

c) Solvent: DMF

まずN-O位置選択性について基質**73**を原料としたときと比較すると、少なくとも同じヒドロキサム酸 ($R^3 = t\text{-BuO}$, **Table 7**)を用いた場合には選択性が低下する結果が得られた (**Entry 1, 2, 3**)。ただし、**a**体と**b**体共に収率が向上しているため実収量は同等とも考えられうる。

次にバナジウム触媒はこれまでに用いてきた $\text{VO}(\text{O}-i\text{Pr})_3$ に比べ、 $\text{VO}(\text{acac})_2$ を用いたとき収率が向上する結果が得られた (**Entry 1 vs. Entry 2**)。また、 $\text{VO}(\text{acac})_2$ は比較的安定な固体試薬であり扱いやすい金属触媒試薬である。

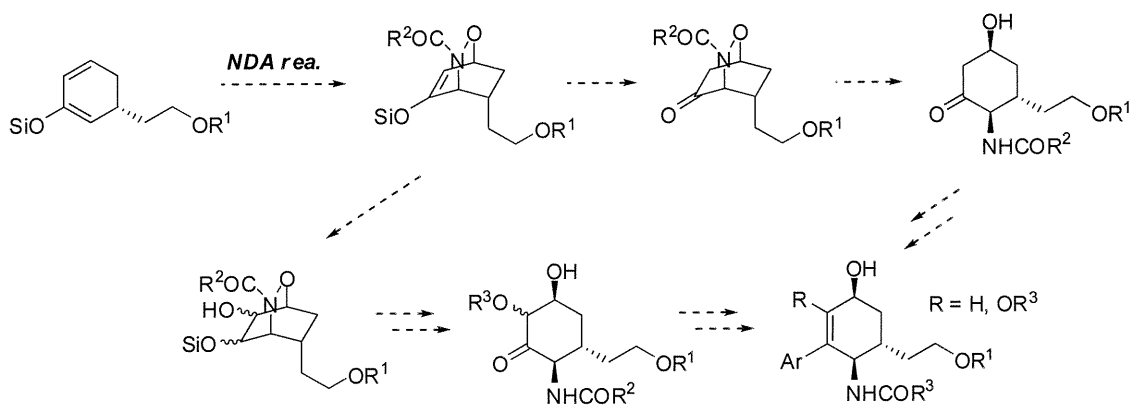
Entry 3のDMFを溶媒として用いた検討では、発生するニトロソ化合物を高極性溶媒により安定化し反応性を下げることで立体効果よりも静電効果の影響による選択性を優先させようと試みたが、結果として収率、選択性ともに低下する結果となった。

異なるヒドロキサム酸を用いた検討で、 $R^3 = \text{EtO}$ のときN-O位置選択性が向上した (**Entry 5**)。選択性が向上した結果について、基質をエチルカーバメートにしたことでNの嵩高さが解消されたことでアリール基との立体反発が小さくなったことが要因として考えられる。

これらの結果から、 $\text{VO}(\text{acac})_2$ が本反応に対して有用な触媒であること、また用いるヒドロキサム酸の利用による選択性向上の可能性を見出すことができた。

3-6. 新合成経路へのアプローチ

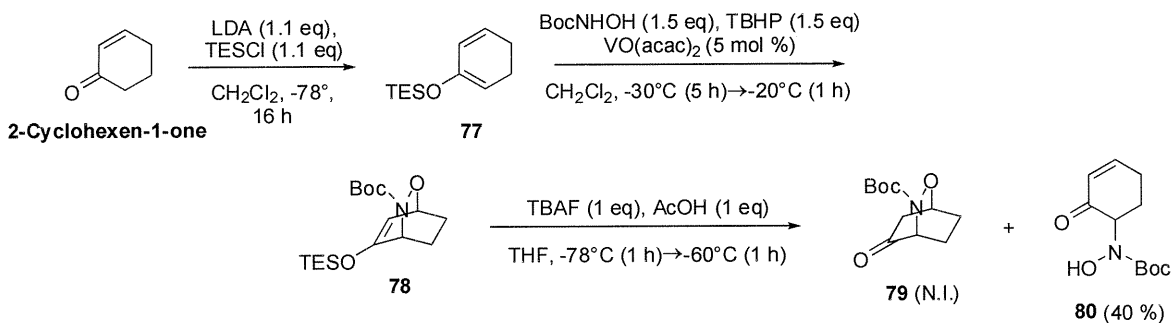
本章で述べた合成戦略は現在も取り組んでいる途中であるが、ここにこれまでの検討で得られた知見を基礎とする *nobilisine* の新たな合成経路を提案する (**Scheme 48**)。まず鍵となるニトロソDiels-Alder反応において最もN-O位置選択性を見込めるジエン基質はその2位にシロキシ基を有するものであった。このニトロソDiels-Alder反応によって得られたN-O付加体を脱シリル保護、もしくはヒドロホウ素化により還元した後、N-O開裂から続く官能基変換を施す。結果として *nobilisine* の全合成における重要な中間体を得られるのではないかと考えている。



Scheme 48

この合成戦略の妥当性を推し量る上で次の検討を行なった (Scheme 49)。反応はシロキシ基が不安定なために全てカラムクロマトグラフィーによる単離をせずに行なっている。まずシクロヘキサノンのエノラート化の後トリエチルシリル (TES-)エーテル保護し、ニトロソ Diels-Alder反応を行なった。得られた反応混合物にTBAFを作用させて脱TES保護することに

より、**79**のようなケトン体を得ようと試みたが、脱TES保護と同時にシクロヘキセン上の炭素とN-Oの酸素原子が開裂した α, β -不飽和ケトン**80**が得られた。現時点でこの一連の反応による**79**の合成は達成されていないが、2章で用いた基質のように側鎖を付けることで安定性が増し単離が可能になった場合には再検討したいと考えている。



Scheme 49

南沢享（研究分担者）

高齢化の進む先進諸国においては、心血管障害による死因が常にトップクラスを占め、中でも心不全による死亡は年々増加している。心不全の治療には交換神経遮断剤やアンギオテンシン変換酵素阻害剤やなど有効な薬物治療があるものの、心不全患者の生命予後はいまだに極めて不良であり、心不全の新たな治療法を見いだすことは、現代の医療における重要課題のひとつとなっている。「心不全」の病態が形成される過程において、交感神経系や液性因子を含む多彩な要因が複合的に絡み合うため、病態が進行すればするほど、その治療が困難になる。従って、病初期に、心臓のポンプ機能を維持することが出来れば、心不全の進行を防ぐことが容易となるはずである。心臓のポンプ機能が低下すると、生体ではそれに適応するために交感神経系の活性化が生じる。しかし、交感神経系の活性化は一時的なポンプ機能の改善には役立つが、長期的にはむしろ心不全の病態を悪化させることが知られるようになった。故に、交感神経系ベータアドレナリン受容体遮断剤が慢性心不全の治療に用いられるようになった歴史的背景がある。

