心筋細胞膜の電気特性

平 岡 昌 和

東京医科歯科大学難治疾患研究所 〒113 東京都文京区湯島1-5-45

Excitation of the Cardiac Cell Membrane

Masayasu HIRAOKA

Department of Cardiovascular Diseases, Medical Research

Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113

There have been multiple ionic current systems which contribute to the electrogenesis of the heart. Their precise mechanisms and roles in the cardiac action potential are difficult to define, because of the complexity of their regulatory functions and, in part, due to inadequate voltage control of the preparations under the study. Recent advent of the isolation procedure of a single cardiac cell and of the application of the voltage clamp method as well as the patch clamp technique to the myocytes has made it possible to approach the fundamental problems as to the function of the single ionic channel. The action potential of the heart muscle is mainly formed by flows of the fast Na^+ current, the slow inward current and the K^+ currents. The amplitudes and time-courses of these currents are determined by electrochemical gradient of each ion across the cell membrane and conductance changes governed by membrane voltage and time. In addition to above factors, the status of cellular energy supply, hormone-receptor bindings and intracellular free ionic concentrations such as Ca^{2+} have now been recognized as important determinants of gating mechanisms of the channel. The currents activated by these factors may play an essential role for the electrical activity of the heart not only under the physiological condition, but also under the pathological conditions.

Key words: Action potential, Ionic currents, Voltage clamp method,
Regulation of the ionic channel

1. 細胞膜の構造
2. 静止電位
3. 心筋の活動電位の特徴
4. 心筋のイオン電流とその役割
5. ホルモン, 細胞内物質やイオンにより制御される心筋のイオン電流系
6. 細胞間の電氣的結合

心筋の細胞膜は, 他の興奮性細胞の膜と同様の電氣的性質を共有している. すなわち, 静止電位を有し, 刺激に応じて活動電位を発生すること, 細胞間に電流の受動的な流れを生じること, などである. これら共有の性質

に加え, 心臓が血液を駆出する役割りを果たすためのいくつかの特徴をあわせ持っている. それらは, 神経の興奮や外的刺激なしに規則的に自発の拍動を繰返す能力を持つこと (自動能), 生じた興奮が素早く心臓内各部へ伝えられる細胞間結合や刺激伝導系の存在, 一回の収縮がほぼ完全に終了するまでつづく長い不応期, などである.

1. 細胞膜の構造

心筋の細胞膜の構造は他の膜と同様にその大部分は脂質の二重層よりなっている. その外側は glycocaryx と呼ばれる糖タンパクでおおわれる¹⁾. glycocaryx はシアル酸などよりなり, その外側は毛細血管の基底膜とも

接し、その中に存在するシアル酸は Ca^{2+} の細胞内外の移動に重要な役割りを果たすとされている¹⁾。一方、脂質二重層内にはコレステロール、受容体、 Na^+ - K^+ ATPaseその他の酵素、などが含まれ、イオンの出入りを制御するチャンネルタンパクも存在すると考えられる。

心筋でのチャンネルタンパクの同定はまだ完全にはなされていない。チャンネル部にはイオン選択フィルター、膜電位感知部と閥門 (gate) などが含まれると考えられている。すなわち、フィルター部でイオンを選択し、感知部が膜電位の変化をキャッチすると、これに応じて閥門が開閉し、イオンがチャンネル内を通過することになる。最近、この閥門機構が膜電位のみでなく、細胞内の代謝状態、特に磷酸化 (phosphorylation) や膜直下に増加する Ca^{2+} イオン濃度によっても開閉がコントロールされる可能性がいわれてきている。

細胞膜にはその一部が陥入した構造を示す T 管 (T system) が認められる。心筋の T 管は骨格筋のそれに比べ、分布は疎で巾広い構造を呈している²⁾。T 管は形質膜の連続として膜の電氣的興奮を細胞内へ伝える経路となるとともに、その内腔は細胞外液で占められて細胞内深くでの細胞内と外液との交換がすみやかに行われるように働いている。細胞内には小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) が存在し、ここにも膜系が広く存在する。小胞体膜は心筋の収縮に必要な Ca^{2+} 放出・取込みを主な機能としている。その他の細胞内膜系にはミトコンドリアの膜があるが、ここを介してもエネルギー物質やイオンの移動が行われる。

2. 静止電位 (resting membrane potential)

静止した心筋は形質膜を介して $-80 \sim -90 \text{ mV}$ (外液をゼロとして) の電位を有している (静止電位)。この電位の発生には二つの因子が関与する。一つは細胞内外でのイオンの不均衡な分布であり、細胞内には K^+ が多く、 Na^+ は少なく分布する。第二は膜の K^+ に対する選択的透過性である³⁾。

Na^+ - K^+ ポンプの働きにより Na^+ は細胞内に少なく、 K^+ は多く含まれる。細胞内外の Na^+ の濃度差は大きい。膜の Na^+ に対する透過性が低いので Na^+ の流入は妨げられる。一方、 K^+ は透過性が高いため電気化学的勾配に従って移動は比較的自由である。細胞外の K^+ 濃度を変化させて心筋の静止電位を測定してみると Nernst の式から予想される K^+ の平衡電位に近い値が得られる (Fig. 1)⁴⁾。特に外液 K^+ 濃度が 10 mM 以上ではほとんど理論値に近い値、ないし 10 倍の濃度変化に対する傾斜が得られる。このことから、心筋の膜は K^+ に対し極めて透過性が高く、 Na^+ その他の透過性の低いことが理解される。しかし、外液 K^+ 濃度が 5 mM 以下になると理論値より偏移し、小さい値を示す。その理由としては、低い K^+ 濃度では心筋の K^+ 透過性が低下し、そのために相対的に Na^+ の透過性が高まるためと説明されている⁵⁾。また、洞結節や房室結節の細胞では同じ K^+ 濃度下においても固有筋やプルキニエのそれに比べて小さい。その理由としては、これらの細胞では Na^+ の透過性の高いためとされていたが⁶⁾ 最近の単一心筋の分析から K^+ のコ

Fig. 1 細胞外 K^+ 濃度と静止電位との関係⁴⁾

横軸は細胞外 K^+ 濃度 (mM)、縦軸は静止電位の値を絶対値で示してある (実測値はマイナスがつく)。細い実線はプルキニエ線維からのもの、黒丸と太い実線はネコの心房筋

