

P6-01

放射光を光源とした軟 X 線顕微鏡によるカビ臭産生シアノバクテリアの観察

竹本 邦子¹, 吉村 真史², 難波 秀利², 木原 裕^{2,3}

¹関西医大, ²立命館大, ³姫路日ノ本短大

水道水源地において、初夏から秋にかけて大増殖し、水道水に著しい異臭味障害をもたらす糸状のシアノバクテリアがいる。京阪神地区の重要な水道水源地である琵琶湖でも、1969年に南湖（琵琶湖大橋より南側）で初めてカビ臭が感知されて以降、毎年のようにカビ臭が発生している。原因生物は、浮遊性糸状シアノバクテリアの *Phormidium tenue* と同定され、臭気の原因物質である 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) を産生する緑色の株 (PTG 株) と産生しない茶色の株 (PTB 株) の存在も報告された。我々は、立命館大学 SR センターに常設されている放射光を光源とした軟 X 線顕微鏡で *P. tenue* の詳細な観察を行い、これらのシアノバクテリアは *P. tenue* とは別種である可能性をみいだした。その後、16S rRNA 系統解析と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、PTG は *Pseudanabaena foetida* nom. nud., PTB は *Pseudanabaena limnetica* であることが判明した (Y. Niiyama et al., Fottea, 16, in press.)。

今回、軟 X 線顕微鏡の特徴を、*P. foetida* と *P. limnetica* の観察結果を示しながら紹介すると共に、現在すすめている X 線マイクロ CT 観察の結果について報告する。

P6-02

ラマン散乱光によるラット心筋梗塞の *in vivo* 観察

原田 義規¹, 村西 菜苗¹, 南川 丈夫¹, 田中 秀央¹, 高松 哲郎^{1,2}

¹京都府医大・細胞分子機能病理学, ²京都府医大・医学フォトリニクス

ラマン散乱光は、入射光と振動数が異なる微弱な散乱光であり、その振動数の変化量は入射した分子の分子振動に依存する。従って、分子振動を反映したラマンスペクトルを解析することで、試料を構成する分子を推定できる。また、光源として可視光や近赤外光を用いることができるため、水の吸収の影響を受けにくく、生きた臓器への応用も可能となる。従って、ラマン散乱光を解析することで、非標識・非侵襲的に生体情報を取得できる可能性がある。我々は以前よりラマン散乱光による非標識組織診断の可能性を探る目的で、心筋梗塞ラットから切り出した組織切片を用いて実験を行ってきた^{1,2)}。今回我々は、*in vivo* における正常および梗塞心のラマンスペクトルの特徴を調べるために、ラット心臓組織をラマン顕微鏡で染色せずに観察した。取得したラマンスペクトルを部分最小二乗回帰法などにより解析することで、陳旧性梗塞巣および非梗塞巣を非標識で *in vivo* 検知可能であった。すなわち、ラマンスペクトルは心筋梗塞における組織化学的变化を反映しており、*in vivo* で梗塞心を標識することなく評価することが可能であることが分かった。

1) Ogawa M, Harada Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2009;382:370-374.

2) Nishiki-Muranishi N, Harada Y, et al. Anal Chem. 2014;86:6903-6910.

P6-03

心筋梗塞境界部位におけるプルキンエ線維の機能障害—高速カルシウムイメージングによる解析—

松山 高明^{1,2}, 田中 秀央¹, 大平 卓¹, 植田 初江², 高松 哲郎³

¹京府医大・院・細胞分子機能病理, ²国循セ・臨検・病理, ³京府医大・医学フォトリニクス

【背景】プルキンエ線維は両心室の心内膜面に分布する刺激伝導系の終末組織である。その細胞特性から虚血耐性を有し、心筋梗塞時には心内膜面に壊死を免れて残存することが多いが、虚血による細胞機能障害によりヒトでは致死性不整脈の発生に関わっている可能性がある。しかしその詳細な機序は不明である。そこでマウス心筋梗塞モデルを用いて、プルキンエ線維・心室筋組織の興奮伝導様式とプルキンエ線維の細胞レベルのカルシウム (Ca²⁺) 動態を可視化することにより、梗塞心におけるプルキンエ線維の機能異常を解析した。

