

心筋Na電流の解析とそのモデル化

佐田 英明*・田中侯太郎**・蛭名 良雄**・伴 隆志*

Analysis and Modeling of Na Current in Cardiac Muscles

Hideaki SADA*, Kotaro TANAKA**, Yoshio EBINA** and Takashi BAN*

Abstract

The Na⁺ channel plays essential roles in initiation and conduction of action potential in a variety of excitable tissues including nerves, hearts and muscles. Na channels undergo activation and inactivation depending on the membrane voltage and time. Hodgkin & Huxley (H-H), early in 1950s, proposed a mathematical model to describe Na channel properties of the squid axonal membrane, based on voltage-clamp (V-C) study. For the next 3 decades since then, direct recording of the Na current by V-C method and hence the study of Na channel property have been hampered in cardiac tissues largely by the complicated geometry of the tissue. Recent electrophysiological studies using V-C method with patch-pipettes on dispersed single heart cells have demonstrated that the gating-kinetics of Na channels is much more complicated than predicted from the H-H model. To establish a new model which enables describing Na channel events in heart, we conducted V-C study in embryonic chick heart cells. In this preparation, we found pronounced differences in the inactivation and re-inactivation mechanisms from those in the axon, suggesting a presence of one conductive and two inactivated states among which voltage-dependent transitions were permitted (a cyclic reaction model). According to the model, we experimentally determined rate-constants of the reaction. We also found a delay in onset of inactivation as well as activation in voltage-clamped heart cells, and derived empirical equations for such delays in onset. Taken above together, we could faithfully reproduce the Na channel currents observed in heart cells under V-C conditions.

1. はじめに

生体膜にはチャンネルと呼ばれる小孔が存在し、ある条件のもとで特定のイオンに対して透過性となり、イオン電流を与える。Naイオン電流は心筋、神経、骨格筋などの組織で初期信号となる中心的な電流である。適当な大きさの電場を細胞膜間に印加するとチャンネルは開孔となりイオン電流が流れるが、開孔は一過性で、

Naイオンに対する透過性を徐々に失ってゆく(不活性化)。電場に対するイオン電流の挙動はコンダクタンス(g_{Na})で表される。このようなNaチャンネルのコンダクタンス変化を初めて定量的に記述したのはHodgkin & Huxley¹⁾(1952年、以下H-H)である。彼らはNa⁺イオン電流(I_{Na})をオーム式、 $I_{Na} = g_{Na}(V_m - E_{Na})$ により記述した。ここで V_m は細胞外を基準(0 mV)とした時の細胞内電位であり、 E_{Na} はNa平衡電位とよばれる定数である。彼らはヤリイカ巨大神経軸索の細胞内電位を種々の値に固定し、その時の I_{Na} を測定した(膜電位固定実験)。その結果をチャンネル開孔、閉鎖の過程は活性化ゲート(m パラメータ)と不活性化ゲート(h パラメータ)で

*山口大学医学部薬理学

**電気電子工学科

制御されるとし、 m や h の時間変化として g_{Na} を記述した。

$$g_{Na} = \overline{g_{Na}} \cdot m^k \cdot h \quad (1)$$

ここに $\overline{g_{Na}}$ は最大コンダクタンスを表わし、 k は m ゲートの個数を表わす。 m (不活性の場合は h) パラメータのとりうる範囲は、完全開孔状態で1、完全閉鎖状態で0、つまり $0 \leq m \leq 1$ (あるいは $0 \leq h \leq 1$) である。 m パラメータの数 k は3で最も良く合った。

一方、心臓組織では、心筋細胞の形態的複雑さのため、膜電位固定法によるNa電流記録は、H-Hの軸索標本での研究から30年を経ねばならなかった。膜電位固定法で記録された心臓組織のNa電流の活性化・不活性化機構ともH-Hのものとは違わないとする報告もある²⁾が、多くの研究結果がH-Hが記述したものより複雑であることを示している^{3-10a)}。

しかし、今日に至るまでのNa電流系に関する統一モデルは心筋については提出されておらず、そのモデル化は極めて有用である。著者らはヒヨコ胚心筋細胞を用いて広い電位範囲にわたる膜電位固定実験を基にして、心筋のNa電流ゲート機序を統一かつ定量的に取り扱うモデルを報告する^{10b)}。H-Hモデルを対照とした主たる変更点は以下の(1)~(3)である。(1)チャンネルの活性化カインेटクスは軸索でのものに類似していたため、H-Hの活性化ゲートと同じモデル式を用い、その速度定数値を心筋に合致するように実験的に決定した。(2)不活性化カインेटクスは完全に異なることがわかったため、新たな不活性化ゲートのパラメータ(C -パラメータ)を導入した。すなわち(1)式の代わりに

$$g_{Na} = \overline{g_{Na}} \cdot m^3 \cdot c \quad (2)$$

を導入する。不活性化ゲートに2種類のトランジェントな不活性化状態 (I_1, I_2) を仮定し、各状態 (c, I_1, I_2) 間相互に一次反応式の移行過程を仮定しその移行速度定数6種を実験的に決定した。(3)活性化及び不活性化開始前に‘おくれ時間’の存在とそれらの‘膜固定電位依存性’が実験的に確認された。おくれ時間と電位とを関係づける実験式を導いた。これらの改良の結果、以下述べるように、(2)式で心筋のNa電流を統一的に記述できることがわかった。

