



| | |
|------------------|---|
| Title | 培養心筋細胞による非線形振動子相互作用系のゆらぎとダイナミクスの解析 |
| Author(s) | 山内, 芳子; 原田, 明彦; 中村, 孝夫 他 |
| Citation | 電子科学研究, 4, 112-114 |
| Issue Date | 1997-02 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/24391 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 4_P112-114.pdf |



培養心筋細胞による非線形振動子相互作用系のゆらぎとダイナミクスの解析

適応制御研究分野 山内 芳子, 原田 明彦, 中村 孝夫, 河原 剛一

非線形自励振動子としての性質を有することが知られている新生ラットの培養心筋細胞を用い、心筋細胞相互作用系における拍動リズムゆらぎとダイナミクスの解析を行った。その結果、培養日数が増加するに従って心筋細胞拍動周期の変動が減少し、拍動のダイナミクスが安定化することがわかった。

1. はじめに

多数の心筋細胞が電氣的、機械的に結合することによって心臓という器官を構成し、更に心臓は自律神経系による複雑な制御下にある。従って、全体としての心臓の拍動リズムゆらぎの起源を明らかにすることは極めて困難である。

新生ラットや鶏胚の単離、培養した心筋細胞が自発的に拍動することはよく知られている。また、培養心筋細胞に電気刺激を加えると、拍動リズムがそのリズムに引き込まれることから、これらは数理的には非線形振動子としての性質を持つ^[1]。心臓それ自体の拍動リズムの特性は、これら多くの非線形振動子の相互作用により生み出されると考えることができる。

そこで、我々は単離、培養した心筋細胞を心臓の拍動リズムの静的、動的ゆらぎ特性の解明のための最も単純化したモデルとしてとらえ、培養心筋細胞の拍動リズムの静的および動的な特性を解明することを目的として実験を行った。

2. 方法

2.1 心筋細胞培養^[2]

実験には生後1~3日目の新生ラットを用いた。ラットの頸椎および腰椎を脱臼させた後に胸郭を切開し、心臓を摘出した。心臓の心室部分のみをハサミで細切して小片とし、0.1%コラゲナーゼ溶液中、37°Cで1時間振盪培養することにより結合組織を分解して心筋細胞を単離した。単離した心筋細胞を培地

(MCDB 107)に加えて37°C, air 95%, CO₂5%の条件下のincubator内で約1時間培養した。この培養により接着時間の比較的早い線維芽細胞をdish上に接着させて取り除き、ほぼ心筋細胞のみを取り出すことができる。最後に細胞数を調整し、incubator内で培養を開始した。本研究では細胞密度を 3.5×10^4 cells/cm²とし、約2週間培養を行った。

2.2 画像解析およびデータ処理

心筋細胞の拍動の様子は、顕微鏡を通してビデオカメラで6分間撮影した。撮影した画像から拍動している心筋細胞の拍動を最も良く表すような一部分(約20×20 pixels)を選択して、ビデオ信号をパーソナルコンピュータにビデオフレーム単位(30 frames/sec)で取り込んだ。このフレーム列中の任意に選んだ基準フレームと他のフレームとの間で、画素濃度間の相互相関係数を求めた。

相互相関係数のピーク間隔より心筋細胞の拍動周期を求め、その変動係数を求めることで心筋細胞拍動ゆらぎの静的な特性を評価した。また、心筋細胞拍動の動的特性を調べるために、相関係数とその1次微分の関係からphase plane plotを求めた。さらに相関積分法^[3]によりアトラクタ次元を求め、培養心筋細胞発振時系列のダイナミクスを解析した。

3. 結果

画像の記録は、ほとんどの培養心筋細胞が拍動を開始する培養3日目から行った。記録した画像中には、

10 個以上の心筋細胞が含まれていた。培養初期では、培養皿に接着した細胞の中に各々独立したリズムで拍動をするものが多く見られた。培養開始から約1週間後には、多くの心筋細胞が結合し、同期して拍動していた。

Fig.1 は録画した同一画面内の2個の心筋細胞から得られた相互相関係数を示している。相互相関係数の各ピークが心筋細胞の拍動に対応する。相互相関係数のピーク間隔及び振幅には、培養6日目にはゆらぎが認められるが、培養13日目になるとゆらぎが減少していた。

