

Electrophysiological Analyses of Negative Chrono-and Dromotropic Actions of Acetylcholine in the Atrioventricular Node

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7782

房室結節におけるアセチルコリンの陰性変時・ 陰性変導作用の電気生理学的解析

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

広 正 修 一

(昭和60年2月12日受付)

房室結節に及ぼすアセチルコリン (ACh) の陰性変時及び陰性変導作用の電気生理学的機序を知るため、微小電極法と電圧固定法を用い自発性活動電位、駆動性活動電位とイオン電流の両面から解析を行った。AChは 10^{-8} Mでは拡張期脱分極速度の低下により自発性興奮頻度を減少させ陰性変時作用を初めて現わした。この変化はACh 10^{-7} Mで更に増強し、最大拡張期電位の増大、発火電位と最大脱分極速度の増大を生じた。高濃度のAChではこれらのAChの陰性変時作用は濃度依存性に増強され、ACh 10^{-6} Mでは膜の過分極は一層増強し、大部分の例で自発活動の消失がみられた。一方、駆動性活動電位に対しては、ACh 10^{-6} M作用下では最大脱分極速度は減少し、このACh濃度ではAChにより緩徐な内向き電流が減少することが示唆された。ACh 10^{-5} Mでは全例で自発活動は消失したが、アトロピンは 10^{-8} Mで膜を脱分極、 10^{-7} Mで自動能を再開させ、 10^{-6} Mでほぼ対照状態に自発興奮を復帰させた。同様なアトロピンの抗コリン作用はアトロピン 10^{-9} M、 10^{-8} M存在下では、房室結節の自発性興奮頻度に及ぼすACh(10^{-8} M \sim 10^{-4} M)の用量-反応曲線をAChの高濃度側へ平行移動させるのが認められた。房室結節の空間定数を測定するため細胞内通電法による過分極性電気緊張性電位の減衰を記録したが、ACh 10^{-6} Mにより房室結節の空間定数は $625 \pm 120 \mu\text{m}$ から $420 \pm 96 \mu\text{m}$ へと減少した。二重微小電極法による電圧固定法により、ACh 10^{-6} Mでは脱分極により外向きACh channelが開くことが明らかとなった。またこのACh電流は弛緩現象を示した。一方、緩徐な内向き電流は $22 \pm 12\%$ 減少した。ACh 10^{-5} Mでは、ACh電流は増加し、保持電流は外向きに移動し、緩徐な内向き電流は $46 \pm 18\%$ 減少した。これらの結果より(1)AChの陰性変時作用は大部分はACh channelの活性化に起因する。また一部分は緩徐な内向き電流の減少により出現する拡張期脱分極速度の減少に起因する。(2)AChの陰性変導作用は最大拡張期電位と発火電位との隔たりの増大、房室結節における細胞間の電気的結合の障害ならびに緩徐な内向き電流の減少による。(3)房室結節にはAChのムスカリン様受容体が豊富に存在し、AChはアトロピンとは競合的に拮抗することが示唆された。

Key words atrioventricular node, acetylcholine, action potential, membrane current

自律神経伝達物質の1つであるアセチルコリン (ACh) はカテコールアミンと共に心臓拍動の神経性調節に主要な役割を演じ、臨床的には主として洞結節と房室結節の自動能及び伝導性を低下させる。その結果、洞性徐脈や房室ブロックの発生、房室結節性補充調律の発生抑制等の調律異常を生じ得るが、一方では発作性及び非発作性房室結節性頻拍の停止あるいは抑

制、更には心房粗動、細動時の心室応答頻度の低下といった治療的效果をも有することが知られている¹¹⁾。このようにAChは臨床に、特に房室結節において不整脈の発生と治療の双方に深く関与するものの、そうした作用の電気生理学的機序は未だに明らかではない。その最大の理由は房室結節の活動電位を単一細胞から持続的に記録することが技術的に困難であったこ

Abbreviations: ACh, acetylcholine; APA, action potential amplitude; APD₅₀ and APD₁₀₀, action potential duration at 50 and 100% of repolarization, respectively; c AMP, cyclic adenosine 3,5-monophosphate; c GMP, cyclic guanosine 3,5-monophosphate; DI, diastolic

と、更に電圧固定法による膜イオン電流の解析が房室結節細胞では従来不可能とされてきたことに求められる。しかしながら、近年、房室結節を空間定数(690 μm)の1/3以下の標本に細切することにより、二重微小電極法による膜電位固定実験が可能となり、房室結節細胞には電位依存性と時間依存性を示す電流系として、緩徐な内向き電流 (i_s)、急速な Na^+ 電流 (i_{Na})、外向き K^+ 電流 (i_k)、過分極により活性化される内向き電流 (i_h)の4電流と、電位依存性で時間非依存性の背景電流 (i_b)の計5種の電流が存在することが明らかとなった²¹⁻²⁵。そこで本研究では房室結節に及ぼす ACh の陰性変時及び陰性変導作用の電気生理学的機序を知るため、活動電位とイオン電流の両面から以下の解析を行い、その結果房室結節細胞に ACh 受容体が密に存在すること、更に上記の5電流系以外に、ACh に特異性を示す新たな電流系として ACh 電流が存在することを明らかにした。

材料及び方法

1. 実験動物及び灌流液

体重1.5~2.0 kg のウサギの後頭部を叩打、意識を失わせた後に瀉血、開胸して迅速に心臓を摘出した。実体顕微鏡下で開心後、冠静脈洞開口部と三尖弁との間に位置する房室結節(約5×3 mm)を切離し、その中央部を幅0.2 mm、長さ3 mmの短冊形標本に細切、これを更に0.2 mm間隔に絹糸で結紮して、最終的に0.2×0.2×0.1 mmの微小標本を作製した。こうした房室結節微小標本は一般に自動性興奮を示し、正常な電気生理学的特性を有することは既報の通りである⁹。この微小標本は長さ70 mm、幅8 mm、深さ1 mmの組織浴槽の上流端から15 mmの位置にタングステン線で固定、毎分5 mlの流量で表面灌流を行った。灌流に用いたTyrode液のmM組成はNaCl 136.9、KCl 4.0、CaCl₂ 1.8、MgCl₂ 1.0、NaH₂PO₄ 0.33であり、Na₂HPO₄添加によりpHを7.4に調整、液温は循環恒温槽によって37±1°Cに保った。使用した薬剤はacetylcholine chloride, physostigmine sulfate, D-tubocurarine chloride (以上、和光純薬), succinylcholine chloride (Sigma), atropine sulfate (田辺製薬), verapamil (エーザイ)であり、原末又は注射液をTyrode液で希釈、灌流することにより、房室結節細胞に及ぼす電気生理学的作用を検討した。標本への薬剤添加は、組織浴槽の上流端に対照灌流液を流入させ

ているポリエチレン管(外径2 mm)を、薬剤含有灌流液の貯蔵槽からのポリエチレン管に切替えることにより瞬間的になされ、また微小標本であるためもあって、本実験における薬剤効果は一般に10秒程で現れ、2~3分でほぼ定常状態に達したので、一つの薬剤の灌流時間は通常4分とした。

2. 膜電位測定法

房室結節の細胞膜電位は3 MKClを満たした芯入りガラス微小電極(抵抗20~50 M Ω)で記録、通常の微小電極用増幅器を用いて増幅し、活動電位0相の最大脱分極速度は時定数1 msecの微分増幅器に活動電位を入力することにより得られた。本微分回路の出力は三角波の較正上0~30 V/secの範囲で直線的であった。房室結節の自発性興奮頻度をみるため、活動電位を更に心拍計ユニット(日本光電 AT-600G)に入力した。

