

9029 マグネシウムイオンの単一心筋細胞における抗不整脈作用発現の機序解明

青峰 正裕(中村学園大学)

【目的】 マグネシウムイオン (Mg^{2+}) は動植物の細胞内に豊富に存在するイオンであり、多種多様の生理・生物学的作用過程、ことに酵素活性やエネルギー代謝過程において重要な役割を果している。最近、 Mg^{2+} 欠乏と不整脈、高血圧や脳血管障害との関連性が注目を集めている。しかも近年食生活の変化により慢性的な細胞内低 Mg^{2+} の状態にあるといわれており、循環器疾患の増加をもたらすことが危惧されている。 Mg^{2+} の補給が、通常の抗不整脈剤が奏効しない心室頻拍、心室細動に対し劇的治療効果をもたらすとの報告が多い。しかし Mg^{2+} のこのような抗不整脈作用がどのような機序によるのかはまだよく判っていない。そこで本研究では細胞内 Ca^{2+} 過負荷細胞において誘発される一過性の脱分極 (DAD、EAD)、撃発活動 (TA)、さらにそれらの原因となる一過性の内向き電流 (TI) に対する Mg^{2+} の影響を調べた。また、細胞内 Ca トランジェントに対する Mg^{2+} の効果も Ca^{2+} 感受性蛍光色素を用いて調べた。

【方法】 単一心筋細胞はモルモット心室筋から酵素法 (コラゲナーゼ) により単離した心筋細胞を用いた。活動電位は脱分極通電により発生させ、膜電流の測定は吸引電極による全体膜電位固定法により測定した。ピペット内液を高 Ca^{2+} 、低 EGTA にし、高頻度刺激 (5~6.7 Hz) 後に DAD、TA を誘発し、 Mg^{2+} (5、10、20 mM) の効果を調べた。さらに TI に対する Mg^{2+} の効果も検討した。一方、多細胞心筋標本としてはラット心室乳頭筋を用いて、低 K^+ (0.5 mM) 液で灌流、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加、そして一定時間の刺激停止後、高頻度刺激 (2~5 Hz、10~30 発) 後に後収縮 (AC) を誘発した。 Ca トランジェントは蛍光色素 Fura-2/AM を負荷し、2 波長励起、1 波長蛍光にて測定した。

【結果】 単一心筋細胞において誘発した DAD、TA、EAD を 5 mM Mg^{2+} は抑制しなかったが、10 mM ではこれらを完全に抑制した。さらに TI をも 10 mM Mg^{2+} は抑制した。多細胞標本において、5 mM Mg^{2+} は AC を部分的に抑制したが、10 mM Mg^{2+} でほぼ完全に抑制した。つまり、 Mg^{2+} の効果は濃度依存性であった。この結果は単一細胞での結果とほぼ一致する。一方、細胞内 Ca^{2+} 増加を反映する Ca トランジェント実験においても 10 mM Mg^{2+} は TA に起因する Ca トランジェントを完全に抑制した。

【結論】 これらの実験結果は、 Mg^{2+} の抗不整脈作用は外液 Mg^{2+} の濃度依存性であり、1) Ca チャネルのブロック、2) 非選択的陽イオンチャネルのブロック、3) 細胞内 Ca^{2+} 貯留からの Ca^{2+} 放出のブロック、4) Na^+-Ca^{2+} 交換のブロックのいずれか、あるいはその複数の組み合わせにより発現されたとの可能性を示した。

9029 マグネシウムイオンの単一心筋細胞における抗不整脈作用発現の機序解明

青峰 正裕 (中村学園大学)

1. 目的

海水および海水から採取した粗塩に多量に含まれているマグネシウムイオン (Mg^{2+}) は、筋肉をはじめとして多くの軟部組織で最も豊富な2価陽イオンであり、多くのATPの産生および利用に預かる酵素反応(例えば、Na,K-pump活性、筋線維の収縮、酸化的リン酸化、解糖系の種々のステップ等)において cofactor として極めて重要である[1-4]。そしてもうひとつの重要な側面は Mg^{2+} が、細胞膜レベルで、そして細胞内のミトコンドリア膜やトロポニン-C 結合部位等で Ca^{2+} と競合することである[5, 6]。そのため Mg^{2+} は“天然の生理的 Ca^{2+} ブロッカー”と呼ばれている[3]。しかし臨床的には、 Mg^{2+} 代謝異常に関する特有な症状が少ないこと、および最近のおびただし、生体における Ca^{2+} 動態研究の陰に隠れ、その重要性に注目される機会が少なかった。しかし、ここ数年 Mg^{2+} に対する認識が高まり、世界的に循環器系疾患との関連が注目され、疫学的にも検討が行われている[2, 3, 7]。

動物実験においては、急性および慢性の Mg^{2+} 欠乏症が心筋虚血に対する耐性を減じ、虚血後再灌流液中の Mg^{2+} 濃度の増加は心筋保護液として有効であるとの報告がある[8]。疫学的には Mg^{2+} 欠乏と不整脈、高血圧や脳出血との密接な関連性が指摘されてきた[2, 3, 7]。さらに血中 Mg^{2+} 含有量の減少が予想される患者においては、通常の抗不整脈剤やD C除細動に反応しない心室頻拍、心室細動に対して Mg^{2+} の経静脈性投与が劇的治療効果をもたらすとの報告が多い[1-3]。しかし、 Mg^{2+} のこのような抗不整脈作用がどのような機序によるのかは、まだよく判っていない。従って本研究ではこの Mg^{2+} の抗不整脈作用に注目し、その解明を目指した。 Mg^{2+} の抗不整脈作用はラット心室乳頭筋およびモルモット単一心室筋細胞を用い、膜電位固定下でおよび非固定下で検討した。さらに Mg^{2+} が実際に細胞内 Ca^{2+} の変動に関係しているかどうかを、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素Fura-2を用いて検討した。

2. 方法

2.1 心室乳頭筋を用いた実験

2.1.1 心室筋標本と灌流溶液

心室乳頭筋はラットを頸椎強打により気絶させた後開胸し、素早く心臓を摘出した。室温下(20~22°C)で100%酸素で飽和したタイロード液(NaCl 145, KCl 4, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 1.1, glucose 10.9, HEPES 5mM; pH=7.4)中で、右、左心室から乳頭筋(直径0.2~

0.5mm, 長さ1~2mm) を切り出し、標本とした。

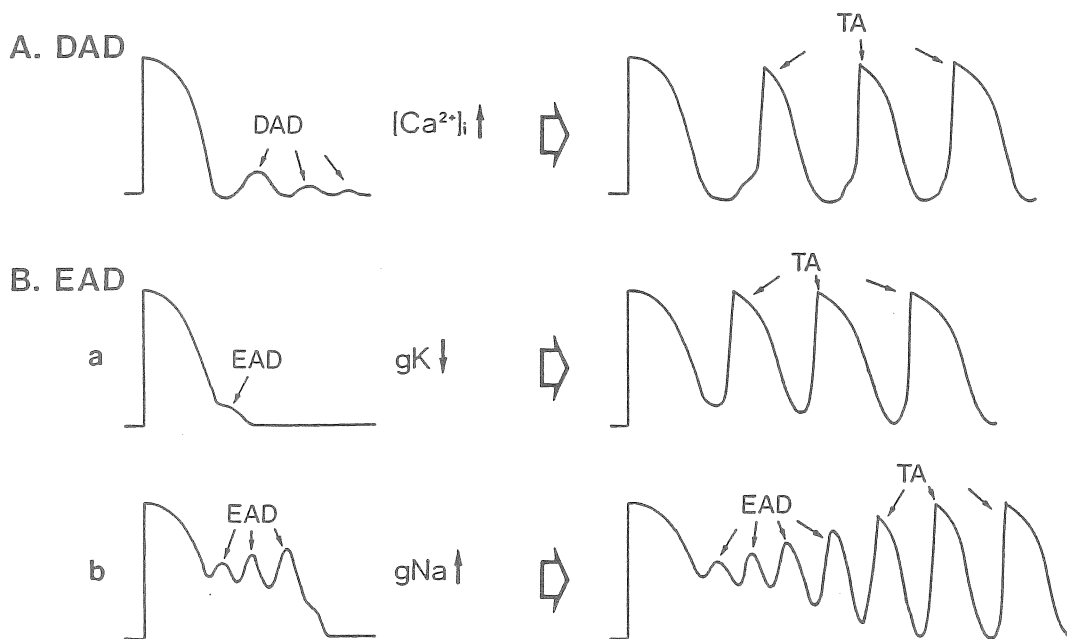
心室筋標本を実験槽(容積1ml)に移し、その基部をピンで固定、他端の腱索を細い絹糸で結びストレイン・ゲージ(BT-612T, 日本光電)端子に連結して収縮張力記録に供した。標本は酸素飽和タイロイド液(36~37°C)をマイクロチューブポンプ(MP-3, 東京理科機械)により、一定流速(2ml/分)で灌流した。

