

博士学位論文

ウサギ催不整脈モデルの活用による QT 間隔延長および
torsade de pointes の誘発に影響を与える
薬理的要因に関する研究

東邦大学大学院 薬学研究科 薬物治療学講座

3019001 川上 聡士

指導：薬物治療学研究室 高原 章 教授

目次

緒言.....	1
実験方法.....	5
第1章 hERG K ⁺ チャンネル抑制作用を有する薬物の TdP 誘発作用の相違に関する検討.....	11
1-1 序論.....	11
1-2 実験材料および方法.....	13
1-3 結果.....	14
1-4 考察.....	21
1-5 小括.....	24
第2章 薬物性 QT 延長症候群発生を修飾する作用の検討：L 型 Ca ²⁺ チャンネル阻害、Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換機構阻害、および内向き整流性 K ⁺ チャンネル電流阻害による影響.....	25
2-1 序論.....	25
2-2 薬物性 QT 延長症候群発生を修飾する作用の検討：L 型 Ca ²⁺ チャンネル阻害と Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換機構阻害による影響.....	27
2-2-1 実験材料および方法.....	27
2-2-2 結果.....	29
2-3 薬物性 QT 延長症候群発生を修飾する作用の検討：I _{K1} 阻害による影響.....	34
2-3-1 実験材料および方法.....	34
2-3-2 結果.....	36
2-4 考察.....	42
2-5 小括.....	46
第3章 薬物性 QT 延長症候群発生を修飾する作用の検討：Gq タンパク質共役型受容体の関与.....	47
3-1 序論.....	47
3-2 実験材料および方法.....	48
3-3 結果.....	50
3-4 考察.....	57
3-5 小括.....	59
第4章 徐拍化作用を有する hERG K ⁺ チャンネル抑制薬の TdP 誘発作用の検討.....	60
4-1 序論.....	60
4-2 実験材料および方法.....	61
4-3 結果.....	62

4-4 考察.....	66
4-5 小括.....	67
総括.....	68
結語.....	70
謝辞.....	71
参考文献.....	72

緒言

薬物による重大な副作用の1つである催不整脈作用は、quinidine 不整脈や digitalis 不整脈で代表されるように循環器官用薬によるものが臨床経験上古くから知られていた。このような抗不整脈薬による催不整脈作用が広く認知されたのは、科学的エビデンスとして 1991 年に臨床試験 CAST (cardiac arrhythmia suppression trial) の結果が報告されたことがきっかけであった (1)。この試験では、心筋梗塞患者に心室性不整脈を抑制する目的で Ic 群抗不整脈薬を投与したところ、予想に反して不整脈死が増加することが明らかにされた。Ic 群抗不整脈薬は強力な Na⁺チャネル抑制作用を示し、それに起因する伝導抑制が原因となり催不整脈作用が生じると説明されている (2)。一方、薬物により心電図 QT 間隔が延長し、torsade de pointes (TdP) と呼ばれる多形性の心室頻拍が誘発される催不整脈作用も CAST 以降の 1990 年代半ば以降に大きく注目された。TdP が発生するとめまいや失神などの脳虚血症状をはじめ突然死をもきたしうる。この催不整脈作用は薬物性 QT 延長症候群と呼ばれ、重大な副作用の1つとして認識されている。

薬物性 QT 延長症候群が世界的に注目されたのは、抗ヒスタミン薬 terfenadine による催不整脈作用が死亡症例も含め 1990 年頃から相次いで報告されたことがきっかけであった (3)。本邦においても 1997 年に「花粉症薬で不整脈、2 年間に 10 人、厚生省注意呼びかけ」という記事が報道され世間に広く知れ渡ることになった (4)。その後、抗精神病薬 sertindole や抗菌薬 grepafloxacin、抗ヒスタミン薬 astemizole、消化管運動賦活調整薬 cisapride による薬物性 QT 延長症候群の発生が 1990 年代から 2000 年代前半にかけて相次いで報告されている (5)。循環器官用薬のみならず非循環器官用薬が催不整脈作用を有する予期しない事態を受け、複数の有望な薬物が市場撤退する結果となった。また、薬物性 QT 延長症候群を回避するために薬物の心臓安全性を早期に明確にすることが重要との考え方が 2000 年頃より急速に普及し、薬物性 QT 延長症候群のリスク評価手法が日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) においても議論されることとなった。

薬物性 QT 延長症候群は QT 間隔延長作用それ自身ではなく TdP 誘発が実際の問題点である。したがって、薬物に潜在する TdP 誘発作用を直接的に評価することがリスク評価手法として理想的である。しかし、薬物性 QT 延長症候群の発生が世界的に問題となった 2000 年代前半では TdP を検出可能な実験系は十分に整備されていなかった。薬物性 QT 延長症候群の主な原因は心筋再分極過程で主要な役割を担う human ether-á-go-go related gene (hERG) K⁺チャネルの抑制 (6) であることから、開発候補薬物の hERG K⁺チャネル抑制作用を細胞レベルで実測し、平行して生体レベルで QT 間隔延長作用を実測

した実験結果を含めた統合的評価を実施し、TdP 誘発作用を予測する手法が提唱された。このようなスキームは「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的な可能性に関する非臨床的評価（ICH S7B）」に記され、本邦では 2009 年からステップ 5 として製造承認申請に含めることが義務付けられた。ICH S7B ガイドライン施行後に承認申請された薬物の中で薬物性 QT 延長症候群誘発により市場撤退したものは現時点では無く、一定の成果を上げている。しかし、このリスク評価手法は考え方として QT 間隔延長と TdP 誘発が必要十分の関係であることを前提としていることが課題であり、実際には TdP 誘発性の有無を実験的に確認できずに、hERG K⁺チャンネル抑制作用と QT 間隔延長作用を有するが故に開発中止と判断された有望な新規薬物も少なくないとの指摘もある。このため、QT 間隔延長に加えて TdP 発生に関わる病態生理学的な機構を考慮したリスク評価法の提案が望まれている。

TdP を含めた致死性不整脈の発生に関わる病態生理学的な機構をより深く理解するため、致死性不整脈発生の前兆現象を捉えるための取り組みが臨床及び非臨床による研究が続けられている。前兆現象を捉えることを目的に、左室肥大、心電図 ST 低下、T 波陰転変化、QT 間隔延長などの所見を確認する他に、交感神経機能を反映する心拍変動、QRS 終末部分に見られる微小電位（心室遅延電位）、T 波の形・波高・極性が 1 拍ごとに交代する現象（T-wave alternans）等の指標を対象に不整脈発生との関係性が検討されている（7）。TdP の場合には、予知指標として QT 間隔延長や T-wave alternans の出現の他に、心電図 RR 間隔の特徴的な変動パターンの出現（short-long-short パターン、increased sinus rate パターンなど）が検討されてきた（8）。また、QT 間隔は生理的に 1 拍ごとに変動が生じているが、この程度が TdP 発生直前において増大することが明らかにされ、この変動を定量化した short-term variability（STV）が TdP の予知指標として提唱されており（9）、薬物性 QT 延長症候群の予知指標としても有用性が報告されている（10,11）。これら不整脈発生に関連する予知指標は現象論に依存しており、不整脈の発生機序との関連性を明確にしていくことが解決すべき課題として残されている。

薬物性 QT 延長症候群は、hERG K⁺チャンネル抑制による活動電位持続時間の延長を出発点とし、TdP 発生のきっかけとなる興奮（不整脈トリガー）と興奮を心室内に巡回させる不整脈維持機構（リエントリー基質）の両者の存在により誘発されると説明されている（12）。この過程を順を追って眺めると、過度な活動電位持続時間の延長が早期後脱分極（early afterdepolarization; EAD）と呼ばれる異常な脱分極を生じさせ、その脱分極が心筋興奮閾値を超えると新たな活動電位であるトリガードアクティビティーが発

生し、これが TdP 開始のトリガーとなる。この経過は、心電図上では R on T 型心室期外収縮 (premature ventricular contraction; PVC) として観察される。また、心室筋は心内膜側心筋、心外膜側心筋、これらの中間層に局在する M 細胞の 3 種類に分類され、それぞれで電気生理学的な特性が異なるため、hERG K⁺チャンネル抑制による活動電位持続時間延長の程度が全ての心室筋層で一様とならず、その結果として心室内で不応期に部位差が生じ、リエントリー基質が形成されることが知られている (13)。このような複雑な過程を経て薬物性 QT 延長症候群が誘発されるのに対し、リスク評価は上記の通り、QT 間隔延長という TdP 発生機序の一部しか含んでいないことが課題と考えられる。したがって、TdP の発生を直接的に捉えることができ、QT 間隔延長から TdP 発生に至るまでの過程を反映する指標を得ることができる実験系が必要と考えられる。

当研究室ではこのような現状を踏まえ、薬物性 QT 延長症候群が高率に発生する *in vivo* ウサギ催不整脈モデルを 2017 年に独自開発した (14)。本モデルでは臨床的に QT 間隔延長と TdP 誘発を認める陽性薬 (dofetilide と sparfloxacin) により TdP が発生し、QT 間隔延長作用を示すが TdP 誘発作用を認めないとされる陰性薬 (amiodarone と moxifloxacin) では TdP が発生しないことから、臨床での薬物性 QT 延長症候群発生リスクを適切に反映する検出力を有している (14)。本モデルを用いた薬物性 QT 延長症候群誘発リスクに関する検討を進めることで薬物の TdP 誘発作用の有無を明らかにするとともに、QT 間隔延長との関係性が明確になると期待される。また、ウサギ催不整脈モデルでは心電図と右心室单相性活動電位 (monophasic action potential; MAP) を同時測定することで、QT 間隔延長、EAD 出現、R on T 型 PVC 出現といった TdP 発生までの経過を経時的に観察できるため、TdP 発生機序の研究にも応用可能である。本モデルの活用により薬物性 QT 延長症候群のリスクを考える上で重要となる、QT 間隔延長および TdP 誘発に影響を与える薬理的な要因が検討可能となり、それは同時に TdP 発生機序の解明に繋がり、不整脈を停止させる新規治療薬の開発に向けた基礎的知見が提示されることが期待される。

そこで本研究では、ウサギ催不整脈モデルを活用し、第 1 章では hERG K⁺チャンネル抑制作用を有する複数の抗ヒスタミン薬を用いて TdP 誘発作用を評価し、これまでに薬物性 QT 延長症候群誘発リスク評価で主要な指標とされてきた QT 間隔延長作用との関連性を検討した。第 1 章で得られた知見を基に、第 2 章～第 4 章では、hERG K⁺チャンネル抑制から TdP 誘発までの過程を分析し、この過程を抑制または促進する薬理的な修飾作用を明らかにするために検討を行った。

本論文は以下の原著論文を基礎とするものである。

1. Satoshi Kawakami, Yoshinobu Nagasawa, Mihoko Hagiwara-Nagasawa, Kensuke Omura, Megumi Aimoto, Akira Takahara. Torsadogenic potential of a novel remyelinating drug clemastine for multiple sclerosis assessed in the rabbit proarrhythmia model. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2020;144(3):123-128. doi: 10.1016/j.jphs.2020.08.003.
2. Akira Takahara, Satoshi Kawakami, Megumi Aimoto, Yoshinobu Nagasawa. Torsadogenic potential of HCN channel blocker ivabradine assessed in the rabbit proarrhythmia model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2021;44(11):1796-1799. doi: 10.1248/bpb.b21-00605.
3. Satoshi Kawakami, Ryuichi Kambayashi, Kazuhiro Takada, Megumi Aimoto, Yoshinobu Nagasawa, Akira Takahara. Role of cardiac α_1 -adrenoreceptors for the torsadogenic action of I_{Kr} blocker nifekalant in the anesthetized atrioventricular block rabbit. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2022;150(2):67-73. doi: 10.1016/j.jphs.2022.07.003.

実験方法

1. 実験動物

本研究は「東邦大学薬学部における実験動物に関する指針」に従い、東邦大学動物実験委員会の承認を得て実施した。本実験では雄のニュージーランドホワイトウサギ（体重 2.5～3.5 kg）を日本エスエルシー（浜松）より購入し、東邦大学薬学部実験動物センター内で飼育したものを使用した。

2. 完全房室ブロックウサギの作製方法

ウサギに導入麻酔を目的に ketamine hydrochloride（ケタラール[®]筋注用 500 mg，第一三共）35 mg/kg および xylazine hydrochloride（セラクター[®]2%注射液，バイエル薬品）5 mg/kg を筋肉内投与した。ウサギを背位に保定して、37°Cで背側から保温し、非コール形換気用気管チューブ（インターメイドジャパン）を気管内に挿管し、人工呼吸器（SN-480-5，シナノ製作所）を用いて一回換気量 6 mL/kg、呼吸数は 40 strokes/min で呼吸管理を行った。維持麻酔は isoflurane（イソフルラン吸入麻酔薬，ファイザー）を用い、isoflurane 専用気化器（ISOTEC，SurgiVet）にて 100%酸素で約 1.5%に気化したものをウサギに吸入させ、麻酔状態を維持した。

静脈針 22G×1 1/1”（夏目製作所）を右上肢、左右下肢の皮下に接触させ、針に導線を繋ぎ、生体電気用入力箱（JB-611J，日本光電）を介し生体電気用アンプ（AC-601G，日本光電）を用いて体表面第 II 誘導心電図を記録した。ヘパリンナトリウム（ヘパリンナトリウム注[®]1 万単位/10 mL「AY」，エイワイファーマ）を生理食塩水（大塚生食注[®]，大塚製薬）で 100 U/mL の濃度になるように希釈し作成したヘパリン生理食塩水をカニューレに満たし、右大腿動脈にカニューレを挿入後、圧トランスデューサーを介してひずみ圧力アンプ（AP-641G，日本光電）により血圧を測定した。

左大腿静脈にサーフロー[®]留置針 18G×2 1/2”（テルモ）を挿入し、外筒を留置したまま針を抜去した。血液の逆流を確認し、ガイドワイヤーを外筒の中に通し、外筒を抜去した。ガイドワイヤーを介してシース（ラジフォーカスイントロデューサー II H，7Fr，テルモ）をダイレーターとともに血管内に挿入後、ガイドワイヤーとダイレーターを一緒に抜去し、シースのみを血管内に留置した。インターフェイスクーブル（ジョンソン・エンド・ジョンソン）に接続した電極カテーテル（Biosence Webster[®]，D-Type，太さ 6Fr，4 極電極，電極間距離 2-5-2 mm，ジョンソン・エンド・ジョンソン）を左大腿静脈のシースを介して血管内に挿入し、心内電位図を生体電気用アンプ（AB-621G，日本光電）

により記録し、電極カテーテル先端を房室結節領域に固定した (Figure 1)。動物病院用電気メス (SL-1PR, セムコ) を用い、20 W の出力で房室結節領域を焼灼することで完全房室ブロックを作製した (Figure 2)。完全房室ブロック作製後、カテーテル電極を電気刺激装置 (SEC-4103, 日本光電) に接続し、刺激電圧は 2.0 V (閾値の約 2 倍)、刺激幅は 3 ms の右心室ペーシングを心拍動数が 60 beats/min となる刺激頻度で施した。

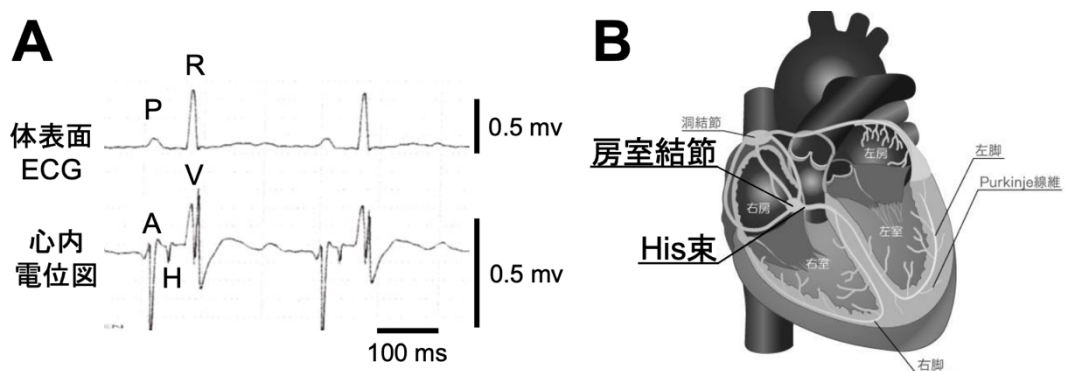


Figure 1. カテーテルによる心内電位図の記録と心臓内の房室結節領域の位置 (A) 同時記録した体表面心電図 (ECG) と心内電位図を示す。(B) カテーテル先端を留置する房室結節領域 (房室結節と His 束) の心臓内における位置を示す。P; P 波, R; R 波, A; 心房電位, H; His 束電位, V; 心室電位

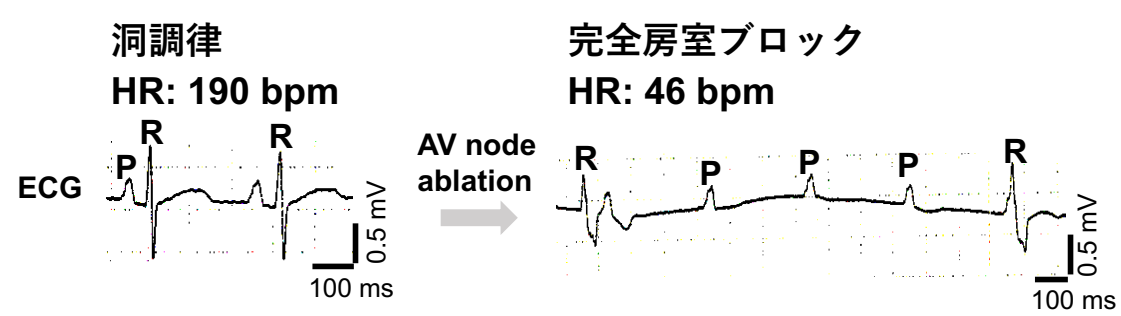


Figure 2. カテーテル焼灼法による完全房室ブロック作製時の体表面心電図 ECG; 心電図, P; P 波, R; R 波

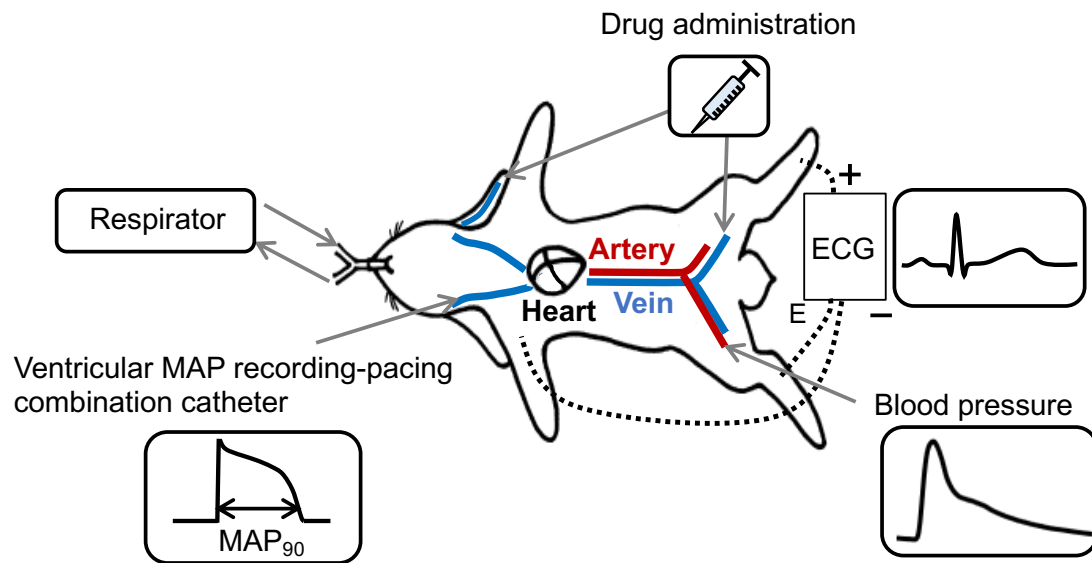


Figure 3. 完全房室ブロックウサギの実験概略図
 ECG; 心電図, MAP; 単相性活動電位, MAP₉₀; MAP 持続時間

3. 電気生理学的パラメータおよび心行動態パラメータの記録法

カテーテル焼灼法により作製した完全房室ブロックウサギ (Figure 3) の右外頸静脈にシース (ラジフォーカスイントロデューサーIIH, 6Fr, テルモ) を留置した。右外頸静脈のシースを介して単相性活動電位記録・刺激用電極カテーテル (ウサギ用, 太さ 5Fr, 4 極電極, 電極間距離 1-1 mm, フィジオテック) を右心室内に挿入し、差動交流増幅器 (DAM-50, WPI) および直流アンプ (AD-601G, 日本光電) を介して右心室の MAP を記録した。また、電極カテーテルを電気刺激装置に接続し、刺激電圧は 2.0 V、刺激幅は 3 ms で右心室ペーシングを心拍動数が 60 beats/min となる刺激頻度で施した。

心電図、血圧および MAP の信号はリアルタイム循環動態記録解析ソフトウェア (iox2, emka TECHNOLOGIES) を介してパーソナルコンピューター (Endeavor Pro5000, EPSON) に取り込むことでモニター保存し、同時に多ペンレコーダ (WR-3310, GRAPHTEC) およびサーマルアレイレコーダー (WT-685G, 日本光電) で経時的に記録した。データ解析は循環動態解析ソフトウェア (ecgAUTO, emka TECHNOLOGIES) で行った。MAP の再分極相終末部の決定は活動電位と同様に困難なこともあり、MAP の立ち上がりから再分極 90% までの時間を MAP 持続時間 (MAP₉₀) として測定した。解析結果をエクセルに集計し、GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) にてグラフを作成した。

4. 心室期外収縮の評価

心室期外収縮 (PVC) は、房室伝導によって生じる心室の電氣的興奮よりも早期に出現する異常な心室興奮であり、心電図上では P 波が先行しない QRS 波として表れる。これは、EAD や遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization; DAD)、異常自動能を由来とし、不整脈発生のトリガーとなるものである。特に連結期の短い PVC からは TdP や心室細動などの不整脈が誘発されやすく (15)、心電図の T 波が終了する前に心室興奮が生じて R 波が T 波上に出現するものは R on T 現象として知られている。この R on T 型 PVC は、Prematurity index (PI) = 連結期/先行 QT 間隔により算出される PI が 1 未満になるものと定義される (16)。第 II 誘導心電図と MAP の記録より、PI を用いて R on T 型 PVC の判定を行った。

5. 心室再分極時間の時間的ばらつきの評価

Figure 4 に示すように、1 拍毎に再分極持続時間は薬物投与前においてもばらつきが生じている。このばらつきは再分極時間の時間的ばらつきと呼ばれている。QT 延長薬の投与により致死性不整脈が誘発されやすい状態になると再分極時間の時間的ばらつきが大きくなることが報告されている (17)。再分極時間の時間的ばらつきの増大は EAD が発生しやすい状態を反映しており、トリガー発生の前兆現象と報告されている (18)。

再分極時間の時間的ばらつきの評価には MAP 信号を用いた。MAP₉₀ の時間的ばらつきは、薬物の投与前後で PVC を含まない連続した 31 拍の MAP を計測し、n 番目と n + 1 番目の MAP₉₀ を MAP₉₀(n) および MAP₉₀(n + 1) として連続的にプロットする Poincaré plot を用いて表した (Figure 4)。また、その 31 拍を用いて short-term variability (STV) および long-term variability (LTV) を算出し、時間的ばらつきを定量化し評価した。

$$STV = \frac{\sum |MAP_{90}(n+1) - MAP_{90}(n)|}{[30 \times \sqrt{2}]}$$

$$LTV = \frac{\sum |MAP_{90}(n+1) + MAP_{90}(n) - 2MAP_{90}(\text{mean})|}{[30 \times \sqrt{2}]}$$

STV は LTV よりも TdP の予測性が高いとの報告があり、bepridil などのマルチイオンチャンネル抑制薬が誘発する TdP の予測指標としての有用性が報告されている (19)。

