

## 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

鳥取大学医学部内科学第一教室 (主任 真柴裕人教授)

長谷川 純

## Catecholamine-induced depolarization of guinea-pig myocardial cells in potassium-rich solution and its dependence on temperature

Jun-ichi HASEGAWA

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

## ABSTRACT

Experiments were performed to investigate the mechanism underlying the depolarization produced by catecholamines (isoproterenol, epinephrine, and norepinephrine) in guinea-pig papillary muscles exposed to K-rich solution. The catecholamine-induced depolarization (CAD) was blocked by Mn (1 mM), verapamil ( $10^{-5}$ M), and propranolol ( $10^{-6}$ M), but not by phenolamine ( $10^{-5}$ M). The magnitude of CAD was sensitive to  $[Ca]_0$ , but not to  $[Na]_0$ . Methylxanthines also produced a depolarization similar to CAD even in the presence of the  $\beta$ -blocker. It is concluded that CAD is mainly due to an increase in the slow channel conductance mediated by  $\beta$ -adrenoceptor/cyclic AMP system.

CAD was markedly enhanced at low temperature (21-26°C). The augmented CAD was characterized by slow repolarization after withdrawal of the drug. Under these circumstances, Mn accelerated the rate of repolarization, but propranolol had no such an effect. At low temperature, the depolarization produced by methylxanthines also increased in magnitude and the rate of repolarization after cessation of drug application decreased. These results suggest that a suppression of the postreceptor metabolic process may be responsible for the enhancement of myocardial catecholamine responses at low temperature.

CAD seems to be a useful tool for studies on the myocardial  $\beta$ -receptor/slow channel system.

(Accepted on November 5, 1982)

## 緒 言

心筋虚血に伴って、種々の不整脈が発生することは良く知られている<sup>17)37)38)</sup>。虚血心筋細胞は、イオンの能動輸送に必要な ATP の欠乏により、細胞内イオン環境の維持が困難となる。このような状態では心筋細胞から K の流出が起こり、膜電位が減少する<sup>37)</sup>。更

に周辺の正常細胞も、傷害心筋細胞から流出した K による高い細胞外 K 濃度の影響に加えて、脱分極細胞からも電気緊張的に脱分極を受けることとなる。Weiss and Shine<sup>36)</sup>は、K ion-sensitive electrode を用いて、実際にウサギ心室筋標本において、細胞外 K 濃度が虚血 10 分で 12 mM, 60 分で 27 mM にまでも上昇することを示している。一方心筋虚血時には、

心室に行く交感神経の activity が著明に亢進し, catecholamine release が増大すること, また局所的にも高い細胞外K濃度と anoxia の直接作用により, 交感神経末端から catecholamine release が起こることが知られている<sup>37)38)</sup>. このため心筋の興奮性が増大し, 不整脈の原因となる異常電気現象が発生し易くなる.

このような条件下の異常電気現象について, 実験的に検討が加えられている<sup>18)36)37)38)</sup>. 脱分極心筋に自動性を発生させる方法としては, 低濃度K液による灌流, Ba塩添加, 伸展, 通電などが試みられているが, これらの実験的自動能において slow inward current の関与が重視されてきた<sup>18)31)37)38)</sup>.

slow inward current の研究に関し, voltage clamp method<sup>9)</sup>のほかに, 通電, 高K液による脱分極, TTX, 無Na液などで fast inward current を除く方法が行われている<sup>9)</sup>. Ehara and Inazawa<sup>9)</sup>は, 高K液に低濃度 BaCl<sub>2</sub> を加えて slow action potential を発生させているが, 更にこれに isoproterenol を加えることにより, モルモットの静止心室筋に自動的活動電位の発生することを報告している. この自動能発生には, catecholamine による slow inward current 増大<sup>26)27)34)</sup>と Ba による shunting conductance の減少<sup>9)13)14)</sup>が関与していると思われる. 心室性不整脈の実験的モデルとして有用であると考えられる.

著者は, この現象を追試した際, 自動的活動電位発生に先立ち, 数 mV の膜電位減少が起こることに注目し, その電気生理学的性質について検討した. その結果, この脱分極心筋における catecholamine による膜電位減少は,  $\beta$ -receptor を介する slow channel の活性化に起因するという結論を得た.

一方 catecholamine の心筋に対する陽性変時作用<sup>11)32)</sup>並びに陽性変力作用<sup>11)23)</sup>が, 低温条件下において増強されることが知られている. しかしながら, この mechanism については充分調べられていない. そこで今回 catecholamine による脱分極反応を用いて, 心筋に対する catecholamine 作用の低温による増強効果について検討したので報告する.

## 方 法

### 1. 実験材料

実験には体重約 200 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, 次いで右心室流出部よりハサミを入れ, 左冠動脈(前下行枝)に

沿って右心室を切開し, 乳頭筋(長さ 2-5 mm, 直径 0.3-1 mm)を切除した.

### 2. 実験容器と灌流液

灌流槽はアクリル製で, 槽底に貼ったラバー上に標本をステンレス製のピンで固定した. 灌流槽はできる限り小さくし(容積 0.4 ml), 灌流液の変換が速やかに行われるようにした. 灌流槽に供給する溶液の種類, 温度を速やかに変更できるように, 3本の並列に置いたテフロン針のいずれか1本が, 絶えず灌流槽へ溶液を供給するようにし, 流速を 2.5-3.0 ml/分に調節した.

また, 記録部位に近接して置いた針状サーミスタ温度計でモニターし, 21-29°C の低温の場合を除いて, 常温 35.8-36.5°C で実験を行った.

灌流する正常 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 Tyrode 液は正常 Tyrode 液に KCl を加え, K 濃度を 27 mM に増加させて作成し, 必要に応じ, 低濃度 BaCl<sub>2</sub> (0.05-0.2 mM) を添加した. このうち, 0.2 mM Ba を含む高K液を標準高K液として用いた.

標準高K液の Ca 濃度 (1.8 mM) を, 必要に応じ 0-5.4 mM に変化させた. 50% Na 液は標準高K液の 72.2 mM NaCl を 144.4 mM sucrose 又は, 等モルの choline-Cl で置換し, 後者の場合は 10<sup>-5</sup>M atropin を加え作成した. Mn 加高K液は, 標準高K液に 1-2 mM の MnCl<sub>2</sub> を加えた.

溶液は 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> で bubbling を行い, pH は約 7.4 に調整した.

使用薬剤は

- (-)isoproterenol-HCl (日研化学)
- (-)epinephrine (第一製薬)
- (±)-norepinephrine (三共)
- (±)-propranolol-HCl (住友化学)
- phenolamine mesylate (Ciba)
- caffeine (Merck)
- theophylline (和光)
- verapamil (Knoll)

で, それぞれ使用直前に溶液に加えた.

### 3. 膜電位記録

膜電位測定は通常の 3 M KCl で満たした細胞内ガラス微小電極(抵抗 10-20 M $\Omega$ )と, より抵抗の小さい細胞外微小電極間の電位差を高入力インピーダンス増幅器(DIA Medical, DPZ-15)で増幅し, オシロ

スコープ(日本光電 VC-9)でモニターするとともにレクチコーダー(日本光電 RJG-3024)に記録した。

膜抵抗の測定には, conventional intracellular two microelectrode method を用いた。即ち, 2本の微小電極を 20-30  $\mu\text{m}$  の間隔で, 筋線維の走行に沿って刺入し, 一方の電極より電流を流した。この時他方の電極と細胞外電極間で得られる electrotonic potential を記録し, 膜抵抗の変化を推定した<sup>8)</sup>。

#### 4. 実験手順

灌流槽に固定した標本は, 自動能の無いことを確認した後, 近接した Ag-AgCl 電極より約1時間, 0.5-0.2 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, 正常の心室筋活動電位であることを確認した後で電気刺激を中止し, 定常状態となつた時点で高 K Tyrode 液に切換えた。更に 15-20 分経過の後に実験を開始した。

### 成 績

#### (1) catecholamine による静止膜脱分極

正常 Tyrode 液を標準高 K 液で置換すると, 心筋静止膜電位は  $-91.6 \pm 2.1 \text{ mV}$  から  $-45.1 \pm 2.1 \text{ mV}$  (mean  $\pm$  SD,  $n=54$ ) に減少した。

