— 原 著 —

単一心室筋細胞の電気活動に及ぼす細胞内酸性化の影響

佐藤 良一

日本医科大学第1内科学教室 (主任: 奥村英正教授)

The effects of intracellular acidification on the electrical activity of single ventricular cell

Ryoichi Sato

The First Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

The effects of intracellular acidification on the electrical activity of single ventricular cell were examined by internal dialysis technique through a patch clamp pipette.

Mild intracellular acidification (pH_{pip} 6.0) evoked a time-independent outward current and stronger acidification (pH_{pip} 5.0) caused reduction of all current systems of the membrane including the evoked outward current. The pH_{pip} 6.0-induced current was specific to intracellular acidification and was separated into two components by the difference of the effects of Cd^{2+} and Ba^{2+} . Both components of the current could be diminished with the replacement of intracellular K^+ to Cs^+ and may be also carried by K^+ . A block of current systems by mild intracellular acidification (pH_{pip} 6.0) was confirmed in the case of the inward-rectifier K^+ channel using a single channel recording in the inside-out patch. The ineffectiveness of low pH_i (pH_{pip} 6.0) in the whole cell experiment could be explained by the existence of Na-H exchange system at the cell membrane, since even pH_{pip} 6.8 could suppress the membrane current under Na-free Tyrode solution.

Key words: intracellular pH, single ventricle cell of guinea pig, voltage clamp, ionic membrane currents, Na-H exchange mechanism

緒 言

心筋組織では、細胞内酸性化に伴いグルコース代謝障害^{1,2)}、電気機械的カップリング不全³⁻⁷⁾、および恐らくギャップジャンクションの閉鎖によるものと思われるが筋線維の縦方向の抵抗増加がみられる^{8,9)}。心筋へのプロトンの細胞外からの負荷に関しては多くの研究が行われているにもかかわらず¹⁰⁻¹⁴⁾、pHの細胞内作用に関してはわずかな研究しか発表されておらず、この作用はあまり重要性のないものと考えられていた^{15,16)}。しかしながら、最近、他の組織で細胞内pHが膜電流に直接的に作用を及ぼすことを証明した

報告が次第に増えてきている¹⁷⁾。

最近 Kurachi¹⁷⁾ は、モルモットの単一心室筋細胞に様々な pH 溶液を注入し、プラトー電位での時間-非依存性の outward current の増加ならびに Ca^{2+} 電流の減少を認めた。彼はプロトンの細胞注入による影響と Ca^{2+} および EGTA の注入による影響とを比較し、細胞内プロトンは心筋細胞の膜興奮性に直接影響を及ぼすかもしれないという見解を示した。しかし細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($(\text{Ca}^{2+})_i$) は細胞内 pH により容易に変化すること¹⁷⁻²⁰⁾、また高 $(\text{Ca}^{2+})_i$ により誘発される膜電流の変化が作用を複雑化すること^{21,22)} も明らかにされている。したがって、膜イオン電流系に及ぼす細胞内酸性化の影響を明白にするためには、プロトン濃度のみならず細胞内 Ca 濃度もコントロールする必要がある。

Present address: The First Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

本研究では、この目的のために細胞内透析法²³⁾を用い、心筋細胞の膜イオン電流に及ぼす細胞内酸性化の影響を検討した。

研究材料および方法

(1) 心筋細胞の分離

モルモットの心臓の単一心室筋細胞は、先に報告されている酵素解離法^{24,25)}により得た。簡単に説明すると、collagenase (0.04% w/vol Sigma type 1) をランゲンドルフ装置により冠動脈に灌流し、high K-low Cl 液 (4°C) に少なくとも1時間放置した後、心臓を開いた。次いで、心室筋組織の小片を切除し、対照タイロッド液の入った記録チェンバーで処理し、単一細胞を分離した。実験には桿状の透明な縞があり、表面に小気胞の生じていない細胞を用いた。

(2) 電気測定

活動電位および膜電流は、先端の直径が2~4 μ で、150 mM KCl 溶液を含んだ 0.6~1.3 M Ω の抵抗をもつ電極を用いて記録した²⁶⁾。まず最初に、吸引ピペットに標準タイロッド液を入れ、ピペットの電位を電流0レベルに調整した。電極の先端を細胞表面に付け、ゆっくりと吸引しながら 10~100 G Ω のシール抵抗を得た (~10~30 cm H₂O)。この高いシール抵抗を保ちながら、ピペット内の溶液を対照内液と交換した。電極内液の交換には数分間要した。次に、電極の先端の細胞膜をわずかな吸引をかけて破った。電流クランプの実験には従来の微小電極アンプファイアーを用

いた。ホールセルクランプ実験には series resistance compensation を行い、タイトシールホールセルクランプ法を用いた²⁶⁾。細胞内透析法については、Soejima らの方法によった^{28,27)} (Fig. 1)。

inward-rectifier チャンネルは、inside-out patch clamp 法により分析した²⁶⁾。

溶液：標準タイロッド液には次のものが含まれている。(mM) : NaCl 136.5, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.53, glucose 5.5 および HEPES 5.5. pH は NaOH により7.4 に調整した。Na 無含有のタイロッド液では、Na⁺ はすべて Tris⁺ に置換した。電極内液は次の組成からなっている。(mM) : K aspartate 130, KCl 20, ATP 5, ethylenglycol-bis (β -aminoethylether)-N, N'-tetra-acetic acid (EGTA) 5, HEPES, PIPES または MES 5, KH₂PO₄ 1, MgCl₂ 1. 細胞内 K⁺ を Cs⁺ により置換した場合の電極内溶液は次の組成からなっている。(mM) : Cs aspartate 130, EGTA 5, MgCl₂ 1, HEPES, PIPES または MES 5, KH₂PO₄ 1, ATP 5. pH は CsOH により、本文に示した値に調整した。(Ca²⁺) は Ca²⁺ 感受性電極 (Orion Research Microprocessor pH/millivolt meter 811) を用いて (Ca²⁺) を測定し、対照および pH 6.0 の溶液では 10⁻⁷ M に調整した。pH 5.0 の溶液の影響に関する実験では対照および pH 5.0 の溶液の (Ca²⁺) を約 5 $\times$ 10⁻⁷ M に調整した。

inside-out patch実験では、ピペット溶液には次のものが含まれている。(mM) : KCl 50, NaCl 100, CaCl₂

Fig. 1 Cell dialysis methods

Briefly the sharpened polyethylene (PE) tube was inserted into the electrode (EL) and through this PE tube various test solutions were perfused from the container (C). FC represents the fluid container.

