

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 **A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers**

和 訳 **新しいカーボンファイバーを用いた単一心筋細胞の収縮機能測定法**

指導教官 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 保田 壮一郎

心不全や心機能低下症例の新たな治療法として心臓の収縮機能を改善する遺伝子治療が注目され様々な実験系で研究が進められている。このうち個体レベルの実験は臨床に類似した条件での評価が可能であるが、心筋の遺伝子導入部位と非導入部位が混在し、さらに生体の複雑な代償機転の影響を受けるため、遺伝子導入部位を特定し収縮機能の改善を評価する目的には不適と思われる。また、乳頭筋などの多細胞の集合標本は代償機転を除外できるもののやはり遺伝子導入および興奮収縮過程の不均一性があり収縮機能の厳密な評価は困難である。単一心筋細胞標本はこのような問題を持たない上に高い遺伝子導入効率を実現できるという利点を持つ実験系である。従って全身の適応の破綻としての心不全の評価はできないものの心筋収縮機能改善のための効果的遺伝子のスクリーニング系としては最適なものとなる可能性がある。しかし、単一心筋細胞は小さく、骨格筋線維標本のように腱を両端に持たないため張力測定装置へ固定保持するのが難しく、短縮距離と発生張力の測定によって収縮機能を厳密に評価することは困難とされてきた。

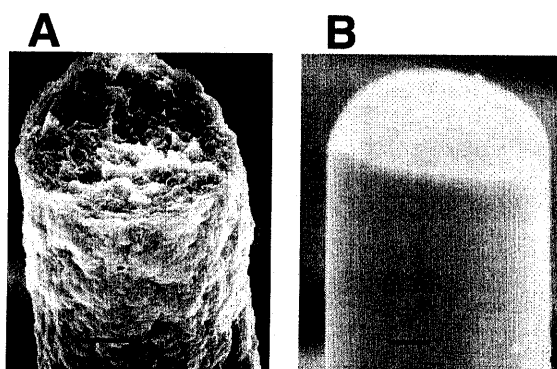


図 1 A: 本研究において使用したカーボンファイバーの電顕像。Bar = 10 μm . B: 従来の市販のカーボンファイバー。Bar = 1 μm .

過去に心筋細胞の発生張力の測定方法がいくつか報告されている。このうちガラスマイクロニードルで細胞

を穿刺する方法、マイクロピペットで心筋細胞の両端を吸引保持する方法、細胞にカトランスデューサーを接着剤で付ける方法は、技術的に難しく、また細胞膜を傷害しやすいため成功率が低いという問題があった。これに対しカーボンファイバーは細胞表面に接触させると、おそらく互いの表面に存在する電荷によると考えられるが、容易に付着することが報告されている。しかし従来用いられてきた均質無構造なカーボンファイバー (図 1B) はその付着力が十分でなく、細胞が大きな負荷に抗して急に強い力を出すと外れやすくなってしまいうため、軽い負荷から徐々に負荷を強くする漸増負荷に対する発生張力しか測定できない、という問題があった。

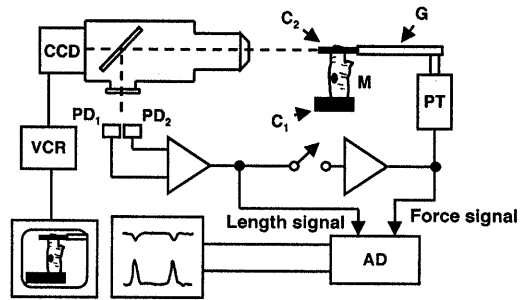


図 2 実験装置の概略図。心筋細胞 (M) を 1 対のカーボンファイバー (C₁, C₂) で保持する。C₁, C₂ はガラス棒 (G) に接続されている。C₂ と心筋細胞の付着点の像を 1 対のフォトダイオード (PD₁, PD₂) に投影する。フォトダイオードからの出力は心筋細胞の長さを表すシグナルであり、フィードバック回路を介してピエゾ素子 (PT) を駆動する。AD: データ記録装置。



今回申請者が共同研究者と共に新たに開発した Graphite Reinforced by Carbon (GRC) ファイバーは、径 1-5 μm のカーボンの細顆粒と樹脂を練り合わせた混合物をサファイアに開けた小孔を通して棒状にした後に 1500°C で炭化させて固める、という行程で作成され、その表面に無数の小さな凹凸がみられる (図 1A)。この表面の形状が細胞表面との付着に有利なように電荷を増加させていると考えられ、心筋細胞に接触させるだけで強く付着することを見出した。この製法で直径 30-40 μm の固いもの (コンプライアンス 0.015-0.02 m/N) と、直径 5-7 μm のある程度のコンプライアンスを持つもの (5.5-7.5 m/N) の 2 種類のカーボンファイバーを作り、それぞれを図 2 に示すように、単離単一心筋細胞 (体重 200-300g の雄 Wister ラットの心臓をペントバルビタール麻酔下に摘出し、コラゲナーゼ・プロテアーゼを含む Tyrode 灌流液にて大動脈より逆行性に灌流して単離した) の両端に付着させて保持した。カーボンファイバーにより細胞の長軸方向に引っ張りを加えた結果を示す (図 3A, B)。細胞の長軸方向にフーリエ解析を行いサルコメア長を解析したところ 1.9 μm から 2.1 μm へ伸長しており、ま