Fig.2 は Fig.1 に示した心筋細胞の拍動周期の変動係数の培養日数に伴う変化を示している。拍動周期の変動係数は、培養日数とともに指数関数的に減少した。すなわち静的な拍動リズムゆらぎが培養日数の増加に伴って減少した。

伴って減少した。

相互相関係数の振幅とその1次微分により構成される2次元相空間における軌道については、培養初期ではこの軌道は limit cycle 様のアトラクタを示したが、ばらつきが大きかった。しかし、培養後期にはこの軌道のばらつきが減少する傾向が認められた。

Fig.3 は相互相関係数から求めた相関次元の培養日数による変化を示している。cell 1 の培養3日目の相関次元は、相関指数が発散したために求めることができなかった。相関次元は培養日数とともに減少し、培養11日目以降その値は1.0 に近づいた。この結果は、相互相関係数の軌道のアトラクタが limit cycle に近づくことを示している。

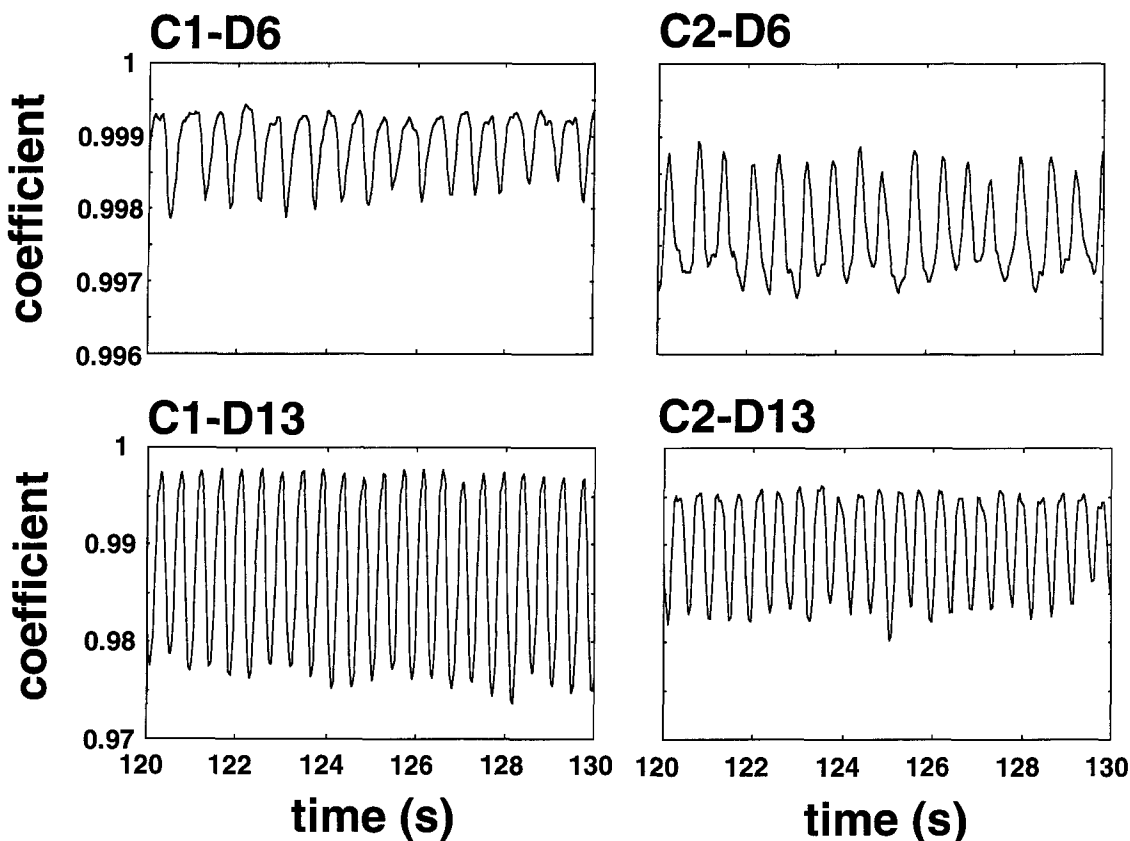


Fig.1 Cross correlograms of myocytes on the 6th (C1-D6 for cell 1 and C2-D6 for cell 2) and the 13th (C1-D13 for cell 1 and C2-D13 for cell 2) days of culture. Each peak (upward in C2-D6 and downward in the others) of correlogram indicates contraction of the myocytes.

