家兎心室筋細胞における再灌流不整脈の発生機序

—— 活性酸素による Ca 負荷と異常自動能の発現 ——

On the cellular basis of reperfusion arrhythmias in
rabbit ventricular myocytes

—— Induction of Ca^{2+} overload and triggered activity by
reactive oxygen intermediates ——

佐賀医科大学 生理学

松浦 博・鶴原 由一・坂口 昌之・額原 嗣尚

セントトーマス病院レイン研究所

Michael J Shattock

Department of Physiology, Saga Medical School, Hiroshi Matsuura,
Yoshikazu Tsuruhara, Masayuki Sakaguchi, Tsuguhisa Ehara. The
Rayne Institute, St. Thomas' Hospital, Michael J Shattock

異型狭心症における冠動脈攣縮の解除時や、冠動脈内血栓溶解療法による冠血行再開通後にしばしば重篤な不整脈が出現することが知られている¹⁾²⁾。このようないわゆる再灌流不整脈 (reperfusion arrhythmia)³⁾の発生には、虚血心筋の再灌流によって生じる活性酸素が密接に関与していると考えられており、その根拠として以下の実験事実をあげることができる。1) 虚血心筋の再灌流早期に再灌流不整脈発生の時間経過にはほぼ一致して活性酸素が生成した⁴⁾。2) 活性酸素消去剤投与により再灌流不整脈の発生頻度が低下した⁵⁾。3) 虚血/再灌流のない条件下においても活性酸素が不整脈を惹起した⁶⁾。

本研究は、このように再灌流不整脈の主要な発生機序と考えられている活性酸素による不整脈誘発機序を、細胞レベルで電気生理学的に検討したものである。

【方 法】

コラゲナーゼ処理⁷⁾により得られた家兎単一心室筋細胞にパッチクランプ法⁸⁾を適用して、全細胞記録 (whole-cell recording) により膜電位および膜電流の記録を行った。図1および図2の実験においては、細胞外灌流液にはタイロド液を用いその組成 (mM) は、NaCl, 140; NaH_2PO_4 , 0.33; KCl, 5.4; CaCl_2 , 1.8; MgCl_2 , 0.5; glucose, 5.5; HEPES, 5 で、NaOH にて pH = 7.4 に滴定した。電極内液 (細胞内液) (mM) は、K-aspartate, 110; KCl, 20; EGTA, 0.25; K_2 -ATP, 5; glucose, 5; HEPES, 10 で、KOH にて pH = 7.2 に調整した。Na/K ポンプ電流を記録するために用いた細胞外灌流液の組成 (mM) は、NaCl, 140; KCl, 5; CsCl, 2; BaCl_2 , 1; NiCl_2 , 2; MgCl_2 , 1; glucose, 5.5; HEPES, 5 で、電極内液 (mM) は、Cs-aspartate,

100; NaCl, 30; TEA-Cl, 20; MgCl_2 , 2; Mg-ATP, 5; CrP, 5; EGTA, 5; glucose, 10; HEPES, 10 とし、それぞれ pH = 7.4 および pH = 7.2 に調整した。本研究では活性酸素の生成には、ローズベンガル⁹⁾の光増感反応を用いた。ローズベンガルに光を照射すると、励起一重項分子となりさらに系間交差により励起三重項分子となる。励起三重項分子のもつ励起エネルギーが、酸素存在下において酸素へ転移して一重項酸素とスーパーオキシドが発生する⁹⁾¹⁰⁾。この反応では、光照射中は継続的に活性酸素の生成が起こる。今回の検討においてはローズベンガルを灌流液に加え、細胞外から活性酸素を作用させた。