【方法】雄性マウス (体重 20-30g) をベントバルビタールで全身麻酔し左冠動脈の結紮により梗塞を作成。結紮 3 日後に心臓を摘出後直ちにランゲンドルフ灌流し Fluo-4 AM を負荷した。左心室後壁を切開して、左室心内膜側組織を展開・露出した。梗塞病変の境界部位を同定した後、同部の細胞レベルの Ca²⁺ 動態を高速共焦点顕微鏡下 (100 コマ/秒) で観察した。観察は心房の 2Hz 駆動下に行い、冠動脈結紮をしないコントロール群と比較した。

【結果】心房駆動により Ca²⁺ トランジェントは心基部から心尖部に向かって伝播したが、梗塞部分では伝導は消失し、梗塞境界部では伝導速度が低下した。さらに細胞レベルの観察では、梗塞境界部のプルキンエ線維には Ca²⁺ トランジェントが不均一化した細胞が多くみられ、その振幅が一拍毎に増減するオルタナンス現象も多く観察された。

【結語】発症早期の梗塞心の梗塞境界部ではプルキンエ線維の Ca²⁺ 動態が不均一化し刺激伝導が抑制されることが明らかになった。このプルキンエ線維を含む心内膜側心筋の Ca²⁺ 動態異常は梗塞心の不整脈発生の一因となる可能性がある。

P6-04

ラット摘出灌流心の虚血プレコンディショニング (IPC) 効果—Raman 分光法による評価

大平 卓^{1,2}, 原田 義規¹, 南川 丈夫¹, 田中 秀央¹, 高松 哲郎³

¹京都府医大・細胞分子機能病理学, ²京都府医大・心臓血管外科, ³京都府医大・医学フォトリニクス

【目的】我々はこれまでに正常心筋と陳旧性心筋梗塞、及び心筋梗塞修復期の心筋を Raman 分光法によって無染色でイメージング、識別に成功した。また正常心筋のスペクトルがミトコンドリア (Mit) のチトクロム c (CytC) (750cm⁻¹ の band) であることを報告したが、機能する whole heart では殆ど検出されていない。本研究は Ex vivo ラット心の IPC モデルを用い、CytC の酸化還元状態の Raman 分光法による評価を試みた。

【方法】ラット心を摘出後 37°C Tyrode 液で灌流、心外膜直下心筋の Raman スペクトルを測定した。コントロール (C 群) を除く 2 群 (単純虚血 (SI), IPC: 2 分×3 回) では 60 分後に全虚血とし 120 分間測定した。梗塞範囲は 1% TTC で定量した。同様の実験系で TMRE を用いて Mit 膜電位を経時的に測定した。また虚血 20 分後 Mit を単離し酸素消費量を測定し Complex IV の活性評価を行なった。

【結果・考察】灌流時は Oxy Mb の Raman スペクトルが観察され、全虚血直後から 750cm⁻¹ のスペクトルが顕著となり、経時的に増加したが単純虚血に比して IPC で上昇が軽度 (P<0.05) で、梗塞領域は有意に縮小した (P<0.05)。Mit 酸素消費量 SI に比して IPC 群で保たれていた (P<0.01)。全虚血 45 分後の Mit 蛍光強度 (SI: 16.6±1.8 vs IPC: 24.4±0.7, P<0.05)、開始から蛍光消失までの時間 (SI: 37.3±1.0 vs IPC: 43.5±0.5, P<0.01) とも IPC 群で保たれていた。つまり IPC が全虚血後の Complex IV 活性を保つことにより還元型 CytC への変化を軽減することを Raman 分光法により明らかにした。

【結論】還元型 CytC が主成分である 750cm⁻¹ のピークの変化は、TMRE による蛍光強度変化に比しより早期から観察され、虚血心筋を評価する上で有用である可能性があると考えられる。