2, HEPES 5, pH は KOH により 7.4 に調整した. 細胞膜の内側に接するバス溶液には, 次のものが含まれている. (mM): KCl 140, MgCl₂ 0.5, KH₂PO₄ 0.5, EGTA 1, ATP 2, HEPES (pH 7.4) または PIPES (pH 6.5) または MES (pH 6.0) 10. pH は KOH を用いて本文に示してある値に調整した. 実験操作中, すべての溶液は, ウォータージャケットを用いて 35~36°C に保たれた.

成 績

1. 細胞内酸性化の, 心室筋細胞の活動電位および膜電流に及ぼす影響

ピペット液の pH (pH_{pip}) を 7.2 (対照) から 6.0 に下げると, 活動電位の持続期間が短縮され (Fig. 2 B) プラトーの電位は徐々に低下していった (Fig. 2 A). pH_{pip} 6.0 で, 静止膜電位はやや過分極方向へ移動した (Fig. 2 D). pH_{pip} 5.0 にすると活動電位の持続期間および振幅が進行的に減少したが, 静止膜電位では脱分極が始まった. 全実験 ($n=5$) で, 静止膜電位は対照の場合には -74.4 ± 7.5 mV であったのに対し, pH_{pip} 6.0 の場合は -75.8 ± 6.5 mV とな

り, pH_{pip} 5.0 では -67.4 ± 0.2 mV へと低下した. 活動電位の振幅は, 対照では 132.3 ± 13.5 mV であり, それが pH_{pip} 6.0 では 127.7 ± 11.3 mV へと低下し ($p < 0.02$), pH_{pip} 5.0 では 104.0 ± 2.0 へとさらに低下した ($p < 0.02$). 90% の再分極化の時点での測定では, 活動電位の持続期間は対照では 332.9 ± 89.4 ms であったのが, pH_{pip} 6.0 では 261.0 ± 69.1 ms へと短縮し, pH_{pip} 5.0 では 157.9 ± 4.6 ms へとさらに短縮した.

上記の活動電位の変化の根底にあるイオン機序を明らかにするため, voltage clamp 下で pH_{pip} 6.0 および 5.0 の影響を検討した (Fig. 3, 4).

対照では, Ca²⁺ 電流 (i_{ca}), delayed outward current と inward-rectifying K⁺ current (i_{Krec}) が認められた. 膜電位を -30 mV に保つと, Na⁺ 電流は不活性化された. ピペットに低 pH_{pip} 6.0 溶液を灌流すると, holding current が外方向に 0.3 nA (0.2 ± 0.2 nA, $n=6$) 移動した. 脱分極パルス中の outward current もまた増大した. しかし脱分極中の outward current の時間-依存性成分および再分極後の current tail は, 有意な変化を示さなかった. 過分極

Fig. 2 Changes of the action potential with intracellular acidification

Membrane potentials were measured continuously under successive perfusions of control (pH_{pip} 7.2), pH_{pip} 6.0 and pH_{pip} 5.0 internal solutions. The action potential amplitude (A), the action potential duration measured at 90% of repolarization (B), and the resting membrane potential (D) are presented. In Fig. 2C, action potentials recorded at the control, 8.3 min after perfusion of pH_{pip} 6.0 solution and 12.5 min after changing pH_{pip} from 6.0 to 5.0 are shown. The shortening of the action potential at low pH_{pip} was significant ($p < 0.01$). The maximum rate of rise of the action potential also reduced (not shown in figure). Consistent with these findings, the threshold potential was increased 1.3 times ($n=2$) at pH_{pip} 6.0.

Fig. 3 Membrane currents under voltage clamp with pH_{pip} 6.0

A: the control membrane currents at pH_{pip} 7.2, B: the membrane currents after 10 min of changing pipette solution to pH 6.0. The holding potential was kept at -30 mV. The membrane currents were elicited with 330 ms clamp pulse to $+20$ mV $\sim$ $+60$ mV (top panels), -20 mV $\sim$ $+10$ mV (middle panels), and -40 mV $\sim$ -70 mV (bottom panels) by 10 mV steps. Dotted lines represent the zero current level. C: the current-voltage relations in the control (circles) and after switching to pH_{pip} of 6.0 (squares) are shown. Closed symbols are the initial current measured at peak of the inward current. Open symbols give the currents measured at the end of the clamp pulse (330 ms).

パルスにより誘発された inward current は増大し、電流の明らかな relaxation が著明となった。clamp パルスの初めと 100 ms 後の間で測定された i_{ca} の amplitude は有意に変化しなかった。この実験例では、 i_{ca} は対照では 3.2 nA であり、低 pH_{pip} 溶液では 2.9 nA であった。他の五つの実験例では、この値は対照で 3.1 ± 0.3 nA, pH_{pip} 6.0 では 3.1 ± 0.2 nA であった。 i_{ca} のピークは、時折、voltage axis に沿って幾分プラス方向に移動したが (10 mV 以下)、この移動は恒常性のあるものではなかった。マイナス方向への移動は、全く観察されなかった。

ピペットの溶液を pH_{pip} 5.0 にしたところ、 pH_{pip} 6.0 の場合に現れた outward current の増加が、初期にのみ短期間にわたりみられたのみで、 i_{ca} ならびに誘発された outward current も含めすべての電流系が徐々に減少していった (Fig. 4)。他の二つの実験例でも、同様の結果を確認した。これらの電流系の減少は、 pH_{pip} を 7.2 にしたところ対照のレベルまで回復

したが、 pH_{pip} 4.5 で灌流を行うと電流の減少は進行し、回復は全く観察されなかった。

上記の結果から、軽度の細胞内酸性化を行った場合 (pH_{pip} 6.0)、主としてプラトーレベルでの outward current の増加により、活動電位の短縮をひきおこしたということが結論できる。さらに高度に酸性化にすると (pH_{pip} 5.0)、すべての時間-非依存性膜電流の減少により、活動電流の持続期間がさらに短縮され、静止膜電位が脱分極した。そこで、細胞内酸性化による影響を明白にするため、軽度の細胞内酸性化により誘発される outward current の性質および強度の酸性化が膜電流に及ぼす遮断作用について次に検討した。

2. 細胞内酸性化による outward current の特性

(1) $(\text{Ca}^{2+})_{\text{i}}$ の増加の膜電流に及ぼす影響と低 pH_{pip} の影響との比較

細胞内の H^{+} と Ca^{2+} とは密接な関係があることが

Fig. 4 Membrane currents with pH_{pip} 5.0

Symbols are same as Fig. 3, except squares are the current-voltage relations of pH_{pip} 5.0. Inset current traces are obtained for the control (a) and pH_{pip} 5.0 (b) with the clamp pulse to +50 mV, 0 mV and -60 mV. The holding potential was -30 mV. Both the amplitude of i_{Ca} and the outward K^+ conductances were reduced. The horizontal calibration line represents 100 ms, and the vertical bar 1 nA.

