

## 心筋収縮に対する Ca チャネル遮断剤の抑制作用と回復期における増強作用

大北 幸生

ウシガエル心房壁筋に nifedipine を与えると、収縮は減弱ないし消失するが、ここで nifedipine を分解する目的で xenon 光を照射すると、その作用からの回復期において収縮力が一過性に増大する。この一過性収縮増強は30%以上にも達し数分持続した後、対照値にもどる。この収縮力増大は単に nifedipine を洗い去るだけではおこらない。xenon 光は紫外線を含み、それ自体収縮を増強する作用を有しているが、その程度は10%にすぎない。nifedipine 作用後の一過性収縮増強作用は、nifedipine 作用中 Ca 流入が減少して細胞内の Ca 除去機構は抑制された状態にあり、nifedipine が速やかに分解されるときは Ca 流入は回復するが、Ca 除去機構の抑制が残存していることが、収縮の一過性増大をもたらす原因と推測される。この Ca 除去機構の一つとして Na-Ca 交換の抑制が考えられる。

(平成元年2月28日採用)

### Transient Potentiation of Tension during Recovery from Treatment with Nifedipine and Verapamil in Bullfrog Atrium Trabeculae

Yukio Okita

A thin heart muscle preparation obtained from the bullfrog atrial trabeculae was isolated and then stimulated at the rate of 1/2 sec by supramaximal strength. Contraction tension was continuously recorded and the membrane potential was recorded occasionally from cells within the preparation. Nifedipine, one of the Ca channel blockers, inhibited the contraction tension, accompanied by shortening of plateau potential. The time course of the decrease after the start of perfusion with nifedipine was much slower than expected from the diffusion of the drug. The contraction was not abolished completely but remained at a low level even when the muscle was exposed to nifedipine-Ringer solution at a concentration as high as  $1 \times 10^{-5}$ M. Probably, the residual tension was produced by Ca-inflow through the forward Na-Ca exchange mechanism rather than through the membrane potential dependent Ca channels. The action of nifedipine was reversible, when the muscle preparation was washed out by perfusion with standard Ringer solution and simultaneously irradiated by ultra-violet light. The most interesting finding was that the tension was potentiated beyond the control level by around 30% during the initial phase of recovery. This transient tension increase was not

observed when nifedipine was simply washed out. Verapamil also decreased the contraction tension but did not show potentiating action during the recovery phase. The product of nifedipine decomposition was ineffective in potentiating contraction tension. Therefore, the transient tension increase can be explained by the increase in Ca influx via the Na-Ca exchange mechanism. During nifedipine treatment, the intracellular concentrations will be lower than control because of the reduced Ca inflow through Ca channels, and Na-Ca exchange is in the accelerated state. When nifedipine is rapidly decomposed, the total amount of Ca entering through Ca channels and Na-Ca exchange is increased. The present results indicate the significance of Na-Ca exchange in contraction and relaxation. (Accepted on February 28, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15 (2) : 320-327, 1989

**Key Words** ① Heart muscle contraction ② Nifedipine ③ Ultra-violet light ④ Na-Ca exchange mechanism

## はじめに

心筋収縮は活動電位プラトー相に細胞外より流入する  $Ca^{2+}$  によって起始される。 $Ca^{2+}$  はプラトー相における内向き電流を担うばかりでなく、<sup>1)~3)</sup> ペースメーカー電位に参与している。<sup>3)~5)</sup>したがって  $Ca^{2+}$  チャネル遮断剤は収縮力を減弱させるばかりでなく、<sup>6),7)</sup> 自動拍動を減少させる作用をそなえている。<sup>4),5)</sup>

