

# ヒヨコ胚培養心筋細胞での Na チャネルの活性・不活性化パラメータの加齢による変化

藤田 健\*・蛭名 良雄\*\*・佐田 英明\*\*\*  
歳谷 英夫\*・中島 一樹\*\*・伴 隆志\*\*\*

## Age-related Changes in Activation and Inactivation Kinetics of the Na Channels in Cultured Heart Muscle from Chick Embryo

Takeshi FUJITA, Yoshio EBINA, Hideaki SADA,  
Hideo TOSHITANI, Kazuki NAKAJIMA and Takashi BAN

### Abstract

To investigate age-related changes in Na<sup>+</sup> channel kinetics, ventricular cells obtained from chick embryos of various developmental stages were voltage-clamped with patch pipettes, and the Na<sup>+</sup> current (I<sub>Na</sub>) together with the membrane potential (V<sub>m</sub>) were recorded (16°C). The data stored in VTR as PCM signal was A/D converted and analyzed in terms of Hodgkin-Huxley model. I<sub>Na</sub> underwent the activation/inactivation sequence in response to change in V<sub>m</sub>. While the activation kinetics little changed throughout embryogenesis, the inactivation kinetics was altered with embryonic development. Yet, the density of Na<sup>+</sup> channel per unit membrane area also was drastically increased with development. We discuss the present voltage-clamp data in comparison with those obtained from different tissues and/or animal species.

### 1. 序 論

Na<sup>+</sup>電流は心筋組織内のインパルスの伝導に直接関与している。このNa<sup>+</sup>電流は細胞膜表面上に存在するNa<sup>+</sup>チャネルを介して流れ、このNa<sup>+</sup>チャネルは膜電位に感応した開（活性化）／閉（不活性化）を繰り返す。成体のNa<sup>+</sup>チャネルの諸特性が発生成長のどの段階で形成されるかを調べることはイオンチャネルの原始的機構についての知見を得るのに重要と考えられる。現在まで、マウスなど哺乳動物の単離心筋細胞を用いたNa<sup>+</sup>チャネルの電気生理学的特性の研究がいくつか

行なわれてきた<sup>1)~5)</sup>。しかし加齢に伴うこれらの電気特性の変化の研究には、その試料の取扱い易さ、単離の容易さなどでヒヨコ胚は便利である。最近 Fujii らはヒヨコ胚単離心室筋細胞のNa<sup>+</sup>チャネルの電気生理学的特性を調べている<sup>3)</sup>。しかし、それらの電気的特性のパラメータを得るための解析方法についてはまだ十分検討していない。

本研究では3日令、10日令及び17日令のヒヨコ胚から得た単離心室筋細胞のNa<sup>+</sup>チャネルの電気生理学的特性について詳しく検討したのでその結果をここに報告する。全ての実験は温度を16±1°Cに統一して行うとともにモデル式への近似で実験結果を定量化することにより、加齢に伴うチャネル機構の変化を調べ他の標本との比較検討を行った。

\*大学院電気工学科

\*\*電気電子工学科

\*\*\*山口大・医・薬理学教室

2. 方 法

1) 標本及び培養手技

受精鶏卵を孵卵器中で種々の期間孵卵させた。鶏卵は通常21日目に孵化する。孵化期間中 3日令 (早期), 10日令 (中期), 17日令 (晩期) のヒヨコ胚から心臓を摘出し、単一心筋細胞として培養したものを実験標本とした。

滅菌した培養液 (M-199に仔牛血清を加えたもの) と共に心筋細胞を炭酸ガス培養器中 (37°C) で0.5~1日間培養し、適宜、膜電位固定実験に用いた。

2) 実験

倒立顕微鏡のステージに設置した溶液灌流型の実験槽内に培養標本を置いた。実験槽の側に配置したチューブ内に希望の温度となるよう温度調節した液体を送ることにより標本槽内温度を一定にした。標本槽内温度を約16°Cに維持したまま、ガラスピペットを用いたホールセルクランプ法 (細胞全体の膜を電位固定する) を行なった。

バス液の組成は NaCl(140), CsCl(5.4), HEPES (10), MgCl<sub>2</sub>(1.1), CaCl<sub>2</sub>(1.8), glucose(5.55) であり, NaOH で pH を 7.4に調節した。ピペット液の組成は CsCl(20), CsOH(124), CaCl<sub>2</sub>(1), HEPES(10), EGTA(10), ATP-Na<sub>2</sub>(5/10), L-Aspartic Acid(93) とし, pH を CsOH で7.1~7.2に調節した。単位は全て (mM) である。

パルス発生器から電圧パルスをもつ増幅器を介して細胞に与え、その電圧パルスとそれに対応するイオン電流を増幅器を通しオシロスコープでモニターすると同時に P C Mプロセッサ (SHOSHIN EM 株式会社 SONY PCM-DP16改) を介して、V T R (日立 MASTACSZ41) に記録した。ここからの処理はオフラインで行なった。必要に応じて V T R に記録したデータを再び P C Mプロセッサを介して、12bit で A Dコンバータ (カノープス電子株式会社 ADX-98E) により、PC9800コンピュータに取り込んだ。システム図を Figure 1 に示す。

