞれ0.5%とした。

(2) 摘出モルモット盲腸紐標本

体重250～300gのモルモットより速やかに盲腸紐を摘出した。以下 1) と同様に被験薬1 濃度につき1標本を用いて実験を行い、1)と同様にpA_2値を求めた後、全濃度のpA_2 値の平均値±標準誤差を算出した。

6. アラキドン酸カスケードに対する作用

(1) ホスホリパーゼA_2阻害作用

Wittenauerら74) の方法に従って行った。すなわち1μgのホスホリパーゼA_2及び被験薬を含む100mMトリス塩酸緩衝液(pH8.3)100μlを25℃で10分間プレインキュベートした後、200mM $CaCl_2$ を含む1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.3)100μlと基質溶液(C_6-NBD-PC, 最終濃度6.25×10^{-6}M)800μlを加えて反応を開始した。２分後に720mM KOHに溶解した240mM EDTA 200μlを加えて反応を停止し、励起波長470nm, 蛍光波長540nmでNBD-hexanoic acid の蛍光強度を

測定した。BPBはエタノールに溶解し、25℃で30分攪拌しながらホスホリパーゼA_2と共にプレインキュベートした。被験薬はDMSOに溶解した。溶媒の最終濃度はそれぞれエタノール1%、DMSO 0.5%とした。

(2) シクロオキシゲナーゼ阻害作用

山口ら75) の方法に従った。すなわち2μMヘマチン、5mMトリプトファン、1mMグルタチオン、80μgのヒツジ精嚢腺ミクロソーム及び被験薬を含む100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)100μlを30℃で5分間プレインキュベートした後、基質溶液($[^{14}C]$AA)5μlを加えて反応を開始した。5分後に氷冷した反応停止液300μlを加え、ミキサーで30秒間攪拌後、低速遠心分離し、有機溶媒層150μlを薄層クロマトグラフィ(TLC) プレート（シリカゲル60, TLCアルミニウムシート,Merck）にスポットした。同時に標準物質としてAA及びPGE_2をスポットしたのち、室温で展開し、ヨウ素発色によりスポットを検出した。次いでAA及びPGE_2に相当する部分を採取し、放射活性を測定した。酵素活性阻害率は下式を用いて、AAからPGE_2への変換率から求めた。

$$\text{変換率}(\%) = \frac{PGE_2(dpm)}{AA(dpm) + PGE_2(dpm)} \times 100$$

$$\text{阻害率}(\%) = \frac{\text{コントロールの変換率}-\text{試料の変換率}}{\text{コントロールの変換率}} \times 100$$

被験薬は、DMSOに溶解したのち精製水で希釈し反応液に加えた。DMSOの最終濃度は0.5%とした。ヒツジ精嚢腺ミクロソームは精製水で4mg/mlの懸濁液にして、超音波処理により均一にして用いた。$[^{14}C]$AAは2mM AAで50倍に希釈して用いた。ヘマチンは少量の0.1M NaOHで溶解したのち、20μM溶液とした。トリプトファンはトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に溶解し50mM溶液とした。グルタチオンは精製水に溶解して10mM溶液とした。反応停止液は酢酸エチル：メタノール：0.2Mクエン酸(30:4:1)の混合液を用いた。TLC展開溶媒は酢酸エチル：2,2,4-トリメチルペンタン：酢酸：精製水の11:5:2:10混合液の有機溶媒層を用いた。

(3) トロンボキサン(TX)A_2合成酵素阻害作用

TXA_2合成酵素活性は、トロンボキサンシンセターゼキット(Eldan Tecnologies)を用いて測定した。すなわち、0.1M NaClを含む50mMトリス緩衝液(pH7.5)に懸濁、氷冷した0.1mg/mlのヒト血小板ミクロソーム液に被験薬溶液を添加し、25℃で3分間プレインキュベートした。続いて氷冷した0.05mg/ml PGH_2/ アセトン溶液2μlを加えて反応を開始した。3分後に25mM $FeCl_2$溶液10μlを加え反応を停止させた。反応溶液は15分間室温に放置し、4℃、1,000 ×g、10分間遠心分離し、上清中の生成されたTXB_2量をラジオイムノアッセイ(RIA) 法（トロンボキサン$B_2$$[^{3}H]$RIA Kit：NEN Reserch Products）を用いて定量した。被験薬の阻害率の算出は、溶媒のみを添加したコントロールが生成したTXB_2量を100%として、被験薬の反応により生成したTXB_2量を百分率として求めた。オザグレルは緩衝液に溶解し、他の被験薬は全てDMSOに溶解後、緩衝液で希釈して用いた。DMSOの最終濃度は2%とした。

(4) 5-リポキシゲナーゼ阻害作用

Yoshimotoら76) の方法に従って行った。すなわち、rat basophil leukemia-1細胞を1mM EDTA、0.1%ゼラチン、14μMインドメタシンを含む50mMリン酸緩衝生理食塩液（pH7. 0）で5×10^7 個/mlに調製し、超音波処理後、10,000×g 、20分間の遠心分離により得られた上清を酵素液とした。酵素液460μlに被験薬溶液10μlを添加し、37℃で5分間プレインキュベートした後、$[^{14}C]$AA及び100mM $CaCl_2$ を添加し反応を開始した。10分後氷冷して1N塩酸にてpH3.0に調製し、反応を停止させ、クロロホルム5ml で抽出した。抽出液を窒素ガス下で乾固して、クロロホルム：メタノール混液(2:1) に溶解し、Jakschikら77) の方法に従い、TLC（Kieselgel $60F_{254}$)で5-hydroxyeicosatetraenoic acid(5-HETE)を分離した。$[^{14}C]$5-HETEの放射活性を測定し、被験薬添加群の対照群に対する5-HETE生合成抑制率を求めた。

被験薬は、DMSOに溶解後、HCO-60／エタノール(1:1)溶液を添加混合し、緩衝液に希釈して使用した。溶媒の最終濃度はそれぞれ、DMSO 0.5%及びHCO-60／エタノール(1:1)溶液0.08%とした。