からの実測値を示す。点線は Nernst の式から予測される理論値で、実測値は $\text{K}^+ = 2 \text{ mM}$ 以上ではよく相関がみられる。 $\text{K}^+ = 2 \text{ mM}$ 以下では理論値から偏位して小さい値が得られている。(転載許可済)

ンダクタンス自体が他の組織に比べて低いことが示されている⁷⁾。

Na^+ - K^+ ポンプの働きは、細胞内 Na^+ を低く、 K^+ を高く維持するのに寄与している。もし、その作働により Na^+ と K^+ の移動が1:1の割合で行われるならば電荷の移動はなく、したがって電位にも変動はみられないはずである。しかるに、 Na^+ と K^+ の移動の割合は必ずしも1:1ではないことが示され⁸⁾、このため Na^+ - K^+ ポンプが起電性をもつこと (electrogenic Na^+ - K^+ pump) がいわれている。心筋においても Na^+ - K^+ ポンプを突然活性化すると静止電位に過分極が認められ、起電性ポンプの存在が広く支持されている⁹⁻¹²⁾。ただし、このポンプ電流自体は極めて小さく、生理的状態での膜電位形成に果たす寄与は少ないと考えてよいであろう。

3. 心筋の活動電位の特徴

心筋は自発的、または外から刺激が加わると活動電位を発生して興奮する。活動電位 (action potential) の波形や時間経過は心臓内の部位や細胞の種類により異なるが、一般的には早い立上り相 (脱分極相) とゆるやかな再分極相とからなる。Fig. 2に代表的な三つの部位からの活動電位波形をシェーマで示す。洞結節細胞からのものは拡張期電位が浅く、かつ一定でなく徐々に時間とともに脱分極方向に変化する (緩徐拡張期脱分極; slow diastolic depolarization)。これよりスムーズに活動電位の立上り相に移行する。活動電位の立上り速度、振巾ともに小さく、その頂点も丸く0mV付近ですぐに再

分極相に移行する。再分極相はゆるやかに経過し、プラトー相はハッキリしない。再分極後ふたたび緩徐拡張期脱分極相に移行するが、後者はペースメーカー電位 (pacemaker potential) とも呼ばれ、後に述べる自動能 (automaticity) の本体である。房室結節細胞からのものとこれと類似の波形を示す。活動電位の各相には名称がつけられ、Fig. 2に示すごとく0相から4相まで分けて呼ばれる。そのうち第2相はプラトー相 (plateau phase) と呼ばれ、心筋活動電位ではこれが著名なことが一つの特徴である。

プルキニエ線維からのものは拡張期電位は深く、時に緩徐拡張期脱分極が認められる。活動電位の最大立上り速度 ($\dot{V}_{\text{max}}$)・振巾・持続時間とともに心筋中最大で、逆転電位も大きく、+30~+40mVを呈する。再分極相は第1相が顕著で、プラトー相も明らかであり、その後早い再分極相 (第3相) が認められる。心室固有筋からのものでは拡張膜電位は一定で、緩徐拡張期脱分極は生理的条件下では認められない。活動電位の最大立上り速度・振巾・持続時間ともにプルキニエ線維からのものに次ぐが、第1相が目立たず、プラトー相が最も高いレベルに認められるのが特徴である。心房固有筋からのものはこれに似るが、プラトー相はあまり顕著でない。

このような心筋活動電位の発生は、膜イオン・チャンネルを介する電流の流れ——イオン電流 (ionic current) ——によってもたらされる。イオン電流は膜内外の電気化学的勾配と膜コンダクタンスによって流れる大きさと時間経過が決められ、後者は膜電位と時間によって変化する。その分析には膜電位を任意の値に固定し、その際

Fig. 2 三種類の心筋細胞から得られる活動電位波形

左は洞結節 (sinus node fiber), 中央はプルキニエ線維 (Purkinje fiber), 右は心室固有筋 (muscle fiber) からのものを示す。

数字は活動電位の各相をあらわす。 E_{max} ; 最大拡張期電位, slow diastolic depolarization ; 緩徐拡張期脱分極

に流れる膜電流を時間の関数として測定する膜電位固定法 (電圧固定法; voltage clamp method) が用いられる。この方法は始め神経軸索に適用されて興奮のイオン機序が見事に解析されたものである¹³⁾。しかし、心筋では細胞がはるかに小さいこと、細胞相互が密接し、かつ細胞間結合により機能的連絡があること、などの理由からその適用が遅れた。そして、1964年以後いくつかの改良の上、二微小電極法・単一遮糖隔絶法・二重遮糖隔絶法などによる電圧固定法が種々の心筋組織を用いて行われ、イオン電流の解析が行われてきた (各方法の詳細・その長所・欠点などは他の総説^{14,15)}を参照されたい)。しかし、これらの多細胞標本を用いた方法では膜電位固定が十分に得られないとの批判をまぬかれず、そのために上記の方法で得られた心筋のイオン電流の特徴が、果たして真のイオン電流の性質を代表しているのか、方法の欠陥によるアーティファクトに修飾されたものかがいくつかの点でつねに問題として残されてきた。

最近、酵素処理により成熟心筋を単一細胞に分離する方法が開発され、これに細胞内灌流や膜電位固定法を用いてイオン電流の分析が可能となってきた^{16,18)}。これらの方法により、これまで多細胞標本で観察されたイオン電流系の大部分の存在が再確認され、大筋ではこれまでの方法の分析の正しかったことが確かめられているが、いくつかの点では定性的及び定量的な面での訂正が必要となってきた。さらにはまた、単一細胞をガラス電極で吸着すると両者間は極めて高抵抗 ($10^{12} \sim 10^{13} \Omega$) でシールされ、このためその内部に含まれる膜にあるチャンネルを流れる微量の電流の測定が可能となってきた (パッチクランプ法; patch clamp method)¹⁹⁾。この方法により単一チャンネル・レベルでの解析も可能となってきた。

4. 心筋のイオン電流とその役割

Fig. 3に羊ブルキニエ線維を用いた二微小電極法により得られた電圧固定法の実記録を示す。静止電位 (-80 mV) 付近では過分極パルスでは内向き電流、脱分極パルスに応じて外向き電流がみられるが、ほぼ同じ電位変化に対しては内向き電流の方が多く流れやすいことがわかる。脱分極の程度を増してゆくと、初めに大きな内向き電流がみられるが、その時間経過は極めて早く 10 msec 以内にほとんど消失してしまう。その後経過のゆるやかなもう一つの内向き電流がみられ、パルスの後半には外向きの電流が認められる。さらに、この組織では -20