房室結節の空間定数の測定には幅0.5 mm、長さ3~4 mmの短冊形標本を用い、本標本的一端に微小電極を刺入して、約50 nA、100 msecの内向き通電を行った。その際、発現する電気緊張性電位の減衰を、100~200 μm 間隔で数カ所に微小電極を刺入することで測定した。本標本は既報の房室結節の空間定数(690 μm)の約5位の長さを有するため⁹、無限長の1次元ケーブルに近似すると考えられ、空間定数 λ は

$$E = E_0 e^{-x/\lambda}$$

E_0 は通電点の膜電位、 E は通電点からの距離 x における膜電位

に従い算出した。

次に ACh の膜抵抗に及ぼす効果をみるため、房室結節の微小標本に二重微小電極法を応用し、一方より内向き通電、他方より膜電位誘導を行って膜電流固定実験を施行した。

3. 膜イオン電流測定法

膜イオン電流の測定のための電圧固定実験も、房室結節の微小標本に二重微小電極法を応用することにより行ったが、その際の電圧固定回路を virtual ground 回路としては New らと本質的に同じものを用いた⁷。通常、膜電位は-40 mVに保持し、これに持続時間500 msecの脱分極又は過分極パルスを与えた時に流れる内向き及び外向き電流を記録の対象とした。

以上の出力信号を全て残像型8チャンネル・オシロスコープ(Tektronix R5113)、4チャンネル・レクテコーダー(日本光電, RJG-4124)、4チャンネル・カセット

interval; MDP, maximal diastolic potential; MRD, maximal rate of depolarization; MRR, maximal rate of repolarization; OS, overshoot; RDD, rate of diastolic depolarization; RP, resting potential; SFF, spontaneous firing frequency; TP, take-off potential

トデータレコーダー (TEAC R-80) に適宜入力した後、ミニコンピューター (Nicolet Lab 1180E) により解析した。計測された活動電位指標は活動電位振幅 (APA), 最大拡張期電位 (MDP), オーバーシュート (OS), 発火電位 (TP), 最大脱分極速度 (MRD), 最大再分極速度 (MRR), 自発興奮頻度 (SFF), 拡張期間隔 (DI), 拡張期脱分極速度 (RDD), 50%及び100%再分極点における活動電位持続時間 (APD₅₀, APD₁₀₀) であり, 3ないし4周期の活動電位の平均値として求めた。その際, 活動電位振幅は最大拡張期電位から活動電位の頂点までの電位差として計測した。拡張期脱分極速度は拡張期電位に最小自乗法により引かれた接線勾配として求められ, 発火電位はこの接線と活動電位0相に最小自乗法で引かれた接線との交点として決定された。本交点から活動電位振幅の50%に再分極する点までの時間を50%活動電位持続時間, 最大拡張期電位までの時間を100%活動電位持続時間とした。なお, これらの接線は元の電位曲線との間で相関係数0.95以上を満足するように留意して引かれた。

膜電流系の解析は次のように行った。すなわち, 緩徐な内向き電流は保持電流を基準に, 容量電流に引き続き流れる一過性内向き電流の最大点までの電流値として, 定常状態における電流は500 msecの脱分極あるいは過分極パルスを与えた際の490 msecにおける電流値としてそれぞれ求めた。又, 外向き K⁺ 末尾電流は, 膜を脱分極状態から保持電位に再分極した直後に発現する外向き電流の最大点から3秒後の定常状態に

おける保持電流までの電流差として, 更に過分極により活性化される内向き電流は, 過分極パルス開始直後の電流を基準に, 490 msecの時点における電流との差として計測した。ACh電流の有無を検討するため, ACh作用後の電流波形から対照の電流波形をコンピューターを用いて差し引き, 電流差が弛緩現象を示すか否かも検討した。以上の計測値の推計学的処理には Student の paired t test を用い危険率5%以下の場合に有意差があるものと判定した。

成 績

1. 外因性 ACh の自動能と活動電位に及ぼす効果

自発性活動を示す房室結節標本に, ACh を 10^{-9} M から 10^{-5} M まで順次濃度を増して作用させ, 活動電位波形に及ぼす効果を14例で検討した。図1は代表的な実験例の低速度記録である。全経過を通じ微小電極が細胞内に安定して刺入されていることが分かる。ACh の各濃度における活動電位変化をまとめたものが表1である。これらの成績より, ACh は 10^{-9} M では活動電位諸指標に特に変化を生じないが, 10^{-8} M では拡張期脱分極速度の低下により自発性興奮頻度を減少させ, 陰性変時作用を現わしたことが判る。こうした変化は ACh 10^{-7} M で更に増強し, 図2上段の高速度記録でも示されるように最大拡張期電位の増大(過分極), 発火電位と最大脱分極速度の増大, 50%及び100%活動電位持続時間の短縮をも生じた。なお本濃度では14例中1例で自発性活動が消失し, -68.1 mV の静止電位を

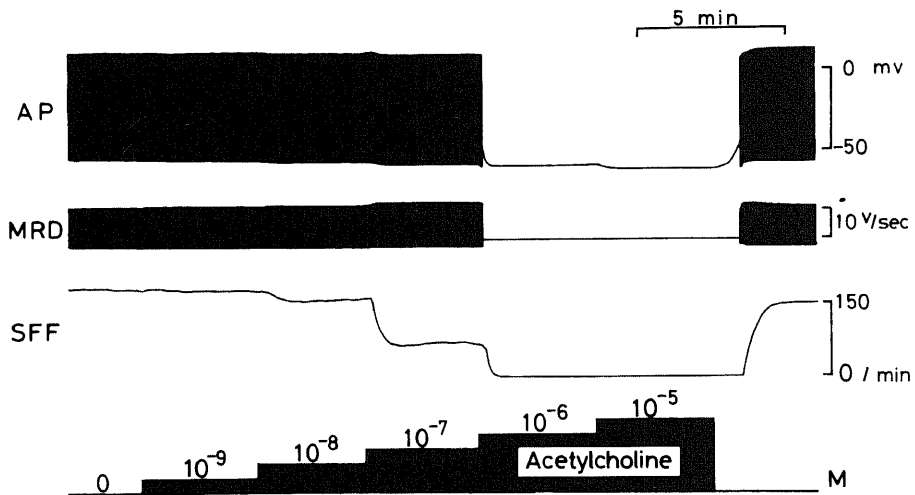


Fig. 1. Effects of ACh on the spontaneous action potential.

AP, action potential; MRD, maximal rate of depolarization; SFF, spontaneous firing frequency. Note that the tracing were recorded at a low speed.