7．各種ホスホジエステラーゼ(PDE)阻害作用

(1)PDEの調製

cAMP特異的PDE(cAMP-PDE) およびcGMP特異的PDE(cGMP-PDE)はHidakaら78) の方法に準じて、ラット血小板ホモジネートからDEAE-celluloseイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。すなわち、あらかじめ少量のヘパリン(25 U/ml) を入れた10ml注射筒を用いラット腹大動脈から採血した。400×g, 5分間の遠心分離で多血小板血漿を得たのち、1200×g, 10分間の遠心により血小板を分離した。血小板はCa^{2+}除去Tyrode液(136.9mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.4mM NaH$_2$PO$_4$, 1.9mM MgCl$_2$, 1.2mM NaHCO$_3$, 5.6mM グルコース, 1mg/ml BSA, 0.5 U/ml ヘパリンを含む) に浮遊させ500×g、10分間遠心分離して洗浄した。さらに2回洗浄し、血小板を1mM MgCl$_2$ を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5) 10mlに浮遊させ、ホモジナイズした。ホモジネートを超音波処理(30秒/ml)したのち、105,000× gで60分間遠心分離した。得られた遠心上清はDEAE-celluloseカラム(2.9×6cm)に添加し、3.75mM 2-メルカプトエタノールを含む50mMトリス酢酸緩衝液(pH6.0) で洗浄したのち、酢酸ナトリウム0～1Mの濃度勾配法により溶出し、cAMP-PDE画分及びcGMP-PDE画分を得た。各PDE画分は4℃にて保存した。Ca^{2+}-カルモジュリン依存性PDE(Ca^{2+}/CaM-PDE) としてはカルモジュリン除去PDE(ウシ心臓由来) を用いた。

(2)PDE 活性阻害作用

cAMP-PDE及びcGMP-PDE：Hidakaら78) の方法に準じて行った。すなわち、5mM MgCl$_2$ 、0.1mg/ml BSA、1mM EGTA、cAMP-PDE または cGMP-PDE 及び被験薬を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5mlに、基質として0.4μM[^{3}H]cAMP(または[^{3}H]cGMP) を加え反応を開始し、30℃で30分間インキュベートした後、3分間煮沸して反応を停止させ、次いで反応液に60mM MnCl$_2$ 100μlと0.1 U/ml 5'-ヌクレオチダーゼ100μlを加え20分間インキュベートした。

直ちに試験管を氷水中に移し、1mlの氷冷した精製水を加えたのち、得られた試料をAG50-X4陽イオン交換樹脂カラム(0.9×1.5cm)に添加した。精製水15mlで樹脂を洗浄後、[^{3}H]アデノシンまたは[^{3}H]グアノシンを3Nアンモニア水1.5mlでバイアル中に溶出、回収し、Clear-solI 10ml を加え、放射活性を測定した。

Ca^{2+}/CaM-PDE：5mM MgCl$_2$ 、 0.1mg/ml BSA 、0.2mM CaCl$_2$ 、2 U/mlカルモジュリン、 Ca^{2+} ／CaM-PDE及び被験薬を含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5mlに基質として0.4μMの[^{3}H]cAMPを加え反応を開始し、cAMP-PDEと同様に[^{3}H]アデノシンを回収し、放射活性を測定した。

F-0401、IBMX、ニモジピン、ニカルジピン及びフルナリジンはDMSOに、ジピリダモールは0.1N HClに溶解し、1%HCO-60水溶液で希釈した。溶媒の最終濃度はそれぞれDMSO 0.5% 、HCO-60 0.05%とした。

なお、酵素阻害率は平均値でProbit法で測定した。有意差検定はStudent's t-testで行い、危険率5%以下をもって有意とした。

第3節　実験結果

1．DHP受容体結合性

本実験条件下での[^{3}H]ニトレンジピンの特異的結合量は1.43±0.2 fmol/mg protein であった。結合飽和実験のスキャッチャードプロットから求めた解離定数(Kd)値は6.1×10^{-10}Mであった。F-0401, ニトレンジピン及びニフェジピンは[^{3}H]ニトレンジピンのDHP受容体への結合を濃度依存的に阻害した。Ki値はそれぞれ2.2×10^{-7}、9.1×10^{-9}及び 2.0×10^{-8}M であった(Fig.18)。

2．PAF受容体結合性

本実験条件下での[^{3}H]PAF特異的結合量は10.3±1.1 fmol/10^{8}cellであった。結合飽和実験のスキャッチャードプロットから求めたKd値は6.4×10^{-10}Mであった。

F-0401、CV-3988、ニカルジピン、ニモジピン及びPAFは[^{3}H]PAFの血小板PAF受容体への結合を濃度依存的に阻害した。Ki値はそれぞれ1.4×10^{-8}、1.9×10^{-8}、4.6×10^{-7}、3.0×10^{-6}及び1.5×10^{-10}Mであった。ニフェジピン及びフルナリジンは1×10^{-9}～1×10^{-5}M で明らかな阻害を示さなかった(Fig. 19)。

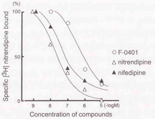


Fig. 18 Inhibition of the specific [^{3}H] nitrendipine binding to rat heart membrane preparations by F-0401, nitrendipine and nifedipine. Membranes were incubated with [^{3}H] nitrendipine and test compounds for 60 min at 25 °C. Each point represents the mean of 4 to 6 experiments performed in duplicate.

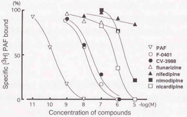


Fig. 19 Inhibition of the specific [^{3}H] PAF binding to rabbit platelet by F-0401, nifedipine, nicardipine, nimodipine, flunarizine, CV-3988 and PAF. The platelets were incubated with [^{3}H] PAF and test compounds for 10 min at 23 °C. Each point represents the mean of triplicate assay.

3．Ca拮抗作用

F-0401はウサギ胸部大動脈及びモルモット盲腸紐標本におけるCa^{2+}収縮反応曲線を右へ移動させた。pA$_2$ 値はそれぞれ7.7±0.1及び6.6±0.1であった。それに対し、ニフェジピンのpA$_2$ 値はそれぞれ8.8 ±0.1 及び9.3±0.1とモルモット盲腸紐標本における作用の方が強かった(Table 18)。

Table 18 Effects of F-0401 and nifedipine on CaCl$_2$-induced contraction in K$^+$-depolarized guinea pig taenia coli and rabbit aorta

Compound	pA$_2$		Vascular selectivity
	Taenia Coli	Aorta	
F-0401	6.6±0.1(14)	7.7±0.1(19)	12.6
Nifedipine	9.3±0.1(14)	8.8±0.1(12)	0.3

Test compound was added to the bath 30 min before the cumulative treatment with CaCl$_2$. Each value represents the mean±S.E. of the data. The figure in the parenthesis indicates the number of experiments.

Table 19 Effects of F-0401 and p-bromophenacyl bromide(BPB) on phospolipase A$_2$ activity

Compound	Concentration(M)	Inhibition(%)
F-0401	1×10^{-6}	4
	3×10^{-6}	13
	1×10^{-5}	17
BPB	5×10^{-5}	70

Phospholipase(PL)A$_2$ activity was measured as the conversion of C$_6$-NBD-PC to NBD-hexanoic acid. PLA$_2$ *(Naja mocambique mocambique)* was incubated with a test compound for 2 min at 25℃ and then CaCl$_2$ and C$_6$-NBD-PC were added to the mixture. After 2 min, the reaction was terminated, and then the NBD-hexanoic acid content was measured quantitatively with a fluorometry. Each value represents the mean of duplicate assay.

