

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11年度研究報告書

2000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11年度研究報告書

2000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

医薬品の致死的催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 一般的薬剤の催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、初年度に引き続き消化管運動調整薬のシサプリドと同効、類似構造の薬であるイトプリドについて検討した結果、対象とした作用が殆どないなど、主作用、構造式の類似性からは必ずしも特定の副作用に関する類似性は判定できないことが示唆された。一方同じく各種薬剤による致死的な不整脈の機序として考えられる心筋細胞ナトリウム電流抑制に関する検討では、酸化剤のクロラミン T を用いた実験から、細胞内の酸化は遺伝的 QT 延長症候群の一つと同様のナトリウムチャネルの修飾が起こり、後天的 QT 延長症候群を引き起こす可能性があることが示唆された。またこの酸化ストレスによるナトリウム電流抑制作用に関し、SH 基を有する L-システインはこのような薬剤性酸化ストレスによる抑制から心筋細胞を防御する効果を有する可能性が示唆された。動物の心電図に関する研究からは、同一の所見に対する機序の相違による危険性の判定には難があるものの、初期のスクリーニングには利用できる可能性が考えられた。

分担研究者 久留一郎
鳥取大学医学部
助教授

れている。また、ナトリウム電流系の異常によっても同様の致死的な不整脈の発生が認められることも判明してきたことから、本研究ではこれら一般の薬剤の催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、初年度は突然死の原因として判明している催不

A. 研究目的

ある種の抗生物質や抗アレルギー薬、胃腸薬等、一般に突然死と無関係とさ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な不整脈であり、更にその発生機序として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

整脈機序を中心に、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ったが、2年目は上記の研究に関し対象薬剤を増やした上、比較の意味で動物の個体を利用した場合の検討も行った。

主任研究者が主に心筋細胞のカリウム電流、カルシ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ったのに対し、分担研究者は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った。

B. 研究方法

モルモット心筋細胞（今年は主に心室筋細胞）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。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。またナトリウム電流に関する検討には、分子生物学的手法を用い COS-7 細胞にヒト心筋型およびヒト骨格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ものを用い、酸化ストレスを生じる薬剤等を作用させた。

個体を用いた実験は、モルモットをウレタン麻酔下に挿管、静脈路を確保し、経静脈的に薬剤を投与し、経時的にモルモットの 12 誘導心電図を記録した。薬剤の投与量と時間、心電図の変化について検討した。

倫理面で学内動物実験委員会承認を得た。

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およびカルシウム電流に

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明らかとなり、この種の薬剤に対する懸念があり、初年度に同効薬のトリメブチンの検討を行ったが、今年度は同効薬であるのみならず、化学構造式にも類似点をもつ新規開発薬のイトプリドのモルモット遅延整流カリウム電流、内向き整流カリウム電流およびカルシウム電流に対する効果を検討した。その結果、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のみならず、遅い成分に対しても殆ど影響が無く、問題となっている催不整脈作用とは異なること、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、更に L 型カルシウム電流に対する抑制効果もかなり高濃度で作用が出現し、臨床上的濃度とは 100 倍以上の差があること等が判明した。

2. 心筋細胞に対する酸化ストレスによるナトリウム電流不活性化過程の障害作用とその病態生理学的意義

初年度に検討した薬剤のナトリウム電流抑制作用に関与する種々の要因の内、酸化ストレスによるナトリウムチャンネル抑制、ならびに還元剤による可逆性について、病態との関連を想定して検討した。すなわち各種薬剤にによる心電図 QT 延長に伴う致命的不整脈の機序として心筋細胞ナトリウム電流抑制が関与する可能性を検討した。

酸化剤であるクロラミン T はモルモット心室筋細胞のナトリウム電流を完全に抑制するが、還元剤ジスレイトールを作用させてからクロラミン T を追加投与した場合はナトリウム電流には変化がなかった。その後クロラミン T 単独作用ではナトリウム電流の不活性化が遅くなり、

