遺伝性糖尿病ラット心室筋細胞の膜電流と心機能

土田勝晴* 渡島 広*

ヒトのインスリン非依存性糖尿病に類似した遺伝性の糖尿病モデルである WBN/Kob ラットの心室筋の電気生理学的検討及び生体心の心機能を検討した。加齢と共に高血糖状態となった 19ヵ月齢の WBN/Kob ラットは同月齢の対照ラットに比べ心筋収縮力は減少し、心室筋の活動電位持続時間が延長していた。basal の L 型 Ca 電流密度は WBN/Kob ラットで対照ラットと差はなく、一方、一過性外向き電流密度は減少していた。後者は活動電位持続時間延長の要因と考えられる。Ca 電流のイソプロテレノールに対する増加反応は WBN/Kob ラットで低下がみられ、これは細胞内情報伝達系の異常によるものではなく β 受容体数の減少によるものと考えられる。

(心電図 17 : No. 4, 322~328, 1997)

I. はじめに

糖尿病に伴う心疾患は、冠動脈の硬化性病変等の血管性変化のみならず心筋細胞自身の質的变化によることが報告されている¹⁾。糖尿病による遺伝素因の重要性、またインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 患者の増加等の事実から、遺伝性糖尿病

ラットの一系統である WBN/Kob ラットに着目した。WBN/Kob ラット^{2),3)} は同じ遺伝性のバイオリーディング (BB) ラット等とは異なり、血中インスリン濃度は正常ウイスター・ラットより低いものの、インスリン投与なしでも 2 年以上の生存が可能であり、また各種臓器合併症の進行が緩徐である点、ヒトの NIDDM に類似した点が多いと考えられる。今回、我々は WBN/Kob ラットの心室筋細胞の電気生理学的変化を中心とした検討を行った。

II. 方 法

雄性 WBN/Kob 及び対照の同月齢のウイスター・ラットは静岡実験動物より購入し、実験に供した。

Key Words ●糖尿病
●心臓
●一過性外向き電流
●Ca 電流
● β 受容体

* 大正製薬(株)総合研究所
(〒330 埼玉県大宮市吉野町 1-403)

Alterations of ionic currents of ventricular myocytes from genetically diabetic rats : Non-insulin dependent model.
Katsuharu Tsuchida, Hiroshi Watajima

1. 心機能測定

ウレタン麻酔下，人工呼吸を施し腕頭動脈から左心室内に挿入したカテーテルを用いて，左心室内圧とその変化速度（dP/dtmax）を記録した。

2. 心室筋細胞活動電位の測定

ラットから摘出した左心室組織切片を 37°C のタイロード（以下使用溶液組成を表 1 に示す）溶液中におき，1 Hz で電気刺激し，3 M KCl を充填した微小電極にて活動電位を記録した。

3. 心室筋細胞膜電流の測定

単離ラット心室筋細胞は，摘出心臓をランゲンドルフ灌流装置でコラゲナーゼ処理して得た。L 型 Ca

電流（I_{Ca}）は−40 mV の保持電位から 200 ms の脱分極テストパルスで 10 mV ステップで 5 秒毎に与えて誘発させた。また一過性外向き電流（I_{to}）は細胞外液にテトロドトキシン 30 μM を添加するか Na⁺ の choline 置換，Co²⁺ 3 mM 存在下で−70 mV の保持電位から 300 ms の脱分極テストパルスで 10 mV ステップで 10 秒毎に与えて誘発させた（CEZ-2300；日本光電，EPC-9；List）。データ解析は pClamp（Axon Instrument），EPC-9 software（Heka）に，手製の curvefitting プログラムを加えて行い，Student's t-test（unpaired），repeated measures ANOVA test あるいは Scheffe's t-test

表 1 使用溶液組成表

	NaCl	Choline Chloride	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	Glu	CsCl	Na ₂ ATP	MgATP	Cs-Asp	EGTA	HEPES	CoCl ₂
タイロード液	137.4	-	5.4	1.8	1.1	0.42	12.0	5.5	-	-	-	-	-	-	-
I C a 用 外 液	138.0	-	-	2.0	1.0	-	-	5.0	20.0	-	-	-	-	5.0	-
I C a 用 内 液	10.0	-	-	-	-	-	-	-	20.0	5.0	2.0	100.0	5.0	5.0	-
I t o 用 外 液	-	135.0	5.4	1.8	1.0	-	-	10.0	-	-	-	-	-	10.0	3.0
I t o 用 内 液	-	-	140.0	1.0	2.0	-	-	-	-	5.0	-	-	11.0	10.0	-

