

## 2 食用蛙心臓における興奮伝導系と

### フランク・スターリング機構

#### A. 目的

反転洞房標本を用いて、心臓の拍動数および拍出量（毎回、毎分）の測定を行なう。まず、アセチルコリン（ACh）ノルアドレナリン（NA）を与えて拍動数にいかなる効果が出現するかを検討し、自律神経による心臓効果を観察する。ついで Stannius 結紮により刺激伝導系の leading focus の部位を推論する。さらに、pacing を行ない心拍数を固定した状態で心房内圧を変えることにより体積（ひいては心筋の長さ）を変化させ、弛緩期内圧と拍出量の関係を求めてフランク・スターリング機構を観察する。また、外液イオン濃度を変化させ、その効果を観察し、心筋の興奮収縮連関に関与するイオン機構を考察する。

#### B. 実験

##### 1. 心臓の露出

ウシカエルを流水でよく洗う。

体重を測定したあと、冷血動物用麻酔剤 MS<sub>222</sub> の 5% 溶液を 100 g あたり 0.5 ml を皮下注射する。麻酔がかかったら、その前、後肢を緊縛し（図 1）手術台上に固定する。皮膚切開を腹から下顎にかけて正中線に沿って行ない、皮膚を左右に十分に反転する。腹壁に小切開を加え（正中線を走る血管を傷つけないよう、下にのこすように注意）、胸骨剣状突起を摘み上げ、その先端から、骨切りバサミを用いて胸骨の両縁を切断、さらに鎖骨との接合部を切断し、胸骨を除去すると、心臓が色素斑を持つ心嚢内で拍動しているのがみえる。心筋をはさまないように注意しながら心嚢をピンセットで摘み上げて小バサミで切開し、除去する。

1) 露出した心臓で房、室および大動脈球の位置ならびに拍動の順序を観察する。心室が赤色に変わるのはいかなる時期か、拍動数は 1 分間何回か〔測定はストップウォッチを用い、10 回の拍動に要する時間を測り、心拍数（1 分間当たりの）を計算する〕。リンゲル液を含ませた綿花で心尖を軽く押し上げる。心室背面と心嚢との間にある細い、線維（plica）は 2 ケ所結紮、中央で切断する。

2) 心臓をひっくり返して静脈洞を観察する。拍動はどこに始まり、どのように伝わるか観察する。

##### 2. 反転洞房試料作製

洞房試料は、カエル摘出心臓から心室を除去し、静脈洞と心房とだけからなる試料で、製作は比較的容易であり、長時間安定に自発活動が続ける（2 日以上）特徴があり、スターリング機構の解析に便利である。本実習ではさらに洞房試料を裏返して心内膜側が外に向くようにした反転洞房試料を用いる。その

理由は心外膜には季節変動を示す脂肪層が存在するが心内膜は薄いので外液環境を変化させるのが容易であるからである。すなわち、通常の洞房試料ではカニューレ内の液交換をしなければならないが、反転するとカニューレ外の液交換ですむ。

心臓の解剖図を図 2 に示す。各血管周囲の軟部組織をピンセットと小バサミを用いて十分に剥離し、血管の下を自由に結紮系が通るようにする(図 3)。2 本の大動脈のうち、まず、右側を二ヶ所結紮、中央で切断する。同様にして両側前大静脈を結紮、切断する。

後大静脈と肝静脈とを一括結紮する。この際も周囲結合織を巻き込まないように注意する。結紮系をつり上げ、結紮部位より末梢側で血管を切断する。次に左側動脈幹を切り離す(結紮不要)。残る肺静脈を同定し結紮、切断すれば心臓は完全に遊離される。遊離した心臓は直ちに通気したリングル液中に投入し、心室を真二つに横断する。心尖部を切離した標本を、滑り止めのために漉紙を浸した通気リングル液を入れたシャーレ内に置いて、大動脈・大動脈球を心房から注意深く剥離、除去する(図 4a, b)。次に残存する心室を冠状溝より 3 mm 程残して切断除去し、切断端から駒込ピペットを入れて、リングル液で血液を洗いだす。房室弁をピンセットで摘み上げ、小バサミで除去した後、心室断端をピンセットでつまんで心房をつり下げリングル液を注入し脹らませ中を覗き込んで心房中隔を確認、これを心房内に挿入した小バサミを用いて切る。この際心房を傷つけないように注意をする。

