

図2. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生酵素発現の変化

A. RT-PCR によってヒアルロン酸産生酵素のサブタイプ(HAS1,HAS2, HAS3)のmRNA 発現を定量した。EP4 選択的な刺激剤である ONO-AE1-329 を 10^{-6} M の濃度において、血管平滑筋を刺激した後に RNA を抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなった。HAS1 および HAS3 に比較して、HAS2 発現の圧倒的な増加が観察された。

B. 時間依存的な HAS2mRNA 発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGFb、PDGF-BB のそれぞれを、 10^{-6} M, 10ng/ml, 10ng/ml の濃度で刺激し、HAS2 の発現を RT-PCR において定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329 による増加効果が最も強力であった。

ISSN 0918-6425

平成21年度

喫煙科学研究財団**研究年報**

SMOKING RESEARCH FOUNDATION ANNUAL RESEARCH REPORT 2009

財団法人喫煙科学研究財団

SMOKING RESEARCH FOUNDATION

横浜市立大学医学部循環制御医学 石川義弘 佐藤元彦 奥村敏
横山詩子 岩坪耕策

要約

「背景目的」ニコチン受容体の果たす役割を細胞内セカンド・メッセンジャー系のなかで cAMP シグナルを中心に検討した。とりわけ cAMP 産生酵素であるアデニル酸シクラーゼおよびその下流酵素である Epac 発現と関連して、ニコチン受容体と cAMP シグナルの機能的関連について検討した。「方法」我々の開発したマウス神経細胞の初代培養系およびミニポンプによる個体レベルでの検討方法を用いて、Epac およびニコチン刺激の細胞生存性に関する影響を調べた。とりわけニコチンの短期および長期刺激による効果の違い、および Epac による細胞死制御メカニズムを PKA シグナルと関連して検討した。「結果」cAMP は PKA および Epac のどちらも活性化するが、神経細胞においては Epac の活性化は細胞死を亢進させた。分子メカニズムとして Bc1-2 の制御因子である Bim 発現の上昇が考えられた。ニコチン刺激による Epac 発現変化は短期刺激では減少だが、埋め込みポンプを用いた長期刺激では、必ずしも同様でない。また短期投与においても脳内部位によっても違いがみられた。「考察示唆」cAMP とニコチンシグナルの相互制御が存在するが、それを規定する重要な因子のひとつとしてアデニル酸シクラーゼの下流酵素である Epac が考えられた。Epac は神経細胞死の誘発因子として機能し、その発現にニコチンシグナルが関与する可能性が推測された。

1. 目的

cAMP シグナルは各種のホルモン信号伝達において G 蛋白共役型受容体の刺激を受けて活性化され、アデニル酸シクラーゼ酵素によって産生される物質であり、古典的な細胞内セカンドメッセンジャーとして知られる。一方で中枢においても神経伝達物質の細胞内シグナルの伝達に重要な役割を果たす。ニコチン受容体シグナルも中枢における重要な神経伝達機能を持つため、両者は自律神経シグナルという枠組みだけでなく、同時に多数の他のシグナル系に関与する多面性をもつ¹⁾。我々は、ニコチン受容体のシグナルが cAMP シグナルにどのように機能的に関連し、細胞機能、とりわけ細胞自体の生存性に関与するかを、我々の開発した実験系・遺伝子操作モデルを用いて検討した。

従来の受容体・セカンドメッセンジャー研究は、受容体の下流シグナル(イオンチャンネルを含む)ないしセカンドメッセンジャーの標的酵素(各種キナーゼ)に焦点を当てるものが主流であった。我々は、受容体あるいはセカンドメッセンジャー産生酵素(アデニル酸シクラーゼ)に注目し、これらの分子間の相互制御は、サブタイプ特異的に起こるとの仮説を立てて検討をおこなってきた。ニコチン受容体は中枢においては $\alpha 2-9$ および $\beta 2-4$ よりなるヘテロトリメリックな 5 量体、あるいは $\alpha 7-9$ よりなるホモメリックな 5 量体などの多数のサブタイプが存在する²⁾。同様にアデニル酸シクラーゼにも 9 つに及ぶサブタイプが存在する。我々は各サブタイプの持つ意義を、サブタイプ特異的な制御薬、あるいは特定のサブタイプをノックアウトした動物モデルを使用して、その意義を検討してき

た^{3, 4, 5)}。これらの検討結果から、ニコチン受容体ないしアデニル酸シクラーゼの特定のサブタイプは(各々 $\alpha 7$ と6型)、物理的にも細胞膜表面上の特定ドメインに強い局在性を示し、お互いに活性調節をおこなっていることを明らかにしてきた⁶⁾。さらに最近の報告によれば、アデニル酸シクラーゼの下流標的として、旧来的なPKA以外にEpacと呼ばれるグアニンヌクレオチド交換因子が存在し、これが細胞生存性などの主要な細胞機能に重要な働きをしていることがわかり、先行研究ではEpacの発現が成長段階において変化することを報告してきた⁷⁾。

本申請ではこれらの仮説を実験動物および培養細胞系で実証することを目的とした。しかるに線条体においてはいわゆる線条体型アデニル酸シクラーゼ(5型酵素サブタイプ)をはじめとする主要蛋白の発現は、生後2週令以降にしか発現がみられず⁸⁾、このため実験系としては生後2週令以降のマウスより得られた線条体神経細胞の培養が必要であるが、いままでに線条体細胞の培養成功例は胎児のみである。そこで前回の助成を受けて成人マウスからの線条体神経細胞の培養系の確立を行い⁹⁾、その培養系を使用してcAMPシグナルとニコチンシグナルの機能関連を検討した。平成20年度は助成休止期間であったが、ニコチンおよびEpac研究¹⁰⁾を絶やすことなく続け、さらに平成21年度の助成を受けて、Epacが神経細胞死に果たす役割の分子メカニズムとニコチン刺激が及ぼす短期および長期効果の検討を行った。

2. 方法

1. 神経細胞におけるEpacと細胞死

培養神経細胞において、Epacシグナルによるアポトーシス誘導と下流のシグナル系の変化について検討した。cAMPアナログでPKAおよびEpacをそれぞれ選択的に刺激する化合物を用いた薬理学的手法や、Epacをアデノウイルスを用いて神経細胞に過剰発現し細胞死に対する影響をみる遺伝子導入手法によって検討した。

2. 培養神経細胞におけるニコチン刺激とEpac発現変化

初代神経細胞培養および埋め込み式ミニポンプをもちいて、ニコチンの投与を培養細胞および個体レベルにおいておこない、Epac発現に対する効果を検討した。とくに様々な部位の神経細胞に対して細胞種特異性の検討もあわせて行った。

倫理面への配慮

DNAプラスミドなどバイオハザード類は、学内審査委員会の承認を受け、組み換えDNA実験指針および学内の安全基準にそって使用した。動物実験に当たっては、学内の審査委員会の承認を受け、そのガイドラインに従って動物実験を行っていった。

3. 結果

A. Epacの細胞死に対する効果

これまでの我々の研究結果から⁷⁾、Epacの発現は心臓と中枢とともに高度にみられる

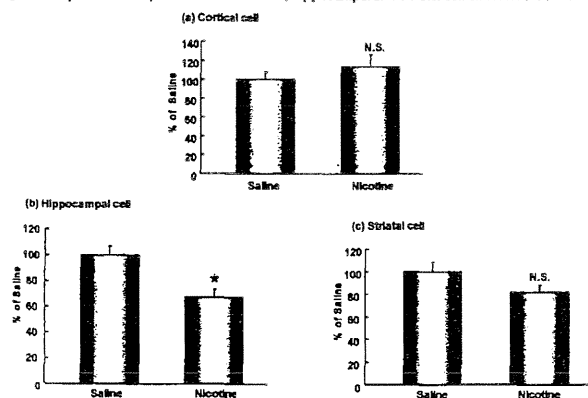
ことがわかっている。そこでE p a c 選択的なc AMPアナログを用いて、皮質および心筋培養細胞に対して刺激実験をおこなった。この結果から、E p a c 刺激は培養皮質細胞では細胞死を亢進させるが、培養心筋細胞では亢進させない。逆にP K A 選択的なc AMPアナログを用いた場合は、心筋細胞で細胞死を亢進させるが、皮質細胞ではそのような効果がないことがわかった。そこでアデノウイルスにE p a c およびP K A を組み込み、同じく培養細胞においてE p a c およびP K A を過大発現させたところ、c AMPアナログを用いた薬物的な刺激効果と同様の結果が得られた。このことから、E p a c は神経細胞に選択的に細胞死を引き起こす可能性が示唆された。これは旧来的にいわれていたc AMPシグナルがP K A を介して神経細胞保護に働くことと異なるメカニズムの存在を意味する。