表 2 8 及び 19 ヶ月齢の WBN/Kob 及び対照ラットの体重及び血糖値

	例 数	体 重 (g)	血 糖 値 (mg/dl)
8 ヶ 月 齢 対 照 ラ ッ ト	31	399 ± 3	146 ± 3
8 ヶ 月 齢 WBN/Kob ラ ッ ト	28	419 ± 3	155 ± 4
1 9 ヶ 月 齢 対 照 ラ ッ ト	21	409 ± 4	141 ± 4
1 9 ヶ 月 齢 WBN/Kob ラ ッ ト	20	394 ± 5	563 ± 27 *

平均値 ± 標準誤差， *p < 0.01

表 3 19 ヶ月齢 WBN/Kob 及び対照ラットの心機能

	左心室内圧 (mmHg)	左心室拡張末期圧 (mmHg)	+dP/dt (mmHg/s)	-dP/dt (mmHg/s)	心拍数 (beats/min)
19 ヶ 月 齢 対 照 ラ ッ ト	126 ± 14	3.0 ± 0.5	4,410 ± 350	2,290 ± 200	262 ± 18
19 ヶ 月 齢 WBN/Kob ラ ッ ト	122 ± 16	8.4 ± 1.2	2,840 ± 220 ⁺	1,760 ± 150 ⁺	224 ± 15 *

平均値 ± 標準誤差， *p < 0.05，⁺p < 0.01，n = 6

を用い統計処理を行った。

III. 結 果

1. 体重及び血糖値

表 2 に 8 及び 19 ヶ月齢の WBN/Kob ラット及び同月齢の対照ラットの体重と血糖値を示す。19 ヶ月齢では WBN/Kob ラットの血糖値は著しく増大していた。

2. 左心室の収縮能

表 3 に示すように、19 ヶ月齢の WBN/Kob ラットの左心室拡張末期圧は同月齢の対照ラットに比べ有意に高い値を示し、左心室内圧の上昇 ($+dP/dt$)、低下速度 ($-dP/dt$) の最大値は有意に低い値を示した。WBN/Kob ラットの心拍数も有意に少なかった。

3. 心室筋組織活動電位

図 1 に 19 ヶ月齢の WBN/Kob ラット及び対照ラットの心室筋活動電位波形を示す。WBN/Kob ラットでは 50% 活動電位持続時間が有意に延長していたが、他のパラメーターである静止膜電位

(WBN/Kob -71 ± 2.2 mV, 対照ラット -74 ± 0.9 mV), 活動電位振幅 (WBN/Kob 96 ± 2.8 mV, 対照ラット 98 ± 2.7 mV) に有意な差は認められなかった。

4. 心室筋細胞の L 型 Ca 電流

心室筋細胞の膜容量は 19 ヶ月齢 WBN/Kob ラットで対照ラットと比べ有意な増加が認められた; WBN/Kob 221 ± 14 pF ($n=48$), 対照ラット 193 ± 12 pF ($n=57$), $*p < 0.01$ 。図 2 に 8 ヶ月齢及び 19 ヶ月齢の WBN/Kob 及び対照ラットの心室筋 L 型 Ca 電流 (I_{Ca}) の実記録及び電流-電圧曲線を示す。8 ヶ月齢, 19 ヶ月齢とも WBN/Kob 及び対照ラットの非刺激下の I_{Ca} 密度に差は認められなかった。図 3 に, I_{Ca} の反応速度論的解析すなわち電流不活性化の時定数 (図 3-A), 活性化不活性化曲線 (図 3-B), 不活性化からの回復過程 (図 3-C) を示す。8 ヶ月齢, 19 ヶ月齢とも WBN/Kob 及び対照ラットで、これらパラメーターに著しい差は認められなかった。次に β 受容体刺激に対する I_{Ca} の増大反応を検討した。図 4 に示すように 10^{-9} ~ 10^{-6} M のイソ

図 1

19 ヶ月齢 WBN/Kob ラット及び同月齢の対照ウイスター・ラットの心室筋組織の活動電位波形と 50% 活動電位持続時間。

図 2

8ヵ月齢及び19ヵ月齢のWBN/Kobラット及び同月齢の対照ウイスター・ラット心室筋細胞のL型Ca電流の実記録及び電流-電圧曲線。電流値を細胞膜容量で除した電流密度で比較。

