

## K<sup>+</sup> 脱分極心室筋の $\dot{V}_{\max}$ に対する isoproterenol の抑制作用

鳥取大学医学部内科学第一教室 (主任 真柴裕人教授)

久 留 一 郎

### Mechanism of isoproterenol-induced inhibition of residual fast channel via stimulation of beta- adrenoceptor in guinea pig ventricular muscle

Ichiro HISATOME

*Department of Internal Medicine, Tottori University*

*School of Medicine, Yonago 683, Japan*

#### ABSTRACT

This study was performed to elucidate the mechanism of isoproterenol-induced reduction in the maximum rate of rise ( $\dot{V}_{\max}$ ) of action potentials in guinea pig papillary muscle perfused with Tyrode's solution of different K<sup>+</sup> concentrations (2.7-14.9 mM).

In relatively high [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> (8.1-14.9 mM), the  $\dot{V}_{\max}$  is composed of 2 components, i.e., the  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  followed by  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$ . The  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  is a measure of residual (partly inactivated) fast channel while the  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  is that of slow channel. Isoproterenol depressed  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  with increase in  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$ , in a concentration-dependent manner (0.01-1  $\mu$ M), but  $\alpha$ -stimulant, phenylephrine (10  $\mu$ M) was without effect. The depression of  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  by isoproterenol (0.1  $\mu$ M) was remarkable in more depolarized membrane and was attributed to the negative shift (2.2 mV  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) of the curve relating  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  to the resting potentials along the voltage axis. A similar shift occurred in the presence of dibutyryl-cAMP (3 mM) or theophylline (4 mM). The isoproterenol-induced shift was inhibited in the presence of beta-blocker such as pindolol (1  $\mu$ g/ml) or atenolol (10  $\mu$ g/ml), but not by an  $\alpha$ -blocker, phentolamine (10  $\mu$ M), calcium antagonists, l-verapamil (1  $\mu$ M) and D 600 (0.4-10  $\mu$ M), or low calcium media (0.9 and 0.45 mM).

These results suggest that isoproterenol probably blocks "residual Na<sup>+</sup> channel" in depolarized ventricular muscle via stimulation of beta-receptor with an increase of cellular cAMP. The block seems not to be mediated by an increase in Ca<sup>2+</sup> influx or [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

(Accepted on December 17, 1984)

#### 緒 言

急性心筋梗塞の初期に発生する心室性不整脈はしば

しば生命を脅かすが、その発生機序の本態は十分明らかでない<sup>24)</sup>。冠動脈の血行途絶により心筋は好氣的代謝から嫌氣的代謝に移行するので、解糖による乳酸産

生が亢進し組織の  $\text{H}^+$  濃度が増加する<sup>27)</sup>。また、細胞膜の選択的透過性が失われ、細胞内に高濃度 (150 mM) に存在する  $\text{K}^+$  が流出し、かつ交感神経緊張により組織の catecholamine 濃度が上昇することも知られている<sup>18)25)27)</sup>。

間質  $\text{K}^+$  濃度  $[\text{K}^+]_o$  が増加すると、心筋膜の静止電位が減少するが、この変化は  $\text{Na}^+$  channel の不活性化をもたらす、活動電位の振幅が減少し、ついには活動電位の発生が停止する。しかしこの時同時に間質の catecholamine 濃度が増加していると、 $\text{Ca}^{2+}$  channel (slow channel) の活性化による slow response が生じる<sup>32)</sup>。slow response は名のごとく、① 伝導速度がきわめて遅く (slow conduction)、② 一方向性に伝導途絶をきたしやすく (unidirectional block)、いわゆる reentry 型不整脈の発生要因として重要である。

しかし reentry は  $\text{Ca}^{2+}$  channel 依存性の slow conduction に限らず、 $\text{Na}^+$  の通路である fast channel が、静止電位の減少 (脱分極) によって相当に不活性化を受け、活動電位の最大立ち上り速度 ( $\dot{V}_{\max}$ ) が著明に減少して生じてよいはずである。すなわち reentry が slow ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channel によるのか、fast ( $\text{Na}^+$ ) channel によるのかは、細胞膜の静止電位のレベルと、外液の catecholamine や  $\text{H}^+$  濃度の大小によって決まると推定される。

そこでまず問題となるのは、急に生じた冠動脈の閉塞で、虚血中心部の間質  $\text{K}^+$  濃度が生体内で一体どの程度まで上昇するのかという点であろう。心筋梗塞時の間質  $\text{K}^+$  濃度をヒトで直接測定することはできないが、最近 polyvinyl chloride を基質とする valinomycin 人工膜を用いた  $\text{K}^+$  感受性電極の開発により、イヌやブタの心臓で間質の  $\text{K}^+$  濃度を測定することが可能となった<sup>17)18)</sup>。Hill and Gettes<sup>17)</sup> によれば、ブタ心臓では冠動脈の急性閉塞による虚血中心部の間質  $\text{K}^+$  濃度は、閉塞 15 秒から急に上昇し、5~8 分で平均 10 mM にも達する。閉塞 20 分を過ぎると、 $[\text{K}^+]_o$  は再び上昇速度が増し、60 分後には 20 mM となる。一方 Hirche ら<sup>18)</sup> によれば、冠動脈結紮 10 秒後から  $[\text{K}^+]_o$  の急上昇がはじまり、3~4 分後の平均  $\text{K}^+$  濃度は 12.6 mM、8~9 分後には 14 mM に達する。結紮後 3~8 分の間は不整脈の発生率が高く、彼らはこの時期を不整脈第 1 相と呼んでいる。一方結紮後 10~20 分の間は  $[\text{K}^+]_o$  の上昇速度が遅く、不整脈もみられず比較的安定した時期である。結紮 20 分を過ぎると Hill and Gettes の場合と同様、再

び急速な  $[\text{K}^+]_o$  の増加がはじまり、15.5 mM 以上では不整脈が再開 (不整脈第 2 相)、結紮 48 分後には  $[\text{K}^+]_o$  は 24 mM に達したという。

このような実験的急性心筋梗塞 (不整脈第 1 相) で報告されているほぼ最高の間質  $\text{K}^+$  濃度 (14-17 mM) を有する高  $\text{K}^+$ -Tyrode 液にて摘出モルモット心室乳頭筋を灌流すると、細胞内活動電位の立ち上り相は抑制され二相性となり、その最大立ち上り速度 ( $\dot{V}_{\max}$ ) は前方成分 (32 V/s) と後方成分 (10 V/s) に分離して記録される (split  $\dot{V}_{\max}$ )<sup>2)3)</sup>。この前方成分 ( $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$ ) は半ば不活性化された fast channel (residual fast channel) の活動を示し、後方成分 ( $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$ ) は slow channel の活動を示すことが判明している<sup>2)3)</sup>。この時 catecholamine である isoproterenol は  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  を抑制し、同時に  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  を増加させる。つまり isoproterenol は  $\text{Na}^+$  channel を抑制し  $\text{Ca}^{2+}$  channel を促進することによって reentry の原因となっている slow conduction (30-35 cm/sec) を担う ion channel を fast ( $\text{Na}^+$ ) channel から slow ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channel に容易に変化させる<sup>2)3)</sup>。

Isoproterenol が心筋の  $\text{Ca}^{2+}$  channel の利用度 (availability) を促進する事実およびその機序については、すでに多くの報告がある<sup>9)32)33)</sup>。しかし  $\text{Na}^+$  channel を抑制する機序についての研究は全くなされていない。そこで私は isoproterenol の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制機序を明らかにする目的で以下の実験を行った。

## 実験方法

200-300 g のモルモットを頸部打撲により失神させ急速に心臓を摘出し、心室乳頭筋標本 (直径 0.8-1.0 mm、長さ 5-8 mm) を得た。その標本先端を実験用筋槽 (0.9 ml) の底にはったラバーにピンで固定し、基部を電気刺激用銀線輪状電極で固定した。刺激頻度 0.2 Hz、持続 3ms、閾値の 1.4~1.6 倍の矩形波電流を輪状電極と標本基部断端に密着するプラチナ板 (3×3 mm) の間に与えた。この刺激方法を用いると、ほぼ均一に伝播する活動電位を得ることができる<sup>3)</sup>。過分極刺激を用いると刺激強度の変化により  $\dot{V}_{\max}$  が不規則に変化するので常に脱分極性刺激 (cathodal stimulation) を用いた。

正常 Tyrode 液の組成は、NaCl 137, KCl 2.7,  $\text{MgCl}_2$  1.0,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{NaHCO}_3$  12,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.4, glucose 5.5 mM である。これを 97%  $\text{O}_2$ -3%

CO<sub>2</sub> で通気し, pH 7.4, 温度 36±0.2°C, 流速 3.0 ml/min で灌流した. 膜電位測定は通常の 3 MKCl で満たしたガラス微小電極 (抵抗 10~30 MΩ) で行ない, その一次微分波形を 0 から 500 V/s まで直線的に変化する微分器を用いて求め, オシロスコープ (日本光電工学 VC-9) でモニターし, 長時間連続撮影カメラ (日本光電工学 RLG-6101) で記録した.

高 K<sup>+</sup> 液 (2.7, 5.4, 8.1, 10.8, 13.5, 14.9 各 mM) は正常 Tyrode 液に KCl を加えて作製した. 浸透圧の補正は特に行ってない.

使用薬剤は d, l-isoproterenol hydrochloride (以下 ISP と略記, 半井化学), l-verapamil (Knoll), D600 (Knoll), pindolol (Sandoz), atenolol (ICI-Pharma), phentolamine mesylate (興和), phenylephrine (興和), theophylline (和光), dibutyryl-cAMP (Sigma) で, 使用直前に特定の濃度となるよう溶液に加えた.

正常 Tyrode 液で少なくとも一時間灌流後, 標本が安定化するのを待って 6 種類の K<sup>+</sup> 濃度の Tyrode 液で少なくとも 7 分間灌流し, 活動電位とその  $\dot{V}_{\max}$  を記録した (対照). その後 ISP ( $1 \times 10^{-8}$ ~ $1 \times 10^{-6}$  M) を加えた上記濃度の K<sup>+</sup> Tyrode 液で実験を繰返し, ISP の効果を観察した. また目的によって上記の実験を Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤や  $\beta$  遮断剤存在下で行った. なお同一細胞からの膜電位記録が成功した実験のみをデータとして採用した.

一定の制約のもとで<sup>10)20)</sup>, 心筋の  $\dot{V}_{\max}$  は内向き Na<sup>+</sup> 電流のピーク値に比例し,  $\dot{V}_{\max}$  と静止電位 (Em) の関係 ( $\dot{V}_{\max}$ -Em 関係) は, 種々の膜電位における定常状態での内向き Na<sup>+</sup> 電流の不活性化曲線の指標と考えられる. そこで下に示す Beeler and Reuter<sup>7)</sup> の式に実験で求めた  $\dot{V}_{\max}$  と Em をあてはめ, 非線形最小二乗法により最も適合するパラメーターを micro-computer (Tandy TRS-80) により求めた.

$$\dot{V}_{\max} = \dot{V}_s / (1 + \exp[(E_m - E_f)/S])^2$$

$\dot{V}_s$ :  $\dot{V}_{\max}$  の saturation value  
 $E_f$ :  $\dot{V}_{\max}$  が  $\dot{V}_s$  の 1/4 の値の時の膜電位  
 $S$ : slope factor

モルモット心室筋の  $\dot{V}_{\max}$ -Em 関係には Beeler and Reuter の式がよく適合することがすでに確かめられている<sup>23)</sup>. 有意差の検定には paired t-test を用い  $p < 0.05$  のものを有意とした.

