

発生初期の心臓の収縮機構  
に関する基礎的研究

研究課題番号62570440

昭和63年度科学研究室 補助金(一般C)  
研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者 中西敏雄

東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所  
循環器小児科学教室

発生初期の心臓の収縮機構に関する基礎的研究

研究課題番号 62570440

昭和63年度科学研究室 補助金（一般C）

研究成果報告書

平成元年 3月

研究代表者 中西敏雄

東京女子医科大付属日本心臓血圧研究所  
循環器小児科学教室

## 研究組織

研究代表者：中西 敏雄（東京女子医科大学 循環器小児科 講師）

研究分担者：瀬口 正史（東京女子医科大学 循環器小児科 助手）

研究分担者：高尾 篤良（東京女子医科大学 循環器小児科 教授）

## 研究経費

昭和62年度 1600千円

昭和63年度 500千円

計 2100千円

## 口頭発表

- 1) Nakanishi T., Seguchi M., and Takao A.  
Intracellular Ca concentrations in the newborn myocardium.  
60th American Heart Association Scientific Sessions. 1987, 11.  
Anaheim, Ca, USA  
(Circulation, 76:IV-455)
- 2) Seguchi M., Nakanishi T., Monma K., Takao A.  
Myocardial perfusion after aortic implantation for anomalous  
origin of the coronary artery.  
60th American Heart Association Scientific Sessions. 1987, 11.  
Anaheim, Ca, USA  
(Circulation, 76:IV-551)
- 3) Kondo C., Hiroe M., Nakanishi T., Takao A.  
Ditetection of transient myocardial ischemia in Kawasaki disease  
by Thallium-201 cardiac tomography after dipyridomole infusion.  
60th American Heart Association Scientific Sessions. 1987, 11.  
Anaheim, Ca, USA  
(Circulation, 76:IV-492)
- 4) 中西敏雄, 鎌田清美, 高尾篤良.  
心筋における交感神経 $\alpha$ -および $\beta$ 受容体の発達における変化  
日本新生児学会. 1987年7月. 松江
- 5) 中西敏雄, 瀬口正史, 高尾篤良.  
Fura-2を用いた心筋内Ca濃度測定の試み  
心筋代謝研究会. 1987年9月. 大阪
- 6) Suga H., Tanaka N., Ohgoshi R., Futaki S., Yasumura T., Saeki Y., and  
Nakanishi T.  
Hyperthyroidism like acute inotropic interventions does not  
affect efficiency of contractile machinery from O<sub>2</sub> consumption to  
total mechanical energy in canine left ventricle.  
Symposium of the 9th International Conference of the  
Cardiovascular System Dynamics Society.  
Burlington, Vermont, USA. November 12, 1988.
- 7) 小川俊一, 中西敏雄, 高尾篤良.  
強心剤ミルリノンの変力効果の発達に伴う変化  
第24回日本小児循環器学会 1988年7月7日, 東京
- 8) 中西敏雄, 鎌田清美, 野島京子, 瀬口正史, 高尾篤良.  
未熟心筋における交感神経 $\alpha$ -作動薬の効果について  
第24回日本小児循環器学会 1988年7月7日, 東京

- 9) Nakanishi T., Kamata K., Seguchi M.  
Myocardial alpha-receptor density and inotropism of alphe-agonost  
in the developing myocardium.  
6lth American Heart Association Scientific Meeting.  
Washington DC. November 14-17, 1988

## 研究発表

### <学会誌等>

- 1) Nakanishi T., Okuda H., Abe K., Seguchi M., and Takao A.  
Development of myocardial contractile system in the fetal rabbit  
Pediatric Research 22:201-207, 1987
- 2) Nakanishi T., Okuda H., Seguchi m., Nakazawa M., and Takao A.  
Influence of acidosis on inotropic effect of catecholamines in  
newborn rabbit hearts.  
American J. Physiology 253:H 1441-1448, 1987
- 3) 中西敏雄, 長江 真千, 高尾篤良  
心筋収縮蛋白の発達による変化  
日本小児科学会雑誌 91: 1551-1558, 1987
- 4) 中西敏雄.  
心収縮機構の発達  
小児医学 20: 960-971, 1987
- 5) Ogawa S., Nakanishi T., Kamata k., and Takao A.  
Effect of milrinone on myocardial mechanical function and cyclic  
AMP content in the fetal rabbit.  
Pediatric Research 22:282-285, 1987
- 6) Takao A., Niwa K., Kondou C., Nakanishi T., Satomi G., Nakazawa M., and  
Endo M.  
Mitral regurgitation in Kawasaki disease.  
Kawasaki Disease. Alan Liss Ins. 1987, p311-323
- 7) Nakazawa m., Nojima K., Okuda H., Imai Y., Nakanishi T., Kurosawa H.,  
and Takao A.  
Flow dynamics in the main pulmonary artery after the Fontan  
procedure in the patients with tricuspid atresia or single  
ventricle.  
Circulation 75:1117-1123, 1987
- 8) Nakanishi T., Seguchi M., Takao A.  
Development of the myocardial contractile system.  
Experientia 44:3242-3250, 1988
- 9) Nakanishi T., Kamata k., Nojima k., Seguchi M., and Takao A.  
Inotropic effect of phenylephrine and myocardial alpha-adrenergic  
receptor in newborn animals.  
J. Molecular Cellular Cardiology (in press).

