

-10、日本光電) でモニターしつつアナログ・デジタルコンバーター (ANALOG-PRO DMA、カノープス電子) を介してパーソナルコンピュータ (PC9801 FA、日本電気) に取り込んで記録、解析した。

活動電位のパラメーターとして、静止膜電位 (Resting potential, RP)、Overshoot (OS)、Action Potential Amplitude (APA)、90%再分極時の活動電位持続時間 (APD₉₀)、最大立ち上がり速度 (+V_{max}) をANALYSIS (沢田&平野 1988) で解析した。

3. 心筋単離細胞の調製

マウスおよびモルモットの心臓からLangendorff灌流法により心室細胞を単離した。マウスでは、素早く心臓を摘出後、大動脈内を大動脈弁方向に逆行性にカニューレを挿入し、Langendorff灌流標本を作製した。またモルモットおよびラットは心臓にカニューレを挿入し、Langendorff灌流標本を作製した。正常Tyrode液を3~5分間、次いでCa²⁺除去Tyrode液を20分間、更にCa²⁺除去Tyrode液に0.2 mg/ml collagenase (ヤクルトYK101) を添加した酵素溶液を約10分間灌流した。最後に、collagenaseを洗い流すために、Ca²⁺除去Tyrode液を約20分間、高K⁺溶液を約20分間灌流した。灌流を止め、心臓を高K⁺溶液を含む容器に移し、心房を取り除いた後、眼科バサミで心室を粗くミンスし、軽く振って心筋細胞を遊離させ単離心筋細胞を得た。灌流液はすべて100% O₂で十分に通気し、35~36 °Cに保った。また、単離した心筋細胞は、実験に用いるまで室温放置し、高K⁺溶液中に保存した。細胞単離に用いた溶液の組成 (mM) を以下の通りである。

正常Tyrode液 : NaCl 143, KCl 5.6, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 1.8, glucose 5.5, HEPES 5, NaH₂PO₄ 0.33 (pH 7.4 with NaOH)

Ca²⁺除去Tyrode液 : NaCl 143, KCl 5.6, MgCl₂ 1.0, glucose 5.5, HEPES 5, NaH₂PO₄ 0.33 (pH 7.4 with NaOH)

高K⁺溶液 : glutamic acid 70, taurine 15, KCl 30, KH₂PO₄ 10, MgCl₂ 0.5, glucose 11, HEPES 10, EGTA 0.5 (pH 7.3 with KOH)

4. 細胞内Ca²⁺濃度の測定

細胞機能の画像化解析には落射蛍光画像取り込み・解析システムを用いた。落射蛍光顕微鏡 (Olympus, IX70) のステージ上に蛍光プローブを取り込ませた細胞を置き、測定を行った。モノクロメーターのグレーティングシステムによりキセノンランプ光のうちプローブに合った励起光のみを取り出し、ダイクロイックミラーで励起光と蛍光を分離した。蛍光はさらにバリアフィルターを通し、この蛍光像を高速冷却CCDカメラ (HISKA CCD CAMERA C6790、浜松ホトニクス) で取り込み、コンピュータ (Endeavor、エプソン) 上で解析ソフトウェア (アクアコスモス Ver2.5、浜松ホトニクス) を用いて解析を行った。蛍光レシオ画像を随時取得し、細胞質領域内の平均蛍光強度の経時変化をグラフ化した。単离心筋細胞においてカルシウムイオンの蛍光プローブであるIndo-1のアセトキシメチル体を用いて実験を行った。351±20 nmの光を励起光とし、蛍光は405±10 nmおよび480±10の波長域のratioとして画像化した。

5. 哺乳動物培養細胞の調整

各種イオンチャネル蛋白質を発現させる哺

乳動物の細胞系としてHEK293細胞を用いた。セルバンカー（血清入り、BLC-1）で-80℃に凍結保存してあるHEK293細胞を溶解し、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium、FBS入り、Gibco™）中に分散させ、36℃、5% CO₂環境下で培養した。増殖したHEK293細胞はPBS（Phosphate Buffered Saline 7.2、Gibco™）で浮遊させ軽く攪拌したのち、DMEM（10% FBS入り）にその細胞懸濁液を2,3滴入れ、継代培養した。凍結保存方法は3001（Falcon）のdishに3×10⁵～10×10⁵個程度のcell数を用い、これらの細胞を500 μLのPBSで浮遊し軽く攪拌させ4.5 mLのセルバンカー（血清入り、BLC-1）を加え攪拌し、直ちにチューブに移し-80℃に保存した。

6. イオンチャネル安定発現細胞株の樹立

各種Ca²⁺チャネルおよびK⁺チャネルのcDNAをヒトライブラリーよりPCR法で増幅し、全長をpIRES2-EGFPベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。これをリポフェクタミン（Gibco BRL）を用いたリポフェクション法によりHEK293細胞に導入した。このベクターは、外来遺伝子を挿入できるCMVプロモーターと、internal ribosome-entry siteであるIRESを持っている。このベクターを使用することで、遺伝子が導入された細胞は必ずGFPも発現することになる。そのため488 nmの励起光照射によるGFPの蛍光を遺伝子導入の指標とした。更に遺伝子発現を確実にするためにはベクター上に存在するneomycin resistance geneを発現させ、発現株を選別することが重要である。そのため、培養液DMEM中に400～500 μg/mlのG418（Geneticin、Gibco BRL）を含有させた。

7. 膜電流の記録

各イオンチャネルを安定発現したHEK293細胞にパッチ電極を装着し、パッチクランプ用増幅器 Axopatch 1Dを用いて膜電位を制御して膜電流を検出し、ADコンバータを介してコンピュータで記録、解析した。用いた栄養液は以下の通りである。

細胞外液正常Tyrode液：NaCl 143, KCl 5.6, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 1.8, glucose 5.5, HEPES 5, NaH₂PO₄ 0.33 (pH 7.4 with NaOH)
パッチ電極内液：KOH 143, KCl 40, aspartic acid 70, MgCl₂ 2.0, ATP-K₂ 5.0, creatine phosphate-K₂ 5.0, HEPES 5.0, EGTA 10.0 (pH 7.2 with KOH)。

8. 倫理面への配慮

すべての実験は日本薬理学会の定めるGuiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animalsに従って行った。哺乳動物からの心臓摘出は動物に苦痛を与えないようにすべてペントバルビタールによる過剰麻酔下に行った。

C. 研究成果

1. 心筋の脱分極機構に関する研究

1-1 洞房結節の緩徐脱分極機構へのCa_v1.3チャネル電流の寄与

心臓本来の（正所性の）ペースメーカーは洞房結節の自動能である。ここでは先行する活動電位が終了し、膜電位が最も過分極した時点から緩徐な脱分極が見られ、これが次の活動電位発生の閾値に達すると急速な脱分極、すなわち活動電位の発生に至る。従って自発活動の本質はこの緩徐脱分極相であるといえる。洞房結節の急速脱分極相は主としてL型Ca²⁺チャネルの

中でも最も一般的なCa_v1.2にコードされるタイプからのCa²⁺流入により生じることが知られているが、緩徐脱分極を起こしているイオンチャネルの詳細は明らかにされていない。そこで我々は洞房結節の緩徐脱分極に関与するチャネル分子種の解明を目指した。薬理学的ツールとしてはefonidipineを用いた。Efonidipineはdihydropyridine構造を有する高血圧症・狭心症治療薬であり、緩徐で持続性の降圧作用を有する。Efonidipineは穏やかな徐脈作用や腎臓保護作用など、臨床的に優れた特徴を有することが知られているが、これらは当初efonidipineの作用発現が緩徐であることに起因すると考えられていた。ところが、我々は摘出心筋標本を用いた検討により、efonidipineが心筋のL型およびT型両Ca²⁺チャネルを遮断して緩徐脱分極を抑制し、徐脈作用を示すことを明らかにした。本研究ではさ

らにefonidipineの2つの光学異性体およびnifedipineの摘出洞房結節組織標本に対する作用を検討するとともに、細胞系に発現させたCa²⁺チャネル電流に対する作用と比較して緩徐脱分極相に寄与するCa²⁺チャネル分子種を検討した。

ウサギ摘出洞房結節組織標本にガラス微小電極法を適用して測定したところ(図1;表1)、S(+)-efonidipine(1μM)は緩徐脱分極相および急速脱分極相の傾きを有意に減少させた。nifedipine(1μM)は急速脱分極相を有意に減少させたが、緩徐脱分極はわずかに減少させた。R(-)-Efonidipine(1μM)はこれらの傾きにはほとんど影響を与えなかった。