2.1.2 活動電位と収縮張力の記録

標本における活動電位と収縮張力の誘発は、標本基部に装着した双極電極を介して、閾値の1.5倍の強さ、持続時間1ms、1Hz(cycle length, CL=1s)の基本電気刺激により行った。活動電位は、3M KClを充填した標準ガラス管微小電極法(電極抵抗10~30MΩ)により記録した。標本によっては活動電位と収縮張力を同時に記録した。これらの記録には、3現象オシロスコープ(VC-11, 日本光電)またはサーマルアレイレコーダー(RTA-1100, 日本光電)を使用した。

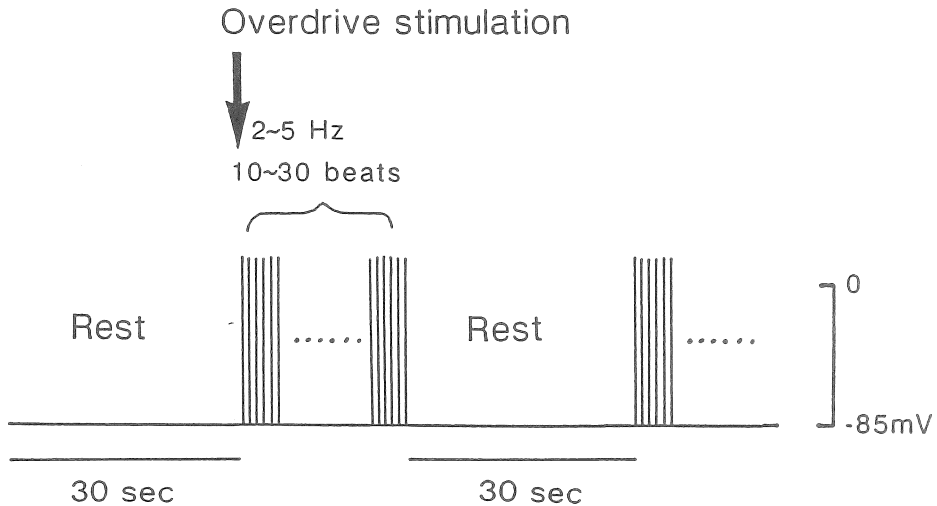
2.1.3 遅延後脱分極(DAD)、早期後脱分極(EAD)、撃発活動(TA)、後収縮(AC)の誘発

細胞内にCa²⁺が過負荷された状態では、先行する電気刺激が起因して、刺激停止後に一過性の脱分極(遅延後脱分極 delayed afterdepolarization, DAD と早期後脱分極 early afterdepolarization, EAD)や、この脱分極がNaチャンネルの閾値に達して生じた伝導性の活動電位(撃発活動 triggered activity, TA)を生じる(Fig. 1) [9]。収縮張



【 Fig. 1 】 遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization; DAD) (A) と早期後脱分極 (early afterdepolarization; EAD) (B) の模式図。右はそれぞれより生じる撃発活動 (triggered activity; TA)。

力にはこれらDAD、TAに付随した張力が記録される。これを後収縮 (aftercontraction, AC) という。Ca²⁺過負荷心筋の作成は、低K⁺タイロート液 (上述の正常タイロート液のKCl濃度を4mMから0.5mMに減少) 灌流により、そしてDAD、TA、ACの誘発には高頻度頻回電気刺激 (トレイン刺激) 法を用いた。具体的には、Fig. 2に示すように1Hzの基本刺激下で標本を低K⁺液で10~30分灌流後、30秒間刺激を停止し、突然2~5Hz (CL=200~500ms) で、10~30発のトレインパルスを与え、刺激停止後にDAD、TA、ACを誘発させた。これらの誘発をみた標本においては、低K⁺液にMgCl₂を混じ、5、10、20mM濃度Mg²⁺液として、これらMg²⁺濃度の効果を調べた。



【Fig. 2】 DAD、TA、AC誘発のための高頻度 (overdrive) 電気刺激法。30秒間の休止後2~5Hz、10~30発の刺激後それらを誘発。詳細は本文参照。

2.2 単一心室筋細胞を用いた実験

2.2.1 細胞の分離と灌流溶液

単一心室筋細胞はモルモットの心室筋より酵素処理法により単離した。具体的には、250-350gのモルモットの頸椎を強打し、心臓を摘出、ランゲンドルフ灌流装置にて、コラゲナーゼ (0.1mg/ml、Yakult) を含む無Ca²⁺タイロート液で10~20分灌流した。その後心臓を保存液 (KCl 25, glutamic acid 70, taurine 10, oxalic acid 10, KH₂PO₄ 5, HEPES 5, glucose 11, EGTA 0.5mM; pH=7.4) の中に置き、必要に応じ心室の組織小片をとり、実験槽中で攪拌し、細胞を分散させた。実験槽 (容積約1.2ml) はタイロート液により、2~3ml/分の速度で灌流した。実験は36~37°Cで行い、Mg²⁺はMgCl₂を5、10、20mMの濃度でタイロート液に混じて使用した。

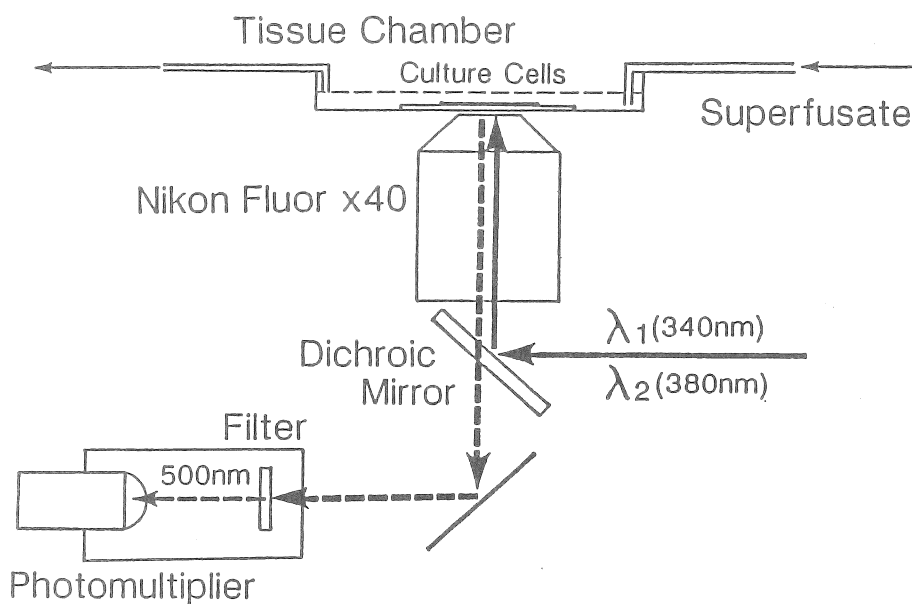
2.2.2 細胞内電位記録と細胞全体膜電位固定

電極は電熱溶解により先端を滑らかにしたパッチクランプ用の微小電極であり、これを細胞内に Ca^{2+} の過負荷を生じせしめるため $CaCl_2$ 0.7mM と通常の10分の1の EGTA 量 (0.1mM) を含む、KOH 110、KCl 20、ATP-K₂ 5、glucose 10、aspartate 110、HEPES 10 mM の溶液で満たして使用した。この電極 (抵抗2~5M Ω) を倒立顕微鏡下に細胞表面に押しあて軽い陰圧を加え電極先端と膜表面の間に giga-ohm の高抵抗の接着が完成した後、強い陰圧 (<-50cm H₂O) を加えて細胞膜を破り、電極内液と細胞内液を連絡することにより、細胞内電位を記録した。活動電位は同じ電極を介して脱分極性通電 (持続時間10ms、刺激頻度0.5Hz) を行い発生させた。DADとTAは高頻度刺激 (5~6.7 Hz、10~50発) により誘発した。なお膜電位は電極に接続した膜電位固定用増幅器 (List Electronics EPC-7) により記録した。さらに膜電位固定も上記の電極により行い、保持電位 (-50~60 mV) から+100mV以上の脱分極パルス (持続時間30~100ms、頻度0.5Hz) を与えておこなった。膜電位と膜電流はデータレコーダー (Sony) によりビデオ用テープに記録し、これをコンピューター (NEC PC-9801RX) により再生、分析した。データは mean \pm SD で示し、有意差の検定は un-paired t-test により $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

