

外膜(d)の共焦点断面像。



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Mas-son trichrome染色から明らかになった(図3)。 $\alpha$ -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、外膜の順で捉えられた。心筋層は基本的には輪層筋方向に走行していたが、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 $\text{Ca}^{2+}$ 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)。 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーションの様式としては $\text{Ca}^{2+}$ トランジェント、 $\text{Ca}^{2+}$ ウェー

ブ、 $\text{Ca}^{2+}$ スパークの3者が見られた。 $\text{Ca}^{2+}$ トランジェントは細胞全体の $\text{Ca}^{2+}$ 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。 $\text{Ca}^{2+}$ ウェーブは細胞内局所での $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$  release (CICR) 機構に基づくことが判明している。 $\text{Ca}^{2+}$ スパークは細胞内の直径1  $\mu\text{m}$ 程度の微小領域で一過性に生じる $\text{Ca}^{2+}$ 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。 $\text{Ca}^{2+}$ ウェーブは心筋細胞の長軸に沿って移動するもの、細胞内の中心の周りを渦巻き状に旋回するもの、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)。

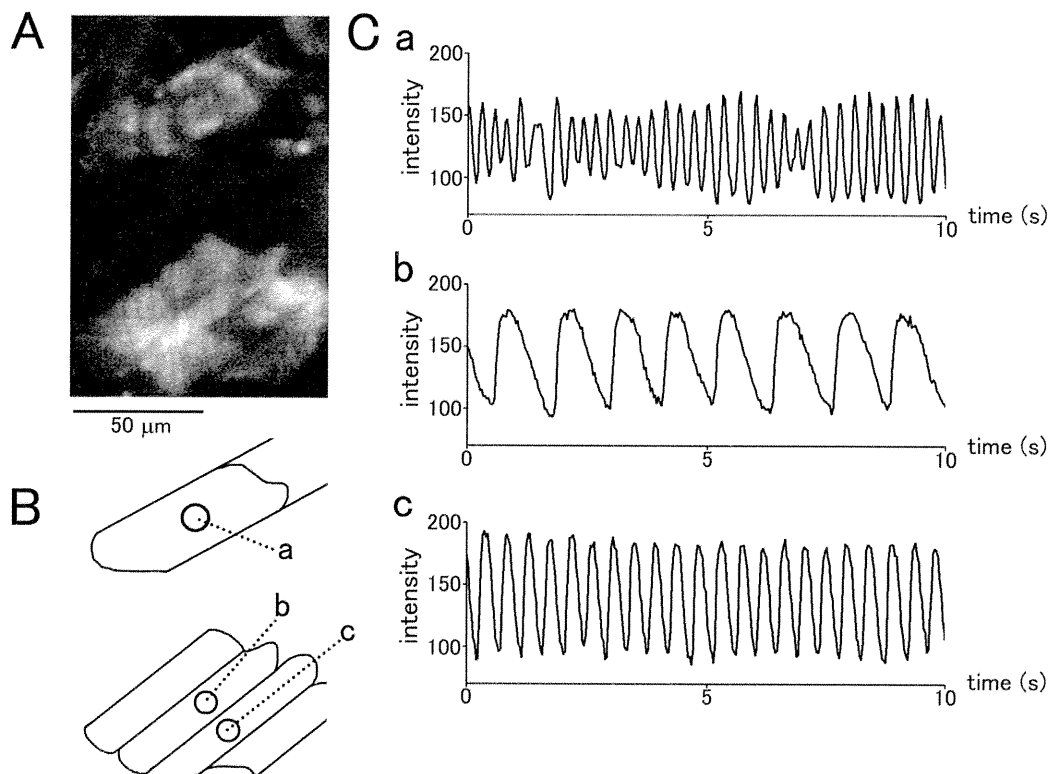


図4：肺静脈心筋層で観測された細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ オシレーション。  
A：Fluo-4をloadしたラット肺静脈心筋層の典型的蛍光像。

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。

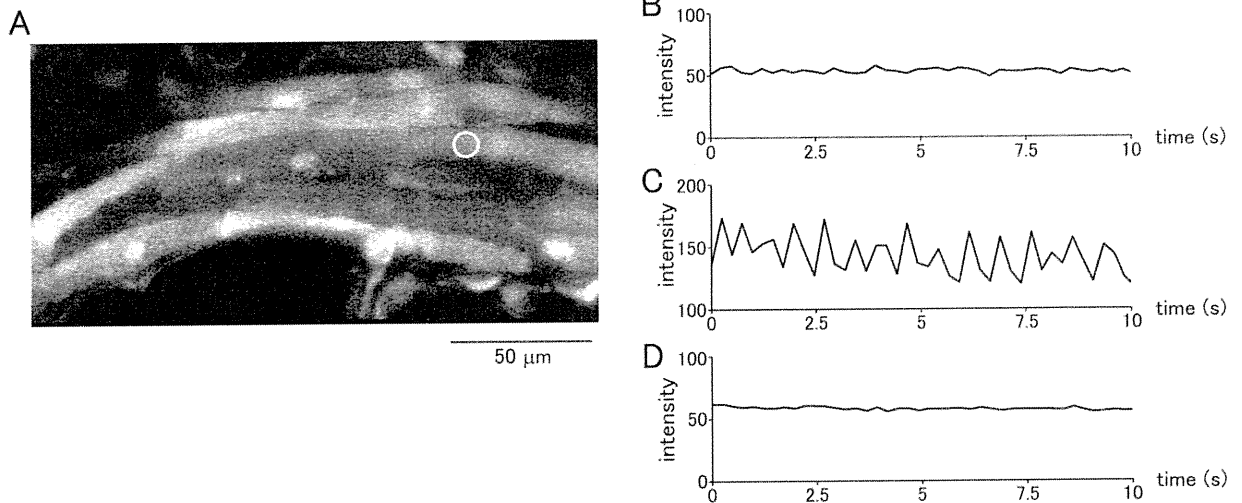


図5 : モルモット肺静脈心筋層でnoradrenaline処置後に観測された細胞内Ca<sup>2+</sup>オシレーション。

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 μM投与前(B)、投与5分後(C)、さらにryanodine 1 μM投与した5分後の蛍光強度の経時変化。

Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>濃度の高まりとともに、Ca<sup>2+</sup>オシレーションが発生したが、これに筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出を抑制するryanodineを投与すると完全に消失した(図5)。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6A;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。自発的な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 ± 12.3 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。

ラット肺静脈心筋では、80標本中で自発的な電

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、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(図6Ba)。静止膜電位はnoradrenaline投与前は-67.4 ± 1.7 mV、最も過分極した時点では-75.5 ± 1.1 mV、最終的には-60.5 ± 2.8 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(図6Bb;表3)。Noradrenaline投与からburst発生までのlatencyは397 ± 58.3 s、反復興奮の持続時間は53.7 ± 8.1 s、burstの間隔は68.8 ± 17.3 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、ryanodine 0.1 μMにより完全に抑制された(図7A)。抑制

までのlatencyは $4.9 \pm 0.3$  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 $4.0 \pm 0.5$  Hz、投与1分後は $4.3 \pm 0.5$  Hz、停止直前は $4.2 \pm 0.2$  Hzであった。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(図7B)。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存在下に残存した自発活動は、nifedipine投与により完全に抑制された(図7C)。

