

Isoproterenolによる一過性内向き電流誘発不整脈モデルを用いた医薬品の催不整脈作用の検討

鳥取大学医学部社会医学講座健康政策医学分野 (主任 能勢 隆之教授)

鳥取大学医学部病態解析医学講座薬物治療学分野 (主任 長谷川 純一教授)

丸 本 明 彬

New tool of isoproterenol-induced transient inward current for the assessment of the potential for proarrhythmic activity associated with delayed afterdepolarization by drugs

Akira MARUMOTO

Division of Health Administration and Promotion, Department of Social Medicine and Division of Pharmacotherapeutics, Department of Pathophysiological and Therapeutic Science, Tottori University, Faculty of Medicine, Yonago 683-8504, Japan

ABSTRACT

For the last decade interest in the potential for drugs to have proarrhythmic effects has increased substantially. Triggered activity initiated by delayed after depolarization (DAD) is one of the causes that induce lethal ventricular arrhythmias. However, screening tests to investigate the potential for proarrhythmic effect of drugs associated with triggered activity have not been established. Therefore, this study was performed to investigate the proarrhythmic effect of drugs on catecholamine-induced transient inward current (I_{Ti}) that causes DAD using the whole cell patch clamp technique in guinea pig ventricular myocytes. Isoproterenol, beta-receptor agonist, induced a single phasic I_{Ti} after repolarization. Since ryanodine, sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} channel blocker, abolished isoproterenol-induced I_{Ti} without any effects on the L-type Ca^{2+} current ($I_{Ca,L}$), isoproterenol-induced I_{Ti} seemed to be caused by release of Ca^{2+} from SR. I compared the effects of trapidil, anti-anginal agent, on $I_{Ca,L}$ and I_{Ti} with those of isoproterenol in order to screen for possible proarrhythmic action. Although a high concentration of trapidil increased $I_{Ca,L}$ as much as isoproterenol, trapidil not only failed to facilitate I_{Ti} , but also suppressed isoproterenol-induced I_{Ti} . This arrhythmic model may be a useful tool for estimating the potential proarrhythmic activity of cardiovascular and non-cardiovascular drugs.

(Accepted on November 11, 2002)

Key words : proarrhythmic effect, transient inward current, triggered activity

はじめに

心臓突然死の主たる原因は心室頻拍 (ventricular tachycardia; VT) に引き続く、もしくは特発性の心室細動 (ventricular fibrillation; Vf) と考えられている。近年、抗アレルギー薬のterfenadine¹⁾, astemizole²⁾, 消化管作用薬のcisapride³⁾など循環器疾患治療薬以外の薬剤による致死的心室性不整脈の発生が相次ぎ報告され、医薬品における催不整脈作用に関するスクリーニングの必要性の認識が高まりつつある。前述の薬剤による致死的心室性不整脈の報告は心電図上のQT間隔延長が引き金となるtorsade de pointes (TdP) である¹⁻³⁾。そのQT間隔延長の発生機序として、QT間隔を規定するrapidly activating delayed rectifier K⁺ current (I_{Kr}) 阻害作用が示唆されているため^{4, 5)}, 医薬品の催不整脈作用をスクリーニングする方法として、QT間隔延長作用の有無とともに、ヒト心筋組織と類似したイオンチャンネルを有する種の心筋組織において、I_{Kr}をはじめとする心筋活動電位の再分極過程に関与するイオンチャンネルへの電気生理学的研究を行うことが勧められている⁶⁾。当教室においてもこれまで、消化管作用薬であるitopride, trimebutineの心筋細胞イオンチャンネルへの影響を検討してきた^{7, 8)}。しかしながら、医薬品の催不整脈作用の原因は単一ではなく、医薬品の催不整脈作用を検討するうえで、心室筋細胞における活動電位持続時間および活動電位再分極相に関わるイオンチャンネルへの影響のみでは不十分と考えられる。そこで、致死的心室性不整脈の発生機序の1つであるtriggered activityの発生について薬剤の影響を検討する必要があると考えた。

Triggered activityは心筋が正常に活動電位を発生したことが引き金となって自動的、連続的に心室筋細胞膜が脱分極することによるものであり、delayed afterdepolarization (DAD) とearly afterdepolarization (EAD) の2つの異なる現象が先行する⁹⁾。このうちDADはtransient inward current (I_{Ti})¹⁰⁾もしくはoscillatory current (I_{os})¹¹⁾と呼ばれる一過性内向き電流、すなわち心筋細胞内のCa²⁺過負荷により活性化される非選択的陽イオンチャンネル電流が主に引き起こしていると考えられている。I_{Ti}は虚血心、梗塞心、肥大心筋など不全心における心筋細胞で認められ

る電流であり、いわゆる正常心筋細胞では観察されない¹²⁾。このため、医薬品においてこのI_{Ti}への影響を検討する手段は確立されているとは言い難い。そこで今回、成熟モルモット単離心室筋細胞にβ受容体刺激薬であるisoproterenolを用いてI_{Ti}を誘発する不整脈モデルを作製し、医薬品における催不整脈作用を評価するスクリーニング法の確立を試みた。さらにこの不整脈モデルを用いて、phosphodiesterase (PDE) 阻害作用による冠血管拡張作用を有し、虚血性心疾患患者に広く用いられているtrapidilについての検討を行った。

材料および方法

モルモット心室筋細胞単離法

モルモット心室筋細胞はcollagenase処理する既存の方法で単離した^{7, 8)}。雄性モルモット (体重250-400 g) にheparin sodium (500 units) 及び、pentobarbital sodium (50 mg/kg) を腹腔内投与し全身麻酔を施した後に、速やかに心臓を摘出した。心臓は冷却したCa²⁺-free Tyrode液にて停止させた。その後、Langendorff灌流装置に装着し、大動脈から灌流圧70 cmH₂Oで逆行性に灌流した。最初にCa²⁺-free Tyrode液 50 mLにて血液を洗浄し、続いてcollagenase (Sigma Type I, 1.0 mg/mL) を含む酵素液で12分間灌流した。全ての灌流液は酸素にて飽和させ、37°Cを保った。さらに心臓をCa²⁺-free Tyrode液 100 mLで灌流することにより酵素液を洗浄し、Langendorff灌流装置より取り外した。摘出心の左心室及び右心室を切除し、Kraftbrühe (KB) 液内で細切し、振盪することにより細胞を単離した。メッシュを用いて濾過した後、単離心室筋細胞は常温下KB液にて保存し実験に供した¹³⁾。

灌流液組成 (mM/L)

正常Tyrode液の組成はNaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 0.5; NaH₂PO₄, 0.33; glucose, 5.5; N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5.0; pH 7.4 (NaOHで調整)。

Ca²⁺-free Tyrodeは上記正常Tyrode液からCaCl₂を除いたものを用い、酵素液はCa²⁺-free Tyrode液にcollagenase (Type I, Sigma Chemical Co, USA) を1 mg/mL加えて作成した。

KB液の組成は potassium glutamate, 70; KCl,

30; KH_2PO_4 , 10; MgCl_2 , 1; taurine, 20; EGTA, 0.3; glucose, 10; pH, 7.2 (KOHで調整).

電極内液の組成はpotassium aspartate, 70; KCl, 50; KH_2PO_4 , 10; MgCl_2 , 3; $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 3; $\text{Li}_2\text{-GTP}$, 0.1; HEPES, 5; pH, 7.2 (KOHで調整)

電気生理学的検査とデータ解析

単離心室筋を倒立顕微鏡 (model IX-70, Olympus, Japan) のステージ上に設置した記録槽 (0.24 mL) に撒き, 37°C に保ったTyrode液を2 mL/minで灌流した. 単離心室筋の膜電流はEPC-9 電位固定用増幅器 (HEKA Electronic, Germany) を用い全細胞膜電位固定法 (whole cell patch clamp 法) により記録した. Patch電極は外径1.5 mm, 内径 1.0 mmのパイレックスガラス管 (model G-1.5, Narishige, Japan) を微小電極作製装置 (model P-97, Sutter Instrument Co., USA) で作成し, 前述の電極内液を入れた状態での電極抵抗が2-4 M Ω となるよう調節した. Liquid junctional potentialを10 mVとし, 膜電位固定実験を行った. 単離心室筋細胞の膜電流の測定結果はanalog/digital converter (Pulse, HEKA Electronic, Germany) を通じてpersonal computer (Power Macintosh G3 DT266, Apple, USA) にデジタルデータとして保存した. 実験終了後電流値の計測はPulse Fit software (HEKA Electronic, Germany) を用いていった. L型 Ca^{2+} 電流 ($I_{\text{Ca,L}}$) は0電流レベルを基準に, 脱分極パルスを与えた際の最初の内向き電流のピークまでを計測し, I_{T_1} は定常電流から脱分極パルス終了後に発生した内向き電流のピークまでを測定した.

