

9244 マグネシウムの単一心筋細胞における抗不整脈作用発現の機序解明

助成研究者:青峰 正裕(中村学園大学 家政学部)

共同研究者:福田 桂子(中村学園大学)

【目的】

細胞内Caを増加する条件下(ジギタリス作用下、外液Ca増加、外液NaまたはK減少)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。DADがNaチャンネルの閾膜電位に達すると伝導性の活動電位すなわち撃発活動 triggered activity(TA)が発生し、心室で発生すれば心電図上、心室性期外収縮や心室頻拍として記録されることになる。DADやTAは膜電位固定実験では一過性内向き電流 transient inward current(I_{Ti})として現れる。前回の本研究助成においては、灌流液中のマグネシウムイオン(Mg)濃度10mMで、これらDADやTAを、そしてこれらの根底にある細胞内Ca濃度上昇(Caトランジェントとして測定)を有意に抑制することを報告した。今回は、Mgのこれらの抗不整脈作用が、細胞膜外からか、あるいは細胞内から発揮されるのかをより明確にする目的でおこなった。

【方法】

標本はモルモット心室筋より酵素法(コラゲナーゼ)により単離した単一心室筋細胞を用い、膜電流は吸引パッチピペット電極による全体膜電位固定法により測定した。ピペット内液には細胞内Ca負荷を容易にするため0.5mM Caを用いた。 I_{Ti} は保持電位-45mVより+100mV以上の脱分極パルス(持続時間100~200msec、頻度0.5~2Hz)を与えた後、再び元の電位に戻した際に時間とともに減衰する振動性内向き電流として記録された。ピペット内液のMg濃度を0、2.5、5、10mMと変化させ、 I_{Ti} への影響を観察した。さらにダブルパッチ電極(一本目の電極でCa負荷、 I_{Ti} 誘発後二本目でMg負荷)により、Mgの効果を確かめた。

【結果と考察】

ピペット内液のMg濃度をゼロから10mMまで変えた実験では、ゼロで I_{Ti} の持続時間は最短であったが、Mg濃度にほぼ比例して延長した。さらに、ピペット内液Mg濃度をゼロに保ったまま、外液Mg濃度を0.5mMから10mMに増加した場合、持続時間は約2.5倍延長した。一方、ダブルパッチ電極による実験も上記のデータを支持した。これらのデータはMgは細胞膜外からも、そして細胞内からも細胞内Ca濃度を抑制する方向へ働くことを強く示唆する。

9244 マグネシウムの単一心筋細胞における抗不整脈作用発現の機序解明

助成研究者:青峰 正裕(中村学園大学 家政学部)

共同研究者:福田 桂子(中村学園大学)

1. 研究目的

最近、マグネシウムイオン(以下Mg)欠乏症と臨床領域における種々の疾患との関連が注目されている[1]。とくに循環器疾患(虚血性心疾患、難治性不整脈、高血圧や脳血管障害)でMg欠乏状態が存在し、Mg補充療法の有用性が検討されている。例えば、急性心筋梗塞発症後静脈内Mg投与により、不整脈発症や死亡率の減少が得られている[2]。しかしMgのこのような抗不整脈作用がどのようなメカニズムによるのかは、まだよく判っていない。

前回の本研究助成[3]においては、Mgの抗不整脈作用を心室乳頭筋とその単離した単一細胞を用いて、以下に述べる結果を得た。

ジギタリス作用下、外液Caを増加、あるいは外液NaまたはKを減少させた条件下で、心筋を高頻度電気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濃度($[Ca]_i$)を増加させることから、DADと $[Ca]_i$ との関連性が推測されてきた。DADがNaチャン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撃発活動 triggered activity (TA)が発生し、不整脈の一因となる。膜電位固定実験ではこれらDAD、TAは I_{Ti} として記録されることになる。 I_{Ti} は細胞内Caイオン負荷の結果、筋小胞体(SR)からCaイオンが振動性に放出され、Na-Ca交換電流あるいはCa活性化非選択的陽イオンチャンネルの活性化により、引き起こされると考えられている[4-6]。我々の研究においては、Ca負荷心室乳頭筋において、高頻度刺激(5Hz)後に生じたDADと、TAに対するMgの抑制作用が、外液Mg濃度5mMではみられず、10mMではほぼ完全であることがわかった。つまりMgの抑制効果は濃度依存性であった。つぎにDADの根底にある $[Ca]_i$ 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時間とともに減衰する振動性の一過性内向き電流 transient inward current (I_{Ti})として現れる。この I_{Ti} の振幅と頻度を外液10mM Mgは有意に抑制した。さらに心室筋細胞を細胞培養し、Fura-2/AMを負荷し、Caトランジェントに対するMgの効果を測定したところ、外液10mM Mgは完全にCaトランジェントを抑制した。したがってこれらの実験結果は、細胞外に添加したMgが確か

に不整脈の一因である I_{T1} を有意に抑制し、しかもその原因となる細胞内 Ca 濃度変動を抑える作用を有することを示した。

しかしながら、 Mg が果して細胞膜外からの効くのか、それとも膜を通過して内側から効くかが不明である。さらに内側から効くとすれば、SRの Ca 取り込み、放出作用に影響を与えるのか、それとも非選択的陽イオンチャネルをブロックするのか、 Ca チャネルへの影響は？代謝への影響は？等が依然として不明である。そこで Mg の抗不整脈作用の真のメカニズムを探るためには、細胞内灌流装置を作成して、細胞内の Mg 濃度をコントロールして詳しい解析を行う必要がある。本研究ではまずシングルパッチ電極実験で電極内 Mg 濃度を変化させて I_{T1} 持続時間と電極内 Mg 濃度との関係を調べた。そして細胞内灌流装置の代わりにダブルパッチ電極を用いた実験も行った。すなわち一方の電極で細胞内 Ca 負荷を行って I_{T1} を誘発し、 Mg を含む他方の電極でその I_{T1} の抑制を調べた。

