

モルモット単離心室筋細胞ナトリウム チャンネルに対する抗不整脈剤 SD-3212 の 電気生理学的効果および細胞外 pH の影響

塚本 哲也 高井 博之 唐崎 専也
藪下 博史 石川 欽司

近畿大学医学部第1内科学教室

抄 録

SD-3212 は新規に開発された抗不整脈剤で, Vaughan-Williams 分類上 I + III + IV 群の作用を呈する抗不整脈剤と考えられているが, ナトリウムチャンネル抑制の結合解離過程について十分明らかにされていない。そこで今回 SD-3212 のモルモット単離心室筋細胞におけるナトリウムチャンネル抑制機序を明らかにすることを目的とした。雄性モルモット (250~300 g) の心臓を Langendorff 法にて灌流し, collagenase を用いて単離心室筋細胞を作成し, SD-3212 のモルモット単離心室筋細胞ナトリウム電流に対する抑制効果を全膜電位固定法を用いて測定した。SD-3212 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ナトリウム電流を用量依存性に減少させた。SD-3212 はナトリウム電流の不活性化曲線を勾配因子に影響を与えずに過分極方向に偏位させた。2 段階パルス法によるナトリウム電流抑制発現過程の実験では, SD-3212 は 10 msec の条件パルスではナトリウム電流を 11.2% 抑制し, 500 msec の条件パルスでは 55.6% 抑制した。これより求めた不活性化チャンネルブロック/活性化チャンネルブロック比は 5.0 であった。SD-3212 は顕著な使用頻度依存性抑制を示した。不活性化されたナトリウム電流の回復過程は, 速い成分の時定数 (τ_f) が pH 6.8 : 66.6 ± 5.5 msec, pH 7.4 : 84.0 ± 24.2 msec, pH 8.0 : 75.3 ± 5.8 msec, 遅い成分の時定数 (τ_s) は, pH 6.8 : 5954.1 ± 1112.8 msec, pH 7.4 : 4563.5 ± 638.3 msec, pH 8.0 : 2983.8 ± 315.4 msec と, 遅い成分の時定数 (τ_s) はアルカローシスによって有意に短縮した。以上より SD-3212 は, ナトリウムチャンネルの不活性化状態に強い親和性を示し, ナトリウムチャンネルからの解離速度に基づく分類からは intermediate kinetic drug に相当する薬剤であり, ナトリウムチャンネル薬剤結合部位からは, 疎水性経路を通して解離することが示唆された。

Key words : whole cell patch clamp technique, SD-3212, sodium current, pH, antiarrhythmic

緒 言

1989年に CAST 報告¹ が発表され, 心筋虚血残存例に Ic 群抗不整脈剤を投与するとその催不整脈作用によって生命予後が悪化することが明らかにされた。以後, 抗不整脈剤の作用機序を十分に理解した上で治療することが重要となってきた。そこで抗不整脈剤の作用機序に関する基礎的研究が, 臨床上也重要な意義を持つと考えられる。SD-3212, (-)-(S)-2-(5-methoxy-2-(3-(methyl(2-(3,4(methylenedioxy)phenoxy)-ethyl)amino)propoxy)phenyl)-4-methyl-2H-1,4-benzothiazin-3(4H)-

one hydrogen fumarate はカルシウム拮抗薬である semotiadil fumarate (SD-3211) の光学異性体である^{2,3,4}。SD-3212 の抗不整脈作用については, 動物実験においてクロロホルムやウワバイン, アドレナリン, アコニチン添加および冠結紮により誘発された上室性及び心室性不整脈に対して抑制作用を示すことが証明されている^{3,5,6}。微小電極法によるモルモット右室乳頭筋に対する電気生理学的検討では, 活動電位最大立ち上がり速度の減少, 活動電位持続時間の短縮が明らかにされており⁵, またモルモット単離心房筋細胞において, カルシウム電流, ナトリウム電流, アセチルコリン感受性カリウム電流を抑制す

ることが全膜電位固定法にて証明されている⁷。これらの結果より SD-3212 は Vaughan-Williams 分類⁸上、I + III + IV 群の作用を呈する抗不整脈剤と考えられているが、本剤のナトリウムチャンネル抑制の結合解離過程については十分に明らかにされていない。本研究では全膜電位固定法を用い、SD-3212 のモルモット単離心室筋細胞におけるナトリウムチャンネル抑制機序を明らかにすることを目的とした。

方 法

心室筋細胞単離法

心室筋細胞の単離は Isenberg と Klockner¹⁰ が行った酵素処理法を用いた。体重 250~300 g の Hartley 種雄性モルモットを pentobarbital sodium (40 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔した。開胸後直ちに心臓を取りだし、Langendorff 型灌流装置に固定した。冠動脈内の血液は大動脈から 30 ml の標準 Tyrode 液を 70 cm H₂O の灌流圧で逆行性灌流を行って取り除いた。次に心臓が自然に停止するまで Ca²⁺-free Tyrode 液 (標準 Tyrode 液から CaCl₂ を除いたもの) で灌流し、さらに 0.04% のコラゲナーゼ (Sigma, Type I) を含む Ca²⁺-free Tyrode 液 60 ml で灌流した後、100 ml の Krebs buffer 液で灌流しコラゲナーゼを洗い流した。すべての灌流液は 100% 酸素で酸素化し、恒温槽で 37°C に加温して使用した。コラゲナーゼを洗い流した後、摘出心をハサミで細切し、150 μm のメッシュナイロンで単離心室筋細胞のみをピーカーで濾過し、実験開始まで 4°C で 1 時間保存した。1 時間保存後得られた単離心室筋細胞をバスに入れ、標準 Tyrode 液を灌流し、Ca²⁺ 耐性が保たれた桿状形態の単離心室筋細胞を実験に使用した。モルモット心室筋単離に用いた各液の組成は標準 Tyrode 液: NaCl 140 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 0.5 mM, N-2-hydroxyethylpiperazine - N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES) - NaOH buffer 5 mM, glucose 10 mM (NaOH で pH 7.4 に滴定), Krebs buffer 液: KCl 25 mM, glutamic acid 80 mM, taurine 10 mM, oxalic acid 14 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 10 mM, glucose 11 mM, ethyleneglycol-bis(aminoethylether) N,N'-tetra-acetic acid (EGTA) 0.5 mM (KOH で pH 7.2 に滴定) であった。

