



SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF $[Na^+]_i$ AND Ca^{2+} TRANSIENTS IN AN ISOLATED MYOCYTE : EFFECTS OF STROPHANTHIDIN

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 寺田, 肇 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1479

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 202号	学位授与年月日	平成 7年 3月 3日
氏 名	寺 田 肇		
論文題目	<p>SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF $[Na^+]_i$ AND Ca^{2+} TRANSIENTS IN AN ISOLATED MYOCYTE: EFFECTS OF STROPHANTHIDIN (単一心筋細胞における細胞内 Na^+濃度と Ca^{2+}トランジェントの同時測定：ストロファンチジンの効果)</p>		

博士(医学) 寺 田 肇

論文題目

SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF $[Na^+]_i$ AND Ca^{2+} TRANSIENTS IN AN ISOLATED MYOCYTE: EFFECTS OF STROPHANTHIDIN

(単一心筋細胞における細胞内 Na^+ 濃度と Ca^{2+} トランジェントの同時測定：ストロファンチジンの効果)

論文の内容の要旨

【目的】心筋細胞において細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は、 Na^+/Ca^{2+} 交換機構を介して相互に関連しているが、同一細胞において $[Na^+]_i$ と、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と下降 (Ca^{2+} トランジェント) を測定した報告はない。我々は、ジギタリス剤投与時の陽性変力作用および中毒作用出現時の $[Na^+]_i$ と Ca^{2+} トランジェントの関連を検討する目的で、 Na^+ 感受性蛍光指示薬の SBFI と Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬の fluo-3 を用いて、細胞拍動中の $[Na^+]_i$ と Ca^{2+} トランジェントを測定した。

【方法】モルモットの心臓をコラゲナーゼ添加 HEPES 緩衝溶液でランゲンドルフ灌流し、単一心室筋細胞を分離した。SBFI/AM ($40 \mu M$) と fluo-3/AM ($20 \mu M$) を同時負荷した細胞を 1 Hz で刺激し、340nm と 380nm で励起時の 510nm の蛍光強度比を用いて、 $[Na^+]_i$ を *in vivo* 較正曲線より算出した。また、490nm で励起時の 540nm での蛍光強度を指標として Ca^{2+} トランジェントを測定した。SBFI と fluo-3 の蛍光信号は、光電子増倍管を用いて各々 5 m秒と 2 m秒の取得速度でコンピュータに取り込んだ。

【結果】(1) SBFI 単独負荷群と fluo-3 同時負荷群における $[Na^+]_i$ の *in vivo* 較正曲線には差を認めなかった。また、同時負荷群において、 $[Ca^{2+}]_i$ の指標となる 490nm で励起時の蛍光強度は、 $[Na^+]_i$ の変化により影響を受けなかった。一方、細胞収縮に伴う $[Na^+]_i$ の motion artifact は、刺激に同期させた 340nm と 380nm で励起時の蛍光強度比を算出することにより除去された。また、細胞収縮時の $[Ca^{2+}]_i$ の変化による $[Na^+]_i$ 測定への干渉は、 Ca^{2+} トランジェントの収縮期と拡張期の 340nm と 380nm で励起時の蛍光強度比に有意の差を認めないことより、無視できると考えられた。(2) 1 Hz で刺激時のストロファンチジン投与前の $[Na^+]_i$ は、 $8.0 \pm 0.7 mM$ ($n=21$, 平均 SE) であった。低濃度のストロファンチジン ($1 \mu M$) の灌流では、不整脈は誘発されず、 $[Na^+]_i$ の増加に伴い拡張期の $[Ca^{2+}]_i$ 、 Ca^{2+} トランジェントの振幅は共に増加した。高濃度のストロファンチジン ($10 \mu M$) の投与初期には、 $[Na^+]_i$ 、拡張期の $[Ca^{2+}]_i$ 、 Ca^{2+} トランジェントの振幅は平行して増加した。しかし、不整脈の出現後には、 $[Na^+]_i$ と拡張期の $[Ca^{2+}]_i$ の増加は持続したが、 Ca^{2+} トランジェントの振幅は減少した。

【考案】SBFI と fluo-3 を同時負荷した細胞と、時間分解能に優れた光電子増倍管を用いることにより、 $[Na^+]_i$ と Ca^{2+} トランジェントを同一細胞において連続的に測定することが初めて可能となった。ジギタリス剤の強心作用は、 Na^+/K^+ -ATPase の阻害による $[Na^+]_i$ 上昇が Na^+/Ca^{2+} 交換機構を介して $[Ca^{2+}]_i$ を増加させることによるとされるが、活動電位持続時間の延長等の $[Na^+]_i$ に非依存性の機序によるとの報告もある。今回の我々の検討では、低濃度のストロファンチジンは $[Na^+]_i$ と Ca^{2+} トランジェントを同様の時間経過で増加させた。一方、高濃度のストロファンチジンは $[Na^+]_i$ をさらに増加させたが、不整脈の出現に伴い Ca^{2+} トランジェントの振幅は減少した。 Ca^{2+} 過負荷時の

$[\text{Na}^+]_i$ と Ca^{2+} トランジェントの振幅の解離は、収縮期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構のみでなく、筋小胞体等の因子により調節されるためと考えられた。一方、拡張期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介して $[\text{Na}^+]_i$ により直接調節されると考えられた。

