

模擬的虚血負荷に伴う培養心筋細胞拍動 リズムゆらぎの変化

適応制御研究分野 山内 芳子, 角谷 昌紀, 河原 剛一

心虚血に伴う心筋細胞拍動リズムゆらぎの変化を, 通常の培地を 100%N₂ により飽和した glucose-free の培地に交換することで虚血状態を模擬し, 培養心筋細胞を用いて解析した. 模擬的虚血負荷により, その後の時間経過に伴って拍動周期が延びると共に拍動リズムが不安定となり, やがて拍動の停止に至る場合も認められた. その後通常培地に戻すと, 一時的に非常に早いリズムの安定した収縮が出現し, 約 1 時間で元の状態に戻る傾向を示した.

1 はじめに

虚血に伴って酸素及びグルコース等の代謝基質の細胞への供給が長時間にわたり停止すると, 細胞の損傷を引き起こし, 最終的には細胞死に至る. 心臓では, 代謝により産生されるエネルギーの多くが筋収縮に利用されており, したがって虚血による酸素及び代謝基質の欠除は心筋の収縮運動に多大の影響を与える.

虚血・再灌流に伴う心筋細胞の種々の応答について, 培養心筋細胞を用いた研究が多くなされているが, その多くは虚血に伴う細胞損傷に主眼がおかれており, 心筋細胞拍動リズムに着目した研究は少ない.

本研究では, 心筋虚血が拍動リズムに及ぼす影響とその機序を明らかにすることを目的とし, 虚血状態を酸素及び培養液中のグルコースの除去により模擬し, これに伴う培養心筋細胞拍動リズムゆらぎ特性の変化を解析した.

2 方法

2.1 培養方法

実験には生後 1 - 3 日目の新生ラットを用いた. ラットの心臓を摘出した後, 心室部分を切り出してハサミで細切し, タンパク質分解酵素 (0.1% collagenase) により結合組織を分解して心筋細胞を単離した. 単離した細胞を培養液 MCDB 107 中に懸濁し, 細胞密度が 3.5×10^4 cells/cm² となるように細胞数を調節して培養用フラスコ内に分注し, 37°C, CO₂ 5 %, air 95%とした incubator 内で 5 - 10 日

間培養した.

2.2 画像解析

心筋細胞拍動リズムの計測のために, 培養用フラスコを倒立顕微鏡下に置き, CCD カメラを通して拍動している心筋細胞の画像を VTR に録画した. 録画した画像から, 心筋細胞の拍動に伴う画素濃度の変化をコンピュータを用いて計測し [1], これを拍動時系列とした. この拍動時系列のピーク間隔より拍動周期を求め, さらにその変動係数より拍動リズムのゆらぎを評価した.

2.3 プロトコル

虚血状態の模擬は, 通常の培養液 (MCDB 107) を, 100%N₂ でバブリングしたグルコース不含培養液 (GF-MCDB 107) と交換し, 更にフラスコ内に窒素を充満させてフラスコのキャップを完全に閉じて閉鎖系とすることで行った.

GF-MCDB 107 への交換前に細胞の拍動の様子を録画し, これを control とした. GF-MCDB 107 負荷を開始してから 3 時間この状態を維持し, その後再び MCDB 107 に戻し, フラスコを開放系とした. この間, GF-MCDB 107 負荷開始後 1 時間と 3 時間, さらに培地を戻した直後および 1 時間後の計 4 回の計測を行い, 各時点での拍動周期及びその変動係数を求めた.

3. 結果及び考察

3.1 拍動周期及びその変動係数の変化

Fig.1 は虚血負荷前後における培養心筋細胞の 5

分間ずつの平均拍動周期 (A) とその変動係数 (B) を 13 例についてまとめたものである。平均拍動周期は、虚血負荷開始 1 時間で負荷前に比べて有意に増加した。さらに負荷後 3 時間の時点ではほとんどの細胞で拍動が止まっており、拍動が持続している場合でも周期が延長していた。通常の培地と交換した直後に拍動が停止していた細胞も拍動を再開し、この際の拍動周期はコントロールに比べて有意に短くなっていた。MCDB 107 に戻してから 1 時間後までには、拍動周期はほぼコントロールの値に戻った (Fig.1 A)。

一方拍動リズムゆらぎの大きさを示す拍動周期の変動係数は、拍動周期の変化と同様に虚血負荷中に有意に増加し、負荷終了直後に有意に減少した後に、1 時間後までにはほぼコントロールの状態に戻るという傾向を示した (Fig.1 B)。