2.3 Ca^{2+} 濃度指示蛍光色素法による研究

2.3.1 細胞標本と灌流液

生後1~5日目の新生児ラットの心室から酵素法 (コラゲナーゼ) により、心室筋細胞を単離し、DME培地 (37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 存在下) で細胞培養した。培養後3~7日目まで直径



【Fig. 3】 新生児ラット心筋培養細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度蛍光測定系の模式図。灌流液 (superfusate) は矢印の方から流入。詳細は本文参照。

100~300 μ m程度の求心性収縮をする細胞集団を用い、0.2% cremophor EL、10 μ M Fura-2/AMを含む培地で、37 $^{\circ}$ C、10分間Fura-2を負荷した。細胞集団はタイロード液 (NaCl 70、Choline-Cl 65、KCl 5.4、CaCl₂ 1.8、MgSO₄ 1、NaH₂PO₄ 1、NaHCO₃ 3、glucose 10、HEPES 10、atropine 0.0007mM; pH=7.4) で灌流し、フィールド刺激による0.5~2 Hz (500ms~2000ms) の電気刺激で実験した。10mM Mg²⁺液としては上記タイロード液のMgSO₄を10mM、choline-Clを56mMに代えた液を用いた。

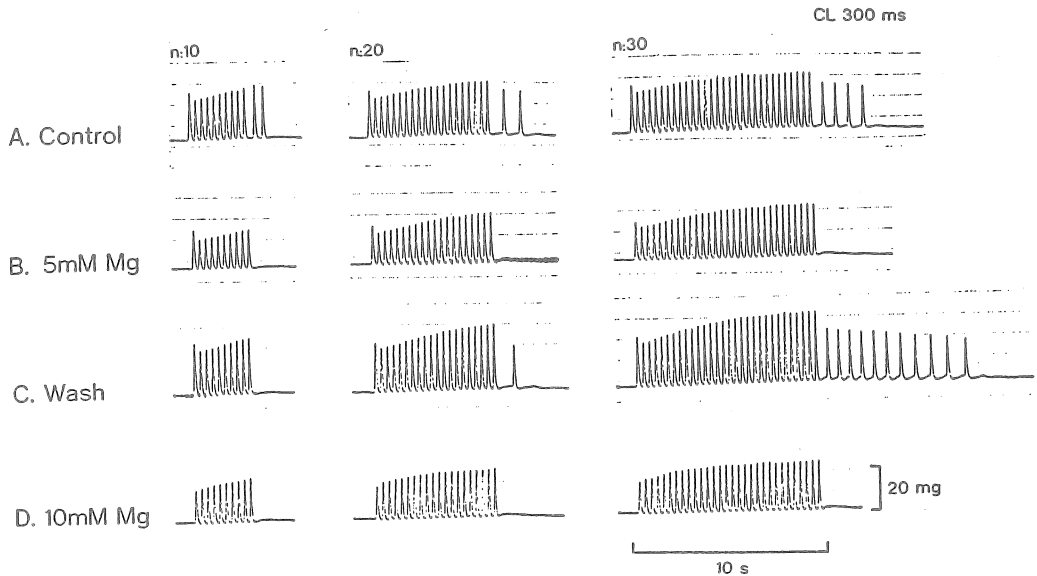
2.3.2 蛍光測定装置

日本分光 CAM-200をもちいてFig.3の tissue chamber に置いた細胞集団に波長 $\lambda_1=340$ nm、 $\lambda_2=380$ nmの励起光を照射し、中心部80 x 80 μ mの範囲からの蛍光は500nmのフィルターを介して光電倍增管 (photomultiplier) で計測した。得られたシグナルは一旦データレコーダー (Teac) に記録後、computerで解析した。 λ_1 、 λ_2 での蛍光強度 F340、F380 を計測し、Fura-2負荷前に測定したバックグラウンド蛍光を差し引き後のそれらの比 R340/380をコンピュータで計算した。

3. 結果

3.1 心室乳頭筋を用いた研究

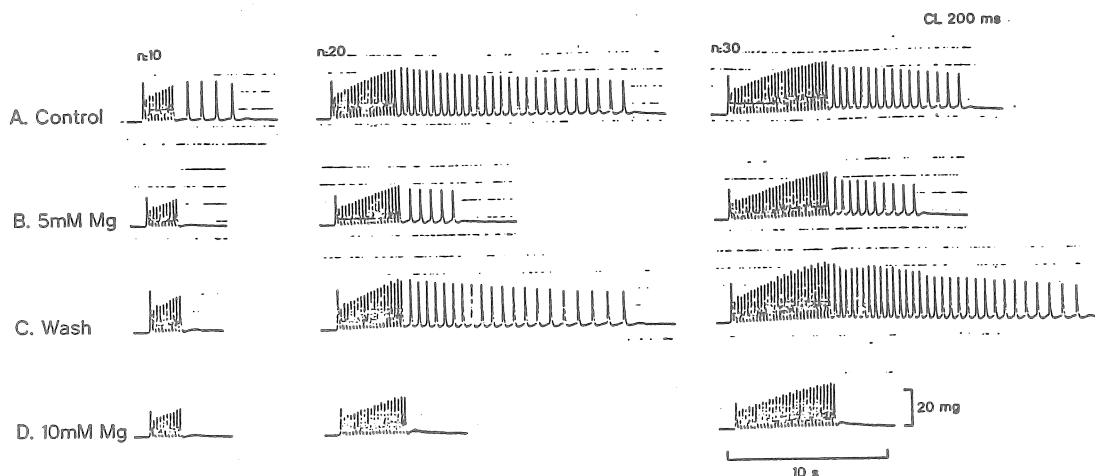
Fig. 4はCa²⁺過負荷多細胞標本 (心室乳頭筋) において高頻度刺激 (3.3Hz; CL 300ms) 後に生じた後収縮 (AC) に対する5mMと10mM Mg²⁺の抑制効果の典型例を示している。一般に control 液 (低K⁺液) 灌流でトレイン刺激を10、20、30発と増加するにつれてACの誘発までの時間 (coupling interval) およびその回数が増加する (Fig. 4 Aに



【 Fig. 4 】 ラット心室乳頭筋において3.3 Hz、10~30発刺激により誘発した後収縮 (AC) に対する5mMと10mM Mg²⁺の効果。両濃度でACが抑制されている。

示すこの標本においては10発の際にAC誘発までの時間が20、30発と比して一番短縮している)。5 mM Mg^{2+} 液での灌流はこれらACを完全に抑制した(B)。5 mM Mg^{2+} の wash 後、再びACは20と30発のトレイン刺激後に出現した(C)。しかしこれらのACは10 mM Mg^{2+} により完全に抑制され、DADと思われるACが僅かに観察された(D)。

一般に、トレイン刺激の頻度の増加は細胞内 Ca^{2+} 過負荷を促進することが知られている[10]。Fig. 5は刺激頻度を5 Hz (CL 200ms)に増加した条件下における Mg^{2+} の効果を示す。control 液下で10~30発のトレイン刺激により誘発されたACを5 mM Mg^{2+} の添加は、この例においては10発の刺激によって誘発されたACの場合のみを完全に抑制した(Fig. 5 B)。しかし20、30発の刺激によるACには部分的にしか抑制しなかった。wash 後、10発を除き20、30発のトレイン後に再びACはその頻度と回数を Mg^{2+} 存在下と比して増加した(C)。しかしこれらのACは5 mM Mg^{2+} の場合と同様に10 mM Mg^{2+} の添加により完全に抑制された(D)。



【Fig. 5】 ラット心室乳頭筋において5Hz、10~30発刺激により誘発したACに対する5 mMと10 mM Mg^{2+} の効果。5 mMではACの抑制が不完全であるが、10 mMではほぼ完全に抑制している点に注意。

