

## 心筋 $\beta$ -receptor・slow channel 系反応による

### catecholamine 作用強度の検討

鳥取大学医学部内科学第一教室 (真柴 裕人 教授)

長谷川 純一・川本 浩雄・山崎 純一

小竹 寛・真柴 裕人

## Potency of catecholamines on the myocardial $\beta$ -receptor/slow channel system

Junichi HASEGAWA, Hiroo KAWAMOTO, Junichi YAMASAKI,  
Hiroshi KOTAKE and Hiroto MASHIBA

*Department of Internal Medicine, Tottori University  
School of Medicine, Yonago, Japan*

### ABSTRACT

The effects of catecholamines (isoproterenol, epinephrine, norepinephrine) on the slow channel dependent depolarization and automaticity in guinea-pig papillary muscles exposed to potassium-rich solution were studied using conventional microelectrode technique.

Catecholamines elicited a small decrease in the resting potential at the narrow range of concentration. At higher concentration of drugs, spontaneous and repetitive action potentials occurred. Potency of catecholamines was determined by measuring the two different concentrations producing depolarization and automaticity.

The order of potency was (-) -isoproterenol > (-) -epinephrine  $\geq$  ( $\pm$ ) -norepinephrine. Epinephrine was 119-145 times weaker than isoproterenol. The results were compared with previous studies in other methods for measuring catecholamine actions.

This new method for determining the potency of catecholamines seems to be a useful tool for studies on the phenomena related to catecholamine action.

(Accepted on November 2, 1983)

急性循環不全の治療において、各種の catecholamine (CA) が用いられ、成果があがっている。従来より CA の心臓作用強度の測定比較には、摘出灌流心の心拍数、収縮張力の変化がしばしば利用される。更に心筋切片の収縮張力<sup>5)7)9)14)16)</sup>や、自動能を持った心筋切片、細胞の発火頻度も、CA の変力、変時作用

の指標として有用である<sup>11)15)</sup>。一方臨床的な応用に近い形として、動物への全身投与により血圧、心拍数、心拍出量などの変化を調べることも多い。

また、CA の心筋作用が  $\beta$ -receptor との結合により開始され、c-AMP 増大を含めた細胞内の代謝が変化することから、 $\beta$ -receptor への親和性<sup>1)2)7)8)17)</sup>や、

c-AMP の変化<sup>3)5)14)</sup>を測定し、CA 作用の指標とすることも広く行われている。

最終的には CA により膜 slow channel が活性化されることから、電気生理学的手法により、脱分極心筋に対する活動電位発生を観察したり<sup>13)</sup>、膜電位固定法を用いて直接 slow inward current を測定比較する試み<sup>10)</sup>もなされている。

しかしながら、これらの方法には、CA の直接作用のほか、反射などの影響がみられるもの、変時、変力作用などは必ずしも相関しないもの、手技的に困難なものなど問題も多い。

今回我々は、CA の心筋 slow channel への影響を比較的簡単に観察できる方法<sup>4)</sup>を、CA 作用強度の比較に応用し、その有用性を検討したので報告する。

## 方 法

体重 200-300 g のモルモットの右心室乳頭筋標本を用いた。撲殺後直ちに心臓を摘出、次いで右心室を切開し、枝分かれのない乳頭筋を切除し灌流槽に固定した。

灌流槽および溶液供給法等は既に発表したもの(長谷川<sup>4)</sup>)と同じものを用いた。灌流する Tyrode 液の組成は NaCl 132, KCl 4, NaHCO<sub>3</sub> 12, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1, glucose 10 各 mM/l。高 K 液はこの Tyrode 液の KCl を 27 mM に増量し、BaCl<sub>2</sub> 0.2 mM 添加したものを用いた。

溶液は 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> で飽和させ、pH を約 7.4、灌流槽内の温度をサーミスタ温度計(日本光電 MGA III-219)でモニターし、35.5-36.5 °C に調節した。

catecholamine (CA) は

(-)-isoproterenol-HCl (日研化学)

(-)-epinephrine (第一製薬)

(±)-norepinephrine (三共)を用い、使用直前に溶液に加えた。また酸化防止の目的で 1-ascorbic

acid (半井化学薬品)を 0.1 mM 添加した。

膜電位の記録には通常の 3 M KCl で満たしたガラス微小電極を用い、細胞内電極(抵抗 7-15MΩ)と細胞外電極(抵抗 2-5 MΩ)の電位差を増幅器(日本光電 MEZ 7101)で増幅し、オシロスコープ(日本光電 VC-10)でモニターするとともに、レクチコーダ(日本光電 RJG 4122)に記録した。