## 出版物

- 1) 中西敏雄, (高尾篤良 編)  
発達経過にある心筋の特性  
小児循環器病学, 中外医学出版社, 1989 (印刷中)
- 2) Nakanishi T., Yasukouchi S., Seguchi M., Ogawa S., and Takao A.  
Cytosolic calcium concentration in the newborn and fetal rabbit  
heart. Proceeding of the 3rd International Symposium on  
Etiology and Moepogenesis of Congenital Heart Disease.  
Futura, 1989 (in press)

## はしがき

本研究の目的は、発生、発達過程にある心臓がどのような機能的特徴をもっているか、未熟心筋の機能的な特徴がどのような機序でもたらされているか、そして未熟心筋の特徴はどのような臨床的意味をもつか、を調べることである。すなわち、生物学的、発生学的のみならず、周産期の心疾患を治療する上で重要な、心機能の発達に関する基礎的な知識を得ることが本研究の目的である。

本研究では、主に家兎を用いて実験を行った。それは動物の入手が容易なことと、胎仔の大きさがある程度あり、生化学的実験が施行できるためである。もちろん家兎で得られた結果がそのままヒトに応用できるわけではない。しかし、ヒトの発生過程でもいずれかの時期には、以下に述べる家兎が経る過程と似た過程を経ている可能性は高い。そうゆう意味で本研究では小児心臓病学（発達心臓病学）にとって重要な研究成果が得られたといえる。



## 成果

### 1. 胎仔心筋細胞内カルシウム濃度の測定

#### 緒言

心臓は発生のごく初期の未だ tube にすぎぬ頃から収縮を始める。心臓の収縮はどのようにして始まり、発達に伴う変化をとげ、そしてついに完成されるのであろうか？ これまでに我々は家兎を用い、胎仔から新生仔、そして成獣までの発達に伴う心機能について調べてきたが、カルシウムイオン (Ca) について直接調べることはできなかつた。Ca は心臓の収縮を媒介する重要なイオンである。近年カルシウム感受性蛍光色素をもちいて細胞内カルシウム濃度を測定する試みが国内外の多くの研究者によりなされるようになってきた。我々もこの蛍光色素を用いて胎仔及び新生仔家兎心筋で発達に伴う心筋細胞内カルシウム濃度の変化について調べた。

#### 方法

家兎の妊娠満期は 31 日であるが妊娠 21 日の胎仔と生後 5 日の新生仔を用いた。胎仔は母親より帝王切開で取り出した。それらの動物より心臓大血管を摘出し、倒立顕微鏡 (Nikon, TMD) 上の心筋バスの上にのせ、上行大動脈にカニューレを挿入し、ハーバードポンプを用いて 3 ml/g.g muscle/分の流量で心臓を灌流した。

右室流出路と左室の基部 (後壁) に糸をかけ、それを利用してふたつのフックの間に心臓を固定した。心尖部を張力トランスジューサー (Kulite) につないだ。収縮に際し心臓が若干もちあがるが、カバーガラスより観察面が離れることはなかつた。

心筋温は 27°C に維持し 40 回/分の電気刺激を加えた。60 分間

心機能を安定させた後、以下の心機能指標を測定しつつ実験を行った。測定項目は、発生張力（Developed tension : DT）、その一次微分（ $dT/dt$ ）、静止張力（Resting tension : RT）、張力の始まりから最大になるまでの時間（Time to peak tension : TPT）であった。

コントロールの灌流液（Krebs-Henseleit 溶液、K-H液と略）の組成は、NaCl:118mM, KCl:6mM, CaCl<sub>2</sub>: 1.5mM, MgCl<sub>2</sub>:1mM, NaHCO<sub>3</sub>:24mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.435mM, glu-cose:6mM である。灌流液は95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>でガス化し、pHは7.4であった。