Table 20 Effects of F-0401 and indomethacin on cyclooxygenase activity in sheep seminal vesicular gland microsomal fraction

Compound	Concentration(M)	Inhibition(%)
F-0401	1×10^{-5}	-7
	1×10^{-4}	38
Indomethacin	3×10^{-7}	63

Cyclooxygenase activity was measured as the conversion of arachidonic acid(AA) to PGE_2. Sheep seminal vesicular gland microsomal fractions were incubated with a test compound for 5 min at 30℃ and then [^{14}C]AA was added to the mixture. After 5 min, the reaction was terminated, and the radioactivities of AA and PGE_2 were measured. Each value represents the mean of duplicate assay.

4．アラキドン酸カスケードに対する作用

(1) ホスホリパーゼA_2阻害作用

BPB(5×10^{-5}M)は明らかな阻害作用を示したが、F-0401(1×10^{-6}～1×10^{-5}M)の阻害作用は軽微であった(Table 19)。

(2) シクロオキシゲナーゼ阻害作用

この反応によって生成したPGE_2は酵素標品1mg当たり36.7±6.9pmol/min であった。インドメタシン(3×10^{-7}M)は明らかなPGE_2産生阻害を示したが、F-0401は1×10^{-5}Mでは全く作用を示さず、1×10^{-4}Mで38%の阻害を示したにすぎなかった(Table 20)。

(3) TXA_2合成酵素阻害作用

この反応によって生成したTXB_2は178.1±9.4fmolであった。オザグレル及びF-0401は濃度依存的にTXB_2産生を阻害し、IC_{50}値はそれぞれ1.0×10^{-7}及び2.5×10^{-7}Mであった。一方、ニフェジピン、ニカルジピン、ニモジピン及びフルナリジン（いずれも1×10^{-5}M）の阻害作用は軽微であった(Table 21)。

Tabel 21 Effects of F-0401 and reference compounds on thromboxane A_2 synthetase activity in human platelet microsomal fraction

Compound	Concentration(M)	Inhibition(%)	IC_{50}(M)
F-0401	10^{-8}	28.6	
	10^{-7}	41.1	
	10^{-6}	66.1	
	10^{-5}	70.5	2.5×10^{-7}
Ozagrel	10^{-8}	44.6	
	10^{-7}	50.0	
	10^{-6}	55.4	
	10^{-5}	66.1	1.0×10^{-7}
Nifedipine	10^{-5}	14.3	
Nicardipine	10^{-5}	10.7	
Nimodipine	10^{-5}	10.7	
Flunarizine	10^{-5}	3.6	

Thromboxane(TX)A_2 synthetase activity was measured as the conversion of PGH_2 to TXB_2. Human platelet microsomal fractions were incubated with a test compound for 3 min at 25℃ and then PGH_2 was added to the mixture. After 3min, the reaction was terminated, and TXB_2 content was measured by the radio immunoassay. Inhibition value represents the mean of duplicate assay.

(4) 5-リポキシゲナーゼ阻害作用

この反応によって生成した5-HETEの放射活性は670.3±68.6fmolであった。AA-861(3×10^{-7}M)は明らかな5-HETE産生阻害を示したが、F-0401は1×10^{-5}Mで20.0% 、1×10^{-4}M で70.6%の阻害と作用発現に高濃度を必要とした(Table 22)。

5．各種PDE阻害作用

本実験条件下ではcAMP-PDE、cGMP-PDE及びCa^{2+}/CaM-PDEの酵素標品1ml当たり各々130.3±12.5,557.6±39.2及び111.0±10.1 fmol/minの[^{3}H]アデノシン又は[^{3}H]グアノシンが生成した。F-0401はcAMP-PDEとCa^{2+}/CaM-PDEに対して阻害作用を示し，それぞれのIC_{50}値は4.2×10^{-5}M及び7.1×10^{-6}Mであった

Table 22 Effects of F-0401 and AA-861 on 5-lipoxygenase activity

Compound	Concentration(M)	Inhibition(%)
F-0401	1×10^{-5}	20.0
	1×10^{-4}	70.6
AA-861	3×10^{-7}	81.4

5-lipoxygenase(5LO) activity was measured as the conversion of AA to 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE). Rat basophil leukemia-1-derived 5LO was incubated with a test compound for 5 min at 30℃, and then [^{14}C]AA and $CaCl_2$ were added to the mixture. After 10 min, the reaction was terminated, and the radioactivity of 5-HETE was measured. Each value represents the mean of duplicate assay.

Table 23 Effects of F-0401 and reference compounds on cAMP-, cGMP- and Ca^{2+}/CaM-phosphodiesterase(PDE) activity

Compound	IC_{50} (M)		
	cAMP-PDE	cGMP-PDE	Ca^{2+} /CaM-PDE
F-0401	4.2×10^{-5}	N E	7.1×10^{-6}
Nicardipine	4.9×10^{-5}	N E	4.5×10^{-5}
Nimodipine	2.1×10^{-5}	4.4×10^{-5}	1.7×10^{-5}
Flunarizine	N E	N E	N E
IBMX	6.1×10^{-6}	3.9×10^{-6}	6.1×10^{-6}
Dipyridamole	3.1×10^{-6}	1.5×10^{-7}	N E

cAMP-PDE and cGMP-PDE were obtained from rat platelet. Calumodulin free PDE(bovine heart) was used as Ca^{2+}/CaM-PDE. PDE and [^{3}H]cAMP or [^{3}H]cGMP were incubated with a test compound for 30 min at 30℃, and $MnCl_2$ and 5-nucleotidase were added to the mixture. After 20 min, the reaction was terminated, and the radioactivity of [^{3}H]adenosine or [^{3}H]guanosine was measured. NE: no effect.

が、cGMP-PDEに対しては阻害作用を示さなかった。ニカルジピンはF-0401と似た傾向を示したが、Ca^{2+}/CaM-PDEに対する選択性は認められなかった。ニモジピン及びIBMXは全てのPDEを同等に阻害した。ジピリダモールはCa^{2+}/CaM-PDEを阻害しなかったが、cGMP-PDEを強く、cAMP-PDEを弱く阻害し、フルナリジンはいずれのPDEも阻害しなかった(Table 23)。

第４節　考察

血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を併せ持つDHP誘導体F-0401の作用機序を明らかにするために、種々検討を行った。

F-0401は[^{3}H]ニトレンジピン結合を特異的に阻害し、胸部大動脈及び盲腸紐の$CaCl_2$収縮を抑制した。このことから、F-0401は既存のDHP誘導体と同様にDHP結合部位（受容体）に結合し、Ca拮抗作用を発現することが明らかとなった。また、その効力は[^{3}H]ニトレンジピン結合実験と胸部大動脈の$CaCl_2$収縮抑制ではいずれも、ニフェジピンの約1/10であったのに対し、盲腸紐標本での$CaCl_2$収縮抑制作用は約1/500と消化管平滑筋のCaチャネルには作用が弱いことが明らかとなった。これらのことから、F-0401の血管拡張作用はCa拮抗作用に起因するものであり、そのCa拮抗作用は消化管平滑筋に比し血管平滑筋に特異性が高いことが明らかとなった。