3) 細胞膜表面積の算出

測定される Na<sup>+</sup>電流値は細胞膜の表面積に比例するため、細胞膜の表面積で規格化した。細胞膜は膜面積あたり常に一定 (1μF/cm<sup>2</sup>) の容量を有することを仮定して、測定される容量値から逆に細胞の表面積を知ることができる。そこで、Amplitude 10mV (イオン電流

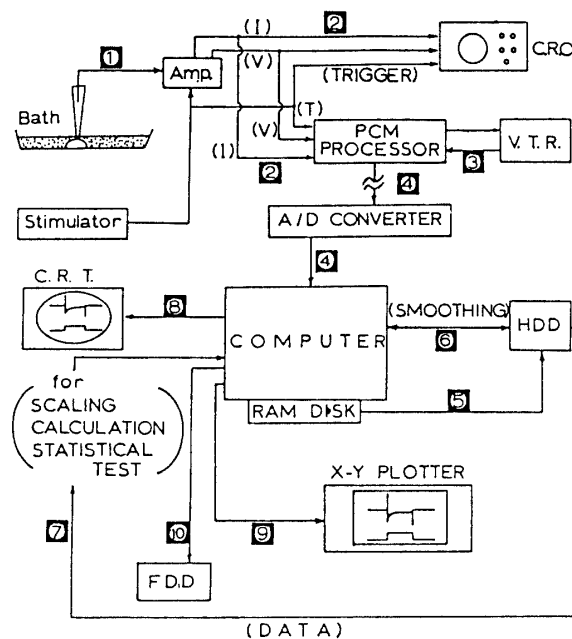


Figure 1 Schematic illustration of measurement and analysis system.

を発生させない電位) の単一パルスを与え、細胞膜を破碎する前後で得られる電流波形の差から細胞膜キャパシタンスを求めた。すなわち破碎前ではピペット電極のガラスのキャパシタンス (C<sub>glass</sub>) のみがまた破碎後は (C<sub>glass</sub>) と膜のキャパシタンス (C<sub>m</sub>) が合わさったものが得られると考えられ、これらの差より C<sub>m</sub> を求めた。

4) 容量性電流の除去

記録された膜電流 (I<sub>m</sub>) にはイオン電流 (I<sub>ion</sub>) のみでなく漏れ電流 (I<sub>leak</sub>) と容量性電流 (I<sub>c</sub>) も含まれており、パルスの立ち上がり時のような過渡期では大きな容量性電流が流れる。Na<sup>+</sup>電流の活性化の速度は速く、しばしば容量成分上に重なる。したがってイオン電流 (I<sub>ion</sub>) のみを計測するには膜電流から容量性電流を除去する必要がある。そこで実験中時折、Na<sup>+</sup>電流が流れない程度の電位領域 (10mV Amplitude) の単一パルスを十数発与えて容量性電流のみを発生させ、その平均をとる。膜のキャパシタンス (C<sub>m</sub>) は各々の細胞に固有のものであり、容量性電流の大きさは電圧の時間変化 (dV/dt) に依存しており、時定数は変わらない。そこで細胞に与えるパルスの電圧に応じた容量性電流の算定量 (I<sub>c</sub> = C<sub>m</sub> · dV/dt) を、実際に観測される膜電流から差し引くとイオン電流 (I<sub>ion</sub>) のみが得られ

ることになる。

5) Na<sup>+</sup>チャンネルのゲートモデル

Na<sup>+</sup>チャンネルの開閉は膜の内外間の電位差の程度で起こる。そこでHodgkin等の場合と同様に細胞膜の脱分極で、急速に開口するゲート(活性化ゲート, mゲート)とこれに比べ緩やかに閉鎖するゲート(不活性化ゲート, hゲート)の2種類のゲートを仮定し、各々が独立に働くモデルを考える。

各膜電位(V<sub>m</sub>)に対するNa<sup>+</sup>電流(I<sub>Na</sub>)は、オームの法則より次式で表わされる。

$$I_{Na} = g_{Na} (V_m - E_{Na}) \quad (1)$$

但し, E<sub>Na</sub>: Na<sup>+</sup>の平衡電位(膜内外のNa<sup>+</sup>濃度で決定される。)

g<sub>Na</sub>: Na<sup>+</sup>チャンネルのコンダクタンス

Na<sup>+</sup>チャンネルのコンダクタンスg<sub>Na</sub>の最大値をḡ<sub>Na</sub>と示すとg<sub>Na</sub>は

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} h m^3 \quad (2)$$

と表わせる。

mゲートの開口確率m(0 ≤ m ≤ 1)の時間経過は、m<sub>0</sub>をmの初期値、m<sub>∞</sub>を定常状態に於けるmの値、τ<sub>m</sub>を活性化経過の時定数とすると次式が得られる。

$$m = m_{\infty} - (m_{\infty} - m_0) \exp(-t/\tau_m) \quad (3)$$

hゲートについても同様に考えることができ上式においてmとhを置き換えることにより得られる。したがってh<sub>0</sub>をhの初期値、h<sub>∞</sub>を定常状態に於けるhの値、τ<sub>h</sub>を不活性化経過の時定数とすると、hゲートの開口確率h(0 ≤ h ≤ 1)は