Ca感受性蛍光色素 fura-2 のエステル fura-2/AM をクレブス液に溶解し、それで心臓を灌流することで fura-2 を細胞内に load した。Fura-2 を含む液は、まず fura-2/AM を dimethylsulfoxide (DMSO) 中に 1 mM になるよう溶かし、その 40  $\mu$ l と 25% w/w Pluronic F-127 (Molecular Probe 社) 10  $\mu$ l を混合し、それに 300  $\mu$ l の胎仔牛血清を加え、さらに 16 ml の K-H 液を加えた。この液で 30 分灌流した後、30 分間コントロールの K-H 液で灌流し、細胞外の fura-2/AM を流し去った。2.5  $\mu$ M Fura-2/AM を 30 分 load すると張力はコントロールの 60% に低下したが、wash out 30 分でほぼコントロール値にもどった。この時点で心表面に 340 と 380 nm の励起光をあて、心表面からの蛍光を測定することで細胞内 Ca 濃度を測定した。（倒立顕微鏡上の心臓の模式図を図 1 に示す）。コントロール状態の細胞内 Ca の値を測定し、その後灌流液の Ca 濃度を 15 mM にあげさらに細胞内 Ca 濃度を測定した。

単離細胞を用いた実験：

単離細胞を用いた実験は新生仔を用いておこなった。新生仔より心臓を摘出し、Ca を含まない K-H 液で 5 分灌流後、collagenase (25 mg/ml) と hyaluronidase (25 mg/ml) を含む Ca-free の K-H 液で 6 分灌流した（37°C）。どろどろになった心室筋を

はさみで細切しCa-freeのK-H液に細胞を浮遊させ、メッシュでこした。これを250rpmで2分遠心し、その沈渣に前述の2.5  $\mu$ M fura-2/AMを含むK-H液を加え細胞を浮遊させた。ただちに再度250rpmで2分遠心し、沈渣をコントロールのK-H液に浮遊させた。その一部を顕微鏡上のバスにいれ、細胞がカバーガラスの上におちつくのを待って、毎分0.5 mlで灌流を開始した。灌流液は27°Cに保ち、40/minで電気刺激した。この時点で細長い形をした細胞(rod-shaped cell)は60-80%、のこりは円形を呈し、rod cellを測定の対象とした。1個の細胞に励起光があたるように励起光をしぼり蛍光を測定した。

#### 蛍光測定：

蛍光測定装置はSpex社製(New Jersey, USA)のものを持ちいた。450wのキセノンランプを光源とし、モノクロメーターで340と380nmの紫外線を取りだした。回転するChopperで2つの波長の励起光を交互に顕微鏡にいれた(図1)。心臓の収縮に伴う動きの影響を少なくする目的で対物レンズはできるだけ低倍率のものすなわち10倍のNikon Fluorを持ちいた。Fura-2の蛍光は505nmのバンドパスフィルターを通し、光電子増倍管で測定した。本実験では各波長での蛍光の1回観察時間を5msecとし、20msecごとに各波長の信号を得た。Ca濃度は340nmでの蛍光強度と380nmでの蛍光強度の比より推定した。全ての実験で心筋にfura-2を負荷するまえに自家蛍光を測定しておき、それを差し引いた後、蛍光比を計算した。

#### 細胞内Ca値の推定：

Fura-2の蛍光比(340/380)よりCa濃度を求めるには標準曲線を作製し、それを利用した。標準曲線作製時のFura-2は生体内にある方が望ましく、また灌流心での細胞内Ca濃度の推定に

は灌流心で細胞内Ca濃度を操作し標準曲線を作ることが望ましい。しかし灌流心ではCa透過性亢進剤であるionomycinの効果が不十分で、その試みは成功しなかった。そこで標準曲線は単離細胞で作製し、それを灌流心に適用した。

前述のごとくfura-2をloadした細胞を作製し遠沈後、沈渣を数本の試験管に分け、そのなかにionomycinを含むCa標準液を各々いれ、120分放置して細胞内外のCa濃度が同じになるようにした。Ca標準液は2 uM ionomycin, 30 mM TES, 1 mM EGTA, 6.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM azide, 124 mM KCl, 11 mM NaCl<sub>2</sub>, および様々な量のCaCl<sub>2</sub>を含み0.5 M KOHでpH 7.1に調整した。Ca濃度はFabiatoの方法で計算し、pCa (= -log Ca)が9, 8, 7, 6.7, 6.5, および6になるようにした。これら細胞浮遊液を顕微鏡上のカバーガラスのうえにおき、単一細胞に励起光をあて蛍光を測定した。図2にこのようにして求めた標準曲線をしめす。

統計処理:

数値は平均値±標準誤差で表し、平均値の差は2群間の比較はstudent t-testで検定し、p<0.05の場合を有意差とした。

## 結果

灌流心にfura-2をload後、心表面を観察すると、心筋細胞に比較的均一に分布する蛍光が観察された(図3)。図4は蛍光強度を光電子倍增管で測定したものである。収縮に際し340 nmの蛍光は上昇し、380 nmの蛍光は低下した。Fura-2のload前の自家蛍光はfura-2蛍光の20%以下であった。Fura-2蛍光より自家蛍光を引き、その比を計算したものが図5である。心臓の収縮に一致してその比は上昇している。この比はカルシウム濃度に相関するので比の上昇はカルシウム濃度の上昇を意味する。

