

Thesis

ラット心筋興奮収縮連関に対するアデニンの作用

埼玉医科大学薬理学教室

(指導：遠藤 實教授)

李 月

哺乳動物心筋の興奮収縮連関は calcium-induced calcium release (CICR) 機構を介すると考えられている。しかし, CICRを抑制するとされるアデニンは, 心筋の生理的収縮を抑制しないと報告されているので, 本研究で詳細に検討した。

これまでの研究では, アデニン単独では CICR をむしろ促進するが, 強い CICR 促進物質である ATP が存在する生理的な条件下では, CICR を抑制することが, 骨格と心筋でスキンド・ファイバーを用いて確認されている。本研究では, 心筋では, アデニンは CICR 促進薬であるカフェインの低濃度における単収縮張力の増加と高濃度における拘縮のいずれも抑制することを見出した。従って, アデニンは心筋の CICR を抑制することを再確認した。しかし, アデニンは心筋の生理的な単収縮張力を全く抑制せず, むしろゆっくりと促進した。

収縮の前段階である細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性変化 (Ca^{2+} transient) をエクオリンを用いて単収縮張力と同時に測定した。アデニン投与直後では, Ca^{2+} transient ピーク値は著しく抑制され, その後, 時間とともに回復する傾向が見られた。一方, Ca^{2+} transient の持続時間はアデニンによって時間とともに徐々に延長していった。洗條後 Ca^{2+} transient ピーク値と持続時間はコントロール値まで回復した。従って, アデニンが CICR を抑制するために Ca^{2+} transient が減少したと考えられた。この抑制作用が張力に反映しなかったのは, CICR は抑制されるものの, Ca^{2+} transient の持続が延長したためと考えられた。実際, 単収縮張力のピーク張力は低下しないものの, 発生速度はアデニン存在下で遅くなっている。アデニンによる Ca^{2+} transient 持続時間の延長は, 筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み抑制作用の結果と考えられる。以上の結果から, アデニンの作用は複雑であるが, 心筋興奮収縮連関は CICR を介するという考えと矛盾していないことが判明した。もう一つの CICR 抑制薬であるプロカインは CICR を誘発する高濃度 K 拘縮を抑制することを確認しており, 興奮収縮連関の基本メカニズムは CICR であるという結論を支持した。

緒 言

動物の心臓は, 個体が生まれてから死に至るまで一刻の休みもなく拍動して, 血液を全身に送り続けている。このポンプ作用を営むため, 心室の壁を形成する筋肉は, 各拍動毎に全体がほぼ同期して収縮しなければならない。心室筋全体の同期は, 心筋細胞の活動電位の伝播という電気現象を通じて, 局所からその隣接局所への速やかな情報伝達によって達成される。各局所において心筋細胞膜に生じた活動電位 (興奮) は, 細胞内部に存在する収縮装置である筋原線維の収縮を引き起こす。この興奮が収縮を引き起こす過程は興奮収縮連関と呼ばれ, 心筋の収縮力調節は主としてこの興奮収縮連関過程を通じて行われる。

収縮力調節という意味で, 心筋の興奮収縮連関は

骨格筋の興奮収縮連関と大きく異なっている。すなわち骨格筋においては, 筋細胞の興奮は常にそのほぼ最大収縮を引き起こすので, その収縮力の調節は主として興奮する細胞の数を調節することによって行われるが, 心筋は上述のとおり常にすべての細胞が興奮しているので, その収縮力を調節するには, 個々の細胞の収縮力が調節されなければならない。その調節が可能なように心筋の興奮収縮連関過程は骨格筋と異なる分子機序を用いて組み上げられているのである。

骨格筋と心筋との興奮収縮連関の最も大きな違いは, それが細胞外液の Ca^{2+} 濃度に依存するか否かに現れている。骨格筋では, 興奮は細胞外の Ca^{2+} 濃度如何にかかわらずほぼ同じ大きさの収縮を惹起する¹⁾が, 心筋では, Ringer²⁾ が 1 世紀以上前にすでに明らかにしたように, 細胞膜興奮の引き起こす収縮は細胞外液の Ca^{2+} 濃度に依存し, Ca^{2+} が外液に存在しないと収縮は起こらない。心筋では, その細胞膜興奮に特有なプ

ラトー相において膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開口し、 Ca^{2+} が細胞外から細胞内に流入してくる³⁾が、流入 Ca^{2+} 量は当然細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存する。その流入 Ca^{2+} が興奮収縮連関に重要な役割を果たすので、心筋収縮の細胞外液 Ca^{2+} 濃度依存性が生じると考えられている。

収縮装置である筋原線維の生理的な収縮は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって惹起される⁴⁾。その Ca^{2+} は、骨格筋においても心筋においても筋小胞体からの放出によって供給される。心筋では上記のとおり興奮に伴って Ca^{2+} 流入が起きるが、その流入 Ca^{2+} 量は少なく、生理的な収縮を惹起するには全く不十分であり、筋小胞体からの放出が必要なのである⁵⁾。筋小胞体は、その膜に存在する Ca^{2+} ポンプ蛋白の働きにより、内腔に多量の Ca^{2+} をふだんから蓄積しているの、興奮の情報を受けて筋小胞体膜の Ca^{2+} 放出チャネルが開口すると、 Ca^{2+} が放出されて筋原線維に供給される。横紋筋小胞体の Ca^{2+} 放出チャネルは、植物アルカロイドのリアノジンを特異的に結合することを利用して単離精製されたので、リアノジン受容体と呼ばれ、骨格筋と心筋とは異なる分子種であることが分かっている⁶⁾。