ベータアドレナリン受容体のサブタイプは少ないが、効果酵素であるアデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、5型あるいは心臓型とよばれるものは心臓に特異的に発現する。石川らの研究から、遺伝子的な心臓型の欠損は心機能低下を定常状態において引き起こさないが、各種のストレスに対する抵抗性を高め心筋保護作用があることが報告されている。このことから、心臓型サブタイプの選択阻害剤は、心不全治療薬として臨床応用が可能となると思われる。

ヒトにむけた臨床試験を開始するに当たり、動物をもちいた前臨床試験においてマウスを使った様々

A. 研究目的

な心不全モデルが作製可能であり、さらに心エコーや心臓カテーテル検査による心機能測定など、ヒトにおいて行われている検査のほとんどが再現可能である。そこで、様々なマウスモデルの作製と共に、どのような心不全モデルにおいて心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果がもっとも顕著となるかの検討が必要である。我々は心臓のポンプ機能を調節する重要な因子である心筋細胞内 Ca^{2+} 、特に心筋筋小胞体における Ca^{2+} 調節機構に注目し、心不全の病態との関連や心筋筋小胞体における Ca^{2+} 調節について検討を行った。

また、心筋筋小胞体分子の遺伝子変異は、心筋症や致死性不整脈の原因となることが分かってきている。心不全や不整脈に対する本質的な治療法の開発を考えると、心筋筋小胞体蛋白は新たな標的として非常に重要である。我々はその中でも特に交感神経活性ならびにアデニル酸シクラーゼ活性、加齢や強度の運動負荷などの生理現象が筋小胞体 Ca^{2+} ATPaseを制御する分子機構について検討を行った。

B. 研究方法

これまでに研究開発した様々なマウス心不全モデルにおいて、心機能変化の特性を比較検討し、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果をみるのに適切なモデルを考案した。

心臓がポンプとしての役割を十分に果たせなくなると、生体が恒常性を保てなくなり、全身の器官・組織の機能に異常が生じる。これが慢性化すると、それぞれの器官の機能異常が相互に作用し、さらなる機能異常や器質的変化をもたらす。それは心臓自体にも悪影響を及ぼし、心機能はさらに低下する。その結果、全身の器官が機能異常をおこす悪循環は一層加速し、全身に様々な症状が現れる。この状態

を心不全と呼ぶ。従って、「心不全」は単一の病名ではなく、心臓がポンプとしての役割を果たせなくなったために生じた症候群としてとらえられる。これまでの研究では、心不全をきたす原因の違いにかかわらず、心不全時には心筋筋小胞体の機能低下がほぼ共通に認められることから、心不全の発症機転及び進行に極めて重要であることがわかってきている。そこで本研究では遺伝子操作技術によって、心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプ（筋小胞体Ca²⁺ATPase）の活性を調節するサルカルメニン(sarcalumenin)と呼ばれるカルシウム結合蛋白を欠損させたサルカルメニンノックアウトマウスを作成した。このマウスでは心筋筋小胞体機能が低下しているため、負荷をかけることで心機能が如何に変化するかを検討した。また、熱ショックタンパク質のひとつである $\alpha\beta$ クリスタリンの遺伝子変異型マウスはヒト拘束性心筋症様の病態を呈し、筋小胞体機能が低下することを見出し、本マウスに関してもモデルとしての検討を行った。

次に、交感神経緊張による不整脈の出現も心不全を悪化させる重要な要因であるため、拘束ストレスにより不整脈を誘発するモデルの確立を行った。

C. 研究結果

サルカルメニンノックアウトマウスでは、加齢や強度の運動負荷をかけると筋小胞体機能低下が進行し、心機能が顕著に悪化することが判明した。さらにTACによる圧負荷をかけると一層、心機能は低下し、死亡率が上昇した。これらのマウスでは交感神経活性が亢進していた。以上のことから本モデルは、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であると考えられた。

$\alpha\beta$ クリスタリンの遺伝子変異型マウスはヒト拘束性心筋症様の病態を呈し、生後23週を過ぎることから急速に死亡した。死亡の原因を調べるために

持続的心電図検査を行ったところ、心筋内刺激伝導障害などの不整脈を頻回に認めた。また交感神経・迷走神経系の異常が認められ、自律神経機能異常があることがわかった。さらに筋小胞体機能が低下し、小胞体ストレスが認められた。以上のことから本モデルは、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であると考えられた。

次に、拘束ストレスにより交感神経緊張による不整脈の誘発をラットに対して行ったところ、心室性頻拍をはじめとする不整脈の出現頻度・重症度ともに増加した。交換神経活性を低下させるためにchewing（木を噛ませる）処置を施したラットでは有意に不整脈の出現頻度・重症度ともに低下した。以上のことから本モデルは、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であると考えられた。

E. 結論

サルカルメニンノックアウトマウス、 $\alpha\beta$ クリスタリンの遺伝子変異型マウスはヒトの心不全の病態に類似しており、交感神経系の活性亢進とそのシグナル伝達異常が認められた。また、筋小胞体機能の低下が認められた。また、拘束ストレスにより交感神経緊張による不整脈の誘発モデルラットは交換神経活性を低下させると有意に不整脈の出現頻度・重症度ともに低下した。以上のことからこれらのモデルは、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Koizumi S, **Minamisawa S**, Sasaguri K, Onozuka M, Sato S, Ono Y. Chewing reduces sympathetic nervous response to stress and prevents post-stress arrhythmias in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301(4):H1551-8, 2011.

Jiao Q, Takeshima H, Ishikawa Y, **Minamisawa S** (correspondence). Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* (in press) 2011.

1. 学会発表

Minamisawa S (シンポジスト). A comprehensive approach to understand the formation of the cardiovascular network (Overview). The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama) *J Physiol Sci*. 61(Suppl. 1):S25, 2011.

Jiao Q, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, **Minamisawa S**. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011.3.28-30, Yokohama) *J Physiol Sci*. 61(Suppl. 1):S200, 2011.

Jiao Q, Takeshima H, **Minamisawa S**. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decrease in SERCA2A expression and activity. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS). (2011.9.14. Taipei, Taiwan).