## 成 績

### 1. 高 K<sup>+</sup> 液中での活動電位立ち上がり相のイオン機序と isoproterenol の効果

Tyrode 液の K<sup>+</sup> 濃度を 2.7 mM から 13.5 mM へ増加させると静止電位は脱分極し, 活動電位立ち上がり相は抑制される. 図 1 は  $[K^+]_0 = 13.5$  mM で灌流し定常状態になった時の活動電位立ち上がり相とその一次微分波形を示す. 活動電位立ち上がり相に step が生じ, これを反映して  $\dot{V}_{\max}$  は峰分れし, 2 峰性  $\dot{V}_{\max}$  (split  $\dot{V}_{\max}$ ) となる.

split  $\dot{V}_{\max}$  の前方成分 ( $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$ ) は比較的鋭く振幅も大きい, 後方成分 ( $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$ ) は鈍く振幅が小さい. 標本の中には後方成分が明確に区別できない例もあり, この場合の  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の測定には  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の鋭い減衰と  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の鈍い減衰の変曲点を用いた (図 2 B 矢印).  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  は residual fast channel の活動を示し, fast channel の選択的阻害剤により抑制され,  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  は slow channel の活動を示し, slow channel の選択的阻害剤により抑制されることがわかっている<sup>23)</sup>.

図 2 A は  $[K^+]_0 = 14.9$  mM で灌流した時の活動電位とその一次微分波形を示す. ISP ( $10^{-7}$  M) 投与後 1~2 分で  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制と  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加がみられる (図 2 B, C). しかし静止電位には変化がない. 3 分後には  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  がさらに減少し,  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  がさらに増加するため 2 つの成分はほぼ同じ大きさとなった (図 2 D). このように ISP は split  $\dot{V}_{\max}$  に対して異った二つの効果, 即ち  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加と  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制効果を有する.

図 3 A, B, C は ISP ( $10^{-7}$  M) 投与前,  $[K^+]_0$  をそれぞれ 5.4, 13.5, 14.9 mM とし, 7 分間灌流した時 (定常状態) の活動電位と, その一次微分波形を示す. これに対し図 3 C, D, E は同一条件で ISP 投与後を示す. ISP は 5.4 mM  $[K^+]_0$  の深い膜電位では  $\dot{V}_{\max}$  を抑制しないが, 13.5, 14.9 mM  $[K^+]_0$  で灌流時の浅い膜電位では  $\dot{V}_{\max}$  を抑制し, 刺激アーチファクトから活動電位立ち上がりまでの時間 (latency period) を延長する (伝導速度の抑制).

### 2. $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$ -Em 関係に対する isoproterenol の効果とその作用機序

図 4 A は  $[K^+]_0$  を 2.7, 5.4, 8.1, 10.8, 13.5 mM と段階的に増加させることにより得られた  $\dot{V}_{\max}$ -Em 曲線に対する ISP ( $10^{-7}$  M) の効果を示す. 曲線

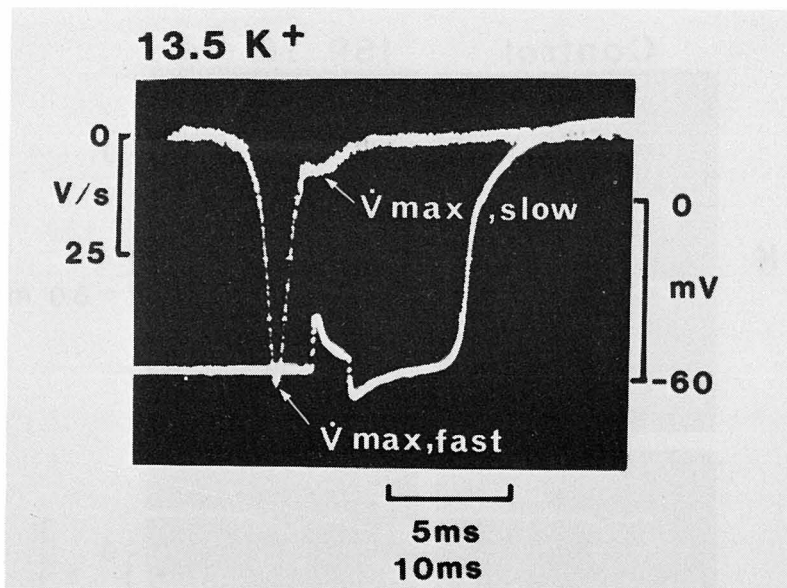


図 1.  $\text{K}^+$  濃度 13.5 mM の Tyrode 液で灌流し, 0.2 Hz で刺激した時のモルモット心室乳頭筋の活動電位立ち上がり相の 2 つの成分  
下段は活動電位立ち上がり相, 上段は立ち上がり相の一次微分波形. 活動電位立ち上がり相は二相性を示し, その一次微分波形は  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  と  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の二峰性となることに注意. (上, 下段の記録の描引速度は異なり, また重なりを防ぐため時相がずらしてある.)

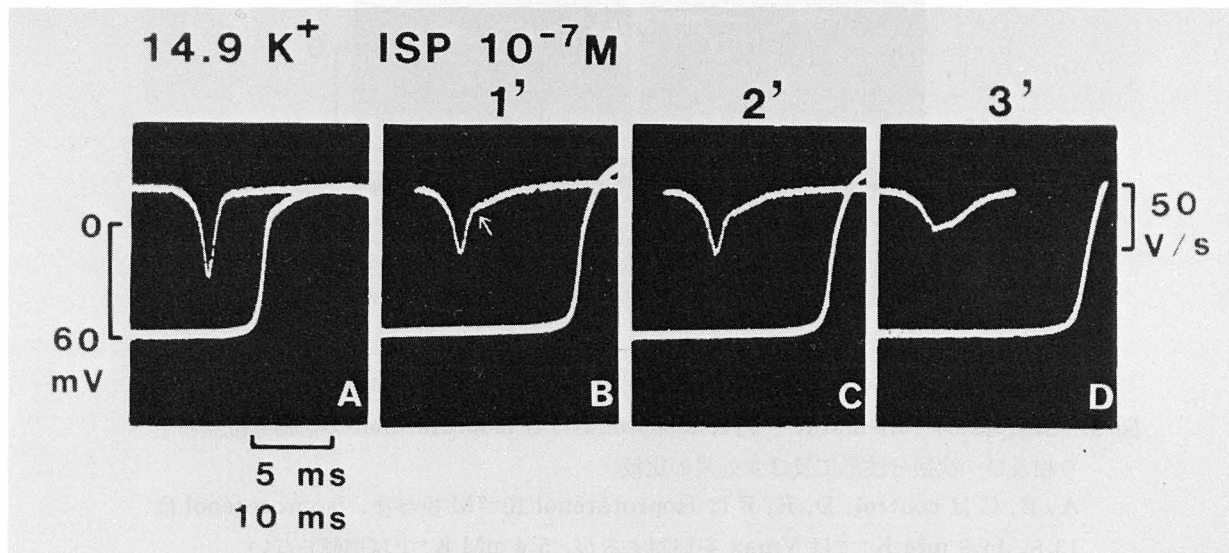


図 2. Isoproterenol ( $10^{-7}\text{M}$ ) の活動電位及び一次微分波形に及ぼす効果

A は control, B, C, D は isoproterenol 投与後 1 分, 2 分, 3 分を示す. B の矢印は  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  と  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の移行部を示す. 14.9 mM  $\text{K}^+$ -Tyrode 液中での記録

は実験値に最も良く適合する Beeler and Reuter の式の各パラメーターを求めこれに基いて描いてある. 図 4 B は図 4 A の曲線を,  $\dot{V}_{\text{max}}$  の最大値をそれぞれ 1 として標準化したものである. 即ちこの標本では,

ISP は  $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線を過分極方向に偏移させ, 標準化曲線 (図 4 B) でみると fast channel が full activation 時の 25% に不活性化される電位 ( $E_f$ ) を  $-62.5\text{ mV}$  から  $-65.0\text{ mV}$  へと 2.5 mV 過分極方向

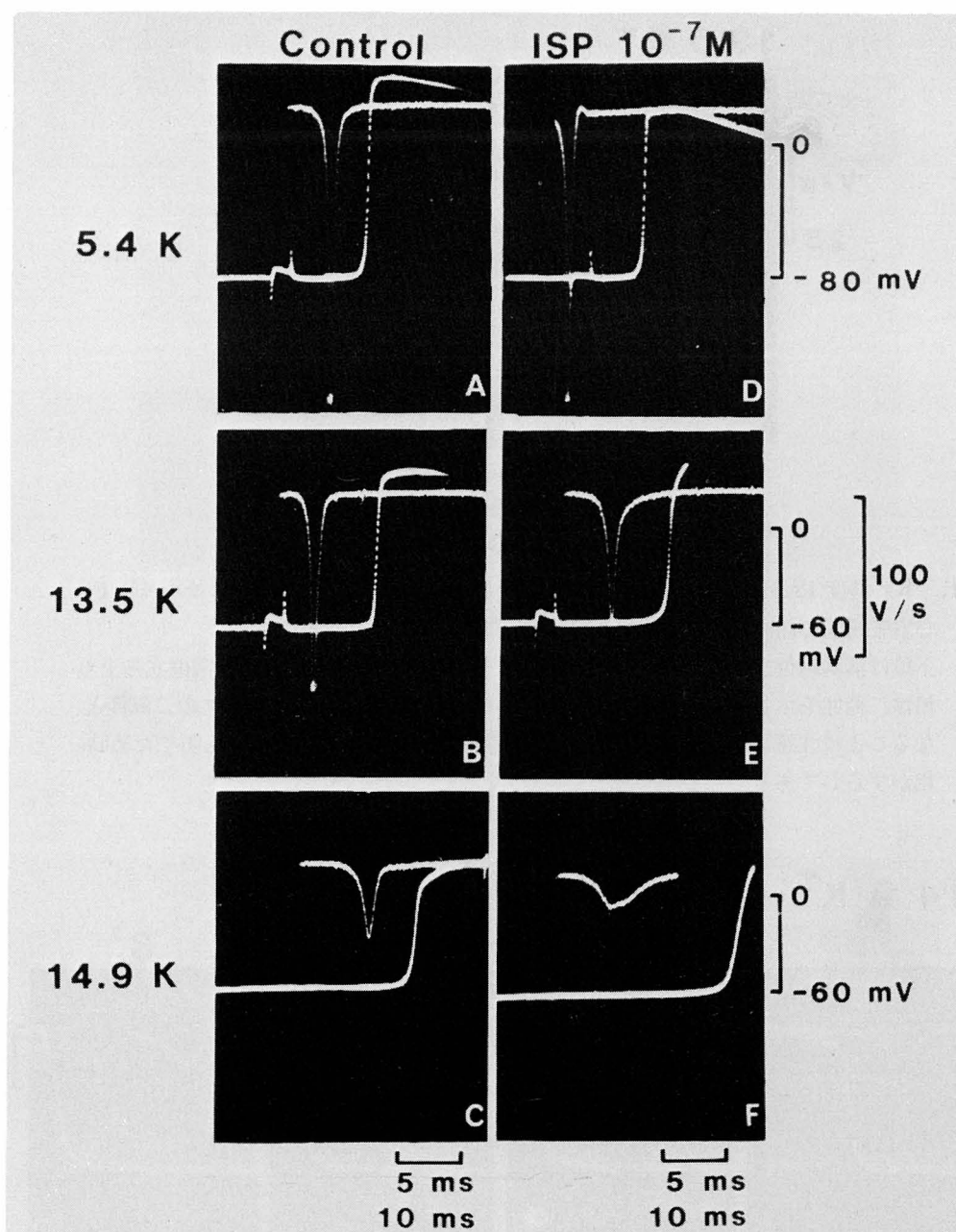


図 3. 5.4, 13.5, 14.9 mM  $K^+$ -Tyrode 液中における isoproterenol の活動電位立ち上り相及び一次微分波形に及ぼす効果の比較

A, B, C は control, D, E, F は isoproterenol  $10^{-7}M$  投与後. isoproterenol は 13.5, 14.9 mM  $K^+$  では  $\dot{V}_{max}$  を抑制するが, 5.4 mM  $K^+$  では抑制しない

に偏移させた. 図 5 A は同様の実験 7 例から得られた結果のまとめであり, 図 5 B はその標準化曲線を示す. ISP は  $\dot{V}_{max}$ -Em 曲線 (Ef) を平均値で  $-58.8$  mV から  $-61.0$  mV へと  $2.2$  mV 過分極方向へ有意に偏移させたが,  $\dot{V}_s$  ( $\dot{V}_{max,fast}$  の saturation value) と S (曲線の傾き) には有意の変化をもたらさなかった (表 1).