1970年頃に Ca^{2+} 自身が筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を惹起するという Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR)機構が発見され⁷⁻⁹⁾、後に、リアノジン受容体は、骨格筋型も心筋型も共にCICRの性質を有していることが明らかにされた¹⁰⁻¹²⁾。CICR機構の存在にもかかわらず骨格筋の興奮収縮連関においては、細胞外からの Ca^{2+} 流入を必要としないことと一致して、CICRとは無関係な分子機序でリアノジン受容体の開口が起きることが明らかになっているが¹³⁾、心筋においてはCICR機構の発見以来、興奮に伴って細胞外から流入した Ca^{2+} はリアノジン受容体に作用してCICRを起こすので流入量に応じた量の Ca^{2+} が筋小胞体から放出するのではないかと考えられたのは自然の流れである。しかし、この考えは定量的に詳細に検討すると、(1)小胞体のCICRの Ca^{2+} 感受性はかなり低い¹³⁾、(2) Ca^{2+} 放出量は必ずしも Ca^{2+} 流入量によって一義的には決まらない¹⁴⁾、(3) Ca^{2+} 流入によって小胞体の Ca^{2+} 放出が開始した後に膜電位を再分極すると、心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} 放出開始時よりもむしろ高くなっているにもかかわらず、 Ca^{2+} 放出は停止してしまう¹⁴⁾、(4)CICR機構は正のフィードバックをかけるはずなのに Ca^{2+} 放出はall-or-none型にならない、など種々の難点があった。しかしながら、これらの難点は、 Ca^{2+} 放出チャネルの近傍の空間(その空間に細胞膜の膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開口している)における局所の Ca^{2+} 濃度は細胞全体とは異なると考えると、すべて説明可能である¹⁵⁾。実際、それを裏付けるデータが積み重ねられ¹⁶⁾、CICRが心筋の生理的 Ca^{2+} 放出機構であるという考えに対する反対はほとんどなくなったよ

うに思われる。このCICRを介する機序によって、心筋では流入 Ca^{2+} 量を調節することを通じて収縮力を興奮収縮連関段階において調節することが可能になっていると考えられる。

この心筋興奮収縮連関機序の考えが正しければ、CICRを抑制する薬物は心筋の生理的収縮を抑制するはずである。しかしThorens¹⁷⁾は、正常のNa濃度を含有する細胞外液中においては、CICRを抑制するプロカインが心筋の膜電位固定法により与えた脱分極による収縮を抑制しないことを報告している。この事実を延長すれば、心筋の自発収縮または通常の電気刺激による収縮も当然プロカインによっては抑制されないと考えられるが、プロカインは、膜電位依存性Naチャネル、したがって心筋の活動電位発生を抑制するので、これを検証することができない。一方、それ自身はCICRを促進するが、ATP存在下の生きた筋細胞内ではCICRを抑制することが骨格筋において知られているアデニンをを用いてCICRを抑制したときに(ATPの強いCICR促進作用がアデニンの弱い促進作用によって置き換えられる結果、CICRは抑制を受ける¹⁸⁾)、心筋収縮は全く抑制されないという予備的実験結果が報告されている¹⁹⁾。もしこれらの薬理学的実験がその額面どおり受け取れるものであるならば、それは心筋の興奮収縮連関がCICRを介するという考えに重大な疑問を投げかけることになる。心筋の興奮収縮連関の生理的重要性を考えると、この問題に対して明確な結論を得ることは緊急の課題なので、本実験においては、心筋の興奮収縮連関に対するアデニンの作用を中心に詳細な検討を加えた。

本実験の結果は、前半部分、後半部分の二回、学会においてそれぞれ発表した^{20,21)}。

方 法

1. 実験材料及び溶液

8週齢雄性Wistarラットの頭部を殴打して意識を消失させた後、頸動脈を切断して放血致死させ、心臓を取り出した。心臓は、生理的塩類溶液に入れ、100%酸素を通気しながら、右心室または左心室乳頭筋を分離した。用いた生理的塩類溶液の組成は以下のとおりである(単位mM)。NaCl 150, KCl 4, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1.0, HEPES (N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid) 5.0, glucose 5.6 (pH 7.4, NaOHで調整)。必要な場合には、 CaCl_2 濃度を適宜減少させた。アデニンは等モルのメタンスルホン酸と共に生理的塩類溶液に溶かし、pHをNaOHで調整した。K拘縮実験は、 $[\text{K}] \cdot [\text{Cl}]$ の積を一定にして行った。その際、生理的塩類溶液のNaをKで置換し、Clはメタンスルホン酸で置換した。実験温度は、 Ca^{2+} transientの測定は30℃で、その他の実験はすべて20℃で行った。

2. 心筋収縮力の測定

乳頭筋の両端を糸で縛り、等尺張力をストレーンゲージ (UL-10GR, Minebea Co, Tokyo) により測定、記録した。単収縮は、持続時間 3.3 ミリ秒で supramaximal の電気刺激を 0.2 または 0.5 Hz の頻度で与えて惹起した。約 60 分間刺激を続けて張力が安定した後、筋長を変えて単収縮張力を測定し、最大張力を発生する長さの 80-90% の筋長で実験を行った。カフェイン拘縮と K 拘縮は、それぞれカフェインと K を適用する時点での小胞体の含有 Ca^{2+} 量を一定にするため、0.5 Hz の単収縮刺激を続けて収縮力が一定になってから電気刺激を止めて、カフェインまたは K を適用した。

3. Ca^{2+} transient の測定

Ca^{2+} transient は、エクオリンを用いて山形大学医学部薬理学教室において、同教室で通常用いられている方法^{22,23)}で測定した。簡潔に方法を述べると、エクオリン溶液 (2 mg/ml) をガラスピペット内に 2-3 μl 充填し、無 Ca^{2+} 条件下 (Ca^{2+} 10^{-7} - 10^{-6} M) で、乳頭筋の筋細胞内に 5 分間以内で手早く注入した。標本は図 1 の装置の 50 ml の実験槽にセットし、細胞外 Ca^{2+} 濃度を 10 分間置きに 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 1.8 mM と順次増加させた後、電気刺激を開始した。その後、温度をゆっくりと 30°C まで上昇させ、90-120 分間安定させてから実験を開始した。電気刺激時の標本の発光を光電子増倍管 (model 9789A; Thorn-EMI Co, N.J, USA) により測定し、 Ca^{2+} transient を得て、ストレーンゲージで測定した収縮張力と同時に digital audiotape (PC-108M, Sony Megnescale, Tokyo) に記録し、後で分析した。 Ca^{2+} transient の光信号と張力信号は、同じ状態における数分間の記録の加算平均で表示した。張力及び Ca^{2+} transient の持続時間は、ピーク値の 50% のところで測定した。