知られているため、 pH_{pip} の低い溶液の灌流を行った場合、たとえピペット溶液の pCa を 5 mM の EGTA で調節したとしても、 $(\text{Ca}^{2+})_{\text{i}}$ に影響が現れるということが考えられる (Fig. 5)²⁹⁾。そこで、高 $(\text{Ca}^{2+})_{\text{i}}$ の膜電流に及ぼす影響を検討するため、低 pH_{pip} での灌流の場合と比較を行った。

pCa_{pip} を 10 から 6 へ変えた場合の効果が Fig. 6 に示されている。脱分極パルス間の outward current は pCa_{pip} 6.0 溶液の灌流後に次第に増加した。 pH_{pip} 6.0 の溶液の場合とは反対に、outward current の時間-依存性成分と再分極後の current tail は増加した。holding current は、内方向に 0.13 pA 移動した。-80 mV に過分極した場合の電流ジャンプは、対照では 1.2 nA であり、 pCa_{pip} 6.0 では 1.6 nA であった。+10 mV で測定した場合の i_{Ca} の振幅は、対照では 2.2 nA であり、 pCa_{pip} 6.0 では 2.1 nA であり、 i_{Ca} amplitude が高 $(\text{Ca}^{2+})_{\text{i}}$ により有意に影響されることはないことが示唆された。

$(\text{Ca}^{2+})_{\text{i}}$ 増加と $(\text{H}^+)_{\text{i}}$ が増加された場合の膜電流を比較するため、低 pCa_{pip} または低 pH_{pip} 溶液の

灌流に感受性のある成分を、各電位での対照値を差し引くことにより求めた。Fig. 7 に細胞内 Ca 濃度を上昇させた場合の膜電流に及ぼす影響を示した。低

Fig. 5 The relationship between pCa and pH . pCa is affected by changing pH because intracellular H^+ and Ca^{2+} are closely linked.

Fig. 6 Family of the voltage clamp records when pCa_{pip} lowered from 10 to 6. The current-voltage relations of pCa_{pip} 10 (closed and open circles) and pCa_{pip} 6 (closed and open squares) are shown. Inset panels show the original current records with pCa_{pip} 10 (a) and with pCa_{pip} 6 (b). Command potentials range between 0 mV and +60 mV by 10 mV steps. The time-dependent outward current was increased, without significant change in the amplitude of i_{Ca} .

pCa_{pip} による誘発電流の 330 ms での電流-電圧の関係から, reversal potential は -13 mV であることが示唆された (他の二つの実験では, -14 および -15 mV であった). outward current 成分はプラス電位で時間-依存性に増加し, delayed rectification を示した (Fig. 7-B,C). 低 pCa_{pip} 誘発性電流のこれらの電流-電圧の関係の特徴は, 細胞内に Ca^{2+} を注入することにより誘発される電流の特徴と非常に似ているため²⁰⁾, この電流は主として細胞内 Ca^{2+} により賦活化される非選択的陽イオンチャンネルから成っているかもしれない^{21,22)}. しかし, 後者のチャンネルが時間-非依存的であるといわれていることによりこの可能性は否定できる.

Fig. 8 は, pH_{pip} 感受性電流を示したものである. 低 pH_{pip} 誘発性の電流-電圧の関係は, 明らかに二つの成分から成っていた. 一方は 0 mV よりもプラスの電位で現れる成分であり, delayed-rectifying 特性を示す. この電流は特に時間-非依存性である. もう一方は, 0 mV からマイナスの電位で活性化されるもので,

-65 mV で電圧軸と交叉する. この成分は, inwardly-rectifying 特性を示す (Fig. 8-B,C).

330 ms での電流-電圧の関係から, マイナスから 0 mV までの電位での電流の性質は, 低 pCa_{pip} の場合と低 pH_{pip} の場合とで完全に異なることが明らかとなった. 0 mV よりもプラスの電位では, 差し引き電流は両者の場合とも delayed rectification を示した (Fig. 7 C, 8 C). しかしながら, H^+ により誘発される outward current は時間-非依存性であり, 0.2 mM の Cd^{2+} を負荷後, 完全に消失したが, Ca^{2+} により誘発される outward current は時間-依存性であり, 0.2 mM の Cd^{2+} 負荷によって完全に消失しなかった (Fig. 7-B,C, 8-B,C). これらの観察から, 低 pCa_{pip} により誘発される電流と低 pH_{pip} により誘発される電流とは起源が異なっているということ, また低 pH_{pip} 誘発性の電流は細胞内酸性化に特異的なものであるかもしれないということが明らかとなった.

(2) 低 pH_{pip} により誘発される電流に対する Cd^{2+} および Ba^{2+} の影響

Fig. 7 Effect of increasing intracellular Ca concentration on the membrane current. In A, top panel gives the experimental paradigm: membrane currents in response to +50 mV and -60 mV from the holding potential of -30 mV are shown, during control with pCa_{pip} 10 (1), pCa_{pip} 6 (2), the recovery from (2) (3) (not shown in Figure), pCa_{pip} 10 with 0.2 mM Cd^{2+} (4) and pCa_{pip} 6 with 0.2 mM Cd^{2+} (5). In B, difference curves of (2)-(1) and (5)-(4) are shown. The subtractions were made at the test pulse of +50 mV (top trace), -20 mV (middle trace) and -60 mV (bottom trace). In C, difference of the steady state I-V relations before and after increasing pCa from 10 to 6 is shown. Open triangles represent values obtained without Cd^{2+} (2)-(1) and the closed triangles those with Cd^{2+} (5)-(4).