試料を左手で支えてピンセットで結紮した血管を心房内側へ軽く押し込み、さらにガラス棒鈍端で、心房内面が輪状の心室切断端より少し突出するようにする。この状態で、ガラス棒を静かに引き抜き、リングル液を駒込ピペットでその部分に吹き込むように入れると、試料は反転し心房と洞の裏表が逆転する。

図 5 のように反転した試料を洞房試料用カニューレの先端に糸で括り付ける。この際、一人が少量のリングル液を入れたカニューレをほぼ水平に保持し(シャーレの縁を利用して手ぶれを防ぐ)他の一人が“括り付け”に専念するとよい。結紮は冠状溝で行ない洞および房を括らないようにする。カニューレ中に約 1cm 高までリングル液をいれ、指先で洞房部分を軽く圧迫して空気泡を除去したのち、通気したリングル液 100 ml を入れたビーカーに移す。水滴を水平ピペットに入れたのち、カニューレを接続チューブにより水平ピペットに連結する。水滴は拍動に応じて水平ピペット内を往復する(図 5)。

なお、洞房標本では、房の収縮による拍出液の多くが壁の薄い洞に向い、これをふくらませるために、房の拍出量はカニューレ水柱の上昇として反映されないので Stannius 結紮をするまでは水平ピペット水滴の動きで拍出量を測定できない。従って、3 および 4 項では拍動数に対する効果のみを観察する。

### 3. アセチルコリン (ACh)、ノルアドレナリン (NA) の作用

摘出した反転洞房標本を 100 ml リングル液を入れたビーカー内に沈めて、通気しながら、収縮の状況を観察する。液高差を約 1cm として、ストップウ

オッチを用いて 10 回の収縮に要する時間を測定し、収縮頻度を算出する（回／分）。正常リンゲル液 \_ ACh10-7g / ml リンゲル液 \_ 正常リンゲル液で洗う \_ NA10-5g / ml リンゲル液 \_ 正常リンゲル液で洗うという順で ACh , NA を投与して測定を行なう。ACh , NA は市販アンプル入溶液から下記の要領で必要量を調製し、外液に追加する。

#### 1) ACh 10-7g / ml の投与方法

市販オピソート 1A (ACh , 100 mg 封入) に 1 ml 蒸留水を加え、溶解したのち、その 0.1ml をとり 100 ml 蒸留水にて希釈する。この 0.1 ml を外液 (100 ml リンゲル液) 中に投入する。

#### 2) NA10-6g / ml の投与方法

市販ノルアドレナリン (1mg / 1ml の注射液から直接 0.1ml をとり外液 (100 ml リンゲル液) 中に投入する。

### 4 . Stannius の結紮

薬物の効果がなくなり、安定した拍動状態に戻つたのち、液高差約 1cm としてふたたび収縮頻度を算出する。つづいて、洞と房の間を綿糸で強く結紮 (Stannius 第一結紮) 心房の収縮 と 洞の収縮 に対する影響を観察せよ。直後の変化にも注意せよ。心房の収縮が安定するまで、拍動頻度を記録し続けること。

### 5 . 内圧の影響

反転洞房標本をリンゲル液を 10 cm 高まで満たした深いメスシリンダーにうつし支持台に固定する。ラックピニオンを用いてメスシリンダーを上げて洞房標本を沈めながらカニューレ内に正常リンゲル液を、液高差が常に 1cm になるように少量ずつ加え、カニューレ内の液面を下から 8 番目の目盛り (1cm 間隔の目盛り) に、カニューレ外側の液面をカニューレの 7 番目の目盛りになるようにする (図 6)。ディスク状刺激電極を心房の一部に付着させ、正常リズムよりやや早い頻度で電気刺激 (1ms , 3mA) を加え、心臓の pacing を行なう。ついでカニューレに接続チューブをはめ、心房の拍出量を水平ピペットの水滴の動きにより測定する。液高差はスタンドのラックピニオンを用いてカニューレ外液の液面を上下させることにより変化させる。液高差は 1 分間隔で 1cm ずつ変化させる。結果を表 3 に記入し、グラフ化する。刺激装置およびその操作方法は図 7 を参照のこと。

### 6 . Ca イオンの作用

液高差を 1cm に調節する。正常リンゲル液中で測定して定常状態になつたことを確認した後、Ca 無リンゲル液に交換し 3 分後に測定を行なう。次に 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  溶液を外液に 1mM Ca リンゲルつまり正常リンゲル液となるように追加

