アゼルニジピンのclonedカルシウムチャネルサブタイプに対する特異性

古川泰司* 佐川俊世* 渡 雄至* 大賀恭司*
渡辺 優* 小金澤 哲* 本田充喜* 一色高明*

ジヒドロピリジン系カルシウム遮断薬(DHP)アゼルニジピンの, 各種カルシウムチャネルサブタイプ特異性を検討するために, アフリカツメガエル(*Xenopus Laevis*)卵母細胞, ならびにBaby Hamster Kidney(BHK)細胞に各種カルシウムチャネルサブタイプを発現させ, 膜電流に対するアゼルニジピンの作用を電気生理学的に測定した. アゼルニジピン 10 μ M 溶液を作用させると, アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたL型カルシウムチャネルは, 保持電位 - 100mVにおいて 31.8 ± 5.1 %抑制された. アゼルニジピンはP/Q型, R型チャネルに対しては抑制作用をもたなかったが, N型, T型チャネルに対しては抑制作用を示した. 50 %抑制濃度を比較すると, N型チャネルはL型の約6倍, T型チャネルはL型の約2倍であった. 一方, BHK細胞に発現させた, T型チャネルに対する抑制作用は, アフリカツメガエル卵母細胞と比較して増強され, 50 %抑制濃度は約 1/9 となった. 以上より, アゼルニジピンはL型チャネルのみならず, N型, T型チャネルに対しても, 比較できる程度の抑制作用を有する薬物であると考えられた. (心電図, 2005 ; 25 : 210 ~ 217)

Keywords

- カルシウムチャネルサブタイプ
- アゼルニジピン
- アフリカツメガエル卵母細胞
- 全細胞膜電位固定
- Baby Hamster Kidney 細胞

* 帝京大学医学部内科
(〒173-8605 東京都板橋区加賀2-11-1)

I. はじめに

アゼルニジピンはジヒドロピリジン系カルシウム遮断薬(DHP)であるが, その臨床薬理効果は, 他の同一骨格を有するカルシウム遮断薬とは異なり, 降圧効果に加え, 心拍数を減少させる作用を有することが示されている¹⁾. この効果は, 一般に反射性交感神経刺激作用を有するDHPとしては特殊なものであり, 降圧薬として長期予後改善効果を期待する

Specificity of azelnidipine block on cloned calcium channel subtypes

Taiji Furukawa, Toshio Sagawa, Yuji Watari, Kyoji Oga, Suguru Watanabe, Satoshi Koganesawa, Mitsuyoshi Honda, Takaaki Isshiki

2004年12月7日 原稿受領 / 2005年3月16日 掲載承認

際には好ましい薬理作用であると考えられる²⁾。同薬物の心拍数減少作用に関しては、薬物血行動態の観点より、その非常に長い半減期が関与すると考えられているが、アゼルニジピン同様に血中半減期の長いアムロジピンでは同作用は明らかではなく、薬物血行動態のみでこの作用を説明できるか否かは不明である。

一方、同薬物のカルシウムチャンネルサブタイプ特異性はいまだ明らかにされていない。DHPの多くは、L型以外の高閾値活性型カルシウムチャンネル(N型、P/Q型)に対し抑制作用を有することが知られる³⁾。また、エホニジピンは低閾値活性型カルシウムチャンネルであるT型カルシウムチャンネルに対して抑制作用を有する⁴⁾。N型チャンネルはカテコールアミンの放出に⁵⁾、T型チャンネルは洞結節細胞の歩調取り電位に関与することより⁶⁾、これらチャンネルサブタイプの抑制は徐脈化に寄与する可能性がある。そこで、今回の研究では、組み換え遺伝子を用いて各種カルシウムチャンネルサブタイプをアフリカツメガエル(*Xenopus Laevis*)に発現させ、単一チャンネルサブタイプに対するアゼルニジピンの作用を電気生理学的に検討した。また、T型カルシウムチャンネルに関しては、哺乳類細胞であるBaby Hamster Kidney (BHK)細胞に発現させ、卵母細胞での結果と比較した。