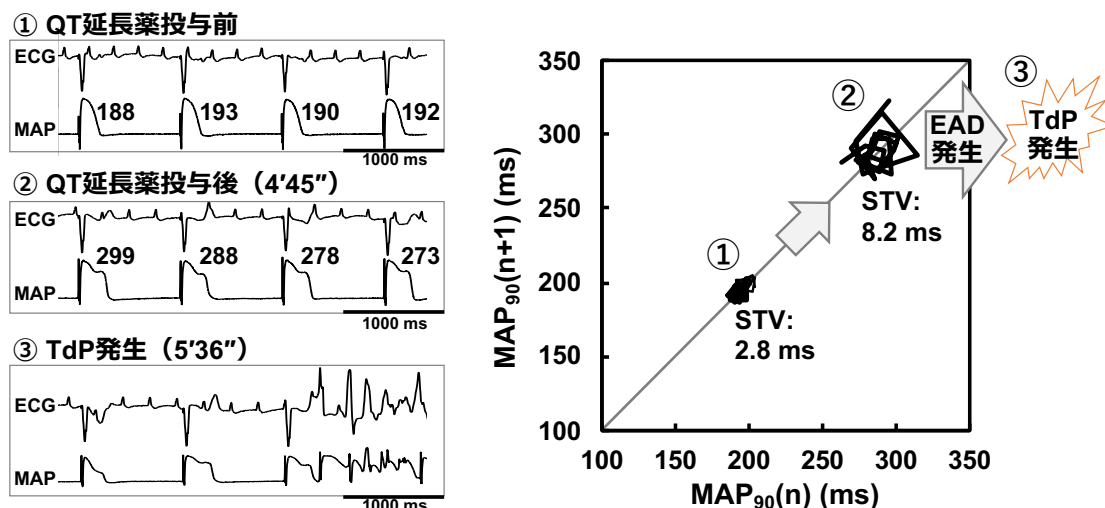


Figure 4. 再分極時間の時間的ばらつきを視覚化した Poincaré plot の例

(左) QT 延長薬を投与すると単相性活動電位持続時間 (MAP₉₀) の 1 拍毎の時間的ばらつきが増大し、torsade de pointes (TdP) が発生する。(右) 左図の MAP₉₀ の時間的ばらつきを視覚化した Poincaré plot を示す。右図の①から③は左図の①から③に対応する。ECG; 心電図

6. 心室頻拍と torsade de pointes の定義

心室頻拍 (ventricular tachycardia; VT) は、連結期の短い心室期外収縮が 3~5 連発以上持続するものと定義されている (20)。心室頻拍の中で、心電図上の QRS 波形が次々と変化するものは多形性心室頻拍に分類され、さらに QT 延長症候群に伴うものを TdP と呼ぶ。TdP は QRS 波形の極性と波高が周期的に変化し、基線を中心に捻じれるような特異な波形を示す (21)。本研究では、従来の不整脈モデルで使用されている定義 (22,23) に基づいて、連結期の短い心室期外収縮が 5 連発以上持続するものを心室頻拍と判定し、また、その中で QRS 波形の形態から TdP を判断した。

7. 統計学的解析法

得られた結果は、平均値±標準誤差 (S.E.M) で表した。また、有意差検定は GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) を使用し、対応のある多群間のグループ内の比較は one-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) および Dunnett 検定を用いて $p < 0.05$ を有意とした。また、対応のある 2 群間の比較は paired *t*-test を、対応のない 2 群間の比較には unpaired *t*-test を、対応のない多群間の比較には Dunnett's multiple comparison test を用いて $p < 0.05$ を有意とした。

第1章 hERG K⁺チャネル抑制作用を有する薬物の TdP 誘発作用の相違に関する検討

1-1 序論

抗ヒスタミン薬はアレルギー疾患の治療や麻酔前投与薬として用いられ、幅広い年齢層に服用されている薬物である。一般用医薬品としても販売され、総合感冒薬の成分として抗ヒスタミン薬が配合されるなど、患者自身の判断により服用する機会が多い薬物の一つである。一方で、緒言に記した通り、抗ヒスタミン薬は薬物性 QT 延長症候群が世間に広く知られる契機となった薬物群でもある。当研究室における従前の調査研究において、現在国内で使用されている抗ヒスタミン薬 25 種を ICH S7B ガイドラインに準じた非臨床試験データに関する公開情報に基づき薬物性 QT 延長症候群のリスク分析を行ったところ、18 種は hERG K⁺チャネル抑制作用の評価がされており、その内 8 種は hERG K⁺チャネル抑制作用を示すことが報告されているなど (24)、約半数の抗ヒスタミン薬は薬物性 QT 延長症候群の原因となりうる可能性が提示されている。

本章では、hERG K⁺チャネル抑制作用を示すことが報告されている 8 種の抗ヒスタミン薬 (azelastine, chlorpheniramine, clemastine, ebastine, diphenhydramine, hydroxyzine, loratadine, promethazine) から 4 種を選択し、催不整脈作用を検討することとした。これまでに報告されている azelastine, clemastine, diphenhydramine, hydroxyzine の催不整脈リスク評価に関する文献情報のまとめを Table 1-1 に示す。Clemastine と azelastine の hERG K⁺チャネルに対する IC₅₀ はそれぞれ 12 nM と 11 nM であり (25,26)、これらの薬物による非臨床における QT 間隔延長作用および TdP 誘発作用の報告はないものの、hERG K⁺チャネル抑制作用は terfenadine (IC₅₀= 26 nM) や astemizole (IC₅₀= 0.9 nM) と同等であるため (27,28)、TdP を誘発させる作用特性が潜在する可能性がある。一方、hydroxyzine と diphenhydramine の hERG K⁺チャネルに対する IC₅₀ はそれぞれ 160 nM と 2700 nM であり (29,30)、どちらも *in vivo* 麻酔下モルモットにおいて 1 mg/kg で QT 間隔延長作用を示すことが報告されていることから (30,31)、これら 2 つの薬物は ICH S7B ガイドラインに準じた評価では高リスクの薬物に相当すると推定される。Hydroxyzine は鎮静目的で、diphenhydramine は抗がん剤投与時のインフュージョンリアクションの予防目的やアナフィラキシーショックの治療を目的に頻繁に臨床使用される薬物であるため、TdP 誘発作用の有無を明確にする必要性は高い。そこで本章では、ウサギ催不整脈モデルを用いて clemastine, azelastine, hydroxyzine, diphenhydramine の QT 間隔延長作用と TdP 誘

発作用の有無を明らかにすること、さらに QT 間隔延長と TdP 誘発の関係性を検討することを目的とした。

Table 1-1. 代表的な抗ヒスタミン薬の催不整脈リスク

薬物名	hERG K ⁺ チャンネル 抑制作用 (IC ₅₀ 値)	QT 間隔 延長作用 (投与量)	TdP 誘発作用
Clemastine	Positive (12 nM)	不明	不明
Azelastine	Positive (11 nM)	不明	不明
Hydroxyzine	Positive (160 nM)	Positive (1 mg/kg)	不明
Diphenhydramine	Positive (2700 nM)	Positive (1 mg/kg)	不明

催不整脈リスクに関連する非臨床データをまとめた。Positive; 作用を有する。

1-2 実験材料および方法

使用動物

実験方法に記した完全房室ブロックウサギを用い、60 beats/min で右心室ペーシングを施した。

使用薬物

Clemastine (富士フィルム和光純薬)、azelastine (東京化成工業)、hydroxyzine (SIGMA) および diphenhydramine (富士フィルム和光純薬) を、生理食塩水 (大塚生食注[®], 大塚製薬) を用いて溶解および希釈して使用した。左大腿静脈に留置したシースを介し、シリンジポンプ (Pump 11 Elite, HARVARD) を用いて、clemastine または azelastine を 0.03, 0.3 および 3 mg/kg を 0.2 mL/kg/min で 10 分間かけて静脈内持続注入し、hydroxyzine または diphenhydramine を 0.1, 1 および 10 mg/kg を 0.2 mL/kg/min で 10 分間かけて静脈内持続注入した。

試験プロトコール

完全房室ブロックを作製後、血行動態が安定したのちに clemastine (n=5)、azelastine (n=5)、hydroxyzine (n=5) または diphenhydramine (n=5) を投与し、催不整脈性を比較検討した。

Clemastine、azelastine、hydroxyzine または diphenhydramine の低用量を 10 分かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25 および 30 分の時点で、心電図、血圧、MAP の測定を行い、続けて中用量を 10 分かけて静脈内投与し同様に測定した。最後に高用量を 10 分間かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 および 60 分の時点で同様に測定した。

1-3 結果

ウサギ催不整脈モデルにおける clemastine および azelastine の催不整脈作用

Clemastine および azelastine の静脈内投与は QT 間隔および MAP 持続時間 (MAP₉₀) を延長させ、TdP を誘発させた。TdP 発生時の心電図、MAP、血圧の波形の典型例を Figure 1-1 に示す。

Clemastine 投与群において、低用量 0.03 mg/kg により MAP₉₀ に有意な延長は認められなかった。R on T 型 PVC は 5 例中 1 例に出現した (Figure 1-2)。中用量 0.3 mg/kg 投与後も統計学的に有意でないものの QT 間隔と MAP₉₀ の延長傾向を認めた。この時 R on T 型 PVC の出現は認められなかった。高用量 3 mg/kg では著明な QT 間隔と MAP₉₀ の延長を認め、R on T 型 PVC は 5 例中 3 例に、TdP は 5 例中 1 例に出現した。

Azelastine 投与群において、低用量 0.03 mg/kg により MAP₉₀ に有意な延長は認められず、R on T 型 PVC の出現も認められなかった (Figure 1-2)。中用量 0.3 mg/kg 投与後は統計学的に有意でないものの QT 間隔と MAP₉₀ の延長傾向を認め、R on T 型 PVC と TdP が 5 例中 1 例に出現した。高用量 3 mg/kg では著明な QT 間隔と MAP₉₀ の延長を認め、R on T 型 PVC は 5 例中 4 例に、TdP は 5 例中 2 例に出現した。

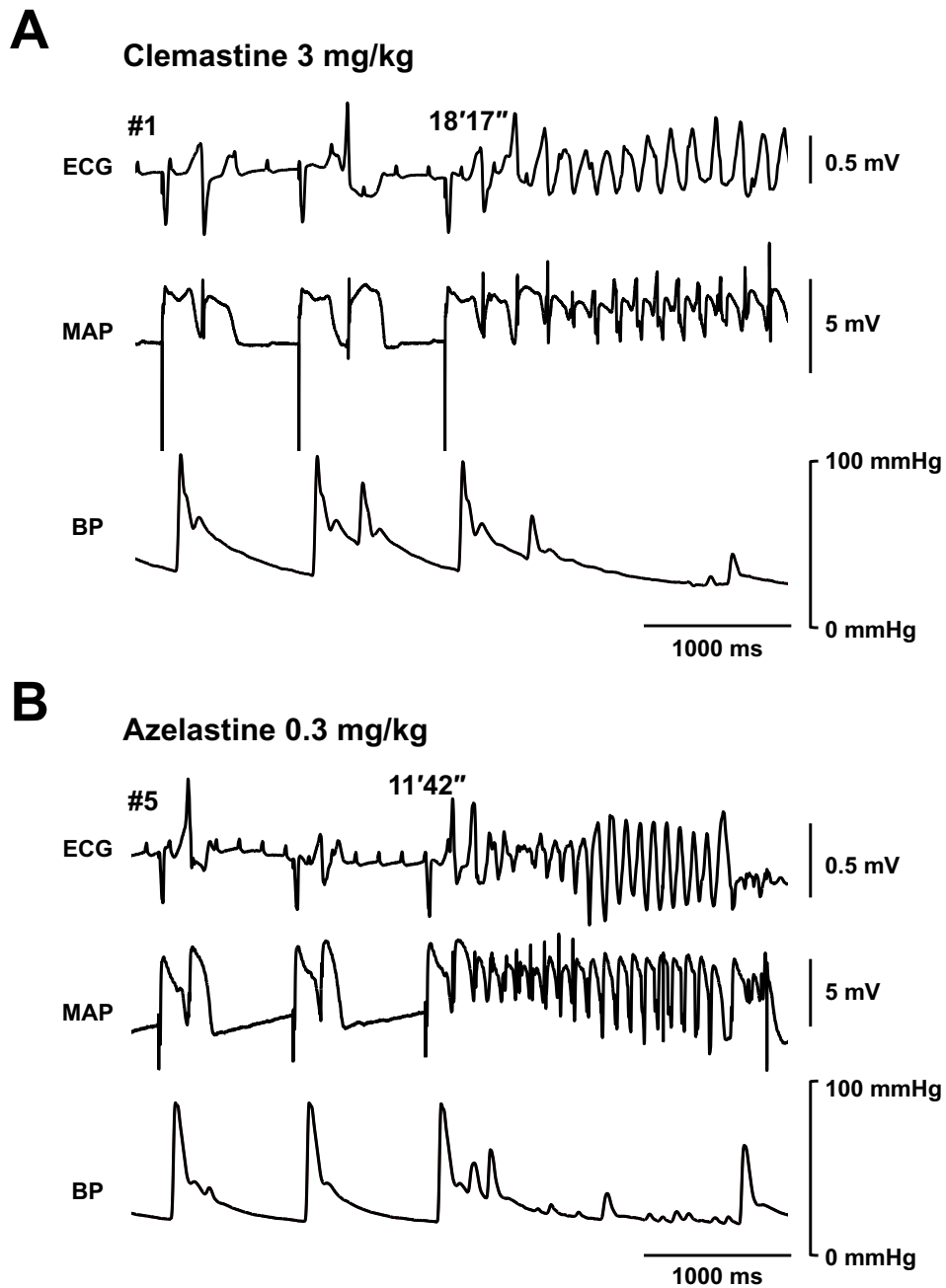


Figure 1-1. Clemastine および azelastine により誘発された不整脈の典型例
 (A) #1 の個体で clemastine 3 mg/kg 投与開始時から 18 分 17 秒後に発生した不整脈の心電図 (ECG)、単相性活動電位 (MAP)、血圧 (BP) の波形を示す。(B) #5 の個体で azelastine 0.3 mg/kg 投与開始時から 11 分 42 秒後に発生した不整脈の ECG、MAP、BP の波形を示す。

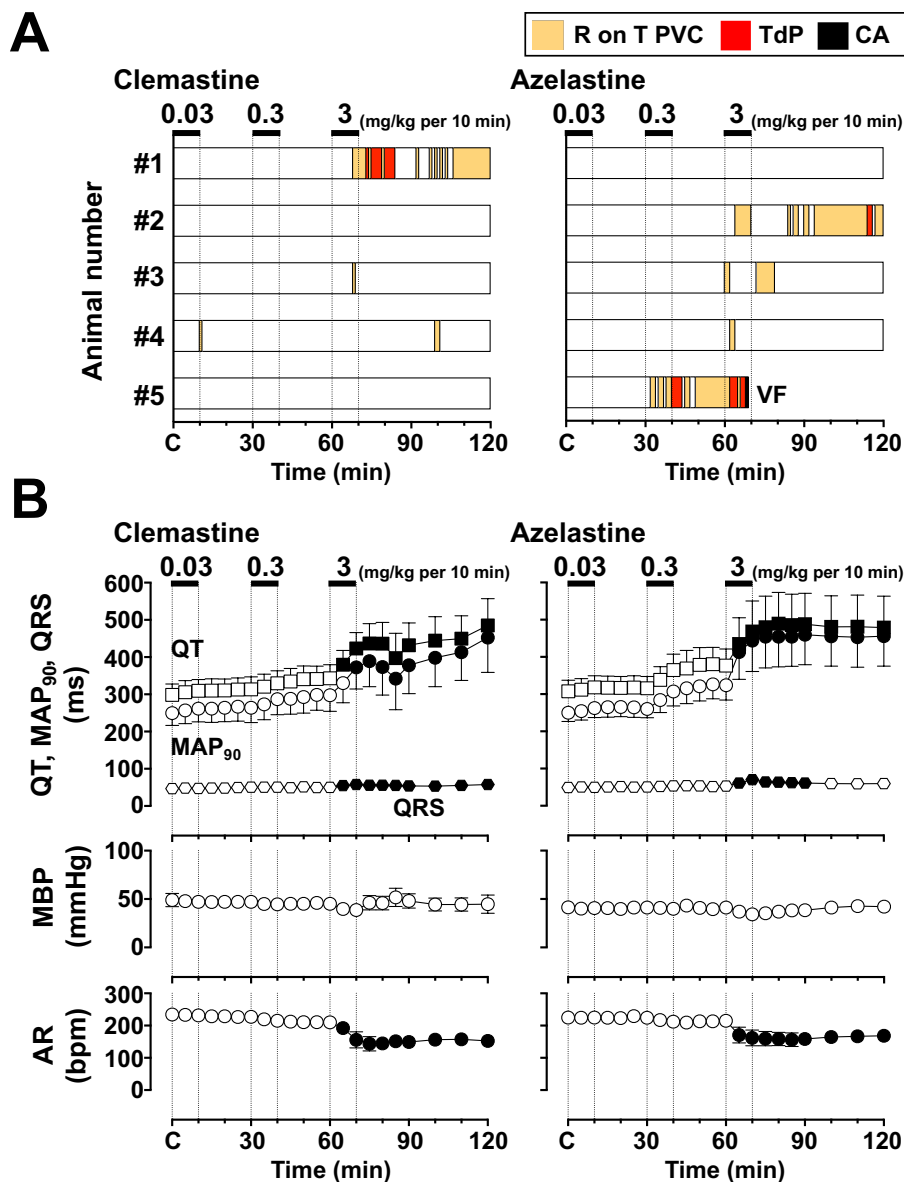


Figure 1-2. Clemastine (左、n=5) および azelastine (右、n=5) の催不整脈作用
 (A) 不整脈発生の時間経過を個体別に示す。オレンジ色のカラムは R on T 型心室期外収縮 (PVC) を、赤色のカラムは torsade de pointes (TdP) の発生している時間帯を示す。黒色のカラムは心停止 (cardiac arrest; CA) し、死亡したことを示す。Azelastine 投与群の #5 では TdP が心室細動 (VF) に移行し CA となったことを示す。Clemastine 高用量の投与により短時間の TdP (<10 秒) が 5 回、長時間の TdP (≥10 秒) が 2 回発生した。Azelastine 中用量の投与により短時間の TdP が 7 回発生し、高用量の投与により短時間の TdP が 10 回、長時間の TdP が 2 回発生した。(B) QT 間隔、MAP 持続時間 (MAP₉₀)、平均血圧 (MBP) および心房拍動数 (AR) の時間経過を示す。Clemastine 投与群の薬物投与前 (control; C) における QT 間隔、MAP₉₀、QRS、MBP および AR の値は、それぞれ 304±29 ms, 251±33 ms, 48±3 ms, 47±7 mmHg, 234±11 beats/min であり、azelastine 投与群ではそれぞれ 308±30 ms, 250±23 ms, 49±2 ms, 41±3 mmHg, 225±14 beats/min であった。Clemastine 投与群では、0.03, 0.3 および 3 mg/kg の投与における MAP₉₀ の最大変化量 (MAP₉₀ 最大延長時の値と control 値の差) は、それぞれ+19±7, +53±11 および+174±50 ms であった。Azelastine 投与群では、0.03, 0.3 および 3 mg/kg の投与における MAP₉₀ の最大変化量は、それぞれ+18±5, +78±21 および+214±58 ms であった。データは mean ± S.E.M. で示す。Closed symbol は各群の C 値と比較したときの有意差を示す ($p < 0.05$)。

ウサギ催不整脈モデルにおける hydroxyzine および diphenhydramine の催不整脈作用

Hydroxyzine 投与群において、低用量 0.1 mg/kg では MAP₉₀ に有意な延長は認められず、R on T 型 PVC の発生も認められなかった (Figure 1-3)。中用量 1 mg/kg 投与後、QT 間隔と MAP₉₀ は有意に延長した。R on T 型 PVC の出現は 5 例中 1 例に認められた。高用量 10 mg/kg ではさらなる QT 間隔と MAP₉₀ の延長を認めたものの、R on T 型 PVC および TdP の発生は認められなかった。

Diphenhydramine 投与群において、低用量 0.1 mg/kg では MAP₉₀ に有意な延長は認められず、R on T 型 PVC の発生も認められなかった (Figure 1-3)。中用量 1 mg/kg 投与後、QT 間隔と MAP₉₀ は有意に延長した。R on T 型 PVC の出現は 5 例中 1 例に認められた。高用量 10 mg/kg ではさらなる QT 間隔と MAP₉₀ の延長が認められ、R on T 型 PVC の出現は 5 例中 1 例に認められたものの、TdP の発生は認められなかった。

再分極時間の時間的ばらつきに対する抗ヒスタミン薬の作用

Figure 1-4 に clemastine, azelastine, hydroxyzine および diphenhydramine の再分極時間の時間的ばらつきに対する作用の典型例を Poincaré plots で示し、Table 1-2 にその作用をまとめた。Clemastine および hydroxyzine の投与により、高用量で MAP₉₀ の延長とともに STV は有意に増大した。Azelastine の投与により MAP₉₀ の延長とともに STV は増大したが、統計的に有意な変化ではなかった。Diphenhydramine は中用量と高用量で MAP₉₀ を有意に延長させたが、STV には影響を与えなかった。

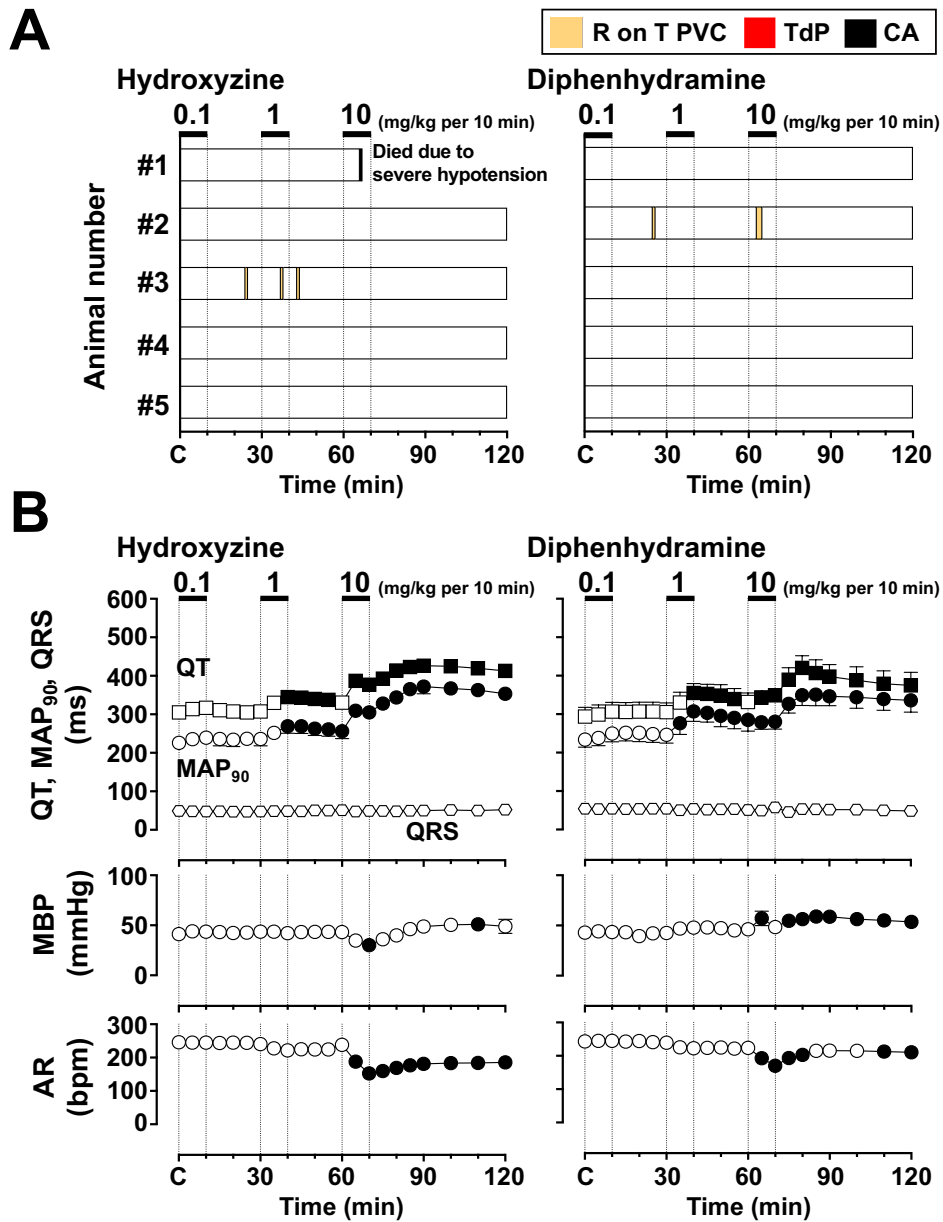


Figure 1-3. Hydroxyzine (左、n=5) および diphenhydramine (右、n=5) の催不整脈作用 (A) 不整脈発生の時間経過を個別別に示す。オレンジ色のカラムは R on T 型心室期外収縮 (PVC) を、赤色のカラムは torsade de pointes (TdP) の発生している時間帯を示す。黒色のカラムは心停止 (cardiac arrest; CA) し、死亡したことを示す。Hydroxyzine 投与群の #1 は重度低血圧により CA となったことを示す。(B) QT 間隔、MAP 持続時間 (MAP₉₀)、平均血圧 (MBP) および心房拍動数 (AR) の時間経過を示す。Hydroxyzine 投与群の薬物投与前 (control; C) における QT 間隔、MAP₉₀、QRS、MBP および AR の値は、それぞれ 305±14 ms, 226±15 ms, 49±5 ms, 41±4 mmHg, 246±7 beats/min であり、diphenhydramine 投与群ではそれぞれ 294±24 ms, 234±19 ms, 54±3 ms, 43±5 mmHg, 243±9 beats/min であった。Hydroxyzine 投与群では、0.1, 1 および 10 mg/kg の投与における MAP₉₀ の最大変化量 (MAP₉₀ 最大延長時の値と control 値の差) は、それぞれ+16±3, +47±6 および+148±6 ms であった。Diphenhydramine 投与群では、0.1, 1 および 10 mg/kg の投与における MAP₉₀ の最大変化量は、それぞれ+21±6, +75±10 および+127±9 ms であった。データは mean ± S.E.M. で示す。Closed symbol は各群の C 値と比較したときの有意差を示す (p < 0.05)。

