

## 単離心室筋細胞における低酸素条件の $Ca^{2+}$ transient に及ぼす影響

田中 淳二

〔目的〕 心筋虚血時の心筋細胞内  $Ca^{2+}$  動態の異常を検討する目的で Fura2-AM を用いてモルモットの単離心筋細胞で低酸素条件下での  $Ca^{2+}$  transient を測定した。また高頻度の刺激を与えて  $Ca^{2+}$  transient を測定し、それらの変化について観察した。〔対象と方法〕 4-7 週齢 (300~400 g) のハートレー系モルモットの心筋から collagenase を用いて単離心室筋細胞を得た。 $Ca^{2+}$  transient は、Fura2-AM を負荷した細胞を 340 nm と 380 nm の紫外光で励起、510 nm の蛍光波長を測定し、NEC PC-9801 を用いて両者の比を求めた。低酸素負荷下での  $Ca^{2+}$  transient (以下低酸素条件) は、100%  $N_2$  を通気した Tyrode 液を 30 分以上灌流することによって得た。また高頻度刺激は、細胞外より 1 sec 間隔の基本刺激で駆動中に 200 msec 間隔の高頻度刺激を 3 発加え、前後の変化を観察した。〔結果〕 心筋細胞に高頻度刺激を加えるとき  $Ca^{2+}$  transient は加重して段階的に上昇する、低酸素条件に放置するときは、高頻度刺激時に段階的増加はみられなかった。 $Ca^{2+}$  transient が立ち上がりの時点よりピーク値の 1/2 まで減衰するまでの時間 (1/2 decay time) は、低酸素条件で短縮していた。また、高頻度刺激を加えた後では、有酸素条件では刺激を加える前に比べて差がなかったのに対して、低酸素条件ではさらに短縮するのがみられた。しかし 1/4 まで減衰するまでの時間 (1/4 decay time) を測定するとき、 $Ca^{2+}$  transient 下降相の短縮は消失する。 $Ca^{2+}$  transient の振幅は、低酸素条件に 2 時間放置して初めて高頻度刺激により減少した。静止時の  $Ca^{2+}$  レベル (EDFR) は、低酸素条件において高頻度刺激を加えるときに次第に上昇した。〔考察〕 低酸素状態では単離心筋細胞内の ATP が減少し、ATP 依存性の  $K^+$  channel の開口により活動電位持続時間が短縮することで 1/2 decay time は短縮し、また ATP の減少が筋小胞体の ATP 依存性の  $Ca^{2+}$  取り込みの減少をもたらしたために、1/4 decay time はむしろ延長し、さらに高頻度刺激により EDFR が上昇したのではないかと考えられた。

(平成 6 年 10 月 31 日採用)

## The Effect of Hypoxia on $Ca^{2+}$ transient in Isolated Guinea Pig Ventricular Myocytes

Junji Tanaka

〔Purpose〕 The purpose of this study was to examine abnormality of  $Ca^{2+}$  kinetics in myocardial ischemia under the cellular level. Isolated myocardial cells of the guinea pig were put in a hypoxic state and the  $Ca^{2+}$  transients were measured when cells were stimulated not only at the basal rate of 1/1 sec but also at high rate.

[Materials and methods] The materials were 4-7 week old guinea pigs (300~400 g : female). Isolated cells were loaded with Fura2-AM and scattered in the small chamber of controlled temperature. The single cell was irradiated with ultraviolet rays of 340 nm and 380 nm and fluorescence was measured at 510 nm. The data were analyzed with the NEC PC-9801. The cell was stimulated extracellularly at the basal rate of 1/1 sec and occasionally at 200 msec intervals for a short period. The hypoxic condition was prepared by perfusing the Tyrode solution previously bubbled with 100% N<sub>2</sub>. [Results] The times to the peak Ca<sup>2+</sup> transients were the same in both the oxygenized and hypoxia groups independent of the intervention of the high rate stimulations. The time required for the Ca<sup>2+</sup> transients to decrease to half of the peak values from the beginning point (1/2 decay time) were shortened in the hypoxia group and were further shortened after the high rate stimulations. The 1/4 decay time (the time required for the Ca<sup>2+</sup> transients to decrease to 1/4 of the peak values from the beginning point) were the same or even prolonged compared with that measured from the oxygenized cell. The amplitude of the Ca<sup>2+</sup> transients decreased following high rate stimulations for around two hours. The peak level was elevated during the high rate stimulations in the oxygenized condition and became the maximum after the last stimulation. However, there was no rise in the peak level following the high rate stimulations if the cells were exposed to hypoxia for two hours. The levels at the end of diastole were elevated after the high rate stimulations in the hypoxia group, although they were kept constant in the oxygenized group. [Discussion] It is expected that there are differences between mechanisms responsible to 1/2 and 1/4 decay time of Ca<sup>2+</sup> transient observed in hypoxia. Probably, a decrease in intracellular ATP causes the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel to open, resulting in the shortening of the action potential duration and 1/2 decay time. The decrease in ATP also would inhibit Ca<sup>2+</sup> uptake into sarcoplasmic reticulum, and prolong the 1/4 decay time. The rise of the diastolic level after the high rate stimulation in hypoxia group can also be explained from the inhibition of Ca<sup>2+</sup> uptake. (Accepted on October 31, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20(4) : 293-302, 1994