II. 方 法

1. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験

すでに筆者らが報告したものと同様の方法で⁷⁾、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて機能的チャンネル発現と膜電流の測定を行い、アゼルニジピンの単一チャンネルサブタイプ由来の膜電流に対する作用を測定した。概説すると、コラゲナーゼ処理により単離した成熟雌アフリカツメガエル卵母細胞(以下、卵母細胞)に、各チャンネルサブタイプに特異的なcRNAを微量注入し、3ないし5日の培養の後、目的とするチャンネルを発現した細胞を用いて計測を行った。使用したのは、 Ca^{2+} チャンネル α_{1A} サブユニット($\text{Ca}_v2.1$)⁸⁾、

Ca^{2+} チャンネル α_{1B} サブユニット($\text{Ca}_v2.2$)⁸⁾、 Ca^{2+} チャンネル α_{1C} サブユニット($\text{Ca}_v1.2$)⁸⁾、 Ca^{2+} チャンネル α_{1E} サブユニット($\text{Ca}_v2.3$)⁸⁾、 Ca^{2+} チャンネル α_{1G} サブユニット($\text{Ca}_v3.1$)⁹⁾、 Ca^{2+} チャンネル α_{2A} サブユニット⁸⁾、 Ca^{2+} チャンネル β_{2A} 、ならびに β_{2A} サブユニット¹⁰⁾。各RNAの最終濃度は α_1 サブユニット0.15 $\mu\text{g/ml}$ 、 α_2 サブユニット0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、 β_{2A} サブユニット0.05 $\mu\text{g/ml}$ となるようにした。

電気生理学的計測には、卵母細胞を灌流槽(RZ-3Z, Warner, USA)内に置き、GeneClamp500(Axon Instruments, Foster City, CA, USA)を用いて二重微小電極膜電位固定法(double microelectrode voltage clamp method)を適用した。電流計測にはP + P/4プロトコール¹¹⁾を用い、容量ならびにリーク電流の補正を行った。細胞外液の組成は下記のとおりである(単位mM): BaCl_2 40, tetraethyl ammonium hydroxide(TEA-OH)90, KOH 4, methane sulfonic acid 130, HEPES 5, niflumic acid 0.3(methane sulfonic acidによりpH7.5に調製)。灌流槽は毎分約2mlの流量で灌流した。すべての計測は $20 \pm 2^\circ\text{C}$ で行った。膜電流を活性化するための、各脱分極パルスは10秒ごとに与えた。

2. Baby-Hamster-Kidney細胞を用いた実験

BHK細胞¹²⁾はDMEM培地(Gibco/BRL)中で培養した。チャンネル蛋白の一過性発現には、 α_{1G} カルシウムチャンネルを含むプラスミドを用い、遺伝子導入確認用のGreen fluorescent protein(GFP)DNAとco-transfectionを行った¹³⁾。発現用のプラスミドは35mmのシャーレに播き、Lipofectamin®試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて遺伝子導入を行った。チャンネルならびにGFP発現用のプラスミドの重量比は20:1とした。細胞はカバーガラス上で培養し、24~48時間の間に電気生理学的計測を行った。

電気生理学的測定用の灌流槽(CF-10, Warner)は、容量0.5mlで、細胞外液を毎分1mlで灌流した。膜電流は、Axopatch 200A電位固定用増幅器(Axon Instruments)を用いwhole cell patch clamp法¹⁴⁾に

よって計測した。ピペット内液組成は(単位 mM) : CsCl 150, MgCl₂ 3.0, Na₂-ATP 5.0, EGTA 5.0, HEPES 5.0 (CsOH により pH7.2 に調製), とした。細胞外液の組成は MgCl₂ 0.5, BaCl₂ 5, CsCl 5.4, tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) 132, HEPES 10, 4-aminopyridine 3.0, glucose 5.5 (TEA-OH にて pH7.4 に調製) とした¹³⁾。パッチクランプ用の電極は, 外径 1.5mm のパイレックスガラス (World Precision Instruments inc., TW-150-4, Sarasota, FL, USA) より微小電極作製機 (Sutter Instrument Company, P-87, Novato, CA, USA) を用いて作製し, 前述の細胞内液を満たしたとき, 電極抵抗が 2~4MΩ となるように調節した。すべての実験は, 22 ± 1℃ で行った。Series resistance の補正は総抵抗に対し 75% ないし 85% の比率で行い, 容量電流ならびにリーク電流の補正には卵母細胞での実験同様 P + P/4 プロトコルを用いた。

