虚血時の心筋細胞膜カルシウム・チャンネルと α_1 ・ β アドレナリン受容体の変化

大柳光正* 川本日出雄* 松森佳子*
小正尚裕* 三谷頼永* 岩崎忠昭*

(受付: 1987年3月27日) (特別掲載)

Effects of Ischemia on the Calcium Channel and α_1 , β -Adrenergic Receptor in the Canine Myocardial Sarcolemmal Membranes

Mitsumasa OHYANAGI* Hideo KAWAMOTO* Yoshiko MATSUMORI*
Naohiro KOMASA* Yori-hisa MITANI* and Tadaaki IWASAKI*

* The First Department of Internal Medicine, Hyogo College of
Medicine, Nishinomiya, Japan

It is known that increased calcium (Ca^{2+}) concentration in the myocardium exacerbates cell damage with ischemia, and that Ca^{2+} enters myocardial cells mainly through the voltage-dependent Ca channel (VDCC). Furthermore, it is thought that α_1 - and β -adrenergic receptors control the influx of Ca^{2+} through the sarcolemmal membrane. The present study was undertaken to determine whether the ischemia alters the affinity and number of ^3H -Nitrendipine (^3H -N) binding sites, and of α_1 - and β -adrenergic receptors, using radioligand binding assay. ^3H -N binding sites are thought to be closely linked with VDCC. The α_1 - and β -adrenergic receptor binding assay was studied with ^{125}I -HEAT and ^3H -dihydroalprenolol (^3H -DHA) as radioligands respectively. 1) ^3H -N binding assay: After 15 or 30 min of ischemia, there was no significant change in B_{max} . Sixty minutes after ischemia the number of ^3H -N binding sites increased significantly (331 ± 14 fmol/mg protein in ischemic areas vs 222 ± 11 fmol/mg protein in nonischemic areas). 2) ^{125}I -HEAT binding assay: Fifteen minutes after ischemia there was no significant change in B_{max} . Thirty and 60 min after ischemia the number of

* 兵庫医科大学第一内科
〒663 西宮市武庫川町 1-1

α_1 -adrenergic receptors increased significantly (77 ± 10 , 105 ± 4 fmol/mg protein in ischemic areas vs 55 ± 4 , 50 ± 11 fmol/mg protein, respectively.). 3) ^3H -DHA binding assay: After 15 or 30 min of ischemia, there was no significant change in B_{max} . Sixty minutes after ischemia the number of β -adrenergic receptors increased significantly (111 ± 6 fmol/mg protein in ischemic areas vs 54 ± 5 fmol/mg protein in nonischemic areas). However, there was no significant change in c-AMP level between ischemic and nonischemic areas. We concluded that after 60 min of ischemia the number of VDCC and β -adrenergic receptors in myocardial sarcolemmal membrane increased. After 30 minutes ischemia, the number of α_1 -adrenergic receptors increased.

Key words: calcium channel, α , β -adrenergic receptor, myocardial ischemia

緒 論

心筋虚血時には心筋細胞質カルシウム・イオン (以下 Ca^{2+}) 濃度が増加し細胞障害を増悪させることが知られている¹⁾。この Ca^{2+} 濃度の増加には細胞外からの Ca^{2+} の流入²⁾、細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出³⁾、ATP の減少による細胞内貯蔵部位への取込みの減少、さらに細胞外への汲出しの低下⁴⁾等が考えられている。

このうち細胞外からの Ca^{2+} の流入の経路は電位依存性 Ca channel (以下, VDCC) が大きく関与していると考えられている⁵⁾。一方, 交感神経系の緊張は β アドレナリン受容体 (以下 β 受容体) を介して c-AMP が Ca channel のリン酸化をきたし channel の疎通性を増加し Ca^{2+} の流入を促進すると考えられ⁶⁾、また細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離は α_1 アドレナリン受容体 (以下 α_1 受容体) を介してイノシトールリン脂質代謝が亢進することにより促進されると考えられている⁷⁾。以上より細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加には VDCC の他に α_1 , β 受容体も関与している。

