

## 学位論文題名

# アドレナリン作動性 $\beta$ 受容体を介するモルモット心室筋 の細胞内 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ 活動度と細胞内 pH の変化

## 学位論文内容の要旨

アドレナリン作動性 $\beta$ 受容体刺激は、心臓の機能に大きな影響を及ぼすが、これと関連があると考えられる、 $\beta$ 受容体刺激による心室筋細胞膜のイオン・チャネルと担体輸送系の活性変化については、広く検討されている。一方、これらの活性変化によって、細胞内イオン活動度の変化と、それに起因する膜電位変化と細胞内 pH ( $\text{pH}_i$ ) の変化が生じ、興奮と収縮に影響するものと思われるが、これら $\beta$ 受容体刺激による心室筋細胞内イオン環境の変化に関する総合的な検討はない。そこで、本研究ではイオン選択性微小電極法により、 $\beta$ 受容体刺激によるモルモット右室乳頭筋の細胞内  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  活動度 ( $a'_{\text{Na}}$ ,  $a'_{\text{K}}$ ,  $a'_{\text{Cl}}$ )、静止膜電位、 $\text{pH}_i$  の変化及びその細胞内機構について検討した。

【方法】体重 200-400 g の雌雄のモルモットから右室乳頭筋を摘出し、重炭酸塩または HEPES 緩衝タイロード液で表面灌流した。ガラス微小電極とイオン選択性微小電極を同一の標本に刺入し、静止状態での細胞内電位を記録した。得られた諸値は、平均値  $\pm$  標準誤差で表した。統計学的検討は、t 検定及び分散分析を行って検討し、危険率 ( $p$ ) が 0.05 より低いものを有意とした。

### 【実験結果】

#### ① モルモット乳頭筋における $\beta$ 受容体刺激による静止膜電位の脱分極

重炭酸塩緩衝タイロード液灌流下において、モルモット右室乳頭筋の静止膜電位は、 $-93.1 \pm 0.5$  mV であった。Isoproterenol (ISO)  $1 \mu\text{M}$  を投与すると、静止膜電位は投与開始後2分で  $7.2 \pm 1.4$  mV の最大脱分極を示し、その後は再分極した。ISO による静止膜電位脱分極は、選択的 $\beta_1$ 遮断薬 atenolol  $10 \mu\text{M}$  で抑制されたが、選択的 $\beta_2$ 遮断薬 ICI 118,551  $0.1 \mu\text{M}$  では抑制されなかった。また、forskolin  $10 \mu\text{M}$  や dibutyryl cAMP  $10 \text{ mM}$  でも静止膜電位の脱分極が観察された。

#### ② ISO による静止膜電位脱分極に対するイオン・チャネル及び輸送系遮断薬の影響

$\text{Na}^+$  チャネル遮断薬 tetrodotoxin  $10 \mu\text{M}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネル遮断薬 nifedipine  $10 \mu\text{M}$  過分極誘発性内向き電流 ( $I_f$ ) を抑制する  $\text{Cs}^+$   $5 \text{ mM}$ 、内向き整流  $\text{K}^+$  電流を抑制する  $\text{Ba}^{2+}$   $0.3 \text{ mM}$ 、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系と  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系を抑制する amiloride  $1 \text{ mM}$  は、ISO による脱分極には影響しなかった。これに対して、 $\text{Cl}^-$  電流を抑制する anthracene-9-carboxylic acid (9AC,  $1 \text{ mM}$ ) によって、ISO による脱分極は  $2.5 \pm 0.6$  mV へと有意に減弱した。

### ③ $\beta$ 受容体刺激による静止膜電位脱分極時の $a'_{K}$ 、 $a'_{Na}$ 、 $a'_{Cl}$ の変化

$a'_{K}$  は ISO によって  $127.2 \pm 5.9$  mM から  $138.0 \pm 7.9$  mM へと増加した。 $a'_{Na}$  は ISO によって  $3.0 \pm 1.1$  mM から  $0.8 \pm 0.2$  mM 減少した。Ouabain  $10 \mu\text{M}$  で  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump を抑制すると、 $a'_{Na}$  は徐々に増加した。Ouabain 存在下に ISO を投与しても一過性脱分極が観察され、 $a'_{Na}$  の増加傾向は ISO 投与前後で変化しなかった。 $a'_{Cl}$  は ISO によって  $24.6 \pm 3.7$  mM から  $17.9 \pm 3.3$  mM へ減少した。 $a'_{Cl}$  の減少は、9AC によって著明に抑制された。

### ④ $\beta$ 受容体刺激による $\text{pH}_i$ の変化

HEPES 緩衝タイロート液灌流下では、ISO によって  $\text{pH}_i$  は  $7.16 \pm 0.03$  から  $0.08 \pm 0.01$  pH 単位低下した。重炭酸塩緩衝タイロート液灌流下では、 $\text{pH}_i$  は  $7.13 \pm 0.08$  から  $0.08 \pm 0.01$  pH 単位低下し、両者の間に有意差を認めなかった。Atenolol によって ISO による  $\text{pH}_i$  の低下は抑制されたが、ICI 118,551 では抑制されなかった。HEPES 緩衝タイロート液灌流下で forskolin, dibutyryl cAMP, epinephrine  $10 \mu\text{M}$ , nor-epinephrine  $10 \mu\text{M}$  も  $\text{pH}_i$  を低下させた。