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 $Ca^{2+}$ 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 $Ca^{2+}$ 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、 $Ca^{2+}$ 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 $Na^+/Ca^{2+}$ 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 $Ca^{2+}$ が $Na^+/Ca^{2+}$ 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(図6)。一般に $\alpha$ アドレナリン受容体刺激は $Na^+/Ca^{2+}$ 交換機構の活性化や $K^+$ チャンネルの抑制を、 $\beta$ アドレナリン受容体刺激は $Ca^{2+}$ チャン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。

	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  $\mu$ 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。

	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  $\mu\text{M}$ )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。

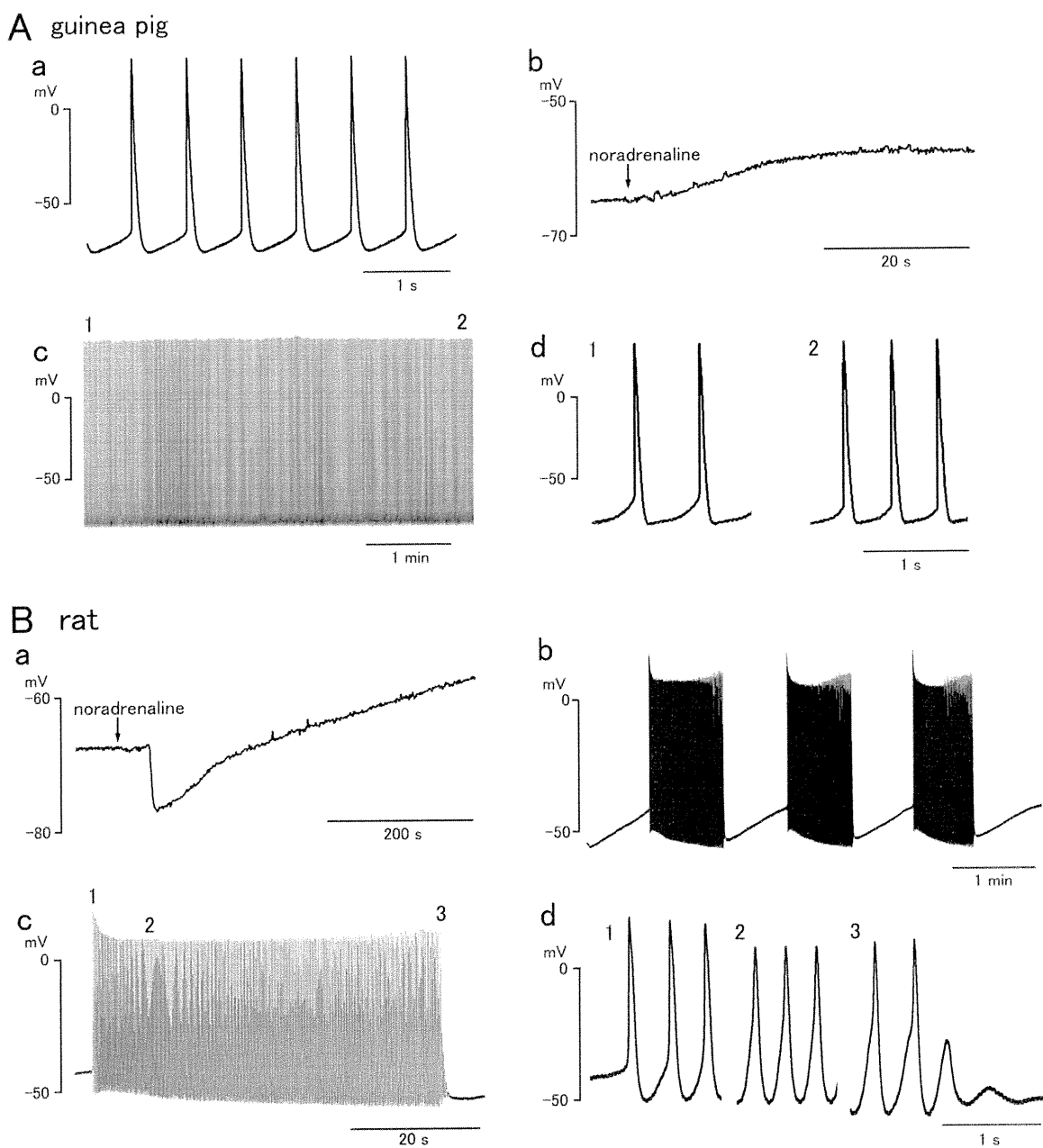


図6：モルモット(A)およびラット(B)肺静脈心筋自動能に対するnoradrenalineの作用。Aa:Noradrenaline非存在下で観測された電氣的自発活動。Ab:Noradrenaline 10  $\mu\text{M}$ による静止膜電位の変化。Ac:Noradrenaline 10  $\mu\text{M}$ により誘発された電氣的自発活動。Ad:Acの時間1および2における活動電位波形。Ba:Noradrenaline 10  $\mu\text{M}$ による静止膜電位の変化。Bb: Noradrenaline 10  $\mu\text{M}$ により誘発されたburst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。

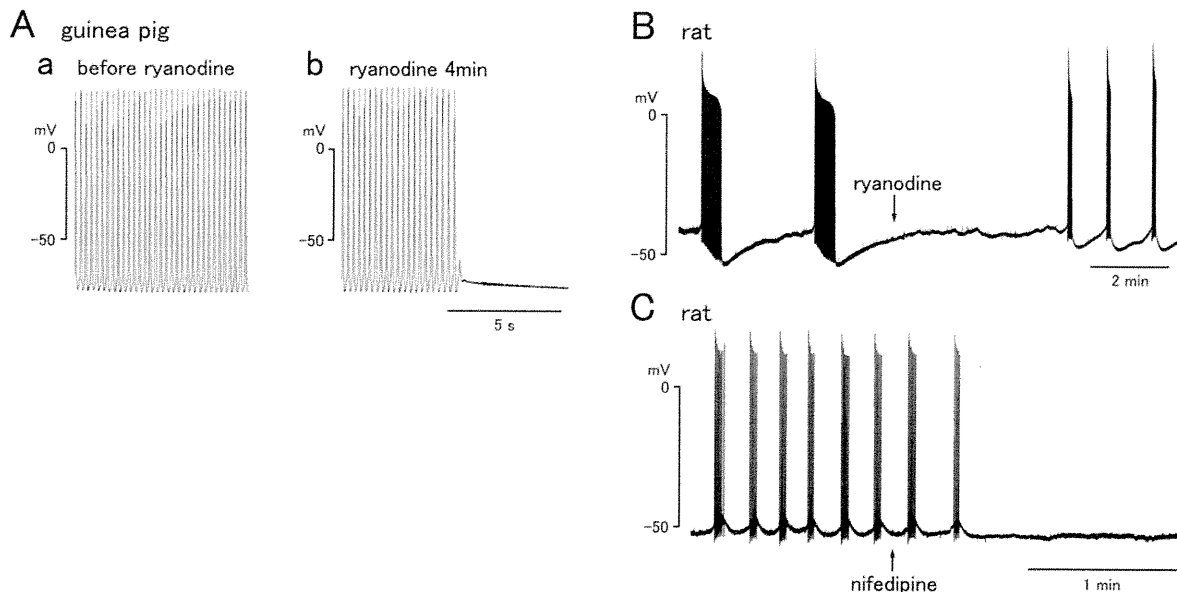


図7：Noradrenaline(10  $\mu\text{M}$ )で誘発されたモルモット(A)およびラット(B)肺静脈心筋の電氣的自発活動に対するryanodineの作用。A:Ryanodine(1  $\mu\text{M}$ )投与前(a)および4分後(b)の電氣的自発活動。B:Ryanodine(1  $\mu\text{M}$ )による自発活動の変化。C:Ryanodine(1  $\mu\text{M}$ )存在下の自発活動に対するnifedipine(1  $\mu\text{M}$ )の作用。