図 3 心筋細胞を 1 対のカーボンファイバーで保持し、細胞を伸長した。サルコメア長の平均は、自然長の細胞 (A) では 1.9 μm 、伸長された状態 (B) では 2.1 μm 。Bar = 20 μm 。C: A と B におけるサルコメア長のスペクトル。

た図3Cに見られるようにサルコメア間での伸長のばらつきもなく、一様に引き伸ばされていた。この程度の伸長ではファイバーは細胞から離れずに付着している。さらに伸長を加えると細いファイバーが細胞から外れるが、その時のファイバーの撓みとファイバーのコンプライアンスから、細胞とカーボンファイバーの付着力(ファイバーが細胞から離れる際の最大張力)を計算した。この付着力の値 $2.42 \pm 0.39 \mu\text{N}$ (mean \pm S.D., $n = 5$) は後ほど示す心筋細胞が強心薬投与下での単収縮により発生する張力 ($\sim 1.3 \mu\text{N}$) よりも大きく、つまり細胞が強く収縮しても外れないことを示している。この新しいカーボンファイバーを用いて申請者は心筋細胞の単収縮における発生張力を測定するシステムを開発した(図2)。電氣的ペースングによって細胞を単収縮させると太いカーボンファイバーは固いため動かないが、細い方は引っ張られて数 μm 程度撓む。このカーボンファイバーの動きを2分割フォトダイオードに投影することによ

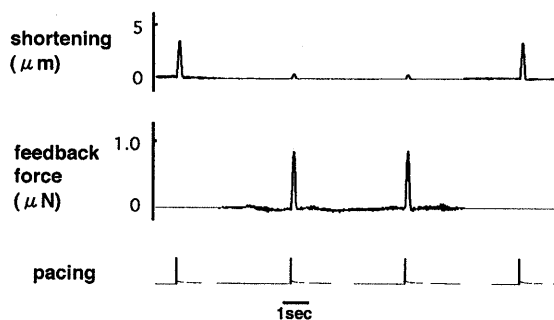


図4 心筋細胞を0.2 Hzの頻度でペースングして4連続の単収縮を記録し、フィードバック制御の効果を示す。上段は心筋細胞の短縮距離、中段はフィードバック力、下段はペースングスパイク。

縮する。2拍目、3拍目はフィードバックをかけた収縮であるが細胞の短縮距離は細胞の全長の0.5%以下、つまりほとんど短縮していない。この際にフィードバック回路にかかる信号より心筋細胞の等尺性張力を得た。直ちにフィードバックをoffとした4拍目は1拍目と同じ収縮をしており、カーボンファイバーを

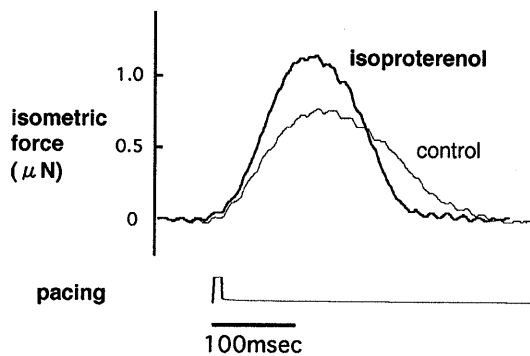


図5 強心薬が等尺性単収縮に及ぼす影響。細線はコントロール、太線はイソプロテレノール $10 \mu\text{M}$ を投与下の記録。

って検出し、この変位シグナルにファイバーのコンプライアンスを乗じることにより発生張力を得る。さらに細いカーボンファイバーをピエゾ素子に固定しそのドライバーに変位シグナルの変化を打ち消すようなフィードバックシグナルを加えることによって等尺性収縮に等しい条件をつくり出すことに成功した。図4にフィードバック回路による等尺性張力の記録の一例を示す。まず1拍目はフィードバックをかけない条件であり細胞はファイバーのコンプライアンスによって決まる負荷に対して収縮し短

縮する。2拍目、3拍目はフィードバックをかけた収縮であるが細胞の短縮距離は細胞の全長の0.5%以下、つまりほとんど短縮していない。この際にフィードバック回路にかかる信号より心筋細胞の等尺性張力を得た。直ちにフィードバックをoffとした4拍目は1拍目と同じ収縮をしており、カーボンファイバーを付着させて負荷をかけても細胞が障害されていないと考えられる。図5に強心薬の効果の一例を示す。イソプロテレノール $10 \mu\text{M}$ を投与すると等尺性張力の最大値は $1.06 \pm 0.20 \mu\text{N}$ (単位断面積あたり $2.91 \pm 0.65 \text{ mN/mm}^2$, $n = 5$) となり、コントロールの $0.73 \pm 0.17 \mu\text{N}$ (単位断面積あたり $2.0 \pm 0.43 \text{ mN/mm}^2$, $n = 5$) に比較して有意に増加し ($P < 0.05$) また収縮・弛緩の時間経過も速くなる傾向が認められ他の実験系で観察される生理的応答がこの系でも実現されることを確認した。

