

## 細胞外 pH の低下が心筋アクチン・ミオシン相互作用に及ぼす影響

### Effects of decreasing extracellular pH on myocardial actin-myosin interaction

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

Juichiro Shimizu<sup>a</sup>, Takehiro Miyasaka<sup>b</sup>, Daiske Takeshita<sup>c</sup>, Tatsuhito Matsuo<sup>d</sup>, Naoto Yagi<sup>d</sup>

<sup>a</sup>広島国際大学、<sup>b</sup>姫路獨協大学、<sup>c</sup>奈良県立医科大学、<sup>d</sup>JASRI

<sup>a</sup>Hiroshima International University、<sup>b</sup>Himeji Dokkyo University、<sup>c</sup>Nara Medical University、<sup>d</sup>JASRI

アシドーシスによる心筋の収縮力低下は、心筋線維のカルシウム感受性の低下と心筋細胞内でカルシウムストアを担う筋小胞体の機能障害により引き起こされるとされている。そこで本研究では、アクチンとミオシンの相互作用即ちクロスブリッジ形成量がアシドーシスによりどう影響を受けるかについて、X線回折実験により解析した。ラット摘出心(n=7)をランゲンドルフ灌流し、心拍数 240/min で刺激をしつつ、左心室自由壁からの X 線回折像を記録した。アクチン・ミオシン相互作用は X 線回折像から(1,0)/(1,1) 輝度比を求め解析した。その結果、pH の低下に伴い左心室発生圧の有意な減少と、収縮期(1,0)/(1,1) 輝度比の有意な増大をみとめ、アシドーシス時の左心室発生圧と収縮期(1,0)/(1,1) 輝度比との関係を明らかにした。

Background: Acidosis is known to produce myocardial contractile dysfunction due to a decreased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the myofilaments and an attenuated function of the sarcoplasmic reticulum (SR). Purpose: To investigate the effect of the acidosis on the actin-myosin interaction using x-ray diffraction technique at SPring-8. Methods: We used seven isolated and langendorff perfused rat hearts and recorded x-ray diffraction images and LV pressure at HR of 240 bpm. We analyzed the actin-myosin interaction by (1,0)/(1,1) intensity ratio. Results: Decreasing pH significantly decreased developed LVP and significantly increased systolic (1,0)/(1,1) intensity ratio. Conclusion: This study revealed the relation between the decreased developed LVP and reduced actin-myosin interaction.

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、特に温度、pH などの筋線維周囲の細胞内環境は重要な決定因子である 1)。一般に pH が低下すると、心筋のカルシウム感受性が低下することが知られている 2)。また、心筋細胞内のカルシウムストアである筋小胞体へのカルシウムの取り込みを担う SERCA2 やカルシウムの放出チャネルであるリアノジン受容体も pH の低下により機能が傷害されることが知られている 3)。しかし、現実に拍動している心臓において、pH の低下が収縮力の低下に及ぼす影響がクロスブリッジ形

成過程、心筋細胞内カルシウムハンドリングにどのような作用を及ぼしているのかについて、新たな解析を試みる。そこで、まずクロスブリッジ形成過程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。心臓は直ちに 20 mM の 2,3-butanedione monoxime (BDM)と 20 U/ml の heparin を含むタイロード液(136 mM

NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.3 at 25°C)に浸漬した。次いで切離した大動脈に18ゲージ金属管をカニューレーションし上記よりheparinを除いたタイロード液で灌流圧 100 mmHg で灌流した。次いでBDMを除いたタイロード液(その他の組成は前記に同じ)で灌流液して拍動を再開させた後、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 240 拍/分で刺激を加えた。

左心室内腔に水で満たした薄いラテックスのバルーンを挿入し、そこに接続したチューブを介して左心室容積の調節と左心室圧の記録を行った。またタイロード溶液は pH7.4 および pH7.0 の二通りを用意し、それぞれを切り換えながら計測を行った。

#### X線回折実験

SPring-8 のビームライン BL40XU のチャンバ内に心臓を持ち込み、心基部を上、心尖部が下を向くようにマウントし、左心室自由壁の前壁側から後壁側に抜けるようにX線を照射した。左室容積は左室拡張期末圧が 0 または 20 mmHg とするように設定した。