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 $\text{K}^+$ 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 $\text{K}^+$ 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 ( $I_{\text{to}}$ )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。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。この筋肉層は $\alpha$ -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。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標本で電氣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。自発活動の電位波形には3つのパターンが見られた(図8)。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8A)。発火頻度は  $1.31 \pm 0.22$  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8B)。反復興奮の開始頻度は  $0.05 \pm 0.01$  Hz、反復興奮時の発火頻度は  $2.08 \pm 0.19$  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様のものである(図8C)。活動電位の発生頻度は  $0.02 \pm 0.004$  Hz、EAD様の脱分極の発生頻度は  $4.07 \pm 0.26$  Hz (n=5) であった。自発活動を示さなかった肺静脈標本にnora-drenaline (1  $\mu$ M) を作用させると自発活動が見られた(図9)。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9A-C)。自発活動はpropranolol (1  $\mu$ M) で抑制された(図9D)。

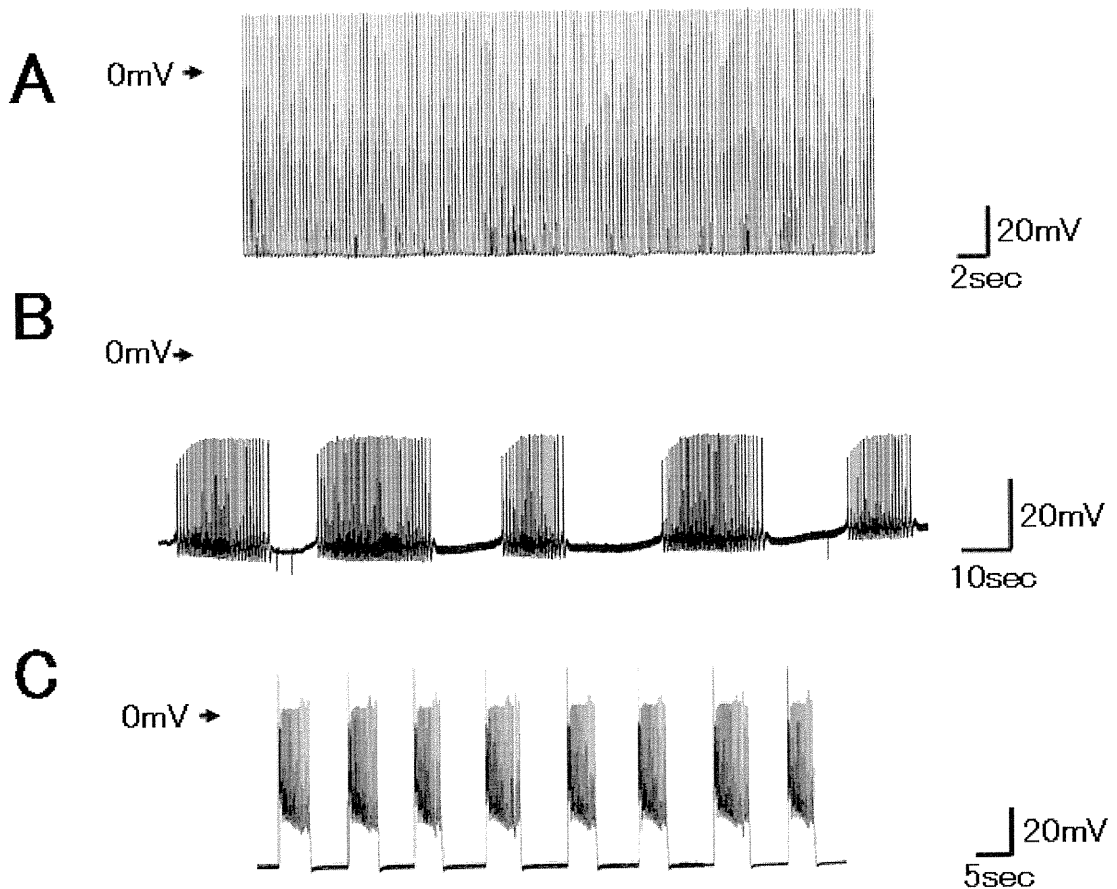


図8：マウス肺静脈心筋層で観測された自発的電気活動。

A：第1のパターンである反復興奮型、B：第2のパターンであるburst型。C：第3のパターンであるEAD様の波形。

今回の検討により、マウスにおいても肺静脈心筋の電氣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の出現確率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種類見られた。第2のパターンすなわちburst状の波形はラット肺静脈心筋においても観測されたものと共通している(図6B;8B)。ラットとマウスに共通する要因として、心筋の再分極電流を担うK<sup>+</sup>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<sup>+</sup>

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<sub>to</sub>)であることが挙げられる。推測ではあるが、一過性外向き電流が速い再分極を起こした後に不活性化し、その時点で未だNa<sup>+</sup>チャンネルやCa<sup>2+</sup>チャンネルを通る内向き電流成分が完全に不活性化していなければ、直ちに次の脱分極を生じる可能性が考えられる。マウスでは一過性外向き電流の挙動がラットよりもさらに速く、再分極の半ばで不活性化が進行して減弱するため、EAD様の第3のパターンが現れるのとも考えられる。これらの点を明らかにするためには、膜電位固定法を用いた電流成分の詳細な解析や、computer simulationを用いた総合的解析などが必要であろう。



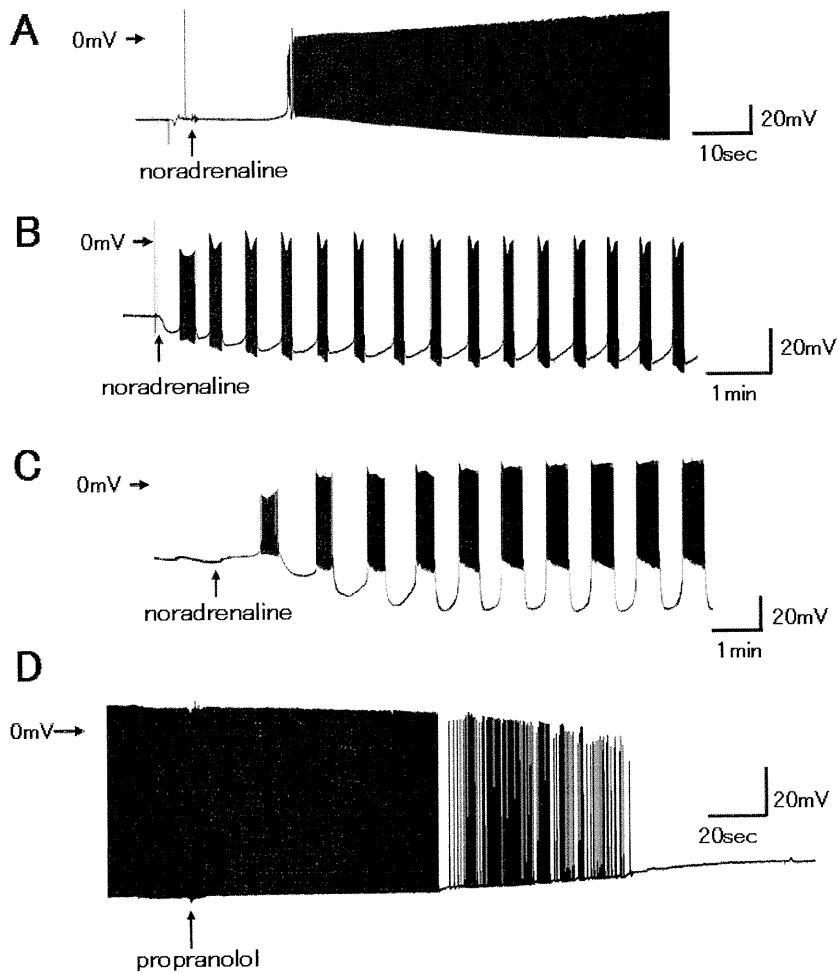


図9：マウス肺静脈心筋層でnoradrenalineにより誘発された電氣的自発活動。  
 A：第1のパターンである反復興奮型、B：第2のパターンであるburst型、C：第3のパターンであるEAD様の波形がnoradrenaline (1  $\mu$ M)でそれぞれ誘発された。  
 D：noradrenaline (1  $\mu$ M)で誘発された自発活動はpropranolol (1  $\mu$ M)によって抑制された。

