

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	横 山 亜 由 美
学 位 論 文 題 目			
洞結節・房室結節細胞に及ぼすカルベジロールの電気生理学的作用			
北海道医学雑誌 80巻 平成17年 掲載予定			
研 究 目 的			
<p>カルベジロールはα_1受容体遮断作用に基づく血管拡張作用と強いアポトーシス抑制効果、抗酸化作用、リモデリング抑制効果等を併せ持つユニークな非選択性β受容体遮断薬である。本剤は、心不全患者の心機能の改善や死亡率の減少をもたらすこと、突然死ならびに心室性頻拍、心室細動を減少させることがこれまでに報告されており、近年注目を集めている。これらの心室性不整脈減少効果は本剤の直接的作用によるものか、心機能改善等による二次的な効果であるのかは明らかではない。最近、カルベジロールが家兎心室筋細胞において主に急速活性型遅延整流カリウム電流(I_{Kr})とL型カルシウム電流(I_{Ca})を抑制すること、ヒトether-a-go-go関連遺伝子(HERG)で発現されたI_{Kr}を抑制することが報告されている。つまり、本剤にはβ受容体遮断作用以外にI_{Kr}、I_{Ca}抑制を介する直接的な抗不整脈作用の存在することが明らかにされた。一方、本剤の結節細胞や上室性不整脈に対する効果に関する検討は未だ十分にはなされていない。洞結節は心臓の歩調取りを司り、房室結節は上室性不整脈の発現に密接に関与している。また、近年、器質的心疾患を有さない患者に生じる心房細動の多くが肺静脈起源であることが判明し、肺静脈にも結節細胞様の細胞が認められることから、結節細胞系が上室性不整脈に一層重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。そこで本研究では、カルベジロールの直接的抗不整脈効果発現の機序に結節細胞への作用が含まれるのか否かを明らかにすべく、本剤の結節細胞活動電位およびイオン電流に及ぼす効果について、全膜電位固定法を用いて検討した。</p>			
対 象 と 方 法			
<p>体重300-500 gのモルモットの心室筋細胞と洞結節細胞、および体重1.5-2.0 kgの家兎の洞結節細胞と房室結節細胞を用いて以下の実験を行った。</p> <p>A) 心筋細胞単離法および全膜電位固定法</p> <p>モルモットの摘出心にランゲンドルフ灌流を行い、コラゲナーゼ処理をした後、心室筋を細切、濾過した後に単离心室筋細胞を得た。また、モルモットおよび家兎の摘出心に同様にランゲンドルフ灌流、コラゲナーゼ処理を行い、解剖学的洞結節、房室結節領域を切除した後、洞結節(SAN)細胞にはコラゲナーゼとエラスターゼを、房室結節(AVN)細胞にはコラゲナーゼを暴露し、単離</p>			

結節細胞を得た。全膜電位固定法には抵抗が1.5–3 M Ω のガラス微小電極を使用し、吸引による陰圧で細胞膜に固定した。結節細胞の活動電位測定にはnystatin permeabilized法を用いた。

B) 実験プロトコール

(1) モルモット心室筋細胞、SAN細胞に及ぼすカルベジロールの電気生理学的作用

カルベジロール投与前後におけるモルモット心室筋細胞活動電位を記録した。また、モルモットSAN細胞の自発活動電位を記録し、薬剤投与前後の変化を検討した。

(2) 家兎SAN細胞およびAVN細胞に及ぼすカルベジロールの電気生理学的作用

家兎結節細胞の自発活動電位をカルベジロール投与前後で記録し、自発興奮周期：SCL(ms)、50%活動電位持続時間：APD₅₀(ms)、90%活動電位持続時間：APD₉₀(ms)、活動電位振幅：APA(mV)、オーバーシュート：OS(mV)、最大拡張期電位：MDP(mV)、最大脱分極速度：MRD(V/s)の各指標を計測した。次に、本剤のカルシウム電流(I_{Ca})、遅延整流K電流(時間依存性外向きK電流： $I_{K\ out}$ 、遅延整流K電流の末尾電流： $I_{K\ tail}$)、過分極誘発内向き電流(I_f)に及ぼす効果について検討し、カルベジロールの各濃度における結節細胞 I_{Ca} 、 $I_{K\ tail}$ 、 I_f に対する抑制率を測定した。

計測値は実測値もしくは平均値±標準誤差で記し、推計学的処理には対応のあるT検定を用い、危険率が0.05未満の場合に有意とした。

成 績

(1) モルモット心室筋細胞、SAN細胞に及ぼすカルベジロールの電気生理学的作用

カルベジロール1 μ M灌流によりモルモット心室筋細胞のAPD₉₀は、平均29%延長した(n=7)。SAN細胞の自発活動電位記録では自発興奮頻度の減少、MDPの減少、APD₉₀の延長とMRDの抑制が認められた。電圧固定実験では、心室筋細胞の内向き整流カリウム電流(I_{K1})はカルベジロール3 μ Mにても変化しなかったが、L型カルシウム電流(I_{Ca})はカルベジロール3 μ Mにより48%減少した。時間依存性外向きK電流($I_{K\ out}$)はカルベジロール1 μ M、3 μ M灌流によりそれぞれ39%、66%減少し、 I_{K} の末尾電流($I_{K\ tail}$)はそれぞれ48%、73%減少した。