膜電位固定法

単離心室筋細胞の膜電流の測定は Hamill¹¹ による全膜電位固定法を用いて実験を行った。吸引電極はガラス製毛細管 (GS150T-10, Clark

Electromedical Instruments) を垂直マイクロ電極プラー (Type PP-83, Narishige) を用いて 2 段階ステップで引き伸ばして作製した。吸引電極は直径 2.5~5.0 μm で、先端をヒートポリッシュで加工した後、標準内液を満たしたときの抵抗が 0.5~1.0 MΩ のものを使用した。電圧クランプのパルスは塩化銀線によって作製した不閉電極を通してバスに与えた。吸引電極は実験中常時アースした。電圧クランプ回路のヘッドステージは、ultra low bias 電流操作アンプにより設定した。吸引電極は 100 MΩ のフィードバック抵抗器によりマイナス入力に接続した。電極先端と細胞内部のための一連の抵抗による電圧誤差は、操作アンプのプラスに入力されるコマンドに対し単一である変換電流のフラクシオンを集めることにより代償した。一連の抵抗を代償した後は、実験中電気容量を一定にした。吸引電極電流は吸引電極とバスを標準 Tyrode 液で満たしたときに電流が 0 ボルトとなるように調節した。一連の抵抗の補正は電気容量の変動が最小になるようにした。17~19°C の標準 Tyrode 液をバスに灌流し、バス内の単離心室筋細胞の表面に吸引電極の先端をつけ 20~40 cm H₂O で吸引するとギガオームシールができた。ギガオームシールが安定したことを確認した後、吸引電極にさらに短時間吸引を加え細胞膜を破った。細胞膜の破れたことは電気容量が増加することで確認できた。吸引電極内液が完全に入れ替わり、シールが安定するまで数分間待った後、バスに細胞外液の灌流を開始した。電気生理学的実験の灌流液組成は、細胞外液: NaCl 10 mM, CsCl 5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 0.5 mM, tetraethylammonium chloride (TMA) 130 mM, HEPES 20 mM, glucose 10 mM (HCl で pH 6.8, 7.4, 8.0 に滴定), 細胞内液: NaF 10 mM, CsF 125 mM, HEPES 5 mM (CsOH で pH 7.2 に滴定) であった。膜電位を十分にコントロールするために低い Na⁺ 濃度細胞外液を使用した。細胞外液中の Cs⁺ により K⁺ を置換、また TMA を加えることによりカリウム電流を遮断できた。このような状況の下で、テスト電位を与えた時のリーク電流は 0.1 nA 以下とした。使用薬剤 (SD-3212, Santen Pharmaceutical Co.) は 10⁻¹ M の濃度で dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解、保存し、実験前に細胞外液へ溶解して使用した。0.01% 以下の濃度の DMSO は、電気生理学的指標に影響を与えない⁹ とされているため、DMSO の最終濃度は、0.01% 以下とした。

データ解析

電圧と電流の信号は、アンプとして Axopatch-

1D (Axon Instruments) を使用し、オシロスコープ (Type VC-6025, Hitachi) 上に表示した。データの解析は Axopatch (Version 5.5.1, Axon Instruments) でコンピューター (AX386, Sanyo) を用いて行った。容量反応曲線、不活性化曲線、使用依存性抑制、ナトリウム電流遮断の発現過程および使用依存性抑制からの回復時間は最小二乗法を用いて各関数式にフィットさせた。これらのデータ解析は p-clamp および Kaleida graph (Ver. 3.0, Synergy Software, Inc) を用いて行った。すべての数値は平均±標準偏差で示し、統計処理には Student paired t test を用い、 $P < 0.05$ を有意と判定した。

成 績

SD-3212 による定常状態におけるナトリウム電流の抑制

図 1 A のパルスプロトコルを用い SD-3212 による定常状態におけるナトリウム電流の抑制効果を検討した。図 1 B に -140 mV の保持電位から -40 mV への脱分極により活性化されるナトリウム電流の実電流記録を、図 1 C に各電位に脱分極させた際に得られた電流電圧曲線を SD-3212 30 μ M 添加前後で示した。ナトリウム電流出現閾値は -60 mV, ナトリウム電流最大電位は -40 mV, ナトリウム電流平衡電位は 0 mV と SD-3212 添加前後において変化は見られなかった。しかしナトリウム電流のピーク電流値は SD-3212 添加により $56.9 \pm 0.1\%$ に抑制された ($n=6$)。

SD-3212 の濃度変化とナトリウム電流の抑制および細胞外 pH の影響

図 2 A のパルスプロトコルに示すように -140 mV または -100 mV の保持電位から -40 mV まで 30 msec 脱分極させ、SD-3212 の濃度を 0.01 μ M から 500 μ M まで変化させてナトリウム電流を記録し、SD-3212 を添加していないときのナトリウム電流で正規化して用量反応曲線を作成した (図 2 B)。SD-3212 は濃度依存性にナトリウム電流を抑制し、保持電位が -100 mV における解離定数 (Kd) は $0.7 \pm 0.3 \mu$ M ($n=5$), -140 mV における Kd は $38.8 \pm 1.8 \mu$ M ($n=5$) であり、保持電位を脱分極側に偏位させることにより容量反応曲線は低濃度側に偏位した。次式により求めた Hill 係数は -100 mV において 0.96, -140 mV において 0.99 であった。

$$\% \text{ inhibition of } I_{Na} = 1 / \{1 + (Kd/[D])^n\}$$

Kd: 解離定数

D: SD-3212 の濃度

n: Hill 係数

次に細胞外液 pH が 6.8 および 8.0 のものを用いて同様の実験を行った (図 3 B)。保持電位が -100 mV における解離定数 (Kd) は、pH 6.8 で $0.7 \pm 0.3 \mu$ M ($n=5$), pH 7.4 で $0.7 \pm 0.3 \mu$ M ($n=5$), pH 8.0 で $2.4 \pm 0.7 \mu$ M ($n=5$) と細胞外液をアルカローシスに変化させることにより SD-3212 の作用は有意に減弱した ($P < 0.05$) が、アシドーシスでは有意差は認められなかった。