2. 方法

受精鶏卵から心臓を摘出し、単一心筋細胞として培養した。倒立顕微鏡ステージ上の実験槽内 (17°C) に培養心筋細胞を置き、ガラスピペットを用いた単細胞膜電位固定実験を行なった¹⁾。

Na⁺電流のみが記録されるよう、槽液(細胞外液)、

ピペット液(細胞内液)からK⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Mg²⁺などの他種イオンを除去した。電圧パルスとそれに対応するNa⁺電流をサンプリング周波数10~50kHzでA/D変換してコンピュータに取り込んだのち種々の解析を行なった。

3. 結果

3.1. Na電流と電位の関係

膜電位を維持電位(VH:-90mV)からより浅い電位(Vm)にステップ的に変化させると、Na電流は約-60mVより陽性電位域で観察され、電流の大きさはステップ電位値に依存する。急激に増加したNa⁺電流はやがて減衰してゆく(不活性化)。減衰前の「電流ピーク値 I_{Na} 」とVmをプロットすると(図1)、ステップ電位Vmが-60mV付近で流れはじめ、-20mV~-30mV付近でピークとなるが、その電位を越えた陽性電位領域では再び減少していく。約-60mV以下の深い電位では心筋細胞は不活性化状態にある。

3.2. 定常状態不活性パラメータ C_{∞}

不活性化ゲートの定常状態での開孔率 C_{∞} をみるため、十分に長いプレパルス(図2, V_1)を加え、プレパルス電位に相応した不活性化の割合をテストパルス(V_2)でみる。各 V_1 に対する定常状態の不活性化ゲートの開孔程度を反映したパルス電流が流れる。図2は最大のNa電流値で各Na電流を規格化したものを示す。この逆S字状曲線は、定常状態での「不活性化ゲート開孔度(C_{∞})の電位依存性」を示す。図中の実線はボルツマン関数、

$$C_{\infty} = 1 / [1 + \exp \{ (Vm - V_{half}) / s \}] \dots (3)$$

による近似であり、 V_{half} は $C_{\infty} = 0.5$ となる膜電位を示

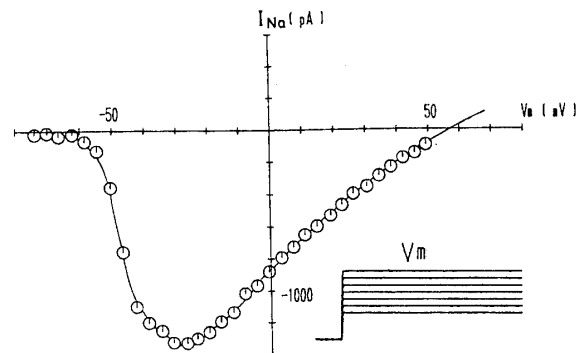


Fig 1. Current-voltage relation.

Plotted are peak currents against depolarized step-voltages V_m which are shown in inset.

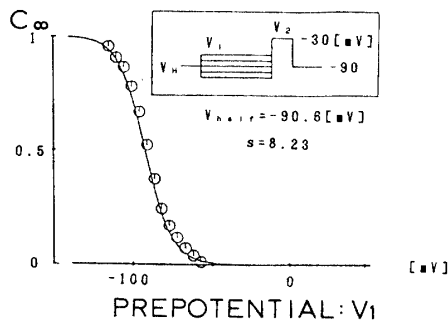


Fig. 2. Steady-state inactivation curve.

The normalized peak values of current are plotted against the amplitude of pre-pulse (V_2). Currents are elicited upon test-step (V_2) preceded by pre-pulse (V_1). The smooth curve is drawn according to Boltzmann Equation:

$$C = 1/(1 + \exp((V_m - V_{half})/s))$$

す。 V_{half} は平均値で、約 -87 mV であり、 s 値は約 $6 \sim 8$ mV であった。

3.3. 不活性化過程

3.3.1. 単一パルス法 (浅い電位領域の不活性化速度の決定)

Na電流がピークに達した後の減衰は不活性化ゲートの閉鎖過程を示す。その時間特性を見るため電流を経過時間に対して片対数プロットした(Fig.3A)。この時間経過は二箇の指数関数の和でよく近似できる。最小二乗誤差法 (LSQ法) によって図中に示したように速い成分と遅い成分の2つの時定数が得られる。

3.3.2. 2段パルス法 (深い電位領域の不活性化速度の決定)

