

REGULATION OF [Na⁺] i AND [Ca²⁺] i IN
GUINEA PIG MYOCYTES –STUDY BY
DUAL-LOADING OF FLUORESCENT
INDICATORS SBF1 AND FLUO-3–

メタデータ	言語: en 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: 佐藤, 洋 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1026

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 173号	学位授与年月日	平成 6年 3月25日
氏名	佐藤 洋		
論文題目	<p>REGULATION OF $[Na^+]_i$ AND $[Ca^{2+}]_i$ IN GUINEA PIG MYOCYTES - STUDY BY DUAL-LOADING OF FLUORESCENT INDICATORS SBFI AND FLUO-3 - (モルモット心筋細胞内ナトリウム、カルシウム濃度の調節機構— 蛍光色素 SBFI と fluo-3 の同時負荷法による検討—)</p>		

医学博士 佐藤 洋

論文題目

REGULATION OF $[Na^+]_i$ AND $[Ca^{2+}]_i$ IN GUINEA PIG MYOCYTES -STUDY BY DUAL-LOADING OF FLUORESCENT INDICATORS SBFI AND FLUO-3 -

(モルモット心筋細胞内ナトリウム、カルシウム濃度の調節機構-蛍光色素 SBFI と fluo-3 の同時負荷法による検討-)

論文の内容の要旨

〔目的〕

心筋細胞において、細胞内の Na^+ と Ca^{2+} は、電気生理学的のみならず、代謝面でも重要な役割を演じている。近年、心筋のジギタリス中毒や虚血/再灌流傷害において、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇による Ca^{2+} 過負荷が、細胞傷害の原因として重要であると考えられている。細胞傷害における Ca^{2+} 流入の経路として細胞膜の Na^+/Ca^{2+} 交換が重要視されており、細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) と Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の同一細胞における測定は、病態の解明に役立つことが予想される。 $[Na^+]_i$ や $[Ca^{2+}]_i$ の測定には、生化学的方法、イオン選択性電極法、NMR 法などが用いられてきたが、間接的な測定であったり、細胞に対して侵襲的であるなどの理由で、単離細胞での測定には適していない。一方、蛍光色素法により、細胞レベルのイオン濃度を速やかに、また経時的に測定することが可能である。我々は Na^+ 感受性蛍光指示薬の SBFI と Ca^{2+} 感受性の fluo-3 の同時負荷法により $[Na^+]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ を測定し、ジギタリス剤の一種であるストロファンチジン (strophanthidin : Str.) 灌流時の変化より、単離心筋細胞における $[Na^+]_i$ 及び $[Ca^{2+}]_i$ の調節機構を検討した。

〔方法〕

コラゲナーゼにより分離したモルモットの心室筋細胞に $5 \mu M$ の SBFI/AM と $10 \mu M$ の fluo-3/AM を加え、室温で30分間負荷した。倒立顕微鏡と落射蛍光装置及び細胞内イオン濃度解析装置を使用し、 $[Na^+]_i$ は $340/380nm$ の波長で励起時の $510nm$ での蛍光像を、 $[Ca^{2+}]_i$ は $500nm$ で励起時の $540nm$ での蛍光像をダイクロイックミラーを交換することで求め、細胞形態の変化とともに観察した。 $[Na^+]_i$ の較正曲線は、 $10 \mu M$ のグラミジンにより $[Na^+]_i$ を任意の濃度に変化させ、各々の $340/380nm$ での蛍光比を計算して作成した。 $[Ca^{2+}]_i$ はコントロールの蛍光強度との%変化を用いたが、細胞形態の変化による影響は $360nm$ での蛍光強度により補正した。

〔結果〕

(1) 同時負荷法の検討

$[Na^+]_i$ を $5-30mM$ に変化させた時の $340/380nm$ での蛍光比は、同時負荷法を行った細胞群と SBFI を単独で負荷した群で差を認めなかった。また、 $500nm$ で励起した fluo-3 の蛍光強度も同時負荷群と単独負荷群の間で差を認めなかった。

(2) ストロファンチジン (Str.) の作用

- (a) 用量依存性：40分間の $10, 100, 500 \mu M$ の Str. 灌流により細胞膜の Na^+/K^+ ポンプを阻害すると、 $[Na^+]_i$ は、コントロールの $7.9 \pm 0.4 mM$ (平均 \pm SE) からそれぞれ $10.4 \pm 1.7, 16.7 \pm 1.4, 19.6 \pm 1.8 mM$ に濃度依存性に上昇した。 $[Ca^{2+}]_i$ は、 $10 \mu M$ ではコントロールの $102 \pm 7\%$ と変化はなく、 $100, 500 \mu M$ ではそれぞれ $193 \pm 50, 361 \pm 69\%$ と有意に上昇した ($p < 0.01$)。

- (b) 時間経過：500 μ M の Str. 灌流時には、 $[\text{Na}^+]_i$ は5分後から上昇し、50分後にはコントロールの 6.6 ± 0.6 mM から 20.2 ± 1.6 mM に達した。 ($n=20$, $p<0.01$)。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は初期の20分間は変化せず、 $[\text{Na}^+]_i$ が充分上昇した25分後より上昇しはじめ、50分後にコントロールの $447 \pm 81\%$ に達した ($p<0.01$)。また、20個中10個 (50%) の細胞は自動収縮運動をおこした後に拘縮した。
- (c) $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の相関：Str. 灌流中は $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇の間には相関が認められたが、細胞が自動収縮運動をおこすと $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急速に上昇し、 $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関係に解離が生じた。この解離は筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の阻害薬であるライアノジン (1 μ M) の投与により軽減した。