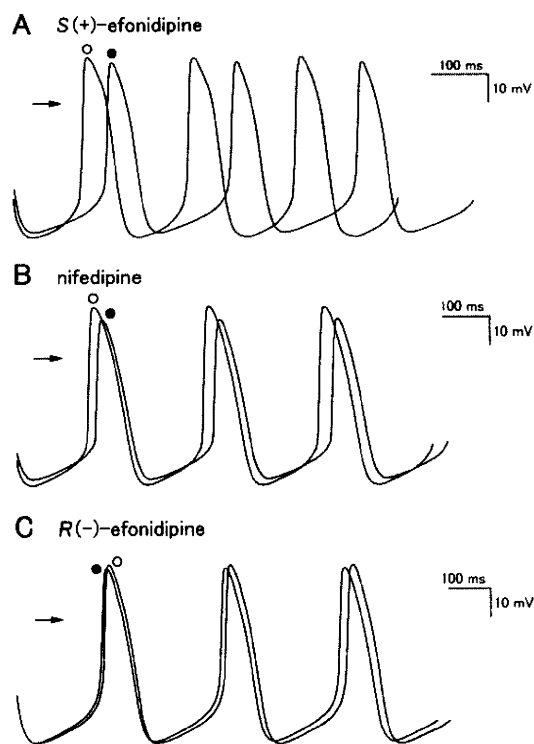


図1：ウサギ洞房結節活動電位に対するS(+)-efonidipine, nifedipine, R(-)-efonidipineの作用。1 μ M投与前(○)および後(●)の典型的トレース。矢印は0 mVを示す。

	S(+)-efonidipine (n=5)		nifedipine (n=5)		R(-)-efonidipine (n=5)		vehicle (DMSO) (n=5)	
	before	after	before	after	before	after	before	after
cycle length (ms)	296 \pm 27	322 \pm 26*	304 \pm 15	314 \pm 15*	325 \pm 37	318 \pm 33	316 \pm 19	312 \pm 21
maximum diastolic potential (mV)	-60.5 \pm 0.3	-56.6 \pm 0.8*	-61.0 \pm 2.0	-58.7 \pm 2.2*	-59.8 \pm 0.8	-57.1 \pm 1.6	-59.6 \pm 3.0	-58.2 \pm 2.7
slope (mV/s)	89.1 \pm 11.1	71.3 \pm 7.3	90.1 \pm 5.1	82.0 \pm 3.4	79.8 \pm 12.1	78.3 \pm 3.1	88.3 \pm 6.7	89.3 \pm 6.8
threshold potential (mV)	-47.9 \pm 1.4	-43.2 \pm 0.8*	-47.6 \pm 2.0	-45.8 \pm 1.8*	-38.1 \pm 3.0	-36.4 \pm 2.4	-45.7 \pm 2.9	-44.0 \pm 2.7
maximum rate of rise (V/s)	13.2 \pm 2.3	10.3 \pm 2.4	14.2 \pm 2.7	11.2 \pm 1.9*	14.4 \pm 3.1	12.1 \pm 2.6	10.7 \pm 1.6	9.7 \pm 1.5
overshoot (mV)	20.6 \pm 2.5	17.3 \pm 4.3	17.7 \pm 2.2	14.4 \pm 2.3*	21.1 \pm 2.5	20.2 \pm 2.6	22.0 \pm 1.5	22.5 \pm 1.7
duration at 50% repolarization (ms)	60.6 \pm 3.5	56.5 \pm 4.1*	67.1 \pm 6.0	62.5 \pm 7.9*	69.5 \pm 2.7	68.1 \pm 2.9*	68.5 \pm 6.0	67.8 \pm 6.0

表1：ウサギ洞房結節活動電位波形に対するS(+)-efonidipine, nifedipineおよびR(-)-Efonidipineの作用。薬物1 μ M投与前および30分後の値を示す。aは薬物投与前との統計的有意差(P<0.05)が有ることを示す。

次にこれらの化合物の各種Ca²⁺チャネル電流に対する作用をwhole cell voltage clamp法を用いて検討した(図2)。

S(+)-EfonidipineはCa_v1.2チャネル電流、Ca_v1.3チャネル電流、Ca_v3.1チャネル電流のすべてを濃度依存的に遮断した。遮断の効力は3種のチャネルに対して同程度であり、S(+)-efonidipine(1 μ M)により遮断された割合およびEC₅₀値は、Ca_v1.2チャネル電流が75.7%および0.46 μ M、Ca_v1.3チャネル電流が75.3%および0.32 μ M、Ca_v3.1チャネル電流が94%および0.11 μ Mであった。

NifedipineはCa_v1.2チャネル電流、Ca_v1.3チャネル電流、Ca_v3.1チャネル電流のすべてを遮断し、その作用の強さはCa_v1.2チャネル電流>Ca_v1.3チャネル電流>Ca_v3.1チャネル電流の順であった。遮断は濃度依存的であり、nifedipine(1 μ M)により遮断された割合およびEC₅₀値は、Ca_v1.2チャネル電流が84.0%お

よび0.19 μ M、Ca_v1.3チャネル電流が43.2%および2.82 μ Mであった。Ca_v3.1チャネル電流が遮断された割合は14.9%であった。

R(-)-EfonidipineはCa_v1.2チャネル電流、Ca_v1.3チャネル電流、Ca_v3.1チャネル電流のすべてを濃度依存的に遮断したが、その効力は弱いものであった。遮断の強さはCa_v3.1チャネル電流>Ca_v1.2チャネル電流=Ca_v1.3チャネル電流の順であった。R(-)-Efonidipine(1 μ M)により遮断された割合は、Ca_v1.2チャネル電流が30.0%、Ca_v1.3チャネル電流が19.6%、Ca_v3.1チャネル電流が92.8%であった。Ca_v3.1チャネル電流に対する抑制のEC₅₀値は0.20 μ Mであった。

S(+)-Efonidipineはウサギ洞房結節組織標本活動電位の緩徐脱分極を著明に抑制したが、これは以前我々がラセミ体のefonidipineで観測した波形変化と同一のものであった。R(-)-Efonidipineによつてはこのような波形変化は見られなかった。従つて、緩徐脱分極の抑制は

2種の光学活性体のうちの*S*(+)-efonidipineのみが有する作用であることが判明した。*S*(+)-E fonidipineおよびnifedipineは最大拡張期電位をわずかに脱分極方向に移動させた。*S*(+)-E fonidipineおよびnifedipineは、内向き整流性K⁺チャンネル電流や遅延整流性K⁺チャンネル電流に対する遮断作用をほとんど持たないことから、最大拡張期電位の移動はこれら以外の電流に対する作用の結果であることが推測される。

緩徐脱分極に関しては、*S*(+)-efonidipineは著明な抑制を示し、nifedipineはわずかな抑制を示し、*R*(-)-efonidipineは全く効果を示さなかった。これは3つの化合物がCa_v1.3チャンネル電流を遮断する強さと相関した。これらの結果から、洞房結節の緩徐脱分極にはCa_v1.3チャンネル電流が寄与しており、*S*(+)-efonidipineはこれを遮断することにより緩徐脱分極を抑制し、徐脈作用を示すことが明らかになった。この結論はCa²⁺チャンネル電流活性化電位領域に関する情報とも整合性がとれている。Ca_v1.2チャンネル電流の活性化閾値は約-30mVであるが、これは洞房結節活動電位が緩徐脱分極から急速な脱分極へと移行する-40mVよりも脱分極側にある。従って、Ca_v1.2チャンネル電流は急速脱分極には

寄与するが、緩徐脱分極には寄与し得ない。一方Ca_v1.3チャンネル電流の活性化電位領域は-50 mV~-10mV、5%活性化が起こる電位は-46mVであることから、-60mV~-40mVの電位領域で生じる緩徐脱分極には十分寄与し得る。ただし、*S*(+)-efonidipineの存在下でも緩徐脱分極は見られたことから、緩徐脱分極の全てがCa_v1.3チャンネル電流に起因するわけではなく、Ca_v1.3チャンネル電流と他の電流系との協同的な働きによって緩徐脱分極が形成されていると考えられる。

以上の結果から、新たな徐脈薬の標的分子としてCa_v1.3チャンネルが注目になることが判明した。Ca_v1.3チャンネルは発現量が心房筋や心室筋に比べて洞房結節に多いことが知られており、これを選択的に遮断することにより心筋のポンプ機能を損なうことなく心拍数を低下させることが出来ると考えられる。また、このような機序に基づく徐脈薬開発の出発点となる化合物として*S*(+)-efonidipineが見出されたが、今後さらなる探索により、高い効力と選択性を有する化合物が見出されると期待される。