以上の結果は、心筋細胞培養系において、酸素及びグルコース除去による模擬的な虚血負荷が可逆的に拍動リズムゆらぎを増大させることを示している。

心虚血時には、嫌気性代謝により産生される代謝産物の蓄積により細胞内 pH が低下することが知られている。また、心筋細胞は細胞間のギャップ結合により電氣的に結合しているが、細胞内 pH の低下や $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によりギャップ結合透過性が低下する。

我々はこれまでの研究で、心筋細胞培養系を用いて細胞間相互作用と拍動リズムゆらぎの関係を検討してきた。その結果、細胞間の電氣的結合を、細胞内 pH の低下、あるいはギャップ結合を閉鎖する薬品を用いて減少させることにより、拍動リズムゆらぎが増加することを明らかにした [2]。

これらのことから、本研究で与えた虚血負荷により細胞内 pH が低下し、細胞間の電氣的結合が低下することで拍動リズムゆらぎが増加した可能性が考えられる。

3.2 拍動時系列間の相互相関係数

次に、本研究で用いた模擬的な虚血状態によりもたらされた拍動リズムゆらぎの増加に心筋細胞間の電氣的結合の欠除が関与しているかどうかを、同一集塊内にある 2 細胞から得られた拍動時系列間の相互相関係数から検討した。

2 細胞の拍動時系列データ間で得られた相互相関

係数は、コントロール、虚血負荷開始 1 時間、負荷終了直後とも 0.9 以上のピーク値を示しており、さらに周期性を持って変動していた。このことは、2 細胞間の拍動リズムが虚血負荷に関わらず同期していたことを示している。

以上の結果は、模擬的な虚血負荷に伴う培養心筋細胞拍動リズムゆらぎの増加にはギャップ結合透過性の低下は無関係であり、心筋細胞自体の拍動ゆらぎの増加に起因している可能性を示唆している。

グリア細胞 (アストロサイト) では、虚血状態下 (glucose free, anoxia), あるいは細胞内 pH の低下や $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によってもギャップ結合チャンネルは開いたままであるという報告もあり、本研究の虚血負荷中にもギャップ結合チャンネルは開いたままであった可能性が考えられる。

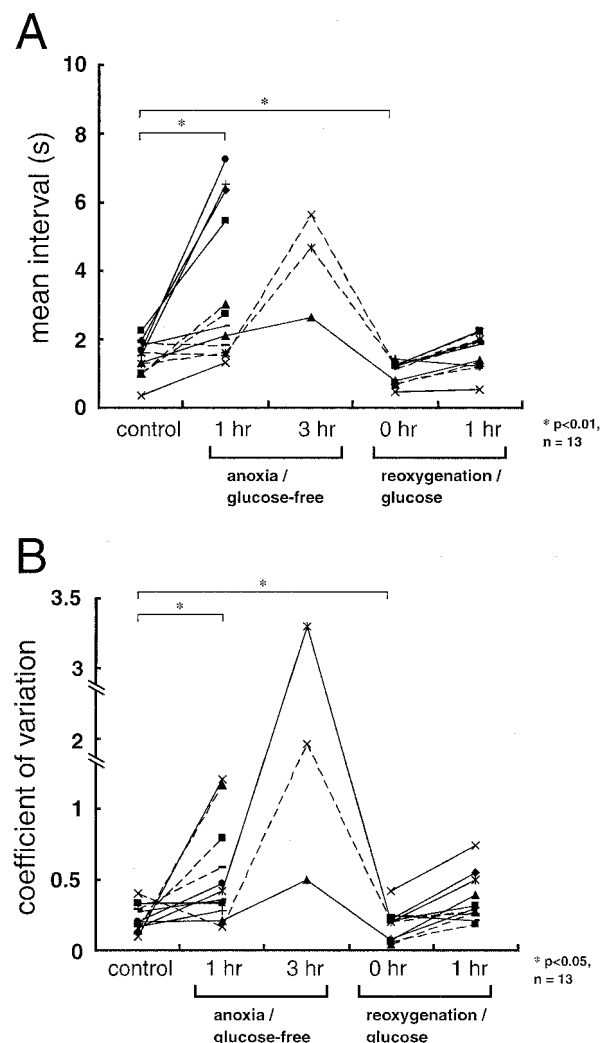


図1 虚血模擬前後での培養心筋細胞の拍動周期及びその変動係数の変化

[参考文献]

- [1] 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).
- [2] 山内芳子, 中村孝夫, 河原剛一, 第 14 回生体生理
工学シンポジウム論文集, 35 (1999).