前章で述べたとおり、細胞内酸性化により誘発される電流は二つの成分から成っていることが示唆された。このことを確認するため、 Cd^{2+} および Ba^{2+} のこの電流系に及ぼす影響を検討した。

Fig. 8 から明らかなように、 Cd^{2+} を添加しておいて (Fig. 8 A-②③), そして pH_{pip} を 7.2 から 6.0 に低下させた。 pH_{pip} 7.2 の条件下でバスに 0.2 mM の Cd^{2+} を添加した場合には、 Ca^{2+} 電流にしか減少はみられず、他の電流の変化は有意でなかった。バスに Cd^{2+} を添加して pH_{pip} を 7.2 から 6.0 に下げると、holding current は 0.3 nA だけ外方向に移動した。0 mV よりもプラスの電位で脱分極パルス中での電流は著しい変化はなかった。ピペットに pH 6.0 の溶液を継続的に灌流しながら、バス溶液から Cd^{2+} を washing out したところ、0 mV よりプラスの電位で著明な outward current が現れ、-70 mV までのマイナスの電位では inward current が増加した。

Cd^{2+} の添加の有・無での pH_{pip} 6.0 の場合と 7.2 の場合との差し引き後の電流を Fig. 8 B に示し、両差し引き電流の 330 ms での電流-電圧の関係を、Fig. 8 C の上のグラフにプロットした。0 mV よりもプラスの電位で低 pH_{pip} により誘発された電流はバス中の Cd^{2+} により完全に抑制された。0 mV よりもマイナスの電位では、電流は完全に遮断されることはなかった。0.2 mM Cd^{2+} による低 pH_{pip} 誘発性電流の膜電位に対するブロックの程度を 0 mV よりマイナスの電位でプロットした (Lower graph in Fig. 8 C)。この図よりブロックの比率はマイナスの電位になるに従い、より低くなることが明らかである。この所見は、 Cd^{2+} による 0 mV よりマイナスの電位での電流の遮断は、電圧-依存性であることを示唆しているといえる。これらのことから、 Cd^{2+} による低 pH_{pip} 誘発性電流の遮断機序は 0 mV よりプラス電位の場合と、0 mV よりマイナス電位の場合とで著しく異なるとい

Fig. 8 Separation of the pH_{ip} sensitive currents using the subtraction method
 In A, the top panel gives the experimental paradigms. ① pH_{ip} 7.2 without Cd^{2+} in the bath, ② pH_{ip} 7.2 with 0.2 mM Cd^{2+} in the bath, ③ pH_{ip} 6.0 with 0.2 mM Cd^{2+} , ④ pH_{ip} 6.0 without Cd^{2+} . In the lower panel, membrane currents with the command pulse of +60 mV and -70 mV are presented under each experimental condition indicated. Dotted line gives zero current level. In B, the subtracted currents without Cd^{2+} ④-① and with Cd^{2+} ③-② are presented. Numerals are the command pulse in mV. C: The current-voltage relations of the pH_{ip} 6.0 sensitive current without Cd^{2+} (open squares) and with Cd^{2+} (closed squares) are shown in the upper graph. In the lower graph, the ratio of the current with 0.2 mM Cd^{2+} to that without Cd^{2+} are plotted between -70 mV and -20 mV. The level of membrane potential where the current-voltage relations crossed is assumed as the reversal of the current.

うことが示唆された。このことは前出の電流分離は信頼のおけるものであるということを強く示唆している。すなわち、低 pH_{ip} 誘発性の電流は少なくとも2種類の成分からなっている。つまり、0 mV からプラスの電位での delayed-rectifying 特性を示す成分と、0 mV からのマイナスの電位での inwardly-rectifying 特性を示す成分である。

これらの電流の両成分間の違いは、inward-rectifier K channel の遮断剤としての Ba^{2+} を用いた場合にも確認された。バスに Ba^{2+} を添加すると、holding potential (-30 mV) および過分極パルスで低 pH_{ip} により誘発される電流が劇的に減少した (Fig. 9A)。-30 mV までのマイナス電位での電流-電圧の関係はほぼ直線的になったが、0 mV よりプラスの電位での

電流には明白な影響は現れなかった。 Ba^{2+} の添加の有・無において pH 6.0 での current trace ならびに 330 ms での電流-電圧の関係の差は、 Ba^{2+} が 0 mV までのマイナス電位では低 pH_{ip} は誘発性の電流を遮断したが、0 mV からプラスの電位では、outward current にいかなる影響も及ぼさなかったということを示唆している。0 mV までのプラス電位で、この差し引き曲線は内方向への偏位を示したが、このことは、 Ba^{2+} は、細胞内酸性化に起因する時間-依存性の outward current の進行的増加を抑制しないことを示唆しているといえる (Fig. 9A-b, c)。 Cd^{2+} を細胞外から負荷した場合の影響、ならびに低 pH_{ip} 誘発性電流に及ぼす Ba^{2+} の影響からこの電流は少なくとも2種類の成分からなるという結論が出された。

Fig. 9 Effect of Ba²⁺ on the low pH_{pip} induced outward currents

In A, the I-V relationships before (pH_{pip} 7.2, open circles) and after (pH_{pip} 6.0, closed circles) are shown. 2 mM Ba was applied to the bath while the intrapipette pH was kept as pH_{pip} 6.0 (triangles). The currents in response to +60 mV and -80 mV are shown in the inset. An obvious reduction is noted in the inward rectifier current, without appreciably affecting the outward current positive to 0 mV. In B, the subtraction curve from without (pH_{pip} 6.0) to with Ba (pH_{pip} 6.0 with Ba²⁺) is illustrated. The inset gives three current traces at the command pulses of +60 mV (upper trace), -40 mV (middle trace) and -80 mV (bottom trace). Letters a and b correspond to the subtracted current trace a and b respectively.

すなわち、0 mV までのプラス電位での delayed-rectifying 特性を示す成分と (d-成分), 0 mV までのマイナス電位での inwardly-rectifying 特性を示す成分 (i-成分) である。

(3) 細胞内 K⁺ の Cs⁺ への置換の低 pH_{pip} 誘発性電流に及ぼす影響

低 pH_{pip} により誘発される電流の inward rectifying 特性を示す成分は約 -70 mV で電圧軸を交叉するため、この成分は主として K⁺ により運搬されるものと思われる。しかし、delayed-rectifying 特性を示す成分の reversal potential は電流-電圧の関係からは不明瞭である。また、この成分の分離は十分でないため、delayed-rectifying 特性を示す成分の tail current の reversal potential を測定することも困難である。そこで、低 pH_{pip} により誘発される電流を運ぶイオンの種類を明らかにするため、細胞内 K⁺ が Cs⁺ により置換され、バース中に K⁺ が含まれていない条件下で (Cs/K 無含有の条件)、細胞内酸性化の影響を検討した。Cs/K 無含有の条件下で、細胞の K⁺ コンダクタンスは著しく抑制され、主な時間-依存性電流は

ic_a となり、holding potential は -30 mV であった。仮りに H⁺ が低 pH_{pip} 誘発性の電流の delayed-rectifying 特性を示す成分を運搬する主なイオンであるとする、この条件下で outward current が現れると予想される。しかし、pH_{pip} 6.0 の溶液を 20 分以上灌流しても、膜電流に測定可能な変化は全く現れなかった。低 pH_{pip} 灌流前、後の電流-電圧の関係は、完全に一致した (Fig. 10)。他の二つの実験でも、同じ結果が得られた。この所見から、pH_{pip} 6.0 により誘発される電流の両成分とも主として K⁺ により運搬され、プロトンにより運搬されるのではないということが示唆された。