$Ca^{2+}$  チャネル遮断剤の摘出心筋試料に対する作用に関してはすでに多く報告されているところである。<sup>8),9)</sup>当初、ウシガエル心房壁筋の収縮に対する nifedipine の作用を検討しているとき、nifedipine の作用を除く目的で xenon 光 (紫~紫外線を含む) を照射し nifedipine を急激に分解すると、その作用からの回復期において収縮力が一過性に増大することを見いだしていた。本研究においては、nifedipine と verapamil を作用させた後の回復期における収縮張力と活動電位の変化を検討した。nifedipine は verapamil にくらべて回復が比較的速やかであり、回復期の変化を検討するのに適している。また一般に  $Ca^{2+}$  チャネル遮断剤の作用は刺激頻度に依存しているが、verapamil はこの依存性が nifedipine より強く、nifedipine が最も弱いことが知られているので、両者の作用を比較することは、回復期の収縮張力変化の成因を明らかにする一助となると考え

たからである。また、細胞外  $Ca^{2+}$  濃度を変えてこれらの  $Ca^{2+}$  チャネル遮断剤の効果を  $Ca^{2+}$  濃度との関係をも明らかにした。実験結果の一部はすでに発表した。<sup>9)</sup>

## 実験方法

### 1) 実験試料と張力測定

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) の心房壁筋のうち筋層のそろった内側の1層から長さ 5 mm、直径 1 mm 以内の小さい筋試料を得た。その試料を筋槽に水平に置き一端を固定し、他端をストレーンゲージトランスジューサー (Showa Instrument, 5356A) につないで収縮力を測定した。

### 2) 筋槽

筋槽容量は 1.5 ml (0.6×5×0.5 cm) である。筋槽より約 1 m の高さに貯水槽を置き、Ringer 液や試験液を 5 ml/min の速度で注入し、常に容量が一定に保たれるように吸引で流出路を調節した。

### 3) 灌流液

灌流液の Ringer 液の組成は Na 114, K 2.8,  $HCO_3$  2.8, Cl 114 mM で  $CaCl_2$  は正常を 2.3 mM, 高濃度 Ca 液は  $CaCl_2$  を 6.9 mM, 低濃度 Ca 液は  $CaCl_2$  を 0.7 mM とし、Ringer 液中の  $CaCl_2$  を単に増加または減少させた。ま

たこれらの灌流液には5% CO<sub>2</sub>を含むO<sub>2</sub>を通して試料を灌流した。

#### 4) 薬物濃度

nifedipine (Sigma Chem. Co.) はまず10mlの dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし、その一部を Ringer 液で希釈して $5 \times 10^{-7}M$ と $1 \times 10^{-6}M$ の2種類の溶液を得、verapamil (Eisai Co. Ltd) は Ringer 液で直接希釈し $5 \times 10^{-6}M$ とした。

#### 5) xenon 光

nifedipine 作用からの回復過程を求めるためには、単に正常 Ringer 液で筋槽を灌流するか、あるいは正常 Ringer 液を灌流しつつ筋試料を xenon 光 (U1-501C, ウシオ電気, 波長3000~4500Å) で照射した。

#### 6) 電位測定

3M KCl 電極を試料の固定端の近くに刺入し、高入力抵抗増幅器 (MEZ 7101, 日本光電) に接続した。電位と張力を同時にオシロスコープで観察しつつペンレコーダー (RJG 4024, 日本光電) に記録した。

## 実験結果

### 1. nifedipine 作用時の張力減弱と回復時の張力増大

筋槽の灌流液を正常 Ringer 液から nifedipine Ringer 液に交換すると、心筋の収縮は減弱し、その濃度が高いときにはほとんど消失する。Figure 1 は、筋試料を0.5/secで刺激しながら nifedipine  $5 \times 10^{-7}M$ の液を筋槽内に流入したとき、および正常 Ringer 液で nifedipine 液を洗い流しながら xenon 光を照射して nifedipine を分解したときの収縮張力の変化を示す。筋槽内溶液を正常 Ringer 液より nifedipine Ringer 液に交換すると心筋の収縮張力は減弱し、nifedipine Ringer 液より正常 Ringer 液にかえて、xenon 光を照射すると収縮力は一過性に増大した後にもとのレベルに回復する。この場合収縮抑制の効果が定常に達するまでに20分を要し、また完全に回復するまでも約23分を要している。Figure 1にはそれぞれ正常 Ringer 液灌流中、nifedipine Ringer 液灌流中の活動電位を示している。nifedipine 作用中には活動電位の振幅はほぼ一定であるが