薬品

Isoproterenol HCl (Nikken Chemical Co., Tokyo, Japan) は0.1% ascorbic acid溶液で400 $\mu\text{M/L}$ に希釈し, ryanodine (Wako Chemical Co., Osaka, Japan) は蒸留水で400 $\mu\text{M/L}$ に希釈し 4°C で暗所保存した. Trapidil (Mochida Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) は使用直前に正常Tyrode液に溶解し用いた.

検定

Student's t-testにて有意差を検定した. 全

データは平均 \pm 標準誤差で示し, $P < 0.05$ を有意とした.

結 果

長時間脱分極パルスにおけるIsoproterenolによる I_{T_1} 誘発

はじめに, isoproterenolによる I_{T_1} の発生ならびに電流電圧関係に対する作用を検討した. 細胞膜静止電位を -40 mVに保持し, 60 s毎に2 sの脱分極ステップパルス (0, +10, +20, +40 mV) を与えた (長時間脱分極パルスモデル). 図1A及び1Bは各電位における電流記録を重ね合わせて示したもので, control記録の後 (図1A) isoproterenolを30 nM/Lの濃度で細胞外より5分間持続的に作用させた (図1B). Controlの条件下においても7細胞中1細胞のみで+40 mVの高電位への脱分極パルスを与えた後 -16.52 pAの I_{T_1} が発生した. Isoproterenol作用により7細胞中全ての細胞で I_{T_1} が発生した. 図1Cに先行する脱分極パルスの電位とそれに引き続く再分極パルス終了後に発生した I_{T_1} の大きさの関係 (電流-電圧曲線) を示す. 図のように, I_{T_1} は脱分極パルスの電位依存性に増大した. Isoproterenolによって発生した再分極後の I_{T_1} は単一の内向き電流として観察され, 脱分極パルス時のような振動性電流は認められなかった (図1B). 図1Dに正常Tyrode液の組成を低 K^+ (0.54 mM/L), 高 Ca^{2+} (5.4 mM/L) 溶液とした場合の I_{T_1} の発生を示す. 細胞外灌流液が低 K^+ 高 Ca^{2+} 溶液の場合, isoproterenol非作用下においても, I_{T_1} の発生が認められたが, 脱分極中および再分極後で誘発された I_{T_1} はisoproterenol誘発 I_{T_1} と同様, 脱分極パルス中では振動性電流がみられ, 再分極後では単一の一相性内向き電流として観察された ($n=3$).

Isoproterenol作用下での連続脱分極パルスによる I_{T_1} 誘発

Isoproterenolは β 受容体刺激により陽性変時作用を有する. この作用を想定したisoproterenolによる I_{T_1} 発生を検討するために短時間脱分極連続パルスを用いた. すなわち, 図2 insetに示すように保持電位 -40 mVから0 mVへの持続時間500 msの脱分極パルスを0.5 Hzの頻度で細胞に与え (連続脱分極パルスモデル), その際パルス毎に誘発された I_{T_1} を記録した. 図2に0.5 Hz, 30 連発

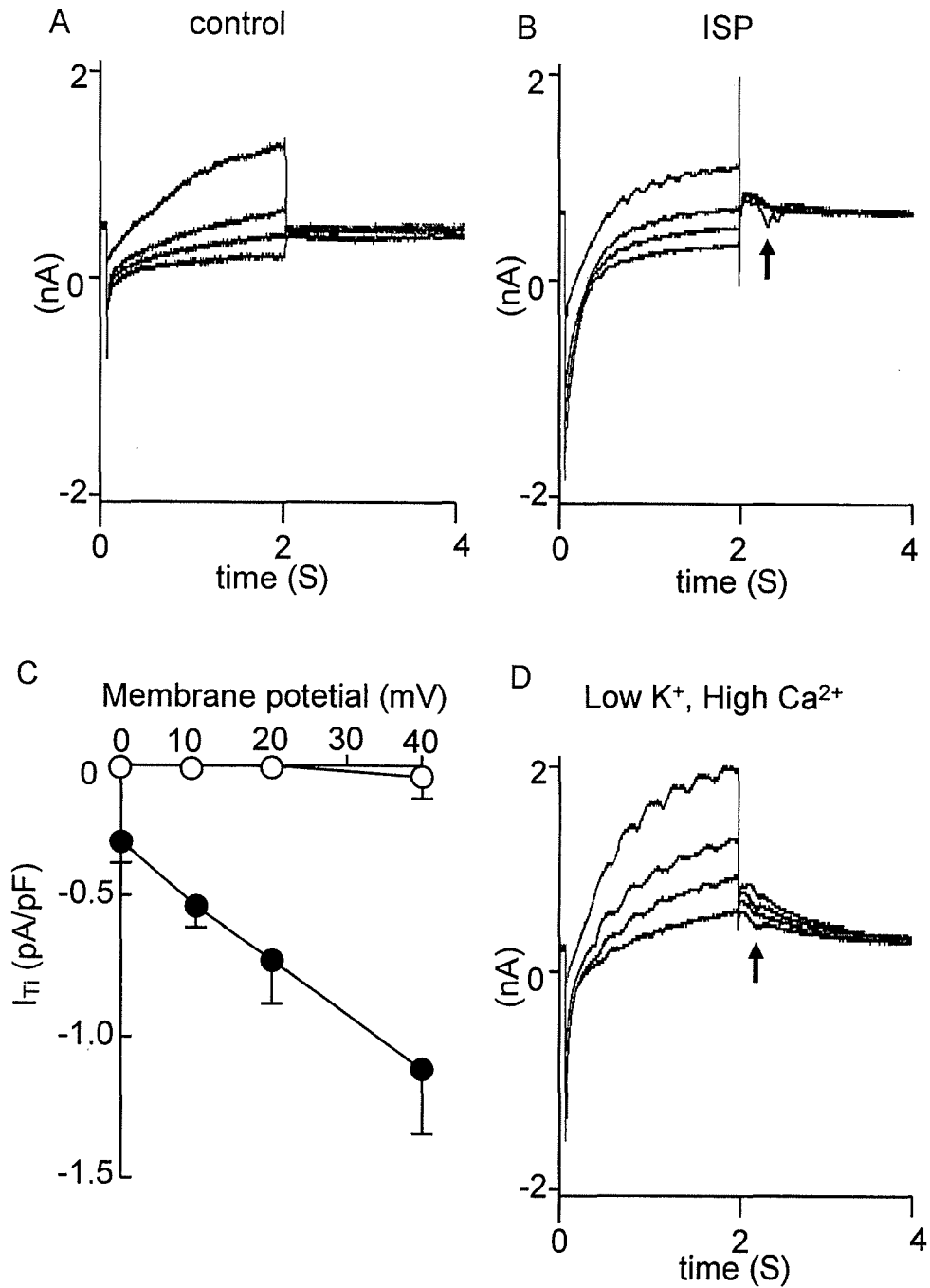


図1. 長時間脱分極パルスにおけるisoproterenolによる I_{Ti} 誘発

保持電位 (-40 mV) から60 s毎に脱分極パルス (0, +10, +20, +40 mV) を与えたときの実電流波形の記録を示す。

A: Controlにおいては長時間脱分極パルスにより I_{Ti} は誘発されない。

B: Isoproterenol (ISP, 30 nM/L) により I_{Ti} (矢印) が誘発される。

C: Controlとisoproterenol作用下での I_{Ti} の電流-電圧曲線を示す。

D: 細胞外灌流液を低 K^+ (0.54 mM/L) 高 Ca^{2+} (5.4 mM/L) 溶液 (low K^+ , high Ca^{2+}) とした場合, isoproterenol非作用下でも I_{Ti} は誘発される。