この状態で catecholamine を作用させると, しばしば自動的活動電位が発生する<sup>9)</sup>。この際自動性発現に先立ち, 静止膜電位がわずかに減少することが観察された(図1)。この現象は isoproterenol, epinephrine, norepinephrine のいずれを用いても同様に見られた。以後, catecholamine による静止膜脱分極(以下 CA 脱分極と略す)の発生には isoproterenol を使用した。

#### (1) CA 脱分極に対する catecholamine 濃度の影響

catecholamine 濃度が低い場合には静止電位に何ら変化が起こらないが, ある濃度以上で脱分極が起こった。次にそれをわずかに上まわる濃度で自動性発現に到つた(図1)。標準高 K 液で灌流中の心室筋静止膜の脱分極を引き起こす isoproterenol の閾濃度は  $(2.0 \pm 1.0) \times 10^{-8} \text{ M}$  (mean  $\pm$  SD,  $n=33$ ) であつた。この際, catecholamine 濃度依存性に CA 脱分極は増大したが, 自動性発現の閾濃度付近では, 4-7 mV 脱分極した後に一群の自動的活動電位がみられ, 続いて比較的速い膜電位の増大と緩やかな減少を伴う静止状態となつた。catecholamine 作用中このような静止期をはさんだ活動電位群が続いた(図1-A)。

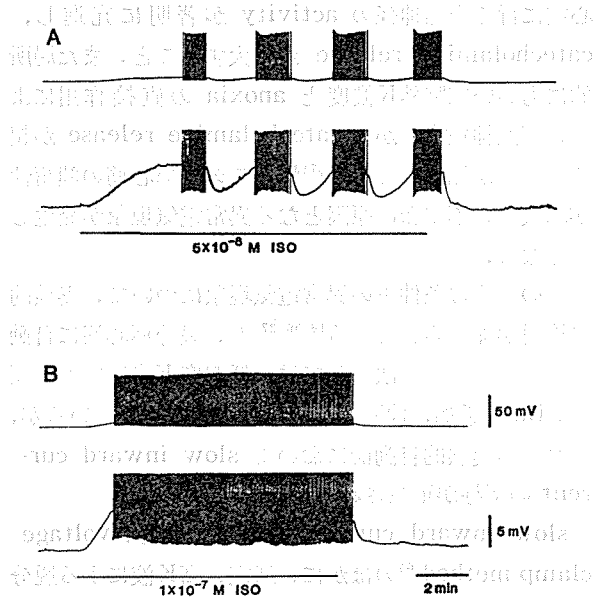


図1. 高Kで脱分極したモルモット心室筋の catecholamine による静止電位減少と自動性の発生。

A.  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ , B.  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  isoproterenol 作用による間歇的及び持続的自動性。

それぞれ上段が low gain, 下段が high gain の膜電位記録。high gain では上方への振れは scale out している。灌流液は標準高 K 液 (27 mM K, 0.2 mM Ba)。下の細い実線が isoproterenol 作用期間を示し, 太い実線は時間及び電位の scale。自動性に先行して脱分極がみられる。

更に catecholamine 濃度を上昇させると脱分極速度が増大し, 自動的活動電位は catecholamine 作用中持続した(図1-B)。

#### (2) CA 脱分極に対する Ba の効果

Ba を加えない高 K Tyrode 液で灌流した場合, 比較的高濃度の catecholamine を作用させなければ CA 脱分極は発現しなかつた(図2-A)。この際 0.2 mM Ba を添加すると, CA 脱分極は著明に増強された(図2-B)。このため低い catecholamine 濃度で CA 脱分極が観察可能となつた(図2-C)。Ba は膜の K 透過性を減少させる<sup>13)14)</sup>ことが知られているので, ここで見られた Ba の CA 脱分極に対する増強効果は, 主として Ba が膜の shunting conductance を減少させたためと考えられる。以後実験は低濃度 Ba を含む液で行つた。

#### (3) CA 脱分極に対する各種 blocker の効果

Mn は心筋の slow channel を block することが知られている<sup>12)</sup>。一方 propranolol は心筋  $\beta$ -receptor

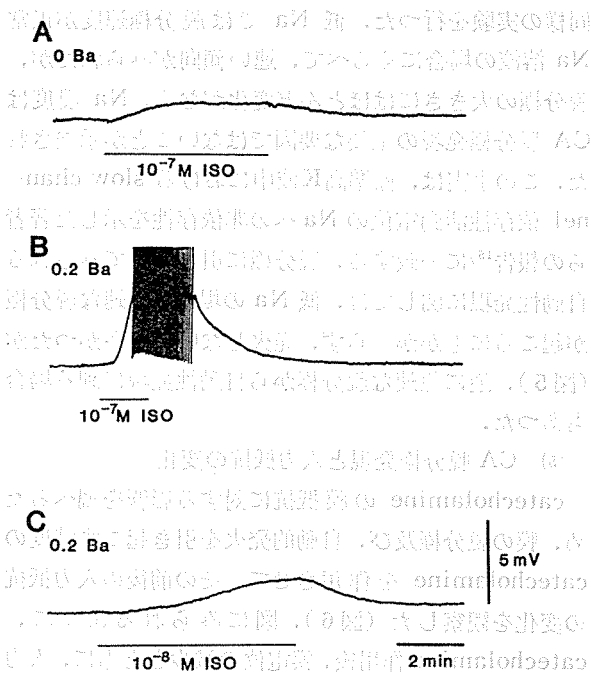
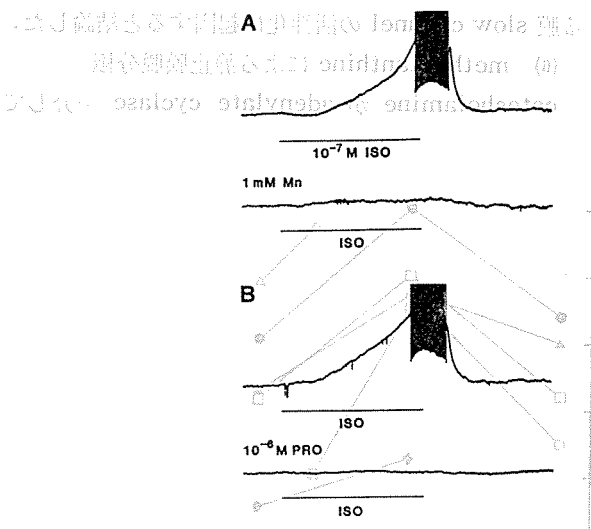


図 2. isoproterenol による脱分極に対する Ba の影響

A. 0 mM, B. 0.2 mM Ba 存在下での  $1 \times 10^{-7}$  M isoproterenol の効果. C. 0.2 mM Ba 存在下での  $1 \times 10^{-8}$  M isoproterenol の効果 (27 mM K).