図2に示したように、 $-100 \sim -60$ mV間の深い電位に於いては部分的な不活性化状態が生ずる。深い膜電位 (≤ -60 mV)での不活性化の経過を調べるため、定常的不活性化状態の極めて深い維持電位 (通常 $V_H: -90$ mV ~ -120 mV, 図2参照) から種々の大きさや時間幅 (D_1) のプレパルス (V_1) を与え、第2ステップ (V_2) によってそのゲートの不活性化率を見る (図3Bの挿図)。持続時間幅 (D_1) に対して、流れる電流のピーク値を片対数プロットした (図3B)。この電流ピーク値の包絡線はプレパルス電位における不活性化状態形成の経過を示し、やはり二箇の指数関数の和によく合致する。非線形最小2乗法でフィットさせると速い、遅いの2個の時定数が得られる。不活性化の開始にはおくれ時間がみられる (図3Bの点線)。

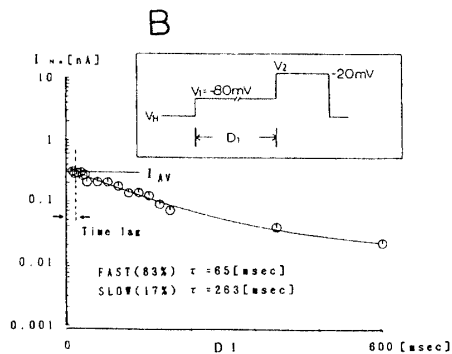
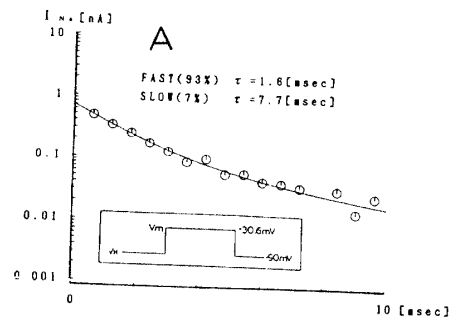


Fig. 3. Time course of inactivation parameters.

A: Plot of the current in decaying phase. Drawn is a curve obtained by the non-linear least square approximation method:

$$I_{Na} = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$$

B: Plot of the current I_{Na} as a function of the first-pulse duration (D_1). Note a delay in onset of inactivation.

3.3.4. 過渡的 (部分的) 不活性化状態から定常的不活性化状態への過程

二連パルスをその間隔 (ISI) を変えて加えると、最初のパルス (条件パルス, V_{cond}) に対応して電流が流れ (そのピーク値を I_{cond}) 部分的に不活性化された状態になるが、そこから元の定常的不活性化状態に移行する過程がみれる。すなわち2番目のパルス (テストパルス, V_{test}) に応じて流れる電流のピーク値 (I_{test}) が I_{cond} に近づく過程で示される。実験的に得られた比 (I_{test}/I_{cond}) を ISI に対して半対数グラフにプロットする (図4)。この時間経過はまた2箇の対数関数の和でよく近似できた。非線形最小2乗法によるフィッティングの結果速い成分と遅い成分の時定数が図に示したように求まる。定常状態不活性化への移行過程 (あるいは回復過程) の初期にも点線で示したようなタイムラグが認められる。

これらの時定数は、遅い、速いいずれの成分も条件

パルス長に影響されないが、各成分の関与の比率（寄与率）は条件パルス長に影響された（図なし）。すなわち、長い条件パルスの後の回復過程では遅い成分の関与が大きくなった。このことは、パルス長をさらに長くするとその長さに依存する一過性の不活性化状態が複数存在し、しかも定常状態でなく、それらの中で移行が起こりうることを暗示させる。

4. 不活性化過程

4.1. 不活性化モデルの定式化

3章で見たように不活性化過程、定常不活性化状態への回復過程のいずれでも2箇の指数関数の和で表された。これらの実験結果は、現在の実験範囲では2種類の中間的な不活性化状態I₁、およびI₂の存在を示唆している。そこで、ゲートの不活性化状態をCとすると図5のような「循環型モデル図」が描ける。これら3状態（I₁、I₂、C）間の相互移行速度定数（6種：k₁-k₆）を含む。これら3状態間相互移行は一次反応で記述されるものとする付録2に示したように連立一次微分方程によって表される。ここに再掲載する。

$$C(t) = C(t) + A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) \quad (4)$$

$$I_1(t) = I_1(t) + B_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + B_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) \quad (5)$$

$$I_2(t) = 1 - (C(t) + I_1(t)) \quad (6)$$

不活性化の程度を示すパラメータC(t)を実験的に得られる電流値の時間変化に非線形最小2乗法でフィットさせる事によって時定数が得られる。

4.2. 速度定数（k₁～k₆）の決定

Cのデータ（図2参照）よりホルツマン近似式（3）を導き、同式により解析の対象となる電位でのC値を求めておく。このCの変化を、3節の図3、4が得られた元の単パルス、二段パルス、二連パルスによる原電流値データと非線形最小二乗法でフィットさせると各k値が得られる。この時、I₁状態とI₂状態の変化がCの変化に含まれることに注意されたい。