**Key Words** ① Calcium      ② Ca<sup>2+</sup> transient      ③ Hypoxia  
 ④ Extrasystole      ⑤ Isolated cardiac myocyte

## はじめに

心筋虚血に際しては収縮力が急速に減少する。これは、エネルギー代謝の減退と、無酸素条件において産生される乳酸の蓄積などがその原因と考えられる。心筋収縮は細胞質のCa<sup>2+</sup>濃度が一過性に上昇することによって開始され、この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇はCa<sup>2+</sup> transientと呼ばれている。心筋虚血による心臓障害の主たる要因の一つ

は、酸素供給の欠乏にある。近年、ますます増加の傾向にある虚血による心臓障害の成因を解明することは重要な課題である。

細胞内Ca<sup>2+</sup>は、収縮弛緩を調節するのみならず、細胞膜の電気的現象や細胞内代謝に対しても主要な役割を果たしている。

すでに、有酸素条件の代謝阻害剤を加えたときのCa<sup>2+</sup> transientの振幅の減少や、さらに拡張期の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>レベルの変化について、収縮期[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の低下、拡張期の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇、ATP

sensitive K<sup>+</sup> current の減少などが報告されている<sup>1)-3)</sup>。低酸素条件に置くと代謝阻害剤と同様の变化が予想される。しかし、単離された心筋細胞は多細胞組織と異なって拡散障壁が存在しないから、低酸素条件を負荷することは困難とされてきた。しかし最近、酵素処理により得られたラットの単離心筋細胞を用いて低酸素条件下における Ca<sup>2+</sup> transient やチャンネル電流について種々の研究がなされている<sup>1),4),5),11)</sup>。

本研究においては、モルモットの単離心筋細胞を得て、Fura2-AM<sup>6)</sup>を負荷することにより Ca<sup>2+</sup> transient を測定した。また低酸素条件や高頻度の刺激を与えて Ca<sup>2+</sup> transient を測定し、それらの変化について観察した。

## 対象と方法

### 1. 対象動物と単离心室筋細胞作成

対象動物4-7週齢のハートレー系モルモットである。モルモットの心室から単离心室筋細胞を得る方法については既に詳細に報告した<sup>7)</sup>の要点のみを記す。

モルモットを pentobarbital Na (50 mg/kg i. p.) にて麻酔を行い、人工呼吸を施行後、上行大動脈にカニューレを逆行性に挿入した。その後心臓を切り出し、Langendorff 法により心室を灌流した。まず摂氏37°Cに保持された Tyrode 液を 50 ml 灌流後、Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode 液に切り換える。ここで、心拍動は停止する。次に collagenase (Yakult, Tokyo) 40 U/ml の濃度を含む Ca<sup>2+</sup>-free Tyrode 液を10分間灌流し、最後に KB 溶液を 50 ml 灌流した。灌流終了後心室を約 3 mm 角に細切し、KB 溶液中で攪拌し、この溶液を 120

μm の金属メッシュで濾過し100 ml の KB 溶液中に浸して4°C で保存した。

Tyrode 液の組成は (mM) : NaCl 136, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 10.0, HEPES 5.0 (NaOH で pH 7.4 に滴定) であり、KB溶液の組成はKCl 40.0, l-glutamic acid 50.0, taurin 20.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20.0, MgCl<sub>2</sub> 3.0, glucose 10.0, HEPES 10.0, EGTA 0.5 (KOH で pH 7.4 に滴定) である<sup>7)</sup>。

### 2. 実験装置

実験に用いた筋槽は直径 10 mm, 厚さ 5 mm のプラスチック製の輪でその底面に薄いカバーガラスを貼布して作製した。この筋槽の周囲に金属製の外槽を置き、40°C の温湯を灌流し、側面より筋槽を加温した。前もって加温した Tyrode 液を灌流することと併せて、筋槽内の温度を37°C に保持することができた。実験装置の概要を **Figure 1** に示す。筋槽を外槽とともに倒立顕微鏡のステージに置き、明瞭な横紋を示し、数回の電気刺激を与えた後完全に弛緩するのを観察できる細胞のみを選択した。

