

家兔房室結節細胞の電気生理学的多様性: Fast Pathway, Slow Pathway との関連

Electrophysiological Heterogeneity of Rabbit Atrioventricular Node Cells: Possible Relationship to Fast and Slow Pathways

佐藤 伸之
羽瀨 義純*¹
田中 秀央*¹
川村祐一郎
菊池健次郎

Kenneth W. SPITZER*²
Wayne R. GILES*³

Nobuyuki SATO, MD
Yoshizumi HABUCHI, MD*¹
Hideo TANAKA, MD*¹
Yuichiro KAWAMURA, MD
Kenjiro KIKUCHI, MD, FJCC
Kenneth W. SPITZER, PhD*²
Wayne R. GILES, PhD*³

Abstract

Catheter ablation has been applied for the therapy of atrioventricular nodal re-entrant tachycardia for several years. Although this procedure is quite successful, the cellular electrophysiological mechanisms underlying fast and slow conductions remain unknown. Therefore, the characteristics of the action potential waveform of rabbit atrioventricular node (AVN) cells obtained from different regions within Koch's triangle were studied using nystatin-permeabilized patch methods, and 64 AVN cells were used for this study.

Based on gross morphology, AVN cells were classified into three groups: ovoid cells, rod shaped cells, and cells with an intermediate shape. Results obtained by measuring the maximum velocity dV/dt of action potentials fell into four subgroups: Group I ($dV/dt < 5$ V/sec, $n=23$), Group II ($dV/dt > 5$ but < 10 V/sec, $n=20$), Group III ($dV/dt > 10$ but < 20 V/sec, $n=13$), and Group IV ($dV/dt > 20$ V/sec, $n=8$). Ovoid cells had the smallest dV/dt , whereas the rod shaped cells had the highest dV/dt . The maximum diastolic potential was more negative in Groups III and IV than in Groups I and II. A notch in the phase II of the action potential was observed in 23% of Group III cells and 56% of those in Group IV, but was not present in Groups I and II.

These findings provide further evidence that AVN cells are heterogeneous both in morphology and electrophysiological characteristics. Provided that values of dV/dt can be related to conduction velocity, our findings suggest that cells in Groups III and IV may contribute to fast conduction pathways whereas those in Groups I and II are responsible for slow conduction pathways.

—J Cardiol 1998; 31 (6): 373-380

Key Words

Electrophysiology, Atrioventricular node, Heart conduction system

旭川医科大学 第一内科: 〒078-8510 北海道旭川市西神楽4線5号3-11; *¹京都府立医科大学 臨床検査医学, 京都; *²Nora Eccles Harrison Cardiovascular Research & Training Institute, University of Utah, Salt Lake City, USA; *³Department of Physiology & Biophysics, The University of Calgary, Calgary, Canada
The First Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College, Hokkaido; *¹Department of Laboratory Medicine, Kyoto Prefectural School of Medicine, Kyoto; *²Nora Eccles Harrison Cardiovascular Research & Training Institute, University of Utah, Salt Lake City, USA; *³Department of Physiology & Biophysics, The University of Calgary, Calgary, Canada

Address for reprints: SATO N, MD, The First Department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College, Nishikagura 4-5, 3-11, Asahikawa, Hokkaido 078-8510

Manuscript received December 26, 1997; revised April 15, 1998; accepted April 16, 1998

はじめに

房室結節リエントリー性頻拍 (atrioventricular nodal re-entrant tachycardia) は発作性上室性頻拍の 30-40% を占める比較的良好にみられる不整脈であり、従来は房室結節上部における機能的縦解離がその発生機序と考えられていた。しかしながら近年、本不整脈の治療にカテーテルアブレーションが導入されるに至り、その際の電気生理学的所見などから、房室結節領域における fast pathway, slow pathway は解剖学におおよそ区別しうることを、すなわち fast pathway は Koch の三角の前上方、前中隔に、slow pathway は同部の後下方、後中隔にそれぞれ位置することがほぼ明らかにされた。

一方、これまでの基礎的研究によると、心房、房室結節間の伝導路に関しては、1975 年、Anderson ら¹⁾が atrial-atrioventricular (AV) nodal transitional cells を解剖学的に 3 つの領域、superficial, deep, posterior zone に分類し、また 1989 年には、Racker ら²⁾が atrial-AV connection が 3 つの atrio-nodal bundle (superior, medial, lateral bundle) からなることを示した。これらの知見より、現在では superficial transitional cell zone (または superior atrionodal bundle) が fast pathway の少なくとも一部を構成し、posterior transitional cell zone (または posterior and medial atrionodal bundles) が slow pathway の主要部分を占めているだろうとの推察がなされている。