$$h = h_{\infty} - (h_{\infty} - h_0) \exp(-t/\tau_h) \quad (4)$$

と表わせる<sup>6)</sup>。

6) パルスプロトコール

膜電位依存的な定常状態活性度及び不活性度を求めるために、Figure 2に示したような単一パルス(A)と二段パルス(B)の2種類のパルスを用いた。

二段パルス: プレパルス(V<sub>1</sub>)を変化させ、hゲートを最大に活性化(h=1即ち、開放状態にしておく)させた状態から完全に不活性化した状態の間(h=0)の種々な程度の不活性化の定常状態をつくる。mゲートはhゲートと比較して素早く移動することから、V<sub>1</sub>の直後に与えるテストパルス(V<sub>2</sub>)でmゲートを完全に開くと、hゲートのV<sub>1</sub>における定常状態の開口確率を反映した電流が流れる。このNa<sup>+</sup>電流のピーク値を計測しピークI<sub>Na</sub>とおく。これを各V<sub>1</sub>におけるピークI<sub>Na</sub>のうちの最大値(I<sub>Na-max</sub>)で規格化すると、V<sub>1</sub>で定常状態に達したh(h<sub>∞</sub>, 即ち式(4)でt→∞とおく)が得られる。

単一パルス: hゲートのみが開いているような維持電位(V<sub>hold</sub>)から任意の脱分極電位(V<sub>m</sub>)にステップ的に変化させる。V<sub>hold</sub>ではmゲートは閉じており、各V<sub>m</sub>で流れるNa<sup>+</sup>電流のピークをピークI<sub>Na</sub>とおく。V<sub>m</sub>を脱分極方向へ上げて行くと、ピークI<sub>Na</sub>値は内向きに次第に増大して最大値(I<sub>Na-max</sub>)に達した後減少し始め、ゼロとなった後その方向を外向きに逆転させて更

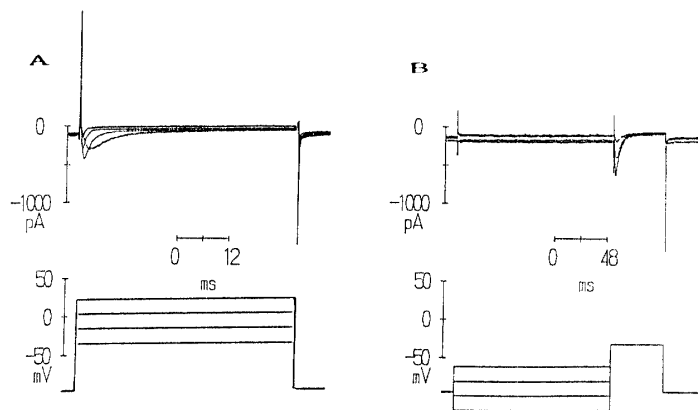


Figure 2 Pulse protocol. (A) Single pulse. The amplitudes of the voltage steps was increased from V<sub>hold</sub>(= -90mV). The duration of pulse was 50 ms. (B) Double pulse. 150 ms -prepulses of varying amplitudes were interposed prior to test steps of a fixed voltage (usually to -30mV). The peak of currents in response to test steps were measured. The holding potential(V<sub>hold</sub>) was -90mV.

に増加して行く。電流ピーク値が内向きから外向きへと方向を逆転させるときの  $V_m$  を、逆転電位 ( $V_{rev}$ ) と呼び  $V_m$  が  $Na^+$  の平衡電位 ( $E_{Na}$ ) と一致した状態である (式 (1) 参照)。これら ( $V_m$ ,  $V_{rev}$  及び  $I_{Na}$ ) を式 (1) に代入すると、各  $V_m$  での  $Na^+$  チャンネルのコンダクタンスのピーク ( $g_{Na}$ ) が求まる。 $g_{Na}$  に関して S 字型の飽和曲線 (式 (11) 参照) を仮定した。この飽和値 (最大値) は  $m$  ゲートが完全に開いた状態 ( $m=1$ ) に対応すると考えられ、 $g_{Na} = \bar{g}_{Na} \cdot h_0$  となる。したがって、 $V_{hold}$  での  $h_\infty$  (つまり  $h_0$ ) を予め求めておくと、チャンネルコンダクタンスの最大値 ( $\bar{g}_{Na}$ ) が求まる。 $\bar{g}_{Na}$  は定数であり、 $h_0$  も  $V_{hold}$  が一定であるから定数となるので、ピーク  $g_{Na}$  は  $m_\infty^3$  を反映していることになる。従って、式 (2) より  $m_\infty$  が得られる。

7) 不活性化経過の時定数 ( $\tau_h$ ) の算出

実験的に観測される  $I_{Na}$  の減衰過程はモデルでは  $h$  ゲートの閉鎖の経過に対応する。この減衰経過は理論的には式 (5) で表わされるが、 $t \rightarrow \infty$  での電流値の見積り方により時定数に差違が生ずる。つまり  $h$  ゲートが完全に定常状態になっていない場合には電圧パルスの終わりに対応する電流値 (EC) を  $t \rightarrow \infty$  での電流値と仮定できない。そこで理論式に当てはまるように  $t \rightarrow \infty$  での電流値を推定した。そしてこの減衰過程において  $I_{Na}$  の初期値  $I_0$  及び時定数  $\tau_h$  を求めるために、

$$I_{Na} = I_0 \exp(-t / \tau_h) \quad (5)$$

とおき、線形最小二乗法で  $I_0$  及び  $\tau_h$  を推定した。

8) 活性化経過の時定数 ( $\tau_m$ ) の算出

式 (1) 及び (2) より、観測されたイオン電流波形は

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} h m^3 (V_m - E_{Na}) \quad (6)$$

