モルモット単一心室筋Naチャンネルに及ぼすBepridilの電気生理学的作用

佐藤伸之*¹ 川村祐一郎*¹ 菊池健次郎*¹ 田中邦雄*²

モルモット単一心室筋細胞のNa電流 (I_{Na}) に対するbepridilの作用を吸引電極法を用いて検討した。

bepridilは -140 mVの静止状態から -30 mVへの脱分極により活性化される I_{Na} を用量依存性に減少させた (解離定数 $369 \mu\text{M}$)。本用量曲線は保持電位を -90 mVにすると低濃度側へ平行移動した。2連パルス法による I_{Na} の遮断発現過程実験では、本剤は4 msの条件パルスでは I_{Na} を14%遮断し、16 ms以上では不活性化状態の I_{Na} をより顕著に遮断した。本剤は顕著な使用依存性抑制を示し、 I_{Na} 遮断が定常状態に達するまで迅速であった。定常状態における I_{Na} の不活性化曲線は、本剤 $10 \mu\text{M}$ により11 mV過分極側に偏位したが、勾配因子は不変であった。不活性化された I_{Na} の回復過程は、 -140 mVにおいて290 msの時定数を示した。以上より、bepridilはNaチャンネルの静止状態よりも不活性化状態に高い親和性を有するが、活性化チャンネルブロックも一部もたらすこと、チャンネルからの解離が速いことが明らかとなった。

(心電図 15 : No. 6, 674~681, 1995)

I. 緒 言

Bepridil は比較的新しく開発されたCaチャンネルブロッカーであり、抗狭心症作用と共に抗不整脈作用を有するユニークな薬剤である。臨床的に本剤は房室結節回帰性頻拍や副伝導路が関与する上室性頻拍、心房細動、心室性不整脈等多彩な不整脈に有効であるこ

とが明らかにされており^{1)~3)}、抗不整脈薬としてもこれまでの薬とは異なった位置づけをされ、その効果が期待されている。

電気生理学的に本薬剤はVaughan Williams分類のclass IaまたはIb, III, IVの特性を有すると考えられ、その薬理作用は複雑と言える。即ち、本剤は心房筋、心室筋においては最大脱分極速度を減少させ、活動電位持続時間を延長させるが^{4),5)}、Purkinje線維においては最大脱分極速度を減少させるとともに活動電位持続時間を短縮させるとされている^{5),6)}。また、IV群の作用として洞結節の自発性興奮頻度と活動電位振幅を短縮させ、拡張期脱分極を緩徐にするとともに房室結節内

Key Words ●ベプリジル
●Naチャンネル
●単一心室筋細胞

* 1 旭川医科大学第一内科
(〒078 北海道旭川市西神楽4線5号)
* 2 旭川医科大学実験実習機器センター

Block of sodium channel by bepridil in isolated guinea pig ventricular myocytes.
Nobuyuki Sato, Yuichiro Kawamura, Kenjiro Kikuchi, Kunio Tanaka

1994年10月27日 原稿受領/1995年5月22日 掲載承認

伝導時間及び不応期を延長させる^{5),7)}。一方、イオンチャンネルに及ぼす効果としては、CaチャンネルとNaチャンネルの遮断作用^{8),9)}に加えて、最近本剤がIII群の抗不整脈薬と同様にK⁺電流(遅延外向きK電流(I_k), 内向き整流K電流(I_{K1}), 一過性外向き電流(I_{to}))を抑制することが示され、心電図上のQT延長は主としてK⁺電流遮断によると考えられるようになった¹⁰⁾。さらに最近のNaチャンネルへの結合・解離速度による抗不整脈薬の細分類の見地からは、本剤はlidocaineに類似したfast kinetic drugに属することが示されている¹¹⁾。しかしながら、本剤のNaチャンネル抑制の詳細なメカニズムについては未だ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、全膜電位固定法を用い、bepridilのモルモット心室筋Naチャンネル抑制の機序を明らかにすることを目的とした。

