洞結節ペースメーカー細胞における TTX 感受性 Na 電流活性化閾値の陽性偏位について

村松 光*¹ Richard D. Nathan*²

洞結節細胞における Na 電流 (I_{Na}) の存在につきいくつか報告はあるが、 I_{Na} の解析と生理的機能の詳細な検討はないためこれを調べた。家兎洞結節よりペースメーカー細胞を単離し、細胞全膜電位固定法 (20 mM $[Na^+]_o$, 22~24°C) で I_{Na} を解析した。またナイス タチン法を用い生理的条件下 (130 mM $[Na^+]_o$, 35~37°C) で、自発性活動電位 (SAP) に対するテトロドトキシン (TTX) の影響を調べ、鋸歯波電位固定 (+0.11 V/sec) で の膜電流に対する TTX の影響と、活動電位固定での TTX による補償電流 ($I_{Na,comp}$) を 測定した。電流-電圧曲線での閾値は -63.8 ± 1.8 mV ($n=12$) で、定常状態における窓電 流は $-63 \sim -43$ mV 間に存在したが、1 pA 以下であった。浅い保持電位 ($-88 \sim -68$ mV) での閾値は $-63 \sim -48$ mV へと逐次陽性側に変移した ($n=4$)。さらに、非定常状 態 (250 msec の条件付け電位) における易利用度-電圧曲線も陽性側に変移した。SAP の 0 相への発火電位は -42 ± 2 mV ($n=10$) で、鋸歯波電位固定での閾値は -42 ± 4 mV ($n=4$) であった。TTX (20 μ M) は 0 相最大立ち上がり速度を 12.0 ± 1.0 から 5.1 ± 0.5 V/sec ($n=15$) へ有意に減少させたが、自動能に有意な変化はなかった。 $I_{Na,comp}$ は 0 相 ($\geq -41 \pm 3$ mV) で $+7.0 \pm 1.0$ pA/pF ($n=12$) 認めたが、4 相には認められなかつ た。洞結節細胞の I_{Na} が -64 mV で活性化されるのに、SAP で 0 相にのみ関与する結果 は、生理的自動興奮時には活性化電位が -40 mV 近傍へ陽性偏位している可能性がある。
(心電図 18: No.4, 470~480, 1998)

Key Words ● 洞結節ペースメーカー細胞
● Na 電流
● 活性化電位

* 1 春日居リハビリテーション病院内科
(〒 406-0014 山梨県東山梨郡春日居町国府 436 番地)

* 2 Department of Physiology
Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock,
Texas, USA

I. 緒 言

洞結節は哺乳動物の心臓のペースメーカーである が、それを構成する細胞として primary (domi- nant) pacemaker cell や latent (subsidiary) pace- maker cell, さらに分解稜に至るまでの transi- tional cell があり、機能的にも構造的にも均一では

Positive shift of apparent activation potential of TTX-sensitive Na current in sinoatrial node pacemaker cells.
Hikaru Muramatsu, Richard D. Nathan

1997 年 7 月 29 日 原稿受領/1998 年 3 月 4 日 掲載承認

ない^{1)~3)}。電子顕微鏡を用いた研究では、電気生理学的に洞結節中心部に相当する細胞でも洞結節細胞像のみならず中間型の細胞像を呈しており、形態的指標は必ずしも機能を反映していない^{4),5)}。洞結節のペースメーカー細胞におけるテトロドトキシン (TTX) 感受性一過性 Na 電流 (I_{Na}) の存在については、未だ一致した見解が得られていない^{6)~9)}。primary pacemaker cell の自発性活動電位 (SAP) における 0 相立ち上がり速度が緩徐である理由として、(1) I_{Na} が存在しないか、(2) 存在してもサイズが非常に小さいか、ないしは (3) 自動脱分極電位の範囲で I_{Na} は著明に不活性化されているためであると考えられている。

最近我々は、家兎洞結節から単離したペースメーカー細胞の中に I_{Na} が存在することを報告し、分離した I_{Na} の特性を詳細に検討した¹⁰⁾。 I_{Na} が存在する細胞では、TTX ($20 \mu\text{M}$) で SAP の 0 相立ち上がり速度は抑制されるが、自発興奮頻度は有意な影響を受けなかった。多細胞標本を用いた研究で野間ら¹¹⁾ は、TTX 感受性の速い Na 電流の定常状態での活性化が電位軸に沿って陽性方向に偏位しており、SAP の 0 相への移行電位 (発火電位) は -40 mV より陽性側であると言及している。本研究において我々は、 I_{Na} が 0 相立ち上がり速度にのみ関与する現象に関し、単一ペースメーカー細胞より分離した I_{Na} の電位特性を調べながらその背景となる機序を検討した。