示した。ACh 10^{-6} M では膜の過分極は一層増強し、拡張期脱分極速度も低下する結果、14 例中 12 例で自発活動は消失し、 -65.6 ± 7.7 mV の静止電位が得られた。ACh の最高濃度である 10^{-5} M では、残る 2 例も自

発活動を停止し、静止電位値 -74.5 ± 4.2 mV の強い膜過分極作用が発現した。

ACh 10^{-6} M では一般に自発活動が消失して活動電位波形を解析することが困難となるので、この点を解決するため二重微小電極法により、約 20 nA、幅 5 msec の外向き細胞内通電を定頻度で行った。図 2 下段はそうした実験の代表例であり、対照記録と ACh 10^{-6} M 作用 2 分後の記録を重ね撮りしたものである。これで見られるように ACh 10^{-6} M でも最大拡張期電位と発火電位は増大したが、最大脱分極速度は逆に減少した。50%及び 100%活動電位持続時間は共に短縮した。なお、ACh 10^{-6} M 作用 5 分後には 20 mA の外向き細胞内通電法を用いても活動電位を発生させることは不能であった ($n = 4$)。

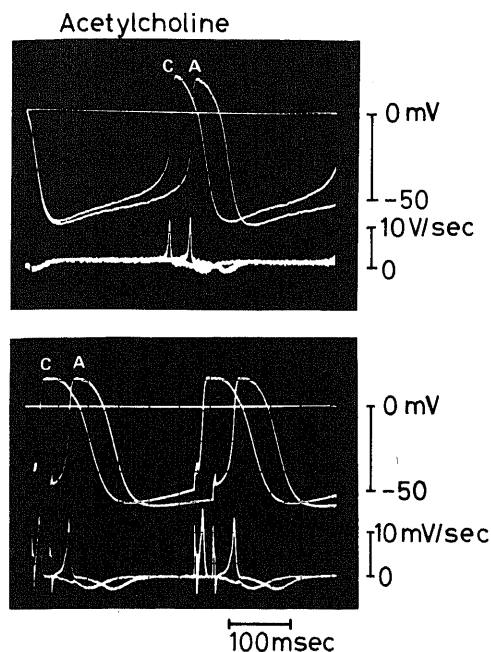


Fig. 2. Effects of ACh on the spontaneous action potential (upper panel) and the driven action potential (lower panel).

The concentrations of ACh are used 10^{-7} M in the upper panel and 10^{-6} M in the lower panel. The upper tracing shows the transmembrane potential and the lower, its first derivative, or the maximal rate of depolarization in each panel. C denotes action potential during control perfusion, and A denotes that during ACh perfusion.

Table 1. Effects of ACh on action potential parameters of the A-V node

	Control	Acetylcholine				
		10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-5} M
Materials (n)	14	14	14	13	2	14
APA (mV)	94.9 ± 4.4	95.1 ± 4.0	95.5 ± 4.5	95.6 ± 4.6	95.7	
MDP (-mV)	71.6 ± 2.7	71.7 ± 3.0	72.1 ± 3.3	$73.4 \pm 3.2^*$	73.6	
OS (mV)	23.2 ± 3.8	23.1 ± 4.0	23.1 ± 4.0	22.0 ± 4.3	20.8	
TP (-mV)	51.3 ± 5.2	51.1 ± 5.4	51.7 ± 5.8	$55.5 \pm 4.9^*$	55.4	
MRD (V/sec)	11.2 ± 3.8	11.0 ± 3.6	11.4 ± 3.9	$12.6 \pm 4.0^*$	12.2	
MRR (-V/sec)	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.8	
SFF (/sec)	166 ± 15	162 ± 18	$157 \pm 18^*$	$108 \pm 24^*$	45	
DI (msec)	244 ± 109	228 ± 113	243 ± 114	$406 \pm 154^*$	508	
RDD (mV/sec)	86 ± 28	85 ± 26	$78 \pm 26^*$	56 ± 26	45	
APD ₅₀ (msec)	90 ± 13	90 ± 13	90 ± 14	$77 \pm 13^*$	80	
APD ₁₀₀ (msec)	169 ± 21	173 ± 21	171 ± 21	$140 \pm 21^*$	130	
RP (-mV)				68.1 (n=1)	65.6 7.7 (n=12)	74.5 \pm 4.2*

Data are based on fourteen experiments. All measurements are expressed as mean values \pm standard deviation.

*=statistical significance at 5% level compared with control values. APA, action potential amplitude; MDP, maximal diastolic potential; OS, overshoot; TP, take-off potential; MRD, maximal rate of depolarization; MRR, maximal rate of repolarization; SFF, spontaneous firing frequency; DI, diastolic interval; RDD, rate of diastolic depolarization; APD₅₀ and APD₁₀₀, action potential duration at 50 and 100% of repolarization, respectively; RP, resting potential.

2. 内因性 ACh の自動能と活動電位に及ぼす効果
 内因性 ACh の活性を高めるためフィゾスチグミンを 10^{-8} から 10^{-4} M まで順次作用させ、その効果を検討した。図 3 は代表的な低速度記録であり、6 例の成績をまとめたものが表 2 である。図 3 ではフィゾスチグミン 10^{-8} M 灌流開始直後に一過性に発現した膜の過分極、最大脱分極速度の増加と自発興奮頻度の低下が示されているが、灌流 2 分以降では表 2 から知られるように自発興奮頻度のみ減少し、他の活動電位指標は不変に留まった。本剤の濃度を増すと、 10^{-6} M で最大拡張期電位と最大脱分極速度の増加、50% 及び 100% 活動電位持続時間の短縮が生じ、これらの変化は陰性変時作用と共に濃度依存性に増強したが、 10^{-4} M でも自発性興奮の消失する例はみられなかった。以上

より、フィゾスチグミンの房室結節に及ぼす効果は外因性 ACh と定性的に同じであり、本組織に内因性 ACh が豊富に存在することが示唆された。

3. ACh に対するアトロピンの拮抗作用

図 4 は ACh に対するアトロピンの拮抗作用の有無を検討した低速度実験記録である。房室結節微小標本に ACh 10^{-5} M を作用させると、前述のように自動能は消失し、膜の過分極が発現した。本例では ACh 10^{-5} M 単独灌流にもかかわらず、1 分後には膜の脱分極がみられた。このような現象は程度の差はあれ、約 1/3 (20 例中 7 例) の房室結節標本でみられ、フィゾスチグミン 10^{-7} M を同時作用させた例では全く認められないことより、外因性 ACh がコリンエステラーゼにより ACh 受容体周辺で急速に加水分解されることを

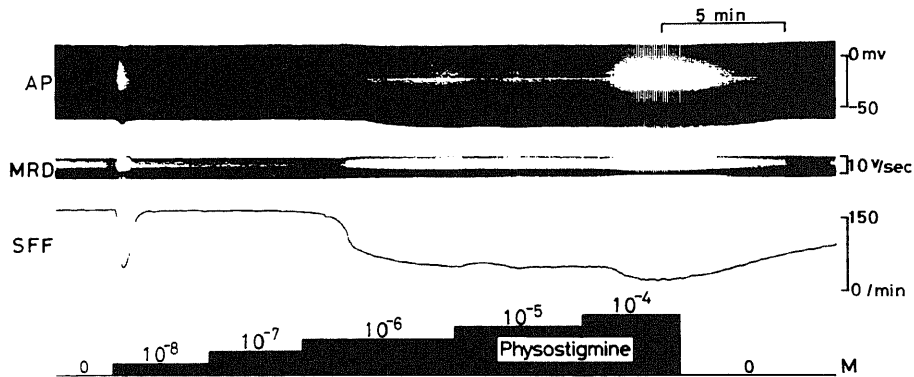


Fig. 3. Effects of physostigmine on the spontaneous action potential. Abbreviations as in Figure 1.

