

氏 名（本籍） 小 田 浩 司

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2762 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 7 年 3 月 8 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 61 年 3 月 31 日  
山形大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 Dynamic Response of Delayed  
Afterdepolarization to Intracellular Calcium  
Oscillation.

（細胞内カルシウム振動に対する遅延後脱分極の  
動的応答の研究）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 白 土 邦 男 教 授 西 山 明 徳

教 授 平 則 夫

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

遅延後脱分極 (DAD) は、活動電位が生じた後、完全に再分極した後に生じる膜電位の再上昇と定義され、不整脈の原因として重要である。細胞内カルシウムの自発的振動による一過性の内向き電流の発生がその発生機構とされている。筋小胞体より、カルシウムイオンが自発的に放出されると、接する隣の筋小胞体からのカルシウムイオン放出を誘発し、局所的なカルシウムイオン濃度の上昇は波の様に広がっていく。一点より生じてカルシウム濃度の高まりが、広がり伝播していくこの波を我々は、カルシウム波と呼んでいる。従来の報告は、筋小胞体より放出されたカルシウムイオンの広がりの増加、すなわち、ある瞬間に細胞内カルシウム上昇にさらされた膜の面積が DAD の振幅を決定すると報告している。その報告では、細胞内カルシウム振動と DAD の関係が一定であると仮定しているが、カルシウム波と DAD の関係の関係を直接証明した報告はない。我々は、細胞内カルシウム振動に対する膜電流系の反応性をさらに明確にするため、連続して減衰する DAD の電位と細胞内カルシウム振動を空間的、時間的要因から解析し、その関係が一定か、あるいは、時間毎にダイナミックに変化するかを解析した。

## 【研究方法】

モルモット心室筋をコラゲナーゼにより単離し、Fura-2 AM にて染色した。心筋細胞を、倒立顕微鏡下におき、380nm の励起光を照射し、510nm のフィルターを通して、その蛍光像を SIT カメラにてビデオレコーダーに記録した。同時に、3モルの KCl が満たされたガラス電極を用い、先端部の抵抗が 20 から 40 メガオームの微小電極にて膜電位を記録した。刺激等の負荷を加えないで  $-70\text{mV}$  以下の静止膜電位が得られた心筋細胞をウアバイン ( $10^{-5}\text{M}$ ) 投与下に、高頻度刺激し、連続して減衰する DAD を誘発した ( $n=8$ )。ここで、その一つ一つの画像は 6 ビットのアナログデジタル変換器により定量化した。画像の分析方法は細胞の収縮のない状態をコントロールとし、細胞の長軸に沿ってサンプルラインを設定し、そのピクセルの光度の強さを解析した。全体の光度変化は、そのフレームのすべてのピクセルの積分値をとった。これらから、DAD 発生時の膜電位と細胞全体、あるいは局所の蛍光変化の関係について解析した。

## 【研究結果】

- 1) DAD 発生時、細胞内にはカルシウム波が必ず観察された。
- 2) DAD が観察されるとき、その後脱分極の振幅は、細胞内の局所カルシウム振動の発火点が

多い程、大きくなった。

3) 連続して、減衰する DAD が認められたとき、細胞内全体のカルシウム濃度の振幅の減衰は DAD 振幅減少に比較して軽度であると思われた。

そこで、DAD 発生後の膜電位 (MP) とその時の蛍光値 ( $\Delta$  TFI) をそれぞれ、X-Y 表示した。細胞内カルシウム濃度の変化と膜電位の関係から得られるループ曲線が得られ、それぞれの遅延後電位のループの軌跡は徐々に下方へ偏位した。この結果は、細胞内カルシウム振動の膜電位に対する影響が時間経過と共に減少することを示している。SIT カメラの残像等のアーチファクトを考慮にいれても、この現象は説明ができない。これを定量化するために DAD 毎の蛍光値の変化を見るため、個々の DAD ループの平均的傾きを最下点から最下点と定義し、それぞれのループの傾きの変化を計算した。明らかに認められる DAD の数は、細胞により異なるが、そのループの傾きは、DAD の出現が遅いほど有意に小さい傾向があった。すなわち、ループの変化率が時間経過とともに減少してくることを示した。

#### 【研究の意義、独創的な点】

ウアバインにより、誘発された DAD において、

- 1) DAD の振幅を決定する因子が心筋細胞内のカルシウム波の発生点の数に依存する事をカルシウム波と後脱分極の同時記録により示した。
- 2) 我々は、心筋細胞内カルシウム濃度の変化を局所、全体の両面より測定し、細胞内カルシウム振動に対する DAD の動的応答がダイナミックに変化することを明らかにした。
- 3) DAD 発生時の膜電流として、non-specific cation channel や Na-Ca exchange の関与による一過性内向き電流が考えられている。ここで、心筋細胞内カルシウム濃度と DAD の関係は一定であると仮定されてきたが、我々の結果はこれらが時間毎に変化していく可能性、すなわち、DAD の発生時において、細胞内の自発的カルシウムイオン振動に対して一過性内向き電流の不活性化現象が認められる可能性を示した。

## 審査結果の要旨

不整脈は心臓疾患の予後を決定する重要な病態であり、その発生機構として、大きく3種、即ち1)リエントリー、2)自動能亢進、3)撃発活動が考えられ、この中で撃発活動は最近活発に実施されている再灌流療法に伴う再灌流不整脈の発生として、および抗不整脈剤の催不整脈作用の機構として注目を集めている。撃発活動の細胞レベルにおける膜電位変化は遅延後電位と早期後電位に分けられ、遅延後電位の発生機構は、細胞内カルシウムイオンの自発振動によるとされていたが、細胞内カルシウムイオン振動は細胞内で均一に生ずるのでは無いことが明らかになっており、細胞内カルシウムイオン動態の詳細と膜電位変化との関連を検討した論文は少ない。小田浩司氏によるこの研究はモルモットの単離心筋を用い、カルシウム感受性色素によって心筋細胞内カルシウムイオン変化を画像として捉え、同時に膜電位を微小電極法によって測定し、両者の関係を検討している。

著者は細胞内カルシウムイオン過剰状態を作り出すために強心配糖体を用い、細胞に高頻度電気刺激を与え、刺激停止後の自発収縮、即ち後収縮および電気現象としての撃発活動を観察した。その結果、1)刺激停止後、細胞内に自発的な局所的カルシウムイオン濃度の上昇とCa波と称されるその伝播が記録され、後電位の振幅がCa波の発生点の数と伝播様式に依存したことから、Ca波の発生が後電位の原因であると結論された、2)連続して発生した遅延後電位において、細胞内カルシウムイオン振動に対する膜電位変化は次第に減弱し、カルシウムイオン変化に依存する膜電流系、おそらくナトリウム-カルシウム交換機構に何等かの不活性化機構が存在することを示した。

これらの観察は臨床的に不整脈の発生機構を解析するに当たり、重要な情報をあたえるものであり、また、論文の体裁、記述、図の提示も適切になされている。従って、当論文は博士論文として適切であると認められる。