2. 研究方法

2.1 単一心室筋細胞の作成

単一心室筋細胞はモルモット心室筋より酵素処理法により得た。具体的には、モルモットをネンブタール(60mg/kg体重)麻酔下で開胸し、素早く心臓を摘出、ランゲンドルフ灌流装置にてコラゲナーゼ(0.1mg/ml)を含む無 Ca タイロード液(mM: NaCl 140、KCl 5.4、 $MgCl_2$ 0.5、glucose 10、HEPES 5; pH=7.2)で10~20分灌流した。その後心臓を保存液(mM: KCl 24、glutamic acid 70、taurine 10、oxalic acid 10、 KH_2PO_4 5、HEPES 5、glucose 11、EGTA 0.5; pH=7.4)の中に置き、必要に応じて心室の組織小片を取り、実験槽中で攪拌し、細胞を分散させた。実験槽(容積約1.2ml)はタイロード液により、2~3ml/分に速度で灌流した。実験は36~37°Cで行い、細胞外 Mg 濃度の効果実験は $MgCl_2$ を終濃度10mMにして行った。

2.2 細胞全体膜電位固定実験

電極は電極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 の負荷を生じせしめるため $CaCl_2$ 濃度を0.7mMとし、さらにEGTAを通常の十分の一の0.1mMを含む溶液(mM: KOH 100、KCl 20、NaCl 10、ATP- K_2 5、glucose 10、aspartate 100、 $CaCl_2$ 0.7、EGTA 0.1、HEPES 10; pH=7.2)で満たして使用した。この電極(抵抗2~4M Ω)を倒立顕微鏡(Nikon、Diaphot)下に細胞表面に押しあて、軽い陰圧を加え電極先端と細胞膜表面の間にgiga-ohmの高抵抗の接着が完成した後、強い陰圧(<-50cm H $_2$ O)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1Hz)を行い、発生させた。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。さらに膜電位固定実験も上記の電極により行い、保持電位 (V_H 、 $-40\sim-50\text{mV}$) から $+100\text{mV}$ 以上の脱分極パルス (持続時間 $100\sim 200\text{ms}$ 、頻度 $0.5\sim 2\text{Hz}$) を与えて行った。ダブルパッチ電極実験では二本目の電極の Mg 濃度を 10mM にして実験を行った。なお、電極の他のイオン組成は上記のと同様である。膜電位と膜電流はデータレコーダー (Teac、RD-100T) により記録し、これをデータ再生処理器 (Macintosh、MacLab/8) により分析した。データは Mean \pm SD で示し、有意差の検定は unpaired t-test により $p<0.05$ をもって有意差ありと判定した。

3. 研究結果

3.1 I_{T1} の特性

膜電位を $-40\sim-50\text{mV}$ に保持し、 $100\sim 200\text{ms}$ の大きな脱分極パルス ($>100\text{mV}$) を与え、再び $-40\sim-50\text{mV}$ に戻すと内向きの振動性の電流が観察される (Fig. 1)。これが I_{T1} であり、その振動の頻度は大体 $4\sim 9\text{Hz}$ の範囲にある [3]。一般に I_{T1} は脱分極時間が長い程その振幅を増し、最初の I_{T1} がピークに達するまでの時間 (time to peak) は短縮する [5, 7, 8]。

Fig. 2には保持電位 (V_H) -45mV から種々の膜電位へ持続時間 200ms の脱分極パルス (V_c) を与え、 -45mV にクランプバックした際に記録された I_{T1} を示す。Fig. 3Aには I_{T1} の大きさ (内向きであるのでマイナスで記録; 振幅と同じ) と V_c との関係、同図Bには time to peak と V_c との関係を示す。 I_{T1} は $V_c = +85\text{mV}$ 近辺で最大値を示したが、time to peak は V_c とともに増大した。

I_{T1} の振幅およびその time to peak と保持電位 (V_H) との関係は Fig. 4 に示されている。 V_H を -45mV から -4mV まで変えて 100ms 持続の 100mV の脱分極パルスを与えた場合、この細胞標本においては、 $V_H = -24\text{mV}$ で I_{T1} の振幅は最大となった。time to peak は V_H が脱分極側に移行するにつれて短縮した。

3.2 ピペット内 Mg 濃度と I_{T1} との関係

「研究方法」の項でも述べたように、本研究においては心室筋細胞において I_{T1} を誘発するためにピペット内の Ca 濃度を 0.7mM に増加し、さらに EGTA を 0.1mM と減少している。これらは細胞内 Ca 負荷を促進する条件であると思われる。しかしこのピペット内液には Mg は含まれていない。ピペット内から細胞内へとイオンが拡散してゆくとすれば、ピペット内 Mg 濃度をいろいろと変化させたとき、 I_{T1} の持続時間 (消失するまでの時間) はピペット内 Mg 濃度が高いほど延長することが予想される。なぜならば、一般に細胞は I_{T1} を細胞死の直前に発生する。 I_{T1} の time to peak を短縮しながら振幅を次第に増加し、やがて逆に time to peak を延長し振幅を減少し、丸く萎縮して死を迎え

るのである。であるからMgが細胞内の遊離Ca濃度を少しでも減少する作用を有するならば、あるいは細胞内Ca濃度を減少しなくても増加率を抑制する作用を有するならば、ピペット内Mg濃度に比例して I_{T1} の持続時間を延長すること(すなわち死までの時間を延長すること)が考えられる。