SD-3212 のナトリウムチャンネル不活性化状態への

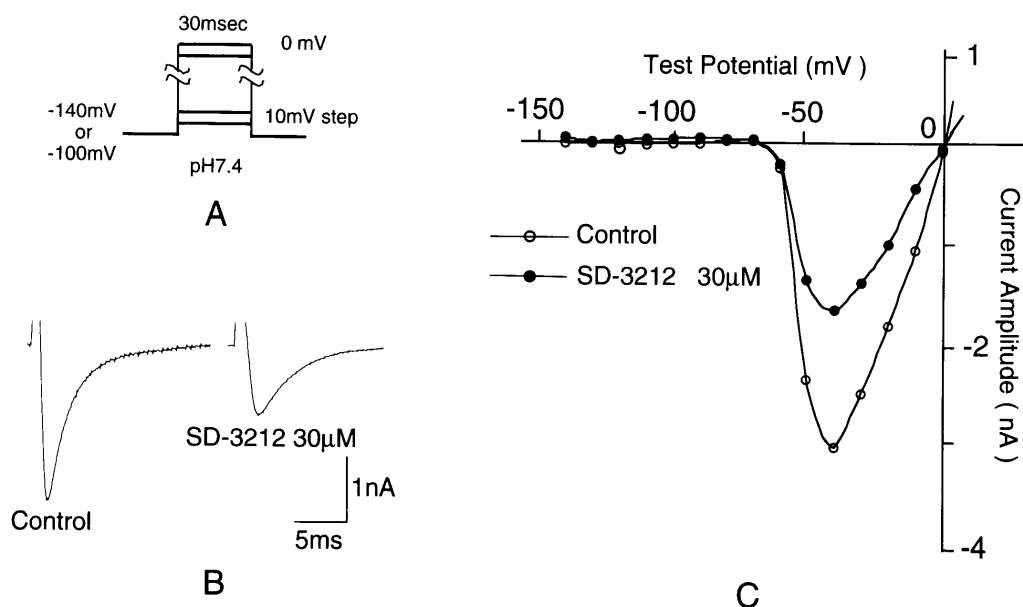


図 1 定常状態におけるナトリウム電流の抑制

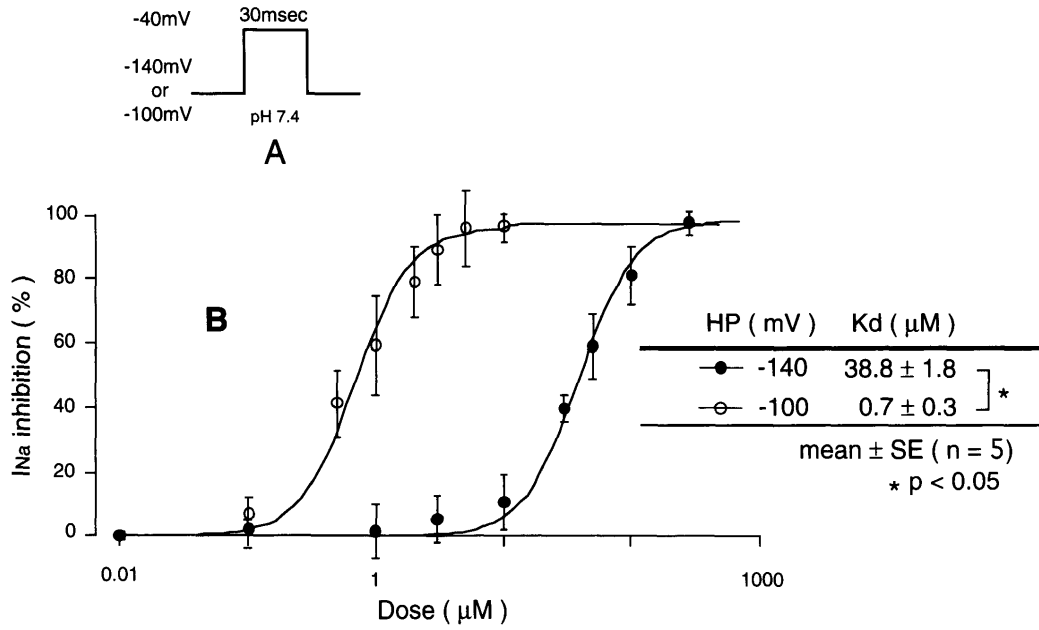


図2 ナトリウム電流抑制の用量反応曲線

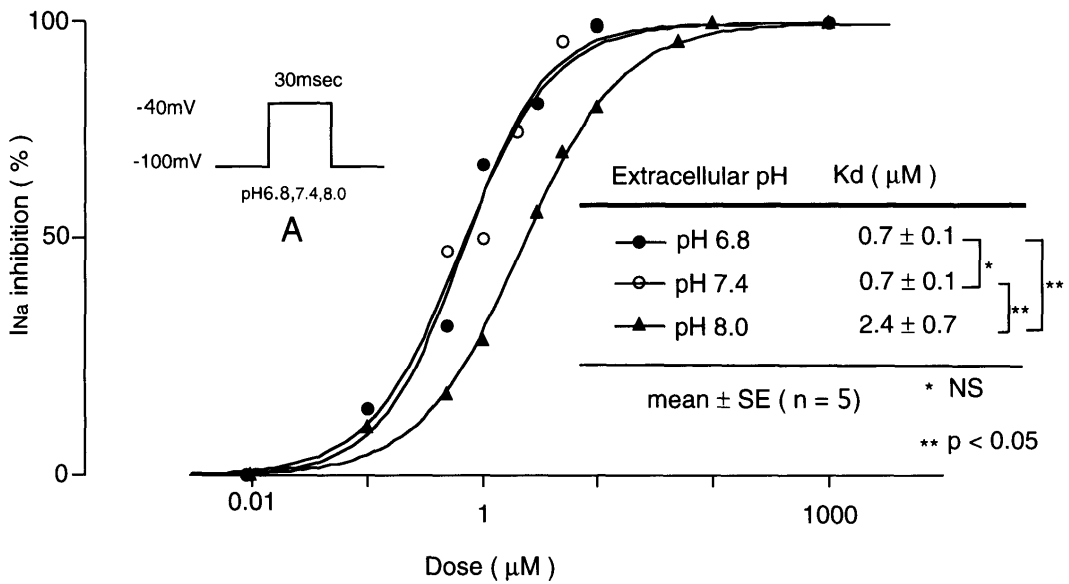


図3 ナトリウム電流抑制の用量反応曲線に対する細胞外 pH の影響

影響

ナトリウムチャネルの定常状態における不活性化に及ぼす SD-3212 の効果を調べるため、図 4 A に示す 2 段パルス法を用い、ナトリウム電流の不活性化曲線を求めた。SD-3212 の濃度は 30 μM とし、-140 mV の保持電位から種々の電位へ 500 msec の条件パルスを与えた後 -30 mV へ 30 msec 脱分極させ、その際に発現するナトリウム電流を -140 mV の条