しかしながら、房室結節領域の単一細胞レベルでの電気生理学的特性や、fast pathway, slow pathway の細胞電気生理学的機序についてはいまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、家兎の房室結節領域から単離された多種類の心筋細胞に関して、電気生理学的特性に基づく分類を試みることを目的とした。

方 法

家兎の房室結節領域を以下の要領でコラーゲナーゼ処理し、単一心筋を獲得、ナスタチン法により自発性活動電位を記録した。房室結節細胞は Koch の三角から Fig. 1 のように広範囲に採取した。活動電位記録には Axoclamp-2B を、解析には p-clamp 6 (Axon Instruments, USA) を用いた。大多数の細胞では、拡張

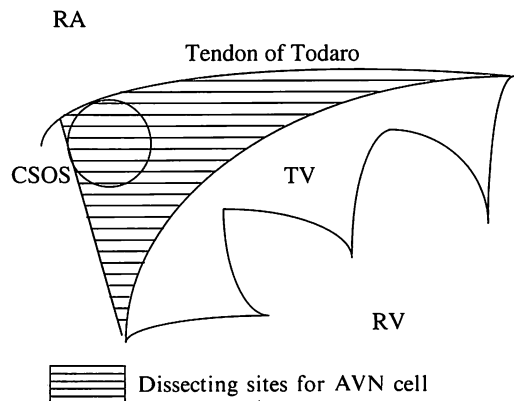


Fig. 1 Schematic distribution of dissecting sites for atrioventricular node (AVN) cell isolation
RA=right atrium; CSOS=coronary sinus ostium; TV=septal leaflet of the tricuspid valve; RV=right ventricle.

期に一定の過分極パルスを与えることにより、input resistance と capacitance を測定した。

細胞分離は既出の論文³⁾と同様、以下に示す要領で行った。すなわち、家兎(1.5-2 kg)を pentobarbital (50 mg/kg) で静脈麻酔し、心臓を迅速に摘出、以下の溶液で Langendorff 灌流(37°C, 90 cm H₂O)を行った。

- 1) Bicarbonate buffered Tyrode solution containing 1 mM CaCl₂ (5 分)
- 2) Ca²⁺-free Tyrode (10 分)
- 3) Ca²⁺-free Tyrode containing 12.5 U/ml collagenase (Yakult, 東京) および 0.0125 U/ml protease (Sigma, Type XIV, USA) (8 分)

8 分のコラーゲナーゼ処理 [上記 3)] の後、房室結節領域を切除し、更に周囲の心室筋を実体顕微鏡下に剝離した。得られた房室結節の微小標本を最終的に幅 2 mm の短冊とし、500 U/ml collagenase (Sigma, Type I), 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, fraction V) を含有する Ca²⁺-free HEPES-buffered Tyrode 液(37°C)の中にインキュベートした。房室結節細胞は 2-3 分ごとに採取し、遠心分離された後 KB 液に保存した。約 1 時間の recovery time を置いた後、単一心筋細胞を実験チャンバー(37°C)に置き、regular beating を示す細胞のみを実験に用いた。

