

Birefringence 法（複屈折法）と心筋保護

酒井 章*

はじめに

複屈折法 (Birefringence 法) は心筋保護を評価するにあたり組織化学的手法に定量性を与えた方法として Braimbridge, Darracott-Cankovic らによって報告されてきた^{1,2)}。しかし、この方法を用いている施設はごく限られており、それ故、複屈折法の意義は十分知られていないのが現状である。そこで、本文では複屈折法の原理と方法、それを用いた心臓外科分野での新しい応用例を紹介する。

1. 複屈折法の原理

偏光顕微鏡は偏光板 (偏光子; polarizer) をおいて自然光より常偏光だけを集光器に入れて標本を照射し、再び偏光板 (検光子; analyzer) をおいて、標本による複屈折を検査する装置である。図1を用いて説明すると、(1)偏光子を介し入ってきた光 (W-E) はこの面でのみ振動することにより、検光子 (N-S) を直交するようにおくと (直交ニコル) 光は遮断され画面は暗色となる (黒丸印)。 (2)ここに光学的等方性の検体を直行ニコルに対して45度におくと、光は偏光されることなく検光子を介し A'-A' の明るさとして観察される。 (3)同様に異方性の検体をおくと、射入した光は常偏光と異常偏光に分かれ、おのおの屈折率が違うためその合成波 A-A は、W-E に対し θ の角度を持ち、A'-A' の明るさとして観察される。この明るさは二つの偏光の行差 (retardation; R) に依存する。行差は射入する光の波長に反比例し、薄片の厚さと二つの偏光の屈折率の差に反比例する。実際の観察では前二者は一定であることから

検体間の差は二つの偏光の屈折率の差 (複屈折) になる。複屈折は行差 (単位; nm) で表され、 θ より算出される。 (4) θ を求めるため、compensator を用いて光学的に検光子の位置を A-A に対し直交させる (C-C)、この時画面は暗色となる。移動した角度 θ を計測し、次式により行差 (R) が算出される。

$$R = Rc \sin 2\theta$$

Rc は各 compensator に固有の定数である。

心筋細胞の複屈折性は形態複屈折である。ミオシン蛋白の微細な構成要素 (ミセル; micell) 自体には複屈折性はないが、その配列、相互間の距離、ミセル間の物質の屈折率の関係から生じる複屈折と説明されている。一方、組織化学の分野では Ca-ATPase 活性の検出が行われているが、この方法を用いてミオシン ATPase を活性しミセルの配列等を変えることができる。心筋保護における複屈折法は組織化学の手法を用いミオシンミセルの配列等を変え、複屈折を測定し心筋細胞の活性 (収縮性) を評価する方法と言える³⁾。

2. 測定方法

生検で取り出した心筋を直ちに -70°C に冷却した n-Hexane もしくは液体窒素に入れ凍結する。凍結保存された検体を -30°C に保たれたクライオスタットで 8μ の厚さに薄切する。切片は -30°C 以下で保存する。切片は空气中で乾燥させた後、偏光顕微鏡の鏡台に筋繊維の縦軸方向が W-E に45度になるよう固定する。切片の周囲に焦点をあわせ、もっとも暗くなる位置まで compensator を回転させ、その角度 ($\theta 1$) を読み取る。この時、検光子は直交ニコルの位置になり、次いで、筋繊維に焦点をあわせ、観察部位が一様に暗くなる位置まで compensator を回転させ、その角度

