

氏 名 (本籍) 井 上 寛 一

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2 1 1 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 元 年 2 月 22 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 54 年 3 月
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Changes in intracellular free calcium during
ischemia in isolated rat ventricle
(虚血下におけるラット摘出心細胞内カルシウム
イオンの測定)

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教授 滝 島 任 教授 平 則 夫

教授 西 山 明 徳

論文内容要旨

【目 的】

心筋を虚血状態とするとまず発生張力が消失するが、さらに虚血が進行すると静止時張力が上昇を始める（虚血性拘縮）。この現象は臨床的には再灌流時の不可逆的な細胞障害の発生と関連づけられて注目されてきた。その機序としては高エネルギーリン酸の枯渇とともに細胞内カルシウム過負荷が考えられている。しかし、現在まで虚血心において細胞質内カルシウムイオン $[Ca]_i$ を経時的に測定し、その虚血性拘縮への関与を検討した報告はない。そこでカルシウムイオン指示薬である蛍光色素 fura 2 を用い、 $[Ca]_i$ の経時的な測定を、虚血下の摘出心にて試みた。さらに虚血下の左室圧と $[Ca]_i$ の変化を比較し虚血性拘縮の成立に対するカルシウム過負荷の関与を検討した。

【方 法】

成熟ラットより摘出した心臓を大動脈より逆行性に灌流、ランゲンドルフ標本とし、倒立顕微鏡上に設置、 $[Ca]_i$ と左室圧を拍動下にて測定した。 $[Ca]_i$ の測定は蛍光色素 fura 2 によった。fura 2/AM ($5 \mu\text{mol/L}$) および界面活性剤 Pluronic F127 (0.02%) を含む Tyrode 液 (Na 144mM, K 5mM, Cl 152mM, Mg 1.2mM, Ca 1.8mM, glucose 10mM, HEPES 5mM, pH=7.40, 37°C) で60分灌流し、fura 2を心室へ負荷した。fura 2/AMを含まない Tyrode 液にて20分 fura 2/AMを洗い出した後、2つの励起波 (340, 380nm) で左室下壁心外膜面を照射し、510nmでの蛍光強度を光電子増倍管にて計測した。得られた蛍光強度の比 (F340/380) を求めて *in vitro*の較正曲線より $[Ca]_i$ を算定した。fura 2の負荷は蛍光顕微鏡下の観察および低Na液 (Na 24mM) 3.5分灌流時の蛍光変化より確認した。左室圧は左室圧バルーンにより求めた。虚血下 (37°C) で、左室圧とともにF340/380を1分ごとに測定した。虚血下での自己蛍光によるF340/380への影響は色素を負荷しない対照心のF340/380との比較より判定した。

【結 果】

fura 2のとりこみ低Na灌流下の340nmおよび380nm励起蛍光強度の鏡像変化とF340/380の増大により確認した。また蛍光顕微鏡下でfura 2は心筋繊維にほぼ均一にとりこまれていることが確認できた。ラット拍動心の時間平均F340/380は 0.277 ± 0.078 で、標準較正曲線より求めた時間平均 $[Ca]_i$ 濃度は、 $420 \pm 120\text{nm}$ であった。次に心室を37°Cで60分間虚血とした。

F340/380は虚血後速やかに上昇し（第一相）、3分以内にほぼプラトー相に達した。その後、F340/380は再び徐々に上昇し、この上昇は虚血後60分までみられた（第二相）。一方、対照心の虚血下のF340/380は第一相の上昇を示し、虚血3分以降は一定の値を示した。従って虚血3分以降のF340/380の変化（第二相）は $[Ca]_i$ の上昇を反映していると考えられた。この第二相は虚血後 5.6 ± 0.6 分より始まり、虚血10分以降F340/380は有意の高値を示した。一方左室圧は虚血後 4.8 ± 0.8 分より上昇を始め（拘縮の発生）、虚血後 11.2 ± 2.2 分には圧は最大値に達した。拘縮の発生とF340/380第二相上昇開始の時間経過を比較すると、両者には密接な相関がみられたが（ $r=0.96$ ）、前者の開始は後者の開始に有意に先行して観察された（ $p<0.05$ ）。

