

論文内容の要旨

論文題目 Cardiovascular Protective Effects of Amiodarone Hydrochloride, an Antiarrhythmic Agent, via Nitric Oxide Production

和訳 抗不整脈薬 塩酸アミオダロンの一酸化窒素産生を介した心血管保護作用に関する研究

指導教員 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 岸田信也

塩酸アミオダロン($C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$; 以下 アミオダロン) は Vaughan Williams の分類でクラス III の薬理学的作用をもつ抗不整脈剤である。主な作用である K チャネル抑制作用に加えて β 遮断作用、Ca チャネル抑制作用、Na チャネル抑制作用が知られており、心室筋とプルキンエ線維の活動電位持続時間延長および不応期を延長する作用を有する。日本国内では、生命に危険のある重症な心室細動、心室頻拍、肥大型心筋症に伴う心房細動に対する適用承認が得られている薬剤である。アミオダロンは肝臓で主要代謝物である N- デスエチルアミオダロン(N-desethylamiodarone; 以下 DEA)に代謝される。慢性投与患者における両者の血中濃度はほぼ同程度であるとされているが、後者も強力な薬理作用を有することが知られている。

アミオダロンが強い抗不整脈作用を有するにもかかわらず、他の抗不整脈薬と比べて、催不整脈性が低い。さらに、心機能が低下した患者における生存率に対して悪影響を及ぼさないばかりではなく、むしろ心血管系保護作用を呈すると報告されているのは特筆に値すべきことであるが、その原因については未だ解明されていない。過去の研究では、アミオダロンやその代謝物である DEA が動物やヒトにおいて血管平滑筋を弛緩させ、末梢血管抵抗を低下させ後負荷を減少させるほか、左心室駆出率を増加させるなど、心血管系保護作用を有することが報告されているものの、その機序については詳細な検討がなされていない。

私は、アミオダロンが血管内皮由来型一酸化窒素産生を増加させることが、心血管系保護作用を呈する一因であると考え、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、アミオダロンおよび DEA の一酸化窒素産生作用に及ぼす影響を調べるとともに、その作用機序に関する研究を行った。

[方法] ヒト臍帯静脈内皮細胞培養細胞を購入し、3-6 世代の細胞を実験に用いた。塩酸アミオダロンはシグマ社より購入し、その主要代謝物 DEA は Sanofi-Aventis 社より提供された pure substance を用いた。一酸化窒素の放出は、以下の 2 種類の方法により測定し

た。まず、Griess 法を用いて、一酸化窒素の安定代謝物である亜硝酸イオンの培養液中濃度を spectrophotometer で測定することにより検討した。6 穴プレートを用いて N=6 とし て実験を行った。また、この作用を確認するため、一部の実験は amino-600 sensor electrode (Innovative Instruments Inc.)を用いた一酸化窒素高感受性微小電極(the inNO nitric oxide measurement system)により直接的に測定を行った。

アミオダロンが、臨床濃度およびこれを上回る濃度において細胞死やアポトーシスをもたらすか否かについては、各濃度での細胞数の観察のほか、細胞死の指標として LDH の測定を行い、4 用量で処理した際のアポトーシスの検出には Enzo Life Science 社の ApopDETEK and Horseradish peroxidase-DAB *in situ* detection system kit を用いた。

作用機序について検討するため、一酸化窒素産生を阻害する可能性が想定される内皮性一酸化窒素合成酵素阻害薬である L-NAME、カルシウムキレート剤である EGTA、非選択的カルシウムチャンネル遮断作用を有する塩化ニッケル、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway 阻害薬である LY294002 および MAP kinase 阻害薬である SB202190 とともに培養を行い一酸化窒素産生への影響を調べた。また RT-PCR 法や real-time PCR 法により細胞に発現する eNOS をそれぞれ検出および定量し、アミオダロンおよび DEA が eNOS 発現に及ぼす作用について調べた。細胞内カルシウムイオン濃度へのアミオダロンおよび DEA の作用については、fura-2 AM を用いた 2 波長励起法により測定した。