Fig. 3 プルキニエ線維での膜電位固定法による電流記録

各写真の上が電流、下が電位の記録をあらわす。 -80 mV の保持電位から 800 msec の矩形波で脱分極または過分極パルスを与えた際の電流変化を示す。横の数字は電位固定中の電位レベルを mV で示す。過分極パルス ($-96, -88 \text{ mV}$) では内向き電流 (下向きの振れ)、脱分極 (-72 mV) ではパルス中を通じ外向き電流がみられるが、 -88 mV の時より流れる電流量は少い。右側の強い脱分極では初めにスパイク状の短い内向き電流 (早い Na^+ 電流) につき、これよりゆるやかな内向き電流 (Ca^+ 電流) とそれにつく外向き電流 (K^+ 電流) がみとめられる。 $+4 \text{ mV}$ への脱分極では早い Na^+ 電流によるスパイクのあとに、一過性に増大してその後減少する外向き電流がみとめられる。

mV より強い脱分極を与えると、一過性に増大し、後に減少する外向き電流がみられる。このように心筋の膜電流には数種類のものがみられ、かつ同じ電位・時間に複数の電流が重複して流れる複雑な系をなしており、このことも心筋イオン電流の解析とその活動電位形成への役割を解明する上での困難の一因となっている。

早い Na^+ 電流 (fast or rapid Na^+ current); -65 mV よりプラス側に脱分極した時にみられる早い大きな内向き電流で、 Na^+ が細胞外から内へ流入することによりもたらされる。早い Na^+ 電流 (I_{Na}) の流入により膜が脱分極されると、さらに大きな I_{Na} の流入を促進する。この意味で I_{Na} の流入は自己再生的に行われることとなる。

I_{Na} は活動電位の立上りをもたらすので、この自己再生的流入により心筋の活動電位の発現は“全か無かの法則” (all or none law) に従うこととなる。 I_{Na} の流れる時期は膜電位固定が得られにくいため、心筋ではその詳しい分析が困難とされてきた。しかし、適当な心筋標本の選択により正確な分析が可能となった^{16, 17, 20)}。その結果、大筋において心筋の I_{Na} は神経や骨格筋のそれに類似しており、一部の細かな点で差異のあることが明らかにされてきている。

I_{Na} は脱分極後急速に活性化され (時定数; 1 msec 以内) 頂点に達するが、脱分極が持続しても頂点に達した後すみやかに減少する (この過程を不活性化; inactivation と呼ぶ)。不活性化の時定数は 5 msec 以内である。電流の最大値、活性化・不活性化の時定数などは膜電位依存性である。また、不活性化があるため、一定の脱分極時に流れる I_{Na} の大きさは脱分極直前の電位により異なる。すなわち、脱分極直前の電位が -90 mV よりマイナス側では最大となり、以後脱分極方向で小となり、 -55 mV 付近ではゼロとなる (14, 15)。不活性化の性質のため、いったん脱分極すると再分極しないかぎり I_{Na} は流れない。 I_{Na} の再活性化 (または不活性化からの回復) は再分極した時の膜電位と時間によって異なる。神経の I_{Na} の不活性化からの回復は 10~20 msec で完了するが、心筋では同様に早く回復する成分の他に、100 msec 以上回復に要する遅い成分が含まれる^{20, 21)}。 I_{Na} はフグの毒の tetrodotoxin (TTX) によりブロックされるが、心筋の I_{Na} は神経などのものより感受性が低く、かつ脱分極やその頻度が高いほど抑制が強く働く (use-or voltage-dependent block) 特徴がある^{22, 23)}。神経では Na^+ のコンダクタンス (g_{Na^+}) と活動電位の最大立上り速度 ($\dot{V}_{max}$) とはよく相関するが、心筋では両者は必ずしも相関せず、特に g_{Na^+} が小さくなると一致しなくなる。これは g_{Na^+} の活性化が比較的遅いため活動電位の立上り時点では定常状態にまで達しえないためと説明されている²⁴⁾。

Patch clamp 法による単一 Na^+ チャンネル電流の解析も行われており、心筋のそれは他組織の Na^+ チャンネルの性質に類似している²⁵⁾。すなわち、チャンネルの slope conductance の大きさ、チャンネル開閉や不活性化の発現は膜電位依存性であること、脱分極の増加によりチャンネルの開口時間が延長し、不活性化はチャンネル電流の減少ではなく、チャンネルの開口確率の減少によること、などが確かめられている。

Fig. 4 遅い内向き電流 (I_s) の Ca^{2+} 依存性

横軸は膜電位、縦軸は I_s のピーク値をとってある。外液 Ca^{2+} 濃度を 1.8 mM (○—○) から 4.5 mM (●—●) に増加すると、すべての電位にわたって I_s の増加がみられている。

遅い内向き電流 (slow inward current; I_s); $-50 \sim -40$ mV よりプラス側への脱分極で I_{Na} より流れる時間経過の遅いもう一つの内向き電流がみられ、これは遅い内向き電流 (I_s) と呼ばれる。 I_s は細胞外 Ca^{2+} 濃度により変化し (Fig. 4), Ca^{2+} で運ばれるところから“ Ca^{2+} 電流” (Ca^{2+} current; I_{Ca}) とも呼ばれるが、外液 Na^+ 濃度の変化にも影響されるところから一部 Na^+ も関与すると考えられている^{14, 15)}。 I_s のイオン選択性は I_{Na} ほど高くなく、 Ca^{2+} , Na^+ の他に Sr^{2+} , Ba^{2+} などの陽イオンもこの系を通過する²⁶⁾。また、実測される I_s の平衡電位は $+30 \sim +40$ mV 付近にあり、予想される Ca^{2+} のそれ ($+150 \sim +180$ mV) より低い。その理由としては、 I_s は Ca^{2+} ・ Na^+ の他に K^+ に対する透過性を示し、特に強い脱分極時にはこの系を外向きに K^+ が流れるためと説明されている²⁷⁾。