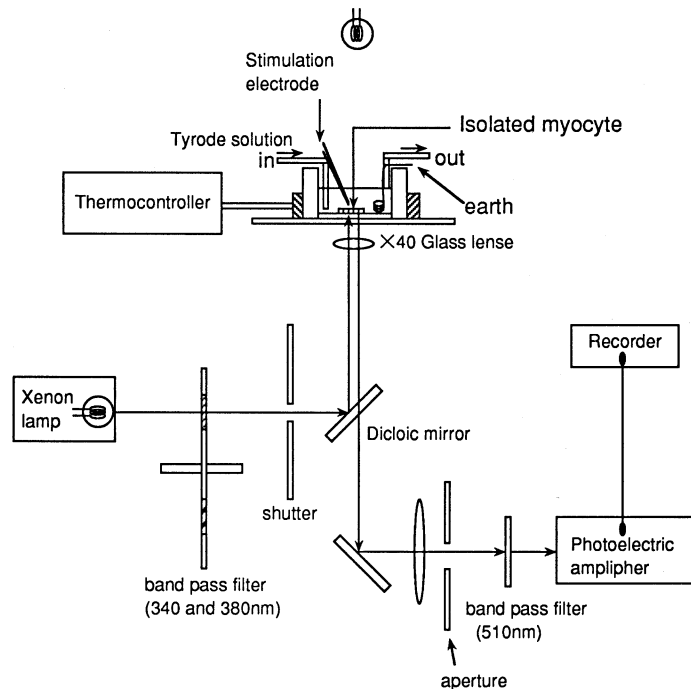


Fig. 1. The experimental device

### 3. Fura2-AM の負荷と蛍光測定

5 $\mu$ M Fura2-AM と0.02% cremophor 液を加えたKB溶液中に細胞を浸し、35°Cの温度のもとで約10分間放置した。Fura2-AMの負荷時間は、細胞の生存率が最も良好であったため10分に定めた。

Ca<sup>2+</sup> transient の測定は、1/secの頻度で電気刺激を反復して与え、まず波長340 nmの励起光によって生じる510 nmの蛍光の強度を1~10回記録し、次に励起光の波長を380 nmに切り替えて同様に1~10回記録し、DATテープに記録した。電気刺激のパルストリガーとして時標を一致させて得られた測定光の蛍光強度は、Figure 2Bに示される。

実験開始の時点でのそれぞれの励起光に対する信号のレベルを1と設定した。340 nmの励起光に対する蛍光強度は、刺激に対して収縮に先行して増大するのに対し、380 nmの励起光の強度は反対に減少する。360 nm波長によって励起される信号は、電気刺激に対して反応しない。340 nm励起による信号の振幅の、380 nm励起

による信号の振幅に対する比340 nm/380 nmを蛍光強度比 (fluorescence ratio) と呼ぶことにする。蛍光強度比の記録は、Ca<sup>2+</sup>濃度に依存しており、これがCa<sup>2+</sup> transientである。これらのデータ処理は、AD変換後 NEC PC-9801を用いて解析した。

### 4. 低酸素負荷と高頻度刺激および測定指標

低酸素負荷下でのCa<sup>2+</sup> transientは100%N<sub>2</sub>で通気したTyrode液を30分以上灌流することによって得た。

低酸素条件状態で得られた記録を、100%O<sub>2</sub>で通気したTyrode液を灌流した状態で得られたCa<sup>2+</sup> transientの対照記録との間で、Ca<sup>2+</sup> transientの振幅、Ca<sup>2+</sup> transientがその立ち上がりの時点よりピークに達するまでの時間 (peak time)、Ca<sup>2+</sup> transientが立ち上がりの時点よりピーク値 (Ca<sup>2+</sup> transientの頂)の1/2まで減衰するまでの時間 (1/2 decay time)、Ca<sup>2+</sup> transientが立ち上がりの時点よりCa<sup>2+</sup> transientの頂の1/4まで減衰するまでの時間 (1/4 decay time)、刺激を加える直前のCa<sup>2+</sup> transientの蛍光強度 (end diastolic fluorescence ratio: EDFR)などの数値について比較した。

さらに、対照と低酸素条件との双方の条件下で、細胞外より1 sec間隔の基本刺激で駆動中に3発の200 msec間隔の高頻度刺激を加えたときのCa<sup>2+</sup> transientと、その前後の基本刺激中に得られたCa<sup>2+</sup> transientとの差異についても前記の指標を求めて比較した。

### 5. 統計学的処理

統計学的処理は、対照群と低酸素条件間では studentの unpaired T検定で、高頻度刺激前後は paired T検定で行った。

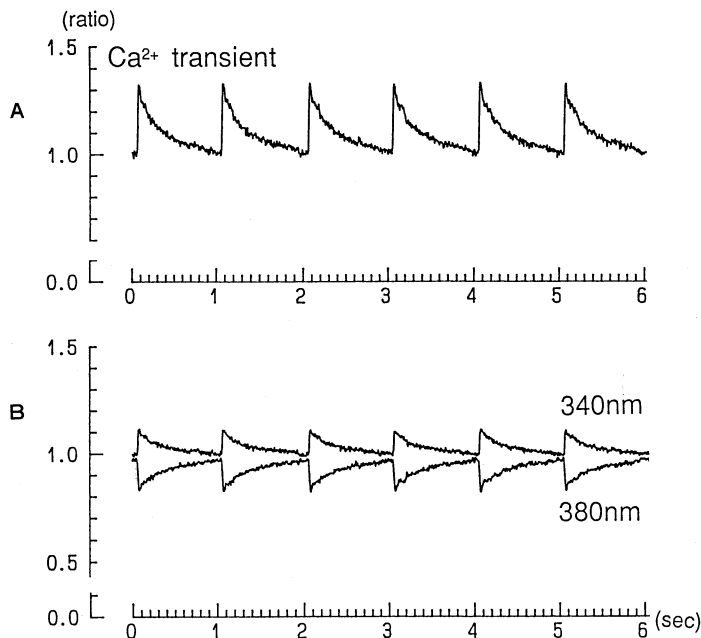


Fig. 2. A: Ca<sup>2+</sup> transients of the control  
B: The fluorescence ratio obtained at 340 and 380nm emission.