件パルスから得られたナトリウム電流で正規化した値を各条件電位に対してプロットすることにより不活性化曲線を作成した。Control および 30 μM の SD-3212 灌流下における不活性化曲線を図 4 B に示す。この曲線は以下の式により求められた。

$$h = 1 / \{1 + \exp[(V_m - V_h) / K]\}$$
 Vm : 条件 pulse 電位
 Vh : 50% 不活性化されるとき条件 pulse 電位

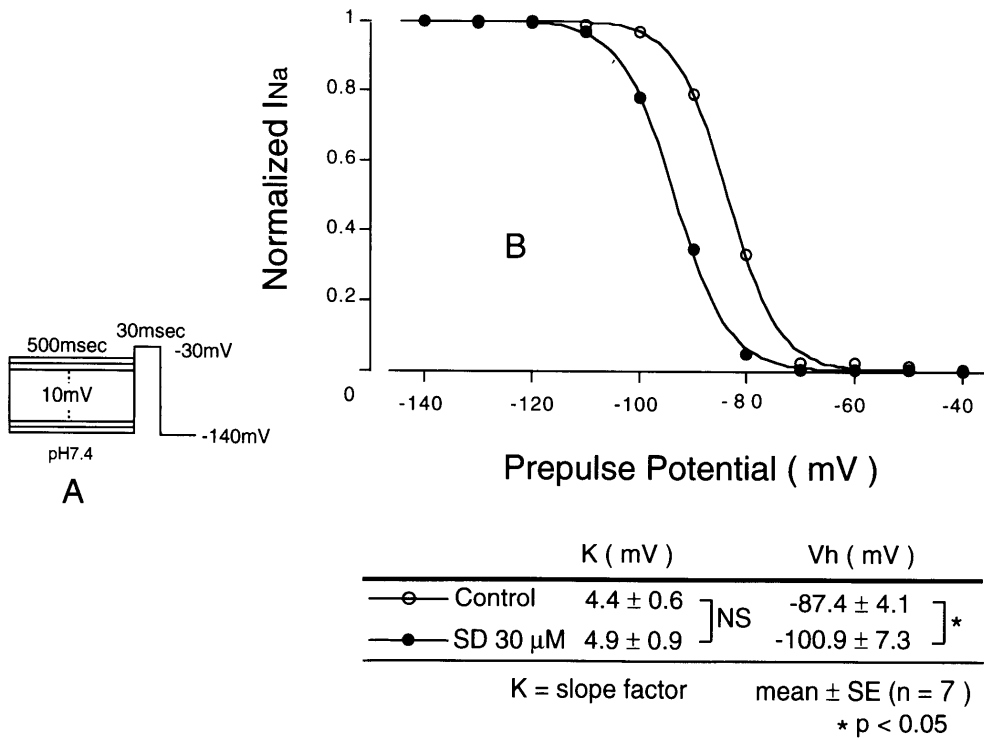


図4 ナトリウムチャンネル不活性化状態への影響

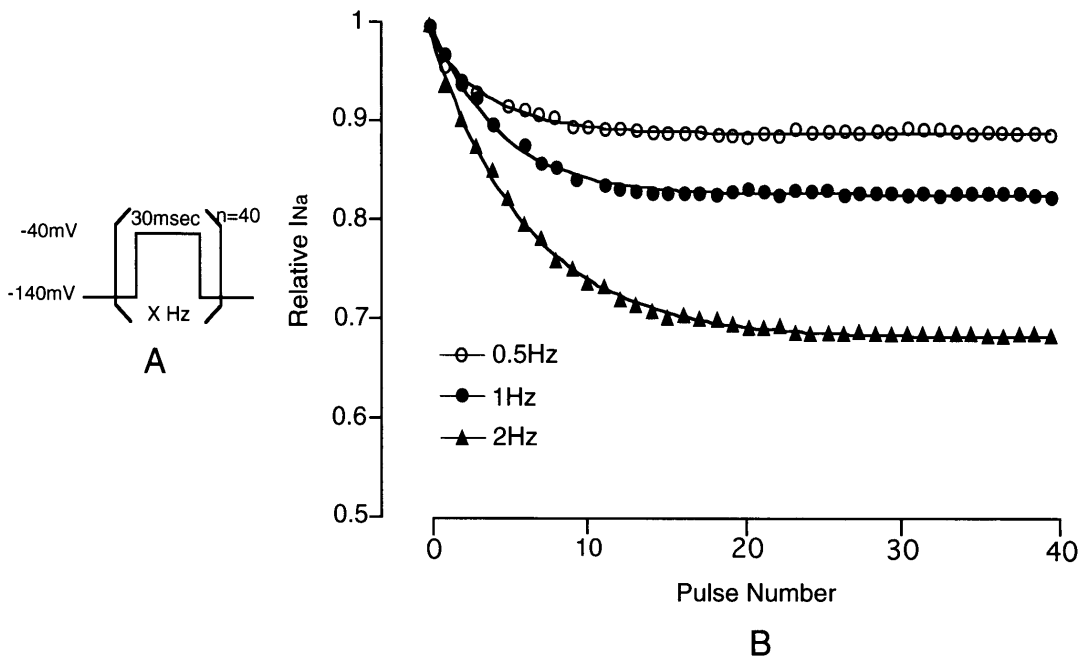


図5 ナトリウム電流使用依存性抑制 (脱分極頻度依存性)