結 果

64 個の房室結節細胞を解析に用いた。全細胞の平均 capacitance は 43±12 pF, input resistance は 920±210

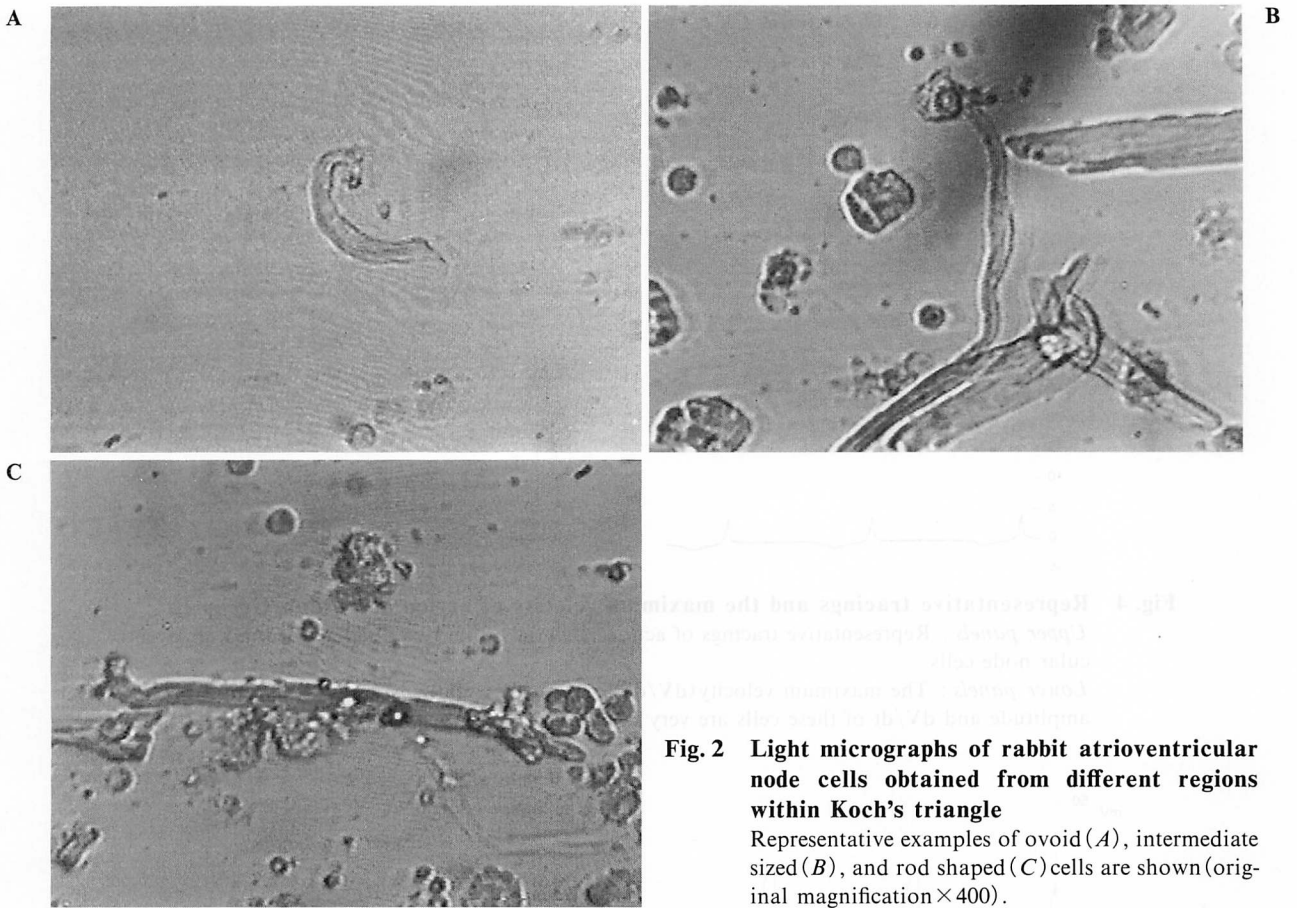


Fig. 2 Light micrographs of rabbit atrioventricular node cells obtained from different regions within Koch's triangle
 Representative examples of ovoid (A), intermediate sized (B), and rod shaped (C) cells are shown (original magnification $\times 400$).

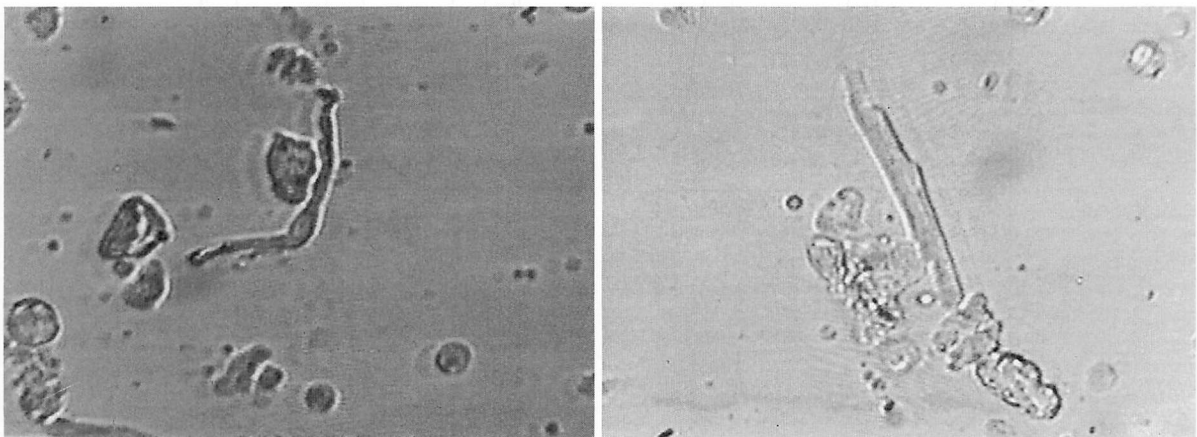


Fig. 3 Light micrographs of rabbit atrioventricular node cells obtained from different regions within Koch's triangle
 Examples of ovoid (left) and rod shaped (right) cells are shown (original magnification $\times 400$).