論文審査の結果の要旨

心筋の活動には細胞内の Ca イオンが中心的な役割を果たしているが、他のイオンもやはり重要な働きをしており、心筋細胞の生理と病理を理解するにはそれらのダイナミックスを共に知る必要がある。特に細胞内 Na イオン濃度は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介して Ca イオン濃度とカップルしていると考えられるが、実際に両イオン濃度がどのように変動するのかについては、それぞれ別の方法による独立の測定がなされてきたのみで、イオン間のカップリングを実際に解析できるほどの直接的な測定はなされなかった。

申請者は、 Na^+ 感受性蛍光指示薬 SBF1 と Ca^{2+} 感受性蛍光指示薬 fluo-3 を単離心筋細胞に同時負荷することにより、その細胞内 Na^+ 濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を同時に測定する方法を開発した。それによって拍動中の心室筋細胞における、強心配糖体の陽性変力作用と中毒作用の解析をおこない、これまでの単独測定から想像されていたことを実際に証明した。

実験標本として、モルモットの心臓をコラゲナーゼ添加 HEPES 緩衝溶液でランゲンドルフ灌流し、酵素処理で分離した単一心室筋細胞を用いた。SBFI/AM ($40\mu\text{M}$) と fluo-3/AM ($20\mu\text{M}$) を同時負荷し、それぞれの蛍光強度を、光電子増倍管を用いて 5 ミリ秒と 2 ミリ秒の間隔で記録した。細胞を 1 Hz で刺激し、340nm と 380nm で励起した時の 510nm における 2 つの蛍光強度の比を用いて $[\text{Na}^+]_i$ を求めた。また、490nm で励起した時の 540nm での蛍光強度を用いて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とそのトランジェントを測定した。

申請者は先ず本法の信頼性の検定のために、1) SBF1 と fluo-3 の両蛍光指示薬の干渉の有無、2) 蛍光指示薬の細胞内小器官への取り込みによる誤差、3) 励起光による蛍光強度の減衰の程度、4) 細胞拍動に起因する動きの信号の混入を調べた。その結果はいずれも、拍動する同一心室筋細胞からの $[\text{Na}^+]_i$ と Ca^{2+} トランジェントの連続的測定が正確にできることを保証するものであった。

次に強心配糖体の効果を調べた。1 Hz で刺激時のストロファンチジン投与前の $[\text{Na}^+]_i$ の値として、 $8.0 \pm 0.7\text{mM}$ を得た。低濃度 ($1\mu\text{M}$) のストロファンチジンの灌流では、 $[\text{Na}^+]_i$ の増加に伴い拡張期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、 Ca^{2+} トランジェントの振幅は共に増加した。高濃度 ($10\mu\text{M}$) のストロファンチジンの投与初期には、 $[\text{Na}^+]_i$ 、拡張期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、 Ca^{2+} トランジェントの振幅は平行して増加した。しかし、不整脈の出現後には、 $[\text{Na}^+]_i$ と拡張期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は持続したが、 Ca^{2+} トランジェントの振幅は減少した。

強心配糖体の強心作用は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ の阻害による $[\text{Na}^+]_i$ の増加が $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介し $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させることによるとされているが、 $[\text{Na}^+]_i$ に非依存性の機序によるとの説もある。申請者らの結果によって、拡張期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は不整脈の有無にかかわらず $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介して $[\text{Na}^+]_i$ により直接調整されることが実証的に示された。さらに、 Ca^{2+} 過負荷時の $[\text{Na}^+]_i$ と Ca^{2+} トランジェントの振幅の解離は、収縮期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換のみでなく筋小胞体等の因子によっても調節されていることを示す。不整脈発生後の $[\text{Na}^+]_i$ と拡張期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加率の増大は、不整脈発生に伴う Na^+ 流入の増加により拡張期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ がさらに増加するという悪循環が形成される可能性を示し、この研究によって心筋障害の病態の理解が進んだことが評価できる。

申請者の発表に対して次のような質疑がおこなわれた。

- 1) Ca 電流と Ca^{2+} トランジェントが一致しない理由は何か
- 2) 心筋細胞の収縮に伴う $[\text{Na}^+]_i$ の変化は記録できないか
- 3) ストロファンチジン投与後の $[\text{Na}^+]_i$ 上昇に対して、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が遅れて生ずるのはなぜか
- 4) 筋小胞体からの Ca^{2+} 放出は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ のどのような範囲で起るのか
- 5) 筋小胞体の Ca^{2+} が枯渇したとき CIF ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増大因子) が現れるか
- 6) 筋小胞体の Ca ポンプに対するストロファンチジンの効果はあるか
- 7) リアノジンで筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が引き起こせるか
- 8) ジギタリス中毒の不整脈とプログラム刺激による不整脈では Ca^{2+} トランジェントの低下に差があるか
- 9) $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の同時測定により不整脈の前兆を知ることはできないか
- 10) Kイオン濃度の変化は測定可能か
- 11) 本法における時間分解能の改善法はあるか

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適当であり、研究内容も博士（医学）の学位論文にふさわしいものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	寺 川	進			
	副査	教授	中 島	光 好	副査	教授	平 光 忠 久
	副査	教授	森 田	之 大	副査	講師	田 港 朝 彦