【結 果】

I. 活性酸素による振動性電位の誘発

家兎心室筋細胞の膜電位に対する活性酸素の効果を検討した。活性酸素は、静止膜電位の軽度脱分極 (約 2-3 mV)、活動電位持続時間の延長、活動電位プラトー相および静止膜電位レベルでの振動性電位 (membrane potential fluctuation) を誘発した (図1.A, B.b)。活性酸素作用約6分後から、静止膜電位レベルにおける膜電位の振動が顕著となり、閾値に達した場合には triggered activity が生じた (図1.A, B.c)。この振動性膜電位とこれより派生する triggered activity が、活性酸素による不整脈の細胞レベルでの電気生理学的機序と考えられた。

高速フーリエ変換により求めたプラトー相 (約 -20 mV) および静止膜電位レベル (約 -70 mV) における膜電位振動の周波数は、それぞれ $2.7 \pm 0.2 \text{ Hz}$ ($M \pm \text{SE}$, $n = 6$) および $1.6 \pm 0.1 \text{ Hz}$ であった。

II. 活性酸素による一過性内向き電流の誘発

活性酸素により誘発された振動性膜電位の発生機序を明らかにする目的で、膜電位固定実験を行った

図1 活性酸素による振動性膜電位と triggered activity の誘発。A. 活性酸素作用下における膜電位のチャート記録。細胞に 0.1 Hz の電気刺激を加えて活動電位を誘発した。タイロッド液にローズベンガル(50 nM)を加えて光照射を行った(矢印)。ローズベンガル+光照射後約 6 分の時点(矢印)で電気刺激を止めた。B. コントロール(a), ローズベンガル+光照射約 3 分後(b)および 6 分 30 秒後(c)の活動電位。同じアルファベットは同一時点で得た記録であることを示す。

(図2). 活性酸素作用下においては脱分極パルスの後いずれの膜電位に clamp back しても振動性一過性内向き電流 (oscillatory transient inward current, i_{TI})¹¹⁾ が出現した(図2B). i_{TI} の発現は活性酸素により細胞内 Ca 負荷が誘発されたことを意味する。また脱分極パルス中の Ca 電流の不活性化の促進も細胞内遊離 Ca 濃度の上昇によるものと考えられる¹²⁾。活性酸素作用により -10, -30, -50 mV における定常電流が内向きに偏位しており, 内向き整流 K 電流が抑制を受けたと考えられる¹³⁾。これが活動電位持続時間の延長(図1B.b, c)の背景にあると思われる。

活性酸素による i_{TI} の反復出現が異常自動能を招来する振動性膜電位の本態であることを確認する目的で, i_{TI} の振動の膜電位依存性を検討してみた。-20 mV で記録された i_{TI} の振動の周波数は $3.2 \pm$

図2 活性酸素による一過性内向き電流の誘発。A はコントロール, B は活性酸素(ローズベンガル 50 nM + 光照射)投与 5 分後の記録を示す。-40 mV の保持電位から +20 mV へ 500 ms の脱分極パルスをかけ, 次に -10 mV, -30 mV および -50 mV に clamp back した。最下段にパルスプロトコルを示す。

0.2 Hz ($M \pm SE$, $n=6$) で, -70 mV においては 2.0 ± 0.1 Hz であった。これらの値は, それぞれプラトー相(約 -20 mV) および静止膜電位レベル(約 -70 mV)における膜電位振動の周波数にほぼ等しく, 異常自動能をひき起こす膜電位の振動が i_{TI} によるものであると考えられた¹⁴⁾。

Ⅲ. 活性酸素の Na/K ポンプ電流に対する抑制効果

活性酸素による細胞内 Ca 負荷の機序を検討する目的で Na/K ポンプ電流に対する影響を調べた。細胞外灌流液には K 電流を抑制する目的で $BaCl_2$, 1 mM と $CsCl$, 2 mM を, Ca 電流をブロックするため $NiCl_2$, 2 mM を加えた。電極内液は K 電流を抑制するために細胞内 K を Cs で置換しさらに TEA-Cl, 20 mM を加えた。先端径の大きな電極 (1.0-1.5 M Ω) を用いて細胞に 30 mM の Na を負荷した。この条件下においては Na/K ポンプ電流以外の電流成分は極力阻害されているため, 細胞外の K により活性化される電流成分を Na/K ポンプ電流と見なすことができる^{15) 16)}。図3A は -40 mV における保持電流のチャート記録で, 垂直の振れはランプ波による膜電位変化に対応する電流の変化を表す。コントロール時において細胞外の K 濃度を 5 mM から 0 mM にすると保持電流が +55 pA から -15 pA に減少し, この差電流 (70 pA) が -40 mV における Na/K ポンプ電流である。活性酸素を作用させると保持電流が徐々に減少していった。図3B はチャート記録上アルファベットで示された時点においてランプ波により記録された電流-電圧関係を示す。コントロール時ならびに活性酸素作用下における Na/K ポンプ電