I_s は $-50 \sim -40$ mV に閾値電位があり、以後脱分極を増すと電流も増加し、0 mV 付近で最大となった後プラス側では減少する。この電流にも活性化—不活性化の性質があり、それらは膜電位依存性である。 I_{Na} に比べ電流の最大値は約 1/10 以下と小さく、活性化—不活性化の動態 (kinetics) もはるかに遅い。ただし、その数値については多細胞標本の報告ではバラツキが多い。また、 I_s の不活性化からの回復も遅く、その時定数は 100~200 msec と長い^{14, 15)}。 I_s は Mn^{2+} ・ Co^{2+} ・ Ni^{2+} などの無機二価イオンや“ Ca^{2+} 拮抗剤”と呼ばれる有機薬剤によ

り容易に抑制される²⁸⁾。二価イオンのうち、 Mn^{+2} のみは特異で、少量では I_s をブロックし、多量では I_s の系を通過する性質がある^{29,30)}。二価イオンは I_s チャンネルの外側より Ca^{+} の流入をブロックするが、 Ca^{2+} 拮抗剤のうち verapamil・D-600・diltiazem はチャンネルが開いた時にその中に入りこんで内側からブロックするとされている。このため、これら薬剤の I_s に対する抑制効果は脱分極時、その頻度が高くなるほど著明となってくる³¹⁻³³⁾。これに対し、nifedipine などの dihydropyridine 系薬剤にはこの性質はみられない³³⁾。

I_s の活動電位形成にはたす役割りは、この流入によりプラトーが維持されることにある。また、洞結節・房室結節のように静止電位が浅く I_{Na} のほとんど不活性化された細胞では活動電位の立上り相 (0 相) をもたらす。さらに、固有筋やプルキニエ線維などがなんらかの理由で静止電位が浅くなると I_s による遅い立上りをもつ活動電位が発現する。このような活動は“緩徐反応” (slow responses) と称し、不整脈の成因として重要視されている³⁴⁾。 I_s のもう一つの重要な役割りは張力発生との関係である。膜電位固定下に張力を同時に測定すると、 I_s の発現とともに発生張力 (twitch) がみられ、 I_s の増減と一致して発生張力に並行した変化がみられる³⁵⁾ ことより、 I_s により流入する Ca^{2+} が収縮の重要な引金になっていることがわかる。ただし、一回の脱分極により流入する Ca^{2+} の量は収縮タンパクの活性化には不十分な量であり、 I_s として流入すると Ca^{2+} またはこれが刺激となって小胞体からの Ca^{2+} 放出が促進されると考えられている³⁶⁾。なお、張力にはこの他に tonic tension もみられるが、これは I_s とは関係なく、主に電位に依存性を示す。

Catecholamine の投与は I_s を増強させ、同時に細胞内 cyclic AMP を増加させる作用がある。細胞内に cyclic AMP の注入やその増加させる操作、さらには cyclic AMP 依存性 protein kinase を活性化させる操作や薬物によっても同様の I_s 増強効果がみられる³⁷⁾。また、ATP の細胞内注入によっても I_s 増強がみられる³⁸⁾。これらはいずれも I_s の最大コンダクタンスを増加させるが、その kinetics には著変を生じていない。これらの成績から、細胞内で protein kinase による phosphorylation が I_s チャンネルの開閉機構に関与する考えが提唱されている³⁹⁾。これによると、 I_s の関門は phosphorylation された状態になると膜電位の脱分極とともに Ca^{2+} の通過を可能ならしめるとするものであ

る。

単一心筋や patch clamp 法による I_s のチャンネル電流の解析も行われている⁴⁰⁻⁴²⁾。これらによると、 I_s のイオン選択性は高く、 Ca^{2+} の存在下ではほとんど Ca^{2+} のみによって運ばれ、他組織での Ca^{2+} 電流に類似すること、 Na^{+} の関与は細胞外に Ca^{2+} がほとんど存在しない場合に限られること、 I_s の平衡電位は低く、それはこの系を K^{+} が通過することによる⁴³⁾、などが確かめられている。また、 I_s の活性化-不活性化の時間経過は多細胞標本で求められたものよりはるかに早く、活性化の時定数は 0.5-1.1 msec、不活性化には 5-10 msec の早い成分と 30-100 msec の時定数の遅い成分を含むことが判明した⁴⁰⁻⁴²⁾。チャンネル電流の測定から、チャンネルは開口と閉鎖状態をくり返し、その確率は電位により異なること、脱分極の持続により不活性化を生じるが、これには膜電位依存性の他に、チャンネルを介して流入する Ca^{2+} によっても不活性化が促進されること^{42,43)} がみとめられている。平均の開口時間は一次指数関数的に分布するが、平均閉鎖時間は二つの指数関数で分布が示され、これよりチャンネルには一つの開口状態と二つの閉鎖状態とが存在すると解釈されている⁴⁵⁾。

K^{+} 電流 (K^{+} current); 心筋の K^{+} 電流には多種類のものが報告されているが^{14,15)}、全ての心筋に共通して存在するものとしては二つのタイプのものが挙げられる。一つは膜電位が変化するとその瞬間に新しい値をとり、以後時間とともに変化しないもの (電位依存性・時間非依存性)、他は電位変化後にも時間とともに変化するもの (電位および時間依存性) である。前者は iK_1 電流と呼ばれ、過分極では流れやすく脱分極方向では流れにくい性質があり、この性質は内向き整流作用 (inward-going rectification, または異常整流 anomalous rectification) を持つとも呼ばれる。この電流は Cs^{+} や Ba^{2+} により抑制され、細胞外 K^{+} により増強させられる^{14,15)}。ただ最近の報告によると iK_1 にも多少の時間依存性が認められている⁴⁶⁾。 iK_1 は静止電位の決定や長いプラトー相の形成に寄与している。Patch clamp のデータから iK_1 の単一チャンネル電流が記録され、 K^{+} に選択性をもち、単一チャンネル・コンダクタンスは細胞外 K^{+} に依存することが確認されている⁴⁷⁾。またチャンネル・コンダクタンスと開口確率ともに K^{+} の平衡電位より脱分極すると減少する性質がみられ・内向き整流の性質をもつことも確められている。