B. 神経細胞の生存性とE p a c 発現

E p a c はc AMPによって直接活性化されるグアニンヌクレオチド調節因子であり、Rap などのGTP 結合蛋白質の活性を制御することが知られている¹⁰⁾。先行研究においてもE p a c 1 を線条体細胞に過大発現すると、細胞死が顕著に亢進することを明らかにしている。そこで皮質細胞において同様の検討を行ったところ、やはり細胞死の亢進が見られた。このことはEpac は少なくとも線条体および皮質における神経細胞においては細胞死を増加させる作用を持つことを示唆する。

神経細胞の細胞死はB c l 2 蛋白質によって制御されることが知られている。そこでE p a c による細胞死の制御メカニズムを検討するために、B i m と呼ばれるB c l 2 の制御蛋白質の変化を検討したところ、B i m の発現がE p a c を発現させた神経細胞で顕著に上昇していることが判明した。同様の効果はアデノウイルスによる遺伝子導入およびc AMPアナログによる選択的E p a c 刺激においても確認された。B i m はB c l 2 に結合し、B c l 2 による細胞死抑制効果を妨げるメカニズムが提唱されている。B i m が神経細胞に発現し、その発現をE p a c が亢進させるために、E p a c 過大発現によって神経細胞にのみ細胞死が起こるメカニズムが示唆された。一方で心筋ではB i m 自体の発現が無いいため、E p a c による効果も見られない可能性がある。

Fig 1. The expression of Epac1 mRNA in cortical, hippocampal and striatal cell simulated with nicotine.



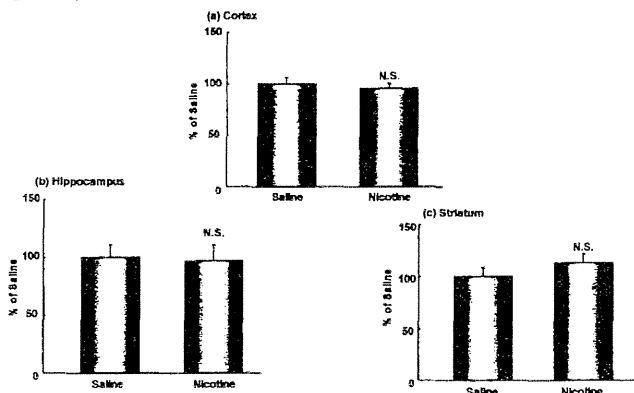
Method) 胎生16-18日のマウスの大脳皮質、線条体、海馬の幼体培養細胞を培養7日に10 μ Mのニコチンで4日間刺激し、Epac1のmRNAをリアルタイムPCRにて測定した。N=4, *p<0.01, N.S. vs. Saline

Result) 培養細胞においてのみニコチン刺激によりEpac1 mRNAの発現が減少した。

C. ニコチン刺激とEpac 発現

先行研究においてニコチンを培養神経細胞に4日間暴露させ、Epac 発現がどのように変化するかを検討したところ、とくに海馬を中心としてE p a c 1 の発現が低下することが示された。そこでニコチンを浸透圧ミニポンプに入れて12週令マウス皮下に植え込み(2.5 mg/kg/hr)、

Fig2. The expression of Epa1 mRNA in cortex, striatum and hippocampus from mice injected with nicotine.



Method) 12週齢の雄マウスに浸透圧ポンプを用いて、2.5mg/kg/日、ニコチン系4週間投与(慢性投与)、大脳皮質、海馬、基底核中のEpa1 mRNAをリアルタイムPCRにて測定した。N=4, N.S. vs. Saline
Result) どの部位においてもEpa1の発現量に有意な差はなかった。また、体重変化においても顕微的な差は認められなかった。

4週間にわたって連続投与を行った。終了後に脳各部位からmRNAを抽出し、RT-PCRにて定量したが、Epa1発現に有意な変化はみられなかった。一方でPKA系のシグナルである活性化CREBの発現亢進が見られた。また、Aktおよびp38MAPKの発現亢進がみられた。

これらの結果から、ニコチン投与のEpa1に対する急性効果と慢性効果は異なる可能性が示唆され、さらに神経細胞種類によっ

ても異なる可能性が示唆された。ニコチンの急性投与によってEpa1発現が変化し、これが神経細胞の生存性制御に関与する可能性が示唆されたが、少なくともニコチンの慢性投与による保護作用には、Epa1発現の変化の関与は少ない可能性が考えられた。

4. 考察

我々の検討にて明らかになったように、Epa1はとりわけ神経細胞の生存性の制御には重要な役割を果たすことが考えられた。旧来はPKAを中心としたcAMPシグナルは神経細胞の生存性を亢進させることが知られていたが、近年になって発見されたEpa1系のシグナルが亢進すると、神経細胞の生存性はむしろ低下することが考えられた。このメカニズムとして、PKA系のシグナルではCREBをはじめとした転写調節系の関与が示唆されているが、Epa1系のシグナルではBcl2の結合蛋白質であるBim発現の制御が考えられた。少なくとも培養細胞から得られた結果では、Bim発現はmRNAおよび蛋白の両方のレベルで発現が亢進した。Bim発現は皮質系の神経細胞でとくに高い発現があることが知られているから、Epa1を介したBim発現制御は、神経細胞においては重要な役割を果たすことが考えられた。

また我々の研究結果から、ニコチン受容体刺激がEpa1発現を変化させることがわかっている。とりわけ培養神経細胞を用いた実験では、海馬神経細胞において3-4日のニコチンへの急性暴露によってEpa1発現が減少することが確認されている。しかるに浸透圧ミニポンプを用いて4週間の長期にわたって行われた慢性投与実験においては、ニコチン投与はEpa1発現を必ずしも減少をさせなかった。このことから、ニコチンの短期および長期投与のEpa1発現に及ぼす効果が異なる可能性が示唆された。この違いが、ニコチンの細胞機能制御に果たす役割とどのように関連するかが今後の検討課題である。

5. 引用文献

1. Khiroug L, Sokolova E, Giniatullin R, Afzalov R, Nistri A. Recovery from desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells is modulated by intracellular calcium through distinct second messengers. J. Neurosci.