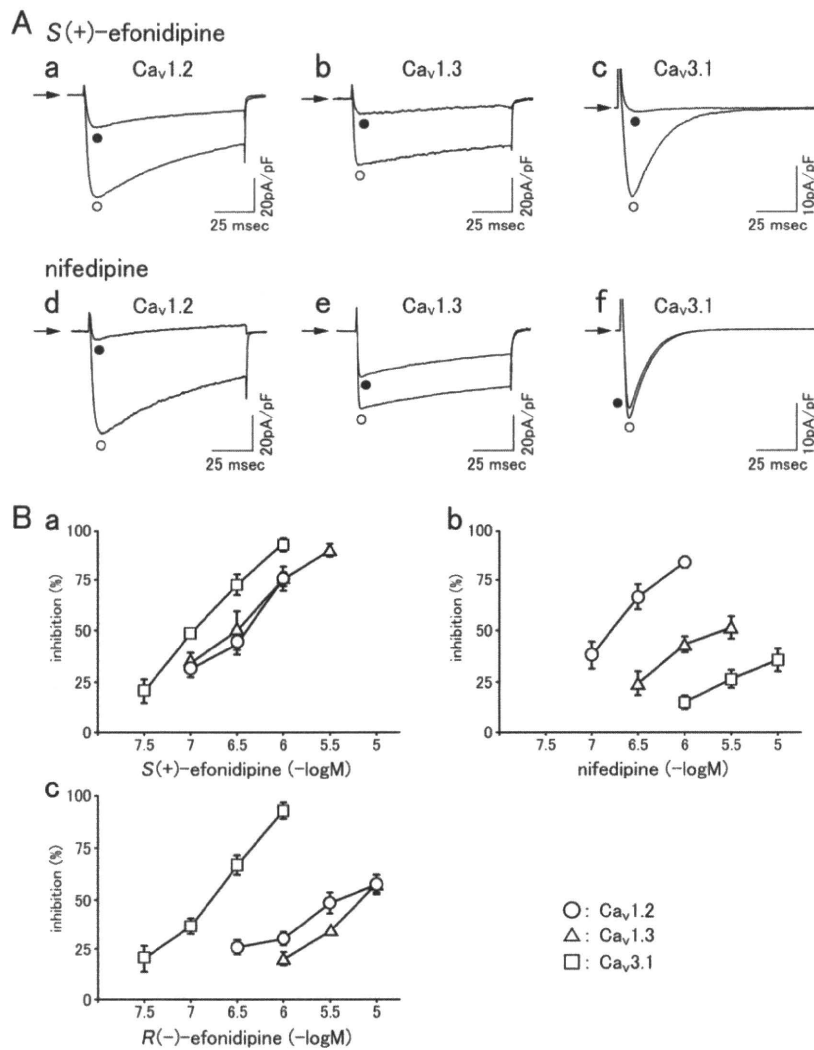


図2 : Ca²⁺チャネル α サブユニットCa_v1.2、Ca_v1.3、Ca_v3.1各電流に対するS(+)-efonidipine、nifedipine、R(-)-efonidipineの作用。
 A: S(+)-efonidipine (1 μ M)投与前(○)および後(●)のCa_v1.2(a)、Ca_v1.3(b)、Ca_v3.1(c)各チャネル電流の典型的トレースおよびnifedipine (1 μ M)投与前(○)および後(●)のCa_v1.2(d)、Ca_v1.3(e)、Ca_v3.1(f)各チャネル電流の典型的トレース。
 B: Ca_v1.2(○)、Ca_v1.3(△)、Ca_v3.1(□)各チャネル電流に対するS(+)-efonidipine (a)、nifedipine (b)、R(-)-efonidipine (c)の遮断作用の濃度反応関係。シンボルとバーは5~8例の平均と標準誤差を示す。

1-2 肺静脈心筋の緩徐脱分極機構

正所性のペースメーカーの機能を担う洞房結節以外にも、心臓には自動能を有する組織がある。そのひとつはPurkinje線維であり、この部位の自動能は洞房結節からの刺激が何らかの伝導障害により心室にまで到達出来ない場合に活動電位を発生して心室を興奮させ、ポンプ機能の維持に貢献する予備のペースメーカー

である。Purkinje線維の細胞で見られる緩徐脱分極は-90mV~-65mVの電位領域で見られ、Na⁺チャネル電流により生じていることが知られている。最近注目されているのが肺静脈心筋の自動能である。肺静脈は肺から心臓に血液を戻す血管であるが、心房との接合部分から心房と連続して心筋層が肺静脈壁の内部にまで入り込んでいる。臨床的に観察される心房細動の9

0%以上がこの部位の心筋細胞から発せられた活動電位が心房筋に伝搬することにより発生していることが明らかになった。すなわち、肺静脈心筋の自動能は心臓のポンプ機能いじには寄与せず、むしろ心房細動などの不整脈を誘発する好ましくない異所性自動能であるといえる。心房細動の治療では肺静脈と心房の接合部分を焼灼して肺静脈心筋と心房筋を電氣的に隔離するcatheter ablationが汎用されるが、焼灼による組織傷害や患者の負担が問題となっている。薬物療法としてはVaughn Williams分類の第I群または第III群の抗不整脈薬が用いられるが、心抑制や心室性不整脈誘発の危険を伴うため理想的な治療とは言い難い。有効性と安全性の高い心房細動治療薬を開発するには、肺静脈心筋の電氣的自発活動がいかなる機序で発生するのかを明らかにし、これを選択的に抑制する薬物を見出すことが必須である。我々はモルモットおよびラット肺静脈心筋に微小電極法を適用し、自発的活動電位を記録してその発生に関与する肺静脈心筋自動能に関与するイオンチャネル・トランスポーターの検討を行ってきた。今回は蛍光イメージング法も導入し、細胞内Ca²⁺の役割も含めて検討した。

肺静脈血管壁にはモルモット、ラットいずれの動物種でも筋肉層が含まれていることがMasson trichrome染色から明らかになった(図3)。

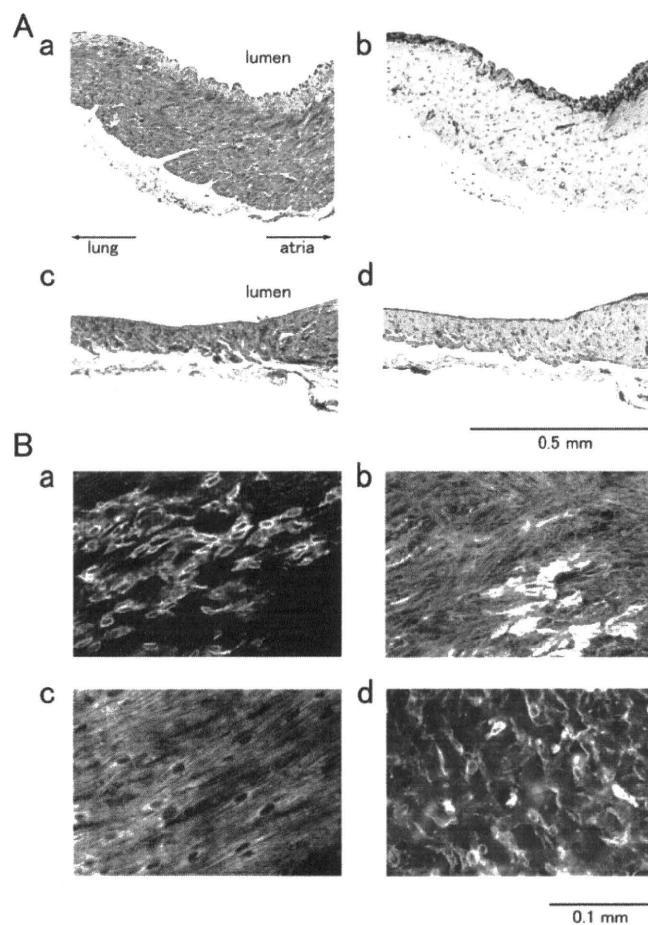


図3：モルモットおよびラット肺静脈における心筋層の存在。
A：モルモット(a, b)およびラット(c, d)肺静脈標本の長軸方向断面のMasson trichrome染色(a, c)および抗smooth muscle α -actin染色(b, d)。
B：細胞膜プローブdi-2-ANEPEQによる肺静脈内皮細胞層(a)、平滑筋層(b)、心筋層(c)および外膜(d)の共焦点断面像。

α -smooth muscle actinに対する抗体の染色像から、平滑筋は血管内腔側に薄く存在しているのみであり、筋肉層の大部分は心筋組織であることが明らかになった。心筋層の厚さはモルモット>ラットであった。共焦点顕微鏡法を用いた観察では、血管内腔側から内皮細胞層、平滑筋層、心筋層、外膜の順で過捉えられた。心筋層は基本的には輪層筋方向に奏功していたが、微妙に走行方向の異なる複数の筋層からな

ることも観測された。

肺静脈組織標本の心筋層では自発的なCa²⁺オシレーションがモルモット、ラットいずれの動物種でも観測された(図4)。Ca²⁺オシレーションの様式としてはCa²⁺トランジェント、Ca²⁺ウェーブ、Ca²⁺スパークの3者が見られた。Ca²⁺トランジェントは細胞全体のCa²⁺濃度の同時上昇で、活動電位を伴っており、多くの細胞で同期して発生するものである。Ca²⁺ウェーブは細胞内局所でのCa²⁺濃度の高まりが伝播していく動きであり、細胞間での同期は見られない。筋小胞体からの

calcium-induced Ca²⁺ release (CICR)機構に基づくことが判明している。Ca²⁺スパークは細胞内の直径1μm程度の微小領域で一過性に生じるCa²⁺濃度の高まりで、CICR発生の機能的単位であると考えられている。Ca²⁺ウェーブは心筋細胞の長軸に沿って移動するもの(図5)、細胞内の中心の周りを渦巻き状に旋回するもの(図6)、同心円状に広がるもの等様々な様式をとり、これらの異なる様式間を相互に移行する場合も多く見られた。