K：勾配因子

Vh は control および 30 μM の SD-3212 灌流後でそれぞれ -87.4 ± 4.1 mV, -100.9 ± 7.3 mV (n=7) であり, また勾配因子はそれぞれ 4.4 ± 0.6 , 4.9 ± 0.9 (n=7) であった. SD-3212 はナトリウム電流の不活性化曲線を勾配因子に影響を与えずに過分極方

向に有意に偏位させた (P<0.05).

SD-3212 によるナトリウム電流使用依存性抑制 (脱分極頻度依存性)

図 5 A のパルスプロトコールに示すように SD-3212 の濃度は 3 μM とし, 保持電位を -140 mV か

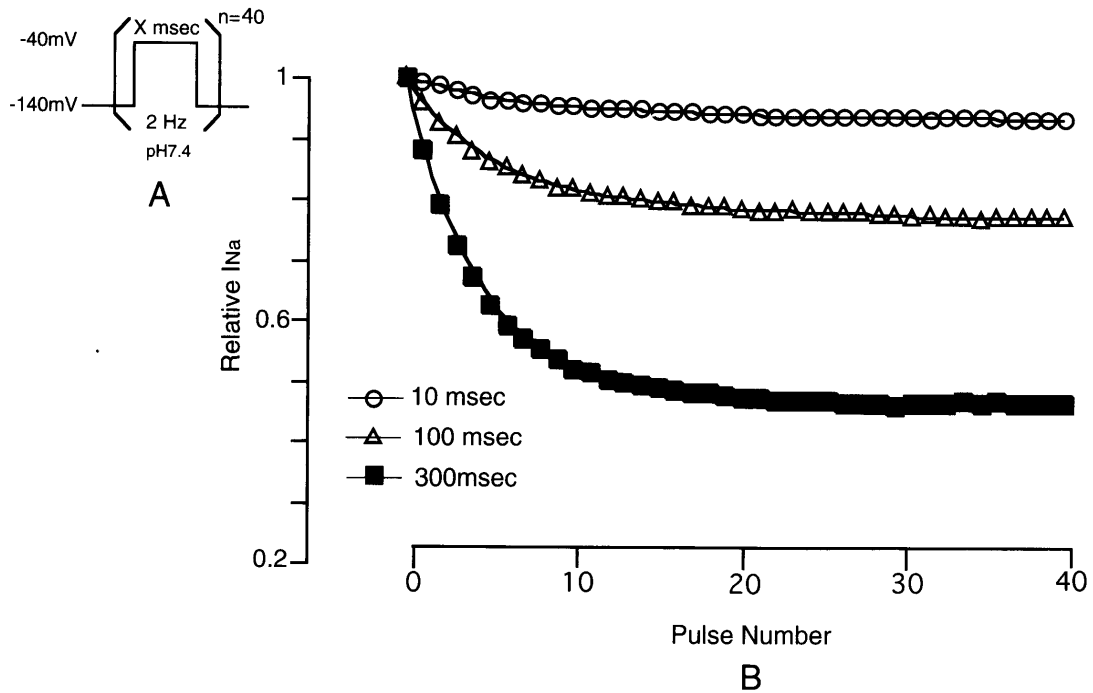


図6 ナトリウム電流使用依存性抑制 (脱分極時間依存性)

ら -40 mV へ30 msec間40回脱分極し、脱分極頻度を0.5 Hz, 1 Hz, 2 Hz, と変化させて、ナトリウム電流を記録した。これを40回中回目のテストパルスのナトリウム電流で正規化した。図5 Bに示すように、0.5 Hzから2 Hzへと脱分極頻度が増加するに従いナトリウム電流のピーク値はより抑制され、いずれも約15回の脱分極で平衡状態に達した。

SD-3212によるナトリウム電流使用依存性抑制 (脱分極時間依存性)

図6 Aのパルスプロトコールに示すようにSD-3212の濃度は $3\text{ }\mu\text{M}$ とし、保持電位を -140 mV から -40 mV へ、脱分極頻度は2 Hzで40回脱分極し、脱分極時間を10 msec, 100 msec, 300 msecと変化させナトリウム電流を記録した。これを40回中1回目のテストパルスのナトリウム電流で正規化した。図6 Bに示すようにナトリウム電流は10 msecの短い脱分極時間でも軽度抑制されるが、脱分極時間が長くなるに従いその抑制はより強くなった。

SD-3212によるナトリウム電流抑制の発現過程

前述したようにSD-3212は長い脱分極パルス程強い頻度依存性抑制を示すがSD-3212のナトリウムチャンネルへの結合様式とその親和性を明らかにするためナトリウム電流遮断の時間経過を検討した。SD-3212の濃度は $30\text{ }\mu\text{M}$ とし、図7 Aに示す2段パ

ルス法を用いて保持電位を -140 mV から -40 mV へ1 msecから700 msecまでさまざまな間隔で脱分極させる条件パルスを与え、1 secの回復時間の後、 -140 mV から -40 mV へ30 msec間1回脱分極させるテストパルスでナトリウム電流を測定した。これによって得られたナトリウム電流は条件パルスを与えずテストパルスのみを与えて得られたナトリウム電流で正規化した。図7 Bは条件電位とテストパルスにおけるナトリウム電流の比を条件間隔に対してプロットしたものである。この関係は以下の2次の指数関数によりフィットされた。

$$\text{Normalized } I_{\text{Na}} = 0.09 \exp(-\tau/\tau_f) + 0.17 \exp(-\tau/\tau_s) + 0.74$$