その後徐々に抑制が強くなった。

一方心筋細胞の酸化ストレスによるナトリウム電流抑制作用に関し、ヒト心筋型および骨格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検討した結果では、二酸化水銀による酸化ストレスにより、ヒト心筋型および骨格筋型におけるナトリウム電流は濃度依存的に抑制される他、心筋型の方が抑制が大きく、10 マイクロモルの濃度で完全に抑制された。この酸化ストレスによるナトリウム電流抑制は SH 基を有する L-システインによりの投与下では 30~40%の抑制にとどまり、L-システイン除去後に加えた酸化ストレスでは、完全抑制までに時間がかかり、特に心筋型で長かった。すなわちヒト心筋型の方が骨格筋型より酸化ストレスによる抑制が強いものの L-システインによる防御効果は長く続くことがわかった。

3. モルモット個体を用いた実験では、心筋細胞遅延整流カリウム電流の活性化の早い成分を抑制することが既知の薬剤であるニフェカレントを投与し、心電図変化を検討した。しかし各電流系を抑制した際の特徴は特になく、また個体差もやや認められた。致死的不整脈が危惧される量でも実際の不整脈は見られない場合が多かった。

D. 考察

致死的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イトプリド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 つの電流に対し高濃度でも殆ど影響しないことが判明した。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のみならず、遅い成分、更に内向き整流カリウム電流に対しても影響

が無い事が解り、これらの関与による危険性がないといえる。また同薬は L 型カルシウム電流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、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。

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、中でも心筋細胞の酸化を惹起する薬剤が骨格筋よりも心筋型のナトリウムチャンネルを強く抑制することが判明した点は、心筋虚血時などの病態時ばかりでなく、薬剤によってはその可能性のあるものをチェックする必要性を示している。さらにクロラミン T を用いた実験が示しているように、薬剤による酸化ストレスによってはナトリウム電流の不活性化が遅くなり、遺伝的 QT 延長症候群 LQT3 と同様のナトリウムチャンネルの修飾が起り、後天的 QT 延長症候群を引き起こす可能性すなわち torsades de pointes と称される致死的不整脈を引き起こす危険があることを示している。

モルモット個体を用いて致死的不整脈発生の可能性のスクリーニングを行うには、反応の個体差が問題となる可能性はあるが、初期のスクリーニングには利用できる可能性があると考えられる。しかし細胞利用よりも効率的とは必ずしもいえず、致死的不整脈の起り安さを判定するには機序の検討ができないことから最終的には細胞利用が必要と考えられる。

E. 結論

遅延整流カリウム電流抑制効果に関し、薬剤の主作用、構造式の類似性からは必ずしも類似性は判定できないことが示唆された。また他の電流系への影響に関しても、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。

ナトリウムチャネルの抑制作用を有する薬剤は多々あるが、そのチャネルへの直接作用の他、心筋細胞に対する酸化ストレスとなることから生じるナトリウムチャネルへの影響も非常に重要かつ危険で、遺伝的 QT 延長症候群 LQT3 と同様のナトリウムチャネルの修飾が起こり、致死的不整脈の発現を危惧させる後天的 QT 延長症候群を引き起こす可能性があることが示唆された。そこで、事前にこれらの要因に関し検討しておくことにより、予防的な措置が検討できるものと思われる。

動物の個体を用い心電図を検討することは、初期のスクリーニングには利用できる可能性が残されていると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka Y, Hisatome I, Miyamoto J, Urashima T, Ikeda K, Yamanouchi Y, Sasaki N, Kinugawa T, Ogino K, Igawa O, 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 ventricular myocytes and the guinea pig papillary muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1418 (2): 320-334 1999.
- 2) 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 Na current by tocainide in guinea-pig isolated ventricular cells. *Gen. Pharmacol.* 32 (5): 541-50 1999.