図5は新生仔のデータで蛍光比は弛緩期  $1.05 \pm 0.05$ 、収縮期  $1.61 \pm 0.06$ であった。灌流液のカルシウム濃度を  $1.5 \text{ m}$  から  $15 \text{ m M}$  にあげると細胞内カルシウム濃度の上昇と、収縮力の増加が観察された。

図6は21日胎仔の同様の実験結果を示す。胎仔では、コントロール状態での  $340 \text{ nm}$  と  $380 \text{ nm}$  の蛍光の強度比が  $1.53 \pm 0.06$  (弛緩期)、 $2.17 \pm 0.06$  (収縮期) で新生仔より高かった。

$\text{Ca}$  標準液に平衡させた単離細胞での蛍光測定よりつくった標準曲線を用いて、蛍光の強度比をカルシウム濃度に換算した。弛緩期と収縮期、そして細胞外液カルシウムが  $1.5 \text{ mM}$  のときと  $15 \text{ mM}$  の時の新生仔と胎仔の細胞内カルシウム濃度を示す(図7)。どの条件下でも胎仔が有意に高い値を示した。

新生仔の灌流心と単離細胞での細胞内  $\text{Ca}$  濃度を比較するとほぼ同様の値であった(図8)。

図9は追加実験で求めたデータで、いろいろな細胞外液カルシウム濃度での心筋収縮力をその最大値に対する百分率(% of maximal value)で表した。新生仔心では曲線が右に偏位しており、このことはコントロール状態( $[\text{Ca}]_o = 1.5 \text{ mM}$ )において新生仔心では自身の最大出力に比し比較的低い張力を発生していることになる。つまり、ある細胞外液カルシウム濃度での収縮性は新生仔で低く、胎仔で比較的高いことを示唆した。

## 考案

家兎の胎生は31日で、心臓大血管の形態が解剖学的に完成するのは16日頃といわれている。つまり今回の実験は肉眼的形態が完成された後の胎仔心筋について、細胞内  $\text{Ca}$  濃度の発達に伴う変化をみたわけである。

成熟心における  $\text{Ca}$  制御機構について簡単に述べると、まず細胞

膜興奮に伴って Slow inward current を通して Ca が流入する。その Ca は筋小胞体よりの Ca 放出をうながし細胞内 Ca 濃度は上昇する。弛緩期には Ca は小胞体にとりこまれ、小胞体や T 管を介して、また細胞膜の Na - Ca 交換を通して細胞外へ放出される。細胞内 Ca 濃度は Ca を細胞内に放出するシステム ( Ca-releasing system ) と Ca をとりこむシステム ( Ca-sequestering system )

との相対的な働きで決まる。今回の実験で胎仔で細胞内カルシウム濃度が高いことがわかったが、この一因として胎仔での小胞体の未発達があげられる。胎仔では細胞内 Ca 濃度の制御はおもに細胞膜によりなされていることを以前我々は示した。胎仔では細胞膜より流入する Ca が比較的多いにもかかわらず、小胞体が胎仔では未発達であるために細胞内カルシウム調整能が低く、そのために比較的細胞内カルシウム濃度が高くなっていると考えられる。

心収縮性とはおおまかに言って、「ある心筋が潜在的に発生できる最大の収縮力のうち、何%の力を実際に発生しているか」ということであり、それは細胞内 Ca イオン濃度に依存する。図9の曲線は心収縮性を示しているといえるが、それは新生仔で右に移動している。細胞外液の Ca 濃度が生理的濃度 ( 例えば 1.5 mM ) の時、胎仔では最大の 55 - 60 %、新生仔で 33 % の力を出していることになり、このことは正常近辺の細胞外液 Ca 濃度下では胎仔の細胞内 Ca 濃度が高く収縮性が比較的亢進していることを示唆する。

今回求めた細胞内 Ca 濃度の値は他の研究者の求めた値より若干低い。Peetersらは indo-1 をもちいて培養鶏胚心筋細胞で Ca 濃度を測定し、328 nM ( 弛緩期 )、および 813 nM ( 収縮期 ) であったと報告している。また Wierらは fura-2 をもちいて成獣ラット心筋単離細胞で Ca を測定し 270 nM であったと報告している。Fura-2 および同種の蛍光色素を用いた細胞内 Ca 濃度の絶対値の測定には未だ解決すべき多くの問題がある。そのひとつは Ca 標準曲線の作製の問題である。今回の実験では灌流心を用いて標準曲線を作製することはできなかった。Fura-2 を細胞より

漏出させることなく、しかも細胞膜をCa透過性にすることができれば理論的には可能であるが、今後さらにこれらの問題を解決する必要があり、それまでは今回求めたCa濃度の値も暫定的なものといわざるをえない。