する (0.2 ml) 3 分後に測定し、さらに 0.5 M CaCl<sub>2</sub> 溶液を外液が 5 mM Ca 液になるよう計算して追加する (0.8 ml)。3 分後に測定して、正常リンゲル液で洗浄した後回復をみる。測定結果を表 3 に記入しグラフ化する。

#### 7. 高 K イオン、低 Na イオンの効果

時間があれば、6. に準じて、高 K イオン液 (1.0 M KCl 液 0.8 ml を追加し、10 mM KCl にする) 低 Na イオン液の収縮力に対する効果を観察せよ。さらに時間があれば、pacing した心臓に対する ACh, NA の効果 (とくに Starling 曲線に対する) も調べてみよ。

### C. 考察すべき事項

「蛙心臓実習」において学習すべきことは下記の諸点である。従ってレポートにも当然この点に関する考察があつて然るべきである。

#### 1. 心筋細胞の興奮のイオン機構。

項目: Ca イオンの作用、高 K イオン、低 Na イオンの効果

#### 2. 心筋細胞の興奮収縮連関。項目: Ca イオンの作用

#### 3. 心臓の歩調取り機構と興奮伝導系。項目: Stannius の結紮

#### 4. 心筋収縮力に対する調節機構。

1. 内因性調節。項目: 内圧の影響