18:2458-66 1998

2. Gotti C, Riganti L, Vailati S, Clementi F. Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery *Curr Pharm Des.* 12:407-28, 2006
3. Ishikawa Y: Isoform-targeted regulation of cardiac adenylyl cyclase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41; S1-S4, 2003
4. Iwatsubo K, Tsunematsu T, and Ishikawa Y. Isoform-specific regulation of adenylyl cyclase; a potential target in future pharmacotherapy *Expert Opinion on Therapeutic Targets,* 7;441-451, 2003
5. Ishikawa Y: A new paradigm in cAMP signal. *Cardiovascular Anesthesia Suppl.* 8; 62-65, 2004
6. Oshikawa J, Toya Y, Fujita T, Sakai I, Hashimoto Y, Kawabe J, Umemura S, and Ishikawa Y: Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 regulates cAMP signal via inhibiting a calcium-sensitive adenylyl cyclase isoform. *Am. J. Physiol.* 285:C567-C574, 2003
7. Ulucan C, Wang X, Baljinnnyam E, Bai Y-Z, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S, and Ishikawa Y: Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293; H1662-72, 2007
8. Iwamoto T, Iwatsubo K, Okumura S, Hashimoto Y, Tsunematsu H, Toya Y, Herve D, Umemura S, Ishikawa Y: Disruption of type 5 adenylyl cyclase negates the developmental increase in Golf expression in the striatum. *FEBS Lett.* 564; 153-156, 2004
9. Iwatsubo K, Suzuki S, Li C, Tsunematsu T, Nakamura F, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Toya Y, Umemura S, and Ishikawa Y: Dopamine induces apoptosis in young, but not in neonatal, neurons via Ca²⁺-dependent signal. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293:C1498-508, 2007
10. Bos JL. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci.* 12:680-6, 2006

6. 発表

1. O Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y and Minamisawa S: T-type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J. Biol. Chem.* (2009) 284:24025-34
2. O Sato M, Honda T, Jiao Q, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Lanier SM, and Ishikawa Y: An involvement of activator of G protein signaling 8 on hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes and its interaction with connexin 43. *J. Biol. Chem.* (2009) 284:31431-40
3. O Kheirbek M, Britt J, Beeler J, Ishikawa Y, McGehee D, and Zhuang X: Adenylyl cyclase type 5 is critical for corticostriatal plasticity and striatum-dependent learning. *J. Neurosci.* (2009) 29:12115-24
4. Jiao Q, Bai Y, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, and Minamisawa S: Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2009) 297; H576-82
5. Hu CL, Chandra R, Ge H, Pain J, Yan L, Babu G, Depre C, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Sadoshima J, Vatner SF, Vatner DE. Adenylyl Cyclase Type 5 Protein Expression during Cardiac Development and Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2009) 297:H1776-82
6. Baljinnnyam E, Iwatsubo K, Kurotani R, Wang X, Ulucan C, Iwatsubo M, Lagunoff D and Ishikawa Y. Epac Increases Melanoma cell migration by Heparan Sulfate-Related Mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2009) 297:C802-13
7. Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S,

- Minamisawa S, Okumura S, and Ishikawa Y: Caveolin gene transfer improves glucose metabolisms in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* (2009) 298(3):C450-6
8. Mann L, Heldman E, Bersudsky Y, Almog O, Belmaker RH, Ishikawa Y, Vatner SF, and Agam G. Inhibition of specific adenylyl cyclase isoforms by mood stabilizers may be related to their mechanism of action. *Bipolar Disorders* (2009) 11:885-96
 9. Ebina T, Ishikawa Y, Uchida K, Suzuki S, Imoto K, Okuda J, Tsukahara K, Hibi K, Kosuge M, Sumita S, Mochida Y, Ishikawa T, Uchino K, Umemura S, and Kimura K: A case of giant coronary aneurysm and literature review. *J. Cardiol.* (2009) 53; 293-300
 10. Okumura S, Suzuki S, and Ishikawa Y: Effect of targeted disruption of type 5 adenylyl cyclase gene. *J. Pharmacol. Sci.* (2009) 109:354-9
 11. Sato M and Ishikawa Y: Accessory proteins for heterotrimeric G protein: Implication in the cardiovascular system. *Pathophysiology* in press
 12. Shimada C, Kurotani R, Fukumura H, Ono S, Eguchi H, and Ishikawa Y: Drug Delivery System Using Magnetic Materials. *Jap J Pathophysiology* in press

7. 英文アブストラクト

cAMP and nicotinic receptors

Yoshihiro ISHIKAWA, Sayaka SUZUKI, Motohiko SATO, Satoshi OKUMURA, Utako YOKOYAMA, Kousaku IWATSUBO

Department of Physiology, Yokohama City University Graduate School of Medicine

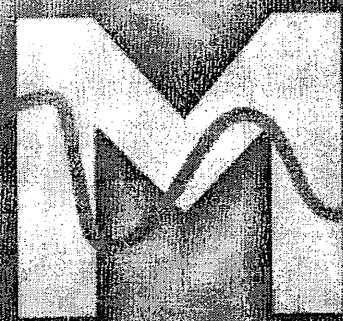
We examined the role of nicotinic receptor stimulation in regulating Epac expression and the role of Epac in regulating neuronal cell apoptosis. We found that overexpression of Epac increased the number of apoptotic cells in cultured neuronal cells, but not in cardiac cells. In contrast, overexpression of PKA increased apoptosis in cardiac cells, but not in neuronal cells. These findings suggest that the role of Epac is different from that of PKA in regulating cell apoptosis between neuronal and cardiac cells although both Epac and PKA are activated by cAMP. Molecular mechanism of inducing apoptosis in neuronal cells was found to increase the expression of Bim, which is a molecule upstream of Bcl2, binding and preventing Bcl2 from exerting its anti-apoptotic effect. We also found that acute nicotinic administration in cultured neuronal cells decreased Epac expression while chronic administration had no changes in neuronal Epac expression. These findings suggest the role of nicotine in regulating Epac expression differs between acute and chronic settings. Nevertheless, nicotine receptor stimulation can regulate the expression of Epac in neuronal cells, which is an important regulator of cellular apoptosis in neurons.

会報23号

2010年7月発行

磁気と健康

Information
on The
Magnetic
Health Science
Foundation



財団法人 磁気健康科学研究振興財団

磁性体を利用した薬剤送達法

黒谷	玲子	横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学
福村	英信	横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・横浜市立大学大学院医学研究科運動器病態学
佐藤	格	横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・横浜市立大学大学院医学研究科顎顔面口顎機能制御学
江口	晴樹	横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・(株)IHI
石川	義弘	横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学・Cardiovascular Research Institute, Department of Cell Biology & Molecular Medicine and Medicine (Cardiology), New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey

1.はじめに

我々は病気になると、病院へ行きお薬を飲んで健康を取り戻す。しかし、体調を崩している時に飲むお薬は、お薬の効果だけでなく、気分が悪くなったりする副作用も持ち合わせている。そこで、生体内で薬剤が必要な時に必要な場所に届けることができれば、必要な場所での薬剤濃度を高くすることができ、投薬量を減らすことにつながり、薬剤によって引き起こされる副作用の軽減につながると考えられてきた。このようなシステムを薬剤送達法(ドラッグデリバリーシステム、DDS)という。我々は、中でも磁性体と磁場を利用した薬剤送達法に注目し、新しい磁性体の探索とその応用を目指している。

現在我々が研究している癌治療法は、主に、外科療法、化学療法、放射線療法があり、それぞれ単独、もしくは併用されている¹⁾。しかしながら、どの治療法を選択しても、悪心、嘔吐、食欲不振、下痢、脱毛、肝機能障害などの種々の副作用が伴ってしまう問題がある²⁻⁵⁾。そこで、この副作用の問題を解決するために、30年以上も前から、多くの研究者が必要な時に必要な場所に薬剤を届けることができる薬剤送達法の開発に取り組んでいる。ここでは、我々が現在目指している磁性体と磁場を利用した薬剤送達法の開発の観点から、他の薬剤送達法についてご紹介したい。

2.薬剤送達法(ドラッグデリバリーシステム、DDS)