結 果

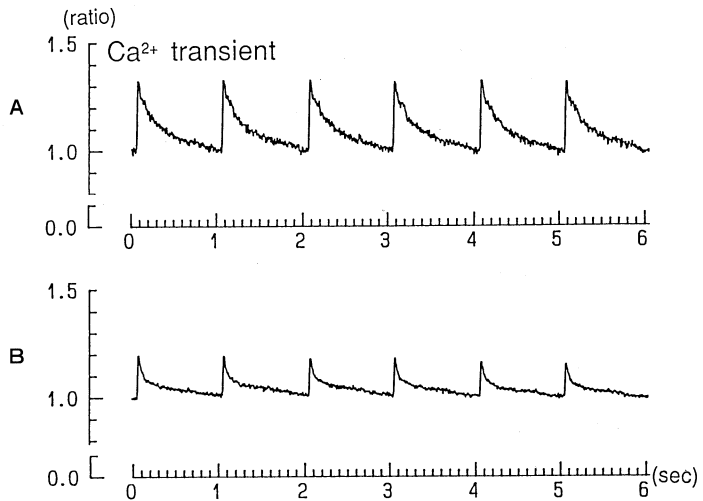
1. 低酸素条件の影響

100% O<sub>2</sub> で飽和した Tyrode 液を灌流しつつ、1 sec 間隔の頻度で刺激したときの 6 回 Ca<sup>2+</sup> transient を **Figure 3** に示す。Ca<sup>2+</sup> transient は、刺激の直後に速やかに上昇してピークに達した後、ほぼ指数関数的経過で減少し、1 秒後に最初の値に復する。ここで第 2 の刺激が加えられるときは、第 1 刺激に対すると同じ経過を示し、以下の刺激に対して繰り返される (**Fig. 3A**)。次に 100% N<sub>2</sub> を通気した Tyrode 液を灌流し、約 2 時間後に 1/sec の頻度で刺激を加えて Ca<sup>2+</sup> transient を記録した (**Fig. 3B**)。低酸素条件においては、Ca<sup>2+</sup> transient の振幅は約 2/3 に減少し、その下降相は最初の速やかな相とそれに続く緩やかな相との 2 相にわかれた経過を示す。また最初の Ca<sup>2+</sup> transient と第 6 回目のそれとを比較すると振幅がわずかに減少しているのが認められる。

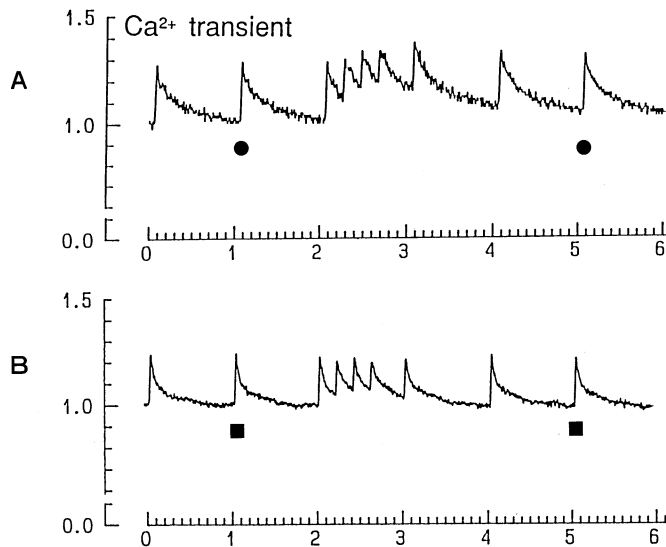
2. 高頻度刺激の作用

1/sec の基本刺激に介在して、200 msec 間隔の刺激を期外収縮となるよう 3 回加えたときの Ca<sup>2+</sup> transient を **Figure 4** に示す。対照の有酸素条件下では、下降相が完了しないうちに次の刺激にたいする反応が加重される結果、下降相のレベルが上昇し、これに伴って反応の頂のレベル

も上昇する。基本刺激に戻るときには、下降相および頂のレベルも低下していくが、3 秒後においても完全に戻ってはいない。低酸素条件下 2 時間置くときは、**Figure 3** の記録と同様に振幅の低下や下降相初期の短縮と終期の遅延とが記録されている。ここで期外収縮刺激を加える



**Fig. 3.** Ca<sup>2+</sup> transients of control and hypoxia.  
**A:** Ca<sup>2+</sup> transients of the control. The same trace as the one shown in **Fig. 2A**  
**B:** Ca<sup>2+</sup> transients of hypoxia.



**Fig. 4.** Ca<sup>2+</sup> transients of hypoxia inserted the high rate stimulations  
 Marks of filled circles and squares indicate the Ca<sup>2+</sup> transients before and after the high rate stimulations.

