

氏 名 (本 籍)	浜 本 徹 (大阪府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 3 2 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 7 年 9 月 1 4 日
学 位 論 文 題 目	In situ Ca^{2+} dynamics of Purkinje fibers and its interconnection with subjacent ventricular myocytes (生体位心におけるプルキンエ線維のカルシウム動態と下層の心筋細胞との相互関係)
審 査 委 員	主 査 教 授 松 浦 博 副 査 教 授 柏 木 厚 典 副 査 教 授 工 藤 基

論文内容要旨

※整理番号	336	(ふりがな) 氏 名	はまもと てつ 浜本 徹
学位論文題目	In situ Ca ²⁺ dynamics of Purkinje fibers and its interconnection with subjacent ventricular myocytes (生体位心におけるプルキンエ線維のカルシウム動態と下層の心筋細胞との相互関係)		
(背景と目的)			
<p>プルキンエ線維は、上室からの電氣的興奮を心室全体に亘って伝導させる刺激伝導系組織であり、心臓が合胞体としての機能を発揮する上で中心的な役割を演じている。古くよりプルキンエ線維・心室筋間の伝導異常が致死的不整脈の重要な発生源になると考えられてきたが、同部の機能異常がどのように不整脈の発生に寄与するかは十分には解明されていなかった。近年リアルタイム共焦点レーザー走査顕微鏡の登場で、実際に機能している心臓（以下、生体位心）における個々の心筋細胞の興奮やカルシウム動態が細胞レベルで捉えられるようになった。そこで本研究では、刺激伝導系末梢のプルキンエ線維網とその近傍の心室筋細胞の細胞内カルシウム動態を同時に高速度で可視化するシステムを確立し、同部における不整脈源としての機能異常を明らかにすることを目的とした。</p>			
(方法)			
<p>雄性Wistarラット（9週齢）より摘出した心臓に、ランゲンドルフ灌流下でカルシウム蛍光指示薬であるfluo-3/AMを負荷した。右室自由壁を切除し、右室中隔の心内膜直下のプルキンエ線維と心室筋細胞のfluo-3蛍光像を30フレーム/秒で描出し、心電図記録下にリアルタイム共焦点レーザー走査顕微鏡で記録した。心収縮に伴う共焦点面の変位はcytochalasinDにより抑止した。得られた画像はNIH imageを用いて解析した。またプルキンエ線維の同定と心室筋細胞との形態的識別を目的に、各々ATCHI(Acetylthiocholine Iodide)染色とdi-4-ANEPPS染色を用いて観察した。</p>			
(結果)			
1. プルキンエ線維の同定			
<p>ATCHI 染色した心室中隔を実体顕微鏡で観察すると、ATCHI で特異的に染色されたプルキンエ線維の網目状構造を認めた。di-4-ANEPPS で染色したプルキンエ線維は細胞幅が細く T 管構造を認めないのに対し、心室筋細胞は T 管が豊富で太く、両者は形態的に容易に識別できた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること
2. ※印の欄には記入しないこと

2. 心内膜表面のカルシウム動態の観察

心電図上洞調律を示す正常時の心臓では、個々のプルキンエ線維網は心電図上のQRS波に同期して空間的に均一な一過性の蛍光強度の増大（カルシウムトランジェント、以下CaT）を発生し、ほぼ同時に下層の心室筋細胞でも均一なCaTを発生した。さらに心房ペースング時（1～3Hz）にもプルキンエ線維と下層の心室筋細胞で空間的に同期したCaTが観察され、またその持続時間が刺激頻度依存性に短縮することが確認された。

3. 高カリウム液灌流時の伝導障害におけるプルキンエ線維・心室筋細胞のカルシウム動態

灌流液のカリウム濃度を正常の 5.4mM から 8mM へと変化させるとプルキンエ線維と心室筋細胞の CaT の出現に約 70 ミリ秒の遅延が生じ、心電図では房室伝導が遅延（PQ 時間が延長）した。さらにカリウム濃度を 10mM に上昇させると房室伝導はより顕著に障害されたが、個々のプルキンエ線維の CaT は、同線維網内で空間的・時間的に同期性が保たれていた。15 例のうち 5 例でプルキンエ線維・心室筋細胞の伝導時間が延長するに留まったが、残る 10 例で高度房室解離を認めた。このうち 6 例がプルキンエ線維より上位で房室ブロックを示し、残りの 4 例では順行性のプルキンエ線維・心室筋間の伝導ブロックを示したが、その際にも心室を心外膜側からペースングするとプルキンエ線維は CaT を生じ、逆行性伝導が保たれていることが判った。

4. プルキンエ線維におけるカルシウム波

右室の自由壁付近では、一部のプルキンエ線維で細胞内を波状に伝播するカルシウム濃度の上昇（カルシウム波、以下 CaW）が心室の興奮とは同期することなくランダムに発生した。こうした CaW はプルキンエ線維が機械的傷害を受けて生じた細胞内カルシウム過負荷により発生したと考えられる。

（考察）

本研究では、生体位の心臓でプルキンエ線維とその直下の心室筋との間の生理的な伝導に加え、不整脈発生の病的基盤として重要な高カリウム時における同部の興奮・伝導異常を細胞レベルで捉えることができた。その結果、プルキンエ線維・心室接合部が房室接合部と同様に伝導障害を生じ易い部位である事が明らかになった。また臨床的に心電図で捉えられる房室伝導障害には、末梢のプルキンエ線維・心室間における伝導障害が寄与している可能性も示唆された。一方、同部の伝導障害において個々の細胞が空間的に均一な興奮を示していたことは、プルキンエ線維の合胞体的な機能を反映するものと考えられた。さらに同部の順行性伝導障害の際にも心室筋からプルキンエ線維への逆行性伝導が保持されたことより、同部に一方向性の伝導障害が生じ易いことも示唆された。プルキンエ線維内の非同期性の CaW の出現は、これまで心室筋で示された撃発活動などの刺激生成異常が同部でも生じうることを示唆する。

（結論）

本研究で得られたプルキンエ線維・心室筋のカルシウム動態は、不整脈発生におけるプルキンエ線維の関与を考える上で有用な情報をもたらすと考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	336	氏名	浜本 徹
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>プルキンエ線維・心室筋間の伝導異常が致死的不整脈の重要な発生源になることが知られている。本研究では、リアルタイム共焦点レーザ走査顕微鏡を用いて、ラットの生体位心における右室中隔心内膜直下のプルキンエ線維とその下層の心室筋の細胞内カルシウム動態を同時に描出できるシステムを確立して、同部の不整脈源としての機能異常を検討した。カルシウム蛍光指示薬には fluo-3/AM を使用し、心電図記録下にその蛍光強度の変化を観察した。プルキンエ線維の同定と心室筋細胞との形態学的識別を目的に、各々、ATCHI 染色と di-4-ANEPPS 染色を行った。洞調律時ならびに 1-3Hz の心房ペーシング時には、両者において時空間的に同期した calcium transient が観察され、上位の興奮はプルキンエ線維を通じて心室筋に均一に伝導されることが判明した。また、高カリウムによる房室伝導障害時にはプルキンエ線維と心室筋との間に伝導遅延や途絶が生じ、同部に伝導障害を生じ易い事も明らかとなった。さらにプルキンエ線維の一部では心室筋非同期性の calcium waves を認めたため、撃発活動などの刺激生成異常が同部でも生じうることが示唆された。</p> <p>以上のように、本研究はプルキンエ線維の関与する不整脈の発生機転に関して新しい知見を示したものであり、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(平成 17 年 8 月 31 日)			