Fig. 6にはピペット内Mg濃度(0、2.5、5、10mM)と I_{T1} の持続時間との関係を示す(図中○印)。この場合細胞外液には0.5mM Mgを含んでいる。図に示すように、ほぼピペット内Mg濃度に比例して I_{T1} の持続時間は延長した。例えばピペット内Mg濃度がゼロの場合、 I_{T1} は 106.7 ± 49.7 秒($n=6$)持続したが、Mg濃度が10mMの場合 350.0 ± 180.8 秒($n=3$)と約3.3倍延長した。一方、細胞外液のMg濃度を最初から10mMで灌流し、ピペット内Mg濃度はゼロに保ったままで I_{T1} を記録した場合、 I_{T1} の持続時間は 273.3 ± 179.1 秒($n=9$)と細胞外液Mg濃度が0.5mMの場合と比較して有意に延長した($p < 0.05$) (Fig. 6の●印)。その代表例をFig. 7に示す。この標本においては I_{T1} が発生して消失するまで9分以上を要した。Fig. 8にはピペット内Mg濃度2.5mM、外液Mg濃度0.5mMで I_{T1} が発生し、2~3分間安定した振幅を示した後、外液Mg濃度を10mMに切り替えた直後より振幅が減少し約30秒で消失した例を示す。

以上示した実験データは上記の推論の妥当性を示唆していると思われる。

3.3 ダブルパッチ電極による実験

本研究においてこれまで示したデータは、全て一本のパッチピペット電極を用いた実験によるものであった。そこで一本目のCaを充填したパッチ電極で I_{T1} を発生させた後、Fig. 9に示すようにMgを充填した二本目のパッチ電極で膜を破り、 I_{T1} がどのように変化するかを確かめた。Fig. 10にその一例を示す。Aには I_{T1} の振幅の外液Mg濃度0.5mMにおける経時的变化と外液Mg濃度を10mMに増加した際の変化を示し、Bには同じ条件での I_{T1} のtime to peakの時間変化を示す。図中上段に示すa、b、c、dはA、Bでのa、b、c、dでの実際の I_{T1} に対応している。外液Mg濃度が0.5mMの場合、 I_{T1} は10秒間に約17%減少したが、10mM Mgへ外液を切り替えると少しtime lagがあって I_{T1} 減少の勾配が増加、time to peakの勾配も10mM Mgでさらに増加し、約30秒後には消失した。前述のように一般に細胞は丸くなって死を迎える直前から I_{T1} を発生する。この過程は不可逆過程であることが極めて多い。しかしこの細胞標本の場合、10mM Mgで細胞内を灌流して I_{T1} が消失し、その後も細胞は見かけ上正常の形態を保ったままであった。

この結果は、二本目のパッチ電極からMgが細胞内に拡散して I_{T1} の消失に何らかの役割を積極的に果たし、しかも細胞の生存に直接的に、あるいは間接的に貢献した可能性を強く示唆する。

4. 考察

前回の報告 [3] では、Ca 過負荷心室乳頭筋における高頻度刺激後に誘発された後収縮 aftercontraction (AC) が、細胞外液（灌流液）のMg濃度を1.1 mMから10 mMに増加するとほぼ完全抑制されたこと、単一心室筋細胞でのDAD、TAさらに膜電位固定実験での I_{T1} 、そしてCa蛍光色素（Fura-2/AM）で負荷した培養心筋細胞のCaトランジェントを外液Mg濃度10 mMが完全に抑制した事実を見だし、Mgは少なくとも細胞膜外から、細胞内遊離Ca濃度を減少させ、DAD、TAおよび I_{T1} を抑制する作用を有することを報告した。

しかし、これらのMgの抗不整脈作用は、Mgが細胞膜外からのみ効果を発揮しての結果であるとは限らない。Mgが細胞膜を通過して、膜に存在するCaチャンネルに膜の内側から、あるいはSRにおけるCaの取り込み、放出過程に抑制的に働いたのかもしれない。

これらの課題を追求するために本研究は企画されたわけであるが、今回得られたデータは十分とは言えないが、少なくともMgは細胞膜外から、そして細胞内からも作用することを示唆した（Fig. 11）。

Fig. 6は、ピペット内液のMg濃度をゼロから、2.5、5、10 mMと変化させ、 I_{T1} が消失するまでの時間（この場合細胞が死ぬまでの時間）がどのように影響されるかを観察した。データはピペット内Mg濃度に比例して消失までの時間は延長した。さらに、ピペットMg濃度がゼロのとき I_{T1} の持続時間は最短であったが、同時に外液Mg濃度を10 mMとした場合約2.5倍有意に延長した。これらのデータはMgは細胞内からも外からも細胞内Ca濃度を抑制する方向へ働くことを強く示唆するものである。

ダブルパッチ電極によるFig. 10の実験はこれらのことを支持するものである。一本目の電極でCaを負荷し I_{T1} を発生させ、10 mM Mgを含んだ二本目で I_{T1} への影響を観察した。 I_{T1} は10 mM Mgでその減少の勾配を増加した。一見するとこの事実はFig. 6の結果と矛盾するようにも見える。Fig. 6のデータは細胞内に拡散してきたMgは細胞が死を迎えるまでの時間を延長したが、Fig. 10では I_{T1} を消失させ細胞を少なくとも光顕レベルでは健全な状態を保つことに成功している。すなわちダブルパッチによる実験ではMgがより効果的に作用した結果なのかもしれない。

Fig. 11に今回得られたデータを基に、Mgの作用機序を模式的に表している。単離したラット心室筋細胞において蛍光Mg指示薬 Fura2/AM を用いての細胞内Mg濃度測定実験があるが、高Mg溶液中でも細胞内遊離Mg濃度は3%/hr程しか上昇していない [9]。このことは細胞外からMgは容易に細胞内へ入らないことを示している。すなわち、灌流液中のMg濃度を増加して抗不整脈作用が得られるのは、主として細胞外からMgが何等かの効果を発揮したためなのかもしれない。例えば、非選択的陽イオンチャネ