実験手順としては、標本に自動能の無いことを確認後、近接した Ag-AgCl 電極より約 1 時間 0.2-0.5 Hz で電気刺激し、平衡状態に置いた。次いで微小電極を刺入した後高 K 液に切換えた(図 1)。更に 20 分以上経過の後刺激を中止し、薬物を作用させた。薬物除去の 5-10 分後に刺激を再開し、活動電位の変化が消失した後次の薬物を使用した。

## 成 績

### 1. Catecholamine (CA) による膜電位の変化

高 K 液中の心筋に CA を作用させると、静止膜電位がわずかに減少し、次いで自動的活動電位が発生する<sup>4)</sup>。この場合、CA 濃度が低いと自動性発生に至らず、脱分極のみが観察される。更に低濃度では膜電位は全く変化しない。

この CA による膜電位の変化は、β-receptor を介した slow inward current 増大に起因することがわかっている<sup>4)</sup>。図 2 および図 3 にその例を示すが、脱分極のみ観察される濃度範囲は極めて狭い。従ってこの脱分極を起こす CA 濃度、または自動性を発生させる最低の濃度を測定することにより、その CA の β-receptor・slow channel 系への作用強度をみる目安となることが考えられる。

### 2. 各種 CA 作用強度

この CA 反応を用いて isoproterenol (ISO), epinephrine (E), norepinephrine (NE) の作用強度を求めた。

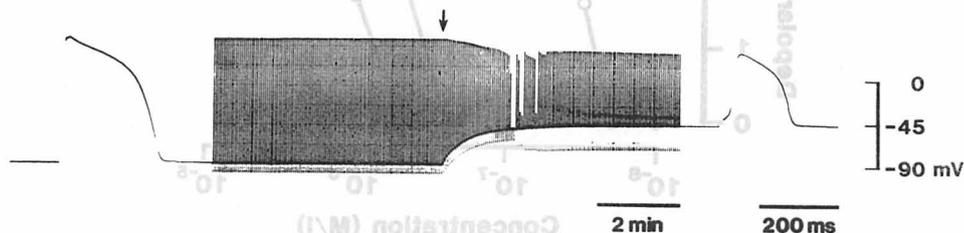


図 1. 高 K 液の効果

Tyrode 液で灌流中の活動電位(左端)に対し、矢印で示す時点で高 K 液に変更すると急速な静止電位減少、刺激閾値の上昇がみられ、約 2-3 分で定常状態となる。その際の活動電位(右端)は、立ち上がりの緩やかな Ca 依存性活動電位である。