Jiao Q, Sanbe A, **Minamisawa S**. Overexpression of R120g $\alpha\beta$ -Crystallin Causes Cardiac Arrhythmias, Reduced Heart Rate Variability,

Alteration in the Expression Of Ca²⁺ Handling Proteins and Er Stress in Mice. The 85th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2011.11.16, Orlando, USA) *Circulation*. Oct. suppl. II; 2011 (Abstract)

Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, **Minamisawa S**, Sata M, Miyajima E, Ishikawa Y. Epac1 Deficiency Inhibit Neointima Formation After Vascular Injury in vivo The 85th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2011.11.16, Orlando, USA) *Circulation*. Oct. suppl. II; 2011 (Abstract)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
検討中

2. 実用新案登録
なし

3. その他

研究分担者 (田中 光)

厚生労働科学研究費補助金 (医療技術実用化総合 (臨床研究推進) 研究事業)

分担研究年度終了報告書

高齢者に向けた心不全治療薬の開発:細胞機能測定

研究分担者 田中 光 東邦大学薬学部教授

研究要旨

昨年に続き心臓の興奮収縮機構を脱分極、再分極、細胞内Ca²⁺制御の3つの観点から詳細に検討し、新たな治療薬開発への基盤を築くことを目的とした。本年度は特に遺伝子改変動物を用いた解析へとつなげる事を目指し、マウス心筋を中心に検討を行った。ペースメーカーの本質である緩徐脱分極機構に関しては、洞房結節の正所性自動能を支えるCa²⁺チャネルは動物種により異なり、T型Ca²⁺チャネル(Ca_v3.1)の寄与は体の小さい動物ほど大きいことが判明した。肺静脈心筋層の自動能に関しては、細胞内で高まったCa²⁺をNa⁺-Ca²⁺交換機構が細胞外にくみ出すことで生じる脱分極が引き金になっていることが判明した。マウスにおいても肺静脈心筋層が存在し、自律神経により影響される異所性自動能を有することが判明した。再分極に関しては、肺静脈心筋では再分極力が弱いことで高頻度電気刺激により撃発活動が誘発されやすいことや、アセチルコリン活性化K⁺チャネルの開口により自発活動を抑制できることを示した。細胞内Ca²⁺制御に関しては筋小胞体のポンプ(SERCA)について検討し、糖尿病マウス心筋では心室筋の拡張能が低下していること、それが主としてSERCA機能の低下に起因すること、SERCA活性化作用を有する薬物により拡張能が改善されることを見出した。以上のように、徐脈薬、抗不整脈薬の開発の出発点となる新たな治療標的蛋白質および治療薬開発の出発点となる化合物が見出されるとともに、心筋拡張不全の発症機序と治療薬に関連する知見が得られた。

A. 研究目的

近年、副交感神経興奮により誘発される心房細動や心室性不整脈による突然死など従来に

ないタイプの循環器系の障害が増加している。これらの循環器系疾患は働き盛りの成人のQOLを著しく損なうことから、有効な予防法・治療

法の確立が社会的急務である。これらの疾患が多発する機序として、社会環境の変化によるストレスが神経系を介してイオンチャネルやトランスポーターなどに悪影響を及ぼし、心臓の興奮収縮機構に異常を生じさせていると考えられる。このような現状をふまえ、本研究では心臓の興奮収縮機構を脱分極、再分極、細胞内Ca²⁺制御の3つの観点から詳細に検討し、心房細動や心不全に対する新たな治療戦略確立への基盤を築くことを目的とした。

B. 研究方法

1. 心室筋の収縮力の測定

マウスを頸椎脱臼させ、直ちに開胸、心臓を摘出した後、右心室遊離壁を短冊状に切り離して実験に用いた。またモルモットを頸部より放血致死後、開胸して直ちに心臓を摘出し、右心室乳頭筋を標本として測定を行った。標本の一端を、20 mlの栄養液 (NaCl 113.1, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 22, glucose 10 mM, pH 7.4、36-37 °C) を満たしたorgan bathの底のシリコンブロックに、電気刺激用の白金双極電極で固定し、他端を歪みトランスデューサー (TB-611T、日本光電) の先端に固定したステンレス製ピンで刺した。標本を水平に保持して、刺激装置 (DPS-07、ダイヤモンドカル) からのfield刺激 (持続時間3ms、閾値の約1.5倍の電圧) により1 Hzで駆動し、等尺性に収縮力を測定した。発生張力はトランスデューサーを介して歪応力用アンプ (AP-621G、日本光電) で増幅し、インク書きレコーダー (CP-600G、日本光電) に記録した。静止時張力は各標本で最大の張力を発生するように設定した。即ち、静止時張力の状態から徐々に標本を伸張してゆき、刺激によって発生する収縮の張力変化が

それ以上大きくならない状態に達するまで伸張を続けた。

2. 微小電極法による活動電位の測定

ウサギ、モルモット、マウスの右心房筋標本、およびモルモット、マウス肺静脈標本の活動電位の記録を行った。肺静脈標本は実体顕微鏡下で肺組織と丁寧に分離して作製した。標本を20 mlの栄養液に満たしたorgan bath底のシリコンブロック上にステンレス製ピンで水平に固定した。自動能を有していない標本は、刺激装置 (SEN-3201、日本光電)、アイソレーター (SS-302J、日本光電) から白金双極電極を用いて、1 Hz、幅3 msの短波長 (閾値の1.2倍の電圧) で駆動した。Organ bath中の栄養液の温度は36±0.5 °Cに保った。細胞内活動電位は定法に従い3 M KClで満たして細胞内に刺入したガラス微小電極 (GD-2、成茂科学) から導出し、高インピーダンス型アンプ (MEZ-8201、日本光電) で増幅後、陰極線オシロスコープ (VC-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ー (PC 9801 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 (+Vmax) 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Langend

Langendorff灌流法により心室筋細胞および肺静脈心筋細胞を単離した。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 *in situ* で大動脈内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离心筋細胞を得た。灌流液はすべて100% O₂で十分に通気し、35~36℃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. 細胞内カルシウム濃度の測定

4-1) 落射蛍光画像取り込み・解析システムを用いた細胞内カルシウム濃度の測定

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。マウス単离心室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。

4-2) 共焦点顕微鏡を用いた細胞内カルシウム動態の解析

モルモット単離肺静脈心筋細胞にアセトキシメチル体5 μM処置によりFluo-4を取り込ませ、LSM510 META (Carl Zeiss社) を用いて、細胞内Ca²⁺動態を画像化した。488 nmで細胞を励起し、505 nm以上の蛍光を検出した。スキャンスピードをline/960 μsecに設定して蛍光画像を取得し、長さ2 μmの領域を設定して蛍光強度の経時変化を解析した。

4-3) 細胞内カルシウム濃度のキャリブレーション法

それぞれの細胞において、*in situ*にて細胞内カルシウムのキャリブレーションを行った。測定終了後、細胞外液を10 mM EGTA、10 μ M ionomycin、5 μ M FCCP、5 μ M rotenoneを含んだCa²⁺ free溶液に変え、10~20分後のratio値をR_{min}とした。その後細胞外液を10 μ M ionomycin、5 μ M FCCP、5 μ M rotenoneを含んだ正常Tyrode液に交換し、1~2分後のratio値をR_{max}とした。細胞内Ca²⁺はこれら測定したR_{min}、R_{max}とカルシウム蛍光プローブのKd値 (indo-1; 250 nM) から以下の式で算出した。なお、F_{free}はCa²⁺非存在下での蛍光強度 (indo-1; 480 nmでの値)、F_{bound}は過剰 Ca²⁺存在下での蛍光強度(indo-1; 480 nmでの値) で算出した。

$$[Ca^{2+}] = Kd \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times F_{free} / F_{bound}$$