## 2. 心筋の再分極機構に関する研究

### 2-1 肺静脈心筋の撃発活動と再分極力

肺静脈心筋は自発活動を生じやすい性質を有することが明らかになりつつあるが、その要因として再分極力の弱さが挙げられる。そこで、不整脈の誘因のひとつである撃発活動 (triggered activity : TA) に注目し、肺静脈におけるTAの誘発され易さと再分極力の関係を検討した。TAは興奮頻度の上昇により誘発される異所性自動能の発生機序のひとつと考えられている。心室筋にCa<sup>2+</sup>を負荷させるようなジギタリス、低K<sup>+</sup>/高Ca<sup>2+</sup>細胞外液などの処置を施すと、細胞内Ca<sup>2+</sup>量が増大し、再分極の直後に筋小胞

体からのCa<sup>2+</sup>放出が起こり、これが一過性の遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization : DAD) を誘発する。このDADが閾値に達した際に惹起される活動電位がTAであると考えられている。

モルモット肺静脈心筋に高頻度電気刺激(100ms間隔で100連発)を加えると、45標本中の43標本でDADやTAが観測された(図10Aa)。同じ刺激を心房筋に加えた場合はDADやTAは誘発されなかった(図10Ab)。肺静脈心筋で見られたTAは、pilsicainide (10 μM)、verapamil (1 μM)またはryanodine (0.1 μM)の存在により著明に抑制された(図10B)。

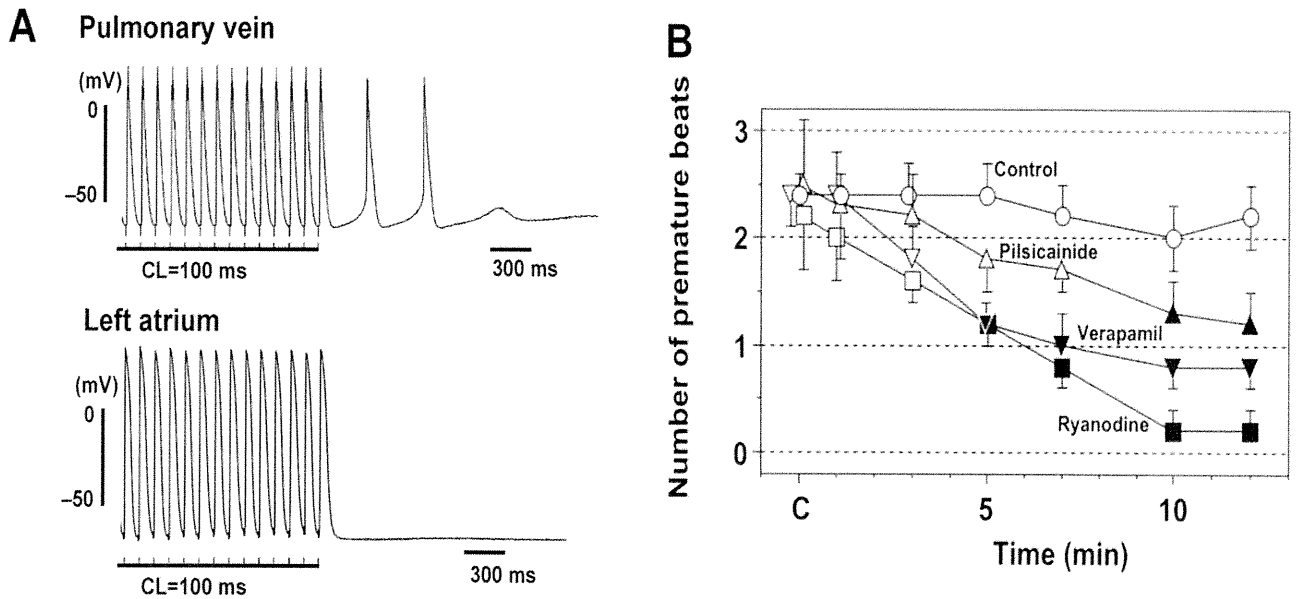


図10：モルモット肺静脈心筋層で観測された撃発活動(triggered activity : TA)。

A：肺静脈心筋(a)および心房筋(b)に高頻度刺激を与えた際の膜電位変化の典型的なトレース。

B：肺静脈心筋で誘発されるTAに対するpilsicainide (10 μM)、verapamil (1 μM)、ryanodine (0.1 μM)の影響。

Muscarine受容体を刺激してacetylcholine活性化K<sup>+</sup>チャネルを開口させるcarbachol (0.3 μM)により、肺静脈心筋のDADおよびTAの発生が完全に抑制された(図11)。心房筋および肺静脈心筋を1 Hzの電気刺激により駆動して活動電位を発生させ、carbachol (0.3 μM)の影響を検討した(表4)。心房筋ではcarbacholにより活

動電位持続時間の短縮がみられたが、静止膜電位は影響されなかった。一方、肺静脈心筋においては、活動電位持続時間の短縮とともに、静止膜電位の陰性電位側(過分極側)への移動がみられた。すなわち、もともと心房筋に比べて浅かった肺静脈心筋の静止膜電位が、carbacholにより心房筋の値に近づいた。