ISP は  $\dot{V}_{max,slow}$  の増加作用を有するため<sup>29)</sup> (図 2 B-D), ISP の  $\dot{V}_{max,fast}$  の抑制は slow inward current の増加による細胞内  $Ca^{2+}$  の増加が膜内側の surface negative charge を変化させた可能性がある. そこで選択的に  $Ca^{2+}$  channel を抑制すると考えられる l-verapamil ( $1 \mu g/ml$ )<sup>5)30)</sup> 存在下で同様の実験を行った. l-verapamil はこの濃度で

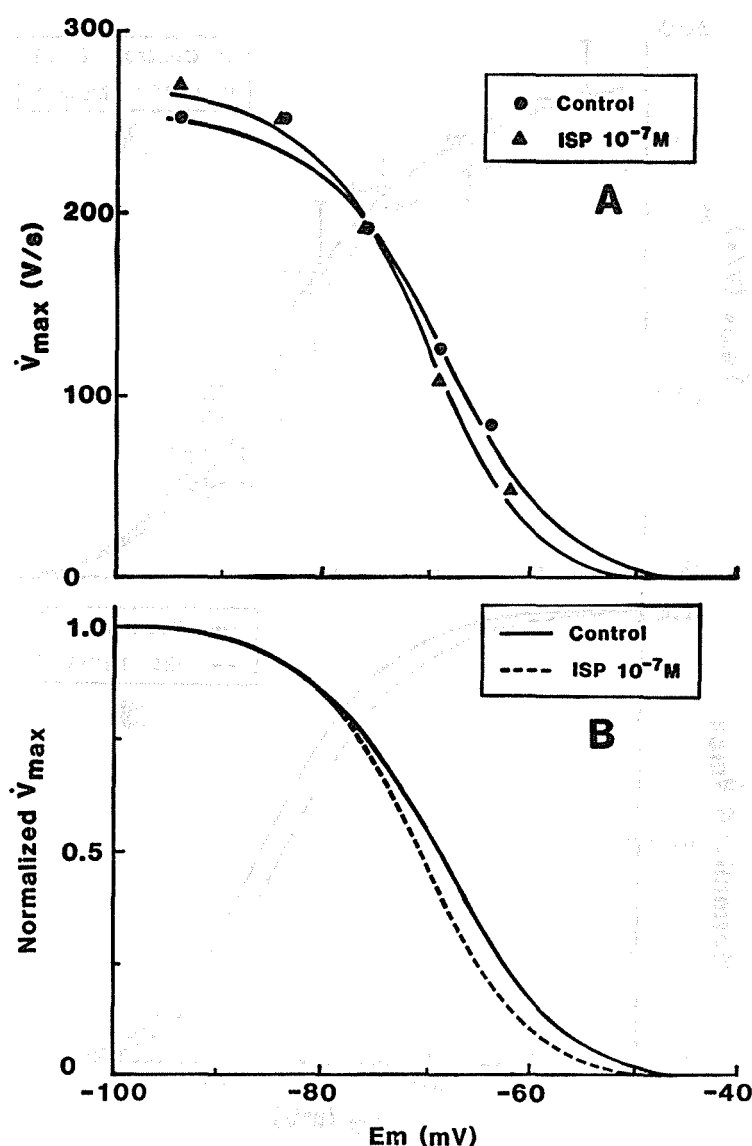


図 4. Isoproterenol の  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線に及ぼす効果

A : ● は control, ▲ は isoproterenol ( $10^{-7}\text{M}$ ) を示す.

B :  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の最大値を 1.0 として標準化した曲線

$\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  を完全に抑制することがわかっている<sup>3)</sup>. 実験に際して, l-verapamil の投与は ISP 投与 30 分前に開始し, 実験終了まで持続した. l-verapamil が存在しても ISP は  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線 ( $E_f$ ) を  $-59.5\text{ mV}$  から  $-62.4\text{ mV}$  へ  $2.9\text{ mV}$  過分極方向へ偏移させた (図 6 A, B). 同様の実験 7 例から, ISP は  $\dot{V}_s$  と  $S$  を有意に変化させず,  $E_f$  を平均値で  $-63.1\text{ mV}$  から  $-65.4\text{ mV}$  へ  $2.3\text{ mV}$  過分極側へ有意に偏移させることが判明した (表 1).

以上より ISP による  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線の過分極方向への偏移は slow inward current の増加とは直接関係がないと推定された.

Isoproterenol は強い  $\beta$  受容体刺激剤であるため, 次に  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制に対する  $\beta$  adrenoceptor の関与について検討した. まず  $\beta$  blocker, pindolol ( $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 存在下で, ISP の  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線に対する効果を調べた. 図 7 の典型例で示すように, pindolol 存在下では,  $E_f$  は ISP 投与前で  $-52.2\text{ mV}$ , 投与後で  $-52.4\text{ mV}$  であり, ISP による  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線の偏移が見られなくなった. pindolol 存在下で行った同様の実験 5 例の平均値で見ても,  $E_f$  は ISP 投与前が  $-58.0\text{ mV}$ , 投与後が  $-57.8\text{ mV}$  であり, 有意の偏移ではなかった (表 1).

Pindolol は非心臓選択性の  $\beta$  blocker で, 局所麻

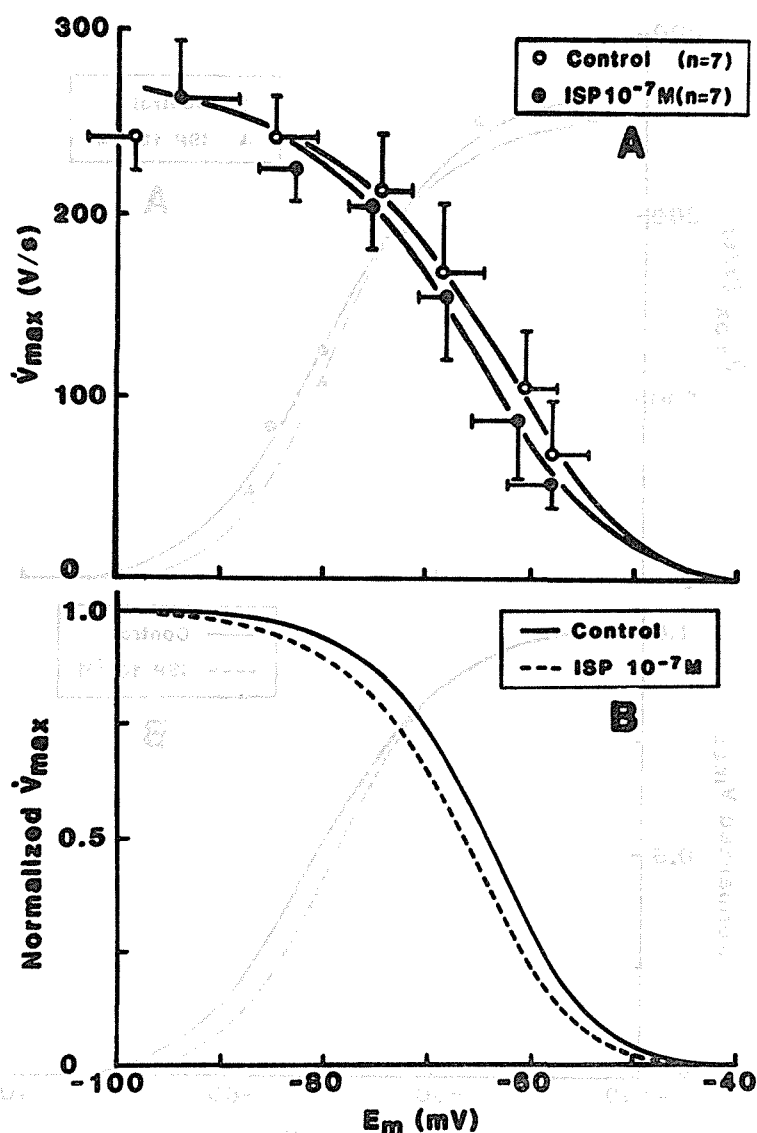


図 5. 種々の  $K^+$  濃度 (2.7, 5.4, 8.1, 10.8, 13.5, 14.9 mM)-Tyrode 液における  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  と膜電位 ( $E_m$ ) の関係 ( $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線) に対する isoproterenol の効果

A: ○ は control, ● は isoproterenol ( $10^{-7}$  M) 存在下を示し, 各点における縦棒と横棒は標準偏差を示す ( $n=7$ ).

B: A の標準化曲線

酔作用を有しない反面, 強い内因性交感神経刺激作用を有する<sup>4)</sup>. そこで内因性交感神経刺激作用も局所麻酔作用も有しない心臓選択性の  $\beta$  blocker, atenolol<sup>8)15)</sup>を用いてみた. atenolol (10  $\mu$ g/ml) は pindolol と同様に, isoproterenol による  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線の偏移を完全に阻止した. つまり ISP による  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制は  $\beta_1$  receptor を介しており, 局麻作用や交感神経刺激作用の有無とは関係がない現象であることが明らかとなった.

次に ISP の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制作用が  $\alpha$  receptor を介している可能性<sup>25)</sup>につき検討した. 図 8 a は 13.5 mM  $K^+$  における活動電位と  $\dot{V}_{\max}$  を示す. b は  $\alpha$  stimulant である phenylephrine  $10^{-5}$  M 投与後を示し, c はこれにさらに ISP  $10^{-7}$  M 追加投与した場合である. phenylephrine を投与しても  $\dot{V}_{\max}$  には影響せず, ISP 投与により  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制と  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加が認められる. d は c の記録後, 標本を 13.5 mM  $K^+$  Tyrode 液で wash out 後の活

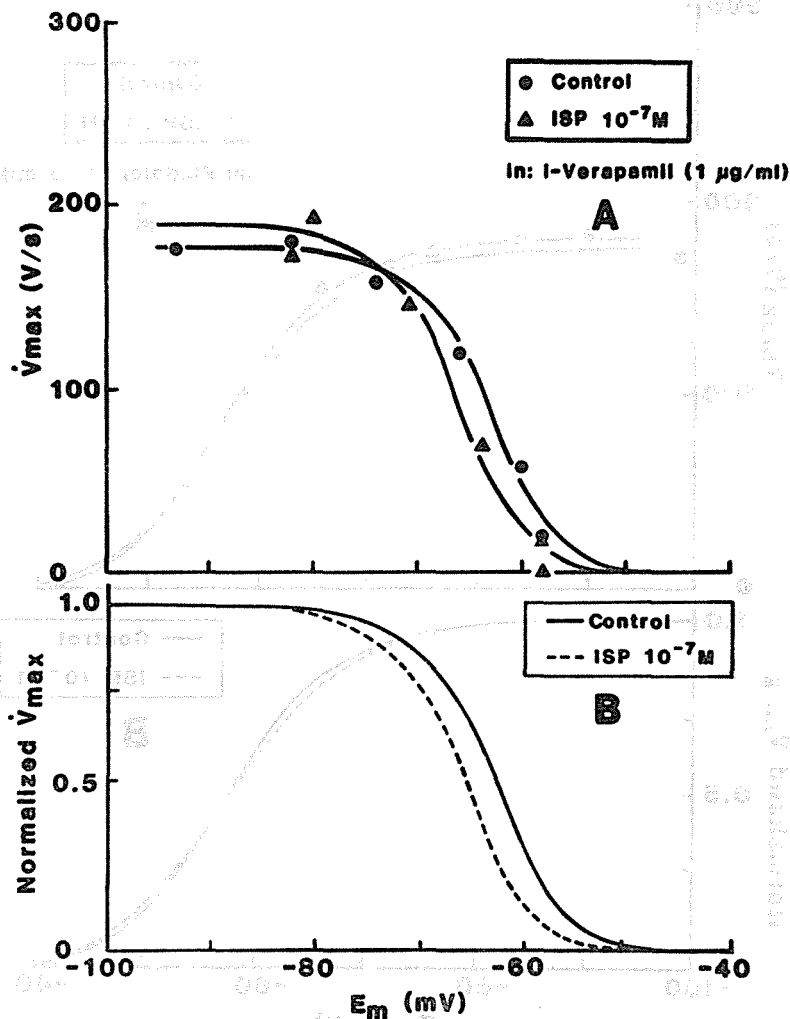


図 6. 1-verapamil ( $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 存在下における isoproterenol の  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線に及ぼす効果

A: ●は control, ▲は isoproterenol ( $10^{-7}\text{M}$ ) を示す.