ルへ、Na-Ca交換機序へ膜外から抑制的に働くことが考えられる。さらに外液Mgが高濃度でしか抑制的に作用しないことは、Caチャンネルへの阻害も考えられる。Caチャンネルの阻害は流入するCaイオンの減少を招きSRにおけるCa-induced Ca-releaseを抑制する結果となる。一方、細胞内においてまず考えられるのは、SRのCa取り込み、放出過程へのMgの関与であろう[10]。SRにおけるCaの放出過程に細胞内Mgが抑制的に働いている可能性がある。さらに、Mgは種々の酵素のcofactorとしての役割を持っていることより、細胞内における種々の代謝過程への直接的、間接的な作用も考えられる。

以上述べたことは、Mgの抗不整脈作用は、細胞内と細胞膜外の少なくとも両面から発揮される可能性を示した。

5. 今後の課題

今回、Mgの抗不整脈作用は、心筋細胞の膜外及び細胞内の両面から発揮される可能性を示したが、その詳細に関しては未だに不明である。今後はこれらのことを明らかにしてゆくことが望まれる。

6. 文献

1. Shils ME (1988) Magnesium. In: Modern Nutrition in Health and Disease. 7th ed. (Shils ME & Young VR, eds.), Lee and Febiger, Philadelphia.
2. 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.
3. 青峰正裕 (1990) 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. ソルト・サイエンス研究財団1990年度研究報告書(助成番号9029) pp299-317.
4. January CT, Fozzard HA (1988) Delayed afterdepolarizations in heart muscle: mechanisms and relevance. Pharmacol Rev 40:219-227.
5. Matsuura H, Shattock MJ (1991) Membrane potential fluctuations and transient inward currents induced by reactive oxygen intermediates in isolated rabbit ventricular cells. Circ Res 68:319-329.
6. 青峰正裕、立川洋一、顎原嗣尚 (1992) マグネシウムの単一心室筋細胞における抗不整脈作用. 呼吸と循環 40:677-683.

7. Fedida D, Noble D, Rankin AC, Spindler AJ (1987) The arrhythmogenic transient inward current i_{T1} and related contraction in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 392:523-542.
8. Lin CI, Kotake H, Vassalle M (1986) On the mechanism underlying the oscillatory current in cardiac Purkinje fibers. *J Cardiovasc Pharmacol* 8:906-914.
9. 本郷賢一、小西真人、栗原 敏 (1992) 蛍光Mg指示薬によるラット単一心室筋細胞内Mg濃度の測定. 第69回日本生理学会予稿集 p179.
10. Ito T, Ehara T (1987) Mg inhibits voltage and tension oscillation but potentiates twitch in depolarized myocardium. *Am J Physiol* 253:H248-H255.

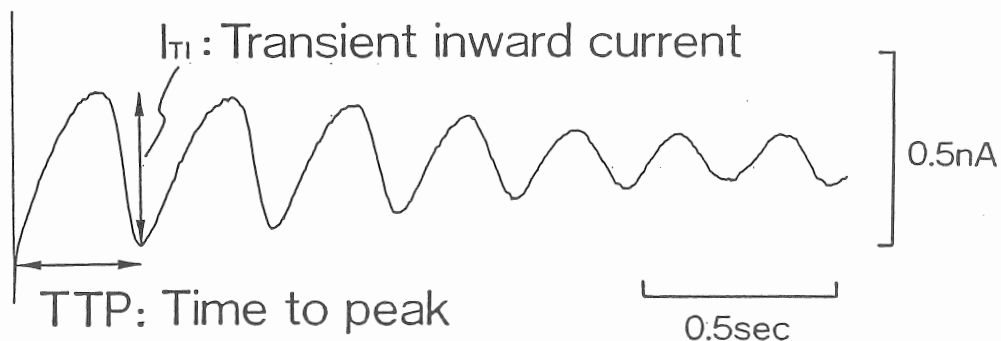


Fig. 1 Representative example of transient inward current (I_{T1}) in single ventricular cell of guinea pig. I_{T1} was induced by a 100-msec voltage step to +45mV from a holding potential (V_H) of -45mV. TTP (time to peak) indicates a time for 1st I_{T1} to attain to its peak current.