II. 方 法

1. 心筋細胞単離法

体重300~500 gのモルモットをペントバルビタール・ナトリウム(30 mg/kg)を用いて腹腔内麻酔した後、開胸し大動脈に逆行性にカニューレを挿入、次いで心臓を摘出しLangendorff灌流を行った。37°Cの温度下で最初にTyrode液を100 ml、次にCa-free液を100 ml、さらにコラーゲナーゼ(Yakult, Japan) 0.1 mg/mlを含むCa-free液を30分間灌流し最後にstorage solutionを100 ml灌流した。続いて心室筋を細切、ナイロンメッシュで濾した後、濾液を遠心分離して単離心室筋細胞を得た。得られた心室筋細胞をアルカリプロテアーゼ0.04 mg/mlを含む保存液で37°C下に15分間インキュベートした後、再び遠心し、4°C下に保存した。モルモット心室筋単離に用いた各液の組成はTyrode液(mM) ; NaCl 143, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.25, HEPES 5, glucose 5.5, (NaOHにて7.4に滴定), storage solution(mM) ; KOH 70, KCl 40, L-glutamic acid 50, taur-

ine 20, KH₂PO₄ 20, MgCl₂ 3, glucose 10, HEPES 10, EGTA 0.5 (KOHにて7.4に滴定)であり、電気生理学的実験の灌流液組成は、細胞外液(mM) ; NaCl 20, CsCl 5, MgCl₂ 1.2, CoCl₂ 3, tetramethyl ammonium(TMA)-chloride 120, glucose 5.6, HEPES 5 (TMA hydroxideで7.4に滴定), 細胞内液(mM) ; NaF 15, CsF 135, HEPES 10, EGTA 5 (CsOHにて7.2に滴定)であった。

膜電位固定法はHamil¹²⁾らのwhole cell clamp法に従い、増幅器は吉井らの作成したもの(ACT ME model TM-1000)を用いた¹³⁾。電流信号は10 KHzのlow pass filterにて処理された。吸引電極は抵抗が0.8~1.3 MΩのものを使用した。得られたデータをデジタルオシロスコープ(Nicolet 310, 周波数帯域0~300 KHz, サンプルレート確度1 MHz)及びコンピューター(NEC 9801)画面上に表示し、同時にデジタルデータレコーダー(Shoshin EM PCM-DP 16, 周波数帯域0~2 KHz)よりビデオレコーダーに保存した。これらの実験データをデジタルオシロスコープ(Nicolet 310)及びコンピューター(NEC 9801)にて解析し、X-Yレコーダー(Graphtec WX 2400)にて図示した。

実験にあたっては10分間の対照時をおき、-140 mVから-30 mVへの脱分極を与えた時の電流が安定していることを確認した上で実験プロトコルを始めた。実験は室温(20°C)にて施行した。使用薬剤(bepridil hydrochloride, Sigma)は10⁻³Mの濃度で保存し、実験前に希釈して使用した。統計処理にはStudent paired t testを用い、P<0.05を有意と判定した。

III. 結 果

1. Bepridilによる定常状態のNa電流の抑制

図1-Aに-140 mVの保持電位から-30 mVへの脱分極により活性化されるI_{Na}の実

図1 Bepridilの電流電圧曲線に及ぼす効果

図1-Aは -140 mVの保持電位から -30 mVへの脱分極により得られた実電流記録(図左は対照時, 図中央は bepridil $300 \mu\text{M}$ 灌流後, 図右は wash out 後)を, 図1-Bは bepridil $300 \mu\text{M}$ 灌流前後の電流電圧曲線を示す。テストパルスは30秒に1回の頻度で与えられた。

電流記録を, 図1-Bに種々の電位に脱分極させた際に得られた電流電圧曲線薬剤灌流前後で示した。対照時, Na 電流は -50 mVより活性化され -30 mVで最高値を示し, 8 mVで極性を転じた。 $300 \mu\text{M}$ bepridil 灌流により I_{Na} は約40%減少したが, 電流電圧曲線の形状に変化はみられなかった。