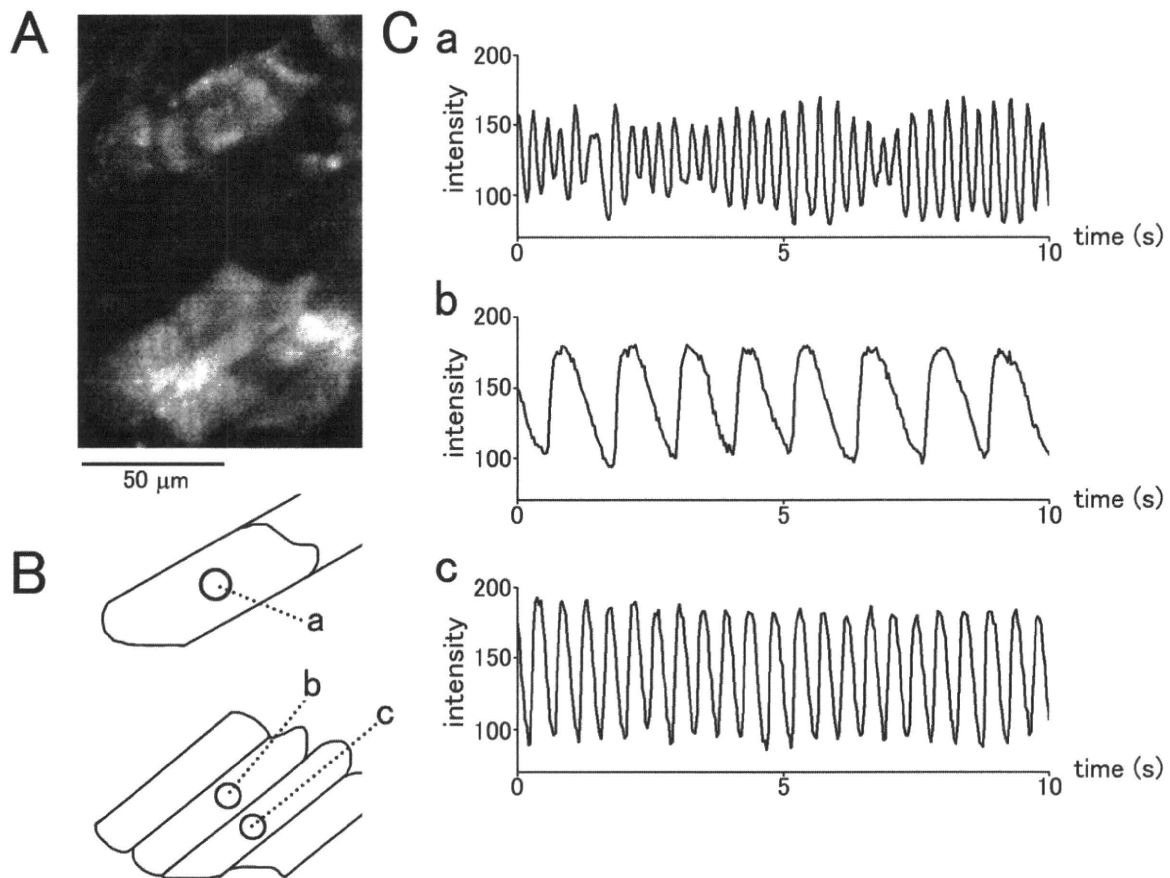


図4：肺静脈心筋層で観測された細胞内Ca²⁺オシレーション。

A：Fluo-4をloadしたラット肺静脈心筋層の典型的蛍光像。

B：蛍光を定量した領域。C：Bで示した領域(a, b, c)の蛍光強度の経時変化。

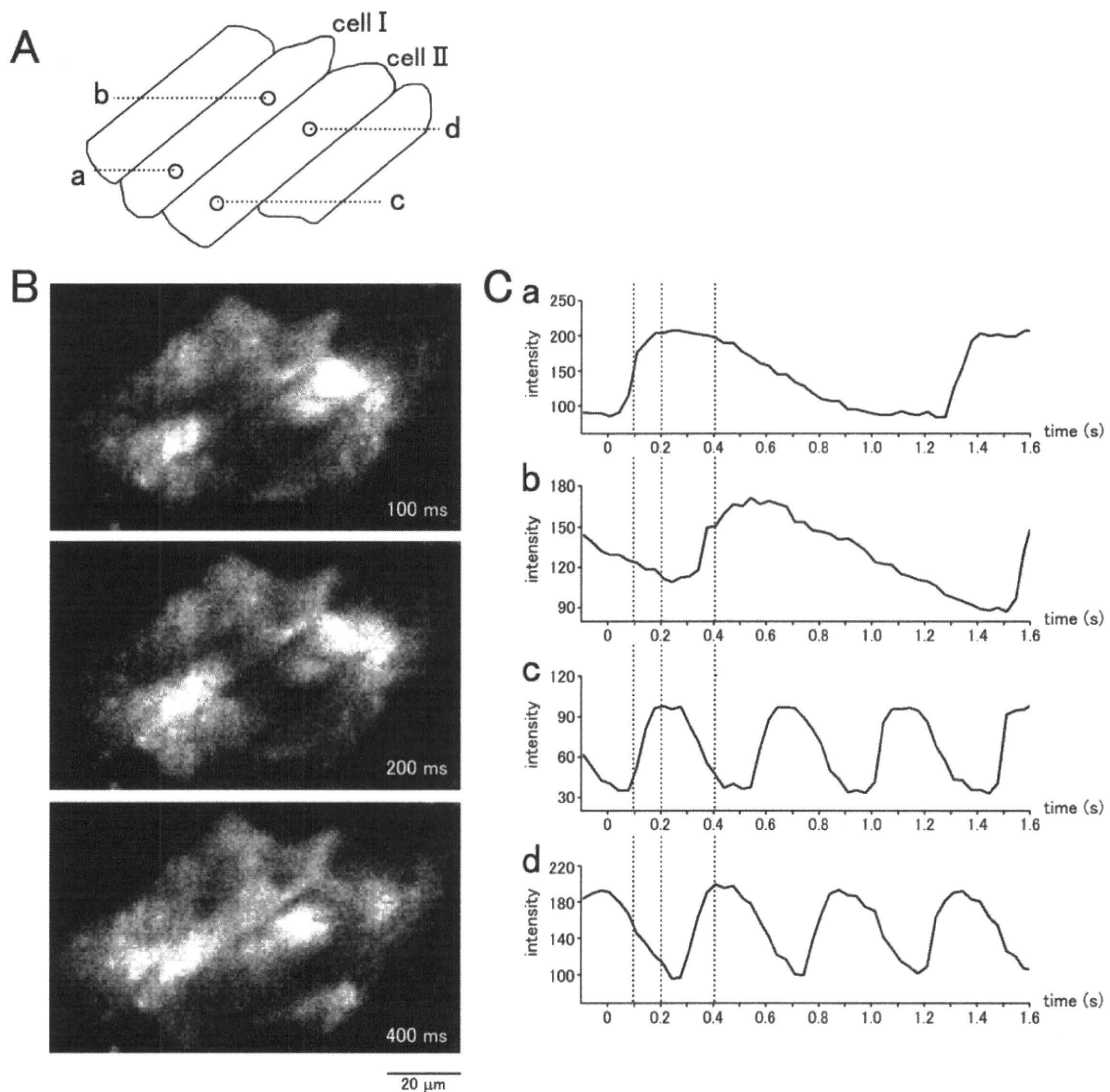


図5：肺静脈心筋層で観測された細胞の長軸方向に伝播するCa²⁺ウェーブ。A: 蛍光強度を定量した細胞内領域。B: Fluo-4をloadしたラット心筋組織の3つの異なる時間(100ms, 200ms, 400ms)における蛍光像。C: Aで示した領域(a, b, c, d)の蛍光強度の経時変化。点線はBの画像を取得した時刻を示す。細胞Iおよび細胞IIでCa²⁺ウェーブが細胞の左下で発生し、右上方向に伝播した。

細胞Iのa地点からb地点まで伝搬する間に細胞IIのc地点からd地点までの伝搬が完了しており、伝搬速度はそれぞれ80 μm/s、120 μm/sであった。

Ca²⁺オシレーションの見られない肺静脈心筋細胞にnoradrenalineを投与すると、細胞内Ca²⁺濃度の高まりとともに、Ca²⁺オシレーションが発生したが、これに筋小胞体からのCa²⁺放出を抑制するryanodineを投与すると完全に消失した(図7)。摘出肺静脈組織標本にガラス微小電

極法を適用し、膜電位変化を観測した(図8;表2)。モルモットでは17標本中6標本で自発的な電気活動が観測された。自発的電気活動を示さなかった11標本では、noradrenaline投与によりまず静止膜電位の脱分極方向への移動が観測された。静止膜電位の値はnoradrenaline投

与前が -67.3mV 、投与後が -62.6mV であった。その後活動電位の反復的発生が起こった。Noradrenaline投与から活動電位発生までのlatency