3. Inward-rectifier K⁺ チャンネルに対する細胞内プロトンの遮断作用

高度の細胞内酸性化 (pH_{pip} 5.0) は、低 pH_{pip} 誘発性電流も含めてすべての膜電流系を抑制することが明らかにされている。この作用を inside-out patch 条件下での inward-rectifier K⁺ チャンネル (i_{Krec}) の場合について検討した。これは、この条件下で他のチャ

Fig. 10 Effects of pH_{pip} 6.0 on the membrane currents under Cs^+/K free condition
Under Cs^+/K free condition (intracellular K^+ is replaced by Cs^+ and extracellular K^+ is omitted), pH_{pip} was lowered from 7.2 to 6.0. The current-voltage relations with pH_{pip} 7.2 (circles) and with pH_{pip} 6.0 (squares) are plotted. Closed symbols represent the initial current-voltage relations at the peak of the inward current and the open symbols represent the late relations at the end of the command pulse (330 ms).

ンネルから電流の安定した記録をとることは不可能であるためである (Fig. 11).

i_{Krec} チャンネルを通る電流は Kameyama ら³⁰⁾, および Sakmann and Trube³¹⁾ の以前の研究の方法により, そのコンダクタンスおよびカイネティクスより容易に同定することができた. ここに示した例では, 対照では少なくとも三つのチャンネルが開閉していたが (Fig. 11 A), バスに pH 6.0 の溶液を用いると (膜の内側), チャンネルの開閉が完全に抑制された. バス溶液を pH 7.2 にもどすと, チャンネルの開閉が回復した. pH 6.5 の溶液ではチャンネルの開閉の遮断は観察されず ($n=3$), pH 5.0 ではチャンネルの開閉は不可逆的に遮断された. これらの結果から, ホールセルクランプ細胞内透析実験で得られた所見が確認された. しかし, チャンネルの遮断に必要な細胞膜内側の H^+ の濃度は, inside-out patch 実験の場合よりホールセルクランプ実験の場合のほうがはるかに

に高いと思われた.

細胞内酸性化による i_{Krec} 遮断の効果に関するこの差の説明として, 二つの可能性を考えることができる. ① i_{Krec} チャンネルの H^+ に対する感受性は, 機械的分離法により変化してしまっていて, チャンネルは低い pH に対する感受性がより高くなっている. しかし, H^+ による i_{Krec} チャンネルの遮断は常にほぼ pH 6.0 で観察されており, これは可逆性であるため, この差が pH_i の感受性の変化のみに起因しているという結論を出すことは, 困難であると思われる. ② ホールセルクランプ実験では, 膜の内側の実際の pH は, ピペット溶液の pH と同じ値になっていないかもしれない. 膜の内側付近の pH は, ピペットからの H^+ の供給と H^+ の膜を通じての排出の間のバランスにより決定されるべきである. これはまた, H^+ に対する細胞内緩衝能力にも依存しているが³²⁾, 定常状態では, 細胞内の H^+ に対する緩衝能力が限定されているため, これが膜の内表面で実際の H^+ 濃度を低下させる主な要因にはならないと思われる. したがって, H^+ のある種の排出機序が inside-out patch とホールセルとの間に観察された低 pH の効果の差

の主要原因であると思われる.

4. 細胞内酸性化条件下での, 細胞外 Na^+ 濃度の低下による影響

H^+ の膜を通しての排出に関しては, 哺乳動物の細胞で2種類の機序が提案されている. すなわち $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換機序および Na^+/H^+ 交換機序である^{33,34)}. 本実験では, バス溶液にもまた細胞内液にも重炭酸緩衝液は含まれていないため, 第一の機序は除外することができる. 第二の機序がどの程度寄与しているかを明らかにするため, Na^+ をバス溶液から除去した場合, i_{Ca} に対する pH_{pip} の効果にどのような影響が現れるかを検討した (Fig. 12).

低 pH_{pip} により誘発される電流の出現により複雑化するのを避けるため, Cs/K 無含有の条件下で i_{Ca} を分離して得た. Na 無含有, K 無含有の溶液中では, i_{Ca} は良好に分離され, 10 分以上安定した状態で観

Fig. 11 Blocking effects of low pH solution on the inward-rectifier K channel current under inside-out patch

1: Original current trace of inward rectifier K channel are shown. Continuous lines in the current traces represent the zero current level. The patch clamp pipette contained 50 mM K^+ . In A, at least three steps of unitary inward current through $i_{K,rev}$ channel were open in the patch. The current amplitude was 1.8 pA. In B, after 1.5 min perfusing pH 6.0 solution to the bath (inside site of the membrane), the inward rectifier channel was completely blocked, which was recovered partially after reperfusion of pH 7.4 solution.

2: Amplitude histogram of the single channel current at the resting potential with 50 mM K^+ in the pipette. In A, control solution, B, perfusion of pH 6.0 solution and C recovery in pH 7.4 solution. Unitary current and opening probability was calculated to be 1.8 pA and 0.29, respectively at pH 7.4. Under perfusion of pH 6.0 solution, the open probability of the channel was 0. At recovery, they were 1.8 pA and 0.27. Low pass filter of 800 Hz (48 dB/oct) was used.

3: Current-voltage relations of the patch current. The slope conductance was 30 pS. The conductance did not change in the control and after the recovery. Inset shows the condition of the electrode solution and the bath solution.

