

厚生科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

医薬品の致死的催不整脈作用スクリーニング法の開発

平成10年度研究報告書

1999年3月

主任研究者 長谷川 純一
(鳥取大学医学部教授 臨床薬理学講座)

厚生科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

医薬品の致死的催不整脈作用スクリーニング法の開発

平成10年度研究報告書

1999年3月

主任研究者 長谷川 純一

(鳥取大学医学部教授 臨床薬理学講座)

I . 總括研究報告

総括研究報告書

医薬品の致死的不整脈作用スクリーニング法の開発

主任研究者 長谷川純一 鳥取大学医学部教授

研究要旨 一般的薬剤の不整脈作用による突然死の原因となる可能性をスクリーニングする方法を検討することを考慮し、不整脈源性となる電流系に対する作用、さらにこれに影響する因子について検討した。カリウム電流系に関しては、消化管運動調整薬のシサプリドの不整脈作用が指摘されるのに反し、同効薬であるトリメブチンでは作用様式が異なり、また消化管運動に影響する濃度よりかなりの高濃度でなければ作用が現れないこと等が判明した。分子生物学的手法を用いた研究より、心房筋と心室筋に発現しているカリウムチャネル遺伝子 mRNA 発現の分布の違いは、心房筋と心室筋の電気生理学的差異に参与している可能性が示唆された。一方ナトリウム電流系への抑制作用に関し、降圧薬のアムロジピンを含め様々な様式でナトリウム電流を抑制すること、更にある種の酸化剤がナトリウムチャネルを抑制すること等の他、各種疾患で併用されているサリチル酸によりこれらの作用が増強されること等が明らかとなった。

分担研究者 久留一郎
鳥取大学医学部
助教授

A. 研究目的

抗生物質や抗アレルギー薬等、一般に突然死と無関係と思われていた薬剤の副作用で突然死が生じている。それらの突然死の原因は、薬剤に起因する致死的不整脈であり、更にはその発生機序が心筋細胞カリウム電流阻害、なかでも遅延整流カリウム電流の早い活性化成分の阻害による事が指摘されている。また最近では、ナトリウム電流系の異常によっても同様の致死的不整脈の発生が認められることも判明した。本研究ではこれら一般の薬剤の不整脈作用を検出する方法として、

動物の心筋細胞の利用法を検討する。更に現在一般的に行われている複数の薬剤の併用に関し、相互作用により上述の作用を発現することもあることから、ある程度予測し得る範囲において、予め実験的に検討できるか否かについても調査研究を行うこととした。その方法として、突然死の原因として現在判明している不整脈機序を中心に検討する。中でも可能性が疑われる薬剤から、心筋細胞膜チャンネル電流に対する影響を検討し、薬剤濃度や他剤併用、代謝の影響等も総合的に検討するスクリーニング体制の確立に向けた研究を行う。

そこで主任研究者が主に心筋細胞のカリウム電流によるものを中心に、上記目的に沿った研究を行うのに対し、分担研究者は一部カリウム電流について検討す

るものの、主にナトリウム電流に原因を持つ致命的な不整脈の可能性についての研究を分担して行う。

B. 研究方法

モルモット心筋細胞（心房筋および心室筋細胞）をコラゲナーゼ処理により単離し、倒立型顕微鏡のステージ上の灌流槽に静置し、タイロード液で灌流した。電気生理学的実験手法を用い、細胞にパッチ電極を密着し、全細胞記録法で膜電位と膜電流を計測した。薬剤を臨床上の血中濃度に近似した濃度から、高濃度で作用させ、催不整脈作用に関与すると考えられる電流系への効果を検討した。また心房筋と心室筋の電気生理学的特性の差異に関する検討には、分子生物学的手法を用い発現しているチャンネル蛋白の遺伝子学的検討も行った。