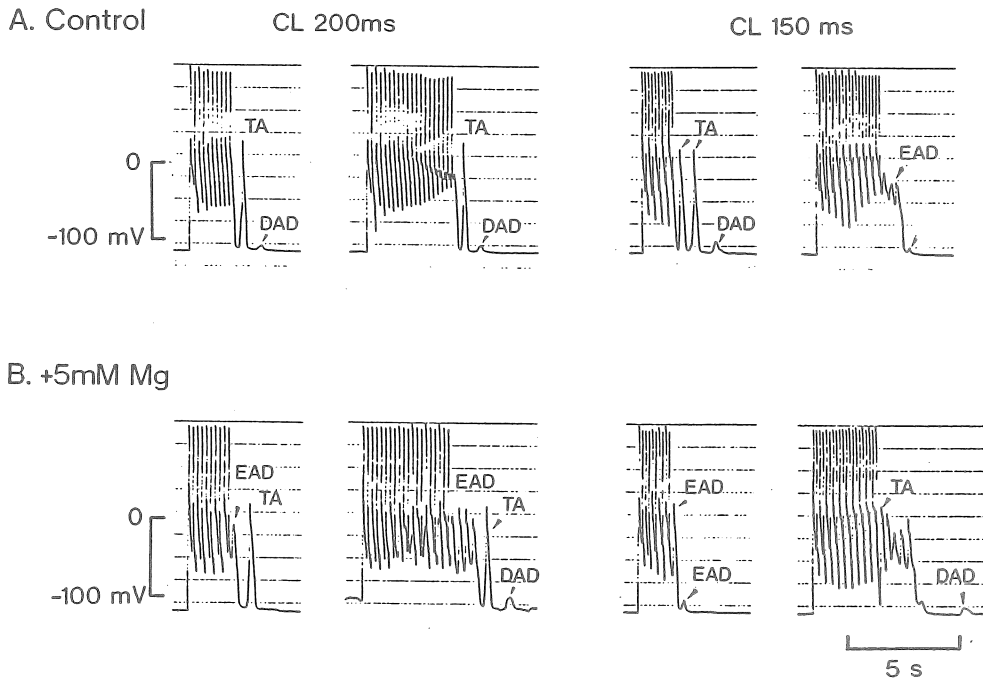
Fig. 4と5の実験結果は次のことを示唆した。すなわち、5 mM Mg^{2+} はトレイン頻度CL=300msで誘発したACには抑制効果を示したが、より高頻度(CL=200ms)でのACには有効ではなかった。一方、10 mM Mg^{2+} はCL=300msとCL=200msの両条件下で、ACに対する抑制効果は顕著であった。

3.2 単一心室筋細胞を用いた研究

多細胞標本においては、細胞間隙におけるイオン濃度の変化、特に K^+ イオンの増減は膜の K^+ コンダクタンス(gK)の増減に直接影響を与えることが知られている[11]。従っ

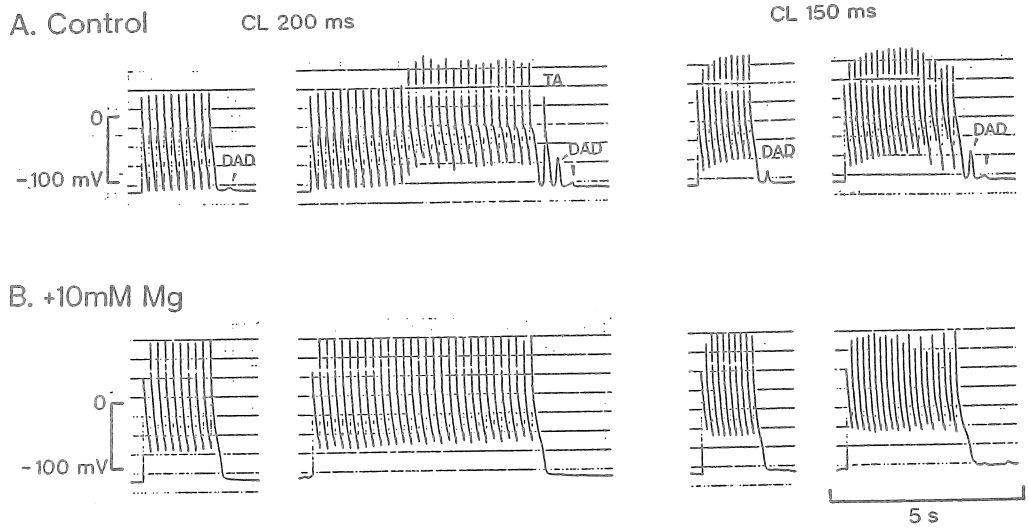
て、これらの問題を出来るだけ排除するためには、単離した心筋細胞を用いることが望ましい。そこで、モルモット心室筋から単離した単一細胞を用いて、 Mg^{2+} の効果を検討した。

Fig. 6 Aには control 液下でCL=200msと150msで、トレイン刺激10発と20発により誘発したTAとDADを示す。control 液としてのピペット内液には Ca^{2+} が細胞内に負荷され易いように Ca^{2+} が通常の0.1mMを0.7mMに、EGTAを1mMから0.1mMに変えている。CL=200msの場合、10発から20発に刺激数を増加するとTAまでの時間(coupling interval)が若干短縮し、DADの振幅の増加が認められた。CL=150msにおいては10発でTAが2個に増加し、続くDADの振幅も増加している。そして、20発にした際、EADが出現した。

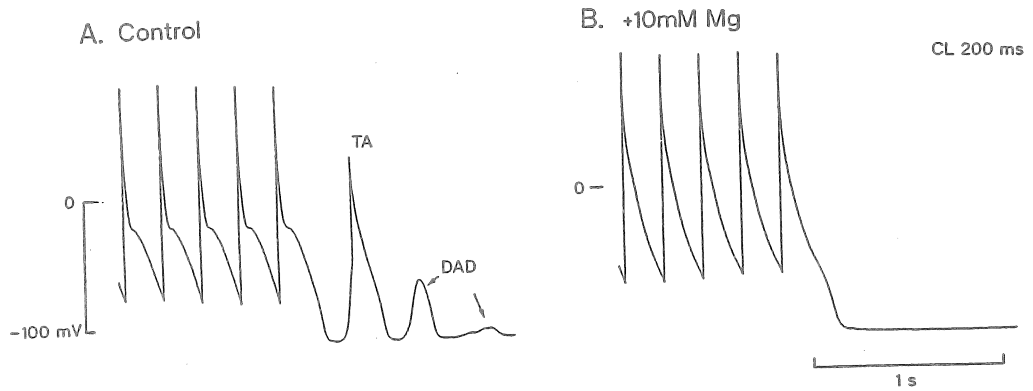


【Fig. 6】 モルモット単一心筋細胞において5~6.7 Hz、10~20発で誘発したDAD、EAD、TAに対する5mM Mg^{2+} の作用。5mM Mg^{2+} によりこれらの抑制はみられず、さらに亢進する傾向があった。

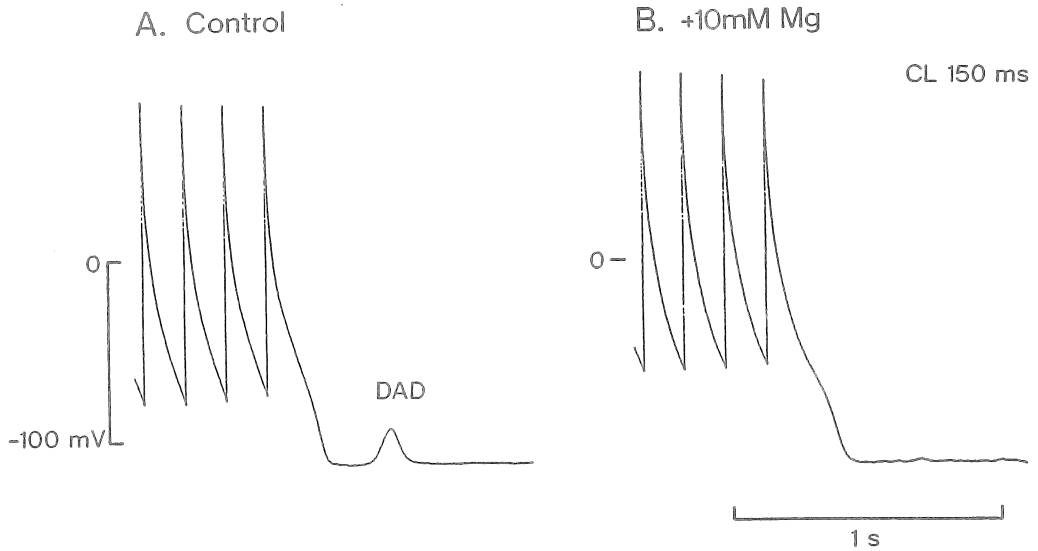
Fig. 6 の下段BにはこれらTA、DAD、EADに対する5mM Mg^{2+} の効果を示す。図に示すように、5mM Mg^{2+} は全くこれらを抑制出来なかった。他の4細胞においても同様の結果が得られた。5mM Mg^{2+} 存在下においてもしばしばTA、DAD、EADの発生がより頻繁になることもあった。しかしながら、 Mg^{2+} 濃度を10mMに増加するとTA、DAD、EADの発生を完全に抑制することが出来た。その典型例をFig. 7に示す。CL=200msと150msで、トレインパルス10~30発で誘発したDAD、TAがほぼ完全に消失



