

Title	Analysis of change with time in intracellular free calcium concentration during hypoxia-reoxygenation of intact rat heart containing indo 1
Author(s)	西村, 元延
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/38691
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	にしむらもと のぶ 西村元延
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 8 7 4 号
学位授与年月日	平成 5 年 7 月 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Analysis of change with time in intracellular free calcium concentration during hypoxia-reoxygenation of intact rat heart containing indo 1 (蛍光指示薬 indo 1 を用いた灌流心モデルにおける無酸素再酸素化灌流時の細胞内カルシウム濃度変化)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉 (副査) 教授 岡本 光弘 教授 多田 道彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

カルシウムは細胞内セカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達において重要な役割を果たしている。心筋の無酸素再酸素化に際しても細胞内カルシウム濃度の異常上昇が細胞障害の発生に関与していると報告されているが、無酸素再酸素化時の灌流臓器レベルにおける細胞内カルシウム濃度変化の詳細は未だ十分明かではない。近年、高感度蛍光カルシウム指示薬や NMR を応用することにより灌流臓器レベルで細胞内カルシウム濃度変化を観察し得ることが報告されている。NMR を用いる方法に比し、蛍光カルシウム指示薬を用いる方法は、時間解像力に優れており、real-time な分析が可能であるという利点を有しているが、一方ではこの方法が細胞内カルシウム濃度を真にとらえているかどうかの問題も指摘されている。

本研究では、蛍光カルシウム指示薬 indo 1 をラット灌流心に応用することにより indo 1 負荷灌流心を作成し、細胞内カルシウム濃度の定量的評価を行うとともに、その心筋酸無酸素再酸素化灌流時における real-time の変化を観察することを目的とした。

〔方 法〕

体重250-300g の Sprague-Dawley ラットから心臓を摘出し、33°C で Langendorff 灌流した。蛍光カルシウム指示薬 indo 1 の負荷は、indo 1 / AM 4 μ M を添加した灌流液にて15分間灌流し、その後15分間の wash out することにより行った。蛍光分光測定は日本分光製 CAF-102を用い、indo 1 負荷灌流心を波長340nm で励起、発生した蛍光を405nm と500nm の2波長で同時に測定することによりおこない、細胞内カルシウム濃度を反映するこの2波長の蛍光強度比 (F405/F500) の変化を観察した。また心拍動の指標として左心室圧を僧帽弁を経由して左心室内に挿入した latex balloon により測定した。この indo 1 負荷灌流心を用いて、高カリウム灌流による心停止下に20分の無酸素灌流、引き続いて再酸素灌流を行い、その間の蛍光強度比の変化及び左心室圧の変化を観察した。またこの indo 1 負荷灌流心における F405/F500 の最小値および最大値を、カルシウムイオンフォアである Br-A23187存在下に 0mM Ca、引き続いて2.5mM Ca の灌流液で灌流することにより求め、無酸素前および無酸素再酸素化時の各時

点における細胞内カルシウム濃度を Scanlon らの方法を用いて算出した。

〔結果〕

I. 好氣的条件下における indo 1 負荷灌流心の蛍光変化

好氣的条件下における indo 1 負荷灌流心の蛍光は波長405nm と波長500nm いずれにおいても心拍動に一致した周期的変化を示したが、波長405nm では心収縮時に蛍光強度が上昇したのに対し波長500nm では心収縮時に低下し、心収縮時における細胞内カルシウム濃度上昇を反映した変化と考えられた。Br-A23187存在下に求められた indo 1 負荷灌流心における F405/F500の最小値は 0.10 ± 0.02 、最大値は 0.22 ± 0.04 で、これより算出された細胞内カルシウム濃度は収縮期 600 ± 60 nM、拡張期 300 ± 20 nM と、他の方法で求められたものとはほぼ一致した値を示した。

II. 無酸素再酸素化灌流時における細胞内カルシウム濃度変化

Indo 1 負荷灌流心の灌流液を高カリウム灌流液に置換することにより心拍動は停止し、同時に F405/F500の周期的変化も停止した。無酸素灌流約10分後より無酸素拘縮の発生とともに F405/F500は徐々に増加し、無酸素灌流20分後には収縮期レベルを越えて上昇した。再酸素化するとともに通常の灌流液と置換することにより F405/F500は急速に無酸素前のレベルまで低下し周期的変化を再開、同時に心拍動も再開した。indo 1 を負荷しない心臓に無酸素灌流をおこなっても蛍光強度比は変化しなかったことから、この変化は無酸素再酸素化灌流による細胞内カルシウム濃度変化を反映したのと考えられた。算出された細胞内カルシウム濃度は無酸素灌流前の高カリウム灌流液による心拍動停止時には 290 ± 20 nM であったのに対し、無酸素灌流20分後には 2200 ± 400 nM と無酸素灌流前に比して有意の高値を示した ($p < 0.05$)。

〔総括〕

1. ラット摘出灌流心に蛍光カルシウム指示薬 indo 1 を応用することにより無酸素再酸素化灌流時における real-time の細胞内カルシウム濃度変化を観察した。
2. カルシウムイオノフォア Br-A23187を用いて、indo 1 負荷灌流心における蛍光強度比の最小値および最大値を求めることにより、細胞内カルシウム濃度の定量化をおこなった。
3. 本定量的評価法を用いることにより、細胞内カルシウム濃度は無酸素灌流20分後に無酸素前に比し有意に上昇し、引き続き再酸素化により急速に低下、無酸素灌流前のレベルに復することが明かとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、蛍光カルシウム指示薬 indo 1 を用いることにより、灌流心における細胞内カルシウム濃度の real-time の測定を試みたものであり、核磁気共鳴を用いる方法などの他の細胞内カルシウム濃度測定法に比して、簡便で、かつ従来の蛍光カルシウム指示薬を用いた方法では困難であった無酸素-再酸素化灌流時における細胞内カルシウム濃度の real-time の定量的評価を可能にしたものである。本定量的評価法を用いることにより、細胞内カルシウム濃度は無酸素灌流20分後には無酸素前に比し有意に上昇し、引き続き再酸素化により急速に低下し、無酸素灌流前のレベルに復することが明かとなった。本法ならびにこれより得られた結果は、心筋の無酸素-再酸素化灌流に伴う心筋細胞内カルシウム動態の解明に寄与するものであり、学位に値するものと考えられる。