【考 察】

今回蛍光色素fura 2を用いて冠灌流摘出心の $[Ca]_i$ 変化を初めて観察し得た。 $[Ca]_i$ は多くの細胞内反応の調節因子であり、心臓の種々の病態においてその動態に関心がもたれているが、これまで虚血心において $[Ca]_i$ を経時的に測定した報告は少ない。今回用いたfura 2による $[Ca]_i$ の観察は、これまで報告されている他の方法に比し、時間分解能に勝り、虚血下 $[Ca]_i$ 変化の時間経過を検討する上で優れた方法である。虚血後、 $[Ca]_i$ は左室圧とともに早期より上昇し始めるが、両者の時間経過を比較すると拘縮の発生は $[Ca]_i$ 上昇に有意に先行していた。このことより、虚血性拘縮の発生に対するカルシウム過負荷の関与は小さいと考えられた。また拘縮の発生と $[Ca]_i$ の上昇の始まりに密接な相関がみられることは、虚血時の $[Ca]_i$ 上昇の機序として拘縮による心筋細胞のstretchが、 $[Ca]_i$ 制御機構の破綻させる可能性を示唆すると考えられた。

審査結果の要旨

心筋が虚血にさらされる心筋梗塞、狭心症、開心術中などにおいて、心筋保護を図る治療法は、予後を改善すると期待されている。心筋保護法の開発のためには虚血における心筋細胞内の変化を明らかにし、心筋細胞の障害がどのような過程を経て不可逆的な状態に陥るかを検討する必要がある。このような不可逆過程の発生に細胞内自由カルシウムイオン濃度の上昇は重要な役割を果たすと推測されてきた。しかし、この上昇は単に細胞障害の結果にすぎないとする報告もなされ意見の一致をみていない。これらの報告の相違は心筋細胞に加える障害方法の差（虚血か低酸素あるいは代謝阻害剤の投与によるといった差）、カルシウムイオンの測定法の差（特に、その測定法が測定可能な濃度範囲、測定に要する時間の差）によると考えられる。学位申請者（以下、著者）は細胞障害を与える方法として冠動脈灌流ラット左心室標本において冠灌流を停止させることによって心室壁の虚血を作成した。壁内における心筋細胞内の自由カルシウム濃度は、他の方法に比べて静止期の細胞内カルシウム濃度変化に敏感なFura-2 蛍光法をもちいて測定した。この方法の問題点として1) 動脈灌流標本では色素の細胞内取り込みが少なく十分な蛍光光度が得られないこと、2) 虚血により自己蛍光が強まることが挙げられる。著者は適当なディタージョントを選択することにより第1の問題点を乗り越え、心室壁内心筋細胞の細胞内カルシウムイオン濃度の測定に成功している。

著者はFura-2 法においてカルシウム濃度を示すとされる340nm励起法による蛍光強度と380nm励起法による蛍光強度の比が、虚血開始直後に高まり、その後、ほぼ一定値を保ったのち、再び緩徐な上昇を示すことを観察した。一方、著者は、カルシウムイオン測定に対する心筋自己蛍光の効果を蛍光色素を投与しない標本に於て検討し、虚血開始直後に見られる信号の上昇は自己蛍光の上昇による効果が大いことを見た。しかし、自己蛍光がその後一定値を示すことを示し、信号の緩徐な上昇は心筋細胞内カルシウムイオン濃度変化を真に反映するものであることを示した。後にみられる再上昇を、同時に測定した心内圧の上昇（虚血による拘縮）の発生と比較すると、両者はほぼ同時に生ずるが、わずかに、しかし有意に拘縮の発生はカルシウムイオン濃度の上昇に先行していた。このように著者は虚血後、ある程度の時間をおいた後に観察される細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は拘縮の発生によって引き起こされることを示した。

以上のように心筋細胞虚血におけるカルシウムイオン濃度の変化を連続的に測定したこの報告は貴重であり学位授与に値すると考えられる。