

# 単離心筋培養系における拍動リズムのゆらぎと 非線形振動子間相互作用

適応制御研究分野 山内芳子, 佐藤泰雅, 中村孝夫, 河原剛一

複数の培養心筋細胞が結合した細胞集塊の拍動リズムゆらぎと細胞間相互作用との関連を解明することを目的として, 心筋細胞間の電気的な結合を薬理的に遮断した結果, 拍動周期の変動係数が有意に増加した。また, 個々の心筋細胞の拍動リズムを BVP 振動子を用いてモデル化したシミュレーションにおいて, 振動子間の結合強度を増加させると振動周期の変動係数がある強度でピークを持ち, その後急激に減少する傾向が認められた。これらの結果は, 心筋細胞拍動リズムが電気的相互作用の強化により安定することを示唆している。

## 1. はじめに

生体の様々なリズム現象にはゆらぎが存在することが明らかにされ, 近年その機能的意味が注目されている。特に心臓の拍動リズムゆらぎについては, 臨床的な面からもその数理的特徴や発生起源についての研究が多くなされている。しかし, 体液性及び神経支配による影響等を取り除いた心臓自体の拍動リズムゆらぎ特性に関する研究は少ない。

一方, 新生ラットや鶏胚の単離・培養した心筋細胞が自律的な拍動を示すことが知られており, その拍動リズムは, 数理的には非線形振動子としての特徴を持つと考えられている<sup>[1]</sup>。これまで我々は, 心筋細胞培養系を非線形振動子間相互作用と心臓の拍動リズムゆらぎとの関連を解明する最も単純化したモデルとしてとらえ, 非侵襲的手法で拍動リズムゆらぎの静的及び動的特性の解析を行ってきた<sup>[2]</sup>。その結果, 培養日数の増加に伴い細胞間の機械的・電気的結合が強化されると共に拍動リズムゆらぎが減少することを明らかにした。

本研究では, 心筋細胞培養系における拍動リズムの安定性に対する細胞間相互作用の影響を検討するために, 薬理的に電気的透過性を遮断する事による拍動リズムゆらぎの変化を解析した。また, 個々の心筋細胞の拍動リズムを非線形振動子

の一つである BVP 振動子でモデル化し, 複数の BVP 振動子を結合させることにより, 心筋細胞間相互作用の拍動リズムに対する影響をシミュレーションにより検討した。

## 2. 実験方法

生後 1-3 日目の新生ラットの心室部分を切り出し, タンパク質分解酵素により結合組織を分解して心筋細胞を単離した。培養皿表面での細胞密度を約  $3.5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  とし,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%, air 95% の条件で培養を行った<sup>[3]</sup>。

自発的な拍動を開始した培養系に対して, 細胞間に形成された細孔 (gap junction) によりもたらされる電気的透過性を阻害するために,  $100 \mu\text{M}$  の 12-doxy stearic acid (DSA)<sup>[4]</sup> を培養液中に負荷した。

心筋細胞の拍動リズムを評価するために, 培養皿を倒立顕微鏡下に置き, CCD カメラを通して拍動している細胞を VTR で録画した後, コンピュータ上で拍動に伴う画素濃度の変化を求め, これを拍動時系列とした<sup>[2]</sup>。この時系列データのピーク間隔より平均拍動周期およびその変動係数を求め, 拍動リズムのゆらぎを評価した。

心筋細胞の拍動リズムを模擬する非線形振動子として BVP 振動子を用いた<sup>[5]</sup>。BVP 振動子は 2 变数 ( $x, y$ ) からなる非線形常微分方程式で表さ

れ、 $x$  は興奮性細胞の膜電位を、 $y$  は不応性を表す変数である。本研究では、複数の心筋細胞が電気的に結合した系をモデル化するために、全ての BVP 振動子が相互に拡散結合する系を考えた。

$$dx_i/dt = c(y_i + x_i - x_i^3/3) + \sum D_{ji}(x_j - x_i)$$

$$dy_i/dt = -(x_i - a_i + b_i y_i)/c_i$$

ここで、パラメータ  $a_i, b_i$  は各振動子で共通とし、 $c_i$  のみが振動子毎に異なる値をとるようにすることで振動子毎に異なる周期を持たせた。さらに、実験系で得られる拍動リズムのゆらぎを振動子に持たせるために、パラメータ  $c_i$  に乱数を加えた ( $c_i = c_{0i} + c_{1i} \times n(t)$ ,  $n(t)$  は疑似乱数)。拡散係数  $D_{ji}$  (gap junction によるコンダクタンスに相当する) は、簡単化のために全ての細胞間で一様 ( $D_{ji} = D$ ) で、時間的にも変化しないものとした。これらを Runge-Kutta 法で計算し、各振動子から得られた  $x(t)$  より振動周期を計測し、平均値及び変動係数の拡散係数に対する変化を解析した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 細胞間の電気的透過性阻害による拍動リズムゆらぎの変化

