

Effects of Strophanthidin on Intracellular Ca²⁺ Concentration and Cellular Morphology of Guinea Pig Myocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮田, 晴夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1351

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 74号	学位授与年月日	平成 元年 9月 8日
氏名	宮田晴夫		
論文題目	Effects of Strophanthidin on Intracellular Ca^{2+} Concentration and Cellular Morphology of Guinea Pig Myocytes (ストロファンチジンのモルモット単一心室筋細胞内カルシウム濃度および形態への影響)		

医学博士 宮田 晴夫

論文題目

Effects of Strophanthidin on Intracellular Ca^{2+} Concentration and Cellular Morphology of Guinea Pig Myocytes

(ストロファンチジンのモルモット単一心室筋細胞内カルシウム濃度および形態への影響)

論文の内容の要旨

【目的】心筋において細胞内遊離カルシウムイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は、興奮・収縮連関、代謝調節等種々の細胞機能において重要な役割をはたしていると考えられているが、弛緩時には 10^{-7} M あるいはそれ以下とされ、その測定は困難であった。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はエネルギーを利用して低濃度に維持されているが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の異常上昇、すなわち Ca^{2+} 過負荷 (Ca^{2+} overload) は、ジギタリス中毒・カテコラミン心筋障害・虚血/再灌流障害および心筋症等各種の病態において重要な因子と考えられている。近年、R. Y. Tsien 等が開発した新しいカルシウム蛍光指示薬 (fura-2) は、細胞内注入を要さないため、単一心室筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を生理的な状態で測定可能であると報告している。そこで著者らは、fura-2 と超高感度テレビカメラを使用し、ストロファンチジン (Str) 投与時のモルモット単一心室筋細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞形態との関連を検討した。

【方法】モルモットの心臓をランゲンドルフの灌流装置を用いて酵素法により単一心室筋細胞を分離し、fura-2 AM (acetoxymethyl ester) $5 \mu\text{M}$ を 37°C で 40 分間負荷した後、倒立顕微鏡のステージに実験槽を置き $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ で飽和した Krebs 液を灌流し、正常形態を示す桿状細胞を選択して実験した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は、倒立顕微鏡、落射蛍光装置、超高感度テレビカメラ、細胞内 Ca^{2+} 濃度解析装置 (ARGUS: 浜松ホトニクス社製)、ビデオデッキを使用し、 340 nm と 380 nm で励起した時の蛍光強度の比より校正曲線を用いて求めた。

【結果】〔1〕Str 投与時の細胞形態と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化: (a) 桿状細胞 ($n = 15$) は Str ($10 \mu\text{M}$) 投与 35 分後、40% が拘縮をきたし、一方 Str ($100 \mu\text{M}$) 投与群 ($n = 15$) では 60% が拘縮し、濃度依存性に減少した。(b) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の経時変化: Str ($10 \mu\text{M}$) 投与群では 10 分後 $120 \pm 19 \text{ nM}$ (mean \pm SE)、20 分後 $240 \pm 85 \text{ nM}$ と投与前の $73 \pm 6 \text{ nM}$ に比し上昇した。Str ($100 \mu\text{M}$) 投与群では $69 \pm 5 \text{ nM}$ から、投与 5 分後 $170 \pm 40 \text{ nM}$ ($p < 0.05$)、10 分後 $204 \pm 45 \text{ nM}$ ($p < 0.01$)、20 分後 $411 \pm 141 \text{ nM}$ に上昇した。

〔2〕細胞形態と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関連: (a) 短縮時 $382 \pm 51 \text{ nM}$ 、拘縮直前 $461 \pm 86 \text{ nM}$ 、拘縮時 $784 \pm 103 \text{ nM}$ と形態の変化とともに有意に漸増した ($p < 0.01$)。 (b) 自動収縮運動を認めた細胞の蛍光像で " Ca^{2+} wave" を認め、その直前の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $263 \pm 9 \text{ nM}$ であり、速度は約 $100 \mu\text{M}/\text{sec}$ であった。(c) 細胞長径の短縮率と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ との間に有意の相関関係 ($r = 0.77$, $p < 0.001$) を認めた。