近年, 放射性リガンド結合実験を用いた受容体の直接的な測定が可能になり心不全, 高血圧症における心筋や血管の α , β 受容体の変動が報告され^{8,9)}、また抗カルシウム剤 (^3H -Nitrendipine: 以下 ^3H -N 等) の結合部位が VDCC と密接に関連している (またはその一部) と考えられており心筋や血管での結合部位の検討がなされてい

る¹⁰⁾。

しかしながら心筋虚血時の心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加に上記の細胞膜レベルでの Ca channel や α , β 受容体がいかに関連しているかの検討はきわめて少なく¹¹⁻¹³⁾、さらに心筋細胞膜の VDCC と α , β 受容体の変化を同時に検討した報告はない。

それゆえ, 今回虚血時の心筋細胞膜の VDCC や α , β 受容体の変化を知る目的で VDCC には ^3H -N を, α_1 受容体には ^{125}I -2-[β -(4-Hydroxy-3-iodophenyl)-ethylaminomethyl]-tetralone (以下 ^{125}I -HEAT) を, β 受容体には ^3H -dihydroalprenolol (^3H -DHA) を用いた放射性リガンド結合実験から検討し, さらに β 受容体と関連している組織 c-AMP 濃度の虚血時における変動を検討したので報告する。

方 法

1. 動 物

8~15 kg の雑種成犬 59 頭 (当初 72 頭に試みたが, 結紮 60 分以内に心室細動を生じた 13 頭を除外した) を pentobarbital (25 mg/kg) 麻酔を施行し Harvard 呼吸器により換気を行った。右大腿動脈にカニューレを挿入し動脈圧を記録した。心拍数は心電図より測定した。左開胸下にて, 左前下行枝 (LAD) を対角枝直下にて剝離結紮した。結紮より末梢の LAD 領域のチアノーゼ部分を虚血部とし, 回旋枝領域を非虚血部とした。

冠動脈結紮時間は15, 30, 60分とした。結紮によって有意な血圧, 心拍数の変動は認めなかった。

なお心筋虚血の範囲はLADを24時間結紮しTetraphenyl tetrazolium chloride染色にて虚血部の面積比を求めた preliminary な検討では左室全体の12~20%であった。今回の検討も結紮部位に差がないため, 同程度の虚血を生じていると思われた。

2. 心筋細胞膜の調製

上記の閉塞時間に応じて冠動脈結紮後, ただちに心臓を取り出し, 虚血部と非虚血部に分け, 心筋を氷冷した20倍の0.25 M Sucrose, 5 mM Tris-HCl buffer 1 mM MgCl₂, pH 7.4のbuffer液中にいれPolytron PT 10 (Kinematica GmbH)を用いてset 7で30秒間homogenizeした。homogenateを4℃にて1,000 g, 10分間の遠沈を行い上澄を30,000 g, 10分間遠沈し沈渣を得た。沈渣をincubation buffer (50 mM Tris-HCl buffer, 10 mM MgCl₂, pH 7.4)にて2回洗浄し, 最終的に約1 ml中1 mgの蛋白量の心筋細胞膜粗分画を作成した。蛋白定量はLowry法¹⁴⁾により行った。

3. Radioligand binding assay

1) ³H-Nitrendipine (³H-N) binding assay

心筋細胞膜粗分画 (0.2 ml) を全量1 mlにて, 0.1~3.2 nMの6~8段階の濃度の³H-N (specific activity 77.4 Ci/mmol) と25℃25分間incubateした。反応終了後, ただちに氷冷したincubation bufferを5 ml加え, 減圧下にWatman GF/Fガラス線維濾紙上に吸引濾過し, 5 mlのbufferにて2回洗浄した。ガラス線維濾紙上に残った結合をPackard scintillation counterにて計測し, これを総結合とした。非特異的反応は10 μM Nifedipineの存在下に同様の反応を行い, 特異的結合は総結合から非特異的結合を差し引いた値とした。³H-Nの特異的結合は25℃の反応では10分で最大に達し, 以後平衡となりここに10 μMのNifedipineを加えると速やかに解離がみられ結合は可逆性であった。Incubation時に加える³H-Nの濃度が増加すると特異的結合量も増加