に対する blocking agent である<sup>19)</sup>。これら blocker の CA 脱分極に対する影響を調べた(図 3)。

図 3-A 上段が control で、 $10^{-7}$  M isoproterenol により脱分極及び自動的興奮が出現している。この標本において、1 mM Mn をあらかじめ充分な時間投与し、同様の操作を繰り返したところ、脱分極も自動性も発現しなかつた。更に充分 wash し、図 3-B 上段のごとく反応性が回復した後、 $10^{-6}$  M propranolol を充分作用させた後に同濃度の catecholamine を作用させたが、下段のように CA 脱分極はみられなかつた。

Mn の代わりに slow channel blocker の verapamil<sup>2)10)16)</sup> の  $10^{-5}$  M 存在下でも CA 脱分極はみられなかつた。一方  $\alpha$ -blocker といわれている phen-tolamine ( $10^{-5}$  M)<sup>19)</sup> 存在下では CA 脱分極は出現した。

また別の標本について、図 3-C に示すように、isoproterenol を作用させた状態でも、1 mM Mn (図 3-C 中段)、 $10^{-6}$  M propranolol (図 3-C 下段) を加えるといずれも CA 脱分極の消失が見られた。

Mn これらの結果より catecholamine による心筋の静止膜脱分極は、 $\beta$ -receptor を介して膜 slow channel が活性化され、slow inward current が流れること

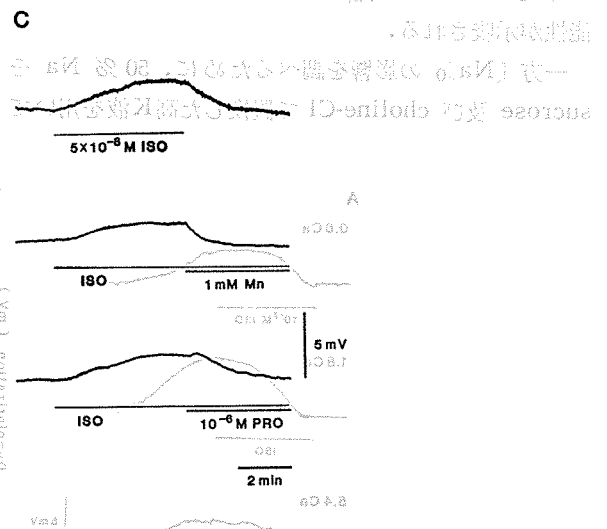


図 3. catecholamine による脱分極に対する Mn 及び propranolol の抑制効果

A. 上段が  $10^{-7}$  M isoproterenol による脱分極及び自動的活動電位群 (control).

下段は 1 mM Mn 存在下での反応。

B. 上段、Mn を充分 wash した後の isoproterenol の効果.

下段、 $10^{-6}$  M propranolol 存在下での isoproterenol の効果.

C. 上段、 $5 \times 10^{-8}$  M isoproterenol による脱分極及び wash による再分極.

中段、isoproterenol 作用中での 1 mM Mn の効果.

下段、同様に、propranolol の効果.

に起因するものと推定される。CA 脱分極に対する  $[Ca]_0$  及び  $[Na]_0$  の影響は、心筋の slow inward current は  $[Ca]_0$  依存性を示す<sup>24)</sup>。従つて、CA 脱分極が slow inward current 増大によるものなら、 $[Ca]_0$  との相関が考えられる。そこで、灌流液の Ca 濃度の影響を調べた。

Ba の charge carrier としての影響<sup>25)</sup>を最小限にするため、0.05 mM Ba を含む高K液を用い、やや高濃度の catecholamine を作用させた。Ca 濃度を 0.6, 1.8, 5.4 mM と変化させた際の反応をまとめたものが図4-Bで、図4-Aはその1例を示す。このように  $[Ca]_0$  が 1.8 mM で最も CA 脱分極が大きく、それより濃度が低い程、又高い程 CA 脱分極が小さかつた。低濃度Caの場合の結果は、この catecholamine による脱分極が slow Ca current によるとする仮説に合致するが、高濃度 Ca の場合脱分極が小さかつた点は問題となる。

一方 0.2 mM Ba, 0 mM Ca の場合  $10^{-7}$  M isoproterenol で脱分極がみられたが、0 mM Ba, 0 mM Ca とした時には、更に高濃度の isoproterenol ( $1-5 \times 10^{-7}$  M) を作用させても、有意の脱分極がみられなかつた。Ba は Ca channel を通る charge carrier となり得ることが知られており<sup>25)</sup>、0.2 mM Ba, 0 mM Ca の場合 slow Ba current が流れた可能性が示唆される。

一方  $[Na]_0$  の影響を調べるために、50% Na を sucrose 及び choline-Cl で置換した高K液を用いて

同様の実験を行つた。低 Na では脱分極速度が正常 Na 溶液の場合にくらべて、速い傾向がみられたが、脱分極の大きさにはほとんど変化がなく、Na 濃度は CA 脱分極発現の主要な要因ではないことが示唆された。この事実は、標準高K液中における slow channel 依存性活動電位の Na への非依存性を示した著者らの報告<sup>15)</sup>に一致する。脱分極に引き続いてみられる自動性発現に関しては、低 Na の場合、急速な脱分極が起こるにもかかわらず、発火しない例が多かつたが(図5)、逆に急速な脱分極から自動性発現に到る場合もあつた。

#### (5) CA 脱分極発現と入力抵抗の変化

catecholamine の膜抵抗に対する影響を調べるため、膜の脱分極及び、自動的発火を引き起こす濃度の catecholamine を作用させて、その前後の入力抵抗の変化を観察した(図6)。図にみられるように、catecholamine 作用後、膜電位の減少とともに、入力抵抗のわずかな増大がみられた。しかしながら、脱分極による K conductance 減少も想定され、catecholamine による slow channel conductance 増大は否定できないものと思われる。

以上の結果より高 K Tyrode 液中のモルモット心室筋の catecholamine による脱分極は、主に、catecholamine と  $\beta$ -receptor の反応に引き続いて起こる膜 slow channel の活性化に起因すると結論した。

#### (6) methylxanthine による静止膜脱分極

catecholamine が adenylate cyclase を介して

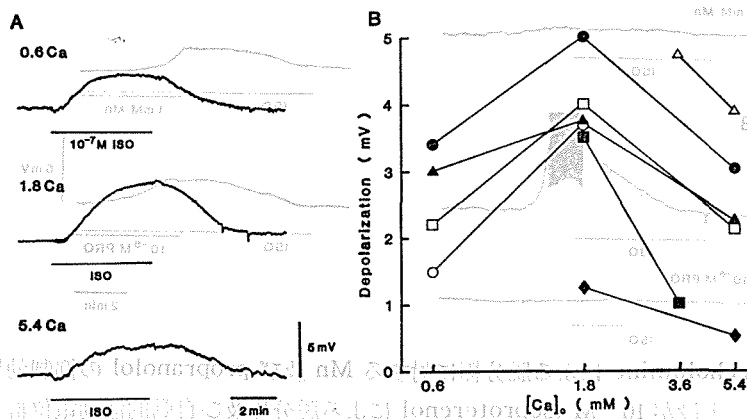


図4. catecholamine による脱分極に対する  $[Ca]_0$  の影響

A. Ca 濃度を上段 0.6 mM, 中段 1.8 mM, 下段 5.4 mM とした時の  $10^{-7}$  M isoproterenol による脱分極

B. Ca 濃度(横軸, 対数目盛)と、 $0.5-1 \times 10^{-7}$  M isoproterenol による脱分極の大きさ(縦軸)の関係。同一実験を同一記号で示し実線で結んである。27 mM K, 0.05 mM Ba 液を用い、標本により isoproterenol 量は異なる。

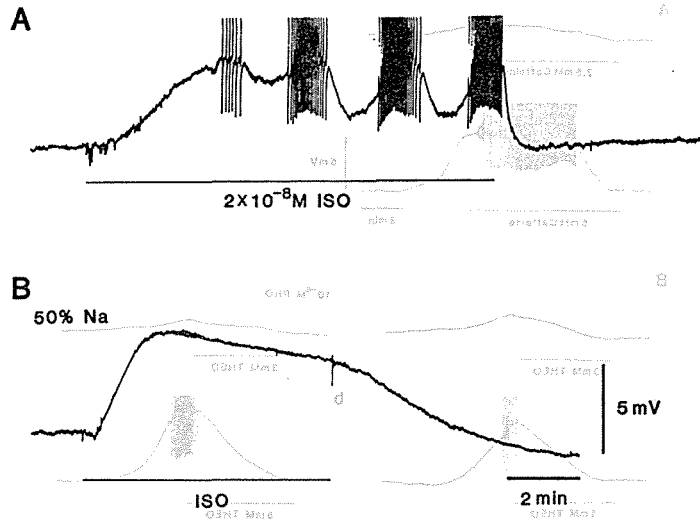


図 5. catecholamine による脱分極への低 Na 液の影響  
 A. ( $2 \times 10^{-8} \text{M}$  isoproterenol による脱分極及び自動的活動電位群 (標準高K液)  
 B. 低 Na 液 (標準高K液の 50% Na を sucrose で置換) での  $2 \times 10^{-8} \text{M}$  isoproterenol による脱分極.