は $40 \pm 12.3\text{s}$ であった。この反復的活動電位発生は30分以上持続し、これに伴い最大拡張期電位は徐々に深まっていった。

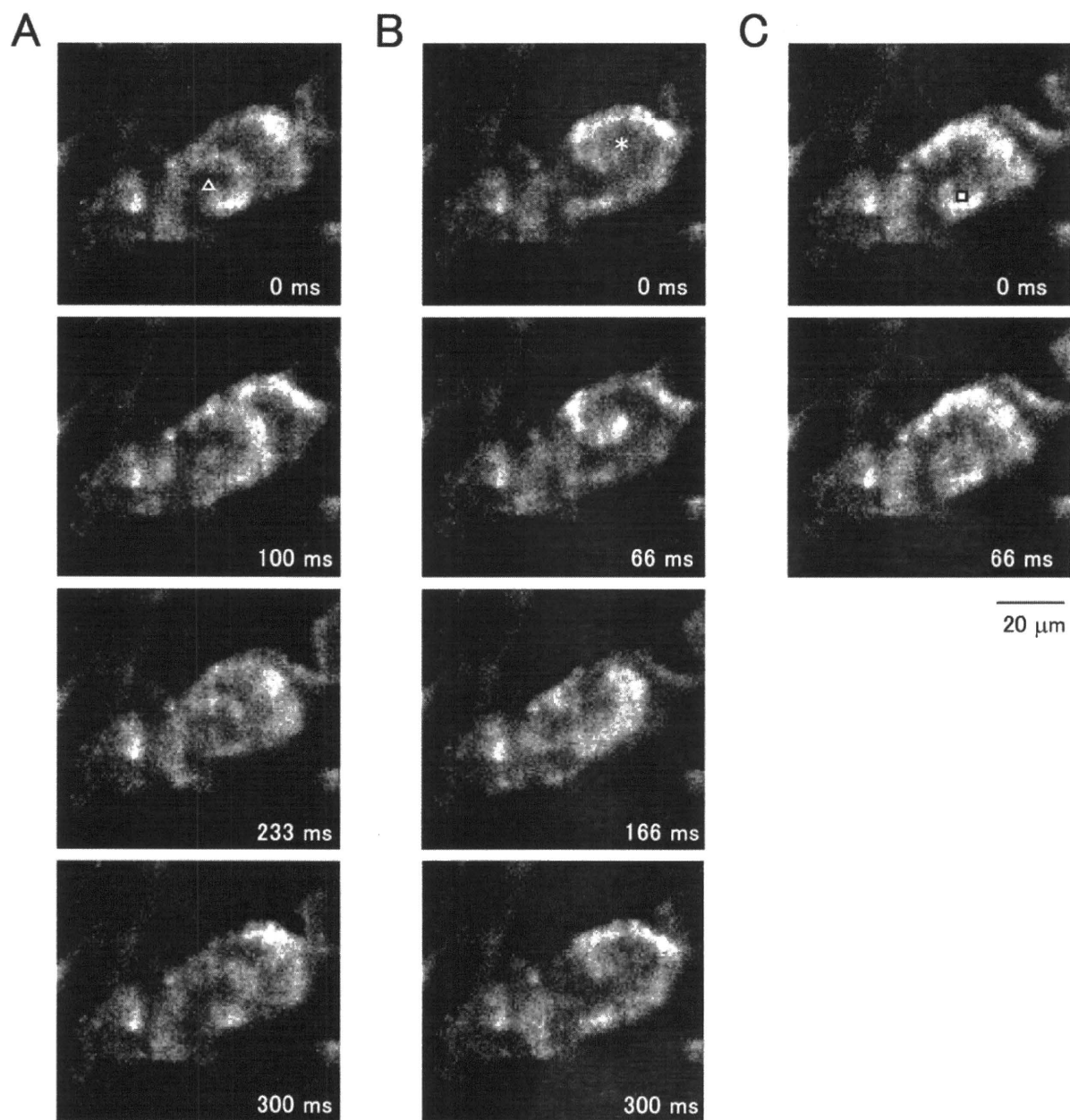


図6：ラット肺静脈心筋層で観測された渦巻き状(A, B)および同心円状(C)の Ca^{2+} ウェーブ。
 A：左巻き渦巻き状の Ca^{2+} ウェーブ(Δ)は渦の中心を示す。
 B：右巻き渦巻き状の Ca^{2+} ウェーブ(*)は渦の中心を示す。
 C：同心円状の Ca^{2+} ウェーブ(\square)は中心を示す

ラット肺静脈心筋では、80標本中で自発的電気活動が観測されたのはわずかに3標本であった。電気活動の観測されなかった標本にnoradrenalineを投与すると(図9)、静止膜電位はまず過分極方向に、つづいて脱分極方向に移動するという二相性の変化を示した。静止膜電位はnoradrenaline投与前は $-67.4 \pm 1.7\text{mV}$ 、最も過分極した時点では $-75.5 \pm 1.1\text{mV}$ 、最終的には $-60.5 \pm 2.8\text{mV}$ であった。この静止膜電位の変化の後に、間欠的な反復興奮(活動電位発生、burst)がみられた(表3,表4)。Noradrenaline投与からburst発生までのlatencyは $397 \pm 58.3\text{s}$ 、反復興奮の持続時間は $53.7 \pm 8.1\text{s}$ 、burst

の間隔は $68.8 \pm 17.3\text{s}$ であった。Burst発生時の最大拡張期電位はまず脱分極方向に移動し、その後過分極方向に移動する二相性の変化を示した。

Noradrenaline投与後のモルモット肺静脈心筋でみられた反復的活動電位発生は、ryanoeine $0.1\mu\text{M}$ により完全に抑制された。抑制までのlatencyは $4.9 \pm 0.3\text{s}$ であった。Ryanodineは反復的活動電位の発生頻度にはほとんど影響を与えなかった。反復興奮の頻度はryanodine投与前は $4.0 \pm 0.5\text{Hz}$ 、投与1分後は $4.3 \pm 0.5\text{Hz}$ 、停止直前は $4.2 \pm 0.2\text{Hz}$ であった。

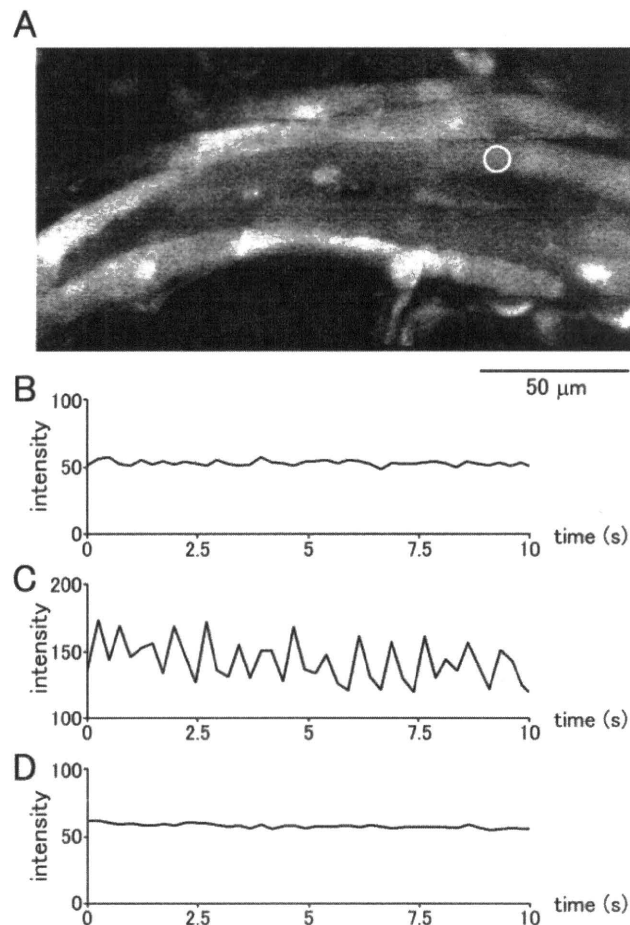


図7：モルモット肺静脈心筋層でnoradrenaline処置後に観測された細胞内 Ca^{2+} オシレーション。

A：典型的なfluo-4蛍光像。白丸は蛍光強度を定量した領域を示す。

B-D:Noradrenaline $10\mu\text{M}$ 投与前(B)、投与5分後(C)、さらにryanodine $1\mu\text{M}$ 投与した5分後の蛍光強度

の経時変化。

一方、ラット肺静脈心筋でもnoradrenalineにより誘発されたburst状の活動電位は、ryanodineにより頻度と持続時間が減少した。10標本中5標本では活動電位の発生が30分以内に完全に抑制された。残りの5標本でryanodine存在化に残存した自発活動は、nifedipine投与により完全に抑制された。

肺静脈心筋の電氣的自発活動が観測される頻度はモルモットで高かったが、これはモルモットで心筋層が厚いことで一部説明可能である。我々は以前単離モルモット肺静脈心筋細胞でouabainがCa²⁺オシレーションおよび電氣的自発活動を誘発し、これらがryanodineにより消失することを報告した。ウサギの肺静脈心筋で、自発活動を有する標本でCa²⁺ウェーブが頻繁に観測される事が報告されている。これらの知見は、Ca²⁺オシレーションが電氣的自発活動の引き金になっていることを示している。モルモットの単離肺静脈心筋細胞では、電氣的自発活動はNa⁺/Ca²⁺交換機構阻害薬により著明に抑制されたが、これは高まった細胞内Ca²⁺がNa⁺/Ca²⁺交換機構により細胞外にくみ出される際の内向き電流が脱分極を起こして電氣的自発活動の引き金となっていることを示している。