とき、 $\text{Ca}^{2+}$  transient の下降後のレベル上昇は顕著ではなくなり、また頂のレベルはむしろ低下している。基本刺激に戻すときは、時間経過も振幅も1秒後には回復する。

### 3. 低酸素条件における高頻度刺激の作用

低酸素条件下における高頻度刺激の前後の  $\text{Ca}^{2+}$  transient の経過の変化 **Figure 5** に示す。

**Figure 5A** は、 $\text{O}_2$  飽和 Tyrode 液において、3連発の高頻度刺激を加える前と加えた後の1秒間隔の基本刺激に対する  $\text{Ca}^{2+}$  transient (**Fig. 4**, ●印) を重ね書きした記録である。高頻度刺激の前後において  $\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅や下降相に顕著な差異は認められない。**Figure 5B** は灌流液を100%  $\text{N}_2$  を通気した Tyrode 液に置き換えて約1時間後において3連発の高頻度刺激を加え、前後の  $\text{Ca}^{2+}$  transient であり、ここでも下降相の経過は高頻度刺激によって影響されることはない。振幅はわずかに増大するが、これは必ずしも常に認められる変化ではない。 $\text{N}_2$  Tyrode 液を灌流して2時間後においては、高頻度刺激を加えた前後の  $\text{Ca}^{2+}$  transient (**Fig. 4**, ■印) を比較するとその経過は高頻度刺激によって下降相が加速されるのが認められる (**Fig. 5C**)。

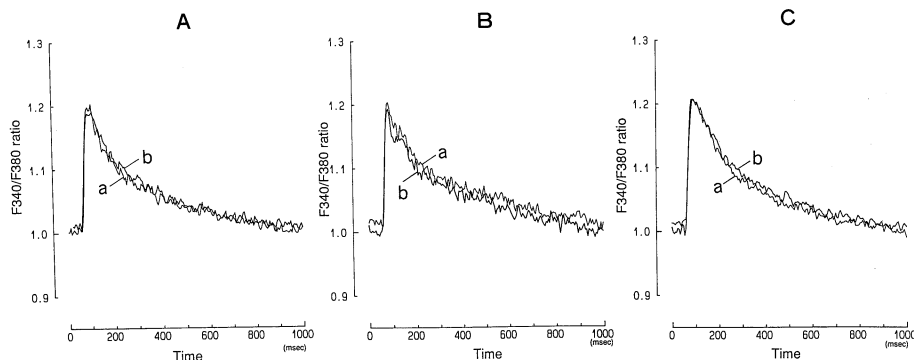
$\text{O}_2$  飽和 Tyrode 液を灌流した有酸素条件と  $\text{N}_2$  飽和 Tyrode 液を灌流した低酸素条件のおおの条件下で、3連発の高頻度刺激によって生じる  $\text{Ca}^{2+}$  transient 経過の変化を **Figure 6**

および **7** に示す。

$\text{Ca}^{2+}$  transient がその立ち上がりの時点より  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂に達するまでの時間は、高頻度刺激前で対照の有酸素条件では  $29.7 \pm 5.9$  msec であり、低酸素条件では  $33.9 \pm 10.2$  msec であって、両者の間で差は無く、高頻度刺激を加えた後においても、有酸素条件では  $29.3 \pm 8.7$  msec、低酸素条件では  $33.5 \pm 12.1$  msec であり差異はなかった。

また  $\text{Ca}^{2+}$  transient の完了した後のレベルすなわち ED<sub>FR</sub> は、有酸素条件では高頻度刺激によって影響されることはなかったのに対して、低酸素条件では高頻度刺激により ED<sub>FR</sub> が上昇した。1/2 decay time は、低酸素条件に放置することによって高頻度刺激前では有酸素条件での  $162.9 \pm 30.0$  msec から  $118.1 \pm 26.1$  msec に短縮される (**Fig. 6A**)。高頻度刺激を加えた後では、有酸素条件では  $159.3 \pm 57.9$  msec で前と差がなかったのに対して、低酸素条件では  $101.7 \pm 39.4$  msec でさらに短縮した (**Fig. 6C**)。しかし、1/4 decay time を測定するときは、有酸素条件では  $333.7 \pm 51.2$  msec、低酸素条件では  $325.0 \pm 40.0$  msec であって低酸素条件の影響はなく、高頻度刺激を加えた後においても、有酸素条件では  $332.1 \pm 79.3$  msec、低酸素条件では  $327.8 \pm 57.6$  msec であっていずれの場合でも差はなかった (**Fig. 6D**)。

$\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅は、対照の有酸素条件



**Fig. 5.** A :  $\text{Ca}^{2+}$  transient in  $\text{O}_2$  Tyrode solution, before (trace b) and after the high rate stimulation (trace a).  
 B :  $\text{Ca}^{2+}$  transient in  $\text{N}_2$  Tyrode solution after 1 hour.  
 C :  $\text{Ca}^{2+}$  transient in  $\text{N}_2$  Tyrode solution after 2 hours.