(3) $[\text{Na}^+]_i$ の調節

細胞内への Na^+ の流入経路としては、①電位依存性 Na^+ チャネル、② $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送路、③ Na^+/H^+ 交換機構が考えられる。①、②の阻害剤であるテトロドトキシン (10 μ M) とブメタナイド (10 μ M) は Str. 灌流時の $[\text{Na}^+]_i$ の上昇に影響を与えなかったが、③の阻害剤であるヘキサメチレンアミロライド (HMA、1 μ M) は $[\text{Na}^+]_i$ の上昇を抑制した ($p<0.01$)。

(4) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の調節

Str. 灌流時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇と細胞拘縮は、HMA により、 $[\text{Na}^+]_i$ の上昇を抑えた時、無 Ca^{2+} 含有液の灌流時、または $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を阻害するニッケルイオン (5 mM) の灌流時に抑制された。 ($p<0.01$)。

【考察及び結語】

1. SBFI と fluo-3 の同時負荷法により、単離心室筋細胞の $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の同時測定が可能であった。
2. Str. 灌流が用量、時間依存性に $[\text{Na}^+]_i$ を上昇させたことと、HMA により $[\text{Na}^+]_i$ の上昇が抑制されたことにより、 $[\text{Na}^+]_i$ は Na^+/K^+ ポンプによる Na^+ 排出と Na^+/H^+ 交換を介する Na^+ の流入のバランスにより決定されることが示された。
3. Str. 灌流時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、 $[\text{Na}^+]_i$ の充分な上昇と細胞外 Ca^{2+} の存在が必要であり、またニッケルイオンにより抑制されたことから、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を介する Ca^{2+} の流入が重要であることが示唆された。
4. 細胞が自動収縮運動を起こすと $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急速に上昇し、 $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の間に解離が生じたことと、ライアノジンの投与が解離を軽減させたことより、筋小胞体からの Ca^{2+} の遊出が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 過負荷と細胞傷害を促進させることが示唆された。

以上により心筋細胞の $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の調節において細胞膜の Na^+/K^+ ポンプ、 Na^+/H^+ 交換、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換と筋小胞体に関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

心筋のジギタリス中毒や虚血/再灌流時に細胞内 Ca^{2+} の過剰が問題視されている。細胞膜を通る Ca^{2+} の経路には、 Ca^{2+} チャネル、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換、 Ca^{2+} ポンプなどがあるが、この中では $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を介する Ca^{2+} の流入や排出は細胞内 Na^+ の濃度によって制御されている。単離細胞における Na^+ 、 Ca^{2+} の濃度変化に対する病態や、薬による影響については数多くの報告がある。しかし、これらは全て別個に測定されたものであり、 Na^+ と Ca^{2+} 濃度を同時に測定したものはない。 Na^+ と

Ca²⁺の細胞内濃度変化を同時に測定すれば、膜のイオン制御機構の解明により役立つことは明らかである。

(対象及び方法)

申請者はこれにチャレンジし、蛍光色素法を用いて、経時的にモルモット単離心筋細胞のNa⁺、Ca²⁺濃度を測定した。Na⁺濃度の測定には、sodium-binding benzofuran isophthalate/AM、Ca²⁺濃度の測定には fluo-3/AM を同時に負荷した。

(結果)

蛍光色素の単独使用の場合と比較して、色素間、Na⁺、Ca²⁺の濃度変化の間に相互作用はないことが判明した。そこで、この方法を用いてジギタリス中毒量でNa⁺-K⁺ATPaseを抑制した時の細胞内イオン濃度変化を解析し、(1)細胞内Na⁺濃度はNa⁺-K⁺ポンプによるNa⁺排出とNa⁺/H⁺交換を介するNa⁺流入のバランスにより決定される。(2)Ca²⁺濃度の上昇はNa⁺濃度の充分な上昇と細胞外Ca²⁺の存在が必要であり、特にNa⁺/Ca²⁺交換を介するCa²⁺の流入が必要である。(3)更に筋小胞体からのCa²⁺の遊出がCa²⁺過負荷と細胞傷害を促進させることを示唆する結果を得た。

(結論)

これらの実験方法、結果、考察について、次の様な質問がなされた。

- 1) 使用した蛍光色素の細胞毒性
- 2) 蛍光色素を高濃度に用いた場合の収縮能への影響
- 3) 細胞内イオン濃度の分布
- 4) Strophanthidin のwashout の可能性
- 5) Na⁺とCa²⁺の濃度変化の解離におけるNa⁺/Ca²⁺交換の役割
- 6) 静止時と活動時のイオン変動に働く膜のチャンネル
- 7) 膜のチャンネル数測定の可能性
- 8) Ca²⁺ induced Ca²⁺ release のメカニズム
- 9) 細胞の自動収縮に対する筋小胞体からのCa²⁺放出の関与
- 10) Fura-2 と fluo-3 の長所と短所
- 11) 膜電位とNa⁺/Ca²⁺交換の関連
- 12) ペースメーカー細胞でのイオン濃度の調節
- 13) 細胞死の判別法

以上の質問に対する解答は概ね適切であり、本論文は単離細胞でのNa⁺、Ca²⁺の濃度を同時に測定し、それらの動態を明らかにした、博士(医学)にふさわしい価値ある論文であると審査員一同が判定した。

論文審査担当者	主査	教授	中島	光好			
	副査	教授	寺川	進	副査	教授	原田幸雄
	副査	教授	森田	之大	副査	助教授	菱田明