2. 外因性とくに自律神経性調節。項目: ACh, NA の作用、各イオンの影響

#### 5. ペースメーカーリズムに対する自律神経性調節。項目: ACh, NA の作用

#### 6. Pacing の基礎となる心筋の構造上、機能上の特性

項目: 内圧の影響、他、Pacing を行なった実験

7. 上記のすべての項目に関して、他の筋肉、とくに骨格筋との対比において考察すれば、心臓機能の特徴が浮彫りにされるであろう。



短いひも：引っ張ると緩む。

長いひも：引っ張ると締まる。

このループに四肢を通し、その長いひもを引っ張って関節部で締める。

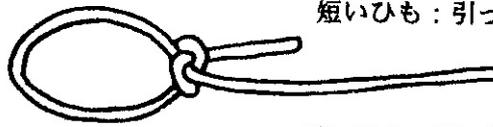


図1 蛙緊縛固定法

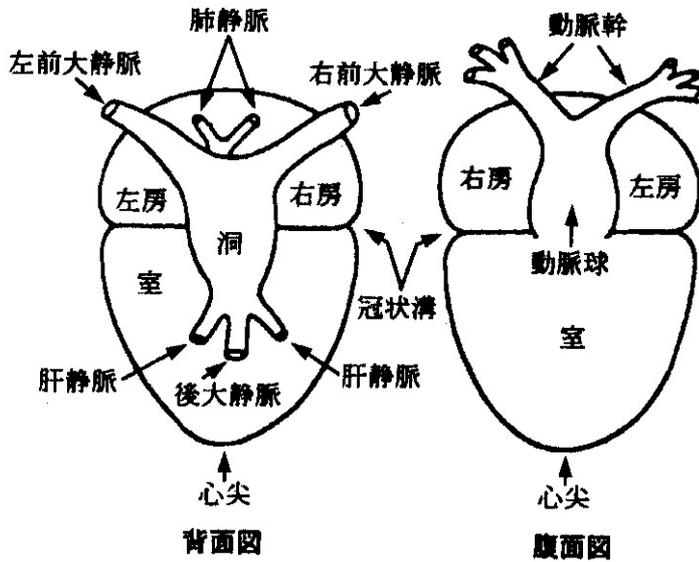


図2 蛙心臓解剖図

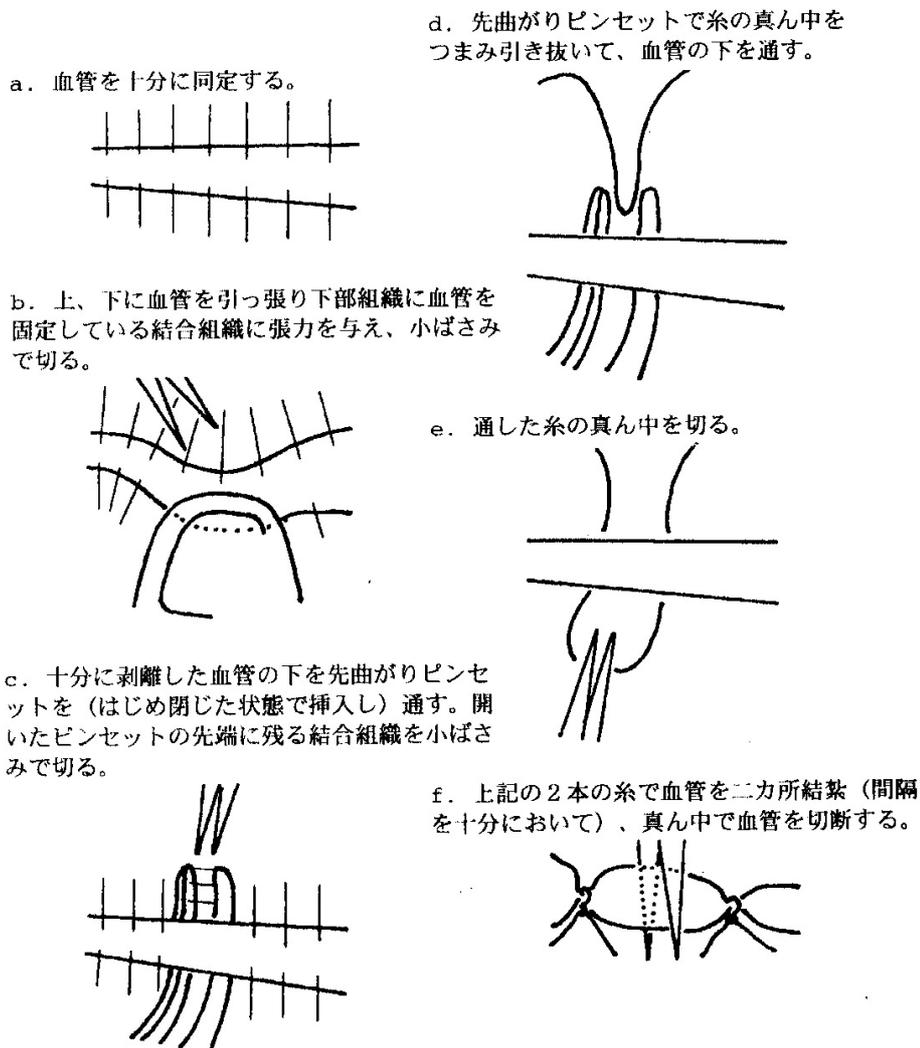


図3 血管の結紮と切断法

図4a 心房と動脈球の剥離法（その1）

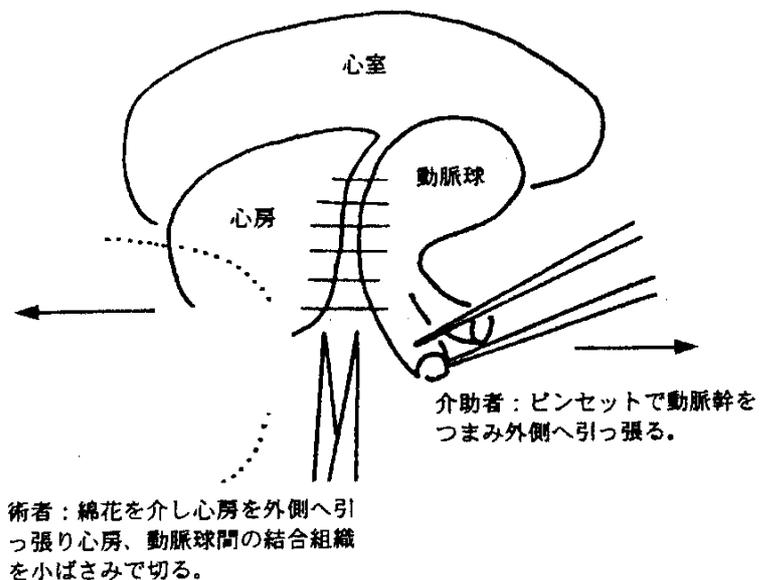
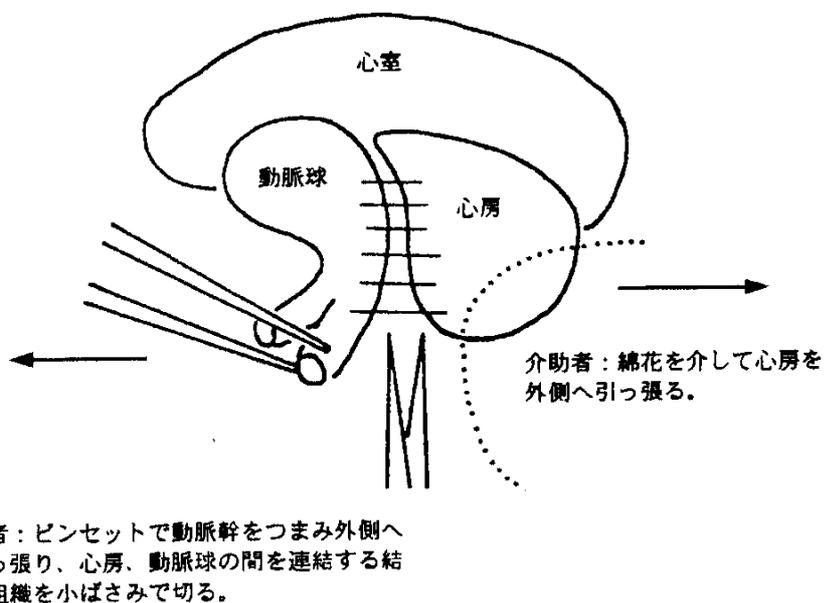