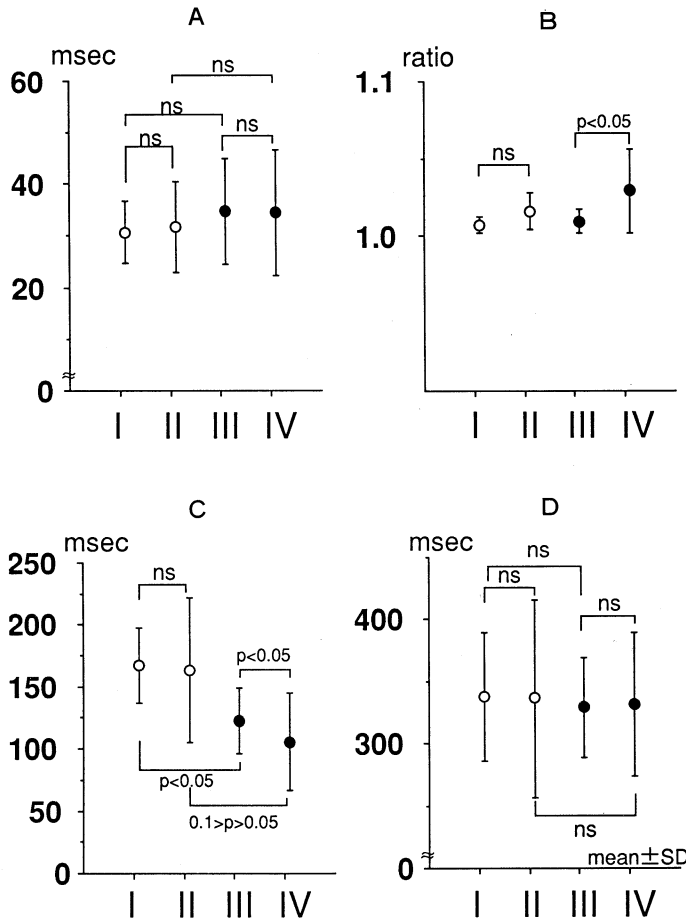


Fig. 6. Group I : O<sub>2</sub> Tyrode, before the high rate stimulation.  
 Group II : O<sub>2</sub> Tyrode, after the high rate stimulation.  
 Group III : N<sub>2</sub> Tyrode, before the high rate stimulation.  
 Group IV : N<sub>2</sub> Tyrode, after the high rate stimulation.  
 A : Time to peak of  $\text{Ca}^{2+}$  transient.  
 B : End diastolic fluorescence ratio.  
 C : Time for decay to 1/2 values of peak amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transient from time of stimulation (1/2 decay time).  
 D : Time for decay to 1/4 values of peak amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transient from time of stimulation (1/4 decay time).

において、 $0.19 \pm 0.05$ 、低酸素条件では $0.20 \pm 0.04$ であって両者の間で差はなく、高頻度刺激を加えた後の振幅を比較するときも、有酸素条件 $0.21 \pm 0.06$ 、低酸素条件では $0.20 \pm 0.05$ であって、やはり両者の間で差はなかった(Fig. 7A). Figure 7A では、低酸素条件を負荷する時間を考慮することなく、すべての例を含めた結果が示されている。Fura2-AM を負荷された細胞を低酸素条件に長時間放置するときは、多くの細

胞は障害され、あるいは、Fura2-AM が分解または漏出して蛍光強度が減少し測定が困難になる場合が多い。数多くの細胞のうち、低酸素条件意識 2 時間残存した細胞のみを用いて測定できた結果を Figure 7B で示す。比較のために、約 1 時間放置して得た結果を併せて示す。1 時間放置した細胞から測定された基本刺激に対する  $\text{Ca}^{2+}$  transient は、その振幅は $0.20 \pm 0.04$  ratio であり、高頻度刺激を加えた後では $0.20 \pm$

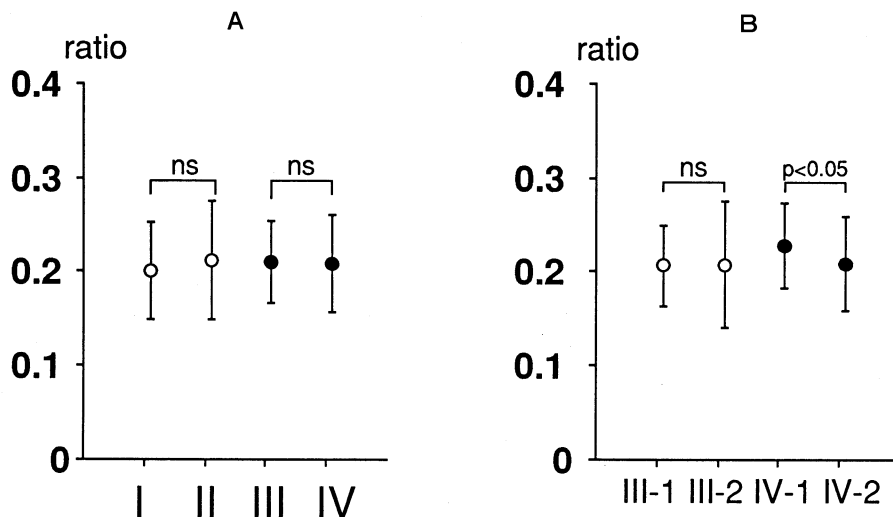


Fig. 7. Amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  transient. The ratio of the output voltage of peak amplitude to the end-diastolic output voltage level is scaled in the ordinate.

Group I : in  $\text{O}_2$  Tyrode, before the high rate stimulation.