### ⑤ $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換系、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共輸送系及び解糖系阻害薬と ISO による $\text{pH}_i$ の低下

HEPES 緩衝タイロート液灌流下で、amiloride によって  $\text{pH}_i$  は  $7.17 \pm 0.05$  から  $7.11 \pm 0.04$  へと低下した。Amiloride 存在下では、ISO による  $\text{pH}_i$  の低下は、 $0.14 \pm 0.02$  pH 単位へと増強した。重炭酸塩緩衝タイロート液灌流下では、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換系や  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送系を抑制する 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS,  $1 \text{ mM}$ ) は、 $\text{pH}_i$  の変化を来さなかった。ISO による  $\text{pH}_i$  低下は DIDS では影響を受けなかった。2-deoxyglucose  $5.5 \text{ mM}$  や iodoacetec acid  $0.3 \text{ mM}$  で解糖系を抑制すると、HEPES 緩衝タイロート液灌流下での ISO による  $\text{pH}_i$  低下は抑制された。

【考案】静止モルモット乳頭筋が  $\beta$  受容体刺激によって、一過性に脱分極することが明らかになった。ISO による一過性脱分極は  $\text{Cs}^+$  によって影響を受けなかったのも、モルモット乳頭筋の一過性脱分極は、ヒツジ Purkinje 線維で報告された  $\text{Cs}^+$  により抑制される脱分極反応 (Glitsch HG, et al. (1986) Pflügers Arch 406: 144-150, Terris S, et al. (1986) Am J Physiol 251: H1056-H1061) とは明らかに異なるものと思われる。一過性脱分極と脱分極の際に観察された  $a'_{Cl}$  の減少が、9AC によって抑制されたことから、この現象は  $\text{Cl}^-$  を担体とする内向き電流が活性化し、 $\text{Cl}^-$  の流出が生じたことによるものと思われる。 $a'_{K}$  の増加と  $a'_{Na}$  の減少は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump の活性化によるものと思われる。 $\text{pH}_i$  の低下は A-kinase の活性化による解糖系の亢進によるものであり、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系は、 $\text{pH}_i$  低下に対して補償的に働いている可能性があるものと思われた。 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換系と  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送系は、 $\text{pH}_i$  調節にあまり関与していないものと思われた。

【結論】モルモット静止乳頭筋において  $\beta$  受容体を刺激すると、内向き  $\text{Cl}^-$  電流の活性化による静止膜電位脱分極と  $a'_{Cl}$  減少、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump 活性化による  $a'_{K}$  増加と  $a'_{Na}$  減少、解糖系の活性化による  $\text{pH}_i$  の低下が生じることが明かとなった。これらの変化によって  $\beta$  受容体刺激による電気力学的反応が修飾されているものと思われた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 斎 藤 秀 哉

副 査 教 授 剣 持 修

## 学 位 論 文 題 名

### アドレナリン作動性 $\beta$ 受容体を介するモルモット心室筋 の細胞内 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ 活動度と細胞内 pH の変化

心臓においては、アドレナリン作動性 $\beta$ 受容体刺激によって、イオン・チャネルや担体輸送系の活性変化が生じ、膜電位や細胞内 pH が変化して、陽性変力・変時作用に影響するものと思われる。しかしながら、その背景にある細胞内イオン環境の変化は不明である。

そこで、本研究では、イオン選択性微小電極法により、重炭酸塩及び HEPES 緩衝タイロート液灌流下の、モルモット右室乳頭筋における、isoproterenol (iso) による細胞内  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  活動度 ( $a^i_{\text{Na}}$ ,  $a^i_{\text{K}}$ ,  $a^i_{\text{Cl}}$ )、細胞内 pH ( $\text{pH}_i$ ) の変化と、その背景にある細胞内機構について検討した。

$\beta_1$ 受容体刺激により 9AC 感受性  $\text{Cl}^-$  チャネルが活性化され、 $\text{Cl}^-$  が細胞外に流出することにより、静止膜電位脱分極が生じることと、解糖系の亢進によって  $\text{pH}_i$  が低下すること等が明らかとなった。 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系は  $\text{pH}_i$  低下に対して代償的に働いているが、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換系と  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送系は  $\text{pH}_i$  調節にはあまり関与していないことも知られた。

臨床的には、心筋虚血時における不整脈や心機能低下には、交感神経系の亢進による脱分極と  $\text{pH}_i$  低下が関与しており、又持続的に $\beta$ 受容体を刺激した際に観察される最大発生張力の低下 (fatigue) も  $\text{pH}_i$  低下が関与しているものと考えられた。

$\beta$ 受容体刺激による陽性変力作用の主要な発現部位は作業心室筋である。従来の、 $\beta$ 受容体刺激による細胞内イオン環境の変化に関する研究は、Purkinje 線維を対象としたものが主体であったが、本研究によって、作業心室筋における細胞内イオン環境の変化が明らかにされたことになり、学位論文に値する結果と判断された。副査の斎藤秀哉、剣持両教授並びに北畠教授から

夫々数問の質問があり、又副査の両教授からは後日改めて審査が行われたが、いずれも順当な応答が得られ合格と判定された。