Table 2. Effects of physostigmine on action potential parameters of the A-V node

	Control	Physostigmine				
		10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M
APA (mV)	95.4±3.6	95.6±4.0	95.8±3.8	95.8±4.4	96.2±4.7	98.0±4.8
MDP (-mV)	68.4±2.2	68.5±2.1	68.6±2.0	71.4±3.2*	71.8±3.6*	72.8±3.0*
OS (mV)	30.4±2.5	30.8±3.0	30.2±3.2	28.2±3.4*	28.8±3.7*	28.0±4.7*
TP (-mV)	48.7±4.7	48.5±4.3	48.5±3.8	49.2±4.8	50.8±4.8	51.4±5.4*
MRD (V/sec)	9.6±3.8	9.6±3.3	6.7±3.3	10.8±3.4*	10.8±3.6*	11.6±4.0*
MRR (-V/sec)	2.1±0.3	2.4±0.4	2.4±0.3	2.2±0.3	2.2±0.4	2.3±0.4
SFF (/min)	172±22	160±21*	132±20*	112±26*	88±24*	76±19*
DI (msec)	208±110	218±95	292±112*	330±122*	357±154*	466±148*
RDD (mV/sec)	94±28	90±26	84±28	62±27*	60±30*	46±31*
APD ₅₀ (msec)	93±7	91±9	90±8	80±10*	78±8*	78±7*
APD ₁₀₀ (msec)	168±16	163±18	165±17	148±16*	146±18*	140±16*

Data are based on six experiments. * = statistical significance at 5% level compared with control values. All measurements are expressed as mean values ± standard deviation. Abbreviations as in Table 1.

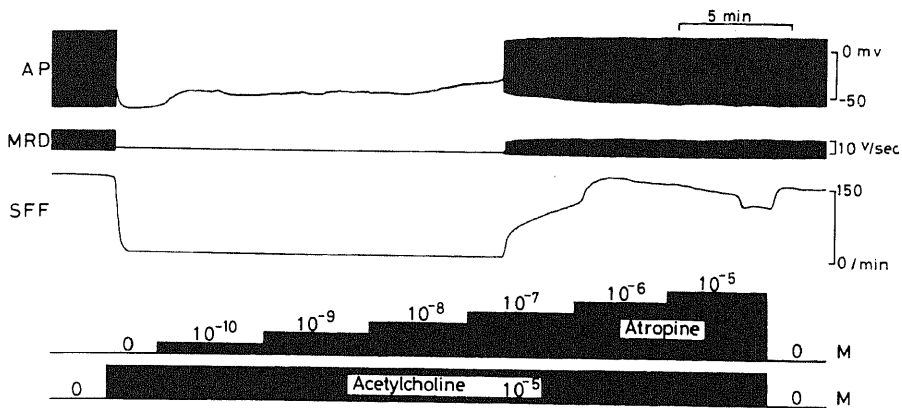


Fig. 4. Antagonistic action of atropine against ACh. Abbreviations as in Figure 1.

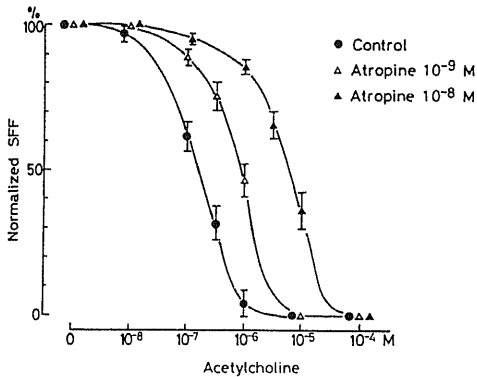


Fig. 5. Antagonistic action of atropine against ACh. Normalized spontaneous firing frequencies are plotted on the vertical axis and ACh concentrations are plotted on the horizontal axis. These measurements are expressed as mean values \pm standard deviation.

Data are based on fourteen experiments using control perfusing conditions without atropine, ten experiments in the presence of 10^{-9} M atropine, and also ten experiments in the presence of 10^{-8} M atropine.

示唆するものと考えられた。以上のような条件下でアトロピンを 10^{-10} から 10^{-5} M まで順次作用させた結果、明らかな膜の脱分極の形で抗コリン作用を発現するアトロピン濃度は 10^{-10} M であった。自発興奮を再開させる濃度は 5 例中 3 例で 10^{-7} M、残る 2 例で 10^{-8} M であった。

ACh に対するアトロピンの拮抗作用が競合的か非競合的であるかを知るため、房室結節の自発性興奮頻度に及ぼす ACh 10^{-8} から 10^{-4} M の効果を用量-反応

曲線に表し、これに対してアトロピンがいかなる効果を与えるかを観察した。図 5 の対照曲線では ACh は 10^{-8} M より自発興奮頻度を減少させ始め、逆 S 字状曲線を描きつつ、 10^{-5} M では全例自動能を停止させた ($n=14$)。次にアトロピン 10^{-9} M ($n=10$)、 10^{-8} M ($n=10$) 存在下で同様の用量-反応曲線を求めると、曲線がアトロピンの濃度に依存して ACh の高濃度側へ平行移動するのが認められた。以上より、房室結節における ACh 受容体はムスカリン様受容体であり、ACh はアトロピンとは競合的に拮抗することが明らかとなった。なお、ニコチン様受容体の有無に関しては、ACh 10^{-8} M で前処置した標本に ACh のニコチン様作用の阻害剤であるサクシニールコリン 10^{-8} M、又は D-ツボクラリン 10^{-5} M を作用させたが、活動電位には全く変化がみられなかったことより、その存在は否定された。

4. 房室結節の空間定数に及ぼす ACh の効果

図 6 は房室結節の空間定数を測定するために行った細胞内通電法による過分極性電気緊張性電位の減衰を記録したものである。膜電位は通電点から 166, 434, 566, 734 μ m 離れた点で誘導されている。左図は対照記録で、細胞内通電前と通電中の膜電位の重ね撮りを、右図は ACh 10^{-6} M により自発興奮を消失させた後の -70 mV の静止電位に及ぼす細胞内通電の効果を示す。電気緊張性電位の測定は可能な限り -70 mV において行ったが、本例におけるその変化をまとめたものが図 7 であり、空間定数は対照時 510 μ m であったものが、ACh 10^{-6} M 作用下では 340 μ m へと減少した。5 例の成績をまとめると、空間定数は ACh 10^{-6} M により $625 \pm 120 \mu$ m から $420 \pm 96 \mu$ m へと有意に減少した ($p < 0.01$)。

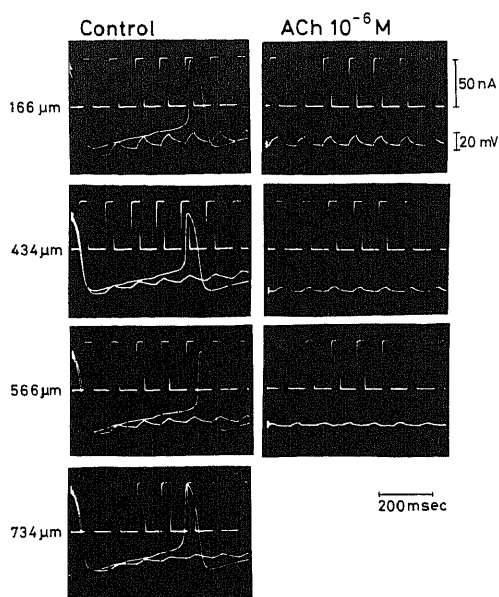


Fig. 6. Effects of ACh on the decay of the electrotonic potential.

Left-sided values express the distances from the point of passing a current intracellularly to the point of induced membrane potential. Upper square pulses denote currents of the point of passing a current intracellularly and lower square pulses denote changes of membrane potential in each panel.

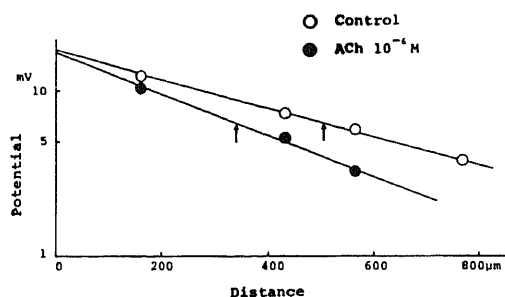


Fig. 7. Effects of ACh on the space constant. The electrotonic potentials are plotted on the vertical axis and the distances from the point of passing a current intracellularly to the point of induced membrane potential are plotted on the horizontal axis.