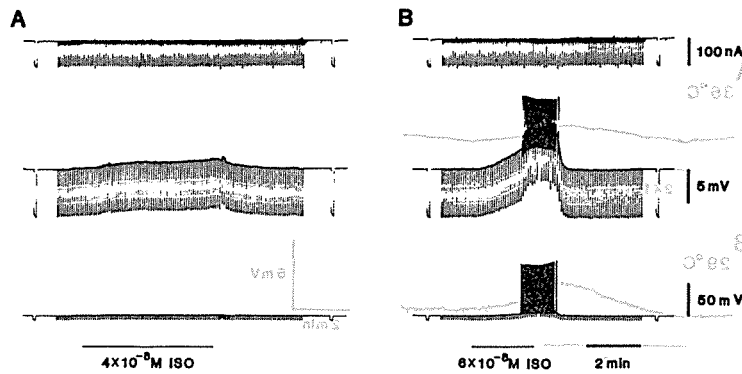


図 6. catecholamine 作用中の入力抵抗の測定  
 A.  $4 \times 10^{-8} \text{M}$  isoproterenol による脱分極.  
 B.  $6 \times 10^{-8} \text{M}$  isoproterenol による脱分極と自動的活動電位群. 20-30  $\mu\text{m}$  離れた 2 本の細胞内電極の一方から流した持続 100 msec 矩形波の電流量 (上段) と他方の電極より記録した静止電位及び通電による electrotonic potential (中段 high gain, 下段 low gain).

cyclic AMP を増大させる<sup>33)</sup>のに対して, caffeine, theophylline などの methylxanthine は phosphodiesterase 阻害作用により, cyclic AMP の分解を抑制し, 結果的に catecholamine と類似の心刺激作用を示す<sup>20)28)</sup>. この methylxanthine により, catecholamine と同様の脱分極が起こることを確かめた. 図 7-A は caffeine について調べたもので, 上段が 2.5 mM の caffeine による約 2.5 mV の脱分極を示し, 下段は 5 mM caffeine による 5 mV 脱分極と自

動性発現を示す. 図 7-B は theophylline でも同様に濃度依存性に脱分極と自動的興奮発生 (図 7-B-a) が起こること, 及び,  $10^{-6} \text{M}$  propranolol をあらかじめ投与しておいても, この脱分極が block されないことを示す (図 7-B-b). しかし, 図には示していないがこの脱分極は Mn, verapamil で block された. これらの所見は, phosphodiesterase inhibitor も catecholamine と同様な膜反応を引き起こすことを示し, cyclic AMP 仮説に合致するものである.

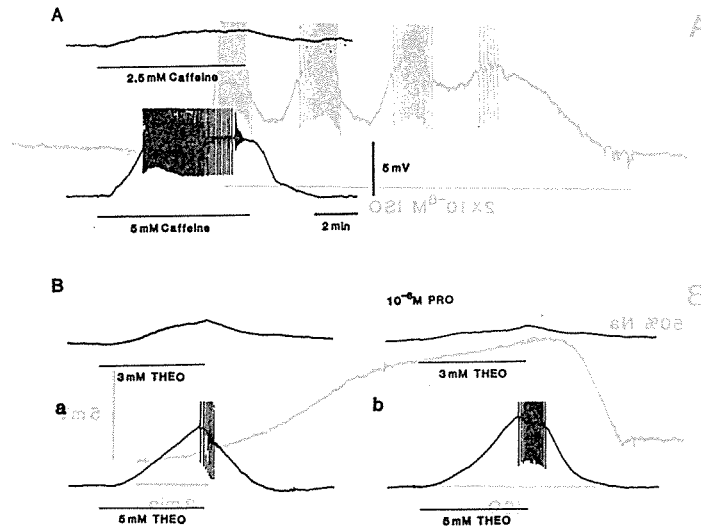


図 7. methylxanthine による脱分極 (A) 標準高K液に 2.5 mM caffeine (上段) 5 mM caffeine (下段) を加えた際の用量依存性脱分極と、それに続く自動的興奮 (B-a) 3 mM, 5 mM theophylline による脱分極及び自動性 (B-b) 10<sup>-6</sup>M propranolol 存在下での theophylline の反応.

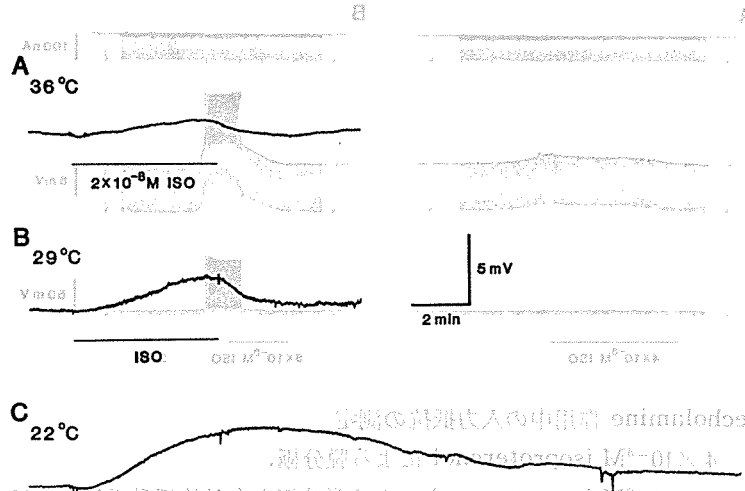


図 8. catecholamine による脱分極に対する温度の影響 (A) 36°C, (B) 29°C, (C) 22°C での 2 × 10<sup>-8</sup>M isoproterenol 作用による脱分極. 低温での再分極速度の低下がみられる.

しかしこの反応は  $\beta$ -receptor を必要としないことが catecholamine の場合と異なる.

2. 低温による catecholamine 作用の増強 catecholamine 作用の低温による増強<sup>11)23)32)</sup>について, CA 脱分極を指標にして検討した.

CA 脱分極は, 図 8 に示すごとく常温の 36°C から 29, 22°C と温度を低下させるのに伴って増大すること

が見出された. この際反応過程, 特に wash out 後の静止電位の回復過程に著しい差が認められた. 36°C から 29°C への中等度低下では CA 脱分極の大きさの増大と回復過程の延長はわずかであったが, 22°C の低温の場合 CA 脱分極増大とともに回復過程の延長が著しい. 図 9 に温度を変化させた場合の catecholamine 反応について, その大きさ及び回復に要する時間 (half