- 3) Inoue Y, Hisatome I, Tsuboi M, Ahmed GU, Yatsuhashi T, Uchida K, Yamanouchi Y, Santo Y, Miake J, Tanaka Y, Hamada Y, Watanabe M, Igawa O, Yoshida A, Shigemasa C, Makita N, Sato R. Effects of amlodipine on native cardiac Na⁺ channels and cloned α -subunits of cardiac Na⁺ channels. *Arzneim. Forsch. /Drug Res.* 49 (5):394-397 1999.
- 4) Kurata Y, Sato R, Hisatome I, Imanishi S. Mechanisms of cation permeation in cardiac sodium channel: Description by dynamic pore model. *Biophys. J.* 77 (4): 1885-1904 1999.
- 5) 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. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 1-7, 2000. (4月発行予定)
- 6) Morisawa T, Hasegawa J, Hama R, Kitano M, Kishimoto Y, Kawasaki H. Effects of itopride hydrochloride on the delayed rectifier K⁺ and L-type Ca²⁺ currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* (accepted).

2. 学会発表

- 1) 森沢剛、長谷川純一. モルモット心筋細胞における trimebutine、itopride の K^+ および Ca^{2+} 電流への影響。第 16 回日本心電学会学術集会 (山梨) 1999.
- 2) 田中保則、八橋透、園山一彦、三明淳一郎、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、佐藤良一. 細胞内酸化は Na 電流不活性化過程の障害をおこし QT 延長症候群 3 型類似の Na 電流を生じる。第 16 回日本心電学会学術集会 (山梨) 1999.
- 3) 八橋透、田中保則、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. ヒト心筋型およびヒト骨格筋型 Na channel α -subunit における L-cysteine の酸化ストレス防御の比較検討。第 16 回日本心電学会学術集会 (山梨) 1999.
- 4) 森沢 剛、北野雅之、岸本洋輔、川崎寛中、長谷川純一. モルモット心筋細胞における trimebutine、itopride の遅延整流 K^+ 電流および Ca^{2+} 電流への影響の検討。第 20 回日本臨床薬理学会年会 (横浜) 1999.

Ⅱ . 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

医薬品の致死的催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 一般に用いられる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な不整脈発生の可能性について研究した。今年度は特に各種薬剤にによる心電図 QT 延長に伴う致死的な不整脈の発生機序に関し、心筋細胞ナトリウム電流不活性化の抑制が関与する可能性を検討した。酸化剤のクロラミン T を用いた検討から、細胞内の酸化は遺伝的 QT 延長症候群 LQT3 と同様のナトリウムチャネルの修飾が起り、後天的 QT 延長症候群を引き起こす可能性があることが示唆された。またこの薬剤投与を含む病態時等に起こりうる酸化ストレスによるナトリウム電流抑制作用に関し、SH 基を有する L-システインは酸化ストレスによる抑制から心筋細胞を防御する効果を有する可能性が示唆された。

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。

また、複数の薬剤の相互作用に関しても、薬物代謝酵素チトクローム P450 の酵素阻害による予測しない血中濃度の上昇のみならず、拮抗的競合や、薬剤の副作用の相加、相乗効果より上述のような危険な作用を発現することもある。このことから、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

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、分担研究者は主にナトリウム電流に原因を持つ致死的な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て検討を行った。

B. 研究方法

モルモット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。またナトリウムチャネルアルファサブユニットにおける酸化ストレスの検討にはヒト心筋型およびヒト骨格筋型ナトリウムチャネルアルファサブユニッ

トを発現させた COS-7 細胞を用いた検討も行った。

倫理面で学内動物実験委員会承認を得た。

C. 研究結果

1. 心筋細胞内酸化によるナトリウム電流不活性化過程の障害作用とその病態生理学的意義

初年度に検討した薬剤のナトリウム電流抑制作用に関与する種々の要因の内、酸化ストレスによるナトリウムチャンネル抑制、ならびに還元剤による可逆性について、病態との関連を想定して検討した。すなわち各種薬剤にによる心電図 QT 延長に伴う致死的不整脈の機序として心筋細胞ナトリウム電流への修飾が関与する可能性を検討した。

酸化剤であるクロラミン T はモルモット心室筋細胞のナトリウム電流を完全に抑制するが、還元剤ジスレイトールを作用させてからクロラミン T を追加投与したところナトリウム電流は変化しなかった。しかしその後クロラミン T 単独作用でナトリウム電流の不活性化が遅くなり、のち徐々に抑制が強くなった。