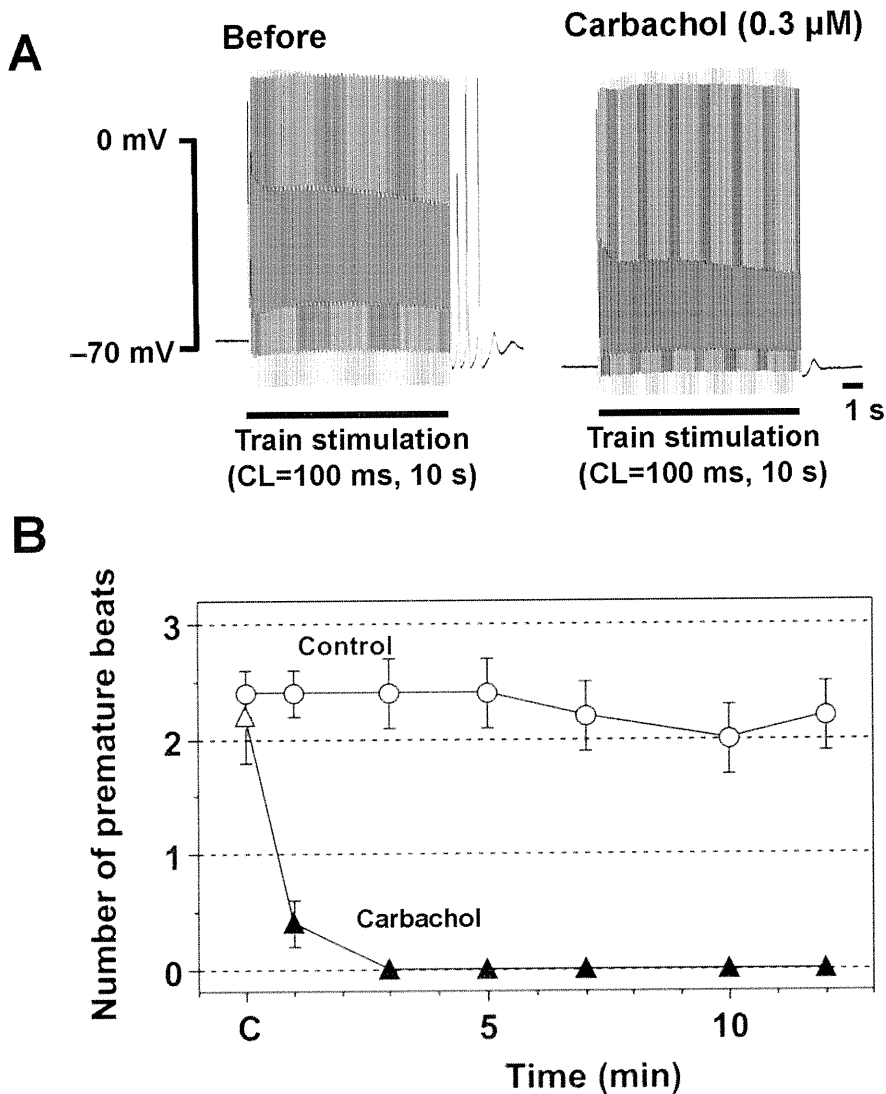


図11：モルモット肺静脈心筋層で観測された撃発活動に対するcarbacholの効果。  
A: Carbachol (0.3 μM)投与前(a)および後(b)に高頻度刺激を与えた際の膜電位変化の典型的なトレース。B: 肺静脈心筋で誘発されるTAに対するcarbachol (0.3 μM)の影響。値は5例の平均値と標準誤差を示す。

Effects of carbachol (0.3  $\mu$ M) on the action potential parameters of the pulmonary vein and left atrium

	Pulmonary vein		Left atrium	
	Before	Carbachol	Before	Carbachol
RP (mV)	-70.3 $\pm$ 1.0	-75.4 $\pm$ 0.9*	-80.6 $\pm$ 1.1	-80.0 $\pm$ 0.6
OS (mV)	27.9 $\pm$ 2.3	26.4 $\pm$ 1.4	27.1 $\pm$ 0.8	18.2 $\pm$ 1.4*
APD <sub>20</sub> (ms)	13.2 $\pm$ 0.6	9.8 $\pm$ 0.5*	23.3 $\pm$ 1.2	12.7 $\pm$ 0.8*
APD <sub>50</sub> (ms)	28.0 $\pm$ 1.9	18.9 $\pm$ 1.1*	40.7 $\pm$ 1.6	21.3 $\pm$ 1.1*
APD <sub>90</sub> (ms)	75.5 $\pm$ 2.5	57.6 $\pm$ 3.5*	76.1 $\pm$ 2.7	45.5 $\pm$ 1.9*

Data are means  $\pm$  S.E.M. of 5 experiments. The preparations were electrically driven at 1 Hz. Resting potential (RP); overshoot (OS); action potential duration at 20% (APD<sub>20</sub>), 50% (APD<sub>50</sub>), and 90% (APD<sub>90</sub>) repolarization.

\* $P < 0.05$ , compared with the corresponding control values (Before).

表4：モルモット摘出心房筋および肺静脈心筋の活動電位パラメーターに対するcarbacholの影響。値は5例の平均値と標準誤差を示す。

今回の検討により、肺静脈心筋では心房筋に比べて高頻度刺激によりTAやDADが発生しやすいことが明らかになった。さらに、TAやDADの誘発され易さは、再分極力を増大させるcarbachol投与により解消することが明らかになった。TAやDADの主な誘因とされている細胞質内の異常なCa<sup>2+</sup>の動き (Ca<sup>2+</sup> sparkやCa<sup>2+</sup> transient) は肺静脈心筋のみならず、心房筋や心室筋でも誘発されることが知られている。従って、肺静脈心筋でTAやDADが誘発されやすい原因は細胞内Ca<sup>2+</sup>動態の特徴ではなく、主として細胞膜レベルの再分極力の弱さによるものであると考えられる。今回carbacholは肺静脈心筋のTAやDADを抑制したが、この方法すなわちacetylcholine活性化K<sup>+</sup>チャネルの開口により肺静脈心筋の自発活動を抑制し、心房細動を抑制できるか否かは未だ明らかではない。Carbacholは心房筋の活動電位を著明に短縮させており、心房筋不応期に対しても短縮効果を発揮する可能性がある。その場合には心房筋内の興奮リエントリーを助長して心房細動を悪化させてしまう可能性も充分考えなければいけない。

2-2 マウス肺静脈心筋の自発活動に対するacetylcholineの影響

肺静脈心筋は自発活動を生じやすい性質を有しており、これが再分極力の弱さに起因することがモルモットなどを用いた検討により明らかになってきた。そこで、この図式がマウス肺静脈心筋についても成立するか否かを検討した。

Acetylcholine (0.3  $\mu$ M) は静止膜電位を陰性電位方向 (過分極方向) に移動させ、この作用はatropine (0.1  $\mu$ M) により解除された (図12A)。Noradrenaline (1  $\mu$ M) により誘発した自発活動に対して、acetylcholine (0.3  $\mu$ M) は停止効果を示した (図12B)。この停止効果はatropine (0.1  $\mu$ M) により解除され、自発活動が復活した。この際、atropine投与後の自発活動の頻度は、同一標本でacetylcholine投与直前にみられた発火頻度を上回る傾向が見られた。Noradrenaline (1  $\mu$ M) により誘発した自発活動に対する停止効果はadenosine (10  $\mu$ M) でもみられた (図12C)。

Acetylcholineにより静止膜電位の陰性電位方向への移動がみられたことは、マウス肺静脈心筋においても、再分極を生じ、静止膜電位を維持する力が弱いことを示している。Noradrenalineにより誘発された電氣的自発活動がacetylcholineにより停止したことから、肺静脈心筋の再分極力の弱さが自発活動を許容していることが明らかになった。Acetylcholine活性化K<sup>+</sup>チャネルを開口させるadenosineによっても同様の停止効果が得られたこともこれを支持している。ただし、ここで注目すべきなのが、atropine投与後に自発活動が復活した際に、そ

の発火頻度が

acetylcholine投与前よりも高まっていることである。この結果は、acetylcholineは必ず自発活動抑制に働くとは断定できず、場合によっては自発活動を促進する可能性を示唆している。生体内の肺静脈は自律神経支配に富んでおり、交感神経および副交感神経の両方の活動が活発であり、その緊張度は時々刻々と変化している。交感神経の緊張の下で副交感神経の緊張が増減する様な状況下では、肺静脈心筋の自発活動が顕在化し、心房細動が誘発されるというような図式も考えられる。