(2) 家兎結節細胞に及ぼすカルベジロールの電気生理学的作用

家兎結節細胞の自発活動電位実験では、カルベジロールは0.1 μ Mから濃度依存性に陰性変時作用を示し、活動電位持続時間を延長させた。7例のAVN細胞の成績では、カルベジロール1 μ M灌流によりSCL、APD₉₀はそれぞれ289±21 msから373±36 msへ、117±7 msから140±11 msへと延長した(いずれもp<0.05)。また、MDPは-59±3 mVから-56±4 mVへと浅くなり、APAは85±3 mVから81±3 mVへと減少した(いずれもp<0.05)。MRDは4.2±0.6 V/sから3.5±0.5 V/sへと減少した(p<0.05)。電圧固定実験では、カルベジロール1 μ Mにより家兎SAN細胞の I_{Ca} は577±258 pAから367±226 pAへと36%減少し(n=5、p<0.01)、AVN細胞の I_{Ca} は463±104 pAから293±68 pAへと37%減少した(n=6、p<0.05)。SAN細胞の $I_{K\ tail}$ 、 $I_{K\ out}$ は99±22 pAから29±7 pA、258±32 pAから141±19 pAへとそれぞれ70%、45%(いずれもn=5、p<0.05)、AVN細胞の $I_{K\ tail}$ 、 $I_{K\ out}$ は97±37 pAから44±24 pA、201±18 pAから130±21 pAへとそれぞれ54%(n=6、p<0.01)、35%(n=5、p<0.05)減少した。SAN細胞の I_f は802±167 pAから555±121 pAへと31%減少した(n=8、p<0.01)。SAN細胞の I_{Ca} 、 $I_{K\ tail}$ 、 I_f はカルベジロールにより濃度依存性に抑制され、各濃度における抑制率(カルベジロール投与後の各イオン電流値)/(コントロール時の各イオン電流値)は $I_{K\ tail}$ > I_{Ca} > I_f の順に大きかつ

た ($1\mu\text{M}$ でそれぞれ0.33、0.62、0.72)。

考 案

本研究により、カルベジロールは結節細胞の自動能ならびに再分極をいずれも抑制すること、すなわち、本剤が結節細胞に対して陰性変時作用を示すとともに、III群様の抗不整脈作用を有することが明らかになった。

結節細胞に対する β 受容体遮断薬の電気生理学的効果としては、 β 受容体刺激によって生ずる第4相脱分極の促進、再分極の促進、MDPの増大をブロックすることが報告されている。一方、 β 受容体遮断薬の種類によっては β 受容体遮断効果に加え、内因性交感神経刺激作用 (ISA)、膜安定化作用 (MSA) の有無とは別に、種々の電気生理学的作用をもたらす得ることが示唆されていたが、その作用についての検討は十分にはなされていなかった。本研究は、最近大規模臨床試験により心不全での有用性が確認され、使用頻度が増加している β 受容体遮断薬カルベジロールの β 受容体遮断以外の直接的な抗不整脈効果を単離結節細胞を用いて自発活動電位、イオン電流の両面から検討したはじめての報告である。

カルベジロールによる結節細胞自発活動電位の変化をイオン電流の面から解析すると、結節細胞の第4相脱分極は主として I_K の脱活性化と背景ナトリウム電流 ($I_{b,Na}$)、 I_f 、遷延性内向き電流 (I_{st}) のバランスにより形成されることから、第4相脱分極の抑制は主として I_K の抑制、一部は I_f の抑制によるものと考えられた。また、MDPの減少には I_K の抑制作用が、MRDの低下には I_{Ca} の抑制作用が関与しているものと考えられた。APDについては I_{Ca} は延長、 I_K は短縮させる方向に働くが、カルベジロールによる結節細胞APDの延長は、 I_K の減少が I_{Ca} の減少を凌駕したために生じたと考えられた。

本結果を臨床不整脈への効果という観点から考察すると、カルベジロールは臨床使用域で、結節細胞の I_K を抑制しIII群抗不整脈薬と同様のAPD延長作用を有すること、 I_{Ca} を抑制し結節細胞自動能を抑制する方向に働くことから、本剤は洞結節を介する不整脈や房室結節を介した不整脈、さらに肺静脈起源の心房頻拍や心房細動にも有効である可能性が示唆された。本結果と、過去の臨床研究結果とをあわせると、心不全患者の予後改善に本剤の不整脈抑制効果も寄与している可能性が考えられた。

