

新生仔SHR/lzmの培養心筋細胞収縮の記録法と薬剤による修飾についての研究

昭和大学藤が丘病院循環器内科 堤 健
同 臨床病理 岩沢篤郎
千葉工業大学電子工学科 岡本良夫

細胞を培養すると自動収縮が見られるのが、心筋培養細胞の特徴である。そこでこの収縮運動の時系列的な特性や、収縮運動の質的解析を行うため機器の開発や解析ソフトの作製について研究を進めてきた。このショートコミュニケーションでは、画像解析と時系列解析の一部を紹介する。

1. SHR心筋培養細胞の時系列解析とアポトーシスの誘導

新生仔SHR/lzmならびにWKY/lzmの心筋細胞を分離培養した後、自動拍動をしている培養心筋細胞の画像をCCDカメラで撮影、Video micrometer (VM 30, Olympus) を介してテレビスクリーンへ写し出し、その動きを観察した。細胞拍動をテレビ画面から記録するために、光感受性transducerを使用した。この方法を用いて拍動記録を行う場合混入するノイズが問題となる。そこで20msec毎の入力の差分を出力できるtransducerを用いて、拍動細胞の光変化率のみを記録できる装置を考案した。さらに出力をアンプを介して増幅した後、computerへ取り込み日本光電社製ソフト (LEG 1000, ver.1.3) を用いて拍動周期のパワースペクトル密度を算出した。

解析結果の実例を図1に示す。図1下段パネルはインプロテネロール添加中に出現した振動拍動の記録を、上段パネルはフーリエの窓関数を利用した周波数解析結果である。インプロの濃度が $10^{-7} \sim 10^{-8} M$ では、パワースペクトルのピークの増加が認められる。また $10^{-9} M$ の濃度では、図1に示すように0.7と1.5Hzに周波数パワーのピークを持つ振動拍動を繰り返す標本が観察される。この振動拍動は数時間にわたって繰り返し観察され、WKYに比較しSHRの培養心筋細胞に出現し易い。そこでELISA (cell death detection kit) 法を用いて、拍動細胞を有する標本のアポトーシス誘導を検討した。その結果振動拍動を記録できる標本は、他の標本に比較してアポトーシス発現が大であるという結果を得た。以上の実験は、高血圧心における頻拍性不整脈とアポトーシス、または頻拍性心筋症とアポトーシスとの関連を示唆するという観点から、興味深い結果であると思われる。

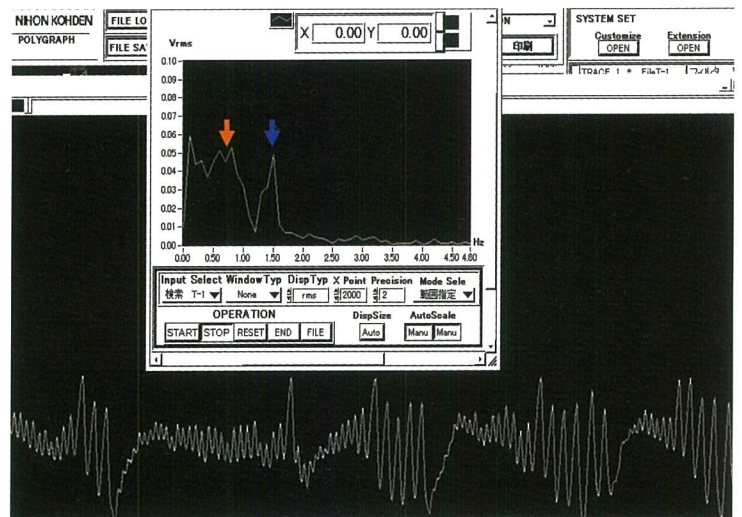


図1 SHR培養心筋細胞から記録された振動拍動とその周波数分析

2. SHR/lzm培養単一心筋細胞のmyofibrilの変形能をコンピューター解析する方法の開発

拍動培養細胞を拡大すると、細胞内筋原線維 (myofibril) の動きを観察することができる。そこでVHSに記録された単一心細胞の二次元画像から、myofibrilの収縮や変形能を解析できるアルゴリズムを考案したので以下紹介する。33コマ/秒で記録されているビデオ画像を1コマ480 x 640ピクセルの白黒画像として、約5秒間コンピューターへ保存した。