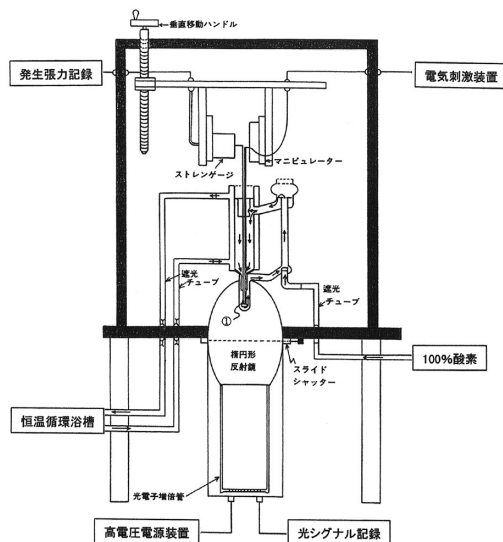


図 1. Ca^{2+} transient 及び張力測定装置。(①: 標本)

4. 試薬等

カフェイン、プロカイン、メタンスルホン酸は和光純薬、アデニンは Sigma Chemical Co., USA, エクオリンは Friday Harbor Photoproteins, WA, USA からそれぞれ購入した。その他は、すべて試薬特級を用いた。

結 果

1. 心筋のカフェイン拘縮のアデニンによる抑制

アデニンが ATP 存在下に小胞体の CICR を抑制することは骨格筋において証明されているが、心筋においてもスキンド・ファイバーを用いて、その小胞体の CICR に対して骨格筋同様、アデニン単独では促進作用を有するが、より強い CICR 促進作用を持つ ATP の存在下ではアデニンは CICR を抑制することが確認された (池本, 私信による)。

生きた心筋細胞内には mM レベルの ATP が存在するので、アデニンは生きた心筋において CICR を抑制するはずである。これを実験的に確認するために、アデニンのカフェイン拘縮に対する効果を調べた。カフェインは CICR の Ca^{2+} 感受性を著しく促進する結果、小胞体から Ca^{2+} 放出させて筋拘縮を惹起する¹³⁾。したがって、上記の論理からすれば、カフェイン拘縮はアデニンによって抑制されるはずである。実際図 2 に示すように、アデニン 10 mM 存在下で 5 mM のカフェインの惹起する収縮は強く抑制された。16 例の平均では、最大収縮張力は約 $32 \pm 7\%$ に減少した。

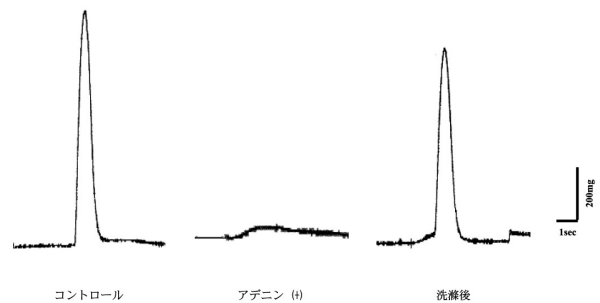


図 2. カフェイン 5 mM による心筋拘縮に対する 10 mM アデニンの抑制効果。

2. 心筋単収縮のカフェインによる増強効果のアデニンによる抑制

低濃度のカフェインは、やはり CICR の促進により、心筋の電気刺激による収縮を一過性ではあるが図 3A, C のように増強する。このカフェインの収縮増強効果もカフェイン拘縮と同様、アデニンによって抑制されるはずである。実際 10 mM アデニンは、後に述べるように電気刺激による心筋収縮を促進するので、図 3B, D に示すように、カフェイン適用前の収縮がかな

り大きくなっているが、カフェインによる増強作用は減弱していることは明かである。カフェイン 0.5 mM による増強のピーク値 4.07 ± 0.45 倍が 10 mM アデニン存在下では 1.32 ± 0.04 倍 ($P < 0.01$) に、また、カフェイン 2 mM では 4.26 ± 0.67 倍が 1.69 ± 0.29 倍 ($P < 0.05$) にと、いずれも有意に減少した。

3. アデニン単独の心筋収縮に対する効果

以上、アデニンは、生きた心筋細胞において CICR を抑制することが確認された、通常の電気刺激による心筋収縮も、もしそれが CICR を介するものであれば、当然アデニンによって抑制されるはずである。しかし、図 4 に示すように、アデニンを適用しても心筋の単収縮は全く抑制されず、むしろ明らかな収縮力増強効果だけが示された。その効果は、図 5 に示すとおり、用量依存적であった。

4. アデニンの Ca^{2+} transient に対する作用

前項までで、アデニンは、カフェイン作用を抑制することから心筋の CICR を抑制していると考えられるにもかかわらず、CICR を介して起きると考えられている正常の心筋収縮を全く抑制しない事実が明らかになった。この矛盾の原因を解明するために、収縮の前段階の過程である細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇 (Ca^{2+} transient) の程度を Ca^{2+} と結合して発光するクラゲの蛋白質エクオリンを用いて図 1 の装置で測定し、それに対するアデニンの作用を調べた。このとき、同時に収縮張力も測定した。

単収縮張力に対するアデニンの効果の典型例を図 6 に、また、ピーク張力に対するアデニン効果の時間経過を図 7 に示す。この結果は、図 4 の結果と一致して、やはりアデニンは、収縮力を増強させるのみであり、増強効果の時間経過は図 4 と同様にゆっくりしていた。しかし、同時に測定した Ca^{2+} transient は、典型例を図 8 に、また、ピーク値の時間経過を図 9 に示すとおり、張力と異なって、アデニン適用直後に明らかに減少し、その後時間と共に徐々に増加する傾向を示した。アデニンを洗滌した時には、逆に洗滌直後に明らかに増大し、その後元のレベルに戻った。

図 8 及び 9 の Ca^{2+} transient に対するアデニンの適用直後の抑制作用は、心筋興奮収縮連関が CICR を介するという一般的な考えとアデニンの CICR 抑制作用とから予想されるとおりの結果である。アデニン洗滌直後に Ca^{2+} transient が増加するのも、アデニンによる CICR 抑制が除去されたためと考えられる。