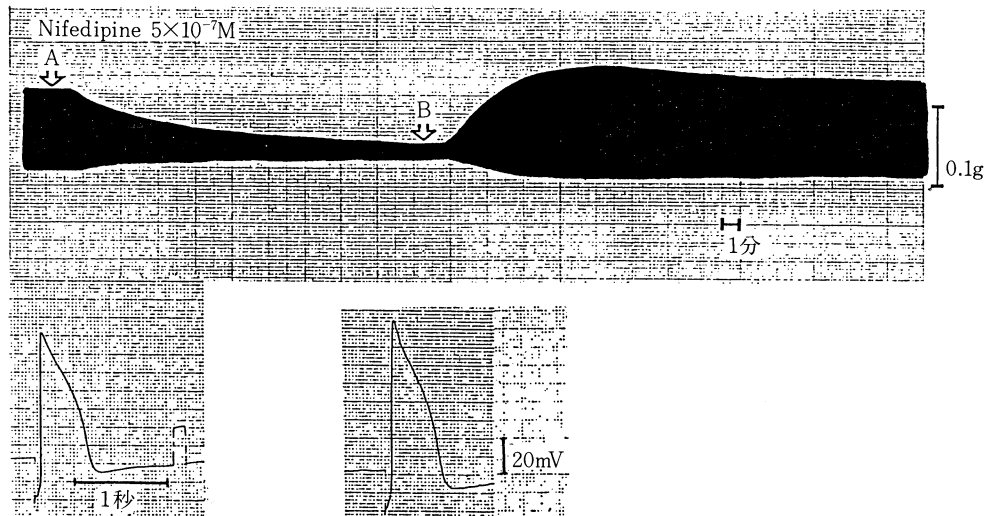
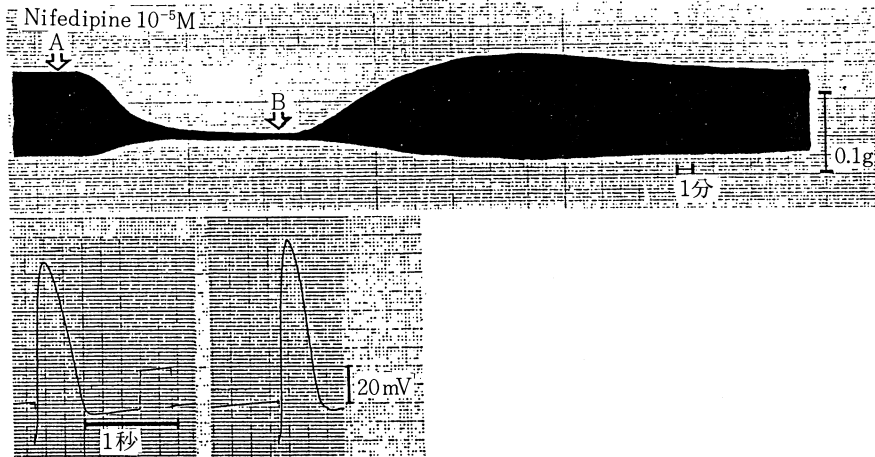


Fig. 1. Inhibition and potentiation of tension by application and removal of nifedipine ( $5 \times 10^{-7}M$ ). Stimulation rate is 1/2sec. At the arrow mark A, the standard Ringer solution is replaced with nifedipine-Ringer solution, and at B, nifedipine solution is replaced with standard Ringer and the muscle is irradiated by ultra-violet light.



