

# 心臓機能の新しい調節機序

—第1報 ATPの心臓作用—

## Effects of ATP on the Frog Myocardium

辻崎 恵美 後藤 昌義 近藤 和彦\*)  
Emi Tsujisaki Masayoshi Goto Kazuhiko Kondō

亀井 真理\*) 島 知代\*)  
Mari Kamei Tomoyo Shima

(1989年11月30日 受理)

### — 要 旨 —

心臓機能の新しい調節機序に関連し、平滑筋で発見された purinergic nerve 支配およびその受容体  $P_1$ ,  $P_2$  などが、心筋組織にも存在するか否かをその伝達物質 ATP の作用を目印に食用ガエルの心臓および各部心筋について検索した。その結果、静脈洞心筋には ATP により  $K$  イオン透過性を増大し心拍を抑制する  $P_1$  レセプター、心房筋には ATP により  $Ca$  電流  $I_{Ca}$  を増強する  $P_2$  レセプター、心室筋にはその両者  $P_1$ ,  $P_2$  レセプターが共に存在することが明らかになった。かくして心臓機能の調節にも purinergic nerve の関与あるいは代謝産物自体による自己調節機序があることが推測された。

### 緒 論

心筋の電気現象に心筋代謝が関与することはつとに予測されていたことであるが、細胞内代謝の作用と、細胞外からの代謝産物の作用は区別して考える必要がある。ATP は、細胞内で slow channel 維持に重大な役割を果たすことが知られている<sup>6)</sup>、最近では、細胞外からの代謝関連物質の作用が注目されている<sup>7, 8)</sup>。すなわち細胞外投与の ATP, GTP および関連ヌクレオチドの作用について、カエル心房筋において、 $I_{Ca}$ ,  $I_n$ ,  $I_{Ca}$  依存性張力の増強、非依存性張力の抑制などが報告されている<sup>9)</sup>。

他方 Burnstock<sup>1)</sup> は、平滑筋支配の purinergic nerve において、神経から放出された ATP が、筋肉細胞の  $P_1$ ,  $P_2$  レセプターに作用して効果をあらわすことを模式化し、心筋にも似た様な受容体があると推測している。しかし心筋においてはまだこれを実証する詳細な研究はなされていない。そこでわれわれは、ATP の心筋に及ぼす影響と、そのメカニズムを解明し、ATP の心臓調節作用を明らかにすることを試みた。

### 研究方法

#### 1. 灌流心臓における実験

食用ガエル摘出心臓の灌流には、八木式灌流法を用いた。まず脳・脊髄を破壊したのち、胸部を切り開き右大動脈幹・左右前大静脈・肺静脈を結紮切断した。ついで後大静脈に静脈カニューレを挿入、結紮切断し左大動脈幹に動脈カニューレを挿入して結紮切断した後に、心臓を摘出遊離させ生理的に灌流した。この灌流心臓について心電図と収縮張力の同時記録を行ったが、心電図誘導用の電極は一方は静脈洞に細い銀線で、他方は心尖部にセルフィンで固定し第 II 誘導に相当した双極誘導とした。また収縮張力は、心尖部のセルフィンの動きを絹糸で、strain gauge に導き心電図と張力を同時にペン書き記録器 (日本光電, PMP 3004) で連続記録した。その他の条件は、下記 strip 標本と同様である。

#### 2. Strip 心筋標本における実験

食用ガエルの脳・脊髄を破壊したのち、心臓を取り出し、静脈洞標本では、洞房結接部を切り離し、筋線維を長さ 5~6 mm, 径 0.5 mm 程度の条片に分離し標本として使用した。