それでは何故、収縮張力はアデニン適用直後に減少しないのであろうか。図 6 の張力の時間経過がその答えを示唆している。すなわち、アデニン適用直後には、張力の発生速度はアデニン適用前のコントロールと比較して遅くなり、 Ca^{2+} transient の減少と確かに一致している。しかし、ピークに至るまでの時間が延長しているため、ピーク張力だけを見ると減少しない

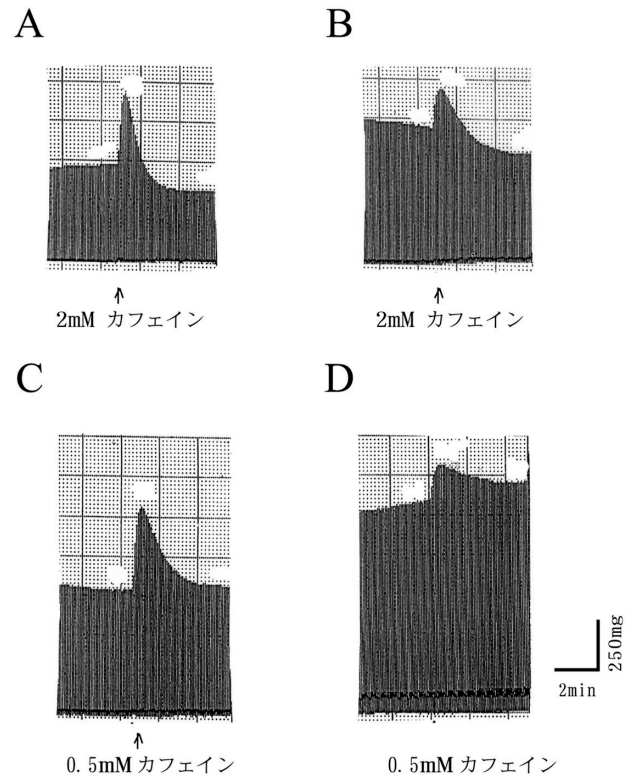


図 3. カフェインによる心筋収縮増強効果のアデニンによる抑制。

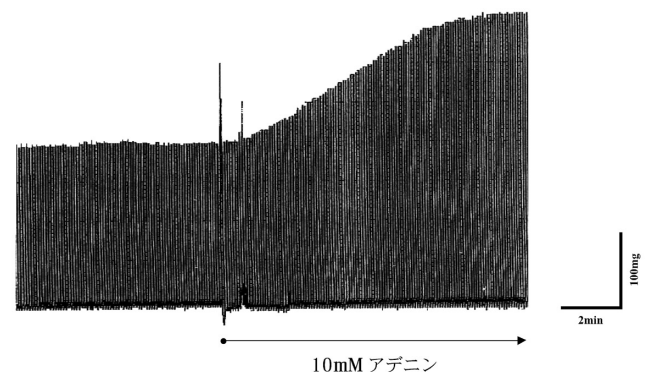


図 4. アデニンの心筋収縮力増強作用。

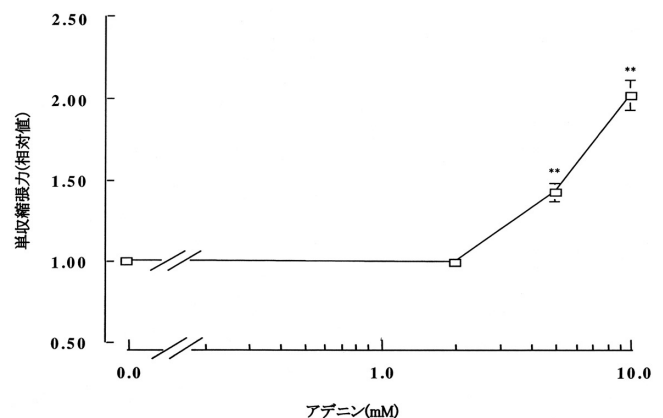


図 5. アデニンの心筋収縮力増強作用の用量依存性。
(: $P < 0.01$, $n = 12$)

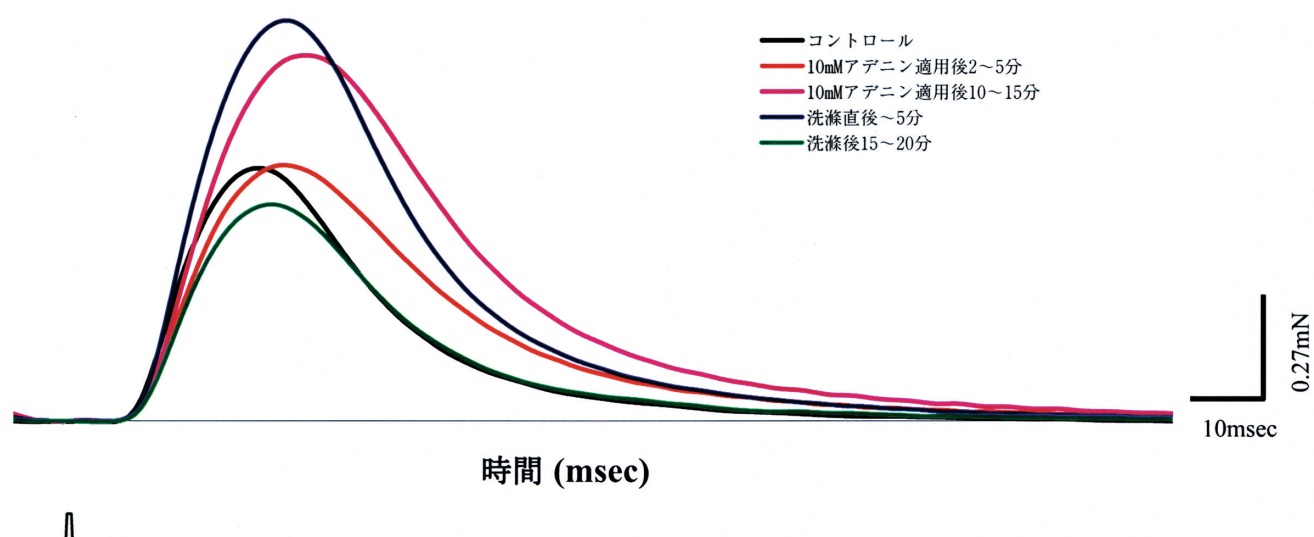


図 6. 単収縮張力に対するアデニンの作用. (上段: 収縮張力; 下段: 刺激電流)