さらにこのフィードバック回路を用いて、漸増負荷に対する心筋細胞の応答を調べるために、フィードバック力を少しずつ増加させながら細胞の収縮を観察した(図 6A)。これらから得られた短縮距離を横軸に、発生張力を縦軸にプロットすると、1回の収縮弛緩に対応して1つのループが得られた。フィードバック力が変化すると、つまり細胞にかかる負荷が変化するとこのループも囲む面積を変えながら傾きを変えていった(図 6B)。さらに1つのループで囲まれる面積、つまり細胞が1回の単収縮でする仕事を縦軸に、細胞にかかる負荷を横軸にとりプロットすると図 6C に示すようなカーブを得た。これは、心筋は中程度の負荷に対して外的仕事が最大になるという Fenn 効果を示すものと考えられ、この実験系によって心筋細胞の生理学的性質を多角的に検証できることを示している。圧負荷肥大心より単離した心筋細胞は外的仕事を最大にする負荷が高い方へ移動しているのではないかといった疑問に対し現在実験を計画中である。

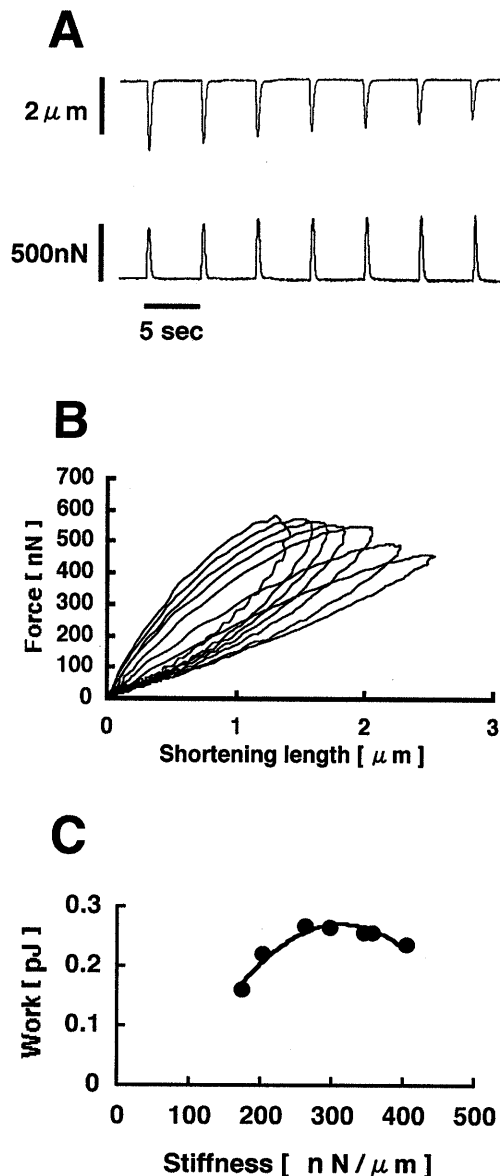


図 6 単一心筋細胞に漸増負荷をかけた場合の単収縮における仕事量。A: 細胞の短縮距離(上段)と発生張力(下段)は負荷を漸増させると変化する。B: A に示した単収縮毎の短縮距離 - 発生張力はループを描く。C: 単収縮毎の仕事量と漸増負荷の強さとの関係。

積、つまり細胞が1回の単収縮でする仕事を縦軸に、細胞にかかる負荷を横軸にとりプロットすると図 6C に示すようなカーブを得た。これは、心筋は中程度の負荷に対して外的仕事が最大になるという Fenn 効果を示すものと考えられ、この実験系によって心筋細胞の生理学的性質を多角的に検証できることを示している。圧負荷肥大心より単離した心筋細胞は外的仕事を最大にする負荷が高い方へ移動しているのではないかといった疑問に対し現在実験を計画中である。

以上のように申請者は共同研究者と共に新たに開発したカーボンファイバーとフィードバック回路を組み合わせて単離単一心筋細胞の単収縮における発生張力や仕事を測る新しい測定系を開発した。この実験系は過去に報告された心筋細胞の張力測定法には認められない以下の2つの優れた特徴を有している。(1) 心筋細胞を傷害することなく再現性をもって容易に等尺性張力の最大値を測定できること。(2) 負荷を任意に変えながら心筋細胞の発生張力や仕事の量や効率を記録できることである。現在細胞内 Ca^{2+} 濃度の同時測定を行うべくシステムを改良中である。これにより、薬物や遺伝子導入によって心臓のエネルギー効率を改善させるという心不全の新たな治療法を開発するのに役立つのみでなく、様々な心不全の病態において上昇した負荷に対して心筋がいかに対応しているかを細胞レベルで評価することが可能になると考えている。