察された。 pH_{pip} を 6.8 まで低下させたとき、 i_{ca} の振幅は進行性に低下した。しかし、 pH_{pip} を 7.2 にしたところ部分的な回復がみられた (Fig. 12)。 pH_{pip} が 6.5 または 6.0 の場合には、 i_{ca} は急速に消失し、回復は全く認められなかった。これらの所見は、膜の内表面付近の H^+ 濃度は、細胞外 Na^+ との交換で過剰の H^+ が排出していくことにより、ピペット溶液中の濃度より低いという考え方と一致している。そこで、ホールセルクランプ実験で細胞外 Na^+ の存在下では、低 pH_{pip} は inside-out patch 実験の場合より効果が低くなった。このことは、 $(H^+)_i$ は細胞膜の Na-H 交換機序により、ホールセルクランプ実験ではピペット溶液よりはるかに低く保たれるからである。

考 察

1. 低 pH_{pip} 誘発性の outward current の性質

低 pH_{pip} 誘発性電流の発生に関しては、いくつかの可能性が考えられる。すなわち、細胞内酸性化により、① $(Ca^{2+})_i$ の増加が生じる、② $(Na^+)_i$ が増加する、③ $(ATP)_i$ が減少する、または④膜電流に特異的な変化が生じるのである。 $(H^+)_i$ の効果と $(Ca^{2+})_i$ の効果との比較から、①の可能性は無視することができる (Fig. 7, 8)。

細胞内酸性化はおそらく、細胞膜における Na-H 交換機序により細胞内 $(Na^+)_i$ の増加を引き起こし⁸⁵⁾、

Fig. 12 Effect of pH_{pip} 6.8 on the Ca current under Na-free Tyrode solution

In A, top panel gives the experimental paradigm; Bath solution was Na-free K-free Tyrode solution and the intrapipette solution was Cs-K free solution with different pH. In 1 and 2 where pH_{pip} was 7.2, the amplitude of i_{Ca} remained almost unchanged within Na free K free condition. When the pH_{pip} was switched to pH_{pip} 6.8, the amplitude of i_{Ca} progressively decreased. The current amplitude decreased progressively (3 and 4). After 10 min perfusion of pH 6.8 solution, the pH_{pip} was again switched to 7.2. The amplitude of i_{Ca} gradually returned to the control value (5). In B, the changes of the amplitude of i_{Ca} (closed triangles) and the 330 ms current levels (open triangles) with time are plotted.

さらにグルコース代謝に障害を与えることにより $(\text{ATP})_{\text{i}}$ も減少する³⁾。 $(\text{Na}^+)_{\text{i}}$ の増加も $(\text{ATP})_{\text{i}}$ の減少も、ラージコンダクタンスの特異的な K 電流は誘発するため^{36,37)}、低 pH_{i} 誘発性の電流を惹起する可能性もある。しかし、 Na_{i} -賦活性 K 電流ならびに ATP_{i} -感受性の K 電流は、0 mV までのプラス電位では inward-rectifying 特性を示す。両者の場合とも、チャンネルの開閉確率は、各電流とも一定している (-80 mV ~ +40 mV)。これらの特徴は、低 pH_{i} -誘発性の電流の二つの成分と異なっている。さらに、 Na_{i} -賦活性化 K 電流には 30 mM 以上の $(\text{Na}^+)_{\text{i}}$ が必要であり、また ATP_{i} -感受性電流は、 $(\text{ATP})_{\text{i}}$ が 1 mM 以下の場合に賦活化されている。本実験では、細胞は Na^+ は含まず 5 mM の ATP を含む内部溶液で灌流した。したがって②の $(\text{Na}^+)_{\text{i}}$ の増加、および③の $(\text{ATP})_{\text{i}}$ の減少は低 pH_{i} -誘発性電流の発生原因ではない。

最後の可能性として、④の細胞内のプロトンが特異的膜電流を発生するという可能性に関しては、プロトンの作用機序として三つが考えられる。すなわち、細胞内プロトンが ① H^+ -選択性チャンネルを通して流

れる、② delayed-outward current (i_{del}) と inward-rectifying K current (i_{Krec}) を修正する、および ③ H^+ に対し選択的でない特異的電流を賦活化する。Cs/K 無含有の条件下では、低 pH_{pip} 誘発性電流は消失するため、電流の主なチャージキャリアーはプロトンではなく、 K^+ であることが示唆される。カタツムリのノイロンおよび両生類の精母細胞で報告されているとおり、プロトンにより運ばれる電流^{38,39)}は、Cs/K 無含有の本研究条件下では検出されなかった (Fig. 10, 12)。しかし、今回の実験条件 (150 mM $(\text{Na}^+)_{\text{o}}$ で pH_{pip} 6.0、および 0 mM $(\text{Na}^+)_{\text{o}}$ で pH_{pip} 6.5~6.8) で、心筋細胞に H^+ チャンネルが存在するかどうかに関し結論を出すことはできなかった。

$(\text{H}^+)_{\text{i}}$ が電流を誘発する機序は、本研究の結果からもなお不明のままに残されている。細胞内プロトンが、 i_{del} および i_{Krec} を修正することにより、この電流を誘発するかもしれない。対照で i_{del} および i_{Krec} には有意な影響を及ぼさなかった Cd^{2+} が、低 pH_{pip} 誘発性の電流の両成分を遮断したことにより、細胞内酸性化は対照の電流を変化させるのではなく、特異的

電流系の賦活化により、電流は誘発するものとも考えることができる。

2. 心室筋細胞における Na-H 交換機序

細胞膜を通しての細胞内プロトンの排出機序に関しては、3種類の運搬系が提案されている^{34,40}。① Na/HCO₃-Cl/H 交換、② Na-H 交換、③ Cl-HCO₃ 交換。第一の機序は squid axon⁴¹、カタツムリおよびザリガニのノイロン^{42,43}、および barnacle の筋肉⁴⁴などの哺乳類以外の動物細胞でしか認められていない。myocyte を含む哺乳類の細胞では、pH 感受性の電極または染料による細胞内 pH の測定で、後者の二つの機序が細胞膜に存在することが明らかにされている^{34,35,40,45,46}。今回の研究結果から、電極からの細胞内酸負荷は、対照のタイロッドより Na 無含有のタイロッド液中のほうが膜電流に対しはるかに大きな効果を示すことが明らかとなった。この所見は、細胞膜の Na-H 交換機序が能動的なものであり、ピペットから負荷されたプロトンは、対照タイロッド液の灌流下では細胞から急速に排出されると考えれば、説明をつけることができる。バス溶液にもまた内部溶液にも重炭酸緩衝液は含まれていないから、われわれの実験で Cl-HCO₃ 交換機序は除外される。このことは、他の組織中で明らかにされているように、モルモットの心室筋細胞では2種類の交換機序が密接な相互関係を保っていないことを示唆している⁴⁰。

Na-H 交換における Na⁺ と H⁺ のカップリング比は、様々な組織で 1:1 であるといわれている³⁴。しかし、心筋の Purkinje 線維では、Deitmer and Ellis³⁵は、細胞内 Na⁺ の有意な緩衝がないと推定して、細胞内 Na⁺ と H⁺ の測定から、1:1.6 という比率を算出している。Na-H 交換のカップリング比が1以下である場合には、この系は electrogenic でなくてはならず、細胞内の酸性化の下で exchange を通して実質的な outward current が生じると予想される。今回の実験では (Fig. 10)、Cs/K 無含有条件下で pH_{pip} 6.0、の細胞内酸性化で (150 mM (Na⁺)_o)、膜電流にいかなる測定可能な変化も現れなかった。この所見は、心室筋細胞の Na-H 交換は electroneutral であることを示唆している。