BおよびDでは再分極後の I_{Ti} のみならず脱分極パルス中に振動性電流を認める。

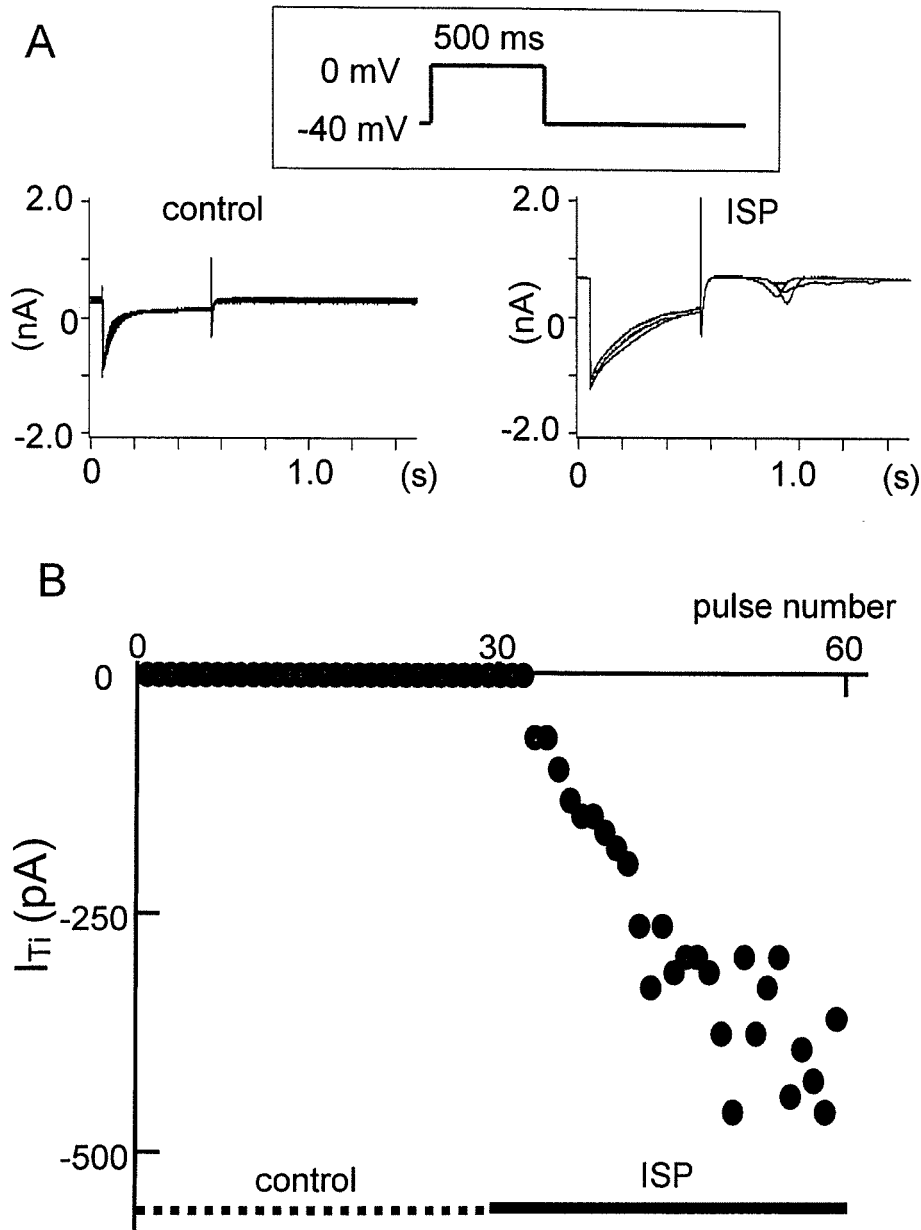


図2. 連続脱分極パルスにおけるisoproterenolによる I_{Ti} 誘発

Insetに示すように、保持電位-40 mVから0 mVへの持続時間500 msの脱分極パルスを0.5 Hzの頻度で与えた時に得られる実電流波形の記録をA, Bに示す。

A: Controlにおいては連続脱分極パルスにより I_{Ti} は誘発されないが(0~30発の重ね合わせ)、isoproterenol (ISP, 30 nM/L)により I_{Ti} が誘発される。(33, 40, 50, 60発目の実電流波形の重ね合わせ記録を示す。)

B: 各脱分極パルスに対する I_{Ti} 値を示す。図の下の波線、実線はcontrol及びisoproterenol作用の時間経過を示す。

脱分極パルスを与えた1実験例を示す。図2Aはisoproterenol作用前(control)と作用時(ISP)の実電流の重ね合わせ記録を示し、図2Bに

isoproterenol作用前及び作用時の各パルスにおける I_{Ti} の大きさをプロットした。図から明らかなようにcontrolでは30連発の脱分極パルスを与えても

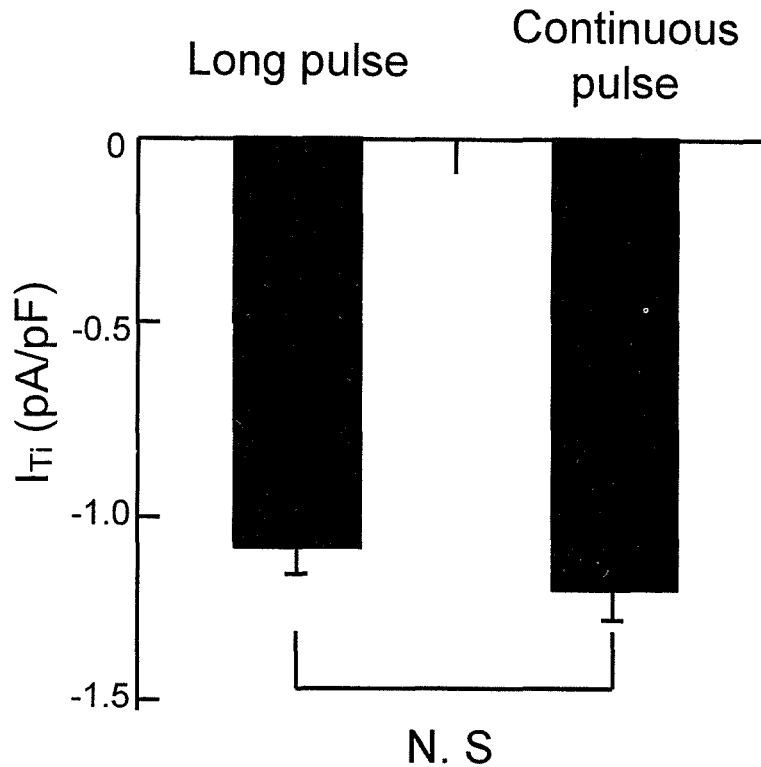


図3. 長時間脱分極パルス (long pulse) と連続脱分極パルス (continuous pulse) でのisoproterenol誘発 I_{Ti} 値の比較 (同一細胞による比較, $n=6$)

I_{Ti} は発生しなかったのに対して, isoproterenol作用下では I_{Ti} が誘発された。この際, 刺激回数が多くなると誘発される I_{Ti} は増大する傾向が認められたが, 誘発された I_{Ti} は全て単一の一相性内向き電流であり, 振動性電流は観察されなかった。この結果は, 他の4例の実験でも同様であった。

長時間脱分極パルスモデルと連続脱分極パルスモデルにおいて誘発された I_{Ti} の電流値を比較した (図3)。それぞれのモデルでの I_{Ti} の最大値, すなわち長時間脱分極パルスモデルでは+40 mVから-40 mVへ再分極させた後に発生した I_{Ti} と, 連続脱分極パルスモデルにおいては30連発中最も大きい I_{Ti} を計測し, 計測した電流値 (pA) を各細胞容量 (pF) で除したものを (pA/pF) を比較した。長時間脱分極パルスモデルと連続脱分極パルスモデルとの間には I_{Ti} の大きさに有意差は認められなかったが, 連続脱分極パルスモデルの I_{Ti} が大きい傾向があった。長時間脱分極パルスモデルにおいては脱分極パルス中に見られる振動性電流の影響も否定できないと考え, 以後の実

験は連続脱分極パルスモデルにより, 医薬品の I_{Ti} 発生に関する催不整脈作用及び, isoproterenolとの相互作用を評価することとした。

Isoproterenol誘発 I_{Ti} は筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離が関与する