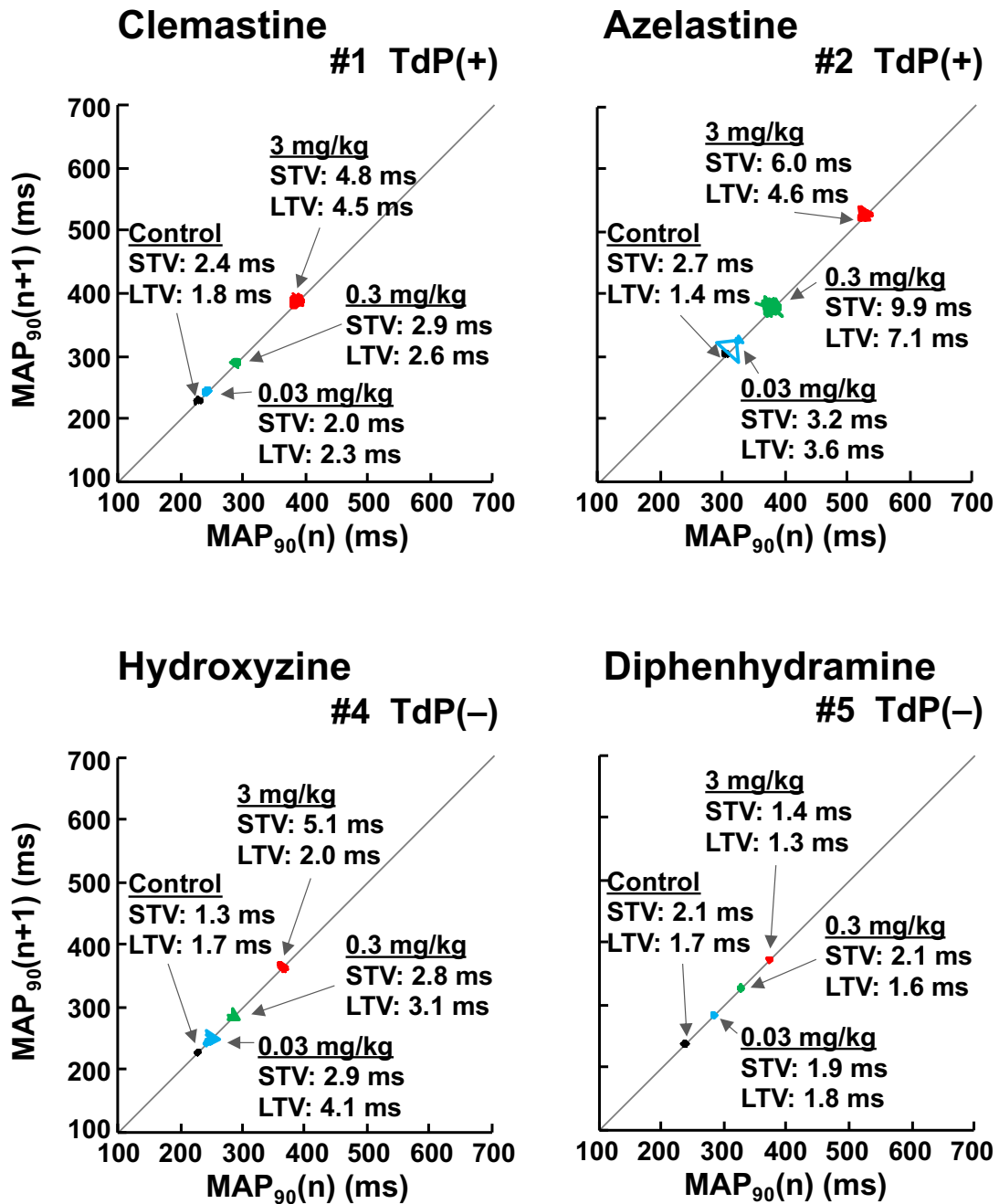


Figure 1-4. 心室再分極時間の時間的ばらつきに対する clemastine, azelastine, hydroxyzine および diphenhydramine の作用を示した Poincaré plots の典型例
 連続した 31 拍の MAP 持続時間 (MAP₉₀) を 4 箇所 (clemastine および azelastine 投与群では control と 0.03, 0.3 および 3 mg/kg、hydroxyzine および diphenhydramine 投与群では control と 0.1, 1 および 10 mg/kg) で計測しプロットした。STV; short-term variability, LTV; long-term variability, TdP(+); torsade de pointes (TdP) が発生した個体, TdP(-); TdP が発生しなかった個体

Table 1-2. 抗ヒスタミン薬の心室再分極時間の時間的ばらつきに対する作用

Clemastine (mg/kg)	Control	0.03	0.3	3
STV (ms)	3.1±0.4	3.2±0.7	4.2±0.6	9.1±1.9*
LTV (ms)	2.4±0.3	3.0±0.9	3.1±0.3	6.5±2.2
MAP ₉₀ (ms)	258±33	265±37	302±43	398±77*
Azelastine (mg/kg)	Control	0.03	0.3	3
STV (ms)	2.6±0.5	3.6±1.1	4.8±1.4	5.5±1.6
LTV (ms)	3.2±1.0	3.7±1.1	6.5±2.2	5.6±1.5
MAP ₉₀ (ms)	245±21	268±27	328±38	469±84**
Hydroxyzine (mg/kg)	Control	0.1	1	10
STV (ms)	2.3±0.8	3.4±1.0	2.6±0.2	4.5±0.6*
LTV (ms)	2.4±0.7	3.6±1.0	2.4±0.4	3.1±0.7
MAP ₉₀ (ms)	224±17	240±17*	272±17**	368±16**
Diphenhydramine (mg/kg)	Control	0.1	1	10
STV (ms)	2.3±0.2	2.7±0.5	2.4±0.4	2.3±0.3
LTV (ms)	2.7±0.4	3.1±0.7	2.1±0.2	2.0±0.3
MAP ₉₀ (ms)	234±19	250±21	310±26**	356±29**

STV; short-term variability, LTV; long-term variability, MAP₉₀; MAP 持続時間のデータを mean±S.E.M. (n=5) で示す。アスタリスクは各群の control 値と比較したときの有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

1-4 考察

Clemastine と azelastine は QT 間隔延長作用出現とともに TdP を誘発する薬物である一方で、hydroxyzine と diphenhydramine は QT 間隔延長時においても TdP を誘発しにくい薬物であることがウサギ催不整脈モデルを用いた検討により明確となった。

1-4-1 用量設定

アレルギー疾患に対する clemastine と azelastine の臨床用量はどちらも 1 日あたり 2 mg (≈ 0.03 mg/kg) を服用することから、本研究で用いた投与量は臨床相当用量 (0.03 mg/kg) から過剰用量 (3 mg/kg) の範囲にあると考えられる。

アレルギー疾患に対する hydroxyzine と diphenhydramine の臨床用量はそれぞれ 1 日あたり 50-75 mg と 30-50 mg であり、どちらもおおよそ 1 mg/kg を服用することから、本研究の投与量は臨床相当用量未満 (0.1 mg/kg) から過剰用量 (10 mg/kg) の範囲にあると考えられる。

1-4-2 *In vivo* における clemastine と azelastine の心臓電気薬理学作用

Clemastine と azelastine による QT 間隔と MAP₉₀ の有意な延長は 3 mg/kg で認められ、0.3 mg/kg (臨床相当用量の 10 倍) においても 50 ms 以上の延長が認められた。また、既報の薬物動態学的パラメータ (32-34) より、0.3 mg/kg の投与終了時における clemastine および azelastine の血中濃度はそれぞれ 48-170 nM と 392 nM になることが推定された。一方、clemastine と azelastine の hERG K⁺チャネルに対する IC₅₀ はそれぞれ 12 nM と 11 nM と報告され (25,26)、III 群抗不整脈薬 dofetilide の hERG K⁺チャネル抑制作用 (IC₅₀=7 nM) と同等の力価を有することが知られている (35)。過去のウサギ催不整脈モデルを用いた同様の検討において、dofetilide は 0.001 mg/kg で MAP₉₀ を 48 ms (≈ 50 ms) 延長させた (14) のに対し、clemastine と azelastine の MAP₉₀ を 50 ms 延長させる用量はそれぞれ 0.27 mg/kg と 0.16 mg/kg と高用量を必要としたことから、薬物動態学的な要因により dofetilide と比較して clemastine と azelastine は生体心において再分極遅延作用を示しにくいと考えられた。

Figure 1-2 に示すように、clemastine は 3 mg/kg から、azelastine は 0.3 mg/kg から TdP を誘発させ、これらは QT 間隔延長作用が認められた投与量の 1-10 倍量であった。当研究室の過去の検討において dofetilide は QT 間隔延長作用が認められた投与量の 10 倍量 (0.01 mg/kg) で TdP を誘発したことから (14)、clemastine と azelastine は QT 間隔延長を来たせば dofetilide と同等の催不整脈特性を示す薬物であると考えられる。また、

TdP 誘発用量では TdP 発生の契機となる R on T 型 PVC を誘発したとともに、その前兆現象として知られる再分極時間の時間的ばらつきの増大を誘発し (Table 1-2)、dofetilide を含む TdP 誘発作用を示す hERG K⁺チャンネル抑制薬と同様の特性を示した (14,36)。興味深いことに、clemastine と azelastine はどちらも高用量で QRS 幅を延長させている (Figure 1-2)。Na⁺チャンネル阻害作用の出現により心室内伝導遅延が生じたと推察される現象である。TdP 発生に不可欠なリエントリーは伝導遅延および不応期短縮により誘発されやすいことから (37)、この clemastine と azelastine の伝導遅延作用が TdP 発生に対し促進的に寄与した可能性が考えられた。一般に Na⁺チャンネル阻害は不応期を延長させる作用も有するため、clemastine と azelastine により R on T 型 PVC が発生しても TdP が発生しなかった個体においては Na⁺チャンネル阻害によりリエントリー形成抑制という抗不整脈の方向に作用した可能性も含まれているかもしれない。以上を統合的に考察すると、clemastine と azelastine は hERG K⁺チャンネル抑制作用の出現により QT 間隔延長を来たせば TdP 誘発作用を示す特性を有する薬物であることが明らかとなった。

1-4-3 *In vivo* における hydroxyzine と diphenhydramine の心臓電気薬理学作用

Figure 1-3 に示すように、hydroxyzine と diphenhydramine は QT 間隔と MAP₉₀ の延長作用をいずれも 1 mg/kg から示し、臨床相当用量から QT 間隔延長作用を有する薬物であることが明らかとなった。また、既報の薬物動態学的パラメータより (38,39)、1 mg/kg の投与終了時における hydroxyzine と diphenhydramine の血中濃度はそれぞれ 391 nM と 226 nM になることが推定された。一方、hERG K⁺チャンネルに対する hydroxyzine と diphenhydramine の IC₅₀ はそれぞれ 160 nM と 2700 nM と報告され (29,30)、dofetilide (IC₅₀=7 nM) に比べて 1/20 および 1/400 程度の力価であった。本研究で、diphenhydramine が MAP₉₀ を 50 ms 延長させる用量は 0.51 mg/kg であったことから、dofetilide (MAP₉₀ を約 50 ms 延長させる用量は 0.001 mg/kg) に比べて 1/500 程度の力価であり、hERG K⁺チャンネルに対する IC₅₀ 値から推定された力価と概ね類似していた。この結果に基づくと、diphenhydramine の心臓組織移行性は dofenilide とほぼ同等と考えられた。一方、hydroxyzine が MAP₉₀ を 50 ms 延長させる用量は 1.11 mg/kg であり、dofetilide に比べて 1/1000 程度の力価だった。hERG K⁺チャンネルに対する IC₅₀ 値から推定された力価よりも小さく、hydroxyzine が dofenilide と同等の再分極遅延作用を示すためには高用量を要したことから、hydroxyzine の心臓組織移行性は dofenilide より低いと考えられた。

Figure 1-3 に示すように、hydroxyzine と diphenhydramine は QT 間隔延長作用を示す投与量 (1 mg/kg) の 10 倍量を投与しても、TdP は誘発されなかった。また、R on T 型 PVC の発生数が少なかったという実験結果に基づくと、hydroxyzine と diphenhydramine は QT 間隔延長作用を示しても TdP を誘発しにくい薬物に属すると考えられる。この点は、clemastine や azelastine と本質的に異なる作用であり、hydroxyzine と diphenhydramine に QT 間隔延長以降の TdP 発生過程において不整脈発生を抑制する薬理作用が潜在している可能性が想定された。Table 1-2 に示すように、hydroxyzine は再分極時間の時間的ばらつきを増大させた一方で、diphenhydramine は再分極時間の時間的ばらつきを増大させにくかったことから、それぞれの薬物に潜在が想定される薬理作用は異なる可能性がある。Hydroxyzine と diphenhydramine の hERG K⁺チャンネル以外の薬理作用は現時点で細胞レベルを含め文献報告はなされていない。当研究室の過去の検討において、hydroxyzine 10 mg/kg は PR 間隔と QRS 幅に影響を与えず、diphenhydramine 10 mg/kg はこれらの心電図パラメータを有意に延長させることが *in vivo* 麻酔モルモットを用いた実験で確認されている (30,31)。したがって、hydroxyzine は Na⁺チャンネルおよび L 型 Ca²⁺チャンネル阻害作用以外の薬理作用により不整脈発生を抑制したと考えられ、diphenhydramine は Na⁺チャンネルおよび L 型 Ca²⁺チャンネル阻害作用を示すことで不整脈発生抑制に寄与した可能性が推察された。

1-4-4 評価薬物の薬物性 QT 延長症候群誘発リスク評価

ウサギ催不整脈モデルにおいて、clemastine は臨床相当用量の 100 倍から、azelastine は臨床相当用量の 10 倍から TdP を誘発することが示された。臨床で薬物性 QT 延長症候群の発生が多数報告されている代表的な薬物である dofetilide は、同モデルにおいて臨床相当用量 (0.01 mg/kg) から TdP を誘発したため (14)、clemastine と azelastine の薬物性 QT 延長症候群誘発リスクは dofetilide と比べて高くないと考えられる。ただし、azelastine は心疾患を合併し QT 間隔が延長している患者に投与する際には容易な増量を避けるなどの注意が必要である。一方で、hydroxyzine や diphenhydramine は臨床相当用量の 10 倍を投与し QT 間隔延長作用を示しても TdP 誘発作用を示さなかったため、これらの薬物のリスクは dofetilide と比較すると低いと考えられる。現行の薬物性 QT 延長症候群の誘発リスク評価では hERG K⁺チャンネル抑制作用と QT 間隔延長作用を有する hydroxyzine や diphenhydramine はリスク陽性と判定されるが、実際には TdP 誘発作用を示さない点は大きな課題である。Hydroxyzine や diphenhydramine の結果より、QT

間隔延長作用は TdP 発生の十分条件とは限らないことが示唆され、リスクを高精度に予測するためには、TdP を誘発しやすい薬物と誘発しにくい薬物の薬理学的な側面を明らかにすることが不可欠と考えられた。

1-5 小括

ウサギ催不整脈モデルを用いた抗ヒスタミン薬の TdP 誘発作用の評価を通じ、QT 間隔延長は TdP 発生の必要条件であるが必ずしも十分条件とならないことが実験的に示された。hERG K⁺チャンネル抑制以外の薬理作用が薬物に潜在し、QT 間隔延長と TdP 誘発の関係性に影響を与えた可能性が考えられた。

第2章 薬物性QT延長症候群発生を修飾する作用の検討：L型Ca²⁺チャネル阻害、Na⁺/Ca²⁺交換機構阻害、および内向き整流性K⁺チャネル電流阻害による影響

2-1 序論

TdPの誘発性はhERG K⁺チャネル以外を標的とした薬理作用の介在により修飾されることが第1章で推定された。そこで、本章ではウサギ催不整脈モデルの活用により、hERG K⁺チャネル抑制を基盤としたTdPの発生過程を抑制または促進する薬理的な修飾作用を明らかにすることを目的に検討を進めた。

心筋組織では脱分極と再分極のサイクルにより細胞内の電位が変化している。Figure 2-1に示すように、心筋活動電位を形成するイオン電流には、Na⁺チャネル電流 (I_{Na}) やL型Ca²⁺チャネル電流 (I_{CaL})、Na⁺/Ca²⁺交換機構 (Na⁺/Ca²⁺ exchanger; NCX) 電流 (I_{NCX}) などの内向き電流や、hERG K⁺チャネルにより生じる遅延整流性K⁺チャネル電流の急速活性化成分 (I_{Kr}) 以外にも、一過性外向きK⁺チャネル電流 (I_{to}) や遅延整流性K⁺チャネル電流の緩徐活性化成分 (I_{Ks})、内向き整流性K⁺チャネル電流 (I_{K1}) などの外向き電流が存在する。これらのイオン電流の増減が再分極時間に影響を与える要因になることから、薬物性QT延長症候群を修飾する薬理作用の研究対象としてイオン電流の種類に焦点を当てることとした。この検討に際し、Romano-Ward症候群を参考にした。先天性QT延長症候群(LQTS)では上記のイオン輸送体に先天的な異常が生じ、心電図QT間隔が延長しTdPが発生することが知られている。Romano-Ward症候群はLQTSを原因遺伝子別に分類したものであり、Table 2-1に示すように、現時点で15種類のタイプが特定されている(8)。LQT4ではNCXに、LQT7では I_{K1} チャネルに、LQT8, 14, 15ではL型Ca²⁺チャネルにそれぞれ異常をきたしTdPが発生することが知られている。これらは細胞内Ca²⁺動態の調節や静止膜電位の維持に関わる機構として知られており、それぞれ阻害薬の存在が知られているため、薬物性QT延長症候群発生を修飾する作用を薬理的に検討可能である。本章では、L型Ca²⁺チャネル、NCX、 I_{K1} チャネルを研究対象とし、それらに対する阻害薬がhERG K⁺チャネル抑制によるTdP誘発性に及ぼす影響を、ウサギ催不整脈モデルを用いて検討した。

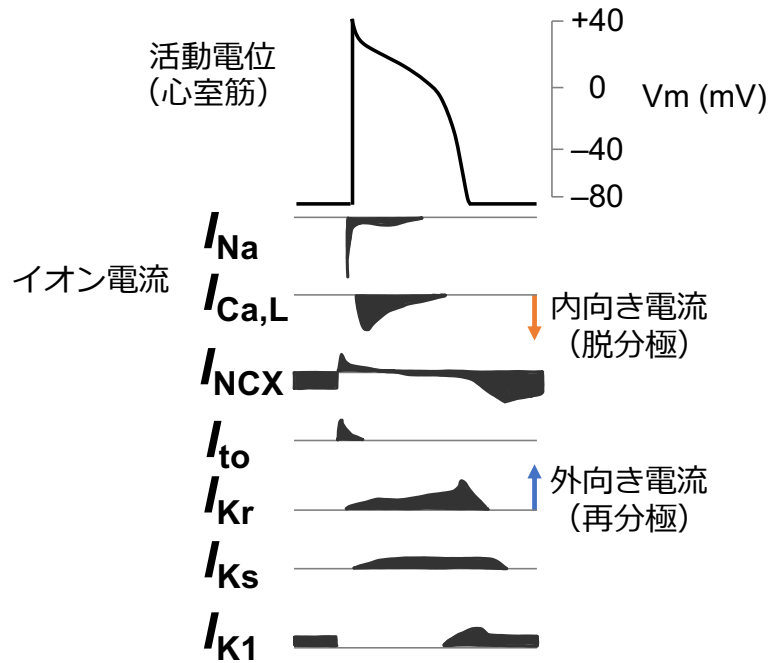


Figure 2-1. 活動電位とイオン電流 (参考文献 40 を参考に作図)

Table 2-1. Romano-Ward 症候群の分類

分類	原因遺伝子	影響される電流とその変化
LQT1	<i>KCNQ1</i>	I_{Ks} 減少
LQT2	<i>KCNH2</i>	I_{Kr} 減少
LQT3	<i>SCN5A</i>	I_{Na} 増加
LQT4	<i>ANK2</i>	I_{NCX} , $I_{Na-K ATPase}$
LQT5	<i>KCNE1</i>	I_{Ks} 減少
LQT6	<i>KCNE2</i>	I_{Kr} 減少
LQT7	<i>KCNJ2</i>	I_{K1} 減少
LQT8	<i>CACNA1C</i>	I_{CaL} 増加
LQT9	<i>CAV3</i>	I_{Na} 増加
LQT10	<i>SCN4B</i>	I_{Na} 増加
LQT11	<i>AKAP9</i>	I_{Ks} 減少
LQT12	<i>SNTA1</i>	I_{Na} 増加
LQT13	<i>KCNJ5</i>	I_{KACh} 減少
LQT14	<i>CALM1</i>	I_{CaL} 増加
LQT15	<i>CALM2</i>	I_{CaL} 増加

2-2 薬物性 QT 延長症候群発生を修飾する作用の検討：L 型 Ca^{2+} チャネル阻害と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害による影響

2-2-1 実験材料および方法

使用動物

実験方法に記した完全房室ブロックウサギを用い、60 beats/min で右心室ペーシングを施した。

使用薬物

L 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬 verapamil (富士フィルム和光純薬) は生理食塩水を用いて溶解および希釈し、0.01 mg/kg/min の投与量を 0.2 mL/kg/min の投与速度で静脈内持続注入した。Verapamil の投与は左耳介静脈に留置したサーフロー®留置針を介し、シリンジポンプを用いて行った。

NCX 阻害薬 SEA0400 (MedChemExpress) は dimethyl sulfoxide に 160 mg/mL の濃度で溶解させ、静注用脂肪乳剤 (イントラリポス®輸液 10%, 大塚製薬) を用いて希釈し (41)、0.16 mg/kg/min の投与量を 0.1 mL/kg/min の投与速度で静脈内持続注入した。SEA0400 の投与は左耳介静脈に留置したサーフロー®留置針を介し、シリンジポンプを用いて行った。

hERG K^+ チャネル抑制薬 dofetilide (SIGMA) は 10 mM の HCl を用いて溶解および希釈して使用した。Dofetilide は 0.025 mg/kg の投与量を 0.1 mL/kg/min の投与速度で静脈内持続注入した。Dofetilide の投与は左大腿静脈に留置したシースを介し、シリンジポンプを用いて行った。

試験プロトコール (Figure 2-2)

薬物投与群としてそれぞれ未処置群 (n=5)、Verapamil 処置群 (n=5)、SEA0400 処置群 (n=5) の 3 群に分けた。

未処置群では、血行動態が安定したのちに、生理食塩水投与前 (Baseline) のデータを記録後、生理食塩水 (0.2 mL/kg/min) の 50 分間の静脈内持続投与を開始した。生理食塩水投与開始後 20 分の時点 (C; control) のデータを記録後、dofetilide (0.025 mg/kg) を 10 分かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25 および 30 分の時点で、心電図、血圧、MAP の測定を行った。

Verapamil 処置群では、血行動態が安定したのちに、verapamil 投与前 (Baseline) のデータを記録後、verapamil の 50 分間の静脈内持続投与を開始した。Verapamil 投与開始後 20 分の時点 (C; control) のデータを記録後、dofetilide (0.025 mg/kg) を 10 分かけて静脈内投与し、未処置群と同様に記録した。