*筑波大学臨床医学系外科

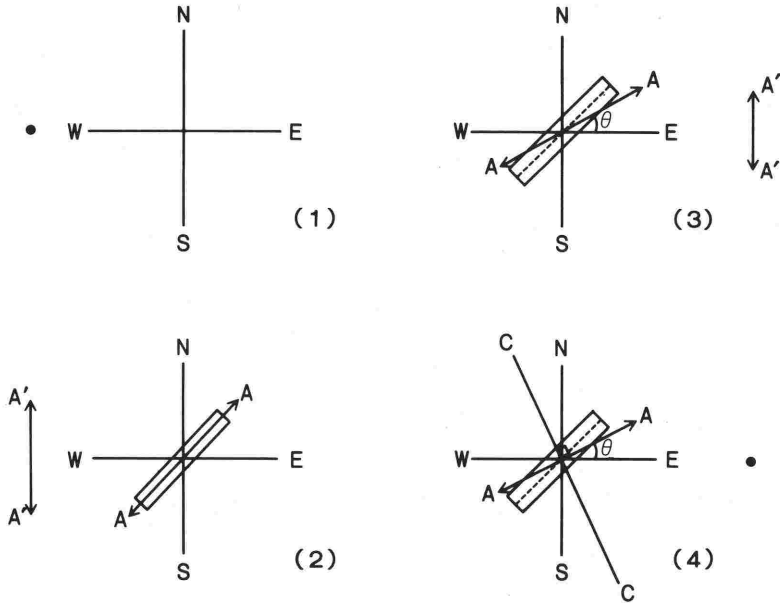


図 1

(θ2) を読み取る。これは検光子が検体の合成波 A-A に直交した位置である。回転角度θはθ2-θ1 であり、この検体の行差が算出される(空気値; air value)。ついで、下記の反応液を滴下しカバーグラスで覆う。

0.1 Mol sodium barbital solution; 10 ml
 10% calcium chloride solution; 5 ml
 distilled water; 35 ml
 ATP 76 mg

これらをよく攪拌し pH 9.4 に調整したのを、反応液とする。同様の操作を行い行差を算出する(ATP 値; ATP value)。ATP 値は空気値に対し常に高い値を示す、この差(反応液に対する変化)を range で表している。最近 range を空気値で標準化した ratio が多く用いられている。

3. 複屈折法の臨床応用

A : 心筋保護 : 対照値に比べ大動脈遮断解除直前の生検の range が 0.7 から 1.48 nm 減少すると中程度の傷害、1.48 nm 以上の減少では、高度の傷害とされている^{1,2)}。

B : 心保存と心移植 : 100例の心移植のドナー心、平均120分の心保存状態を検討した報告では、ドナー心の45%の ratio は1.03と残り58%の1.42に比べ有意に低く、死亡率は40%、15%と前者が

高く、カテコールアミンの使用も60%、27%と有意の差を見た。後者の内 ratio が1.11と保存中に低下した31例は死亡率19%カテコールアミン使用48%と保存がよかった27例(1.38)に比べ成績は悪化した。複屈折法がドナー心の選択、保存の評価にも有用なことを示している⁴⁾。

C : 心移植後の拒絶反応 : 急性、慢性拒絶反応において移植心の ratio が1.0以下に低下して行くことから、本法が拒絶反応の診断に有用なことが示唆されている。

D : 骨格筋構造蛋白の変換 : ラットの代表的速筋と言われている長指伸筋と遅筋と言われている、ひらめ筋の range を計測した。前者は 10.7 nm、後者は 6.6 nm と有意の差を示した。雑種成犬の広背筋を電気刺激により二ヶ月トレーニングすると、8.0 nm から 5.3 nm と有意に変化した。複屈折法はトレーニングによる骨格筋構造蛋白の速筋から遅筋へのタイプ変換を評価する方法として有用なことが示唆された⁵⁾。

文 献

- 1) Cankovic-Darracott, S., et al: Myocardial preservation during aortic valve surgery: Assessment of five techniques by cellular chemical and biophysical methods. J Thorac Cardiovas Surg 73: 699-706, 1977.

- 2) Braimbridge, M. V., et al: Cold cardioplegia or continuous coronary perfusion? J Thorac Cardiovasc Surg 74: 900-906, 1977.
- 3) Chayen J., et al: Increased myosin orientation during muscle contraction: A measure of cardiac contractility. Cell Biochem Function 3: 101-114, 1985.
- 4) Darracott-Cankovic, S., et al: Biopsy assessment of donor heart prior to and during transplantation. Transplant Proc 19: 2564-2565, 1987.
- 5) 土肥俊樹, 他: 電気刺激による骨格筋トレーニングに関する細胞生物学的研究. 日心外会誌: 投稿中

* * * * *

* * * * *

* * * * *

* * * * *