バリウム電流の測定結果は, 周波数 10kHz で AD-DA converter (Digidata® 1200, Axon Instruments) を通じて PC-AT compatible personal computer の外部記憶装置にデジタルデータとして保存した。高周波フィルターとして, low-pass Bessel filter (CyberAmp® 320, Axon Instruments) を用い, カットオフ周波数は 2kHz とした。実験終了後, 電流値の計測は pClamp® software version 6.04 (Axon Instruments) を用いて行った。

3. 薬物その他

アゼルニジピンは宇部興産株式会社から提供を受けた。その他の薬物は Sigma (USA) より購入した。アゼルニジピンはジメチルスルホキシドに溶解し, 50mM 溶液とした後, 最終濃度になるように灌流液中に添加した。対照時ならびに低濃度の灌流液を用いる場合も, ジメチルスルホキシドの濃度は常に 0.2% となるように調製した。

測定結果は AD-DA converter (Digidata® 1200) を通じて personal computer の外部記憶装置にデジタルデータとして保存し, 実験終了後に各種計測を行った。電流値の計測は pClamp® software version

6.04 と自家製の解析ソフトウェアを用いて行った。

チャンネル抑制作用の濃度作用関係は, 以下の式:

$$\text{抑制率 (\%)} = 100 / (1 + (IC_{50} / [C])^n)$$

に対して, 最も誤差の小さくなるパラメーター, IC₅₀ と n を求めた。ここに, [C] は薬剤濃度を示し, IC₅₀ は 50% 抑制率を与える濃度, n は Hill 係数を示す。数式への実験結果の当てはめと, パラメーターの推定には JMP® version 5.1 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) の Nonlinear Fitting を用いた。

実験結果は平均値 ± 標準誤差の形式で表記した。多群間の平均値の比較には Analysis of Variance with post-hoc test を用い, p < 0.05 を有意とした。

III. 結 果

1. アゼルニジピンの卵母細胞発現電流に対する作用

図 1 に, 5 種類のカルシウムチャンネルサブタイプをそれぞれ発現させた卵母細胞における, アゼルニジピンの作用を示す。図上段は, 薬物作用前 (対照時) と, アゼルニジピン 10μM 作用 5 分後の膜電流の重ね合わせ記録である。保持電位 -100mV より, 最大内向き電流を与える膜電位へ脱分極パルスを与えている。図に示した実験では, L 型チャンネル発現卵母細胞において, 約 30% の膜電流抑制が認められる。P/Q 型, R 型チャンネル発現卵母細胞においては, アゼルニジピン作用後も膜電流はほとんど変化しなかった。しかし, T 型チャンネル発現卵母細胞では, L 型チャンネルの場合とほぼ同程度の, また, N 型チャンネル発現卵母細胞でも, これより弱いものの明らかな膜電流減少が認められた。図下段は, 同一実験条件での複数例の結果をまとめたもので, 膜電流抑制率の平均値である。P/Q 型, R 型チャンネルに対しては, 事実上なんら作用を及ぼしていないことがわかる。残る 3 種のチャンネルサブタイプでは, 抑制率は L > T > N 型の順に大きかった。

図 1 の実験より, L 型, N 型, T 型 3 種類のチャネ

図1 アゼルニジピンの各種カルシウムチャネルサブタイプに対する抑制作用

保持電位 -100mVにおいて、細胞外より10 μ Mのアゼルニジピンを5分間作用させた際の、膜電流抑制率を示す。図上段には、各サブタイプの代表的実験における、薬物作用前後の膜電流重ね合わせ記録を示している。

図2 3種のカルシウムチャネルサブタイプにおける、アゼルニジピン作用の濃度作用関係

L, N, T型チャネルサブタイプにおいて、薬物濃度と保持電位を変化させ、抑制率との関係を見た。

ルサブタイプについては、薬剤感受性があると判断し、濃度作用関係と抑制作用の保持電位依存性について検討を行った。結果を図2に示す。保持電位は、-100mV、-80mVと-60mVに変化させて、

各保持電位で抑制率を計測した。今回の実験条件で、30 μ Mの溶液を作製すると、明らかな沈殿物を認めたので、濃度は10 μ Mまで検討した。図に明らかにように、アゼルニジピンは各チャネルサブタイプに