電位および時間依存性の電流は -40mV よりプラス側に脱分極すると認められ、脱分極の時間が長くなるほど外向きに多く流れるための遅延整流 K^+ 電流 (delayed-rectifier K^+ current) と呼ばれる^{14, 15)}。この K^+ 電流は神経軸索で初めに報告された K^+ 電流に類似のものであるが、心筋のものは神経のそれに比べてはるかに小さく、かつ流れる時間経過も遅い。この電流はプルキエ線維では i_{K_1} 電流、固有筋では i_{K_1} または i_{K} 電流とも呼ばれる。この電流は脱分極が続くかぎり増加して不活性化の性質はみられず、その時間経過と最終値は膜電位によって異なってくる。また、脱分極から再分極すると電流は直ちに元の値に変化するのではなくある時間経過をもってゆるやかに元の値に戻ってくる。この経過は脱活性化 (deactivation) と呼ばれる。 i_{K_1} または i_{K} の役割りは再分極相、特に第3相の決定に寄与している。また、後に述べる浅い膜電位での緩徐拡張期脱分極に本電流の脱活性化が関与する。なお、現在までのところ patch clamp 法による単一チャンネル電流の記録は少なく、その詳しい本態については今後の検討を要する。

プルキエ線維では -20mV よりプラス側に脱分極すると、一過性に増加しやがて減少してくる外向き電流がみられる。これは positive dynamic current とか transient outward current などと呼ばれる。この電流は Cl^- により運ばれると考えられたが⁴⁸⁾、むしろ K^+ が大部分で一部 Cl^- により運ばれるとする考えが強く⁴⁹⁾、少なくともその一部は細胞内 Ca^{2+} の増加によってもたらされる可能性が指摘されている⁵⁰⁾。この電流には早い Na^+ 電流と同様の電位及び時間依存性の不活性化がみられる⁴⁸⁾。そして、この電流はプルキエ線維に特有の著明な第一相の形成に寄与すると考えられている。

ペースメーカー電流；自動能の本体である緩徐拡張期脱分極は二つの膜電位レベルでみとめられる。一つは洞結節や房室結節の細胞にみられるもので $-60 \sim -30\text{mV}$ の膜電位、他は心室のプルキエ線維などで $-90 \sim -60\text{mV}$ で認められる。前者に関与する電流は、先行する脱分極により活性化された i_{K} が再分極とともに元の値に戻らず、ゆっくりと脱活性化されるために膜電位は再び脱分極側に徐々に変化し、同時にこの電位付近では I_{f} が活性化されるためにペースメーカー電位が発現すると説明されている⁶⁾。一方、 -50mV よりマイナス側への過分極により活性化される内向き電流があり、これは i_{f} または i_{h} 電流と呼ばれる⁵¹⁾。この電流がはたし

て洞結節の自動能に寄与しているか否かについては意見が分かれており、いまだ決着はついていない。

一方、プルキエ線維の緩徐拡張期脱分極には i_{f} 電流が主体をなすと考えられる⁵²⁾。 i_{f} は主に Na^+ により運ばれるが、一部 K^+ によっても運ばれる。本電流は電位により活性化される時間経過、大きさともに異なってくる。単一筋においても本電流の存在は認められているが⁵³⁾、まだ patch clamp 法での同定はなされておらず、詳しい分析は充分になされているとは言えない。

5. ホルモン、細胞内物質やイオンにより制御される心筋のイオン電流系

これまで述べたイオン電流系は細胞内外のイオン濃度差と電位変化、すなわち電気化学的駆動力、とコンダクタンスによってその流れる大きさと時間経過の大部分が決められてきたものである。ところが、すでに I_{f} の項で述べたごとく細胞内での phosphorylation がチャンネルの開閉に寄与することがいわれており、このように電気化学的勾配以外の要因がチャンネル機構に関与し得ることが明らかにされてきつつある。

迷走神経からの伝達物質であるアセチルコリン (Ach) は心房筋の K^+ コンダクタンスを増加させると古くからいわれてきた⁵⁴⁾。最近の一連の研究から Ach を投与すると急速に増加し、その後減少する K^+ 電流の活性化が認められた。そして、この増加・減少の過程は Ach がムスカリン受容体への結合とその後の分解の過程によるものと考えられ、この伝達物質が受容体と結合することにより i_{K_1} に似た K^+ チャンネルを開くことが確認された。Ach により活性化される K^+ チャンネルは内向き整流を示すこと、細胞外 K^+ 濃度に依存性をもつこと、単一チャンネル・コンダクタンスの大きさがほぼ同じであるなど i_{K_1} との類似点があるが、電位依存性が異なること、 i_{K_1} のみを含む patch に Ach を作用させても変化のみられない点などより、 i_{K_1} とは別の系と考えられている^{55, 56)}。Ach 依存性の K^+ 電流の活性化により静止電位の過分極、自動能の抑制などを心房や洞結節・房室結節にもたらすことになる。

神経細胞などにおいて細胞内に Ca^{2+} が増加すると K^+ コンダクタンスが増加することがいわれ、Meech 効果などと呼ばれている⁵⁷⁾。プルキエ線維に Ca^{2+} を注入すると静止電位の増加、活動電位の短縮と i_{K_1} の増加が認められ、心筋においても Meech 効果が報告された⁵⁸⁾。ただ、これまでのところ、単一心筋や patch clamp 法

を用いての心筋における Meech 効果の確認はなされておらず、今後の検討を要するところである。ただ最近、単一心筋において細胞内 Na^+ が $20 \sim 30 \text{ mM}$ に達すると K^+ 電流を増加させる作用が報告⁵⁹⁾されており、その生理学的意義が注目される。

細胞内増加 Ca^{2+} が心筋においても一つの内向き電流系を活性化されることが示され、これが異常興奮のもととなる異常自動能をもたらすところから、その病態生理学的意義が注目されている。この現象が注目されるキッカケはジギタリス中毒時にみられる心室性不整脈の原因がプルキエ線維に生じる一過性脱分極 (transient depolarization; TD) とこれより発生する異常興奮によることが示されたことによる。その後、他の特殊心筋や脱分極心筋でも同様の現象が報告^{34, 60)}されていたが、我々はこの現象を心室固有筋の通常の静止電位レベルでも発現することを発見し (Fig. 5)⁶¹⁾、すべての心筋に共有される活動であることを明らかにした。この一過性脱分極は振動性電位 (oscillatory afterpotential; OAP),