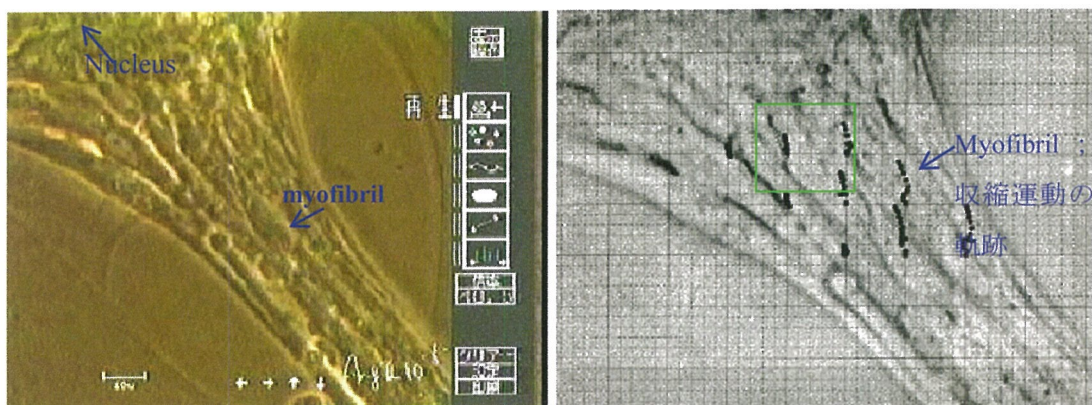


図2 拍動している単一培養心筋細胞の一部を拡大した図

左パネルでは左上方部が核の位置になる。中央部の→は筋原線維の束と考えられ、収縮運動が観察される。右パネルはフレーム毎の筋原線維の動きの軌跡を黒点で表示している。

この方法を解析に適応させるためには、フレームjの任意の点 (m, n) がつぎのフレーム (j+1) のどの点へ移動したのかを知る必要がある。そこで任意の点周囲 (10×10ピクセルの領域) のグレイスケール分布情報が次の画面のなかで最大相関する部位を求め、そこに任意の点が移動したとみなした。この方法で細胞内の任意の点の軌跡を描画できることを示したのが図2の右のパネルである。このパネルでは、フレームの進行に伴う任意の点 (m, n) の移動が黒点の連続で表されている。次に解析対象となる画像に任意の4点で囲まれる領域 (図2右パネル) を設定した後、細胞の収縮に伴ってこの領域にどのような歪みが生じるのかを微小領域の変形数学を適応して算出した。囲まれた領域の変形をAffine変換を用いた式で表すと $R_n = A r_n + a + s_n$ と表現できる。Aは回転や伸縮を表す二次正方行列、aは平行移動を表すベクトル、 S_n は誤差ベクトルである。そこでN=1, 2, 3, ..., nの二乗平均が最小となるようにAを決定すると、解を算出でき、平行移動 (translation)、伸縮 (shrinkage)、回転 (rotation) を算定できる。図3に計算結果の一部を示す。左パネルは標本の平行移動、右パネル収縮-弛緩速度表示である。平均移動はコントロールで5.3, ジギタリス $10^{-6}M$ 添加で7.2micrometer, 収縮/弛緩速度比は正常で0.48、ジギタリスで0.99と強心薬添加でいずれも増大した。この現象は薬剤の濃度依存性に出現した。またWKYとSHRの比較では、SHRの培養細胞で平行移動距離が有意に大であった。したがって良好な記録が得られれば、この方法を用いて最小の収縮unitである筋原繊維の二次元の動きのkineticsを定量的に分析することが可能である。このシリーズではさらにpimobendanの収縮能率の算定を試み、ジギタリスとの差を検討した²⁾。