ここで得られた6種類のk値を種々の膜電位についてプロットすると、膜電位の浅いところでは主にk₁、k₄、k₅が大きく、深い膜電位ではk₃、k₆が大きかった^{10b)}。各k値のデータ点数はそれぞれ275点であるが電位と平均した速度定数値間の関係を以下の実験式のように単一指数関数で近似し、AとBの値を表1に示した。

$$k = \exp \{ (V_m - A) / B \} \dots\dots (7)$$

4.3. 不活性化開始のタイムラグ

図3Bと図4に示されたように2段パルス、2連パ

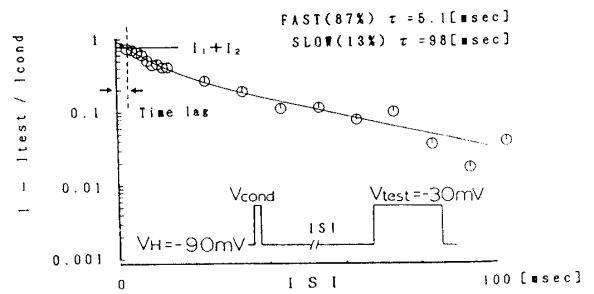


Fig.4. Time course of the recovery in inactivation parameter (re-inactivation). Abscissa is the interval of stimulus (ISI).

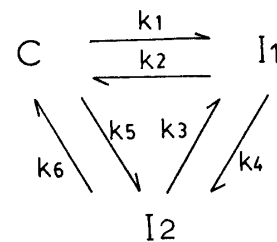


Fig.5. Cyclic inactivation model.

Transitions among three inactivation states (C, I₁, I₂) are controlled by 6 rate constants (K₁ - K₆).

ルスを印加した場合タイムラグが見られた。これらはある膜電位に対する不活性化状態への移行開始、定常的不活性化状態への回復化開始に「遅れ時間(タイムラグ)」が伴っている事を示している。種々の膜電位に対して遅れ時間を求める。得られた結果を図6に白丸で示した。この遅れ時間は膜電位(V_m)に対して(8)式のベル型の実験式でよく表せる。

$$\text{Time-lag} = 1 / [\exp \{ (V_m - A) / B \} + \exp \{ (V_m - C) / D \}] \quad (8)$$

LSEにより図の実曲線が係数A, B, C, Dを、A = -43.53, B = 10.10, C = -125.9, D = -21.74 (mV)と置くことによって得られた。

5. Naチャンネル活性化過程

Naチャンネルの活性化過程はmゲートの開口確率m (0 ≤ m ≤ 1)の時間変化で記述される。すでに序で述べたようにこのmはH-Hモデル¹⁾でのmと同じカインेटクスに従う。ここでは心筋膜のチャンネルに合うように実験的に決定する。m₀をmの初期値、m_∞を定常状態のm値、τ_mをチャンネル活性化経過の時定数とすると次

Table 1 k parameters

	A [mV]	B [mV]
k_1 [1/ms]	-18.45	13.51
k_2	-115.2	-6.887
k_3	-138.3	-8.210
k_4	67.65	31.53
k_5	130.8	18.79
k_6	-132.0	-7.148

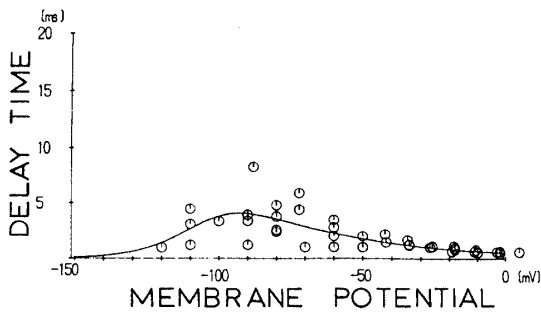


Fig.6. Bell-shaped voltage-dependence of the delay time in onset of inactivation.

式となる (付録1 参照).

$$m = m_{\infty} - (m_{\infty} - m_0) \exp(-t/\tau_m) \quad (9)$$

図7A(a)に示すように維持電位VHに脱分極電位(0)を加えると、電流が流れるのが観察される。これはNa電流(I_{Na})であるが、いったんピークに達した後減衰する。この減衰、すなわちmゲートの活性化過程(on kinetics)は(10)式のように外挿電流値(I_{Na}^*)とNa電流(I_{Na})との比で与えられる。