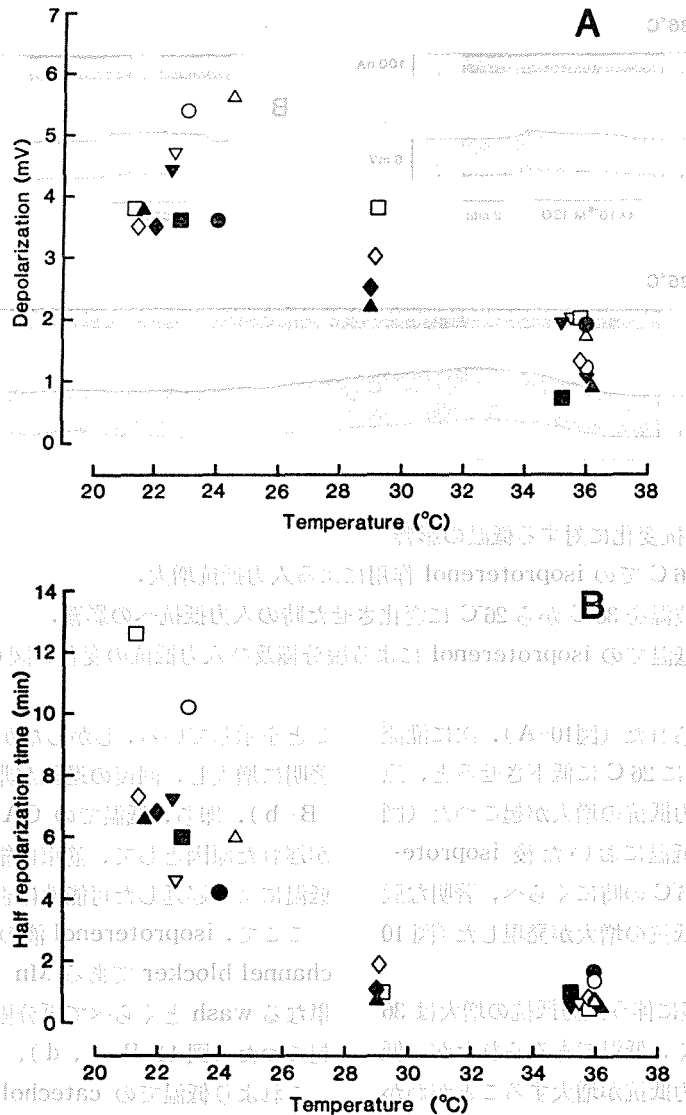


図 9. catecholamine による脱分極と温度との関係

- A. catecholamine による脱分極の大きさ (縦軸, mV) は温度 (横軸, °C) の低下に伴い増大する。
- B. catecholamine 作用中止後の再分極速度 (縦軸, half repolarization time で示す) は, 29°C ではあまり変化しないが, 22°C 前後では著しく遅延する (横軸が温度)。それぞれの記号が同一の標本を示し, 標本ごとに, それぞれ一定濃度の isoproterenol を使用。

repolarization time を測定した) を実験ごとに異なる記号で示した。CA 脱分極の大きさは, 実験を行った温度の範囲内において, 温度低下に伴い増大した (図 9-A)。しかしながら低温での反応の特徴である再分極過程についてみると, 36°C と 29°C の場合にあまり変化がなく, 22°C 前後で著明に遅くなった (図 9-B)。従って, 温度低下に伴う心筋の catecholamine 作用増大に複数の要因が関与している可能性及び再分極遅延をもたらす因子もそれに関与している

可能性が示唆された。

なお, CA 脱分極は, 21-29°C の低温においても propranolol, Mn 等で block されたので, 低温下の CA 脱分極も常温下の CA 脱分極と同じく,  $\beta$ -receptor を介して slow channel が活性化されることによるものであると結論される。

低温における CA 脱分極増大と, 入力抵抗の変化を示したのが図 10 である。36°C において, 低濃度 isoproterenol を作用させると, わずかな脱分極と



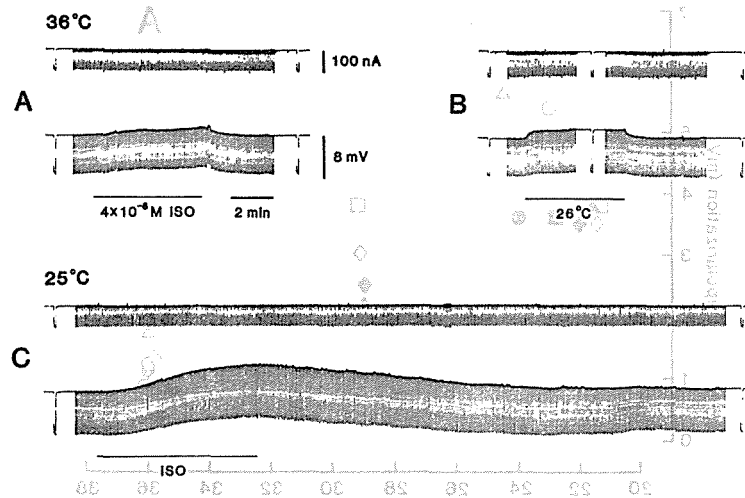


図 10. 入力抵抗変化に対する低温の影響

- A. 36°C での isoproterenol 作用による入力抵抗増大。  
 B. 液温を 36°C から 26°C に変化させた時の入力抵抗への影響。  
 C. 低温での isoproterenol による脱分極及び入力抵抗の変化。(図 6 参照)

もに入力抵抗の増大がみられた(図10-A)。次に灌流槽の液温を 36°C から急速に 26°C に低下させると、急激な静止電位の減少と入力抵抗の増大が起こった(図10-B)。更に充分な時間低温においた後 isoproterenol を作用させると、36°C の時に比べ、著明な脱分極増大とともに、入力抵抗の増大が発現した(図10-C)。

このように CA 脱分極に伴う入力抵抗の増大は 36°C の時(図6)だけでなく、低温でもみられたが、低温にすることのみでも入力抵抗が増大することがわかった。従って、低温による CA 脱分極の増強に、膜の shunting conductance 減少が少なくとも一部寄与している可能性が考えられる。しかし CA 脱分極の回復遅延はそれからは説明できない。そこで図11に示すような実験を行った。

まず、27 mM K Tyrode から 32 mM K へと、5 mM だけ K 濃度を変化させた際の脱分極の時間経過が図11-A-aであり、灌流槽内の溶液の変換と心筋線維を取り巻く溶液の変化のようすがわかる。これより、溶液の変更に伴い瞬時に静止電位が減少し、比較的短時間に定常状態となることがわかる。これに対し、図11-A-bでは、isoproterenol を含む溶液に変換した際の CA 脱分極の発生を示している。次に 22°C の低温下で同様の操作を行うと、図11-B-aのように、K 濃度増加に対する静止電位の変化は、36°C の場合と変わらないことがわかった。このことは、細胞を取り巻く溶液の変換速度は低温下でも常温下でも変わらない

ことを示している。しかしながら CA 脱分極は低温で著明に増大し、回復の過程が非常に遅くなった(図11-B-b)。即ち、低温での CA 脱分極からの回復過程が遅れた原因として、筋内細胞直外の溶液変化が、低温により遅延した可能性は否定できる。

ここで、isoproterenol 液の wash に代えて、slow channel blocker である Mn (1 mM) を加えると、単なる wash とくらべて再分極に要する時間の短縮が起こった(図11-B-c, d)。

これより低温での catecholamine response からの回復遅延は slow channel conductance 減少の緩徐化を反映していると考えられる。

低温では catecholamine- $\beta$ -receptor の結合が離れにくい<sup>35)</sup>。従って灌流液中の catecholamine が消失した後も、catecholamine と  $\beta$ -receptor の解離が徐々に進行しているとすれば、この低温による catecholamine と  $\beta$ -receptor の affinity 増大が、CA 脱分極の消失遅延の原因となり得る。しかし図11-B-eのように、競合的拮抗剤である propranolol を投与しても、再分極速度は変化しない。即ち catecholamine- $\beta$ -receptor の解離する速度の低下が、低温での CA 脱分極の回復を遅らせる主因ではないと考えられる。このことは以下の実験からも支持される。

前述のように methylxanthine 単独でも CA 脱分極類似の脱分極を生じる。この反応を低温条件下で観察すると、図12に示すように、CA 脱分極同様、脱分