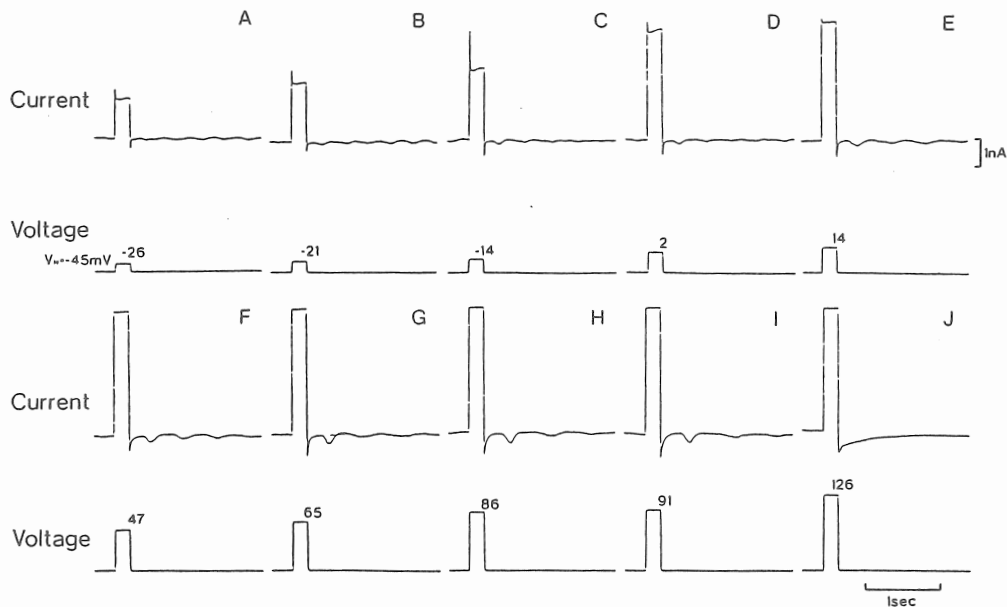


Fig. 2 Dependence of I_{T1} on the magnitude of the depolarizing pre-pulse. Membrane current (upper trace) and membrane potential (lower trace) are shown during depolarizations of 200 msec-duration to -26mV (A), -21mV (B), -14mV (C), +2mV (D), +14mV (E), +47mV (F), +65mV (G), +86mV (H), +91mV (I), and +126mV (J), from a V_H of -45mV. More positive depolarizations gave earlier and larger I_{T1} , except for I and J.

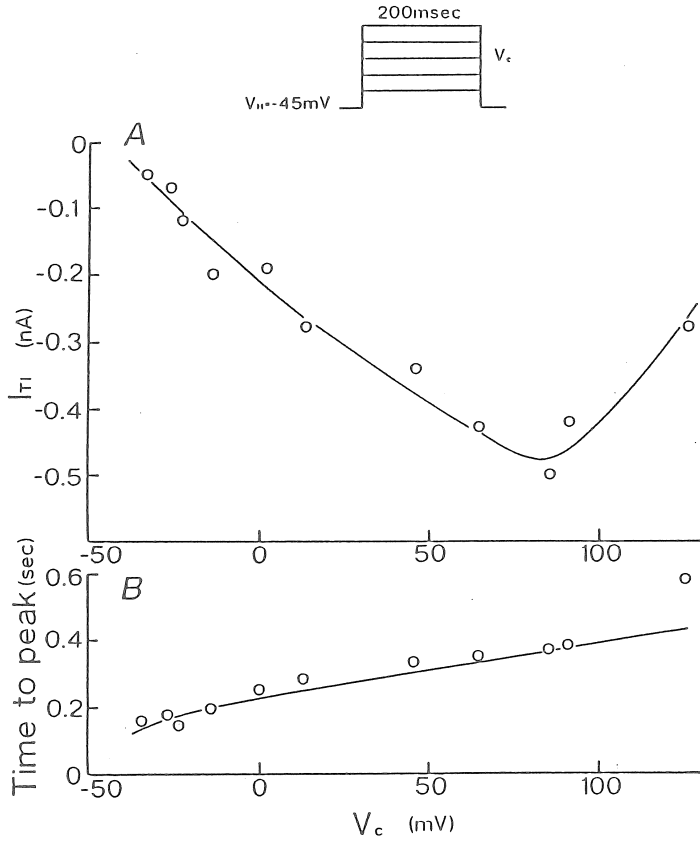


Fig. 3 Amplitude (in A) and time to peak current (in B) of I_{T1} shown in Figure 2 plotted against magnitude of depolarizing clamp step.

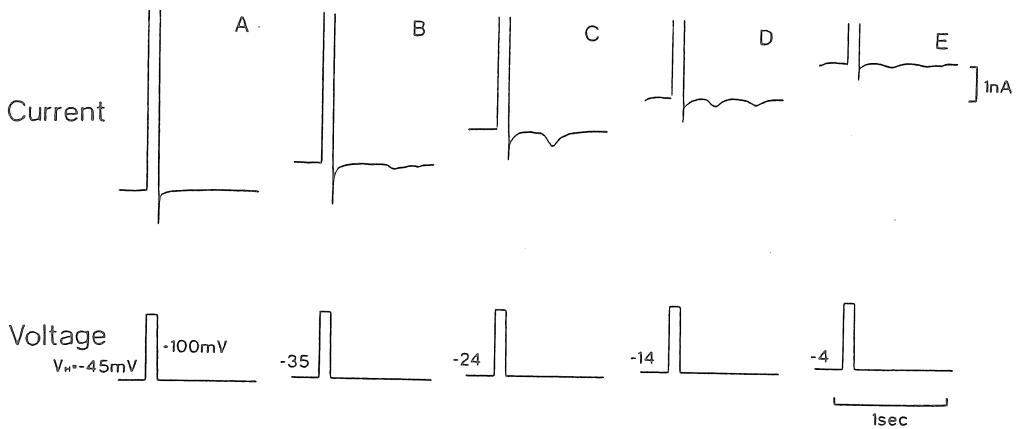


Fig. 4 Dependence of I_{T1} on the level of holding potential (V_H). I_{T1} was induced by a 100 msec -voltage step pulse of 100mV from a V_H of -45mV (A), -35mV (B), -24mV (C), -14mV (D) and -4mV (E). At $V_H = -24\text{mV}$, the largest amplitude of I_{T1} was obtained in this cell preparation.