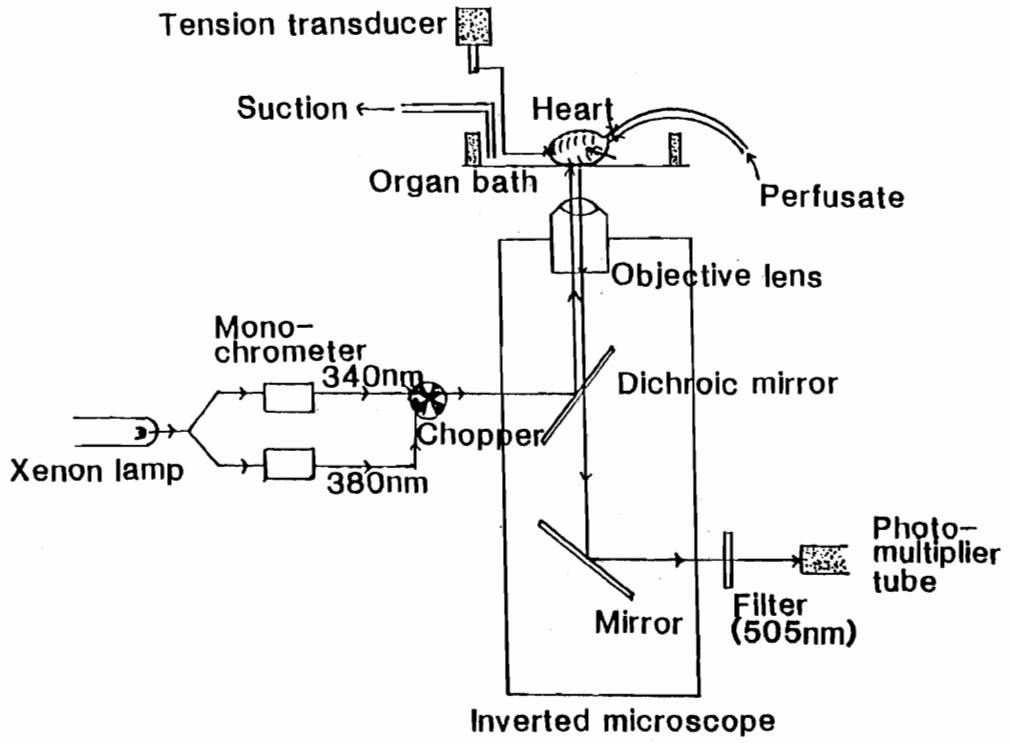


Figure 1

## Ca calibration

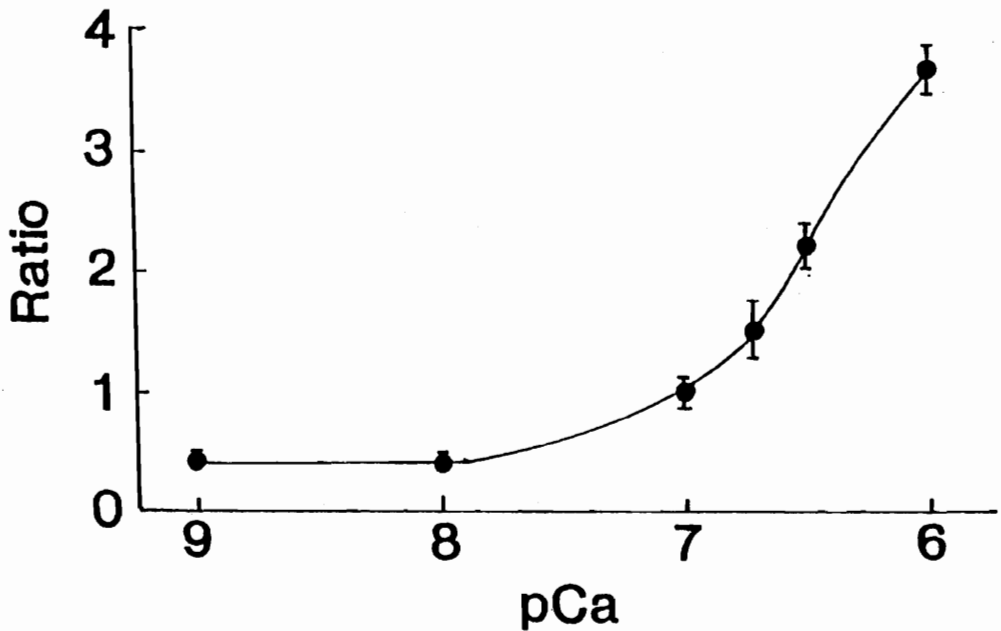


Figure 2