5. 肺静脈組織染色標本の作製

マウス肺静脈標本を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。その後標本をパラフィン包埋し、4 μ mの厚さで亜連続切片を作用し、スライドガラスに標本を貼り付けた。スライドガラス上の標本の筋組織と結合組織を染めるためにMasson-trichrome染色を行い、それに連続する標本は抗アクチン(α -SMA) モノクローナル抗体で染色し平滑筋の分布を調べた。

6. 統計処理

実験結果に示した値は、平均値±標準誤差で表した。また、有意差検定は、Student's unpaired t-test、t-test、 χ^2 検定、Fisherの正

確確立検定またはDunnettの多群検定を行った。

7. 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T型カルシウムチャネル(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ている。薬理的ツールとして用いているのがefonidipineである。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⁺チャン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。昨年度の本補助金による研究ではさらにefonidipineの光学異性体*R*(-)-efonidipine(1 μM)がT型カルシウムチャンネル(Ca_v1.3チャンネル)に対する選択的な遮断薬である事が明らかになり、これを用いて各種心筋自動能におけるT型カルシウムチャンネルの寄与を明らかにすることが可能となった。本年度は*R*(-)-efonidipineを用いて体の大きさの異なるウサギ、モルモット、マウスの3つの動物種の洞房結節自動能におけるT型カルシウムチャンネルの寄与を検討した結果を報告する。

マウス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)、*R*(-)-efonidipineは拍動数を有意に低下させた。*R*(-)-efonidipine(1 μM)投与前および30分後の拍動数はそれぞれ408 ± 14 および380 ± 17 (n=7)であった。この拍動数減少は緩徐脱分極相の傾き(slope)の有意な減少を伴っていた(図1a;表1)。マウスは右心房標本そのものや洞房結節領域が小さいため、ガラス微小電極刺入による標本の損傷が起きている懸念があったが、同様の拍動数減少は細胞外誘導法による測定下でも観察されたため、洞房結節細胞内への電極刺入によるartifactではないことが確認された。細胞外誘導法の下で*R*(-)-efonidipine(1 μM)投与前および30分後の拍動数はそれぞれ396 ± 20 および351 ± 17 (n=7)であった。モルモット洞房結節標本においても*R*(-)-efonidipineによる拍動数の低下がみられ、程度は

わずかであったが統計的に有意であった(図1b;表1)。*R*(-)-efonidipine(1 μM)投与前および30分後の拍動数はそれぞれ206 ± 10 および191 ± 9 (n=5)であった。この拍動数低下は、緩徐脱分極相のslopeの有意な減少を伴っていた。ウサギ洞房結節標本においては、*R*(-)-efonidipineは拍動数に影響を及ぼさなかった(図1c;表1)。*R*(-)-efonidipine(1 μM)投与前および30分後の拍動数はそれぞれ204 ± 12 および206 ± 12 (n=5)であった。マウス洞房結節の拍動数をカルバコールにより低下させた状態でも、*R*(-)-efonidipineは有意な拍動数減少作用を示した。カルバコール(0.3 μM)存在下で、*R*(-)-efonidipine(1 μM)投与前および後の拍動数はそれぞれ207 ± 16 および191 ± 18 (n=6)であった。

ウサギ、モルモット、マウスを含む実験動物種間での洞房結節の自発活動におけるT型カルシウムチャンネル電流の寄与を薬理的に検討した結果はこれまでも報告されているが、十分に選択性の高い遮断薬が存在しなかったため、信頼できる結論は得られていなかった。今回T型カルシウムチャンネルに対する選択性の高い遮断薬である*R*(-)-efonidipine(1 μM)を用いて検討した結果、マウスおよびモルモットにおいて、洞房結節活動電位の緩徐脱分極にT型カルシウムチャンネル電流による脱分極が寄与していることが明らかになった。

R(-)-efonidipineによる拍動数低下はマウスで最も顕著であり、モルモットでもわずかにみられたが、ウサギでは全くみられなかった。すなわち、体の小さい動物ほど心拍数が高く、T型カルシウムチャンネルの寄与が大きかった。一般にイオンチャンネル遮断薬の中には、脱分極状態でチャンネルに対する親和性が増大するも

のが多くみられる。従って、心拍数が高いということがR(-)-efonidipineのチャンネルに対する効力を高めている可能性も考えられた。しかし、カルバコールによってマウス心房標本の拍動数をウサギ並みに低下させてもR(-)-efonidipineによる拍動数低下はみられなかったことから、この可能性は否定され、T型カルシウムチャンネルの寄与が確かにマウスで大きいことが確認された。これまでに報告されている洞房結節細胞の膜電流測定の結果から求められるT型カルシウムチャンネルの電流密度は、マウスで10.4 pA/pFだが、ウサギではその約5分の1の2.1 pA/pFである。また、L型カルシウムチャンネル電流密度と比較した場合、マウスではT型カルシウムチャンネルの電流密度の方が大きく、モルモットでは同程度、ウサギではL型カルシウムチャンネルの方が大きいという知見もある。これらの知見も、我々の結果同様に、T型カルシウムチャンネルの歩調取りへの寄与が体の小さい動物ほど大きい事を示している。T型カルシウムチャンネルはL型カルシウムチャンネルよりも陰性の電位領域において開口し、主として緩徐脱分極相における脱分極成分として機能する。よってT型カルシウムチャンネル電流密度を大きくすることにより、活動電位の持続時間を増大させることなく発火の頻度を増大させることが出来る。従って、高い心拍数を有する小動物ほどT型カルシウムチャンネル電流密度が高いことは機能的にも理にかなっている。一方、犬やブタを含めた体の大きな動物ではT型カルシウムチャンネルの電流密度は小さいと報告されている。このことからヒトの洞房結節細胞においてもT型カルシウムチャンネルの電流密度は小さいと推測することは可能だが、実証されていない。また、仮に正常なヒトの洞房結節におけ

るT型カルシウムチャンネル電流密度が小さかったとしても、それが各種病態時に増大している可能性も考えられる。今後の研究によりこれらの事柄が明らかになり、T型カルシウムチャンネル遮断薬の薬物治療上の有用性が確立されることを期待する。

T型カルシウムチャンネルをコードする三種の遺伝子のうち、一般に α_{1c} および α_{1h} が心臓拍動に寄与するとされている。マウス洞房結節においては α_{1c} の発現が優勢であることが報告されているが、モルモットおよびウサギに関しては報告されていない。Efonidipineの遮断作用に関しては、R(-)-efonidipineの α_{1c} に対する IC_{50} 値0.9 μ M、efonidipineの α_{1h} に対する IC_{50} 値0.35 μ Mが報告されており、R(-)-efonidipineの α_{1c} および α_{1h} に対する遮断の効力はほぼ同程度である。従って、R(-)-efonidipineの拍動数減少作用の種差は、T型カルシウムチャンネル分子種 α_{1c} および α_{1h} の発現比率の差異によるものとは考えられない。これらの分子種間の選択性も含め、より選択性と効力の高い遮断薬が開発されれば、T型カルシウムチャンネルの機能に関する研究がさらに進展するはずである。Efonidipineのもう一方の光学異性体S(+)-efonidipineに関しては、昨年報告したように、L型カルシウムチャンネル($Ca_v1.2$)電流、L型カルシウムチャンネル($Ca_v1.3$)電流、T型カルシウムチャンネル($Ca_v3.1$)電流のすべてを濃度依存的に遮断した。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。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。 $Ca_v1.3$ 、 $Ca_v3.1$ チャンネルともに発現量は