図4b. 心房と動脈球の剥離法（その2）



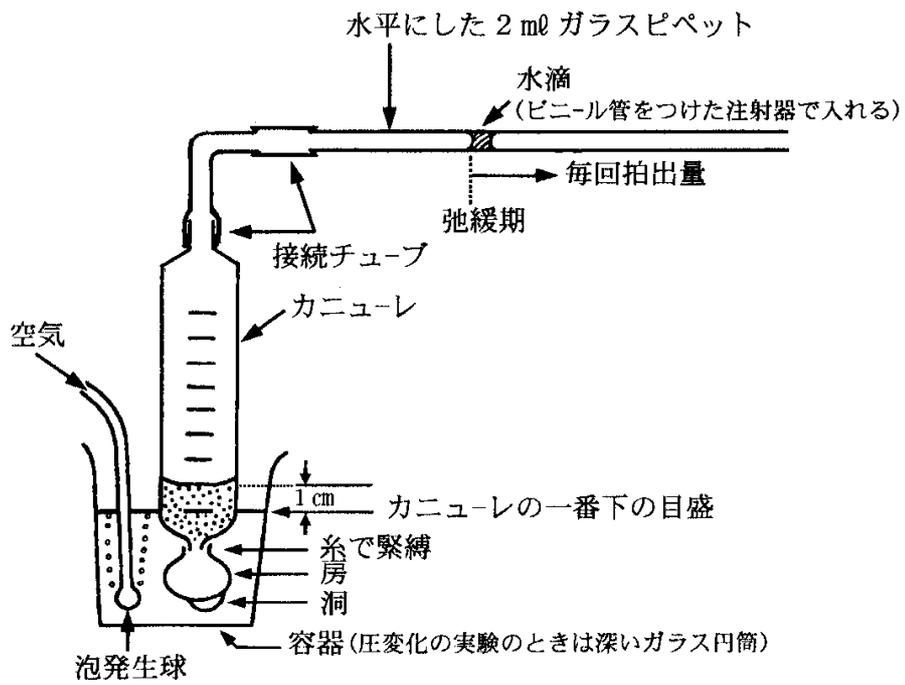


図 5. 反転洞房標本 (1)

