— 原 著 —

ウサギ洞房結節細胞に対する低酸素の陰性変時作用について

櫛方 美文

日本医科大学第1内科学教室 (主任: 奥村英正教授)
藤田学園保健衛生大学医学部総合医学研究所 (指導: 渡部良夫教授)

Negative chronotropic effect of hypoxia on the rabbit sinus node

Yoshibumi Kushikata

The First Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Using small preparations ($0.2 \times 0.2 \times 0.2$ mm) of the rabbit sinus node, I studied the effects of hypoxia ($pO_2=20$ mmHg) on the sinus node pace maker. Hypoxic perfusion caused a progressive decrease in the spontaneous firing frequency, eventually leading to quiescence. The membrane potential attained at the cessation of spontaneous activity was -51.0 ± 3.5 mV, which was significantly more negative than that obtained by verapamil perfusion (-42.0 ± 1.0 mV) under a normoxic condition ($pO_2=140$ mmHg). The termination of spontaneous firing by hypoxic superfusion was preceded by a decrease in the rate of diastolic depolarization. The action potential duration tended to be shortened but no significant changes were observed in other parameters of the action potential. Continuous hypoxic superfusion caused a greater hyperpolarization to -63 ± 6 mV. Such changes were reversed with the resumption of normoxic superfusion. The time course of hyperpolarization was accompanied by a reduction in the membrane resistance, suggesting an increased membrane permeability. Voltage clamp experiments using the double microelectrode method were carried out during the initial normoxic superfusion and after the cessation of spontaneous firing with hypoxia. The current-voltage (i-v) relationships were shifted outward by hypoxia at potentials positive to -80 mV, and the magnitude of the shift became greater with the application of more positive test potentials. The hypoxia-induced component of the steady-state current had a reversal potential of -79.2 ± 3.7 mV and showed no time dependency. The slow inward current was not significantly altered on cessation of the action potential. These results suggest that the depression of sinus node automaticity by hypoxia results from an increase in the K^+ current, which was formerly supposed to be a change in the background current.

Key words: sinus node, automaticity, hypoxia, voltage clamp method, double microelectrode

緒 言

洞結節の自動能が心筋虚血時に抑制されることは臨床上良くみられる事実である^{1,2)}。また、病的洞結節症候群の一因として洞結節領域の虚血が挙げられている³⁾。虚血の際には低酸素状態を伴うが、心筋に対する低酸素の効果は、心室筋や Purkinje 線維といった高膜電位性組織ではかなり良く検討されてきた⁴⁻¹¹⁾。一方、洞結節細胞に与える低酸素の影響についてもこれまで二、三の実験的報告がみられ、自動能の抑制、活動電位振幅や拡張期脱分極速度の減少などが起こるとされ

るが¹²⁻¹⁴⁾、確定的な成績であるとは言い難い。細胞膜電流のうち緩徐な内向き電流(i_{si})は、洞結節における pace maker 電位の発生および活動電位の立ち上がり (phase 0) に主要な役割を演ずることが知られているが、 i_{si} の活性化は phosphorylation を介して行われるので¹⁵⁾、その基質である ATP の減少は i_{si} を抑制するであろう。また、ATP の減少は Na-K pump を抑制して細胞内 Na の増加および Ca の増加を来す。このうち、Na の増加は心室筋などで知られている Na activated gK (細胞内 Na 濃度依存性 K 電流)¹⁶⁾の活性化をもたらし、細胞内 Ca の増加は Ca activated gCa (細胞内 Ca 濃度依存性 Ca 電流)¹⁷⁾の活性化をもたらす可能性がある。しかし、細胞内 Ca の増加は Ca 電流の駆動力を減少させ、かつ Ca 電流の不活性化を

Correspondence to Yoshibumi Kushikata, The First Department of Internal Medicine, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

促進する結果、 i_{si} を減少させる方向に働くかも知れない。

一方、Noma and Irisawa¹⁸⁾により洞結節微小標本を用いた実験法が導入されて以来、洞結節の電気生理学的性質に関する知識は飛躍的に増してきた。しかしながら、このような空間固定された自動標本に対する低酸素の効果を検討した報告はない。そこで、本実験ではウサギ洞結節微小標本を用い、細胞膜の諸特性に対する低酸素の影響につき電気生理学的に検討した。