するが, Fig. 1のごとく, 0.9 nM以上では飽和を示した。飽和曲線から求めたScatchard plotは直線であり, Hill係数は 1.00 ± 0.012 を示した。心筋細胞膜粗分画と³H-Nの結合が, 可逆的であり高親和性, 飽和性を示し単一部位にて結合することが認められ³H-Nはイヌ心筋細胞膜のNitrendipine結合部位の検討に有用と思われた。そこで³H-Nの特異的結合の飽和曲線からScatchard分析を行い結合部総数(B_{max})と親和性を算出した。B_{max}は蛋白量として1 mgの膜成分に結合しうる放射性リガンドの最大量をfmol単位で表し親和性は解離定数(K_d)をnM単位で表した。

2) α₁-adrenergic receptor binding assay

心筋細胞膜粗分画 (0.2 ml) を全量400 μlにて, 50~300 pMの6~8段階の濃度の¹²⁵I-HEAT (specific activity 2,200 Ci/mmol) と25℃25分間incubateした。反応終了後1)の³H-N binding assayと同様の操作をしガラス線維濾紙上の結合を計測した。非特異的反応には10 μM phentolamineを用いた。¹²⁵I-HEATの特異的結合はincubation時に加える¹²⁵I-HEATの濃度が増加すると結合量も増加するが, Fig. 2のごとく, 150 pM以上では飽和を示した。飽和曲線から求めたScatchard plotは直線を呈し, Hill係数は 1.00 ± 0.014 を示し結合部位は単一と考えられた。Scatchard plotより受容体総数(B_{max})と解離定数(K_d)を算出した。1)と同様にB_{max}はfmol単位で表しK_dをnM単位で表した。

3) β-adrenergic receptor binding assay

心筋細胞膜粗分画 (0.2 ml) を全量400 μlにて, 0.5~12 nMの6~8段階の濃度の³H-DHA (specific activity 77 Ci/mmol) と37℃12分間incubateした。反応終了後, 2)の¹²⁵I-HEAT binding assayと同様の操作をしガラス線維濾紙上の結合を計測した。非特異的反応には10 μM (±) propranololを用いた。³H-DHAの特異的結合もFig. 3のごとく, 8 nM以上では飽和を示した。飽和曲線から求めたScatchard plotは直線を呈しHill係数は 1.00 ± 0.011 を示し結合部位は単一と考えられた。Scatchard plotより受容体総数

Fig. 1 Specific binding was defined as the difference between total binding in the absence of Nifedipine and nonspecific binding in the presence of $10 \mu\text{M}$ Nifedipine. The specific binding of ^3H -Nitrendipine to membrane was saturable. Scatchard analysis of these data demonstrated that the binding shows a single class of site.

Fig. 2 Specific binding was defined as the difference between total binding in the absence of phenolamine and nonspecific binding in the presence of $10 \mu\text{M}$ phenolamine. The specific binding of ^{125}I -HEAT to membrane was saturable. Scatchard analysis of these data demonstrated that the binding shows a single class of site.

Fig. 3 Specific binding was defined as the difference between total binding in the absence of ($\pm$) propranolol and nonspecific binding in the presence of $10 \mu\text{M}$ ($\pm$) propranolol. The specific binding of ^3H -DHA to membrane was saturable. Scatchard analysis of these data demonstrated that the binding shows a single class of site.

(B_{max}) と親和性 (K_d) を算出した。2) と同様に B_{max} は fmol 単位で表し K_d を nM 単位で表した。

4. c-AMP 濃度の測定

虚血, 非虚血部の心筋 10~20 mg をとり acetone dry-ice にてただちに凍結した。定量は Homma らの方法¹⁹⁾に従い, Yamaso Co. の c-AMP assay kit を使用した。

5. 統計分析

結果は平均 $\pm$ SEM で表し, 有意差は, 同一結紮時間での虚血部と非虚血部間では paired Student's t-test を用いて検討し, 各閉塞時間では unpaired Student's t-test を用いて検討し $P < 0.05$ にて有意差があるとした。

成 績

1. ^3H -Nitrendipine 結合部位への冠動脈閉塞の影響 (Tab. 1)

閉塞 15 分と 30 分での虚血部の B_{max} はそれぞ

Tab. 1 Changes in Specific Binding and Dissociation Constant of ^3H -Nitrendipine in Ischemic and Nonischemic Cardiac Membranes

	Number	Ischemic areas		Nonischemic areas	
		B_{max}	K_d	B_{max}	K_d
15 min	5	216 ± 3	0.37 ± 0.03	227 ± 3	0.37 ± 0.01
30 min	6	245 ± 11	0.48 ± 0.03	213 ± 7	0.44 ± 0.02
60 min	6	$331 \pm 14^*$	0.47 ± 0.01	222 ± 11	0.48 ± 0.01

B_{max} : fmol/mg protein, K_d : nM (mean $\pm$ SE).