〔3〕Ryanodine 投与の影響: (a) Ryanodine ($10 \mu\text{M}$) を 20 分間前処置後に、Str ($100 \mu\text{M}$) を投与した細胞の拘縮までの時間は、Str ($100 \mu\text{M}$) 単独投与群に比し有意の延長を認めた ($p < 0.05$)。

(b) Ryanodine 前投与群で自動収縮する細胞は認めなかった。

【考案】虚血・再灌流障害等種々の病態において細胞障害に Ca^{2+} overload の関与が考えられているが、心筋の細胞形態と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ について同時に検討した報告は少ない。従来は蛍光指示薬より蛍光が明るく、2 波長励起により細胞内蛍光色素量、形態変化に関係なく $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定が可能な fura-2 を用い、Str 投与時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と細胞形態を同時に観察した。静止心室筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、Str 投与により形態の変化とともに著明に上昇し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、細胞の自動収縮運動、短縮、拘縮と密接な関連を有することが示唆された。また、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を抑制する Ryanodine の前投与により拘縮までの時間が延長し、自動収縮運動が発現しなかったことよりジギタリス投与時の自動収縮運動、および拘縮において筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の関連が示唆された。

【総括】以上より Str 投与時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が心筋細胞の短縮、自動収縮運動、および拘縮と密接な関連を有し、Str 投与時の細胞障害および不整脈の発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ジギタリス中毒、虚血後再灌流障害、心筋症、カテコラミン心筋障害、不整脈などの病態では細胞内 Ca^{2+} の過負荷がしばしば認められる。しかし、細胞内 Ca^{2+} 濃度は著しく低いため、直接それを測定することは非常に困難であった。現在まで、細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は ^{45}Ca 、イオン選択性電極、Aequorin、Quin 2、Fura-2を用いる方法が行われているが、それぞれに長所、短所がある。

申請者は、細胞内注入の必要がなく、そのまま細胞内に取り込まれ、蛍光強度が強く測定が容易な蛍光指示薬のFura-2を用いる方法を選んだ。対象にはモルモット単一心室筋細胞を用いた。超高感度テレビカメラで、細胞形態と細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時に観察、測定することにより細胞内 Ca^{2+} 濃度との関連を検討した。薬物は、Strophanthidin 10 μM 、100 μM の二濃度を用いた。形態が、短縮、拘縮を起こすにつれて、細胞内 Ca^{2+} 濃度は著しく増大した。

筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を抑制するRyanodineを用いることにより拘縮までの時間が延長し、自動収縮運動が抑制された。これは、拘縮及び自動収縮運動が筋小胞体からの Ca^{2+} 放出に関連していることを示唆した。

以上の所見は、心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態に関する情報を明確にし、今後の各種心疾患の病態解明、治療法の開発に役立つものと考えられる。

なお審査員から、次の様な質問がなされた。

- (1) 細胞の形態変化で短縮したと認めたときの基準
- (2) 心筋細胞分離方法と心筋細胞選択
- (3) 本実験の時間経過
- (4) 具体的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の蛍光分析法
- (5) Mg^{2+} など二価イオンの影響
- (6) Strophanthidinの作用部位と $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ の存在部位
- (7) 細胞内 Ca^{2+} の局在が認定可能か
- (8) 不整脈の成因のうち、この方法で解析可能なものは何か
- (9) Ca拮抗薬の効果
- (10) ジギタリスが効かないラット心筋での反応
- (11) この実験法は心筋細胞以外どの様な組織に応用可能か

以上の質問に対し、申請者は明解な解答を行った。従って、本論文は医学博士の学位授与に相応しいものと全審査員が判断した。

論文審査担当者	主査	教授	中島光好			
	副査	教授	一瀬典夫	副査	教授	菅野剛史
	副査	教授	原田幸雄	副査	教授	森田之太