MΩであった。Figs. 2, 3 に房室結節細胞の顕微鏡所見 ($\times 400$)を示す。形態的には Munk ら⁴⁾の提唱した 1) ovoid cell (O cell), 2) rod shaped cell (R cell)に加え、中間的な size を示す細胞である 3) intermediate sized

cell (I cell)が認められた。自発性活動電位の最大立ち上がり速度 (dV/dt)により、これらの細胞を I 群 ($dV/dt < 5$ V/sec, 23 個), II 群 ($5 < dV/dt < 10$ V/sec, 20 個), III 群 ($10 < dV/dt < 20$ V/sec, 13 個), IV 群 (20 V/

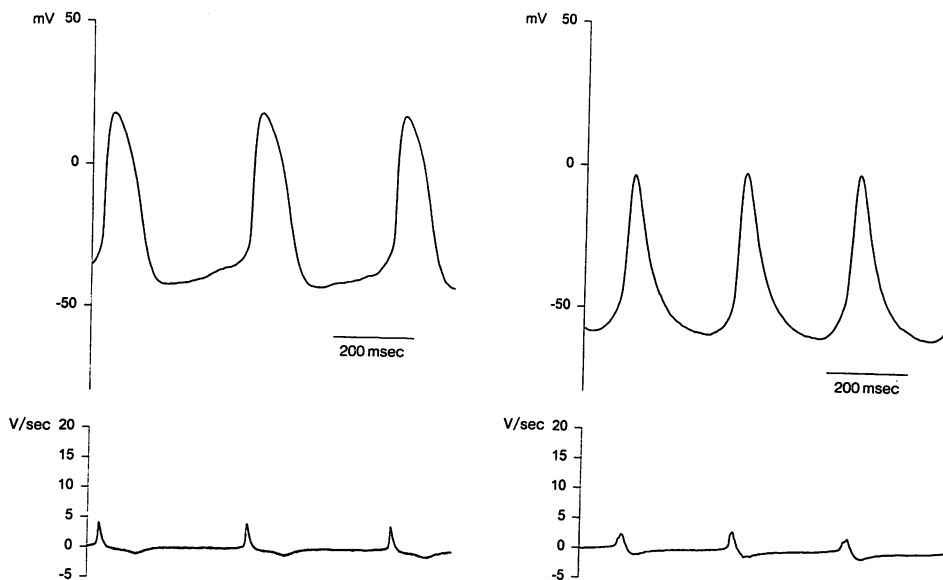


Fig. 4 Representative tracings and the maximum velocity of action potentials (Group I)
Upper panels: Representative tracings of action potentials from two different Group I atrioventricular node cells.
Lower panels: The maximum velocity (dV/dt) of action potentials. Note that the action potential amplitude and dV/dt of these cells are very small.