SEA0400 処置群では、血行動態が安定したのちに、SEA0400 投与前 (Baseline) のデータを記録後、SEA0400 の 50 分間の静脈内持続投与を開始した。SEA0400 投与開始後 20 分の時点 (C; control) のデータを記録後、dofetilide (0.025 mg/kg) を 10 分かけて静脈内投与し、未処置個体と同様に記録した。

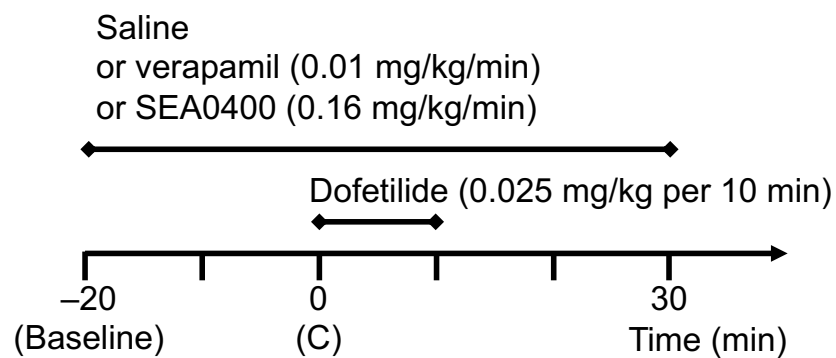


Figure 2-2. プロトコール図

2-2-2 結果

Verapamil と SEA0400 の心血管作用のまとめを Table 2-2 に示す。生理食塩水投与後、血圧と心房拍動数は有意に低下した。QT 間隔および MAP₉₀ は僅かに延長した。Verapamil の投与後、血圧と心房拍動数は有意に低下し、QT 間隔および MAP₉₀ は短縮した。SEA0400 投与後、血圧に変化は認められなかったが心房拍動数は有意に低下した。QT 間隔および MAP₉₀ は有意に短縮した。STV と LTV は生理食塩水、verapamil、SEA0400 のいずれによっても有意な変化は認められなかった。

Table 2-2. Verapamil と SEA0400 の心血管系に対する作用

	Saline		Verapamil		SEA0400	
	Baseline	Post	Baseline	Post	Baseline	Post
MBP (mmHg)	42±8	40±9*	39±3	29±3**	37±1	36±1
Atrial rate (bpm)	247±15	237±16*	250±11	220±14**	276±7	259±7*
QT interval (ms)	255±15	261±14	263±13	248±14*	260±18	220±16**
MAP ₉₀ (ms)	211±14	222±13*	212±7	199±8	221±18	179±17*
STV (ms)	2.2±0.2	2.9±0.4	2.0±0.3	1.7±0.3	3.4±0.8	2.6±0.7
LTV (ms)	1.8±0.3	2.3±0.2	1.7±0.1	1.3±0.3	2.2±0.6	2.5±0.4

Verapamil と SEA0400 の投与前 (Baseline) と投与開始から 20 分後 (Post) の MBP; 平均血圧, 心房拍動数, QT 間隔, MAP₉₀; MAP 持続時間, STV; short-term variability, LTV; long-term variability を mean±S.E.M. (n=5) で示し、アスタリスクは各群の Baseline 値と比較したときの有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

Verapamil と SEA0400 が dofetilide の催不整脈作用に与える影響

Dofetilide 投与時の典型波形を Figure 2-3A に示す。未処置群の個体において dofetilide による TdP は、R on T 型 PVC を契機として誘発された。Dofetilide 投与後の不整脈発生の時間経過を Figure 2-3B に示す。未処置群では、dofetilide 投与後に EAD の発生は全例に認め、R on T 型 PVC と TdP の発生はどちらも 5 例中 4 例に認められた。Verapamil 処置群では、dofetilide 投与後に EAD 発生は 5 例中 2 例に、R on T 型 PVC の発生は 5 例中 1 例に認められたものの、TdP の発生は認められなかった。SEA0400 処置群では、dofetilide 投与後に EAD 発生は全例に認められ、R on T 型 PVC と TdP の発生はそれぞれ 5 例中 3 例と 2 例に認められた。

Dofetilide 投与後に得られた MAP の典型波形を Figure 2-4A に示し、電気生理学的および血行動態パラメータに対する作用の時間経過を Figure 2-4B に示す。未処置群では、QT 間隔は dofetilide 投与後 15 分において有意に延長した。Verapamil 処置群では、QT 間隔および MAP₉₀ は dofetilide 投与後 5 分から 30 分にかけて有意に延長した。SEA0400 処置群では、QT 間隔および MAP₉₀ は dofetilide 投与後 5 分から 30 分にかけて有意に延長した。Dofetilide 投与後の MAP₉₀ の延長の程度 (Δ MAP₉₀) は、統計学的な有意差は認められなかったが verapamil 処置群で小さい傾向を示した。一方で、SEA0400 処置群における Δ MAP₉₀ は未処置群と同等であった。

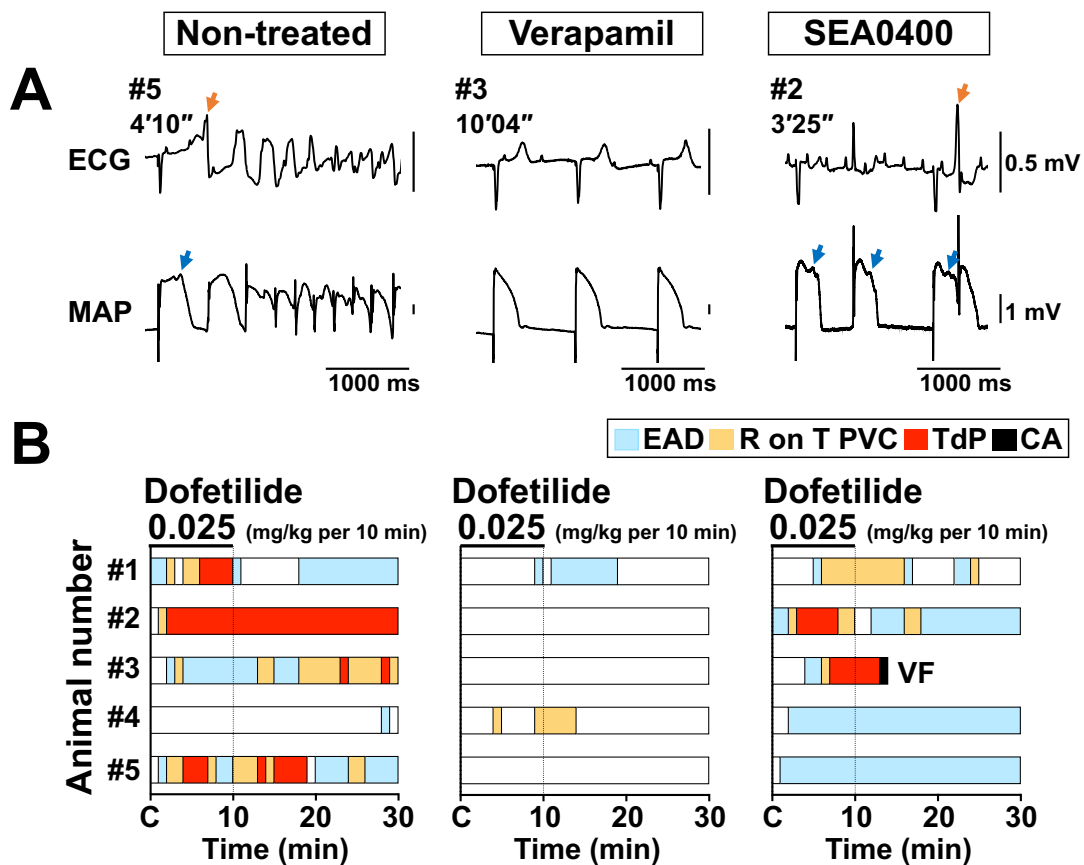


Figure 2-3. Dofetilide の催不整脈作用に対する verapamil と SEA0400 の作用

(A) Dofetilide 投与後に得られた心電図 (ECG) と単相性活動電位 (MAP) の典型波形を示す。青色とオレンジ色の矢印はそれぞれ早期後脱分極 (EAD) と R on T 型心室期外収縮 (PVC) を示している。#5 の未処置個体 (左) では、dofetilide 0.025 mg/kg 投与開始から 4 分 10 秒後に torsade de pointes (TdP) が発生し、139 秒間持続した。#3 の verapamil 処置個体 (中央) では、EAD と R on T 型 PVC の発生は認められなかった。一方で、#2 の SEA0400 処置個体 (右) では、dofetilide 投与後 EAD と R on T 型 PVC の発生が認められた。(B) 不整脈発生の時間経過を個体別に示す。青色のカラムは EAD の発生を、オレンジ色のカラムは R on T 型 PVC を、赤色のカラムは TdP の発生している時間帯を示す。黒色のカラムは心停止 (cardiac arrest; CA) し、死亡したことを示す。SEA0400 処置群の CA は心室細動 (VF) を原因とした。未処置群 (左) では、dofetilide の投与後 R on T 型 PVC が 7.1 ± 3.3 回/分発生し、短時間の TdP (<10 秒) が 547 回、長時間の TdP (≥ 10 秒) が 3 回発生した。Verapamil 処置群 (中央) では、dofetilide の投与後 R on T 型 PVC が 0.2 ± 0.2 回/分発生したが、TdP の発生は認められなかった。SEA0400 処置群 (右) では、dofetilide の投与後 R on T 型 PVC が 2.1 ± 1.0 回/分発生し、短時間の TdP が 9 回、長時間の TdP が 3 回発生した。

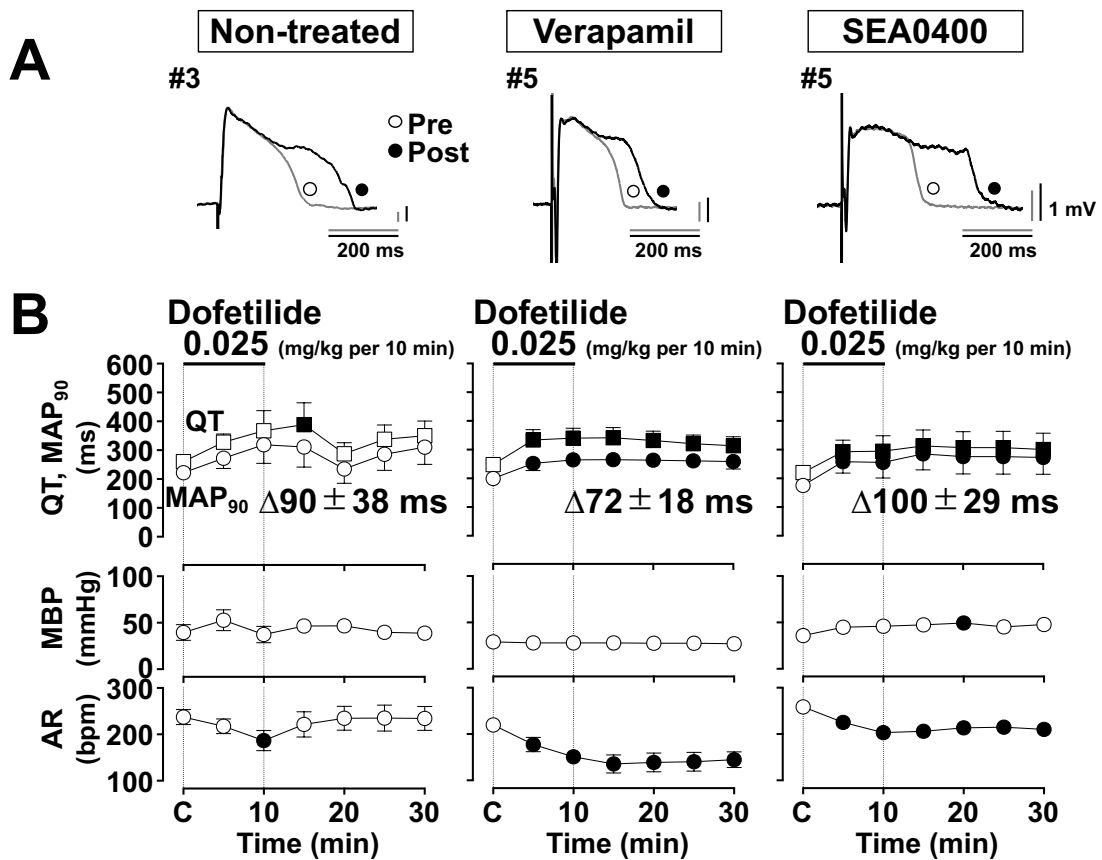


Figure 2-4. Dofetilide の心臓電気生理学作用に対する verapamil と SEA0400 の作用
 (A) 未処置個体 (左)、verapamil 処置個体 (中央) および SEA0400 処置個体 (右) において dofetilide 0.025 mg/kg 投与後に右心室から測定され得られた単相性活動電位 (MAP) の典型波形を示す。(B) QT 間隔、MAP 持続時間 (MAP₉₀)、平均血圧 (MBP) および心房拍動数 (AR) の時間経過を示す。未処置群 (左、n=5) の薬物投与前 (control; C) における QT 間隔、MAP₉₀、MBP および AR の値は、Table 2-2 にまとめた (Post)。#2 の個体では torsade de pointes (TdP) が頻回に発生したため、dofetilide 投与開始後 10 分から 30 分の QT 間隔、MAP₉₀、MBP は 4 例の平均を示す。Verapamil 処置群 (中央、n=5) と SEA0400 処置群 (右、n=5) の薬物投与前 (control; C) における QT 間隔、MAP₉₀、MBP および AR の値は、Table 2-2 にまとめた (Post)。SEA0400 処置群の #3 の個体は dofetilide 投与開始後 12 分 16 秒後に TdP が心室細動に移行し死亡したため、dofetilide 投与開始後 10 分から 30 分値は 4 例の平均を示す。MAP₉₀ の最大変化量 (ΔMAP₉₀; MAP₉₀ 最大延長時の値と control 値の差) は、図中上段に示した。データは mean ± S.E.M. で示す。Closed symbol は各群の C 値と比較したときの有意差を示す ($p < 0.05$)。

心室再分極時間の時間的ばらつきに対する verapamil と SEA0400 の作用

Figure 2-5 に dofetilide の再分極時間の時間的ばらつきに対する作用の典型例を Poincaré plots で示し、Table 2-3 にその作用をまとめた。未処置群において dofetilide は MAP₉₀を延長させるとともに STV を増大させた。Verapamil 処置群においても dofetilide は STV を僅かに増大させたが、その程度は未処置群と比べると小さかった。SEA0400 処置群においても dofetilide は STV を増大させ、その程度は未処置群と同等であった。

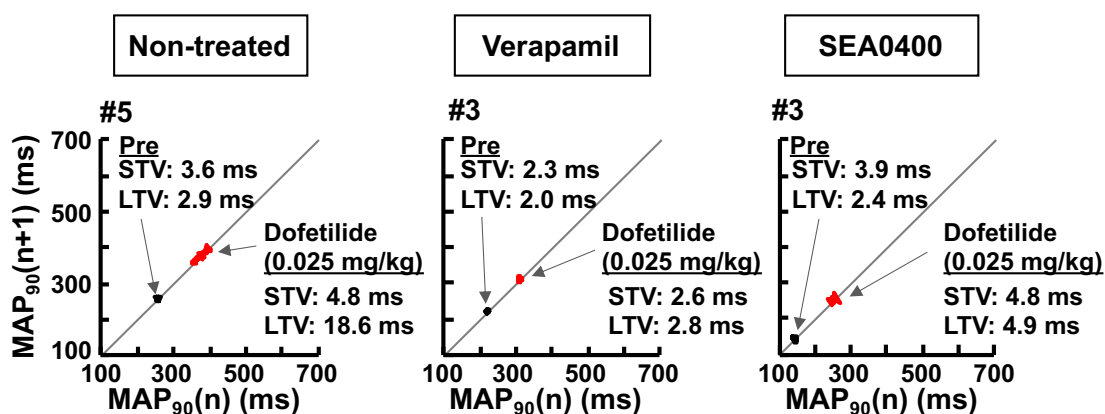


Figure 2-5. Dofetilide により生じた心室再分極時間の時間的ばらつきに対する verapamil と SEA0400 の作用を示した Poincaré plots の典型例
連続した 31 拍の MAP 持続時間 (MAP₉₀) を 2 箇所 (control と dofetilide 投与後) で計測しプロットした。STV; short-term variability, LTV; long-term variability

Table 2-3. Dofetilide により生じた心室再分極時間の時間的ばらつきに対する verapamil と SEA0400 の作用

	Non-treated		Verapamil		SEA0400	
	Before	After	Before	After	Before	After
Dofetilide						
STV (ms)	2.9±0.4	4.0±1.0	1.7±0.3	2.4±0.5	2.6±0.7	4.3±0.7
LTV (ms)	2.3±0.2	9.6±3.5	1.3±0.3	2.6±0.5	2.5±0.4	6.3±1.7*
MAP ₉₀ (ms)	225±12	281±43	203±6	271±21**	177±20	259±48*

STV; short-term variability, LTV; long-term variability, MAP₉₀; MAP 持続時間のデータを mean±S.E.M. (n=5) で示す。アスタリスクは各群の dofetilide 投与前と比較したときの有意差を示す (*p<0.05)。

2-3 薬物性 QT 延長症候群発生を修飾する作用の検討： I_{K1} 阻害による影響

2-3-1 実験材料および方法

使用動物

実験方法に記した完全房室ブロックウサギを用い、60 beats/min で右心室ペーシングを施した。

使用薬物

Dofetilide (SIGMA) は 10 mM の HCl を用いて溶解希釈した。 I_{K1} 阻害は dofetilide の催不整脈性に対し増強作用を示すことが予測されたため、本実験では 2-2 の実験で用いた投与量 (0.025 mg/kg) より低用量から投与を開始した。左大腿静脈に留置したシースを介し、シリンジポンプを用いて、dofetilide 0.005, 0.025 mg/kg の投与量を 0.1 mL/kg/min の投与速度で 10 分かけて静脈内持続注入した。

I_{K1} 阻害薬 BaCl₂ (Alfa Aesar) は精製水を用いて溶解および希釈し、0.1 mg/kg/min を 1 mL/kg/h で静脈内持続注入した。BaCl₂ の投与は左耳介静脈に留置したサーフロー®留置針を介し、シリンジポンプを用いて行った。

試験プロトコール (Figure 2-6)

薬物投与群としてそれぞれ未処置群 (n=5)、BaCl₂ 処置群 (n=5) の 2 群に分けた。未処置群では血行動態が安定したのちに、BaCl₂ の溶媒である精製水 (Vehicle) の投与前 (Baseline) のデータを記録後、Vehicle の静脈内持続投与を開始した。Vehicle 投与開始後 20 分の時点 (C; control) のデータを記録後、dofetilide 低用量 (0.005 mg/kg) を 10 分かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25 および 30 分の時点で、心電図、血圧、MAP の測定を行った。続けて dofetilide 高用量 (0.025 mg/kg) を 10 分かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 および 60 分の時点で同様に測定した。BaCl₂ 処置群では血行動態が安定したのちに、BaCl₂ 投与前 (Baseline) のデータを記録後、BaCl₂ (0.1 mg/kg/min) の静脈内持続投与を開始した。BaCl₂ 投与開始後心電図および MAP の変化が安定するまで 20 分以上の時間を要し、変化が安定した時点 (C; control) でデータを記録した後、未処置群と同様のプロトコールで dofetilide を投与した。

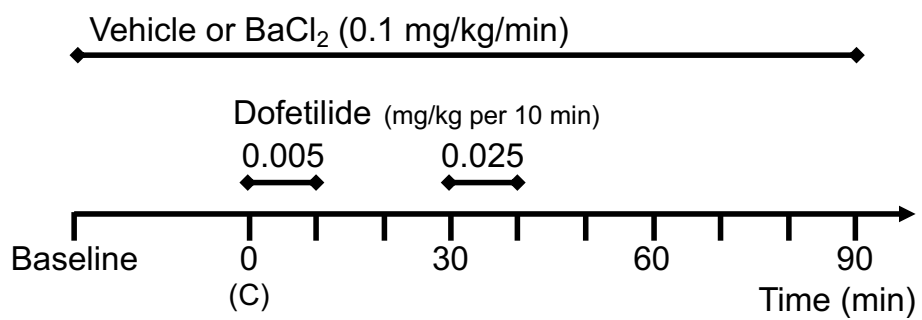


Figure 2-6. プロトコール図

2-3-2 結果

Vehicle および BaCl₂ の心血管作用のまとめを Table 2-4 に示す。Vehicle 投与後、血圧、心房拍動数および QRS 幅に影響は認められなかった。MAP₉₀ は僅かではあるが、有意に延長した。STV および LTV に影響は認められなかった。BaCl₂ 投与後、心房拍動数と QRS 幅に影響は認められなかったが、血圧上昇とともに QT 間隔および MAP₉₀ が有意に延長した。STV および LTV は上昇した。

Table 2-4. 溶媒と BaCl₂ の心血管系に対する作用

		Vehicle		BaCl ₂	
		Baseline	Post	Baseline	Post
MBP	(mmHg)	41±4	44±6	34±2	47±1**
Atrial rate	(bpm)	258±14	257±16	258±6	252±3
QRS	(ms)	56±4	58±4	57±1	59±3
QT interval	(ms)	264±14	273±14	278±23	374±15**
MAP ₉₀	(ms)	203±10	218±10*	221±19	327±17**
STV	(ms)	2.6±0.9	2.3±0.3	1.4±0.3	3.2±0.5*
LTV	(ms)	2.2±0.7	2.5±0.5	1.5±0.4	3.8±1.0

溶媒もしくは BaCl₂ の投与前の時点 (Baseline) および、投与開始から心電図指標と MAP₉₀ (MAP 持続時間) の変化が安定した時点での MBP; 平均血圧, 心房拍動数, QT 間隔, MAP₉₀, STV; short-term variability, LTV; long-term variability を mean±S.E.M. (n=5) で示す。アスタリスクは各群の Baseline 値と比較したときの有意差を示す (**p*< 0.05, ***p*< 0.01)。

BaCl₂ が dofetilide の催不整脈作用に与える影響

BaCl₂ 処置群において、dofetilide 高用量 0.025 mg/kg 投与時に発生した TdP の典型波形を Figure 2-7 に示す。Dofetilide 投与後の不整脈発生の時間経過を Figure 2-8A に示す。未処置群において、dofetilide 低用量 0.005 mg/kg 投与後、R on T 型 PVC の発生は 5 例中 3 例に認められ、TdP の発生は 5 例中 2 例に認められ、そのうち 1 例は心室細動に移行して死亡した。Dofetilide 高用量投与後、R on T 型 PVC の発生は 4 例中 2 例に認められ、TdP の発生は 4 例中 1 例に認められた。BaCl₂ 処置群では、dofetilide 低用量投与後、R on T 型 PVC の発生は 5 例中 4 例に認められ、TdP の発生は 5 例中 2 例に認められ、そのうち 1 例は TdP が停止した後に無脈性電気活動 (pulseless electrical activity; PEA) となり死亡した。Dofetilide 高用量投与後、R on T 型 PVC と TdP の発生はどちらも 4 例全例に認められ、そのうち 3 例は TdP が停止した後に PEA となり死亡した。

Dofetilide の電気生理学的および血行動態パラメータに対する作用の時間経過を Figure 2-8B に示す。未処置群では、QT 間隔および MAP₉₀ は dofetilide により用量依存性に延長した。心房拍動数は dofetilide により低下した一方で、平均血圧は上昇した。BaCl₂ 処置群においても、dofetilide 低用量の投与後 QT 間隔および MAP₉₀ の延長、心房拍動数の低下、平均血圧の上昇が同様に認められた。一方、高用量投与後一時的に QT 間隔および MAP₉₀ の延長が認められたが、不整脈が頻回に発生し、QT 間隔および MAP₉₀ は短縮した。BaCl₂ 処置群における dofetilide 低用量による MAP₉₀ の延長の程度 (Δ MAP₉₀) は未処置群と比較すると小さかった。