2. Bepridil による I_{Na} 遮断の用量反応曲線

図2に保持電位 -140 mV, -90 mVにおける用量反応曲線を示す。bepridilは濃度依存性に I_{Na} を抑制し, 本用量反応曲線は, 保持電位を -90 mVに減少させると, ほぼ10分の1の低濃度側に偏位した。 -90 mVにおける解離定数(K_d)は $43 \mu\text{M}$, -140 mVにおける K_d は $369 \mu\text{M}$ であり, 次式により求めた Hill 係数は -90 mVにおいて1.32, -140 mVにおいて1.30であった。

$$I/I_{\text{cont}} = 1 / [1 + (C/K_d)^n]$$

図2 Bepridilによる I_{Na} 遮断の用量反応曲線

保持電位 -140 mV, -90 mVにおける用量反応曲線を示す。保持電位 -140 mV, -90 mVから -30 mVへ20 msの脱分極パルスを与えた際の I_{Na} を各濃度で検討した。横軸に bepridil 濃度を, 縦軸に対照時の I_{Na} により正規化された各濃度における I_{Na} を示す。図の各点は -90 mV, -140 mVともに4例の平均±標準偏差で表示した。

(I は bepridil 灌流後の Na 電流値, I_{cont} は対照時の Na 電流値, C は bepridil の濃度, K_d は解離定数, n は Hill 係数を表す。)

3. I_{Na} の定常状態の不活性化曲線に及ぼす bepridil の効果

Na チャネルの定常状態における不活性化に及ぼす bepridil の効果を調べるため, 2段パルス法を用い, I_{Na} の不活性化曲線を求めた。パルスプロトコールは挿入図3-Cの如くで, -140 mVの保持電位から種々の電位へ3秒の条件パルスを与え, -140 mVに5 ms戻した後再び -30 mVへ20 msのテストパルスを与え, その際に発現する Na 電流を検討した。図3-Aはテストパルスで得られた電流値を各条件電位に対してプロットしたものであり, 図3-Bは図3-Aを正規化することにより得られた定常状態における I_{Na} の不活性化曲線である。正規化した不活性化曲線は $h = 1 / \{1 + \exp[(V_m - V_h)/k]\}$, (V_m : 条件パルス電位, V_h : $h = 0.5$ となる電位, k = 勾配因子) の式でフィットさせた。 $10 \mu\text{M}$ bepridil 灌流により定常状態の不活性化曲線は対照群の $V_h = 78.0 \pm 3.8$ mV から -89.0 ± 3.5 mV へと過分極側に有意に偏位したが ($p < 0.05$), 勾配因子は 5.3 ± 2.0 mV から 5.2

±1.1 mV と有意な変化を示さなかった (n=5)。

4. Bepridil による I_{Na} の使用依存性抑制

図 4-A は本剤 10 μ M 灌流下, -140 mV の保持電位から -30 mV へ種々の間隔 (1000 ms, 500 ms, 200 ms) の 10 連続脱分極パルスを与えた際に発現する Na 電流を重ね書きしたものであり, 図 4-B は各パルスにおける Na 電流を第 1 発目に対する比で表したものである。bepridil は Na チャネルに対し顕著な使用依存性抑制を示し, I_{Na} 遮断が定常状態に達するまで非常に迅速であった。即ちパルス間隔 1000 ms, 500 ms, 200 ms における I_{Na} の抑制は 5 拍目, 10 拍目においていずれも同率であり, それぞれ 9%, 18%, 30% で

図 3 I_{Na} の定常状態の不活性化曲線に及ぼす bepridil の効果

図 3-A は -140 mV の保持電位から種々の電位へ 3 秒の条件パルスを与え, -140 mV に 5 ms 戻した後 -30 mV へ 20 ms のテストパルスを与えた際に発現する Na 電流を各条件電位に対してプロットしたものであり, 図 3-B は図 3-A を正規化することにより得られた定常状態における I_{Na} の不活性化曲線である。本標本では bepridil は不活性化曲線を 8 mV 過分極側に偏位させたが勾配因子は不変に留まった。尚, 1 連のパルスは 30 秒に 1 回の頻度で与えられ, 全実験は 15 分で終了した。