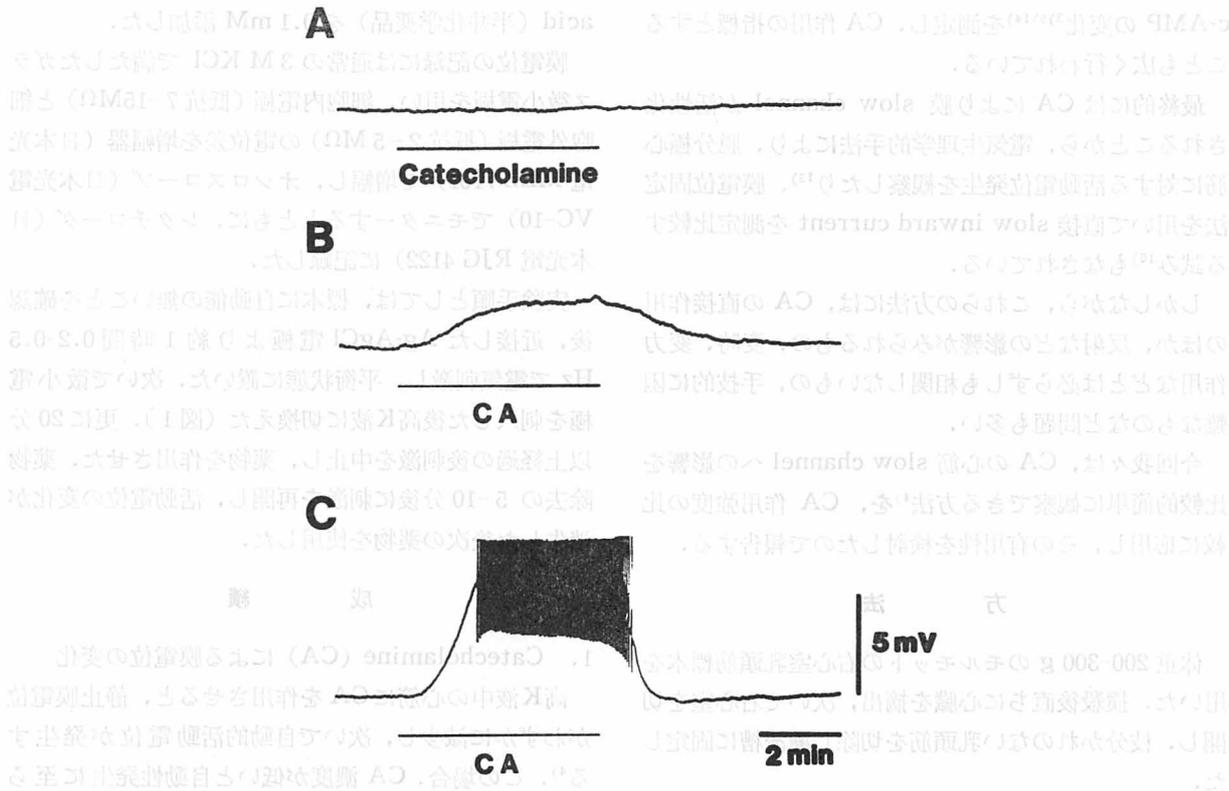


図 2. 2段階の catecholamine 反応  
高K液中での静止膜電位の変化を示す。

A :  $1 \times 10^{-8} \text{M}$ , B :  $1.5 \times 10^{-8} \text{M}$ , C :  $2 \times 10^{-8} \text{M}$  の isoproterenol をそれぞれ下線の部分で作用させると, A : 無反応, B : 約 2.2 mV の脱分極, C : 約 5.6 mV の急峻な脱分極の後, 自動的活動電位が発生. 活動電位の上部はペンが振り切れている.

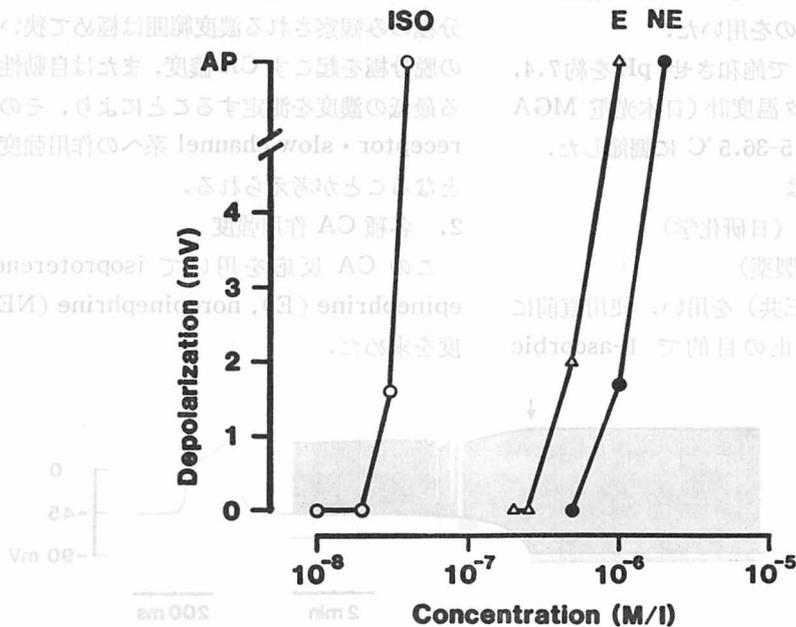


図 3. 同一標本での catecholamine 用量・反応の関係

同一標本で, 3 種の catecholamine について繰り返し作用させた例.

○—○ isoproterenol, △—△ epinephrine, ●—● norepinephrine.

catecholamine 濃度増大とともにみられる脱分極, 自動性発生の 2 つの現象が, かなり近い濃度で起っていることがわかる. 急峻な S 字曲線と考えることができる.