* : $P < 0.001$ indicates a significant difference between ischemic and nonischemic areas at a given time after ischemia.

れ 216 ± 3 , 245 ± 11 fmol/mg prot. であり, 非虚血部の B_{max} はそれぞれ 227 ± 4 , 213 ± 7 fmol/mg prot. であり, 虚血部と非虚血部には有意差を認めなかった。しかしながら閉塞 60 分での虚血部の B_{max} は 331 ± 14 fmol/mg prot. であり, 非虚血部の B_{max} は 222 ± 11 fmol/mg prot. であり, 虚血部が非虚血部に比べ有意 ($P < 0.001$) に大で

Tab. 2 Changes in Specific Binding and Dissociation Constants of ^{125}I -HEAT in Cardiac Membranes from Ischemic and Nonischemic Areas of LAD-Occluded Dogs

	Number	Ischemic areas		Nonischemic areas	
		$B_{\max}$	K_d	$B_{\max}$	K_d
15 min	5	52 ± 3	0.15 ± 0.02	49 ± 2	0.13 ± 0.01
30 min	6	$77 \pm 10^*$	0.13 ± 0.01	55 ± 4	0.13 ± 0.01
60 min	6	$105 \pm 4^*$	0.13 ± 0.01	50 ± 11	0.13 ± 0.01

$B_{\max}$: fmol/mg protein, K_d : nM (mean $\pm$ SE).

* : $P < 0.001$ indicates a significant difference between ischemic and nonischemic areas at a given time after ischemia.

Tab. 3 Specific Binding and Dissociation Constants of ^3H -DHA in Cardiac Membranes from Ischemic and Nonischemic Areas of LAD-Occluded Dogs

	Number	Ischemic areas		Nonischemic areas	
		$B_{\max}$	K_d	$B_{\max}$	K_d
15 min	6	59 ± 5	4.0 0.5	60 ± 6	3.5 ± 0.5
30 min	6	57 ± 8	3.5 ± 0.6	56 ± 6	3.9 ± 0.7
60 min	13	$111 \pm 6^*$	3.0 ± 0.6	54 ± 5	3.1 ± 0.6

$B_{\max}$: fmol/mg protein, K_d : nM (mean $\pm$ SE).

* : $P < 0.001$ indicates a significant difference between ischemic and nonischemic areas at a given time after ischemia.

あることが示された。 K_d は虚血部・非虚血部間に有意差を認めなかった。

2. α_1 受容体への冠動脈閉塞の影響 (Tab. 2)

閉塞15分での虚血部の $B_{\max}$ は 52 ± 3 fmol/mg prot. であり、非虚血部の $B_{\max}$ は 49 ± 2 fmol/mg prot. であり有意差を認めなかった。しかし閉塞30分と60分での虚血部の $B_{\max}$ はそれぞれ 77 ± 10 , 105 ± 4 fmol/mg prot. であり、非虚血部の $B_{\max}$ はそれぞれ 55 ± 4 , 50 ± 11 fmol/mg prot. であり虚血部が非虚血部に比べ有意 ($P < 0.001$) に大であることが示された。 K_d は虚血部・非虚血部間に有意差を認めなかった。

3. β 受容体への冠動脈閉塞の影響 (Tab. 3)

閉塞15分と30分での虚血部の $B_{\max}$ はそれぞれ 59 ± 5 , 57 ± 8 fmol prot. であり、非虚血部の

Tab. 4 Serial Changes in c-AMP Concentration in Ischemic and Nonischemic Areas of Canine Heart

	Before	15 min	30 min	60 min
Ischemic area	0.67 ± 0.14	0.69 ± 0.15	0.62 ± 0.21	0.88 ± 0.25
Nonischemic area	0.67 ± 0.14	0.65 ± 0.12	0.62 ± 0.20	0.70 ± 0.10

c-AMP concentration : nmol/g weight (mean $\pm$ SE).