表1 アゼルニジピンの各カルシウムチャネルサブタイプ抑制作用

保持電位		卵母細胞			BHK細胞
		L型	N型	T型	T型
-60mV	IC ₅₀ (μM)	9.3±2.5	45.8±7.3	35.8±8.4	1.4±0.6
	n _H	0.7±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.5±0.2
		(n= 8)	(n= 8)	(n= 8)	(n= 6)
-80mV	IC ₅₀ (μM)	15.0±7.8	120.2±31.8	34.6±6.4	3.4±2.8
	n _H	0.6±0.2	0.8±0.2	0.5±0.2	0.7±0.2
		(n= 9)	(n= 8)	(n= 13)	(n= 8)
-100mV	IC ₅₀ (μM)	22.4±7.6	270.7±82.1	87.3±6.1	9.8±4.8
	n _H	0.6±0.2	0.6±0.2	0.6±0.2	0.7±0.2
		(n= 9)	(n= 8)	(n= 21)	(n= 5)

図3 BHK細胞における、アゼルニジピンのT型チャネルサブタイプに対する作用
発現系を卵母細胞からBHK細胞に変えて、T型(α_{1G})チャネルに対する抑制作用を検討した。
A：アゼルニジピン作用前後の膜電流重ね合わせ記録。B：アゼルニジピン抑制作用の濃度作用関係。

対して、濃度依存性の抑制作用を有していた。この結果から、類推されるIC₅₀を、表1にまとめた。保持電位依存性に関して、N型チャネルに対しては、脱分極による抑制率増加が認められた($p < 0.05$)。L、T型チャネルでも同様の傾向は認められたが、統計的有意差は認められなかった。

2. アゼルニジピンのBHK細胞発現電流に対する作用

次に、BHK細胞にT型カルシウムチャネル(α_{1G})

を発現させ、このチャネルに対するアゼルニジピンの作用を検討した。図3に示されるごとく、アゼルニジピンは、卵母細胞におけるより低い濃度で、T型チャネルを抑制した。図3Aは、保持電位-80mVで1 μMのアゼルニジピンを作用させた前後の膜電流の重ね合わせ記録である。同実験では、膜電流は42%抑制された。図3Bは3種類の保持電位における濃度作用関係を示す。アゼルニジピンの膜電流抑制作用は0.1 μMより明らかであり、また卵母細胞

での実験とは異なり、明らかな保持電位依存性がみられた。各膜電位における推定IC₅₀は、卵母細胞における結果とともに、表1にまとめた。

IV. 考 察

今回の検討は、新規に日本国内で使用できるようになったDHPアゼルニジピンのカルシウムチャネルサブタイプに対する抑制作用を検討する目的で、遺伝子発現カルシウムチャネルに対する同薬物作用を電気生理学的に計測した。同薬剤は臨床的に、有意な心拍数減少作用を有することが明らかにされており¹⁾、通常、反射性の交感神経刺激作用から心拍数を増加させることの多いDHPとしては特異な薬効を有している。結果として、アゼルニジピンはL型に加え、N型、T型チャネルに対して、L型よりは弱い、抑制作用を有することが明らかとなった。N型チャネルは、交感神経末端よりのカテコールアミンの遊離に⁵⁾、T型チャネルは洞結節細胞の歩調取りに⁶⁾関与することが知られており、いずれもその抑制は心拍数減少に寄与すると推定される。しかし、同薬物の心拍数減少作用を、これらチャネルサブタイプに対する作用のみで説明できるとは考えられない。他のDHPの非L型チャネルサブタイプに対する作用を同一の実験系で検討した結果をみると、N型チャネルサブタイプに対してはアムロジピンが³⁾、T型チャネルサブタイプに対しては、エホニジピンが⁹⁾より強い抑制作用を有していた。この2種のDHPは、反射性交感神経刺激作用が少ないことを特徴としているが、有意の徐脈化作用は有しておらず、アゼルニジピンの作用についてはなんらかの別の機序を想定する必要があると考える。

心拍数減少作用を考察するうえで、同薬剤は30時間を超える効力の半減期を有し、この点も反射性の交感神経刺激作用を起こしにくい特性である。しかし、降圧効果・心拍数減少作用ともその発現に8週を超える長期間の投与を必要とすることから¹⁾、組織・細胞のリモデリングも視野に入れた検討が必要であると思われる。