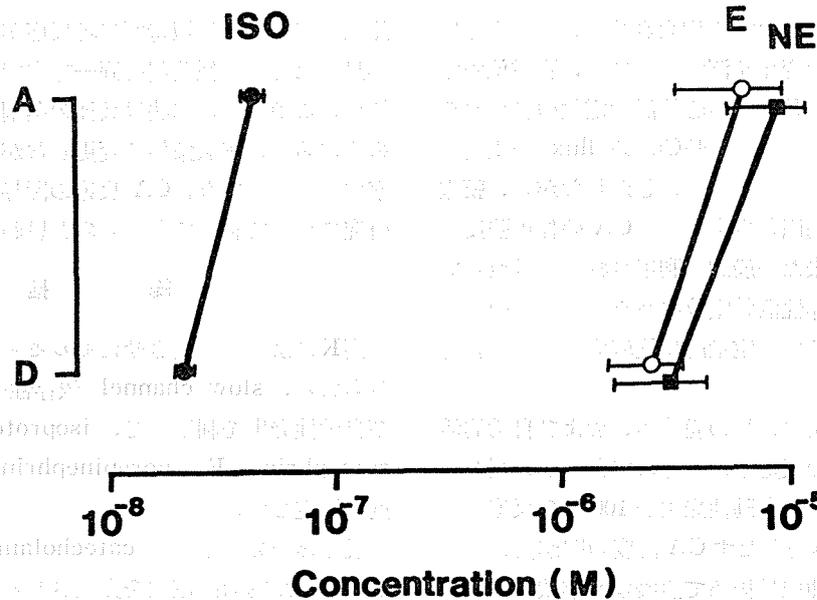


図 4. 3種の catecholamine の作用強度

3種の catecholamine について脱分極 (D) 自動性活動電位 (A) を発生する最低濃度を測定したもの. 平均  $\pm$  S E を示す.

●—● isoproterenol, ○—○ epinephrine, ■—■ norepinephrine

各薬剤の脱分極 (D) を引き起こす最低の濃度は, それぞれ図 4 に示すごとく, ISO ( $2.1 \pm 0.2$ )  $\times 10^{-8}$  M ( $n=36$ ), E ( $2.5 \pm 0.9$ )  $\times 10^{-6}$  M ( $n=5$ ), NE ( $3.0 \pm 1.3$ )  $\times 10^{-6}$  M ( $n=6$ ) (それぞれ平均  $\pm$  S E) で, ISO  $>$  E ( $p < 0.001$ ), ISO  $>$  NE ( $p < 0.001$ ) であった.

また自動性活動電位 (A) を発生させる最低濃度は, ISO ( $4.4 \pm 0.5$ )  $\times 10^{-8}$  M ( $n=32$ ), E ( $6.4 \pm 3.2$ )  $\times 10^{-6}$  M ( $n=5$ ), NE ( $8.8 \pm 3.3$ )  $\times 10^{-6}$  M ( $n=6$ ) で, ISO  $>$  E ( $p < 0.001$ ), ISO  $>$  NE ( $p < 0.001$ ) であった.

また, この反応は同一標本において数時間から10時間にわたって, かなり良好な再現性がみられた.

#### 考 察

従来より CA の心臓作用の検討には, 臨床応用に近いものとしては, 動物への全身投与を行い血圧, 心拍数, 心拍出量を測定する方法が行われている<sup>19)</sup>. しかし, この方法では CA の  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  の各 receptor への作用が複雑に関係するほか, 神経系を介した反射の影響もある. したがって純粋に心臓作用を検討する際には問題が多い. 摘出灌流心を用いる場合にも, 灌流圧の影響, 神経系の問題など, 充分単純化されているとはいえない.

一方比較的単純化された方法として, 心筋切片に対

する CA の効果をみるものがある. このうち, radioligand を用い, 心筋  $\beta$ -receptor への親和性を求める方法は広く行われ, 有用性が高い<sup>12) 17) 17)</sup>. この方法では, agonist のみならず, antagonist の親和性をも同じように検討できる有利な点があるが, 逆に親和性が必ずしも  $\beta$  作用の強度を表わしているのではない点<sup>6) 7)</sup> に注意が必要である. 事実 Kaumann<sup>7)</sup> は, 心筋膜  $\beta$ -receptor 結合実験の  $K_D$  値と乳頭筋を用いた張力実験の  $EC_{50}$  の両者の関係より, agonist を3群に分類している.