プロテレノールに対し、19ヵ月齢のWBN/Kobラットでは対照ラットと比較して著しく減弱していた。8ヵ月齢ラットでは差がなかった（データ省略）。 10^{-6} Mのイソプロテレノールにフォルスコリンを重ねて添加した場合、あるいは予めパッチ電極内にGTP γ S 100 μ Mあるいはcyclic AMP (cAMP) 50 μ Mを充填して得られた最大の I_{Ca} 密度は、19ヵ月齢のWBN/Kobラットと同月齢の対照ラットとで有意差が認められなかった（図4）。

5. 一過性外向き電流 (I_{to})

-70 mVの保持電位から300 msecの脱分極テス

トパルスを与え、そのピーク電流値とテストパルスの最終電流値との差をテストパルス電位に対しプロットした結果を図5に示す。17~19ヵ月齢のWBN/Kobラットの I_{to} 密度は同月齢の対照ラットに対して有意に小さく、4-アミノピリジン(4-AP) 5 mMにより抑制される成分として求めた場合にもWBN/Kobラットでは対照に比較して有意に小さかった。-70 mVから+70 mVに電圧固定した際の4-AP感受性電流の値を図5（挿入図）に示す。

IV. 考 察

糖尿病モデル動物の心機能異常、心筋の病理組織学的、生化学的、電気生理学的変化が報告されている¹⁾。電気生理学的には、既にストレプトゾトシン(STZ)処置ラットにおいて心室筋活動電位の延長が報告されている^{4)~7)}。STZによる糖尿病モデルは、ヒトにおけるインスリン依存性糖尿病(IDDM)に対応している。今回の実験で用いたWBN/Kobラットはインスリン投与なしでも生存可能であり、合併症の進行は緩徐である点などヒトのNIDDMに類似した点も多い実験モデルである^{2),3)}。WBN/Kobラットで、左心室収縮力の低下と左心室筋活動電位持続時間の延長が認められた。ラット心室筋においては、活動電位持続時間の決定要因として I_{Ca} および I_{to} の影響が大きいことが知られている⁸⁾。 I_{Ca} および I_{to} の糖尿病病態下での変化を調べた。 I_{Ca} については、STZ処置ラットでのジヒドロピリジン系化合物の受容体結合実験によるカルシウムチャンネル数の減少⁹⁾あるいは増加¹⁰⁾が報告されており、また活動電位に対する Co^{2+} あるいは La^{3+} の作用解析からカルシウムチャンネルの変化が指摘されている¹¹⁾。本実験では非刺激下の心室筋細胞膜の I_{Ca} 密度は、血糖値の著しく増加した19ヵ月齢のWBN/Kobラットでも対照ラットと差はなく、JourdonとFeuvrayによるSTZ処置(3~4週間)ラットで I_{Ca} 密度が不変であったとの報告⁵⁾と一致するものであった。また本実験の結果から、 β 受容体刺激によ

図 3

8ヵ月齢及び19ヵ月齢のWBN/Kobラット及び同月齢の対照ウイスター・ラット心室筋細胞のL型Ca電流の反応速度論的解析。A：不活性化の時定数(τ_f 速, τ_s 遅), B：活性化及び不活性化曲線, C：不活性化からの回復過程。

図 4

19ヵ月齢のWBN/Kobラット及び同月齢の対照ウイスター・ラット心室筋細胞のL型Ca電流のイソプロテレンール(Iso), フォルスコリン(Fors)による増加作用及びcAMP, GTP γ Sパッチ電極内充填時の最大Ca電流密度。

図 5

17～19ヵ月齢の WBN/Kob ラット及び同月齢の対照ウイスター・ラット心室筋細胞の一過性外向き電流の実記録（挿入図）と電流－電圧曲線及び 4－アミノピリジン感受性電流成分（挿入図）。

る I_{Ca} 増加反応が 19ヵ月齢の WBN/Kob ラットで対照に比べ著しく減少していた。この β 受容体刺激反応の減少は、既に報告されている STZ 処置ラット心筋での β 受容体刺激反応の低下と一致していた^{10),12)~15)}。 β 受容体刺激からカルシウムチャンネル磷酸化に至る細胞内情報伝達系の異常については、ほぼ最大効果を発揮する $GTP\gamma S$ ¹⁶⁾ および $cAMP$ ¹⁷⁾ をパッチ電極内に充填した際の、あるいはフォルスコリン添加時の最大 I_{Ca} 密度が、19ヵ月齢の WBN/Kob ラットと同月齢の対照ラットとで有意差がないことから否定され得る。ただし、Nishio らが STZ 処置ラットで報告している様に、Gi 蛋白が糖尿病心筋で増加している可能性も完全には否定できない¹⁸⁾。またイソプロテレノールの I_{Ca} 増加反応の閾値濃度には WBN/Kob ラットと対照ラットとで差を認めなかったことから、 β 受容体の親和性の低下ではなく数の減少が考えられ得る。この β 受容体反応性低下の原因は不明である。