本研究に用いたX線のエネルギーは 15.0 keV で、 $7 \times 10^{14}$  個の光子の一部をアルミニウムに吸収させた後の  $2 \times 10^{12}$  個の光子からなるビームを用いた。X線ビームのサイズは水平方向が 0.25 mm、垂直方向が 0.10 mm というサイズである。撮像はベリリウムイメージンテンシファイア (V5445P, Hamamatsu Photonics) をもった高速 CCD カメラ (C4880-80-24A, Hamamatsu Photonics) を用いて記録した。

#### X線回折像の解析

X線回折像を解析する際には、(1,0)、(1,1) 反射を円周方向に積分して輝度分布曲線を得た後、背景放射を表す四次関数と(1,0)、(1,1) 反射の分布を表す二つのガウス関数からなる曲線でカーブフィッティングし、それぞれのガウス関数の係数から(1,0)、(1,1) 反射強度を求め、この反射強度比  $I(1,0)/(1,1)$  からクロスブリッジ形成量を推定した。

#### 結果

##### ラット左心室圧の pH による変化

ラット左心室発生圧が pH 変化および前負荷によりどのように変化したかを表 1 に示す。

表1 pH とラット左心室発生圧

pH		
拡張期末圧 (mmHg)	7.4	7.0
0	66±18	47±18*
20	100±37†	61±21*†

\*;  $p < 0.05$  vs pH7.4

†;  $p < 0.05$  vs 拡張末期圧 0 mmHg

左心室拡張期末圧が 0 mmHg あるいは 20 mmHg のいずれでも、pH の低下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、pH7.4 では左心室発生圧は 66±18 mmHg から 100±37 mmHg へと有意に増大し、また pH7.0 では 47±18 mmHg から 61±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

左心室自由壁心筋のクロスブリッジ形成量と pH の関係を表 2 に示す。クロスブリッジ形成量は X 線回折像の解析から得られた(1,0)赤道反射お

よび(1,1)赤道反射の輝度比  $I(1,0)/(1,1)$ を求め、収縮期における  $I(1,0)/(1,1)$ の最低値(ミオシン頭部が最も多く移動したと思われる時点)、および拡張期と収縮期の  $I(1,0)/(1,1)$ の差(当該収縮におけるミオシン頭部の移動量を表すと考えられる)の二項目について、pH および左心室拡張期末圧との関係を解析した。

表2 pHと  $I(1,0)/(1,1)$ の最低値

pH		
拡張期末圧 (mmHg)	7.4	7.0
0	$0.93 \pm 0.16$	$1.56 \pm 0.18^*$
20	$0.91 \pm 0.16$	$1.47 \pm 0.24^*$

\*;  $p < 0.05$  vs pH7.4

表2、表3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、および拡張期と収縮期の  $I(1,0)/(1,1)$ の差は共にpHの低下に応じて有意な変化を示し、共に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。一方で、興味深いことに、各pHにおいて左心室拡張期末圧の増加、すなわち前負荷の増加、によるクロスブリッジ形成量の有意な増加は観察されなかった。

表3 pHと  $I(1,0)/(1,1)$ の変化量

pH		
拡張期末圧 (mmHg)	7.4	7.0
0	$1.29 \pm 0.32$	$0.41 \pm 0.29^*$
20	$1.25 \pm 0.24$	$0.40 \pm 0.30^*$

\*;  $p < 0.05$  vs pH7.4

## 考察

本実験において、pHの低下即ちアシドーシス時に見られる左心室圧の低下が、心筋線維のクロスブリッジ形成量の低下に由来することを確認した。

pHにおける筋線維カルシウム感受性の低下は従来から報告されている通りであり、本実験結果もそれに矛盾するものではない。しかし、アシドーシス時の心筋発生張力の低下は心筋細胞内カルシウム動態異常にもよると考えられ、今後その可能性についての検討を加える。

## 参考文献

1. Hata K, Goto Y, Kawaguchi O, Takasago T, Saeki A, Nishioka T, Suga H., Am J Physiol. 1994 Feb;266(2 Pt 2):H730-40.
2. Komukai K, Ishikawa T, Kurihara S., Am J Physiol. 1998 Jan;274(1 Pt 2):H147-54.
3. Kockskämper J, Zima AV, Blatter LA. J Physiol. 2005 May 1;564(Pt 3):697-714.