

左心室弛緩機能のアクチン・ミオシン分子ダイナミクスによる解明  
**Elucidation of the Left Ventricular Relaxation by Analyzing the  
 Actin-myosin Molecular Dynamics**

清水壽一郎<sup>a</sup>、田村大和<sup>b</sup>、宮坂武寛<sup>c</sup>、竹下大輔<sup>d</sup>、松尾龍人<sup>e</sup>、八木直人<sup>e</sup>

Juichiro Shimizu<sup>a</sup>, Yamato Tamura<sup>b</sup>, Takehiro Miyasaka<sup>c</sup>, Daisuke Takeshit<sup>d</sup>, Tatsuhito Matsuo<sup>e</sup>,  
 Naoto Yagi<sup>e</sup>

<sup>a</sup> 広島国際大学保健医療学部診療放射線学科、<sup>b</sup> 奈良県立医科大学胸部・心臓血管外科、  
<sup>c</sup> 姫路獨協大学医療保健学部臨床工学科、<sup>d</sup> 奈良県立医科大学第二生理、  
<sup>e</sup> 高輝度光科学研究センター

<sup>a</sup> Dept. of Clin. Radiol., Hiroshima International University, <sup>b</sup> Dept. of Thoracic and Cardiovasc.  
 Surgery, Nara Medical University, <sup>c</sup> Dept. of Clin. Engineer., Himeji Dokkyo University, <sup>d</sup> Dept. of  
 Physiol. II, Nara Medical University, <sup>e</sup> JASRI

ヒト不全心筋は心拍数が増加するにつれて発生張力が低下する。そこで、ヒト不全心筋と同様に心拍数の増加につれて左心室発生圧が低下するラット摘出心を用い、心拍数が心機能とアクチンミオシン相互作用に及ぼす影響について X 線回折実験により検討する。実験は SPring-8 において行った。ラット摘出ランゲンドルフ灌流心臓標本を作成し心拍数制御のため完全房室ブロックを行った。拡張期末圧 0 mmHg とし、等容性収縮下に心拍数(HR) 120、240、300 bpm で拍動させた時の左心室圧と左心室自由壁に X 線を照射して得られた X 線回折像を同時に記録し、アクチン-ミオシン架橋形成の程度を解析した。また、ラット左心室のスライス心筋標本を用い、心拍数を変化させたときの Ca<sup>2+</sup> トランジェントを記録した。心拍数の増加により、収縮期左心室圧は有意に低下し、収縮期アクチン-ミオシン架橋形成量の減少も確認された。逆に、拡張期アクチン-ミオシン架橋残存量は、心拍数増加に伴って増えることが明らかとなった。また、心筋スライス標本で記録した Ca<sup>2+</sup> トランジェントは、心拍数の増加により短縮した。心拍数依存性の左心室圧低下は、Ca<sup>2+</sup> と筋線維の作用時間短縮によるものと考えられる。

Heart rate (HR) is one of the determinant factors of cardiac performance. Failing human myocardium shows negative force frequency relation, whereas normal one shows positive relation. To test the effect of HR on actin-myosin interaction (AMI) in beating rat hearts those have negative force-frequency relation by X-ray diffraction (XRD) analysis at third-generation synchrotron facility. Seven isolated isovolumically contracting rat hearts were paced at 120, 240, and 300 bpm after complete heart block, mounted so that the X-ray beam (15.0keV) passed the left ventricular (LV) free wall, and perfused with Tyrode solution bubbled with 100% O<sub>2</sub>. LV volume were adjusted through water filled thin latex balloon inserted into LV cavity so that end-diastolic LV pressure (LVP) was 0 mmHg. The amount of AMI was evaluated by the minimum value of the intensity ratio of inner (1,0) and outer (1,1) equatorial reflections (I<sub>min</sub>) provided by anaysis of XRD. Between three different HRs, we compared the amount of AMI and LVP. We also measured frequency-dependent changes in Ca<sup>2+</sup> transient in sliced myocardial preparations at 0.5, 1.0, and 2.0 Hz. In all hearts, we did not observe incomplete relaxations. As increasing HR at 120, 240, and 300 bpm, LVP significantly decreased (66 ± 18, 51 ± 16, and 47 ± 18mmHg, respectively) and I<sub>min</sub> also significantly increased (0.93 ± 0.16, 1.20 ± 0.11, and 1.56 ± 0.18, respectively), indicating a significant decrease of the amount of AMI. The durations of Ca<sup>2+</sup> transient at 20% developed level at stimulating frequency of 0.5, 1.0, and 2.0Hz were significantly shortened (233 ± 25, 206 ± 34, and 171 ± 28ms, respectively). Increasing HR reduces the AMI. Absence of incomplete relaxations indicates intact intracellular Ca<sup>2+</sup> handling. These results may derive from shortening the period of Ca<sup>2+</sup>-myofilament interaction with increasing HR