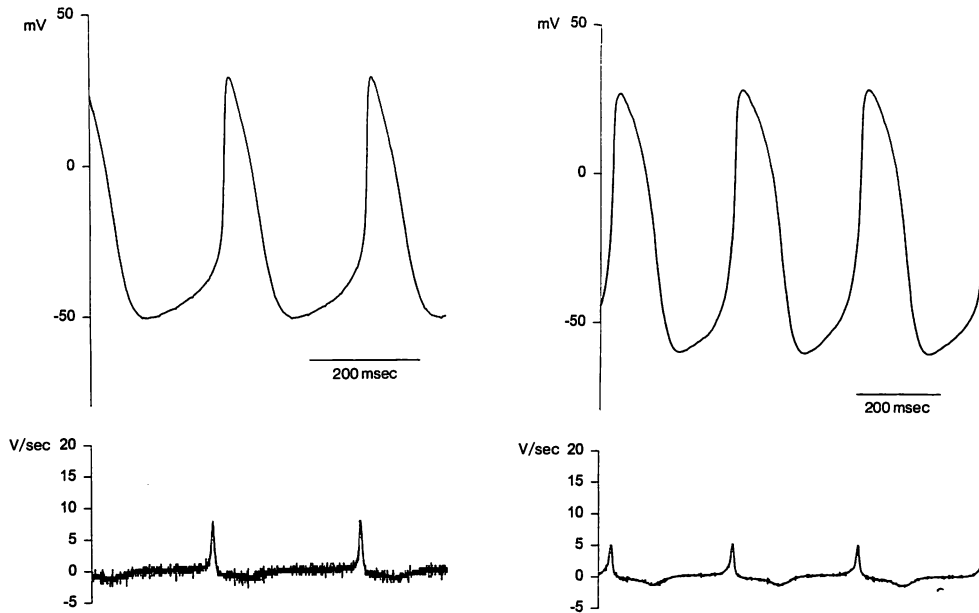


Fig. 5 Actual tracings and the maximum velocity of action potentials (Group II)
Upper panels: Actual tracings of action potentials from two different Group II atrioventricular node cells.
Lower panels: The maximum velocity (dV/dt) of action potentials.

sec < dV/dt, 8 個) に分類すると, 形態的には O cell は I 群に最も多く (75%), R cell は IV 群に多く認められた (90%). 各群における代表的な活動電位波形をそれぞれ 2 つずつ Figs. 4-7 に, 活動電位指標のまとめを

Table 1 に示す. 活動電位振幅, 最大拡張期電位は I 群でそれぞれ小さく浅く, II, III, IV 群となるにつれ, それぞれ大きく深くなる傾向を示した. また, 50% 活動電位持続時間 (action potential duration at 50% re-

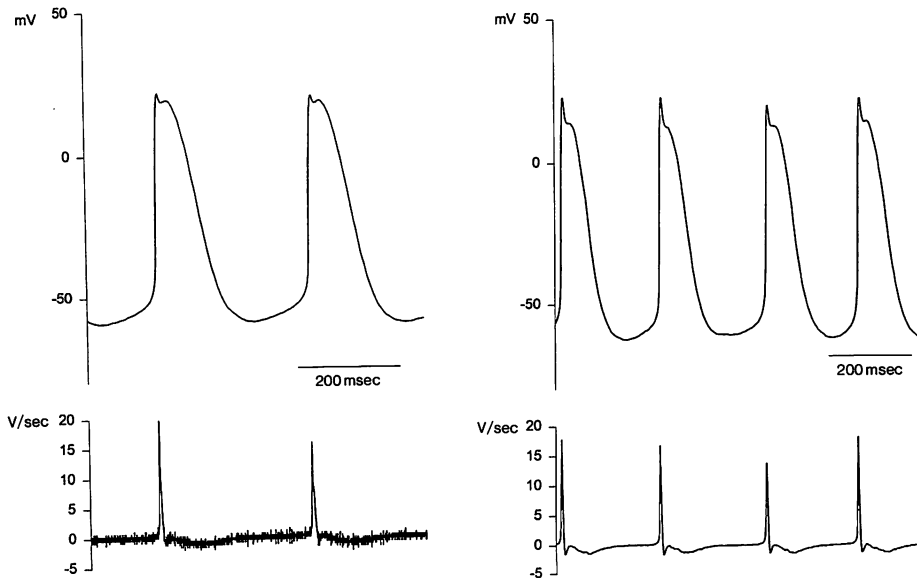


Fig. 6 Representative tracings and the maximum velocity of action potentials (Group III)
Upper panels: Representative tracings of action potentials from two different Group III atrioventricular node cells.
Lower panels: The maximum velocity (dV/dt) of action potentials. Note that a notch in the phase II of the action potential is observed in both cells.