This figure summarizes the data of Figure 6 and the arrows denote the values of the space constant in each condition.

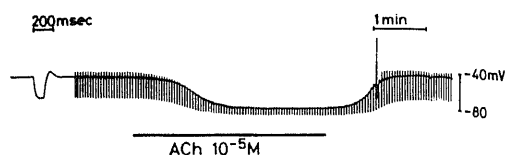


Fig. 8. Effects of ACh on the membrane resistance. This figure shows the changes of the membrane potential when the preparation was stimulated with hyperpolarizing pulses of 200 msec duration at a constant rate (cycle length, 3 sec).

5. 細胞膜抵抗に及ぼす ACh の効果

図 8 は verapamil 10^{-6} g/ml の灌流により静止した房室結節の膜抵抗に及ぼす ACh の作用をみた記録例である。ACh 10^{-5} M を作用させると静止電位は -43 mV から -80 mV へと著明に増加し、 12 nA の内向き電流の細胞内通電により生じた過分極性電位は対照の約 $1/3$ にまで減少した。従って、ACh は膜抵抗を減少させることが示唆された。

6. 膜イオン電流に及ぼす ACh の効果

ACh による膜抵抗の減少は膜コンダクタンスの増加を反映するので、その詳細な機序を知るため膜電位固定実験を施行した。図 9 は代表例であり、上段には保持電位の -40 mV から -10 mV へ 500 msec 幅の脱分極パルスを与えた場合、下段には保持電位から -80 mV へ 500 msec 幅の過分極パルスを与えた際にそれぞれ発現するイオン電流を示す。脱分極パルス開始直後に容量電流に引き続き流れる緩徐な内向き電流は、対照時 26 nA であるが、ACh 10^{-6} M を作用させると 16.5 nA へと減少、ACh 10^{-5} M では 13.5 nA へと更に減少した。次に ACh 10^{-5} M にアトロピン 10^{-6} M を添加して灌流すると、緩徐な内向き電流は 24 nA とほぼ対照状態にまで復帰した。緩徐な内向き電流が不活性化を受けた後、外向き電流が流れるが、本電流は ACh 10^{-6} M 及び 10^{-5} M 作用により保持電流の外向き偏移と共に大きく外向きに流れた。ACh 作用下の外向き電流の増強様式は、ACh 10^{-5} M で明らかなように、脱分極パルスの前半相で特に外向きに流れるという特徴を有した。この点を解析するため、ACh 10^{-6} M 作用下で保持電流が不変であった標本において、膜を -40 mV から $+10$ mV へ脱分極、次いで -40 mV へ再分極した際の対照と ACh 灌流中の電流を重ね撮りしたのが図 10-A である。膜の脱分極により外向き電流が活性化されているが、図 9 と同様に ACh により本電流は増加し、次に、膜を再分極した際に流れる外向き K^+ 電流の脱活性化による末尾電流は ACh により逆に減

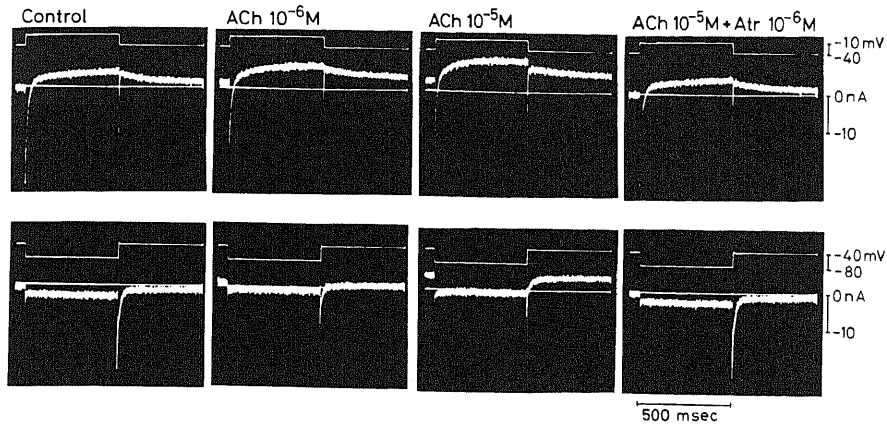


Fig. 9. Actions of ACh on membrane current systems of the A-V node, and the antagonistic action of atropine against ACh.

These panels show the ionic currents which obtained when the holding potential was set at -40 mV, a depolarizing pulses to +10 mV were applied for 500 msec (top panels), and a hyperpolarizing pulses to -80 mV were applied for 500 msec (bottom panels).

In each panel, upper record denotes the membrane potential and lower record denotes the membrane current.

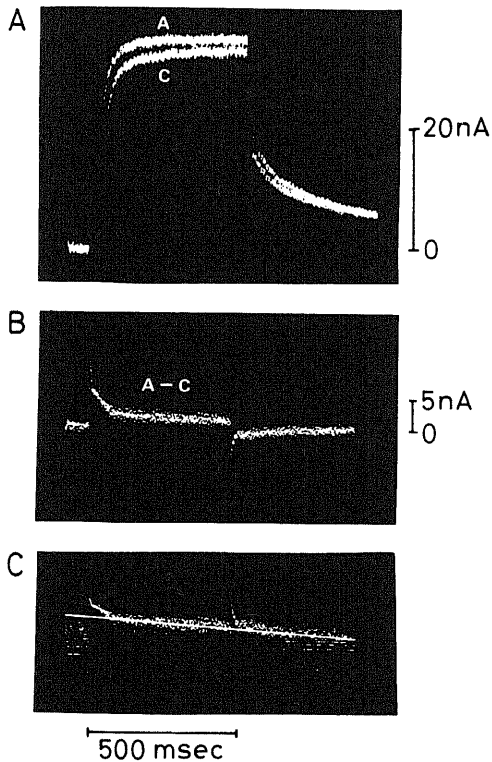


Fig. 10. Demonstration of ACh current.

The top panel (A) shows the outward currents when obtained with voltage clamp techniques, the holding potential was set at -40 mV, and a depolarizing pulse to +10 mV was applied. In

this panel (A), C denotes the records obtained during the control perfusion, and A denotes the records obtained during 10^{-6} M ACh perfusion. The middle panel (B) shows the difference between the current curve during ACh perfusion and the current curve during control perfusion (ACh current).