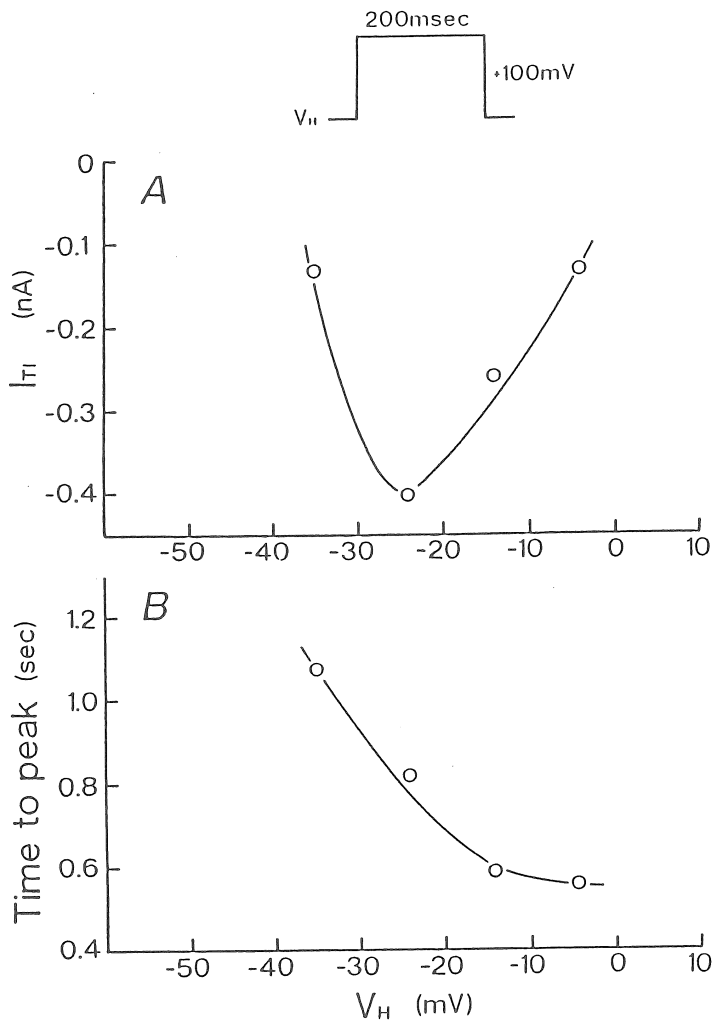


Fig. 5 Amplitude (in A) and time to peak current (in B) of I_{T1} shown in Figure 4 plotted against magnitude of depolarizing clamp step.

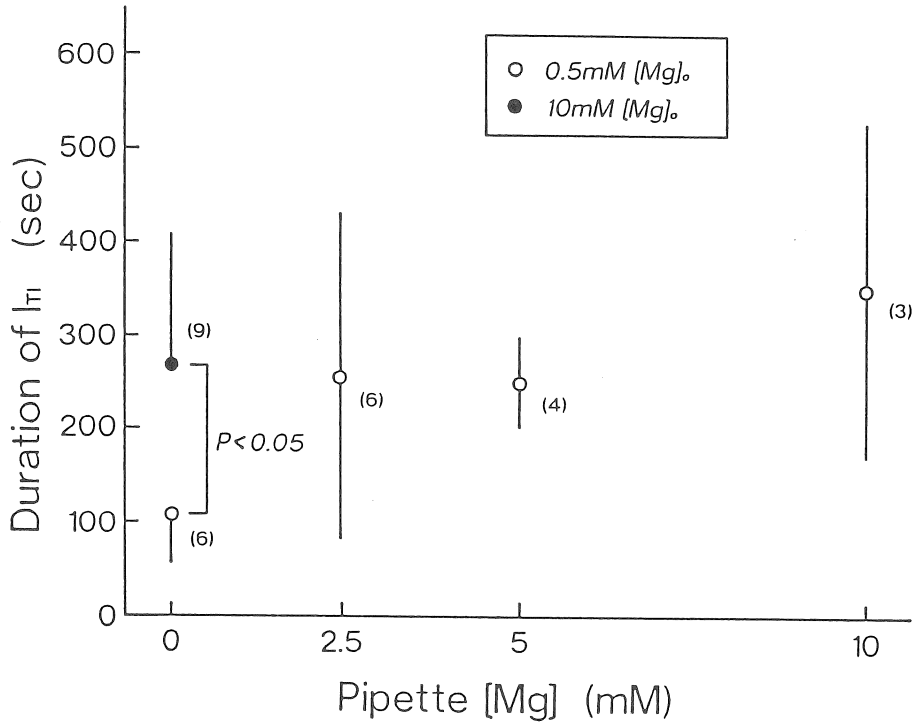


Fig. 6 Dependence of I_{T1} -persisting time (duration of I_{T1}) on Mg concentrations in a pipette solution. Open circles show the duration of I_{T1} in the condition of 0.5mM $[Mg]_o$ (extracellular Mg concentration), and a closed circle shows it in the condition of 10mM $[Mg]_o$. Number of cells in parentheses. Bars=SD.