B: A の標準化曲線

動電位と  $\dot{V}_{\max}$  を示しており回復は完全である. e はこれに  $\alpha$  blocker, phentolamine  $10^{-5}\text{M}$  を投与した場合を示し, f はそれに ISP  $10^{-7}\text{M}$  を追加投与した場合である. phentolamine を投与しても  $\dot{V}_{\max}$  には影響せず, ISP 投与で  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制と  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加が認められる. 以上の結果より  $\alpha$  stimulant 及び  $\alpha$  blocker は  $\dot{V}_{\max}$  には作用せず, また  $\alpha$  stimulant や  $\alpha$  blocker が存在しても ISP が  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  を抑制することにより, ISP の  $\dot{V}_{\max}$ , fast 抑制作用発現には,  $\alpha$  receptor は関与していないと考えられる.

一方 ISP は adenylate cyclase を介して cyclic AMP を増大<sup>16)28)33)</sup>させるので,  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制が細胞内 cAMP の増加を介している可能性につき検

討した. 細胞内 cAMP を増加させるために二つの方法を用いた. すなわち phosphodiesterase を抑制する theophylline を用いる方法と, 細胞外から細胞内へ拡散し cAMP としての作用を発揮する dibutyryl-cAMP を用いる方法である. theophylline  $4 \times 10^{-3}\text{M}$  投与により,  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線は平均  $3.8\text{ mV}$  ( $n = 3$ ) 過分極方向へ偏移した. つまり theophylline によっても ISP 作用時と同様の効果を認めた.

図 9 a は  $14.9\text{ mM K}^+$  Tyrode 液中での活動電位と  $\dot{V}_{\max}$  を示す. b, c, d は dibutyryl-cAMP  $3 \times 10^{-3}\text{M}$  投与後 10 分, 20 分, 30 分の活動電位と  $\dot{V}_{\max}$  であるが, dibutyryl-cAMP により  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  が抑制され,  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  が増加していくのがわかる. これらの結果から細胞内に cAMP が増加す



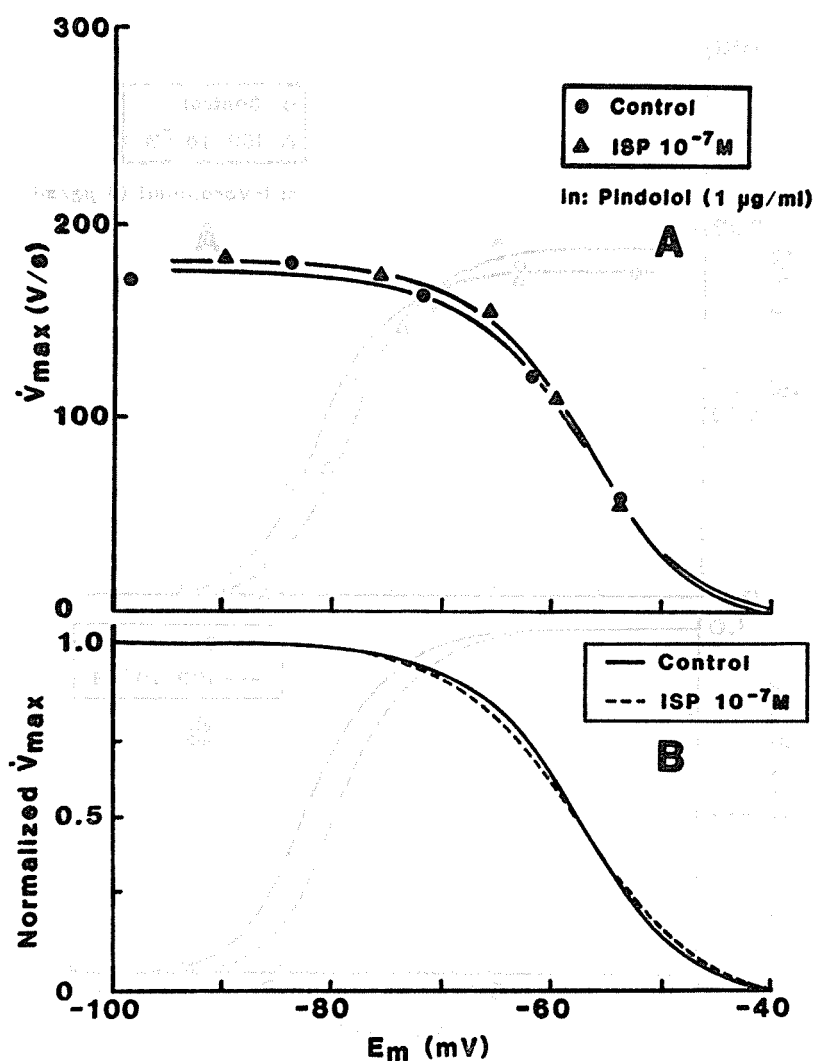


図 7. Pindolol ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) 存在下における isoproterenol の  $\dot{V}_{\max}$ - $E_m$  曲線に及ぼす効果

A: ● は control, ▲ は isoproterenol ( $10^{-7}\text{M}$ ) を示す.

B: A の標準化曲線

表 1. Fast channel の不活性化を規定する各パラメータ (定常状態) に及ぼす isoproterenol の効果 (上段—no treatment) と, その l-verapamil (中段), または pindolol (下段) による修飾.

Treatment	n	ISP	$\dot{V}_s$ (V/s)	$E_f$ (mV)	$\Delta E$ (mV)	S (mV)
no treatment	7	absent	$251.2 \pm 25.7$	$-58.8 \pm 4.8$	-2.2	$6.2 \pm 2.1$
		present	$258.3 \pm 19.5$	$-61.0 \pm 4.7^\dagger$		$6.6 \pm 2.5$
l-Verapamil ( $1\mu\text{g/ml}$ )	7	absent	$223.5 \pm 36.7$	$-63.1 \pm 3.8$	-2.3	$5.5 \pm 3.5$
		present	$228.0 \pm 38.0$	$-65.4 \pm 3.7^\dagger$		$4.4 \pm 1.0$
Pindolol ( $1\mu\text{g/ml}$ )	5	absent	$214.9 \pm 29.7$	$-58.0 \pm 3.1$	+0.2	$5.6 \pm 3.3$
		present	$210.3 \pm 24.3$	$-57.8 \pm 2.8$		$6.0 \pm 2.1$

$\dot{V}_s = \dot{V}_{\max}$  の saturation value

$E_f = \dot{V}_{\max}$  が  $\dot{V}_s$  の  $1/4$  の時の膜電位

S = slope factor

$\Delta E$  = isoproterenol 投与前後の  $E_f$  差 (マイナスは  $E_f$  が過分極方向に偏移したことを示す)

† : 直上の数値に対し有意差があることを示す ( $p < 0.05$ ).

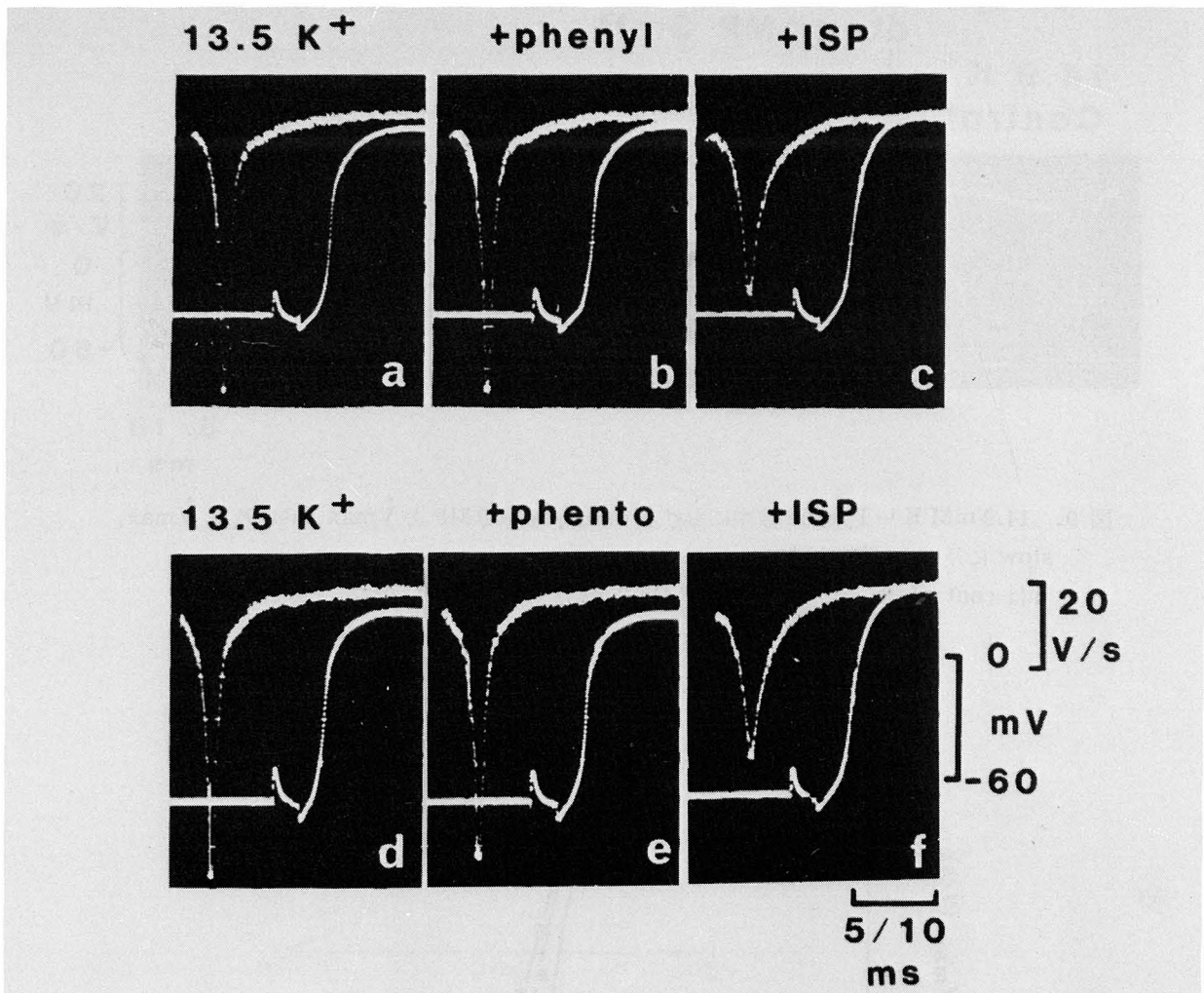


図 8. Isoproterenol による  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制に及ぼす  $\alpha$  受容体の効果

a は control, b は phenylephrine ( $10^{-5}\text{M}$ ) の作用, c は phenylephrine 存在下で isoproterenol ( $10^{-7}\text{M}$ ) の作用を示す. d は c の状態で wash out 1 時間後(再 control), e はそれに対する phentolamine ( $10^{-5}\text{M}$ ) の作用, f は phentolamine 存在下における isoproterenol ( $10^{-7}\text{M}$ ) の作用を示す. phenylephrine 又は phentolamine を投与しても isoproterenol の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制作用には影響がみられない.