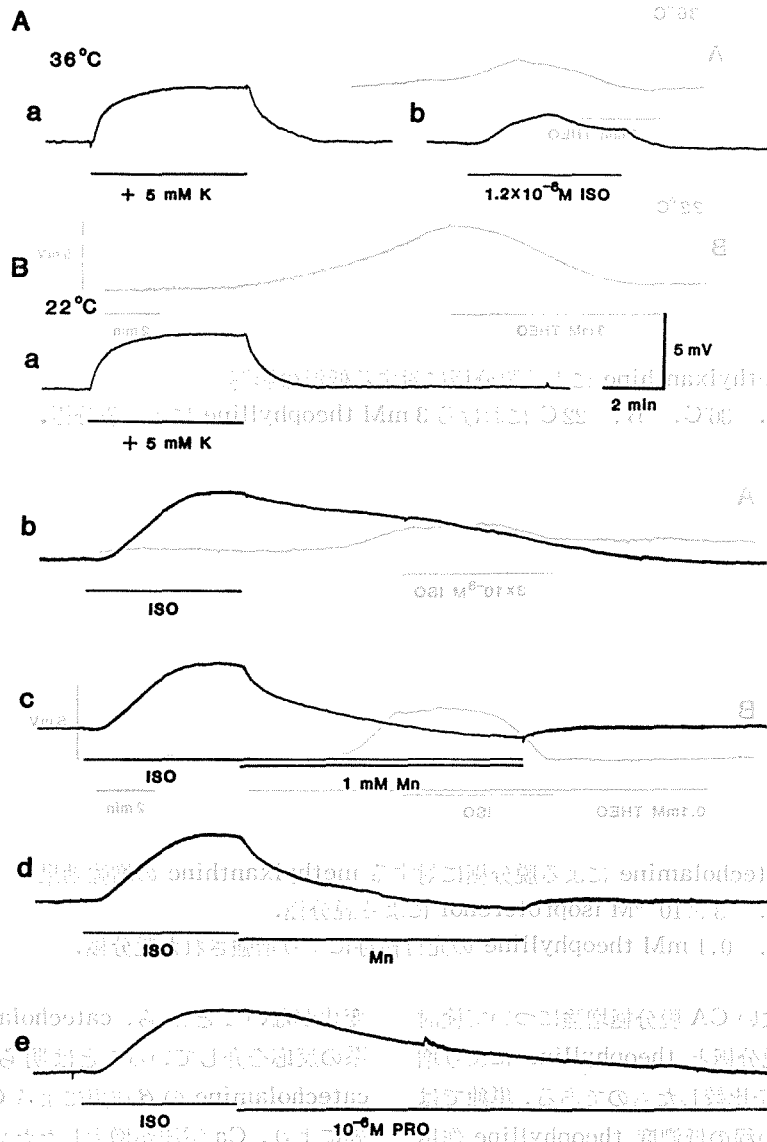


図 11. 種々の条件下での K 及び catecholamine による脱分極

A. 36°C での反応 (control)

a. 5 mM K 増加 (32 mM).

b.  $1.2 \times 10^{-8}$  M isoproterenol による脱分極.

B. 22°C での反応

a. 5 mM K 増加.

b.  $1.2 \times 10^{-8}$  M isoproterenol 作用及び washing.

c. 1 mM Mn による catecholamine 作用の抑制効果.

d. catecholamine 作用中止後再分極過程に及ぼす 1 mM Mn の影響.

e. 再分極過程への  $10^{-6}$  M propranolol の影響.

K による脱分極は温度の影響を受けなかった. 低温下での緩徐な再分極は, Mn で促進されたが, propranolol は無効であつた.

極の増大とともに, 回復過程の遅延がみられる. 従つて, 再分極の遅延は catecholamine と methylxanthine と共通の作用機転の部位に原因があることが推定される. つまり, methylxanthine は  $\beta$ -receptor/

adenyl cyclase system を介さないで cyclic AMP を増大させるから, この低温における再分極速度の低下には, cyclic AMP 合成に続く代謝過程の緩徐化が関係していると考えられる.

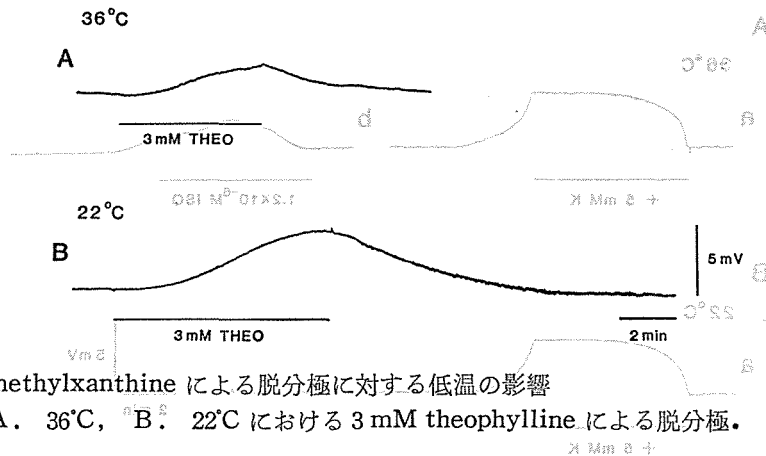


図 12. methylxanthine による脱分極に対する低温の影響  
A. 36°C, B. 22°C における 3 mM theophylline による脱分極。

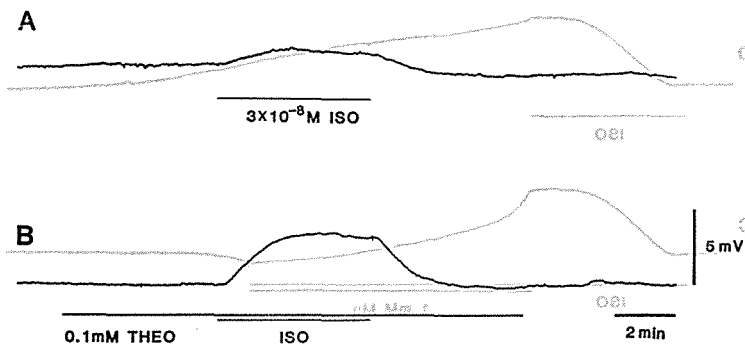


図 13. catecholamine による脱分極に対する methylxanthine の増強効果  
A.  $3 \times 10^{-8}$  M isoproterenol による脱分極。  
B. 0.1 mM theophylline の先行投与により増強された脱分極。

次に、低温によらない CA 脱分極増強について検討した。図 13 は CA 脱分極と theophylline により増強された CA 脱分極を比較したものである。単独では脱分極を発生し得ない程の低濃度 theophylline 作用下に、isoproterenol を加えて発生させた CA 脱分極は、isoproterenol 単独の反応にくらべ、著しく増大している。この結果は、前述の結果（図 7）と同様いわゆる cyclic AMP 仮説を支持するものである。しかし、theophylline 作用下の CA 脱分極の再分極速度は遅くはならなかつた（図 13-B）。このことは、phosphodiesterase 活性の減少は、CA 脱分極回復遅延をもたらさないことを示すものかも知れない。

#### 考 察

##### 1. catecholamine による静止膜脱分極

高K液で灌流したモルモット心室筋に、catecholamine を作用させると、静止膜電位が減少した。catecholamine としては、isoproterenol, epinephrine, norepinephrine のいずれでも同様の反応を示し、 $\beta$ -blocker で block されるが、 $\alpha$ -blocker では

変化がないことから、catecholamine- $\beta$ -receptor 系の反応を介していることは明らかである。即ち、catecholamine の  $\beta$  作用による Ca conductance 上昇により、Ca 電流が増大したためと考えられる。

catecholamine により心筋の Ca 電流が増大することは、既によく知られている<sup>21)22)26)27)34)</sup>。一方 slow channel の活性化、不活性化は膜電位依存性で、voltage clamp study による報告の多くは、-50 mV の膜電位付近から、slow inward current が発生することを示している<sup>6)24)</sup>。今回著者が実験に用いた心室筋の静止膜電位は、高 K Tyrode 液中で約 -45 mV であり、slow channel の活性化電位領域に入っていると考えられる。即ち、catecholamine による slow inward current の増大が起り得る実験条件である。

一方、Dudel und Trautwein<sup>8)</sup>は、犬 auricle で、epinephrine による過分極を観察しているが、深い膜電位における反応であり、彼らは膜抵抗の減少から、K 透過性の増大を推定し、更に能動輸送への影響について言及している。また Cranefield and Gadsby<sup>7)</sup>

は、犬 Purkinje fibres において、isoprenaline による静止膜のK透過性増大を認め、 $-45$  mV の holding potential で、isoprenaline による outward current を観察している。今回それに相当するような現象は見られなかつたが、動物種、及び組織が異なっており、Purkinje においてK透過性増大がCaのそれを凌駕したことが考えられる。

catecholamine による脱分極は、Mn や verapamil で block されることから、これに対する slow channel の関与は明らかであるが、Ca 濃度が  $1.8$  mM を越えると、この反応が予想外に小さくなつた。Reuter<sup>24)</sup>及び、Beeler and Reuter<sup>9)</sup>は voltage clamp により、slow inward current のCa濃度依存性を示し、Ehara and Inazawa<sup>9)</sup>は、高K溶液灌流心筋において、 $0.9$  から  $7.2$  mM のCa濃度において、活動電位の overshoot、 $V_{max}$  などが、直線的に増大することを報告している。しかしながらCaは、心筋においても、channel に隣接する膜表面の負の電荷を中和することにより、activation curve を脱分極側に shift させる効果を持っている<sup>6)30)</sup>。CA 脱分極は、slow channel の閾電位付近の、subthreshold response を見ている。そのため一般の活動電位と異なり微妙な閾電位の変化が大きく影響することが考えられる。従つて高Caにより activation curve が positive shift し activation の起こる閾電位が上昇したことが考えられ、そのためCA脱分極が小さくなつたものと思われる。