There was no significant change in c-AMP concentration between ischemic and nonischemic areas.

$B_{\max}$ はそれぞれ 60 ± 6 , 56 ± 6 fmol/mg prot. であり有意差を認めなかった。しかし閉塞60分での虚血部の $B_{\max}$ は 111 ± 6 fmol/mg prot. であり、非虚血部の $B_{\max}$ は 54 ± 5 fmol/mg prot. であり、虚血部が非虚血部に比べ有意 ($P < 0.001$) に大であることが示された。 K_d は虚血部・非虚血部間に有意差を認めなかった。

なお上記の $B_{\max}$ は蛋白質当りにて算出しているので細胞膜粗分画の蛋白の回収率に差がないか否かを検討した。虚血1時間での虚血部の膜分画の蛋白量は 1.5 ± 0.21 mg/g wet weight であり、非虚血部は 1.7 ± 0.13 mg/g wet weight であり有意差はなかった。

4. 心筋内 c-AMP の変化 (Tab. 4)

心筋内 c-AMP は冠動脈閉塞前では 0.67 ± 0.14 nmol/g wet weight であり、冠動脈閉塞15, 30分後の虚血部はそれぞれ 0.69 ± 0.15 , 0.62 ± 0.21 nmol/g wet weight であり非虚血部はそれぞれ 0.65 ± 0.12 , 0.62 ± 0.20 nmol/g wet weight で虚血部と、非虚血部には有意差を認めなかった。冠動脈閉塞60分後の虚血部は 0.88 ± 0.25 nmol/g wet weight であり非虚血部は 0.70 ± 0.10 nmol/g wet weight で虚血部は非虚血部に比べ、大なる傾向を示すも有意差を認めなかった。

考 察

^3H -Nitrendipine (^3H -N) は dihydropyridine 系の抗 Ca 剤で電位依存性カルシウム・チャンネル (VDCC) に結合し、抗 Ca 剤の薬理作用と密

接に関連した機能的な受容体を標識していると考えられており、 $^3\text{H-N}$ 結合実験から VDCC の変化を知ることができると考えられている¹⁰⁾。

われわれの心筋細胞膜粗分画を用いた結合実験では $^3\text{H-N}$ の結合部位は Scatchard plot と Hill 係数より単一と考えられ、心筋虚血後 60 分では虚血部の結合部位数が増加を示した。

さて心筋における $^3\text{H-N}$ 結合部位の検討で心筋虚血に関する報告は、われわれの知る限りでは Nayler ら¹¹⁾のものを見るにすぎない。しかしながら彼らの研究では $^3\text{H-N}$ 結合部位は高親和性と低親和性の 2 カ所であり、しかも虚血 60 分後では両方の $B_{\max}$ が減少すると報告している。

われわれの検討では結合実験に加える free の $^3\text{H-N}$ の濃度が 4 nM 以上高くなると非特異的結合が増大し特異的結合のばらつきが多くなり検討から除外せざるをえず結合反応に加える free の $^3\text{H-N}$ の濃度は 3.2 nM までとし、高親和性部分のみの検討を行った。さて高親和性部分では Nayler ら¹¹⁾は結合部位数は減少すると報告している。これはまず第一に結合部位が単一かまたは 2 カ所かで実験方法に根本的な相違があると考えられるが、それ以外に、用いた動物種の差や虚血の作成法の違い（彼らはラットを用い、global ischemia を作成）にも因ることも考えられる。

いずれにせよ $^3\text{H-N}$ の結合部位が単一であることについては Williams¹⁰⁾, Murphy¹⁷⁾, Ehlert¹⁸⁾らの結果と一致しており、今回の検討では $^3\text{H-N}$ の結合部位数は 60 分間の虚血により増加した。

このことは心筋虚血時の心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加の一因に細胞外からの Ca^{2+} が増加した VDCC を通して流入していると推測される。しかしながら虚血時の VDCC の増加がすなわち Ca^{2+} の流入促進につながるか否かについては以下のような問題が残る。すなわち、(1) 虚血になれば心筋内 ATP 含量が減少し VDCC の維持が阻害され機能が低下していると思われる¹⁹⁾、(2) VDCC は脱分極により Ca^{2+} の流入が生じると考えられており¹⁾、虚血時の脱分極の問題、(3) VDCC を通しての Ca^{2+} の流入量は少量であると