$$1 - (I_{Na} / I_{Na}^*)^{1/3} = \exp(-t/\tau_m) \quad (10)$$

式(10)の両辺の自然対数値を非線形最小2乗法でフィット近似させて開孔率mの時定数(τ_m)を決定した。なお、この解析により同時に「活性化の遅れ時間」も決定された。図7A(b)のように、深い膜電位から短い第1パルス電位 V_1 (-10mV, 1msec)を加えmゲートを完全に開孔させた後、直ちに過分極パルス V_2 (この例では-80mV)を与えると電流は増大した後、急速に減衰する。この減衰過程は脱分極パルス(V_1)で開いたゲートmの開孔過程(mチャンネルの脱活性化, off-kinetics)を示す。減衰過程を単一指数関数(その時定数を τ_m')で近似する。時定数(τ_m)が $\tau_m/3 = \tau_m'$ から得られる。これらの時定数は膜電位に依存する。時定数の膜電位依存性は図7Bに示される。これらの定数を付録1のパラメータを用いて τ_m , τ_m' を実験式で表す。

$$\alpha_m = A(V_m + B) / [1 - \exp\{(V_m + B)/C\}] \quad (11)$$

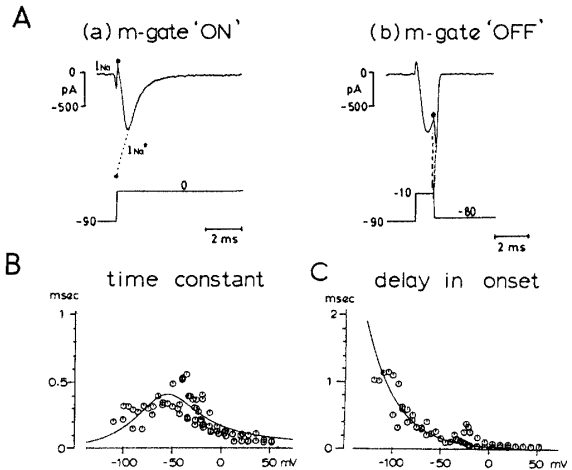


Fig.7. Activation kinetics.

A: Picture illustrating on- and off kinetics of m gate.

(a): The time course of original current I_{Na} elicited under applied depolarized step voltage. The curve of m parameter is defined by a normalized current by smoothly extrapolated current (I_{Na}^*).

(b): Current trace under inactivated step voltage of -80 mV after a depolarized short pulse voltage (-10 mV).

B: Time constant of activation parameter m time against m.

C: Delay time in onset against applied voltages.

$$\beta_m = \tau_m = D \cdot \exp(V_m/E) \quad (12)$$

ここに τ_m は $\tau_m = 1/(\alpha_m + \beta_m)$ から得られる。フィッティングの結果, A = 0.1218, B = 43.52, C = -13.76, D = 0.2084, E = -29.45 (mV) であった。

また同時に求まる「遅れ時間」の電位依存性は図7Cに示した。このタイムラグは次の単一指数関数の実験式

$$\text{Time-lag} = \exp\{(V_m - A)/B\} \quad (13)$$

で表せる。フィッティングの結果 A = -107.4, B = -31.55 (mV) となった。

6. 実験的に得られた速度定数値による心筋Naチャネルの各種ゲートパラメータのシミュレーション

6.1. 定常状態不活性パラメータ C_{∞}

決定された速度定数値($k_1 \sim k_6$)を用いて C_{∞} , $I_{1\infty}$, $I_{2\infty}$ 値と膜電位との関係を計算した。それらを膜電位に対してプロットした(図なし)。 C_{∞} を図2と比較するとシミュレーションでは、-120mVの深い膜電位では1.0

に近く、 -60mV 付近ではほぼ0となる逆S字型電位依存性を示し、よく合っていた。不活性化状態 I_2 は浅い膜電位ではほぼ1.0に、深い膜電位ではほぼ0となり C_∞ とは鏡像関係にある。すなわち浅い電位での定常状態からの不活性化は I_2 へ向かう。一方もう一つの I_1 は $-90\text{mV} \sim -80\text{mV}$ でピークを持つベル型の電位依存性となり、 C_∞ と I_2 の間隙を埋めている。

6.2. 不活性ゲートパラメータの時定数のシミュレーション

Cの時間変化は二つの指数関数の和として表せる(4)参照)。これらの時定数のシミュレーションの結果を膜電位に対してプロットした(図なし)。それぞれの時定数とも $-90 \sim -80\text{mV}$ をピークとするベル型の電位依存性を示し、互いにおよそ数倍異なる値を有し、実験結果や他者の報告ともよく一致した。

6.3. Na電流のシミュレーション

(1) 不活性ゲートのカインेटクスを決める6種の速度定数値(k値)、(2)活性化と(3)不活性化の遅延特性を示す実験式、(4)活性化カインेटクスを決める速度定数(α_m, β_m)の実験式の4種を用いて、単一パルス(維持電位を -120mV とし、第1パルス V_1 を $-70 \sim 80\text{mV}$ までステップ的に与えたとき)に対応して流れるNa電流を再構築した(図8A)。ただし、 E_{Na} 値 65mV 、 $\overline{g_{\text{Na}}}$ を 20nS とした。再構築Na電流データから得られる(1) $I_{\text{Na}} - V$ 特性、(2)ピーク電流到達時間-膜電位依存性、(3)Naコンダクタンス-膜電位依存性、(4)チャネル活性のゲートパラメータ m の定常状態でのグラフがをそれぞれB(a), (b), (c), (d)に示した。特に図8B(d)は、窓(Window)電流領域(交差付近領域)を示す為、 m_∞ と c_∞ を同一電位軸上に示した。これら(a)~(d)は著者らのデータのみならず、他者の報告する実験結果とも極めてよく一致する²⁻¹²⁾。