と表わされ、7) で求めた不活性化経過を Figure 3 に示すように電圧パルスの立ち上がりまで外挿する。この外挿した電流 ( $I_{Na}^*$ ) は

$$I_{Na}^* = \bar{g}_{Na} h (V_m - E_{Na}) \quad (7)$$

と表わせる。したがって式 (6) と (7) との比を取ると、

$$\begin{aligned} I_{Na} / I_{Na}^* &= m^3 \\ &= (m_\infty - (m_\infty - m_0) \exp(-t / \tau_m))^3 \quad (8) \end{aligned}$$

となり、電流の不活性成分  $h$  が除かれ活性化成分のみとなる。

ここで、 $m_\infty = 1$ ,  $m_0 = 0$  となるような実験条件を選ぶと

$$\begin{aligned} I_{Na} / I_{Na}^* &= (1 - \exp(-t / \tau_m))^3 \\ \therefore 1 - (I_{Na} / I_{Na}^*)^{1/3} &= \exp(-t / \tau_m) \quad (9) \end{aligned}$$

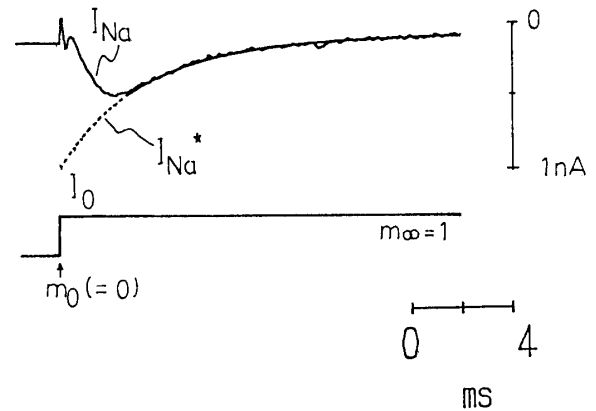


Figure 3 The inward (downward deflection) sodium current after a subtraction of the capacitive transient (continuous trace,  $I_{Na}$ ) and a presumed current trajectory ( $I_{Na}^*$ ) obtained from the extrapolation of a decaying stage of the current (broken trace).

となる。

実験から求める  $1 - (I_{Na} / I_{Na}^*)^{1/3}$  の経過は実際、線形指数関数によく近似できた。よって、上式 (9) で線形最小二乗法を用い  $\tau_m$  を推定した<sup>7)</sup>。

3. 結 果

1) 加令に伴う  $Na^+$  電流密度の増加

維持電位を約  $-90mV$  とし、単一パルスを細胞に与える。各電位に対して正味の  $Na^+$  電流を求め、細胞膜の表面積でこの電流値を規格化する。3 種の日令胚の心筋細胞で得られた代表例を Figure 4(A) に示す。

単位膜面積あたりの最大電流密度の平均値は 3 日令で約  $25 (\mu A / cm^2)$ , 10 日令で約  $70 (\mu A / cm^2)$ , 17 日令では約  $100 (\mu A / cm^2)$  となり、これらをまとめて Figure 4(B) に示す。

2) 不活性化のカイネティクス

3 種類の日令胚の各膜電位に対する不活性化経過の時定数 ( $\tau_h$ ) を Figure 5 に示す。

$\tau_h$  は 3 日令から 10 日令にかけて約 1/2 に減少し、10 日令から 17 日令にかけて再び約 1/2 倍となり、加令に伴い不活性化速度の増加が示唆された。