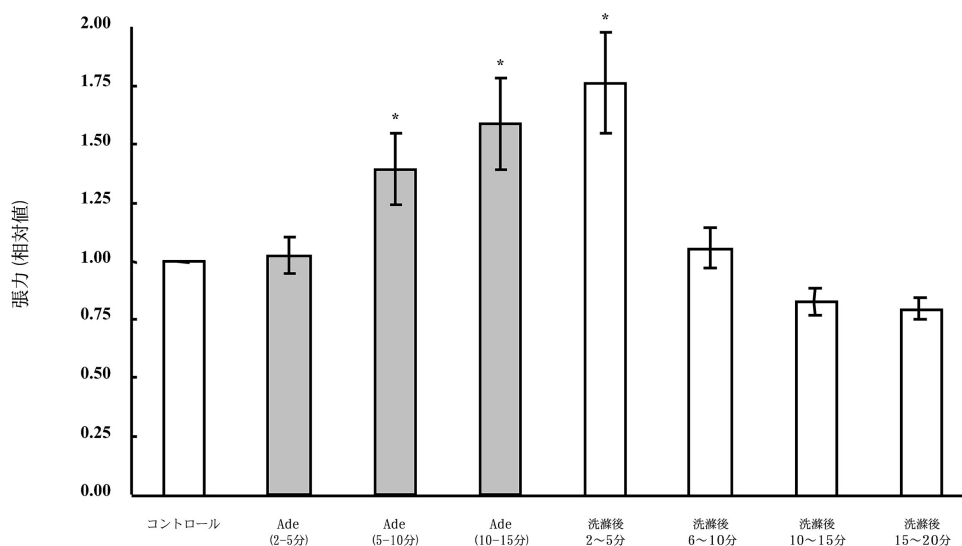


図 7. 単収縮のピーク張力に対するアデニン (Ade) 作用の時間経過. (: $P < 0.05$ (対コントロール), $n = 8$)

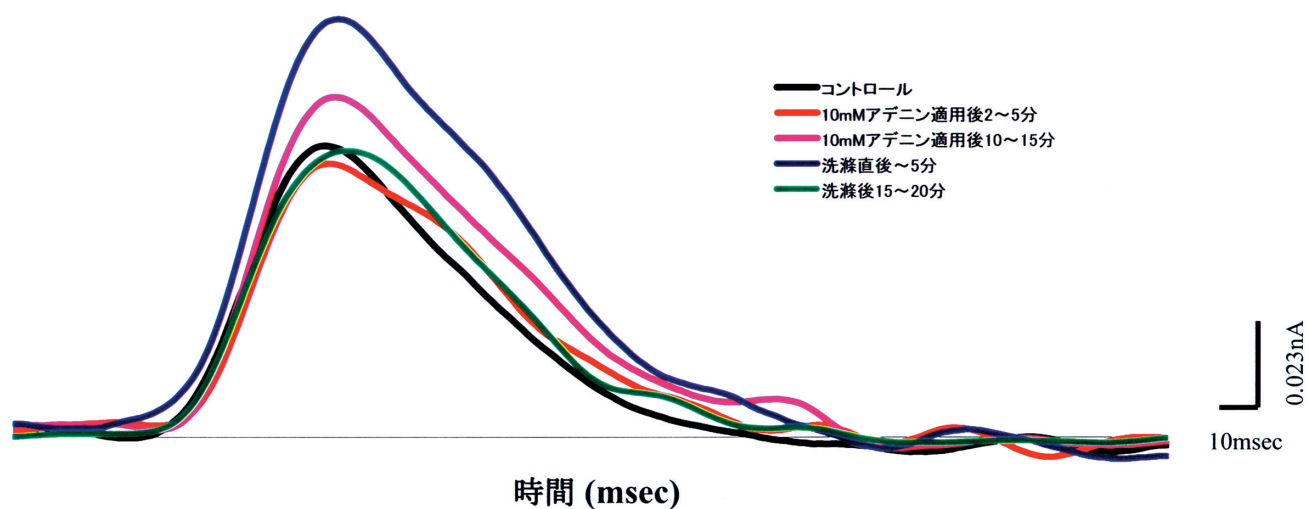


図 8. Ca^{2+} transientに対するアデニンの作用. (上段: 光電子増倍管電流; 下段: 刺激電流)

というわけである。張力の持続時間を測定してみたところ、平均的にもアデニン適用直後から明らかに増大していた(図 10)。ピークに至る時間及び張力の持続時間が延びる原因は図 8 に見られるように Ca^{2+} transient が延長するためと考えられる。実際 Ca^{2+} transient の持続時間を測定してみたところ、やはり明らかにアデニン適用直後から Ca^{2+} transient の持続時間は増大していた(図 11)。

5. プロカインの K 拘縮抑制作用

以上、アデニンの心筋に対する作用は、解析の結果、心筋の興奮収縮連関が CICR を介して起きるという一般的な考えに決して矛盾しないことが分かった。しかし、文献で報告されているもう一つの CICR 抑制薬プロカインが正常の溶液条件下で心筋脱分極による収縮を抑制しない事実¹⁷⁾は、やはり再検討を必要とする。したがって、ラット乳頭筋の K 拘縮に対してプロカインがどのような影響を及ぼすかを検討した。細胞外液の K^+ 濃度を高くして脱分極を起こさせるに当たって、プロカインが K^+ 透過性を抑制して脱分極の程度が小さくなるのを避けるため、外液中の $[\text{K}^+]\cdot[\text{Cl}^-]$ 積を一定にして、膜電位変化をプロカイン存在下でも同じだけ起こるようにした。結果は図 12 及び 13 に示すとおり、プロカインは明らかに K 拘縮を抑制した。したがって、この実験結果も心筋の興奮収縮連関が CICR を介するものであるという一般的な考えと矛盾はしないことが分かった。