II. 対象と方法

1. 細胞分離と培養

洞結節単一ペースメーカー細胞の分離方法は前報告で詳細に述べられているが¹⁰⁾、簡略に記述すると、体重 $1.3 \sim 2.0 \text{ kg}$ の雄家兎 (New Zealand White rabbit) を頸部強打にて失神させた後、開胸して迅速に心臓を摘出し実体顕微鏡下で洞結節中心部を切離し、コラゲナーゼ処理 (CLS II, 320 U/ml , Washington Biochemical) にてペースメーカー細胞を単離した。単離直後のペースメーカー細胞は、 $50 \mu\text{M}$

表 1 溶液組成 (in mM)

A. Ruptured-patch whole-cell voltage clamp			
External		Internal	
NaCl	20	CsCl	130
KCl	5.4	Mg-ATP	5.0
CaCl ₂	1.8	Na ₂ CrPO ₄	5.0
MgCl ₂	0.8	EGTA	5.0
NaH ₂ PO ₄	0.3	HEPES	5.0
4-AP	4.0	(pH) _i	(7.2)
TMA-Cl	106		
NiCl ₂	1.2	V _j	-8.4 mV
CsCl	4.0		
dextrose	5.5		
HEPES	5.0		
(pH) _o	(7.4)		

B. Perforated-patch clamp			
External		Pipette (Internal) ‡	
NaCl	130	KCl	55
KCl	5.4	K ₂ SO ₄	75
CaCl ₂	1.8	MgCl ₂	7.0
NaH ₂ PO ₄	0.6	dextrose	10
NaHCO ₃	16	HEPES	10
dextrose	5.5	(pH) _i	(7.3)
(pH) _o	(7.3-7.4) †		
		V _j	-2.9 mV

†細胞外液は 95%O₂-5%CO₂ でバブルし pH を調整した。

‡電極内液は $300 \mu\text{g/ml}$ ナイスタチンと 6%DMSO を含む。

Ca²⁺ を含む HEPES 緩衝溶液中で紡錘型、桿状型ないしは卵円型を呈したが、 1.5 mM Ca^{2+} を含む培養溶液中では卵円型を呈し規則的な拍動を示した。単一ペースメーカー細胞は CO₂ 培養器中で 24 時間以内 (day 0) ないしは 1~4 日間保存 (培養) した。電気生理学的実験は、単離直後 (4~24 hrs) のペースメーカー細胞、または培養 (day 1~4) ペースメーカー細胞 (Type II)⁶⁾ を用いた。単離直後の細胞と培養細胞との間で I_{Na} の特性に有意な差異は認められなかった。膜容量は $31.2 \pm 3.4 \text{ pF}$ ($n=41$) であった。

2. 溶液

HEPES 緩衝溶液のミリモル組成は、NaCl 126, KCl 1.8, CaCl_2 0.05, MgCl_2 0.8, dextrose 5.5, HEPES 5 または 25 で、pH は NaOH で 7.4 に調整した。培養溶液は 20% medium 199 (GIBCO), 4% ウシ胎児血清 (GIBCO), 2% ウマ血清 (GIBCO), 0.1% 硫酸ゲンタマイシン (Sigma) と 73.9% 塩類溶液を含んでおり、その塩類溶液のミリモル組成は、NaCl 116, CaCl_2 1.8, MgSO_4 0.8, NaH_2PO_4 0.9, NaHCO_3 26.0, dextrose 5.6 で K^+ 濃度は 5.4 mM であった。電気生理学的実験に用いた溶液の組成を表 1 に示した。分離した I_{Na} の測定は、細胞外液 Na^+ 濃度を 20 mM とし、 I_{Na} 以外のチャネル電流は各々阻害剤を用いてブロックした。すなわち、細胞外液の 1.2 mM Ni^+ で T 型及び L 型 Ca 電流をブロックし、細胞外液の 4 mM Cs^+ , 106 mM tetramethylammonium (TMA^+), 4 mM 4-aminopyridine (4-AP), 及び細胞内液の 130 mM Cs^+ で過分極活性化内向き電流、遅延外向き K 電流、一過性外向き電流をブロックした。細胞内液にはフッ素をあえて用いなかった。生理的条件下でしかもナスタチン法 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 電極内液)¹²⁾ を用い SAP を記録した。パッチ電極外の細胞膜にナスタチンによる穿孔孔形成を阻止するために、パッチ電極先端 (0.5~1.0 mm) は予めナスタチンを含まない内液で充填した。内液組成は電極と細胞質間の浸透圧較差が最小となるよう配慮した¹²⁾。HEPES 緩衝系を用いて記録した SAP の自発興奮頻度 ($86 \pm 6/\text{min}$, $n=13$) に比較して、燐酸・重炭酸緩衝系を用いた方が高頻度 ($150 \pm 9/\text{min}$, $n=10$) であったため、SAP を記録する細胞外液の pH は燐酸・重炭酸緩衝系を用い 7.3~7.4 の範囲内に調整した。溶液界面電位 (V_j) は Barry と Lynch の理論¹³⁾ に基づき適切に補正した。計算上の V_j は実験で得られた電極・細胞外液間の相殺電位に極めてよく一致した。