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*R*(-)-efonidipineおよび*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。

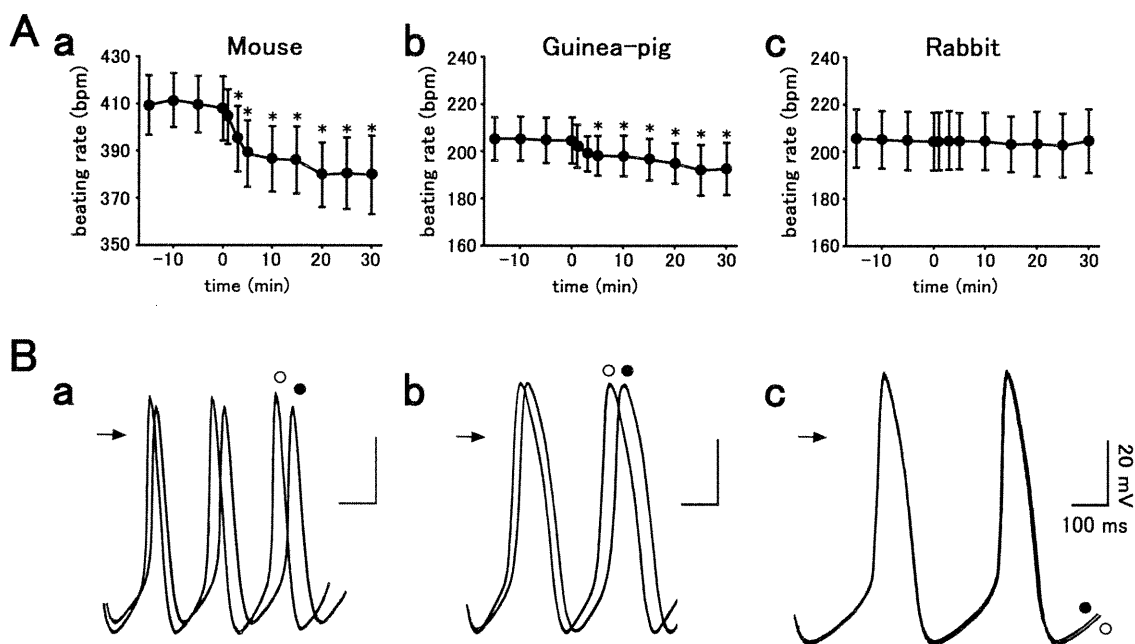


図1：心臓の歩調取りに対する*R*(-)-efonidipineの作用。A:マウス(a)、モルモット(b)およびウサギ(c)の摘出右心房標本の拍動数に対する1 μM *R*(-)-efonidipineの作用の時間経過。*は投与直前の値との統計的有意差を示す。B: *R*(-)-efonidipine (1 μM) 投与前(○)および投与30分後(●)のマウス(a)、モルモット(b)およびウサギ(c)の洞房結節活動電位波形の典型的トレース。矢印は0 mVを示す。ガラス微小電極法。

Action potential parameters before and after application of 10^{-6} M *R*(-)-efonidipine

	Mouse (n = 7)		Guinea pig (n = 5)		Rabbit (n = 6)	
	before	after	before	after	before	after
Cycle length (ms)	147.8 ± 4.4	169.8 ± 8.3*	294.4 ± 13.8	316.6 ± 14.9*	311.8 ± 19.4	309.9 ± 19.3
Maximum diastolic potential (mV)	-61.1 ± 2.7	-55.2 ± 3.2*	-62.9 ± 2.3	-57.9 ± 3.4	-59.6 ± 0.6	-56.6 ± 0.7
Slope (mV/s)	143.6 ± 11.4	112.9 ± 15.9*	120.0 ± 27.0	98.8 ± 24.5*	87.0 ± 10.2	85.0 ± 13.6
Threshold potential (mV)	-51.9 ± 2.7	-46.8 ± 2.7*	-51.6 ± 2.8	-49.1 ± 4.0	-47.9 ± 1.7	-45.0 ± 1.9
Maximum rate of rise (V/s)	26.7 ± 9.5	17.6 ± 5.8	9.6 ± 2.0	5.8 ± 2.3	11.3 ± 2.9	7.9 ± 1.4
Overshoot (mV)	12.4 ± 2.9	7.1 ± 3.8	19.2 ± 2.8	10.4 ± 3.3	21.4 ± 2.3	18.9 ± 2.0
Duration at 50% repolarization (ms)	31.6 ± 1.4	33.6 ± 1.8	96.0 ± 5.1	95.1 ± 7.1	86.5 ± 8.3	84.6 ± 9.2

表1：マウス、モルモットおよびウサギの洞房結節活動電位波形に対する*R*(-)-efonidipineの作用。*R*(-)-efonidipine 1 μ M投与前および投与30分後の値を示す。*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。

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 $-90\text{mV}\sim-65\text{mV}$ の電位領域で見られ、 Na^+ チャン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90%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維持には寄与せず、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ンネルやトランスポーターの検討を行ってきた。また、蛍光イメージング法も導入し、細胞内 Ca^{2+} の役割も含めて検討してきた。今回はモルモット肺静脈を用いて細胞内 Ca^{2+} が自発活動を惹起する仕組みを詳細に解析するとともに、マウス肺静脈についても検討を開始した。

モルモット単離肺静脈組織標本141本中116本では、心筋層にガラス微小電極を刺入して観測しただけでは自発活動はみられなかった。これらの標本を1 Hzで電気刺激すると活動電位が発生した。波形パラメーターは以下の通りであった。RP: $-71.4 \pm 1.9 \text{ mV}$, MDP: $-75.4 \pm 1.5 \text{ mV}$, OS: $30.9 \pm 1.5 \text{ mV}$, V_{max} : $135.6 \pm 15.5 \text{ V/s}$, APD_{20} : $16.7 \pm 2.0 \text{ ms}$, APD_{50} : $37.7 \pm 2.8 \text{ ms}$, APD_{90} : $92.9 \pm 1.2 \text{ ms}$ ($n=6$)。また明らかな緩徐脱分極相(第4相脱分極)がみられ、その傾きslopeは $9.5 \pm 2.0 \text{ mV/s}$ ($n=6$)であった。ただし、ガラス微小電極を刺入した細胞そのものが歩調取りを行っているとは限らない。 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害薬のSEA0400は活動電位持続時間(APD_{50} および APD_{90})を有意に短縮し、緩徐脱分極のslopeを減少させたが、他の活動電位パラメーターには影響しなかった。SEA0400($1 \mu\text{M}$)投与後の活動電位パラメーターは以下の通りであった。RP: $-70.5 \pm 1.6 \text{ mV}$, MDP: $-73.7 \pm 1.2 \text{ mV}$, OS: $30.7 \pm 1.6 \text{ mV}$, V_{max} : $128.3 \pm 15.8 \text{ V/s}$, APD_{20} : $15.3 \pm 1.8 \text{ ms}$, APD_{50} : $33.1 \pm 2.2 \text{ ms}$, APD_{90} : $87.6 \pm 2.1 \text{ ms}$, slope: $6.3 \pm 1.1 \text{ mV/s}$ ($n=6$)。