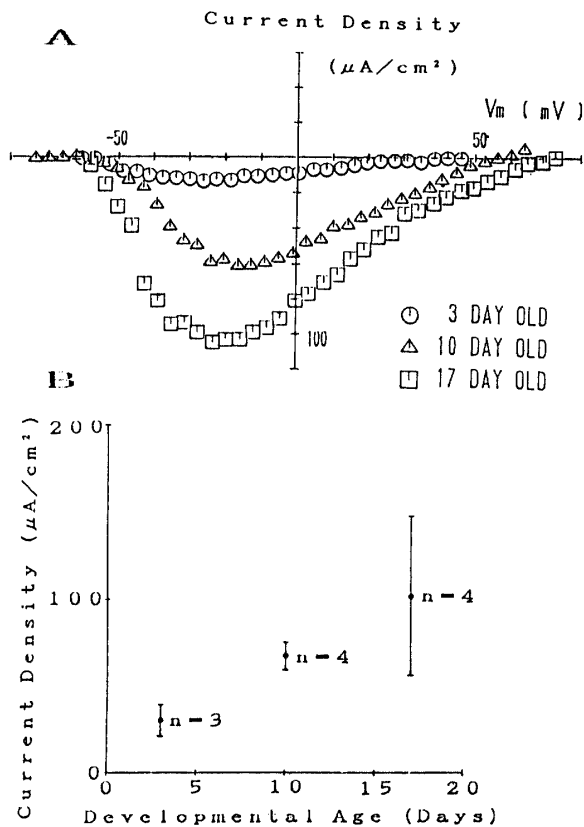


Figure 4 Increase in  $I_{Na}$  of different ages. (A) Typical current-voltage relations of 3-, 10- and 17-day-old chick embryonic heart cells. The peak of currents (ordinate) in response to voltage steps ( $V_m$ , abscissa) is plotted. Plotted are the current values normalized with repeat to cell membrane capacitance ( $C_m$ ).  $V_{hold} = -90mV$ . (B) Increase in Na current with development age the current density (mean  $\pm$  SD ordinate) is plotted as a function of embryonic stage (abscissa).

3) 活性化のカイネティクス

3種類の日令胚の各膜電位に対する活性化経過の時定数 ( $\tau_m$ ) を Figure 6 に示す。

これらの結果からは活性化の速さについては3種類の日令胚の間に有意な差はみられなかった。

4) 定常状態におけるhゲートの開口確率  $h_\infty$

$h_\infty$  を求めるために維持電位を約  $-90mV$  とし、二段パルス細胞に与える。各プレパルス ( $V_1$ ) における  $Na^+$  電流のピーク ( $I_{Na}$ ) を読み取り、その最大値 ( $I_{Na-max}$ )

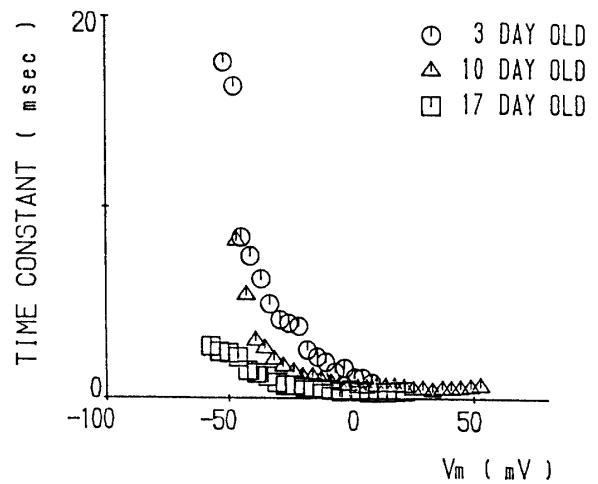


Figure 5 Representative voltage-dependence of the inactivation time constant. Plotted are the time constant of inactivation (ordinate) as a function of  $V_m$  (abscissa), obtained from a 3- (circle), 10- (triangle), and 17- (square)-day-old embryonic heart cells. The earlier the embryonic stage, the slower the inactivation proceeded.

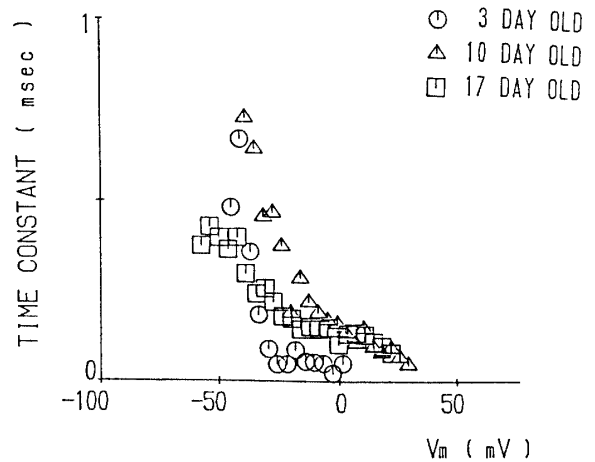


Figure 6 Representative voltage-dependence of the activation time constant. Plotted are the time constant of activation (ordinate) as a function of  $V_m$  (abscissa), obtained from a 3- (circle), 10- (triangle), and 17- (square)-day-old embryonic heart cells.

で規格化すると、 $h_0 = h_0^* (I_{Na} / I_{Na-max})$  となる。ここで  $h_0$  (即ち  $V_1$  における  $h_\infty$ ) はボルツマン関数

$$h_\infty = 1 / [1 + \exp\{(V - V_{half}) / S\}] \quad (10)$$

で近似される。

但し、 $V_{half} : h_\infty = 0.5$  となる電位

S : Slope factor

実験結果を上式に関し最小二乗法でフィットさせ、 $h_0^*$ を推測した。以上の結果を Figure 7 に示す。  
(● : 3日令胚, ▲ : 10日令胚, ■ : 17日令胚)

$h_\infty$ の電位依存性を規定する2つのパラメータ  $V_{half}$  と S を実験により求め、結果を Table 1 に示した。これより3日令と10日令との間には有意な差はみられなかつ

Table 1 Developmental changes in  $h_\infty$  parameters (mean  $\pm$  SD)

Age	$V_{half}$ (mV)	S (mV)	N
3	-82.4 $\pm$ 5.19	11.3 $\pm$ 2.40	3
10	-85.2 $\pm$ 6.77	13.3 $\pm$ 2.86	4
17	-97.2 $\pm$ 0.94	7.58 $\pm$ 0.36	4