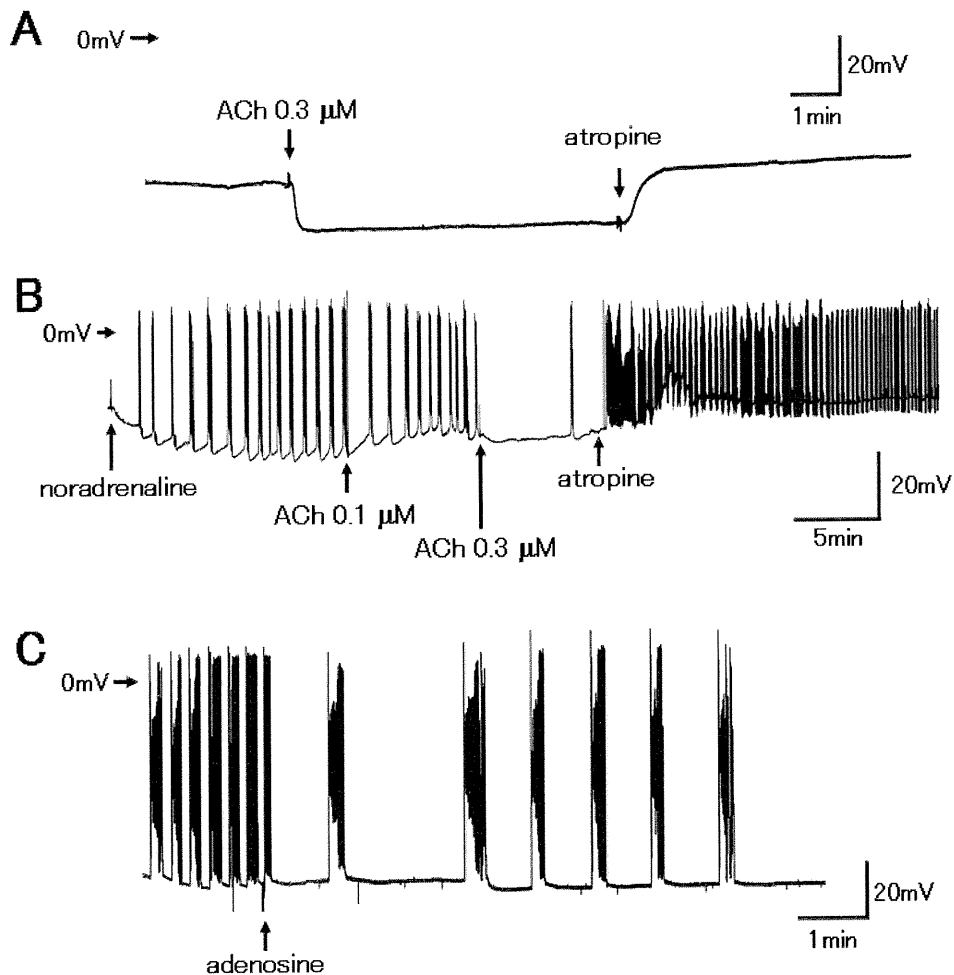


図12：マウス肺静脈心筋層で観測された自発的電気活動に対するacetylcholine等の影響。  
 A：自発活動を示さない標本に対するacetylcholine(0.3 μM)およびatropine(0.1 μM)の効果、  
 B：Noradrenaline(1 μM)により誘発した自発活動に対するacetylcholine(0.1-0.3 μM) およびatropine(0.1 μM)の効果、C：Noradrenaline(1 μM)により誘発した自発活動に対するadenosine(1

0 μM)の効果。

### 3. 心筋細胞内Ca<sup>2+</sup>制御機構に関する研究

心不全は心臓が全身の需要を十分満たすだけの血液を循環させられなくなった状態である。心拍出量を増大させる目的で、従来よりdigitalisやβ-agonistなど心筋の収縮性を高める強心薬が用いられてきた。これらの薬物には催不整脈性という問題があり、また長期的には心臓を酷使することによりむしろ心不全を悪化させる場合が多いことも判ってきた。一方、近年心臓の収縮能よりもむしろ拡張能に異常のある心不全、いわゆる拡張機能不全が注目されている。心筋の拡張能が低下することにより心拍出量が低下する心不全であり、心筋の弛緩機能低下が主な原因と考えられているが、その詳細は未だ研究途上にある。心筋の弛緩能に影響する要因のひとつが細胞内Ca<sup>2+</sup>動態である。心筋収縮に使われたCa<sup>2+</sup>が筋小胞体内に再び取り込まれることで心筋が弛緩するが、この取り込みを行う筋小胞体のCa<sup>2+</sup>ポンプ (SERCA) の機能が低下するとCa<sup>2+</sup>濃度の低下が遅れ、心筋の弛緩も遅れると考えられる。これが正しければ、SERCA機能を増大させる薬物により心筋の弛緩機能を改善できるはずである。そこで我々は糖

尿病性心筋傷害に注目し、心筋に弛緩不全がみられることを確認した。次にSERCA機能を増大させる化合物を探索した結果、ellagic acidおよびgingerolの2つの化合物に到達した。

マウスにstreptozotocin (STZ)を投与すると、血糖値の上昇が観測され、糖尿病を発症していることが確認されたが、その際に心重量/体重比の増大もみられた(表5)。摘出右心室筋標本の収縮力測定によって、STZ群では心収縮力の顕著な低下や、拡張能の指標である心筋の弛緩に必要な時間time for 90% relaxation (TR<sub>90</sub>)が有意に延長していた(図13A;表6)。心室筋細胞を単離し、電気刺激(1 Hz)によりCa<sup>2+</sup> transient発生させ、Ca<sup>2+</sup>動態を両群で比較した(図13B;表7)。STZ群ではbasalのCa<sup>2+</sup>濃度が有意に上昇しており、Ca<sup>2+</sup> transientのamplitudeが有意に減少していた。Ca<sup>2+</sup>濃度がpeakの半分にまで減衰するのに必要な時間t<sub>1/2</sub>や減衰の時定数τはSTZ群で有意に延長していた。

SERCA阻害薬のcyclopiazonic acid (CPA;10 μM)によりnormal群、STZ群ともにTR<sub>90</sub>が延長したが、延長の程度はnormal群で有意に大きかった(図14A;表8)。

	Normal mice	Diabetic mice
Serum glucose levels (mg/dl)		
Fasted-condition	105.0 ± 2.6	387.3 ± 47.2*
Non- fasted condition	135.4 ± 8.9	774.5 ± 14.5*
Body weight (g)	44.2 ± 0.8	27.9 ± 1.2*
Heart weight (mg)	189.8 ± 3.4	151.1 ± 4.1*
Heart weight /Boby weight (mg/g)	4.30 ± 0.1	5.49 ± 0.4*

表5 : Streptozotocin投与の血糖値、心重量、体重に対する影響。

正常マウスおよびstreptozotocin単回投与(200mg/kg, ip)の後4~6週間で糖尿病を発症したマウス(diabetic mouse)各5例より得られた平均値と標準誤差を示す。Streptozotocin 投与により、血糖値上昇、