BaCl₂-treated animal

Dofetilide 0.025 mg/kg

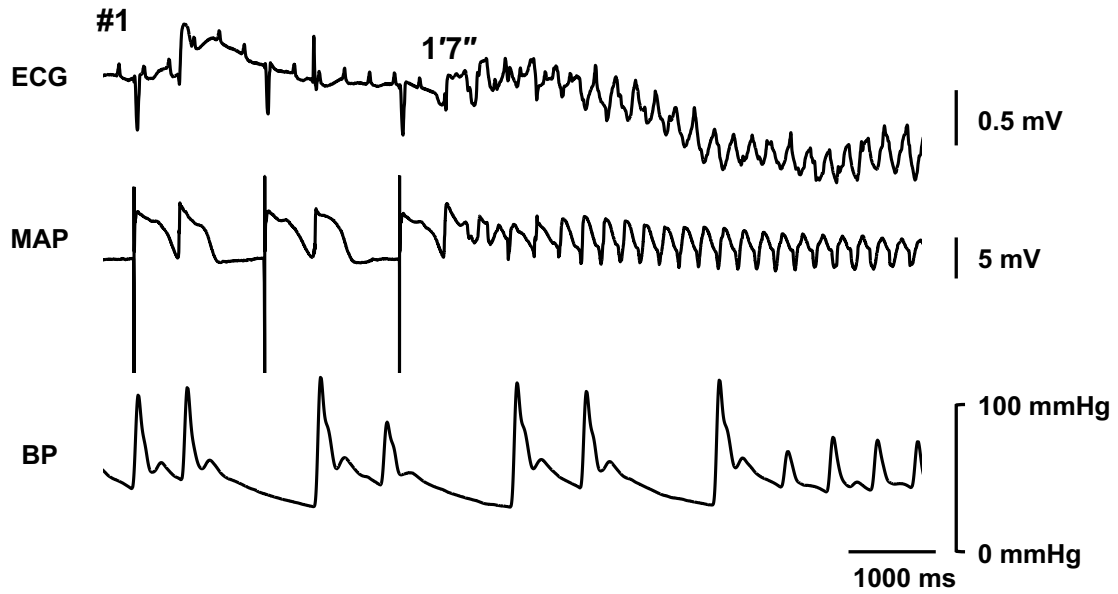


Figure 2-7. BaCl₂ 処置個体 (#1) において dofetilide により誘発された不整脈の典型例
Dofetilide 0.025 mg/kg 投与開始時から 1 分 7 秒後に発生した不整脈の心電図 (ECG)、
単相性活動電位 (MAP)、血圧 (BP) の波形を示す。

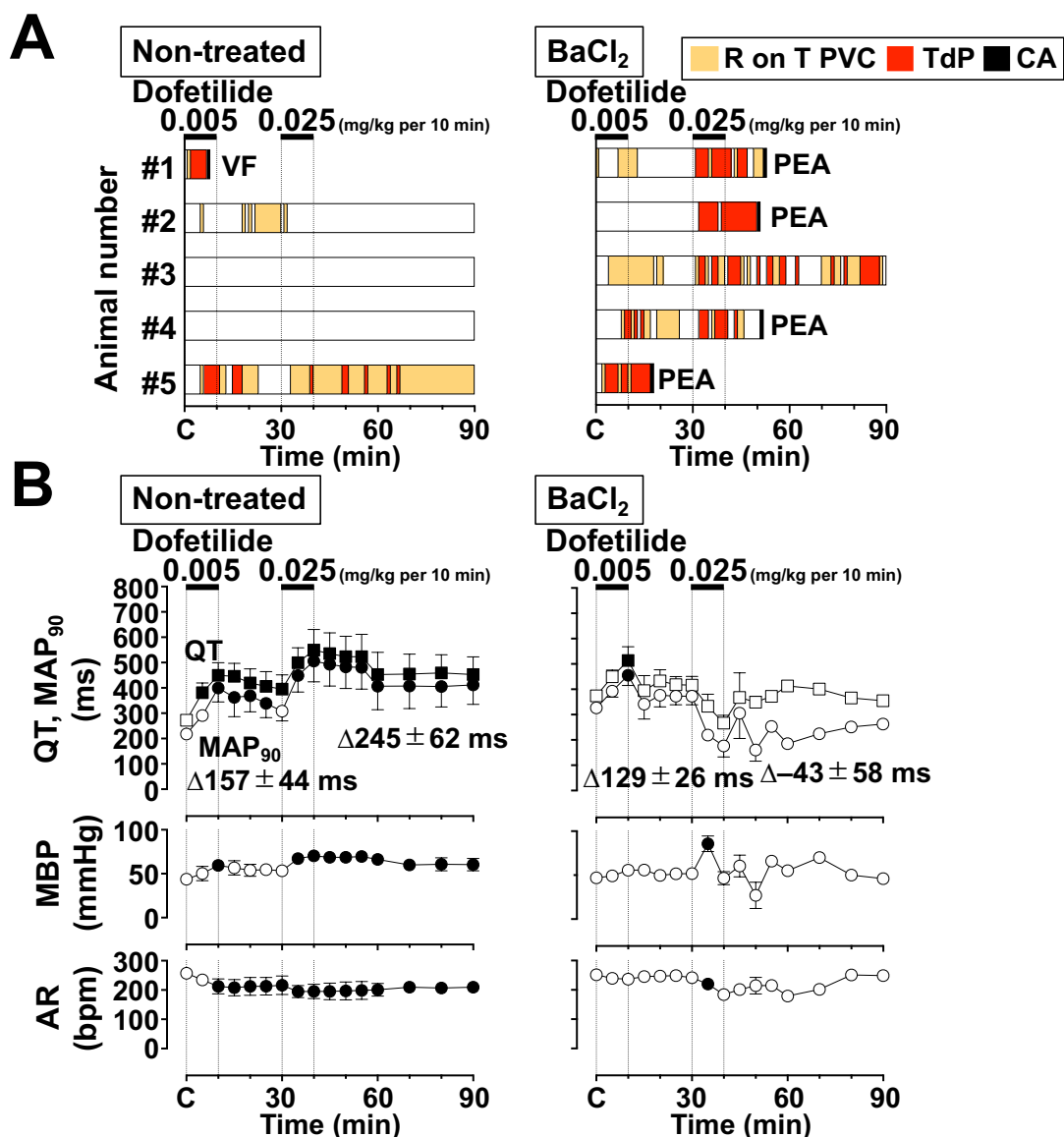


Figure 2-8. Dofetilide の催不整脈作用に対する BaCl₂ の作用

(A) 不整脈発生の時間経過を個体別に示す。オレンジ色のカラムは R on T 型心室期外収縮 (PVC) を、赤色のカラムは torsade de pointes (TdP) の発生している時間帯を示す。黒色のカラムは心停止 (CA) し、死亡したことを示す。未処置個体の CA は心室細動 (VF) を原因とし、BaCl₂ 処置個体では無脈性電気活動 (PEA) を原因とした。未処置群 (左、n=5) では、dofetilide 低用量および高用量による R on T 型 PVC の発生回数はそれぞれ、2.2±1.3 回/分と 6.0±6.0 回/分であった。Dofetilide 低用量により短時間の TdP (<10 秒) が 19 回、長時間の TdP (≥10 秒) が 2 回発生し、高用量により短時間の TdP が 5 回、長時間の TdP が 1 回発生した。BaCl₂ 処置群 (右、n=5) では、dofetilide 低用量および高用量による R on T 型 PVC の発生回数はそれぞれ、6.3±2.4 回/分と 7.5±2.7 回/分であった。Dofetilide 低用量により短時間の TdP が 10 回、長時間の TdP が 5 回発生し、高用量により短時間の TdP が 57 回、長時間の TdP が 21 回発生した。(B) QT 間隔、MAP 持続時間 (MAP₉₀)、平均血圧 (MBP) および心房拍動数 (AR) の時間経過を示す。未処置群と BaCl₂ 処置群の薬物投与前値 (control; C) は Table 2-4 にまとめた (Post)。MAP₉₀ の最大変化量 (ΔMAP₉₀; MAP₉₀ 最大延長時の値と control 値の差) は、図中上段に示した。データは mean ± S.E.M. で示す。Closed symbol は各群の C 値と比較したときの有意差を示す (p < 0.05)。

心室再分極時間の時間的ばらつきに対する BaCl₂ の作用

Figure 2-9 に未処置群および BaCl₂ 処置群における dofetilide の再分極時間の時間的ばらつきに対する作用の典型例を Poincaré plots で示し、Table 2-5 にその作用をまとめた。未処置群では、dofetilide 低用量および高用量は MAP₉₀ を延長させるとともに、STV を用量依存性に増大させた。BaCl₂ 処置群では、dofetilide 低用量および高用量は MAP₉₀ を延長させたが、STV の増大はわずかであった。

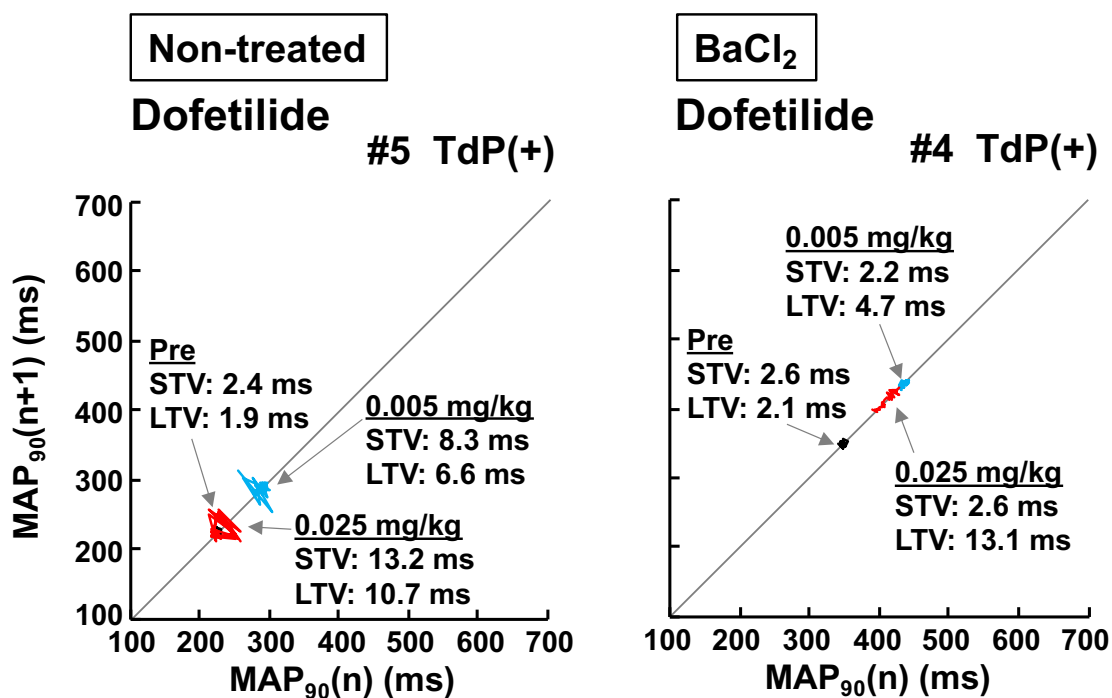


Figure 2-9. 未処置個体 (n=5) および BaCl₂ 処置個体 (n=5) における dofetilide の心室再分極時間の時間的ばらつきに対する作用を示した Poincaré plots の典型例
連続した 31 拍の MAP 持続時間 (MAP₉₀) を 4 箇所 (未処置個体では溶媒投与後 (Pre) と dofetilide 0.005 および 0.025 mg/kg、BaCl₂ 処置個体では BaCl₂ 投与後 (Pre) と dofetilide 0.005 および 0.025 mg/kg) で計測しプロットした。STV; short-term variability, LTV; long-term variability, TdP(+); Torsade de Pointes (TdP) が発生した個体

Table 2-5. Dofetilide により生じた心室再分極時間の時間的ばらつきに対する BaCl₂ の作用

	Dofetilide		
	pre-drug	0.005 mg/kg	0.025 mg/kg
Non-treated animals			
STV (ms)	2.3±0.3	5.3±1.1	8.1±2.9*
LTV (ms)	2.5±0.5	6.8±0.5	9.8±2.8**
MAP ₉₀ (ms)	218±10	334±59	373±105
BaCl ₂ -treated animals			
STV (ms)	3.2±0.5	3.1±1.1	3.7±0.7
LTV (ms)	3.8±1.0	5.3±0.8	10.8±0.9*
MAP ₉₀ (ms)	333±17	409±32*	401±33*

STV; short-term variability, LTV; long-term variability, MAP₉₀; MAP 持続時間のデータを mean±S.E.M. (n=5) で示す。アスタリスクは各群の薬物投与前と比較したときの有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

2-4 考察

本章では薬物性 QT 延長症候群発生に対する薬理的修飾機構を、L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬または NCX 阻害薬、 I_{K1} 阻害薬を共存させた実験条件で、hERG K^{+} チャンネル抑制薬による催不整脈性の変化を観察する手法により検討した。

2-4-1 薬物性 QT 延長症候群発生を修飾する作用の検討：L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害と $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害による影響

Verapamil および SEA0400 は dofetilide による TdP の誘発を抑制した。細胞内 Ca^{2+} 動態に関わる機構を抑制することで、hERG K^{+} チャンネル抑制薬による TdP の発生を抑制的に修飾しうることを示された。

2-4-1-1 Dofetilide の催不整脈作用

Dofetilide は hERG K^{+} チャンネルに対する選択的抑制薬である。Figure 2-3B と Figure 2-4B に示すように、dofetilide は QT 間隔延長を伴い TdP を 5 例中 4 例に誘発させた。また、Figure 2-3A に示すように、TdP 発生に至るまでに QT 間隔延長、EAD 発生、R on T 型 PVC 発生の順に一連の心電図変化および MAP 変化が観察された。Dofetilide 投与後、EAD は全例に、R on T 型 PVC は 5 例中 4 例に頻回に観察された。また、トリガー発生の前兆現象とされる再分極時間の時間的ばらつき (STV) の増大が dofetilide 投与後に認められるなど (Table 2-3)、QT 間隔延長以降の TdP 発生過程に関わる現象が dofetilide の投与により高率に観察された。したがって、dofetilide は QT 間隔延長の過程および QT 間隔延長以降の TdP 発生過程のそれぞれに影響を与える薬物の分析に有用な TdP 誘発薬と考えられる。

2-4-1-2 Verapamil と SEA0400 の投与量の根拠

Verapamil の投与量は過去の *in vivo* 研究を参考に設定した (42)。Verapamil の作用点である L 型 Ca^{2+} チャンネルは洞房結節で活動電位の立ち上がりに関与し自動能の発生に寄与する。Table 2-2 に示すように、verapamil による心房拍動数ならびに平均血圧の有意な低下は、本薬の L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用を反映した結果である。

SEA0400 の投与量は過去の *in vivo* 研究を参考に設定した (43)。Bourgonje らが用いた投与量により得られる血中濃度は 11 μM と報告され (43)、この濃度はモルモット単離心室筋細胞において NCX 電流を完全に抑制することが示されている (44)。NCX は

3つのNa⁺と1つのCa²⁺を細胞内外で交換する機構であり、イオン交換の際に電流が生じる。Figure 2-1に示すように再分極過程では、増加した細胞内のCa²⁺を細胞外に排出するモードが優勢となり、Na⁺を細胞内に取り込む際に内向き電流が生じる。したがって、Table 2-1に示すように、SEA0400によるQT間隔とMAP₉₀の短縮は、本薬の内向きNCX電流阻害作用を反映した結果である。

2-4-1-3 Dofetilideの催不整脈作用に対するverapamilの修飾作用

Figure 2-3に示すように、verapamil処置群でdofetilideによるTdP発生は完全に抑制された。DofetilideによるMAP延長の程度は未処置群と比較すると小さかったことから、verapamilによるQT間隔延長過程の抑制が抗不整脈作用に寄与したと考えられた。hERG K⁺チャンネル抑制による再分極時間延長やTdP誘発に対するverapamilの抑制作用は低K⁺溶液で灌流させたモルモット心室筋およびウサギ摘出心臓を用いた過去の*in vitro*研究で報告されており(45,46)、本章の*in vivo*条件においてもL型Ca²⁺チャンネルはhERG K⁺チャンネル抑制によるQT間隔延長の過程に対し促進的に寄与し、TdP発生に関与したと考えられる。また、dofetilideによるEADおよびR on T型PVCの誘発と、再分極時間の時間的ばらつきの増大はverapamil存在下で抑制されている(Figure 2-3, Table 2-3)。これらの現象はQT間隔延長以降のTdP発生過程に関わるものであるが、それ以前のQT間隔延長過程がverapamilにより抑制されていたため、EADおよびR on T型PVCの誘発と、再分極時間の時間的ばらつきの増大に対しverapamilが直接的に影響を与えうるかについては本結果から判断できなかった。Dofetilide以外のhERG K⁺チャンネル抑制薬を用いた検討によりこの点を解明できる可能性が考えられ、今後の研究の進展を待ちたい。以上の結果より、L型Ca²⁺チャンネルに対する阻害作用を有する薬物は、QT間隔延長過程の抑制を通じて薬物性QT延長症候群の発生を抑制的に修飾しうることが示された。

2-4-1-4 Dofetilideの催不整脈作用に対するSEA0400の修飾作用

Figure 2-3Bに示すように、SEA0400処置群でdofetilideによるTdP発生は未処置群と比較して半数であり、抑制効果が認められた。Figure 2-4Bに示すように、dofetilideによるMAP延長はSEA0400により影響されなかったことから、hERG K⁺チャンネル抑制によるQT間隔延長の過程にNCXは関与しないと考えられた。また、dofetilideによるEADの発生はSEA0400存在下で抑制されないが、R on T型PVCの発生はTdP発生と同様に

SEA0400により抑制されることが見出された。この事実より、EADからR on T型PVCが発生する過程にNCXが関与することを示された。一方で、SEA0400処置群においてdofetilideによる再分極時間の時間的ばらつきの増大作用は未処置群と同等であったことから、NCX阻害作用は再分極時間の時間的ばらつきに影響を与えずにトリガーの発生を抑制すると考えられた。以上の結果より、NCX阻害作用を有する薬物は、EADからR on T型PVCが発生する過程に作用して薬物性QT延長症候群の発生を抑制的に修飾しうることが明らかとなった。

2-4-2 薬物性QT延長症候群発生を修飾する作用の検討： I_{K1} 阻害による影響

BaCl₂は、dofetilideによるQT間隔延長の過程に影響を与えなかったものの、TdP発生を大幅に増加させた。 I_{K1} 阻害はhERG K⁺チャネル抑制薬によるTdP発生を促進することが示された。

2-4-2-1 BaCl₂の投与量の根拠

本研究ではBaCl₂の投与量を0.1 mg/kg/minとした。ラットで報告されているBaCl₂の血中濃度に基づくと(47)、本投与量での血中濃度はおよそ12 μMと推定された。BaCl₂は I_{K1} 阻害を主作用とするが、高濃度では非選択的にイオンチャネル作用を示すことが一方で指摘されている。ラット心房筋における I_{K1} 、 $I_{K,ACh}$ 、 $I_{K,ATP}$ に対するBaCl₂のIC₅₀は、それぞれ16.8 μM、34.9 μM、164.5 μMと報告されている(48)。また、BaCl₂ 10 μMは I_{to} 、 I_{Ks} 、 I_{Kr} に影響を与えずに I_{K1} を選択的に阻害することがイヌ心室筋細胞において報告されている(49)。研究対象である心室筋には $I_{K,ACh}$ は存在しないため、本研究で用いた投与量0.1 mg/kg/minにより得られる血中濃度は、心室筋に対し I_{K1} を選択的に阻害できると推測される。 I_{K1} は再分極終末相の形成にも関与しているため(Figure 2-1)、Table 2-3に示すように、BaCl₂によりQT間隔およびMAP₉₀が有意に延長したのは、本薬の I_{K1} 阻害作用を反映した結果である。また、BaCl₂により平均血圧の有意な上昇が認められた。 I_{K1} は平滑筋弛緩に関与することが知られており(50)、BaCl₂によるこの機構の抑制が血圧上昇に寄与したと考えられる。

2-4-2-2 Dofetilideの催不整脈作用に対する I_{K1} 阻害の修飾作用

Figure 2-8に示すように、未処置群においてdofetilideは低用量から高用量を通じて5例中2例にTdPを発生させた一方で、BaCl₂処置群では5例全例にTdPを発生させた。

BaCl₂ 処置群の dofetilide 低用量による MAP₉₀ 延長の程度は未処置群と比較して小さく (129 ms vs. 157 ms)、MAP₉₀ 延長が観察されなかった dofetilide 高用量において TdP を頻回に発生させるという結果が得られた。BaCl₂ による I_{K1} 阻害は hERG K⁺チャネル抑制による QT 間隔延長には影響を与えないが、QT 間隔延長以降の TdP 発生に至る過程を促進的に修飾することが示された。Table 2-5 に示すように、再分極時間の時間的ばらつきに対する dofetilide の増大作用は BaCl₂ 処置下で増強されなかったものの、Figure 2-8 に示すように、dofetilide による R on T 型 PVC の誘発は BaCl₂ 処置群で 5 例全例に頻回に認められた。この結果に基づくと、I_{K1} は hERG K⁺チャネル抑制薬によるトリガー発生に対し抑制的に働く保護機構としての役割を果たすことが示唆された。

BaCl₂ 処置群における TdP 持続時間は未処置群と比較すると長く (36.7 s vs. 10.9 s)、リエントリーが促進された。I_{K1} の阻害は一般的に静止膜電位を上昇させ、Na⁺チャネルを間接的に抑制することで心室内伝導を遅延させることが知られているため、BaCl₂ 処置群ではリエントリーが成立しやすかったと考えられる。しかしながら、Table 2-4 に示すように、BaCl₂ は心室伝導時間を反映する QRS 幅を延長させなかった。Na⁺チャネル抑制が伝導性に与える影響は頻度依存性を示すことが知られているため、I_{K1} 阻害による影響はペーシングにより心室拍動数を 60 beats/min に設定された本章の実験条件下では顕在化せず、不整脈発生時などの頻拍時において顕在化した可能性が考えられた。また、TdP 停止後は一時的に QT 間隔が短くなる性質があるものの、BaCl₂ 処置群において TdP は繰り返し発生した。活動電位持続時間に対し不応期が短く、トリガーが興奮可能な時間が存在していればリエントリーは成立可能であるため、I_{K1} 阻害は電氣的受攻期を延長させるなどリエントリーに対する修飾作用の可能性も考えられた。

2-4-2-3 BaCl₂ による I_{K1} 阻害が TdP 発生後の心機能に与える影響

未処置群で dofetilide 投与後に死亡した個体 (#1) は、TdP が VF に移行したことを原因とした不整脈死であったのに対し、BaCl₂ 処置群では TdP が自然停止したとしても、PEA となり心不全死した個体が大半を占めた。PEA を生じる原因には、循環血液量の減少、低酸素血症、心タンポナーデなどが知られている。どの原因も共通して冠動脈血流の低下により心筋への酸素供給が減少し、心筋障害が生じうると考えられる。BaCl₂ 処置群では TdP が頻回に発生した上、未処置群と比較すると TdP 持続時間も長かった。TdP 発生時には血行動態が破綻するため、心筋が虚血に晒される時間は長いと考えられる。心筋には短時間の心筋虚血が先行することによって虚血耐性を獲得し、長時間の虚

血が引き続き生じても心筋障害が軽減するプレコンディショニングと呼ばれる機構が存在している (51)。この機構には ATP 感受性 K^+ チャンネルが関与することが広く知られているが (52)、 I_{K1} チャンネルの関与もウサギ心室筋細胞を用いた研究により示されている (53)。したがって、 $BaCl_2$ 存在下では TdP 持続時間が長かったことに加え、プレコンディショニングの効果が得られにくかったことが心筋障害に関与し、PEA に陥った可能性が考えられた。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度の異常な増加によっても心筋障害は生じることが知られている。TdP などの頻拍が生じると Ca^{2+} 過負荷となるが、 I_{K1} 阻害により静止膜電位が上昇した状態ではその影響が強く出現する可能性が考えられた。 I_{K1} 阻害は hERG K^+ チャンネル抑制による TdP の発生を促進することに加え、TdP 発生中の心機能に何かしらの影響を与える可能性が示唆された。

2-5 小括

細胞内 Ca^{2+} 動態や静止膜電位維持に関わる機構に対する作用を hERG K^+ チャンネル抑制薬が併せ持つと、薬物性 QT 延長症候群の誘発のしやすさが変化しうることが示された。

第3章 薬物性QT延長症候群発生を修飾する作用の検討：Gqタンパク質共役型受容体の関与

3-1 序論

第2章では、hERG K⁺チャンネル抑制を基盤としたTdP誘発性が、心筋イオンチャンネルやトランスポーターに対する薬理作用を共存させることにより修飾されることを示した。本章では受容体レベルでの修飾の可能性を検討した。