このようにCA脱分極は微妙な現象ではあるが、catecholamine/ $\beta$ -receptor/slow channel 系の反応が、単に膜電位の変化として観察できること、更にその時間的経過が連続的にみられることなどの merit があり、心筋の電気生理、薬理学的研究において有用な実験系であると思われる。

また、この実験系は虚血心筋で想定される条件下で、心室作業筋にも自動性が発生し得ることを示すものである。

犬の冠動脈結紮により、心室性不整脈が発生するが、これは明瞭に2つの時期に分けられる<sup>17)37)38)</sup>。結紮直後から2-3時間の early phase では、hypoxia、pH の変化、乳酸、K、adenosine、catecholamine 等の影響による slow conduction から reentry が想定される不整脈が発生し、late phase では、一層の metabolic 及び ultrastructural な変化により、心室筋細胞の death が起こり、わずかに生き残つた心内膜下の異常 Purkinje fiber 起源の ventricular

ectopic beats が発生するといわれている<sup>37)</sup>。また、early phase についても Solberg<sup>ら</sup><sup>29)</sup>は、梗塞を起こした心室乳頭筋において、膜電位の oscillation や pacemaker activity の発生を観察している。

前述のように、この実験系は高K液を用いることにより、心筋を脱分極させているが、実際の心筋虚血時にみられるように、高Kもさることながら、膜特性の変化に起因する種々の要因で脱分極した場合は、単に溶液のK濃度を上昇させて心筋を脱分極させた場合と比較して、K conductance の低下が特徴である<sup>37)</sup>。この点において、本実験系では、Ba を添加することにより K conductance を変化させ、脱分極及び自動性の発現を容易にしている<sup>31)</sup>(図2)。従つてこの実験系は、特に心筋虚血時の early phase での不整脈の研究に有用であると考えられる。

## 2. catecholamine の作用に及ぼす低温の影響

温度が低下するのに伴い、catecholamine による膜の脱分極が増強された。この際、catecholamine を wash した後の膜電位の回復の遅延が特徴的であつた。この再分極の遅れは、筋線維を灌流する溶液を変更した後の、定常状態に到達する速度が変化したためではなかつた(図11)。

低温において catecholamine の効果で脱分極させた後、propranolol を作用させても再分極速度が変化しなかつた(図11-B-e)。これは、低温による catecholamine と  $\beta$ -receptor の affinity 増大が、再分極遅延の原因ではないことを示している。Weiland<sup>ら</sup><sup>35)</sup>によると、低温において、心筋膜の  $\beta$ -receptor の agonist 及び antagonist に対する affinity は増大するが、 $25^{\circ}\text{C}$  においても、antagonist の方が agonist よりも affinity が高い。Reinhardt<sup>ら</sup><sup>23)</sup>は、低温下でもモルモット atria において、catecholamine の陽性変力作用に対する抑制作用を認めている。また、Caron and Lefkowitz<sup>5)</sup>も犬及びラットの心室筋における adenylyl cyclase-coupled  $\beta$  adrenergic receptor について検討し、isoproterenol の  $\beta$  作用に対し、低温でも等モルの propranolol が拮抗することを示している。著者も、低温条件下でも  $10^{-6}\text{M}$  propranolol 作用下で常温同様 CA 脱分極が block される点を確認している。従つて propranolol は低温でも有効な  $\beta$ -blocker であると考えられる。にもかかわらず、低温で propranolol が catecholamine 中止後の再分極過程に変化を与えなかつたことより、CA 脱分極の回復過程に対する低温の影響は、例えば

agonist-receptor complex の解離の遅れのような catecholamine/ $\beta$ -receptor の相互作用の変化ではなく、 $\beta$ -receptor 刺激に引き続く細胞内代謝過程の変化に起因していることが考えられる。実際 theophylline による脱分極でも、低温による増強及び作用中止後の再分極過程の遅延効果が認められる(図 12)。theophylline は、caffeine 同様  $\beta$ -receptor を介さず、cyclic AMP を増大させ、slow channel を活性化すると考えられるから、 $\beta$ -receptor 刺激以後、更に細胞内 cyclic AMP 合成に続く代謝過程の変化が、低温における CA 脱分極からの回復遅延に強く関連している可能性が示唆される。これは、心筋の catecholamine response の最終的な減衰が、cyclic AMP の減少よりも、phosphorylate された膜が元に戻る過程によつて control されるとする Niedergerke and Page<sup>21)</sup>の考えと一致する。

また、膜電位に影響を与えない微量の theophylline は、その phosphodiesterase 抑制効果により、catecholamine 作用を増強する。しかし図 13 にみられるように、CA 脱分極は増強されるが、再分極の遅延はみられない。従つて、phosphodiesterase 活性減少による CA 脱分極の増強効果と、低温による増強効果とは異なる可能性が考えられる。

低温で shunting conductance が減少する点(図 10-B)も CA 脱分極増強に寄与していると考えられるが、低温条件下での細胞内代謝過程の遅れは、catecholamine 作用中も生じているはずであり、それが増強効果に重要な役割を演じている可能性がある。

低温条件下において、心筋に対する catecholamine の陽性変時作用<sup>11)32)</sup>、及び陽性変力作用<sup>11)23)</sup>の増大が報告されているが、その mechanism のひとつとして、cyclic AMP 合成に引き続く代謝過程の、低温による抑制が考えられる。

一方 cultured fibroblasts において cyclic AMP accumulation に対する温度の影響を調べた Barber<sup>11)</sup>は、37°C から 25°C に温度を下げると、prostaglandin E<sub>1</sub> 刺激による cyclic AMP の合成と、分解の速度が同程度に減少し、最終的な cyclic AMP accumulation は変化がないことを示しているが、このような cyclic AMP の合成、分解過程を含めて、心筋で低温がどのような反応過程に影響を与えたかについて、より詳細な研究が望まれる。

### 総 括

高 K 液により脱分極させたモルモット心室筋に、

catecholamine を作用させた際に起こる静止膜電位減少について、その mechanism を検討した。またこの作用を利用して、低温による catecholamine 効果の増強について検討した。

### 1. catecholamine による脱分極 (CA 脱分極)

(1) catecholamine (isoproterenol, epinephrine, norepinephrine) は、27 mM K で脱分極した心筋の静止電位をわずかに減少させ、低濃度 Ba 添加によりそれが一層著明となり、しばしば自動性が発現した。

(2) CA 脱分極は catecholamine 濃度依存性に増大し、Mn, verapamil 及び propranolol で block されたが、phentolamine では block されなかつた。

(3) CA 脱分極は Ca 濃度に影響されたが、Na 濃度には相関しなかつた。

(4) methylxanthine (caffeine, theophylline) でも類似の反応が起こつた。

(5) CA 脱分極は catecholamine/ $\beta$ -receptor 反応を介する slow channel conductance 増大によると結論できる。

### 2. catecholamine 作用の低温による増強

(1) 低温 (21-26°C) で CA 脱分極は著明に増強され、catecholamine 作用中止後の緩徐な再分極が特徴であつた。

(2) 低温での CA 脱分極の回復は、Mn で促進されたが、propranolol では変化しなかつた。

(3) methylxanthine による脱分極も、低温により増強され、再分極の遅延がみられた。

(4) 低温による shunting conductance の減少は CA 脱分極増強の一因となり得ると思われた。

(5) CA 脱分極は低濃度 methylxanthine によつても増強されたが、回復過程は変化しなかつた。

(6) 低温での心筋への catecholamine 作用増大に、 $\beta$ -receptor 刺激に続く細胞内代謝過程の変化の関与が示唆され、catecholamine/ $\beta$ -receptor 反応の変化が、その原因ではないと考えられた。