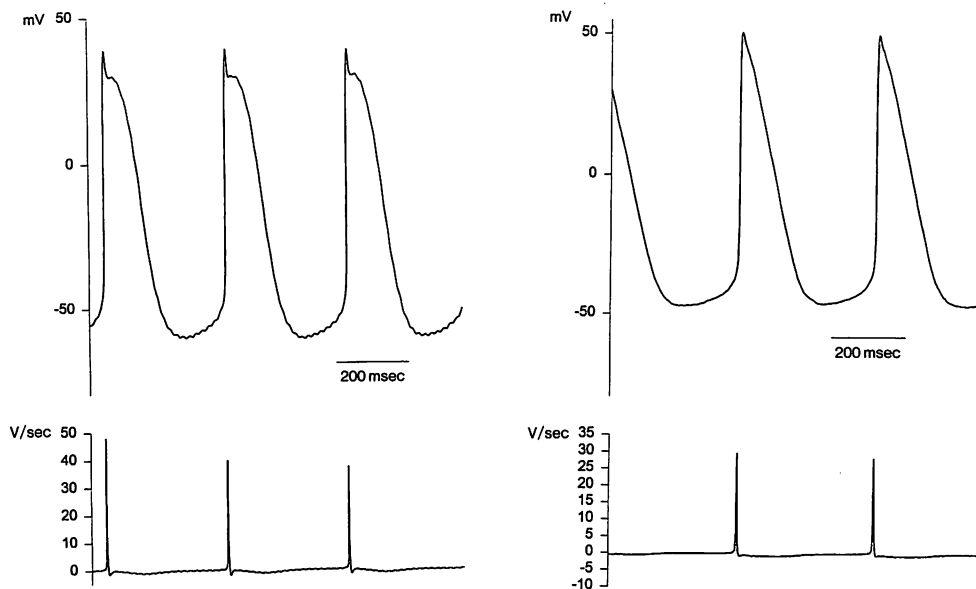


Fig. 7 Actual tracings and the maximum velocity of action potentials (Group IV)
Upper panels: Actual tracings of action potentials from two different Group IV atrioventricular node cells.
Lower panels: The maximum velocity (dV/dt) of action potentials. Note that the action potential amplitude and dV/dt of these cells are very large. The cell in the left side shows a notch in the phase II of the action potential.

polarization: APD_{50}), 90%活動電位持続時間(APD_{90})はI群で短くII, III, IV群では長い傾向にあった。一過性外向き電流を反映すると考えられる活動電位第2

相の notch は, III 群の 23%, IV 群の 56%に認められたが, I, II 群ではみられなかった。

Table 1 Action potential parameters measured in isolated cells from rabbit atrioventricular node

Cell type	n	CL (msec)	MDP (mV)	DDR (mV/sec)	APD ₅₀ (mV)	APD ₉₀ (mV)	V _{max} (V/sec)	OS (mV)	APA (mV)
I	23	314±40	-48.3±7.0	80.4±21.1	78.2±12.0	115.8±12.8	3.6±0.9	17.8±8.8	66.5±9.3
II	20	359±46	-59.3±7.6	72.1±19.7	117.3±25.8	156.0±30.4	6.7±1.6	27.3±7.3	86.9±13.0
III	13	340±72	-63.5±5.2	73.4±36.6	94.6±20.5	127.0±19.3	14.0±3.0	31.9±10.5	95.4±11.2
IV	8	326±66	-69.4±11.7	75.1±26.6	93.7±10.1	144.8±33.7	26.7±6.6	27.8±12.0	97.3±10.1

n : number of experiments.

CL=cycle length; MDP=maximal diastolic potential; DDR=diastolic depolarization rate; APD₅₀=action potential duration at 50% repolarization; APD₉₀=action potential duration at 90% repolarization; V_{max}=maximal upstroke velocity; OS=overshoot potential; APA=action potential amplitude.

考 察

房室結節細胞の分類に関しては、Andersonら¹⁾や Janseら²⁾による細胞電気生理学的特性に基づいた分類 [atro-nodal (AN), nodal (N), nodal-His (NH)] がよく知られている。これによると、N zone は compact AV node の存在する midnodal area にほぼ相当し、この領域の細胞は浅い拡張期電位と小さな活動電位立ち上がり速度を有するとされる。一方、AN cell は心房と compact AV node の間の transitional zone に認められ、広い範囲の拡張期電位と活動電位立ち上がり速度を示し、また NH cell は compact AV node と His 束の間に位置し、深い拡張期電位と大きな活動電位立ち上がり速度を有するとされる。その後 Billelte³⁾は、房室結節細胞を活動電位波形、activation time と期外刺激に対する反応により更に細かく 6 つの cell type (AN, ANCO, ANL, N, NH, H) に分類し、房室結節には種々の移行細胞が存在することを示した。

更に、最近 McGuireら⁴⁾は、AV junction cell は三尖弁輪から右房自由壁に移行するに従い心房筋に近い活動電位波形を呈すること、三尖弁輪から 1-2 mm 以内の AV junction cell は細胞電気生理学的特性やアデノシンに対する反応、connexin-43 の欠乏など AV node cell と多くの共有点を有し、これらの細胞群が slow pathway を形成しようとの報告を行った。これらの分類は多細胞標本の細胞内電位記録に基づくものであり、活動電位波形の違いは Ca チャネルと Na チャネルの分布の差によるものとおおよそ推察されていたが、最近 Munkら⁵⁾は、家兎房室結節細胞の電気生理学的特性を単一細胞レベルで詳細に検討した。それによると、房室結節細胞は ovoid cell と rod cell に大きく