Noradrenalineは自発活動を示さない標本で静止膜電位を変化させた。モルモットでは脱分極、ラットでは一過性の過分極の後脱分極である。一般にαアドレナリン受容体刺激はNa⁺/Ca²⁺交換機構の活性化やK⁺チャネルの抑制を、βアドレナリン受容体刺激はCa²⁺チャネルの活性化を起こすことが知られているが、肺静脈心筋での静止膜電位変化の機序に関しては今後の検討課題である。

モルモット、ラットともにnoradrenalineに

より電氣的自発活動が誘発され、ryanodineで消失または減弱した。この結果は細胞内Ca²⁺オシレーションが電氣的自発活動の引き金になっていることを示唆している。ラットではburst状の反復興奮が間欠的に見られたが、最大拡張期電位がburstの期間中に徐々に過分極方向に移動した。この現象はburstによる細胞内Ca²⁺濃度の高まりが過分極性の電流系を活性化したことで説明可能である。我々は以前AVブロック処置を施した犬の肺静脈心筋において、通常心筋には発現していない細胞内Ca²⁺依存性のK⁺チャネルが発現しており、これが活動電位持続時間の短縮を起こしていることを見出した。ラット肺静脈心筋のburst時にこの種のイオンチャネルが活性化している可能性が考えられる。高頻度電気刺激を加えると肺静脈心筋でtriggered activityと呼ばれる部分的脱分極が生じるという知見も細胞内Ca²⁺と自発活動の関連性を示唆するものである。また、近年侵害刺激等により開口するTRP等のイオンチャネルが、循環器系や免疫系の様々な現象に関与することが明らかになりつつある。肺静脈心筋の自発活動にこれらのイオンチャネルが関与している可能性も十分に考えられ、今後の検討課題である。

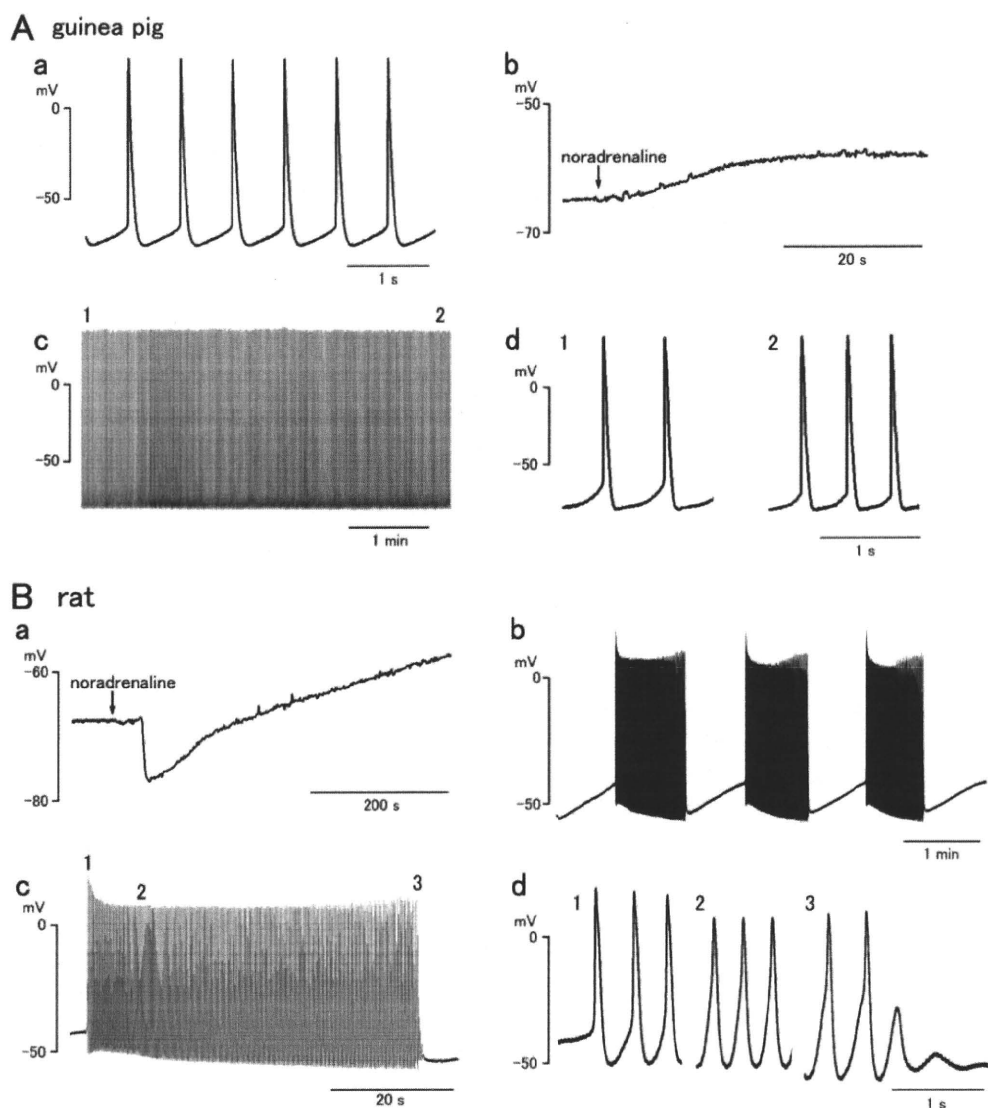


図8：モルモット(A)およびラット(B)肺静脈心筋自動能に対するnoradrenalineの作用。Aa:Noradrenaline非存在下で観測された電氣的自発活動。Ab:Noradrenaline 10 μ Mによる静止膜電位の変化。Ac:Noradrenaline 10 μ Mにより誘発された電氣的自発活動。Ad:Acの時間1および2における活動電位波形。Ba:Noradrenaline 10 μ Mによる静止膜電位の変化。Bb: Noradrenaline 10 μ Mにより誘発されたburst状の電氣的自発活動。Bc:Bbの最初のburstの拡大表示。Bd : Bcの時間1、2および3における活動電位波形。

	Start	1 min	5 min	10 min
maximum diastolic potential (mV)	-70.9 \pm 2.3	-72.6 \pm 2.4	-77.0 \pm 3.6	-79.3 \pm 2.2
peak (mV)	27.9 \pm 3.0	27.3 \pm 3.5	28.8 \pm 2.3	26.5 \pm 1.5
frequency (Hz)	0.4 \pm 0.1	3.1 \pm 0.3	3.1 \pm 0.4	3.4 \pm 0.4

表2：モルモット肺静脈でnoradrenaline(10 μ M)により誘発された活動電位の特性。値は6例の平均値と標準誤差を示す。

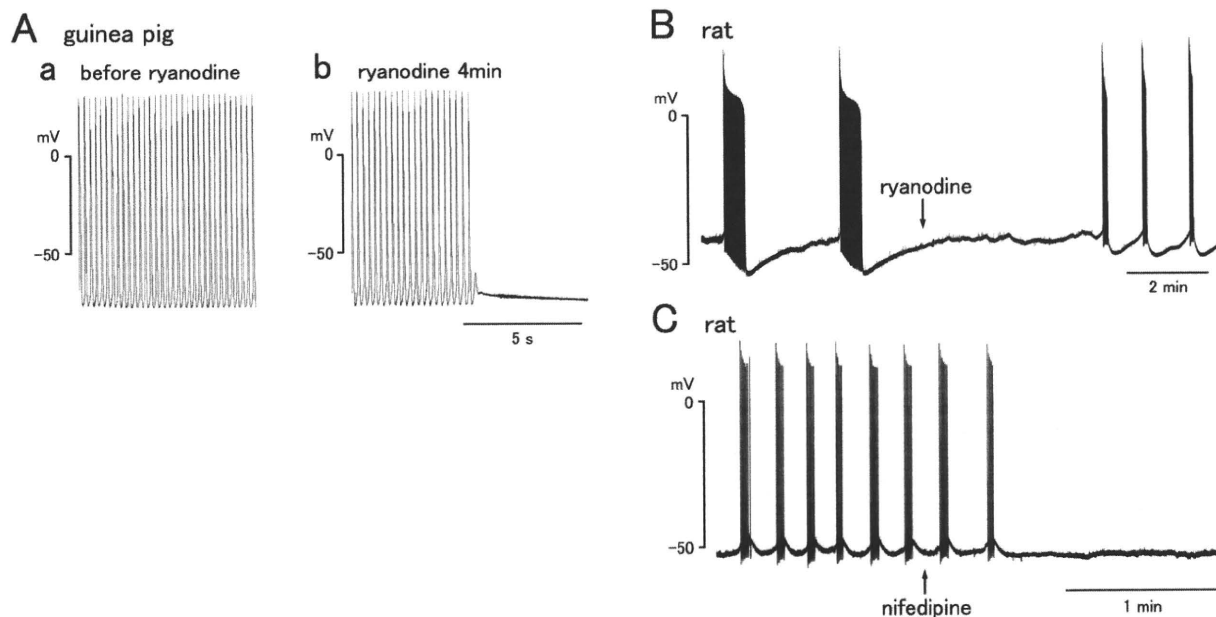


図9：Noradrenaline (10 μ M)で誘発されたモルモット(A)およびラット(B)肺静脈心筋の電氣的自発活動に対するryanodineの作用。A:Ryanodine (1 μ M)投与前(a)および4分後(b)の電氣的自発活動。B:Ryanodine (1 μ M)による自発活動の変化。C:Ryanodine (1 μ M)存在下の自発活動に対するnifedipine (1 μ M)の作用。