血小板凝集は種々な物質によって惹起されるが、中でもTXA_2とPAF は強力な凝集促進物質として知られている。F-0401は、TXA_2の関与が大きいことで知られている閾値濃度AA凝集を抑制し、TXA_2合成酵素阻害効果を発揮することが知られているイミダゾール環30) を分子内に有することから、同合成酵素に対する阻害作用が期待された。そこで今回、F-0401のアラキドン酸カスケードに対する影響を検討した結果、F-0401はホスホリパーゼA_2、シクロオキシゲナーゼ及び5-リポキシゲナーゼ活性にはほとんど影響せず、TXA_2合成酵素を強く阻害した。ニフェジピンは、そのCa拮抗作用により間接的にTXA_2産生を抑制したとする報告79) もあるが、本実験系ではピペラジン誘導体Ca拮抗薬フルナリジンをはじめ、DHP誘導体のニフェジピン、ニモジピン及びニカルジピンにはほとんど阻害活性が認められなかった。従って、F-0401はオザグレルと同様に直接TXA_2合成酵素に働いて、血小板凝集抑制作用を示すことが明らかとなった。

F-0401は、PAF拮抗薬CV-3988と同等の強さで$[^3H]$PAFの血小板への特異的結合を阻害した。この作用はニモジピンにF-0401の約1/200の、ニカルジピンに約1/30の効力で認められ、ニフェジピンやフルナリジンには無く、PAF凝集抑制作用の効力順と同じであり、Ca拮抗作用の効力とは相関しなかった。また、第２章で述べたように、F-0401のPAF 凝集抑制作用とCa拮抗作用は、Ｓ体とＲ体で乖離した。一方、PAFの作用にはCa^{2+}流入機構の関与が大きく80)、血小板においてPAF受容体はCa^{2+}チャネルと交差している81) という説もあり、Ca拮抗作用によりPAF 凝集抑制作用が発現するかのような印象を持たれる。しかし、PAF受容体の一次構造が解明され、ホスホリパーゼCに連関するG蛋白に共役する受容体であることが見出され82)、血小板には電位依存性Ca^{2+}チャネルが存在しない83, 84)ことが知られている。これらのことから、F-0401の血小板におけるPAF凝集抑制作用は、電位依存Ca^{2+}チャネルを介したものではなく、血小板のPAF受容体に対する直接的な拮抗作用によるものと判断する。また、これは既存のDHP 誘導体には報告されていない新しい知見である。

以上、F-0401の血小板に対する作用には PAF 結合阻害作用が大きな役割を果していることが明らかとなった。

ニカルジピンはPDEを阻害する85) ことが報告されている。F-0401のPDE阻害活性スペクトラムを検討したところ、F-0401は非選択的PDE阻害剤IBMXや選択的cGMP-PDE(TypeⅤ)阻害剤ジピリダモールと異なり、Ca^{2+}/CaM-PDE(TypeⅠ）に対して強く(IC_{50} 値:7.1×10^{-6}M)、cAMP-PDEに対して弱い(IC_{50} 値:4.2×10^{-5}M)阻害作用を示したが、cGMP-PDE(TypeⅤ）には全く影響を与えなかった。このPDE阻害活性スペクトラムはニカルジピンやニモジピンと異なるものの、いずれもCa拮抗作用に比べ軽微であった。また、cAMP-PDEにはTypeⅢ(cGMP-inhibited PDE)とTypeⅣ(cAMP-specific PDE）の二種類の存在78) が知られているが、今回用いたPDEにはcGMPに対する加水分解活性が認められなかったことから（未発表データ）、本cAMP-PDEはTypeⅣと予想される。いずれにしても、cAMP-PDE阻害剤86)が効果を発揮するADP凝集に対し、F-0401は抑制作用を示さなかった。従って、F-0401はcAMP-PDE(TypeⅣ)を阻害するもののその作用は軽微であり、血小板凝集抑制作用における寄与は小さいものと思われる。

以上のように、F-0401の血管拡張作用はCa拮抗作用に、血小板凝集抑制作用はTXA_2合成酵素阻害作用及びPAF結合阻害作用に起因することが明らかとなった。

本報において、DHP結合実験はラット心筋を、TXA_2合成酵素阻害はヒト血小板を、PAF結合阻害はウサギ血小板を使用するなど、実験により使用した動物種あるいは組織が異なるものの、F-0401の作用はいずれも10^{-7}M オーダーで発現した。そのTXA_2合成酵素阻害作用及びPAF結合阻害作用は、各々の代表的阻害剤であるオザグレル及びCV-3988と同等の効力を有していたことから、F-0401はCa拮抗作用に加え、TXA_2合成酵素阻害作用及びPAF結合阻害作用を併せ持つユニークなDHP 誘導体であることが明らかとなった。また、第２章ウサギ*ex vivo* 実験で、F-0401が降圧作用発現に必要な用量以下で、血小板凝集抑制作用を示したことから、降圧作用を起こす用量では、Ca拮抗、TXA_2合成酵素阻害及びPAF結合阻害の３種の作用を同時に発現しているものと考えられる。ヒトにおいても同様な効果が発現すれば、F-0401は血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を併せ持つ脳循環改善薬として有用性の高いものとなることが期待される。

第3編　総括

高齢化社会へ向けて、益々循環器系疾患の占める割合が高くなると予想されている。そこで本研究では、Ca拮抗作用を有するDHP誘導体に注目し、先ずはじめに、副作用が少なく、良好な降圧作用を持つ高血圧治療薬FRC-8411を、次に動脈硬化性疾患にも有効な抗血小板作用を併せ持った血管拡張薬F-0401を創製し、それら薬物の薬理学的特徴を解明すると共に、既存のCa拮抗薬と比較しながら医薬品としての開発が意義あることを明らかにした。

Ⅰ. 副作用軽減を目指したジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の創薬と薬理

(1) FRC-8411の選出

1)1次スクリーニング

自然発症高血圧ラット(SHR)を用い、降圧作用の緩徐性、持続性、効力を同時に評価できるモデルを確立し、主にDHP骨格の3位エステル基を変換した約200の化合物の評価を行った。その結果、消化管からの吸収性に優れ、緩徐で持続的な降圧作用を示す化合物として、含窒素化合物(KAD-5)、共役ジエン構造を有する化合物(D-34)、シンナミルエステル基を有する化合物(FRC-8411,D-29,D-46,D-51,D-77)の7化合物を選出した。

2)2次スクリーニング

正常血圧ラットを用いて心臓抑制作用と降圧作用の乖離を同時に評価できるモデルを確立し、1次スクリーニングで選出した7化合物を評価した。その結果、優れた降圧作用を有し、心臓抑制作用の弱い化合物として、KAD-5、D-34、及びFRC-8411の3化合物を選出した。