研究材料および方法

体重 1.5~2.0 kg のウサギの項部を叩打、頸動脈切開によりシャ血の後、開胸して心臓を迅速に摘出した。洞房結節領域を実体顕微鏡下に切離後、その中央部を幅 0.2 mm の短冊形に切り出し、さらに絹糸にて結紮することにより 0.2×0.2×0.2 mm 大の微小標本作製した。この微小標本をタングステン線を用いて組織槽中に固定し、正常 Tyrode 液にて灌流した。用いた Tyrode 液の組成は以下のとおりである。NaCl 136.9 mM, KCl 4.0 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1.0 mM, NaH₂PO₄ 0.33 mM, glucose 10 mM. pH は Na₂HPO₄ により 7.4 に調整し、液温は恒温槽を用い 37±1℃ に保った。正常 Tyrode 液は平常の大気圧下で O₂ を吹き込むことなく使用したが、その組織槽での酸素分圧は 140 mmHg であった。低酸素液は正常 Tyrode 液から glucose を除いたものに 100% N₂ を 30 分以上吹き込むことにより作製、その酸素分圧は 20 mmHg であった。

膜電位は 3 M KCl を満たしたガラス微小電極（電極抵抗 10~40 MΩ）を用い、通常の高入力抵抗増幅器により記録した。活動電位 0 相の最大脱分極速度は時定数 1 msec の微分増幅器に活動電位を入力することにより得た。自発興奮頻度の測定には日本光電製の心拍計（AT-600 G）を用いた。

膜電位固定実験は Noma and Irisawa¹⁸⁾ に準じ、二重微小電極法を用いて行った。その際の膜電流測定には New and Trautwein¹⁹⁾ の回路と同様の装置を用いた。全実験を通じ、これらの電気信号はストレージ・オシロスコープ（テクトロニクス社 5113 型）およびレクチャー（日本光電 RJG-4124 型）上に表示し、同時にデータレコーダー（TEAC 社 R-81 型）に保存した。得られたデータは、再度ミニコンピュター（Nicolet 社 1180 E 型）に入力し、解析を行った。

解析に用いた活動電位の指標は以下のとおりに定義

した。オーバーシュート（OS）および最大拡張期電位（MDP）はそれぞれ活動電位の最も陽性と最も陰性の電位とし、両者の差を活動電位振幅（APA）とした。拡張期電位（phase 4）に引かれた接線の傾きより拡張期脱分極速度（RDD）を求め、この接線と活動電位の立ち上がり（phase 0）に一致させた直線との交点を発火電位（TP）と定めた。50%および 100%活動電位持続時間（APD₅₀, APD₁₀₀）はそれぞれ TP から 50%再分極点と 100%再分極点までの時間とし、100%再分極点は最大拡張期電位到達点とした。解析結果は、Student's *t* test により検定し、*p* 値が 0.05 以下を有意と判定した。

結 果

ウサギ洞結節細胞活動電位に及ぼす低酸素灌流（glucose free）の効果の代表的な例を Fig. 1 に示す。本標本では 15 分間の対照灌流中自発興奮頻度は毎分 150 拍であった。次いで低酸素灌流を開始したところ自発興奮頻度（SFF）の急激な低下が観察され、1 分半後に自発活動が停止した。活動停止時の膜電位は -54 mV であったが、低酸素液の持続灌流により -71 mV まで 17 mV の過分極を示した。再度正常

Fig. 1 Records from a typical experiment illustrating the effects of hypoxic perfusion on the spontaneous action potential of the rabbit sinus node.

This preparation showed a spontaneous activity at the rate of 150/min. The activity ceased 1.5 minutes after the start of hypoxic perfusion (indicated by the black bar). This was followed by a hyperpolarization of -17 mV. Spontaneous firing was restored after several seconds of perfusion with normal oxygenation. AP denotes action potential, dV/dt, the first derivative of the action potential, and SFF, the spontaneous firing frequency, respectively.

Fig. 2 High speed recordings of the action potential (upper trace) and its first derivative (lower trace) illustrating the effects of hypoxia. C denotes the control and the numbers 6-9 denote the duration of hypoxic perfusion in minutes. A progressive reduction in the spontaneous firing frequency is evident, which results from a decrease in the rate of diastolic depolarization. A transient increase of dV/dt was observed after nine minutes of hypoxic perfusion.