	Start	Max Frequency	End
maximum diastolic potential (mV)	-60.0 \pm 2.7	-62.5 \pm 2.4	-68.4 \pm 1.9
peak (mV)	16.1 \pm 2.1	11.1 \pm 2.7	12.6 \pm 2.4
frequency (Hz)	3.4 \pm 0.4	5.3 \pm 0.5	3.6 \pm 0.5

表3：ラット肺静脈でnoradrenaline (10 μ M)により誘発されたburst状の電氣的自発活動の特性。値は10例の平均値と標準誤差を示す。

	before ryanodine	ryanodine 5 min	ryanodine 10 min
duration (sec)	59.5 \pm 16.9	11.7 \pm 1.5*	8.7 \pm 1.3*
maximum frequency (Hz)	5.9 \pm 0.4	4.6 \pm 0.4*	3.1 \pm 0.5*

表4：ラット肺静脈でnoradrenaline (10 μ M)により誘発された電氣的自発活動に対するryanodineの作用。値は6例の平均値と標準誤差を示す。*はryanodine投与前の値との有意に異なることを示す。

2. 心筋の再分極機構に関する研究

2-1 心房に特有の再分極機序に関する研究

心房細動などの心房性不整脈に対する有効かつ安全に治療するには心房選択的に活動電位持続時間、すなわち不応期を延長する作用を有する治療薬が有力な手段となる。我々は以前からモルモットの摘出心筋組織標本の活動電位波形を用いて検討を重ねた結果、benzopyran系化合物のNIP-142が心房筋のみ活動電位持続時間および不応期を延長する作用を有することを見出した。静止膜電位や最大立ち上がり速度には影響は見られなかった。すなわち、NIP-142は心室筋の再分極に影響せずに心房筋の不応期を延長させる作用を有していた。アコニチンにより誘発される心房細動モデルに適用したところ、NIP-142により著明な停止効果が見られ、心房細動治療薬としての可能性を有する事が明らかになった。そこで治療効果の基盤となる薬理作用を

分子レベルで検討するため、各種 K^+ チャンネル電流に対する遮断作用の有無を膜電位固定法により評価した。まずアセチルコリン K^+ チャンネルを担うGIRK1/GIRK4、遅延整流性 K^+ チャンネルの早い成分IKrを担うhERG、遅延整流性 K^+ チャンネルの遅い成分IKsを担うKCNQ1/KCNE1、遅延整流性 K^+ チャンネルの極めて速い成分IKurを担う $K_v1.5$ をPCRクローニングし、これらをHEK293細胞系に導入して安定発現細胞株を樹立し、patch電極を用いたwhole cell voltage clamp法により電流を測定した。一過性外向き電流を担う $K_v4.2$ および $K_v4.3$ に関してはPCRクローニングののち、in vitro transcriptionにより取得したmRNAを*Xenopus* oocyteに注入してチャンネルを発現させ、double microelectrode voltage clamp法により電流測定した。NIP-142により電流遮断がみられたが、遮断の強さはチャンネルの種類により大きく異なっていた(図10, 図11)。

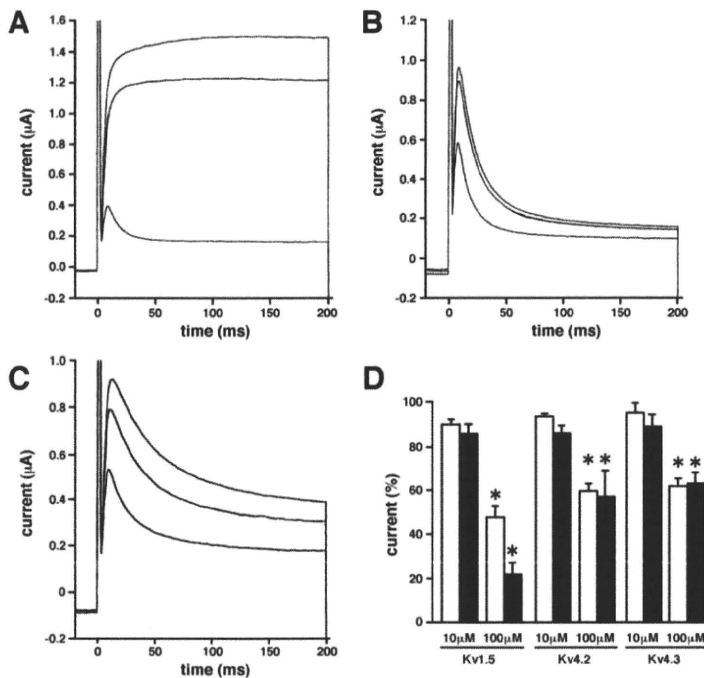


図10 : K^+ チャンネル電流 $K_v1.5$ 、 $K_v4.2$ および $K_v4.3$ に対するNIP-142の作用。保持電位 $-80mV$ から $+40mV$ への持続 $200ms$ の脱分極パルスで惹起した $K_v1.5$ (A)、 $K_v4.2$ (B)および $K_v4.3$ (C)電流の典型的トレース。各パネルにおいて、トレースは上から順に薬物非存在下、NIP-142 $10\mu M$ 存在下および $100\mu M$ 存在下。各濃度における電流量を薬物非存在下を基準としてまとめたものをDに示す。

遮断作用の強さの指標である EC_{50} 値は、GIRK1/GIRK4; $0.64\mu\text{M}$ 、 $K_v1.5$; $4.8\mu\text{M}$ 、KCNQ1/KCNE1; $12\mu\text{M}$ 、 $K_v4.2$ および $K_v4.3$; $>100\mu\text{M}$ であった。この結果は、NIP-142がアセチルコリン K^+ チャネルの選択的な遮断薬であることを示している。アセチルコリン K^+ チャネルは副交感神経興奮時に遊離されるアセチルコリンにより活性化され、かつ心房でのみ機能するチャネルであることから、NIP-142の抗心房細動作用の機序として

アセチルコリン K^+ チャネル遮断は極めて有力であると言える。マウス心房筋においてNIP-142がアセチルコリン K^+ チャネル遮断薬のtertiapin同様に活動電位持続時間を延長させたこともこの結論を支持する(図12, 表5)。ただし、遅延整流性 K^+ チャネルの極めて速い成分 I_{Kur} も心房に多く発現しているチャネルであり、NIP-142の抗不整脈作用に関連している可能性を完全に排除することは出来ない。

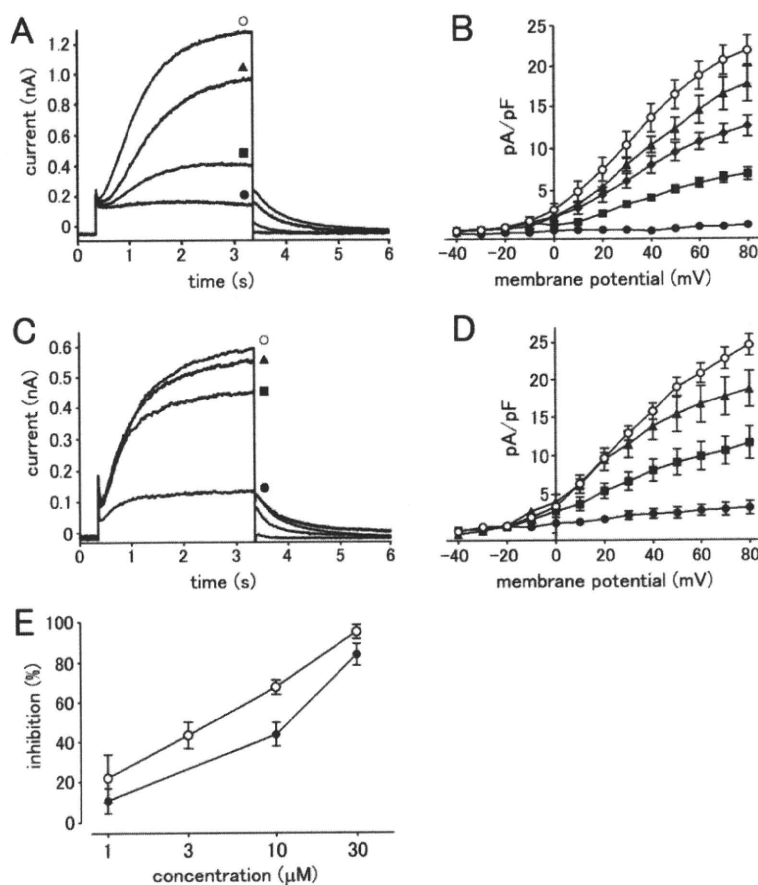
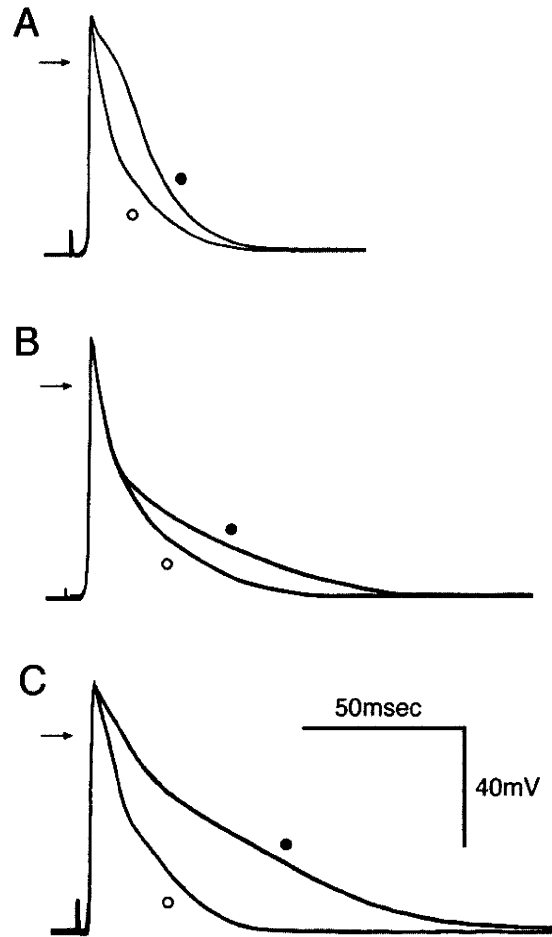