I_{Ti} は細胞内 Ca^{2+} 過負荷により引き起こされ, その細胞内 Ca^{2+} 負荷に筋小胞体 (SR) からの Ca^{2+} 遊離が原因の1つとして考えられている¹⁴⁾。連続脱分極モデルにおいてもisoproterenol誘発 I_{Ti} がSRからの Ca^{2+} 遊離に関連していることを確かめるために, SRの Ca^{2+} -release channel blockerであるryanodineを用いて検討した。図2で示したプロトコルを用い, 同様に0.5 Hzの連続脱分極パルスを与えた1実験例を図4Aに示す。Controlでは20連発の脱分極パルス中に I_{Ti} の発生は認められなかったが, 30 nM/L isoproterenolにより I_{Ti} が誘発され, その振幅は徐々に増大した。Isoproterenolと同時に細胞外より100 nM/L ryanodineを作用させると誘発された I_{Ti} はほぼ完

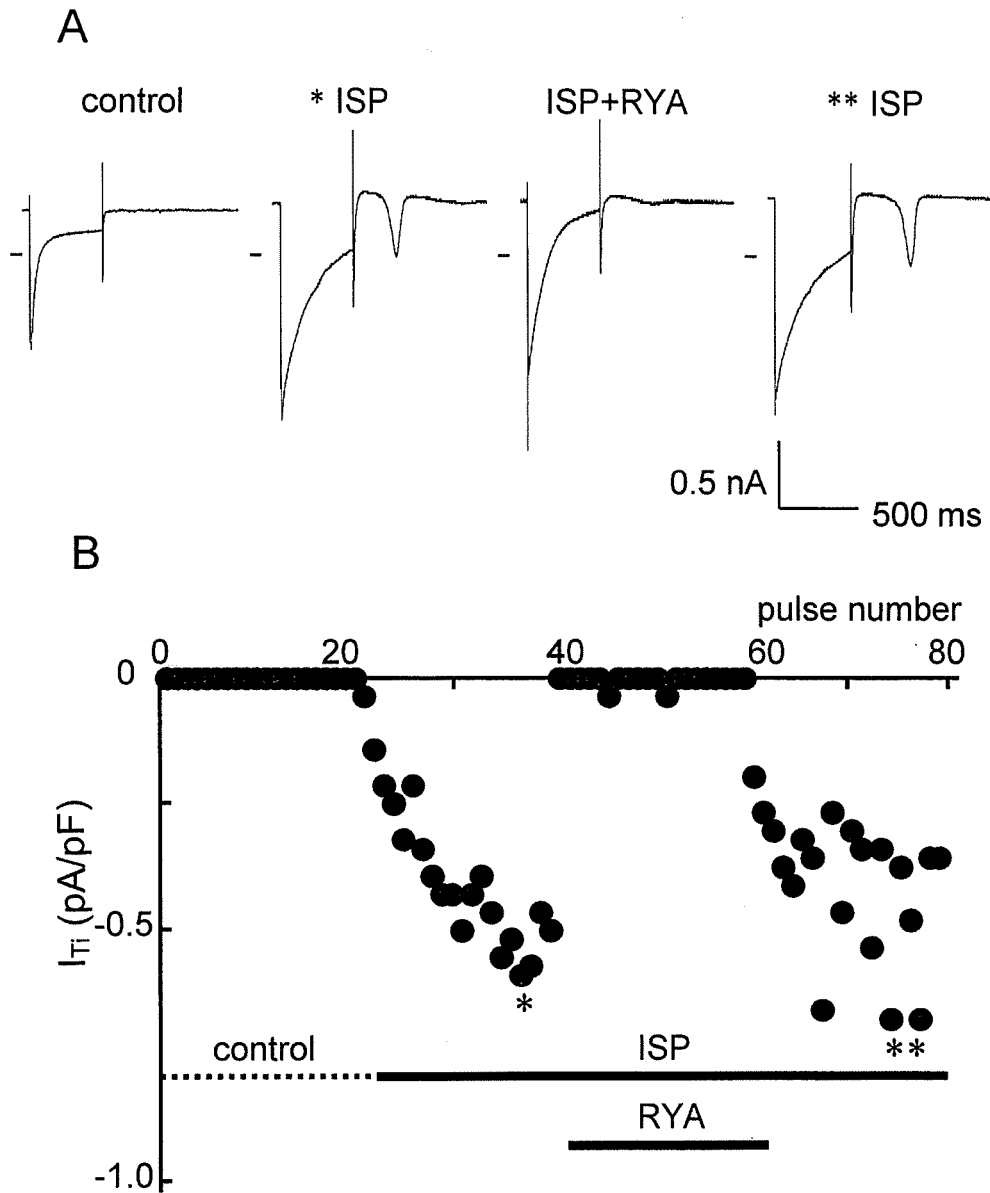


図4. Isoproterenol誘発 I_{T1} に対するryanodineの作用

A: 連続脱分極パルスモデルにおけるcontrol, isoproterenol作用時 (ISP), 及びryanodine追加投与時 (ISP+RYA) の実電流を示す. Isoproterenolにより I_{T1} は誘発され, ryanodineにより I_{T1} はほぼ完全に抑制される. 各電流記録直前 (左) の短い線は電流値0レベルを示す.

B: 各脱分極パルスにおける I_{T1} 値を示す. 図下部の波線及び直線は図2と同様各薬剤作用の時間経過を示す.

完全に抑制された. 再びisoproterenolのみ作用させると, より大きな I_{T1} が誘発された. 図4Bに脱分極パルス毎の I_{T1} をプロットした. 同様の結果が4例の実験で得られた. 図5にisoproterenol及びryanodine作用時の $I_{Ca,L}$ と I_{T1} の電流値の平均を示す. I_{T1} は20連発中の最大値を計測した.

Isoproterenol単独投与時とryanodine作用下において, $I_{Ca,L}$ には有意な差は認められなかったが, ryanodineにより I_{T1} は有意に抑制された. 5例中3例において, I_{T1} は完全に抑制され, 平均では $99.6 \pm 0.2\%$ の抑制であった.

PDE阻害作用を有するtrapidilは I_{T1} を誘発しない

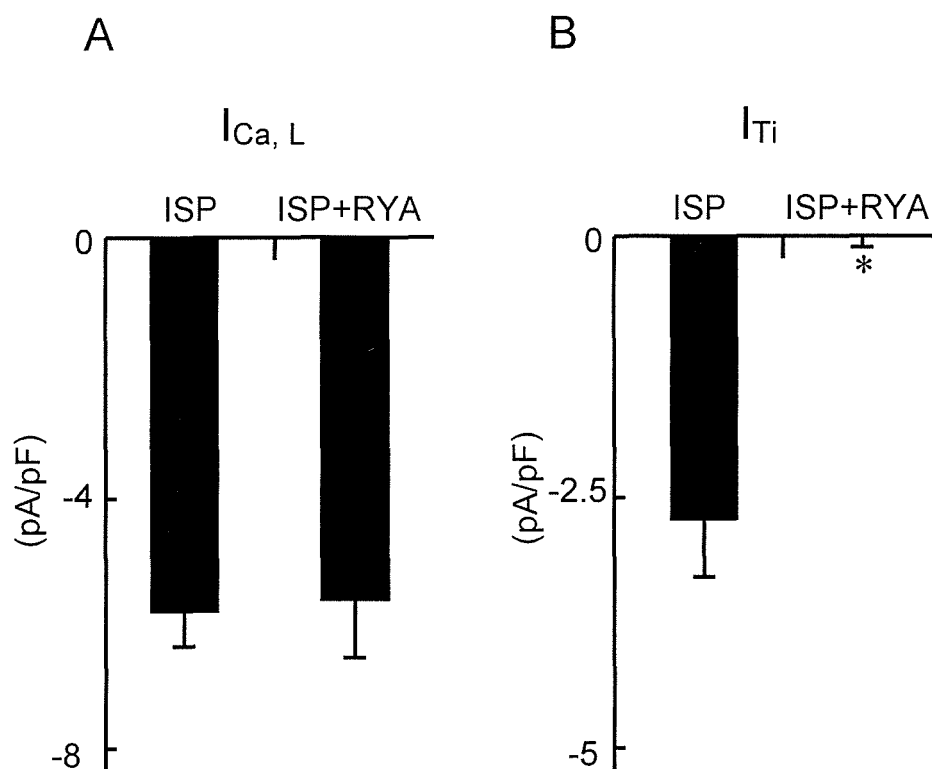


図5. Isoproterenol及びryanodine追加投与時の $I_{Ca,L}$ 値と I_{Ti} 値の比較

A: Isoproterenol単独投与時 (ISP) とryanodine追加投与時 (ISP+RYA) $I_{Ca,L}$ 値の比較 (n=5). $I_{Ca,L}$ について有意差は認められない.