分類され、後者は Na チャネルを高率に有するが前者は低率にしか有さないこと、過分極により活性化される内向き電流(I_n)の電流密度は ovoid cell が rod cell の 25 倍大きいこと、一過性内向き電流は rod cell で高率に認められるが、ovoid cell では低率であることが示された。また、羽淵ら⁶⁾は、房室結節には自動性の強い細胞と Na チャネルをより発現しやすい細胞の 2 種が混在し、自動性の強い細胞は His 束寄りに多く局在していること、Na チャネルは AN, N, NH 領域ともに広く分布し、過分極により不活性化が解除された場合、緩徐型活動電位のそれよりもはるかに速い活動電位立ち上がりをもたらすことを示した。更に Petreccaら⁷⁾は、最近、immunohistochemistry の手法を用い、midnodal cell には Na チャネルが疎であるか稀少であること、transitional cell や lower nodal cell においては心房筋や心室筋に匹敵する Na チャネルが認められることを報告し、これらの所見は細胞電気生理学的所見とほぼ合致することを明らかにした。

今回の我々の検討においても、Ca チャネル依存性の房室結節活動電位立ち上がり速度がおおよそ 10 V/sec 以下であると仮定すると、rod cell が主体の III, IV 群の細胞は Na チャネル活性を有し、また一過性外向きチャネルも高率に有するであろうこと、一方 ovoid cell が主体の I, II 群の細胞は Ca 依存性細胞か、もしくは Na チャネル活性の乏しい細胞であろうことが予測され、Munkら⁵⁾や羽淵ら⁶⁾の報告とほぼ合致していた。Munkらは形態的ならびに活動電位とイオン電流の特性より房室結節は少なくとも 2 種の細胞群から構成されると報告しているが、今回、我々の結果からは、房室結節細胞は心房筋細胞や心室筋細胞と異なり更に多種類の多様な電気生理学的性質を有する細胞集団であ

ることが示唆された。

房室結節リエントリー性頻拍患者における fast pathway, slow pathway は、ともに心房筋と compact AV node の間に存在する transitional cell から構成されていることが推察されている。すなわち、transitional cell の中に Na チャネルの密度の大きい細胞と、Na チャネルが小さいかもしくは欠如し、主として Ca チャネルに依存する細胞が存在し、両者の電気生理学的特性(伝導速度と不応期)の差と解剖学的構築がリエントリー成立に重要な役割を果たすものと推察されている。更に房室結節リエントリー性頻拍の臨床電気生理学的検査ならびにアブレーションにおいては、典型的 jump up を示さない症例や 3 重あるいは 4 重房室伝導曲線を示す例、fast-slow form 以外に fast-intermediate, intermediate-slow, slow-slow 型を示す症例など、多様な症例が存在することが報告されている¹⁰⁾。本研究の結果でみられたような房室結節細胞の電気生理学的多様性がこれらの症例ごとの多様性の一因になりうると考えられ、更にこれに加えて解剖学的構築(配列)の違いが関与すれば、種々のタイプの re-entry circuit が生じうるものと考えられる。

生体内においては心房筋や心室筋からの electrotonic effect が存在し、単一心筋と多細胞における conduction を全く同一に論じることは出来ない。すなわち心房筋のような静止膜電位の深い組織が結節細胞に隣接し、過分極性の electrotonic effect が結節細胞

に波及すると自動能は抑制され、一方、結節細胞の膜電位が深くなると Na チャネルが活性化され、速い伝導速度を呈しうる³⁾。したがって、compact AV node 外に存在する移行細胞の伝導速度は心房筋から受ける electrotonic effect の程度により多様と推測され、単一細胞の電気生理学的特性のみから生体内における伝導を論じるにはおのずと限界があるが、今回の我々の検討において、単一細胞の最大立ち上がり速度と伝導速度の間に密な相関があると仮定すると III, IV 群の細胞は fast pathway を I, II 群の細胞は compact AV node および slow pathway を構成しうると考えられた。今回の検討では房室結節細胞は Koch の三角内から無作為に isolation されたため、部位による電気生理学的特性の差異を論じることは出来なかったが、今後 anterior inputs, posterior inputs それぞれの cell isolation が可能となれば、解剖学的 fast pathway, slow pathway の細胞電気生理学の性質が更に詳細に明らかにされると思われる。

結 論

房室結節細胞は形態的にも活動電位波形上も多様な細胞から構成されていた。多細胞における conduction と単一細胞の活動電位立ち上がり速度から求めた伝導速度に密な相関があると仮定すると、今回の我々の分類では III, IV 群の細胞は fast pathway を、I, II 群の細胞は slow pathway を構成しうると推察された。