また, この CA と  $\beta$ -receptor との結合と生物学的作用との問題については, receptor との反応に引き続きものとして, adenylyl cyclase 活性や, c-AMP の測定を併用することが有用と思われる<sup>13) 14)</sup>. ただし, CA は c-AMP を介さない膜への直接作用も一部想定されており<sup>5)</sup>, 問題がないわけではない.

次に, 心筋細胞内過程の変化, 膜の変化の結果として, 特殊心筋片や単一細胞の自動性への影響をみる方法があり, CA の変時作用を検討する有効な指標とされている.

また変力作用を直接観察する方法として, 心筋片の収縮張力の変化を観察することが多い.

今回我々が用いた方法は, 心筋の  $\beta$  作用を介した slow inward current 増大を, 単に心筋の膜電位を測定するだけで観察するものである. CA が心筋の

slow inward Ca current を増大させることはよく知られているが、この変化を測定するには、膜電位固定法の応用<sup>11)</sup>のほか、K脱分極心筋活動電位の各種パラメーターの変化をみるもの、<sup>45</sup>Ca の flux を測定する方法<sup>12)</sup>などが用いられている。しかしながら、膜電位固定法には手技的困難さもあり、CA の作用強度の検討については、未だ一般的に利用されるには至っていない<sup>10)</sup>。Ca 依存性活動電位のパラメーターの変化を利用する場合、それを定量的に比較することは容易ではない。

我々が用いた方法は、膜の脱分極、および自動的活動電位発生<sup>13)</sup>の2つの反応をみるものであるが、図3の例でもわかるように、自動性発生を100%の反応と考えると、脱分極のみをきたすCA濃度範囲が狭いことから、用量・反応曲線は極めて急峻なS字状曲線を描く。従って脱分極反応のみを起こすCA濃度を求めるだけでも、通常の用量・反応曲線のED<sub>50</sub>に相当するものと考えることが可能と思われる。更に自動性を発生させる最低とみなし得る濃度の測定を併用することで、CA作用強度を定量的に検討し得ると思われる。

今回、標本数が少なく、EとNEについての脱分極、および自動性発生の濃度の間に有意差が出なかったが、作用強度順位は、個々の標本においては、全例でISO>E>NEであった。

この順位は、β-receptor との結合実験<sup>13)17)</sup>、adenyl cyclase 活性<sup>13)</sup>、c-AMP 活性<sup>14)</sup>より求められたものと同じであった。しかしその作用強度の比率に関しては、特にISOとEを比較した場合、我々はISOがEの119-145倍の強度であるという結果を得たが、Schümannら<sup>14)</sup>のウサギ乳頭筋c-AMP含量変化で検討された30倍程度の差、U'Prichardら<sup>17)</sup>がラット心筋の(-)-[<sup>3</sup>H] dihydroalprenolol との結合実験で得られた約21倍、川本ら<sup>8)</sup>の約16倍のほかは、数倍から10倍の値が多く、やや開きがみられた。これには動物の違いのほか、CAの作用過程の異なった反応をみていることにより、直接および間接的な他の要因の関与があるのかも知れない。

このK脱分極心筋におけるCAによる静止膜電位減少、自動性発生は、一方で心筋虚血時の不整脈発生機序としての可能性も考えられている<sup>18)</sup>。この観点からすれば、このような不整脈を発生させるような作用強度と考えることができるかも知れない。

長時間の連続実験の困難な膜電位固定法による方法や、それぞれ別の個体、標本を使用する必要のあるβ-receptor との結合実験、代謝産物の測定法などと

比較して、本法は短時間に各反応が観察でき、再現性が良いため、各種薬剤を同一標本で比較できる利点を持つ。このため、本法は数種の薬剤の作用強度の比較のみならず、実験条件を変更しながら反応の変化を観察することもでき、CA反応の関与した様々の病態の研究において利用できるものと思われる。

## 総 括

高Kにより脱分極させたモルモット心室筋においてみられる、slow channel 依存性の膜電位減少および自動性発生を利用して、isoproterenol (ISO)、epinephrine (E)、norepinephrine (NE) の作用強度を測定した。

脱分極を発生させる catecholamine (CA) 濃度、および自動的活動電位を発生させる濃度の2つを指標として求めた作用強度順位は、ISO>E≥NEであった。