B: Ryanodineによりisoproterenol誘発 I_{Ti} は有意に抑制された. (n=5, *p < 0.05 vs ISP)

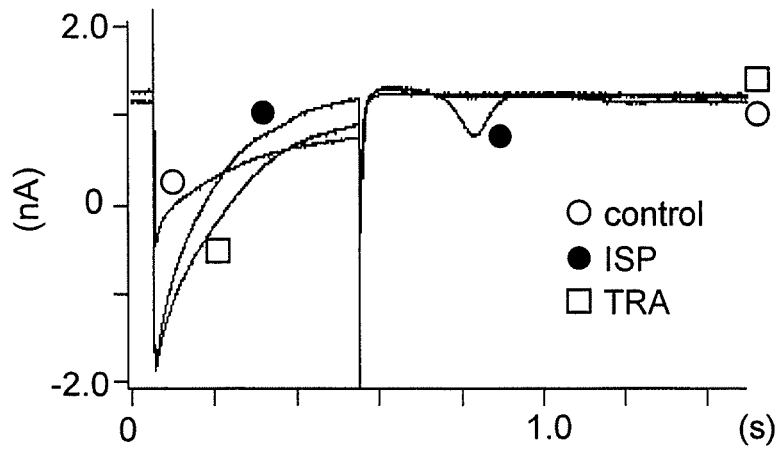
Ryanodineがisoproterenolにより増加した $I_{Ca,L}$ に影響を与えることなく、 I_{Ti} のみを抑制した結果より、 I_{Ti} 発生にはL型 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入とそれによりトリガーされるSRからの Ca^{2+} 遊離、すなわち Ca^{2+} -induced Ca^{2+} releaseが関わることが確認された。この結果に基づいて、 Ca^{2+} 電流の増加作用が報告されているphosphodiesterase (PDE) 阻害薬であるtrapidil¹⁵⁾を用いて I_{Ti} 誘発に関して検討した。上記の連続脱分極パルスモデルを用い、同一細胞に30 nM/L isoproterenol作用させた後、細胞外より1 mM/L trapidilのみ投与し同様に膜電流を記録した。図6 Aにコントロール、isoproterenol単独投与、及びtrapidil単独投与時の膜電流の重ね合わせ記録を示す。30 nM/L Isoproterenol単独投与により I_{Ti} が誘発されたが、trapidil単独投与では I_{Ti} は誘発されなかった。図には示していないがtrapidil単独投与後、再びisoproterenol単独投与すると同様

に I_{Ti} が誘発された。図6B, Cに5細胞例でのisoproterenol単独投与とtrapidil単独投与の場合の、 $I_{Ca,L}$ と I_{Ti} を示す。 $I_{Ca,L}$ に関しては両薬剤間に有意差は認められなかった。しかしながら、isoproterenolにより5例中全ての細胞において I_{Ti} が誘発されたのに対し (-2.7 ± 0.6 pA/pF, n = 5), trapidil単独投与では5例中1例にのみ微弱な I_{Ti} (-0.17 pA/pF) が誘発された。このことから少なくともtrapidilには I_{Ti} 誘発による催不整脈作用を有さないと考えられた。

Isoproterenol誘発 I_{Ti} はtrapidilにより抑制される

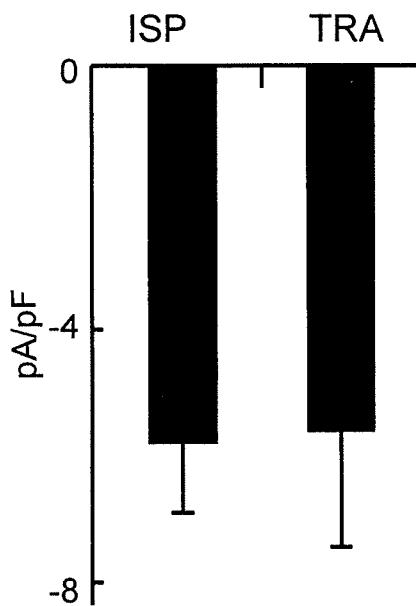
次にisoproterenolによる β 受容体刺激とtrapidilによるPDE阻害作用の相互作用を検討するために、連続脱分極パルスモデルにおいて、isoproterenol投与後、trapidilを追加投与し膜電流変化を記録した。図7Aは、コントロール、isoproterenol単独投与、及びisoproterenol作用下

A



B

$I_{Ca, L}$



C

I_{Ti}

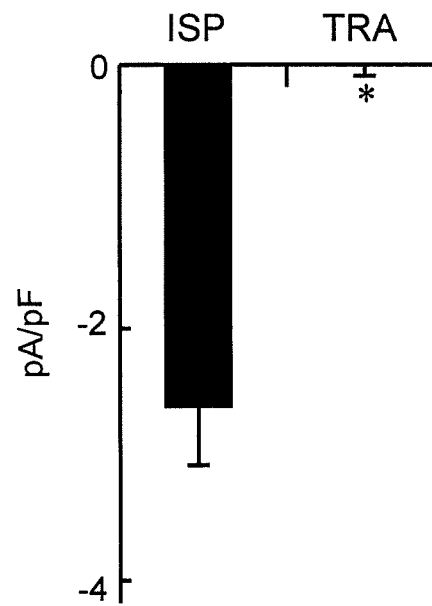


図6. trapidilは I_{Ti} を誘発しない

A: Control (○), isoproterenol (●; ISP), trapidil (□; TRA, 1 mM/L) 作用時の実電流を示す。

B: Isoproterenol単独 (ISP) 及びtrapidil単独投与時 (TRA) の $I_{Ca, L}$ 値の比較。両群間に有意差は認めない (n=5)。

C: Isoproterenol単独 (ISP) 及びtrapidil単独投与時 (TRA) の I_{Ti} 値の比較。Isoproterenolにより I_{Ti} が誘発されるが, trapidilでは誘発されない (n=5, * $p < 0.05$, vs ISP)。