結 論

本研究により、カルベジロールは洞結節・房室結節細胞において、III群抗不整脈薬類似の I_K 抑制作用と I_{Ca} 、 I_f 抑制作用を示し、結節細胞の自動能を抑制、活動電位を延長させることがはじめて明らかにされた。本剤の自動能抑制作用、再分極抑制作用は種々の上室性不整脈に有効である可能性が強く示唆された。

引 用 文 献

- 1 Packer M, Fowler MB, Roecker EB, Coats AJS, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Staiger C, Holcslaw TL, Amann-Zalan I, DeMets DL (Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) Study Group). Effect of carvedilol on

the morbidity of patients with severe chronic heart failure. *Circulation* 2002; 106: 2194-2199.

- 2 Cheng J, Niwa R, Kamiya K, Toyama J, Kodama I. Carvedilol blocks the repolarizing K⁺ and the L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1999; 376: 189-201.
- 3 Dukes ID, Vaughan Williams EM. Electrophysiological effects of α -adrenoceptor antagonists in rabbit sino-atrial node, cardiac Purkinje cells and papillary muscles. *Br J Pharmacol* 1984 : 83; 419-426.

参 考 論 文

- 1 川村祐一郎、横山亜由美、角地祐幸、佐藤伸之、菊池健次郎：通常型心房粗動アブレーション後の自律神経機能変化：焼灼部位による差異を含めた検討. *J Cardiol* 2000; 36: 103-111
- 2 Kawamura Y, Yoshida A, Toyoshima E, Sato N, Kawashima E, Hasebe N, Kikuchi K, Matsuhashi H. A case of cardiac sarcoidosis -Significance of ventricular tachycardia originating from the septum-. *Jpn Circ J* 1998; 62: 458-461
- 3 吉田亜由美、松本博之、飯田康人、高橋啓、藤田結花、辻忠克、藤兼俊明、清水哲雄、小笠原英紀、佐藤義徳：慢性結核性膿胸に併発した胸壁原発悪性リンパ腫の 1 例. *結核* 1996; 71: 415-421.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	横山 亜由美
審査委員長 菊池 健次郎 ㊞			
審査委員 高井 章 ㊞			
審査委員 柏柳 誠 ㊞			
学位論文題目			
洞結節・房室結節細胞に及ぼすカルベジロールの電気生理学的作用			
<p>カルベジロール (Carved.) は、α_1 受容体遮断、アポトーシス抑制、抗酸化作用、心筋リモデリング抑制作用等を併せ持つ非選択性 β 遮断薬で、大規模臨床試験において、心不全患者の生命予後改善、致死性不整脈および突然死抑制効果のあることが示され、日本では β 遮断薬中、最も繁用されている。また、最近、本剤には β 受容体遮断作用以外に急速活性型遅延整流カリウム電流と L 型カルシウム電流を抑制するなど他の β 遮断薬とは異なる抗不整脈作用のあることが示されている。一方、ペースメーカーとなる洞結節や上室性不整脈の発現に関わる房室結節に対する Carved. の直接的抗不整脈作用の有無、その機序は明らかではない。そこで論文提出者は、Carved. の直接的抗不整脈作用の機序に結節細胞の活動電位やイオン電流に及ぼす効果が包含されるか否かについて全膜電位固定法を用いて検討した。</p> <p>実験材料には、それぞれ単離したモルモットの心室筋細胞と洞結節細胞、および家兎の洞結節細胞と房室結節細胞を用いた。実験の結果、Carved. は洞結節・房室結節細胞に対して、β 受容体遮断作用とは異なる時間依存性外向きカリウム電流 ($I_{k\ out}$) 及び末尾カリ</p>			

ウム電流 ($I_{k\text{tail}}$) の用量依存性の抑制と、一部過分極誘発内向き電流 (I_f) の抑制を介して第 4 相脱分極、すなわち自動能抑制、陰性変時効果を発揮することが初めて示された。また、Carved. は I_k の抑制を介して最大拡張期電位 (MDP) を、L 型 Ca 電流 (I_{ca}) 抑制を介して最大脱分極速度 (MRD) を低下させることが明らかとなった。そして、 I_{ca} の抑制を上回る I_k の抑制により活動電位持続時間 (APD) を延長させ、再分極を抑制することも示された。これらの結果は、Carved. が β 受容体遮断作用とは別に結節細胞の自動能や再分極抑制を介して心房頻拍や心房細動を含む上室性不整脈の発現抑制ひいては心不全の予後改善に寄与する可能性を示唆するもので、心不全治療における Carved. の有用性の機序のさらなる解明に資するところ少なくないと考えられる。

なお、審査委員による論文提出者に対する論文内容および関連領域の試問に対し適切な回答が得られ学力も十分と判断された。以上より、本審査委員会は本論文を博士 (医学) に値すると判定した。