ると  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制作用がおけると推定される. つまり ISP による  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制作用は  $\beta$  receptor を介して細胞内 cAMP 増加により  $\dot{V}_{\max}$ -Em 曲線が過分極方向へ偏移するために出現したものと考えられる.

### 3. Isoproterenol による $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$ の濃度依存性抑制の検討

図 10 は 10.8, 13.5, 14.9 mM  $[\text{K}^+]_o$  で ISP 濃度を  $10^{-7}\text{M}$  から  $10^{-6}\text{M}$  まで増加させた時の  $\dot{V}_{\max}$ -Em 曲線の偏移を示す. 10.8 mM  $[\text{K}^+]_o$  での比較的深い膜電位では ISP 濃度増加による  $\dot{V}_{\max}$  の抑制は小さいが, 14.9 mM  $[\text{K}^+]_o$  での浅い膜電位では濃度

増加による抑制は著明となる.  $\dot{V}_{\max}$ -Em 曲線の Ef は, ISP 投与前が  $-61.9\text{mV}$ ,  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  ISP 投与で  $-63.7\text{mV}$ ,  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  ISP 投与で  $-64.4\text{mV}$  と濃度依存性に過分極方向へ偏移した. 図 11 は 13.5 mM  $[\text{K}^+]_o$  における ISP の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の濃度依存性抑制を示す.  $\text{Ca}^{2+}$  blocker と  $\beta$  blocker がともに存在しない場合 (control),  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  は ISP  $5 \times 10^{-7}\text{M}$  まで濃度依存性に抑制される. l-verapamil ( $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 存在下では濃度曲線は control に比し不変もしくはやや低濃度側へ偏移したが, pidolol  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  存在下では濃度曲線はより高濃度側へ偏移した. これらの結果から ISP は  $\beta$  adrenoceptor を

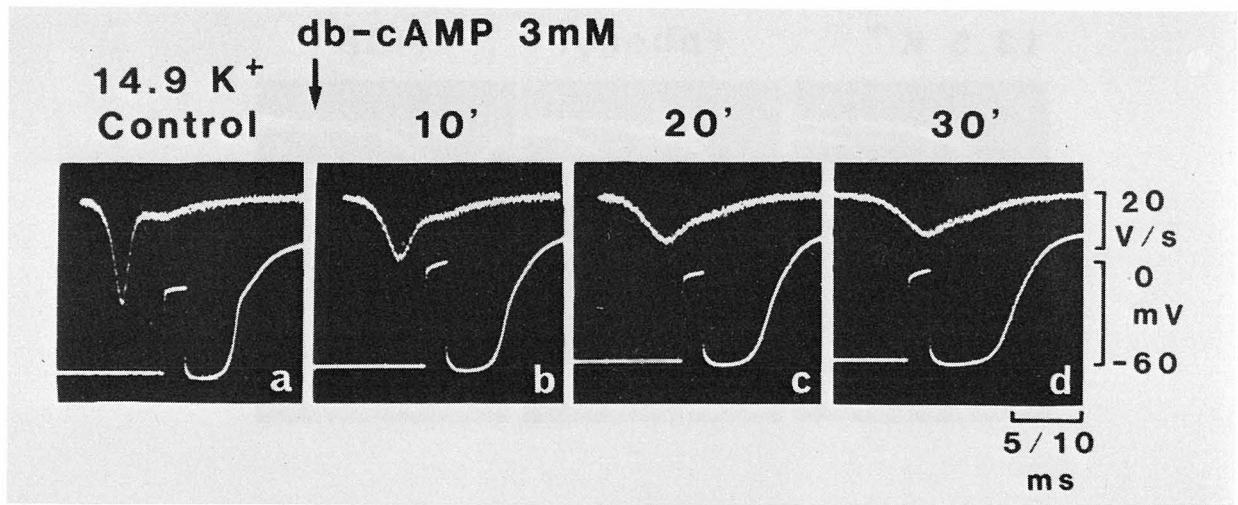


図 9. 14.9 mM  $K^+$ -Tyrode 液中における dibutyryl-cAMP の  $\dot{V}_{max,fast}$  及び  $\dot{V}_{max,slow}$  に及ぼす効果  
a は control, b, c, d は db-cAMP (3 mM) 投与後 10 分, 20 分, 30 分を示す。

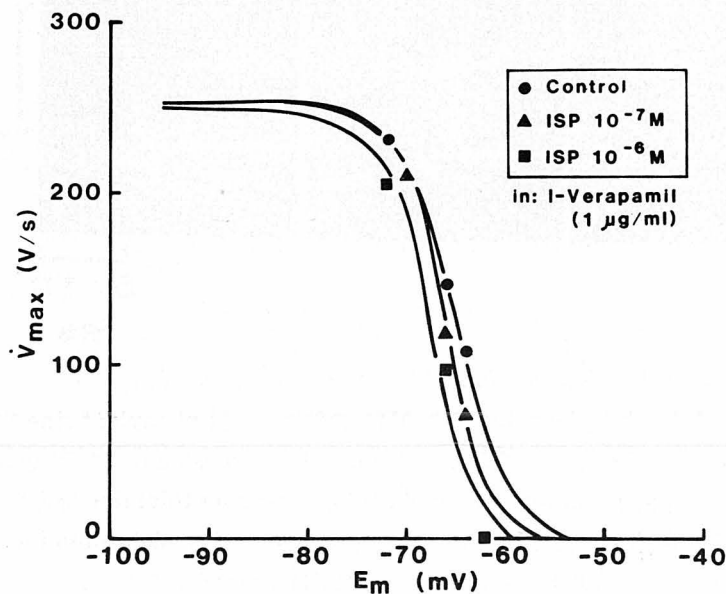


図 10. l-verapamil (1  $\mu$ g/ml) 存在下における isoproterenol の  $\dot{V}_{max}$ - $E_m$  曲線に及ぼす濃度効果  
● は control, ▲ は isoproterenol  $1 \times 10^{-7} M$ , ■ は isoproterenol  $1 \times 10^{-6} M$  投与後を示す。  
10.8, 13.5, 14.9 mM  $K^+$ -Tyrode 液における実験

介して濃度依存性に  $\dot{V}_{max}$ - $E_m$  曲線を過分極方向に偏移させその結果  $\dot{V}_{max,fast}$  を抑制することが判明した。

4. Isoproterenol による  $\dot{V}_{max,fast}$  の抑制作用に対する slow inward current の関与

これまでの結果より isoproterenol の  $\dot{V}_{max,fast}$  の抑制作用は  $\dot{V}_{max}$ - $E_m$  曲線の過分極方向への

偏移により説明でき、l-verapamil 1  $\mu$ g/ml が存在しても見られることより、slow inward current の増加を介する効果ではないと一応推定される。しかし ISP の  $\dot{V}_{max,slow}$  増加作用は強力で、標本によっては l-verapamil では  $\dot{V}_{max,slow}$  の増加を完全に抑制できない例もみられた。

図 12 は 13.5 mM  $[K^+]_o$  及び 14.9 mM  $[K^+]_o$

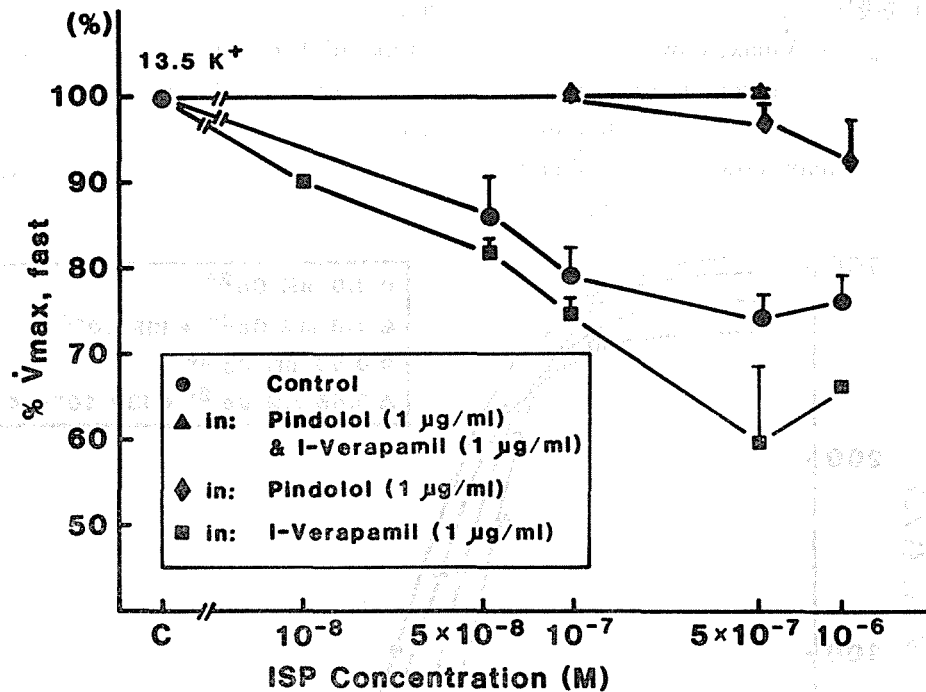


図 11.  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤または  $\beta$  遮断剤存在下, 非存在下における isoproterenol の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の濃度依存性抑制 (外液  $\text{K}^+$  濃度はすべて 13.5 mM) 縦軸は isoproterenol 投与前の  $\dot{V}_{\max}$  を 100 % として表示し, 横軸は isoproterenol 濃度を対数で表示した. ● は control, ■ は l-verapamil (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下, ◆ は pindolol (1  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下, ▲ は l-verapamil (1  $\mu\text{g/ml}$ ) と pindolol (1  $\mu\text{g/ml}$ ) の同時存在下を示す. 縦棒は標準偏差

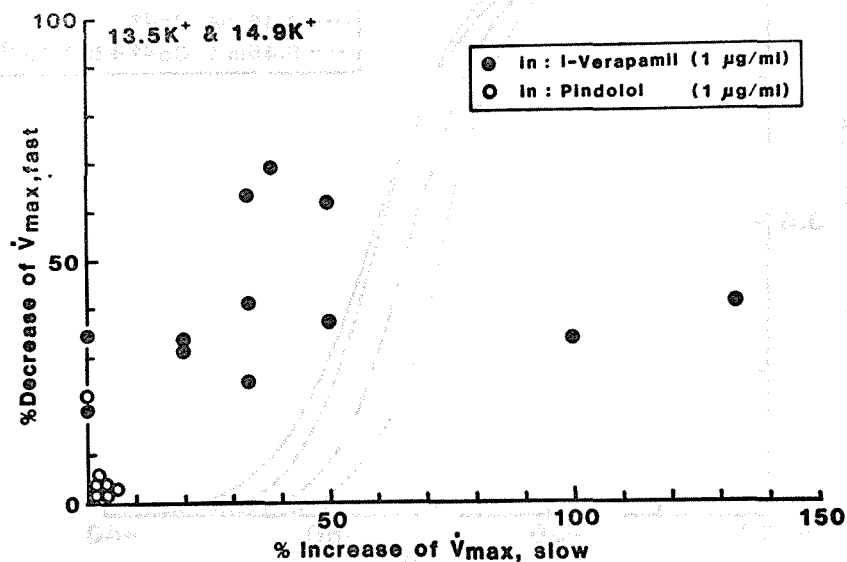


図 12. l-verapamil (●) または pindolol (○) 存在下における isoproterenol の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の減少作用と  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加作用との関係 縦軸は対照時 (isoproterenol 投与前) の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  を 100 として, isoproterenol による減少率を % で表わし, 横軸は対照時の  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  を 100 として isoproterenol による増加率を % で表示した. (外液  $\text{K}^+$  濃度は 13.5 mM または 14.9 mM)