Table 2 Developmental changes in  $m_\infty$  parameters (mean  $\pm$  SD)

Age	$V_{half}$ (mV)	S (mV)	N
3	-51.9 $\pm$ 5.20	-7.18 $\pm$ 1.10	3
10	-45.2 $\pm$ 3.33	-8.56 $\pm$ 0.55	4
17	-54.8 $\pm$ 7.76	-7.46 $\pm$ 0.83	4

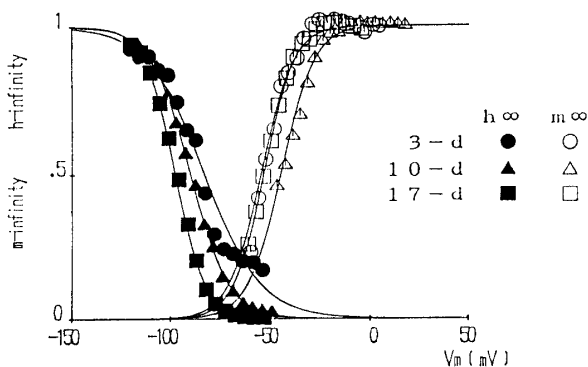


Figure 7 Steady-state inactivation ( $h_\infty$ ; filled symbols) and activation ( $m_\infty$ ; open symbols) of  $I_{Na}$  of 3-, 10- and 17-day-old chick embryo.

たが、3日令と17日令との間及び10日令と17日令との間には  $V_{half}$  の有意差がみられた。

5) 定常状態における m ゲートの開口確率  $m_\infty$ 。

$m_\infty$  は以下の手順で求めた。まず、1) で得られた電流-電圧特性から、各  $V_m$  での  $Na^+$  チャンネルのピークコンダクタンス ( $g_{Na} = \bar{g}_{Na} h_0 m_\infty^3$ ) を求めた。ここで、 $g_{Na}$  の最大値 ( $g_{Na-max} = \bar{g}_{Na} h_0 m_\infty^{*3}$ ) で規格化すると  $m_\infty = m_\infty^* (g_{Na} / g_{Na-max})^{1/3}$  となる。ここで  $m_\infty$  をボルツマン関数

$$m_\infty = 1 / [1 + \exp\{(V - V_{half}) / S\}] \quad (11)$$

で近似した。

但し、 $V_{half} : m_\infty = 0.5$  とした膜電位

S : Slope factor

最小二乗法により、 $m_\infty^*$  を推測し、その結果を Figure 7 に示す。

(○ : 3日令胚, △ : 10日令胚, □ : 17日令胚)

$m_\infty$  の電位依存性を規定するパラメータ  $V_{half}$  と S を実験により求め、結果を Table 2 に示した。これより  $m_\infty$  については3種類の日令胚の間には有意な差はみられなかつた。

#### 4. 考 察

加令に伴い単位膜面積あたりの電流密度は3日令から10日令にかけては約3倍に増加し、10日令から17日令にかけて更に約1.5倍に増加した。つまり「細胞膜の単位面積当たり  $Na^+$  チャンネル個数」の加令に伴う増加が示唆される。

不活性化速度は3日令から10日令にかけて約2倍に増加し、10日令から17日令にかけて再び約2倍となった。一方、活性化速度には3種類の日令胚の間に有意な差はみられなかつた。

$m_\infty$  の電位依存性に3種類の日令胚の間に有意な差はみられなかつた。 $h_\infty$  の電位依存性では差がみられた。すなわち3日令及び10日令間では殆ど変わらないが、17日令ではその電位依存性が陰性電位方向に移動していた。この理由を少し考察してみる。

$m_\infty$  と  $h_\infty$  曲線の交点付近の電位領域では  $m_\infty$  と  $h_\infty$  のいずれも0でないので、この電位領域 (以下「窓領域」と定義する) では定常状態になっても常に弱い内向きの電流が流れ続けることを意味する。よって、この窓領域と細胞の膜電位が一致すれば持続的内向き電流による脱分極が生じ、自動能に寄与する。実際、幼若な (3日令の様に若い) 胚では自動能がみられるが、このような胚の膜電位が実際にこの窓領域に近いことと

関係があることを示唆している。即ち、幼若な胚心筋では $h_{\infty}$ の電位依存性が陽性電位領域にあることで自動能を生じ、胚の成長と共にそれが陰性電位方向に移動して、安定化してゆくと考えれば説明できる。

実験では $h_{\infty}$ を規定するパラメータの一つである Slope factor は3日令と10日令との間には有意な差はなく、3日令と17日令との間及び10日令と17日令の間では有意差がみられた。しかし、加齢に伴い不活性化速度の増加の事実より、3、10日令胚のような早期のものでは不活性化速度が遅く、実験に用いたような長さのプレパルス期間内に $h$ が完全に定常状態( $h_{\infty}$ )となっていない可能性がでてきた。そこでプレパルスの長さを変えることにより、 $h_{\infty}$ の電位依存性を規定する2つのパラメータ  $V_{half}$ と Slope factor に変化が生ずるかどうかが17日令胚を標本として20°Cで実験を行なった。