心重量/体重比の増大が起きている。\*は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

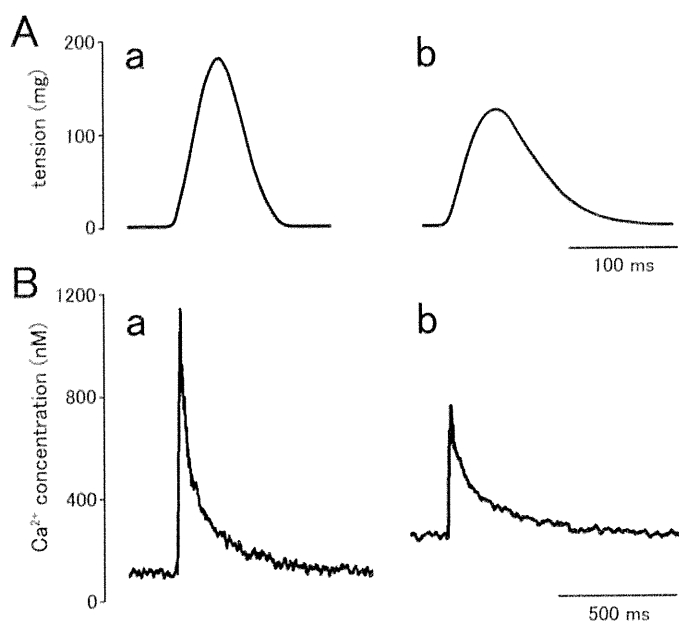


図13：糖尿病による心筋拡張機能の低下。

正常マウス(a)および糖尿病マウス(b)の収縮波形(A)およびCa<sup>2+</sup>transient波形(B)。糖尿病マウスでは収縮およびCa<sup>2+</sup>transientのamplitudeが減少しており、収縮力およびCa<sup>2+</sup>濃度の減少速度は低下している。

	Normal	Diabetic
contractile force (mg/mm <sup>2</sup> )	11.11 ± 0.34	10.01 ± 0.24*
TTP (msec)	49.17 ± 1.03	55.04 ± 1.87*
TR <sub>90</sub> (msec)	54.07 ± 1.17	77.00 ± 2.19*

表6：糖尿病マウスにおける弛緩機能の低下

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける心収縮力、収縮弛緩パラメーター。糖尿病マウスで収縮力および弛緩機能の低下が起きている。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。TTP: Time to peak tension、TR<sub>90</sub>: time for 90% relaxation。

	Normal	Diabetic
Basal (nM)	135.0 ± 6.0	228.2 ± 9.4*
Peak (nM)	1144 ± 30.0	774.9 ± 19.8*
Amplitude (nM)	1009 ± 33.5	546.7 ± 18.0*
T <sub>1/2</sub> (ms)	61.3 ± 2.6	105.2 ± 2.4*
τ (ms)	88.4 ± 3.7	151.7 ± 3.5*

表7：正常マウスと糖尿病マウスCa<sup>2+</sup>動態の比較

正常マウスおよび糖尿病マウスにおけるCa<sup>2+</sup>動態パラメーター。糖尿病マウスではCa<sup>2+</sup>transientの全パラメーターが低下している。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*は正常マウスの値と統計的有意差(P < 0.05)があることを示す。



CPAによりnormal群、STZ群ともにCa<sup>2+</sup> transientが延長し、t<sub>1/2</sub>やτが増大したが、それらの程度はnormal群で有意に大きかった(図14B;表9)。CPAにより収縮およびCa<sup>2+</sup> transientのamplitudeに減少がみられ、それらの程度はnormal群で有意に大きかった。

Ellagic acid(10 μM)によりnormal群、STZ群ともにTR<sub>90</sub>が短縮したが、短縮の程度はSTZ群で有意に大きかった(図15A;表10)。Ellagic

acidによりnormal群、STZ群ともにCa<sup>2+</sup> transient後半でのCa<sup>2+</sup>濃度の低下が加速され、t<sub>1/2</sub>やτが減少したが、それらの程度はSTZ群で有意に大きかった(図15B;表11)。Ellagic acidはnormal群、STZ群ともに収縮力やCa<sup>2+</sup> transientのamplitudeには影響を与えなかった。なお、ellagic acidとほぼ同様の弛緩促進結果がgingerol(10 μM)によっても得られた(表12)。

		Normal mice	Diabetic mice
TTP (msec)	before	49.2±1.5	53.3±1.7
	after	54.5±1.0	59.6±3.6
TR <sub>90</sub> (msec)	before	57.7±2.3	77.1±2.7
	after	90.5±4.0*	96.9±1.2*
	prolongation	36.0±4.4	19.8±3.2 <sup>†</sup>

表8: CPAによる弛緩機能の低下

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける収縮弛緩パラメーター。CPAにより弛緩機能の低下が起きている。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はCPA投与前の値と、<sup>†</sup>は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

		Normal	Diabetic
Basal (nM)	before	125.4±8.9	210.4±12.5
	after	219.8±7.1*	253.5±18.9*
Peak (nM)	before	1130±49	776.3±51.6
	after	781±15.2*	689.5±47.9
Amplitude (nM)	before	1004.6 ±52.3	565.9±63.1
	after	561.2±21.5*	436±56.8
T <sub>1/2</sub> (ms)	before	61.5±2.7	101.3±3.9
	after	120±8.2*	153.5±7.5*
τ (ms)	before	98.2±7.1	151.1±8.7
	after	181±11.5*	203.7±11.5*

表9: CPAのCa<sup>2+</sup>動態への影響

正常マウスおよび糖尿病マウスにおけるCa<sup>2+</sup>動態パラメーター。CPAによりCa<sup>2+</sup>transient後半のCa<sup>2+</sup>濃度減少速度が低下している。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はCPA投与前の値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

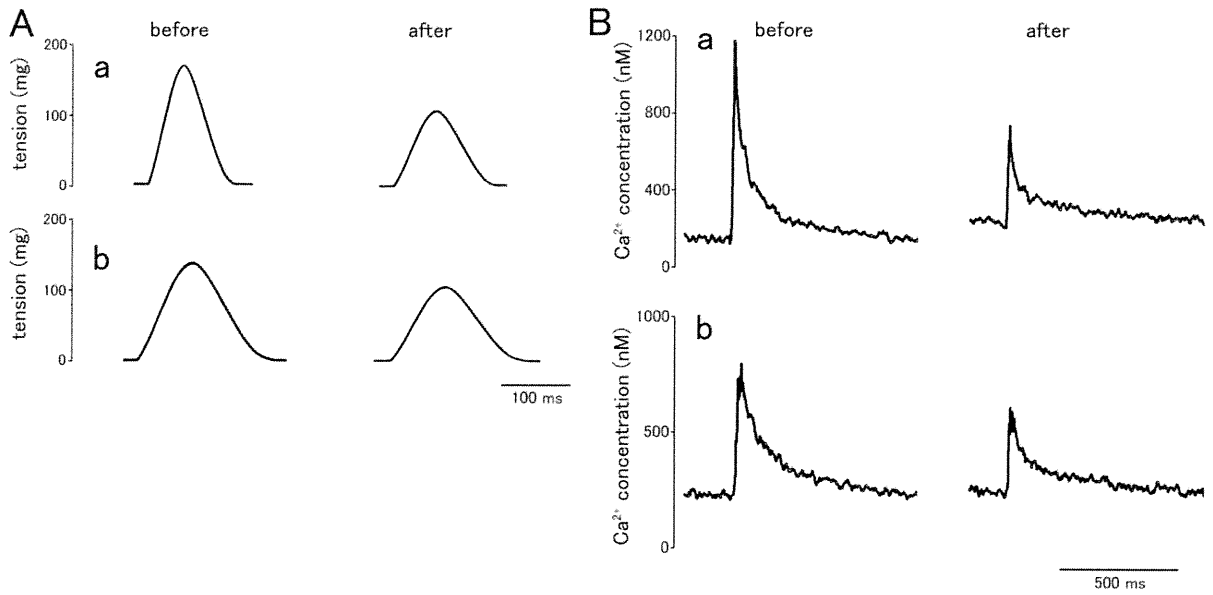


図14：心筋弛緩機能に対するCPAの影響。

CPA (10  $\mu\text{M}$ ) 投与前後の正常マウス (a) および糖尿病マウス (b) の収縮波形 (A) および  $\text{Ca}^{2+}$  transient 波形 (B)。CPAにより収縮および  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude が減少し、弛緩速度および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少速度が低下した。これらの変化はいずれも糖尿病マウスよりも正常マウスで顕著であった。