C. 研究結果

1. 消化管運動調整薬のモルモット心筋カリウム電流に対する作用の検討

非潰瘍性消化器症状改善薬として頻用されているシサプリドによる致命的催不整脈作用がごく最近明らかとなり、この種の薬剤に対する懸念が広がっていることから、同効薬であるトリメブチンのモルモット遅延整流カリウム電流に対する効果を検討した。その結果、同薬はシサプリドで不整脈源性と考えられている活性化の速いカリウム電流成分単独ではなく、遅い成分に対しても同様の効果を持ち、問題となっている催不整脈作用とは異なること、更にこれらは L 型カルシウムチャンネルに対する抑制効果と同様にかなり高濃度で作用が出現し、実験的に消化管運動に影響する濃度とは 100~1000 倍の差があること、同じく心電図上 QT 延長に関与し得る内向き整流カリウム電流に対しては殆ど作用が無いこと等が判明した。

2. カリウムチャンネル遺伝子発現の心筋組織間の差異

分子生物学的手法を用いてモルモットの心房筋と心室筋に発現している Shaker 型のカリウムチャンネル遺伝子 mRNA 発現の分布を調べた。その結果心室筋に比較し、心房筋ににおいて有意に高頻度に発現していることが判明した。このことが種差のみならず、心室筋と心房筋の電気生理学的差異に関与している可能性が示唆された。

3. 薬剤のナトリウム電流抑制作用の心房筋と心室筋細胞に対する作用の差異

モリシジンのナトリウムチャンネル抑制機構を薬剤と受容体の状態に関する理論に基づいて解析したところ、心房筋と心室筋において差があり、モリシジンは心室筋に対してより結合性が高いことが判明した。

4. 各種薬剤の心筋細胞ナトリウム電流に対する抑制作用、ならびにこれに影響する種々の要因、他薬剤（特にサリチル酸）についての検討

本来カルシウム拮抗作用が主作用であり、降圧薬として近年多用されているアムロジピンにナトリウム電流に対する抑制作用があることをヒト心筋型ナトリウムチャンネルアルファサブユニットを発現させた系を用いて確認した。また抗不整脈薬トカイナイドのナトリウム電流に対する抑制作用についても検討し、トカイナイドは親水経路を介して不活性化状態の受容体に結合し、疎水経路を介して不活性化状態の受容体から解離することでその作用を発揮していることが示唆された。一方各種の 1 群抗不整脈薬のナトリウム電流に対する抑制作用を増強するサリチル酸の効果について検討した。提唱されている受容体の異なった状態と薬剤の関係に関する仮説に基づいて検討した結果、サリチル酸は不活性化過程への速度定数を増大することにより抑制を増強

することが示唆され、このサリチル酸の効果は脂質親和性の高い抗不整脈薬について考慮が必要であることが判明した。

また酸化ストレスのナトリウムチャンネルに及ぼす影響を調べた。その結果単一システインを修飾する酸化剤はナトリウムチャンネルを抑制しないが、2個のシステインを修飾する酸化剤はナトリウムチャンネルを抑制すること、ならびにこの反応は還元剤により可逆的であることが判明した。

D. 考察

致死的催不整脈作用が認められる非潰瘍性消化器症状改善薬シサプリドと同効薬であるトリメブチンの遅延整流カリウム電流に対する効果に関し、同電流を構成している2つの電流に対する作用の違いがあることが判明した。すなわち同薬は不整脈源性の活性化の速いカリウム電流成分同様に、遅い成分に対しても効果を有する事が解り、この選択性の有無も重要な要因と考えられる。また同薬はL型カルシウムチャンネルに対しても抑制効果を有するが、かなり高濃度で作用が出現し、消化管運動に影響する濃度とは100~1000倍の差があり、臨床上の血中濃度からも100倍以上で安全性が高いと考えられる。

アムロジピンは近年L型カルシウムチャンネルのみならず、N型カルシウムチャンネルをも抑制することから、交感神経活性を減少する副次的効果も認められ、処方頻度の高い降圧薬である。本研究で明らかとなったように、この上さらにナトリウムチャンネルの抑制効果も認めることは、細胞内のナトリウム、カルシウム両イオン濃度を減少させ、カルシウム過負荷を抑制するという意味で、心筋虚血等の病態時において心筋保護的に作用する可能性を有する。しかしこのことは、一方で細胞の状態によっては伝導遅延の原