Tyrode 液で灌流すると、膜の急速な脱分極およびそれに伴う自発興奮の回復をみた。洞結節の自発活動が停止するまでの時間は標本により著しく異なった。30分までの低酸素灌流を試みた一連の実験で、低酸素灌流による自発活動の停止は約 1/2 (41 例中 19 例) に認められた。また、自発活動の停止直後に得られた静止

電位は -51 ± 3.5 mV であった。これに対し、同様の標本において verapamil を用いて得られた静止電位は、諸家によれば -40 mV 程度であり、 10^{-6} M verapamil を用いた今回の検討でも -42 ± 1 mV ($n=4$) の値を示した。静止後の膜の過分極は自発活動停止例に共通してみられ、過分極が十分に進行するまで安定した静止電位の記録が可能であった 5 例での膜電位の平均は -63 ± 6 mV であった。

Fig. 2 では対照時および低酸素灌流中の活動電位波形の比較を示す。この例は低酸素開始 10 分後に自発活動が停止したもので、Fig. 2 は対照時および低酸素開始 6 ~ 9 分後の活動電位(上段)、およびその微分波形(下段)を重ね撮りしたものである。低酸素灌流開始後自発興奮頻度が順次低下し、それは主に拡張期脱分極速度の低下に起因するのが明らかである。活動電位持続時間および最大拡張期電位には著明な変化は認められなかった。また最大脱分極速度は灌流後 9 分の時点で一過性に対照時より増加した。他の 9 例でも自発興奮頻度の漸減と拡張期脱分極速度の低下は共通して観察された。一方、活動電位持続時間 (50% および 100%) は短縮する例が多く (7/10)、最大拡張期電位には減少するものと一過性に増加するものがあり、一定の傾向を示さなかった。

Fig. 3 Effects of the addition of glucose on a quiescent preparation under hypoxia. This preparation showed a spontaneous activity at the rate of 160/min under control conditions. Its firing ceased after about two minutes of hypoxic perfusion, with a subsequent 18 mV hyperpolarization developing in 2.5 minutes. 10 mM glucose was then added to the perfusate in the presence of hypoxia. Resumption of spontaneous firing was noted within 40 seconds, following a rapid depolarization of the membrane. The brief fluctuation of the membrane potential seen immediately before the depolarization is an artifact caused by switching the perfusate.

Hypoxia

Fig. 4 Effects of an overdrive pacing on the sinus node under hypoxic conditions. In an experiment shown in the upper trace, hypoxia decreased the spontaneous firing frequency to 146/min from the control value of 230/min. Overdrive pacing for 10 seconds at the rate of 300/min terminated the spontaneous activity when the membrane potential was -55 mV. A gradual depolarization and small oscillatory activities led to the restoration of spontaneous activity in 4 seconds. In another experiment reproduced in the lower trace, the initial spontaneous firing frequency of 240/min was decreased to 110/min by hypoxia. Subsequent overdrive pacing caused a complete cessation of spontaneous activity, with the maintenance of a membrane potential of -68 mV.

低酸素が心筋組織に与えると予測される最大の効果は細胞内 ATP の減少であろう。一方、細胞内 ATP は電子伝達系を介さなくとも嫌気性解糖系によってある程度補給されうる。そこで Fig. 3 に示すごとく、低酸素灌流により自発活動の停止と、膜の過分極を示した標本の灌流液に 10 mM の glucose を添加しその影響をみた。

glucose 添加後、膜は -62 mV から -42 mV へ急速に脱分極し、次いで自発興奮が再開した。この実験結果は、低酸素による自動能低下および膜過分極が低酸素の細胞膜への直接作用よりも細胞内 ATP の減少を介して発現するものであることを示唆する。そこで細胞内 ATP の減少を促進させる手段として過駆動刺激を試みた。すなわち 2 本の微小電極を刺入後、一方より刺激閾値の 2 倍で 5 msec 幅の脱分極パルスを加えて標本を刺激し、他方より活動電位を誘導した。Fig. 4 には代表的な 2 例を示す。上段の例では低酸素灌流開始 7 分後、自発興奮頻度が対照の 230/min から 146/min へ低下した時点で頻度 300/min の過駆動を 10 秒間試みた。過駆動刺激停止後、膜電位は -55 mV 付近で静止し、次いで小さな振動性電位が出現した後に自

