3PD049

灌流心におけるカルシウム波の観察と特性

○金子智行^{1,3}、田中秀央²、藤田克昌³、小山田正人¹、中村収³、河田聡²、高松哲郎¹ (京都府立医大・第二病理、²京都府立医大・臨床検査、³阪大・院工・応用物理)

心筋の虚血や傷害によって生じる心筋のカルシウム過負荷は、振動性の収縮波や後脱分極などを生じ、不整脈の原因になると考えられている。従来より培養心筋、単離心筋などにおいて Ca^{2+} wave の観察がなされてきたが、心機能や不整脈との関連が方法の制限から解析できなかった。そこで我々はランゲンドルフ灌流下のラット摘出心に、カルシウム指示薬である fluo-3/AM を経冠動脈的に負荷した後、心電図モニタ下における細胞内カルシウム動態をリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡(Hama *et al.*, Cell Signal, 10, 331-337, 1998)で観察し、さらに二光子励起顕微鏡によるリアルタイム観察を試みた。

共焦点顕微鏡での観察の結果、正常な心臓では Ca^{2+} wave はほとんど観察されなかった。しかし、細胞内カルシウム濃度が高い細胞では絶えず Ca^{2+} wave が発生しており、周囲の Ca^{2+} transient にも反応せず、隣接した細胞に Ca^{2+} wave が伝播する現象も観察された。一方、この様な Ca^{2+} wave とは異なり細胞内カルシウム濃度が正常であるにもかかわらず、 Ca^{2+} transient の休止期にだけ発生する Ca^{2+} wave も観察された。この Ca^{2+} wave は、ギャップ結合機能の阻害剤である heptanol を加えたり、房室結節を機械的に切断し Ca^{2+} transient を消失させると多数観察された。逆に、heptanol の洗い流しや電気刺激によって Ca^{2+} transient を回復させると、 Ca^{2+} wave は消失した。この Ca^{2+} wave も極希に隣接した細胞に伝播する現象も観察された。

したがって、心臓の Ca^{2+} wave には細胞内カルシウム濃度の違いにより二種類に分けられ、細胞内カルシウム濃度が正常でも起こる Ca^{2+} wave は Ca^{2+} transient によりカルシウム動態の空間的不均衡が正常化され、不整脈の発生には関与していないと考えられるが、細胞内カルシウム濃度の高い細胞で起こる Ca^{2+} wave は不整脈の発生に関与している可能性が示唆された。

一方、二光子励起顕微鏡は走査デバイスにニポウディスクを採用することにより、リアルタイムでの心筋の Ca^{2+} wave の観察を試みている。

(この研究の一部は日本学術振興会未来開拓研究「生体の計測と制御」によって行われた。)

T. Kaneko, H. Tanaka, K. Fujita, M. Oyamada, O. Nakamura, S. Kawata, T. Takamatsu : Observation and characterization of the Ca^{2+} waves in the perfused whole heart.

3PD051

ステロイドによる海馬スライスでの NO 産生増強の可視化解析

○高田則雄¹、木本哲也¹、高橋泰城¹、小島宏建²、小南思朗³、長野哲雄²、川戸佳¹ (¹ 東大院・広域・生命物理、² 東大院・薬・薬品代謝化学、³ 広島大学総合科学部)

現在までに知られているステロイドの作用は、遺伝子発現をともなつて数時間以上経たあとに効果が現れる長期効果が一般的であった。

我々は NO 感受性蛍光色素 DAF2 をもちいて海馬スライスでの NO 産生を可視化解析し、NO 産生に与えるステロイドの急性効果を発見した。

8 週齢のラットより調製した厚さ 400 μm の海馬スライスに 10 μM の NO 感受性蛍光色素 DAF2 を 30 分間負荷し、ビデオ顕微鏡により蛍光画像解析した。その結果、NMDA の灌流刺激による海馬 CA1 領域での NO 産生を観測した。さらに、海馬スライスを NMDA 刺激前 20 分間ニューロステロイドである pregnenolone sulfate またはストレスステロイドである corticosterone でインキュベートすると、NMDA 灌流刺激時の NO 産生が増大することを観察した。当日はステロイドの Ca^{2+} 応答に与える効果も発表する予定である。

N. Takata, T. Kimoto, T. Takahashi, H. Kojima, S. Kominami, T. Nagano and S. Kawato : Steroids potentiate Nitric Oxide production in rat hippocampal CA1 region: Real-time fluorescence microscopic imaging