因となり、リエントリー性の重篤な不整脈を誘発する、いわゆる催不整脈作用となる危険性をはらんでいるともいえよう。

モリシジンの心室筋と心房筋のナトリウムチャンネルの結合性の違いが明らかとなったが、不整脈発生ならびに維持機構に対する薬剤使用の点で、心房、心室のどちらに重点を置くか、また逆になった場合の催不整脈作用等の副作用に影響することからこのような検討の重要性が考えられる。

ナトリウムチャンネルの抑制に種々の要因が関与することが判明したが、中でも各種抗不整脈薬作用に関し、サリチル酸がその効果を有意に増強することが確認された。これは特に脂質親和性の高い薬剤との併用時に注意が求められる。一方近年、アスピリンが動脈硬化性の疾患、とりわけわが国で多い脳梗塞の再発予防の目的、更に心筋梗塞の一時予防、再発予防薬として世界的に認知され、その予防効果は高価な高脂血症改善薬であるスタチン薬と同等とまでいわれて頻用されている。さらに最近では大腸癌の予防効果まで認められ益々重用されてきているが、このアスピリンがまさにそのサリチル酸であり、このような病態時に使用するナトリウムチャンネル抑制作用を持った薬剤の効果が増強することは、その催不整脈作用等の副作用をも増強する結果となり嚴重な注意を要すると考えられる。

酸化ストレスがSH基を介してのナトリウムチャンネルを抑制することは、心筋虚血再灌流時の不整脈発生に関与し得ることが示唆される。

E. 結論

遅延整流カリウム電流抑制効果に関し、同電流を構成している2つの電流に対する選択性の有無、およびその力価と主作用の力価、臨床上の血中濃度の関係が重要であることが判明した。ナトリウムチ

チャンネルの抑制作用を有する薬剤に関し、それぞれ作用容態に差があり、種々の外的修飾要因に影響されることが判明した。これらの要因に関し予め検討しておくことにより、それぞれの病態において最適な種類と最適な用量の設定が可能となると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurata Y, Hisatome I, Tsuboi M, Uenishi H, Zhang G, Oyaizu M, Sato R, Imanishi S. Effects of sulfhydryl oxidoreduction on permeability of cardiac tetrodotoxin-insensitive sodium channel. *Life Sciences* 63:1023-1035,1998.
- 2) Manabe I, Tsuboi M, Ahmed GU, Sasaki N, Ohtahara A, Yamamoto Y, Hiroe K, Yoshida A, Hisatome I, Shigemasa C. Expression of Shaker-type coltage-gated potassium channel genes in the guinea-pig. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 99:33-40,1998.
- 3) Tanaka Y, Hisatome I, Sasaki N, Ahmed GU, Yatsuhashi T, Yamanouchi Y, Uchida T, Hamada T, Taniguchi S, Ogino K, Igawa O, Yoshida A, Shige-masa C, Sato R. Mechanism of inhibition of the sodium current by tocainide in guinea-pig isolated ventricular cells. *Gen. Pharmacol.* (in press).
- 4) Inoue Y, Hisatome I, Tsuboi M, Ahmed GU, Yatshuhashi T, Tanaka Y, Igawa O, Yoshida A, Shigemasa C, Makita N. Amlodipine blocks native cardiac

Na⁺ channels and cloned α -subunits of cardiac Na⁺ channels. *Arzneim. Forsch. /Drug Res.* 49: (in press)

- 5) Kurata Y, Sato R, Hisatome I, Imanishi S. Mechanisms of interactions of cardiac tetrodotoxin-insensitive sodium channel with metal cations: 1. Dynamic pore model for selective permeability to monovalent metal cations. *Biophys. J.* (accepted)
- 6) Morisawa T, Hasegawa J, Tanabe K, Watanabe A, Kitano M, Kishimoto Y. Effects of trimebutine maleate on the delayed rectifier K currents in guinea-pig ventricular myocytes. (submitted)
- 7) Miyamoto J, Shimoyama M, Hiroe K, Ya-manouchi Y, Sasaki N, Sawada Y, Kinugawa T, Ogino K, Igawa O, Kotake H, Yoshida A, Shigemasa C, Kurata Y, Sato R. Enhancing effects of salicylate on tonic and phasic block of Na⁺ channels by class I antiarrhythmic agents in the guineapig papillary and ventricular myocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* (revised).
- 8) Ahmed GU, Hisatome I, Tanaka Y, Yoshida A, Shigemasa. Study onInhibition of Na⁺ current by moricidine in isolated single atrial myocytes in comparison with ventricular myocytes. (submitted)