**Fig. 2.** Inhibition and potentiation of tension by application and removal of nifedipine ( $1 \times 10^{-5}M$ ). Stimulation rate is 1/2 sec. At the arrow mark A, the standard Ringer is replaced with nifedipine-Ringer solution, and at B, nifedipine solution is replaced with standard Ringer and the muscle is irradiated by ultra-violet light.

**Table 1.** Inhibitory and potentiation acts of nifedipine and verapamil on contract at different external Ca concentrations

Nifedipine 濃度	CaCl <sub>2</sub> 濃度	T1	T2	T3	T4
$5 \times 10^{-7}M$ (n=10)	2.3 mM	100	32 (21-48)	122 (100-159)	102 (94.4-109)
$10^{-5}M$ (n=10)	2.3 mM	100	14.5 (7.7-23)	131 (107-152)	104 (90.9-121)
$10^{-5}M$ (n=3)	0.7 mM	100	12.5 (6.5-20)	120 (102-140)	100 (94.5-106)
$10^{-5}M$ (n=3)	6.9 mM	100	36 (22-45)	138 (112-156)	94 (85.5-108)

T1: Tension in the standard Ringer solution before nifedipine treatment. This is taken as 100%.

T2: The steady tension in nifedipine Ringer solution.

T3: The tension in the peak of the transient potentiation in the initial phase of recovery after removal of nifedipine by procedures of wash out and ultra-violet irradiation.

T4: Final steady tension after recovery.

プラトーの持続時間が減少している。

**Figure 2** に同様に nifedipine Ringer 液  $1 \times 10^{-5}M$  を灌流したときの結果を示す。 **Figure 1** の例と比較して収縮抑制に要する時間は 11 分に短縮され、抑制の程度も大きく、回復の時間は延長されている。しかし回復は可逆的である。特徴的なことは **Figure 1** と同じく回復の

初期に一過性の張力増大の相が認められることである。

20 例の結果は **Table 1** に要約される。 nifedipine 濃度を  $1 \times 10^{-5}M$  に高めるときは、当然収縮抑制は強く現れるが、完全に消失することはなくわずかの収縮が残存している。また、濃度が高く収縮抑制が強く現れるときは、回復初期に認められる一過性の収縮増強は顕著である。

2. 灌流液  $Ca^{2+}$  濃度変化による nifedipine の作用時と回復期の張力変化

灌流液の  $CaCl_2$  濃度が 6.9, 2.3, 0.7 mM の Ringer 液と nifedipine Ringer 液 (nifedipine 濃度は

$1 \times 10^{-5}M$ ) を作製し同様に灌流した (**Table 1**)。その値を比較すると、灌流液  $Ca^{2+}$  濃度が高ければ nifedipine による収縮抑制作用は減少され、また xenon 光使用による回復期の一過性の収縮張力増強は大きく、  $Ca^{2+}$  濃度が低いと収縮抑制は増強し、回復期の一過性収縮増強も減少する。

3. nifedipine 作用後 xenon 光を使用せず  
に正常 Ringer 液のみを灌流した場合  
nifedipine Ringer 液  $5 \times 10^{-7} M$  を作用させ、  
xenon 光を照射せずに正常 Ringer 液のみを  
灌流した結果を **Figure 3** に示す。nifedipine  
作用からの回復は長時間を要し 60 分後にも回  
復は完全でない。また、一過性の収縮張力増強  
は認められない。