τ : 脱分極時間

τ_f : 速い成分の結合時定数

τ_s : 遅い成分の結合時定数

速い成分の時定数 (τ_f) および遅い成分の時定数 (τ_s) はそれぞれ $6.4 \pm 1.1\text{ msec}$, $491.6 \pm 127.1\text{ msec}$ ($n=4$) であった。

ナトリウム電流使用依存性抑制からの回復に及ぼすSD-3212の効果と細胞外pHの影響

図8 Aのパルスプロトコールに示すように $30\text{ }\mu\text{M}$ のSD-3212灌流下で -140 mV の保持電位から -40 mV へパルス幅100 msecの条件パルスを2 Hz 20発連続刺激した後、種々の回復時間を与え再び

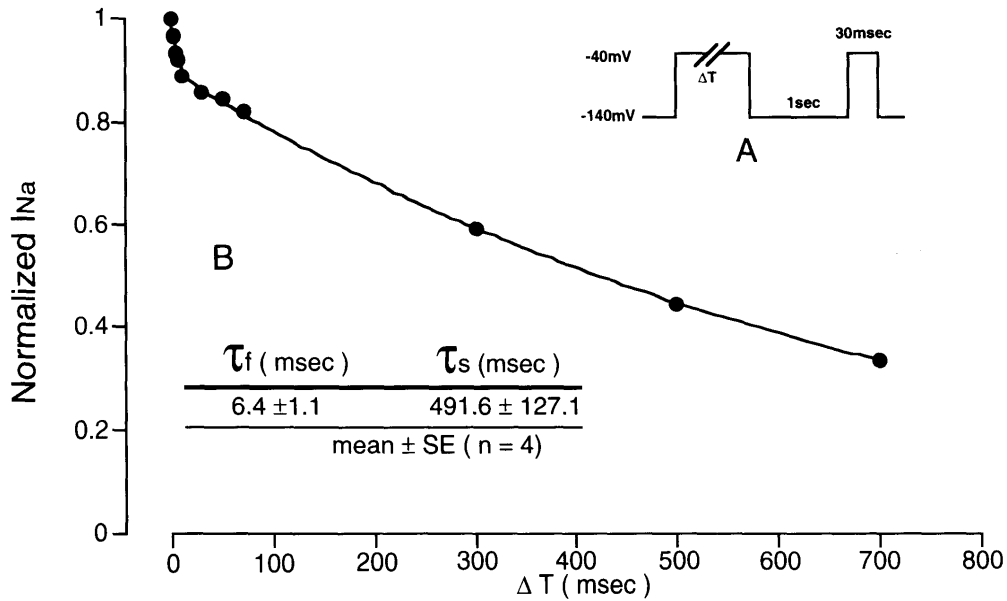


図7 ナトリウム電流抑制の発現過程

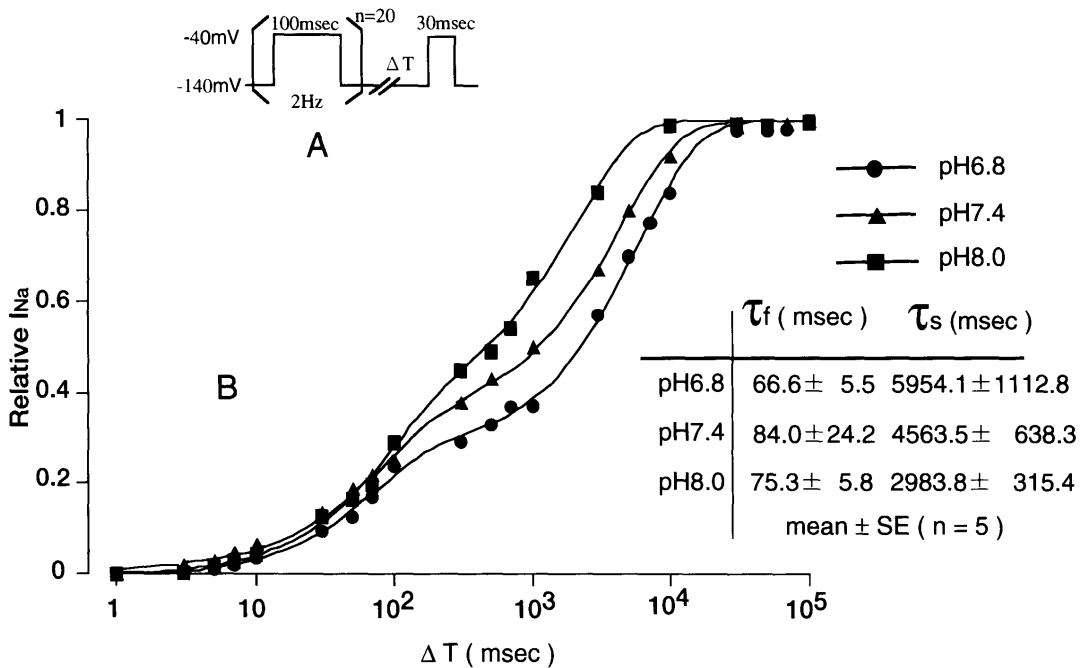


図8 ナトリウムチャンネルの不活性化からの回復過程および細胞外 pH の影響

140 mV から -40 mV へ 30 msec 脱分極パルスをあ
たえた際に発現するナトリウム電流を測定した。こ
のナトリウム電流をナトリウムチャンネルが十分回復
可能な 180 sec の回復時間を与えた後に得られたナ
トリウム電流の比として表し、この比と回復時間と
の関係をプロットした。以上の実験を、細胞外液 pH
がそれぞれ 6.8, 7.4, 8.0 で行った。ナトリウムチャ
ネルの不活性化からの回復過程を図 8 B に示す。得