要 約

近年、房室結節リエントリー性頻拍の治療にカテーテルアブレーションが導入され、本不整脈に対する治療法は著しい進歩を遂げたが、fast pathway, slow pathway に関する細胞電気生理学の機序はいまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、家兎の房室結節領域から単離された多種類の心筋細胞活動電位に関して分類を試みた。

方法は家兎の房室結節領域(Kochの三角)をコラーゲナーゼ処理することにより単一心筋を獲得、ナスタチン法により自発性活動電位を記録した。64個の房室結節細胞を解析に用いた。形態的には Munk らの提唱した ovoid cell (O cell), rod shaped cell (R cell) に加えて、中間的なサイズの細胞 intermediate sized cell (I cell) が認められた。自発性活動電位の最大立ち上がり速度 (dV/dt) により、これらの細胞を I 群 ($dV/dt < 5$ V/sec, 23 個), II 群 ($5 < dV/dt < 10$ V/sec, 20 個), III 群 ($10 < dV/dt < 20$ V/sec, 13 個), IV 群 (20 V/sec $< dV/dt$, 8 個) に分類すると、形態的には O cell は I 群に最も多く、R cell は IV 群に多く認められた。活動電位指標では活動電位振幅、最大拡張期電位は I 群でそれぞれ小さく浅く、II, III, IV 群となるにつれ、それぞれ大きく深くなる傾向を示した。一過性外向き電流を反映すると考えられる活動電位第 2 相の notch は、III 群の 23%, IV 群の 56% に認められたが、I, II 群ではみられなかった。

以上より、房室結節細胞は形態的にも活動電位波形上も多様な細胞から構成されていることが明らかになった。多細胞においては electrotonic effect が存在するため、単一細胞の結果で conduction を論じることは難しいが、 dV/dt と伝導速度が密に相関すると仮定すると今回の我々の検討では III, IV 群の細胞は fast pathway を, I, II 群の細胞は slow pathway を形成しうると推察された。

— J Cardiol 1998; 31 (6) : 373–380 —

文 献

- 1) Anderson RH, Becker AE, Brechenmacher C, Davies MJ, Rossi L: The human atrioventricular junctional area: A morphological study of the A-V node and the bundle. *Eur J Cardiol* 1975; **3**: 11–25
- 2) Racker DK: Atrioventricular node and input pathways: A correlated gross anatomical and histological study of the canine atrioventricular junctional region. *Anat Rec* 1989; **224**: 336–354
- 3) Spitzer KW, Sato N, Tanaka H, Firek L, Zaniboni M, Giles WR: Electrotonic modulation of electrical activity in rabbit atrioventricular node myocytes. *Am J Physiol* 1997; **42**: H767–H776
- 4) Munk AA, Adjemian RA, Zhao J, Ogbaghebril A, Shrier A: Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol* 1996; **493**: 801–818
- 5) Janse MJ, van Capelle FJL, Anderson RH, Touboul P, Billette J: Electrophysiology and structure of the atrioventricular node of the isolated rabbit heart. *in* The Conduction System of the Heart: Structure, Function and Clinical Implication (ed by Wellens HJJ, Lie KI, Janse MJ). Sterert Kroese BV, Leiden, 1976; pp 296–315
- 6) Billette J: Atrioventricular nodal activation during periodic premature stimulation of the atrium. *Am J Physiol* 1987; **252**: H163–H177
- 7) McGuire MA, de Bakker JMT, Vermeulen JT, Moorman AFM, Loh P, Thibault B, Vermeulen JLM, Becker AE, Janse MJ: Atrioventricular junctional tissue: Discrepancy between histological and electrophysiological characteristics. *Circulation* 1996; **94**: 571–577
- 8) 羽瀧義純, 田中秀央: 房室結節細胞の電気生理特性. *心電図* 1997; **17**: 462(abstr)
- 9) Petrecca K, Amellal F, Laird DW, Cohen SA, Shrier A: Sodium channel distribution within the rabbit atrioventricular node as analysed by confocal microscopy. *J Physiol* 1997; **501**: 263–274
- 10) Tai C-T, Chen S-A, Chiang C-E, Lee S-H, Chiou C-W, Ueng K-C, Wen Z-C, Chen Y-J, Chang M-S: Multiple anterograde atrioventricular node pathways in patients with atrioventricular node reentrant tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 1996; **28**: 725–731