薬剤送達法は、安全に標的とする器官、組織、細胞で薬剤の効果を発揮させるために開発されてきた。薬剤送達法は、1) 標的・特異的薬剤送達法、2) 放出制御薬剤送達法、3) 吸収法の大きく3種に分類される。特に標的・特異的薬剤送達法は、標的とする器官、組織、および細胞に薬剤を送達する方法であり、正常細胞に与える薬剤の副作用の大幅な軽減が期待される。近年、新たな構造、物質、及び装置を生成するために、大きさが1~100ナノメートル(nm)の物質を理解し制御する技術であるナノテクノロジーとバイオテクノロジーが結びついたナノバイオテクノロジーの分野でもナノテクノロジーを生かした新しい薬剤の開発や薬剤送達法の開発が行われている。主なナノ材料として、①リポソーム⁶⁾、②高分子ミセル、③デンドリマー、④水溶性高分子、⑤ナノゲル、⑥エマルション、⑦マイクロスフェア⁷⁾などが開発されている。これらを利用し、生きた細胞をナノレベルで操作したり、ナノ材料を生物に導入して制御する研究が行われている。なかでも、興味深い方法の1つとしてリポソームを利用した標的・特異的薬剤送達法が注目されている^{8,9)}。

リポソームは、脂質2重膜で構成されているため、疎水性および親水性の両方の薬剤をリポソーム内に含有できるだけでなく、リポソーム表面に特異抗体、リガンド、ポリマーなどを修飾可能である【図1】¹⁰⁻¹³⁾。

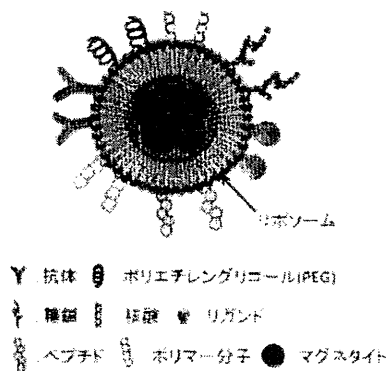
また、アルブミンに抗がん剤バクリキタセル(微小管重合を促進することにより複製を抑制する薬剤)を結合させ、ナノ粒子化させたアブラキサンという薬剤は、水溶性を持ち、バクリキタセル単体よりも高い抗腫瘍効果を示したことで、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration, FDA)で、はじめての化学療法用のナノ粒子として認可された¹⁴⁾。

一方、磁性体を利用した薬剤送達法は、1970年代には開発され始め¹⁵⁾、酸化鉄(マグネタイト, Fe₃O₄)とトキソルピシンという薬剤を含有したアルブミン粒子を水久磁石で肉腫(腫瘍)に集めることにより、効果的な腫瘍縮小が認められている。1980年代になって、マグネタイトを含有したリポソーム(磁性化マグネタイト)を動物生体内で集める研究がされるようになった。さらに、1990年代前後からマグネタイトを動物

に投与し、交流磁場を印加することで抗腫瘍効果を発揮させる温熱療法に関する報告されるようになった¹⁴⁾。また、1980年代にはマグネタイトの核磁気共鳴画像法(MRI)の画像診断用の造影剤として使用できることが報告され^{15,16)}、現在も臨床で使用されている。研究者のなかには、マグネタイトが長期間、患者の体内にとどまっても鉄イオンとして溶け出るだけで、鉄分は栄養素であるから安全であるとする者もいる。ニッケルやコバルトなども磁性体であるが、安全性を考えると使いにくい。マグネタイトは、薬ではないが毒性が低いと考えられ、新しい治療法の素材として注目されてきた。

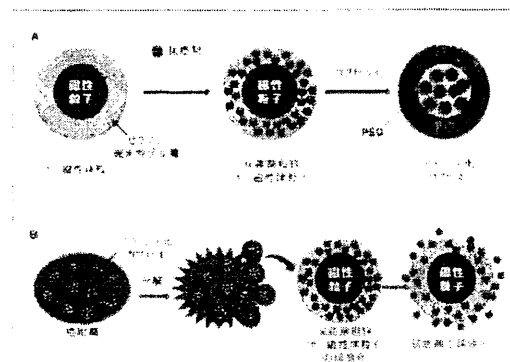
さらに、最近の報告では、薬剤とナノ磁性体粒子を含有した新しいステルス化カプセルが開発されている。これは、ナノ磁性体粒子表面を親水性のゲル層(ハイドロゲル層)で覆い、ゲル層に抗癌剤を含有させた抗癌剤担持ナノ磁性粒子を作成後、この抗癌剤担持ナノ磁性粒子を多数含ませ、最終的に表面にポリエチレングリコール(PEG)を付加したカプセルである。このカプセル化によって抗癌剤を磁石で標的部位に送達可能にする新たな材料となった。このカプセルは、ナノ磁性体粒子表面をゼラチンによって親水性ゲル層を作成すること、PEGをカプセル表面に付加することで、ステルス化されているが¹⁷⁾、ゼラチンやPEGは、既に臨床応用されている安全な材料である。このカプセルと磁場の利用によって血管分岐部でナノ磁性体粒子を目的方向へ誘導し薬物を集積させ、このカプセルの集積をMRIで確認することで薬剤投与量の減量と副作用の軽減を同時に達成することを目標とした研究がなされている¹⁸⁾。

【図1】薬剤送達に利用されるリボソーム



リボソーム表面には、抗体、PEG、酵素、核酸など多種のプロープを修飾可能である。また、リボソーム内にマグネタイトを含有させることで磁性化可能である。

【図2】抗癌剤を担持したナノ磁性体親水性ゲル粒子を含むステルス化カプセル



A. 抗癌剤担持ナノ磁性粒子作成とステルス化カプセル作成過程

B. 癌組織に送達された後に起こる抗癌剤担持ナノ磁性粒子の徐放化と抗癌剤の徐放化

ここで使用されているゼラチンは、反応性官能基を数多く持ち、親水性ゲル状の生理活性物質・低分子薬物の徐放キャリアとして放出制御薬剤送達法に有用な材料である。すなわち、抗がん剤担持ナノ磁性体親水性ゲル粒子を含むステルス化カプセルを、磁場誘導により標的である癌組織に送達・集積させた後、PEGで覆われた生体吸収性のカプセルを加水分解により崩壊させることで、カプセル内部の抗がん剤担持ナノ磁性体から抗癌剤を徐放させることが可能である^{20,21)}。さらに、取束超音波照射、磁場誘導、電磁波などの外部エネルギーをがん部位に照射させることによって、ステルス化カプセルの崩壊を促進させ、より選択的に癌組織で薬剤担持ナノ磁性体粒子から薬剤を徐放化させるシステムが構築されてきている。この試みにより、磁気誘導および集積によるステルス化カプセルの“癌”ターゲティング(空間的制御)およびステルス化カプセルからの徐放化(時間的制御)を同時に制御できると期待されている^{22,24)}。

また、放出制御薬剤送達法には、決まった温度で水に対する溶解性を変化させる刺激応答型の高分子である温度応答性高分子材料の研究と利用が盛んに行われている。代表的なものに、ポリ-N-アルキルアクリルアミド²⁵⁾やポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコールブロック共重合体²⁶⁾などがある。これらの材料を利用した温度応答性ゲルを応用し、疾患によって特異的に変化する化学的・物理的的刺激に応じて薬剤放出を制御するシステムが研究されている。すなわち、決まった刺激に応じて薬物を放出し、回復を検知したら、直ちに薬物放出を停止させるオートフィードバック機能を備えたシステムが研究されている。同時に、デバイスの開発も行われ、温度応答性ゲルを用いた体温近傍での微小温度変化による薬物放出の

オン・オフ制御システムとして、とくにポリ共重合三次元架橋ゲルを利用した温度変化に応答した膨潤-収縮変化に伴う薬物放出を可能にしてきている²⁷⁾。最近では、分解性のポリマーで構成された内核を持つ温度応答高分子ミセル型キャリアを設計し、体温以上の温度(40℃)でのみ薬物放出を促進することに成功している²⁸⁾。

吸収法の薬剤送達システムとしては、スキンパッチや埋め込み型のポンプなどが開発され、使用されている。経皮吸収システムでは、肝臓や消化管での初回通過効果を回避できること、緩徐に長時間にわたって吸収されるため貼付している間は安定した血中濃度を維持できること、副作用発現時に応じて投与が中止可能であることなどの利点がある^{29),30)}。

3.最後に

近年の高分子化学やナノテクノロジーの進展は、特異性の高い標的化薬剤送達を可能とし、分子・細胞イメージング全般に大きな貢献が期待されている。たとえば、樹状に枝分かれした巨大分子である dendrimer、3次元全ての方向から電子を閉じ込めた量子ドット、多数の炭素原子で構成されるクラスターであるフラーレン、生体膜に類似のリボソームなどは、個別化医療、高精度な標的化治療などへの利用が期待されている。

我々は、化合物自体が細胞傷害性のような生物学的な特徴を有する新規磁気体の同定を試み、単剤で細胞傷害性と磁性を有する化合物を磁石で腫瘍内に送達させる抗癌剤送達法の開発に取り組んでいる。将来的には我々が開発中の磁性薬剤と磁場を利用した薬剤送達法が臨床で応用され、副作用の軽減につながることを期待し、日々の研究に取り組んでいる。

4.Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health, Labor and Welfare and New Energy and Industrial Technology Department Organization (NEDO) of Japan and the Magnetic Health Science Foundation.