あった。

5. Bepridil による I_{Na} 遮断の発現過程

Bepridil の Na チャネルへの結合様式と親和性を明らかにするため, 2 段パルス法を用いて Na 電流遮断の時間経過を調べた。膜を -140 mV に保持後, -30 mV への条件パルスを種々の幅で与え, 薬剤が結合していないチャネルが十分に回復可能な 250 ms の間隔を置いた後, -30 mV へ再びテストパルスを与えた際に活性化される I_{Na} を薬剤灌流前後で検討した。図 5-A は 10 μ M の bepridil 投与後の条件パルスとテストパルスで活性化される Na 電流を重ね書きしたものであり, 図 5-B は条件電位とテストパルスにおける Na 電流の比を条件間隔に対してプロットしたものである。対照群には, テストパルスにおける電流値は 128 ms の条件間隔においても不変であった。一方, 10 μ M bepridil 灌流時には 4 ms の条件パルスで I_{Na} は 14% 遮断され, 16 ms 以上の条件パルスではより顕著に不活性化状態の I_{Na} が遮断された (n=4)。

6. I_{Na} の不活性化からの回復に及ぼす bepridil の効果

Na チャネルの不活性化からの回復過程を調べるため, 挿入図 6-C に示すような 2 段パルス法を用いて検討した。即ち, -140 mV の保持電位から -30 mV へ 3 秒の条件パルスを与えた後, -140 mV へ種々の回復間隔を与え再び -30 mV への脱分極パルスを与えた際に発現する Na 電流を薬剤灌流前後で比較した。図 6-A は bepridil 10 μ M 存在下の条件パルスとテストパルスにおける Na 電流の実記録を示しており, 図 6-B は各回復間隔に対し Na 電流の unrecovered fraction ($1 - I_{test}/I_{cont}$) を片対数プロットしたものである。

対照時, Na 電流は 300 ms 以内に回復したが, bepridil 10 μ M 存在下では 272 ms の時定数を有する slow phase が出現した。5 例の平均では slow phase の時定数は 290 ± 34 ms であった。

図4 Bepridilによる I_{Na} の使用依存性抑制

図4-Aは -140 mVの保持電位から -30 mVへ10連続の脱分極パルス(パルス幅1 s)を種々のパルス間隔(1000 ms(黒丸), 500 ms(黒四角), 200 ms(黒三角))で与えた際のNa電流実記録の重ね書きを示したものであり, 図4-Bは各パルスにおけるNa電流を第1発目に対する比で示したものである。bepridilはNaチャネルに対し顕著な使用依存性抑制を示し, I_{Na} 遮断はいずれのパルス間隔においても第2~3発目で定常状態に達した。

IV. 考 察

本研究により bepridil は濃度依存性に Na 電流を抑制することが明らかになった。また, 本薬剤の保持電位 -140 mVの際のKdは 369μ M, -90 mVの際のKdは 43μ Mであることから, 本剤はNaチャネルの静止状態よりも不活性化状態により高い親和性を持つことが明らかになった。定常状態におけるNaチャネルの不活性化曲線が過分極側に偏位することも不活性化状態への高親和性を裏付ける結果であった。このことは臨床的に長い活動電位持続時間を有する心室筋や Purkinje 線維に対し伝導抑制をもたらすことと関連し, 本剤の心室性不整脈抑制機序の一つと考えられた。

本薬剤の有効血漿濃度は 0.5 – 5μ Mであり, 本剤の蛋白結合率は97%であることから遊離薬物濃度は 0.001 – 0.01μ Mと計算される¹⁴⁾。従って, 本実験結果と考えあわせるとより臨床使用域における I_{Na} の静止時ブロックはほとんどないものと考えられる。一方,

Bean¹⁵⁾による次式

$$dVh =$$

$$k \times 1 n [(1 + [D]/Kd_{rest}) / (1 + [D]/Kd_i)]$$

Kd_{rest}: 静止状態における解離定数

Kd_i: 不活性化状態における解離定数

dVh: 不活性化状態における中間点偏位

k: 勾配因子

D: bepridil の濃度

から求めた不活性化状態における解離定数(Ki)は 1.5μ Mであり, この値を用いると不活性化チャネル遮断率は bepridil 遊離血漿濃度 0.01μ Mで9%と計算される。この値は小さくはあるが, 臨床使用域である程度の使用頻度依存性抑制が生じ得ると考えられる。