Fig. 5 心室固有筋標本にみられた DADs, triggered-activity および頻拍

同一標本における記録を示す。A, B, C は 10 拍のトレース刺激を与えた時のもので、基本刺激間隔 (BCL) は A では 400 msec, B では 300 msec, C は 250 msec で与えた際の記録である。A では刺激中止後 DADs がみられている。B では DADs の振幅が大きく閾値に達して triggered-activity (矢印) がみられている。C では刺激中止後 triggered activity (矢印) とその後につづく頻拍が発現している。

Hiraoka, Okamoto; *Arch. Pharmacol.*, 317: 339-344 (1981) (転載許可済)

遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization; DAD) などと呼ばれ、特に後者の呼称が広く用いられてきている³⁴⁾。この活動は活動電位にひきつづきみられる後電位の一種であり、その振幅が増して閾値に達すると異常興奮 (これを triggered activity と呼ぶ) をひきおこすため不整脈の成因として注目されている。

TD ないし DAD の発現に一致して一過性の内向き電流 (transient inward current; TI) の流れることが見出された (Fig. 6)⁶²⁾。この電流は脱分極パルスを再分極した際にみられ、その電位依存性や時間経過が I_s とは異なるため別の内向き電流系と考えられるにいたった。TD や TI の発現時には同時に後収縮がみられ細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇がうかがわれること^{63, 64)}、細胞内 Ca^{2+} 注入時にみられること⁶⁵⁾や細胞に Ca^{2+} 負荷を生じる条件下でみられやすいこと、しかも貯蔵庫である小胞体からの Ca^{2+} 放出に影響する薬剤や操作により TD や TI が変化させられること⁶³⁻⁶⁷⁾、などが観察されている。これらの現象より TI は細胞に Ca^{2+} 負荷が生

Fig. 6 心室固有筋での遅延後脱分極と一過性内向き電流

左側は活動電位の記録、右側は同一標本を電圧固定法により -46 mV から $+11 \text{ mV}$ に 1 sec の脱分極パルスを与えた時のものを示す。上段が膜電位、下段が膜電流をあらわす。(B)の 0 mM-K^+ , 3.6 mM-Ca^{2+} 液中では DAD がみられ、電圧固定法では脱分極から再分極した際に一過性内向き電流がみられている。このような変化は (A) と (C) ではみられていない。

じると小胞体からの“ Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出”(Ca^{2+} induced Ca^{2+} -release)が生じ、このために増加した膜直下の Ca^{2+} がTIチャンネルを開口せしめるためであると説明されている⁶⁴⁾。その根拠として上記の観察の他に skinned cardiac muscleでは過量の Ca^{2+} を投与すると Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -releaseを生じて筋原線維が収縮する観察⁶⁸⁾が挙げられている。TIの平衡電位は0mV付近にあり、 Ca^{2+} 濃度変化では影響されず、 Na^+ により影響されるところから主に Na^+ により運ばれ、一部 K^+ も関与すると考えられている⁶⁴⁾。そして patch clampの研究から Ca^{2+} 増加により活性化される内向き電流系があり、 $\text{K}^+ \cdot \text{Na}^+$ ともに通過する陽イオン非選択性チャンネル(non-selective cation channel)がこのTIをもたらしと考えられているが⁶⁹⁾、果たしてこの考えがそのまま多細胞標本でみられるTIに相当するものかは今後さらに検討を要する問題と思われる。

従来から心筋虚血に際して活動電位の短縮を生じることがよく知られ、その成因としては I_{Na} の減少と K^+ 電流の増加とが言われてきた。ところが、最近の単一心筋の分析により高度の酸素欠乏時には I_{Na} が不変のままで K^+ 電流の著明な増加のみられることが確められた。そして、これは通常の2–5mMのATPが細胞内に存在することにより抑制されていた K^+ 電流がATPが2mM以下に低下することにより、その抑制がとれて著明な K^+ 電流の流出が生じることが明らかにされた⁷⁰⁾。すなわち、このATPにより規制される K^+ 電流は酸素欠乏や虚血時に役割りを発揮する電流であり、その病態生理学的意義をもつ電流といえる。ただし、この電流の生理学的意義については今のところわかっていない。

6. 細胞間の電氣的結合

心筋細胞は各々形質膜にかこまれており、それぞれは独立した構造をとっている。このため隣り合う細胞間を電氣的興奮が素早く伝わるためには細胞間に電気抵抗の低い連絡がなければならない。この役割りを果たするのがギャップ・ジャンクション(gap junction)の部である。心筋細胞間に電氣的結合のあることは、機能的には一点に与えられた電流によりその心筋組織の長軸方向に沿って受動的な電位変化が記録され、かつてその電位変化の傾斜と距離は細胞1個の長軸径よりはるかに長いこと(例えば、羊プルキニエ線維の細胞長径 $< 200\mu$ であるのに、ケーブル解析から得られる空間定数は2.0mmであ

る⁷¹⁾、イオンやある分子量以下の粒子が gap junctionを介して隣りの細胞へ流入することが確認されること⁷²⁾、などから支持されている。gap junctionの抵抗を測定した報告によると約 $1\Omega \cdot \text{cm}^2$ となり、これは形質膜の抵抗よりはるかに低い(ただし、いずれも面積の測定には問題がある)。gap junctionのイオン透過性、ひいてはその電気結合をコントロールするのが局所の Ca^{2+} 濃度であるとされ、心筋では自由 Ca^{2+} 濃度が $5 \times 10^{-7}\text{M}$ をこえると電氣的結合の破綻(uncoupling)を生じてくるとされる⁷³⁾。その他、局所 H^+ 濃度の増加もuncouplingを生じることがいわれているが⁷⁴⁾、これには H^+ イオンそのものが一次的原因になっているのか、 H^+ 濃度の増加が局所の Ca^{2+} 濃度に変化を生ぜしめるためかは今のところ不明である。gap junctionの発育の程度や分布は心筋細胞や部位によって異なり、このことが心臓内各部や方向により伝導速度が異なる一因となっている。例えば、洞結節や房室結節の細胞では細胞径も小さく、gap junctionの発育の悪いことがこの部の伝導速度の遅いことの一因となっている。また、細胞の縦方向に多く、横方向には gap junctionの分布が少ないため、前者に比べ後者の方向への伝導速度は小さい。

ま と め

心筋の興奮に関与するイオン電流系には多数のものがあり、その制御機構も複雑である。しかし、最近の単一心筋での膜電流の分析や patch clamp法による単一チャンネル電流の解析によりその詳細が少しずつ明らかにされてきつつある。活動電位の形成には、早い Na^+ 電流、 Ca^{2+} 電流、 K^+ 電流などが関与し、これらは主に各イオンの電気化学的勾配によってその流れが決められているが、これ以外にも細胞内の代謝状態、ホルモンの受容体への結合、膜直下のイオン濃度、などによっても、コントロールされるイオン機構の存在が明らかになってきた。これらは生理的のみならず、病態生理学的にも心筋細胞の興奮に重要な要因となるものと考えられる。

文 献

- 1) Langer, G. A.: *Am. J. Physiol.*, **237**, H 239–H 246 (1979)
- 2) Sommer, J. R., E. A. Johnson: Ultrastructure of cardiac muscle. In, *Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, The Heart*, ed by R. M. Berne and N. Sperelakis. Am. Physiol. Soc. Bethesda, 1979, pp 113–186.