少した。AChによる正味の電流変化を知るため、ACh作用下の電流から対照時の電流を差し引いた電流を図10-Bに示す。脱分極パルス開始後50 msecの間にみられる外向き電流はAChによる緩徐な内向き電流の減少量を、他方脱分極パルス開始50 msec以後の外向き電流はAChによる外向き電流の増加量を示すが、後者は時間と共に減少したので、遅延整流特性を有する外向き K^+ 電流とは異質のものと考えられた。この差し引き電流を図10-Cのように片対数表示すると、+10 mVにおける本電流は550 msecの時定数で減少、同様に膜を-40 mVに再分極した際の差し引き電流は、脱分極時とは逆に時間と共に95 msecの時定数で増加した。従って、これらの成績より、AChにより脱分極時に減少し、再分極時に増加する電流は、外向き K^+ 電流とは独立した新たなる電流系であり、図9でも示されるようにアトロピンで拮抗されることから、AChにより特異的に活性化され、弛緩現象を呈する電流(ACh電流)であると同定された。本電流の

存在を考慮して、他の膜電流系に及ぼす ACh の効果を図 9 で検討した。外向き末尾電流は見かけ上、対照時の 4.2 nA から ACh 10^{-6} 、 10^{-5} M より 3.8 nA、3.6 nA へと減少したが、本現象は再分極により時間依存性に外向きに増加する ACh 電流の単独効果としても説明できるため、結論的には ACh が外向き K^+ 末尾電流に作用するか否かは不詳であった。図 9 下段には、膜を -80 mV に再分極した際に僅かに流れる過分極により活性化される内向き電流を示す。本電流も ACh 作用後、見かけ上減少したが、ACh 電流の関与を考慮すると ACh に感受性を示すか否かは不詳である。次に膜の過分極直後に現われる時間非依存性の背景電流であるが、対照及び ACh 10^{-6} M 作用下では 3 nA 外向きに流れたが、ACh 10^{-5} M 作用により 10 nA と著明に増加した。

以上の成績を電流-電圧曲線上にまとめたのが図 11 である。 -30 mV から $+10$ mV における一過性内向き電流 (大部分は緩徐な内向き電流) が ACh により濃度依存性に減少すること、更に -80 mV から $+10$ mV における定常状態の電流が外向きに流れることが知られる。このような変化はアトロピンによりほぼ対照状態にまで復帰したので、イオン電流的にもアトロピンは ACh に拮抗することが明らかとなった。なお、5 例において ACh は -10 mV での緩徐な内向き電流を 10^{-6} M で $22 \pm 12\%$ 、 10^{-5} M で $46 \pm 18\%$ 有意に減少させ ($p < 0.01$)、0 mV における定常状態の外向き電流を 10^{-6} M で $12 \pm 15\%$ 、 10^{-5} M で $86 \pm 23\%$ 増加させた ($p < 0.01$)。

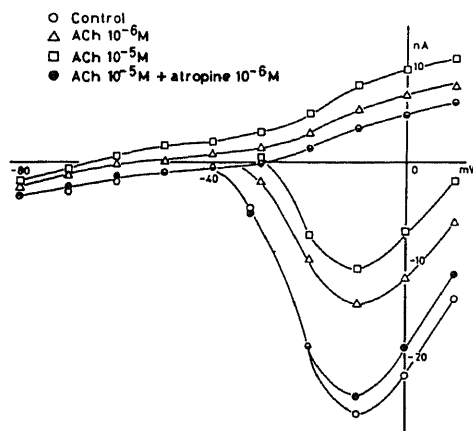


Fig. 11. Actions of ACh on current-voltage curve and the antagonistic action of atropine against ACh. This figure summarized the data of Figure 9. See the text for detailed explanation.

考 察

ACh の心筋細胞に対する電気生理学的作用をイオン電流的に解析したものとしては、洞結節では Noma ら⁸⁾、心房筋では Giles ら⁹⁾、Ten Eick ら¹⁰⁾、Ikemoto ら¹¹⁾、プルキンジェ線維では Carmeliet ら¹²⁾¹³⁾、Mubagwa ら¹⁴⁾、心室筋では Hino ら¹⁵⁾の報告がそれぞれみられるが、房室結節では著者らの報告¹⁶⁾以外はみられない。今回の成績より、房室結節には内因性 ACh と ACh 受容体が豊富に存在すること、ACh はアトロピンと競合的に拮抗し、ムスカリン様作用を呈するが、ニコチン様作用を欠くことなどが明らかとなった。ACh の房室結節における作用を大別すると、自動能の抑制と伝導性の抑制であるので、以下この 2 点の細胞生理学的機序について考察する。

我々の用いた房室結節の微小標本は空間固定されているため、歩調取り細胞の移動を生じる可能性は全くなく、ACh の陰性変時作用を調べる上では理想的な実験系である。自発性活動電位上、陰性変時作用は ACh 10^{-8} M を閾値濃度として濃度依存性に発現し、 10^{-6} M では 14 例中 12 例で自動能は消失した。活動電位的に自動能を規定する因子は最大拡張期電位、発火電位、拡張期脱分極速度の三者であるが、ACh は前二者をほぼ同程度増大させるため、陰性変時作用は主として拡張期脱分極速度の減少に起因した。イオン電流的にはこれらの作用は全て一元的に理解され、即ち ACh により外向きの ACh 電流が活性化されることが本態をなすと考えられた。ACh 電流は脱分極により活性化され、弛緩現象を示すことから同定されたが、本電流は Adams¹⁷⁾、Neher ら¹⁸⁾により骨格筋の終板で発見され、次いで心筋組織では Noma ら⁸⁾により洞結節で検出されたが、Mubagwa ら¹⁴⁾によりプルキンジェ線維ではこの存在は否定された。房室結節は電流生理学的に洞結節に類似した特性を持つが、ACh 電流の面からも両結節の類似性が更に確認されたことは生理学的、薬理的に興味深い。ACh 電流のイオン担体は本研究では調べられていないが、洞結節では K^+ であるといわれている⁸⁾。従って、房室結節でも電位と時間に依存性を示す外向き K^+ 電流とは無関係に ACh に特異性を示す膜のイオン通路を通り K^+ が膜外に流れると考えられる。なお、膜電流固定実験で ACh により膜抵抗が減少し、膜の過分極が発現したが、これは ACh 電流のコンダクタンスの増加を反映したものであろう。

自動能はイオン電流的には外向き K^+ 電流の脱活性化、緩徐な内向き電流の活性化、内向きに流れる背景電流の三者により規定される¹⁹⁾。ACh 電流は第四の因

子の存在を示すものであるが、ACh 電流の活性化は外向き K⁺ 末尾電流の解析を不能とするため、後者に及ぼす ACh の効果は不詳に留まった。緩徐な内向き電流は ACh により 10⁻⁶M では減少するため、拡張期脱分極相の後半の抑制には関与すると思われた。しかしながら 10⁻⁷M までの ACh は自発性活動電位の最大脱分極速度を有意に増加させたので、この濃度で緩徐な内向き電流を遮断するとは考え難く、これは ACh 電流による膜の過分極と自発興奮周期の延長から、電位と時間依存性に緩徐な内向き電流の不活性化からの回復が促進されたことに起因すると推察された。次に ACh による内向き背景電流の増加作用は最大拡張期電位の減少と拡張期脱分極速度の増大から陽性変時的に働くと考えられたが、内向き背景電流の増加を相殺する程に ACh 電流が外向きに流れるため、その効果は顕在化しなかった。以上より、房室結節における ACh の陰性変時機序は主として ACh 電流の活性化に基づき、高濃度では緩徐な内向き電流の減少も加わると結論された。

房室結節における ACh の陰性変導作用は、臨床的には迷走神経刺激手技により、実験的には迷走神経の直接刺激あるいは ACh 灌流により、心電図の PR 間隔又はヒス束心電図の AH 間隔の延長として認められる^{20,21)}。その機序として、Matsuda ら²²⁾は房室結節活動電位の最大脱分極速度の低下を挙げている。本研究では自発性活動電位における同指標は ACh 10⁻⁹ から 10⁻⁸M では不変にとどまり、10⁻⁷M では膜の過分極により増大した。10⁻⁶M では自動能が消失したので、定頻度駆動を行うと膜の過分極にもかかわらず減少を示した。従って、ACh 10⁻⁶M 以上の濃度であればイオン電流的にも緩徐な内向き電流の減少により房室結節伝導は抑制されるが、10⁻⁷M ではプルキンジェ線維²³⁾のように最大脱分極速度の増加から伝導は改善されるかも知れない。本実験で用いた房室結節標本は伝導現象の存在しない微小標本であるため、ACh の伝導に及ぼす用量-反応効果は見られなかった。しかしながら、これまでの報告によれば、定頻度駆動下では迷走神経刺激の強さにかかわらず房室結節では常に陰性変導作用が発現した²⁰⁾、心拍数が制御されていない場合には陽性変動作用がみられたこともあるという²⁴⁾。後者は徐脈により緩徐な内向き電流の不活性化からの回復が一層進行したことで説明可能であろう。他方、前者が普遍的現象であり、低濃度の ACh で最大脱分極速度が増加しても房室結節伝導が抑制されるのであれば、その機序としては以下のことが考えられよう。第 1 には、ACh 電流により膜が過分極すると駆動性活動電位においては拡張期電位と発火電位（緩徐な内向き