図3 活性酸素(ローズベンガル 50 nM+光照射)のNa/Kポンプ電流に対する抑制作用。A. -40 mVにおける保持電流のチャート記録で、垂直の振れは1秒間に18 mV変化するランプ波(ramp voltage clamp)により生じた電流の変化を表す。[K⁺]_oを電流のチャート記録の上段に、活性酸素作用後の時間を下段に示した。B. コントロール時および活性酸素作用下において、細胞外のK濃度が5 mMおよび0 mMの時にランプ波により求めた電流-電圧関係。同じアルファベットは同一時点で得た記録であることを示す。C. 細胞外K感受性成分として差電流により求めたコントロール時(b-a)ならびに活性酸素作用下(d-c)におけるNa/Kポンプ電流。

流を、それぞれにおいて差電流により求めた(図3C)。いずれの膜電位においても活性酸素作用下におけるNa/Kポンプ電流(図3C, d-c)はコントロール時(図3C, b-a)の約60-70%に抑制された。0 mVにおけるNa/Kポンプ電流密度は $0.95 \pm 0.10 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ ($n=4$, コントロール)から、 $0.43 \pm 0.06 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ (活性酸素投与10分)に減少した。また細胞外のK濃度が0 mMのときに記録された背景電流(background current)は活性酸素によりほとんど影響を受けなかった(図3B, a, c)。

図4 Aはコントロール時ならびに活性酸素作用下におけるNa/Kポンプ電流の膜電位依存性を示すが、活性酸素により大きな影響は受けなかった。図4 Bは活性酸素によるNa/Kポンプ電流の減少の時間経過を示す。活性酸素作用約10分後においてNa/Kポンプ電流は約50%に減少した。

[考察・結論]

再灌流不整脈発現の細胞レベルでの電気生理学的機序を、家兎単離心室筋細胞に活性酸素を作用させてパッチクランプ法により検討した。

活性酸素により活動電位プラトー相および静止膜電位レベルにおいて反復する振動性電位が誘発され、さらにそれらのうち閾値に達したものにより単発もしくは反復するtriggered activityが発現した。

高速フーリエ変換を用いた周波数分析の結果、 i_{TI} が振動性膜電位の本態と考えられた。 i_{TI} は細胞内Ca負荷の結果、筋小胞体からCaが周期的に放出されることにより発現すると考えられており¹⁷⁾¹⁸⁾、活性酸素による i_{TI} の惹起は細胞内Ca負荷が誘発されたことを意味する。筋小胞体からのCa放出に膜電位依存性があるために i_{TI} の振動に膜電位依存性があると考えられている¹⁹⁾。

活性酸素による細胞内Ca負荷はNa/Kポンプ電流の抑制によりもたらされたと考えられた。活性酸素はNa/Kポンプ電流の膜電位依存性にほとんど影響を与えずに(図4.A)それを抑制したが、このことは、活性酸素によりactiveなNa/Kポンプ分子の数が減少した可能性を示唆する。Na/K ATPaseの β サブユニットはその細胞外側面に活性酸素に高い感受性のあるSH(sulfhydryl)基をもつことが知られており²⁰⁾、活性酸素によるSH基の酸化がその酵素活性を抑制したのかも知れない。