3)3次スクリーニング

総合的な安全性を予測するため、2次スクリーニングで選出された3化合物の急性毒性を評価した。その結果、FRC-8411は既存薬ニフェジピン及びニカルジピンより遙かに高い安全性を示したので、FRC-8411を有望化合物として選出した。

(2) FRC-8411の薬理学的特徴の解析

1)抗高血圧作用

FRC-8411の抗高血圧作用を、第一世代のCa拮抗薬と比較検討した。高血圧モデルとしては、本態性高血圧症モデル(SHR)、腎性高血圧症モデル(RHR)、体液貯留型高血圧症モデル(DHR)を用いた。いずれのモデルにおいても、第一世代のCa拮抗薬は急激で持続性のない降圧作用を示したのに対し、FRC-8411は経口投与においても、静脈内投与時と同様に、緩徐で持続的な降圧作用を示すことが明らかとなった。また、他のCa拮抗薬では選択性が乏しかったにもかかわらず、FRC-8411の降圧作用は正常血圧ラットに比べ、高血圧ラットにおいて明らかに強力であり、高血圧動物に対する選択性が著しく高いことが明らかとなった。

これらのFRC-8411が示した降圧作用の特徴は、第一選択の抗高血圧治療薬として望まれているものでもあり、臨床の場において1日1回服用で安定した血圧コントロールが可能な薬剤になりうると期待される。

2)心臓抑制作用

心拍数減少作用をペースメーカー抑制作用の指標とし、拡張期圧の低下を血管拡張作用の指標として心臓抑制作用の強度を評価したところ、ジルチアゼム及びニカルジピンは心臓に対する作用が強く、FRC-8411は弱いことが明らかとなった。ジルチアゼム、ニカルジピン及びベラパミルは、心電図PQインターバルの延長を誘起し、心刺激伝導系にも作用を及ぼすことが示されたが、FRC-8411では降圧用量の300倍投与でも影響が認められず、ペースメーカー抑制作用の結果も合わせ、FRC-8411は心臓に対する抑制作用が弱い、安全性の高い薬物であることが明らかとなった。

3)血管平滑筋選択性

FRC-8411のCa拮抗作用は、モルモット盲腸紐よりウサギ大動脈標本において明らかに強かった。他のCa拮抗薬は、いずれもモルモット盲腸紐標本における作用の方が強かったことから、FRC-8411は消化管平滑筋に比べ、血管平滑

筋に対する選択性が著しく高いことが明らかとなった。Ca拮抗薬の副作用の一つに、便秘が挙げられていることから、消化管平滑筋に対するCa拮抗作用の弱いことは、副作用軽減の意味から有用性が高いものと思われる。

4)結晶型による降圧作用の違い

FRC-8411 には２つの結晶型が存在する。SHR を用い、２種類の結晶型の降圧作用を比較したところ、Ⅱ型は作用発現が急激であったが、Ⅰ型は投与後３時間にピークを有する緩徐で持続的な効果を発現した。臨床応用するにはⅠ型が優れていると判断し、Ⅰ型を選択した。

以上 FRC-8411 は、第一世代のCa拮抗薬の欠点を克服し、緩徐で持続的な降圧作用を示すとともに、正常血圧に影響しない性質を有していることが明らかとなった。これらの成績から、臨床の場において１日１回服用で安定した血圧コントロールが可能な優れた薬剤になることが期待され、開発が開始された。

現在は高血圧治療薬として臨床試験を終え、厚生省に製造承認申請中である。

Ⅱ. 抗血小板作用を有するジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の創薬と薬理

(1) F-0401の選出

脳梗塞や心筋梗塞などの虚血性疾患の予防治療に抗血小板薬の有用性に期待が高まっている。そこで、著者らはDHP誘導体に、より積極的な抗血小板作用を併せ持たせることで虚血性疾患に対する理想的な薬物の創製を試みた。抗血小板作用としては、TXA_2産生のみを抑えてアスピリンジレンマを解消するTXA_2合成酵素阻害作用に期待した。種々の化合物を合成して検討した結果、イミダゾール環を FRC-8411 エステル側鎖に導入した化合物 F-0401 を、血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を同時に発現する薬物として選出した。

(2) F-0401の薬理学的特徴の解析

1)血小板凝集抑制作用

血小板凝集にはTXA_2の他に、ADPやPAFを介する異なった経路が存在することが知られている。F-0401は*in vitro*ウサギ血小板において、閾値濃度AA凝集

を強く、高濃度AA及びコラーゲン凝集を弱く抑制したが、ADP凝集には作用を及ぼさなかった。閾値濃度AA凝集は TXA_2 依存性の強い血小板凝集であり、高濃度AA及びコラーゲン凝集は、一部TXA_2に依存していることが知られている。F-0401は、上記のTXA_2依存性の血小板凝集を抑制し、その効力はTXA_2合成酵素阻害剤オザグレルと同等以上であった。また、探索研究の段階では予知できなかった効果としてF-0401はPAFによる血小板凝集を強力に抑制することを発見した。その効力はPAF拮抗薬 CV-3988より強力で、閾値濃度AA凝集に対する抑制作用と同等の濃度で発現した。

一方Ca拮抗薬は、*in vitro*で著明な作用を示さないものでも、血圧を低下させることによって、PGI_2やNOなどの血小板凝集抑制因子を産生することが知られている。F-0401も高用量では降圧作用を示すことが知られている。そこで、本研究では降圧作用を発現しない用量を用いて、ウサギ *ex vivo*における血小板凝集に対する抑制作用を検討したところ、F-0401は、*ex vivo* においても、*in vitro*と同様に、PAF及び閾値濃度AA凝集を強く、高濃度AA凝集を弱く抑制した。これに対して、*in vitro*で弱い効果を示したニカルジピンのPAF凝集抑制作用は、*ex vivo* では発現せず、F-0401の血小板凝集抑制作用がCa拮抗作用とは独立して発現していることが明らかとなった。

なお、強力なPAF拮抗作用はDHP誘導体の薬理作用としては新しい発見であり、その後の研究により分子の立体構造上Ｓ体に特異的に認められる現象であることが明らかとなった。

2)血管拡張作用

F-0401の血管拡張作用を明らかにすべく、イヌ摘出血管標本を用い既存のCa拮抗薬と比較検討を行った。

脳支配血管として脳底、中大脳、椎骨及び内頸動脈を、末梢血管として冠、腎、上腸間膜及び大腿動脈を用いKCl収縮に対する作用を検討し、その作用強度より血管部位別選択性を推定した。F-0401のKCl収縮抑制作用は、末梢及び頭蓋外血管に比べて頭蓋内血管において明らかに強く発現した。すなわち、頭蓋内血管と末梢血管における効力（脳底動脈pD'_2／大腿動脈pD'_2）を比較するとF-0401のそれはフルナリジンの４倍、ニカルジピンの25倍、ニモジピンの40