考えられており細胞障害をきたすほどではない²⁰⁾等の疑問である。しかし (1) (2) については Nayler ら¹¹⁾は 60 分の虚血後において Ca channel agonist による Ca^{2+} の流入をみており、VDCC は虚血後 60 分でも作用すると考えられ、(3) についても VDCC を通しての Ca^{2+} の流入量は少量であるが Ca^{2+} の流入が細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出をきたし²¹⁾遊離 Ca^{2+} 濃度が増加すると考えられる。以上より VDCC の増加が Ca^{2+} の流入促進し細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加をきたすと考えてよいと思われる。このことは抗 Ca 剤の心筋虚血に対する心筋保護作用のうち、一つには心筋細胞膜での VDCC を遮断することで Ca^{2+} の流入を抑制することにより生ずると考えられる¹⁾。ただし冠血流の増加や末梢血管の拡張による心機能の改善等²²⁾も考えられ、これらの相互作用によると思われる。

次に α_1 受容体は 30 分の虚血ですでに増加することが示されたが、これは $^3\text{H-Prazosin}$ を用いた Corr ら¹²⁾の報告とよく一致している。彼らは再灌流後の不整脈との関連で検討しているが、 α_1 受容体は細胞内のイノシトールリン脂質代謝を亢進させ細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出を促進させると考えられており⁷⁾、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が細胞障害のみならずあるいはそのために不整脈が発生するものと思われる。

次に β 受容体においては虚血後 15, 30 分では、数・親和性に虚血、非虚血部に有意差はなく、1 時間後に虚血部が非虚血部に比べ受容体数が有意に大であることが示された（親和性に変化を認めず）。これは Mukherjee¹³⁾らの報告とよく一致した。

さてこれらの受容体は蛋白量あたりで計測しているので虚血が細胞膜蛋白を変性させたためにあたかも数が増加したような結果になっているのではないかとの疑問が生じてくるが、Mukherjee ら¹³⁾によれば、心筋細胞膜の muscarinic cholinergic receptor と 5'-nucleotidase は虚血（1, 3 時間後）により変化が認められないことを示し、また今回の膜粗分画の蛋白の回収率に虚血部と非

虚血部に有意な差はなく α_1 , β 受容体の変動が細胞膜蛋白の変性によるものではないと考えられる。

心筋内 c-AMP の変化は今回の検討では虚血 1 時間後に濃度が増加する傾向をみるも有意差は認めなかった。Podzuweit ら²³⁾も同様の結果を得ている。これは β 受容体数が増加しても c-AMP が相関して上昇しないことを示している。Drummond ら²⁴⁾は虚血時の Adenylate cyclase (AC) 活性を検討し、虚血後に低下してゆくと報告しており虚血 1 時間後には β 受容体は増加するも AC 活性が低下していることより c-AMP が増加できないと考えられる。このことから β 受容体は虚血時においては c-AMP を介するカルシウム・チャンネルのリン酸化によるチャンネルの疎通性の増大には大きくは関与していない可能性も考えられる。

さてこれらの結合部位や受容体の増加の機序については不明ではあるが、 α , β 受容体に関しては以下の可能性が推察されている。

すなわち蛋白の合成の促進、または崩壊の遅延¹³⁾、また受容体の膜と cytosol との turn over の変化（その一つに細胞膜からの internalization の障害²⁵⁾または細胞膜への externalization の増加²⁶⁾）等が考えられている。さらに虚血により細胞膜の流動率が変化し、また phospholipid が変化する²⁷⁾ことが相対的な数を変化させている可能性もある。VDCC の結合部位に関しては、上記の細胞膜の流動率や phospholipid の変化等が考えられるが、VDCC の状態 (rest, inactive そして active²⁸⁾) により $^3\text{H-N}$ 結合が変化した可能性もあるが現在のところは不明である。