発興奮が出現した。自発興奮再開までのいわゆる洞結節回復時間は 4 秒であった。下段の例では、低酸素灌流によって自発興奮頻度が 240/min から 110/min へ低下した時点において 300/min の頻度で過駆動したものであるが、膜は -68 mV で静止し、その後も徐々に過分極を示して、自発興奮の回復はみられなかった。前述のように低酸素灌流後の膜電位は $-70 \sim -80$ mV といった K^+ の平衡電位に近い領域まで過分極を示し、その原因が細胞膜の K^+ 透過性の亢進にあることが示唆された。そこで過分極に伴う膜抵抗の変化を検討するため、先の実験と同様に 2 本の微小電極を標本に刺入し、自発活動停止後、一方の電極より 50 msec の過分極側への定電流通電を行いそれに対応する膜電位変化を他方より記録した。Fig. 5 に示す例では、膜電位が -53 mV で静止した時には 5 mA の通電に対し 4.8 mV の過分極が観察されたが、低酸素の持続により膜が -70 mV へ過分極するに従い、同じ通電による膜電位の変化は 1.7 mV へと減少し、入力インピーダンスは約 1/3 に減少した。こうした所見から、細胞膜のイオン透過性亢進に伴って膜の過分極が生じることが示唆された。

Fig. 5 Changes in the membrane conductance during hypoxia.

As shown in the upper panel, this preparation showed a resting membrane potential of -53 mV on cessation of the spontaneous activity under hypoxic conditions. Hyperpolarizing pulses of 5 nA and 50 msec duration (the upper trace in the lower panels) were applied every 5 seconds to this preparation. Arrows 1-3 indicate the time when the lower panels (1)-(3) were recorded at the membrane potentials of -53 , -60 and -70 mV, respectively. Note that the magnitude of voltage displacement was progressively decreased with hyperpolarization.

Fig. 7 Current-voltage relationships during control (open circles with solid lines) and hypoxic perfusion (closed circles with dotted lines). Note the outward shift of the curve under hypoxia. Open and closed triangles denote the i_k tail current seen on repolarization to -40 mV from a 0 mV test pulse during normoxia and hypoxia, respectively.

Fig. 6 Current traces obtained by voltage clamp under normoxia (left panels) and hypoxic conditions after the cessation of spontaneous activity and at the membrane potential -72 mV (right panels).

In the upper panels, a 500 msec depolarizing step to -10 mV from the holding potential of -40 mV elicited a slow inward current (i_{si}) followed by a delayed outward current (i_k). On repolarization, the tail of i_k was recorded. In the lower panels, a hyperpolarizing test pulse to -80 mV elicited a hyperpolarization activated inward current (i_h).

次に、低酸素による自発活動の停止が膜電流系のいかなる変化によりもたらされたのかを膜電位固定法を用いて調べた。膜電位固定実験は、まず通常膜電位を -40 mV に保持し、 $+10$ mV から -80 mV までの間の種々の電位へ 500 msec 幅のテストパルスを加える方法で行った。Fig. 6 には -10 mV (上段) および -80 mV (下段) へのテストパルスに際して発現した電流の記録を示す。上段の脱分極パルスでは、緩徐な内向き電流 i_{si} に引き続き遅延外向き電流 i_k の出現が認められ、さらに保持電位への再分極により i_k の末尾電流が観察された。一方下段のように過分極パルスを加えた場合には、過分極により活性化される内向き電流 i_h が観察された。Fig. 6 左は、正常 Tyrode 液灌流下で $160/\text{min}$ の頻度で自発興奮を示す微小標本を電圧固定した時の記録である。対照時の記録後、標本を電圧固定から開放して自発興奮が回復した後、低酸素灌流を行った。Fig. 6 右には、本標本が低酸素灌流開始 1 分後に -48 mV の膜電位で静止した時の記録を示す。この例の低酸素灌流前後の電流電圧関係を Fig. 7 に示す。Fig. 6, 7 からは、低酸素灌流により保持電流、内向き電流のピークおよび 500 msec での定常電流のい

Fig. 8 Methods of isolating i_{si} from the recorded peak inward current.

The original inward currents (top panels) were recorded on depolarizing test pulses to -10 mV under normoxic (left) and hypoxic (right) conditions. After subtracting the value at the steady state from that at each measured point, the results were semi-logarithmically plotted as shown in the second panels. The theoretical i_k was obtained from the line fitted to the i_k curve during the latter part of the test pulse. The pure i_{si} shown in the third panels were obtained by subtracting this theoretical i_k from the recorded current. Note that there is little difference in the values of pure i_{si} during normoxia and hypoxia. The results of 5 such experiments are summarized in the bottom panel. The ordinate shows the value of pure i_{si} , and the abscissa shows the perfusing conditions (N denotes normoxia and H denotes hypoxia).