2. 学会発表

- 1) 三明淳一郎、田中保則、Ahmed GU、

- 広江晃、佐々木紀仁、坪井麻理子、下山晶樹、太田原顕、衣川徹、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、蒔田直昌、佐藤良一。Amlodipine による Na channel 抑制は α -subunit を介する。第 15 回日本心電学会学術集会（鹿児島）1998.
- 2) 田中保則、Ahmed GU、坪井麻理子、八橋透、広江晃、三明淳一郎、佐々木紀仁、真鍋一郎、山本康孝、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、蒔田直昌、佐藤良一。Amlodipine による Na channel 抑制は α -subunit を介する。第 15 回日本心電学会学術集会（鹿児島）1998.
- 3) 久留一郎、田中保則、坪井麻理子、三明淳一郎、佐々木紀仁、太田原顕、荻野和秀、井川修、重政千秋、森崎隆幸、蒔田直昌、佐藤良一。ヒト心筋型 Na channel α -subunit の酸化ストレスへの特異的な感受性は P-loop 内の Cystein³⁷³ が担う。第 63 回日本循環器学会学術集会（東京）1999.
- 4) 田中保則、八橋透、三明淳一郎、坪井麻理子、太田原顕、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、蒔田直昌、佐藤良一。組織特異性を有さない Class 1c 群抗不整脈剤 Moricidzine の Na channel α -subunit 抑制作用。第 63 回日本循環器学会学術集会（東京）1999.

II . 分 担 研 究 報 告

分担研究報告書

医薬品の致死的不整脈作用スクリーニング法の開発

分担研究者 久留 一郎 鳥取大学医学部助教授

研究要旨 一般の薬剤の副作用である催不整脈作用の可能性を検出する方法として、動物の心筋細胞を利用し、主に心筋細胞のナトリウム電流に原因を持つ致死的不整脈の可能性について研究を深めることを目的として検討を行った。各種薬剤に心筋細胞ナトリウム電流抑制作用が認められ、カルシウム拮抗性降圧薬のアムロジピンも例外でなく、その他抗不整脈薬、2個のシステインを修飾する酸化剤はナトリウムチャンネルを抑制すること等が明らかとなった。また、各種疾患で併用されているサリチル酸により、これらの作用が増強されることを解明した。これら種々の外的修飾要因に関し予め検討しておくことにより、それぞれの病態において最適な種類と最適な用量の設定が可能となると考えられる。

A. 研究目的

抗生物質や抗アレルギー薬、更に抗不整脈薬等一般に突然死と無関係と思われていた薬剤について、突然死の原因となることが判明し、人的、社会的損害が発生する事態が生じている。これら一般の薬剤において、副作用としての催不整脈作用による突然死の原因となる可能性を検出する方法として、動物の心筋細胞の利用法を検討することを目的としている。更に複数の薬剤の相互作用により上述のような危険な作用を発現することもあることから、ある程度予測し得る範囲において、予め実験的に検討できるか否かについても検討することとした。

そこで主任研究者が主に心筋細胞のカリウム電流に関し上記目的に沿った研究を行うのに対し、分担研究者は、一部カリウム電流、主にナトリウム電流に原因を持つ致死的不整脈発生の可能性について研究を深めることを目的とした検討

を行った。

B. 研究方法

モルモット心筋細胞（心房筋および心室筋細胞）をコラゲナーゼ処理により単離し、倒立型顕微鏡のステージ上の灌流槽に静置し、タイロッド液で灌流した。細胞にパッチ電極を密着し、全細胞記録法により膜電位と膜電流を計測した。また心房筋と心室筋の電気生理学的特性の差異に関する検討には、分子生物学的手法を用い、発現しているチャンネル蛋白の遺伝子学的検討も行った。