いずれにしても、心筋虚血時には心筋細胞膜の Ca channel (VDCC) と α_1 ・ β 受容体の数の増加を認めるが、もちろん心筋細胞内の Ca^{2+} の増加には、(1) ATP の減少による Ca^{2+} の細胞内貯蔵部位の取込みの減少⁴⁾、(2) Na の細胞内濃度の増加による Na-Ca exchange の増加による Ca^{2+} の細胞内への流入の増加、(3) 細胞障害の増悪による passive な流入²⁹⁾等が知られているが心筋保

護の面、すなわち、細胞膜レベルでの薬剤の効果からみれば、Ca channel (VDCC) と α_1 ・ β 受容体の数の増加は重要ではないかと考える。

なお心筋 α_1 ・ β 受容体には種族差³⁰⁾が報告されており、今回はイヌを用いており、結果をそのままヒトに当てはめることは問題と思われるが、臨床での抗カルシウム剤³¹⁾・ β 遮断剤³²⁾が心筋保護に有効との報告から考えると、ある程度ヒトでもかかる細胞膜レベルでの変化をきたしているのではないと思われる。

結 論

心筋虚血時の心筋細胞膜のカルシウム・チャンネル (VDCC) と α_1 ・ β 受容体の変化を放射性リガンド結合実験より検討した。

1) カルシウム・チャンネル (VDCC) と考えられている $^3\text{H-Nitrendipine}$ の結合部位は虚血 60 分後には結合部位数が増加することが認められた。

2) α_1 受容体は虚血 30 分、60 分後には受容体数が増加することが示された。

3) β 受容体は 60 分後には受容体数が増加することが示された。しかしながら心筋内 c-AMP 濃度は虚血 60 分後でも有意な増加を認めず受容体との関連性の不一致を見た。

以上から心筋虚血時の心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加に VDCC や α_1 受容体の数の増加が関与していると推測され抗 Ca 剤や α_1 受容体遮断剤等が細胞内 Ca^{2+} の増加を抑制し、心筋障害を軽減することが期待される。

終りに、本研究にあたりご指導を賜りました本学薬理学教室の永井和男助教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Fleckenstein, A.: Special inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions. Harris, P. and Opie, L. (Ed.):