倍となり、F-0401は脳血管に対する選択性が著しく高いことが明らかとなった。対照薬はいずれも脳循環改善薬として上市されているCa拮抗薬であり、F-0401の脳血管選択性が極めて高いことが明らかとなった。この特徴は探索研究の段階では期待されていなかったものであり、本研究により初めて見出されたものである。また、F-0401は$CaCl_2$収縮を強く抑制したことから電位依存性Ｌ型Ca^{2+}チャネルを抑制することも明らかとなった。

F-0401は、他のCa拮抗薬と同様に電位依存性Ca^{2+}チャネルに作用して血管拡張作用を発現するにもかかわらず、頭蓋内血管に対する選択性が他のCa拮抗薬に比較して著しく高い。この理由として、血管の部位により、収縮に要するCa^{2+}動員や、Ca^{2+}チャネルの種類が異なり、F-0401が既存のCa拮抗薬と異なる作用を及ぼしている可能性が高い。

一方、F-0401は、5-HT収縮及び$PGF_{2\alpha}$収縮をほとんど抑制しなかったことから、受容体依存性Ca^{2+}チャネル抑制作用はないことも明らかとなった。

以上、F-0401は主に電位依存性Ｌ型Ca^{2+}チャネルを阻害して血管拡張作用を示すが、受容体作動性Ca^{2+}チャネルには作用しないこと、並びに既存のCa拮抗薬と異なり、頭蓋内血管（脳底動脈及び中大脳動脈）に対し著しく高い選択性を有する血管拡張薬であることが明らかとなった。

3)作用機作

F-0401はラット心筋膜画分DHP受容体への[^{3}H]ニトレンジピン結合を阻害し、ウサギ大動脈標本及びモルモット盲腸紐標本において$CaCl_2$収縮を抑制したことから、F-0401はDHP受容体に結合してCa拮抗作用を発現し血管拡張作用を示すことが明らかとなった。さらにF-0401には、既存のCa拮抗薬にはほとんど認められない、ヒト血小板のTXA_2合成酵素阻害作用が認められたが、アラキドン酸カスケードの他の酵素群には、著明な作用を示さなかった。また、ウサギ血小板への[^{3}H]PAF特異的結合を競合的に阻害し、その効力はPAF拮抗薬 CV-3988と同等であったことから、著明なPAF 拮抗作用を有することが認められた。一方、ラット血小板由来のcAMPおよびcGMP特異的ホスホジエステラーゼに対する阻害作用は、既存のDHP誘導体と同様軽微であった。

以上のことから、F-0401の血小板凝集抑制作用はTXA_2合成酵素阻害作用及びPAF拮抗作用に依存して発現していることが明らかとなった。

Ca^{2+}の細胞内への流入機構とTXA_2産生系、TXA_2及びPAF受容体の間に緊密な関連が示唆されており、Ca拮抗薬にはそれらに対する阻害または拮抗作用があるとする報告がある。従って、F-0401のTXA_2合成阻害とPAF拮抗作用もCa拮抗作用に基づく二次的な作用ではないかとの懸念がある。しかし、F-0401の両作用はいずれも他のCa拮抗薬で報告されているものより強力であり、かつCa拮抗作用から期待される以上の効力、即ちいずれも10^{-7}M オーダーで作用を発現したので解決される。

以上の成績から、F-0401はCa拮抗作用に加え、TXA_2合成酵素阻害及びPAF拮抗作用を併せ持つユニークなDHP誘導体であることが明らかとなった。

(3) F-0401の臨床応用の可能性

従来、Ca拮抗薬は、脳血流増加作用を期待して慢性期の脳血管障害患者に用いられてきたが、近年、虚血性神経細胞死におけるCa^{2+}の細胞内異常蓄積の重要性が認識されるようになり、Ca拮抗薬の神経細胞保護作用が期待されるようになった。Ca^{2+}の異常蓄積は、虚血時のエネルギー代謝障害や興奮性アミノ酸受容体(NMDA 受容体）刺激による神経細胞の脱分極がＬ型Ca^{2+}チャネルを活性化し、Ca^{2+}流入を引き起こすことによると考えられている。

一方、脳梗塞では脳表血管や脳実質血管に血小板血栓が多数出現していることが確認されており、脳動脈閉塞により内皮細胞が障害を受け、二次血栓が形成されてさらに虚血が進み、組織が壊死するという経路を辿って障害が進行していることが病理的にも証明されている。その血栓形成は発作後96時間には見られるとされ、オザグレルは脳梗塞の急性期に適応され、TXA_2合成を阻害することで二次血栓の形成を抑え、障害の進行を抑制するとされる。

さらに、PAFは虚血に関与していると言われているが、脳ではスナネズミの脳虚血再開モデルにおいて、PAF 拮抗薬(BN52021）が脳虚血再開通後の脳虚血と虚血からくる行動障害の改善を早めたと報告されている。TXA_2とPAFは血小板や内皮細胞から虚血時に多量に産生され、互いに作用を増強していることが知られており、PAFは脳梗塞などの成立因子ではなく、虚血による組織損傷を

進展増悪させる因子として作動している可能性が示唆されている。

このような背景から、その後開始された開発研究において、数種の病態モデルにおいてF-0401の脳保護作用が検討され、優れた効果を有することが明らかにされている。従ってCa拮抗作用に基づく選択性の高い脳血管拡張作用を有すると共に、TXA$_2$合成阻害作用とPAF 拮抗作用に基づく抗血小板作用を併せ持つF-0401は、虚血性の脳障害、特に脳血管障害急性期の治療薬として、有用性が高いものと期待される。

また、血管拡張作用と抗血小板作用により治療効果が期待できる疾患として末梢動脈閉塞症が挙げられる。最近の我々の研究でも、種々の実験モデルでF-0401の有効性が確認されており、現在、末梢動脈閉塞症の治療薬としての開発についても検討を始めた。

以上Ca拮抗作用にTXA$_2$合成阻害作用及びPAF拮抗作用を併せ持つF-0401は、虚血性疾患の理想的な薬剤となる可能性を有するDHP誘導体であることが明らかとなった。

Ⅲ. 結語

1. 優れた第一選択降圧薬を開発するためにDHP誘導体の探索研究を行い、第一世代のCa拮抗薬の欠点を克服し、緩徐で持続的な降圧作用を示すとともに、正常血圧に影響しない FRC-8411 を選出した。

2. FRC-8411 に新たに抗血小板作用を付加する探索研究を行い、血管拡張作用と抗血小板作用を兼ね備えた F-0401 を選出した。

3. F-0401の薬理学的特徴の解析を行い、以下のことを明らかにした。
1)F-0401はL型Ca^{2+}チャネル抑制、TXA$_2$合成阻害作用及びPAF拮抗作用を有する。また、F-0401のPAF拮抗作用は新しい発見である。
2)F-0401は血管拡張作用と抗血小板作用を同等に発現する。
3)F-0401の血管拡張作用は頭蓋内血管に対して著しく高い選択性を有する。