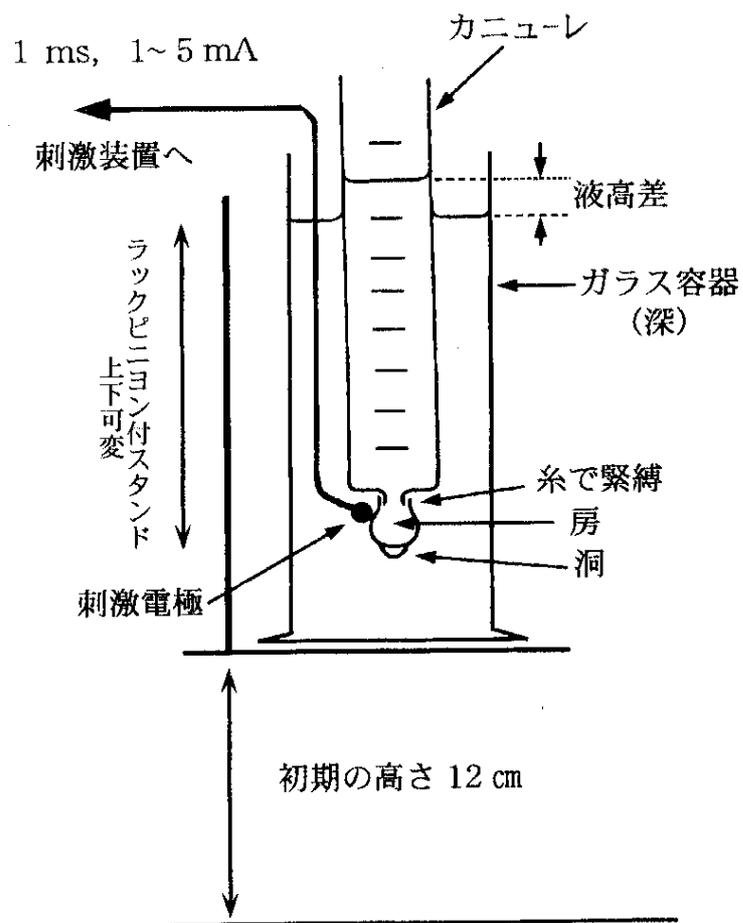
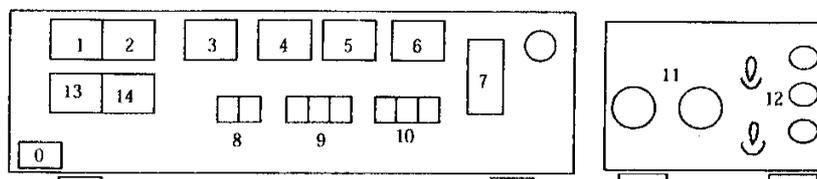


図6. 反転洞房標本(2)



図 7 ペーシング用電気刺激装置の操作



0. ON/OFF : 押し込んで電源を入れる。
1. MAIN INTERVAL : 刺激間隔 (逆数が頻度) をきめる。自発興奮間隔より 200 ms 程度短い間隔を選択する。
2. SET CYCLE : 刺激回数をプレセットできる。000 (free run) を選択する。
3. DELAY : START と刺激出力の遅延時間。 1 ms を選択。
4. INTERVAL : トレイン刺激の場合のパルス間隔。無関係。
5. DURATION : 刺激パルスの幅。1msを選択。
6. TRAIN : 群発刺激の各群内のパルス数をきめる。1とする。
7. OUTPUT : 出力調整、999を選択。
8. TRIG : トリガー源、MAIN 選択。
9. 無関係。
10. POLARITY : 極性をきめる。  を選択。
- (11)アイソレーター部分MODE : CURRENT 5 mAレンジを選択。  
FINE で 3 mA 程度とする。
- (12)アイソレーター部分 トグルスイッチは  STIMを選択する。
13. START : 刺激を加える。
14. STOP : 刺激を止める。

表-1 ACh, NA の効果のデータ整理表

測定時間 (何時何分)	実験条件 時間経過 (分)	A 10 拍動時間 (秒) 実測	B 毎分拍動数 (beats / 分) 計算
	正常リンガー液		
	ACh 1 分		
	ACh 3 分		
	正常リンガー液		
	NA 1 分		
	NA 3 分		

表-2 Stannius 結紮前後の拍動頻度のデータ整理表

測定時間 (何時何分)	実験条件 時間経過 (分)	A 10 拍動時間 (秒) 実測	B 毎分拍動数 (beats / 分) 計算
	S 結紮前		
	S 結紮後 0		
※			
	※ 後 1		
	※ 後 5		

※ 結紮後収縮開始までの時間  
 静脈洞の拍動頻度も併記する。

表-3 内圧の影響のデータ整理表

測定時間 (何時何分)	液高差 (cm)	A pacing 刺激時間 (秒)	B 毎分拍動数 (beats./分) 計算	C 毎回拍出量 (ml) 実測	D = B × C 毎分拍出量 (ml/分) 計算	E = 液高差 × C 毎回収縮期仕事 (g重・cm) 計算	F = B × E 毎分収縮期仕事 (g重・cm/分) 計算
	0						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	6						
	5						
	4						
	3						
	3						
	1						
	0						

必要ならば0.5 cm の効果も調べる。