参考文献

- (1) Recht A, Come SE, Gelman RS, Goldstein M, Tishler S, Gore SM, Abner AL, Vicini FA, Silver B, Connolly JL, Schnitt SJ, Coleman CN, Harris JR. Integration of conservative surgery, radiotherapy, and chemotherapy for the treatment of early-stage, node-positive breast cancer: sequencing, timing, and outcome. *J Clin Oncol*. 9 (9) : 1662-7, 1991
- (2) Schnell FM. Chemotherapy-induced nausea and vomiting : the importance of acute antiemetic control. *Oncologist*. 8 (2) : 187-98, 2003
- (3) Morse MA. Supportive care in the management of colon cancer. *Support Cancer Ther*. 3 (3) : 158-70, 2006
- (4) Zidan J, Haim N, Beny A, Stein M, Gez E, Kuten A. Octreotide in the treatment of severe chemotherapy-induced diarrhea. *Ann Oncol*. 12 : 227-9, 2001
- (5) Kornek GV, Ulrich-Pur H, Penz M, Haider K, Kwasny W, Depisch D, Kovats E, Lang F, Schneeweiss B, Scheithauer W. Treatment of advanced breast cancer with vinorelbine and docetaxel with or without human granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol*. 19 (3) : 621-7, 2001
- (6) Kiwada H, Sato J, Yamada S, Kato Y. Feasibility of magnetic liposomes as a targeting device for drugs. *Chem Pharm Bull*. 34 (10) : 4253-8, 1986
- (7) Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Nanomedicine for drug delivery and imaging a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles. *Int J Cancer* 120: 2527-2537, 2007.
- (8) Wickline SA, Lanza GM. Nanotechnology for molecular imaging and targeted therapy. *Circulation* 107: 1092-1095, 2003

- (9) Farokhzad OC, Langer R : Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 1456-1459,2006. McBain SC, Yiu HH, Dobson J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int J Nanomedicine*, 3 (2) : 169-80, 2008
- (10) Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lütke AS. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res*, 60 (23) :6611-8, 2001
- (11) Cheong I, Huang X, Thornton K, Diaz LA Jr, Zhou S. Targeting cancer with bugs and liposomes : Ready, Aim, Fire. *Cancer Res*, 67 (20) : 9605-8, 2007
- (12) Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Review*, 4 : 145-60, 2005
- (13) Chowdary KP, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull*, 27 (11) : 1717-24, 2004.
- (14) Widder KJ, Morris RM, Poore G, Howard DP Jr, Senyei AE. Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci*, 78 (1) : 579-81, 1981
- (15) Gradishar WJ:Albumin-bound paclitaxel : a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother* 7 : 1041-1053,2006
- (16) Wada S, Yue L, Tazawa K, Furuta I, Nagae H, Takemori S, Minamimura T. New local hyperthermia using dextran magnetite complex (DM) for oral cavity : experimental study in normal hamster tongue. *Oral Dis*, 7(3):192-195, 2001
- (17) Renshaw PF, Owen CS, McLaughlin AC, Frey TG, Leigh JS Jr. Ferromagnetic contrast agents: a new approach. *Magn Reson Med*, 3(2):217-225,1986.
- (18) Mendonca Dias MH, Lauterbur PC. Ferromagnetic particles as contrast agents for magnetic resonance imaging of liver and spleen. *Magn Reson Med*, 3(2):328-330, 1986
- (19) Wang C, Tucker JG, Roberts MS, Hirst LW. In vitro and in vivo evaluation in rabbits of a controlled release 5-fluorouracil subconjunctival implant based on poly (D,L-lactide-co- glyco- lide). *Pharm Res*, 13 (7) : 1059-64, 1996
- (20) El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin : from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, 34 : 203-22, 2008
- (21) Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discov Today*, 12 : 1061-7, 2007
- (22) Yie W, Chien : New developments in drug delivery systems. *Med Res Rev*, 10 (4) : 477-504, 1990
- (23) Widera G, Johnson J, Kim L, Libiran L, Nyam K, Daddona PE, Cormier M. Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine*, 24 : 1653-64, 2005
- (24) Jun-ichiro Jo, Fumito Mishima , Shin-ichi Takeda , Musaya Yamamoto , Yoshihiro Muragaki-Hiroshi Iseki , Norihide Saho , Jun Kubota-Akira Sasaki , Shigehiro Nishijima , Yasuhiko Tabata. *Drug Delivery System* 22-5, 2007
- (25) Bae YH, Okano T, Kim SW :Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N-alkyl substituted acryl-amide) in water. *J Polym Sci Part B : Polym Phys* 28:923-936,1990
- (26) Schmolka IR : Artificial skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res* 6 : 571-582,1972.
- (27) Hoffman AS : Applications of Thermally reversible poly-mers and hydrogels in therapeutics and diagnostics. *J Control Release* 6 : 297-305,1987.
- (28) Nakayama M, Okano T, Miyazaki T, Kohori F, Sakai K, Yokoyama M. Molecular design of biodegradable polymeric micelles for temperature-responsive drug release.
- (29) 杉林聖次 森本雅憲 : 経皮吸収システム(TTS).*日本臨床*56:619-627,1998
- (30) 杉林聖次 : 薬物の経皮系粘膜吸収 - Overview. *Drug Delivery System* 15 : 492-498,2000

運動誘発性発作を呈するQT延長症候群の運動負荷心電図の特徴について

岩本 真理, 西澤 崇, 渡辺 重朗, 市川 泰広
志水 直, 山口 和子, 赤池 徹, 横山 詩子
瀧間 浄宏, 佐近 琢磨, 安井 清, 柴田 利満
 新村 一郎, 横田 俊平

日本小児循環器学会雑誌第 26 巻第 1 号

別 刷

2010. 1. 1

日本小児循環器学会
Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery

運動誘発性発作を呈する QT 延長症候群の運動負荷心電図の特徴について

岩本 眞理¹⁾, 西澤 崇¹⁾, 渡辺 重朗¹⁾, 市川 泰広¹⁾
 志水 直¹⁾, 山口 和子¹⁾, 赤池 徹²⁾, 横山 詩子²⁾
 瀧間 浄宏³⁾, 佐近 琢磨⁴⁾, 安井 清⁵⁾, 柴田 利満⁶⁾
 新村 一郎⁷⁾, 横田 俊平⁸⁾

Key words:
 long QT syndrome, exercise ECG,
 Fridericia formula, T peak-end

横浜市立大学附属病院小児循環器科¹⁾, 横浜市立大学医学部循環制御医学²⁾,
 長野県立こども病院循環器科³⁾, 藤沢市民病院小児科⁴⁾, やすい医院⁵⁾,
 しばた医院⁶⁾, 新村医院⁷⁾, 横浜市立大学医学部小児科⁸⁾

Characteristics of Exercise ECG of Long QT Syndrome Who Have Symptoms during Exercise