C. 研究結果

1. 各種薬剤の心筋細胞ナトリウム電流に対する抑制作用ならびにサリチル酸による作用増強

本来カルシウム拮抗作用が主作用であり、降圧薬として近年多用されているアムロジピンにナトリウム電流に対する抑

制作用があることをヒト心筋型ナトリウムチャンネルアルファサブユニットを発現させた系を用いて確認した。また抗不整脈薬トカイナイドのナトリウム電流に対する抑制作用についても検討し、トカイナイドは親水経路を介して不活性化状態の受容体に結合し、疎水経路を介して不活性化状態の受容体から解離することでその作用を発揮していることが示唆された。一方各種の 1 群抗不整脈薬のナトリウム電流に対する抑制作用を増強するサリチル酸の効果について検討した。提唱されている受容体の異なった状態と薬剤の関係に関する仮説に基づいて検討した結果、サリチル酸は不活性化過程への速度定数を増大することにより抑制を増強することが示唆され、このサリチル酸の効果は脂質親和性の高い抗不整脈薬について考慮が必要であることが判明した。

2. 薬剤のナトリウム電流抑制作用の心房筋と心室筋細胞に対する作用の差異

モリスジンのナトリウムチャンネル抑制機構を薬剤と受容体の状態に関する理論に基づいて解析したところ、心房筋と心室筋において差があり、モリスジンは心室筋に対してより結合性が高いことが判明した。

3. 薬剤のナトリウム電流抑制作用に関与する種々の要因に関する検討

本研究では酸化ストレスのナトリウムチャンネルに及ぼす影響を調べた。その結果単一システインを修飾する酸化剤はナトリウムチャンネルを抑制しないが、2 個のシステインを修飾する酸化剤はナトリウムチャンネルを抑制すること、ならびにこの反応は還元剤により可逆的であることが判明した。

またコンピューターシミュレーションを用い 1 価の陽イオンとナトリウムチャンネルとの結合機構に関し、エネルギー障壁モデルを用いて解析した。

4. 分子生物学的手法を用いてモルモツ

トの心房筋と心室筋に発現している Shaker 型のカリウムチャンネル遺伝子 mRNA 発現の分布を調べた。その結果心室筋に比較し、心房筋において有意に高頻度に発現していることが判明した。このことが種差のみならず、心室筋と心房筋の電気生理学的差異に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

アムロジピンは近年 L 型カルシウムチャンネルのみならず、N 型カルシウムチャンネルをも抑制し、交感神経活性を減少する副次的効果も認められ、処方頻度の高い降圧薬である。本研究で明らかとなったように更にナトリウムチャンネルの抑制効果も認めることは、細胞内のナトリウム、カルシウム両イオン濃度を減少させ、カルシウム過負荷を抑制するという心筋保護的に作用する可能性を有する一方、細胞の状態によっては伝導遅延の原因となり、リエントリー性の重篤な不整脈を誘発する、いわゆる催不整脈作用となる危険性をはらんでいるともいえよう。

モリスジンの心室筋と心房筋のナトリウムチャンネルの結合性の違いが明らかとなったが、不整脈発生ならびに維持機構に対する薬剤使用の点で、心房、心室のどちらに重点を置くか、また逆になった場合の催不整脈作用等の副作用に影響することからこのような検討の重要性が考えられる。

ナトリウムチャンネルの抑制に種々の要因が関与することが判明したが、中でも各種抗不整脈薬作用に関し、サリチル酸がその効果を有意に増強することが確認された。これは特に脂質親和性の高い薬剤との併用時に注意が求められる。一方近年、アスピリンが動脈硬化性の疾患、とりわけわが国で多い脳梗塞の再発予防の目的、更に心筋梗塞の一時予防、再発予防薬として世界的に認知され、その予

防効果は高価な高脂血症改善薬であるスタチン薬と同等とまでいわれて頻用されている。さらに最近では大腸癌の予防効果まで認められ益々重用されてきているが、このアスピリンがまさにそのサリチル酸であり、このような病態時に使用するナトリウムチャンネル抑制作用を持った薬剤の効果が増強することは、その催不整脈作用等の副作用をも増強する結果となり嚴重な注意を要すると考えられる。