考 察

アデニンは、単独では筋小胞体の CICR を促進するが、より強い促進物質である ATP の存在下ではこれを抑制する、という骨格筋において知られていた事実¹⁸⁾が哺乳類心筋小胞体にも当てはまることが確認されたので、これを用いて、生きた心筋細胞におけるアデニンの作用を調べた。その結果アデニンは、CICR を促進することによって拘縮を起こしたり、生理的収縮を促進したりするカフェインの作用を明らかに抑制した(図 2, 3) ので、やはりアデニンは ATP の存在する生きた心筋細胞においては、CICR を抑制すると言えるであろう。

したがって、心筋の生理的収縮が一般的に考えられているように CICR を介して起きているものであれば、アデニンによって抑制されるはずであるが、報告された予備的実験結果¹⁹⁾と一致して、そのような抑制は全く見られなかった(図 4-7)。そこで、収縮の前段階である Ca^{2+} transient をエクオリンを用いて測定した結果、アデニン適用直後には Ca^{2+} transient は減少し、洗滌直後には増大するという結果を得た(図 8, 9)。この結果は、やはり心筋の興奮収縮連関は CICR を介しており、アデニンは生きた心筋細胞において CICR を抑制するためである、という考えと一致している。ア

デニンによる抑制はあまり強いものではないが、アデニンがそれ自身は CICR 促進物質であり、ATP 存在下でのみ抑制的に作用することを考えると、やむを得ないと思われる。

アデニンによって Ca^{2+} transient が減少するにもかかわらず収縮力が減少しなかったのには、二つの原因が考えられる。一つは結果の項ですでに述べた Ca^{2+} transient の持続時間延長(図 9, 11)であり、もう一つは、収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性増大である。第一の原因が実際に関与していることは、アデニン適用直後には Ca^{2+} transient の抑制と一致して収縮力の立ち上がり速度が抑制されているにもかかわらず、ピークに至る時間が延長していて、結局同じピーク張力にまで到達していたこと(図 6)から疑いがない。骨格筋スキンド・ファイバーにおいて、アデニンは小胞体の Ca^{2+} 取り込みを抑制することが報告されている¹⁸⁾ので、心筋においてもおそらく小胞体の Ca^{2+} ポンプが抑制されていて、それが Ca^{2+} transient の持続時間延長に貢献しているものと思われる。

第二の可能性として、やはり骨格筋において、アデニンは収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性を増大させる事実が報告されている¹⁸⁾。したがって、心筋においても、アデニンはおそらく収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性を増大し、そのことも Ca^{2+} transient の減少にもかかわらず収縮が減少しない事実に貢献している可能性は十分にあると考えられる。

緒言の項に述べたように本実験の開始時には、心筋の興奮収縮連関は興奮時に細胞外から流入する Ca^{2+} が小胞体を刺激して CICR による Ca^{2+} 放出を行うことによって機能する、という一般的な考えは、心筋に必要な細胞の収縮力調節を流入 Ca^{2+} 量の増減を通じて行うことができるという利点もあり、生理的に納得のできる考えである一方、CICR 抑制薬に関する定性的な疑問が存在していた。心筋興奮収縮連関の生理的重要性から、この定性的な疑問を解決することは極めて重要と考えて本実験を行った結果、定性的な疑問は氷解し、心筋興奮収縮連関は CICR を介すると考えて矛盾はないことが分かった。

今後は、プロカイン作用に関するモルモットを用いた Thorens の実験との差異の検討、心筋においても実際にアデニンが小胞体の Ca^{2+} ポンプ抑制作用、収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性増大作用を有するか否かの検討、などを行い、本研究を真の意味で完結しなければならない。他方、心筋の興奮収縮連関には、かなりの動物種差があることが知られているので、CICR の性質について、違いの報告されているいくつかの動物に関して検討して行きたい。

結 語

生理的な条件下で CICR を抑制するアデニンを用い

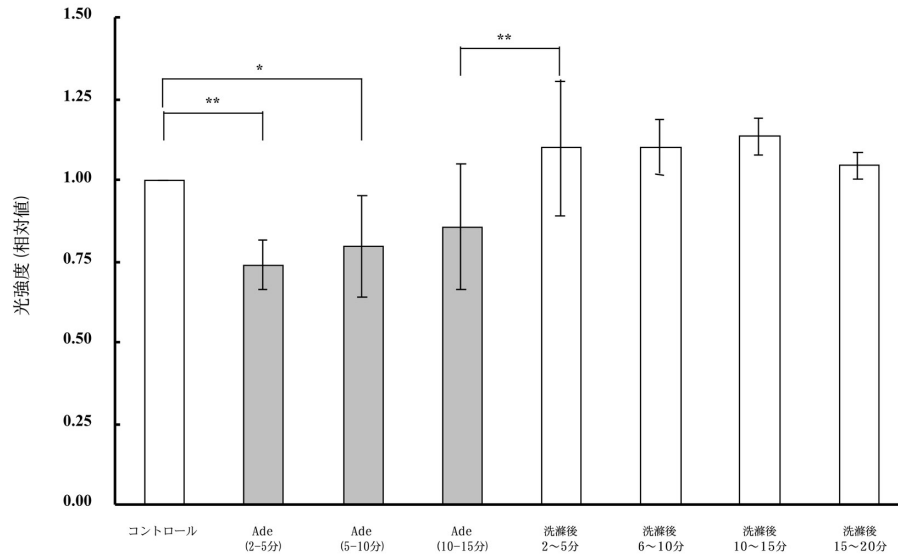


図 9. Ca^{2+} transient のピーク値に対するアデニン (Ade) 作用の時間経過. (: $P<0.05$, : $P<0.01$, $n=8$)