Mari Iwamoto,¹⁾ Takashi Nishizawa,¹⁾ Shigeo Watanabe,¹⁾ Yasuhiro Ichikawa,¹⁾ Nao Shimizu,¹⁾
 Kazuko Yamaguchi,¹⁾ Tohru Akaike,²⁾ Utako Yokoyama,²⁾ Kiyohiro Takigiku,²⁾
 Takuma Sakon,⁴⁾ Kiyoshi Yasui,⁵⁾ Toshimitsu Shibata,⁶⁾ Ichiro Niimura,⁷⁾ and Shunpei Yokota⁸⁾

¹⁾Department of Pediatric Cardiology, Yokohama City University Hospital, ²⁾Cardiovascular Research Institute,
 Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, ³⁾Department of Cardiology, Nagano Pediatric Hospital, Nagano,
⁴⁾Department of Pediatrics, Fujisawa City Hospital, ⁵⁾Yasui Clinic, ⁶⁾Shibata Clinic, ⁷⁾Niimura Clinic,
⁸⁾Department of Pediatrics, Yokohama City University School of Medicine, Kanagawa, Japan

Background: Symptoms (syncope, cardiac arrest, sudden death) in long QT syndrome (LQTS) are triggered by exercise, emotion, or sleep/rest arousal. QT responses to heart rate during exercise are not good in LQTS patients who have symptoms during exercise. We estimated other indices of ECG during exercise in LQTS patients.

Methods: Ten cases of LQTS with cardiac events during exercise and 10 controls (post mucocutaneous lymph-node syndrome (MCLS) and normal coronary artery) were examined by exercise ECG. RR interval, QT interval, and QT peak: QTp, T peak-end: Tp-e were measured, and corrected using the Fridericia formula ($QT/RR^{1/3}$).

Results: QTc was increased to maximum values at the recovery 2-3 min. phase in the LQTS subjects (17% increased compared with rest), and in control cases QTc was not increased during exercise. Tp-e c were increased during exercise in LQTS, and improved after β -blocker therapy.

Conclusion: ECG parameters had characteristic changes during exercise in LQTS who have exercise-induced syncope. Those changes may be an important factor for TdP.

要 旨

背景: QT 延長症候群(以下 LQTS)における症状(失神・心停止・突然死等)の誘因には運動・精神的緊張・睡眠中などのタイプが知られている。運動誘発性発作を呈する LQTS では運動による QT の心拍応答が不良である。そこで、運動負荷心電図における特徴について検討した。

方法: 運動誘発性発作を呈する LQTS 10 例とコントロール 10 例(川崎病後正常冠動脈例)に運動負荷心電図を施行し心電図上の各指標(RR 間隔・QT 間隔・QT peak: QTp・T peak-end: Tp-e)を計測し Fridericia 法にて心拍を補正し比較検討した。

結果: LQTS 全例で負荷前に比して QTc は増大し回復期 2-3 分に最大(安静時の 17% 増加)となった。コントロール例では運動による QTc の増大はみられなかった。Tp-e c も LQTS では運動後に増大したが β ブロッカー投与後に改善がみられた。

平成 19 年 8 月 29 日受付 別刷請求先: 〒 236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9
 平成 21 年 10 月 5 日受理 横浜市立大学附属病院小児循環器科 岩本 眞理

結論：運動誘発性の発作を呈する LQTS では特徴的な運動負荷心電図を呈し、その所見は運動によって誘発される torsades de pointes の重要な因子と考えられる。

はじめに

QT 延長症候群(以下 LQTS)は心臓のチャネル異常により QT 時間の延長を呈し、torsades de pointes (TdP) と呼ばれる多形性心室性不整脈の発作によって失神やけいれん、さらに突然死のリスクのあることで知られている疾患である。約 3,000 人あたり 1 人にみられ年間の死亡率は約 1% と推定されている¹⁾。なお心臓検診にて偶然に発見される QT 延長は Aihoshi らによると約 1,100 人に 1 人ほどである²⁾。LQTS の不整脈発作は運動や水泳中に誘発される場合と聴覚刺激・驚愕時などの急激な精神緊張時で誘発される場合、睡眠中に起こる場合とがある。以前、われわれは、運動誘発性発作を呈する LQTS において運動による QT peak (QTp: Q 波から T 波の頂上までの時間)の心拍応答が不良であることを報告した³⁻⁶⁾。すなわち正常では運動で心拍数が上昇し RR 間隔が短縮するのに伴い QTp も追隨して短縮するのに対し、LQTS では QTp の短縮が不良であった。本研究では運動誘発性発作を呈する LQTS 症例の運動負荷心電図所見の特徴を明らかにするために、詳細な検討を加えて報告した。

対象と方法

横浜市立大学小児循環器科を受診した LQTS の患者のうち運動時または水泳中に失神発作を呈したことのある患者 10 名(男 6 名、女 4 名)で年齢は 5～14 歳(平均 10 歳)である。10 名のうち家族例は 2 組で 4 名であった。10 名中 9 名は診断後に β ブロッカー(propranolol 1～2 mg/kg/day)投与を開始した。残り 1 名は本人と親が治療を希望せず経過観察中である。8 名は KVLQT1 の異常(全例膜貫通部位の異常)が同定され、残り 2 名は遺伝子検索中である。コントロール群として 10 名の川崎病後正常冠動脈の患者(男 6 名女 4 名、年齢 7～13 歳;平均 9 歳)を対象とした。

全例に対して Bruce プロトコルによるトレッドミル運動負荷テストを亜最大負荷まで施行した。運動負荷によって LQTS 患者では失神発作を生じる可能性があるため医師の立ち会いのもとに検査を施行することおよび電氣的除細動器や点滴などの備品を用意して発作時の処置を迅速に行えるようにしていることを患者と患者の家族に説明しインフォームドコンセントを得たうえで行った。心電図記録は Marquette 社製

CASE16 を使用し 15 秒間の加算平均心電図を紙送りスピード 50 mm/sec、20 mm/V のスケールで記録した。安静時・運動中・回復期 1 分ごとに心拍数(HR)、RR 間隔、QT 間隔、QT peak (QTp)、T peak-end (Tp-e: T 波頂上から T 波終末までの時間)をデジタイザーまたは用手法で計測した。T 波は全例が broad based T の形態を呈しており、最も安定して計測可能であった V5 誘導にて諸計測を行った。運動負荷中の計測では運動量に伴う振動と基線の不安定性および P 波との重なりによって QT 終末の判定は不可能となる部分は QT 関連では QTp のみを計測した。心拍数(RR 間隔)の変化による補正は Fridericia 法($QTc=QT/RR^{1/3}$)を使用した。その理由は本研究対象の心電図の大部分が心拍数の高い部位での計測であり汎用される Bazett 法では QT 間隔の過大評価になるため Fridericia 法のほうが妥当と判断されたからである^{7, 8)}。計測された QT、QTp、Tp-e 等のパラメーターはすべて Fridericia 法にて心拍数補正し、それぞれ QTc、QTp c、Tp-e c と表示して比較検討した。また安静時の QTc を基準として運動後の QTc 増加分を % 表示し % up QTc として変化を示した。また QT の運動による心拍応答の評価のため以前われわれが行った方法で QTp と RR 間隔の安静時と最大運動時の点を結んだ直線の傾き slope (QTp/RR) を求めた。これらの計測を LQTS 例とコントロール例で施行し比較検討した。また LQTS 群の 9 例で β ブロッカーによる治療を開始した。 β ブロッカー投与前後で運動負荷心電図における各指標の変化を検討した。LQTS 群とコントロール群の 2 群間の比較は Mann-Whitney's U test を用いて危険率 5% 未満を有意とした。LQTS 例における β ブロッカー投与前後の比較は Wilcoxon signed-ranks test を用いて危険率 5% 未満を有意とした。