従来より行われている心筋へのCA作用強度の評価法による強度順位と、ほぼ同様であったが、その強度比については相違がみられた。これには、動物種の違いのほか、測定の対象となる反応過程に関する種々の要因の影響が考えられた。

心筋β-receptor・slow channel系反応により、CA作用強度を測定する方法は、数種の薬剤の強度比較のみならず、CA反応の関与した様々の病態の研究に利用できると思われる。

## 文 献

- 1) Alexander, R. W., Williams, L. T. and Lefkowitz, R. J. (1975). Identification of cardiac β-adrenergic receptors by (-)-[<sup>3</sup>H] alprenolol binding. Proc Nat Acad Sci USA **72**, 1564-1568.
- 2) Baker, S. P., Boyd, H. M. and Potter, L. T. (1980). Distribution and function of β-adrenoceptors in different chambers of the canine heart. Br J Pharmacol., **68**, 57-63.
- 3) Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1974). Temperature immutability of adenylyl cyclase-coupled β adrenergic receptors. Nature **249**, 258-260.
- 4) 長谷川純一 (1983). 高K液中モルモット心筋静止膜のカテコラミンによる脱分極及びその温度依存性. 米子医学雑誌 **34**, 56-70.

- 5) Ingebretsen, W. R. Jr., Friedman, W. F. and Mayer, S. E. (1981). Isoproterenol-induced restoration of contraction in K<sup>+</sup>-depolarized hearts: relationship to cAMP. *Am J Physiol* **241**, H 187-H 193.
- 6) Kaumann, A. J. (1978). On spare  $\beta$ -adrenoceptors for inotropic effects of catecholamines in kitten ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **305**, 97-102.
- 7) Kaumann, A. J. (1980). A proposal for 3 classes of agonists from relations between  $\beta$ -adrenoceptor occupancy and positive inotropic effects in cat heart. *Prog Pharmacol* **4** (1), 1-4.
- 8) 川本浩雄, 真柴裕人, 石指文子, 林原 博, 伊藤忠雄. (1982). 選択的  $\beta_2$  アゴニスト, ツロブテロールに関する研究. 第6回日本薬理学会近畿西南合同部会要旨, 180.
- 9) Niedergerke, R. and Page, S. (1977). Analysis of catecholamine effects in single atrial trabeculae of the frog heart. *Proc R Soc Lond [Biol]* **197**, 333-362.
- 10) Ouedraogo, C.O., Garnier, D., Nargeot, J. and Pourrias, B. (1982). Electrophysiological and pharmacological study of the inotropic effects of adrenaline, dopamine and tryptamine on frog atrial fibres. *J Mol Cell Cardiol* **14**, 111-121.
- 11) Reuter, H. (1974). Localization of  $\beta$  adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle. *J Physiol (Lond)* **242**, 429-451.
- 12) Reuter, H. (1980). Effects of neurotransmitters on the slow inward current. Zipes, D.P., Bailey, J.C. and Elharrar, V. (ed). *The slow Inward Current and Cardiac Arrhythmias*. pp 205-219, Martinus Nijhoff Publishers, Hague.
- 13) Schneider, J.A. and Sperelakis, N. (1975). Slow Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> responses induced by isoproterenol and methylxanthines in isolated perfused guinea pig hearts exposed to elevated K<sup>+</sup>. *J Mol Cell Cardiol* **7**, 249-273.
- 14) Shümann, H. J., Motomura, S., Endoh, M. and Brodde, O.-E. (1977). Comparison of the mechanisms underlying the positive inotropic actions of dopamine, adrenaline and isoprenaline on the isolated rabbit papillary muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **297**, 257-267.
- 15) Tsien, R.W., Giles, W. and Greengard, P. (1972). Cyclic AMP mediates the effects of adrenaline on cardiac Purkinje fibres. *Nature [New Biol]* **240**, 181-183.
- 16) Tuttle, R. R. and Mills, J. (1975). Dobutamine Development of a new catecholamine to selectively increase cardiac contractility. *Circ Res* **36**, 185-196.
- 17) U'Prichard, D. C., Bylund, D. B. and Snyder, S. H. (1978). (+)-[<sup>3</sup>H]epinephrine and (-)-[<sup>3</sup>H]dihydroalprenolol binding to  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -noradrenergic receptors in brain, heart and lung membranes. *J Biol Chem* **253**, 5090-5102.