それ以外の25標本では自発的電気活動がみられた(17.7%; 図2A)。自発活動が30分以上持

続することを確認した後、薬物を投与し、さらに30分以上観測した。SEA0400 (1 μM) は自発的電気活動のcycle lengthを延長し、10分以内に活動を完全に停止させた(図2Aa, 表2)。SEA0400 は1 μM という濃度において心筋の $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交換機構を電流レベルで80%以上阻害する。その一方で、その他の心筋の主要なイオンチャンネルにほとんど影響しないことは確認済みであるが、 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交換機構の関与をさらに確実に示すために、低 Na^+ 灌流の影響を検討した。灌流液(細胞外液)の Na^+ 濃度を通常半分弱の70 mM とした低 Na^+ 灌流液により直ちに自発活動の発火頻度が有意に($p < 0.05$)低下し、通常の栄養液に戻すと直ちに回復した(図2Ac)。自発活動の頻度は通常の栄養液中では 1.2 ± 0.1 Hz、低 Na^+ 灌流液中では 0.6 ± 0.1 Hz ($n=6$)であった。

筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を阻害するryanodine (0.1 μM) はほとんどの標本で自発的電気活動を完全に停止させた(図2Ab, 表2)。

自発的電気活動を示さない標本にouabain (1 μM) を投与すると、まず静止膜電位の揺らぎが観測され、続いて反復的自発活動が誘発された(図2Ba)。あらかじめSEA0400 (1 μM) を処置しておくことにより、ouabainによる自発活動の誘発は濃度依存的に抑制された(図2Bb; 表3)。一部の標本ではSEA0400存在下でもouabainによる自発活動誘発がみられたが、その際の発火頻度はSEA0400非存在下の場合と比べて低かった(表3)。Ryanodine (0.1 μM) 存在下では、ouabainによる自発活動誘発はみられなかった(図2Bc; 表3)。

Inhibition by SEA0400 and ryanodine of the pulmonary vein spontaneous activity.

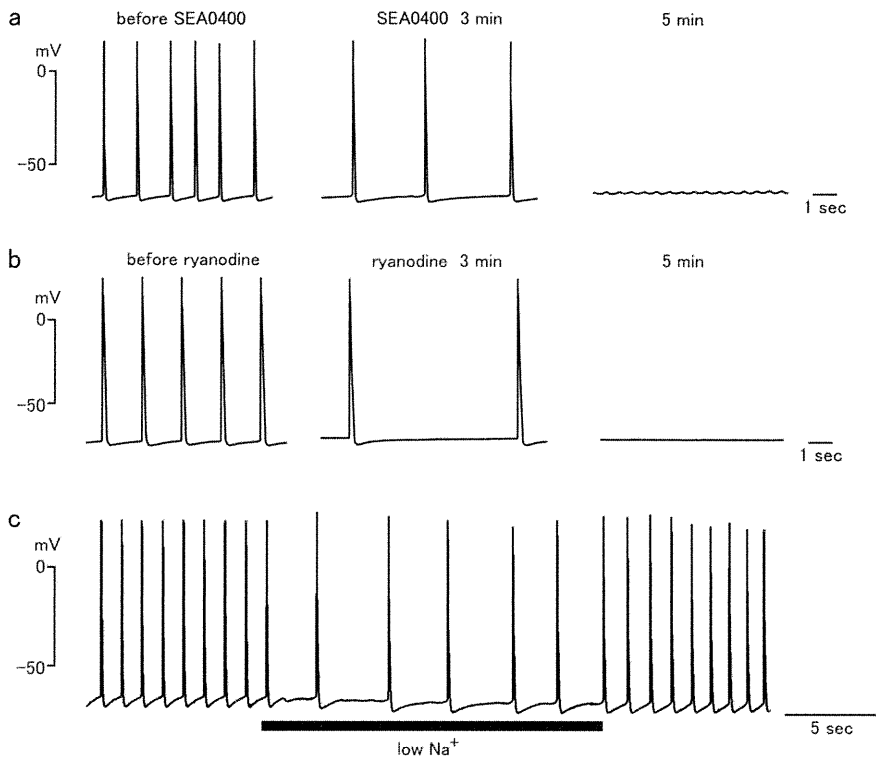
	Frequency (Hz)			Average of cessation time (min)	Cessation at 10 min (%)
	0 min	5 min	10 min		
control	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	—————	0/7 (0%)
SEA0400 (1 μM)	1.1 ± 0.5	0.6 ± 0.6	0 [†]	5.7 ± 1.5 min	6/6 (100%)*
ryanodine (0.1 μM)	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.2 [†]	0.2 [†]	6.2 ± 1.5 min	5/6 (83.3%)*

表2：モルモット肺静脈心筋の自発活動に対するSEA0400およびryanodineの効果。

自発活動を示すモルモット肺静脈心筋に対してSEA0400 (1 μM) またはryanodine (0.1 μM) を投与した際の発火頻度の変化、自発活動が停止するまでの時間、薬物投与後10分の時点での停止した標本の割合を示す。

*は薬物非処置群 (control) で自発活動が停止した標本の割合との、[†]は薬物処置前 (0分値) の頻度との統計的有意差 ($P < 0.05$) が有ることを示す。