E. 結論

ナトリウムチャンネルの抑制作用を有する薬剤に関し、それぞれ作用様態に差があり、種々の外的修飾要因に影響されることが判明した。特に安価で高い動脈硬化性疾患予防効果の認められるアスピリンの併用が、薬剤の持つナトリウムチャンネルの抑制作用を増強することおよびその機序も判明した。これらの要因に関し予め検討しておくことにより、それぞれの病態において最適な種類と最適な用量の設定が可能となると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurata Y, Hisatome I, Tsuboi M, Uenishi H, Zhang G, Oyaizu M, Sato R, Imanishi S. Effects of sulfhydryl oxidoreduction on permeability of cardiac tetrodotoxin-insensitive sodium channel. *Life Sciences* 63:1023-1035,1998.
- 2) Manabe I, Tsuboi M, Ahmed GU, Sasaki N, Ohtahara A, Yamamoto Y, Hiroe K, Yoshida A, Hisatome I, Shigemasa C. Expression of Shaker-type coltage-gated potassium channel genes in the guinea-pig. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.*

99:33-40,1998.

- 3) Tanaka Y, Hisatome I, Sasaki N, Ahmed GU, Yatsuhashi T, Yamanouchi Y, Uchida T, Hamada T, Taniguchi S, Ogino K, Igawa O, Yoshida A, Shigemasa C, Sato R. Mechanism of inhibition of the sodium current by tocainide in guinea-pig isolated ventricular cells. *Gen. Pharmacol.* (in press).
- 4) Inoue Y, Hisatome I, Tsuboi M, Ahmed GU, Yatshuhashi T, Tanaka Y, Igawa O, Yoshida A, Shigemasa C, Makita N. Amlodipine blocks native cardiac Na⁺ channels and cloned α -subunits of cardiac Na⁺ channels. *Arzneim. Forsch. /Drug Res.* 49:(in press).
- 5) Kurata Y, Sato R, Hisatome I, Imanishi S. Mechanisms of interactions of cardiac tetrodotoxin-insensitive sodium channel with metal cations: 1. Dynamic pore model for selective permeability to monovalent metal cations. *Biophys. J.* (accepted).
- 6) Tanaka Y, Hisatome I, Miyamoto J, Shimoyama M, Hiroe K, Yamanouchi Y, Sasaki N, Sawada Y, Kinugawa T, Ogino K, Igawa O, Kotake H, Yoshida A, Shigemasa C, Kurata Y, Sato R. Enhancing effects of salicylate on tonic and phasic block of Na⁺ channels by class I antiarrhythmic agents in the guineapig papillary and ventricular myocytes. *Biochim. Biophys. Acta* (revised).

7) Ahmed GU, Hisatome I, Tanaka Y, Yoshida A, Shigemasa. Study on Inhibition of Na⁺ current by moricidine in isolated single atrial myocytes in comparison with ventricular myocytes. (submitted).

2. 学会発表

- 1) 三明淳一郎、田中保則、Ahmed GU、広江晃、佐々木紀仁、坪井麻理子、下山晶樹、太田原顕、衣川徹、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、蒔田直昌、佐藤良一
Amlodipine による Na channel 抑制は α -subunit を介する。第 15 回日本心電学会学術集会（鹿児島）1998.
- 2) 田中保則、Ahmed GU、坪井麻理子、八橋透、広江晃、三明淳一郎、佐々木紀仁、真鍋一郎、山本康孝、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、蒔田直昌、佐藤良

一。 Amlodipine による Na channel 抑制は α -subunit を介する。第 15 回日本心電学会学術集会（鹿児島）1998.

- 3) 久留一郎、田中保則、坪井麻理子、三明淳一郎、佐々木紀仁、太田原顕、荻野和秀、井川修、重政千秋、森崎隆幸、蒔田直昌、佐藤良一。 ヒト心筋型 Na channel α -subunit の酸化ストレスへの特異的な感受性は P-loop 内の Cysteine³⁷³ が担う。第 63 回日本循環器学会学術集会（東京）1999.
- 4) 田中保則、八橋透、三明淳一郎、坪井麻理子、太田原顕、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、蒔田直昌、佐藤良一。 組織特異性を有さない Class 1c 群抗不整脈剤 Moricidine の Na channel α -subunit 抑制作用。第 63 回日本循環器学会学術集会（東京）1999.