ずれもが外向きに変化しているのが明らかである。また、低酸素灌流により i_k 末尾電流が約 11% 減少した。 i_h については明確な変化を認めなかった。定常状態電流と外向き電流の外向き変位は同様な実験を行った他

Fig. 9 Effects of hypoxia on the background current.

As shown in the top panels, the membrane potential was initially held at -60 mV. Hyperpolarizing pulses of -70 to -100 mV were then applied and the resultant currents recorded during normoxia (left panel) and hypoxia (right panel). Middle panels show magnification of the initial portion of the upper panels. The holding current at -60 mV and the instantaneous currents on hyperpolarization were measured from these records and plotted in the bottom panel. Note that the current-voltage curves under these two conditions intersect each other at -86 mV.

の 4 例でも認められた。また、 0 mV から -40 mV へ再分極した際の i_k 末尾電流は $24.2 \pm 8.2\%$ ($n=5$) の減少を示した。Fig. 6 の実験結果からは内向き電流のピーク値が減少し、 i_{si} が低酸素により抑制されることが推測される。しかしながら、実測された内向き電流には背景電流および i_k の混入が避けられないため、後二者を Fig. 8A のような方法で除去した。すなわちテスト

パルス開始後 500 msec における定常電流と実測電流の差を中段のように対数プロットし、活性化しつつある i_k に合致する指数曲線を最小二乗法により求めた。これを理論的な i_k 値を表すものとみなし、実測の電流値からこの指数曲線の値を差し引くことにより i_{s1} を求めた(下段)。こうして得られた i_{s1} のピーク値を低酸素灌流前後で比較すると、前では 22 nA、後で 21 nA とほとんど変化はなかった。同様な実験 5 例の結果を Fig. 8B にまとめたところ、 i_{s1} の電流値の平均は 23.6 nA から 20.6 nA へと減少しているが、有意差は得られなかった。なお、5 例のうち 3 例では i_{s1} の電流値にほとんど変化がみられないにもかかわらず、自動活動が停止したという点に注目すべきであろう。

次に、電流電圧曲線の外向き変位が背景電流のうちの K^+ 電流の増加によるものかどうかを検討した成績を Fig. 9 に示す。この場合、膜電位を -60 mV に保持し、 -70 mV から -100 mV までの間のテストパルスを加えた。上段左に対照時の、右に低酸素灌流による膜静止後の記録を示す。膜電位を -60 mV に保持した場合、洞結節における時間依存性電流の大部分は不活性化または脱活性化されているため、 -60 mV での保持電流およびその電位から過分極させた際に発現する瞬時電流は、ともに主として背景電流を表すものと考えられる。Fig. 9 下段に低酸素灌流前後の -60 mV での保持電流とテストパルスでの瞬時電流をプロットした。こうして得られた背景電流の電流電圧曲線は -84 mV で交差し、低酸素により変化した電流成分が K^+ の平衡電位に近い電位で逆転することが示された。こうした実験 5 例の結果をまとめると、この逆転電位は -79.2 ± 3.7 mV であり、低酸素により生ずる膜過分極が K^+ 透過性亢進による背景電流中の K^+ 成分の変化によりもたらされることが判明した。

考 察

洞結節の自動性活動電位に対する低酸素灌流の影響をみたこれまでの実験によると、自動能の抑制は報告されているが、その停止を認めたものはない¹²⁻¹⁴⁾。しかしながら、本実験のおよそ半数例で洞結節の自動性活動は停止した。このような結果を得た理由として、まず標本の大きさが考えられる。すなわち、以前の報告では洞結節全体の標本が用いられており、結節組織全体に十分な低酸素灌流が行われていない可能性がある。また、本実験において、同じ洞結節から得られた標本でも自発興奮停止に至るものと至らないものとが