プレパルスの長さ(Duration-1)を30, 70, 150または300msecの4種類に設定した時の $V_{half}$ および Slope factor を求めた。結果を Table 3 に示した。

実験結果より何れの長さのプレパルスでも $V_{half}$ に変化はみられなかったが、Duration-1を小さくすると Slope factor 値はプレパルスが短くなるにつれて増加した。これは不活性化速度が遅い幼若胚では、短いパルス中に $h$ ゲートが維持電位の時の値からテスト電位での定常状態の値にまで完全に移行するに至らず、維持電位を反映した $h_{\infty}$ が観測されるためであると考えられる。即ち、プレパルスの電位が維持電位に比べて脱分極にあれば開孔度は高められ、逆に過分極にあれば低く見積られる。この結果、 $h_{\infty}$ の電位依存性は広い電位帯に跨ることとなる。従って3日令と17日令の間及び10日令と17日令の間に Slope factor に有意差がみられたのはこのことも原因と考えられる。おそらく、 $h_{\infty}$ の電位依存性を規定するパラメータである Slope factor の加齢に伴う変化はあっても僅かであろう。

他の標本についてホールセルクランプ法で行われた他者の研究との比較を Table 4 にまとめた。尚、不活性化及び活性化の速度として( )内に示した2種の

膜電位に於ける値を掲げた。また Fujii 等の活性化の速度は電圧パルスの立ち上がりからイオン電流がピークになるまでの時間(TTP)で代用した。

ヒヨコ胚心筋標本を用いた Fujii 等の研究によれば、2日令から7日令にかけ加齢に伴い電流密度は約8倍に、不活性化の速さは約2倍になるが、活性化の速さには加齢に伴う顕著な変化はみられなかったという<sup>3)</sup>。

Fujii 等の研究結果と我々の実験結果とを比較すると電流密度、 $m_{\infty}$ 及び $h_{\infty}$ の電位依存性で顕著な違いがみられる。一般に実験温度が高いと電流密度は劇的に大きくなり、不活性化及び活性化の速度は増加することが知られている。これを考慮すると我々と Fujii 等と差違には両者の実験温度差が影響していることが示唆される。この実験温度の各パラメータに対する影響を他の例でみてみよう。

例えば、Murray 等は大きなピペットを使う cell-attached patch 法を用いモルモットの心室筋細胞で、温度変化に伴う $Na^+$ チャンネルのカイネティクスの変化について報告している<sup>4)</sup>。それによると実験温度を16°Cから26°Cに上昇させると、 $m_{\infty}$ の電位依存性は陽性電位方向に8 mV 移動し、 $h_{\infty}$ の電位依存性は17mV 陽性電位方向に移動する。この事実を我々の場合に当てはめ、我々と Fujii 等の間の実験値の差を加齢が共通の3日令について検討する。 $h_{\infty}$ の $V_{half}$ は我々の研究(実験温度16°C)では-82.4mV となり、Fujii 等(実験温度22°C)は-79.1mV で、温度差(6°C)を考慮するとこの差が約3 mV と云うのは小さ過ぎる。一方、 $m_{\infty}$ の $V_{half}$ は我々の研究では-51.9mV で Fujii 等のものは-30.0mV であるから実験温度差に比べ、両者間の $V_{half}$ の差は大き過ぎる。従って、Murray 等の結果を考慮すればこれらの差は実験温度よりも他の実験条件の差に起因すると考えられる。

Pröbstle 等はヒト(成人)の骨格筋細胞を使い $Na^+$ チャンネルのカイネティクスについての報告を行った<sup>5)</sup>。それによればヒトの骨格筋細胞ではTTXの感受性の違いによりTTXに対し低い感受性を示す幼若型チャンネル(Juvenile channel)とTTX-sensitiveなAdult channelという2種類の $Na^+$ チャンネルが存在する。 $m_{\infty}$ の電位依存性はこの2種類の $Na^+$ チャンネル間に顕著な違いがみられないのに対し、 $h_{\infty}$ の電位依存性はJuvenile channel に比べ Adult channel は $V_{half}$ は陰性方向にあり、Slope factor は小さい。つまり、成長するに従って Adult channel が増加し、 $h_{\infty}$ の電位依存性は陽性方向に移動する。

これは我々がヒヨコ胚単離心室筋細胞で得た $h_{\infty}$ の $V_{half}$ は3日令及び10日令間では殆ど変わらず、その後

Table 3 Relation between Duration-1 and  $h_{\infty}$  parameters

Duration-1(msec)	$V_{half}$ (mV)	S(mV)
30	-90.5	17.8
70	-91.1	12.6
150	-90.6	8.2
300	-89.4	6.3

Table 4. Bibliographic comparison of voltage-clamp data for  $I_{Na}$  obtained from different tissues and/or animal species