3. 電気生理学的測定

I_{Na} は通常 (ruptured-patch) の細胞全膜電位固定法で記録した。1 G Ω の feedback resistor と 10 kHz

の low-pass filter を使用したパッチクランプシステム (model 8900, Dagan) を用いた。パッチ電極の抵抗は $3.0 \pm 0.2 \text{ M}\Omega$ ($n=34$) で、補正後の series resistance は $5.9 \pm 0.5 \text{ M}\Omega$ であった。 I_{Na} を矩形波脱分極パルスで誘発した際にみられる実際の膜電位 (V_m) の指定電位 (V_c) からの逸脱は、 I_{Na} ピーク時ですら $2.9 \pm 1.2 \text{ mV}$ で V_c の 5% 以下に過ぎなかった。定常状態または非定常状態における I_{Na} の易利用度を調べる実験では、ダブルパルス法を用いた。保持電位は -98 mV で、条件付け電位 (P_c) を 500 msec または 250 msec とし、0.1 Hz で P_c を -118 mV から -48 mV の範囲で変化させた。ナスタチン法 (perforated-patch) を用い鋸歯波で細胞全膜電位固定し膜電流を誘発し TTX の影響を調べ、緩徐な脱分極パルス ($+0.11 \text{ V}/\text{sec}$) による I_{Na} 活性化につき検討した。また活動電位固定法を用い TTX による補償電流 ($I_{\text{Na,comp}}$) を測定した。活動電位固定は PCM システム (Model DR-390, Neuro Data Instruments) を使って磁気テープに安定した SAP を記録した後、これを即再生し V_c として同一ペースメーカー細胞を膜電位固定した。SAP の発火電位は、拡張期脱分極相 (4 相) 及び立ち上がり相 (0 相) を各々直線近似しそれらの直線の交点から得られる電位とした。実験温度は、矩形波または鋸歯波による膜電位固定時は $22 \sim 24^\circ\text{C}$ ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) で、SAP または $I_{\text{Na,comp}}$ 記録時は $35 \sim 37^\circ\text{C}$ ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) とした。

4. データ解析

解像度 12 ビットの A/D 変換器 (LabMaster, Scientific Solutions) と pClamp 6 ソフトウェア (Axon Instruments) を用いて、膜電流と膜電位記録を各々 $24 \sim 240 \mu\text{sec}$ と $4 \sim 8 \text{ msec}$ の間隔で採取後デジタル化し、コンピュータ (IBM PC/AT) のハードディスクに保存し解析した。膜電流固定実験において、各 SAP 間に元々僅かなばらつき (特に 4 相) があるために誤差を最小限にする目的で、8 個の SAP 波形を pClamp ソフトウェアで加算平均し TTX の影響を調べた。諸種の計測値は平均 $\pm$ 標準

誤差で示した。推計学的処理には student の paired または unpaired t 検定を用い、危険率が 0.05 以下の場合に有意な変化と判定した。

III. 結 果

1. I_{Na} の定常状態における活性化と不活性化

ペースメーカー細胞より記録した I_{Na} の電位依存性活性化及び不活性化に関し、通常の矩形波パルス膜電位固定法を用い検討した。約 25% が不活性化された保持電位 (Hp) -98 mV より脱分極パルスを与え I_{Na} を活性化させた。定常状態の不活性化 (h_{∞}) 曲線は Pc が 500 msec で試験電位が -8 mV のダブルパルス法で調べた。電流-電圧 (I-V) 曲線上の活性化閾値 (sigmoidal activation threshold) は -63.8 ± 1.8 mV ($n=12$) であった。コンダクタンス-電圧関係を Boltzmann 曲線で近似すると、半値活性化電位 ($V_{1/2}$) は -41.7 ± 2.0 mV で、勾配因子 (slope factor) は 6.4 ± 0.5 mV であった。最大コンダクタ