られたデータは 2 次指数関数でフィットされ、その
回復時定数は速い成分の時定数 (τ_f) が pH 6.8 :
 66.6 ± 5.5 msec, pH 7.4 : 84.0 ± 24.2 msec, pH
8.0 : 75.3 ± 5.8 msec, 遅い成分の時定数 (τ_s) は、
pH 6.8 : 5954.1 ± 1112.8 msec, pH 7.4 : $4563.5 \pm$
 638.3 msec, pH 8.0 : 2983.8 ± 315.4 msec であつ
た。図 9 は、図 8-B の回復時間の対数表示を線形表
示にしたものであるが、これからも遅い成分の時定

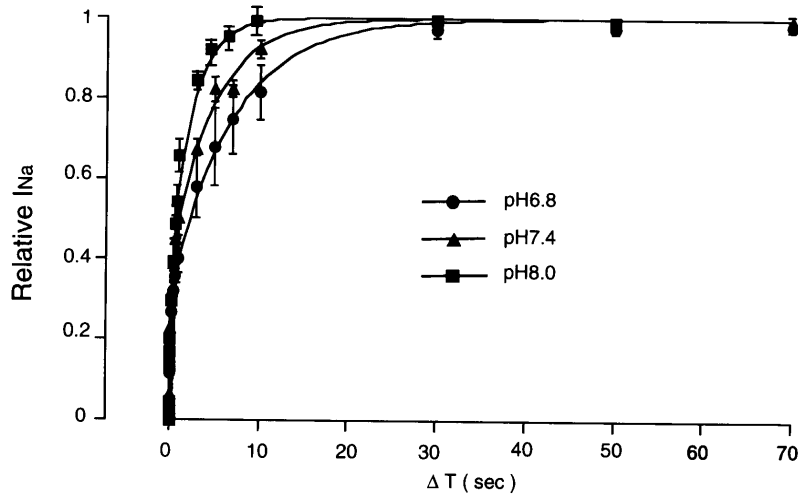


図9 図9は、図8-Bの回復時間の対数表示を線形表示にしたものである。

数 (τ_s) はアルカローシスによって有意に短縮することが明らかとなった。

考 察

本研究より SD-3212 はナトリウムチャンネルからの解離速度に基づく分類からは intermediate kinetic drug に相当する薬剤であり、ナトリウムチャンネルの不活性化状態に強い親和性を示し親水性経路を通して、ナトリウムチャンネル受容体結合部位と 1 : 1 で結合し疎水性経路を通して解離することが推測された。

1. SD-3212 のナトリウムチャンネルへの結合様式

SD-3212 の K_d 値は、保持電位が -140 mV, -100 mV の時それぞれ $38.8 \pm 1.8 \mu\text{M}$, $0.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$ とより浅い膜電位での K_d 値が有意に低値であった ($P < 0.05$)。また定常状態のナトリウムチャンネルの不活性化曲線を過分極側へ偏位させたことより本剤はナトリウムチャンネルの静止状態に比し不活性化状態に、より高い親和性を有していると推測された。またナトリウム電流抑制の発現過程に関する実験において、ナトリウムチャンネルが活性化状態にあると考えられる 10 msec の条件パルス時と、不活性化状態にあると考えられる 500 msec の条件パルス時のナトリウムチャンネル抑制率の比によって、薬剤のチャンネル親和性を検討した報告がある¹²。本研究においてナトリウム電流抑制の発現過程より得られた SD-3212 の 10 msec の条件パルス時のナトリウムチャンネル抑制率は 11.2% であり、500 msec の条件パルス時は 55.6% であった。これより求めた不活性化チャンネルブロック/活性化チャンネルブロック比は 5.0 であり活性化チャンネルブロックを主とする quinidine (1.6), disopyramide (1.5)¹² より大きく、不活性化

チャンネルブロックが主体とされる mexiletine (6.4), lidocaine (5.9)¹² に類似した結果であった。これからも SD-3212 は不活性化チャンネルブロックが主体であると考えられた。Hill 係数は -100 mV において 0.96, -140 mV において 0.99 と、1 に近似しており、このことから SD-3212 は、ナトリウムチャンネル受容体結合部位と 1 : 1 で結合すると推測された¹³。SD-3212 は、強い使用頻度依存性を示した。このことは薬剤がチャンネルゲートによるトラッピングを受けていることを示しており¹⁴、これより SD-3212 は親水性経路を通してチャンネルゲートを通して受容体結合部位へ到達すると考えられた。

2. SD-3212 のナトリウムチャンネルからの解離様式

薬剤のナトリウムチャンネル薬剤結合部位からの解離経路として細胞膜の内側へ解離する親水性経路と脂質二重層を介して解離する疎水性経路が存在すると考えられている¹⁴。荷電型薬剤は親水性経路を介し薬剤結合部位から解離し、一方脂溶性の非荷電型薬剤は疎水性経路を介し同部位から解離する^{14,15}。1995年 Koumi ら¹⁶ は disopyramide のナトリウムチャンネル受容体からの解離が、アシドーシスにより有意に延長する事より、disopyramide の解離が疎水性経路を通ると推測した。その理由として、アシドーシスの環境下において薬剤の deprotonation rate は一定と仮定されるが、protonation rate は加速される。それにより薬剤分子が非荷電型で存在する確率が減少する。その結果 disopyramide のナトリウムチャンネル受容体からの解離が減少し回復時定数が遅延すると考えている。本研究において細胞外 pH をアルカローシスに変化させると、SD-3212 の薬剤結合部位からの遅い成分の回復時定数は有意に短縮した ($P < 0.05$)。これは細胞外アルカローシスによ