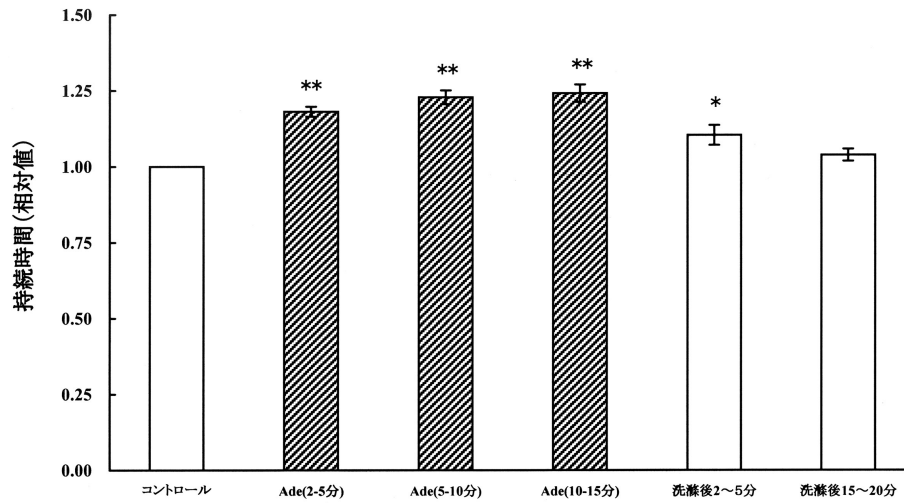


図 10. 単収縮張力の持続時間に対するアデニン (Ade) 作用の時間経過. (: $P<0.01$, : $P<0.05$ (対コントロール), $n=11$)

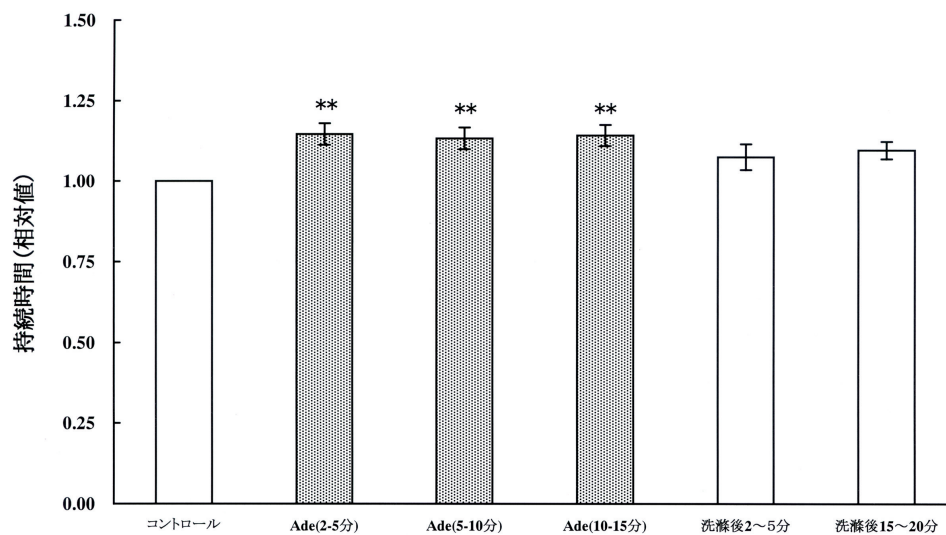


図 11. Ca^{2+} transient の持続時間に対するアデニン (Ade) 作用の時間経過. (: $P<0.01$ (対コントロール), $n=11$)

て、心筋の興奮収縮連関がCICRを介しているどうかを調べ、次の結果を得た。

1. 10 mM アデニンは 5 mM カフェインによる心筋の拘縮及び低濃度 (0.5-2 mM) カフェインによる単収縮増強効果を抑制した。したがって、アデニンは生理的な条件下でCICRを抑制することが確認された。
2. アデニンは心筋の電気刺激による単収縮張力を全く抑制せず、むしろ濃度依存的に促進した。張力の持続時間は延長した。
3. 単収縮時の Ca^{2+} transient のピーク値は、アデニンによって先ず抑制され、その後徐々に増大した。洗條後は逆に先ず増大し、その後元に戻った。 Ca^{2+} transient の持続時間はアデニンによって延長した。
4. CICR の抑制薬であるプロカインは、 K^+ 拘縮を抑制した。

5. アデニンによる Ca^{2+} transient の抑制とプロカインによる K^+ 拘縮の抑制は、心筋の興奮収縮連関がCICRを介するものであるという一般的な考えと一致している。
6. アデニンによってCICRが抑制されるにもかかわらず単収縮張力が減少しなかった事実には、 Ca^{2+} transient の持続時間延長が関与している。さらにアデニンの収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性増加作用も関係している可能性が考えられた。
7. アデニンの心筋に対する作用は複雑であるが、心筋の興奮収縮連関にCICRが重要な役割を果たすという考えと矛盾するものではないことが明らかになった。