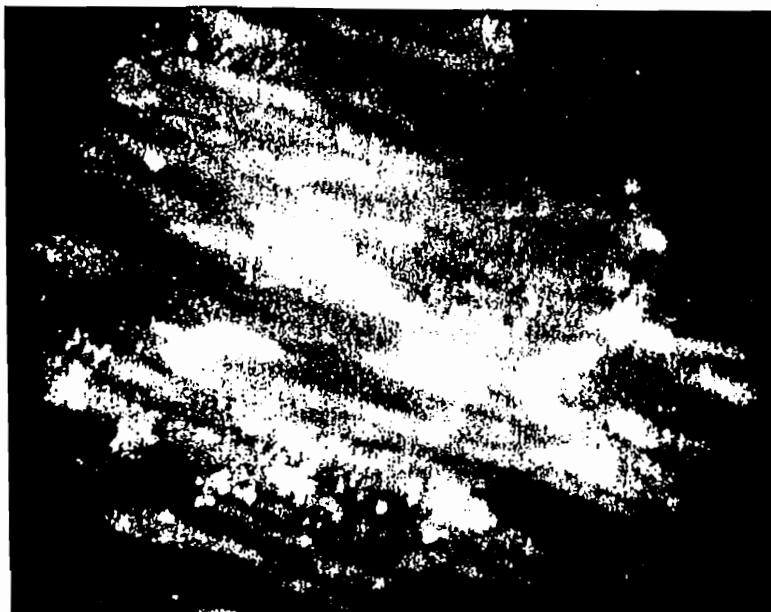


Figure 3 (2) 3

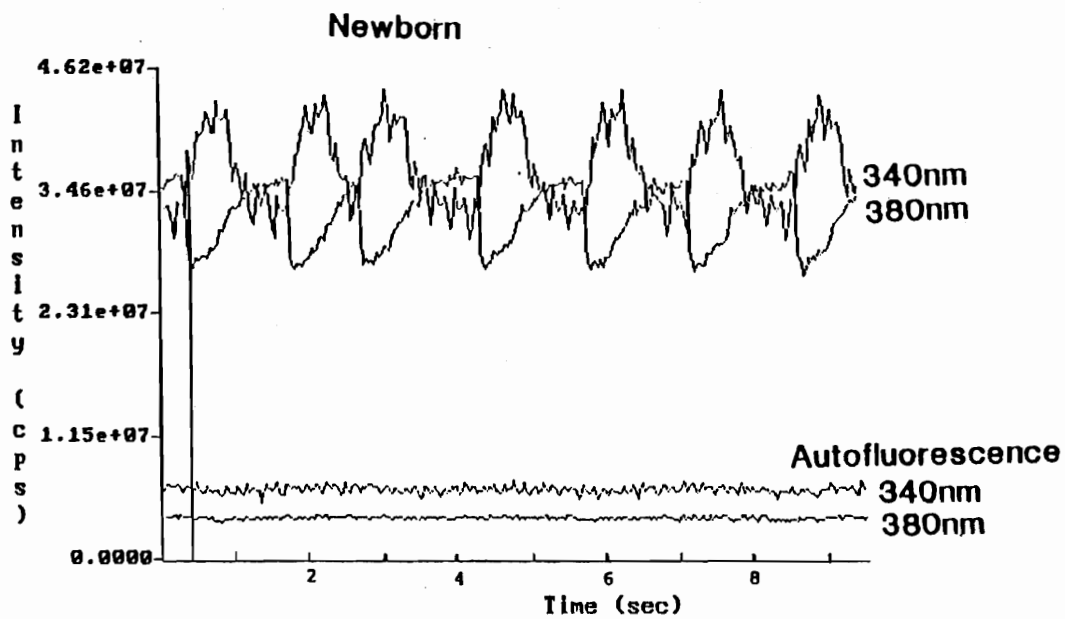


Figure 4 (2) 4

Newborn rabbit