A Pulmonary vein with spontaneous activity



B Pulmonary vein without spontaneous activity

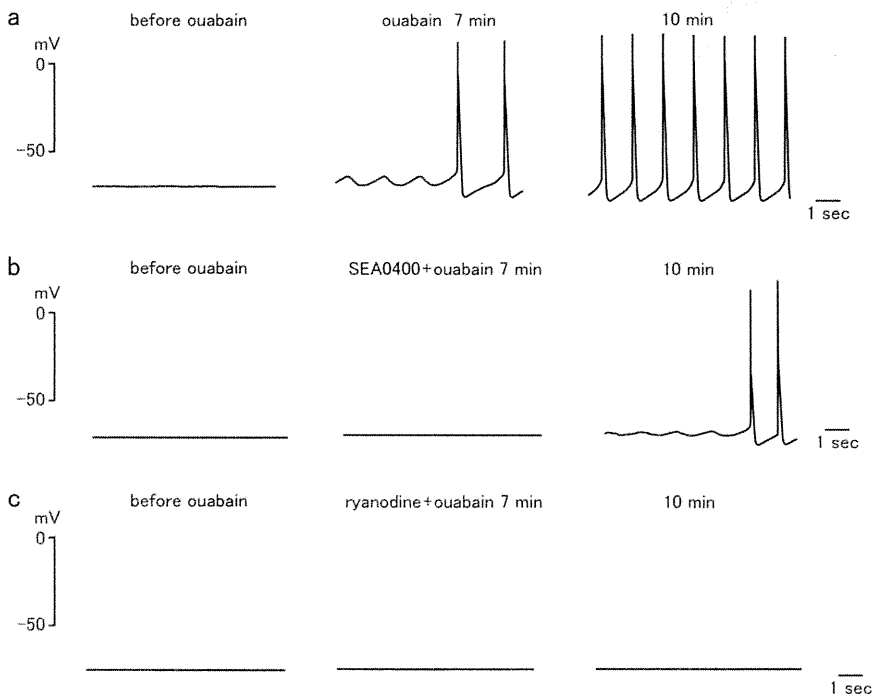


図 2 : モルモット肺静脈心筋の電氣的自発活動に対する薬物の効果。

A: もともと電氣的自発活動を示した標本に対する1 μM SEA0400 (a)、0.1 μM ryanodine (b)および低 Na^+ 灌流液(c)の処置を行った際の膜電位変化の典型的なトレース。B: もともと電氣的自発活動を示さ

なかった標本に対するouabainの効果の典型的膜電位トレース。Ouabain(1 μM)を、薬物処置無しの標本(a)、SEA0400(1 μM)前処置後の標本(b)、ryanodine (0.1 μM)前処置後の標本(c)にそれぞれ投与した。

Inhibition by SEA0400 and ryanodine of the ouabain -induced pulmonary vein electrical activity.

	Incidence at 30 min (%)	Latency (min)	Frequency at 15 min (Hz)
control	13/15 (86.7%)	7.0 \pm 0.9	4.8 \pm 0.4
SEA0400 (1 μM)	7/15 (46.7%)*	9.8 \pm 1.2	3.5 \pm 0.5
SEA0400 (10 μM)	2/11 (18.2%)*	13.1 \pm 3.1	0.2
ryanodine (0.1 μM)	0/7 (0%)*		

表3：モルモット肺静脈心筋におけるouabain誘発性電氣的自発活動に対する薬物の効果。Ouabain(1 μM)処置により活動電位が発生した標本の割合(incidence)、発生までの潜時(latency)および発火頻度(frequency)を、他の薬物非存在下(control)、SEA0400(1 μM および10 μM)存在下およびryanodine(0.1 μM)存在下に計測し集計した。*は薬物非処置群(control)との統計的有意差(P<0.05)が有ることを示す。

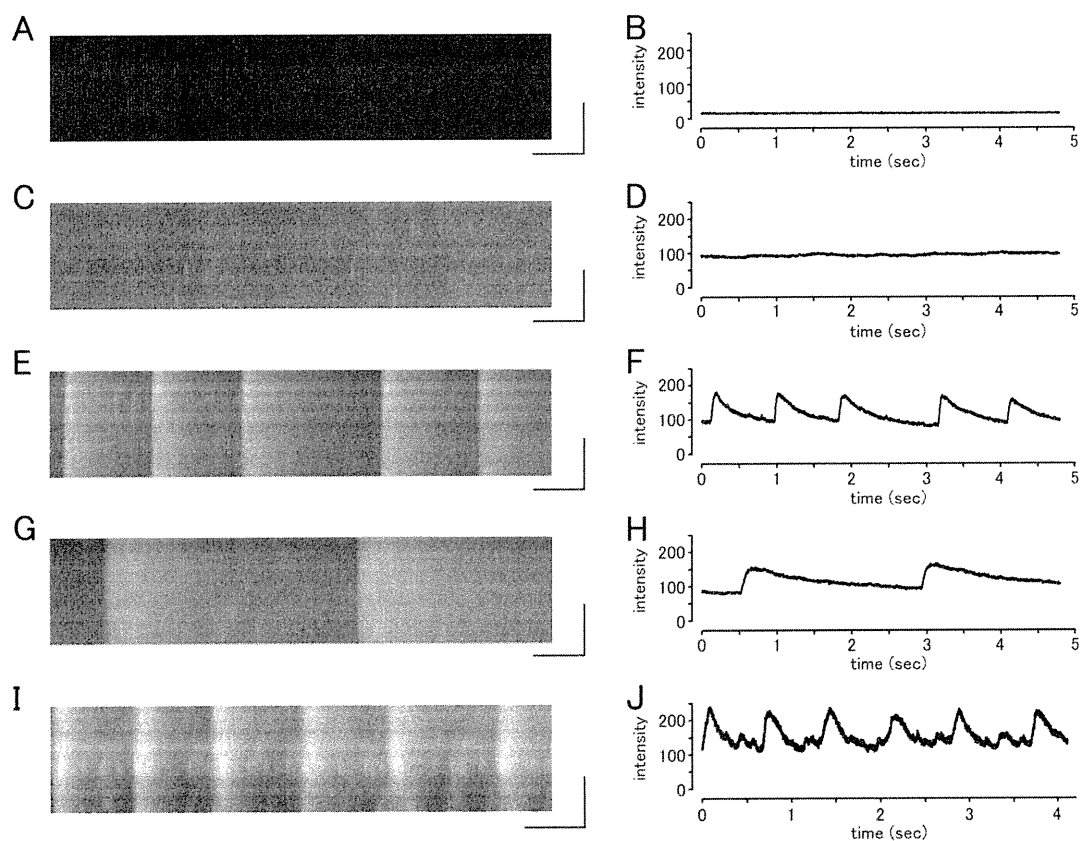


図3：モルモット肺静脈心筋細胞の細胞内Ca²⁺濃度変化に対する薬物の効果。共焦点顕微鏡のlin

e-scan modeで捉えたCa²⁺蛍光画像(A, C, E, G, I)および蛍光強度の経時変化(B, D, F, H, J)。

AおよびB: 薬物処置前、CおよびD: Ouabain(1 μM)処置によりbasal Ca²⁺濃度が上昇した時点、

EおよびF: Ouabain(1 μM)処置によりCa²⁺ transientが発生した時点、GおよびH: さらに

SEA0400(1 μM)を投与してCa²⁺ transient発生頻度の減少がみられた時点、IおよびJ: Ouabain(1 μM)処置によりCa²⁺ transientに先行するCa²⁺ sparkが観測された細胞。

OuabainやSEA0400の細胞内Ca²⁺に対する影響を確認するため、単離肺静脈心筋細胞にCa²⁺感受性蛍光プローブfluo-4を取り込ませ、共焦点顕微鏡のline-scan modeを用いて観測した(図3)。もともとCa²⁺濃度の変化が観測されない肺静脈心筋細胞(図3A, 3B)にouabain (1 μM)を投与すると、細胞質内のCa²⁺濃度が上昇し(図3C, 3D)、ouabain投与前の281.8 ± 60に達した(n=6)。やがて自発的電気活動を反映する細胞質全体での濃度の同時上昇であるCa²⁺ transientが観測された(図3E, 3F)。この状態でさらにSEA0400 (1 μM)を投与するとCa²⁺ transient (自発活動)の発生頻度の低下がみられ、やがて発生は完全に抑制されたが、その際にbasalの(弛緩期の) Ca²⁺濃度は変化しなかった(図3G, 3H)。SEA0400投与後のCa²⁺濃度(蛍光輝度)は投与前の10.8 ± 2.1であった(n=6)。OuabainによりCa²⁺ transientが誘発されるのに先立ち、局所的な小胞体からのCa²⁺放出であるCa²⁺ sparkが観測される細胞もみられた(図3I, 3J)。