結 果

今回の症例において運動負荷心電図施行中に失神発作や心室性不整脈を呈した例はなかった。LQTS 群とコントロール群における運動負荷心電図施行中の QT 等心電図変化(平均値)の経緯を Fig. 1, 2 に示した。LQTS 群 (Fig. 1) では安静時より QTc、QTp c ともに高値で、運動直後(回復期 2～3 分)にはさらに増大しその後安静時の値付近まで回復した。Tp-e c もほぼ同時期の回復期 2～3 分に最大となった。これに対しコ

Exercise TMT in LQTS group

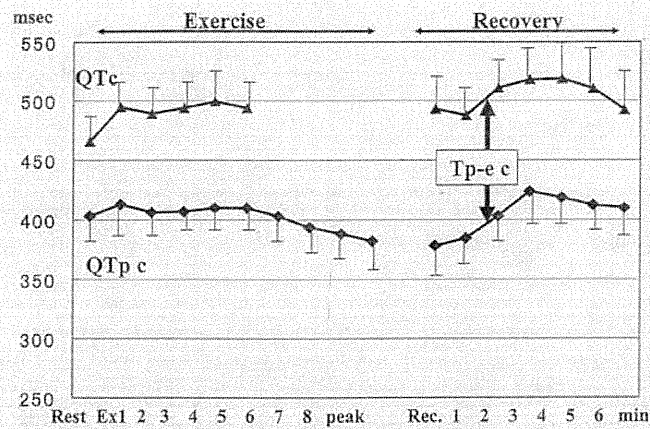


Fig. 1 Mean \pm SE change of QTc and QTpc during exercise treadmill test (TMT) in long QT syndrome (LQTS) subjects. QTc after exercise were longer than those at rest, and they were at maximum value at recovery 2–3 minutes.

Exercise TMT in Control group

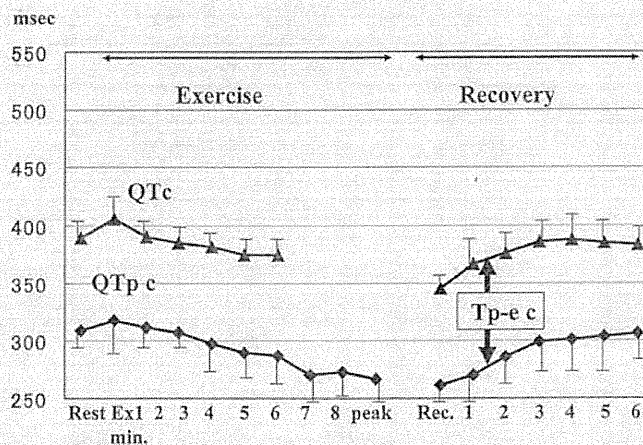


Fig. 2 Mean \pm SE change of QTc and QTpc during exercise treadmill test (TMT) in control (post-MCLS and normal coronary artery) subjects. QTc after exercise was not longer than those at rest. MCLS: mucocutaneous lymph-node syndrome

コントロール群では (Fig. 2) 運動中および運動後 QTc の有意な増大はみられなかった。運動負荷による各パラメーターのまとめを Table 1 に示した。LQTS 症例は 10 例全例で QTc は増大し、その最大値は 9 例で回復期 2～3 分にみられ、1 例で回復期 5 分にみられた。QTc の増加率は安静時の 16.6% であった。コントロール例では運動負荷による有意な QTc の延長はみられなかった (QTc 増加率 3.4%)。また Tp-e c の変化は

QTc と同様に LQTS において増大し回復期 2～3 分に最大値となったが、コントロール群では有意な変化はみられなかった。次に QTp と RR の二次元表示の実例を Fig. 3 に示した。運動誘発性発作を呈する LQTS では平均 QTp/RR slope は平均 0.19 でコントロール群の平均 0.29 と比して有意に傾きは小さく、QT の心拍応答が不良であった (Table 1)。両群において運動時最大心拍数 (peak heart rate: PHR) に差はなかったが、rest

Table 1 Comparison of parameters of exercise stress ECG test between LQTS and control. In LQTS subjects QTc and Tp-e c at rest and their maximum values were longer than those in control subjects. QTc prolongation was increased after exercise stress test in LQTS subjects, but no remarkable change was found in control subjects. The QTP/RR slope in LQTS was smaller than that of control subjects

	LQTS (n=10)	Control (n=10)	p value
PHR	153±18 bpm	167±16	n.p.
QTP/RR slope	0.19±0.07	0.29±0.04	0.01
Rest QTc	486±18 msec	388±15	0.006
Max QTc	543±22 msec	401±11	0.007
%up QTc	16.6±3.5%	3.4±2.6	0.007
Max Tp-e c	125±14 msec	98±17	0.007

PHR: peak heart rate

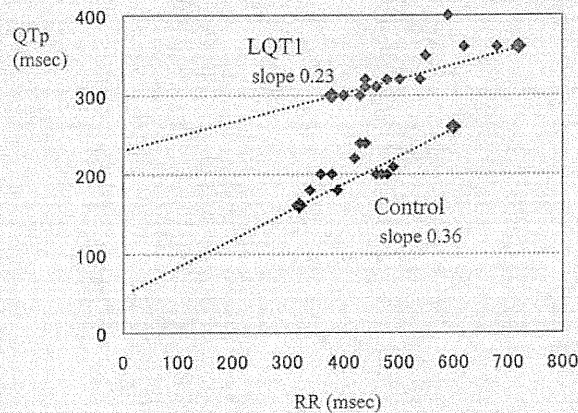


Fig. 3 Scatter plot of RR and QTP during exercise stress ECG test in LQTS subject and control subject. Control subject's slope of QTP/RR was steeper than LQTS subject's slope. Heart rate response of QTP in LQTS subject was less than that in control subject.

QTc, max QTc, max Tp-e c, % up QTc は LQTS 群において有意に高値を示した (Table 1)。次に治療を施行した LQTS 群の 9 例における治療前と β ブロッカー投与後の各指標について Table 2 に示した。 β ブロッカー投与によって治療後全例で失神発作が抑制された。 β ブロッカー投与前後の比較では PHR と max Tp-e c は低下したが, rest QTc, max QTc, % up QTc は治療前後で有意な変化は示されなかった。

考 察

先天性 LQTS はこれまでに 13 種類の遺伝子異常が同定されており, 遺伝子のタイプにより臨床症状の特

徴や治療方針も異なることが知られている。LQTI から 13 のうち LQTI・2・3 が多く, 全体の約 75% を占めている。LQTI では運動関連性の失神や突然死が 60 ~ 70% であるのに対し LQTI・3 では 0 ~ 13% ほどで残りは睡眠中・大きな音や驚愕等が発作のきっかけである⁹⁾。本研究で遺伝子検索された 8 例は LQTI であり全例がチャンネルの膜貫通部位の異常であることを確認した。残り 2 例は遺伝子の検索中であるが T 波形態は全例 broad based T で LQTI に特徴的とされるものと同様であり¹⁰⁾。本症例の大部分または全例が LQTI である可能性が高いと考えられた。10 例ともに運動中または水泳中に失神発作を繰り返す, 運動負荷に対す

Table 2 Change of parameters at exercise stress ECG test in LQTS subjects (n=9) after β -blocker medication. After medication, max HR and max Tp-e c had been lowered, but QTc had not changed

	Baseline (n=9)	β -blocker	p value
PHR	153 \pm 18 bpm	141 \pm 14	0.006
QTp/RR slope	0.18 \pm 0.07	0.19 \pm 0.12	n.p.
Rest QTc	486 \pm 18 msec	454 \pm 20	n.p.
Max QTc	539 \pm 29 msec	524 \pm 46	n.p.
%up QTc	17.8 \pm 6.7%	16.9 \pm 7.0	n.p.
Max Tp-e c	125 \pm 14 msec	109 \pm 12	0.02