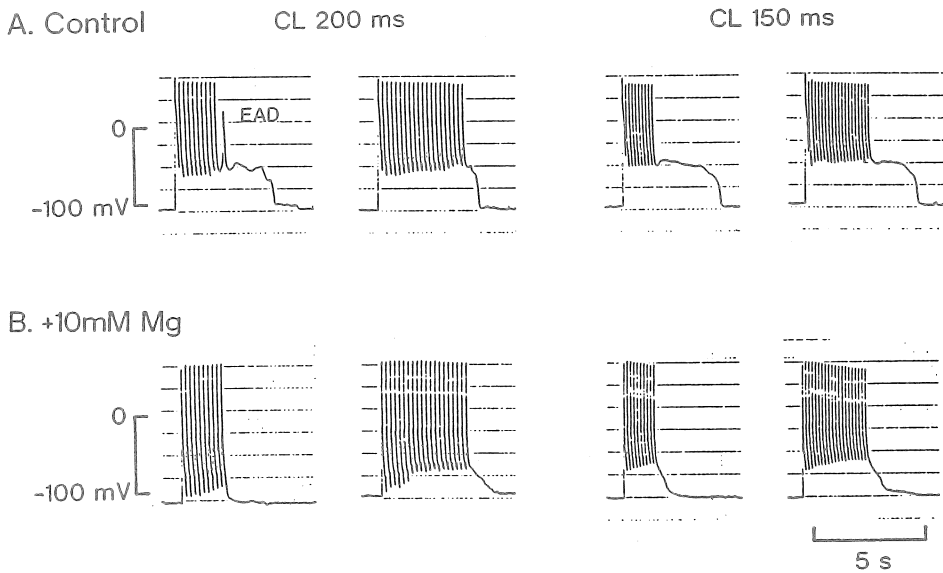
【 Fig. 7 】 モルモット単一心筋細胞におけるDAD、TAの発生を10mM Mg²⁺が完全に抑制した一例。トレインの頻度5~6.7Hz、10~30発でDAD、TAは誘発されている。



【 Fig. 8 】 10mM Mg²⁺によるTA、DADの抑制。これらは5Hz (CL=200ms)、30発のトレイン刺激で誘発している。Fig.7のデータの一部の拡大したものである。



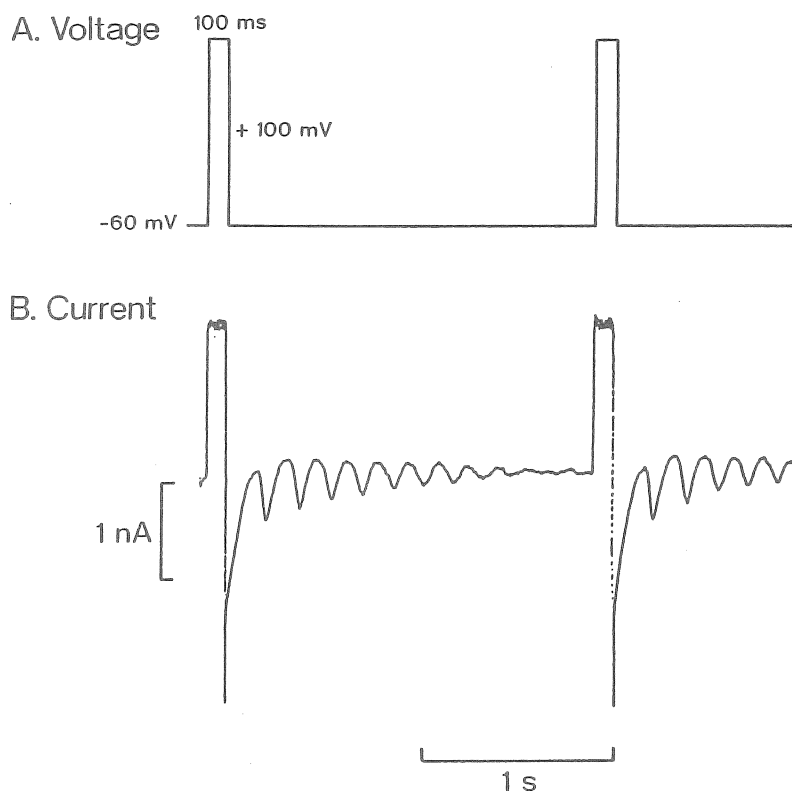
【 Fig. 9 】 10mM Mg^{2+} による6.7Hz、10発のトレイン刺激により誘発したDADの抑制。Fig.7のデータの一部を拡大したものである。



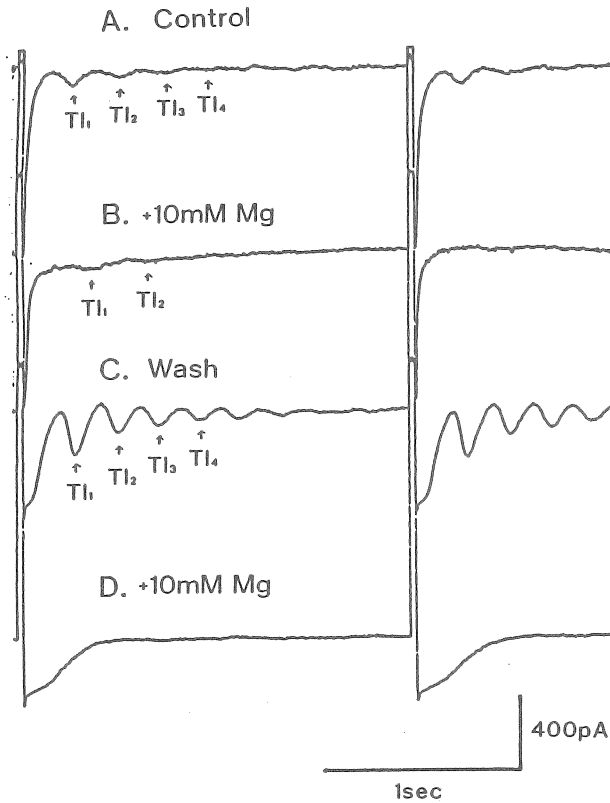
【 Fig. 10 】 モルモット単一心筋細胞における Mg^{2+} (10mM)によるEADの抑制。5~6.7Hz、10~20発で誘発したEADが Mg^{2+} でほぼ抑制されている。

している。Fig. 8 と Fig. 9 は各々 $CL=200ms$ と $150ms$ の場合での $10mM Mg^{2+}$ の効果を拡大して示している。Fig. 10 は EAD を $10mM Mg^{2+}$ が抑制した例を示している。

つぎに、DAD の根底にある $[Ca^{2+}]_i$ の微小変動について詳細に検討するために、単一心筋細胞の膜電位固定実験を行った。DAD は、膜電位固定実験では一過性内向き電流 transient inward current (TI) として現れる。膜電位を $-60mV$ に保持し、 $30\sim 200 msec$ の大きな脱分極パルス ($>100mV$) を与え、再び $-60mV$ に戻すと一過性の内向きの振動性電流が観察される。これが TI であり、その頻度は $4\sim 9Hz$ で時間とともに減衰しやがて消失する。Fig. 11 に典型例を示す。この TI に対し、外液に Mg^{2+} ($10mM$) を添加してその効果をみたのが、Fig. 12 である。この例では control 液下 (Fig. 12 A) での第一、二番目の TI の振幅は 165 および $85pA$ であったが、 Mg^{2+} により各々 50 と $25pA$ に減少し、TI の周期も延長した (B)。再び control 液に戻した後 (wash 後、C)、TI の振幅は増加し、周期も再び短縮したが、 Mg^{2+} の再添加 (D) は再びこれらをほぼ完全に抑制した。wash 後の TI の増加はリバウンド現象による $[Ca^{2+}]_i$ の増加を反映したと思われる。 Mg^{2+} による TI の抑制に再現性が見られたことは、 Mg^{2+} 添加後に発現した TI の抑制は外液に加えた Mg^{2+} ($10mM$) によるであろうことが強く示唆された。6 例の平均を Table 1 に示す。 $10mM Mg^{2+}$ は第一、二番目の TI の振幅を各々 82.6% ($307\pm 224pA$ から $54\pm 22pA$ へ)、 85.2% ($203\pm 18pA$ から $30\pm 10pA$ へ) 減少した。一方、TI の発生頻度は $5.90\pm 1.66Hz$ から $4.83\pm 1.26Hz$ へと有意に ($p < 0.05$) 抑制された。