細胞外 Na⁺ すべてを Tris⁺ により置換して、Na-H 交換機序を失活された条件下でも、i_{ca} の抑制の発現は遅延する (Fig. 12)。i_{ca} の振幅は、酸性の内部溶液の灌流後最初の数分間は有意に変化しなかった。

K⁺ から Cs⁺ への置換の場合から推定してみると、細胞内環境の電極内液による置換の速度は3分以内であるため²⁹、観察された効果の遅延徐化は、心室筋細胞において、他の H⁺ の効果的な細胞内緩衝機序の存在を示唆している。

3. 細胞内と細胞外の低 pH の効果の比較

Na 無含有のタイロッド液中で数分以上、酸性溶液をピペットに灌流した後では、pH_{pip} 6.8 の溶液でも i_{ca} を対照の 20% まで低下させる (Fig. 12)。一方、細胞外酸化の場合には i_{ca} はカエルの心房線維では pH 5.6 で対照の 40% に減少し¹⁰、ネコの心室筋標本では pH 5.5 で 33%¹¹に、またラットの単一心室筋細胞では約 55%¹⁴に減少した。0.23 pH units/pH_o unit による細胞内 pH の変化が、文字通り重炭酸無含有の HEPES 緩衝タイロッド溶液の灌流による Purkinje 線維の測定の場合に起こりうると仮定すると³⁵、pH 5.5~6.0 のバス溶液下での細胞の pH_i は、非透析細胞では 6.8~6.9 と算出される。したがって、観察された i_{ca} に対する細胞外アシドーシスの抑制作用は、それに伴う細胞内酸性化に帰することができると思われる。細胞外酸性化の場合、細胞内の pH の低下により Ca 電流が減少するという考え方が、ヒトデの卵母細胞ではじめて示された⁴⁷。

Moody and Hagiwara⁴⁷ は、細胞外酸性化の場合、外部の pH の低下ではなく内部の pH の低下によりヒトデの卵母細胞の inward-rectifier K チャンネルを遮断することを明らかにしている。細胞の内側からのプロトンによる i_{Krec} の asymmetric block も、カエルの骨格筋で確認されている⁴⁸。i_{Krec} に対する (H⁺)_i 遮断の pH は、ヒトデの卵母細胞では 6.26 であり⁴⁷、カエルの骨格筋では 6.1 であった⁴⁸。inside-out path の結果からみると、心室筋細胞における pH は、6.0~6.5 でなくてはならないが、今回の研究で著者は正確な用量-反応の関連を得ることはできなかった。

以上のことから、心室筋膜電流系は細胞外酸性化よりも細胞内酸性化により、容易に影響され、細胞の内側へのプロトンの蓄積は、Na-H 交換機序を介してプロトンを sarcolemma を通して排出させることにより効果的に抑制することができると、結論することができる。

結 論

1) 細胞内透析法によって、細胞内 pH を酸性 (pH=6.0) にしたところ、細胞内酸性化により誘発される電流系の発生を確認した。この酸誘発性電流出現に際して、 i_{Ca} amplitude は不変であったが活動電位持続期間の短縮、および静止膜電位の過分極が見られた。

2) さらに強い細胞内酸性化 (pH=5.0) により i_{Ca} のみならず、すべての膜電流が抑制された。

3) この酸誘発性電流は電位依存性に二つの成分に分けることができた。一つは 0 mV よりもプラスの電位で認められる時間-非依存性の delayed-rectifying 特性を示す outward current であり、他の一つは、0 mV よりもマイナスの電位で認められる電流系であった。

4) これらの酸誘発性電流は K イオンによって運ばれることが証明された。

5) 細胞内酸負荷に対するシングルチャンネルレコーディングとホールセルクランプ法との成績から、細胞内 H^+ の排出機序の存在、特に Na-H exchange 関与の重要性が示唆された。

6) Na-H exchange により細胞内 pH は効果的に調節されており、Na-H exchange 抑制下では、細胞外からよりも細胞内から、効果的に膜電流系は H^+ によって抑制されることが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、直接の御指導を頂きました岡崎国立共同研究機構生理学研究所入沢宏教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Williamson, J.R., Schaffer, S.W., Ford, C. and Safer, B.: Contribution of tissue acidosis to ischemic injury in the perfused rat heart. *Circulation*, **53** (Suppl.), 3~14, 1976.
- 2) Roos, A. and Boron, W.: Intracellular pH. *Physiol. Rev.*, **61**, 296~434, 1981.
- 3) Katz, A.M. and Hecht, H.H.: The early "pump" failure of the ischemic heart. *Am. J. Med.*, **47**, 497~502, 1969.
- 4) Poole-Wilson, P.A.: Is early decline of cardiac function in ischemia due to carbon-dioxide retention? *Lancet*, **2** (7948), 1285~1287, 1975.
- 5) Poole-Wilson, P.A.: Measurement of myocardial intracellular pH in pathological states. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **10**, 511~526, 1978.
- 6) Steenbergen, C., Deleuw, G., Rich, T. and Williamson, J.R.: Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ. Res.*, **41**, 849~858, 1977.