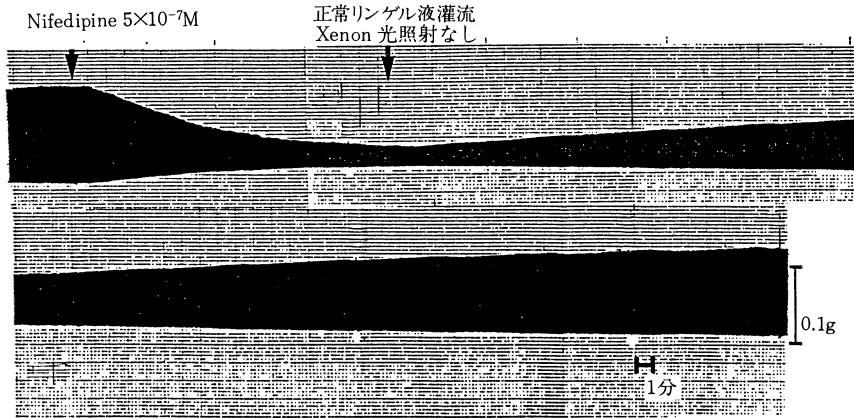
#### 4. 正常 Ringer 液灌流中の xenon 光照射の 影響

筋試料を正常 Ringer 液のみで灌流し、張  
力が安定したときに xenon 光を照射して張

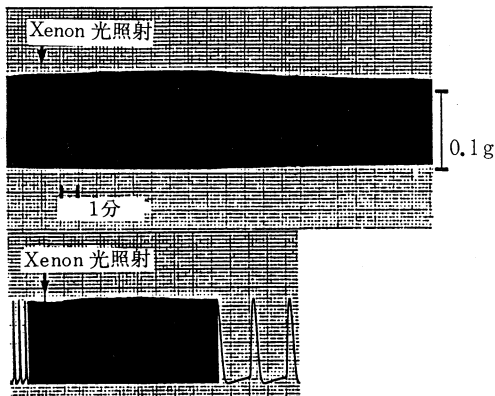
力変化を観察した。xenon 光の照射によって  
張力はわずかであるが増強する (**Fig. 4**)。な  
お、そのとき同時に筋槽内の温度変化を測定し  
たが、筋槽容量 (1.5 ml) に比して灌流速度  
が速いため温度変化はほとんど認められな  
かった。

#### 5. nifedipine 最終分解産物の影響

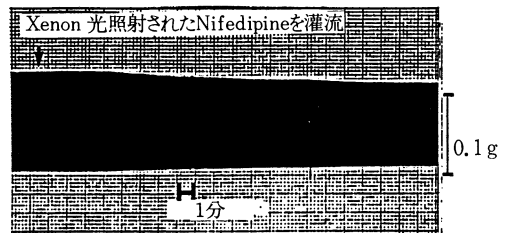
**Figure 5** は nifedipine Ringer 液を貯水槽  
に入れ 1 時間 xenon 光を照射し、その後室温  
にして灌流した結果である。nifedipine の影響  
がまだ少し残っているために、張力は少し減弱  
するが収縮増強作用は全く認められない。



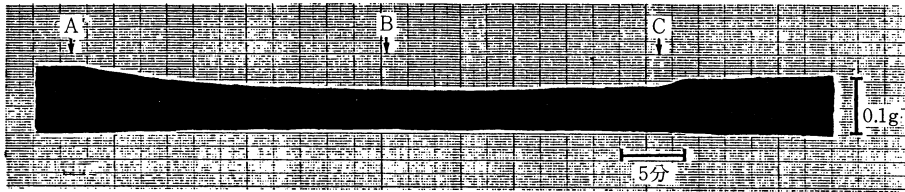
**Fig. 3.** Inhibition and recovery of tension by application and removal of nifedipine. Nifedipine is removed by simple wash out, without irradiation by ultra-violet light. Stimulation rate is 1/2 sec.



**Fig. 4.** A small increase in contraction tension produced by ultra-violet irradiation in the standard Ringer solution. Stimulation rate is 1/2 sec.



**Fig. 5.** Continuous recording of tension after treatment with nifedipine previously irradiated by ultra-violet light for 60 min. Stimulation rate is 1/2 sec.



**Fig. 6.** Inhibition and recovery of tension and removal of verapamil ( $5 \times 10^{-6}M$ ). At the arrow mark A, perfusion with verapamil Ringer solution starts, and at B, perfusing solution is switched from verapamil solution to the standard Ringer solution. At C, the muscle is irradiated by ultra-violet light, showing a slight acceleration of recovery. Stimulation rate is 1/2 sec.