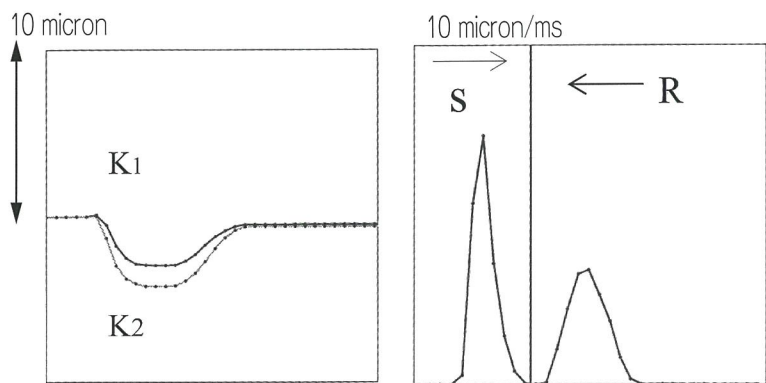


図3 筋原繊維の平行移動 (translation) を左パネル、収縮-弛緩速度を右パネルに示す。N=50, S:収縮期, R:弛緩期

◆参考文献

- 1) 浅野冬樹、堤 健、佐藤真紀子、清水寛、嶽山陽一、岩沢篤郎、須藤邦彦 : ラット培養心筋細胞の拍動に与える強心薬の作用。Ther Res 20(5);370-375, 1999.
- 2) Shimizu Y, Tsutsumi T, Takeyama Y, Iwasawa I, Nakamura Y, Okamoto Y. : A new computer method for analyzing contractile movement of myofibril under cardiotoxic drugs. 11th Congress of the European Society of Cardiology. International Proceeding Division. Ed. By F Navarro-Lopez. pp986-989, 1999.

編集後記 :

本研究会が微生物学的、遺伝学的に均一な高血圧ラットを、登録された会員のみによりリーズナブルな価格で配布すると云う形をとっている理由が、一般の学界には十分に理解されていないようである。それはある深刻な反省に基づいている。SHRが世界的に認められ始めた頃、そして今のように遺伝的な均一性の確認方法が未だ無かった頃に、世界各地の研究者に岡本耕造先生が好意的に分与されたSHRが、それぞれの場所で継代される間に、突然変化か、選択がかかった故か、異常交配が何かが起こって、同じ“SHR”と言う名前でありながら遺伝的には全く違うラットになってしまっていたのである。これに気が付いたのは動物の遺伝子解析が一般化した最近になってからである。極端な話、米国の所謂WistarKyotoは本家本元の京大のWistarKyotoとはまるで関係ないラットに変わっていた。それは最早SHRの母系統の末裔では無くなってしまっていたのである。SHRそのものも血圧の高い点だけは同じでもその他の特徴は微妙に食い違い始めている。これではSHR関係動物を使った仕事相互の比較は不可能となる。それ故多くの研究者に、はっきりした遺伝背景を持ち、綺麗な環境で育成された、全く同じ背景を持ったラットを使って研究して頂こうと、その時点で遺伝子地図の一番ハッキリしていた/lzm株を選び、同志「会員」を募ってこの方法を取ったわけである。研究会としては会員から戴いた会費の多くを使って、会員の研究者仲間が、常に生産施設を訪れて、遺伝子と微生物的チェックを欠かさず、常に均一な背景の動物を提供し、また次々に新しい系統のラットの開発とその育成も引き続き行っていて、近いうちにその中の幾つかは生産できそうである。幸いに私共のこの方法は学界の賛同を得て、会員は増え、ラットも国際的に認められて、わが国のナショナルバイオリソースプロジェクトに登録され、近くにはEUのプロジェクトに委託してSNPS解析も行われ、文字どおり世界で最も素性、遺伝背景のハッキリしたSHRになる。

故に当研究会が選定し、生産をSLCに委託しているラットは、このような理由で一般の市販SHRとは違い、本会の趣旨に共感して会費を払って入会された会員だけがその分与の恩恵を受け、情報交換が出来るのだということを十分に御理解いただきたい。

2005.6.1. DMCRA会長 京極 記

SHR SHR等疾患モデル共同研究会

事務局

〒606-8413 京都市左京区浄土寺下馬場町86番地
国際健寿ビル1F TEL & FAX : 075-761-2371
E-mail:dmcra@j.email.ne.jp

生産管理部 責任者 土倉 覚

〒433-8114 浜松市葵東3丁目5番1号
TEL & FAX : 053-414-0626
E-mail:shrtsuchikura@h5.dion.ne.jp