- Calcium and the Heart, Academic Press, London, pp. 135-188 (1971).
- 2) Nayler, W. G. : The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am. J. Path.*, **102** : 262-270 (1981).
 - 3) Bourdillon, P. D. V. and Poole-Wilson, P. A. : Effects of ischemia and reperfusion on calcium exchange and mechanical function in isolated rabbit myocardium. *Cardiovasc. Res.*, **15** : 121-130 (1981).
 - 4) Opie, L. H., Nayler, W. and Gevers, W. : Calcium fluxes. Opie, L. H. (Ed.) : *The Heart*. Grune and Stratton Inc., London, pp. 87-97 (1984).
 - 5) Opie, L. H. : Pumps, channels and currents. Opie, L. H. (Ed.) : *The Heart*, Grune and Stratton Inc., London, p. 45 (1984).
 - 6) Rinaldi, M. L., Capony, J. P. and Demaille, J. G. : The cyclic AMP dependent modulation of cardiac sarcolemmal slow calcium channels. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **14** : 279-289 (1982).
 - 7) Berridge, M. J. and Irvine, R. F. : Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312** : 315-321 (1984).
 - 8) Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W. et al. : Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic receptor density in failing human hearts. *N. Engl. J. Med.*, **307** : 205-221 (1982).
 - 9) Hoffman, B. B. and Lefkowitz, R. J. : Alpha-adrenergic receptor subtypes. *N. Engl. J. Med.*, **302** : 1390-1396 (1980).
 - 10) Williams, L. T. and Tremble, P. : Binding of a calcium antagonist, 3H-Nitrendipine to high affinity sites in bovine aortic smooth muscle and canine cardiac membranes. *J. Clin. Invest.*, **70** : 209-212 (1982).
 - 11) Nayler, W. G., Dillon, J. S., Elz, J. S. et al. : An effect of ischemia on myocardial dihydropyridine binding sites. *European J. Pharmacol.*, **115** : 81-89 (1985).
 - 12) Corr, P. B., Schayman, J. A. and Kipnis, R. J. : Increased α -adrenergic receptors in ischemic cat myocardium. *J. Clin. Invest.*, **67** : 1232-1236 (1981).
 - 13) Mukherjee, A., Wong, T. M., Buja, L. M. et al. : Beta adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in canine myocardium. Effects of ischemia. *J. Clin. Invest.*, **64** : 1423-1428 (1979).
 - 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et al. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275 (1951).
 - 15) Homma, M., Satoh, T., Takezawa, J. et al. : An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small volume samples from blood and tissue. *Biochem. Med.*, **18** : 257-273 (1977).
 - 16) Bolger, G. T., Gengo, O., Klockwski, R. et al. : Characterization of binding of the Ca^{++} channel antagonist [^3H] Nitrendipine, to guinea pig ileal smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **225** : 291-309 (1983).
 - 17) Murphy, K. M. M. and Snyder, S. H. : Calcium antagonist receptor binding sites labeled with ^3H -Nitrendipine. *European J. Pharmacol.*, **77** : 201-202 (1982).
 - 18) Ehlert, F. J., Higa, E., Roeske, W. R. et al. : The interaction of [^3H] Nitrendipine with receptors for calcium antagonists in the cerebral cortex and heart of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104** : 937-943 (1982).
 - 19) Sperelakis, N. and Schneider, J. A. : A metabolic control mechanism for calcium ion influx that may protect the ventricular myocardial cell. *Am. J. Cardiol.*, **37** : 1079-1084 (1976).
 - 20) Beeler, G. W. and Reuter, H. : Membrane calcium current in ventricular myocardial fibers. *J. Physiol.*, **207** : 191-209 (1970).
 - 21) Fabiato, A. and Fabiato, F. : Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Cir. Res.*, **40** : 119-129 (1977).
 - 22) Schmier, J., Bruckner, U. B., Mittman, U. et al. : Inter coronary collaterals and intramyocardial blood distribution in dogs following nifedipine administration compared with controls. Jatene, A. D. and Lichtlen, P. R. (Ed.) : *The Third International Adalat Symposium*, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 42-49 (1976).
 - 23) Podzuweit, T., Lubbe, W. F. and Opie, L. H. : Cyclic adenosine monophosphate, ventricular fibrillation and anti-arrhythmic drugs. *Lancet*, **1** : 341-342 (1976).
 - 24) Drummond, R. W. and Sordahl, L. A. : Temporal changes in adenylate cyclase activity in acutely ischemic dog heart : Evidence of functional subunit damage. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **13** : 323-330 (1981).
 - 25) Chuang, D. M. and Costa, E. : Evidence for

- internalization of the recognition site of beta-adrenergic receptors during receptor subsensitivity induced by (–) isoproterenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76** : 3024-3028 (1979).
- 26) Maisel, A. S., Motulsky, H. J. and Insel, P. A. : Externalization of β -adrenergic receptors promoted by myocardial ischemia. *Science*, **230** : 183-186 (1985).
 - 27) Strittmatter, W. J., Hirata, F. and Axelrod, J. : Phospholipid methylation unmasks cryptic beta-adrenergic receptors in rat reticulocytes. *Science*, **204** : 1205-1207 (1979).
 - 28) Bean, B. P. : Nitrendipine block of cardiac calcium channels. High affinity binding to the inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81** : 6388-6392 (1984).
 - 29) Nayler, W. G. : The role of calcium in myocardial ischemia and cell death. Stone, P. H. and Antman, E. M. (Ed.) : *Calcium Channel Blocking Agents in the Treatment of Cardiovascular Disorders*, Futura Publishing Company Inc., New York, pp. 81-105 (1983).
 - 30) Mukherjee, A., Haghani, Z., Brady, J. et al. : Differences in myocardial α - and β -adrenergic receptor numbers in different species. *Am. J. Physiol.*, **245** : H957-H961 (1983).
 - 31) Stone, P. H. and Antman, E. M. : Use of the calcium channel blocking agents in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. Stone, P. H. and Antman, E. M. (Ed.) : *Calcium Channel Blocking Agents in the Treatment of Cardiovascular Disorders*, Futura Publishing Co., New York, p. 321-346 (1983).
 - 32) Peter, T., Norris, R. M., Clarke, E. D. et al. : Reduction of enzyme levels by propranolol after acute myocardial infarction. *Circulation*, **57** : 1091-1095 (1978).