ンスは -8 mV にて 1.1 ± 0.2 nS/pF であった。一方、半値不活性化電位 ($V_{1/2}$) は -90.8 ± 2.5 mV で、勾配因子は 7.1 ± 0.7 mV であった。定常状態における活性化及び不活性化曲線の重なり (窓電流) をペースメーカー電位の範囲内 (-63 mV $\sim$ -43 mV) に認めたが (図 1), 実測値で 1 pA 以下であった。しかしながら、この窓電流成分を Goldman-Hodgkin-Katz の式を用いて生理的条件下 (130 mM $[Na^+]_o$, $35^\circ C$) での値に換算すると、 -48 mV で -2.9 pA また -58 mV で -5.3 pA となり、SAP の拡張期脱分極相 (4 相) に十分関与し得る値となった。

2. TTX は 0 相にのみ関与する

ナスタチン法による perforated patch で series resistance が一定 (8.7 ± 1.0 M Ω) に達すると (40 ± 6 min, $n=22$), 安定した SAP が 30 分以上、ときには 1 時間以上記録できた。TTX は 20 μ M で I_{Na} を 3 分以内に完全に阻害し得たので、SAP に対

図 1 定常状態の活性化・不活性化曲線：窓電流成分

矩形波パルスを用いた膜電位固定法では、電流-電圧 (I-V) 曲線上の閾値は ~ -65 mV であった (保持電位は -98 mV)。一方、易利用度は -50 mV 近傍まで 0 になることはなく、ペースメーカー電位の範囲内に窓電流を認めた。コンダクタンスと h_{∞} は各々平均 $\pm$ SEM ($n=12$) または $\pm$ SEM で示した。

図2 自発性活動電位に対するテトロドトキシン (TTX) の影響
自発性活動電位 (SAP) はナイスチン法を用いて記録した。8 個の SAP の加算平均波形に対する TTX (20 μ M) の影響を示した。TTX は 4 相に明らかな影響を与えることなく、0 相立ち上がり速度を減少させた。また 0 相への移行電位 (発火電位) を陽性側に移動させた (▲: コントロール, △: TTX)。

する TTX の影響すなわち I_{Na} の関与を調べるために 20 μ M TTX を使用した。図 2 に加算平均化した SAP 波形の TTX 投与後における変化の 1 例を示した。TTX 投与前のコントロール SAP では、一定で緩徐な 4 相は徐々に 0 相に移行している。10 個のペースメーカー細胞で調べた結果、発火電位は -42 ± 2 mV であった。また、TTX は 4 相の自動脱分極速度に明らかな影響を与えることなく、0 相最大立ち上がり速度を 12.0 ± 1.0 V/sec から 5.1 ± 0.5 V/sec へ、オーバーシュートを $+27.4 \pm 1.4$ mV から $+22.9 \pm 2.2$ mV へ各々有意に減少させた ($n=10$)。さらに、TTX は発火電位を -39 ± 1 mV に $+3 \pm 1$ mV だけ陽性方向へ有意に変化させたため、僅かながら 4 相の延長を認めた。しかし、自発興奮頻度に有意な変化は認められなかった (コントロール 150 ± 9 /min; TTX 152 ± 10 /min, NS)。

3. 活性化閾値の陽性偏位

膜電位固定実験における I_{Na} の定常状態での活性化電位 (閾値) は -64 mV であったが、一方膜電流

固定実験における SAP の TTX 感受性の発火電位は -42 mV であり、かつ TTX は -63 mV ~ -43 mV 間のペースメーカー電位に影響を与えなかった。我々は、サイクルを繰り返す SAP の中で Na チャネルは実際の閾値よりもっと陽性側 (~ -40 mV) で活性化している可能性を考えた。そこでまず、多くのないしは大半の Na チャネルが不活性化されていると考えられる浅い Hp (> -98 mV) を用いて I_{Na} を誘発した (図 3)。Hp が -88 mV では I_{Na} の閾値は -63 mV であったが、Hp が -80 mV より浅いと I_{Na} の閾値はより陽性方向に移動した。すなわち、Hp が -73 mV での閾値は -53 mV であり、Hp が -68 mV での閾値は -48 mV であった。また、Hp を -88 mV から -68 mV へと順次変化させると、I-V 曲線上のピーク電位は -28 mV から -13 mV へと変化し、Hp を -88 mV に復すると閾値とピーク値も前値に復した。これらの現象は調べた 4 個のペースメーカー細胞のすべてに認められ、Hp が -70 mV より陽性側だと閾値は -50 mV より陽性側に変移