あることから、洞結節内でも低酸素に対する感受性に空間的な差があるものと推測される。このような洞結節内の生理学的不均一性に関するものとしては、例えば Kodama らの報告²⁰⁾があり、洞結節中心部の細胞は分界稜に近い結節周辺部の細胞に比べて高 K^+ 濃度に対しては抵抗が弱く、より早期に自動能を失うのに対し、Acetylcholine (Ach) に対しては逆に抵抗が強いという。とすれば、洞結節全体の標本においては、細胞間の電気結合が存在して自発活動の同期化が生じ、低酸素灌流下でも低酸素に感受性の低い領域で残存する自動能に他の領域が同期するため、全体の自発活動は停止しにくいことが考えられる。

さて、結節細胞における自動能の本態である拡張期脱分極の発生には外向き K^+ 電流の脱活性化や過分極により活性化される内向き電流 i_h のほか、拡張初期には背景電流 i_b の内向き電流が関与する可能性があり、また後期には不活性化から回復して活性化され始める i_{s1} が役割を演ずることが認められている²¹⁾。後述するごとく、これら以外の電流の存在も認められているが、いずれにしても内向き電流の減少または外向き電流の増加は拡張期脱分極を抑制し、自動能の低下を導く。そこで、低酸素による自動能の抑制がこれらのいずれの電流系の変化に依存するのかを、以下に検討した。

まず低酸素灌流は、心室筋では活動電位持続時間 (APD) を短縮させるとする報告が多い^{4,6,9)} のに対し、結節細胞ではわずかな短縮を生ずるに過ぎないとされている¹⁴⁾。本実験においても、Fig. 2 に示すごとくほとんど APD の短縮を認めない例もみられたが、70% の例で短縮を認めた。心室筋においては、APD の短縮は i_{s1} の減少によるとされており、洞結節についても同様の機序が働くことが考えられる。Fig. 2 より、拡張期脱分極速度の低下が自発活動の停止に最も大きな作用を及ぼすことは明らかであり、一見 i_{s1} の減少はこれにある程度の役割を果たしうるように思われる。しかし、一方では心室筋における低酸素の効果とは別の機序、すなわち、嫌気性解糖下でのみ働く回路が洞結節細胞の拡張期脱分極に関与しているとの見解もあり¹⁴⁾、自発活動の抑制が Fig. 4 に示すように過駆動により増強され、また Fig. 5 に示すように glucose により拮抗されることは、この機序の重要性を示唆する。

また、最大脱分極速度については、Fig. 1 に示すごとく一様な減少を認める例が多かったが、低酸素灌流開始 9 分後に、かえって一時的な増加を示した Fig. 2 のような例もあった。この後者の例は、自発興奮頻度

の低下により、低酸素条件下でも i_{s1} の活性化-不活性化過程が完全に行われるようになったためと思われるが、この点からも、自発活動停止の原因は i_{s1} の減少のみではないと思われる。また、本実験における自発活動停止時の膜電位が、 -51 ± 3.5 mV と、洞結節の静止電位とされる -40 mV²²⁾ よりも深いため、 i_h も活性化されている可能性もあるが、これについては後述する (Fig. 6, 7 参照)。

一方、Fig. 5 に示されるように、低酸素が膜抵抗の減少をもたらすことにより結果的に膜の過分極を生じ、それが -84 mV と K^+ 平衡電位に近いことから、低酸素時における自発活動停止に K^+ channel が関与することが考えられる。

電圧固定実験の結果では、Fig. 6, 7 に示されるように、定常状態での外向き電流の増加が最も明らかな変化であり、これは心室筋における報告^{10,23)}、房室結節における報告²⁴⁾と一致している。 i_{s1} については、Fig. 8 に示すごとく減少例と不変例が認められたが、心室筋においても同様に減少するという報告²⁵⁾と減少しないという報告^{10,23)}があり、いまだ見解の統一をみるに至っていない。心室筋を用いた研究では、低酸素時の i_{s1} の減少は、代謝阻害による ATP 減少から筋小胞体への Ca uptake が減少し、 $[Ca^{2+}]_i$ が増えて Ca 電流の駆動力が減少したためであり、Ca conductance の変化に依存しないとする成績¹⁰⁾もあり、先の活動電位変化と併せ考えれば、 i_{s1} の減少は低酸素の最も本質的な効果ではないと考えられる。過分極により活性化される内向き電流 i_h は膜を脱分極させることにより自動能を保持する役割を担っているとされているが、Fig. 6 に示すごとく、明らかな増加や減少のないことから低酸素時の自動能の抑制への関与は小さいと思われる。そこで、Fig. 9 のごとく、増加している外向き電流の本態を検討したところ、すべての電位域で増加を示しており、これは心室筋細胞を用いた今までの報告^{7,23)}と一致している。この i_k 増加の機序については従来 $[Ca^{2+}]_i$ 増加による二次的な効果とされてきた²⁶⁾が、本実験での -60 mV の保持電位からのテストパルスによる膜電流の解析により、その本態は時間非依存性の外向き背景電流の増加であると考えられる。また、その増加に電位依存性が認められ、かつ -79.2 ± 3.7 mV という K^+ 逆転電位とほぼ同一の逆転電位を示すことから、その主たるイオン担体は K^+ であると考えられる。以上より、代謝変化によりもたらされた K^+ conductance の増加は K^+ を担体とする背景電流中の K^+ 成分