アドレナリン α_1 受容体やアンジオテンシン II 1 型 (AT₁) 受容体は代表的な Gq タンパク質共役型受容体である。Gq タンパク質共役型受容体にアゴニストが結合すると、ホスホリパーゼ C が活性化し、ホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP₂) からイノシトール三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DAG) が産生される。IP₃ の作用により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇し、血管では血管平滑筋の収縮が生じる。DAG はプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化させることにより生理作用をもたらすことが知られている。心臓電気生理の観点からは、Gq タンパク質共役型受容体は、PKC を介した機序や PIP₂ の減少を介した機序により心筋 K⁺チャンネルを複合的に抑制することが指摘されている (54-59)。そこで本章では、Gq タンパク質共役型受容体の一つであるアドレナリン α_1 受容体の選択的刺激薬である methoxamine を用い、hERG K⁺チャンネル抑制による TdP 誘発性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。Gq タンパク質共役型受容体刺激は心筋イオンチャンネルに対し間接的に修飾しうるため、その修飾効果は QT 間隔延長作用および TdP 誘発作用の用量反応性が比較的緩やかである hERG K⁺チャンネル抑制薬を用いて検討することが好ましいと考え、そのような特性を有することが当研究室の過去の検討から確認されている nifekalant を用いて実験を行った。

3-2 実験材料および方法

使用動物

実験方法に記した完全房室ブロックウサギを用い、60 beats/min で右心室ペーシングを施した。

使用薬物

アドレナリン α_1 受容体刺激薬 methoxamine (SIGMA) は生理食塩水を用いて溶解および希釈し、0.9 mg/kg/h の投与量を 2 mL/kg/h の投与速度で静脈内持続投与した。Methoxamine の投与は左耳介静脈に留置したサーフロー®留置針を介し、シリンジポンプを用いて行った。

アドレナリン α_1 受容体遮断薬 prazosin (東京化成工業) は 5%ブドウ糖液 (大塚糖液 5%, 大塚製薬) を用いて溶解および希釈し、0.1 mg/kg をボラス投与し、その後 0.018 mg/kg/h の投与量を 1 mL/kg/h の投与速度で静脈内持続投与した。Prazosin の投与は左耳介静脈に留置したサーフロー®留置針を介し、シリンジポンプを用いて行った。

hERG K^+ チャネル抑制薬 nifekalant hydrochloride (シンビット®静注用 50 mg, トーアエイヨー) は 5%ブドウ糖液を用いて溶解および希釈して使用した。Nifekalant は 0.03, 0.3, 3 mg/kg の投与量を 0.2 mL/kg/min の投与速度で静脈内持続投与した。Nifekalant の投与は左大腿静脈に留置したシースを介し、シリンジポンプを用いて行った。

試験プロトコール (Figure 3-1)

薬物投与群としてそれぞれ Group I (未処置群, n=5)、Group II (Methoxamine 処置群, n=5)、Group III (Prazosin & Methoxamine 処置群, n=5)、Group IV (Prazosin 処置群, n=5) の 4 群に分けた。

Group I (未処置群) では血行動態が安定したのちに、生理食塩水投与前 (Pre 1) のデータを記録後、生理食塩水の投与を開始し、130 分間静脈内持続投与した。生理食塩水投与開始後 10 分の時点 (C; control) のデータを記録後、nifekalant 0.03 mg/kg を 10 分かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25 および 30 分の時点で、心電図、血圧、MAP の測定を行い、続けて 0.3 mg/kg を 10 分かけて静脈内投与し同様に測定した。最後に 3 mg/kg を 10 分かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 および 60 分の時点で同様に測定した。

Group II (Methoxamine 処置群) では血行動態が安定したのちに、methoxamine 投与前 (Pre 1) のデータを記録後、methoxamine の投与を開始し、130 分間静脈内持続投与し

た。Methoxamine 投与開始後 10 分の時点 (C; control) のデータを記録後、nifekalant 0.03, 0.3, 3 mg/kg を 10 分かけて静脈内投与し、Group I と同様に記録した。

Group III (Prazosin & Methoxamine 処置群) では血行動態が安定したのちに、prazosin 投与前 (Pre 2) のデータを記録後、prazosin の投与を開始し、145 分間静脈内持続投与した。Prazosin 投与開始後 15 分の時点 (Pre 1) のデータを記録後、methoxamine の投与を開始し、130 分間静脈内持続投与した。Methoxamine 投与開始後 10 分の時点 (C; control) のデータを記録後、nifekalant 0.03, 0.3, 3 mg/kg を 10 分かけて静脈内投与し、Group I と同様に記録した。

Group IV (Prazosin 処置群) では血行動態が安定したのちに、prazosin 投与前 (Pre 2) のデータを記録後、prazosin の投与を開始し、145 分間静脈内持続投与した。Prazosin 投与開始後 15 分の時点 (Pre 1) のデータを記録後、生理食塩水の投与を開始し、130 分間静脈内持続投与した。生理食塩水投与開始後 10 分の時点 (C; control) のデータを記録後、nifekalant 0.03, 0.3, 3 mg/kg を 10 分かけて静脈内投与し、Group I と同様に記録した。

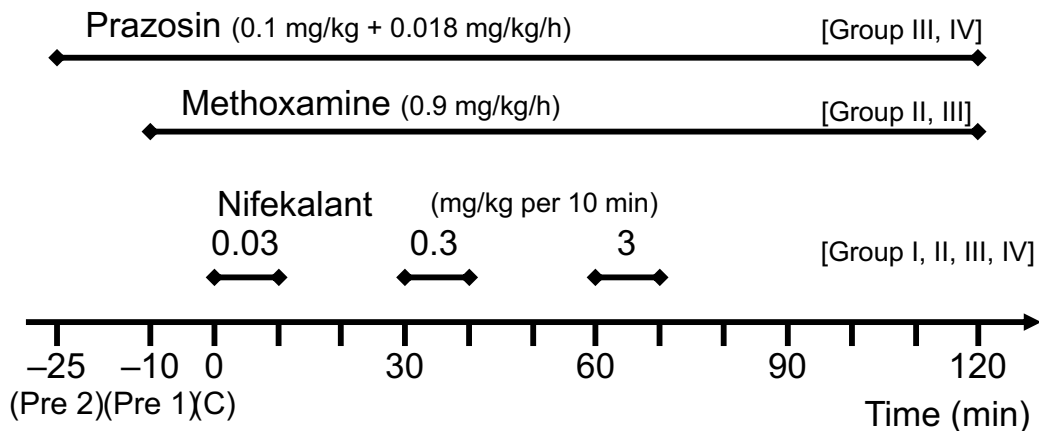


Figure 3-1. プロトコール図

3-3 結果

生理食塩水、methoxamine、prazosin の心血管作用のまとめを Table 3-1 に示す。Group I では、生理食塩水の投与後、血圧および心房拍動数に影響は認められなかった。MAP₉₀ は僅かだが有意に延長した。Group II では、methoxamine の投与後、血圧上昇とともに、MAP₉₀ が有意に延長した。Group III では、prazosin および methoxamine の投与後、心房拍動数以外のパラメータに有意な差は認められなかった。Group IV では、prazosin の投与後、血圧と心房拍動数は有意に低下した。STV と LTV は生理食塩水、methoxamine、prazosin の投与により変化しなかった。

Table 3-1. Methoxamine と prazosin の心血管系に対する作用

	Group I (Control)		Group II (Methoxamine)		Group III (Prazosin & Methoxamine)		Group IV (Prazosin)			
	Pre 1	saline at 10 min	Pre 1	methoxamine at 10 min	Pre 2	prazosin at 15 min	methoxamine at 10 min	Pre 2	prazosin at 15 min	saline at 10 min
MBP (mmHg)	36±1	37±2	41±4	56±4**	44±6	38±6	41±7	47±1	36±1**	37±2*
AR (bpm)	238±6	241±10	236±20	225±17	201±14	195±12	188±13*	262±14	247±12*	244±12*
QT (ms)	292±22	295±21	344±22	359±26	303±22	298±24	307±24	271±18	245±24	245±25
MAP ₉₀ (ms)	236±29	243±27*	289±22	311±25**	243±25	238±26	244±28	227±21	205±22	205±20
STV (ms)	2.0±0.5	2.2±0.6	3.4±0.6	3.5±0.9	2.6±0.3	2.5±0.3	2.0±0.3	3.7±1.3	2.5±0.7	3.0±0.5
LTV (ms)	1.8±0.5	2.1±0.6	3.1±0.7	3.5±1.2	2.5±0.7	2.4±0.2	1.9±0.3	4.4±1.5	2.4±0.7	2.7±0.7

薬物投与前 (Pre 1 および Pre 2) と薬物投与後のデータを示す。Saline は methoxamine の溶媒である。MBP; 平均血圧, 心房拍動数, QT 間隔, MAP₉₀; MAP 持続時間, STV; short-term variability, LTV; long-term variability を mean±S.E.M. (n=5) で示し、アスタリスクは各群の薬物投与前と比較したときの有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

Methoxamine が nifekalant の催不整脈作用に与える影響

Group II (Methoxamine 処置群) において、nifekalant 高用量 3 mg/kg 投与時に発生した TdP の典型波形を Figure 3-2 に示す。Nifekalant 投与後の不整脈発生の時間経過を Figure 3-3A に示す。Group I (未処置群) において、R on T 型 PVC の発生は nifekalant 低用量 0.03 mg/kg および中用量 0.3 mg/kg 投与後どちらも 5 例中 1 例に認められ、高用量投与後 5 例中 3 例に認められた。TdP の発生は高用量投与後 5 例中 1 例に認められた。Group II において、R on T 型 PVC の発生は nifekalant 低用量で 5 例中 1 例、中用量で 5 例中 4 例、高用量で 5 例全例に認められた。TdP の発生は高用量投与後に 5 例中 2 例に認められた。Group III (Prazosin & Methoxamine 処置群) では、R on T 型 PVC の発生は nifekalant 低用量で 5 例中 2 例、中用量で 5 例中 3 例、高用量で 5 例中 4 例に認められた。この群では TdP の発生は認められなかった。Group IV (Prazosin 処置群) では、R on T 型 PVC の発生は nifekalant 低用量で認められなかったが、中用量で 5 例中 3 例に、高用量で 5 例中 4 例に認められた。TdP の発生は中用量投与後に 5 例中 2 例に、高用量投与後に 5 例中 3 例に認められた。

Nifekalant の電気生理学的および血行動態パラメータに対する作用の時間経過を Figure 3-3B に示す。Group I では、QT 間隔および MAP₉₀ は nifekalant 中用量および高用量の投与後延長した。心房拍動数は中用量および高用量の投与後に減少した一方で、平均血圧は高用量の投与後 5 分と 60 分で上昇した。Group II、Group III および Group IV においても、nifekalant 投与後に QT 間隔および MAP₉₀ の延長、心房拍動数の低下、平均血圧の上昇が同様に認められた。Group II における nifekalant 中用量および高用量による MAP₉₀ の延長の程度 (Δ MAP₉₀) は、Group I よりも大きく、統計学的に有意差が認められた。

Group II (Methoxamine)

Nifekalant 3 mg/kg

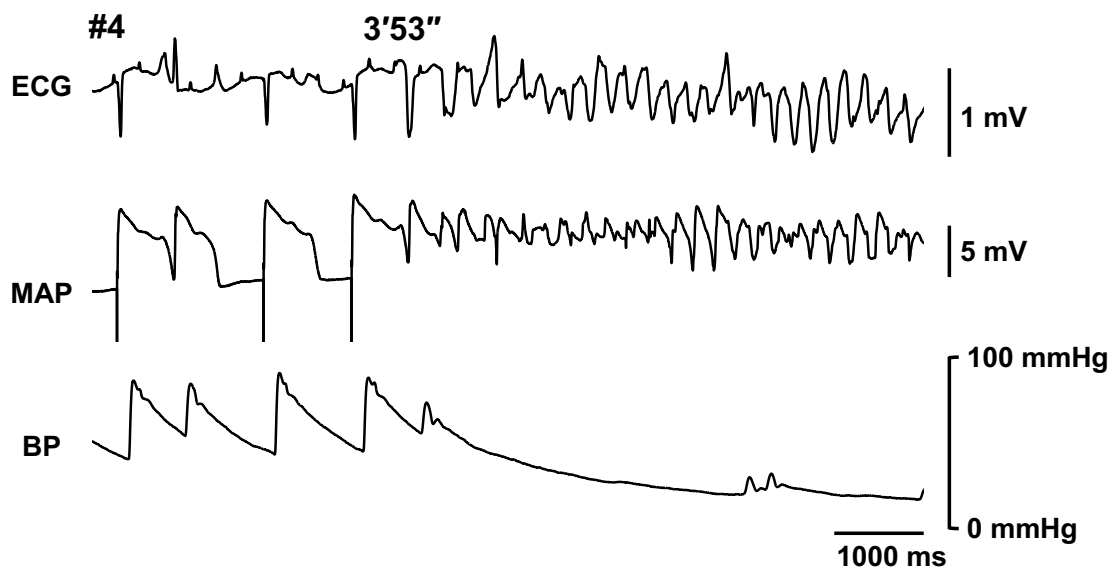


Figure 3-2. Methoxamine 処置個体 (Group II の 4 例目) で nifekalant により誘発された不整脈の典型例

Nifekalant 3 mg/kg 投与開始時から 3 分 53 秒後に発生した不整脈の心電図 (ECG)、単相性活動電位 (MAP)、血圧 (BP) の波形を示す。

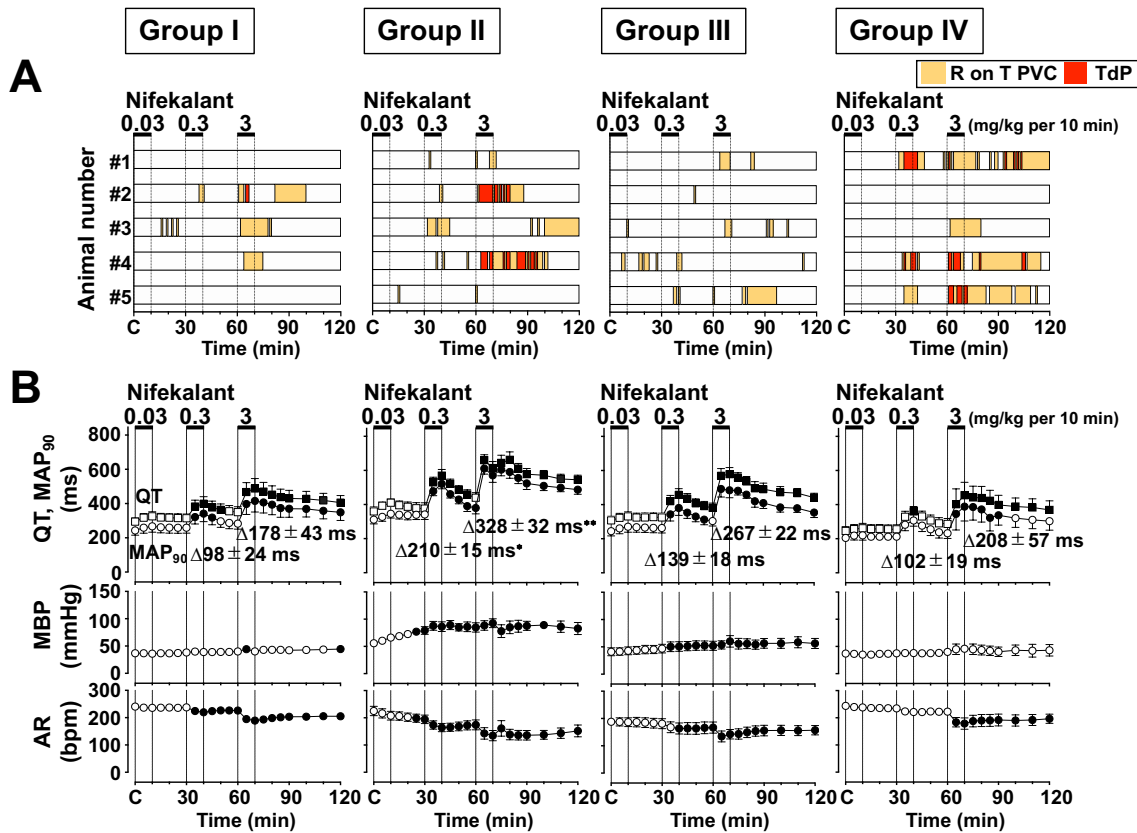


Figure 3-3. 未処置群 (Group I, n=5)、Methoxamine 処置群 (Group II, n=5)、Prazosin & Methoxamine 処置群 (Group III, n=5)、Prazosin 処置群 (Group IV, n=5) における nifekalant の催不整脈作用

(A) 不整脈発生の時間経過を個体別に示す。オレンジ色のカラムは R on T 型心室期外収縮 (PVC) を、赤色のカラムは torsade de pointes (TdP) の発生している時間帯を示す。Group I では、nifekalant 低用量、中用量および高用量による R on T 型 PVC の発生回数はそれぞれ、 0.1 ± 0.1 回/分、 0.1 ± 0.1 回/分と 2.7 ± 1.5 回/分であった。高用量により短時間の TdP (<10 秒) が 1 回、長時間の TdP (≥ 10 秒) が 1 回発生した。Group II では、nifekalant 低用量、中用量および高用量による R on T 型 PVC の発生回数はそれぞれ、 0.0 ± 0.0 回/分、 0.5 ± 0.5 回/分と 3.1 ± 1.2 回/分であった。高用量により短時間の TdP が 28 回、長時間の TdP が 13 回発生した。Group III では、nifekalant 低用量、中用量および高用量による R on T 型 PVC の発生回数はそれぞれ、 0.1 ± 0.1 回/分、 0.1 ± 0.1 回/分と 1.4 ± 1.1 回/分であった。Group IV では、nifekalant 中用量および高用量による R on T 型 PVC の発生回数はそれぞれ、 2.8 ± 1.8 回/分と 6.8 ± 2.3 回/分であった。中用量により短時間の TdP が 13 回、長時間の TdP が 2 回発生し、高用量により短時間の TdP が 10 回、長時間の TdP が 9 回発生した。(B) QT 間隔、MAP 持続時間 (MAP₉₀)、平均血圧 (MBP) および心房拍動数 (AR) の時間経過を示す。各群の薬物投与前値 (control; C) は Table 3-1 にまとめた

(Group I; saline at 10 min, Group II; methoxamine at 10 min, Group III; methoxamine at 10 min, Group IV; saline at 10 min)。MAP₉₀ の最大変化量 (Δ MAP₉₀; MAP₉₀ 最大延長時の値と control 値の差) は、図中上段に示した。データは mean \pm S.E.M. で示す。Closed symbol は各群の C 値と比較したときの有意差を示す ($p < 0.05$)。また、* $p < 0.05$ と ** $p < 0.01$ は Δ MAP₉₀ を Group I と比較したときの有意差を示す。

心室再分極時間の時間的ばらつきに対する methoxamine の作用

Figure 3-4 に Group I、Group II、Group III、Group IV における nifekalant の再分極時間の時間的ばらつきに対する作用の典型例を Poincaré plots で示し、Table 3-2 にその作用をまとめた。Group I では、nifekalant 中用量および高用量は MAP₉₀ を延長させ、STV を上昇させた。Group II, III, IV においても同様に、nifekalant 中用量および高用量は MAP₉₀ を延長させると同時に STV を上昇させたが、その程度は Group I よりも大きかった。

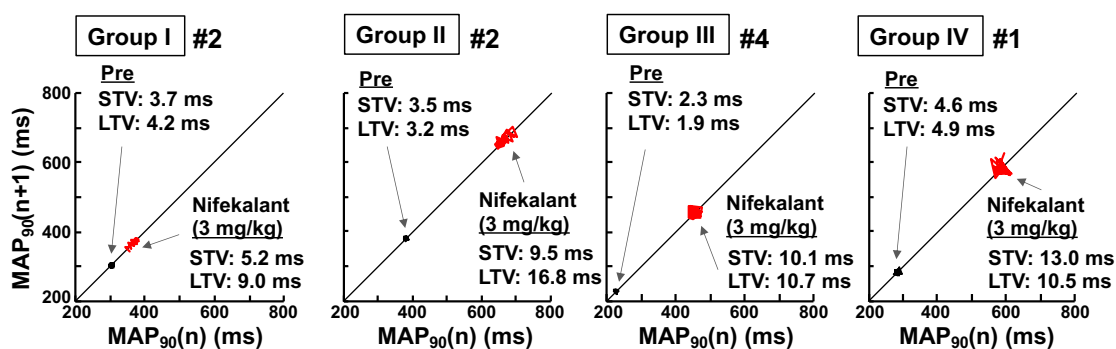


Figure 3-4. 未処置群 (Group I)、Methoxamine 処置群 (Group II)、Prazosin & Methoxamine 処置群 (Group III)、Prazosin 処置群 (Group IV) における nifekalant の心室再分極時間の時間的ばらつきに対する作用を示した Poincaré plots の典型例
 連続した 31 拍の MAP 持続時間 (MAP₉₀) を 2 箇所 (nifekalant 投与前 (Pre) と nifekalant 3 mg/kg) で計測しプロットした。STV; short-term variability, LTV; long-term variability, TdP(+); Torsade de Pointes (TdP) が発生した個体, TdP(-); TdP が発生しなかった個体

Table 3-2. Nifekalant により生じた心室再分極時間の時間的ばらつきに対する methoxamine の作用

	Nifekalant			
	pre-drug	0.03 mg/kg	0.3 mg/kg	3 mg/kg
Group I (Control)				
STV (ms)	2.2±0.6	2.7±0.7	3.7±0.8	4.2±1.2
LTV (ms)	2.1±0.6	2.2±0.4	3.5±0.7	5.5±2.1
MAP ₉₀ (ms)	244±28	265±34	340±45*	407±70**
Group II (Methoxamine)				
STV (ms)	3.5±0.9	3.9±0.8	6.6±1.6	8.0±1.0*
LTV (ms)	3.5±1.2	4.0±1.3	6.0±1.9	10.0±2.6
MAP ₉₀ (ms)	316±24	351±25	524±30**	587±30**
Group III (Prazosin & Methoxamine)				
STV (ms)	2.0±0.3	2.1±0.4	4.2±0.7	9.2±3.6*
LTV (ms)	1.9±0.3	2.3±0.4	4.1±0.7	7.2±1.4**
MAP ₉₀ (ms)	245±27	273±30	384±42**	510±39**
Group IV (Prazosin)				
STV (ms)	3.0±0.5	3.5±0.6	4.1±1.1	8.5±3.0
LTV (ms)	2.7±0.7	2.6±0.6	5.3±1.4	15.0±5.1*
MAP ₉₀ (ms)	208±20	236±23	291±30	363±80*

STV; short-term variability, LTV; long-term variability, MAP₉₀; MAP 持続時間のデータを mean±S.E.M. (n=5) で示す。アスタリスクは各群の薬物投与前と比較したときの有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

3-4 考察

Methoxamine は nifekalant による MAP 延長と TdP 発生を促進し (Group II)、この作用は prazosin の投与により抑制されたことから (Group III)、心筋アドレナリン α_1 受容体を介した Gq タンパク質共役型受容体の活性化は hERG K^+ チャンネル抑制薬による TdP の発生を促進することが示された。

3-4-1 薬物投与量の根拠

本研究では、アドレナリン α_1 受容体作動薬の中で、アドレナリン α_1 受容体に対する選択性が phenylephrine よりも高いことが報告されている methoxamine を用いた (60)。Methoxamine と prazosin の投与量は過去に報告されている *in vivo* 研究に基づき決定した (22,61,62)。Table 3-1 に示すように、Group II では methoxamine により平均血圧が上昇し、Group IV では prazosin により平均血圧が低下した。しかし、Group III では、methoxamine は prazosin 存在下においても平均血圧をわずかに上昇させたことから、prazosin の投与量は methoxamine によるアドレナリン α_1 受容体刺激を完全には抑制できていない可能性がある。III 群抗不整脈薬 nifekalant は hERG K^+ チャンネル抑制を主作用とし、心臓移行性が高く、TdP 誘発性が知られる薬物である。臨床では心室頻拍の患者に対し 0.3 mg/kg の静脈内投与がされている (63)。本章の nifekalant の投与量は、臨床相当用量よりも低い量から過剰量を用いたと考えられる。Nifekalant によるアドレナリン α_1 受容体遮断作用は報告されていない。

3-4-2 アドレナリン α_1 受容体活性化が心筋再分極に与える影響

Table 3-1 に示すように、methoxamine はそれ自身で MAP₉₀ を延長させた。この作用は prazosin により抑制されたことから、アドレナリン α_1 受容体を介することが示された。過去の *in vitro* 研究においても同様に、methoxamine および phenylephrine はモルモット単離心室筋およびウサギ単離心室筋の活動電位持続時間を延長させることが示されている (64,65)。アドレナリン α_1 受容体の活性化は I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} を抑制することが示されており、この作用には Gq タンパク質共役型受容体活性化による細胞内シグナルが関与するとされている (54-59)。代表的な Gq タンパク質共役型受容体の一つである AT₁ 受容体の活性化も同様に、 I_{K1} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} を抑制することが報告されていることから (66-69)、アドレナリン α_1 受容体刺激による再分極時間の延長は Gq タンパク質共役型受容体の活性化により共通に認められる反応と考えられる。

