

ラット新生児摘出心標本を用いた心筋六角格子構造と興奮収縮連関の発達に関する解析

Analysis of Development of Myocardial Hexagonal Lattice and Excitation-Contraction Coupling in Neonatal Rat Heart

清水壽一郎^a, 田村大和^b, 宮坂武寛^c, 竹下大輔^b, 八木直人^d
 Juichiro Shimizu^a, Yamato Tamura^b, Takehiro Miyasaka^c, Daisuke Takeshita^b, Naoto Yagi^d

^a広島国際大学, ^b奈良県立医科大学, ^c姫路獨協大学, ^d高輝度光科学研究センター
^aHiroshima International University, ^bNara Medical University, ^cHimeji Dokkyo University, ^bJapan Synchrotron Radiation Research Institute

我々は出生後の心筋線維格子の発達過程について、ラット新生児およびウサギ新生児を用いた X 線回折実験を実施し、新たな知見を得たので報告する。

We have investigated the time course of the postnatal development of hexagonal lattice by analyzing the X-ray diffraction patterns obtained from the neonatal rat and rabbit hearts.

新生児心筋細胞は、形態的、機能的に成体心筋細胞とは大きく異なる特徴を持つ。一般に哺乳類では成体の心筋細胞は桿状であるのに対し、新生児の培養心筋細胞は星形を呈しており、横紋構造も不明瞭である。また、筋線維やミトコンドリアなどの詳細な構造を観察するために透過型電子顕微鏡像で比較すると、成体の心筋組織では精緻な筋節構造と緻密なクリステ構造を持つ豊富なミトコンドリアが認められるのに対し、新生児の心筋組織では筋節構造がca. 1/3程度認められるが精緻な配列は認められず、ミトコンドリアも空隙が目立つ疎らな構造を示す。

ラット新生児の左心室外径が約2~3mm、ラット成体の左心室外径が約8~10mmだとすると、ラプラスの法則

$P=2T/R$ (P: 圧, T: 張力, R: 半径) から、新生児の心筋組織の発生する張力が、成体の心筋組織の発生する張力の約1/3~ 1/5程あれば、末

梢血管抵抗による血圧低下を受けても十分な組織灌流圧が得られるものと推測される。

このような未熟な心筋組織におけるアクチン-ミオシン相互作用についての解析の報告はほとんど無く、心筋の発達生理学へ新たな知見を加えることが可能となる。そこで、未熟な心筋組織が成体と同じような精緻な構造へ発達する過程で、筋線維六角格子構造の発達がX線回折像上どのような変化として観察されるのか、さらにアクチン-ミオシン相互作用についての評価法は成体と同じ手法を用いることができるのかどうかについて検討する。

本研究では生後0日目から21日目までのラット新生児~乳児およびウサギ新生児~乳児の摘出心を用い、ランゲンドルフ灌流下にX線回折実験を行う。

実験方法
 標本作製

哺乳0～21日のWistar rat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 CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.3 at 25. C) に浸漬した。拍動停止させた後、心臓ホルダーに懸垂し、計測を行った。

また、哺乳0～14日のNew Zealand White Rabbit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 CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 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、洞結節破壊を行い右心室自由壁心尖部に置いたペースメーカーサイトから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。

X線回折実験

SPring-8のビームラインBL40XUのチャンパー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。Newzealand White Rabbit新生児の

左室容積は左室拡張期末圧が0となるように設定した。

本研究に用いたX線のエネルギーは15.0 keVで、7×10¹⁴個の光子の一部をアルミニウムに吸収させた後の2×10¹²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。

