

論文審査の要旨(甲)

申請者領域・分野 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 外山 佑一
指導教授氏名	富田 泰史
論文審査担当者	主 査 加藤 博之 副 査 袴田 健一 副 査 佐々木 賀広
(論文題目) Establishment of cardiac action potential recording using a membrane potential indicator in the mouse sinoatrial node (マウス洞房結節における膜電位指標を用いた活動電位測定的确立)	
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>実験動物としてのマウスは、世代間隔が短いことや遺伝子改変がしやすいといった長所がある一方、循環器系研究においては、小型であるがゆえに生理・薬理学的指標の測定精度が低いことが研究の妨げとなってきた。そこで今回、マウス洞房結節における膜電位指標を用いた活動電位測定法的确立を試みた。</p> <p>本研究では第一に解剖学的に洞房結節を同定するために、洞房結節の自動能を指標として可能な限り周囲組織を切除し洞房結節の単離を試みた。次に、同定した組織が洞房結節であることを確認するために RT-PCR を行い、洞房結節に特異的とされる hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 (HCN4) の発現を確認した。また心室筋の活動電位発生に寄与する Cav1.2 や RyR2 などの各種チャネルや、アドレナリン受容体などの修飾因子の遺伝子発現を確認した。他に心房筋や心室筋には一般に発現がない Cav1.3 や RyR3 の遺伝子発現も確認した。これらの結果は洞房結節同定が、相当程度、妥当であることを示唆していた。第二の目標として、洞房結節の生理学的な検討を行うためにガラス微小電極法を用い、心房筋・心室筋における活動電位と比較検討した。洞房結節の最大弛緩期電位は -60 mV と心房筋・心室筋よりも浅く、活動電位脱分極相(立上り相)は Ca^{2+} チャネルの開閉により形成される特徴を持つ。微小電極法では測定中に洞房結節の自動能が停止することが多く(約 70%)、安定した測定を得ることは困難であることが判明した。そこで膜電位感受性色素である oxonol V を用いて簡便に洞房結節の活動電位を測定する方法を検討した。まず心房筋を室温、oxonol V (200 nM) の条件で色素を 10 分間負荷した。その後 45 mM KCl にて心停止させ、タイロード液で洗浄し、実体顕微鏡で観察した。蛍光画像(励起光 525 nm、蛍光 600 nm)を高感度カメラで撮影し、局所の蛍光強度を光依存性抵抗の変化を利用して測定し、データは LabChart 8 で解析した。外液のカリウム濃度を変化させることで、蛍光強度がゴールドマン・ホジキン・カッツ (GHK) の式から推定される膜電位の変化に応じて変化することを確認した。次に膜電位感受性色素で洞房結節における活動電位の測定を試みたところ、洞房結節の活動電位に対応して蛍光強度が変化することが判明した。</p> <p>本研究により実体顕微鏡を用いて蛍光色素負荷した組織レベルでの研究が可能であることを示した意義は大きく、膜電位感受性色素、さらには細胞内カルシウム濃度蛍光指示薬などを用いることにより、洞房結節や房室結節など複数箇所における活動電位測定を可能とする道を開くものである。以上の研究内容は学位授与に値する。</p>	
公表雑誌等名	弘前医学 70 巻第 2-4 号掲載予定