電流の活性化の開始電位）との隔たりが増すため、未興奮の隣接細胞の膜を発火電位まで脱分極させるに要する局所電流量に不足が生じること、第 2 には、ACh 10⁻⁶M により空間定数が 33% 減少することから知られるように、房室結節における細胞間の電氣的結合が障害されることが挙げられる。本研究では房室結節の細胞内抵抗は直接求められなかったが、心房筋では ACh 2 × 10⁻⁶g/ml により同抵抗が 1.25 倍に増したとの報告もあり²⁵⁾、このような受動的電気特性が低濃度の ACh 作用時の最大脱分極速度の増加を相殺するものと考えられる。なお、伝導速度 (θ) を Hunter ら²⁶⁾は次のように理論的に表わしている。

$$\theta = \frac{3^{\frac{1}{2}} a \dot{V}_{\max}}{4 C_m R_i V_p} = \frac{3^{\frac{1}{2}} \lambda^{\frac{1}{2}} \dot{V}_{\max}}{2 \tau V_p}$$

但し、 a は細胞の直径、 V_{\max} は最大脱分極速度、 C_m : 膜比容量、 R_i : 細胞内比抵抗、 V_p : 活動電位振幅、 λ : 空間定数、 τ : 膜時定数

本式からも ACh の陰性変導機序として、膜の過分極による最大拡張期電位の増大、空間定数の減少、更に高濃度では緩徐な内向き電流の減少による最大脱分極速度の低下が動くとして理解されよう。

次に、心臓内及び房室結節内の異なる細胞に対する ACh の生理学的作用の差について言及する。心臓における迷走神経支配は洞結節と房室結節で特に密であることは組織化学²⁷⁾や電子顕微鏡²⁸⁾による形態学的研究から既に明らかとなっている。本研究では ACh 灌流により房室結節でムスカリン様作用が発現、更にコリンエステラーゼの阻害剤であるフィゾスチグミン灌流による内因性 ACh の活性化でも同様のムスカリン様作用が発現した。これは房室結節において ACh の受容体と迷走神経終末が密に分布することを電気生理学的に示すものである。我々の用いた房室結節標本は主として房室結節中央部から採取されているが、一部心房あるいはヒス束寄りの標本もある。異なる房室結節細胞の ACh に対する感受性に関しては、定量的には多少の差異は認められたが、房室結節内の解剖学的位置との相関はなく、又定性的に異なる反応を示す標本はなかった。ただ、約 80 例の標本中 ACh 10⁻⁶M 灌流を行っても自発性活動電位が不変に留まったものが 2 例あり、これらは ACh 受容体を欠く標本かとも思われたが、フィゾスチグミン 10⁻⁶M 灌流により直ちに過分極を生じ、自発性活動を停止した。従って、房室結節の各細胞にはコリンエステラーゼの活性に差異はあっても、ACh 受容体の欠如はないと考えられた。

イオン電流に及ぼす ACh の効果は、房室結節では

ACh 電流の活性化, 緩徐な内向き電流の減少, 深い膜電位における内向き背景電流の増加である。洞結節においては, ACh 10^{-6} M では ACh 電流の活性化のみ発現し, 緩徐な内向き電流は不変であったという⁹⁾。心筋組織の中で ACh 電流を有するものは両結節細胞のみであるが, 緩徐な内向き電流に対する感受性が異なるのがいかなる生理学的意義を有するかは不詳である。なお, ACh の緩徐な内向き電流に対する抑制作用は心房筋⁹⁾⁻¹¹⁾, 心室筋¹⁵⁾, プルキンジェ線維¹³⁾でも観察されている。時間依存性の外向き電流に対する ACh の効果は結節細胞では ACh 電流のため解析されていないが, 本電流は心房筋⁹⁾, プルキンジェ線維¹³⁾では不変, 心室筋¹⁵⁾では減少したという。時間非依存性の背景電流は心房筋では房室結節と同様に深い膜電位では内向きに流れるが⁹⁾, プルキンジェ線維では -75 mV より正の電位域では内向きに, これより負の電位域では外向きに流れ¹²⁾, 心室筋では不変である¹⁵⁾。このように ACh の作用は心臓内各組織においてそれぞれ異なっており, このような差異がどういふ機序により発現するかは未だに明らかではない。生化学的には ACh は cyclic guanosine 3, 5-monophosphate (c GMP) を増加し, cyclic adenosine 3, 5-monophosphate (c AMP) を幾分減少させるといわれているので²⁹⁾, 細胞内代謝を介して緩徐な内向き電流の抑制効果が生じる可能性はある。ACh 電流に関しては従来のイオン電流とは異なった動態を示すことから, 結節細胞にのみ存在するイオン通路であり, ACh 受容体そのものがイオン通路となっているのかも知れない。その他の電流系に対する ACh の作用発現機序の相違点に関しても, 各心筋組織における ACh 受容体, 細胞内代謝, イオン通路の三者を結ぶ生理学的, 生化学的研究による今後の解明が期待される。

結 論

房室結節に及ぼす ACh の陰性変時及び陰性変導作用の電気生理学的機序を明らかにするため, 微小電極法と電圧固定法を用い自発性活動電位, 駆動性活動電位と膜イオン電流の両面から検討を行い, 以下の結論を得た。

1. ACh の陰性変時作用は大部分は ACh channel の活性化に起因するところの, また一部分は緩徐な内向き電流の減少により出現する拡張期脱分極速度の減少に起因する。

2. ACh の陰性変導作用は最大拡張期電位と発火電位との隔たりの増大, また房室結節における細胞間の電気的結合の障害ならびに緩徐な内向き電流の減少による。

3. 房室結節には ACh のムスカリン様受容体が豊富に存在し, ACh はアトロピンとは競合的に拮抗する。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学第一内科服部 信教授, 及び藤田学園保健衛生大学総合医科学研究所心臓血管部門渡部良夫教授に深謝いたします。また直接御指導と御助言をいただきました金沢大学第一内科池田孝之講師, 藤田学園保健衛生大学総合医科学研究所心臓血管部門西村昌雄先生に心から感謝申し上げます。更に, 御協力をいただきました金沢大学第一内科循環器班及び藤田学園保健衛生大学総合医科学研究所心臓血管部門の諸先生に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 渡部良夫: 不整脈, その電気生理と臨床, 1~12 頁, 文光堂, 東京, 1973.
- 2) Bellet, S.: Clinical Disorders of the Heart Beat, 3rd ed., p1114-1124, Lea & Febiger, Philadelphia, 1971.
- 3) Noma, A., Irisawa, H., Kokubun, S., Kotake, H., Nishimura, M. & Watanabe, Y.: Slow current system in the A-V node of the rabbit heart. *Nature*, **285**, 228-229 (1980).
- 4) Kokubun, S., Nishimura, M., Noma, A & Irisawa, H.: Membrane currents in the rabbit atrioventricular node cell. *Pflügers Arch.*, **393**, 15-22 (1982).
- 5) Watanabe, Y., Nishimura, M. & Tsuji, Y.: Function of *In* Abe, H., Ito, Y., Tada, M., & Opie, L. H. (ed.), Regulation of Cardiac Function, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/VNU Sci. Press, Utrecht, 1984.
- 6) Kokubun, S., Nishimura, M., Noma, A. & Irisawa, H.: The spontaneous action potential of rabbit atrioventricular node cells. *Jpn. J. Physiol.*, **30**, 529-540 (1980).
- 7) New, W. & Trautwein, W.: Inward membrane currents in mammalian myocardium. *Pflügers Arch.*, **334**, 1-23 (1972).
- 8) Noma, A. & Trautwein, W.: Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.*, **377**, 193-200 (1978).
- 9) Giles, W., & Noble, S. J.: Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)*, **261**, 103-123