以上まとめると、活性酸素によるNa/Kポンプの抑制による細胞内Ca負荷の結果発現した i_{TI} を背景とする振動性膜電位およびこれより派生する自動反復放電(triggered activity)が、再灌流不整脈発現の細胞レベルでの電気生理学的機序である考えることができる。

図4 A. コントロール時(○)および活性酸素作用下(●)のNa/Kポンプ電流の膜電位依存性。それぞれの膜電位におけるNa/Kポンプ電流の大きさを+50 mVにおける値を基準として標準化したものを示す(6例の平均±標準偏差)。B. 活性酸素作用下におけるNa/Kポンプ電流の減少の時間経過。5例の結果を示し異なるシンボルは異なる実験を表す。

〔文 献〕

- 1) Tzivoni D, Keren A, Granot H, Gottlieb S, Benhorin J, Stern S: Ventricular fibrillation caused by myocardial reperfusion in Prinzmetal's angina. *Am Heart J* 1983; **105**: 323-325.
- 2) Goldberg S, Greenspan AJ, Urban PL, Muza B, Berger B, Walinsky P, Maroko PR: Reperfusion arrhythmia; A marker of restoration of antegrade flow during intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1983; **105**: 26-32.
- 3) Manning AS, Hearse DJ: Reperfusion-induced arrhythmias; Mechanism and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984; **16**: 497-518.
- 4) Garlick PB, Davies MJ, Slater TS, Hearse DJ:

Detection of free radical production in the isolated rat heart using a spin trap agent and electron spin resonance. *Circ Res* 1987; **61**: 757-760.

- 5) Bernier M, Hearse DJ, Manning AS: Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals; Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1986; **58**: 331-340.
- 6) Hearse DJ, Kusama Y, Bernier M: Rapid electrophysiological changes leading to arrhythmias in the aerobic rat heart; Photosensitization studies with rose bengal-derived reactive oxygen intermediates. *Circ Res* 1989; **65**: 146-153.
- 7) Powell T, Terrar DA, Twist VW: Electrical properties of individual cells isolated from adult ventricular myocardium. *J Physiol* 1980; **302**: 131-153.
- 8) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981; **391**: 85-100.
- 9) Paczkowski J, Lamberts JJM, Paczkowska B, Neckers DC: Photophysical properties of rose bengal and its derivatives. *J Frez Radic Biol Med* 1985; **1**: 341-351.
- 10) Lee PCC, Rodgers MAJ: Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochem Photobiol* 1987; **45**: 79-86.
- 11) Kass RS, Lederer WJ, Tsien RW, Weingart R: Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1978; **281**: 187-208.
- 12) Lee KS, Marban E, Tsien RW: Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: Joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985; **364**: 395-411.
- 13) Matsuura H, Shattock MJ: Effects of oxidant stress on steady-state background currents in isolated ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1991; **261**: H1358-H1365.
- 14) Matsuura H, Shattock MJ: Membrane potential fluctuations and transient inward currents induced by reactive oxygen intermediates in isolated rabbit ventricular cells. *Circ Res* 1991; **68**: 319-329.
- 15) Gadsby DC, Kimura J, Noma A: Voltage

- dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature* 1985; **315**:63-65.
- 16) Shattock MJ, Matsuura H: Measurement of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell voltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxidant stress. *Circ Res* 1993; **72**:91-101.
- 17) Kass RS, Tsien RW: Fluctuations in membrane current driven by intracellular calcium in cardiac Purkinje fibers. *Biophysical J* 1982; **38**:259-269.
- 18) Eisner DA, Valdeomillos M: Simultaneous measurement of tension, membrane current and intracellular calcium oscillations in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1985; **358**:74P.
- 19) Matsuda H, Noma A, Kurachi Y, Irisawa H: Transient depolarization and spontaneous voltage fluctuations in isolated single cells from guinea pig ventricles. Calcium-mediated membrane potential fluctuations. *Circ Res* 1982; **51**:142-151.
- 20) Pedemonte C, Kaplan JH: Chemical modification as an approach to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am J Physiol* 1990; **258**:C1-C23.