Figure 3-3 に示すように、nifekalant による QT 間隔延長および MAP 延長は methoxamine 存在下で増強された (Group I vs. Group II)。この反応は prazosin 存在下で減弱したことから (Group III)、アドレナリン α_1 受容体を介した機序であることが示された。一方で、nifekalant による QT 間隔延長および MAP 延長は prazosin により影響を受けなかったことから (Group IV)、内因性のアドレナリン α_1 受容体活性では nifekalant の再分極遅延作用の修飾に関与していないと考えられた。アドレナリン α_1 受容体の活性化は種々の心筋 K^+ チャネルを阻害することを考慮すると (54-59)、nifekalant の再分極遅延作用に対する methoxamine の作用は再分極予備能の低下により説明されうると考えられた (70)。以上の結果より、ウサギ心臓において外因性のアドレナリン α_1 受容体の活性化は hERG K^+ チャネル抑制薬による QT 間隔延長作用を増強することが示された。

3-4-3 Nifekalant の催不整脈作用に対するアドレナリン α_1 受容体活性化の修飾作用

Figure 3-3 に示すように、未処置群では、高用量の nifekalant は TdP を 5 例中 1 例に誘発したが、低用量または中用量の投与は TdP を誘発しなかった。Methoxamine 存在下では (Group II)、高用量で 5 例中 2 例に TdP が誘発され、Group I と比較して致死性不整脈がより頻繁に観察された。また、高用量投与後は TdP 発生の前兆現象である再分極時間の時間的ばらつきが増大し、R on T 型 PVC がより頻繁に発生した。Methoxamine による TdP 発生の促進は prazosin によって抑制されたため (Group III)、ウサギ心臓においてアドレナリン α_1 受容体の活性化は、hERG K^+ チャネル抑制薬による再分極遅延作用を促進するなど催不整脈因子として寄与し TdP 発生を促進したと考えられ、薬物性 QT 延長症候群の発生に対する Gq タンパク質共役型受容体の修飾が示された。

Group IV では、nifekalant による QT 間隔延長と MAP 延長は prazosin により修飾されなかった一方で、TdP の発生は nifekalant 中用量および高用量で認められた。Group I よりも強い催不整脈作用が認められたため、アドレナリン α_1 受容体活性化以外の機序の関与が想定された。Table 3-1 に示すように、prazosin により平均血圧が約 10 mmHg 低下したことが交感神経反射につながり、その結果、内因性のアドレナリン β_1 受容体の活性化が nifekalant による TdP 発生を促進した可能性が推測された。この考察は、ウサギ催不整脈モデルを用いた当研究室の過去の検討において、アドレナリン β_1 受容体遮断薬 metoprolol の前処理が dofetilide 誘発性 TdP を完全に抑制した結果に基づくものである (未発表データ)。一方で、本研究における心房拍動数は prazosin 投与後に減少を認めている (Table 3-1)。Prazosin 自体が迷走神経を介した機序により徐脈作用を示すことがヒトおよびラットの心房において報告されており (71,72)、本研究のウサギの実験

においても同様に観察された可能性が考えられたが、prazosin の単回投与下で nifekalant 誘発性 TdP に対するアドレナリン β_1 受容体の修飾作用の可能性は、さらなる薬理学的分析によって解明する必要がある。

3-4-4 アドレナリン α_1 受容体刺激を介さない methoxamine の催不整脈修飾作用

Table 3-2 に示すように、Group II では nifekalant 高用量による再分極時間の時間的ばらつきに対する作用が methoxamine により増強されているが、その作用は prazosin により抑制されずむしろ促進された (Group III)。この結果から、methoxamine のアドレナリン α_1 受容体を介さない作用が再分極時間の時間的ばらつきに影響を与えた可能性が考えられた。アドレナリン α_1 受容体を介さない methoxamine の作用は、50 年ほど前からアドレナリン α_1 受容体遮断薬抵抗性の作用として知られてきた。ウサギ乳頭筋における陰性変力作用やラット心室筋における I_{to} 抑制作用が報告されている (73,74)。本研究で認められた methoxamine の作用の場合を考えると、再分極時間の時間的ばらつきの増大には L 型 Ca^{2+} チャンネルや NCX、late I_{Na} 、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の促進などが寄与していることが報告されているため (43,75-78)、これらの機構に対しアドレナリン α_1 受容体非依存性に作用したと想定される。Methoxamine のアドレナリン α_1 受容体を介さない作用は、薬物性 QT 延長症候群発生に対する修飾機構として Gq タンパク質共役型受容体の関与を検討することを目的とした本章の限界とはなるが、さらなる検討を進めていくことで薬物性 QT 延長症候群発生を促進的に修飾する機構が明らかになることが期待される。

3-5 小括

アドレナリン α_1 受容体刺激は hERG K^+ チャンネル抑制薬の QT 間隔延長作用を増強させることで、TdP 発生を促進した。Gq タンパク質共役型受容体の活性化は薬物性 QT 延長症候群の発生を促進的に修飾しうることが示された。

第4章 徐拍化作用を有する hERG K⁺チャンネル抑制薬の TdP 誘発作用の検討

4-1 序論

第2章と第3章では、hERG K⁺チャンネル抑制を基盤とした薬物性 QT 延長症候群の誘発性が、薬理的な修飾により大幅に変化することを実験的に示した。本章では、薬物性 QT 延長症候群の薬理的な修飾作用となりうる徐拍化作用を hERG K⁺チャンネル抑制作用に併せ持つ薬物の心臓安全性に関する検討を第1章と同様に行い、代表的な薬物として ivabradine を用い、TdP 誘発作用を評価した。Ivabradine は HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated) チャンネルに対する抑制作用を有し、心拍数低下薬として冠動脈疾患や慢性心不全の治療に用いられている (79)。また、ivabradine は hERG K⁺チャンネル抑制作用と QT 間隔延長作用を有することが非臨床試験および臨床試験で示されている (80,81)。近年では、ivabradine を服用している心不全患者で TdP 発生の症例報告がなされている (82)。しかしながら、この患者は心疾患を有していることに加えて TdP 誘発リスクとなる薬物を複数併用していたため、因果関係は明確にされていない。本章では ivabradine の TdP 誘発作用の有無をウサギ催不整脈モデルを用いて明らかにすることを目的とした。本ウサギモデルは 60 beats/min で心室ペーシングすることを基本的な実験条件としているが、被験薬の薬理学的特性ならびに薬物性 QT 延長症候群の発生を修飾しうるリスク因子の1つである徐脈作用 (8) を考慮する必要がある。そこで、徐拍化作用の影響を含めた形で ivabradine の TdP 誘発作用を評価する必要があると考え、心室ペーシングを適用しない実験条件にて検討を行った。

4-2 実験材料および方法

使用動物

実験方法に記した完全房室ブロックウサギを用いた。心室ペーシングを適用しない条件で心行動態に異常をきたさない個体を選抜して実験に供した。

使用薬物

Ivabradine（東京化成工業）は、生理食塩水（大塚生食注[®]，大塚製薬）を用いて溶解および希釈して使用した。左大腿静脈に留置したシースを介し、シリンジポンプを用いて、ivabradine 0.01, 0.1 および 1 mg/kg の投与量を 0.2 mL/kg/min の投与速度で静脈内持続投与した。

試験プロトコール

非心室ペーシング下で、ivabradine (n=5) を投与し、MAP₉₀ の変化および TdP の発生を心室拍動数の変化と同時に観察した。

Ivabradine 0.01 mg/kg を 10 分かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25 および 30 分の時点で、心電図、血圧、MAP の測定を行い、続けて 0.1 mg/kg を 10 分間かけて静脈内投与し同様に測定した。最後に 1 mg/kg を 10 分間かけて静脈内投与し、投与開始から 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 および 60 分の時点で同様に測定した。

4-3 結果

Ivabradine の催不整脈作用

Ivabradine 中用量 0.1 mg/kg の静脈内投与後に認められた TdP の波形の典型例を Figure 4-1A に示す。Ivabradine 投与後の不整脈発生の時間経過を Figure 4-1B に示す。Ivabradine 低用量 0.01 mg/kg の投与では R on T 型 PVC と TdP は発生しなかった。中用量の投与では R on T 型 PVC と TdP の発生はともに 5 例中 1 例に認められ、高用量 1 mg/kg の投与ではそれらの不整脈が 5 例中 2 例に認められた。Ivabradine 高用量の投与後に TdP 発生が認められた個体 (#2 と #5) では、最後に発生した TdP が自然停止した後、PEA となり死亡した。Table 4-1 に示すように、ivabradine 高用量の投与後、MAP₉₀ の有意な延長とともに、STV の増加が認められた ($p=0.06$)。

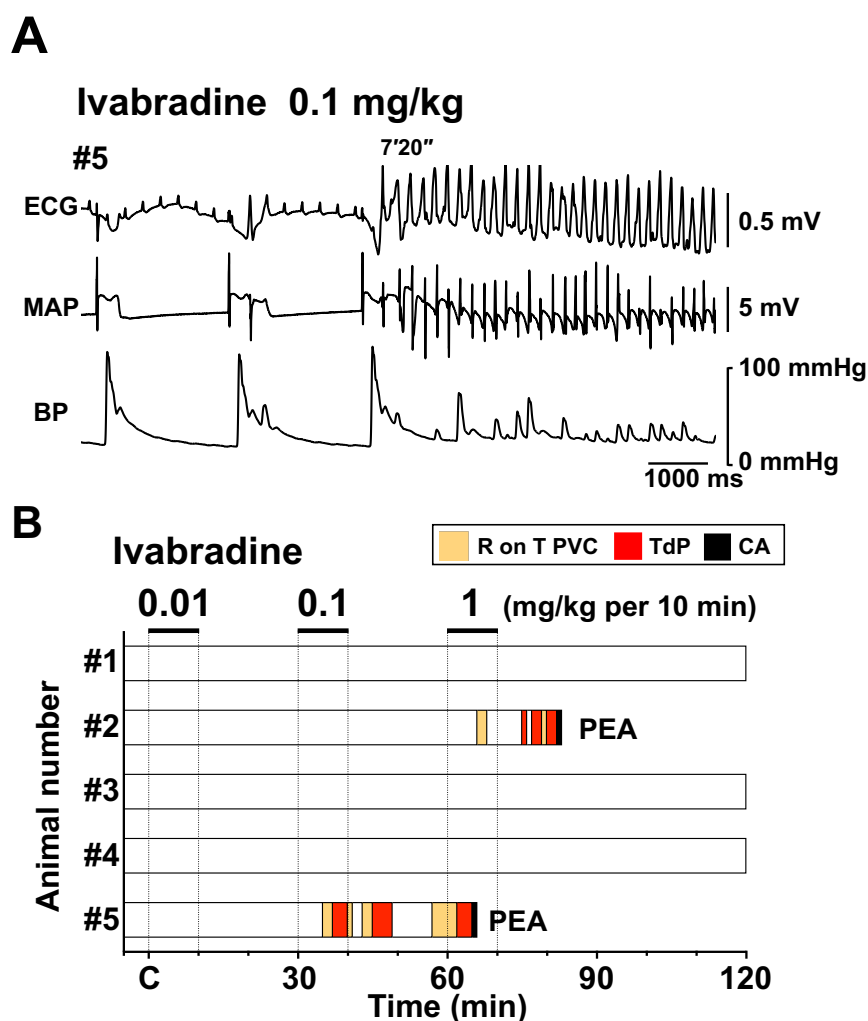


Figure 4-1. Ivabradine の催不整脈作用

(A) #5 の個体で ivabradine 0.1 mg/kg 投与開始時から 7 分 20 秒後に発生した不整脈の心電図 (ECG)、単相性活動電位 (MAP)、血圧 (BP) の波形を示す。(B) 不整脈発生の時間経過を個体別に示す。オレンジ色のカラムは R on T 型心室期外収縮 (PVC) を、赤色のカラムは torsade de pointes (TdP) の発生している時間帯を示す。黒色のカラムは心停止 (CA) し、死亡したことを示す。Ivabradine 中用量の投与後短時間の TdP (<10 秒) が 2 回、長時間の TdP (≥10 秒) が 2 回発生し、高用量の投与後短時間の TdP が 3 回、長時間の TdP が 4 回発生した。PEA; 無脈性電気活動

Table 4-1. Ivabradine の心室再分極時間の時間的ばらつきに対する作用

Ivabradine (mg/kg)	Control	0.01	0.1	1
STV (ms)	2.3±0.9	3.0±0.8	2.9±0.6	5.4±1.5
LTV (ms)	1.9±0.7	2.7±0.8	2.3±0.5	4.3±1.1
MAP ₉₀ (ms)	177±33	190±35	202±38	228±44*

STV; short-term variability, LTV; long-term variability, MAP₉₀; MAP 持続時間のデータを mean±S.E.M. (n=5) で示す。アスタリスクは各群の control 値と比較したときの有意差を示す (**p*<0.05)。

Ivabradine が心行動態及び心臓電気生理に与える影響

Ivabradine の電気生理学および血行動態パラメータに対する作用の時間経過を Figure 4-2 に示す。Ivabradine 低用量と中用量の投与後、どの指標も有意な変化は認められなかった。Ivabradine 高用量の投与後は心房拍動数と心室拍動数の低下と同時に、QT 間隔、QTc 間隔、QRS 幅および MAP₉₀ に有意な延長が認められた。平均血圧に影響は認められなかった。Table 4-2 に示すように、ivabradine の心室拍動数低下作用は TdP 陰性例に比べて TdP 陽性例で明確に出現していた。

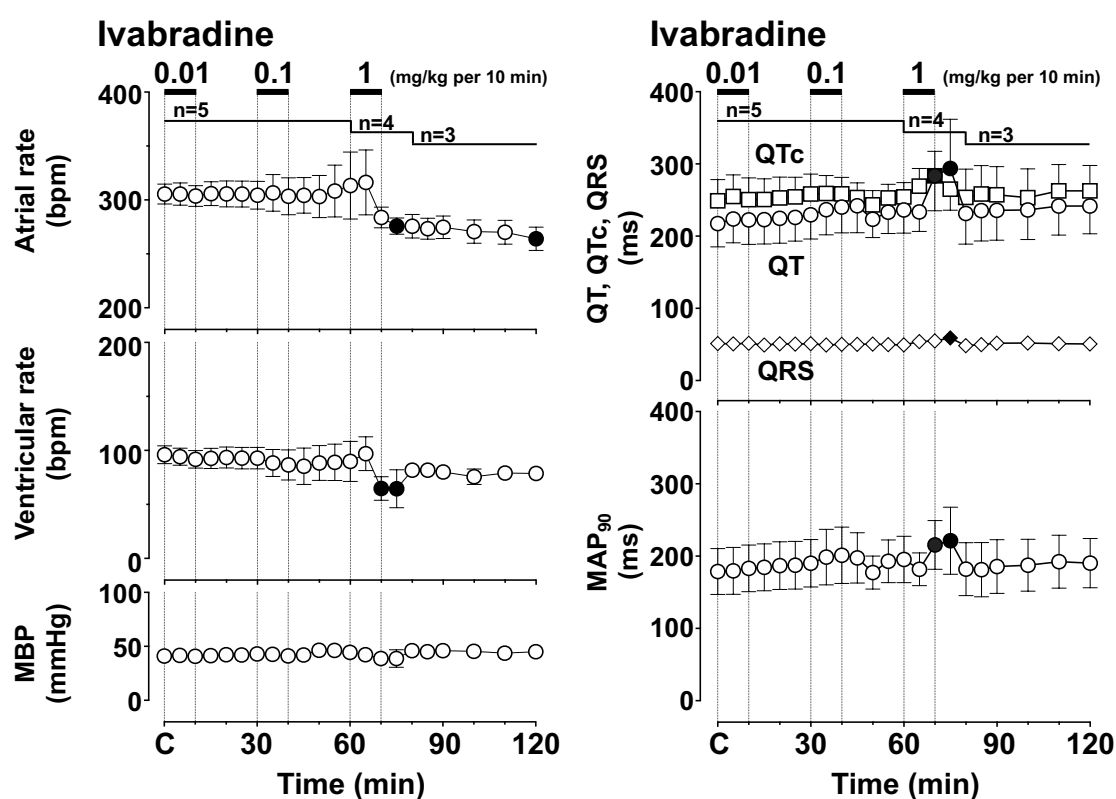


Figure 4-2. Ivabradine (n=5) が心行動態及び心臓電気生理学的指標に与える影響
 Ivabradine 投与群の薬物投与前 (control; C) における心房拍動数、心室拍動数、平均血圧 (MBP)、QT 間隔、QTc 間隔、QRS 幅、MAP₉₀ の値は、それぞれ 305±9 beats/min, 96±8 beats/min, 41±3 mmHg, 217±32 ms, 249±29 ms, 51±5 ms, 179±32 ms であった。Ivabradine 高用量投与後の心房拍動数、心室拍動数、QT 間隔、QTc 間隔、MAP₉₀ の最大変化量は、それぞれ -48±3 beats/min, -45±17 beats/min, +112±65 ms, +60±30 ms, +77±42 ms であった。補正 QT 間隔 (QTc) は Fridericia の式を用いて算出した。データは mean ± S.E.M. で示す。Closed symbol は各群の C 値と比較したときの有意差を示す (p < 0.05)。

Table 4-2. Ivabradine による心房拍動数、心室拍動数および心室再分極時間の変化

Animal No.	TdP	Atrial rate (bpm)	Ventricular rate (bpm)	MAP ₉₀ (ms)
Ivabradine 0.1 mg/kg				
#5	+	-20	-32	+57
#1 to #4 (n=4)	-	-3±15	-5±6	+19±3
Ivabradine 1 mg/kg				
#2	+	-88	-86	+216
#5	+	-34	-42	-7
#1, #3, #4 (n=3)	-	-49±4	-29±8	+35±8

データは torsade de pointes (TdP) 発生直前もしくは、TdP が発生しない場合においては最大変化が得られた時点で測定し、それぞれの個体の薬物投与前の値からの変化量として示した。

4-4 考察

心室ペーシングを行わない完全房室ブロックウサギを用いた検討で、低用量の ivabradine は心血管指標に影響を与えず、中用量と高用量で催不整脈作用が観察された。Ivabradine により催不整脈作用が出現した個体では、徐脈の進行の程度が大きく認められたことから、ivabradine の催不整脈作用の顕在化に本薬自身が有する徐拍化作用の寄与が示された。

4-4-1 用量設定

本章で用いた ivabradine の投与量 (0.01 mg/kg から 1 mg/kg) は海外における臨床研究のプロトコールを参考にした (83,84)。ウサギに 0.1 mg/kg の ivabradine を投与終了時点の血中濃度は 8.8-41 nM であることが薬物動態パラメーターより推定され、この血中濃度は健常人が ivabradine 2.5-7.5 mg 錠を内服した際の最高血中濃度 13.5-45 nM とおおよそ同等であった (81)。したがって、本研究で用いた投与量 (0.01 から 1 mg/kg) は臨床相当量未満から過剰用量の範囲を用いたことになる。

4-4-2 Ivabradine の催不整脈作用と徐拍化作用による修飾

Figure 4-1B に示すように、ivabradine は 0.1 mg/kg の投与で 5 例中 1 例に、1 mg/kg の投与で 5 例中 2 例に TdP を誘発した。この結果は ivabradine が臨床相当用量から TdP 誘発特性を有することを示している。また、Table 4-1 に示すように、ivabradine は TdP 発生の予測指標である再分極時間の時間的ばらつきを増大させる傾向にあったことから、ivabradine の TdP 誘発性は hERG K⁺チャンネル抑制薬と類似していると考えられた(14,36)。

Figure 4-2 に示すように、低用量および中用量の ivabradine は心血管指標に有意な変化を与えなかったが、高用量の ivabradine は心房および心室拍動数を低下させるとともに QT 間隔と MAP₉₀ を有意に延長させた。Ivabradine の HCN4 チャンネルと hERG K⁺チャンネルに対する IC₅₀ はそれぞれ 2.2 μM と 3.5 μM でほぼ同等の作用を有することが *in vitro* 研究で報告されている (80,85)。Ivabradine が心室自動能に対する抑制作用と心室再分極遅延作用を同用量から示したことは、この *in vitro* 研究の結果を反映しているかもしれない。興味深いことに、TdP 発生が認められた 2 例のウサギでは、TdP 未発生個体と比較して心室拍動数の低下が強く出現し、MAP₉₀ は明確に延長していた (Table 4-2)。hERG K⁺チャンネル抑制による QT 間隔延長は逆頻度依存性を示すことが知られているため (86)、HCN チャンネル抑制による徐脈が薬理的に ivabradine の催不整脈作用を強力に促進した結果であると考えられる。

4-4-3 臨床への提言

Ivabradine の催不整脈作用の発現には本薬の徐拍化作用が寄与することが明らかとなった。徐拍化作用を有する薬物の催不整脈性の評価には徐脈による修飾を考慮する重要性が示された。Ivabradine は徐拍化が進行した個体で特異的に TdP を誘発したことから、TdP 誘発リスクを考慮すると、ivabradine 処方患者に対し適切に心拍数管理を行う必要がある。

4-5 小括

Ivabradine は TdP 誘発作用を有する薬物であることが示された。Ivabradine の催不整脈作用の出現には本薬自身が有する徐拍化作用の寄与が極めて大きく、薬物自身による徐拍化は薬物性 QT 延長症候群を薬力学的に強力に修飾しうる因子であることが実験的に示された。

総括

本研究は、薬物性 QT 間隔延長と TdP 誘発の関係性と、そこに影響を与える薬理的な要因を明らかにすることを目的に実施されたものである。

創薬における非臨床安全性評価で、薬物性 QT 延長症候群の誘発リスク評価は ICH S7B の考えに基づいて実施される。開発候補化合物が hERG K⁺チャンネル抑制作用と QT 間隔延長作用の両者を示すと TdP 誘発リスクを有する可能性が高いと非臨床段階で判定され、その判断をもとに慎重な臨床開発が進められる。また、リスクとベネフィットの関係から有望な新規薬物の開発が中止となる場合もある。TdP 誘発リスクを直接的に評価することを目的に当研究室で独自開発した *in vivo* ウサギ催不整脈モデル (14) を活用し、第 1 章では hERG K⁺チャンネル抑制作用を有する抗ヒスタミン薬の TdP 誘発リスクを検討した。その結果、hydroxyzine や diphenhydramine は hERG K⁺チャンネル抑制作用と QT 間隔延長作用を示すものの、TdP 誘発作用を示さない薬物であることが示された。QT 間隔延長は TdP 誘発の十分条件とは限らないことが明らかとなり、現行の ICH S7B に基づくリスク評価結果では偽陽性と扱われる事例となることから、創薬戦略に大きな課題を残している可能性がある。薬物性 QT 延長症候群のリスクを高精度に予測していくためには、TdP を誘発しやすい薬物と誘発しにくい薬物の科学的な側面を明らかにする必要があると考えられた。引き続き実施した第 2 章と第 3 章では hERG K⁺チャンネル抑制による QT 間隔延長および TdP 誘発に影響を与える薬理的な要因について検討した。心筋イオンチャンネルやトランスポーター、受容体に焦点をあてた検討により、hERG K⁺チャンネル抑制に L 型 Ca²⁺チャンネル阻害または NCX 阻害作用を共存させると TdP 発生は抑制され、I_{K1} 阻害または Gq タンパク質共役型受容体刺激作用を共存させると TdP 発生が促進されることを明らかにした。このうち、NCX 阻害と I_{K1} 阻害は hERG K⁺チャンネル抑制薬による QT 間隔延長に影響を与えずに TdP 誘発性を変化させた知見は、QT 間隔延長から TdP 誘発までのプロセスを分析可能な *in vivo* ウサギ催不整脈モデルで得られた独自性の高い情報である。これらの結果は、hERG K⁺チャンネル抑制作用を有する薬物に他の薬理作用が同時に存在すると薬物性 QT 延長症候群誘発リスクは抑制的にも促進的にも修飾されうることを示唆しており、非臨床で薬物性 QT 延長症候群の誘発リスクを判定する上で重要なインフォメーションが提示された。また、第 4 章では ivabradine の催不整脈作用は薬物自身の徐拍化作用が強く出現した場合に顕在化することが示された。したがって、薬物による TdP 誘発の可能性は、TdP 発生を抑制または促進する薬理的な修飾作用による影響を踏まえて評価する必要があり、非臨床段階