PHR: peak heart rate

る QT 時間などの心電図の変化は特徴的であった。

すなわち LQTS 群ではコントロール群と比較すると、運動後早期の QT 延長が増悪し Tp-e c も延長した。このような反応は LQTS 群の 10 例全例にみられたが、コントロール群では全例で QT 延長を呈することはなく、運動誘発性発作を呈する LQTS に特徴的な反応である可能性が示唆された。以前われわれは運動による QTp の変化を調べ LQT1 と LQT2・正常例では異なることを報告した^{3, 5)}。この報告では安静時と運動ピークにおける RR 間隔と QTp を計測して QTp の短縮率、QTp/RR slope を求めた。正常コントロール例では QTp/RR slope 0.258 \pm 0.046 であったのに対し LQT1 では 0.135 \pm 0.043 と低く、LQT2 では 0.353 \pm 0.08 と高い値を示した。したがって運動による RR 短縮に伴う QT 心拍応答が LQT1 では不良であり LQT2 ではむしろ良好であると結論づけた。清水らは LQT1、LQT2 においてエピネフリン負荷試験を施行し、その反応の相違により鑑別が可能であるとした。エピネフリンは初めにボラスで静注 (0.1 μ g/kg) しその後持続点滴 (0.1 μ g/kg/min) をする方法である。負荷直後心拍数上昇に一致して LQT1・2 ともに QTc 延長がみられるが、定常状態になると LQT1 では QTc 延長は持続するのに対し、LQT2 は QTc がコントロールレベルまでに短縮すると報告した^{11, 12)}。また Ackerman らが報告した Mayo Clinic のエピネフリン負荷法においては (低濃度段階的負荷) LQT1 では QT 延長が明らかであったが、LQT2 では初期の延長は一部のみで、むしろ T 波形の変化 (2 相性 T, notched T) が特徴的であった¹³⁻¹⁵⁾。運動負荷テストにおいても自己のカテコラミン血中濃度が上昇するためこれらのエピネフリン負荷テストに類似した反応が予測される。本研究で運動負荷テストにおける LQT の心電図反応はエピネフリン負荷テストにおける LQT1 の反応と同様のものがみられた。

LQT1 においてカテコラミンや運動によって QT が延長する機序は以下のように考えられている。正常では運動やカテコラミンにより遅延整流型 K⁺ チャンネルのうち Iks の機能が増強して、心筋活動電位の再分極 phase 3 の K チャンネルによる外向き電流が増大するため再分極が促進され活動電位時間が短縮する^{16, 17)}。同時に L 型 Ca チャンネルも増強して内向き電流を増大し心筋の収縮力増加と活動電位持続時間の延長 (すなわち QT 時間の延長) を来すが、K チャンネルの割合がかなり多く全体として QT は短縮する。LQT1 では Iks の機能不全によって再分極の促進がなく活動電位持続時間の短縮がないうえ、Ca チャンネルの影響は受けるため全体としては QT 延長が増悪することとなる。

LQT2 は遅延整流型 K⁺ チャンネルのうち Ikr の機能異常であるが、Ikr は活動電位 phase 3 の早い時期の再分極に関与し、カテコラミンや運動負荷直後は QT が延長するが Iks チャンネルの機能増強によって QT が短縮してくる。

エピネフリン負荷試験は原則として入院にて行う必要があるのに対し、運動負荷試験は外来診療で繰り返し施行でき、より日常生活に近い状態での検査である。しかし運動負荷試験では体動、基線の揺れ、RR 間隔の変化が強く、QT 間隔をはじめとする心電図の計測が困難となることが欠点である。そのため以前われわれは運動中でも判読可能な QTp の計測を主体とした。QTp 以外の QT 関連の計測は運動中には困難であるが、回復期は全項目計測できる。本研究では安静時と運動後回復期だけに注目しても運動誘発性発作を呈する LQTS の心電図変化の特徴を捉えることが可能であった。実際の診療においては、運動誘発性失神発作の既往のある LQTS 例・家族に運動歴のある QT 延長例で運動負荷心電図に特徴的な反応であるかを見極めて、その場合は失神や突然死予防のための治療、す

なわち β ブロッカーの投与を検討する必要があると考えられる。

β ブロッカー投与について

QTの延長は心筋活動電位時間の延長を示し、Tp-e cの延長はAnterovitchらの実験では心室筋の内膜から外膜方向の活動電位時間のばらつきを表していた。LQTS群では β ブロッカー投与後QT時間は不変であったがTp-e cの延長の改善がみられたことより、 β ブロッカーのTdP予防効果の機序はQT時間そのものよりも心筋細胞間の活動電位のばらつきを抑えることによって心室性不整脈の予防効果を呈することが推測される。

まとめ

運動誘発性の発作を呈するLQTSでは、コントロールではみられない特徴的な運動負荷心電図を呈した。その所見は運動によって誘発されるTdPの重要な因子の可能性がある。また β ブロッカーのTdP予防効果の機序を考察するうえで興味深い所見が得られた。

本稿は第42回日本小児循環器学会総会・学術集会(2006年、名古屋)で発表した。

【参考文献】

- 1) Keating MT, Sanguinetti MC: Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001; 104: 569-580
- 2) Aihoshi S, Yoshinaga M, Nakamura M, et al: Screening for QT prolongation using a new exponential formula. *Jpn Circ J* 1995; 59: 185-189
- 3) Shibata T, Iwamoto M, Nishizawa T, et al: QaT interval-heart rate relation during exercise in patients with KVLQT1 and HERG mutations. *Cardiol Young* 2001; 11: 9-10
- 4) 瀧開浄宏: QT延長症候群. *小児内科* 2002; 34: 373-378
- 5) 西澤 崇: 先天性QT延長症候群の遺伝子型と表現型の比較検討: T波の形態および運動負荷によるQT短縮応答と遺伝子型の関連について. *横浜医学* 2004; 55: 11-18
- 6) 岩本真理, 柴田利満, 新村一郎, ほか: QT延長症候群と運動負荷心電図検査. in 第18回不整脈勉強会: 運動と不整脈(第40回日本小児循環器学会総会・学術集会サテライトセミナー). 2004. 東京池袋サンシャインコンベンションセンター
- 7) Batchvarov V, Malik M: Individual patterns of QT/RR relationship. *Cardiac Electrophysiology Review* 2002; 6: 282-288
- 8) Aihoshi S, Yoshinaga M, Tomari T, et al: Correction of the QT interval in children. *Jpn Circ J* 1995; 59: 190-197
- 9) Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, et al: Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; 103: 89-95
- 10) Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, et al: ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 1995; 92: 2929-2934
- 11) Shimizu W, Noda T, Takaki H, et al: Diagnostic value of epinephrine test for genotyping LQTS1, LQTS2, and LQTS3 forms of congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2004; 1: 276-283
- 12) Tanabe Y, Inagaki M, Kurita T, et al: Sympathetic stimulation produces a greater increase in both transmural and spatial dispersion of repolarization in LQTS1 than LQTS2 forms of congenital long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 911-919
- 13) Ackerman MJ, Khositseth A, Tester DJ, et al: Epinephrine-induced QT interval prolongation: a gene-specific paradoxical response in congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 413-421
- 14) Vyas H, Ackerman MJ: Epinephrine QT stress testing in congenital long QT syndrome. *J Electrocardiol* 2006; 39 (4 Suppl): S107-S113
- 15) Vyas H, Hejlik J, Ackerman MJ: Epinephrine QT stress testing in the evaluation of congenital long-QT syndrome: diagnostic accuracy of the paradoxical QT response. *Circulation* 2006; 113: 1385-1392
- 16) Ackerman MJ, Clapham DE: Ion channels—basic science and clinical disease. *N Engl J Med* 1997; 336: 1575-1586
- 17) Roden DM, George AL Jr.: The cardiac ion channels: relevance to management of arrhythmias. *Annu Rev Med* 1996; 47: 135-148