2. 心筋細胞の酸化ストレスによるナトリウム電流抑制作用に関与する要因の検討

ヒト心筋型および骨格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二酸化水銀による酸化ストレスの影響を調べると、ヒト心筋型および骨格筋型におけるナトリウム電流は濃度依存的に抑制される他、心筋型の方が抑制が大きく、10 マイクロモルの濃度で完全に抑制された。この酸化ストレスによるナトリウム電流抑制は SH 基を有する L-システインの投与下では 30~40% の抑制にとどまり、L-システイン除去後に加えた酸化ストレスでは、完全抑制までに時間がかかり、特に心筋型で長かった。すなわちヒト心筋型の方が骨格筋型

より酸化ストレスによる抑制が強いものの、L-システインによる防御効果は長く続くことがわかった。

D. 考察

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、中でも心筋細胞の酸化を惹起する薬剤が骨格筋型よりも心筋型のナトリウムチャンネルを強く抑制することが判明した点は、心筋虚血時などの病態時ばかりでなく、薬剤によってはその可能性のあるものをチェックする必要性を示している。さらにクロラミン T を用いた実験が示しているように、薬剤による酸化ストレスによってはナトリウム電流の不活性化が遅くなり、遺伝的 QT 延長症候群 LQT3 と同様のナトリウムチャンネルの修飾が起こり、後天的 QT 延長症候群を引き起こす可能性があることが示唆される。すなわちこのような場合に、torsades de pointes と称される致死的不整脈を引き起こす危険があることを示している。

E. 結論

ナトリウムチャンネルの抑制作用を有する薬剤は多々あるが、そのチャンネルへの直接作用の他、心筋細胞に対する酸化ストレスとなることから生じるナトリウムチャンネルへの影響も非常に重要かつ危険で、遺伝的 QT 延長症候群 LQT3 と同様のナトリウムチャンネルの修飾が起こり、致死的不整脈の発現を危惧させる後天的 QT 延長症候群を引き起こす可能性があることが示唆された。また薬剤によってはそれを防ぐ方向に作用する可能性が考えられるものもあることが判明した。そこで、事前にこれらの要因に関し検討しておくことにより、予防的な措置が検討できるものと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka Y, Hisatome I, Miyamoto J, Urashima T, Ikeda K, Yamanouchi Y, Sasaki N, Kinugawa T, Ogino K, Igawa O, 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 ventricular myocytes and the guinea pig papillary muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1418 (2): 320-334 1999.
- 2) Tanaka Y, Hisatome I, Sasaki N, Ahmed GU, Yatsunami T, Yamanouchi Y, Uchida T, Hamada T, Taniguchi S, Ogino K, Igawa O, Yoshida A, Shigemasa C, Sato R. Mechanism of inhibition of the Na current by tocainide in guinea-pig isolated ventricular cells. *Gen. Pharmacol.* 32 (5): 541-50 1999.
- 3) Inoue Y, Hisatome I, Tsuboi M, Ahmed GU, Yatsunami T, Uchida K, Yamanouchi Y, Santo Y, Miake J, Tanaka Y, Hamada Y, Watanabe M, Igawa O, Yoshida A, Shigemasa C, Makita N, Sato R.

Effects of amlodipine on native cardiac Na⁺ channels and cloned α -subunits of cardiac Na⁺ channels. *Arzneim. Forsch. /Drug Res.* 49 (5):394-397 1999.

- 4) Kurata Y, Sato R, Hisatome I, Imanishi S. Mechanisms of cation permeation in cardiac sodium channel: Description by dynamic pore model. *Biophys. J.* 77 (4): 1885-1904 1999.

2. 学会発表

- 1) 田中保則、八橋透、園山一彦、三明淳一郎、荻野和秀、井川修、久留一郎、重政千秋、佐藤良一. 細胞内酸化は Na 電流不活性化過程の障害をおこし QT 延長症候群 3 型類似の Na 電流を生じる。第 16 回日本心電学会学術集会 (山梨) 1999.
- 2) 八橋透、田中保則、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. ヒト心筋型およびヒト骨格筋型 Na channel α -subunit における L-cysteine の酸化ストレス防御の比較検討。第 16 回日本心電学会学術集会 (山梨) 1999.