では未知となる修飾作用が薬物に潜在する可能性を考慮すると、本研究で用いた *in vivo* ウサギ催不整脈モデルを活用した TdP 誘発作用の直接評価は重要な創薬戦略となることが期待される。また、hERG K⁺チャネル抑制活性と同時に本研究で明らかにしたような薬物性 QT 延長症候群の誘発リスクを修飾する薬理作用を創薬の初期段階で確認することは、*in vitro* でリスクを定性的に簡便に予測する手法として有用である。この考え方は新しい心臓安全性評価のパラダイムとして提案された包括的 *in vitro* 催不整脈アッセイ (Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay: CiPA) でも取られており (87)、本研究で得られた成果を相補的に活用することで、催不整脈リスクを高精度に評価するための基盤構築が進展することが期待される。

本研究で明らかにした薬物性 QT 延長症候群の誘発リスクを修飾する薬理的な要因に関する知見は、観点を換えれば、TdP 発生に関わる機構を解釈する上で重要な情報に位置づけられる。第 2 章で示された L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬が hERG K⁺チャネル抑制薬による QT 間隔延長を抑制し、NCX 阻害薬が EAD から R on T 型 PVC が発生する過程を抑制した結果に基づくと、hERG K⁺チャネル抑制による QT 間隔の延長には L 型 Ca²⁺チャネルの開口による内向き Ca²⁺電流の増加が関与し、この増加した細胞内 Ca²⁺を NCX が細胞外に排出する過程で生じる内向き電流が EAD から R on T 型 PVC への移行を促進させる機構の存在が想定される。また、I_{K1} 阻害薬 BaCl₂ が hERG K⁺チャネル抑制薬による R on T 型 PVC 発生を促進し、TdP 発生時の持続時間を延長させた結果に基づくと、I_{K1} は R on T 型 PVC の発生に対して保護的に作用することと、リエントリー基質の形成に対し抑制的な役割を担うことが示唆された。第 3 章で示された Gq タンパク質共役型受容体刺激が hERG K⁺チャネル抑制薬による QT 間隔延長を促進した結果に基づくと、Gq タンパク質共役型受容体活性化は心筋 K⁺チャネル (I_{K1}, I_{Kr}, I_{Ks}, I_{to}) の複合的な抑制 (54-59) を介して心筋再分極時間の延長に関わることが明確にされた。

結語

ウサギ催不整脈モデルを活用した本研究で示されたのは以下の2点である。

- ① 明確な QT 間隔延長作用を示しても TdP を誘発しない薬物の存在が確認され、QT 間隔延長は TdP 発生の必要十分条件ではない。
- ② hERG K⁺チャンネル抑制による QT 間隔延長と TdP 誘発を抑制または促進する薬理的な修飾作用が存在する。

本研究で得られたこれらの知見を踏まえると、薬物性 QT 延長症候群を誘発する可能性が想定される薬物の特性は hERG K⁺チャンネル抑制作用および QT 間隔延長作用の統合的評価では計り知れないものが含まれており、ヒトにおける薬物性 QT 延長症候群の誘発リスクを高精度で予測するにあたり、ウサギ催不整脈モデルなどを用いた不整脈誘発性の直接的な評価の重要性が一連の研究結果より示唆された。さらに、本研究で明らかとなった薬物性 QT 延長症候群のリスクを修飾する薬理的な要因は、TdP 発生機序に関わる重要な機構であると考えられ、不整脈を停止させる新規治療法の開発に基盤となる知見として活用されることが期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました東邦大学薬学部薬物治療学研究室 高原 章 教授に心からの感謝の意を表します。また、本研究成果を纏めるにあたり、親身なる御指導と貴重な御助言を頂きました永澤 悦伸 講師、ならびに相本 恵美 助教に深く感謝致します。併せて、種々のご助言と激励の言葉をいただきました、本学薬学部薬物治療学研究室の皆様にも深く感謝いたします。

本研究は、東邦大学薬学部大本奨学基金の支援により遂行されました。深く感謝いたします。

本研究の審査に際して数々の有益なご助言、ご指摘を賜りました東邦大学薬学部薬物学教室 田中 光 教授、東邦大学薬学部病態生化学研究室 檜貝 考慈 教授、東邦大学薬学部薬物動態学教室 宮内 正二 教授に深く感謝いたします。

令和5年3月
薬物治療学研究室
川上 聡士

参考文献

1. Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med*. 1991;324(12):781-788. doi: 10.1056/NEJM199103213241201.
2. Wallace AA, Stupienski RF III, Kothstein T, Gehret JR, Lynch JJ Jr. Demonstration of proarrhythmic activity with the class IC antiarrhythmic agent encainide in a canine model of previous myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;21(3):397-404. doi: 10.1097/00005344-199303000-00008.
3. Monahan BP, Ferguson CL, Killeavy ES, Lloyd BK, Troy J, Cantilena LR Jr. Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA*. 1990;5;264(21):2788-2790. doi:10.1001/jama.1990.03450210088038.
4. 花粉症薬で不整脈 商品名トリルダン 2年間で10人 厚生省、注意呼びかけ. *朝日新聞*. 1997-02-14, 朝刊, p.38.
5. Yap YG, Camm AJ. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart*. 2003;89(11):1363-1372. doi: 10.1136/heart.89.11.1363.
6. Roden DM. Cellular basis of drug-induced torsades de pointes. *Br J Pharmacol*. 2008;154(7):1502-1507. doi: 10.1038/bjp.2008.238.
7. 日本循環器学会・日本冠疾患学会・日本胸部外科学会・日本小児循環器学会・日本心血管インターベンション学会・日本心血管外科学会・日本心臓病学会・日本心電学会・日本心不全学会・日本不整脈学会合同研究班編 『心臓突然死の予知と予防法のガイドライン（2010年改訂版）』 日本循環器学会. 2010.
8. 日本循環器学会・日本心臓病学会・日本不整脈心電学会合同研究班編 『遺伝性不整脈の診療に関するガイドライン（2017年改訂版）』 日本循環器学会. 2017.
9. Niemeijer MN, van den Berg ME, Eijgelsheim M, et al. Short-term QT variability markers for the prediction of ventricular arrhythmias and sudden cardiac death: a systematic review. *Heart*. 2014;100(23):1831-1836. doi: 10.1136/heartjnl-2014-305671.
10. Hinterseer M, Thomsen MB, Beckmann BM, et al. Beat-to-beat variability of QT intervals is increased in patients with drug-induced long-QT syndrome: a case control pilot study. *Eur Heart J*. 2008;29(2):185-190. doi: 10.1093/eurheartj/ehm586.
11. 高原 章, 中村 裕二, 杉山 篤. 心臓突然死のリスク予測に有用な新指標: beat-to-beat variability of repolarization. *日本薬理学雑誌*. 2011;138(1):43-44.

12. Sugiyama A. Sensitive and reliable proarrhythmia *in vivo* animal models for predicting drug-induced torsades de pointes in patients with remodelled hearts. *Br J Pharmacol.* 2008;154(7):1528-1537. doi: 10.1038/bjp.2008.240.
13. Antzelevitch C. Drug-induced spatial dispersion of repolarization. *Cardiol J.* 2008;15(2):100-121.
14. Hagiwara M, Shibuta S, Takada K, et al. The anaesthetized rabbit with acute atrioventricular block provides a new model for detecting drug-induced Torsade de Pointes. *Br J Pharmacol.* 2017;174(15):2591-2605. doi: 10.1111/bph.13870.
15. Yan GX, Wu Y, Liu T, Wang J, Marinchak RA, Kowey PR. Phase 2 early afterdepolarization as a trigger of polymorphic ventricular tachycardia in acquired long-QT syndrome: direct evidence from intracellular recordings in the intact left ventricular wall. *Circulation.* 2001;103(23):2851-2856. doi: 10.1161/01.cir.103.23.2851.
16. Adgey AA. Warning arrhythmias in ischemic heart disease. *Int J Cardiol.* 1983;4(2):224-228. doi: 10.1016/0167-5273(83)90141-9.
17. Takahara A, Sugiyama A, Ishida Y, et al. Long-term bradycardia caused by atrioventricular block can remodel the canine heart to detect the histamine H₁ blocker terfenadine-induced torsades de pointes arrhythmias. *Br J Pharmacol.* 2006;147(6):634-641. doi: 10.1038/sj.bjp.0706493.
18. Smoczyńska A, Aarnink EW, Dunnink A, et al. Interplay between temporal and spatial dispersion of repolarization in the initiation and perpetuation of torsades de pointes in the chronic atrioventricular block dog. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;321(3):H569-H576. doi: 10.1152/ajpheart.00945.2020.
19. Takahara A, Nakamura Y, Sugiyama A. Beat-to-beat variability of repolarization differentiates the extent of torsadogenic potential of multi ion channel-blockers bepridil and amiodarone. *Eur J Pharmacol.* 2008;596(1-3):127-131. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.08.018.
20. 井上博編 『新不整脈学』 杉本恒明監修 南江堂. 2003.
21. Dessertenne F, Fabiato A, Coumel P. A new chapter of electrocardiography: the progressive variations in the amplitude of the electrocardiogram. 1966. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1991;5(1):171-190. doi: 10.1007/BF03029819.

22. Carlsson L, Almgren O, Duker G. QTU-prolongation and torsades de pointes induced by putative class III antiarrhythmic agents in the rabbit: etiology and interventions. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16(2):276-285. doi: 10.1097/00005344-199008000-00014.
23. Takahara A, Sugiyama A, Satoh Y, Iwasaki H, Nakamura Y, Hashimoto K. Cardiovascular profile of the canine torsades de pointes arrhythmia model assessed by echocardiographic and haemodynamic methods. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007;101(1):35-40. doi: 10.1111/j.1742-7843.2007.00071.x.
24. 小林 加寿子, 永澤 悦伸, 相本 恵美, 高原 章. ICH-S7B ガイドラインに準じた非臨床試験データに関する公開情報に基づいた抗ヒスタミン薬による薬物性 QT 延長症候群のリスク分析. *薬理と治療*. 2017;45(4):571-585.
25. Ridley JM, Milnes JT, Hancox JC, Witchel HJ. Clemastine, a conventional antihistamine, is a high potency inhibitor of the HERG K⁺ channel. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40(1):107-118. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.09.017.
26. Park MH, Lee SH, Chu DH, Won KH, Choi BH, Choe H, Jo SH. Effect of azelastine on cardiac repolarization of guinea-pig cardiomyocytes, hERG K⁺ channel, and human L-type and T-type Ca²⁺ channel. *J Pharmacol Sci*. 2013;123(1):67-77. doi: 10.1254/jphs.12239fp.
27. Zhou Z, Vorperian VR, Gong Q, Zhang S, January CT. Block of HERG potassium channels by the antihistamine astemizole and its metabolites desmethylastemizole and norastemizole. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1999;10(6):836-843. doi: 10.1111/j.1540-8167.1999.tb00264.x.
28. Lu HR, Hermans AN, Gallacher DJ. Does terfenadine-induced ventricular tachycardia/fibrillation directly relate to its QT prolongation and Torsades de Pointes? *Br J Pharmacol*. 2012;166(4):1490-1502. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01880.x.
29. Lee BH, Lee SH, Chu D, et al. Effects of the histamine H₁ receptor antagonist hydroxyzine on hERG K⁺ channels and cardiac action potential duration. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(9):1128-1137. doi: 10.1038/aps.2011.66.
30. Takahara A, Fujiwara K, Ohtsuki A, Oka T, Namekata I, Tanaka H. Effects of the antitussive drug cloperastine on ventricular repolarization in halothane-anesthetized guinea pigs. *J Pharmacol Sci*. 2012;120(3):165-175. doi: 10.1254/jphs.12117fp.

31. Kobayashi K, Omuro N, Takahara A. The conventional antihistamine drug cyproheptadine lacks QT-interval-prolonging action in halothane-anesthetized guinea pigs: comparison with hydroxyzine. *J Pharmacol Sci.* 2014;124(1):92-98. doi: 10.1254/jphs.13159fp.
32. Törneke K, Ingvast-Larsson C, Pettersson K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clemastine in healthy horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 2003;26(2):151-157. doi: 10.1046/j.1365-2885.2003.00460.x.
33. Adusumalli VE, Wong KK, Kucharczyk N, Sofia RD. Pharmacokinetics of azelastine and its active metabolite, desmethylazelastine, in guinea pigs. *Drug Metab Dispos.* 1992;20(4):530-535.
34. Hansson H, Bergvall K, Bondesson U, Hedeland M, Törneke K. Clinical pharmacology of clemastine in healthy dogs. *Vet Dermatol.* 2004;15(3):152-158. doi: 10.1111/j.1365-3164.2004.00367.x.
35. Orvos P, Kohajda Z, Szlovák J, et al. Evaluation of possible proarrhythmic potency: comparison of the effect of dofetilide, cisapride, sotalol, terfenadine, and verapamil on hERG and native I_{Kr} currents and on cardiac action potential. *Toxicol Sci.* 2019;168(2):365-380. doi: 10.1093/toxsci/kfy299.
36. Hagiwara M, Kambayashi R, Aimoto M, Nagasawa Y, Takahara A. *In vivo* analysis of torsadogenic potential of an antipsychotic drug paliperidone using the acute atrioventricular block rabbit as a proarrhythmia model. *J Pharmacol Sci.* 2016;132(1):48-54. doi: 10.1016/j.jphs.2016.05.001.
37. Tse G. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Arrhythm.* 2016;32(2):75-81. doi: 10.1016/j.joa.2015.11.003.
38. Chen X, Simons FE, Simons KJ. Effect of the H₂-receptor antagonist cimetidine, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H₁-receptor antagonists hydroxyzine and cetirizine in rabbits. *Pharm Res.* 1994;11(2):295-300. doi: 10.1023/a:1018971828065.
39. Simons KJ, Chen X, Fraser TG, Simons FE. Effect of cimetidine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorpheniramine and diphenhydramine in rabbits. *Pharm Res.* 1996;13(2):301-304. doi: 10.1023/a:1016011702703.
40. 犀川哲典、小野克重編 『QT 間隔の診かた・考えかた』 有田眞監修 医学書院. 2007.
41. Nagasawa Y, Zhu BM, Chen J, Kamiya K, Miyamoto S, Hashimoto K. Effects of

- SEA0400, a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in the in vivo dogs. *Eur J Pharmacol.* 2005;506(3):249-255. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.11.011.
42. Shiina H, Sugiyama A, Takahara A, Satoh Y, Hashimoto K. Comparison of the electropharmacological effects of verapamil and propranolol in the halothane-anesthetized in vivo canine model under monophasic action potential monitoring. *Jpn Circ J.* 2000;64(10):777-782. doi: 10.1253/jcj.64.777.
 43. Bourgonje VJ, Vos MA, Ozdemir S, et al. Combined $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and L-type calcium channel block as a potential strategy to suppress arrhythmias and maintain ventricular function. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2013;6(2):371-379. doi: 10.1161/CIRCEP.113.000322.
 44. Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol.* 2002;135(5):1096-1100. doi: 10.1038/sj.bjp.0704574.
 45. Yamada M, Ohta K, Niwa A, Tsujino N, Nakada T, Hirose M. Contribution of L-type Ca^{2+} channels to early afterdepolarizations induced by I_{Kr} and I_{Ks} channel suppression in guinea pig ventricular myocytes. *J Membr Biol.* 2008;222(3):151-166. doi: 10.1007/s00232-008-9113-9.
 46. Milberg P, Fink M, Pott C, et al. Blockade of I_{Ca} suppresses early afterdepolarizations and reduces transmural dispersion of repolarization in a whole heart model of chronic heart failure. *Br J Pharmacol.* 2012;166(2):557-568. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01721.x.
 47. Schott GD, McArdle B. Barium-induced skeletal muscle paralysis in the rat, and its relationship to human familial periodic paralysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1974;37(1):32-39. doi: 10.1136/jnnp.37.1.32.
 48. Azam R. *The pharmacology of three inwardly rectifying potassium channels in neonatal rat cardiac myocytes.* [PhD thesis]. London: University College London; 1999.
 49. Biliczki P, Virág L, Iost N, Papp JG, Varró A. Interaction of different potassium channels in cardiac repolarization in dog ventricular preparations: role of repolarization reserve. *Br J Pharmacol.* 2002;137(3):361-368. doi: 10.1038/sj.bjp.0704881.
 50. Park WS, Han J, Earm YE. Physiological role of inward rectifier K^+ channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 2008;457(1):137-147. doi: 10.1007/s00424-008-0512-7.

51. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-1136.
doi: 10.1161/01.cir.74.5.1124.
52. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*. 1992;70(2):223-233.
doi: 10.1161/01.res.70.2.223.
53. Diaz RJ, Zobel C, Cho HC, et al. Selective inhibition of inward rectifier K⁺ channels (Kir2.1 or Kir2.2) abolishes protection by ischemic preconditioning in rabbit ventricular cardiomyocytes. *Circ Res*. 2004;95(3):325-332.
doi: 10.1161/01.RES.0000137727.34938.35.
54. Fedida D, Braun AP, Giles WR. α_1 -Adrenoceptors reduce background K⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol*. 1991;441:673-684. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018772.
55. Sato R, Koumi S. Modulation of the inwardly rectifying K⁺ channel in isolated human atrial myocytes by α_1 -adrenergic stimulation. *J Membr Biol*. 1995;148(2):185-191.
doi: 10.1007/BF00207274.
56. Wang H, Yang B, Zhang Y, et al. Different subtypes of α_1 -adrenoceptor modulate different K⁺ currents via different signaling pathways in canine ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(44):40811-40816. doi: 10.1074/jbc.M105572200.
57. Bian JS, Kagan A, McDonald TV. Molecular analysis of PIP₂ regulation of HERG and I_{Kr}. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(5):H2154-2163.
doi: 10.1152/ajpheart.00120.2004.
58. Matavel A, Lopes CM. PKC activation and PIP₂ depletion underlie biphasic regulation of IKs by Gq-coupled receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(5):704-712.
doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.006.
59. Kurakami K, Norota I, Nasu F, et al. KCNQ1 is internalized by activation of α_1 adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol*. 2019;169:113628. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113628.
60. Shibata S, Seriguchi DG, Iwadare S, Ishida Y, Shibata T. The regional and species differences on the activation of myocardial alpha-adrenoceptors by phenylephrine and methoxamine. *Gen Pharmac*. 1980;11:173-180. doi: 10.1016/0306-3623(80)90057-9.

61. Imagawa J, Nabata H, Sakai K. Comparison of cardiovascular effects of SGB-1534 and prazosin, selective α_1 -adrenoceptor antagonists, in anesthetized dogs. *Jpn J Pharmacol.* 1987;44(1):35-41. doi: 10.1254/jjp.44.35.
62. Chiba K, Hayashi Y, Hisa H, Suzuki-Kusaba M, Satoh S. Effects of a novel α_1 -adrenoceptor antagonist, SGB-1534, on adrenergically induced renal vasoconstriction in dogs. *Eur J Pharmacol.* 1990;176(3):263-269. doi: 10.1016/0014-2999(90)90019-3.
63. Katoh T, Mitamura H, Matsuda N, Takano T, Ogawa S, Kasanuki H. Emergency treatment with nifekalant, a novel class III anti-arrhythmic agent, for life-threatening refractory ventricular tachyarrhythmias: post-marketing special investigation. *Circ J.* 2005;69(10):1237-1243. doi: 10.1253/circj.69.1237.
64. Imai S. The effects of methoxamine upon the membrane resting and action potentials of the guinea pig's ventricular muscle fibres. *Jpn J Physiol.* 1961;11:54-61. doi: 10.2170/jjphysiol.11.54.
65. Nagashima M, Hattori Y, Akaishi Y, et al. α_1 -Adrenoceptor subtypes mediating inotropic and electrophysiological effects in mammalian myocardium. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 2):H1423-1432. doi: 10.1152/ajpheart.1996.271.4.H1423.
66. Sonoyama K, Ninomiya H, Igawa O, et al. Inhibition of inward rectifier K^+ currents by angiotensin II in rat atrial myocytes: lack of effects in cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2006;29(11):923-934. doi: 10.1291/hypres.29.923.
67. Wang YH, Shi CX, Dong F, Sheng JW, Xu YF. Inhibition of the rapid component of the delayed rectifier potassium current in ventricular myocytes by angiotensin II via the AT_1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2008;154(2):429-439. doi: 10.1038/bjp.2008.95.
68. Gou X, Wang W, Zou S, Qi Y, Xu Y. Protein kinase C epsilon mediates the inhibition of angiotensin II on the slowly activating delayed-rectifier potassium current through channel phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;116:165-174. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.02.010.
69. Tyan L, Turner D, Komp KR, Medvedev RY, Lim E, Glukhov AV. Caveolin-3 is required for regulation of transient outward potassium current by angiotensin II in mouse atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(2):H787-H797. doi: 10.1152/ajpheart.00569.2020.

70. Varró A, Baczkó I. Cardiac ventricular repolarization reserve: a principle for understanding drug-related proarrhythmic risk. *Br J Pharmacol.* 2011;164(1):14-36. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01367.x.
71. Kobrin I, Stessman J, Yagil Y, Ben-Ishay D. Prazosin-induced bradycardia in acute treatment of hypertension. *Arch Intern Med.* 1983;143(10):2019-2023. doi: 10.1001/archinte.1983.00350100203049.
72. Paakkari I and Puurunen J. Vagally mediated bradycardiac effect of prazosin in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 1984;105(3-4):223-228. doi: 10.1016/0014-2999(84)90613-7.
73. Endoh M, Schümann HJ. Frequency-dependence of the positive inotropic effect of methoxamine and naphazoline mediated by α -adrenoceptors in the isolated rabbit papillary muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1975;287(4):377-389. doi: 10.1007/BF00500039.
74. Parker C, Li Q, Fedida D. Non-specific action of methoxamine on I_{to} , and the cloned channels hKv 1.5 and Kv 4.2. *Br J Pharmacol.* 1999;126(3):595-606. doi: 10.1038/sj.bjp.0702335.
75. Oros A, Houtman MJ, Neco P, et al. Robust anti-arrhythmic efficacy of verapamil and flunarizine against dofetilide-induced TdP arrhythmias is based upon a shared and a different mode of action. *Br J Pharmacol.* 2010;161(1):162-175. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00883.x.
76. Wu L, Ma J, Li H, et al. Late sodium current contributes to the reverse rate-dependent effect of I_{Kr} inhibition on ventricular repolarization. *Circulation.* 2011;123(16):1713-1720. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000661.
77. Johnson DM, Heijman J, Bode EF, et al. Diastolic spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum increases beat-to-beat variability of repolarization in canine ventricular myocytes after β -adrenergic stimulation. *Circ Res.* 2013;112(2):246-256. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.275735.
78. Antoons G, Johnson DM, Dries E, et al. Calcium release near L-type calcium channels promotes beat-to-beat variability in ventricular myocytes from the chronic AV block dog. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):326-334. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.008.

79. Ide T, Ohtani K, Higo T, Tanaka M, Kawasaki Y, Tsutsui H. Ivabradine for the treatment of cardiovascular diseases. *Circ J*. 2019;83(2):252-260. doi: 10.1253/circj.CJ-18-1184.
80. Koncz I, Szél T, Bitay M, et al. Electrophysiological effects of ivabradine in dog and human cardiac preparations: potential antiarrhythmic actions. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(3):419-426. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.07.025.
81. コララン®錠 2.5 mg/5 mg/7.5 mg 医薬品インタビューフォーム第5版. 小野薬品工業(株). 2021.
82. Jang JH, Kwon SW, Lee MJ, et al. Ivabradine-induced torsade de pointes in patients with heart failure reduced ejection fraction. *Int Heart J*. 2020;61(5):1044-1048. doi: 10.1536/ihj.20-073.
83. Manz M, Reuter M, Lauck G, Omran H, Jung W. A single intravenous dose of ivabradine, a novel I_f inhibitor, lowers heart rate but does not depress left ventricular function in patients with left ventricular dysfunction. *Cardiology*. 2003;100(3):149-155. doi: 10.1159/000073933.
84. De Ferrari GM, Mazzuero A, Agnesina L, et al. Favourable effects of heart rate reduction with intravenous administration of ivabradine in patients with advanced heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(6):550-555. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.04.005.
85. Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol*. 1996;118(4):1051-1057. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15505.x.
86. Hondeghem LM, Snyders DJ. Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation*. 1990;81(2):686-690. doi: 10.1161/01.cir.81.2.686.
87. Sager PT, Gintant G, Turner JR, Pettit S, Stockbridge N. Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: a meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. *Am Heart J*. 2014;167(3):292-300. doi: 10.1016/j.ahj.2013.11.004.