モルモット肺静脈組織標本のうちで、電気的自発活動を示すものは特に処置を加えない状態では約18%であったが、ouabainにより自発活動が誘発される標本が多くみられた(87%)。Ouabain投与はNa⁺-K⁺ATPaseを阻害して細胞内にCa²⁺を負荷する処置として汎用されている。細胞内にCa²⁺を負荷すると細胞質内のCa²⁺濃度上昇や筋小胞体からの局所的なCa²⁺放出(Ca²⁺ sparkやCa²⁺ wave)が誘発される。このCa²⁺がNa⁺-Ca²⁺交換機構により細胞外にくみ出される際に生じる脱分極が緩徐脱分極に寄与し、膜電位がNa⁺チャネルやCa²⁺チャネルの閾値に達すると活動電位が惹起され、Ca²⁺ transientが発生する。今回、ouabainによって弛緩期のCa²⁺濃度が上昇してCa²⁺ sparkが誘発されたことや、SE

A0400やryanodine前処置がouabainによるCa²⁺ transient(自発活動)を抑制したことは、自発活動がこのような機序により発生していることの証拠である。SEA0400により再分極の加速(APD₅₀およびAPD₉₀の短縮)がみられたことや、SEA0400により緩徐脱分極のslopeが減少したことは、Na⁺-Ca²⁺交換機構によるCa²⁺の細胞外への汲み出しが再分極相から緩徐脱分極相にかけて起きていることを示す。

Ouabainは肺静脈心筋において1 μMの濃度で自発活動を誘発させた(図2B, 表3)。この濃度のouabainは心室筋や心房筋では自発活動を誘発しない。このことから肺静脈心筋は心室筋や心房筋とは異なり、自発活動を発生しやすい性質を有することが明らかになった。モルモット肺静脈心筋の静止膜電位は-71.4 mVであったが、これは我々が以前モルモットの心室筋で観測した-85 mVや心房筋で観測した-78 mVという静止膜電位の値よりも浅い(陰性度が小さい)。膜電流測定の結果、肺静脈心筋細胞では静止膜電位付近で外向き電流を生じるI_{K1}電流の電流密度が心房筋や心室筋に比べて小さい事が報告されている。肺静脈心筋細胞において、静止膜電位付近で流れるI_{K1}電流が少ないということは脱分極性の電流成分が出現したときにそれが自発活動を惹起し易い環境であることを意味する。我々は以前モルモット心室筋細胞において、ouabainによる自発活動誘発率をSEA0400が73%から46%に低下させることを報告した。今回肺静脈心筋で得られた結果もouabainによる自発活動誘発率をSEA0400が87%から47%に低下させるという心室筋と類似したものであった。このことから、肺静脈心筋でも心室筋でも、細胞内Ca²⁺濃度上昇がNa⁺-Ca²⁺交換機構を活性化して自発活動を誘発するという共通の図式

が潜在的に存在することを示している。このような機序は、静止膜電位を維持する力の弱い肺静脈心筋で顕在化しやすいと考えられる。

マウスは心拍数が毎分600と極めて高く、高頻度での反復興奮に適応するためかその活動電位は持続時間が数十ミリ秒と極めて短いものである。この最大の要因として、再分極電流を担う K^+ チャンネル分子種が他の動物で多く発現している遅延整流性 K^+ チャンネルの系統ではなく、活性化・不活性化が速い一過性外向き電流transient outward current (I_{to})であることが挙げられる。マウスは現状では遺伝子改変動物の作製が普及している唯一の動物種であり、病態モデルを用いた研究への展開を考えると、肺静脈自発活動の研究対象動物種にマウスも加えておくことの意義は大きい。そこで我々はこれまでモルモットやラットで行ってきたような研究をマウスについても開始した。

マウスの肺静脈は大きなものが3本存在した。右側には上下に2本(RSとRI)、左側には1本(L)である(図4A)。肺静脈血管壁にはモルモット、ラットなどの動物種と同様に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4Ba)。この筋肉層は α -smooth muscle actin抗体では染色されないことから心筋であることが明らかになった(図4Bb)。心筋層の厚みは30ミクロン程度、細胞は3層程度と、モルモット、ラットなどの小動物と比べても一段と薄いものであった。

マウス摘出肺静脈標本の心筋層に微小電極を刺入し、膜電位を計測した。マウス肺静脈の場合、心筋細胞層がわずか数層の細胞からなるためか、モルモット、ラットと比べて安定した電極刺入が困難であった。浅めの静止膜電位が観測されたが、今回は膜電位の絶対値ではなく、

電気活動の有無やそのパターンについて解析した。

マウス肺静脈標本、全84標本中の69標本で電気的自発活動が観測された。RIでの自発活動発生率は他の2本(RSとL)に比べて低いものであった(表4)。自発活動の電位波形には3つのパターンが見られた(図5)。第1のパターンはモルモットやウサギで見られたのと同様の単純な活動電位の反復である(図5A)。発火頻度は 1.31 ± 0.22 Hz (n=4)であった。第2のパターンは反復興奮が間欠的に起きるburst状のものである(図5B)。反復興奮の開始頻度は 0.05 ± 0.01 Hz、反復興奮時の発火頻度は 2.08 ± 0.19 Hz (n=5)であった。第3のパターンはひとつの活動電位の再分極が完了する前に次の脱分極が繰り返し発生する、いわゆるearly afterdepolarization: EAD状のものである(図5C)。活動電位の発生頻度は 0.02 ± 0.004 Hz、EAD様の脱分極の発生頻度は 4.07 ± 0.26 Hz (n=5)であった。自発活動を示さなかった肺静脈標本にno radrenaline ($1 \mu\text{M}$)を作用させると自発活動が見られた(図6)。上記の第1パターン、第2パターン、第3パターンの全てが見られた(図6A-C)。自発活動はpropranolol ($1 \mu\text{M}$)で抑制された(図6D)。

今回の検討により、マウスにおいても肺静脈心筋の電気的自発活動に関する研究を展開できることが明らかになった。ただし、マウスの肺静脈心筋層は極めて薄いため、標本の取扱いやガラス微小電極の刺入の際には細心の注意が必要であり、データの解釈の際にも時間controlを置くなど慎重な対応が求められる。マウス肺静脈心筋が自発活動を示す確率は約46%であり、おおよそモルモットとほぼ同程度であった。また自発活動の出現パターンには3種類