実験のうえでの技術的問題としては、アゼルニジピンの細胞外溶液に対する溶解度の問題があった。作成しえた溶液としては10 μ Mが最高濃度で、このため濃度作用関係をみるうえで、さらに高濃度溶液での抑制率が確認できず、計算されたIC₅₀は推定値の域を出ない。しかし、チャネルサブタイプ間の作用強度の差をみるためには、有用な情報が得られたと考える。この点を考慮しつつ、アゼルニジピンのチャネルサブタイプ特異性をみると、N型チャネル抑制作用を有しながら、P/Q型チャネル抑制作用が弱いことが注目される。これまで我々が報告してきたDHPの非L型チャネル抑制作用をまとめると^{3), 15)}、R型チャネルを抑制するものはなく、エホニジピンは、LとT型チャネルのみに作用を有し、シルニジピンはN型、P/Q型に抑制作用を示すが、T型抑制作用はもたない。他の非L型チャネル抑制作用を有するDHPは、T、NとP/Q型にはある程度の抑制作用を有しており、N型チャネル抑制作用を有しながらP/Q型抑制作用をもたないのはアゼルニジピンのみである。同薬物が、N型チャネルにのみ有意な電位依存性抑制作用を示したことと併せ、薬物構造とチャネルサブタイプ特異性、薬物の生理学的作用を考えるうえで考慮すべき知見と考える。

DHPのチャネル抑制作用を、単離細胞や発現系を用いて電気生理学的に検討した報告は相当数にのぼるが^{3), 16)}、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験ではその抑制作用は哺乳類細胞を用いた実験より減弱する傾向がある。その原因は詳細には検討されていないが、細胞内成分や細胞膜組成の差によるチャネル性質の変化^{17), 18)}、細胞外液組成など実験環境の差などが指摘されている¹⁹⁾。例えば、エホニジピンについて、そのカルシウムチャネル抑制作用が、用いた発現系に影響を受け、同じチャネルサブタイプでも卵母細胞ではBHKと比較すると、その抑制作用は約1/10になり、抑制の膜電位依存性も認めたいと報告されている¹⁹⁾。本稿では、アゼルニジピンについても、同様の影響があるかT型チャネルを用いて検討したが、確認された α_{1G} チャネルに対す

るアゼルニジピン抑制作用の IC_{50} は、卵母細胞においてBHK細胞の場合の約9倍であり、エホニジピンとはほぼ同様の傾向が確認できた。また、その抑制の保持電位依存性が、卵母細胞では認めがたく、BHK細胞では認められる点もほぼ同様の結果である。哺乳類細胞で薬剤感受性と電位依存性が増強するという結果は、同薬剤の非L型チャンネル抑制作用が臨床的に効果を示している可能性を示唆する所見である。

次に、今回の結果の臨床的意義と、各種DHP中におけるアゼルニジピンの位置づけにつき、若干の考察を加えてみる。DHPの高血圧治療における長期予後改善効果は、多くの大規模臨床試験によって確認されている。これらの試験でDHPとしてはアムロジピンがプロトタイプとして最も頻用されている^{20)~22)}。アムロジピンは、L、N、P/Q、T型チャンネルに抑制作用をもち、最も標的サブタイプの多い薬物である。アゼルニジピンは、アムロジピンと同様標的サブタイプが多い薬物であるが、上述のごとく、P/Q型チャンネル抑制作用をもたない。このことより、臨床研究データが集積し、アムロジピンとの比較検討がなされることにより、P/Q型チャンネル抑制効果の生理学的・臨床的意義を浮かび上がらせることが期待される。また、近年の大規模臨床試験では、試験目的の主眼は、長期予後改善効果が証明された降圧薬のクラス間の比較に移ってきている。最近行われた、ALLHAT²¹⁾やThe Value Study²²⁾では、アムロジピンとACE阻害薬やアンギオテンシン受容体遮断薬との比較検討が行われている。このような臨床試験において、クラス間の薬剤効果を比較するにあたっては、そのプロトタイプとして選択された薬剤の薬理特性が十分に解明されている必要があり、また、単一薬剤の結果がクラス全体に当てはまるか否かは必ずしも明らかでないことは、留意されるべきと考える。