- 7) Tsien, R.D.: Possible effects of hydrogen ions in ischemic myocardium. *Circulation*, **53** (Suppl. 1), 14~16, 1976.
- 8) Reber, W.R. and Weingart, R.: Ungulate cardiac Purkinje fibres; The influence of intracellular pH on the electrical cell-to-cell coupling. *J. Physiol. (Lond.)*, **328**, 87~104, 1982.
- 9) DeMello, W.C.: Cell coupling and healing-over in cardiac muscle. "Physiology and pathophysiology of the heart" (Sperelakis, N. ed.), p. 493~501, Martinus-Nijhoff publishing, Boston, 1984.
- 10) Chesnais, J.M., Corabeuf, E., Sauvait, M.P. and Vassas, J.M.: Sensitivity to H^+ , Li^+ and Mg^{++} ions of the slow inward sodium current in frog atrial fibres. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **7**, 627~642, 1975.
- 11) Kohlhardt, M., Haap, K. and Figulla, H.R.: Influence of low extracellular pH upon the Ca inward current and isometric contractile force in mammalian ventricular myocardium. *Pflügers Arch.*, **366**, 31~38, 1976.
- 12) Vogel, S. and Sperelakis, N.: Blockade of myocardial slow inward current at low pH. *Am. J. Physiol.*, **233**, C99~C103, 1977.
- 13) Brown, R.H., Cohen, I. and Noble, D.: The interactions of protons, calcium and potassium ions on cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)*, **282**, 345~352, 1978.
- 14) Yatani, A. and Goto, M.: The effect of extracellular low pH on the plateau current in isolated, single rat ventricular cells; A voltage clamp study. *Jpn. J. Physiol.*, **33**, 403~415, 1983.
- 15) Vaughan Williams, E.M. and Whyte, J.M.: Chemosensitivity of cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, **189**, 119~137, 1967.
- 16) Sperelakis, N.: Changes in membrane electrical properties during development of the heart. "The slow inward current and cardiac arrhythmias" (Zipes, D.P., Bailey, J.C. and Elharrar, V. eds.), p. 221~262, Martinus-Nijhoff Publishing, Boston, 1980.
- 17) Kurachi, Y.: The effects of intracellular protons on the electrical activity of single ventricular cells. *Pflügers Arch.*, **394**, 264~270, 1982.
- 18) Bers, D.M. and Ellis, D.: Intracellular calcium and sodium activity in sheep heart Purkinje fibres; Effect of changes of external sodium and intracellular pH. *Pflügers Arch.*, **393**, 171~178, 1982.
- 19) Lea, T.J. and Ashley, C.C.: Carbon dioxide or bicarbonate ions release Ca^{2+} from internal stores in crustacean myofibrillar bundles. *J. Membr. Biol.*, **81**, 115~125, 1981.
- 20) Vaughan-Jones, R.D., Lederer, W.J. and Eisner, D.A.: Ca^{2+} ions can affect intracellular pH in mammalian cardiac muscle. *Nature*, **301**, 522~524, 1983.
- 21) Matsuda, H., Noma, A., Kurachi, Y. and Irisawa, H.: Transient depolarization and spontaneous voltage fluctuations in isolated single cells from guinea pig ventricles. *Circ. Res.*, **51**, 142~151, 1982.
- 22) Colquhoun, D., Neher, E., Reuter, H. and Stevens, G.

- C.F. : Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature*, **294**, 752~754, 1981.
- 23) Matsuda, H. and Noma, A. : Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea pig. *J. Physiol. (Lond.)*, **357**, 553~573, 1984.
 - 24) Isenberg, G. and Klöckner, U. : Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflugers Arch.*, **395**, 6~18, 1982.
 - 25) Taniguchi, J., Kokubun, S., Noma, A. and Irisawa, H. : Spontaneously active cells isolated from the sino-atrial and atrio-ventricular nodes of the rabbit heart. *Jpn. J. Physiol.*, **31**, 547~558, 1981.
 - 26) Hamill, O.P., Marty, A., Neher, A.E., Sackmann, B. and Sigworth, F.J. : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, **391**, 85~100, 1981.
 - 27) Soejima, M. and Noma, A. : Mode of regulation of the ACh-sensitive K channel by the muscarinic receptor in the rabbit atrial cells. *Pflugers Arch.*, **400**, 424~431, 1984.
 - 28) Fabiato, A. and Fabiato, F. : Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. (Paris)*, **75**, 463~505, 1979.
 - 29) Matsuda, H. : Effects of intracellular calcium injection on steady state membrane currents in isolated single ventricular cells. *Pflugers Arch.*, **397**, 81~83, 1983.
 - 30) Kameyama, M., Kiyosue, T. and Soejima, M. : Single channel analysis of the inward rectifier K current in the rabbit ventricular cells. *Jpn. J. Physiol.*, **33**, 1039~1056, 1983.
 - 31) Sakmann, B. and Trube, G. : Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol. (Lond.)*, **347**, 641~657, 1984.
 - 32) Sakmann, B. and Trube, G. : Voltage dependent inactivation of inwardly-rectifying single-channel currents in the guinea-pig heart cell membrane. *J. Physiol. (Lond.)*, **347**, 659~683, 1984.
 - 33) Ellis, D. and Thomas, R.C. : Microelectrode measurement of the intracellular pH of mammalian cardiac muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, **262**, 755~771, 1976.
 - 34) Thomas, R.C. : Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. *J. Physiol. (Lond.)*, **354**, 3~22, 1984.
 - 35) Deitmer, J.W. and Ellis, D. : Interactions between the regulation of the intracellular pH and sodium activity of sheep cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)*, **304**, 471~488, 1980.
 - 36) Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H. and Irisawa, H. : Intracellular Na activates a K⁺ channel in the mammalian cardiac cells. *Nature*, **309**, 354~356, 1984.
 - 37) Noma, A. : ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*, **305**, 147~148, 1983.
 - 38) Byerly, L., Meech, R. and Moody, W. : Rapidly activating hydrogen ion currents in perfused neurones of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Physiol. (Lond.)*, **351**, 199~216, 1984.
 - 39) Barish, M.E. and Baud, C. : A voltage-gated hydrogen ion current in the oocyte membrane of the axolotl, *Ambystoma*. *J. Physiol. (Lond.)*, **352**, 243~263, 1984.
 - 40) Boron, W.F. : Transport H⁺ and of ionic weak acids and bases. *J. Membr. Biol.*, **72**, 1~16, 1983.
 - 41) Boron, W.F. and DeWeer, D. : Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO₂, NH₃, and metabolic inhibitors. *J. Gen. Physiol.*, **67**, 91~112, 1976.
 - 42) Thomas, R.C. : The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, **255**, 715~735, 1976.
 - 43) Moody, W. : The ionic mechanism of intracellular pH regulation in crayfish neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, **316**, 293~308, 1981.
 - 44) Boron, W.F., McCormick, W.C. and Rose, A. : pH regulation in barnacle muscle fibers; Dependence on extracellular sodium and bicarbonate. *Am. J. Physiol.*, **240**, C80~C89, 1981.
 - 45) Vaughan-Jones, R.D. : Regulation of chloride in quiescent sheep-heart Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive micro-electrodes. *J. Physiol. (Lond.)*, **295**, 111~137, 1979.
 - 46) Piwnicka-Worms, D. and Lieberman, M. : Microfluorometric monitoring of pH_i in cultured heart cells; Na⁺-H⁺ exchange. *Am. J. Physiol.*, **244**, C422~C428, 1983.
 - 47) Moody, W. and Hagiwara, S. : Block of inward rectification by intracellular H⁺ in immature oocytes of the starfish *Medaster aequalis*. *J. Gen. Physiol.*, **79**, 115~130, 1981.
 - 48) Blatz, A.L. : Asymmetric proton block of inward rectifier K channels in skeletal muscle. *Pflugers Arch.*, **403**, 402~407, 1984.

(受付: 1985 年 10 月 3 日)