図3 浅い保持電位から誘発されるNa電流 (I_{Na}) の閾値の変化

保持電位 (Hp) -88 mV (A), -73 mV (B) 及び -68 mV (C) からの脱分極パルスにより活性化される I_{Na} の閾値からの電流波形 (5-mV step) を示すが、閾値は各々 -63 mV, -53 mV 及び -48 mV であった。D: 各種 Hp を用いた I-V 曲線の一部 (閾値付近) を示す。閾値は Hp が浅いと逐次陽性側に変移した。

し、ピーク値も -15 mV より陽性側に変化した。Hp が -65 mV より浅い場合には S/N 比が極めて小さくなるために、 I_{Na} とその閾値を正確に評価することが不可能であった。

4. 非定常状態における I_{Na} の易利用度

非定常状態における I_{Na} の易利用度を検討するため、同一ペースメーカー細胞に対し、500 msec と 250 msec の2種類の Pc を用いダブルパルス法で h_{∞} -, 易利用度-電圧曲線を調べた。非定常状態 (Pc = 250 msec) においては、定常状態 (Pc = 500 msec)

に比較して I_{Na} の易利用度は -98.4 mV から -58.4 mV の範囲で有意に大であった (図4)。Pc が 500 msec での $V'_{1/2}$ は -88.5 ± 2.6 mV ($n=7$) であったが、250 msec では -81.8 ± 3.3 mV で 6.7 ± 1.7 mV だけ陽性側に有意に変化した。また勾配因子は各々 6.9 ± 0.3 mV 及び 8.6 ± 0.3 mV で、Pc が 250 msec では 1.7 ± 0.5 mV と有意に大であった。なお本実験での $V'_{1/2}$ 及び勾配因子と、定常状態での窓電流を調べた際の $V'_{1/2}$ (-90.8 ± 2.5 mV) 及び勾配因子 (7.1 ± 0.7 mV) との間に各々有意差は認められな

図4 非定常状態における I_{Na} の易利用度

条件付き電位 (P_c) 500 msec の定常状態と 250 msec の非定常状態での I_{Na} 易利用度を比較した。易利用度を P_c に対して平均値±標準誤差で示した。非定常状態における易利用度は−98.4 mV から−58.4 mV の範囲で有意に大で、半値不活性化電位はより陽性であった (-81.8 ± 3.3 mV, $n=7$)。

かった。

5. 鋸歯波電位固定及び活動電位固定での I_{Na} の活性化電位

緩徐な4相の自動脱分極速度を想定して、鋸歯波電位固定法の脱分極 ($+0.11$ V/sec) により膜電流を誘発させた (図5 A)。振幅の大きな (>900 pA) 内向き電流が ~ -45 mV より陽性側で活性化された。 I_{Na} を完全に阻害し得る $30 \mu\text{M}$ の TTX でこの内向き電流は著明に減少し、発火電位は -40 mV へと陽性側に移動した。4個のペースメーカー細胞で検討した結果、TTX 添加前の発火電位は平均 -42 mV であり、この値は膜電流固定実験での SAP の発火電位によく一致した。

最後に、活動電位固定法を用い TTX の影響を検討した。安定した SAP を記録した後、この電位波形で同一ペースメーカー細胞を膜電位固定した。膜電流は完全に補償されているので、微小な (<10 pA) ノイズ以外の明らかな電流は記録されなかった (図5 B-a)。しかしながら、TTX ($20 \mu\text{M}$) 存在下では

外向きの $I_{Na,comp}$ が0相に一致して出現した (図5 B-b)。この $I_{Na,comp}$ のピーク値は各 SAP 間で誤差があるため、4拍を加算平均し評価した。12個のペースメーカー細胞で検討した結果、 $I_{Na,comp}$ のピーク値は $+7.0 \pm 1.0$ pA/pF であった。この数値は SAP の0相最大立ち上がり速度における TTX 感受性成分 (7.1 ± 1.1 V/sec) に極めてよく一致した。一方、4相には明らかな補償電流は認められなかった。

IV. 考 案

1. 洞結節ペースメーカー細胞の heterogeneities について

洞結節部位には機能的に不均一性 (heterogeneities) が存在することはよく知られている^{2),5)}。ペースメーカー細胞に TTX 感受性一過性 Na 電流 (I_{Na}) が存在するか否かに関しても、未だ確固とした定説がないのが現状であり議論の余地がある。生体心臓において真のペースメーカー細胞 (部位) は、