- 3) Sperelakis, N.: Origin of the cardiac resting potential. In, *Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, The Heart.* ed by R.M. Berne, N. Sperelakis. Am. Physiol. Soc., Bethesda, 1979, pp 187–267.
- 4) Weidmann, S.: *Elektrophysiologie der Herzmuskel Faser.* Hans Huber, Bern, 1956.
- 5) Carmeliet, E.E.: Chloride and potassium permeability in cardiac Purkinje fibers. Presses Academiques Europeennes, Bruxelles, 1961.
- 6) Irisawa, H.: *Physiol. Rev.*, **58**, 461–498 (1978)
- 7) Noma, A., T. Nakayama, Y. Kurachi, H. Irisawa: *Jpn. J. Physiol.*, **34**, 245–254 (1984)
- 8) Sjodin, R. A., L. A. Beauge: *J. Gen. Physiol.*, **51**, 152S–161S (1968)
- 9) Page, E., S. K. Storm: *J. Gen. Physiol.*, **48**, 957–972 (1965)
- 10) Glitsch, H. G.: *Pflugers Arch.*, **307**, 29–46 (1969)
- 11) Hiraoka, M., H. H. Hecht: *Pflugers Arch.*, **339**, 25–36 (1973)
- 12) Glitsch, H. G.: Characteristics of active sodium transport in intact cardiac cells. In, *Excitation and neural control of the heart.* ed. by M. N. Levy and M. Vassalle. Am. Physiol. Soc. Bethesda, 1982, pp 37–58.
- 13) Hodgkin, A. L., A. F. Huxley: *J. Physiol. (Lond)*, **117**, 500–544 (1952)
- 14) Carmeliet, E., J. Vereecke: Electrogenesis of the action potential and automaticity. In, *Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, The Heart.* ed. by R.M. Berne and N. Sperelakis. Am Physiol. Soc., Bethesda 1979, pp. 269–334.
- 15) Coraboeuf, E.: Ionic basis of electrical activity in cardiac tissues. In, *Excitation and neural control of the heart.* ed. by M. N. Levy and M. Vassalle Am. physiol. Soc., Bethesda, 1982, pp 1–35.
- 16) Lee, K. S., T. A. Weeks, R. L. Kao, N. Akaike, A. M. Brown: *Nature*, **278**, 269–271 (1979)
- 17) Powell, T., D. A. Terrar, V. W. Twist: *J. Physiol. (Lond)*, **302**, 131–153 (1980)
- 18) Isenberg, G., V. Klockner: *Nature*, **284**, 358–360 (1980)
- 19) Hamil, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sackmann, F. J. Sigworth: *Pflugers Arch.*, **391**, 85–100 (1981)
- 20) Colatsky, T. J.: *J. Physiol. (Lond)*, **305**, 215–234 (1980)
- 21) Brown, A. M., K. S. Lee, T. Powell: *J. Physiol. (Lond)*, **318**, 479–500 (1981)
- 22) Reuter, H., M. Baer, P. M. Best: Voltage dependence of tetrodotoxin action in mammalian cardiac muscle. In, *Biophysical Aspects of Cardiac Muscle*, ed. by M. Morad Academic Press, New York, 1978, pp 129–142.
- 23) Cohen, C. J., B. P. Bean, T. J. Colatsky, R. W. Tsien: *J. Gen. Physiol.*, **78**, 383–411 (1981)
- 24) Bean, B. P., C. J. Cohen, R. W. Tsien: Block of cardiac sodium channels by tetrodotoxin and lidocaine; Sodium current and Vmax experiments. In, *Normal and Abnormal Conduction in the Heart.* ed. by A. Paes de Carvalho, B. F. Hoffman and M. Lieberman, Futura, Mt. Kisco, New York, 1982, pp 198–206.
- 25) Cachelin, A. B., J. E. de Peyer, S. Kokubun, H. Reuter: *J. Physiol. (Lond)*, **340**, 389–401 (1983)
- 26) Kohlhardt, M., H. P. Haastert, H. Krause: *Pflugers Arch.*, **342**, 125–136 (1973)
- 27) Reuter, H., H. Scholz: *J. Physiol. (Lond)*, **264**, 17–47 (1977)
- 28) Kohlhardt, M., B. Bauer, A. Krause, A. Fleckenstein: *Pflugers Arch.*, **338**, 115–123 (1973)
- 29) Delahayes, J. F.: *Circ. Res.*, **36**, 713–718 (1975)
- 30) Ochi, R.: *J. Physiol. (Lond)*, **263**, 139–156 (1976)
- 31) McDonald, T. F., D. Pelzer, W. Trautwein: *Pflugers Arch.*, **385**, 175–179 (1980)
- 32) Heschler, J., D. Pelzer, G. Trube, W. Trautwein: *Pflugers Arch.*, **393**, 287–291 (1982)
- 33) Lee, K. S., R. W. Tsien: *Nature*, **302**, 790–794 (1983)
- 34) Cranefield, P. F.: *The Conduction of the Cardiac Impulse.* Futura, New York, 1975.
- 35) Trautwein, W., T. F. McDonald, O. Tripathi: *Pflugers Arch.*, **354**, 55–74 (1975)
- 36) Fozzard, H. A.: *Ann. Rev. Physiol.*, **39**, 201–220 (1977)
- 37) Reuter, H.: *Nature*, **301**, 569–574 (1983)
- 38) Irisawa, H., S. Kokubun: Modulation by intracellular ATP and cyclic AMP of the slow inward current in isolated single ventricular cells of the guinea-pig. *J. Physiol. (Lond)* **338**, 321–337, 1983.
- 39) Reuter, H.: *Ann. Rev. Physiol.*, **41**, 413–424 (1979)
- 40) Isenberg, G., V. Klockner: *Pflugers Arch.*, **395**, 30–41 (1982)
- 41) Hume, J. R., W. Gile: *J. Gen. Physiol.*, **81**, 153–194 (1983)
- 42) Tsien, R. W.: *Ann. Rev. Physiol.*, **45**, 341–358 (1983)
- 43) Lee, K. S., R. W. Tsien: *Nature*, **297**, 498–501 (1982)
- 44) Hagiwara, S., L. Byerly: *Ann. Rev. Neurosci.*, **4**, 69–125 (1981)
- 45) Fenwick, E. M., A. Marty, E. Neher: *J.*