の増加によると考えられた。

心筋の K^+ channel については、single channel recording²⁶⁾ の出現により特に心室筋で検討されており、内向き異常整流性 K 電流 (i_{k-rec})²⁷⁾、ACh 感受性 K 電流 (i_{k-ACh})²⁸⁾、細胞内 Na 濃度依存性 K 電流 (Na activated gK)¹⁶⁾、細胞内 Ca 濃度依存性 K 電流 (Ca activated gK)¹⁶⁾、細胞内 ATP 濃度依存性 K 電流 (i_{k-ATP})²⁹⁾、Ca activated non-specific current³⁰⁾ などの存在が今までに挙げられている。このうち、 i_{k-rec} は結筋細胞にはほとんど存在せず、また、Ca activated gK、Ca activated non-specific current は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇により活性化されるが、本実験において自発活動停止時に行った電圧固定では、一過性内向き電流の存在を認めなかったことから、代謝阻害による $[Ca^{2+}]_i$ の多少の上昇はあるものの、これらの channel を活性化するほどではないと考えられる。同様に、代謝阻害による $[Na^+]_i$ の上昇の可能性もあり、それが Na activated gK をもたらす可能性は必ずしも否定できない。しかしながら、この機序の出現には Na-K pump、Na-Ca exchange などの exchangemechanism の関与が示唆されており、本実験で得られた外向き電流の増加が比較的早期にみられることは説明しにくい。したがって、本実験で得られた外向き電流の増加は、既知の channel の中では、主として i_{k-ATP} の活性化によると考えられる。

結 論

ウサギ洞結節に対する低酸素の影響につき、微小標本を用いて電気生理学的に検討した結果、以下の成績を得た。

- 1) 低酸素により、洞結節の自発活動電位は活動電位持続時間 (APD₁₀₀) の短縮を伴い停止した。
- 2) 自発活動電位の停止後、膜は過分極を示した。
- 3) 上記の変化は glucose 添加により消失し、低酸素時の変化に代謝が深く関与していることが示唆された。
- 4) 膜電位固定実験により、上記の変化は K^+ を担体とする背景電流中の K^+ 成分の増加に主として依存するものと考えられた。

文 献

- 1) Adgey, A.J.J., Geddes, J.S., Mulholland, H.C., Keegan, D. A.J. and Pantridge, J.F.: Incidence, significance, and management of early bradyarrhythmia complicating acute myocardial infarction. Lancet, 2(7578), 1097~1101, 1968.