【 Fig. 11 】
モルモット単一心筋細胞における脱分極により誘発された一過性内向き電流 (transient inward current; TI)。保持電位 $-60mV$ より $100mV$ 、 $100ms$ 持続の脱分極パルスを与え、元の保持電位に戻した際、時間とともに減衰する振動性の TI が観察される。詳細は本文参照。



【Fig. 12】
 Mg^{2+} (10mM) によるTI抑制の典型例。この例ではTIは保持電位-60mV、持続30ms、100mVの脱分極パルスで誘発した。10mMの Mg^{2+} の添加はTIの振幅と周期を抑制した。 Mg^{2+} のwash後、TIは再び顕著になり、(A)のcontrolよりも増強したが、 Mg^{2+} の再添加はTIをほぼ完全に抑制した。

	Control	10mM Mg	Inhibition
Amplitude of TI_1	307 ± 224 pA	54 ± 22 pA	82.6 %
Amplitude of TI_2	203 ± 18 pA	30 ± 10 pA	85.2 %
Frequency of TI	5.90 ± 1.66 Hz	4.83 ± 1.26 Hz	

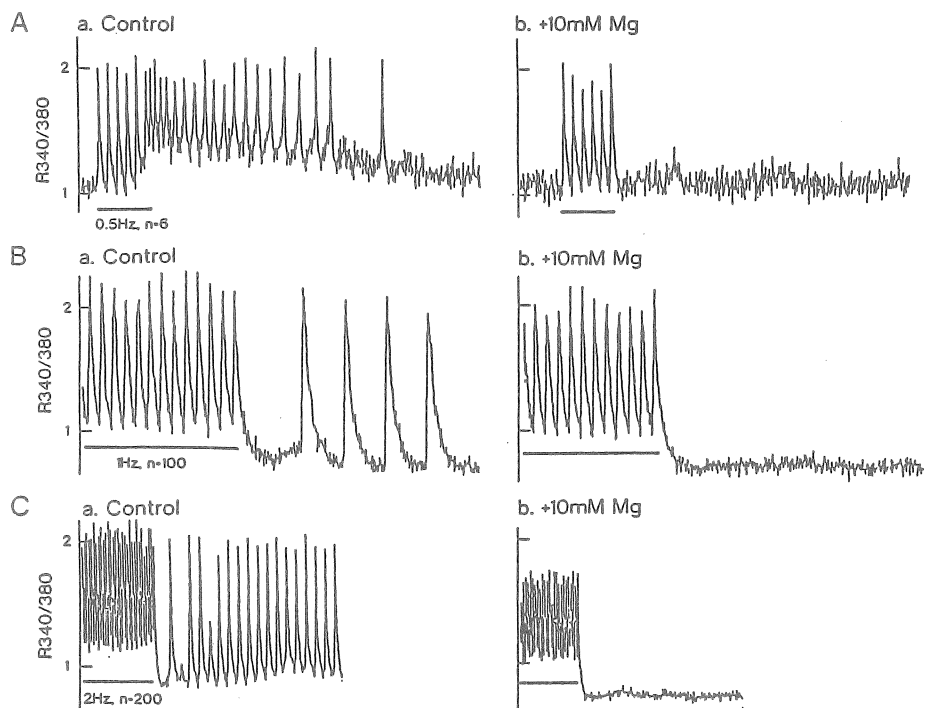
【Table 1】 TIの振幅と周期に対する10mM Mgの抑制。データは6例の平均値±標準誤差。 TI_1 と TI_2 は各々1番目と2番目のTIを示す。

3.3 Ca^{2+} 蛍光の測定

今まで述べた実験結果は $10\text{ mM } Mg^{2+}$ は DAD、TA そしてその原因としての TI を有意に抑制することを示した。TI は心筋 Ca^{2+} 貯留（主に SR）からの Ca^{2+} の周期的な放出により、 $[Ca^{2+}]_i$ が周期的に増加することにより引き起こされることが知られている [10]。従って Mg^{2+} により TI が抑制されることは、 Mg^{2+} が $[Ca^{2+}]_i$ の増加を抑制すると考えることが妥当であろう。この可能性を調べたのが Fig. 13 の結果である。

Fig. 13 A は 0.5 Hz ($CL=2000\text{ ms}$) の頻度で 6 発のトレインパルスを与えるとパルス毎に $[Ca^{2+}]_i$ の増加を反映した Ca トランジェントがみられ、そして次第にパルス毎に基線のレベルの上昇がみられる。そして 6 発目が終了してもおそらく TA の原因となったであろう $[Ca^{2+}]_i$ の周期的な変動がしばらく持続している。 $10\text{ mM } Mg^{2+}$ の添加はこれらの Ca トランジェントを殆ど抑制した。同様に Fig. 13 B は刺激頻度 1 Hz ($CL=1000\text{ ms}$) で 100 発のトレインで誘発した TA による $[Ca^{2+}]_i$ の増加を完全に抑制した例である。さらに C においては 2 Hz 、200 発による $[Ca^{2+}]_i$ の変動が $10\text{ mM } Mg^{2+}$ の添加でやはり完全に抑制された例を示している。

これらの実験結果は確かに $10\text{ mM } Mg^{2+}$ が $[Ca^{2+}]_i$ の増加を反映している Ca トランジェントを抑制することを示した。



【 Fig. 13 】 新生児ラット培養心筋細胞における Fura-2-Ca 蛍光に対する $10\text{ mM } Mg^{2+}$ の抑制。縦軸は 340 nm と 380 nm の励起光による 500 nm の蛍光の比、 $R_{340}/380$ 。A)、B)、C) は各々 0.5 Hz 、6 発、 1 Hz 、100 発、 2 Hz 、200 発の電気刺激により誘発した TA によるとと思われる Ca トランジェントに対する Mg^{2+} の効果を示す。

4. 考察

最近では心血管系における Mg^{2+} の重要性が基礎、臨床両面で注目されている。心筋梗塞で死亡した患者の非梗塞部心筋内 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 濃度を検討した報告があり、それによると非梗塞部心筋では正常心筋に比し Mg^{2+} と K^+ は減少しており、一方 Ca^{2+} は増加していた[2]。すなわち Mg^{2+}/Ca^{2+} 比は低下する。 Mg^{2+} 濃度は正常心筋より12~33%の減少であった。しかし、 Mg^{2+} 含有量の多い骨格筋や横隔膜においては患者では正常例とほぼ同様であり、この心筋内 Mg^{2+} の減少は心筋特異性とされている[2]。心筋梗塞発症2~3時間以内に測定された血清 Mg^{2+} 濃度は有意に低下しているとの報告が多い[12, 13]。この血清 Mg^{2+} の低下は急性心筋梗塞に合併する不整脈の増悪、発症頻度増加に関与する傾向がある[2]。実際、急性心筋梗塞発症後静脈内 Mg^{2+} 投与により、不整脈発症やそれによる死亡率の減少が得られている[14]。また、血清 Mg^{2+} 濃度が正常範囲であっても、心室性頻拍症や難治性心室性不整脈に対して Mg^{2+} が効果的であったとの報告もある[1, 15]。突然死の原因の一つとして冠動脈スパズムが関与しているといわれている[16]。 Mg^{2+} 欠乏状態では前述のように、心筋、血管平滑筋内 Mg^{2+} 、 K^+ 減少、 Ca^{2+} 、 Na^+ 増加がみられる。とくに Ca^{2+} の細胞膜を介しての過度の流入は細胞内遊離 Ca^{2+} の上昇を招き、血管収縮を惹起する。