り SD-3212 のナトリウムチャンネル結合部位からの解離が加速されることを示しており、SD-3212 も上記と同様の理由で、疎水性経路を通じて薬剤結合部から解離すると考えられた。以上のように細胞外アルカローシスによる影響は見られたが、アシドーシスの条件下においては、SD-3212 のナトリウムチャンネルからの解離速度、ナトリウム電流抑制作用とも正常状態と比して有意差は認められなかった。この理由としては、先ず Henderson-Hasselbalch の式 ($\text{pH} = \text{pKa} + \log[\text{N}]/[\text{C}]$, N = 非荷電型の比率, C = 荷電型の比率) により任意の細胞外 pH に対する薬剤の荷電型と非荷電型の比率を計算できる^{17,18} が、SD-3212 の pKa (薬剤の分子の50%荷電化する pH) は9.03であるため、これより、pH=8.0, 7.4, 6.8における非荷電型の SD-3212 の存在比率はそれぞれ9.1%, 2.5%, 0.6%と計算される。このように pH 7.4から pH 8.0に変化させるのに比して pH 6.8では非荷電型の SD-3212 の存在比率の変化量が小さいこと。次に Deitmer, Ellis¹⁹ は心臓プルキンエ線維を用いた実験において、細胞外 pH が1下がることによって細胞内 pH が約0.23下がることを報告している。このように細胞外に急速な H⁺ の流入がおきても正常な細胞における細胞内 pH は細胞外に比して約5分の1しか低下しないと推測されることなどが考えられた。CAST 報告¹以降ナトリウムチャンネルからの解離速度に基づく分類が新たに提唱されているが、Sato ら^{16,17} はモルモット単離心室筋細胞を用いた実験において intermediate kinetic drug に相当するとされている disopyramide 及び aprindine の回復時定数がそれぞれ5.4 sec, 4.8 sec と報告している。pH 7.4における遅い成分の回復時定数が 4563.5 ± 638.3 msec である SD-3212 も、intermediate kinetic drug に属すると推測された。

以上より SD-3212 はナトリウムチャンネルからの解離速度に基づく分類からは intermediate kinetic drug に相当する薬剤であり、ナトリウムチャンネルの不活性化状態に強い親和性を示し親水性経路を通じて、ナトリウムチャンネル受容体結合部位と1:1で結合し疎水性経路を通じて解離すると推測された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を遂行するにあたり終始ご協力をいただいた佐藤良一先生 菅野 亮先生をはじめ教室の諸先生方に、心から感謝いたします。

本論文の要旨は、第13回日本心電学会学術集会(1996年10月別府)、第14回日本心電学会学術集会(1997年10月東京)にて発表した。

文 献

1. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) (1989) Preliminary report: Effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. *N Engl J Med* 321: 406-412
2. Miyawaki N, Furuta T, Shigei T, Yamauchi H, Iso T (1990) Electrophysiological properties of SD-3212, a novel putative Ca²⁺ antagonist, in isolated guinea pig and rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 16: 769-775
3. Fukuchi M, Uematsu T, Nagashima S, Nakashima M (1990) Antiarrhythmic effects of a benzothiazine derivative (SD-3211) and its stereoisomer (SA-3212) in anesthetized rats and isolated perfused rat hearts compared with bepridil. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 341: 557-564
4. Teramoto N (1993) Mechanisms of the inhibitory action of semotiadil fumarate, a novel Ca antagonist, on the voltage-dependent Ca current in smooth muscle cells of the rabbit portal vein. *Jpn J Pharmacol* 61: 183-195
5. Miyawaki N, Yamazaki F, Furuta T, Shigei T, Yamauchi H (1991) Antiarrhythmic effects of a novel Na⁺ and Ca⁺⁺ channel blocker, SD-3212: a comparison with its enantiomer (SD-3212). *Drug Dev Res* 22: 293-298
6. Nagashima S, Uematsu T, Araki S, Matsuzaki T, Fukuchi M, Hashimoto H, Nakashima M (1992) Antiarrhythmic and electrophysiological effects of SD-3212, a novel Na⁺ and Ca⁺⁺ channel blocker, in anaesthetized dogs with myocardial infarction in comparison with its stereoisomer (SD-3212) and bepridil. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 345: 688-695
7. Hashimoto H, Umemura K, Araki S, Ishii M, Nagashima S, Uematsu T, Nakashima M (1994) Comparison of electrophysiologic and hemodynamic effects of SD-3212, a new antiarrhythmic drug, and flecainide in a canine myocardial infarction model. *Biol Pharm Bull* 17: 548-550
8. Vaughan Williams EM (1984) A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. *J Clin Pharmacol* 24: 129-147
9. Hara Y, Nakaya H (1995) SD-3212, a new class I and IV antiarrhythmic drug: a potent inhibitor of the muscarinic acetylcholine-receptor-operated potassium current in guinea-pig atrial cells. *Br J Pharmacol* 116: 2750-2756
10. Isenberg G, Klockner U (1982) Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflüers Arch* 395: 6-18
11. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüers Arch* 391: 85-100
12. Maruyama K, Kodama I, Anno T, Suzuki R, Toyama J (1995) Electrophysiological effects of Ro 22-9194, a

- new antiarrhythmic agent, on guinea-pig ventricular cells. *Br J Pharmacol* 114: 19-26
13. Bean BP, Cohen CJ, Tsien RW (1983) Lidocaine block of cardiac sodium channels. *J Gen Physiol* 81: 613-642
 14. Hille B (1977) Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol* 69: 497-515
 15. Bean BP (1984) Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci* 81: 6388-6392
 16. Koumi S, Sato R, Hayakawa H (1995) The activation gate of cardiac Na⁺ channel modulates voltage- and pH-dependent unbinding of disopyramide. *Eur J Pharmacol* 227: 165-172
 17. Sato R, Hisatome I, Tanaka Y, Sasaki N, Kotake H, Mashiba H, Katori R (1991) Aprindine blocks the sodium current in guinea-pig ventricular myocytes. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 344: 331-336
 18. Grant AO, Strauss LJ, Wallace AG, Strauss HC (1980). The influence of pH on the electrophysiological effects of lidocaine in guinea pig ventricular myocardium. *Circ Res* 47: 542-550
 19. Deitmer JW, Ellis D (1980) Interactions between the regulation of the intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 304: 471-488