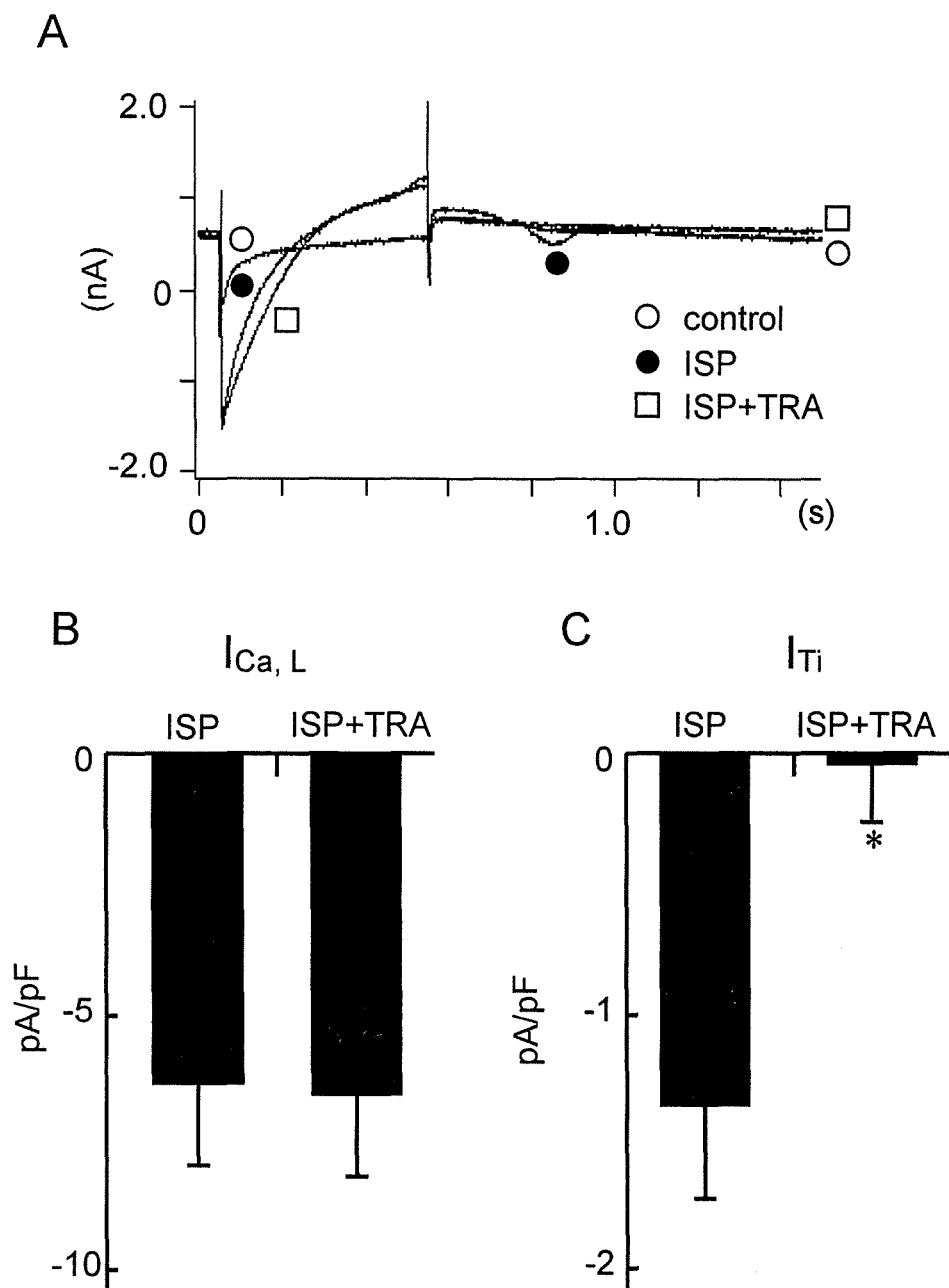


図7. trapidilはisoproterenol誘発 I_{Ti} を抑制する

A: Control (○), isoproterenol (●; ISP), 及び1 mM/L trapidil追加投与時 (□; ISP+TRA) の実電流波形の重ね合わせ記録を示す.

B: Isoproterenol単独 (ISP) 及びtrapidil追加投与時 (ISP+TRA) の $I_{Ca,L}$ 値の比較. 両群間に有意差はない (n=5).

C: Isoproterenol単独 (ISP) 及びtrapidil追加投与時 (ISP+TRA) の I_{Ti} 値の比較. Isoproterenolにより誘発された I_{Ti} は, trapidilにより抑制された (n=5, *p<0.05).

に1 mM/L trapidilを追加投与した際の膜電流変化を示す. 30 nM/L isoproterenol投与により有意に $I_{Ca,L}$ は増加し, I_{Ti} が誘発された.

1 mM/L trapidilを細胞外より追加投与すると, isoproterenolにより増加した $I_{Ca,L}$ に対しては明らかな作用を示さなかったが, isoproterenolに

より誘発された I_{Ti} はtrapidilにより抑制された。図7B, Cは5細胞でのtrapidilを追加投与した場合のisoproterenol存在下での $I_{Ca, L}$ 及び I_{Ti} に対する作用を示す。 $I_{Ca, L}$ に有意差は認めないものの(図7B), I_{Ti} はtrapidil追加投与により平均 $92.2 \pm 3.2\%$ ($n=5$)抑制された(図7C)。特に5例中2例においてはtrapidilにより I_{Ti} が完全に抑制された。このtrapidilのisoproterenol誘発 I_{Ti} 抑制作用は図4に示したryanodineのそれに類似していると考えられた。

考 察

非循環器作動薬による副作用の1つとして致死的心室性不整脈であるTdP発生の報告が多くなされてきている¹⁻³⁾。そのため、循環器作動薬を含む医薬品のもつ催不整脈作用が注目されている。致死的心室性不整脈の発生機序として薬剤によるQT間隔延長が関与しているとされ、医薬品の催不整脈作用を検討するうえでもQT間隔延長作用の有無が重要視されている¹⁶⁾。そのスクリーニング法として、心電図上のQT間隔を規定する、心筋細胞活動電位の再分極過程に関与するイオンチャンネルの分布が、ヒト心筋と類似した動物種的心筋細胞を用いて、薬剤のそれぞれのイオンチャンネルに対する作用を電気生理学的に検討する方法が勧められている。また薬剤誘発QT間隔延長作用が、心筋活動電位での再分極過程に関与するイオンチャンネルの内、特にdelayed rectifier K^+ channel (I_K) 阻害によるとの報告から、human ether-a-go-go related geneやKCNQ1とKCNE1といった I_K channelの遺伝子導入を施した細胞で、HERG- I_{Kr} 電流やKVLQT1 + minK- I_{Ks} 電流を検討するスクリーニング法が確立されている^{16, 17)}。

しかしながら致死的心室性不整脈の発生機序はQT間隔延長のみでなく、心筋が正常な刺激伝導により活動電位を発生したことが引き金になり、自動的に連続的な心筋細胞膜の脱分極がおこるtriggered activityの出現も致死性不整脈の発生機序の1つとして重要視されている。医薬品の催不整脈作用の有無について、前述のごとくQT間隔延長に着目したスクリーニング法は確立されているもののtriggered activityの発生に関するスクリーニング法は未だ充分検討されてはいない。Triggered activityは不全心において、DADとEADの2つの異なった現象が引き金となり⁹⁾、

EADは心筋細胞の活動電位中に起こり、活動電位中のL型 Ca^{2+} チャンネルの再活性化によって引き起こされると考えられている¹⁸⁾。EADはQT間隔延長とのかかわりが深く、TdP発生の原因となる¹⁶⁻¹⁸⁾。一方、DADは心筋細胞の活動電位終了後に出現し⁹⁾、主として I_{Ti} もしくは I_{Os} と呼ばれる電流によって引き起こされる^{10, 11)}。 I_{Ti} は心筋細胞内 Ca^{2+} 過負荷を反映する電流であり、細胞内 Ca^{2+} 過負荷の状況で頻脈時に引き起こされる¹⁹⁾。DADは特に梗塞心、肥大心など不全心において認められる^{19, 20)}。本研究は I_{Ti} に注目し、医薬品におけるDAD発生による催不整脈作用を検討するスクリーニング法の確立を試みた。

これまで心筋組織もしくは心筋細胞を用いた膜電位固定実験においては、 I_{Ti} 誘発には図1で示したような細胞外灌流液に低 K^+ 高 Ca^{2+} 溶液を用い、長時間脱分極パルス、もしくは連続脱分極パルスをもちいる方法や^{21, 22)}、高濃度のジギタリスを作用させ、 Na^+ ポンプを阻害させることにより細胞内 Ca^{2+} 過負荷を惹起させる方法^{11, 23)}、もしくはSRへの Ca^{2+} の取り込みと遊離を増加するcaffeineを作用させるなど様々な方法が試みられており^{24, 25)}、 I_{Ti} 誘発とともに細胞内 Ca^{2+} 過負荷の程度を評価する方法として確立されている^{26, 27)}。これらの方法はいずれも病的状態を引き起こし I_{Ti} を誘発している。しかしながら医薬品の I_{Ti} の発生や I_{Ti} への作用を評価するスクリーニング法として用いるには、医薬品の作用が I_{Ti} を引き起こしている病的状態によって何らかの修飾が加わり、本来の薬理作用を評価するには適さないのではないかと考えた。 I_{Ti} が病的状態のみ認められる電流ではあるが、この電流に対する医薬品の薬理作用を検討するスクリーニング法は、簡便かつ生理的状态に類似した状況下での方法がより有用と考える。この病的状態でおこる I_{Ti} への生理的状态に近い状況下での薬理作用評価という相反する点を克服するため、心筋細胞の膜電位固定実験において、細胞外灌流液のイオン組成は生理的状态下を想定したTyrode液を用い、 β 受容体刺激作用を有するisoproterenolとの比較、もしくはisoproterenolとの相互作用の観点から、医薬品の催不整脈作用を検討することとした。