Mg^{2+} は前述のように抗不整脈作用がある[1-3, 13, 17]。 Mg^{2+} の効果は大きく分けて間接作用と直接作用に分けられる[18]。直接作用としては Mg^{2+} の減少が細胞膜の K^+ と Na^+ に対する透過性を亢進させる可能性(、および2価イオンとしての構造類似性による Ca^{2+} に対する競合阻害作用がある。 K^+ の透過性に対する作用としては、最近心筋で $[Mg^{2+}]_i$ が1mM以下に減少した場合、ATP感受性 K チャネルを介する外向き K 電流が著しく増加することが発見された[19]。このことは $[Mg^{2+}]_i$ が減少すれば、活動電位発生時の K^+ の流出が増え、 $[K^+]_i$ は減少することを示す。 $[K^+]_i$ の減少は膜電位を脱分極させ活動電位の立ち上がり速度(\dot{V}_{max})を減少させ、伝導速度の遅延、不整脈の誘発を導く。さらに $Mg^{2+}-Na^+$ 交換機構の存在が示された[6]。すなわち $[Mg^{2+}]_i$ の低下は $[Na^+]_i$ 上昇を招く。 Ca^{2+} に対する競合作用については、 Mg^{2+} は $[Ca^{2+}]_o$ が低い条件下では心筋の Ca^{2+} チャネルを通過可能であるが[20]、細胞内遊離 Mg^{2+} と Ca^{2+} は逆相関にあり[12]、正常 $[Ca^{2+}]_o$ においては逆に Ca 電流を抑制する[21]。これが“天然の生理的 Ca ブロッカー”とよばれる由縁である。すなわち Mg^{2+} は verapamil や diltiazem などの Ca 拮抗剤と同様、 Ca^{2+} チャネルに作用して Ca 電流を減少させ、最終的に $[Ca^{2+}]_i$ を減少する可能性がある。

一方、間接作用としては、 Mg^{2+} は約300にわたる酵素の補酵素として作用することが知られている。例えば、 Mg^{2+} は生理的範囲の濃度で細胞膜 Na,K -ATPaseの活性化を通じ、 $[Na^+]_i$ を低下させ、 Na^+-Ca^{2+} 交換機構を介して細胞内遊離 Ca^{2+} を減少させる。臨牀的にも心不全でみられる低 Na^+ 血症が、 Mg^{2+} または K^+ の補給で正常化することがある[22, 23]。また、 $[Mg^{2+}]_i$ は Ca ポンプとしての膜 Ca -ATPaseを活性

化させ、細胞外への Ca^{2+} の汲み出しとSRへの Ca^{2+} 流入を促進し、 $[Ca^{2+}]_i$ を調節している。

ジギタリス作用下、外液 Ca^{2+} を増加、あるいは外液 Na^+ または K^+ を減少させた条件下で、心筋を高頻度刺激すると刺激停止後に一過性の脱分極 delayed afterdepolarization (DAD) が生じる。これらの条件はいずれも間接的に細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) を増加させることから、DADと $[Ca^{2+}]_i$ の関連性が推測されてきた。最近では、Fig. 14に示すように、 Na ポンプ抑制により、 $[Na^+]_i$ が増加し、 Na^+-Ca^{2+} 交換を介して $[Ca^{2+}]_i$ が増加するためと考えられている[24]。すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加により非選択的陽イオンチャネルが活性化され、これを介して主として Na^+ が流入し、DADを生ずる。DADが Na チャネル活性化の閾膜電位に達すると、伝導性の活動電位、すなわちTAが発生し、これがもし心室で生じれば、心電図上心室性期外収縮や心室頻拍として記録される。

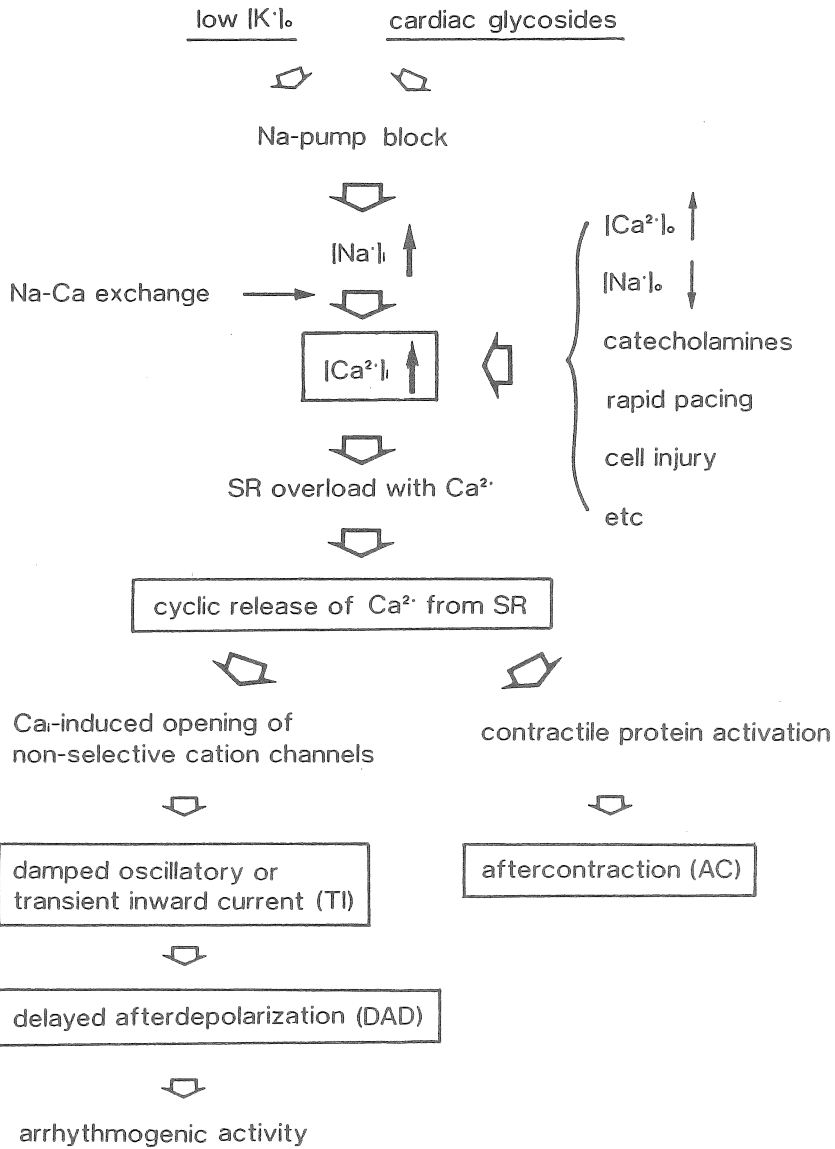
本研究では $[Mg^{2+}]_o$ 増加によるTA停止の機序として、DADの振幅の減少、 Na チャネル活性化閾膜電位の脱分極側へのシフト(閾値の上昇)が考えられる[9]。

第一の可能性、すなわち Mg^{2+} によるDAD振幅の抑制に関しては、すでに多細胞心筋標本(モルモット心室乳頭筋)での報告がある[25]。彼らの報告によると、低 K^+ (0.7mM)、高 Ca^{2+} (3.6mM)、ouabain(1 μ M)存在下で得られたDADが1.2mM Mg^{2+} で抑制(振幅減少と周期延長)された。Kassら[26]は犬プルキンエ線維でDADの原因であるTIに対する Mg^{2+} の抑制作用をすでに報告している。しかし、単一心筋細胞におけるDAD、TIに対する Mg^{2+} の抑制作用は、我々が知るかぎり本報告が初めてである。この Mg^{2+} の抑制作用として、1) Mg^{2+} が Ca チャネルをブロック[4, 27]、2) 非選択的陽イオンチャネルをブロック[9]、3) Na^+-Ca^{2+} 交換ブロック[9]、4) 細胞内 Ca^{2+} 貯留(SR)からの Ca 放出のブロック[28]等が考えられる。いずれによってもDAD、ひいてはTAは減少ないし消失してもよいと思われる。詳細については今後の検討が必要である。

つぎに Mg^{2+} によるTA停止の機序として Na チャネル活性化閾膜電位の脱分極側へのシフトについては、本研究ではTAはいずれもその周期を次第に延長しながら振幅を減少させ停止に至っているのので考えにくい。

一方、 Mg^{2+} はEADをも抑制した(Fig. 10)。EADの発生機序は膜 K^+ コンダクタンス減少と-60mV付近で増加する Na^+ コンダクタンスの増加によるとされている[10]。すなわち、 $[Ca^{2+}]_i$ が増加した条件下では Na^+-Ca^{2+} 交換により、 Na^+ 流入が増加する。そして前述のように $Mg^{2+}-Na^+$ 交換で細胞内 Mg^{2+} は減少したレベルにあるのであろう。そこへ加えられた1.0mM Mg^{2+} がこれに対して拮抗的に作用したのかもしれない。