- 2) Rotman, M., Wagner, G.S. and Wallace, A.G.: Bradycardias in acute myocardial infarction. *Circulation*, 45, 703~722, 1972.
- 3) Belic, N. and Talano, J.V.: Current concepts in sick sinus syndrome I. *Arch. Intern. Med.*, 145, 521~523, 1985.
- 4) Trautwein, W., Gottstein, U. und Dudel, J.: Der Aktionsstrom der Myokardfaser im Sauerstoffmangel. *Pflugers Arch.*, 260, 40~60, 1954.
- 5) Vleugers, A. and Carmeliet, E.: Hypoxia increases potassium efflux from mammalian myocardium. *Experimentia*, 32, 483~484, 1976.
- 6) Wojtczak, J.: Contractures and increase in internal longitudinal resistance of cow ventricular muscle induced by hypoxia. *Circ. Res.*, 44, 88~95, 1979.
- 7) Vleugels, A., Vereecke, J. and Carmeliet, E.: Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. *Circ. Res.*, 47, 501~508, 1980.
- 8) Cobbe, S.M. and Poole-Wilson, P.A.: Tissue acidosis in myocardial hypoxia. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 12, 761~770, 1980.
- 9) Ikeda, K. and Hiraoka, M.: Effects of hypoxia on passive electrical properties of canine ventricular muscle. *Pflugers Arch.*, 393, 45~50, 1982.
- 10) Allen, D.G. and Orchard, C.H.: Intracellular calcium concentration during hypoxia and metabolic inhibition in mammalian ventricular muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 339, 107~122, 1983.
- 11) Fuller, E.O., Goldberg, D.I., Starnes, J.W., Sacks, L.M. and Delivoria-Papadopoulos, M.: Mitochondrial respiration following acute hypoxia in the perfused rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 17, 71~81, 1985.
- 12) Kohlhardt, M., Minich, Z. and Maier, G.: Alterations of the excitation process of the sinoatrial pacemaker cell in the presence of anoxia and metabolic inhibitors. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 9, 477~488, 1977.
- 13) Senges, J., Brachmann, J., Pelzer, D., Rizos, I. and Kubler, W.: Effect of glycolytic inhibitors on the sinoatrial node, atrium and atrioventricular node in the rabbit heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 13, 811~821, 1981.
- 14) Nishi, K., Yoshikawa, Y., Sugahara, K. and Morioka, T.: Changes in electrical activity and ultrastructure of sinoatrial nodal cells of the rabbit's heart exposed to hypoxic solution. *Circ. Res.*, 46, 201~213, 1980.
- 15) Sperelakis, N. and Scholz, H.: A metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cell. *Am. J. Cardiol.*, 37, 1079~1083, 1976.
- 16) Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H. and Irisawa, H.: Intracellular Na^+ activates a K^+ channel in mammalian cardiac cells. *Nature*, 309, 354~356, 1984.
- 17) Colquhoun, D., Neher, E., Reuter, H. and Stevens, C.F.: Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. *Nature*, 294, 752~754, 1981.
- 18) Noma, A. and Irisawa, H.: Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Arch.*, 364, 45~52, 1976.
- 19) New, W. and Trautwein, W.: Inward membrane currents in mammalian myocardium. *Pflugers Arch.*, 334, 1~23, 1972.
- 20) Kodama, I. and Boyett, M.R.: Regional differences in the electrical activity of the rabbit sinus node. *Pflugers Arch.*, 404, 214~226, 1985.
- 21) Brown, H.F., Kimura, J., Noble, D., Noble, S.J. and Taupignon, A.: The ionic currents underlying pacemaker activity in rabbit sino-atrial node. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*, 222, 329~347, 1984.
- 22) Noma, A. and Irisawa, H.: Effects of Na^+ and K^+ on the resting membrane potential of the rabbit sinoatrial node cell. *Jpn. J. Physiol.*, 25, 287~302, 1975.
- 23) Conrad, C.H., Mark, R.G. and Bing, O.H.L.: Outward current and repolarization in hypoxic rat myocardium. *Am. J. Physiol.*, 244, H341~H350, 1983.
- 24) Katoh, T., Nishimura, M., Tsuji, Y., Hiromasa, S. and Watanabe, Y.: Electrophysiologic effects of reduced oxygen supply on the transmembrane potential and membrane current systems of the rabbit atrioventricular node. *Cardiac Pacing; Proceedings of the 7th World Symposium on Cardiac Pacing* (Steinbach, K., Glogar, D., Laßkovics, A., Scheivelhofer, W. and Weber, H. eds.), Dr. D. Steinkopff Verlag, Darmstadt, p. 95~100, 1983.
- 25) Masher, D. and Carmeliet, E.: The effects of hypoxia on the membrane resistance of ventricular fibers of the guinea pig; A mechanism for the control of the action potential duration? *J. Physiol. (Lond.)*, 262, 15~27, 1976.
- 26) Hamill, O.P., Marty, A., Neher, 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) 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.
- 28) Noma, A. and Trautwein, W.: Relaxation of the Ach-induced potassium current in the rabbit sinoatrial cell. *Pflugers Arch.*, 377, 193~200, 1978.
- 29) Noma, A.: ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature*, 305, 147~148, 1983.
- 30) Sato, R., Noma, A., Kurachi, Y. and Irisawa, H.: Effects of intracellular acidification on membrane currents in ventricular cells of the guinea pig. *Circ. Res.*, 57, 553~561, 1985.

(受付 : 1987年12月4日)