Isoproterenolなどのcatecholaminesによる β 受容体刺激はGTP結合蛋白の一種であるGsを活性化し、細胞内セカンドメッセンジャーである

cAMPを増加させる。これに伴い機能的調節蛋白リン酸化が起こり、 $I_{Ca,L}$ およびSRへの Ca^{2+} の貯蔵とSRからの Ca^{2+} の遊離が増加し、結果的に細胞内 Ca^{2+} 過負荷が惹起されることから、catecholaminesは I_{T1} の増悪因子と考えられている²⁸⁾。CatecholamineのDAD発生に関する催不整脈作用については虚血心において報告されている¹⁹⁾。しかしながら、正常心室筋におけるcatecholamineによるDAD誘発の報告は様々である。Dangmanらは正常心室筋ではnorepinephrineによりDADは誘発されず、梗塞周囲の心筋のみに誘発されると報告しているが²⁹⁾、正常心筋においてもcatecholamine刺激により、DADは誘発されうるとの報告がある³⁰⁻³²⁾。Prioriらはイヌ単離心室筋細胞においてisoproterenolによるEAD, DADの誘発を報告している³²⁾。彼らの報告によるとisoproterenolは1~10 nM/Lの低濃度では心室筋細胞のAPDを延長し、かつEADを発生させるが、100 nM/L以上の高濃度ではAPDを短縮し、DADを誘発するという2相性の催不整脈作用を持っている。生体内でcatecholamine濃度に基づいて作用の違いを評価することは、局所におけるcatecholamine濃度の差や受容体数に影響されるため困難であると思われるが、*in vivo*の研究において、左星状神経節の電気刺激により再分極時間が有意に短縮することから³³⁾、心室筋細胞のAPDを短縮させる100 nM/L程度のisoproterenolは、生体内における最大アドレナリン作用に相当すると考えられている³²⁾。本研究によりisoproterenolが最大アドレナリン作用に相当する濃度100 nM/L以下の30 nM/Lの比較的低濃度でも、正常心室筋細胞においてDADを誘発し、催不整脈作用を有することが明らかとなった。

本研究では、Isoproterenolによる I_{T1} の発生にSRの Ca^{2+} 取り込みと遊離が関与していることが確認できた。心筋細胞では活動電位の脱分極相において、L型 Ca^{2+} チャネルを介して Ca^{2+} が細胞内から流入し、SRから Ca^{2+} の遊離が起こるため、長時間の脱分極はSRの Ca^{2+} 過負荷を引き起こすことになる³⁴⁾。図1に示す長時間脱分極モデルにおいてコントロールでは脱分極パルス時に振動性電位は認められなかったが、isoproterenolにより、脱分極パルス時に振動性電位が誘発されている。これはisoproterenolによる β 受容体刺激が脱分極中のSRからの Ca^{2+} 遊離を増加しているためと考

えられている^{35, 36)}。連続脱分極パルスモデルにおいては、脱分極時にはisoproterenol作用下であっても、振動性電位は誘発されない。しかしながら、図3に示したように、再分極させた時に誘発された単一波 I_{T1} がSRの Ca^{2+} -release channel blockerであるryanodineによりほぼ完全に抑制された結果からも、isoproterenolはSRからの遊離とSRへの Ca^{2+} 取り込みを増加することにより I_{T1} を誘発させることが示唆される。

I_{T1} の発生やその大きさ、頻度には細胞内 Ca^{2+} 濃度が影響していることは明らかで、事実、今回示さなかったものの、電極内液に0.3 mM/L EGTAを加えた場合には、 I_{T1} がまったく誘発されないことから確認される。このため、図1の長時間脱分極モデルの脱分極中に見られるように、 I_{T1} は膜電位を固定していても細胞内 Ca^{2+} 濃度が振動するのに伴い振動性に膜電流が変化することが特徴である^{10, 36, 37)}。 I_{T1} への薬理作用を評価するうえでこの振動性電流を評価するには、大きさのみならず、その向きや出現までの時間を評価しなければならず、困難である。長時間脱分極パルスモデルにおいても、再分極時に出現した I_{T1} は単一波であるが、脱分極パルス中に出現する振動性電流の影響を否定できないと考えた。一方で、連続脱分極パルスモデルにおいては脱分極パルス中には振動性電流は認められず、再分極パルス時に誘発された I_{T1} は常に単一波であり、評価が容易であるように思われた。このように連続脱分極モデルでは、脱分極中に振動性の I_{T1} は誘発されず、再分極時の I_{T1} が単一波であるばかりか、その振幅が長時間脱分極モデルの場合よりも大きい傾向があったことより、 I_{T1} への薬理作用を容易に評価できる可能性があると思われた。又、DADが頻脈時に出現することも考慮すると、連続脱分極モデルの方がより生体での状況に似ていると考えられる。

Isoproterenolによる I_{T1} の誘発が $I_{Ca,L}$ の増大とそれに引き続くSRからの Ca^{2+} 遊離であることが確認できたことより、 $I_{Ca,L}$ を増大する薬剤は細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、DADを誘発する可能性があると考えられた。本研究に用いた狭心症治療薬として用いられているtrapidilは、PDE阻害作用を有し、Kotakeらにより家兎洞房結節において Ca^{2+} 電流の増大が報告されているが¹⁵⁾、 I_{T1} への作用は不明である。図6に示すように、連続脱分

極モデルにおいてtrapidilは I_{T1} を誘発することはなかった。さらに図7ではtrapidilはisoproterenol誘発 I_{T1} に対する抑制効果を有することが明らかとなった。 $I_{Ca,L}$ については単独投与およびisoproterenol作用下であっても有意な差は認められず、trapidilには細胞内 Ca^{2+} 過負荷に対する何らかの防御作用を有する可能性があると考えられる。このtrapidilの細胞内 Ca^{2+} 過負荷抑制作用の1つとして、isoproterenolにより増大した $I_{Ca,L}$ と誘発された I_{T1} に対するtrapidilの作用はryanodineのそれと類似していることから、trapidilはSRからの Ca^{2+} 遊離に関わっている可能性も考えられる。しかしながら I_{T1} 発生にはSRからの Ca^{2+} 遊離だけでなく、非選択的陽イオンチャンネル¹⁴⁾、 Na^+ / Ca^{2+} 交換機構、 Ca^{2+} 依存性Cl⁻電流が関わっているとされるため^{23, 34)}、これら他の因子についての作用を検討する必要があると考えられる。しかしながら、少なくとも、本研究でtrapidilのDADに関するarrhythmogenic activityについては、isoproterenolによる I_{T1} 誘発不整脈モデルを用いることにより評価可能であった。すなわち、trapidilは $I_{Ca,L}$ を増大させるにも関わらず、DADを誘発せず、加えてcatecholamineによるDADに対して抗不整脈作用を有する可能性が示唆された。

Isoproterenolによる I_{T1} 誘発不整脈モデルは、医薬品のもつDADに対する不整脈作用を検討するスクリーニング法となりうる可能性があると考えられた。本研究においては30 nM/Lの比較的low濃度のisoproterenolを使用し、 I_{T1} 誘発不整脈モデルを作製した。梗塞心や肥大心などの不全心においては組織catecholamine濃度の上昇が認められており、この比較的low濃度isoproterenolによる不整脈モデルは、不全心の環境の一面を顕わしているとも考えられ、今後、循環器疾患治療薬の催不整脈作用の検討や、抗不整脈薬の薬理作用評価に有用であると考えられた。

結 論

Isoproterenolはモルモット心室筋細胞において、比較的low濃度でもDADの原因である I_{T1} を誘発した。連続脱分極パルスによって誘発される I_{T1} は振動性を認めず、 I_{T1} の発生にはSRからの Ca^{2+} 遊離が関与していた。抗狭心症治療薬として用いられているtrapidilは I_{T1} を誘発しないだけでなく、isoproterenolによる I_{T1} の誘発も抑制した。