図5 鋸歯波電圧固定法及び活動電位固定法による検討

A：脱分極速度 0.11 V/sec の鋸歯波電位固定により -45 mV (▲) から大きな内向き電流が活性化された。TTX ($30 \mu\text{M}$) 添加でこの内向き電流の一部がブロックされるとともに活性化電位が -40 mV (▽) に移動した ($130 \text{ mM } [\text{Na}^+]_o$, 22.8°C)。B：活動電位固定のコントロール下 (a) では膜電流が完全に補償され、ノイズ以外記録されなかった。TTX ($20 \mu\text{M}$) 存在下 (b) では 0 相に一致して外向きの補償電流 (125 pA) を認めた (35.6°C)。

必ずしも洞結節中心部の領域にのみ存在するとは限らず、洞結節の細胞群の中に primary pacemaker の機能的役割を果たす細胞が存在し得ると考えられている⁹⁾。我々は前報告で洞結節中心部を含む領域より分離培養したペースメーカー細胞 (Type II) の中に I_{Na} の存在する細胞があることを報告した¹⁰⁾。 I_{Na} の存在しない細胞がいわゆる primary pacemaker cell で、 I_{Na} の存在する細胞は latent pacemaker cell であると推測することもできる。しかし、酵素処理による分離過程で primary pacemaker cell から I_{Na} が失われたかまたは機能しなくなった可能性も考えられる。

2. ペースメーカー細胞における I_{Na} の役割

定常状態における活性化及び不活性化曲線の重なりを、ペースメーカー電位の範囲内 ($-63 \sim -43$

mV) に認めたが、この窓電流成分は 1 pA 以下であった。実際に SAP を記録した生理的条件 ($130 \text{ mM } [\text{Na}^+]_o$, 35°C) での値に換算すると $3 \sim 5 \text{ pA}$ となり、ペースメーカー電位に関与する可能性が示唆された。しかしながら、TTX ($20 \mu\text{M}$) は SAP の拡張期脱分極速度を抑制することなく、0 相にのみ関与し立ち上がり速度を抑制した。

新生家兎の洞結節においては、 I_{Na} はすべての細胞に認められ、TTX ($3 \mu\text{M}$) は拡張期脱分極速度と 0 相立ち上がり速度の両者を著明に抑制したという報告がある¹⁴⁾。I-V 曲線上の閾値は $\sim -60 \text{ mV}$ であったが、SAP の発火電位は -41 mV で TTX はこれをさらに脱分極させた。両生類であるヒキガエル (*Bufo marinus*) の静脈洞では、TTX ($20 \mu\text{M}$) は自発興奮頻度を減少させたが、これは TTX 感受

性の非不活性化 (inactivation-resistance) Na 電流が関与していると考えられた¹⁵⁾。成熟家兎の洞結節でも末梢の分界稜に近い細胞では、TTX (20 μ M) は発火電位を脱分極側 (-61 mV ~ -40 mV) へ変化させて自発興奮頻度を著明に (49%) 減少させた¹⁶⁾。

3. I_{Na} 活性化電位の陽性偏位の原因

I_{Na} の I-V 曲線上の閾値は -64 mV であったが、SAP における実際の活性化電位 (“apparent” activation potential) は約 -40 mV にあった。TTX は SAP の 4 相 (-65 mV ~ -40 mV) には影響なく、0 相 (> ~ -40 mV) の立ち上がり速度を抑制した。膜電位固定実験と膜電流固定実験との間に一見矛盾を認めたが、Hp が浅いと I_{Na} の I-V 曲線上の閾値も陽性側に変移した。SAP の最大拡張期電位 (MDP) は -65 mV 以上と浅いため、ごく一部の Na チャネルしか活性化できず、しかも -40 mV 近傍ではじめて活性化する可能性を示唆している。ペースメーカー細胞に存在する I_{Na} の不活性化からの回復過程は強い電位依存性を示し、浅い電位での回復過程は非常に緩徐であった¹⁰⁾。鋸歯波電位固定で誘発される内向き電流のうち TTX 感受性電流 (すなわち I_{Na}) の発火電位は -42 mV であったし、また活動電位固定での $I_{Na,comp}$ も 0 相の -40 mV 以上の電位で出現した。より陰性の保持電位から誘発される電流の閾値が陰性に変移する現象は、モルモット冠動脈の血管平滑筋における L 型 Ca 電流で報告されているが¹⁷⁾、 I_{Na} に関しては今のところ報告はなく、この現象が洞結節細胞に特異的なものであるか否かは今後の研究を待つ必要がある。

さらにもう 1 つ考えられるのは ruptured-patch 細胞全膜電位固定法の特長として、活性化・不活性化曲線の電位軸にそっての陰性方向への変移が、 I_{Na} 記録開始 (≥ 10 min) 以前に既に起きている可能性がある。簡単な細胞質構造をもつ小型の卵円型ペースメーカー細胞 (Type II) では、電極内液と細胞質との平衡はごく短時間 (≤ 2 min) に完了することが判っている¹⁰⁾。その代わり両曲線にみられる自然の時間依存性陰性変移は、ほとんど無視できる程度 (<