- (1976).
- 10) **Ten Eick, R., Nawrath, H., McDonald, T. F. & Trautwein, W.**: On the mechanisms of the negative inotropic effect of acetylcholine. *Pflügers Arch.*, **361**, 207-231 (1976).
 - 11) **Ikemoto, Y. & Goto, M.**: Effects of ACh on slow inward current and tension components of the bullfrog atrium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **9**, 313-326 (1977).
 - 12) **Carmeliet, E. & Ramon, J.**: Effect of acetylcholine on time-independent currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch.*, **387**, 207-216 (1980).
 - 13) **Carmeliet, E. & Ramon, J.**: Effects of acetylcholine on time-dependent currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch.*, **387**, 217-223 (1980).
 - 14) **Mubagwa, K., Vereecke, J. & Carmeliet, E.**: Does the acetylcholine-induced potassium current in rabbit cardiac Purkinje fibers show relaxation? *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **262**, 322-323 (1983).
 - 15) **Hino, N. & Ochi, R.**: Effect of acetylcholine on membrane currents in guinea-pig papillary muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, **307**, 183-197 (1980).
 - 16) **Hiromasa, S., Nishimura, M., Tsuji, Y. & Watanabe, Y.**: Electrophysiologic demonstration of acetylcholine receptors and acetylcholine effects in the rabbit atrioventricular node. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **1**, 730 (1983).
 - 17) **Adams, P. R.**: Kinetics of agonist conductance changes during hyperpolarization at frog endplates. *Br. J. Pharmacol.*, **53**, 308-310 (1974).
 - 18) **Neher, E. & Sakman, B.**: Noise analysis of drug-induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fiber. *J. Physiol. (Lond.)*, **258**, 705-729 (1976).
 - 19) **西村昌雄・入沢 宏**: 心臓細胞の自動性. 代謝, **18**, 29-36 (1981).
 - 20) **Martin, P. J.**: Dynamic vagal control of atrial-ventricular conduction: Theoretical and experimental studies. *Ann. Biomed. Eng.*, **3**, 275-295 (1975).
 - 21) **Priola, D. V.**: Intrinsic innervation of the canine heart. Effects on conduction in the atrium, atrioventricular node, and proximal bundle branch. *Circ. Res.*, **47**, 74-79 (1980).
 - 22) **Matsuda, K., Hoshi, T. & Kameyama, S.**: Action potential of the atrio-ventricular node (Tawara). *Tohoku J. Exp. Med.*, **68**, 8-9, (1958).
 - 23) **Bailey, J. C., Greenspan, K., Elizari, M. V., Anderson, G. J. & Fisch, C.**: Effects of acetylcholine on automaticity and conduction in the proximal portion of the His-Purkinje specialized conduction system of the dog. *Circ. Res.*, **30**, 210-216 (1972).
 - 24) **Levy, M. N., Martin, P. J., Iano, T. & Zieske, H.**: Effects of single vagal stimuli on heart rate and atrioventricular conduction. *Am. J. Physiol.*, **218**, 1256-1262 (1970).
 - 25) **Bredikis, J., Bukauskas, F. & Veteikis**: Decreased intercellular coupling after prolonged rapid stimulation in rabbit atrial muscle. *Circ. Res.*, **49**, 815-820 (1981).
 - 26) **Hunter, P. J., McNaughton, P. A. & Noble, D.**: Analytical models of propagation in excitable cells. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **30**, 99-144 (1975).
 - 27) **大塚長康**: 刺激伝導系の光学顕微鏡および組織化学的所見(佐野豊美編), 刺激伝導系, 1~23頁, 医学書院, 東京, 1974.
 - 28) **河村慧四郎**: 刺激伝導系の電子顕微鏡所見(佐野豊美編), 刺激伝導系, 23~50頁, 医学書院, 東京, 1974.
 - 29) **George, W. J., Wilkerson, R. D. & Kadowitz, P. T.**: Influence of acetylcholine on contractile force and cyclic nucleotide levels in the isolated perfused rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **184**, 228-235 (1973).

Electrophysiological Analyses of Negative Chrono- and Dromotropic Actions of Acetylcholine in the Atrioventricular Node Shuichi Hiromasa, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., **94**, 298—310 (1985)

Key words atrioventricular node, acetylcholine, action potential, membrane current

Abstract

To investigate the mechanisms of negative chrono- and dromotropic effects of acetylcholine (ACh) on the atrioventricular node, spontaneous or driven action potentials and membrane ionic currents were recorded using microelectrode and voltage clamp techniques. ACh started to exert a negative chronotropic effect at 10^{-8} M by reducing the rate of diastolic depolarization. At 10^{-7} M, ACh increased the maximal diastolic and the take-off potential to the same extent, and increased the maximal rate of depolarization. At higher concentrations, the negative chronotropic effect of ACh was further exaggerated in a dose dependent manner. This led to a cessation of automatic activities due to a marked membrane hyperpolarization at the concentrations of 10^{-6} M. In driven action potentials, ACh this concentration reduced the maximal rate of depolarization, suggesting a reduction of the slow inward current by ACh. In the presence of 10^{-5} M ACh, atropine started to depolarize the membrane at 10^{-8} M, and restored spontaneous firing at 10^{-7} M. The control firing rate was attained at 10^{-6} M. Similar anticholinergic action of atropine was shown at 10^{-9} M and 10^{-8} M as a parallel shift of the dose response curve between ACh concentration (10^{-8} — 10^{-4} M) and spontaneous firing frequency to higher ACh concentrations. By passing a hyperpolarizing current intracellularly through the microelectrode, the decay of the electrotonic potential was recorded to determine the space constant. ACh at 10^{-6} M decreased this constant from $625 \pm 120 \mu\text{m}$ to $420 \pm 96 \mu\text{m}$. Voltage clamp studies using the double microelectrode method revealed that ACh at 10^{-6} M opened an outward directed ACh channel on depolarization. This ACh current showed a relaxation phenomenon. The slow inward current was reduced by $22 \pm 12\%$. A higher ACh level of 10^{-5} M increased the ACh current, shifted the holding current outward and reduced the slow inward current by $46 \pm 18\%$. These results suggest that (1) the negative chronotropic effect of ACh is caused by a reduction of the rate of diastolic depolarization, which is mainly attributed to an activation of the ACh channel and partly to a reduction of the slow inward current, (2) the negative dromotropic effect of ACh is caused by an increased difference between the maximal diastolic potential and the take-off potential, by an impairment of electrical cell-to-cell coupling and by a reduction of the slow inward current, and that (3) the atrioventricular node possesses abundant muscarinic receptors, against which atropine shows a competitive antagonistic action.