まず、一つの心拍数を選択し安定的な収縮が得られた後、左心室自由壁心外膜面にX線を照射しその回折像を100 frame/秒で記録した。心臓は240拍/分で収縮しており、一心拍を25分割し、六心拍分記録したことになる。以後、同じ心拍数で刺激を加えながらX線の通過部位を200μmずつ心内膜側へシフトさせ、それぞれのX線回折像を上記と同様に記録した。心内膜側へ達したか否かは、X線が深部心筋層を通過した際観察される二重環状の回折像に、乳頭筋からの回折像が付加されることで判断した。心内膜側に達した後、異なるpHを選択し、再度心外膜側心筋から順にX線照射部位を心内膜側へシフトさせながら、同様の計測を繰り返した。ただし、一度X線が照射された心筋は急性放射線障害を起こしている可能性が高く、同一部位での再度の回折像観察を避けるために、pHあるいは心室容積を変えるたびに、心基部側、あるいは心尖部側へ2 mm高さをシフトした上でX線回折像を記録した。

X線回折像の解析

X線回折像を解析するには、X線ビーム位置を中心とし、回折像を30度ずつ12個のセクタに分割し、垂直軸は12時方向・6時方向のセクタを含むように設定した。心筋からのX線回折像は基本的にX線ビームを中心として点対称の関係を持つため、12時方向・6時方向のセクタのように対向する二つのセクタは結晶学的には等価である。また、骨格筋ではアクチン線維、ミオシン線維による六角格子構造からの赤道反射のほか、アクチンやミオシンの繊維の長軸方向の繰り返し構造からの子午反射、アクチンのらせん構造からの層線が観察されるが、心筋では赤道反射のうち(1,0)、(1,1)反射のみが観察される。

結果

ラット新生児左心室回折像

ラット新生児左心室回折像について、出生直後については成体の心臓とは異なり明らかな(1,0)、(1,1)赤道反射は観察されなかった。生後7日目頃には、(1,0)赤道反射はかろうじて確認されるが、(1,1)赤道反射は認められていない。14日目以降では(1,0)、(1,1)赤道反射が共に観察された。(Fig. 1)

ウサギ新生児左心室回折像

ラットとは異なり、ウサギ新生児左心室回折像は、生後1~2日でも(1,0)赤道反射が観察されており、左心室発生圧も成体のそれと違いはない。

考察

現在解析を遂行中であり、詳細な考察は解析結果を待って報告したい。新生児のX線回折像は、未発達な心筋線維格子の経時的な発達

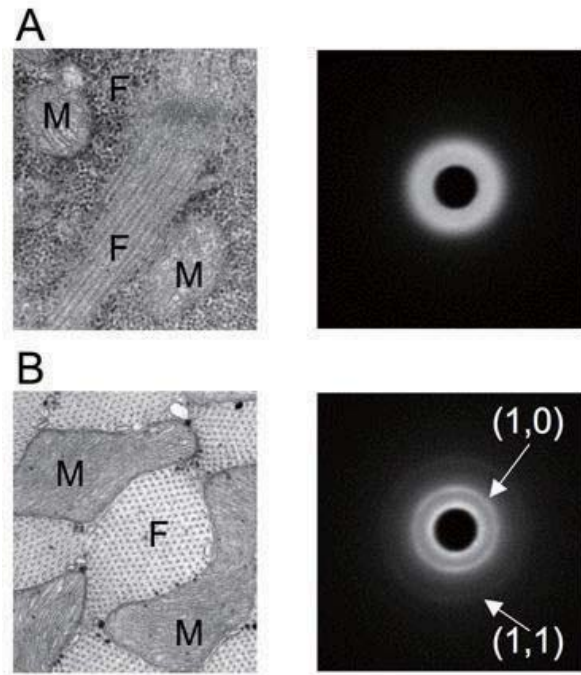


Fig. 1 心筋線維格子構造の出生後の発達解析

生後0日目(A)と21日目(B)のラット心筋細胞の電子顕微鏡画像とX線回折像：生後0日目では筋線維(F)は錯綜しており、六角格子構造は観察されないため、X線回折像も散乱像のみである。21日目では筋線維六角格子構造、ミトコンドリア共に十分な発達が見られる。

過程を表すと思われるが、傍証として心筋収縮タンパク関連タンパク(タイチン、ミオメシンなど)の発現量の推移を観察する必要もある。ウサギ新生児の摘出心では、左心室の力学的な測定も可能であり、X線回折像からの解析結果と左心室発生圧との関連がより詳細に計測しうるものとする。