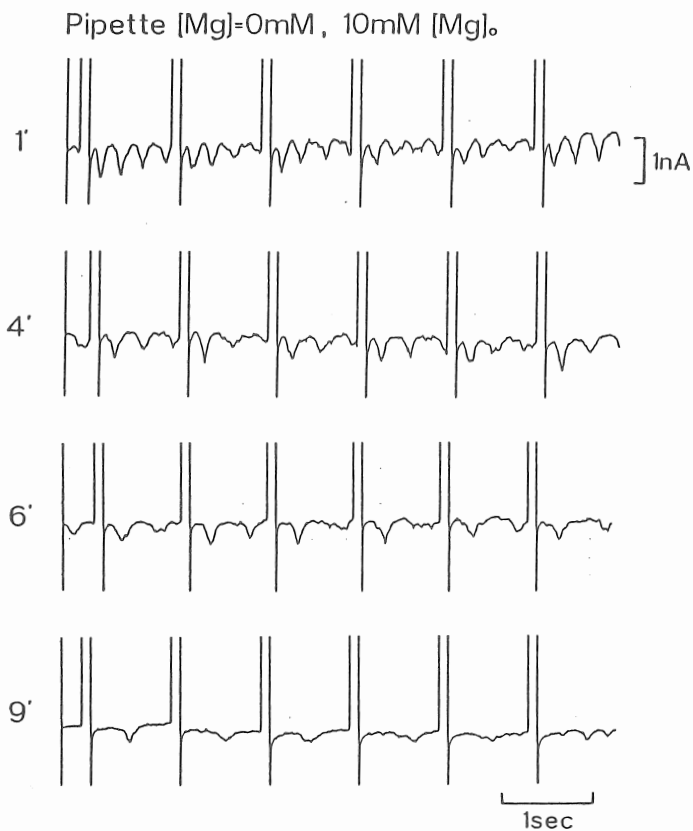


Fig. 7 Changes of I_{T1} in the condition of simultaneous application of 0mM Mg in pipette solution and 10mM Mg in superfusing solution. I_{T1} was induced by a 100msec-voltage step to +60mV from a V_H of -45mV.

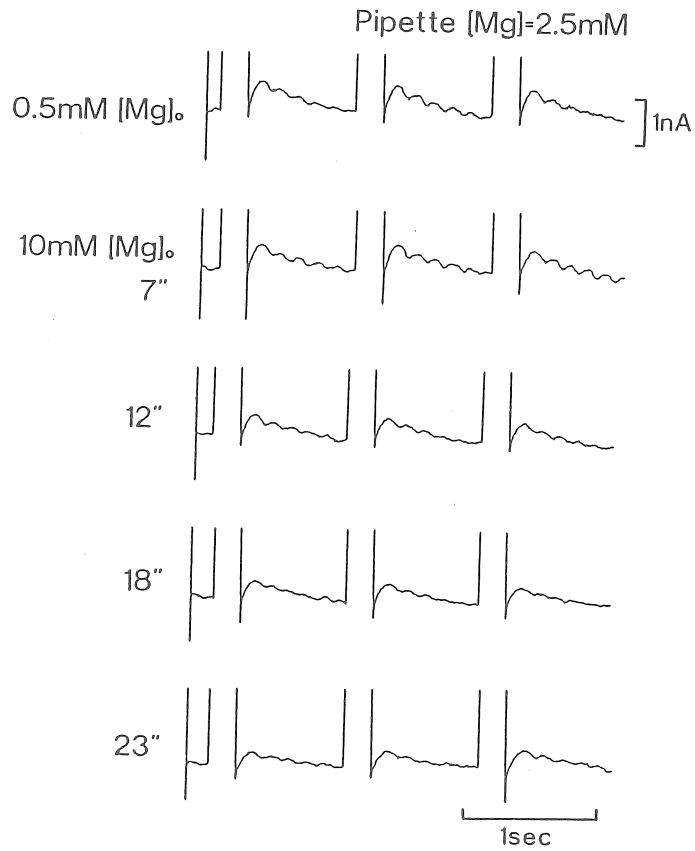


Fig. 8 Effect of addition of 10mM [Mg]_o on time course of changes of I_{T1}. I_{T1} was induced by a 200msec-voltage step to +55mV from a V_H of -40mV.

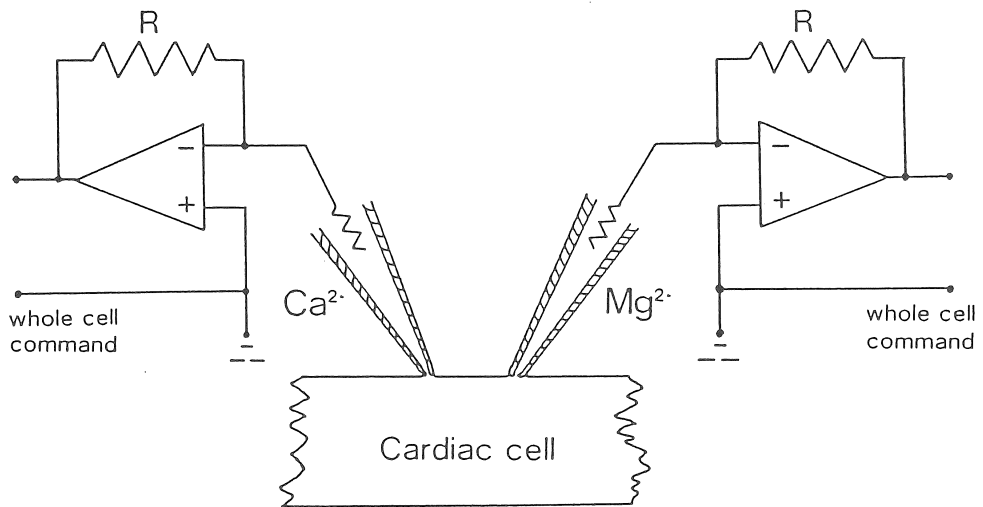


Fig. 9 Schematic diagram of the current measurement circuits using double-patch-pipettes. One pipette (left side in this figure) contains 0.7mM Ca, and the other one (right side), 10mM Mg.