心房筋では、静脈洞から心尖部へ向かって切開し、左心房前壁の筋線維を洞標本と同程度の心筋条片に分離して標本とした。

心室筋は、房室結接部から室を切り離し心尖部に向かって切開し、上記と同程度の筋条片に分離して実験に使用した。

\*) 1986 年度卒業論文学生

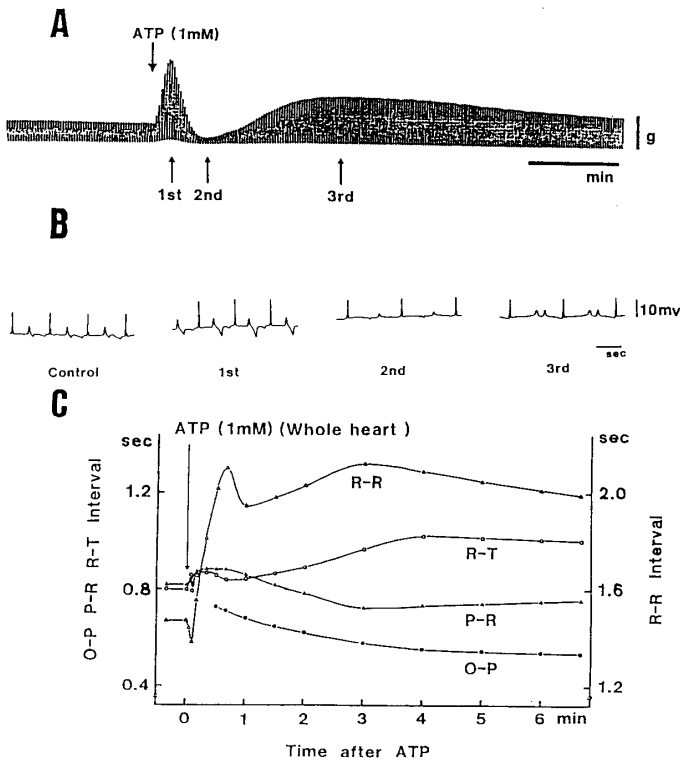


図1. 摘出全心臓灌流標本の収縮張力、心電図に及ぼすATPの作用

A) 収縮張力の実際の記録, B) 心電図, C) 心電図各棘波の間隔の変化, ただし洞の電気現象をOと仮称した。ゆえにO-Pは洞房伝導時間を示す。

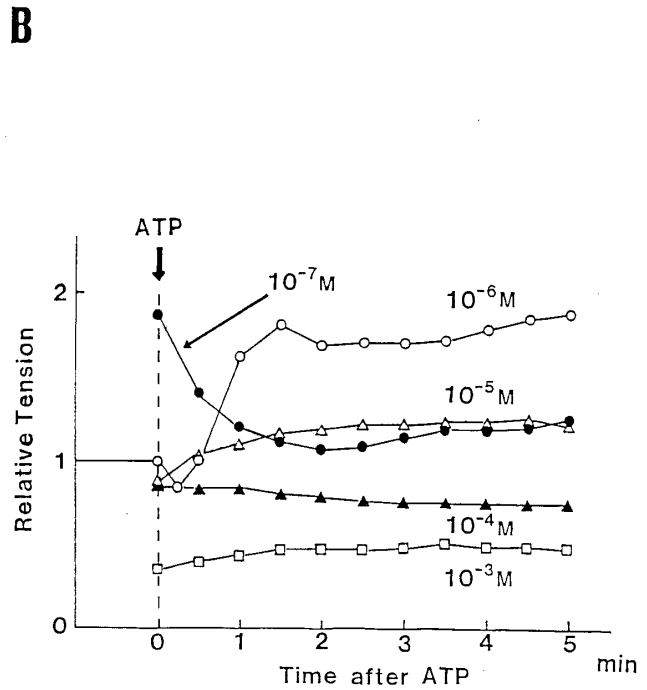
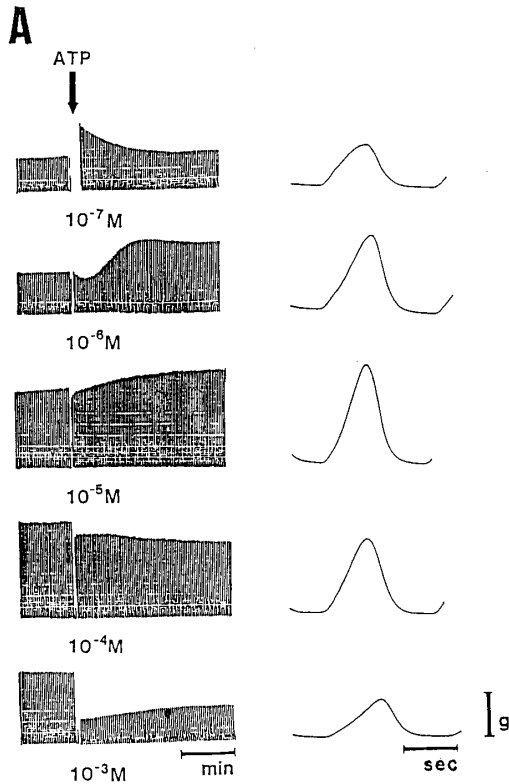