今回示した実験結果は、未だ研究の途上にあるが、細胞外液に加えた Mg^{2+} (1.0mM)が確かに不整脈の一因である誘発活動(TA)、一過性脱分極(TD)の原因である一過性内向き電流(TI)を有意に抑制することを示した。 Ca トランジェント測定において



【 Fig. 14 】 低 K^+ 液灌流と強心配糖体作用下心筋で起こるDAD、TA、ACの発生機序。詳細は本文参照。

も10mM Mg^{2+} は確かに $[Ca^{2+}]_i$ の増加を抑えた。これは単一細胞では未だ報告されていない新知見であり、大変重要な結果である。しかしながら、 Mg^{2+} が果して膜の外から効くのか、それとも膜を通過して内側から効くのかが不明である。さらに内側から効くとするとその濃度は？そして非選択的陽イオンチャネルを直接ブロックするのか、それともSRの Ca^{2+} 取り込み過程に影響を及ぼすのか、 Ca チャネルへの影響はどうか、あるいは代謝(種々の酵素反応を含む)を介して作用するのか、等が不明である。 Mg^{2+} の抗不整脈作用の真のメカニズムを探るうえで、これらのことは避けて通れない。そのためには細胞内灌流法により、細胞内の Mg^{2+} 濃度をコントロールして詳しい解析を行う必要があろう。

5. 文献

1. Iseri LT, Freed J, Bures AR (1975) Magnesium deficiency and cardiac disorders. *Am J Cardiol* 58:837-846.
2. Ebel H (1983) Role of magnesium in cardiac disease. *J Clin Chem Clin Biochem* 21:249-265.
3. Altura BM, Altura BT (1985) New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. I. Clinical aspects. *Magnesium* 4:226-244.
4. White RE, Hartzell HC (1988) Effects of intracellular free magnesium on calcium current in isolated cardiac myocytes. *Science* 239:778-780.
5. Gunther T (1977) Stoffwechsel und Wirkungen des intrazellularen Magnesium. *J Clin Chem Clin Biochem* 15:433-438.
6. Blatter LA (1990) Intracellular free magnesium in frog skeletal muscle studied with a new type of magnesium-selective microelectrode: interactions between magnesium and sodium in the regulation of $[Mg]_i$. *Pflügers Arch* 416:238-246.
7. Seeling MS (ed.) (1980) Magnesium deficiency in the pathogenesis of disease. Early roots of cardiovascular, skeletal, and renal abnormalities. Plenum Medical, New York, London.
8. Cumming JR (1960) Electrolyte changes in heart tissue and coronary arterial and venous plasma following occlusion. *Circ Res* 8:865-870.
9. 有田 真 (1987) 心筋の興奮性・伝導性の維持とマグネシウムイオン. *心臓ペースティング* 3:16-28.
10. January CT, Fozzard HA (1988) Delayed afterdepolarizations in heart muscle: Mechanisms and relevance. *Pharmacol Rev* 40:219-227.
11. Noble D (1979) *The Initiation of the Heartbeat*. Clarendon Press, Oxford.

- 1 2 . Altura BM (1984) Mg deficiency and hypertension: correlation between magnesium deficient diets and microcirculatory changes in situ. *Science* 223:1315-1317.
- 1 3 . Dyckner T (1980) Serum magnesium in acute myocardial infarction. *Acta Med Scand* 207:59-66.
- 1 4 . Smith LF et al. (1986) Intravenous infusion of magnesium sulphate after acute myocardial infarction: effects on arrhythmias and mortality. *Int J Cardiol* 12:175-180.
- 1 5 . 斉藤幾重、高畑秀夫、渡辺達也、堀川章仁、鈴木 彰、鈴木重文、前山忠美、佐藤雅彦。小松正文 (1990) Torsades de pointesに対し硫酸マグネシウムが著効した一例。 *心電図* 10:485-493.
- 1 6 . Altura BM et al. (1985) Interactions of Mg and K on blood vessels-aspects in view of hypertension. *Magnesium* 3:175-194.
- 1 7 . Wester PO (1986) Magnesium: effects on arrhythmias. *Int J Cardiol* 12:181-183.
- 1 8 . Eisenberg MJ (1986) Magnesium deficiency and cardiac arrhythmias. *New York State J Med* 133, March.
- 1 9 . Horie M, Irisawa H, Noma A (1987) Voltage-dependant Mg block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea pig ventricular cells. *J Physiol* 387:251-272.
- 2 0 . Kohlhardt M, Haastert HP, Krause H (1973) Evidence of nonspecificity of the Ca channel in mammalian myocardial fiber membranes. Substitution of Ca by Sr, Ba or Mg as charge carries. *Pflügers Arch* 342:125-136.
- 2 1 . Sebeszta M, Coraboeuf E, Deroubaix E et al. (1981) Effect of tetraethylammonium, 4-aminopyridine, cesium and magnesium on slow responses in the guinea pig papillary muscle. *Cardiovasc Res* 15:468-474.
- 2 2 . Laragh J. (1954) The effect of potassium chloride on hyponatremia. *J Clin Invest* 33:807-818.
- 2 3 . Dyckner T, Wester P (1981) Effects of magnesium infusion in diuretic induced hyponatremia. *Lancet* 1:585-586.
- 2 4 . Ferrier GR (1977) Digitalis arrhythmias: role of oscillatory afterpotentials. *Prog Cardiovasc Dis* 19:459-474.
- 2 5 . Saikawa T, Arita M, Ito S (1987) Effects of magnesium on transient depolarization and triggered activity induced by ouabain in guinea pig ventricular muscle. *Magnesium* 6:169-179.
- 2 6 . Kass RS, Lederrer WJ, Tsien RW, Weingart R (1978) Role of calcium ions in

transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibers. J Physiol 281:187-208.

27. Wu J, Lipsius SL (1990) Effects of extracellular Mg^{2+} on T- and L-type Ca^{2+} currents in single atrial myocytes. Am J Physiol 259:H1842-1840.
28. Ito T, Ehara T (1987) Mg inhibits voltage and tension oscillation but potentiates twitch in depolarized myocardium. Am J Physiol 253:H248-255.

The mechanisms of antiarrhythmic efficacy of magnesium ions
in isolated ventricular cells

Masahiro Aomine and Youichi Tatsukawa*

Division of Nutritional Physiology, Graduate School of Nutrition
Sciences, Nakamura Gakuen College and Department of Physiology,
Medical College of Oita.

Summary

Despite magnesium ions (Mg)'s widespread use for antiarrhythmic purposes, little is known concerning its antiarrhythmic mechanisms. We, therefore, examined Mg effects on delayed afterdepolarization (DAD), early afterdepolarization (EAD), triggered activity (TA) and aftercontraction (AC), using isolated ventricular cells and/or ventricular papillary muscle. In the experiments using the multicellular preparation, ACs were measured, with the use of strain gauge. ACs were induced in isolated rat papillary muscle superfused with low K^+ (0.5 mM) medium, after a train stimulation (2-5 Hz, 10-30 beats). In the experiments of cardiac myocytes, the effects of Mg on transient inward current (TI), which is responsible for DAD, were studied using whole-cell voltage-clamp method applied on isolated ventricular cells from guinea pig. And action potentials were also induced by current clamp (10 ms) and the effects of Mg on DAD, EAD and TA were examined. TI, DAD, EAD and TA were induced by use of pipette solution with high Ca^{2+} (0.7 mM) and low EGTA (0.1 mM). Moreover, Mg effects on the intracellular Ca^{2+} concentration were measured in neonatal rat ventricular cells, by means of Ca^{2+} -indicator dye fura-2. We found: 1) In the rat papillary muscle, 10 mM Mg inhibited ACs, although 5 mM Mg failed to inhibit them; 2) In cardiac myocytes, 5 mM Mg was unable to inhibit DAD, EAD and TA, however, 10 mM of the ions inhibited them completely; 3) The amplitude and frequency of TI were significantly reduced in the presence of 10 mM Mg (e.g. amplitude of first TI: 307 ± 224 pA to 54 ± 22 pA; amplitude of second TI: 203 ± 30 pA to 30 ± 10 pA; frequency: 5.9 ± 1.7 Hz to 4.8 ± 1.3 Hz); 4) Mg (10 mM) inhibited Ca transient responsible for DAD and/or TA. These results show that the antiarrhythmic activities of Mg may reflect a decrease in Ca^{2+} influx via Ca^{2+} channels, an impairment of Ca^{2+} sequestration, a blockade of non-specific cation channels, and/or a blockade of Na^+ - Ca^{2+} exchanger, alone or in combination.