背景と研究目的：

心臓の収縮弛緩はクロスブリッジの結合・解離を反映しているが、それらは興奮収縮連関により支配され、特に心筋細胞内のカルシウムハンドリングは興奮収縮連関の重要な決定因子である。一般に心拍数が増加すると、心筋張力が増大することが知られている（陽性階段現象）。これも、心拍数の増加に伴い、心筋細胞内のカルシウムストアである筋小胞体からのカルシウム放出量が増加する結果であることが示されている。一方、ラットなど齧歯類では、心拍数の増加に伴い心筋張力が減弱することが知られており、陰性階段現象と呼ばれている。この陰性階段現象についても、心筋細胞内カルシウムハンドリングに与るタンパクの発現比が、ヒトなどとは異なるためと考えられている。しかしながら、陰性階段現象についてクロスブリッジが本当に減弱しているのかについてはつまびらかにされていない。そこで本研究では陰性階段現象について、ラット左心室自由壁心筋の X 線回折実験により解析を行った。

実験方法：

標本作製

8～10週齢の雄の Wistar rat (n=8) を麻酔下に開胸し、素早く心臓を摘出した。切断した大動脈にカニューレションシタイロード液で灌流圧 100 mmHg で灌流した。房室ブロックを作成し右心室自由壁心尖部に置いたペーシングサイトから 120、240、300 拍/分で刺激を加えた。

左心室内腔に薄いラテックスのバルーンを挿入し、左心室容積の調節と左心室圧の記録を行った。

X 線回折実験

SPring-8 のビームライン BL40XU のチャンバー内に心臓を持ち込み、左室拡張期末圧が 0 mmHg となるように設定した。

心臓を 120、240、300 拍/分のいずれかで刺激しながら心外膜に X 線を照射し X 線回折像を記録した。以後、X 線照射部位を心内膜側へ 200 $\mu$ m シフトさせ左心室自由壁全層(約 2mm) の X 線回折像を得た。心内膜側に達した後、異なる心拍数を選択し、再度心外膜側心筋から順に X 線回折像を記録した。

X 線回折像から (1,0)、(1,1) 反射強度をそれぞれ求めこの反射強度の比  $I(1,0)/(1,1)$  からクロスブリッジ形成量を推定した。

実験結果：

ラット左心室圧の心拍数による変化

左心室拡張期末圧が 0 mmHg あるいは 20 mmHg のいずれでも、心拍数の増加に伴って左心室発生圧は有意な低下を示した。また、左心室拡張期末圧を 0 mmHg から 20 mmHg へ増加させる、すなわち前負荷を増大させると、心拍数 120 では左心室発生圧は  $66 \pm 18$  mmHg から  $100 \pm 37$  mmHg へと有意に増大し、また心拍数 240 では同じく  $51 \pm 16$  mmHg から  $74 \pm 25$  mmHg へ、心拍数 300 では  $47 \pm 18$  mmHg から  $61 \pm 21$  mmHg へと有意に増加した。

左心室自由壁クロスブリッジ動態

表 1 に示すようにクロスブリッジ形成量を表すと考えられる  $I(1,0)/(1,1)$  の最低値は心拍数の増加に応じて有意な変化を示し、クロスブリッジ形成量が低下していることを示している。

表1 心拍数と I(1,0)/(1,1)の最低値

心拍数 (min <sup>-1</sup> )	120	240	300
拡張期末圧 (mmHg)			
0	0.93± 0.16	1.20± 0.11*	1.56± 0.18*†
20	0.91± 0.16	1.18± 0.21	1.47± 0.24*†