更に、17～19ヵ月齢の WBN/Kob ラットでは同月齢の対照ラットに比べ I_{to} が有意に抑制されていた。この結果は、STZ 処置ラットでの既報の結果^{5),6)}と一致していた。WBN/Kob ラットでの活動電位延長に参与していると考えられる。WBN/Kob ラット心室筋における活動電位持続時間の延長は正常な機能を維持しているカルシウムチャンネルを通して二次的に細胞内への Ca^{2+} 流入を増加させられるが、WBN/Kob ラットの生体心で認められた収縮力低下を十分補償するには至らず、すでに STZ 処置ラットで報告されている種々の細胞内収縮系の異常¹⁾ が WBN/Kob ラット心筋でも起きている可能性が示唆される。

〔文 献〕

- 1) Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett

- T : Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 44 : 104, 1992
- 2) Nakama K, Shichinohe K, Kobayashi K, Naito K, Uchida O, Yasuhara K, Tobe M : Spontaneous diabetes-like syndrome in WBN/Kob rats. *Acta Diabet Lat* 22 : 335, 1985
 - 3) Tsuchitani M, Saegusa T, Narama I, Nishikawa T, Gonda T : A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Lab Anim* 19 : 200, 1985
 - 4) Fein FS, Aronson RS, Nordin C, Green BM, Sonnenblick EH : Altered myocardial response to ouabain in diabetic rats : mechanics and electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 15 : 769, 1983
 - 5) Jourdon P, Feuvray D : Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol Lond* 470 : 411, 1993
 - 6) Magyar J, Rusznak Z, Szentesi P, Szucs G, Kovacs L : Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 24 : 841, 1992
 - 7) Nordin C, Gilat E, Aronson RS : Delayed afterdepolarizations and triggered activity in ventricular muscle from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Circ Res* 57 : 28, 1985
 - 8) Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM : Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 54 : 157, 1984
 - 9) Lee SL, Ostadalova I, Kolar F, Dhalla N : Alterations in Ca^{2+} -channels during the development of diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 109 : 173, 1992
 - 10) Nishio Y, Kashiwagi A, Ogawa T, Asahina T, Ikebuchi M, Kodama M, Shigeta Y : Increase in [3H] PN200-110 binding to cardiac muscle membrane in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 39 : 1064, 1990
 - 11) Nobe S, Aomine M, Arita M, Ito S, Takaki R : Chronic diabetes mellitus prolongs action potential duration of rat ventricular muscles : circumstantial evidence for impaired Ca^{2+} channel. *Cardiovasc Res* 24 : 381, 1990
 - 12) Göttsche O : The adrenergic β -receptor adenylate cyclase system in heart and lymphocytes from streptozotocin-diabetic rats : *in vivo* and *in vitro* evidence for a desensitized myocardial β -receptor. *Diabetes* 32 : 1110, 1983
 - 13) Horackova M, Murphy MG : Effects of chronic diabetes mellitus on the electrical and contractile activities, $^{45}Ca^{2+}$ transport, fatty acid profiles and ultrastructure of isolated rat ventricular myocytes. *Pfluegers Arch* 411 : 564, 1988
 - 14) Savarese JJ, Berkowitz BA : β -adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. *Life Sci* 25 : 2075, 1979
 - 15) Sundaresan PR, Sharma VK, Gingold SI, Banerjee SP : Decreased β -adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes : role of thyroid hormones. *Endocrinology* 114 : 1358, 1984
 - 16) Scamps F, Rybin V, Puceat M, Tkechuk V, Vassort G : A Gs protein couples P_2 -purinergic stimulation to cardiac Ca channels without cyclic AMP production. *J Gen Physiol* 100 : 675, 1992
 - 17) Kameyama M, Hofmann F, Trautwein W : On the mechanism of beta-adrenergic regulation of the Ca channel in the guinea-pig heart. *Pfluegers Arch* 405 : 285, 1985
 - 18) Nishio Y, Kashiwagi A, Kida Y, Kodama M, Abe N, Saeki Y, Shigeta Y : Deficiency of cardiac β -adrenergic receptor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 37 : 1181, 1988