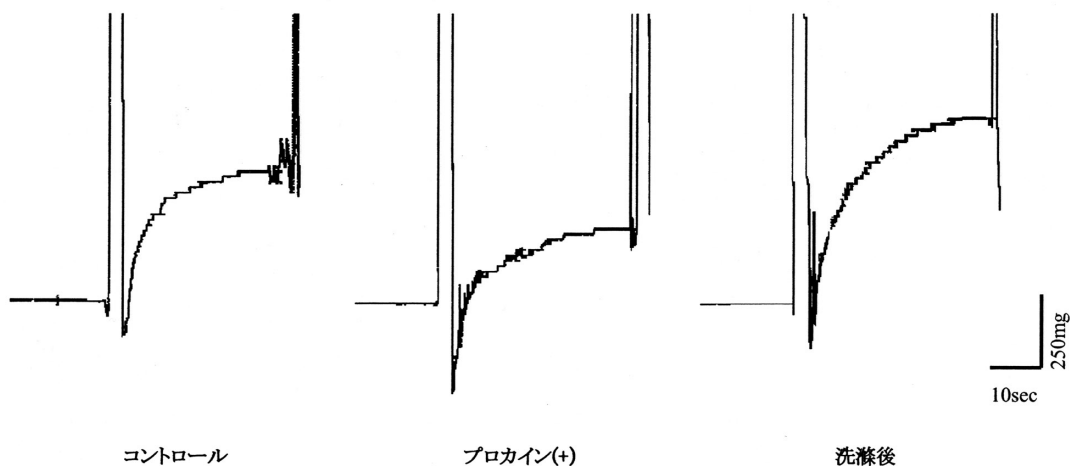


図 12. 100 mM K^+ による心筋の拘縮に対する 5 mM プロカインの作用の一例。

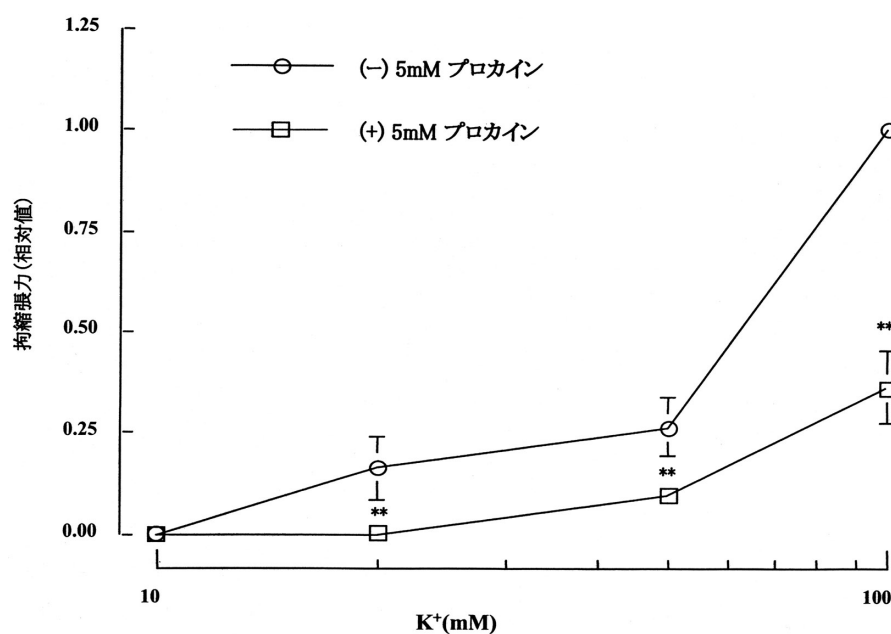


図 13. 心筋の K^+ 拘縮に対するプロカインの作用. (: $P < 0.01$, $n = 7$)

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご高閣頂きました埼玉医科大学薬理学教室の遠藤實教授（現副学長）及び丸山敬教授、 Ca^{2+} transientの測定に当たってご指導、ご協力を頂きました山形大学医学部薬理学教室の遠藤政夫教授、野呂田郁夫技官、沢田裕伸研究員に深謝いたします。また、実験に種々の面でご協力頂きました埼玉医科大学中央研究施設実験動物部門の鈴木政美助教授、富永信子助手、薬理学教室の鈴木正彦講師に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Mashima H, Matsumura M. Roles of external ions in the excitation-contraction coupling of frog skeletal muscle. *Jpn J Physiol* 1962;12:639-53.
- 2) Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol* 1983;4:429-42.
- 3) Reuter H, Beeler GW Jr. Calcium current and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. *Science* 1969;163:399-401.
- 4) Ebashi S, Endo M. Calcium ion and muscle contraction. *Progr Biophys Biophys Chem* 1968;18:123-83.
- 5) Mitchell MR, Powell T, Terrar DA, Twist VW. Ryanodine prolongs Ca-currents while suppressing contraction in rat ventricular muscle cells. *Br J Pharmacol* 1984;81:13-5.
- 6) Endo M, Ikemoto T. Regulation of ryanodine receptor calcium release channels. In: Endo M, Kurachi Y, Mishina M, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 147. Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2000. p. 583-603.
- 7) Ford LE, Podolsky RJ. Regenerative calcium release within muscle cells. *Science* 1970;167:58-9.
- 8) Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 1970;228:34-6.
- 9) Fabiato A, Fabiato F. Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium dependent cyclic and tonic contractions. *Circ Res* 1972;31:293-307.
- 10) Imagawa T, Smith JS, Coronado R, Campbell KP. Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem* 1987;262:16636-43.
- 11) Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu Q-Y, Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 1988;331:315-9.
- 12) Hymel L, Inui M, Fleischer S, Schindler H. Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms Ca^{2+} -activated oligomeric Ca^{2+} channels in planar bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:441-5.
- 13) Endo M. Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Curr Top Membr Transp* 1985;25:181-230.
- 14) Cannel MB, Berlin JR, Lederer WJ. Effect of membrane potential changes on the calcium transient in single rat cardiac muscle cells. *Science* 1987;238:1419-23.
- 15) Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J* 1992;63:497-517.
- 16) Wier CW, Egan TM, Lopez-Lopez J, Balke CW. Local control of excitation-contraction coupling in rat heart cells. *J Physiol* 1994;474:463-71.
- 17) Thorens S. Electrical and mechanical effects of procaine on mammalian heart muscle. *Pflugers Arch* 1971;324:56-66.
- 18) Ishizuka T, Endo M. Effects of adenine on skinned fibers of amphibian fast skeletal muscle. *Proc Jpn Acad* 1983;59:93-96.
- 19) 遠藤 實. 心筋細胞におけるカルシウムイオン動員. *心臓* 1990;22:597-601.
- 20) Li Y, Ikemoto T, Endo M. The disparity between the effect of adenine on excitation-contraction coupling and that on the calcium-induced calcium release mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998;358:Suppl 2, R685.
- 21) Li Y, Sawata H, Norota I, Endoh M, Endo M. Effects of adenine on rat cardiac excitation-contraction coupling. *Jpn J Pharmacol* 2000;82:Suppl I,148.
- 22) Kihara M, Morgan JP. A comparative study of three methods for intracellular loading of the calcium indicator aequorin in ferret papillary muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:402-7.
- 23) Watanabe A, Tomoiike H, Endoh M. Ca^{2+} sensitizer Org-30029 reverses acidosis- and BDM-induced contractile depression in canine myocardium. *Am J Physiol* 1996;271:H1829-39.