Group II : in  $\text{O}_2$  Tyrode, after the high rate stimulation.

Group III : in  $\text{N}_2$  Tyrode, before the high rate stimulation.

Group IV : in  $\text{N}_2$  Tyrode, after the high rate stimulation.

III-1, IV-1 : exposed to  $\text{N}_2$  Tyrode for 1 hour.

III-2, IV-2 : exposed to  $\text{N}_2$  Tyrode for 2 hours.

A : Open circles, in  $\text{O}_2$  Tyrode and filled circles in  $\text{N}_2$  Tyrode. In group III and IV, all of the results obtained from various exposure times (0.5 to 2.5 hours) to  $\text{N}_2$  Tyrode are altogether included.

B : The results in  $\text{N}_2$  Tyrode are grouped into two according to the exposure time of around 1 hour (open circles) and of around 2 hours (filled circles). Vertical bars indicate  $\pm 1\text{SD}$ .

0.07であって、振幅の変化は認められない。2時の低酸素条件にある細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  transientの振幅は  $0.22 \pm 0.05$  であるが、高頻度刺激を加えた後では振幅は  $0.20 \pm 0.05$  に減少した。

#### 4. 高頻度刺激中の作用

また Figure 4A に示すように、高頻度刺激有酸素条件では  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂が徐々に上昇し、終了次拍で最大となったが、これに対して Figure 4B に示すように、低酸素条件状態ではこの  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂の上昇はみられなかった。

Figure 8 は、基本刺激中の  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂を100%とした  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂の変化率と、その変化に対する低酸素条件の影響とを示した図である。有酸素条件では高頻度の刺激に対応して  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂は次第に上昇し、振幅は50%以上にも増大する。低酸素条件に30分間放置するときは、 $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂は有

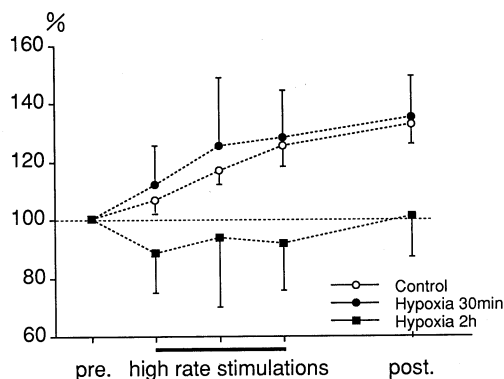


Fig. 8. Time course of peak of  $\text{Ca}^{2+}$  transient during high rate stimulations.

酸素条件とほぼ同じ変化を示したが、低酸素条件2時間おくとときは  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂は増加することなく、終了後の次の刺激で前の値に復した。



## 考 察

心筋細胞においては、活動電位の間細胞外より細胞内に流入して  $\text{Ca}^{2+}$  が Calcium induced calcium release の機序により増幅されて収縮を引き起こし、その  $\text{Ca}^{2+}$  は、筋小胞体 (SR) の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプによる  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みや、 $\text{Na}/\text{Ca}^{2+}$  交換系による  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞外への排出により弛緩をもたらすという説が広く受け入れられている<sup>8)</sup>。

今回の検討では、 $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する低酸素条件の最も顕著な影響は、1/2 decay time は短縮するが、1/4 decay time はむしろ延長すること、高頻度刺激により EDFR が上昇することである。低酸素条件でのこれらの  $\text{Ca}^{2+}$  transient の経過の変化には、下降相の初期と後期では異なるメカニズムが関与している可能性が推測された。シアンを用いた代謝阻害によりマウスのニューロンで  $\text{Ca}^{2+}$  transient の下降相は、2次の指数関数によって表されることが報告されているが<sup>9)</sup>、今回の実験で心筋細胞においても同様の変化が生じている可能性も考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$  transient の下降相すなわち細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の減少過程において、1/2 decay time が短縮したのは、低酸素条件により単離心室筋細胞内の ATP 低下が生じたため、 $\text{Ca}^{2+}$  transient による一過性の細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  増加に引き続いて生じる  $\text{Ca}^{2+}$  減少過程の初期に ATP 依存性  $\text{K}^+$  channel が開口し、これにより活動電位の持続時間 (action potential duration: APD) が短縮したためである可能性が考えられた<sup>10)~12)</sup>。Hirche ら<sup>11)</sup> は、心筋細胞を無酸素状態に置くと、ATP 依存性  $\text{K}^+$  channel が開口して APD が短縮し、このことが虚血心筋における  $\text{Ca}^{2+}$  overload を防止する結果をもたらしている可能性についても示唆している。今回の結果もまた、このことの合目的性を反映しているものと考えられた。

下降相の 1/4 decay time は逆にむしろ延長することが認められた。これは、低酸素によって細胞内の ATP 濃度が減少し、SR の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ機能が低下し、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合が阻害された結果

であると考えられた。さらに高頻度刺激中、低酸素状態の持続時間が長いもので  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂の段階的增加がみられなかったことは、 $\text{Ca}^{2+}$  の結合阻害の結果 SR 内  $\text{Ca}^{2+}$  含量が低下したために、高頻度刺激中の SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が減少したという可能性が考えられた。

