

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域循環病態内科学教育研究分野 氏名 米倉 学
(論文題目) <b>Medaka as a model for ECG analysis and the effect of verapamil</b> (心電図解析モデルとしてのメダカとベラパミルの効果)	
(内容の要旨) ◎背景 メダカはゼブラフィッシュとならび遺伝子工学などのモデル動物として利用されつつある。メダカには、繁殖が容易である点や、透明な体幹で解剖の観察に有利である点や、総長 <b>700Mbp</b> の染色体に <b>160</b> 万個もの多型を有し突然変異解析に適しているなど様々な利点があり、これらはゼブラフィッシュよりも優れている。循環器領域に関しては、心拍数がマウスやラットよりもヒトに近いという特徴があり、この点ではゼブラフィッシュと同等である。しかし、電気生理学分野のモデル動物としてゼブラフィッシュほど注目を集めるに至っていない。このような現状を踏まえ、本研究では電気生理学や循環器分野におけるモデル動物としてのメダカの可能性を探ることを目的とし、メダカに対する生理学実験と生化学的実験を通して交感神経系の関与とカルシウムチャネルの特徴について評価した。  ◎方法  ◎対象 <b>HO5</b> 系メダカを対象とし、すべての実験は弘前大学動物研究倫理委員会の承認のもと実験を行った。生理学の実験については水温 <b>25℃</b> で施行した。  ◎心電図測定 メダカ体幹部両側に配置した電極から心電図を記録した。自律神経系の評価としてアトロピン、プロプラノロール、イソプロテレノールを投与し、カルシウムチャネルの評価としてベラパミルを投与し、心拍数の変化を解析した。さらに心拍変動解析として、ポアンカレプロットと周波数スペクトラムにより評価した。  ◎活動電位と心室筋収縮力 心室筋に接触させた針電極を用いて活動電位を測定した。静止膜電位、活動電位波高値、最大電位上昇率、活動電位持続時間について評価した。同時にカトランスデューサーで心室筋収縮力も測定した。いずれもベラパミル投与時の反応性を観察した。  ◎カルシウムチャネル $\beta 2$ サブユニットの発現解析 カルシウムチャネルのうちチャネル機能の調整を担う $\beta 2$ サブユニットに注目し、心筋細胞から抽出した mRNA に対して RT-PCR を行い、発現しているバリエーションを同定した。  ◎結果 アトロピン投与時( <b>2.5、5.9、7.5 <math>\mu</math> M</b> )の心拍数はそれぞれ <b>112.2<math>\pm</math>3.2、117.0<math>\pm</math>2.5、127.2<math>\pm</math>3.6 bpm</b> であった。またプロプラノロール投与時( <b>2.5、5.0、7.5 <math>\mu</math> M</b> )では心拍数はそ	

れぞれ  $108.8 \pm 5.5$ 、 $104.0 \pm 5.4$ 、 $100.0 \pm 3.7$  bpm であった。イソプロテレノール投与時 (2.5、5.0、7.5  $\mu$ M) の心拍数はそれぞれ  $125.0 \pm 7.5$ 、 $143.6 \pm 7.9$ 、 $149.9 \pm 7.0$  bpm であった。いずれも用量依存性変化が認められた。心拍変動解析として行ったポアンカレプロットでは、ヒトよりも心拍変動が大きく、周波数解析では副交感神経系を反映する高周波成分がヒトよりも低かった。

ベラパミル投与前後の心電図変化について、心拍数は  $122.0 \pm 5.2$ s から  $71.3 \pm 7.1$ s に低下し、QT 時間は  $0.284 \pm 0.03$ s から  $0.18 \pm 0.02$ s へ、QTc 時間は  $0.40 \pm 0.06$ s から  $0.26 \pm 0.02$ s へと短縮していた。活動電位波形はマウスやラットよりもヒトに近く、ベラパミル投与により活動電位持続時間が短縮することを確認した。心室筋収縮に関しては、ベラパミル投与で収縮力の変化は認められなかった。

カルシウムチャンネルサブユニットについては、 $\beta 2$  サブユニットについて RT-PCR を行い、variant2 だけが発現していることを確認した。この  $\beta 2$  サブユニットについては CaV1.2 と合わせてウェスタンブロッティングで発現を確認した。

#### ◎考察

心拍数についてはゼブラフィッシュと同等で、アトロピン、プロプラノロール、イソプロテレノールへの反応性は良好であった。心電図については PR,QT インターバルはマウスやラットに比べて、ゼブラフィッシュやヒトと近似していた。心筋活動電位の形状についても、ゼブラフィッシュと同様プラトー相が長く、ベラパミル投与による活動電位の短縮も確認され、マウスやラットよりもむしろヒトと類似していた。心室筋収縮についてはベラパミル投与で収縮力を維持したまま心拍数減少を低下させることを確認した。これらの生理学実験結果は、メダカの心臓はマウス・ラットよりもヒトに近い生理学的性質を有している可能性を示唆している。さらにカルシウムチャンネル  $\beta 2$  サブユニット遺伝子塩基およびタンパク質の相同性解析によると、メダカはゼブラフィッシュよりも哺乳類に高い相同性を有しておりチャンネル機能についてはゼブラフィッシュよりもむしろ哺乳類に近い可能性もある。以上より、メダカは電気生理学分野におけるモデル動物としてゼブラフィッシュ同等以上の可能性を有していると考えられた。

#### ◎結語

メダカは電気生理学や心血管系分野での薬剤スクリーニングにおけるモデル動物として十分な可能性を有している。