図2. 摘出全心臓灌流標本の収縮張力に及ぼすATP効果の濃度依存性

A) 10<sup>-7</sup> ~ 10<sup>-3</sup> Mの各濃度ATPを作用させた時の実際の記録, B) 各濃度ATP作用の時間経過。

膜電位, 膜電流および収縮張力の測定には, Gotoら<sup>4)</sup> (1982) 工夫の二重ショ糖隔絶法および単純隔絶法を用いた。すなわち, 二重ショ糖隔絶法では5つの小室に隔絶, 区分した実験容器に標本を装着し, 中央の幅0.3 ~ 0.4 mmの小室は, 正常リンゲル液または試験溶液で灌流し, 中央の両側の小室は, 電気的隔絶のため250 mMショ糖液で灌流し, さらに両外側の小室は, その部分の心筋を完全に脱分極するために200 mM KCl溶液で灌流した。単純隔絶法は, 2つの小室に隔絶, 区分した実験容器に標本を装着し, 一方の小室は正常リンゲル液または試験溶液で灌流し, もう一方の小室は, その部分の心筋を完全に脱分極するために200 mM KCl溶液を満たした。

正常リンゲル液の組成は, NaCl:110.0, KCl:2.5, CaCl<sub>2</sub>:1.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:2.15, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.85, glucose:20.0 (各mM/l) で, pHは7.2とした。

ATPは, 各濃度(10<sup>-8</sup> ~ 3 × 10<sup>-3</sup> M) いずれも正常リンゲル液に直接添加して使用した。

### 実験結果

#### 1. 摘出全心臓灌流標本における実験

食用ガエル摘出全心臓灌流標本にATP 1 mMを作用させた時の実際の記録を図1 A, Bに示す。そのAは収

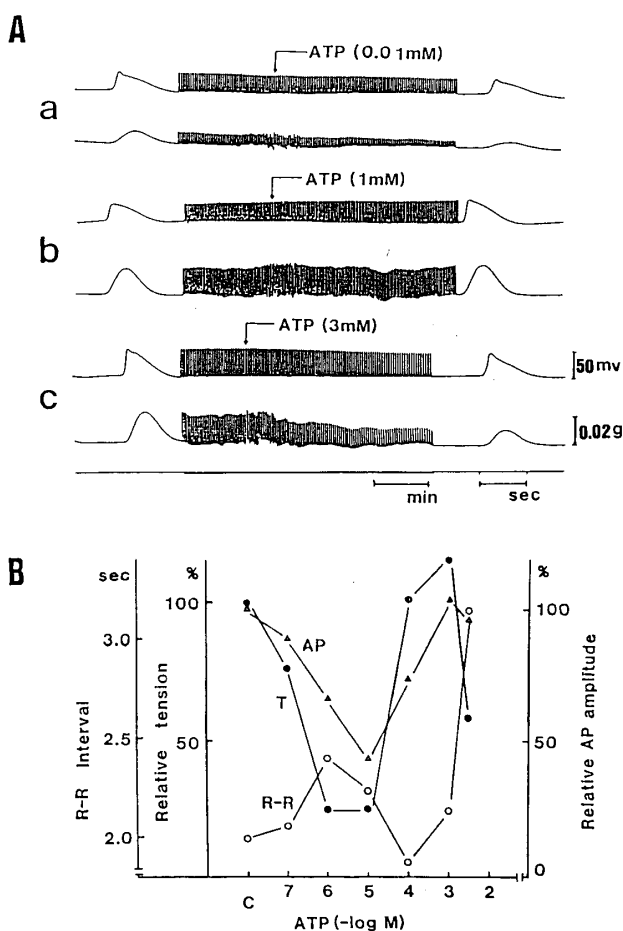


図3. 分離静脈洞に及ぼす ATP の作用 (単純隔絶法)