Isoproterenolによる I_{T1} 誘発不整脈モデルは、医薬品の不整脈作用を検討するスクリーニング法に有用である可能性がある。

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部病態解析医学講座薬物治療学分野長谷川純一教授、また御助言、御校閲賜りました鳥取大学医学部社会医学講座健康政策医学分野能勢隆之教授、同器官制御外科学講座器官再生外科学分野應儀成二教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究遂行にあたり御協力頂きました器官再生外科学教室員各位ならびに薬物治療学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) June, R. A. and Nasr, I. (1997) Torsades de pointes with terfenadine ingestion. *Am J Emerg Med* 15, 542-543.
- 2) Brans, S., Murray, W. A., Hirsch, I. B. and Palmer, J. P. (1995) Long QT syndrome during high dose cisapride. *Arch Intern Med* 155, 765-768.
- 3) Rao, K. A., Adlakha, A., Verma-Ansil, B., Meloy T. D. and Stanton, M. S. (1994) Torsades de pointes ventricular tachycardia associated with overdose of astemizole. *Mayo Clin Proc* 69, 589-593.
- 4) Salata, J. J. JR., Kiewicz, N. K., Wallace, A. A., Stuppienski, R. F. III., Guinosso, P. J. JR. and Lynch, J. J. JR. (1995) Cardiac electrophysiological actions of the histamine H_1 -receptor antagonists astemizole and terfenadine compared with chlorpheniramine and pyrilamine. *Circ Res* 76, 110-119.
- 5) Drici, M. D. and Barhanin, J. (2000) Cardiac K^+ channels and drug-acquired long QT syndrome. *Therapie* 55, 185-193.
- 6) Cerbai, E., Sartiani, L., DePaoli, P., Matucci, R., Davoli, G., DiCiolla, F., Lisi, G., Maccherini, M., Sani, G. and Mugelli, A. J. (2000) Electrophysiologic effects of lercanidipine on repolarizing potassium currents. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, 584-591.
- 7) Morisawa, T., Hasegawa, J., Hama, R., Kitano, M., Kishimoto, Y. and Kawasaki, H.

- (1999) Effects of itopride hydrochloride on the delayed rectifier K^+ and L-type Ca^{2+} currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Res Comm Mol Pathol Pharmacol* 106, 37-45.
- 8) Morisawa, T., Hasegawa, J., Tanabe, K., Watanabe, A., Kitano, M. and Kishimoto, Y. (2000) Effects of trimebutine maleate on delayed rectifier K^+ currents in guinea-pig ventricular myocytes. *J Pharm Pharmacol* 52, 403-408.
 - 9) Cranefield, P. F. (1977) Action potentials, afterpotentials, and arrhythmias. *Circ Res* 41, 415-423.
 - 10) Matsuda, H., Noma, A., Kurachi, Y. and Irisawa, H. (1982) Transient depolarization and spontaneous voltage fluctuations in isolated single cells from guinea pig ventricles. Calcium-mediated membrane potential fluctuations. *Circ Res* 51, 142-151.
 - 11) Vassalle, M. and Mugelli, A. (1981) An oscillatory current in sheep cardiac Purkinje fibers. *Circ Res* 48, 618-631.
 - 12) Pogwizd, S. M., McKenzie, J. P. and Cain, M. E. (1997) Mechanisms underlying spontaneous and induced ventricular arrhythmias in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 98, 2404-2414.
 - 13) Isenberg, G. and Klockner, U. (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Arch* 395, 6-18.
 - 14) Kass, R. S., Lederer, W. J., Tsien, R. W. and Weingart, R. (1978) Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 281, 187-208.
 - 15) Kotake, H., Hisatome, I., Miyamoto, J., Igawa, O. and Mashiba, H. (1986) Electrophysiological effect of trapidil on rabbit sinoatrial node cells. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 279, 61-71.
 - 16) Haverkamp, W., Breithardt, G., Camm, A. J., Janse, M. J., Rosen, M. R., Antzelevitch, C., Escande, D., Franz, M., Malik, M., Moss, A. and Shah, R. (2000) The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 47, 219-233.
 - 17) Vos, M. A., van Opstal, J. M., Leunissen, J. D. and Verduyn, S. C. (2001) Electrophysiological parameters and predisposing factors in the generation of drug-induced Torsade de Pointes arrhythmias. *Pharmacol Ther* 92, 109-122.
 - 18) Veldkamp, MW., Verkerk, A. O. and van Ginneken, A. C. G. (2001) Norepinephrine induces action potential prolongation and early afterdepolarizations in ventricular myocytes isolated from human end-stage failing hearts. *Eur Heart J* 22, 955-963.
 - 19) Pogwizd, S. M. and Corr, B. (1992) The contribution of nonreentrant mechanisms to malignant ventricular arrhythmias. *Basic Res Cardiol* 87, 115-129.
 - 20) Verkerk, A. O., Veldkamp, M. W., Baartscheer, A., Schumacher, C. A., Klopping, C., van Ginneken, A. C. G. and Ravesloot, J. H. (2001) Ionic mechanism of delayed afterdepolarizations in ventricular cells isolated from human end-stage failing hearts. *Circulation* 104, 2728-2733.
 - 21) Coetzee, W., Biermans, G., Callewaert, G., Vereecke, J., Opie, L. H. and Carmeliet, E. (1988) The effect of inhibition of mitochondrial energy metabolism on the transient inward current of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Moll Cell Cardiol* 20, 181-185.
 - 22) Cordeiro, J. M., Howlett, S. E. and Ferrier, G. R. (1992) Unblock of the slow inward current induces the arrhythmogenic transient inward current in isolated guinea-pig myocytes. *J Moll Cell Cardiol* 24, 125-132.
 - 23) Karagueuzian, H. S. and Katzung, B. G. (1982) Voltage-clamp studies of transient inward current and mechanical oscillations induced by ouabain in ferret papillary mus-

- cle. *J Physiol* **327**, 255-271.
- 24) Clusin, W.T. (1983) Caffeine induces a transient inward current in cultured cardiac cells. *Nature* **301**, 248-250.
- 25) Hasegawa, J., Satoh, H. and Vassalle, M. (1987) Induction of the oscillatory current by low concentrations of caffeine in sheep cardiac Purkinje fibres. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **335**, 310-320.
- 26) Hasegawa, J. and Vassalle, M. (1986) Enhancement and suppression of currents related to calcium-overload by different concentrations of methylxanthines. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **282**, 68-81.
- 27) Satoh, H., Hasegawa, J. and Vassalle, M. (1989) On the characteristics of the inward tail current induced by calcium overload. *J Mol Cell Cardiol.* **21**, 5-20.
- 28) Wit, A. L. and Cranefield, P. F. (1977) Triggered and automatic activity in the coronary sinus. *Circ. Res* **41**, 435-445.
- 29) Dangman, K. H., Dresdner, K. P. JR. and Zaim, S. (1988) Automatic and triggered impulse initiation in canine subepicardial ventricular muscle cells from border zones of 24-hour transmural infarcts. *Circulation* **78**, 1020-1030.
- 30) Ferrirer, GR. (1976) The effects of tension on acetylcholine-induced transient depolarizations and aftercontractions in canine myocardial and Purkinje tissues. *Circ Res* **38**, 156-162.
- 31) Schechter, E., Freeman, C. C. and Lazzara, R. (1984) After depolarizations as a mechanism for the long QT syndrome: electrophysiologic studies of a case. *J Am Coll Cardiol* **3**, 1556-1561.
- 32) Priori, S. and Corr, P. B. (1990) Mechanisms underlying early and delayed afterdepolarizations induced by catecholamines. *Am J Physiol* **258**, H1796-H1805.
- 33) Prior, S. G., Mantica, M. and Schwartz, P. J. (1988) Delayed afterdepolarizations elicited in vivo by left stellate ganglions stimulation. *Circulation* **78**, 178-185.
- 34) Mezsaros, J., Khananshivili, D. and Hart G (2001) Mechanisms underlying delayed afterdepolarizations in hypertrophied left ventricular myocytes of rats. *Am J Physiol* **281**, H903-H914.
- 35) Xiao, R. P. and Lakatta, E. G. (1993) Beta₁-adrenoceptor stimulation and beta₂-adrenoceptor stimulation differ in their effects on contraction, cytosolic Ca²⁺, and Ca²⁺ current in single rat ventricular cells. *Circ Res* **73**, 286-300.
- 36) Song, Y., Shryock, J. C., Knot, H. J and Belardinelli, L. (2001) Selective attenuation by adenosine of arrhythmogenic action of isoproterenol on ventricular myocytes. *Am J Physiol* **281**, H2789-H2795.
- 37) Berlin, J. R., Cannel, M. B. and Lederer, W. J. (1989) Cellular origins of the transient inward current in cardiac myocytes. *Circ Res* **65**, 115-126.