I_{Na} 遮断の発現過程に関する実験では, Naチャネルが活性化状態にあると考えられる4 msの条件パルスでは本剤のNaチャネル抑制率は14%であるのに対し, 16 ms以上の条件パルスではより顕著に不活性化状態の I_{Na} が遮断された。また, bepridil 投与前後での時間依存性電流減衰はほぼ不変であった。以上より, 本剤のNaチャネル遮断の機序として

図5 Bepridilによる I_{Na} 遮断の発現過程

膜を -140 mVに保持後、 -30 mVへの条件パルスと種々の幅で与え、250 msの間隔を置いた後、 -30 mVへ再びテストパルスを与えた際に発現する I_{Na} を示す。

図5-Aは10 μ Mのbepridil投与後の条件パルスとテストパルスで活性化されるNa電流を重ね書きしたものであり、図5-Bは条件パルスとテストパルスにおけるNa電流の比を片対数表示した条件間隔に対してプロットしたものである。白丸は対照時、黒丸は10 μ M bepridil灌流時のNa電流比を示す。

は不活性化チャネルブロックが主体であるが、活性化チャネルブロックも一部関与する可能性が考えられた。ところで臨床的に bepridil は心室性不整脈のみならず房室結節回帰性頻拍や副伝導路を介する上室性頻拍、心房細動にも有用であることが示されている^{1)~3)}。本剤はNaチャネルやCaチャネルの遮断作用に加えてKチャネル遮断作用を有していること¹⁰⁾から、これら上室性不整脈の抑制機序としてはCaチャネル抑制による房室結節伝導抑制やKチャネル遮断による心房筋、房室結節の不応期延長作用に加えて、Naチャネルへの活性化チャネルブロックも

図6 I_{Na} の不活性化からの回復に及ぼす bepridil の効果

-140 mVの保持電位から -30 mVへ3秒の条件パルスを与えた後、 -140 mVへ種々の回復間隔を与え、再び -30 mVへの脱分極パルスを与えた際に発現するNa電流を図示した。1連のパルスは30秒に1回与えられた。

図6-Aはbepridil 10 μ M存在下の条件パルスにおけるNa電流(図左)とテストパルスにおけるNa電流を重ね書きしたもの(図右)であり、図6-Bは各回復間隔に対しNa電流のunrecovered fraction ($1 - I_{test}/I_{cond}$)を片対数プロットしたものである。対照時、Na電流は300 ms以内に回復したが、bepridil 10 μ M存在下では272 msの時定数を有するslow phaseが出現した。

I_{cond} : 条件パルスにおけるNa電流

I_{test} : テストパルスにおけるNa電流

一部関与する可能性が示唆された。

本剤は顕著な使用依存性抑制を示し、 I_{Na} 遮断が定常状態に達するまで迅速であった。また、本剤はNaチャネルの不活性化からの回復を遅らせたが、bepridil投与後のslow成分の時定数は 290 ± 34 msと比較的小さく、Naチャネルへの結合・解離速度による抗不整脈薬の細分類の見地からは、本剤はlidocaineに類似したfast kinetic drugに属することが示唆された。Annoらはモルモットの活動電位実験において、本薬剤の使用依存性抑制からの回復時定数が 602 ± 34 msであることから本剤がfast kinetic drugであることを

示し¹¹⁾、また、Yataniらは新生児ラット心室筋細胞を用いた実験より、保持電位 -80 mV における本剤の不活性化からの回復時定数は $290 \pm 130\text{ ms}$ と報告している⁹⁾。Naチャネルの不活性化からの回復時定数は膜電位に依存するため本実験結果とこれらの結果とを単純に比較することはできないが、いずれの結果も本剤がfast drugであることを示していた。CAST以降抗不整脈薬の催不整脈作用が注目されており、encainideやflecainide等のIc群は十分慎重に投与するよう勧告されている¹⁶⁾が、本剤は薬剤のNaチャネルへの結合・解離の見地からはlidocaineと同様のfast drugであり、その意味では本剤は臨床的に使用し易い薬剤であると考えられた。過去の報告では、Naチャネル遮断のKdは -80 mV の保持電位で $30\text{ }\mu\text{M}$ (ラット心室筋データ)、Caチャネル遮断のKdは $0.5\text{ }\mu\text{M}$ (モルモット心室筋)、Kチャネル(遅延外向きK電流)を70%遮断する濃度は $1.8\text{ }\mu\text{M}$ (ヒツジPurkinje線維)と報告されている^{9),10)}。このようにNaチャネル遮断効果に関して(種差による可能性はあるものの)、他のチャネル遮断効果より弱い可能性が報じられているが、先述のように $10\text{ }\mu\text{M}$ で顕著な使用依存性抑制が生じること、臨床有効域でbepridilはHV時間を延長させること¹⁷⁾等から、本剤のNaチャネル遮断作用も、多彩な不整脈に対する抑制機序の1つになり得ると考えられた。