A) 各濃度における ATP の作用。上段：活動電位，下段：収縮張力。B) ATP 効果の用量作用曲線。AP：活動電位持続時間，T：収縮張力，R-R：心拍間隔，C：正常リンゲル液での対照値。

縮張力の slow record, B は心電図の fast record である。図より明らかなように, ATP は収縮張力を三相性 (第一相増強, 第二相抑制, 第三相増強) に変化させた。心電図においても, 図 1 B に示す通り各相により特有の変化を示すことがわかる。つまり, 第一相では各棘波の増大, 第二相では RR 間隔の延長, 第三相では T 波の逆転および RR 間隔の再短縮が認められた。

図 1 C は, 心電図各棘波間隔の時間的变化を示す。RR 間隔, RT 間隔は三相性を示しながら延長している。すなわち, 心拍数は抑制され, 興奮の持続は増大したことになる。一方, PR 間隔と OP 間隔 (洞房伝導時間) は短縮を示した。つまり伝導速度は速くなっていることになる。

次に, ATP 濃度による作用の相違を検討した。図 2 A は,  $10^{-7} \sim 10^{-3} M$  の各濃度の ATP を cumulative に作用させた時の収縮張力の実際の記録で, B は A を標準化してグラフにしたものである。 $10^{-7} M$  では初期増強,  $10^{-6} M$  では二相性増強,  $10^{-5} M$  では単相性増強,  $10^{-4} M$

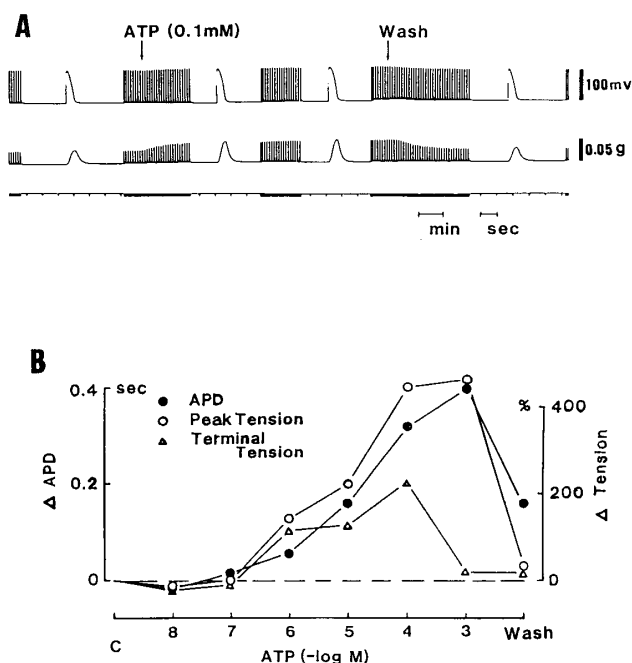


図4. 摘出心房筋の活動電位と張力に及ぼす ATP の効果

A) 二重ショ糖隔絶法による細胞内電位 (上段) と収縮張力 (下段) に及ぼす ATP 0.1 mM の作用。B) ATP 効果の用量作用曲線。●活動電位の持続, ○その用量での最大張力, △同最終張力, なお活動電位の持続は振巾の 15% レベルで測定した。

以上では単相性抑制を示している。

この結果と 1 mM 作用時の結果とを照らし合わせてみると, 1 mM 作用時の第一相目増強は  $10^{-7} M$  での初期増強, 第二相目抑制は  $10^{-6} M$  での一相目に現れた抑制, 第三相目増強は  $10^{-5} M$  での単相性増強にそれぞれ対応するのではないかとと思われる。