また、F-0401のこの特徴は他剤では認められない。
4)F-0401の抗血小板作用はPAF拮抗作用とTXA$_2$合成阻害作用に起因して発現する。

4. 以上の成績をもとに、 FRC-8411 を第一世代のCa拮抗の欠点を克服した第一選択と成りうる降圧薬として、F-0401を新タイプの脳虚血性疾患治療薬として、臨床応用する有用性を示唆した。

謝辞

本稿を終わるにあたり、有益な御助言を賜りました城西大学薬学部教授・菅谷愛子博士、並びに同大学薬学部教授・従二和彦博士に深謝致します。また、本論文作成に際し、終始にわたり御教示戴き、御多忙な中、御校閲を賜りました城西大学薬学部教授・谷覺博士に深甚なる謝辞を表します。

また、本研究の機会を与えて下さいました富士レビオ株式会社　医薬研究所所長・大西治夫博士、同　医薬研究推進室　部長・山浦哲明博士、同　医薬企画部長・関根安男博士に心より感謝致します。最後に本研究の遂行に御協力と御助言を戴きました富士レビオ株式会社医薬研究所所員の皆様方に感謝致します。

参考文献

1)厚生省保険医務局（編），" 第4次循環器疾患基礎調査(平成2年）報告"，循環器病研究振興財団，大阪，1993，pp.168.

2)村谷博美，木村頼雄，川副信行，瀧下修一，柊山幸志郎，内科，**70**，811(1992).

3)T.Pollare,H.Lithell,C.Berne，*N.Engl.J.Med.*，**321**,868(1989).

4)J.H.Warram，L.M.B.Laffel，P.Valsania，A.R.Christlieb，A.S.Krolewski，*Arch.Intern.Med.*，**151**，1350(1991).

5)The National High Blood pressure Education Program Working Group，*Hypertention*，**23**，145(1994).

6)M.Middeke，W.O.Richter，P.Schwandt，B.Beck，H.Holzgreve，*Arteriosclerosis*，**10**，145(1990).

7)A.Dornhorst，S.H.Powell，J.Pensky，*Lancet*，**1**，123(1985).

8)J.E.Manson，H.Tosteson，P.M.Ridker，S.Satterfield，P.Hebert，G.T.O'Connor，J.E.Buring，C.H.Hennekens，*N.Engl.J.Med.*，**326**，1406(1992).

9)小田淳，池田康夫，カレントテラピー，**12**，1482(1994).

10)The SALT Collaborative group，*Lancet*，**338**，1345(1991).

11)A.Fleckenstein，*Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.*，**17**，149(1977).

12)K.Aoki，S.Kando，A.Mochizuki，T.Yoshida，S.Kato，K.Kato，K.Takikawa，*Am.Heart J.*，**96**，215(1978).

13)I.M.O'shanghnessy，T.A.Kotchen，*Current Opinion in Cardiology*，**8**，761(1993).

14)秋下雅弘，大内尉義，折茂肇，CLINICAL CALCIUM，**12**，116(1991).

15)P.D.Henry，K.I.Bentley，*J.Clin.Invest.*，**68**，1366(1981).

16)大内尉義，折茂肇，動脈硬化，**18**，183(1990).

17)A.Loaldi，A.Polese，P.Montorsi，N.De Cesare，F.Fabbiocchi，P.Ravagnani，M.D.Guazzi，*Am.J.Cardiol.*，**64**，433(1989).

18)矢部喜正，動脈硬化，**13**，793(1985).

19)P.R.Lichtlen，P.G.Hugenholtz，W.Rafflenbeul，H.Hecker，S.Jost，J.W.Deckers，*Lancet*,**335**， 1109(1990).

20)P.H.Stone，*Am.J.Cardiol.*， **59**，101B(1987).

21)石崎高志，" 循環器疾患の薬物療法",南江堂，東京，1992，pp.191.

22)F.Urthaler，*Am.J.Med.Sci.*，**29**，217(1986).

23)M.Thibonnier，F.Bonnet，P.Corvol，*Eur.J.Clin.Pharmacol.*，**17**，161(1980).

24)伊川博，角入章仁，佐藤芳昭，平川信彦，柏葉憲明，関根安男，久津間輝雄，山浦哲明，加瀬則子，富士レビオ株式会社社内報告書 1990.7.13

25)K.Nakao，H.Kato，K.Takagi，*Jpn.J.Pharmacol.*，**25**，25(1975).

26)J.M.Van Rossum，*Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*,**143**,299(1063).

27)O.Arunlaskshana，H.O.Schild，*Br.J.Pharmacol.*,**14**，48(1959).

28)F.E.Preston，S.Whipps，C.A.Jackson，A.J. French，P.J.Wyld，C.J.Stoddard，*N.Engl.J.Med.*，**304**， 76(1981).

29)伊川博，角入章仁，富士レビオ株式会社社内報告書 1991,6,20.

30)P.Needleman，A.Raz，J.A.Ferrendeli，M.Minkes，*Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.*，**74**，1716(1977).

31)佐野圭司，半田肇，鈴木重晴，浅野孝雄，田村晃，米川泰弘，小野博久，橋直矢，花岡一雄，医学のあゆみ，**138**， 455(1986).

32)G.V.R.Born，M.J.Cross，*J.Physiol.(London).*， **168**，178(1963).

33)M.J.Silver，J.B.Smith，C.Ingerman，J.J.Kocsis，*Prostaglandins*，**4**， 863(1973).

34)内藤惇，平工誠治，久我哲郎，応用薬理，**27**，267(1984).

35)Y.Kawahara，J.Yamanishi，Y.Furuta，K.Kaibuchi，Y.Takai，H.Fukuzaki，*Biochem. Biophys.Res.Commun.*， **117**，663(1983).

36)G.J.Johnson，L.A.Leis，G.S.Francis，*Circulation*，**73**，847(1986).

37)D.J.Hanahan，C.A.Demopoulos，J.Liehr，R.N.Pinckard， *J.Biol.Chem.*，**255**， 5514(1980).

38)F.H.Valone，B.Johnson，*J.Immunol.*，**134**， 1120(1985).

39)S.D.Shukla，D.J.Hanahan，*Arch.Biochem.Biophys.*， **232**，458(1984) .

40)F.H.Valone，*Thromb.Res.*，45，427(1987).

41)L.Grodzínska,E.Marcinkiewicz，*Pharmacol.Res.Commun.*，**11**，133(1979).

42)J.B.Smith，C.Ingerman，J.J.Kocsis，M.J.Silver，*J.Clin.Invest.*，**52**，965(1973).

43)D.C.B.Mills，J.B.Smith，*Biochem.J.*， **121**， 185(1971).