で  $\text{ISP } 10^{-7}\text{M}$  を投与した時の多数標本における  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制率と  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の増加率の関係を表わしている。白丸は pindolol ( $1\mu\text{g/ml}$ ) 存在下であるが、全て原点に集中しており、pindolol があると  $\text{ISP}$  による  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の増加も  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制も全く生じないことを示す。黒丸は l-verapamil  $1\mu\text{g/ml}$  存在下であるが、その分布状態により  $\text{ISP}$  による  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の増加と  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制の間に何らかの相関がある可能性を否定できない。すなわち  $\text{ISP}$  による  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制

fast の抑制も全く生じないことを示す。黒丸は l-verapamil  $1\mu\text{g/ml}$  存在下であるが、その分布状態により  $\text{ISP}$  による  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の増加と  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制の間に何らかの相関がある可能性を否定できない。すなわち  $\text{ISP}$  による  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制

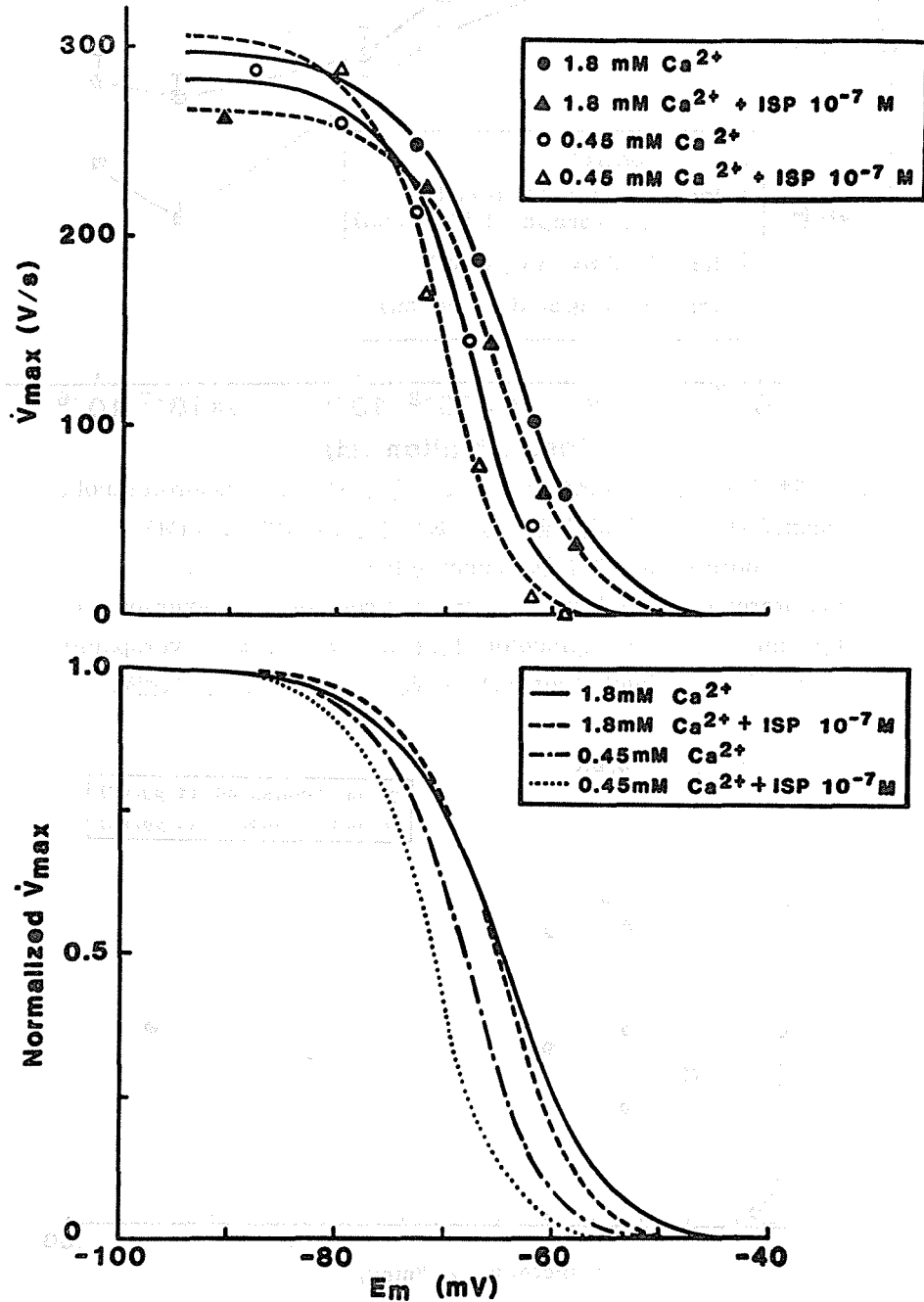


図 13.  $1.8\text{ mM Ca}^{2+}$  および  $0.45\text{ mM Ca}^{2+}$ -Tyrode 液中における isoproterenol の  $\dot{V}_{\text{max}}\text{-}E_m$  曲線に及ぼす効果

上段：●は  $1.8\text{ mM Ca}^{2+}$ -Tyrode 液中の記録。▲は  $1.8\text{ mM Ca}^{2+}$ 液中における isoproterenol  $10^{-7}\text{M}$  の効果。○は  $0.45\text{ mM Ca}^{2+}$  液中の記録  
△は  $0.45\text{ mM Ca}^{2+}$  液中における isoproterenol  $10^{-7}\text{M}$  の効果

下段：上段の標準化曲線

は、 $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の増加を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増加したため（例えば膜内側の surface negative charge が変化して）生じた可能性がある．そこで ISP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加を修飾する二つの方法（細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少と、 $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤の濃度の漸増）により ISP の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  抑制作用の変化を観察した．

図 13 は異った  $\text{Ca}^{2+}$  濃度（1.8 mM と 0.45 mM）で、ISP ( $10^{-7}\text{M}$ ) の  $\dot{V}_{\text{max}}\text{-Em}$  曲線に及ぼす効果を比較したものである．1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  においては、ISP 投与により  $E_f$  は  $-59.8\text{ mV}$  から  $-61.0\text{ mV}$  へ 1.2 mV 過分極方向へ偏移した．その後 0.45 mM  $\text{Ca}^{2+}$  に変えると ISP 投与前の  $\dot{V}_{\text{max}}\text{-Em}$  曲線は  $E_f$  が  $-64.1\text{ mV}$  となり 1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  のときに比して 4.3 mV 過分極方向に偏移した．そこで再び ISP

を投与すると、 $E_f$  は  $-64.1\text{ mV}$  から  $-67.3\text{ mV}$  へと 3.2 mV さらに過分極方向へ偏移した．ISP による過分極方向への  $E_f$  偏移は 0.45 mM  $\text{Ca}^{2+}$  のとき平均 3.1 mV ( $n=3$ ) であり、0.9 mM  $\text{Ca}^{2+}$  のとき平均 3.4 mV ( $n=5$ ) で両者に有意差はみられなかった．すなわち ISP の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制には細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は関与していない．従って細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化も関与していないと推定される．

ISP による  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制がもし slow inward current の増大（即ち  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の増加）を介するものであれば、 $\text{Ca}^{2+}$  blocker により  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の増加をいろいろな程度に抑制すれば、それに応じて ISP による  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制も回復してゆくことが予想される．まず予備実験を行い  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤、D600 は 2.7 mM  $[\text{K}^+]_0$  においては、

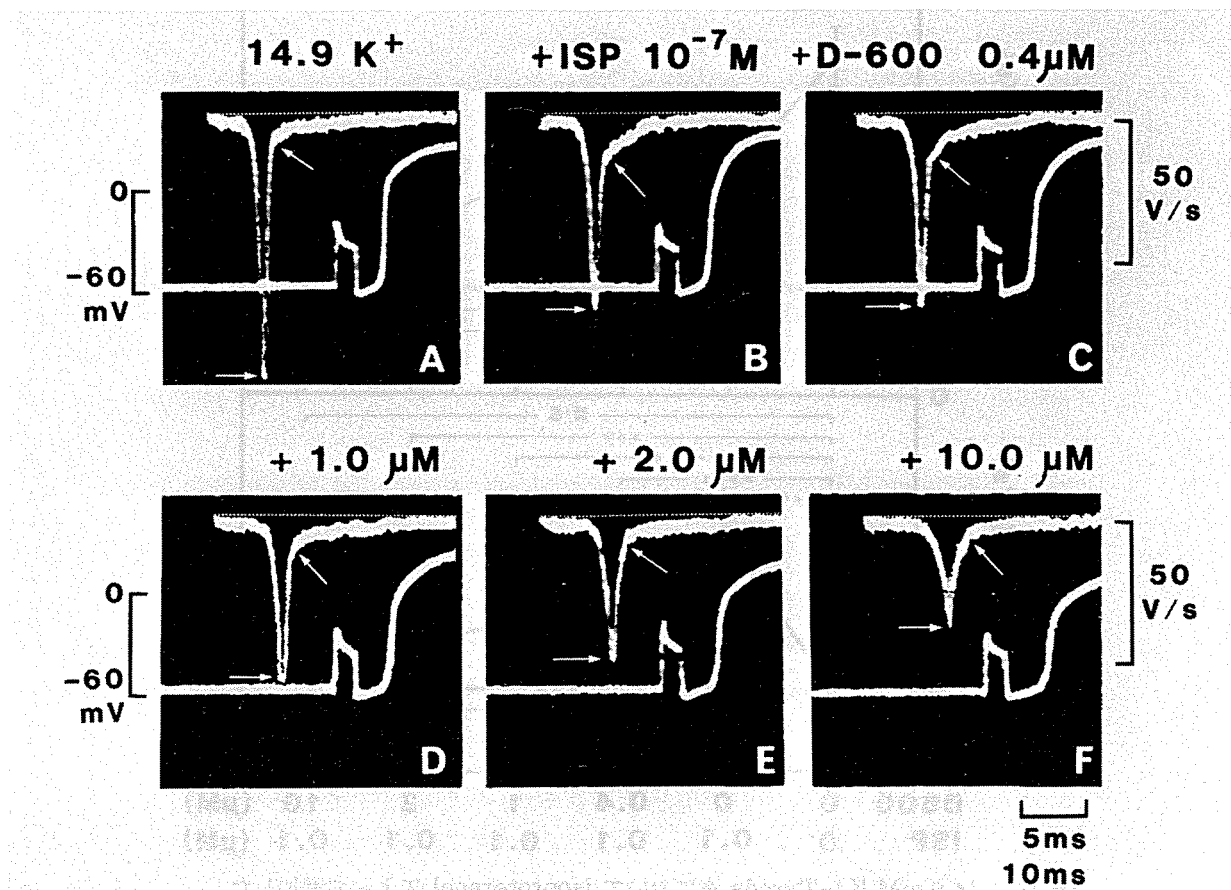


図 14. Isoproterenol により増加した  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  を D 600 の濃度を漸増することにより抑制した場合の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の変化（外液  $\text{K}^+$  濃度は 14.9 mM）

A は control, B は isoproterenol  $10^{-7}\text{M}$  投与時, C, D, E, F は isoproterenol 存在下で D600 の濃度を 0.4  $\mu\text{M}$  から 10  $\mu\text{M}$  へ順次増加させた場合を示す．各パネル中の矢印は  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  と  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  を、また点線はそれらの基線を示す．D600 の濃度を増加し  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  を減少させても、isoproterenol により減少した  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  は回復しない．

10  $\mu\text{M}$  まではモルモット心室筋の  $\dot{V}_{\text{max}}$  を抑制せず, 14.9 mM  $[\text{K}^+]_o$  においては 2  $\mu\text{M}$  までは  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  を抑制しないが  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  についてはこれを完全に抑制すること, また 10  $\mu\text{M}$  では  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  のほか  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  も軽度抑制することを確認した. つまり D 600 は少なくとも 2  $\mu\text{M}$  までは静止電位,  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  に全く影響を与えず,  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  を抑制する. 次にいろいろな濃度の D 600 を用いて, ISP により増加した  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  を抑制した時の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の変化を示す. 図 14 A は 14.9 mM  $[\text{K}^+]_o$  で ISP 投与前の活動電位と  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  及び  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$

slow (矢印) を示す. B はこれに ISP  $10^{-7}\text{M}$  を投与した時であるが, すでに述べたごとく  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  が抑制され  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  が増加した. C, D, E は D 600 0.4, 1.0, 2.0  $\mu\text{M}$  と次第に濃度を増加した時の記録である. D 600 の濃度依存性に  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  は抑制されてゆくが,  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  には少くとも増加はみられない. F は D 600 10  $\mu\text{M}$  の場合であるがこの濃度では  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  とともに  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  も著明に抑制されている. 図 15 は同様の実験 5 例の結果をまとめたものである. 横軸に ISP 及び D 600 の濃度を取り, 縦軸に  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  及び  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  の大きさをと