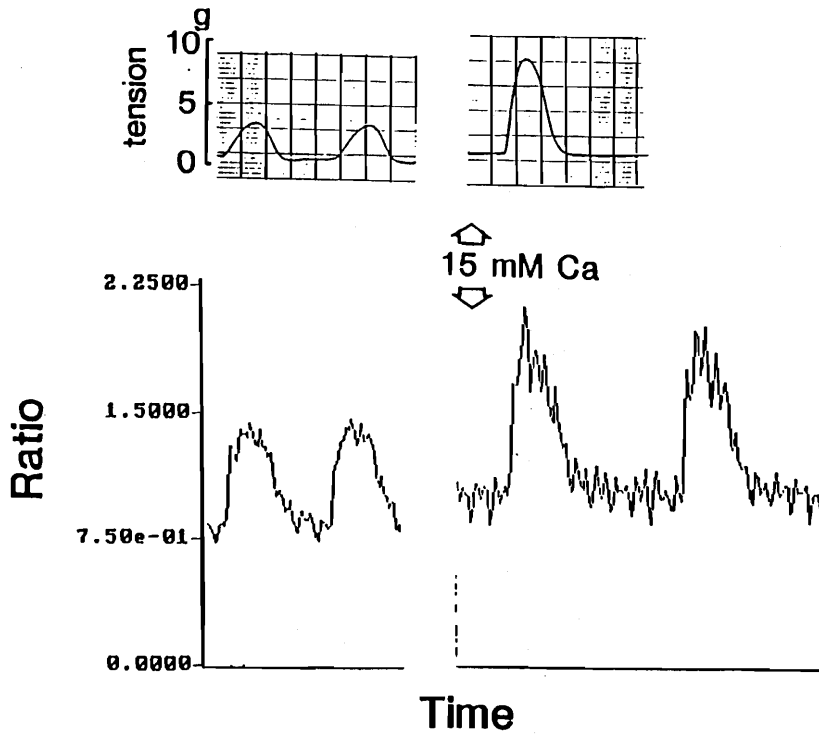


Figure 5 5

21-day fetus

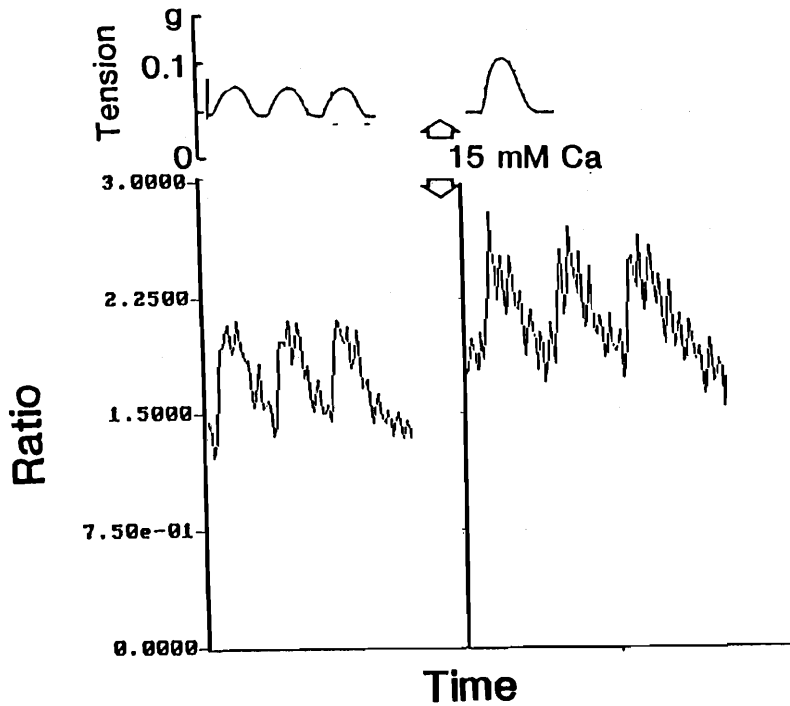
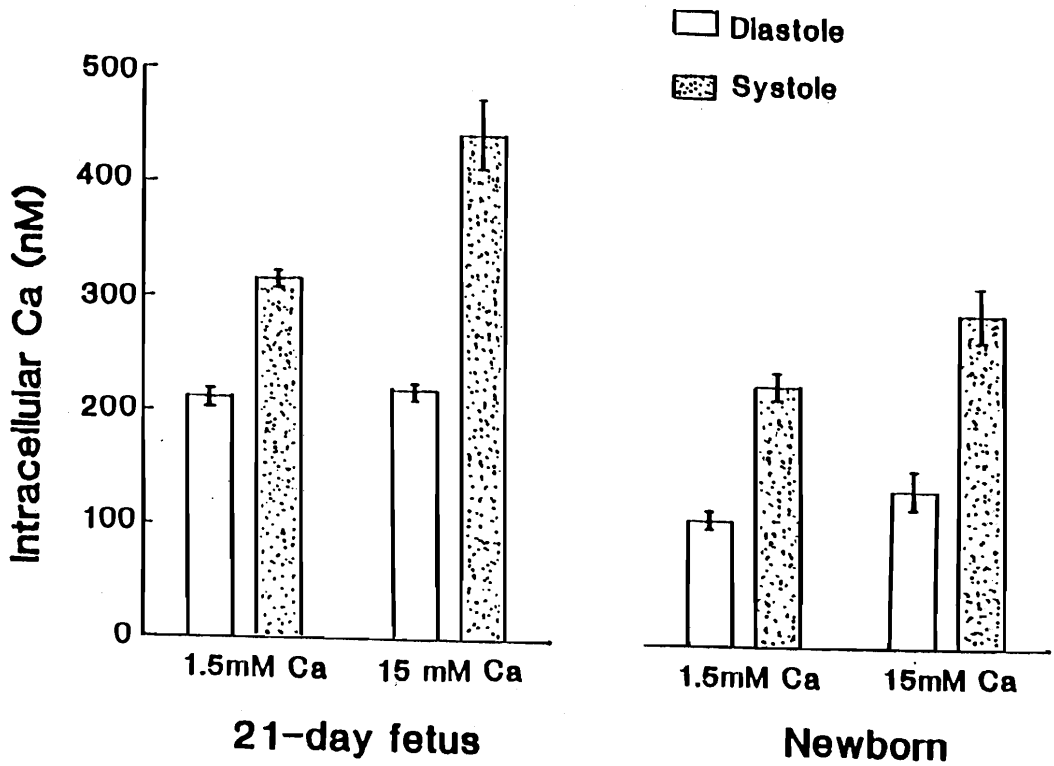