Preparations	Temp. (°C)	$[Na^+]_o/[Na^+]_i$ (mM)	$V_H$ (mV)	I-Density ( $\mu A/cm^2$ )	$\tau_h$	$\tau_m, TTP$	$h_\infty$ (mV)		$m_\infty$ (mV)	
					ms (mV)	ms (mV)	$V_{half}$ S	$V_{half}$ S		
Frog ventricle	15	113.5/10	-80	10-20	7.1/3.1 (-40) (0)	9.4/1.0 (-40) (0)	-73	6.3	-	-
Mouse ventricle	22	52.5/13	-100	180	5/0.8 (-50) (0)	0.8/0.15 (-50) (0)	-76	6.3	-57.9	-4.3
Human myoball										
Juvenile channels	24	130/-	-135	-	1.8/0.4 (-40) (10)	0.6/0.1 (-40) (10)	-86.0	10.2	-33.9	-5.7
Adult channels	24	130/-	-135	-	2.3/0.4 (-40) (10)	0.6/0.1 (-40) (10)	-65.9	5.6		
Chick embryo ventricle										
Fujii et al.										
3 day-old	22	143/15	-80	114	6.8/0.7 (-40) (0)	-	-79.1	7.2	-30.0	-6.5
7 day-old	22	143/15	-80	219	2.8/0.7 (-40) (0)	1.6/0.5 (-40) (0)	-86.4	8.5	-32.8	-6.9
Present study										
3 day-old	16	145/10	-90	25	10.7/1.0 (-40) (0)	0.7/0.1 (-40) (0)	-82.4	11.3	-51.9	-7.2
10 day-old	16	145/10	-90	67	5.1/0.8 (-40) (0)	1.0/0.2 (-40) (0)	-85.2	13.3	-45.2	-8.6
17 day-old	16	145/10	-90	102	1.8/0.5 (-40) (0)	0.5/0.1 (-40) (0)	-97.2	7.6	-54.8	-7.5

17日令にかけてその電位依存性が陰性電位方向に移動した」という結果とは一致しない。またヒトの骨格筋細胞ではTTXの感受性の違いによりNa<sup>+</sup>チャンネルは幼若型と成人型の2種類に分類されるが、ヒヨコの心筋ではNa<sup>+</sup>チャンネルはTTXの感受性に日令による差はないと考えられている<sup>9)</sup>。よってこれらの差は動物種の相違と云うよりむしろ臓器種(心筋と骨格筋)の違いに起因しているであろう。

5. まとめ

今回の研究で得られた結果を以下にまとめる。

- (1)細胞膜の単位面積当たりNa<sup>+</sup>チャンネル個数の加令に伴う増加、(2)不活性化速度の加令に伴う増加が示唆された。(3)活性化速度には3日令、10日令及び17日令胚の間に有意な差はみられなかった。(4)不活性化ゲートの開口確率の電位依存性においては、3日令及び10日令間では殆ど変わらず、その後17日令にかけてその電位依存性が陰性電位方向に移動した。(5)活性化ゲートの開口確率の電位依存性は3種類の日令胚の間に有意な差はみられなかった。(6)不活性化速度

は3、10日令胚のような早期のものでは遅いため、実験に用いるパルスの長さが短いと完全に定常状態とならない。それ故Duration-1が短いとV<sub>half</sub>の値は変化しないがSlope factorの値が増加する。従って3日令と17日令との間および10日令と17日令との間にSlope factorの有差がみられたのはこのためであると考えられる。よって加令に伴い不活性化ゲートの開口確率の電位依存性を規定するパラメータSlope factorには変化は生じない可能性が強いことを指摘した。

最後に他種属、特に哺乳類の心筋のNa<sup>+</sup>チャンネルの電気生理学的性質と鳥類心筋のNa<sup>+</sup>チャンネルのそれとの間に本質的な違いが存在するのか、それとも今回の研究で認められた特徴は個体発生時期の差を反映したものを示しているのかは今後検討すべきものと思われる。また孵化後(ヒヨコ~ニワトリ)の標本を用いたNa<sup>+</sup>チャンネルカイネティクスの研究は未だ殆ど行なわれておらず、興味ある課題である。

参考文献

- 1) Benndorf, K., W. Boldt, and B. Nilius. Sodium-current in single myocardial mouse cells.



- Pflügers Arch. 404: 190-196, 1985.
- 2) Seyama, I., and K. Yamaoka. A Study of the electrical characteristics of sodium currents in single ventricular cells of the frog. *J. Phys.* 401: 257-275, 1988.
  - 3) Fujii, S., Ayer, R.K., Jr., DeHaan, R.L. Development of the Fast Sodium Current in Early Embryonic Chick Heart Cells. *J. Membrane Biol.* 101: 209-223, 1988.
  - 4) Katherine T. Murray, Takafumi Anno, Paul B. Bennett, and Luc M. Hondeghem. Voltage clamp of cardiac sodium current at 37°C in physiologic solutions. *Biophys. J.* 57: 607-613, 1990.
  - 5) T. Pröbstle, R. Rüdell, and J. P. Ruppertsberg. Hodgkin-Huxley parameters of the sodium channels in human myoballs. *Pflügers Arch.* 412: 264-269, 1988.
  - 6) 北里 宏: 「興奮性膜の一般生理」第一版, 南江堂 (1976) P101-113
  - 7) Ogata, N., Narahashi, T. Block of sodium channels by psychotropic drugs in single guinea-pig cardiac myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 97: 905-913, 1989.
  - 8) Marcus, N.C., Fozzard, H. Tetrodotoxin Sensitivity in the Developing and Adult Chick Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13:335-340, 1981.

(平成2年10月15日受理)