## 2. 摘出静脈洞標本における実験

摘出静脈洞心筋に及ぼす ATP の作用を図 3 に示す。その A は,  $10^{-5} M, 10^{-3} M, 3 \times 10^{-3} M$  の濃度における張力と活動電位の実際の記録である。 $10^{-3} M$  と  $3 \times 10^{-3} M$  においては過分極を生じた。張力においては,  $10^{-5} M$  で抑制,  $10^{-3} M$  で増強,  $3 \times 10^{-3} M$  で再抑制であった。

B は, 張力 (T), 活動電位 (AP), 心拍間隔 (R-R) についての用量曲線である。張力と活動電位は,  $10^{-7} M$  の低濃度抑制,  $10^{-4} \sim 10^{-3} M$  で増大,  $10^{-3} M$  以上で再抑制と, 三相性の変化をした。心拍間隔については, 張力や活動電位と逆の三相性を示した。以上より, ATP の静脈洞に及ぼす効果は抑制が主体であると推測された。

## 3. 摘出心房筋における実験

ATP の摘出心房筋に及ぼす作用を図 4 に示す。心房筋においては ATP はいずれの濃度においても張力増強作用のみを示したが, 図 4 A でも 0.1 mM の ATP で, 張力と活動電位は共に単相性増強を示している。またわ

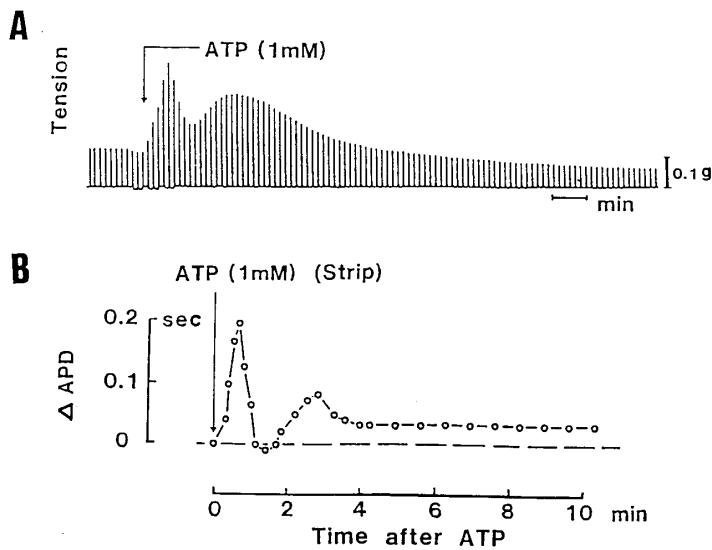


図5. 心室筋における ATP  $10^{-3}$  M の効果  
A) 収縮張力。B) 活動電位持続時間の変化 ( $\Delta$ APD)

ずかに脱分極を生じた。これらは静脈洞に及ぼす作用と逆の効果であった。

図4Bは、活動電位の持続と張力に及ぼすATP効果の用量曲線である。張力と活動電位はよく平行して、ATP濃度の上昇と共に単相性増強を示した。正常リンゲル液で洗浄後は、活動電位の持続、張力共にすみやかに回復した。これは、投与ATPが細胞内代謝まで影響せず細胞外から直接作用しているためだと考えられる。

ATPの心臓作用の詳細を解明するため、心房筋について膜電位固定下で実験を行い膜電流に及ぼす効果を検討した。図には示していないが、ATP (0.05 ~ 1 mM) を心房筋に作用させると、作用後収縮張力と脱分極時の内向きCa電流  $I_{Ca}$  の増強がみられ、洗浄後には減少した。ゆえに収縮張力増強は、内向き電流  $I_{Ca}$  の増強によるものと推測される。心筋の収縮張力は、 $I_{Ca}$  依存性、 $I_{Ca}$  非依存性、SR依存性の少くとも三種に区別できるが、カエル心筋ではSRに乏しく、 $I_{Ca}$  依存性、非依存性の二要素のみを容易に区別できる。そこで膜電位固定下について検討するため、小脱分極パルス (70 mV, 0.15 sec) で  $I_{Ca}$  と  $I_{Ca}$  依存性張力を誘発し、大脱分極パルス (150 mV, 1 sec) で  $I_K$  と  $I_{Ca}$  非依存性張力を発生させた。小脱分極パルスへの張力は増大し、 $I_{Ca}$  も増大を示した。大脱分極パルスへの張力は減少し、外向き電流  $I_K$  の抑制がみられた。