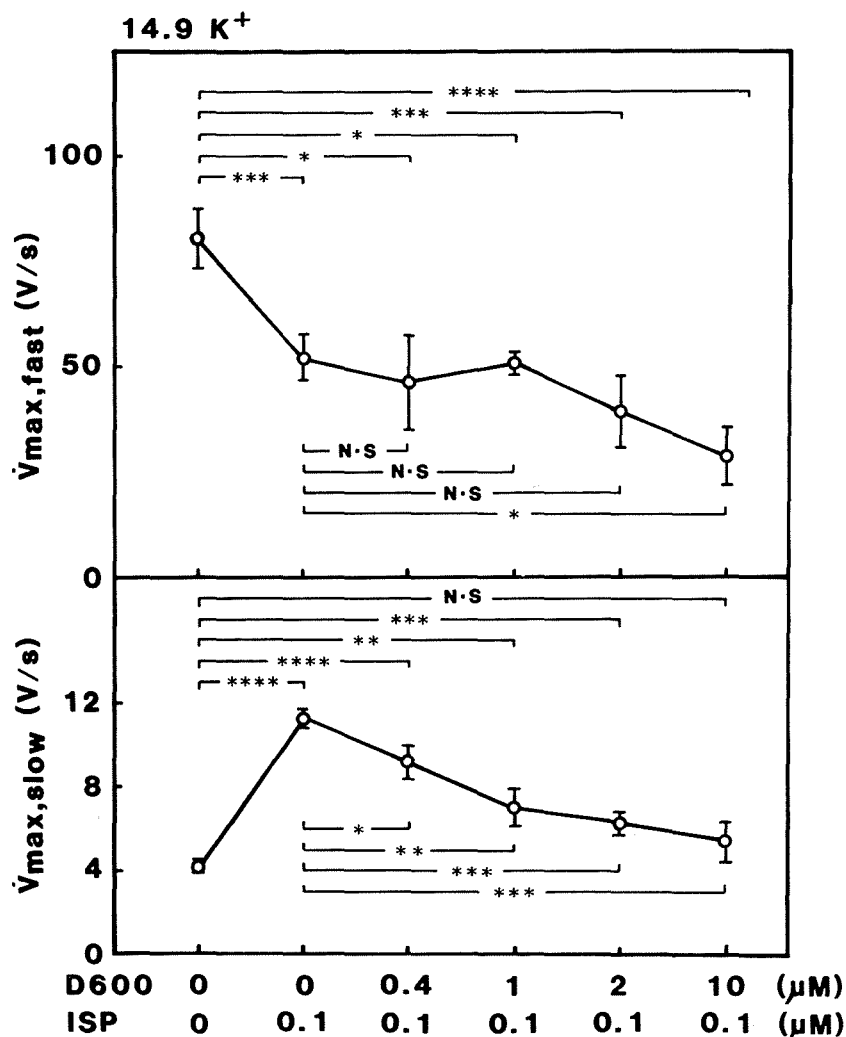


図 15. 14.9 mM  $\text{K}^+$ -Tyrode 液において isoproterenol によって増加した  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  を D 600 により濃度依存性に抑制した時の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の変化のまとめ ( $n = 5$ )  
縦軸に  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  と  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$ , 横軸に D 600 と isoproterenol の濃度を示す.

縦棒は標準偏差. 星印は横線で結んだ値の間に有意差があることを示す.  
(\*\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.02$ , \*  $p < 0.05$ ).

り、平均値で示している。ISP  $10^{-7}\text{M}$  を投与すると  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  は  $4.1 \pm 0.4 \text{ V/s}$  から  $11.2 \pm 0.8 \text{ V/s}$  へ有意に増加し、 $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  は  $80.8 \pm 14.5 \text{ V/s}$  から  $52.4 \pm 11.9 \text{ V/s}$  へ有意に抑制された。D600 を  $0.4 \mu\text{M}$  から順次  $10 \mu\text{M}$  へ増加させてゆくと、 $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  は  $9.1 \pm 1.6 \text{ V/s}$ ,  $7.0 \pm 2.0 \text{ V/s}$ ,  $6.2 \pm 1.1 \text{ V/s}$ ,  $5.4 \pm 2.1 \text{ V/s}$  と濃度依存性に有意に抑制されてゆく、しかるに  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  は  $2 \mu\text{M}$  までは  $46.6 \pm 22.7 \text{ V/s}$ ,  $51.7 \pm 2.3 \text{ V/s}$ ,  $39.9 \pm 17.1 \text{ V/s}$  と有意な変化を示さず最高濃度 ( $10 \mu\text{M}$ ) でのみ  $29.1 \pm 14.4 \text{ V/s}$  へと有意に抑制された。つまり D600 を濃度依存性に増加させて ISP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が種々に変化すると推定される条件を作っても、 $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制の程度には有意な変化がみられなかった。すなわち ISP は膜内側の surface negative charge の変化とは関係なく  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  を抑制するものと考えられる。

## 考 察

### 1. 高 $\text{K}^+$ 液中での活動電位立ち上り相のイオン機序と isoproterenol の効果

本研究においては、活動電位の最大立ち上り速度 ( $\dot{V}_{\text{max}}$ ) を fast 及び slow inward current の指標として用いた。ことに fast inward current の指標として  $\dot{V}_{\text{max}}$  を用いることの正当性については従来より賛否両論があり、多くの議論<sup>11)12)20)21)34)35)</sup>がなされている。最近 Walton and Fozzard<sup>35)</sup>は心筋の Purkinje 線維で、伝導している活動電位の  $\dot{V}_{\text{max}}$  と peak inward current の間に直線的な関係があることを示した。すなわち  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の減少はそのまま  $g_{\text{Na}}$  ( $\text{Na}^+$  conductance) または fast inward current の減少を示すと考えられる。しかし  $\dot{V}_{\text{max}}$  と fast inward current との関係を直接比較したごく最近の Cohen<sup>12)</sup>らの報告によると、 $\dot{V}_{\text{max}}$  と  $g_{\text{Na}}$  ( $\text{Na}^+$  conductance) の間には非直線的な関係しか認められないという。しかしながら  $\dot{V}_{\text{max}}$  の不活性化曲線と  $g_{\text{Na}}$  の不活性化曲線の膜電位依存性については、両者は平行して移動することが示された。つまりすでに指摘されたごとく薬物による  $\dot{V}_{\text{max}}$  の抑制は、ブロックされた正確な  $\text{Na}^+$  channel 数の指標とはならないが<sup>11)</sup>,  $\dot{V}_{\text{max}}$  の電位軸に沿った移動から  $g_{\text{Na}}$  の電位軸に沿った移動 (従って同一膜電位レベルにおける fast inward current の変化) を推定することは特に問題はないと考えられる。

さて高  $\text{K}^+$  液中でのモルモット心室筋の活動電位は

立ち上り相に step を生じ、その一次微分波形は 2 つの成分より構成される (図 1)。その前方成分 ( $\dot{V}_{\text{max,fast}}$ ) は residual fast channel の活動により生じ、後方成分 ( $\dot{V}_{\text{max,slow}}$ ) は slow channel により生じることが報告されている<sup>1)2)23)</sup>。この時の伝導速度は  $30 \sim 35 \text{ cm/sec}$  (slow conduction) であるが、伝導を担う channel は  $\text{Ca}^{2+}$  channel (slow response) ではなく大部分不活性化された  $\text{Na}^+$  channel (residual fast channel) である。しかし外液の catecholamine 濃度 (今回の実験では isoproterenol) が増加すると状況は一変し、 $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  は減少し、 $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  は増加する (図 2)。このことは ISP により slow conduction を担う channel が residual fast から slow channel へ変化することを示している。この ISP の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  と  $\dot{V}_{\text{max,slow}}$  に対する効果は深い (正常) 膜電位ではみられず、脱分極した浅い (異常) 膜電位でのみ出現する点は興味深い点だが、その理由については今後の検討が必要であろう。

### 2. Isoproterenol による $\dot{V}_{\text{max,fast}}$ 抑制機序

今回の実験によると、脱分極した膜電位で見られる ISP の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  抑制効果は、 $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線の過分極方向への偏移で説明可能であった (図 5)。よく知られているように<sup>19)20)23)31)36)37)</sup>, 細胞外液二価イオン濃度の増加は、膜の外側の surface negative charge の中和または遮へい効果により  $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線を脱分極方向に偏移させる。従ってもし ISP が slow inward current の増加を介し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を増加させ膜内側の surface negative charge を中和すれば、 $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線は過分極方向へ偏移してよいことになる。  $1 \mu\text{g/ml}$  濃度の l-verapamil はモルモット心室筋の slow inward current を完全に抑制することができる<sup>3)</sup>。しかしこの濃度の l-verapamil 作用下でも、ISP は  $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線を過分極方向へ有意に偏移させた (図 6)。この事実は ISP が膜内側の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変化させて  $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線を偏移させるのではないことを示唆する。一方  $\beta$  blocker (pindolol または atenolol) が存在すると isoproterenol は  $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線を全く偏移させることができなかった (図 7)。これらの結果から、isoproterenol による  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制は、slow inward current の増加とは関係なく、 $\beta$  adrenoceptor を介して生じると考えられる。またこの ISP 作用における  $\alpha$  receptor の関与を検討した結果、 $\alpha$  agonist である phenylephrine や  $\alpha$  blocker である phentola-



mine 存在下においても, ISP の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制作用は影響をうけないことが判明した (図 8). すなわち ISP の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制作用には  $\alpha$  receptor の関与はないと考えられる. さて ISP の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制作用が  $\beta$  receptor を介する反応であるとすれば細胞内 cAMP を他の方法で増加させても  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制が起こることが期待される. theophylline により phosphodiesterase 活性を抑制した場合, dibutyryl-cAMP により細胞内 cAMP を直接増加させた場合 (図 9), ともに ISP 投与と同様の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制と  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加が観察された. このことより ISP による  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制は細胞内 cAMP の増加を介し, これが  $\text{Na}^+$  channel の不活性化に関与する蛋白のリン酸化過程を変えたためではないかとの推定は可能であろう. 心筋では cAMP-dependent protein kinase  $\alpha$  catalytic subunit を単離した心室筋細胞内に注入すると  $\text{Ca}^{2+}$  電流が増加することが知られている<sup>9)</sup>. また最近 rat の脳から取り出された  $\text{Na}^+$  channel の  $\alpha$  subunit が cAMP-dependent protein kinase により速やかにかつ選択的にリン酸化されるとの報告<sup>26)</sup>があり,  $\text{Na}^+$  channel 活動の代謝依存性が示唆される.