また nifedipine Ringer 液を1日直射日光の照射する所に放置したものを灌流しても、収縮張力には変化は認められなかった。

#### 6. verapamil 作用後の張力回復

$5 \times 10^{-6}M$  の verapamil を作用させその回復期に xenon 光を照射すると、収縮張力の回復速度が速くなる。しかし、xenon 光を照射し続けても一時的に回復速度が速くなるだけでその回復速度は持続しないし、もとの張力以上に収縮張力が増強することはない (Fig. 6)。

### 考 察

nifedipine をカエル心房筋に作用させるとき、温血動物心筋に対する作用<sup>10)</sup>と同様に、プラトー相の短縮とそれにとまらぬ収縮張力の減弱が起こる。この作用は完全に可逆的ではなく、十分な時間をかけて Ringer 液で洗い続けても収縮の抑制は完全に除去されない。しかも、nifedipine の作用経過もその回復の経過も、定常に達するまでに10分以上を要し、筋線維間隙に薬物が拡散するに要する時間だけでは説明できない。Ca チャネルと nifedipine の解離恒数は 10 nM と報告されており、<sup>11)</sup>ここで使われた nifedipine 濃度ではそのほとんどすべてがチャネル蛋白と結合されていると期待できるが、その反応速度は小さいと予想できる。

nifedipine 濃度を  $1 \times 10^{-5}M$  に高めても収縮は完全に消失することはない、わずかな張力が残存している。ウサギ心室筋について、灌流液

中に nifedipine を加えるときは収縮は消失するが、もし筋小胞体からの Ca 放出を抑制すると収縮張力が残存することが報告され、ここでは、Na-Ca 交換機構を介しての Ca 流入が収縮に関与していると説明されている。<sup>12)</sup>カエル心房筋においては筋小胞体に対する処置を加えていない条件における収縮に際しても、Ca 電流に加えて Na-Ca 交換による Ca 流入が収縮に関わっていると推測される。

nifedipine の抑制作用からの回復について特徴的なことは、xenon 光で照射するとき、一過性に張力増大が認められることである。自動拍動を続けるニワトリ胚培養心筋細胞についても nifedipine 作用からの回復期に一過性の拍動数増加と収縮力増加とが認められる。<sup>13)</sup>古く Azuma<sup>14)</sup>は、両生類骨格筋線維を紫外線照射するとき、持続的収縮の発生と刺激に対する単収縮の減少が起こることを報告しており、その成因は紫外線が筋小胞体から Ca を放出させるためと考えられている。<sup>15)</sup>心筋試料についても、正常 Ringer 液で xenon 光を照射するとき、収縮張力は一過性に増大する (Fig. 4)。しかし、この収縮増大は常に認められる現象ではなく、また増大の程度も数%にすぎず nifedipine 作用からの回復中にみられる 20~30%以上の一過性収縮増大を説明するには十分ではない。patch clamp 法による研究によれば低濃度においては、nifedipine は Ca チャネルの開閉時間を長くすることが報告されている。<sup>16)</sup>nifedipine 液を正常 Ringer 液で洗浄しつつ xenon 光で照射するとき、筋線維周辺の

nifedipine 濃度が一様に速やかに低下して、Ca チャネル agonist としての作用を発揮するようになる可能性がある。しかし、 $1 \times 10^{-5}$ M nifedipine 液を 60~120 分間 xenon 光で照射した後、筋槽内に灌流して収縮に対する効果を検討したが、収縮増加は認められなかった (Fig. 5)。したがって、nifedipine の分解過程における産物が収縮増強に関与するとは考えられない。

回復期における収縮増強を細胞内 Ca 濃度の消長から説明することは興味深い。nifedipine が作用しているときには、Ca チャネルは抑制され、細胞内に入る Ca は減少するので細胞内の Ca イオン濃度は減少し、相対的に Na 流入-Ca 流出の逆方向性 Na-Ca 交換機構が抑制される。そのときに紫外線による nifedipine の急激な分解が起こると、この Na-Ca 交換が抑制されたまま Ca チャネルが開き細胞内に Ca が入り、また紫外線により筋小胞体よりの Ca が放出され、細胞内の Ca 濃度の相対的な増加が起こり、その結果筋収縮中の張力の増大をも