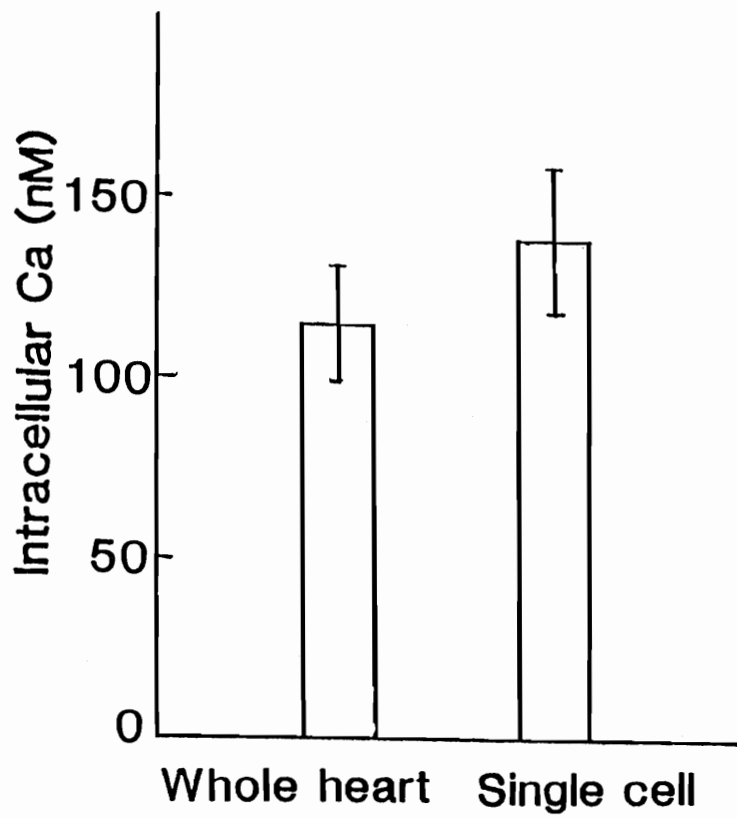
Figure 6 6



127

---

### Diastolic Ca in the newborn



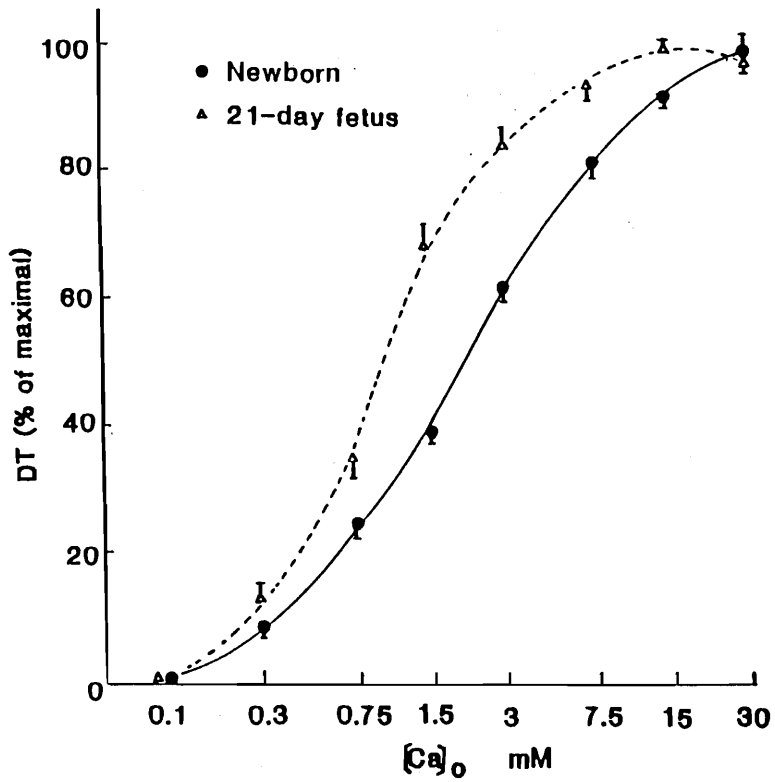


Figure 9

29