3PD050

NO 産生経路再構築系での NO シグナルの可視化解析

○渋谷啓介¹、向井秀夫²、内野茂夫³、小南思朗⁴、長野哲雄⁵、川戸佳² (¹ 東大院・理・物理、² 東大院・広域・生命物理、³ 三菱化学横浜総合研究所、⁴ 広島大学総合科学部、⁵ 東大院・薬・薬品代謝化学)

脳神経では一酸化窒素 (NO) はシナプス可塑性を調節することで脳の記憶・学習に関与すると考えられている。NO は L-Arginine を基質として一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって産生される。記憶形成をつかさどるといわれている海馬には neuronal NOS (nNOS) が存在し、nNOS は Ca^{2+} 依存的カルモジュリン (CaM) 依存的に NO を産生するらしいと言われている。我々は海馬での NO 産生の機構を次のように考えている。シナプス前細胞からのグルタミン酸放出によりシナプス後膜の NMDA 受容体が開くと Ca^{2+} が流入する。この Ca^{2+} の上昇により CaM が活性化される。さらにその活性化された CaM により nNOS が活性化され NO が産生される。

本研究では、heat shock によって NMDA 受容体が発現するように開発された CHO 細胞に nNOS 遺伝子をリポフェクションし nNOS を発現させ、その後 heat shock により NMDA 受容体が発現させた。nNOS の発現は diaphorase activity で確かめた。その発現した細胞を用いて nNOS の活性のイメージング解析を行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度と NO 産生との関係を検討するために、 Ca^{2+} の検出には Ca^{2+} 感受性蛍光色素である Fura-2 を、NO の検出には NO 感受性蛍光色素 DAF-2/DA (東大・薬・小嶋氏 合成) を用い、それぞれを別々に蛍光顕微鏡によりリアルタイムでシグナルを測定した。その結果、100 μM NMDA 刺激を与えた細胞で細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、NO のシグナルも上昇するのが観測された。

ラット海馬スライスにおいて神経ステロイドである Pregnenolone Sulfate 存在下では NMDA 受容体を介した Ca^{2+} 流入が Pregnenolone Sulfate のないときに比べ上昇し、それにより NO 産生が増加することが当研究室の高橋・高田によって示された。更なる検討のため、本研究では上述の CHO 細胞を用いて Pregnenolone Sulfate 存在下で NMDA 刺激による Ca^{2+} 流入の増大で NO 産生がどう増加するかを検討中である。

K. Shibuya, H. Mukai, S. Uchino, S. Kominami, T. Nagano, S. Kawato : Imaging analysis of NO signals in reconstructed system of NO producing process

3PD052

スピントラッピング法によるたばこ主流煙中の NO ラジカル (II) その発生メカニズム

○時本 孝行、* 品川 興造 (大阪市大・医・1 生理、* 同・環境衛生)

我々はこれまで、喫煙直後の主流煙中に、はじめ観測されなかった NO ラジカルが最初の約 25 分間、急速に生成し、その後ゆっくりと一定値に達し、2~3 日後まで持続するのを観察した。さらに、その発生源を検討するために、模擬喫煙の代わりに亜硝酸ナトリウム水溶液を用いた実験を行い、 Fe^{2+} 存在下 (還元状態) で NO ラジカルが濃度依存的に産生されることを明らかにした。模擬喫煙装置を用いて、たばこ (hit-te) 1 本 (喫煙速度: ~0.58 l/min, 燃焼時間: ~60 sec) の主流煙中の気体成分を NO ラジカルスピントラッピング試薬 (MGD)₂- Fe^{2+} 溶液 (用時調製) で捕集し、ESR (TE-200, JEOL) で測定した (室温 ~20°C)。

今回は、模擬喫煙に代えて、(MGD)₂- Fe^{2+} 溶液に、NO ラジカル標準発生試薬である S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) 10 mM 20 μl を加えた実験を行った。その結果は、NO アダクトの ESR シグナルはその直後より大きく、安定していた (Fig. a)。次に、SNAP 10 mM 40 μl に、各濃度 (1.67, 1.00, 0.67, 0.33, 0.25, 0.17 M) の H_2O_2 溶液 40 μl を別容器にて混合した後、その混合液 40 μl を上記の SNAP 溶液に代えて、実験を行った。 H_2O_2 の濃度依存的に混合直後の NO シグナルは小さくなり、その最終値も小さくなった (Fig. b, c)。 H_2O_2 0.33 mM では (Fig. d)、NO の発生経過は、たばこのそれと類似した。その 2 倍以上の濃度になると、そのシグナルは大きく抑制された (Fig. e, f, g)。

文献 : K. Shinagawa, T. Tokimoto & K. Shirane. BBRC 253, 99 - 103 (1998)

T. Tokimoto, K. Shinagawa : NO radical in cigarette smoke with spin trapping technique (II) its mechanism.