- Physiol. (Lond)*, **331**, 599–635 (1982)
- 46) Carmeliet, E.: *J. Physiol. (Lond)*, **327**, 285–308 (1982)
- 47) Sackmann, B., G. Trube: *J. Physiol. (Lond)*, **347**, 641–657 (1984)
- 48) Fozzard, H. A., M. Hiraoka: *J. Physiol. (Lond)*, **234**, 569–586 (1973)
- 49) Kenyon, J. L., W. R. Gibbons: *J. Gen. Physiol.*, **73**, 139–157 (1979)
- 50) Siegelbaum, S. A., R. W. Tsien: *J. Physiol. (Lond)*, **299**, 485–506 (1980)
- 51) Yanagihara, K., H. Irisawa: *Pflüger Arch.*, **385**, 11–19 (1980)
- 52) DiFrancesco, D. A.: *J. Physiol. (Lond)*, **314**, 377–393 (1981)
- 53) Callewaert, G., E. Carmeliet, J. Vereecke: *J. Physiol. (Lond)*, **349**, 643–661 (1984)
- 54) Trautwein, W., S. W. Kuffler, C. Edwards: *J. Gen. Physiol.*, **40**, 135–145 (1956)
- 55) Noma, A., W. Trautwein: *Pflügers Arch.*, **377**, 193–200 (1978)
- 56) Sakmann, B., A. Noma, W. Trautwein: *Nature*, **303**, 250–253 (1983)
- 57) Meech, R. W., N. B. Standen: *J. Physiol. (Lond)*, **249**, 211–239 (1975)
- 58) Isenberg, G.: *Nature*, **253**, 273–274 (1975)
- 59) Kameyama, M., M. Kakei, R. Sato, T. Shibasaki, H. Matsuda, H. Irisawa: *Nature*, **309**, 354–356 (1984)
- 60) Ferrier, G. R.: *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **19**, 459–474 (1977)
- 61) Hiraoka, M., Y. Okamoto, T. Sano: *Circ. Res.*, **48**, 510–518 (1981)
- 62) Lederer, W. J., R. W. Tsien: *J. Physiol. (Lond)*, **263**, 73–100 (1976)
- 63) Kass, R. S., W. J. Lederer, R. W. Tsien, R. Weingart: *J. Physiol. (Lond)*, **281**, 187–208 (1978)
- 64) Kass, R. S., R. W. Tsien, R. Weingart: *J. Physiol. (Lond)*, **281**, 209–226 (1978)
- 65) Matsuda, H., A. Noma, Y. Kurachi, H. Irisawa: *Circ. Res.*, **51**, 142–151 (1982)
- 66) Karagueuzian, H. S., B. G. Katzung: *J. Physiol. (Lond)*, **327**, 255–271 (1982)
- 67) Hiraoka, M., S. Kawano: *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**, 285–289 (1984)
- 68) Fabiato, A., F. Fabiato: *J. Physiol. (Lond)*, **249**, 469–495 (1975)
- 69) Colquhoun, D., E. Neher, H. Reuters, C. F. Stevens: *Nature*, **294**, 752–754 (1981)
- 70) Noma, A.: *Nature*, **305**, 147–148 (1983)
- 71) Weidmann, S.: *J. Physiol. (Lond)*, **118**, 348–000 (1952)
- 72) De Mello, W. C.: *Prog. Biophys. molec. Biol.*, **39**, 147–182 (1982)
- 73) Dahl, G., G. Isenberg: *J. Membrane Biol.*, **53**, 63–75 (1980)
- 74) Turin, L., A. E. Warner: *J. Physiol. (Lond)*, **300**, 489–504 (1980)

第3回関西界面科学セミナー

主 催：日本化学会コロイドおよび界面化学部会関西支部・コロイド懇話会

協 賛：日本膜学会ほか

界面科学に関心を持つ技術者および研究者の密接な交流をはかり、界面化学の進歩を促進することを目的として、今回は「生体機能に学ぶ」という主題を選び、下記のセミナーを開催いたします。講演および討論の時間も十分にとってありますので、じっくり学び討論できると思います。ふるって御参加下さい。

主 題：「生体機能に学ぶ」

日 時：8月9日(金) 13時から10日(土) 17時まで

会 場：㈱ノエビア研修センター

〒527 滋賀県八日市市岡田町112-1

電話 (07482) 3-6810

参加申込締切：7月27日(土) 定員(60名)になり次第
講 演：

8月9日(金) — (13時から) —

生体膜の物理化学 (京大薬) 中垣正幸
麻酔薬の作用機構 (大阪成人病センター) 吉川 清

8月10日(土) — (9時から) —

タンパク質：その多態・多様性

(阪大タンパク研) 高木俊夫

真珠の層状構造とその出来る仕組み

(水産庁養殖研) 和田浩爾

— (13時から) —

リポソーム——界面活性剤除去法によるリポソーム形成を中心に—— (富山医薬大) 上野雅晴

医用材料の界面科学(国立循環器病センター) 松田武久

参加費：(宿泊・食事(1泊4食)代、懇親会費、講演要旨集代を含む)

主催学会会員 12,000円、一般 15,000円、

学生 11,000円

参加申込方法：ハガキに氏名、所属、住所(連絡先)、電話、会員、非会員、学生の別を明記のうえ、下記へお申し込み下さい。

申込先：〒658 神戸市東灘区岡本8-9-1

甲南大学理学部化学教室 菅野竹雄

(電話(078) 431-4341 内線359)