図11 : K^+ チャネル電流KCNQ1/KCNE1に対するNIP-142の作用。A: 薬物非存在下(○)およびchromanol293B $1\mu\text{M}$ (▲)、 $10\mu\text{M}$ (■)、 $30\mu\text{M}$ (●)存在下で保持電位 -40mV から $+60\text{mV}$ への持続3sの脱分極パルスを与えた際の電流の典型的なトレース。B: 薬物非存在下(○)およびchromanol293B $1\mu\text{M}$ (▲)、 $3\mu\text{M}$ (◆)、 $10\mu\text{M}$ (■)、 $30\mu\text{M}$ (●)存在下で各電位への3sの脱分極の後に -40mV に戻した際のtail電流のピーク値。C: 薬物非存在下(○)およびNIP-142 $1\mu\text{M}$ (▲)、 $10\mu\text{M}$ (■)、 $30\mu\text{M}$ (●)存在下で保持電位 -40mV から $+60\text{mV}$ への持続3sの脱分極パルスを与えた際の電流の典型的なトレース。D: 薬物非存在下(○)およびNIP-142 $1\mu\text{M}$ (▲)、 $10\mu\text{M}$ (■)、 $30\mu\text{M}$ (●)存在下で各電位への3sの脱分極の後に -40mV に戻した際のtail電流のピーク値。D: chromanol293B(○)およびNIP-142(●)による電流抑制の濃度作用関係。各濃度における膜電位 20mV への脱分極パルスから -40mV に戻した際のtail電流のピーク値を薬物非存在下を基準としてまとめたものをDに示す。



シンボルとバーは4~8例の平均値と標準誤差を表す。

図12：心房筋活動電位に対する4-aminopyridine、tertiapinおよびNIP-142の作用。
 マウス単離心房筋組織標本にガラス微小電極法を適用し、薬物非存在下(○)および1mM 4-aminopyridine(A)、1 μ M tertiapin(B)、100 μ M NIP-142(C)存在下(●)での典型的活動電位波形。矢印は0mVを示す。

		4-aminopyridine (1mM)	4-aminopyridine (10mM)	tertiapin (1 μ M)	NIP-142 (1 μ M)	NIP-142 (10 μ M)	NIP-142 (100 μ M)
APD ₂₀ (ms)	before	33 ± 04	44 ± 03	24 ± 02	27 ± 04	26 ± 01	27 ± 02
	after	85 ± 04*	186 ± 13*	25 ± 03	26 ± 03	35 ± 02*	127 ± 21*
APD ₉₀ (ms)	before	328 ± 22	362 ± 21	39.1 ± 29	332 ± 37	330 ± 29	350 ± 23
	after	328 ± 19	600 ± 31*	598 ± 38*	347 ± 40	449 ± 15*	905 ± 63*

表5：マウス心房筋活動電位に対する4-aminopyridine、tertiapinおよびNIP-142の作用。
薬物投与前および4-aminopyridine (1mM, 10mM)、tertiapin(1 μ M)およびNIP-142(100 μ M)投与30分後の20%および90%再分極までの活動電位持続時間。値は4～5例の平均値と標準誤差。*は薬物投与前の値と統計的に有意な差があることを示す。

2-2 心室の再分極制御機序の発達変化

心筋の再分極を担うイオンチャネルの組み合わせは動物種、発達段階、心臓の部位、病態の有無などにより様々であり、これが生理活性物質や薬物の効果にも影響を与える。本研究では、モルモット心房筋のヒスタミン反応性の発達変化と、ニワトリ心室筋のK⁺チャンネル作用薬に対する反応性の発達変化について検討した。

モルモット心室筋収縮力は、成体、新生仔いずれもヒスタミンにより増大した。そこでこの反応に対する受容体拮抗薬の影響を検討した(図13)。成体の反応は、H₁受容体拮抗薬のchlorphenylamineにより競合的に拮抗されたが、H₂受容体拮抗薬のranitidineやH₃受容体拮抗薬のthiperamideによつては影響されなかった。心房筋細胞のマイクロソーム分画を用いた受容体結合実験の結果、心房のヒスタミン受容体密度は新生仔の心房ではH₂受容体>H₁受容体、成体の心房ではH₁受容体>H₂受

容体でることが判明した。新生仔の心房ではヒスタミンによる収縮力増大は、ホスホジエステラーゼ阻害薬のisobutyl-methyl xantine (IBMX)により増強されたが、成体ではIBMXの影響は見られなかった(図14)。新生仔では、収縮力増大に伴い活動電位持続時間の延長も見られたが、この反応も収縮力変化と同様にH₁受容体拮抗薬のchlorphenylamineにより競合的に拮抗されたが、H₂受容体拮抗薬のranitidineやH₃受容体拮抗薬のthiperamideによつては影響されなかった。これらの結果から、ヒスタミンはcAMPによるCa²⁺チャンネル活性化、活動電位持続時間の増大を引き起こすが、その作用機序は生後発達に伴いcAMP依存型から非依存型に変化していくことが判明した。

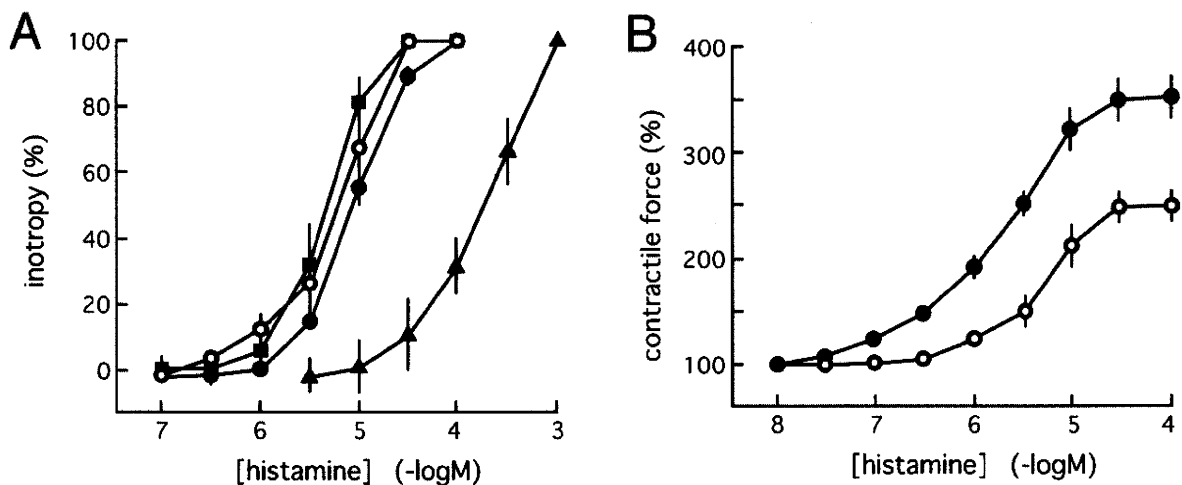


図13: モルモット左心房筋に対するヒスタミンの陽性変力作用の性質。A: 関与する受容体タイプの検討。薬物非存在下(○)、chlorphenylamine 0.3 μM存在下(●)、ranitidine 10 μM存在下(▲)およびthiperamide 1 μM存在下(■)のヒスタミンの濃度反応関係。各濃度のヒスタミンによる収縮力の増加分を最大濃度による増加分に対する割合で示す。B: cAMPの関与の検討。薬物非存在下(○)およびisobutyl-methyl xantine 1 μM存在下(■)のヒスタミンの濃度反応関係。シンボルとバーは5例の平均値と標準誤差を表す。