低酸素状態の持続時間が30分以内であれば、高頻度刺激中の  $\text{Ca}^{2+}$  transient は有酸素条件下とほぼ同じ変化を示した。Koretune ら<sup>13),14)</sup> は、ferret の摘出灌流心を用いた ischemic contracture の発現機序に関連して灌流遮断40分後に細胞内 ATP は有酸素条件の1/10に低下したと報告している。本研究においても低酸素条件に30分間おいたときは、細胞内 ATP 濃度の低下は  $\text{Ca}^{2+}$  transient の変化を示す程ではなかったのではないかと考えられた。

低酸素条件における下降相の経過の変化は、基本刺激時には必ずしも常に明らかに示されない。しかしここで高頻度刺激を加えるとき、より顕著になる。またシアンを用いて細胞内の代謝を阻害すると、EDFR が上昇し、 $\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅が減少することが報告されている<sup>11),15)</sup>。本研究において、低酸素条件において振幅の減少を認めたものの、基本刺激中の高頻度刺激を加えることにより顕著になった。おそらく高頻度刺激によって細胞内 ATP の減少の影響が増大され、より顕性化されたものではないかと考えられた。さらに、高頻度刺激時に  $\text{Ca}^{2+}$  transient の頂の上昇がみられないか否か、あるいは  $\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅減少の程度は低酸素条件の負荷時間に依存しているのではないかと考えられた。

## 総 括

モルモットの単離心室筋細胞を用いて低酸素状態が  $\text{Ca}^{2+}$  transient に与える影響を検討し、同時に高頻度刺激を与えることによって生じる影響について検討した。

その結果、低酸素状態では単離心筋細胞内の ATP が減少し、ATP 依存性の  $\text{K}^+$  channel の

開口により APD が短縮, また SR の  $\text{Ca}^{2+}$  取り組みの減少をもたらし, 結果として単離心筋細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  動態の異常を呈する可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり, 直接ご指導いただいた川崎医科大学生理学 I 教室 松村幹郎教授ならびに同内科循環器部門 沢山俊民教授に深甚の謝意を捧げます。また終始ご指導と助力をいただきました川崎医科大学生理学 I 教

室 奥山博司講師ならびに内科循環器部門 井上省三講師に深く感謝いたします。

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(No. 2-615 および No.5-207)によって支援された。附記して感謝します。

本論文の要旨は XXXII Congress of The International Union of Physiological Sciences (1993年8月) において発表した。

## 文 献

- 1) Eisner DA, Nichols CG, O'Neill SC, Smith GL, Valdeolmillos M: The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cells. *J Physiol* 411: 393-418, 1989
- 2) Benndorf K, Bollmann G, Friedrich M, Hirche H: Anoxia induces time-independent  $\text{K}^+$  current through  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels in isolated heart cell of the guinea-pig. *J Physiol* 454: 339-357, 1992
- 3) GROSS GJ, Auchampach JA: Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* 26: 1011-1017, 1992
- 4) Allen DG, Orchard CH: Intracellular calcium concentration during hypoxia and metabolic inhibition in mammalian ventricular muscle. *J Physiol* 339: 107-122, 1983
- 5) Findlay I: ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in rat ventricular myocytes are blocked and inactivated by internal divalent cations. *Pflügers Arch* 410: 313-320, 1987
- 6) Tsién RY: Fluorescent probes of cell signaling. *Ann Rev Neurosci* 12: 227-253, 1989
- 7) 井上省三, 松村幹郎, 田中淳二, 田村敬二, 豊田弘子, 奥山博司, 長谷川浩一, 鼠尾祥三, 沢山俊民: モルモット単離心室筋細胞の作成と電気的活動. *川崎医学会誌* 18: 81-86, 1992
- 8) Nabauer M, Callewaert G, Cleemann L, Morad M: Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* 244: 800-803, 1989
- 9) Duchen MR, Valdeolmillos M, O'Neill SC, Eisner DA: Effects of Metabolic blockade on the regulation of intracellular calcium in dissociated mouse sensory neurones. *J Physiology* 424: 411-426, 1990
- 10) Fosset M, de Weille JR, Green RD, Schmid Antomachi H, Lazdunski M: Antidiabetic sulfonylurea control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent  $\text{K}^+$  channels. *J Biol Chem* 263: 7933-7938, 1988
- 11) Hirche H, Benndorf K: Change of ion flux and currents in the myocardium during ischemia and reoxygenation. *心臓* 26: 911-925, 1994
- 12) 林 秀晴, 寺田 肇, 宮田晴夫, 野田直久, 小林 明, 山崎 昇: 心筋虚血時および再灌流時不整脈の機序 低酸素灌流時および再酸素化時の過負荷と電気的不均一性. *心電図* 11: 144-150, 1992
- 13) Koretune Y, Marban E: Relative roles of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent mechanisms in hypoxic contractile dysfunction. *Circulation* 82: 528-535, 1990
- 14) Koretune Y, Marban E: Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation and ATP depletion. *Am J Physiol* 258: H9-H16, 1990
- 15) Goldhaber JJ, Parker JM, Weiss JN: Mechanisms of excitation-contraction coupling failure during metabolic inhibition in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 443: 371-386, 1991