1 mV/10 min) であった¹⁰⁾。

また、モルモット心室筋を用いた結果ではあるが、 I_{Na} の活性化・不活性化曲線は低温で過分極側に変移することが報告されている¹⁸⁾。その結果から概算すると 23°C では 36°C と比較して、活性化曲線の $V_{1/2}$ は約 7 mV 過分極側へ移動すると推測される。一方本実験において、22~24°C で測定した I_{Na} の閾値 (-64 mV) と 35~37°C で測定した SAP の発火電位 (-42 mV) との差 (> 20 mV) は、実験温度差による影響だけでは解釈できないと考えられる。さらに、22~24°C で記録した鋸歯波電位固定による発火電位 (閾値) は同一温度条件での I_{Na} の閾値より約 20 mV 以上陽性で、むしろ SAP の発火電位に近い事からしても、実験温度差による影響はあったとしても少ないと考えられる。いずれにせよペースメーカー細胞に I_{Na} が存在すれば、非定常状態における I_{Na} の易利用度は拡張期脱分極電位でむしろ増加しており、 I_{Na} が完全に不活性化されてしまうことなく Na チャネルの一部は実際 0 相で活性化されたことは事実である。非定常状態における不活性化曲線と活性化曲線の重なりは、もし存在するとすれば 0 相の電位の範囲に存在している可能性がある。

4. 洞結節細胞の自動能に対する Na^+ イオンの貢献

洞結節細胞の自動能や自発性活動電位に関与するチャネル電流や担体輸送の charge carrier として、 Na^+ イオンは非常に重要である。電位作動性チャネルとしては、本研究で検討した TTX 感受性一過性 Na 電流 (I_{Na}) と Guo らの報告¹⁹⁾ による TTX 非感受性 sustained Na 電流 (I_{st}) がある。後者は -70 mV より陽性側の電位で活性化され Ca チャネル阻害剤でブロックされることから、ペースメーカー電位に強く関与するものと考えられている¹⁹⁾。TTX 感受性の Na 電流として他に persistent Na 電流が、両生類ヒキガエル (*Bufo marinus*) の静脈洞ペースメーカー細胞で発見されており、TTX (20 μ M) は自発興奮頻度を著明に減少させた¹⁵⁾。過分極活性化内向き電流 (I_h または I_f) は multi-ion チャネルで、

その透過性は細胞外液 Na^+ 濃度に強い依存性がある²⁰⁾。活性化・脱活性化動態が非常に緩徐なため、 I_f は背景電流としての要素ももち得ると考えられる。

上にあげた4種の電位作動性チャネルとは別に、 Na-K ポンプ電流や Na-Ca 交換電流といった担体輸送電流及び背景電流もあげられる。 Na 依存性背景電流は TTX の感受性はなく、幾種の一価陽イオンに対し透過性があり逆転電位が -21 mV であるためペースメーカー電位に関与していると考えられている²¹⁾。 Na-K ポンプ電流は4相においては外向き電流ではあるが、内向きの背景電流の大きさとほぼ同等であるため、 Na-K ポンプ電流の変化が潜在的にペースメーカー電位を修飾し得ると考えられている。 Na-Ca 交換電流の逆転電位はペースメーカー周期内で逐次変化するが、その内向き電流成分はペースメーカー電位の後期相に関与することが示唆されている²²⁾。

5. 臨床的意義について

本研究で用いたペースメーカー細胞が primary pacemaker cell か latent pacemaker cell についての議論は別として、 I_{Na} は0相に関与し立ち上がり速度の約57%を占めた。TTX はSAPの発火電位を数mVだけ陽性側に移動させたが、拡張期脱分極速度に対する抑制効果は認めず自発興奮頻度に有意な影響はなかった。心筋虚血のような代謝阻害時やCa拮抗薬や β 阻害剤の過剰投与時のようにL型Ca電流が減少すると考えられるような病態では、 Na 依存性の立ち上がり速度がより優勢になり、 I_{Na} はSAPの生成(立ち上がり)や洞結節内の transitional 領域への興奮伝搬という役割で重要になると考えられる。逆に、速い内向きの I_{Na} が抑制された状態では、洞房伝導遅延が起こり得る可能性もあると考えられる。

洞結節の末梢領域に関しての主な機能は、分界稜を含む心房筋に transitional cells の興奮を介してSAPを伝搬することである²³⁾。洞房輪束に近い記録部位では、0相最大立ち上がり速度は非常に大きく ($>50 \text{ V/sec}$) またMDPも深い ($<-70 \text{ mV}$)²⁾。洞