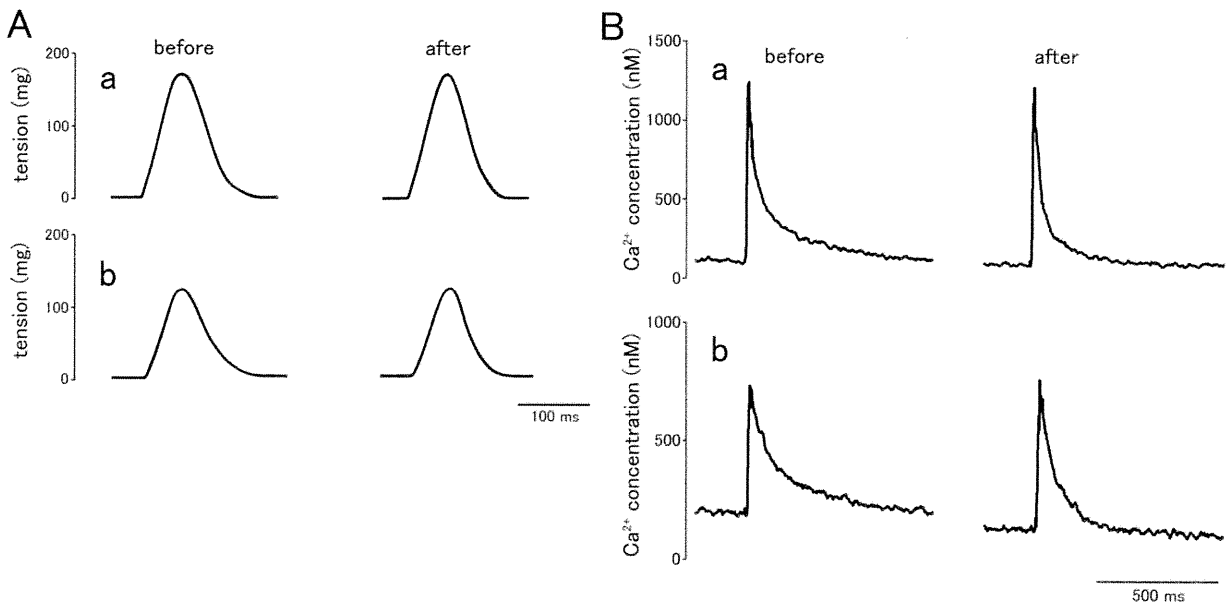


図15：心筋弛緩機能に対するellagic acidの影響。

Ellagic acid (10  $\mu\text{M}$ ) 投与前後の正常マウス (a) および糖尿病マウス (b) の収縮波形 (A) および  $\text{Ca}^{2+}$  transient 波形 (B)。Ellagic acidにより弛緩速度および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少速度が増大した。この変化は正常マウスよりも糖尿病マウスで顕著であった。

		Normal mice	Diabetic mice
TTP (msec)	before	56.4±1.52	62.4±1.97
	after	53.0±1.46	57.7±1.67
TR <sub>90</sub> (msec)	before	63.5±2.12	75.1±3.04
	after	59.7±1.79*	65.1±2.31*
	shortening	7.8±1.8	14.2±2.0 <sup>†</sup>

表10 : Ellagic acidによる弛緩機能の改善

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける収縮弛緩パラメーター。Ellagic acidにより弛緩機能の改善が起きており、特に糖尿病マウスで顕著である。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はellagic acid投与前の値と、<sup>†</sup>は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

		Normal	Diabetic
Basal (nM)	before	128.3±5.5	209.9±13.3
	after	105.9±6.9*	148.3±9.8*
Peak (nM)	before	1160±34.0	743.5±21.7
	after	1164±35.0	765.4±19.4
Amplitude (nM)	before	1032±31.9	533.6±9.9
	after	1058±40.7	617.1±14.5
T <sub>1/2</sub> (ms)	before	66.9±3.7	104.8±3.0
	after	42.4±2.4*	66.9±4.9*
τ (ms)	before	96.5±5.3	151.1±4.4
	after	61.2±3.4*	96.6±7.0*

表11 : Ellagic acidのCa<sup>2+</sup>動態への影響

正常マウスおよび糖尿病マウスにおけるCa<sup>2+</sup>動態パラメーター。Ellagic acidによりCa<sup>2+</sup>transient後半のCa<sup>2+</sup>濃度減少が速くなっている。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はellagic acid投与前の値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

		Normal mice	Diabetic mice
TTP (msec)	before	48.6±1.62	56.7±0.89
	after	46.8±2.14	55.7±1.24
TR <sub>90</sub> (msec)	before	58.8±1.65	75.8±1.60
	after	51.4±1.32*	63.9±1.56*
	shortening	7.4±1.0	11.8±1.0 <sup>†</sup>

表12 : Gingerolによる弛緩機能の改善

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける収縮弛緩パラメーター。Gingerolにより弛緩機能の改善が起きており、特に糖尿病マウスで顕著である。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はgingerol投与前の値と、<sup>†</sup>は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

今回の研究では、拡張機能不全のモデル心筋を確立し、拡張機能改善薬の探索と機序解明を目指した。STZ群では血糖値の上昇や心重量/体重比の増大が起きており、いわゆる糖尿病性心筋傷害が発症した状態にあったと考えられる(表5)。STZ群ではCa<sup>2+</sup> transientの減衰が遅れており、弛緩機能も低下していたことから、糖尿病性心筋傷害にともなう心臓拡張機能不全の状態にあることが明らかになった(図13;表6, 7)。Normal群、STZ群ともに、心筋の収縮力およびCa<sup>2+</sup> transientの減衰がCPAにより遅延したことから、拡張機能がSERCAの働きに依存していることが確認された(図14;表8, 9)。なお、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換機構阻害薬は拡張機能に大きな影響は与えないことは確認済みである。これらのことから、STZ群でみられた心筋拡張機能障害はSERCA機能の低下が主な原因であることが判明し、SERCA機能を増大させる化合物の探索が可能になった。

Ellagic acidはブルーベリーなどの果実に含まれるポリフェノール類の一種、gingerolは生姜の成分のひとつである。こ

れまでに両化合物がSERCA機能を増大させることを示す生化学的検討の結果は報告されているが、心筋組織・細胞標本の収縮力およびCa<sup>2+</sup> transientを用いた検討はなされていなかった。今回の結果から、ellagic acidおよびgingerolがSERCA機能を増大させることによりCa<sup>2+</sup> transientの減衰および心筋の弛緩を促進することが明らかになった(図15;表10-12)。SERCA機能増大の詳細な分子機序は今後解明されなければならないが、SERCAそのものに作用している可能性や、SERCAの調節蛋白であるphospholambanを介して作用している可能性などが考えられる。

Ellagic acid、gingerolともに収縮力やCa<sup>2+</sup> transientのamplitudeを増大させる作用は示さなかった。これらの点はcAMP量の増大を介して奏効するβ受容体刺激薬やphosphodiesterase阻害薬とは異なっている。Ellagic acidに関しては心拍数にほとんど影響しないことも確認されている。cAMPを増大させる効果は頻脈や催不整脈などの好ましくない結果につながり得ることが知られているが、el