以上の実験結果よりATPの摘出心房筋に及ぼす作用は、活動電位と収縮張力の単相性増強であり、それは主として内向き電流  $I_{Ca}$  の増強と外向き電流  $I_K$  の抑制によるものであると推測される。

#### 4. 摘出心室筋における実験

摘出心室筋にATP ( $10^{-3}$  M) を作用させた時の張力と

活動電位の変化を図5に示す。そのAは張力の記録である。全心臓に及ぼす効果と同じく三相性を示している。Bに示した活動電位の持続についても同様であった。

### 考 察

全心臓におけるATP ( $10^{-6}$  ~  $10^{-3}$  M) の作用は、収縮張力を三相性に变化させた。心電図についてみると心拍リズムは抑制されるが、伝導時間の方は短縮した。そこで洞、房、室の各摘出標本について各部の効果を比較してみた。洞では、 $10^{-6}$  Mで膜の過分極と共に収縮張力、活動電位、心拍数共に抑制を生じた。房では、収縮張力、活動電位共に単相性の増大、膜静止電位は脱分極を示した。室では、収縮張力、活動電位共に全心臓と同じく三相性の効果を示した。

心室筋についてのFlitney, Singhらの実験によれば、cAMPは初期増強、中期抑制、後期増強の三相性を示すが、cGMPはcAMPに遅れて増強、抑制の二相性を示すという。ゆえにcAMPとcGMPの濃度比により、収縮張力の三相性が起こると報告している。Burnstockによると、平滑筋ではpurinergic nerveにアデノシン感受性の  $P_1$  レセプター、ATP感受性の  $P_2$  レセプターが存在する。これが心筋にも適用できるとすると、 $P_1$  レセプターはcGMPを介し  $I_K$  を増大させ、 $P_2$  レセプターはcAMPを介し  $I_{Ca}$  を増大させる。摘出した洞、房、室の各実験結果より、洞では過分極、心拍抑制から  $I_K$  の増大が推測されるので、主に  $P_1$  レセプターが作用すると考え

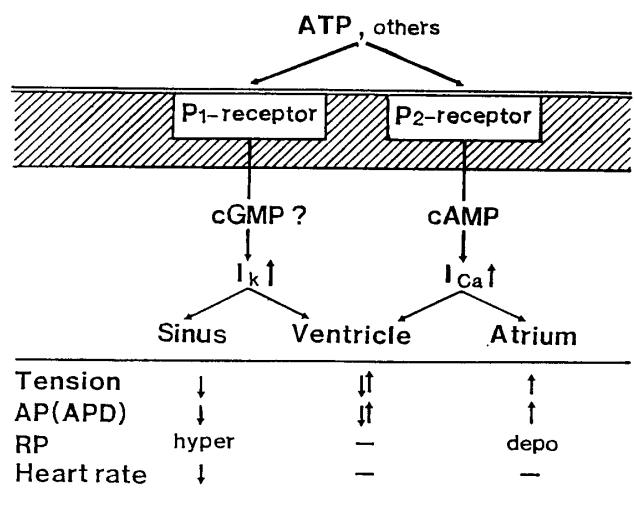


図6. カエル心筋に及ぼすATPの作用仮説

Purinergic nerveの神経・筋伝達には、アデノシン感受性の  $P_1$  レセプター、ATP感受性の  $P_2$  レセプターが知られているが、これらがカエルの洞、房、室の生理的活動とどのように関連しているかを示す。説明本文参照。

られる。房では  $I_{Ca}$  と張力の増大が認められるので、主に  $P_2$  レセプターが存在すると考えられる。室においては三相性の変化を示すことから、 $P_1$ ,  $P_2$  両方のレセプターが存在すると推測される。以上の仮説をまとめたものが図6である。