7. 考察

心筋の不活性化メカニズムを説明するためには2種類の中間的な不活性化状態が必要であった。これは、従来多くの人を用いてきた神経軸索でのH-Hモデル¹⁾とは異なっている。最近不活性化過程は単一指数関数よりも2つの指数関数の和でよりよく表わされるということが報告されている³⁻¹⁰⁾。数値的に見ると、遅い成分と速い成分の時定数は数倍~10倍の差があり^{4,10)}、不活性化過程は明確に単一指数関数で表せない。著者らは説明するため、2種類のトランジェントな不活状態(I_1 ,

I_2)を持つ状態(C)とが互いに連結したモデルを考え、その速度定数を直接実験的に決定した。

近年、いくつかの研究室で、細胞内をタンパク分解酵素で灌流するか¹³⁾、ある特定のアミノ酸に作用する物質(クロラミン-Tなど)で灌流する¹⁴⁾とトランジェントな不活性化状態は消滅するが、定常状態の不活性化パラメータ(H-Hでは h_∞ 、本モデルでは C_∞)にはほとんど変化がないことが報告された。これは、速い不活性化機序とは別の、定常状態の不活性化に関係した遅い不活性化の過程(又は状態)が存在していることを示唆する。上記の物質によって速い不活性化状態に関係し

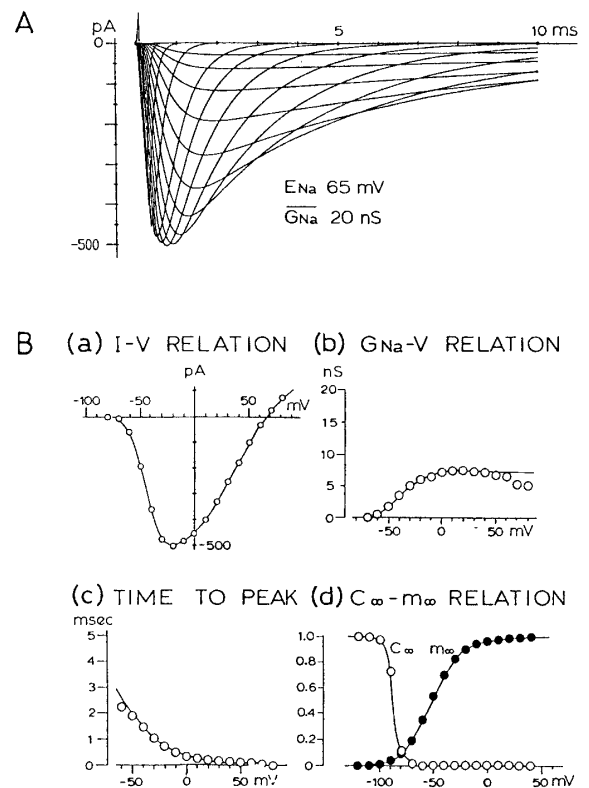


Fig.8
 A: Reproduction of the cardiac Na^+ current elicited upon step depolarization voltages in the single-pulse protocol.
 B: Other parameters obtained from the Na current calculation data in A.
 (a): Current-voltage relation.
 (b): Conductance (G_{Na}) vs. voltage (V_m). Calculated from $I_{\text{Na}} = G_{\text{Na}} (V_m - E_{\text{Na}})$
 (c): Delay time to peak current.
 (d): Steady state activation parameter (m) and steady-state inactivation parameter (C_∞). These are shown to demonstrate the relative positions of two parameters.

た機序のみ破壊されるのは、著者らの循環モデルで「C-I₁ルート」が破壊されたことで説明可能である。

本モデルに基づいて実験データの解析で求めた6種の速度定数($k_1 \sim k_6$)、活性化、不活性化、定常状態の不活性への移行に際しての時間遅れなどのパラメータを用いて、実験的に観察される2つの時定数と共に定常状態不活性のパラメータ(C_∞)を極めて正確に再現し得た。さらに、Na電流の時間経過をも正確に再現できた。他の研究者が報告してきた不活性ゲート(Cパラメータ)、そのゲートの定常状態への時定数^{5,8,10}、定常状態Cパラメータの膜電位性^{5,10,11}、I-V特性^{2,4,5,7,10,11}、電流ピーク到達時間^{6,11}、チャネル活性化パラメータの定常状態(m_∞)での特性^{2,3,11}、窓領域現象¹¹の実験結果と完全に一致した。