たらせるであろう。そして灌流液の Ca 濃度が高いときには細胞内に Ca が流入しやすいために収縮増強も大きく、Ca 濃度が低いときには減少するという結果はこの仮定を裏付けるものであろう。

Nifedipine 作用からの回復において xenon 光照射を与えないで、単に正常 Ringer 液で洗浄するときは、一過性の収縮増強相を認められなかった。nifedipine の除去される経過が遅く、回復の経過が細胞によって異なっているので、一過性の増強が除去されないでいる抑制効果によって蔽われてしまうためであろう。

もう一つの  $Ca^{2+}$  遮断剤である verapamil は、 $10^{-6}$ M においても抑制作用経過が遅く、また、張力の回復には必ずしも完全ではない。verapamil の  $K_d$  は 8nM で nifedipine のそれと大きくは異ならない。<sup>11)</sup>しかし、verapamil や D600 は長時間作用させるときは、チャネルを遮断する作用のほかに膜の構造や機能に対して広汎な変化を起こすような非特異的作用が加わるためと考えられる。

## 文 献

- 1) Reuter, H.: Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog. Biophys. mol. Biol.* 26: 1-43, 1973
- 2) Kohlhardt, M., Bauer, B., Krause, H. and Fleckenstein, A.: Differentiations of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors. *Pflugers Arch.* 335: 309-322, 1972
- 3) Noble, D.: The initiation of the heart beat. 2nd ed. Oxford, Clarendon Pr. 1979
- 4) Brown, H. F.: Electrophysiology of the sinoatrial node. *Physiol. Rev.* 62: 505-530, 1982
- 5) Hagiwara, N., Irisawa, H. and Kameyama, M.: Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 395: 233-253, 1988
- 6) Nayler, W. G. and Horowitz, J. D.: Calcium antagonists: A new class of drugs. *Pharmacol. Ther.* 20: 203-262, 1983
- 7) Sperelakis, N.: Electrophysiology of calcium antagonists. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19 (Suppl. II): 19-47, 1987
- 8) Molyvdas, P. A. and Sperelakis, N.: Comparison of the effects of several calcium antagonistic drugs (slow-channel blockers) on the electrical and mechanical activities of guinea pig papillary muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 162-169, 1983
- 9) 大北幸生: Ca-channel 遮断剤の作用回復期における摘出心筋収縮の変化. *日生理誌* 51: 41, 1989
- 10) Kohlhardt, M. and Fleckenstein, A.: Inhibition of the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.*

298 : 267—272, 1977

- 11) Marsh, J. D., Loh, E., Lachance, D., Barry, W. H. and Smith, T. W.: Relationship of binding of a calcium channel blocker to inhibition of contraction in intact cultured embryonic chick ventricular cells. *Circ. Res.* 53 : 539—543, 1983
- 12) Bers, D. M., Christensen, D. M. and Nguyen, T. X.: Can Ca entry via Na-Ca exchange directly activate cardiac muscle contraction? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20 : 405—414, 1988
- 13) Matsumura, M. and Toyota, H.: Actions of calcium channel blockers on the beating rhythm and membrane potential of cultured chick embryonic heart cells. *Kawasaki med. J.* 13 : 177—188, 1987
- 14) Azuma, Y.: Effect of ultraviolet rays upon skeletal muscle. *Proc. Soc. Lond. [Biol.]* 3 : 24—29, 1926
- 15) Endo, M.: Entry of fluorescent dyes into the sarcotubular system of the frog muscle. *J. Physiol.* 185 : 224—238, 1966
- 16) Hess, P., Lansman, J. B. and Tsien, R. W.: Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311 : 538—544, 1984