今後、各DHPのチャンネルサブタイプ選択性を明らかにしたうえで、各種臨床試験の解釈が行われることが望まれる。

【謝辞】本研究にあたり、cDNAをご提供頂いた、東京都精神医学総合研究所の額田敏秀博士に幸甚なる感謝を表します。

【文 献】

- 1) Kuramoto K, Ichikawa S, Hirai A, Kanada S, Nakachi T, Ogihara T : Azelnidipine and amlodipine : a comparison of their pharmacokinetics and effects on ambulatory blood pressure. *Hypertens Res*, 2003 ; 26 : 201 ~ 208
- 2) 南 順一, 石光俊彦, 松岡博昭 : 【心血管危険因子の進展】心拍数と心拍変動. 血圧, 2003 ; 10 : 815 ~ 820
- 3) Furukawa T, Yamakawa T, Midera T, Sagawa T, Mori Y, Nukada T : Selectivities of dihydropyridine derivatives in blocking Ca^{2+} channel subtypes expressed in xenopus oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999 ; 291 : 464 ~ 473
- 4) Tanaka H, Shigenobu K : Efonidipine hydrochloride : a dual blocker of L-and T-type Ca^{2+} channels. *Cardiovasc Drug Rev*, 2002 ; 20 : 81 ~ 92
- 5) Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, Tsien RW : Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science*, 1988 ; 239 : 57 ~ 61
- 6) Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M : Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*, 1988 ; 395 : 233 ~ 253
- 7) Furukawa T, Nukada T, Suzuki K, Fujita Y, Mori Y, Nishimura M, Yamanaka M : Voltage and pH dependent block of cloned N-type Ca^{2+} channels by amlodipine. *Br J Pharmacol*, 1997 ; 121 : 1136 ~ 1140
- 8) Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S : Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, 1989 ; 340 : 230 ~ 233
- 9) Furukawa T, Miura R, Honda M, Kamiya N, Mori Y, Takeshita S, Isshiki T, Nukada T : Identification of R(-) -isomer of efonidipine as a selective blocker of T-type Ca^{2+} channels. *Br J Pharmacol*, 2004 ; 143 : 1050 ~ 1057
- 10) Mori Y, Friedrich T, Kim M-S, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, Mikoshiba K, Imoto K, Tanabe T, Numa S : Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature*, 1991 ;

- 350 : 398 ~ 402
- 11) Bezanilla F, Armstrong CM : Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol*, 1977 ; 70 : 549 ~ 566
 - 12) Talavera A, Basilico C : Temperature sensitive mutants of BHK cells affected in cell cycle progression. *J Cell Physiol*, 1977 ; 92 : 425 ~ 436
 - 13) Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H, Teramoto T, Tanaka I, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y, Sekiguchi N, Mori E, Mori Y, Imoto K : Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. *J Biol Chem*, 1998 ; 273 : 34857 ~ 34867
 - 14) 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 Arch*, 1981 ; 391 : 85 ~ 100
 - 15) Furukawa T, Nukada T, Miura R, Ooga K, Honda M, Watanabe S, Koganesawa S, Isshiki T : Differential blocking action of dihydropyridine Ca^{2+} antagonists on a T - type Ca^{2+} channel ($\alpha 1\text{G}$) expressed in xenopus oocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005 ; 45 : 241 ~ 246
 - 16) Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA : Molecular diversity of voltage - dependent Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci*, 1991 ; 12 : 349 ~ 354
 - 17) Cannon B, Hermansson M, Gyorke S, Somerharju P, Virtanen JA, Cheng KH : Regulation of calcium channel activity by lipid domain formation in planar lipid bilayers. *Biophys J*, 2003 ; 85 : 933 ~ 942
 - 18) Mason RP : Membrane interaction of calcium channel antagonists modulated by cholesterol. Implications for drug activity. *Biochem Pharmacol*, 1993 ; 45 : 2173 ~ 2183
 - 19) Furukawa T, Miura R, Honda M, Kamiya N, Mori Y, Takeshita S, Isshiki T, Nukada T : Identification of R (-) -isomer of efonidipine as a selective blocker of T-type Ca^{2+} channels. *Br J Pharmacol*, 2004 ; 143 : 1050 ~ 1057
 - 20) Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P, Thompson PD, Ghali M, Garza D, Berman L, Shi H, Buebendorf E, Topol EJ : Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure : the CAMELOT study : a randomized controlled trial. *JAMA*, 2004 ; 292 : 2217 ~ 2225
 - 21) Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic : The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA*, 2002 ; 288 : 2981 ~ 2997
 - 22) Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B, Zanchetti A : Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine : the VALUE randomised trial. *Lancet*, 2004 ; 363 : 2022 ~ 2031