以上を総合すると、bepridilはNaチャネルの静止状態よりも不活性化状態に高い親和性を有すること、本剤のNaチャネルへの遮断様式としては不活性化チャネルブロックが主体であるが、活性化チャネルブロックも一部関与すること、本剤のNaチャネルへの結合・解離に基づく分類からはlidocaineと同様のfast kinetic drugであることが示された。

〔文 献〕

- 1) Touboul P, Atallah G, Kirkorian G, Lavanaud P, Kieny JR, Mathieu M, Dellinger A : Electrophysiological action of bepridil on atrioventricular accessory pathways. *Br Heart J* 58 : 333, 1987
- 2) Rowland E, McKenna WJ, Krikler DM : Electrophysiologic and antiarrhythmic action of bepridil. Comparison with verapamil and ajmaline for atrioventricular reentrant tachycardia. *Am J Cardiol* 55 : 1513, 1985
- 3) Perelaman MS, McKenna WJ, Rowland E, Krickler DM : A comparison of bepridil with amiodarone in the treatment of established atrial fibrillation. *Br Heart J* 58 : 339, 1987
- 4) Winslow E, Kane KA : Supraventricular antidysrhythmic and electrophysiological effects of bepridil, a new antianginal agent. *J Cardiovasc Pharmacol* 3 : 665, 1981
- 5) Kato R, Singh BN : Effects of bepridil on the electrophysiologic properties of isolated canine and rabbit myocardial fibers. *Am Heart J* 111 : 271, 1986
- 6) Kane KA, Winslow E : Antidysrhythmic and electrophysiological effects of a new antianginal agent, bepridil. *J Cardiovasc Pharmacol* 2 : 193, 1980
- 7) Anno T, Furuta T, Itoh M, Kodama I, Toyama J, Yamada K : Electromechanical effects of bepridil on rabbit isolated hearts. *Br J Pharmacol* 81 : 42, 1984
- 8) Vogel S, Crampton R, Sperelakis N : Selective blockade of myocardial slow channel by bepridil. *Clin Res* 27 : 212A, 1979
- 9) Yatani A, Brown AM, Schwartz A : Bepridil block of cardiac calcium and sodium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 237 : 9, 1986
- 10) Berger F, Borchard U, Hafner D : Effects of the calcium entry blocker bepridil on repolarizing and pacemaker currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 339 : 638, 1989
- 11) Anno T, Furuta T, Itoh M, Kodama I, Toyama J, Yamada K : Effects of bepridil on the electrophysiological properties of guinea pig ventricular muscles. *Br J Pharmacol* 81 : 589, 1984
- 12) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv* 391 : 85, 1981

- 13) Narahashi T, Tsunoo A, Yoshii M : Characterization of two types of Ca^{++} channels in neuroblastoma cells. *J Physiol* 383 : 231, 1987
- 14) Benet LZ : Pharmacokinetics and metabolism of bepridil. *Am J Cardiol* 55 : 8C, 1985
- 15) Bean BP, Cohen AJ, Tsien RW : Lidocaine block of sodium channels. *J Gen Physiol* 81 : 613, 1983
- 16) The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators, Preliminary report : Effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 321 : 406, 1989
- 17) Singh BN, Nademanee K, Feld G, Piontek M, Schwab M : Comparative electrophysiologic profiles of calcium antagonist with particular reference to bepridil. *Am J Cardiol* 55 (suppl) : 14C, 1985