\*; p<0.05 vs 心拍数 120 min<sup>-1</sup>

†; p<0.05 vs 心拍数 240 min<sup>-1</sup>

一方で、拡張期末の I(1,0)/(1,1)、即ち I(1,0)/(1,1)の初期値は心拍数の増加により有意に減少する傾向を示した(表2)。左心室圧の拡張機能指標である弛緩の時定数は有意な変化を示さず、また拡張期末圧も有意な変化を示していないこととの関連について考察する必要がある。

表2 心拍数と I(1,0)/(1,1)の初期値

心拍数 (min <sup>-1</sup> )	120	240	300
拡張期末圧 (mmHg)			
0	2.34± 0.28	2.29± 0.18	2.18± 0.25*
20	2.38± 0.20	2.21± 0.40*	2.14± 0.36*

\*; p<0.05 vs 心拍数 120 min<sup>-1</sup>

#### 心筋細胞内カルシウムトランジェント

心筋スライス標本を用いて、記録したカルシウムトランジェントの結果を示す。右図は、Fluo-3 をロードした心筋スライス標本を用いて、刺激頻度を 0.5、1.0、2.0Hz と変化させたときのカルシウムトランジェントを規格化したもので、その持続時間を評価するのに適している。刺激頻度の増加に伴い、カルシウムトランジェントが明らかに短縮していることが解り、齧歯類の心筋で観察される陰性階段現象が、心筋細胞内のカルシウムトランジェント持続時間の短縮を引き起こす、発生張力の低下に基づくものであることが解る。

(図)

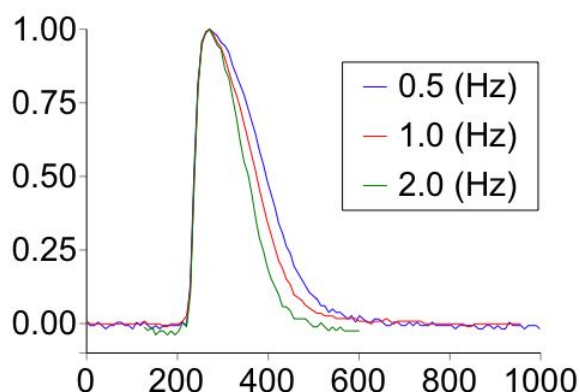


図 刺激頻度変化によるカルシウムトランジェント持続時間の変化

心筋スライス標本に Fluo-3 をロードし、タイロッド液で表面灌流をしつつ、カルシウムトランジェントを記録した。刺激頻度を 0.5、1.0、2.0 Hz と増加させると、カルシウムトランジェントの持続時間が短縮していくことが解る。

#### 考察:

拡張期心筋線維格子間隔は、前負荷の増大に伴い心筋線維が伸展されることで、心筋線維格子間隔が狭小化し、アクチン・ミオシン相互作用の確立が増加すると考えられ、Frank-Starling の法則の一つの因子と見なすことができる。左心室発生圧は心拍数 300 の時を除いて、左心室拡張期末圧の増加に伴って有意に増大しているが、表4の結果は、心拍数 120 の時は心筋線維格子間隔の狭小化がその要因として考えられるが、心拍数 240 の時はその限りではないことを示している。

心拍数 240 では、何が左心室発生圧の増加をもたらしているのだろうか。表5は拡張期と収縮期の心筋線維格子間隔の変化をまとめたものである。これを見ると、心拍数 240 の時には、心筋線維格子間隔の変化が左心室拡張期末圧を 20 mmHg とすると、心筋線維格子間隔の変化が有意に小さくなることを示している。実は、心筋線維格子間隔の変化量

は、一義的に決まる要素ではなく、少なくとも収縮力の強さ、後負荷の小ささの二つの因子によって決まるものと考えられる。収縮力の強さとは非常に曖昧な表現であるが、クロスブリッジの形成量に差がないことから、心筋線維に作用したカルシウムイオンの量も有意差はないものと考えられ、収縮力の強さにも有意な差はないのではないかと考える。一方、後負荷に関しては、本実験で用いた標本が等容性収縮ではあるが、筋線維で見ると等尺性収縮ではないことは明らかであり、左心室拡張期末圧の増加が筋節の短縮に制限をかけることで、結果として高い張力を発生しているのではないだろうか。

心拍数 300 では、左心室発生圧、クロスブリッジ形成量、心筋線維格子間隔のいずれにも左心室拡張期末圧の増加に伴う有意な変化は認められなかった。