Fig. 1 は、DSA 負荷前、負荷中、洗い流し後の心筋細胞拍動周期の変動係数を示している。心筋細胞拍動周期の変動係数は、DSA の負荷により有意に増加した (Fig. 1, CNT vs DSA,  $p < 0.005$ )。また、DSA を洗い流した後は、変動係数はほぼ負荷前の数値に戻った。以上の結果は、電気的結合による細胞間相互作用が、心筋細胞拍動リズムの安定化に大きく寄与していることを示唆している。一方、電気的な結合を遮断しても細胞同士の接着による機械的な結合は残っており、隣接した心筋細胞の収縮に伴う伸展刺激による外乱が拍動リズムゆらぎを大きくしている可能性がある。従って今後、機械的結合に伴うゆらぎの変化についても検討を行う必要があると考えられる。

#### 3.2 BVP 振動子によるシミュレーション

Fig. 2 は、拡散係数を変化させたときの平均振

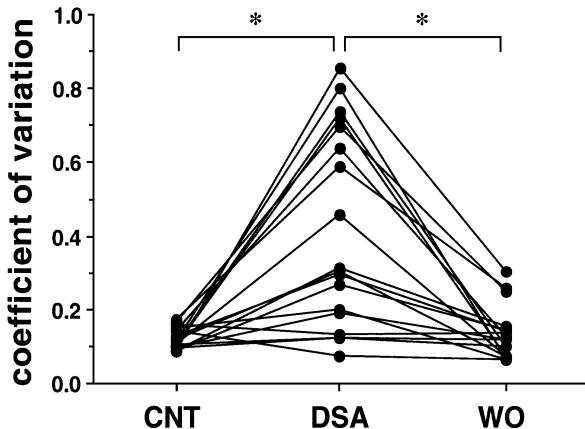


Fig. 1 Coefficient of variations of beat-to-beat intervals before (CNT) and during (DSA) loading of 12-doxyl stearic acid ( $100 \mu\text{M}$ ) and after washout (WO). \* $p < 0.005$ ,  $n = 18$ .

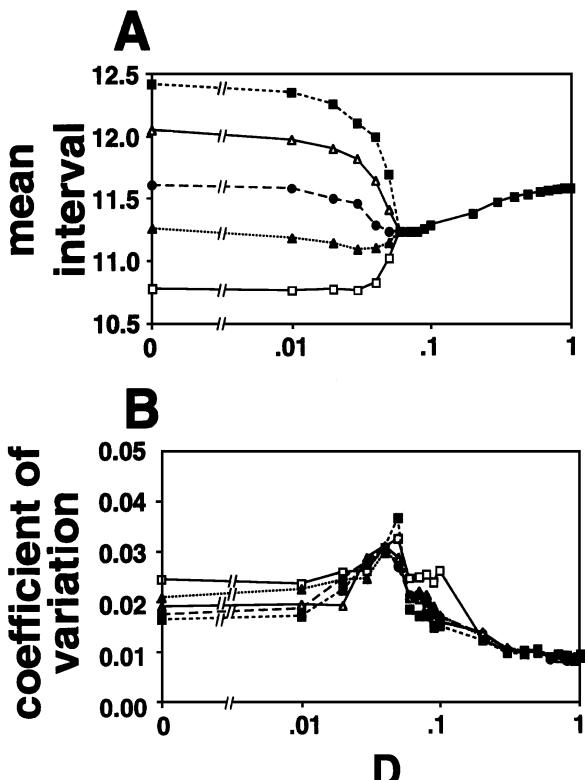


Fig. 2 Changes of mean interval (A) and coefficient of variation (B) in interacted BVP oscillators against coupling strength (D)

動周期とその変動係数を振動子数が 5 個の場合について示している。結合強度が  $D = 0.00 - 0.03$  では、各振動子ともに平均値、変動係数ともほとんど固有の振動からの変化は見られなかった。振

動周期は  $D = 0.03 - 0.05$  から急激な変化がおこり , その後各振動子ともほぼ同じ値に収束し (Fig. 2, A) , 振動子間の相互引き込みが起こったことを示している .

一方 , 振動周期の変動係数は (Fig. 2, B)  $D = 0.02 - 0.03$  で増加し始め ,  $D = 0.04 - 0.05$  でピークを持ち , さらに拡散係数が増加して振動子間に引き込みが起こると , 変動係数は急激に減少する傾向が認められた .

以上の結果は , 我々が明らかにした培養日数に伴う心筋細胞拍動リズムの変動係数の変化<sup>[2]</sup> ( 培養開始 3-5 日目にかけて一過性に増加し , その後減少した ) と同様の経過を示している . 従って , 心筋細胞拍動周期ゆらぎの培養日数に伴った変化は , 固有のゆらぎを持った非線形振動子間の結合強度の変化でほぼ再現できることが示唆された .

---

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Glass L, Guevara MR, Shrier A, Perez R, Physica D, 7: 89 ( 1983 )
- [ 2 ] 山内芳子 , 原田明彦 , 中村孝夫 , 河原剛一 , 第11回生体・生理工学シンポジウム論文集 , 113 ( 1996 )
- [ 3 ] Orita H, Fukasawa M, Hirooka S, et al., Jpn Circ J, 57: 912 ( 1993 )
- [ 4 ] Burt JM, Am J Physiol, 256: C913 ( 1989 )
- [ 5 ] Nomura T, Sato S, Doi S, Segundo JP, Stiber MD, Biol Cybern, 69: 429 ( 1993 )