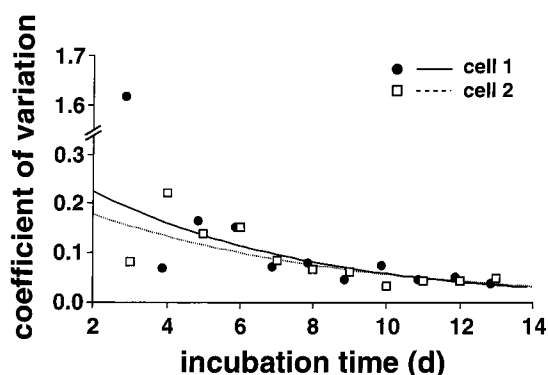


Fig.2 Temporal changes in the coefficient of variation of contraction intervals in cultured myocytes. Closed circles show the data obtained from cell 1 and opened squares from cell 2. Solid and dotted lines show regression curves in the form of exponential function fitted to data obtained from cell 1 and cell 2, respectively.

4. 考 察

接着した心筋細胞同士は gap junction を介して電気的に、あるいはカドヘリンなどの細胞接着分子により機械的に結合し、相互作用を及ぼしあっている。Gap junction は connexon により形成され、脊椎動物の心筋細胞の主な構成要素はそのうちの connexin-43 (Cx 43) であることが知られている^[4]。Oyamada らは新生ラットの心筋細胞において、Cx 43 の数と総面積が培養日数の増加に伴って増加することを示しているが^[5]、本研究は Oyamada らと同様の条件で心筋細胞の培養を行っており、同様の経過で Cx 43 の数、総面積ともに増加したと推測される。よって、Fig.2 に示

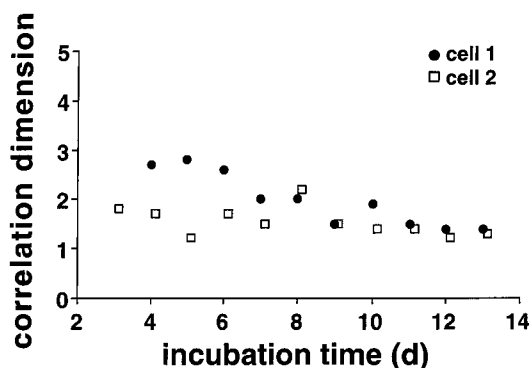


Fig.3 Temporal changes in the correlation dimension of the attractor of cross-correlogram. Closed circles show the data obtained from cell 1 and opened squares from cell 2. The correlation dimension of cell 1 on the 3rd day of culture was not shown because correlation exponent did not reach to a plateau.

した変動係数の減少は心筋細胞間の相互作用の強化によるものと考えられる。

一方、機械的な結合による相互作用の寄与については明確にされておらず、今後明らかにしていく必要がある。

相互相関係数より再構成された phase plane plot の軌跡は完全な limit cycle を描かず、ゆらぎが存在し、このゆらぎは培養前期よりも後期で減少した。また、相互相関係数より求めた相関次元の値は、培養日数の増加に伴い減少した (Fig.3)。これらの結果は、培養心筋細胞の拍動が徐々に安定化することを示唆している。その原因は明確ではないが、おそらく拍動周期の変動係数の減少と何らかの関係があると推測される。

【参考文献】

- [1] Glass L, Guevara MR, Shrier A, Perez R., Physica D, 7: 89 (1983).
- [2] Orita H, Fukasawa M, Hirooka S, Fukui K, Kohi M, Washio M., Jpn Circ J, 57: 912 (1993).
- [3] Grassberger P, Procaccia I., Phys Rev Lett, 50: 346 (1983).
- [4] Beyer EC, Kistler J, Paul DL, Goodenough DA., J Cell Biol, 108: 595 (1989).
- [5] Oyamada M, Kimura H, Oyamada Y, Miyamoto A, Ohshika H, Mori M., Exp Cell Res, 212: 351 (1994).