### 3. Isoproterenol による $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$ の抑制作用と slow inward current の関与

ISP が  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  を抑制する機序として, (1) すでにのべたごとく  $\beta$  receptor 刺激を介して増加した cAMP が protein kinase を介して  $\text{Na}^+$  channel を抑制する経路, (2) slow inward current の増加が直接に, または  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release を介して細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を増加し, これが膜内側の negative charge を変化させて  $\text{Na}^+$  channel を不活性化する経路, 及び (3) ISP により筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出量が増加し, それにより細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増えて,  $\text{Na}^+$  channel を抑制する経路などが考えられる. 事実 ISP の  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加作用は強力であり, 1-verapamil 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加を完全には抑制できない標本もみられた (図 12). そこで細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を減少させるか<sup>6)29)</sup>,  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤の濃度を増加させることにより, ISP による slow inward current の増加を, いろいろな程度に抑制した時の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の変化を観察したが, 細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を減少させても ISP による  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  の抑制には変化がなかった (図 13). また D 600 により濃度依存性に  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  を抑制し

ても, ISP の  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制作用が解除されることはなかった (図 14, 15). この二つの実験から ISP が slow channel を活性化して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を変えることにより  $\text{Na}^+$  channel を抑制する経路は一応否定できると考えられる. このほか ISP が直接筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を促し,  $\text{Na}^+$  channel を不活性化する可能性については直接これを支持する報告はない. むしろ逆に ISP は心筋拡張期に  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を介して, 筋小胞体内への  $\text{Ca}^{2+}$  とり込みを促進する<sup>22)</sup>. 従って拡張期の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は, 増加よりむしろ減少が期待される. 加うるに ISP は  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  pump を活性化<sup>23)</sup>するので, 細胞内  $\text{Na}^+$  濃度を減少させ, これが  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を減少させる. すなわち ISP が  $\dot{V}_{\max}$ -Em 曲線を過分極方向に偏移させる効果は,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加を介するものとは考え難い.

### 4. 臨床との関連性

実験的に作られた心筋梗塞のごく初期 (数分以内) において, 梗塞巣の間質  $\text{K}^+$  濃度は 14~17 mM<sup>14)</sup> 17)18)に上昇することが報告されている. このとき norepinephrine も放出され, 血漿 norepinephrine 濃度が上昇する<sup>13)18)</sup>. 間質  $\text{K}^+$  濃度の増加及び norepinephrine 濃度の増加は slow channel または residual fast channel のいずれかの興奮による遅い伝導を形成し, reentry 型不整脈の原因となりうるであろう<sup>23)18)</sup>. 今回の実験結果は  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤や  $\beta$  遮断剤が梗塞部心筋に存在しない場合, reentry 型不整脈の slow conduction を担う ionic channel はおそらく residual fast channel であることを示している. しかし間質の catecholamine 濃度がある程度以上に増加すると, 伝導を担う channel は ( $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  が抑制され,  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  が増加するため) residual fast channel から slow channel に移行するものと考えられる. しかしながら  $\beta$  遮断剤があらかじめ投与されていると, catecholamine 濃度上昇による ionic channel の移行は生じ得ないであろう. なぜなら  $\beta$  遮断剤は catecholamine による  $\dot{V}_{\max, \text{fast}}$  抑制作用と  $\dot{V}_{\max, \text{slow}}$  の増加作用を同時にかつ完全に阻止するからである. 一方  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤があらかじめ投与されていると, 間質の catecholamine 濃度上昇により residual fast channel は強く抑制されるが, slow inward current は増加しないと考えられる. 従って  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤存在下では, catecholamine はあたかも quinidine や lidocaine のごとき局麻剤 ( $\text{Na}^+$  channel blocker) 類似

の作用を発揮し<sup>2)3)38)</sup>, residual  $\text{Na}^+$  channel 依存性の reentry であればこれを容易にブロックし, 不整脈は停止するものと推定される。

かくして, 今回脱分極心筋で明らかにした  $\beta$  受容体を介する residual fast channel の抑制現象は, 急性心筋虚血でみられる reentry 型不整脈の発生機序とその抗不整脈剤による治療を考える上で極めて重要な所見と考えられる。

## 結 語

1. Isoproterenol は  $[\text{K}^+]_0$  濃度 8.1~14.9 mM の範囲で摘出モルモット心室乳頭筋活動電位の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  (residual fast channel 活性化の指標) を抑制した。この現象は  $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線の過分極方向への偏移で説明できた。またこの偏移は isoproterenol の濃度 ( $10^{-8}$ ~ $10^{-6}\text{M}$ ) に依存した。
  2. Isoproterenol の  $\dot{V}_{\text{max}}-\text{Em}$  曲線の過分極方向への偏移は  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗剤では抑制できず,  $\beta$  遮断剤により抑制できた。 $\alpha$  受容体はこの現象には関与していなかった。また細胞内 cAMP を増加する theophylline や dibutyryl-cAMP 投与によっても, isoproterenol 投与と同様の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制がみられた。
  3. Isoproterenol による slow inward current の増加は本剤の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  の抑制作用には関与していなかった。
- 以上より isoproterenol の  $\dot{V}_{\text{max,fast}}$  抑制作用は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加とは直接関係がなく, 細胞内 cAMP の増加を介する反応であることが推察された。

稿を終えるに臨み, 終始御懇篤な御指導を賜った, 大分医科大学生理学 (第二) 教室有田真教授, および同教室の皆様, ならびに御助言, 御校閲を賜った, 恩師真柴裕人教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨の一部は, 第48回日本循環器学会総会ならびに第189回米子医学会例会で発表した。

## 文 献

- 1) Akasu, T., Ohta, Y. and Koketsu, K. (1978). The effect of adrenaline on the electrogenic  $\text{Na}^+$  pump in cardiac muscle cells. *Experientia* **34**, 488-490.
- 2) Arita, M., Kiyosue, T. (1981). Modulation of "depressed fast channel dependent slow conduction" by lidocaine and verapamil in the presence and absence of catecholamines. *Jpn Circ J* **47**, 68-81.
- 3) Arita, M., Kiyosue, T., Aomine, M., Imanishi, S. (1983). Nature of "residual fast channel" dependent action potential and slow conduction in guinea pig ventricular muscle and its modulation of isoproterenol. *Am J Cardiol* **51**, 1433-1440.
- 4) Barret, A. M. (1970). A survey of the pharmacological properties of adrenergic beta-receptor antagonists. *Int J Clin Pharmacol (Suppl. 3)*, 2-18.
- 5) Bayer, R., Kalushe, D., Kaufman, R., Mannuhold, R. (1975). Inotropic and electrophysiological action of verapamil and D 600 in mammalian myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **290**, 81-97.
- 6) Beeler, G. W. Jr. and Reuter, H. (1970). Membrane calcium current in ventricular fibers. *J Physiol (Lond)*, **207**, 191-209.
- 7) Beeler, G. W. and Reuter, H. (1977). Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* **268**, 177-210.
- 8) Braham, N. S., Heather, D. N., Edward, A. H., Robert, M. L. W. (1975). A comparison of the action of ICI 166082 and propranolol on cardiac and peripheral beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **34**, 75-86.
- 9) Brun, G., Flocker, V., Hoffman, F., Osteriede, W. and Trautwein, W. (1983). Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocyte. *Pflüger Archiv* **398**, 147-154.
- 10) Cohen, I., Attwell, D., Strichartz, G. (1975). The dependency of the maximum rate of rise of action potential upstroke on membrane properties. *Proc R Soc London* **137**, 218-244.
- 11) Cohen, I., Atwell, D., Strichartz, G. (1981). The dependency of the maximum rate of rise of action potential upstroke on

- membrane properties. *Proc R Soc London [Biol]* **214**, 85-98.
- 12) Cohen, C. J., Bean, B. P. and Tsien, R. W. (1984). Maximal upstroke velocity as an index of available sodium conductance. *Circ Res* **54**, 636-651.
  - 13) Goldstein, D. S. (1983). Plasma norepinephrine as an indication of sympathetic neural activity in clinical cardiology. *Am J Cardiol* **48**, 1147-1154.
  - 14) Harris, A. S. (1960). Potassium and experimental coronary artery occlusion. *Am Heart J* **71**, 797-802.
  - 15) Harry, J. D., Knapp, M. F., Linden, R. J. (1974). The actions of a beta-adrenoceptor blocking drug, ICI 66082, on the rabbit papillary muscle and the dog heart. *Br J Pharmacol* **51**, 169-177.
  - 16) Henion, W. F., Sutherland, E. W. and Posternak, T. H. (1967). Effect of derivatives of adenosine 3', 5'-phosphate on liver slices and intact animals. *Biochem Biophys Acta* **148**, 106-113.
  - 17) Hill, J. L. and Gettes, L. S. (1980). Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular  $K^+$  activity in swine. *Circulation* **61**, 768-778.
  - 18) Hirche, H. J., Frantz, C. H. R., Bos, L., Bissig, R., Lang, R. and Scharmann, M. (1980). Myocardial external  $K^+$  and  $H^+$  increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary artery occlusion. *J Mol Cell Cardiol* **12**, 579-593.
  - 19) Hogan, P. M., Spitzer, K. W. (1975). Magnesium and electrogenic phenomena in purkinje fibers. *Circ Res* **36**, 377-391.
  - 20) Hondeghem, L. M. (1978). Validity of  $\dot{V}_{max}$  as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissue. *Biophys J* **23**, 147-152.
  - 21) Hunter, P. J., McNaughton, P. A., Noble, D. (1975). Analytical models of propagation in excitable cells. *Prog Biophys Mol Biol* **30**, 99-144.
  - 22) Katz, A. M., Toda, M. and Kirchberger, M. A. (1975). Control of calcium transport in the myocardium by the cyclic AMP-protein kinase system. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **5**, 453-472.
  - 23) Kiyosue, T., Arita, M. (1982). Magnesium restores high  $K^+$ -induced inactivation of the fast  $Na^+$  channel in guinea pig ventricular muscle. *Pflüger Archiv* **395**, 78-80.
  - 24) Lazzara, R., El-Sheif, N., Hope, R. R. and Sherlag, B. J. (1978). Ventricular arrhythmias and electrophysiological consequence of myocardial ischemia and infarction. *Circ Res* **42**, 740-749.
  - 25) Magner, W. M. (1981). Catecholamines and heart. Bourne, G. H. (ed.) *Heart and Heart-like Organs*, Vol. 2, 161-202, Academic Press, New York.
  - 26) Maria, R. C. Vosta., John, E. Casnellie and Williams, A. Catteval. (1982). Selective phosphorylation of alpha-subunit of the sodium channel by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **257**, 14, 7918-7921.
  - 27) Opie, L. (1978). Myocardium metabolism and heart disease. *Jpn Circ J* **42**, 1223-1247.
  - 28) Posternak, T. H., Sutherland, E. W. and Henion, W. F. (1962). Derivatives of cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Biochem Biophys Acta* **65**, 558-560.
  - 29) Reuter, H. (1967). The dependence of slow inward current in Purkinje fibers on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol (Lond)* **192**, 479-492.
  - 30) Saikawa, Y., Arita, M. (1980). Effect of verapamil and its optimal isomers on repetitive slow response induced by electrical depolarization in canine ventricular myocardium. *Jpn Heart J* **21**, 2, 247-255.
  - 31) Schaaf, C. L. (1975). The interaction of calcium with Myxicola giant axon and a description in terms of a simple surface model. *J Physiol* **248**, 613-624.
  - 32) Sperelakis, N., Schneider, J. A. (1976). A metabolic control mechanism for calcium

- ion influx that may protect the ventricular myocardial cell. *Am J Cardiol* **37**, 1079.
- 33) Tsien, R. W., Giles, W. and Greengard, P. (1972). Cyclic AMP mediates the effect of adrenaline on cardiac Purkinje fibers. *Nature [New Biol]* **240**, 181-183.
- 34) Walton, M., Fozzard, H. A. (1978). The relation of  $\dot{V}_{max}$  to  $I_{Na}$ ,  $G_{Na}$  and  $h$  in a model of the cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* **44**, 1-8.
- 35) Walton, M., Fozzard, H. A. (1983). Experimental study of conducted action potential in cardiac Purkinje strands. *Biophys J* **44**, 1-8.
- 36) Weidmann, S. (1955). Effect of calcium ion and local anesthetics on electrical properties of Purkinje fibers. *J Physiol* **129**, 568-582.
- 37) Windisch, M., Tritthart, H. A. (1981). Calcium ion effect on the rising phase of action potentials obtained from guinea-pig papillary muscle at different potassium concentrations. *J Mol Cell Cardiol* **14**, 431-434.
- 38) Windisch, H., Tritthart, H. A. (1982). Isoproterenol, noradrenaline and phosphodiesterase inhibitors are blockers of depressed fast  $Na^+$ -system in ventricular muscle fibers. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **14**, 431-434.