44)Y.Ikeda，M.Kikuchi，K.Toyama，K.Watanabe，Y.Ando，*Thromb.Haemostas.*，**45**，158(1981).

45)J.Mehta，P.Mehta，N.Ostrowski，F.Crews，*Thromb.Res.*，**30**，469(1983).

46)A.Shinjo，Y.Sasaki，M.Inamasu，T.Morita，*Thromb.Res.*， **13**，941(1978).

47)川島祐彦，久保田功，八巻通安，立木楷，安井昭二，大沼沖雄，宮沢光瑞，基礎と臨床，**20**，305(1986).

48)H.AI-Mondhiry，J.O.Ballard，V.McGarvey，*Thromb.Res.*，**31**，415(1983).

49)J.E.Merrit，W.P.Armstrong，C.D.Benham，J.Hallam，R.Jacob，A.Jaxa-Chamiec,B.K.Leigh，S.A.McCarthy，K.E.Moores，T.J.Rink，*Biochem.J.*，**271**， 515(1990).

50)T.Hiroki，T.Inoue，T.Yoshida，K.Arakawa，*Arzneim.-Forsh.*， **32**，1572(1982).

51)日高弘義（編），"血小板の分子薬理-基礎と臨床 "，初版，講談社サイエンティフィク編，講談社，東京，1983，pp.74.

52)前田義春，金山春洋，長村吉郎，林謙宏，岡島泰，川村恒博，木谷輝夫，和多田光朗，中川雅夫，伊地知浜夫，血液と血管，**14**，65(1983).

53)J.P.Vilaine，M.L.Biondi，N.Villeneuve，M.Feletou，J-L.Peglion， P.M.Vanhoutte，*Eur.J.Pharmacol.*，**197**， 41(1991).

54）小林　誠，金出英夫，“カルシウム拮抗薬 -解明された基礎と臨床への応用”， 初版，矢崎義雄，遠藤政夫（編）， 医薬ジャーナル社，大阪，1995，pp.69.

55)T.Iwamoto，T.Morita，T.Kanazawa，H.Ohtaka，K.Ito，*Jpn.J.Pharmacol.*，**48**，241(1988).

56)J.M.Van Nueten，P.M.Vanhoutte，*Angiology*， **32**，476(1981).

57)久保和博，唐沢　啓，山田耕二，二藤真明，周藤勝一，中溝喜博，日薬理，**79**，383(1982).

58)T.Takenaka，S.Usuda，T.Nomura，H.Maeno，T.Sado， *Arzneim.-Forsh.*，**26**，2172(1976).

59)S.Kazda，B.Garthoff，H.P.Krause，K.Schlossmann， *Arzneim.-Forsh.*，**32**，331(1982).

60)M.Yamamoto，T.Ohta，N.Toda，*Stroke*， **14**，270(1983).

61)R.Towart，E.Wehinger，H.Meyer，S.Kazda，*Arzneim.-Forsh.*，**32**，338(1982).

62)G.Julou-Schaeffer，J.L.Freslon，*Naunyn-Schmideberg's Arch.Pharmacol.*，**336**， 670(1987).

63)M.Masuo，T.Toyooka，W.S.Shin，T.Sugimoto，*Circ.Res.*，**69**，1327(1991).

64)中山貢一，" カルシウム拮抗薬 -基礎と臨床-"，初版，木村栄一，平則夫編，医薬ジャーナル　東京，1983，pp.33.

65)堀田　健，心臓，**13**，1162(1981).

66)E.Müller-Schweinitzer，P.Neumann，*J.Cereb.Blood Flow Metab.*，**3**，354(1983).

67)北村憲司，熊　志，鴨打正浩，蛋白質　核酸　酵素，**36**，869(1991)

68)元村成，橋本敬太郎，CLINICAL CALCIUM，**2**， 931(1992).

69)T.Nakaki，B.L.Roth，D.Chuang，E.Costa，*J.Pharmacol.Exp.Ther.*，**234**， 442(1985).

70)T.Furuichi，S.Yoshikawa，A.Miyawaki，K.Wada，N.Maeda，K.Mikoshiba，*Nature*，**342**， 32(1989).

71)A.Miura，Y.Ukai，T.Tatsuzaki，N.Taniguchi，S.Hayashi，S.Kano，Y.Kimura，K.Kimura，H.Enomoto，*Arzneim.-Forsh.*，**36**，1323(1986).

72) H.Glossmann，D.R.Ferry，“ Methods in Enzymology，Vol.109 ”，Edited by L.Birnbaumer and B.W.O'Malley， Academic Press.Inc.，New York，1985，pp.513.

73)F.H.Valone，*Biochem.Biophys.Res.Commun.*，**126**， 502(1985).

74)L.A.Wittenauer，K.Shirai，R.L.Jackson，J.D.Johnson，*Biochem.Biophys.Res.Commun.*，**118**， 894(1984).

75)山口敏朗，広瀬勝巳，中村裕，菅野浩一，日薬理，**90**，295(1987).

76)T.Yoshimoto，C.Yokoyama，K.Ochi，S.Yamamoto，Y.Maki，Y.Ashida，S.Terao，M.Shiraishi，*Biochem.Biophys.Acta.*， **713**，470(1982).

77)B.A.Jakschik，F.F.Sun，L.Lee，M.M.Steinhoff， *Biochem.Biophys.Res.Commun.*，**95**，103(1980).

78)H.Hidaka，T.Asano，*J.Biol.Chem.*，**251**， 7508(1976).

79)G.Davi，S.Novo，M.Fiore，A.Foderà，A.Mattina，A.Mazzola，A.Strano，*Thromb.Res.*， **28**，837(1982).

80)T.J.Hallam，A.Sanchez，T.J.Rink，*Biochem.J.*，**218**，819(1984).

81)W.Siess，*Physiol.Rev.*，**12**，65(1989).

82)Z.Honda，M.Nakamura，I.Miki，M.Minami，T.Watanabe，Y.Seyama，H.Okada．H.Toh，K.Ito，T.Miyamoto，T.Shimizu，*Nature*，**349**，342(1991).

83)V.M.Doyle，U.T.Rüegg，*Biochem.Biophys.Res.Commun.*， **127**，161(1985).

84)T.J.Rink，S.O.Sage，*Annu.Rev.Physiol.*，**52**，431(1990).

85)N.Sakamoto，M.Terai，T.Takenaka，H.Maeno，*Biochem.Pharmacol.*，**27**，1269(1978).

86)D.C.B.Mills，J.B.Smith，*Biochem. J.*，**121**，185(1971).

87)M.S.Magnoni，S.Govoni，F.Battaini，M.Trabucchi，*J.Cereb.Blood Flow Metab.*，**8**，96(1988).

88)B.Spinnewyn，N.Blavet，F.Clostre，N.Bazan，P.Braquet，*Prostaglandins*，**34**，337(1987).