



CYTOSOLIC Ca^{2+} CONCENTRATION AND pH OF DIABETIC RAT MYOCYTES DURING METABOLIC INHIBITION

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: 野田, 直久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/999

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	医博第 146号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏 名	野 田 直 久		
論文題目	CYTOSOLIC Ca^{2+} CONCENTRATION AND pH OF DIABETIC RAT MYOCYTES DURING METABOLIC INHIBITION (代謝阻害時における糖尿病ラットの心室筋細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 pH)		

医学博士 野田直久

論文題目

CYTOSOLIC Ca^{2+} CONCENTRATION AND pH OF DIABETIC RAT MYOCYTES DURING METABOLIC INHIBITION

(代謝阻害時における糖尿病ラットの心室筋細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 pH)

論文の内容の要旨

糖尿病心筋の虚血に対する抵抗性に関しては、未だ一致した結論は得られていない。近年、虚血時の細胞障害における Ca^{2+} 代謝異常及び細胞内 pH (pHi) の関与が示唆されているが、糖尿病心筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) と pHi を同時に測定した報告はない。今回、画像解析装置を用いた蛍光色素法により、糖尿病ラットの単離心室筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と pHi を同時に測定した。虚血類似の条件として酸化的磷酸化を阻害するシアン化ナトリウム (NaCN) を添加し、糖尿病ラットの心室筋細胞に対する影響を観察すると同時に、NaCN 添加時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と pHi を測定し、虚血時の細胞障害との関連について検討した。

【方法】

- 1) 糖尿病ラットの作成及び単離心室筋細胞の分離：ストレプトゾトシン (45mg/kg) 静注後 8 週間の糖尿病ラット (DM 群) 及び対照ラット (対照群) の心室筋細胞をコラゲナーゼを用いてランゲンドルフ法により分離した。
- 2) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と pHi の測定：心室筋細胞に Fura-2/AM (5 μM) 及び 2,7-Bis-carboxyethyl-5 (6)-carboxyfluorescein (BCECF)/AM (0.5 μM) を 40 分間同時に負荷した。340/380nm で励起時の蛍光強度比より $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を、490/450nm で励起時の蛍光強度比より pHi を、高感度テレビカメラ (SIT カメラ) 及び画像解析装置 (ARGUS-100: 浜松ホトニクス社製) を用いてそれぞれ算出した。
- 3) 細胞形態の検討：NaCN (2 mM) 投与後に全細胞にしめる非拘縮細胞の比率を算出し、細胞障害の指標とした。

【結果】

- 1) 酸素化クレブス液灌流時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、DM 群では $53 \pm 3 \text{ nM}$ (Mean \pm S.E., $n=61$) と、対照群の $75 \pm 5 \text{ nM}$ ($n=36$) に比し有意に低値であった ($p < 0.01$)。pHi は DM 群で 7.06 ± 0.02 、対照群で 7.07 ± 0.02 と、両群間で有意差を認めなかった。
- 2) (a) グルコース非存在下での、2mM の NaCN 灌流 30 分後の非拘縮細胞の比率は、DM 群では NaCN 前の 53%、対照群では 52% と、両群間で有意差を認めなかった。NaCN 添加後に拘縮した細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、DM 群では $172 \pm 21 \text{ nM}$ 、対照群では $421 \pm 106 \text{ nM}$ と、いずれも NaCN 添加前に比し有意に上昇したが、DM 群で対照群に比し有意に低値であった ($p < 0.05$)。NaCN 添加後に拘縮した細胞の pHi は、いずれも有意に低下したが、両群間に有意差を認めなかった。
- (b) 50mM グルコースの添加により、NaCN 灌流後の非拘縮細胞の比率は、対照群で 95% と改善した

のに比し、DM 群では改善を認めなかった。

(c) DM 群において、インスリン (25mU/ml) と15mM グルコースの添加により、NaCN 灌流後の非拘縮細胞の比率は、88%と有意に改善した。

3) 高濃度 Ca^{2+} 液 (24.5mM) 灌流により細胞が短縮または拘縮した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、DM 群で有意に低値であった [短縮時; 対照群: $389 \pm 34 \text{ nM}$ 、DM 群: $208 \pm 27 \text{ nM}$ ($p < 0.01$)、拘縮時; 対照群: $669 \pm 135 \text{ nM}$ 、DM 群: $344 \pm 69 \text{ nM}$ ($p < 0.05$)]。

【考察及び結論】

Dhallaらにより、糖尿病性心筋症の発症における Ca^{2+} 過負荷の関与が示唆されている。一方、Bergh らにより糖尿病心筋における Ca^{2+} 流入の低下が報告されているが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を直接測定した報告はない。今回の検討では、非刺激時において、糖尿病の心室筋細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が対照群に比し有意に低値であり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の低下が糖尿病性心筋症の収縮力低下と関連していることが示唆された。NaCN 灌流時の細胞拘縮率は、グルコース非存在下では両群に有意差を認めなかったが、対照群ではグルコースの添加により、また、糖尿病群ではインスリンとグルコースの添加により、それぞれ抑制された。このような両群の NaCN に対する反応性の差は、糖尿病心筋におけるグルコース利用能の低下に基づくことが示唆された。また、糖尿病心筋ではより軽度の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇によって不可逆的な細胞障害を生じることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 pH の変動及びその変動と細胞障害の1つの指標と考えられる細胞形態の変化との関連を、単離心室筋細胞を用いて糖尿病ラットと正常ラットの心室筋細胞で比較したものである。特に虚血状態にしたときに明らかな違いがあることを見いだした点が新しい知見である。

方法としては、細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 pH は浜松ホトニクス社製画像解析装置を用い、糖尿病ラットはストレプトゾトシン静注後8週間のものを使用した。細胞単離はコラゲナーゼで、虚血状態はシアン化ナトリウム添加により作成した。細胞形態変化は、rod、short、round の3形に分けた。

その結果、非刺激下では、細胞内 Ca^{2+} 濃度は糖尿病では低下している。一方、細胞内 pH には差は認められなかった。この細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下は糖尿病での収縮力低下の原因であることを示唆する。又、糖尿病ではわずかな細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加で細胞が round 状に変化し容易に障害を起こすことを示した。虚血状態になると細胞は round 状に変化するが、それを防ぐためには、正常心室筋細胞ではグルコースのみの添加でよいが、糖尿病の心室筋細胞では、グルコースにインスリンを加えないと抑制されない。このことから糖尿病心筋ではグルコース利用能が低下していると推察している。

以上の論文内容につき審査員より次のような質問がなされた。

1. ストレプトゾトシンで糖尿病のできるメカニズム
2. ストレプトゾトシン静注8週後のラットを用いた理由

3. 糖尿病の重症度が変わるとどうか
4. 細胞の拘縮と虚血の相関
5. 細胞形態の変化は Ca^{2+} 流入の原因か結果か
6. 蛍光色素 indo-1 の特色
7. グルコース添加溶液が高張になるがその影響はないか
8. 実験に要する時間
9. 糖尿病心室筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度か低い理由
10. pH の測定限界
11. 自然発症糖尿病ラットではどうか
12. この実験の臨床への応用の可能性
13. グルコースそのものが心室筋細胞内 Ca^{2+} 濃度、pH に変化を与えないか

これらの質問に対し申請者の回答は適切であり、問題点も充分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 中 島 光 好

副査 教授 原 田 幸 雄 副査 教授 平 光 忠 久

副査 助教授 上 里 忠 良 副査 助教授 田 港 朝 彦