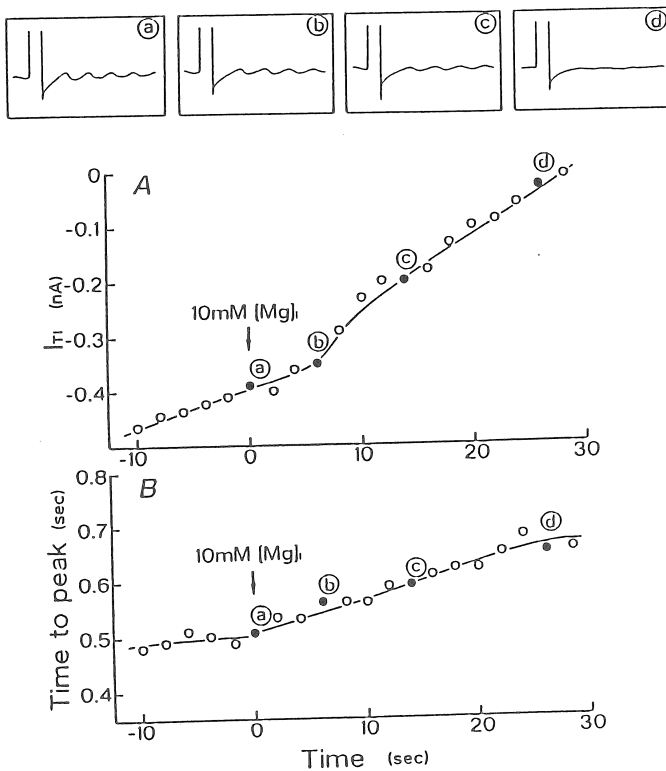


Fig. 10 Time course of changes of I_{T1} before and after addition of 10mM [Mg]. In A, a relationship between amplitude of I_{T1} and time is shown, and in B, a relation between time to peak current and time is shown. At downward arrows 10mM Mg was applied from a 2nd patch pipette. Actual I_{T1} data of a, b, c and d in A and B are shown as a, b, c, and d in top pannel.

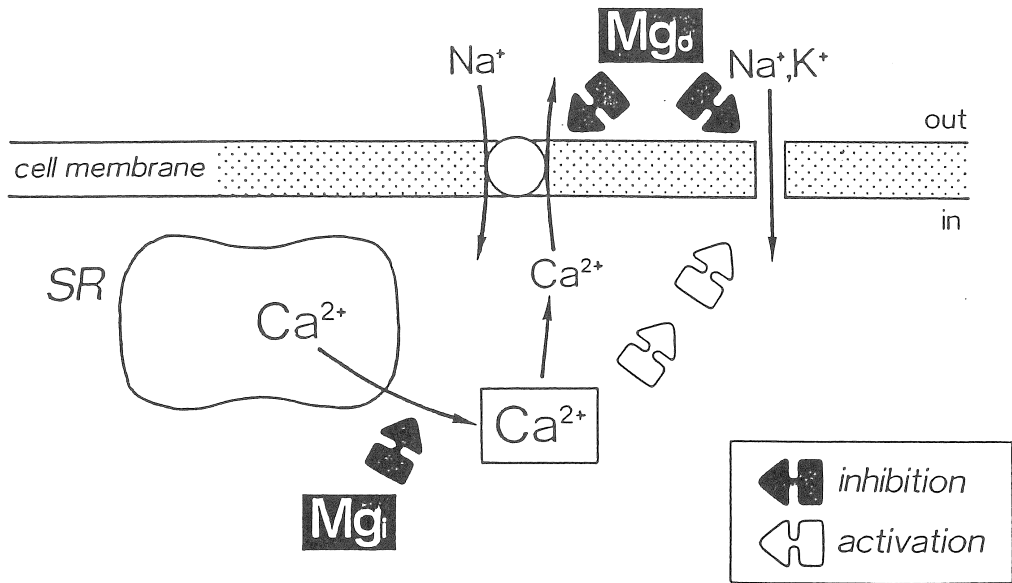


Fig. 11 Schematic illustration of antiarrhythmic activity of Mg in heart cells. In this figure, Mg_o , Mg_i , open and closed arrows show extracellular free Mg, intracellular free Mg, activation and inhibition, respectively.

No.92044

Antiarrhythmic efficacy of magnesium in single ventricular myocytes:
a study using an intracellular perfusion method

Masahiro Aomine, Keiko Fukuda

Department of Nutritional Physiology, Nakamura-Gakuen University, Fukuoka

Summary

The transient inward current, I_{T1} , which underlies triggered cardiac arrhythmias, is seen in conditions of Ca^{2+} overload, such as can be produced by exposure to cardiac glycosides or low K^+ concentration. Its dependence in intracellular Ca^{2+} is well established. The proposed mechanisms are a Ca^{2+} -activated non-specific channel and an electrogenic Na-Ca exchange process. In this study effects of magnesium (Mg) on the I_{T1} were investigated in isolated guinea pig ventricular cells using the whole-cell voltage-clamp techniques. I_{T1} was induced on repolarization after a depolarizing clamp step from a holding potential (V_H) of $-40\sim-45mV$, by use of a suction-pipette containing $0.7mM Ca^{2+}$. Mg^{2+} concentration of superfusing solution was $0.5mM$. The amplitude of I_{T1} increased with the magnitude of preceding voltage within a range of $-45mV\sim+80mV$, but above $+80mV$ the current decreased. I_{T1} was also dependent on levels of V_H ; when $200msec$ - and $100mV$ -depolarizing pulses from various V_H s were applied, I_{T1} had a reverse bell-shaped voltage-dependency, showing a maximum value at $-25mV$. When the Mg^{2+} concentration in a suction-pipette was changed from $0mM$ to 2.5 , 5 , and $10mM$, I_{T1} -persisting duration also varied. The duration was the shortest in the condition of $0mM Mg^{2+}$, but lengthened with a higher concentration of Mg^{2+} . Moreover, even in the condition of zero Mg^{2+} in the pipette, the duration markedly lengthened when Mg^{2+} concentration in the superfusate was increased to $10mM$. Generally I_{T1} was observed just before the cell death. This result suggested the pipette Mg^{2+} lengthened a survival time of the cell. The experiment using double suction-pipette also was conducted and supported the above data. These suggested that a mechanism underlying Mg's antiarrhythmic action is, at least, to suppress I_{T1} , possibly by decrease of intracellular free Ca^{2+} concentrations, and that its action may be done in both the outside and inside of the cell membrane.