The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	STUDIES ON THE BEATING PROPERTIES OF SINGL MYOCARDIAL CELLS IN VITRO
Author(s)	Ohtsuka, Kenzo
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32093
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【11】

氏名・(本籍)	大塚健三（おおつかけんぞう）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 4106 号
学位授与の日付	昭和52年12月13日
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**培養単一心筋細胞の拍動性に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 殿村 雄治 (副査) 教授 松原 央 教授 原 富之

論文内容の要旨

アウス胎児の心臓組織片をtrypsin処理して得られた個々の心筋細胞は，培養下で自発的に拍動し，個々の心筋細胞はかなり安定した固有の拍動数を持っていることは良く知られている。培養心筋細胞の拍動性に対する薬理学的な研究は多くなされているが，それに対するmedium conditioningの効果はあまり報告されていない。本研究では，まず培養心筋細胞の拍動性に対する細胞密度及びmedium conditioningの効果について調べ，次にconditioned medium(CM)中に存在する心筋細胞の拍動促進因子を部分的に精製しその性質を調べた。

(1) 心筋細胞をhigh density(HD)とlow density(LD)で1日間培養した。拍動する細胞の割合と，拍動数の平均値はいずれもHDの方がLDより高い値を示した。またLDでもHDでも培養日数が経つにつれて拍動する細胞の割合，拍動数の平均値はともに増加するが，その増加のしかたがHDでは速くLDではゆるやかであった。

(2) 心筋細胞をconditioned medium中で培養すると，新しいmedium中で培養したときより拍動数の平均値は高い値になった。

以上のことから，心筋細胞の拍動数はmedium conditioningにより増加することが示されたが，このことを更に確めるために次の実験を行なった。

(3) 同一plate上に心筋細胞の密度の高い部分（HD-area）と低い部分(LD-area)をつくった。まわりをHD-areaで囲まれたLD-areaにある心筋細胞の方が，controlに比べて拍動数は高い値を示した。

(4) (3)と同じ方法を用いてHD-areaに他の臓器（肺，腎，骨格筋）の細胞，株細胞(FL,L),ニワト

リ胎児の細胞及びハ虫類のiguana心臓由来の細胞を培養しても同様の効果が見られた。したがって，心筋細胞の拍動性に対するmedium conditioningの効果は臓器特異性も種特異性も見られなかった。

次に，conditioned medium中の心筋細胞の拍動促進因子の部分的精製とその性質を調べた。

(5) 活性因子は透析されず，ultrafiltrationによりretentateに残り，飽和硫安で沈澱した。

(6) その因子は熱に不安定で，trypsin, pronase, 及びhyaluronidase処理により失活するが，neuraminidase処理では失活しなかった。これらの結果は促進因子が高分子で，しかもglycoproteinであることを強く示唆している。

(7) 濃縮したCMをSephadex G-200にかけると，活性のmain peakはhemoglobinとほぼ同じ位置に溶出されてきた。このことから活性因子の分子量は5－7×10^4daltonsであると考えられる。

(8) crude CMをSDS-polyacrylamide gel電気泳動にかけると，20本以上のprotein bandsと約10本のPAS-stainable bandsが見られるが，Sephadex G-200の活性peakの電気泳動パターンでは，10本のprotein bandsと1本のPAS-stainable bandが見られた。

論文の審査結果の要旨

マウス胎児の心臓をtrypsin処理して得られた単一心筋細胞が，培養下で自発的に拍動することはよく知られている。大塚君は心筋細胞をhigh densityで1日間培養した時の拍動する細胞の割合と拍動数の平均値がいずれもlow densityで培養した時の値より高いことを示した。さらに心筋細胞をconditioned medium中で培養すると，新しいmedium中で培養したときより拍動数の平均値が高いことを観察した。またマウス胎児の心臓のみならず他の臓器の細胞，株細胞，ニワトリ胎児の細胞およびハ虫類の心臓由来の細胞のconditioned mediumもマウス心筋細胞の拍動数を高めることを確めた。

大塚君はこれらの結果に基づき，マウス胎児からtrypsin処理によって得た細胞を培養してconditioned mediumを得，その中の活性因子がセロハン膜で透析されず，ultrafiltrationによりretentateに残り，飽和硫安で沈澱することを示した。しかも，培養単一心筋細胞の拍動数の増加は加える濃縮conditioned mediumの量に比例することを明らかにし，活性の定量化に成功した。

大塚君はこの活性因子が熱に不安定でtrypsin, pronaseおよびhyaluronidase処理により失活することからglycoproteinであると結論した。またゲルろ過法によってその分子量は5－7×10^4daltonであると推定した。10^5個の心筋細胞にゲルろ過法で得られた活性因子を約80μg加えると，拍動数は2倍になり，またそのSDS-polyacrylamide gel電気泳動では1本の多糖類を含むbandがみられた。

大塚君はこのようにして，心筋細胞の拍動を促進する活性因子が種々の細胞からconditioned medium中に遊離されること，それが分子量5－7×10^4のglycoproteinであることを示した。多量のconditioned mediumを得るのが困難なため，まだ活性因子は十分精製されていないが，大塚君のこの研究は単一心筋細胞の拍動の生理学的研究に新しい分野を開いたものとして高く評価される。

以上の理由により大塚君の論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。