次の2点が再現できたことは本モデルの妥当性を支持する。(1) E_{Na} 付近の強い陽性電位領域ではNaチャネルコンダクタンスの線形性が失われ(図8B(b))整流性が生ずる。従来これは、細胞内 Mg^{++} が陽性電位域でNaチャネルブロックを生ずることによるとか¹⁶、 Na^+ イオン自身による負帰還的なNaチャネルブロックによる¹⁷ためとされてきたものである。(2)二連パルスによる定常状態不活性化の実験(図4)で、条件パルスの長さが長くなると、パルスがきれた後の過程が遅くなる⁵。この現象は1つの不活状態のモデル(例えばH-Hモデル)では説明ができない。

Hahn¹⁸はカエル骨格筋で、電位に依存する「活性化のタイムラグ」を示したが、心筋についての報告はない。我々の実験結果によると、活性化開始時のタイムラグは電位に依存しており、電位が陽性になるにつれ単調減少していく。その減少は単一指数関数で表されることがわかった。不活性化開始にタイムラグが存在することは心筋でも既に何人かの研究者が報告し^{8,19}、定常状態不活性へのタイムラグについても、心臓組織^{5,8,10,19}やカエル骨髄神経²⁰で報告されている。これらのうちBenndorf & Nilius⁸、Chiu²⁰、Follmer等⁵、Benndorf¹⁹はその電位との関係についても検討し、今回の著者の結果に合致した報告を行っている。これらのタイムラグは、電位に対してベル型の依存性を示し、著者らのシミュレーションでよく再現できた。

以上で得られた著者らの膜電位固定実験によるNaチャネルの電流 I_{Na} は、

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} \cdot m^3 \cdot C \cdot (V_m - E_{Na}) \quad \dots\dots (14)$$

で与えられる。トランジェントな I_1 と I_2 は上式にあらわには見えないが、 $C + I_1 + I_2 = 1$ の条件式からCの時間変化に寄与する。 E_{Na} は、実験に用いる溶液Naイオン濃度の関数であり、著者らの場合ほぼ+65

mVである。 \bar{g}_{Na} 値は主として細胞の大きさで決まり(20~50 nS)、著者らの場合、およそ30 nSである。

今後心筋細胞において新たに明確にしなければならないことの1つは、チャネルカイネティクスの温度依存性である。異なったいくつかの温度で実験を行い、より生理的体温に近い温度でのカイネティクス特性を知る必要があろう。

参考文献

- 1) Hodgkin, A.L. and Huxley, A.F.: The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol. (Lond.)* **116**:497-506, 1952
- 2) Seyama, I. and Yamaoka, K: A study of the electrical characteristics of sodium currents in single ventricular cells of the frog. *J. Physiol.* **401**: 257-275, 1988
- 3) Brown, A.M., Lee, K.S. and Powell, T.: Sodium current in single rat heart muscle cells. *J. Physiol.* **318**: 479-500, 1981
- 4) Clark, R.B. and Giles, W.: Sodium current in single cells from bullfrog atrium: voltage dependence and ion transfer properties. *J. Physiol.* **391**:235-265, 1987
- 4) Follmer, C.H., Eick, R.E.T. and Yeh, J.Z.: Sodium current kinetics in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* **384**:169-197, 1987
- 6) Hanck, D.A. and Sheets, M.F.: Time-dependent changes in kinetics of Na^+ current in single canine cardiac Purkinje cells. *Am. J. Physiol.* **262**:H1197-H1207, 1992
- 7) Gold, M.R. and Strichartz, G.R.: Acute effects of repetitive depolarization on sodium current in chick myocytes. *Am. J. Physiol.* **260**: H1810-H1818, 1991
- 8) Benndorf, K. and Nilius, B.: Inactivation of sodium channels in isolated myocardial mouse cells. *Eur. Biophys. J.* **15**: 117-127, 1987
- 9) Kirsch, G.E. and Brown, A.M.: Kinetic properties of single sodium channels in rat heart and rat brain. *J. Gen. Physiol.* **93**:85-99, 1989
- 10a) Sakakibara, Y., Wasserstrom, J.A., Furukawa, T., Jia, H., Arentzen, C.E., Hartz, R.S. and Singer, D.H.: Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes. *Circulation Res.* **71**:535-545, 1992

10b) 結果の一部を次の文献に報告した. 田中, 佐田, 蛭名, 伴: ヒヨコ心筋 Na チャネルの不活性化機構の新しいモデル, 第7回生体・生理工学シンポジウム論文集, **E P E S ' 9 2**, 37-42, ('92).