3. 脱分極心筋における CA 脱分極は、心筋の  $\beta$ -receptor/slow channel 系の研究において、有用な実験モデルであり、心筋虚血時の不整脈研究にも応用できると思われた。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導を賜つた、九州大学医学部第二生理 後藤昌義教授、舘原嗣尚助教授、ならびに御助言、御校閲を賜つた、恩師真柴裕人教授に深甚なる謝意を表します。

- 文 献
- 1) Barber, R., Ray, K.P. and Butcher, R. W. (1980). Temperature effects on cyclic AMP accumulation in cultured fibroblasts. *J Cell Physiol* **135**, 15-24.
  - 2) Bayer, R. and Ehara, T. (1978). Comparative studies on calcium antagonists. *Prog Pharmacol* **2** (1), 31-37.
  - 3) Beeler, G. W. Jr. and Reuter, H. (1970). Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. *J Physiol (Lond)* **207**, 191-209.
  - 4) Carmeliet, E. (1980). The slow inward current: non-voltage-clamp studies. Zipes, D. P., Bailey, J. C. and Elharrar, V. (ed.) *The Slow Inward Current and Cardiac Arrhythmias*. pp. 97-110, Martinus Nijhoff Publishers, Hague.
  - 5) Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1974). Temperature immutability of adenylyl cyclase-coupled  $\beta$  adrenergic receptors. *Nature* **249**, 258-260.
  - 6) Coraboeuf, E. (1980). Voltage clamp studies of the slow inward current. Zipes, D. P., Bailey, J. C. and Elharrar, V. (ed.) *The Slow Inward Current and Cardiac Arrhythmias*. pp. 25-95, Martinus Nijhoff Publishers, Hague.
  - 7) Cranefield, P. F. and Gadsby, D. C. (1981). Isoprenaline increases the potassium permeability of the resting membrane of canine cardiac Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)* **318**, 34P-35P.
  - 8) Dudel, J. und Trautwein, W. (1956). Die Wirkung von Adrenalin auf das Ruhepotential von Myokardfasern des Vorhofs. *Experientia* **12**, 396-398.
  - 9) Ehara, T. and Inazawa, M. (1980). Calcium-dependent slow action potentials in potassium-depolarized guinea-pig ventricular myocardium enhanced by barium ions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **315**, 47-54.
  - 10) Ehara, T. and Kaufmann, R. (1978). The voltage- and time-dependent effects of (-)-verapamil on the slow inward current in isolated cat ventricular myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* **207**, 49-55.
  - 11) Garb, S. and Penna, M. (1956). Relationship of temperature to sensitivity of the mammalian auricle to sympathomimetic amines. *J Appl Physiol* **9**, 431-432.
  - 12) Hagiwara, S. and Nakajima, S. (1966). Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine, and manganese ions. *J Gen Physiol* **49**, 793-806.
  - 13) Hermsmeyer, K. and Sperelakis, N. (1970). Decrease in  $K^+$  conductance and depolarization of frog cardiac muscle produced by Ba<sup>2+</sup>. *Am J Physiol* **219**, 1108-1114.
  - 14) Hutter, O. F. and Stekar, J. (1982). Block by Ba<sup>2+</sup> of <sup>42</sup>K<sub>o</sub> efflux from resting and acetylcholine treated sinus venosus. *J Physiol (Lond)* **322**, 46P-47P.
  - 15) Inazawa, M., Ehara T. and Hasegawa, J. (1982). Effects of low-sodium solutions on the calcium-dependent slow action potentials in potassium-depolarized guinea-pig ventricular muscle. *Jpn J Physiol* **32**, 315-319.
  - 16) Kohlhardt, M., Bauer, B., Krause, H. and Fleckenstein, A. (1972). Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors. *Pflugers Arch* **335**, 309-322.
  - 17) Lazzara, R., El-Sherif, N., Hope, R. R. and Scherlag, B. J. (1978). Ventricular arrhythmias and electrophysiological consequences of myocardial ischemia and infarction. *Circ Res* **42**, 740-749.
  - 18) Lazzara, R. and Scherlag, B. J. (1980). Role of the slow inward current in the generation of arrhythmias in ischemic myocardium. Zipes, D. P., Bailey, J. C. and Elharrar, V. (ed.) *The Slow Inward Current and Cardiac Arrhythmias*. pp. 399-416, Martinus Nijhoff Publishers, Hague.

- 19) Manger, W. M. (1980). Catecholamines and heart. Bourne, G. H. (ed.) Heart and Heart-like Organs, Vol. 2, pp. 161-262, Academic Press, New York.
- 20) Mirro, M. J., Bailey, J. C. and Watanabe, A. M. (1980). The role of cyclic AMP in regulation of the slow inward current. Zipes, D. P., Bailey, J. C. and Elharrar, V. (ed.) The Slow Inward Current and Cardiac Arrhythmias, pp. 111-126, Martinus Nijhoff Publishers, Hague.
- 21) 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.
- 22) Page, S. (1978). Analysis of catecholamine action in frog atrial fibers. Morad, M. (ed.) Biophysical Aspects of Cardiac Muscle, pp. 391-406, Academic Press, New York.
- 23) Reinhardt, D., Wagner, J. and Schümann, H. J. (1972). Influence of temperature on the sensitivity of the  $\beta$ -receptors and the contractility of guinea-pig atrium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **275**, 95-104.
- 24) Reuter, H. (1967). The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. J Physiol (Lond). **192**, 479-492.
- 25) Reuter, H. (1973). Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. Prog Biophys Mol Biol **26**, 1-43.
- 26) 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.
- 27) Reuter, H. and Scholz, H. (1977). The regulation of the calcium conductance of cardiac muscle by adrenaline. J Physiol (Lond) **264**, 49-62.
- 28) Schneider, J. A. and Sperelakis, N. (1975). Slow  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$  responses induced by isoproterenol and methylxanthines in isolated perfused guinea pig hearts exposed to elevated  $K^{+}$ . J Mol Cell Cardiol **7**, 249-273.
- 29) Solberg, L., TenEick, R. and Singer, D. (1972). Electrophysiological basis of arrhythmia in infarcted ventricle. Circulation **46**, (Suppl. II), II-116.
- 30) Sperelakis, N. (1979). Origin of the cardiac resting potential. Berne, R. M., Sperelakis, N. and Geiger, S. R. (ed.), Handbook of Physiology, Section 2, Vol. 1, pp. 187-267, American Physiological Society, Bethesda.
- 31) Surawicz, B. (1980). Depolarization-induced automaticity in atrial and ventricular myocardial fibers. Zipes, D. P., Bailey, J. C. and Elharrar, V. (ed.) The Slow Inward Current and Cardiac Arrhythmias, pp. 375-396, Martinus Nijhoff Publishers, Hague.
- 32) Trendelenburg, U. (1968). The effect of cocaine on the pacemaker of isolated guinea-pig atria. J Pharmacol Exp Ther **161**, 222-231.
- 33) 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.
- 34) Vassort, G., Rougier, O., Garnier, D., Sauviat, M. P., Coraboeuf, E. and Gargouil, Y. M. (1969). Effects of adrenaline on membrane inward currents during cardiac action potential. Pflugers Arch **309**, 70-81.
- 35) Weiland, G. A., Minneman, K. P. and Molinoff, P. B. (1980). Thermodynamics of agonist and antagonist interactions with mammalian  $\beta$ -adrenergic receptors. Mol Pharmacol **18**, 341-347.
- 36) Weiss, J. and Shine, K. I. (1981). Extracellular potassium accumulation during myocardial ischemia: Implications for arrhythmogenesis. J Mol Cell Cardiol **13**, 699-704.
- 37) Wit, A. L. and Bigger, T. J. Jr. (1975). Possible electrophysiological mechanisms for lethal arrhythmias accompanying myocardial ischemia and infarction. Circulation **51** and **52**, (Suppl. III), III-96-III-115.
- 38) Wit, A. L. and Friedman, P. L. (1975). Basis for ventricular arrhythmias accompanying myocardial infarction. Arch Intern Med **135**, 459-472.