房輪束に近いほど発火電位はより陰性になり洞房輪束内では -60 mV にも達する。洞房輪束またはその近傍の細胞におけるSAPの自発興奮頻度がTTXで減少する理由は、発火電位が陽性側に著明に移動して4相が延長するためであり、自動脱分極速度自体が減少するためではないと考えられる。

謝辞

本原稿作成にあたり御校閲を賜った有田眞教授に感謝申し上げます。本研究の主旨は、第13回日本心電学会学術集会(平成8年10月3日、大分・別府)において発表した。

〔文 献〕

- 1) Bleeker WK, Mackaay AJC, Masson-Pévet M, Bouman LN, Becker AE: Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circ Res* 46: 11, 1980
- 2) Kodama I, Boyett MR: Regional differences in the electrical activity of the rabbit sinus node. *Pflügers Arch* 404: 214, 1985
- 3) Irisawa H, Giles WR: Sinus and atrioventricular node cells: cellular electrophysiology. In *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, ed by Zipes DP, Jalife J. WB Saunders, Philadelphia, 1990, 95
- 4) Irisawa H: Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism. *Physiol Rev* 58: 461, 1978
- 5) Irisawa H, Brown HF, Giles WR: Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 73: 197, 1993
- 6) Nathan RD: Two electrophysiological distinct types of cultured pacemaker cells from rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol* 250 (Heart Circ Physiol 19): H325, 1986
- 7) Oei HI, van Ginneken ACG, Jongsma HJ, Bouman LN: Mechanisms of impulse generation in isolated cells from the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* 21: 1137, 1989
- 8) Denyer JC, Brown HF: Rabbit sino-atrial node cells: isolation and electrophysiological properties. *J Physiol (Lond)* 428: 405, 1990
- 9) van Ginneken ACG, Giles WR: Voltage clamp measurements of the hyperpolarization-activated

- inward current I_f in single cells from rabbit sino-atrial node. *J Physiol (Lond)* 434 : 57, 1991
- 10) Muramatsu H, Zou A-R, Berkowitz GA, Nathan RD : Characterization of a TTX-sensitive Na^+ current in pacemaker cells isolated from rabbit sinoatrial node. *Am J Physiol* 270 (Heart Circ Physiol 39) : H2108, 1996
 - 11) Noma A, Yanagihara K, Irisawa H : Inward current of the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch* 372 : 43, 1977
 - 12) Korn SJ, Horn R : Influences of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride current in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J Gen Physiol* 94 : 789, 1989
 - 13) Barry PH, Lynch JW : Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Memb Biol* 121 : 101, 1991
 - 14) Baruscotti M, DiFrancesco D, Robinson RB : A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol (Lond)* 492 : 21, 1996
 - 15) Ju Y-K, Saint DA, Gage PW : Tetrodotoxin-sensitive inactivation-resistant sodium channels in pacemaker cells influence heart rate. *Pflügers Arch* 431 : 868, 1996
 - 16) Kodama I, Nikmaram MR, Boyett MR, Suzuki R, Honjo H, Owen JM : Regional differences in the role of the Ca^{2+} and Na^+ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am J Physiol* 272 (Heart Circ Physiol 41) : H2793, 1997
 - 17) Ganitkevich VY, Isenberg G : Contribution of two types of calcium channels to membrane conductance of single myocytes from guinea-pig coronary artery. *J Physiol (Lond)* 426 : 19, 1990
 - 18) Murray KT, Anno T, Bennett PB, Hondeghem LM : Voltage clamp of the cardiac sodium current at 37°C in physiological solutions. *Biophys J* 57 : 607, 1990
 - 19) Guo J, Ono K, Noma A : A sustained inward current activated at the diastolic potential range in rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol (Lond)* 483 : 1, 1995
 - 20) Ho WK, Brown HF, Noble D : Internal K ions modulate the action of external cations on hyperpolarization-activated inward current in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflügers Arch* 424 : 308, 1993
 - 21) Hagiwara N, Irisawa H, Kasanuki H, Hosoda S : Background current in sino-atrial node cells of the rabbit heart. *J Physiol (Lond)* 448 : 53, 1992
 - 22) Li J, Qu J, Nathan RD : Ionic basis of ryanodine's negative chronotropic effect on pacemaker cells isolated from the sinoatrial node. *Am J Physiol* 273 (Heart Circ Physiol 42) : H2481, 1995
 - 23) Sano T, Yamagishi S : Spread of excitation from the sinus node. *Circ Res* 16 : 423, 1965