11) Sada, H., Kojima, M. and Sperelakis, N.: Fast in ward current properties of voltage-clamped ventricular cells of embryonic chick heart. *Am. J. Physiol.* **255**: H540-553, 1988

12) Benndorf, K., Boldt, W. and Nilius, B.: Sodium current in single myocardial mouse cells. *Pflugers Arch.* **404**:190-196, 1985

13) Zilberter, Y.I. and Motin, L.G.: Existence of two fast inactivation states in cardiac Na channels confirmed by two-state action of proteolytic enzymes. *BBA*1068:77-80, 1991

14) Wang, G., Dugas, M., Armah, I. B. and Honerjager, P.: Interaction between DPI201-106 enantiomers at the cardiac sodium channel. *Molec. Pharmacol.* **37**: 17-24, 1990

15) Mitsuiye, T. and Noma, A.: Exponential activation of the cardiac Na⁺ current in single guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* **453**: 261-277, 1992

16) Albitz, R., Magyar, J. and Nilius, B.: Block of single cardiac sodium channels by intracellular magnesium. *Eur. Biophys. J.* **19**:19-23, 1990

17) Fahlke, C. and Ruppersberg, J.P.: Saturation effects and rectifier properties of sodium channels in human skeletal muscle. *Europ. Biophys. J.* **16**: 307-312, 1988

18) Hahn, R.: Na activation delays and their relation to inactivation in frog skeletal muscle. *J. Membrane Biol.* **118**:233-242, 1990

19) Benndorf, K.: Patch clamp analysis of Na channel gating in mammalian myocardium: Reconstruction of double pulse inactivation and voltage dependence of Na currents. *Gen. Physiol. Biophys.* **7**: 353-378, 1988.

20) Chiu, S. Y.: Inactivation of sodium channels: Second order kinetics in myelinated nerve. *J. Physiol.* **273**:573-596, 1977

付録 1

H-Hモデルによる不活性化(hパラメータ)と活性化パラメータ(mパラメータ)の計算法:

h-ゲートの開放状態の確率をhとすると閉鎖状態は

(1-h)となる. hの開放速度定数を α_h , 閉鎖速度定数を β_h とすると, hの経過(dh/dt)は

$$dh/dt = (1-h)\alpha_h - h\cdot\beta_h \dots\dots\dots(1.1)$$

定常状態(t→∞)では

$$h_\infty = \alpha_h / (\alpha_h + \beta_h) \dots\dots\dots(1.2)$$

上記微分方程式の解は, hの初期値をh₀として

$$h = h_\infty - \{(h_\infty - h_0) \exp(-t/\tau_h)\} \dots\dots(1.3)$$

ここで

$$\tau_h = 1 / (\alpha_h + \beta_h) \dots\dots\dots(1.4)$$

τ_h, h_∞ とも実験的に決定できる(例:図2,3). よって式(1.1)(1.3)より α_h, β_h の各電位毎の値を得ることができる. 種々の電位で α_h, β_h を求めたのち, 各電位毎の α_h, β_h の値を与えるような実験式を作る(i.e. $\alpha_h = f_1(V_m), \beta_h = f_2(V_m)$)ことで, 電位(V_m)が与えられれば, α_h, β_h が判り, 式(1.2)よりその V_m でのhを知ることができる.

活性化ゲート(m-ゲート)も同様の方法で解析する. ただしm³とした時が最もよく実験結果を説明できた.

付録 2

速度定数値による不活性化状態の数式化

チャネルの不活性化ゲート(C-ゲート)はC, I₁またはI₂の何れかにあるので, これらの状態を確率で表すと C+I₁+I₂=1 と表せる. 更に, それぞれの状態間の移行は一次反応式にしたがうものと仮定する. 本文の図5の定数(K₁~K₆)を用いて, 次の連立微分方程式を得る.

$$dC/dt = -k_1C + k_2I_1 - k_5C + k_6I_2 \dots\dots(2.1)$$

$$dI_1/dt = k_1C - k_2I_1 + k_3I_2 - k_4I_1 \dots\dots(2.2)$$

$$dI_2/dt = -dC/dt - dI_1/dt \dots\dots(2.3)$$

式(2.1)~(2.3)をラプラス変換を用いて解くと, C, I₁, I₂は以下に示す時間関数として表される.

$$C = C_\infty + A \exp(-t/\tau_1) + B \exp(-t/\tau_2) \dots\dots(2.4)$$

$$I_1 = I_{1\infty} + C \exp(-t/\tau_1) + D \exp(-t/\tau_2) \dots\dots(2.5)$$

$$I_2 = 1 - C - I_1 \dots\dots(2.6)$$

ここで, C_∞及びI_{1∞}はそれぞれC, I₁の定常状態での値である. また, A~DはC, I₁の初期値で決まる定数である. 2個の時定数 τ_1, τ_2 は反応速度定数で次のように与えられる.

$$\tau_1 = 2 / (a - d^{1/2}) \dots\dots(2.7)$$

$$\tau_2 = 2 / (b + d^{1/2}) \dots\dots(2.8)$$

ただし, $d^{1/2} = a^2 - 4b \geq 0$ で, a, bは次式である.

$$a = k_1 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_6$$

$$b = (k_1 + k_5 + k_6)(k_1 + k_3 + k_4) - (k_2 - k_6)(k_1 - k_3)$$

(平成5年4月15日受理)