ただし摘出心房筋において、アセトアルデヒドを作用させた後、正常リンゲル液で洗浄した標本に ATP を作用させると三相性の反応が得られた。ゆえに房においてもある特殊条件下においては、主に作用していた  $P_2$  レセプターが何らかの原因で作用が減少し、主役を果たしていなかった  $P_1$  レセプターの作用が増大したのだと考えられる。また灌流心臓の所見のように、ATP 濃度により作用するレセプターが異なってくるのが推測された。

## 要 約

食用ガエルの摘出全心臓と、洞、房、室各心筋に及ぼす ATP の心臓作用について研究を行った。全心臓では八木式灌流法により、収縮張力と心電図を連続記録した。摘出心筋標本では二重ショ糖隔絶法また単純隔絶法により、膜電位固定下また非固定下で、膜電位、膜電流、収縮張力を同時記録して解析した。その結果、次のような所見が得られた。

1) 全心臓では ATP  $10^{-3}$  M を作用させると、収縮張力において初期増強、続く抑制と著しい再増強の三相性の変化を生じた。心電図でも三相性の変化がみられ、心拍数は三相性に抑制されるが、RT および伝導速度は増大した。ただし ATP の作用は濃度依存性を示した。

2) 静脈洞心筋では、 $10^{-6}$  M で膜の過分極を生じ、心拍数、張力共に抑制されるが、 $10^{-4}$  M 付近では張力が回復し、脱分極を生じた。心房筋では張力および活動電位は単相性に増大し、脱分極を生じた。心室筋では張力、活動電位ともに、増大、抑制、増大と三相性の変化を示した。

3) 膜電位固定下の心房筋で小脱分極パルスを与えるると、 $I_{Ca}$  の増大に平行して  $I_{Ca}$  依存性張力が増大し、大脱分極パルスを与えると、 $I_k$  の抑制に平行して  $I_{Ca}$  非依存性

張力が減少した。

平滑筋における purinergic nerve 支配には、アデノシン感受性の  $P_1$  レセプター、ATP 感受性の  $P_2$  レセプターが存在することが知られているが、本実験の結果からカエルの心臓にも同様な受容体が存在し、洞では  $P_1$  レセプター、房では  $P_2$  レセプターが主役を果たし、室では  $P_1$ ,  $P_2$  レセプターの両方が作用していると推測された。

## 参 考 文 献

- 1) Burnstock, G. (1980) : Purinergic receptors in the heart. *Circ. Res.* (Suppl. 1), **46** : 175 — 182.
- 2) Flitney, F. W. and Singh, J. (1980) : Inotropic responses of the frog ventricle to adenosine triphosphate and related changes in endogenous cyclic nucleotides. *J. Physiol.*, **304** : 21 — 42.
- 3) Goto, M., Yatani, A. and Tsuda, Y. (1977) : An analysis of the action of ATP and related compounds on membrane current and tension components in bullfrog atrial muscle. *Jpn. J. Physiol.*, **27** : 81 — 94.
- 4) Goto, M., Urata, M. and Hyōdō, T. (1982) : Instantaneous and delayed outward currents of bullfrog atrial muscle in Ca-free or Na-deficient conditions. *Jpn. J. Physiol.*, **32** : 573 — 587.
- 5) 後藤昌義 (1984) 心臓の生理, 南江堂, 東京.
- 6) Irisawa, H. and Kokubun, S. (1983) : Modulation by intracellular ATP and cyclic AMP of the slow inward current in isolated single ventricular cells of the guinea-pig. *J. Physiol.*, **338** : 321 — 337.
- 7) MacLeod, D. P. and Daniel, E. E. (1965) : Influence of glucose on the transmembrane action potential of anoxic papillary muscle. *J. Gen. Physiol.*, **48** : 887 — 899.
- 8) Schneider, J. A. and Sperelakis, N. (1974) : The demonstration of energy dependence of the isoproterenol induced transcellular  $Ca^{2+}$  current in isolated perfused guinea pig hearts. *J. Surg. Res.*, **16** : 389 — 403.