また、whole-cell patch-clamp 法によりアミオダロンおよび DEA がカルシウムイオン電流増加をもたらすメカニズムを調べた。

〔結果〕ヒト臍静脈内皮細胞では eNOS mRNA のみの発現が認められた。

アミオダロンおよび DEA は、生理的血中濃度において用量依存的および時間依存的に一酸化窒素産生を増加させ、両者の作用を検討した結果、DEA の方がアミオダロンよりも強力な作用を有することが確認できた。EGTA 1mM、L-NAME および NiCl₂ 1 mM はアミオダロンによる一酸化窒素を有意に阻害したが、LY294002 および SB202190 は、DEA による一酸化窒素産生に影響を与えなかった。一酸化窒素高感受性微小電極を用いた測定では、DEA 30 μM 投与により速やかな一酸化窒素濃度上昇が認められた。

アミオダロンは 10 および 30 μM で 6 および 24 時間処理により内皮型一酸化窒素合成酵素 mRNA の発現には、有意な影響をきたさなかった。

細胞内カルシウムイオン濃度測定では、アミオダロンよりも代謝物である DEA の方がより迅速かつ多くカルシウムイオン濃度を上昇させた。また、これらによるカルシウムイオン濃度上昇は、細胞外カルシウムイオンを非選択的 Ca²⁺遮断薬である La³⁺ により除去すると抑制された。

Whole-cell patch-clamp 法による電位測定では、まず保持電位を -40mV としてパルスをかけたところ、DEA 10 μM では内向き電流が観察された。この電流は La³⁺ および Gd³⁺

投与により抑制された。また、逆転電位が 0mV 付近であることから、K 電流の関与は否定的であり、細胞外 Cl⁻濃度を低くしても電流は変化せず、Na⁺を NMDG⁺に置換したとこ

る抑制されたことから、非選択性陽イオンチャンネルを通る電流の関与が強く示唆された。

[考察] 心血管系において eNOS は血管拡張や心筋リモデリング抑制、抗不整脈作用、迷走神経コントロールおよび血栓形成抑制に携わっているとされている。本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞における eNOS を介する一酸化窒素産生に及ぼすアミオダロンとその代謝物である DEA の効果について検討した。

アミオダロンとその代謝物である DEA は、慢性的に投与されている患者において血中濃度は、およそ $0.7\text{-}3\mu\text{M}$ であり、両者はほぼ等しいとされている。本研究では、それぞれの一酸化窒素産生に与える影響を調べたが、ともに時間依存のおよび用量依存的な作用を有しており、DEA の作用の方が強力であることが実証された。また、臨床血中濃度の上限とされる $4\mu\text{M}$ よりも高濃度であるアミオダロン $10\mu\text{M}$ 、24 時間処理でもアポトーシス細胞が認められなかった。本研究から、アミオダロン及びその主要代謝物 DEA の心血管保護効果には、eNOS 活性化がかかわっているものと示唆される。その機序としては、real-time RT-PCR 法でアミオダロンが eNOS mRNA の有意な上昇をもたらさないため mRNA 合成を介した機序は否定的であった。

一方、アミオダロンによる一酸化窒素産生の亢進は、細胞外カルシウム除去にて抑制され、さらに、アミオダロン及び DEA は、細胞外からのカルシウム流入によると考えられる細胞内カルシウム濃度の上昇がきたした。さらに、whole-cell patch-clamp の結果から、非選択的陽イオンチャンネル電流がこのカルシウム上昇の原因となっていると考えられた。

本研究は、アミオダロンおよびその代謝物である DEA が eNOS を介する一酸化窒素産生を亢進することが培養ヒト内皮細胞を用いて初めて実証したものであり、更に、その機序として、fura-2 AM 二波長励起法や whole-cell patch-clamp 法により非選択的陽イオンチャンネル電流による細胞内カルシウムイオン濃度上昇を考えられた。これは、アミオダロンの心血管保護作用を説明する上で有意義なものであり、本剤の強力な抗不整脈効果を有するにもかかわらず催不整脈性が低く心血管保護作用を有するという特異的な現象の解明につながると期待される。