

Title	好中球による心筋細胞障害 : 活性酸素ならびに脂質過酸化反応の役割
Author(s)	藤, 久和
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37993">https://hdl.handle.net/11094/37993</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	藤 久 和
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学位記番号	第 1 0 1 7 2 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 病理系専攻
学位論文名	好中球による心筋細胞障害：活性酸素ならびに脂質過酸化反応の役割
論文審査委員	(主査) 教授 多田 道彦 (副査) 教授 谷口 直之 教授 松田 暉

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

近年、心筋の再灌流障害進展の増悪因子として活性酸素が重要な役割を演じることが活性酸素消去剤を用いた薬理学的検討より報告されている。虚血心筋組織における活性酸素産生源として、組織に浸潤した好中球由来の活性酸素は再灌流障害の進展に最も重要な障害因子の一つとして注目されている。好中球は活性酸素をはじめとする種々のケミカルメディエーターを産生することにより炎症反応を惹起し、壊死に陥った組織の修復を行う。しかしながら、この再灌流にともなう炎症反応に際しては虚血に陥った心筋組織に作用して障害をおよぼし、細胞障害を増悪すると考えられている。本研究では好中球の直接的な心筋細胞障害性を検討するため、マウス胎児培養心筋細胞と活性化好中球の混合培養系を用いて、細胞障害の程度と活性酸素、脂質過酸化物の産生について検討した。

#### (方 法)

心筋細胞はマウス胎児心臓よりトリプシン処理にて採取した。培養心筋細胞を予め無グルコースのH BSS 液中にて低酸素条件下 (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) に密閉容器中にて60分処理した。かかる心筋細胞を好氣的条件に復した後、人末梢血より Percoll 密度勾配法により採取した好中球を含む溶液に交換した (3 × 10<sup>6</sup> celL/ml HBSS/dish)。対照として低酸素負荷をしていない心筋細胞に対する活性化好中球の影響を検討した。好中球と心筋細胞を30分共存させた後、好中球刺激剤 [phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA : 10ng/ml), opsonized zymosan (500ug /ml), N-formyl-methionyl-leucy-phenylalanine (FMLP : 10ug/ml)] を添加しエリスロシンBの排出能と電子顕微鏡下での形態学的変化を検討した。一部の心筋細胞には再酸素化直後に SOD (100ug /ml) あるいはカタラーゼ (100ug /ml)

を添加した。また好中球と心筋細胞の混合培養系におけるフリーラジカル産生はルミノール化学発光法により測定し、脂質過酸化物質の産生量はチオバルビツール法を用いて測定した。好中球からの活性酸素産生量はチトクロームc還元法、わさびペルオキシダーゼ法、ルミノール化学発光法により測定した。

(成績)

### 1. 心筋細胞障害

心筋細胞を低酸素条件下で60分処理すると細胞拍動は停止するものの、エリスロシンB染色陰性で、形態学的変化もみとめられず、好气的条件に戻すと拍動能を回復した。低酸素処理後の心筋細胞に好中球を添加し、30分後(約10%の好中球が心筋細胞に粘着)好中球を刺激した。好中球をPMAにて活性化後20分では好中球の粘着している心筋細胞においてのみ細胞障害を認めるものの、その周辺の好中球の粘着していない心筋細胞には障害を認めなかった活性化60分には好中性の粘着していない心筋細胞においてもエリスロシンB染色陽性で、電顕下では細胞膜の破綻やミトコンドリアクリスタの融解が生じ、不可逆性細胞障害像を呈した。かかる心筋細胞障害の程度は正常心筋細胞よりも予め低酸素負荷を与えた心筋細胞に於て有意に増大した。

### 2. 活性酸素産生

- (1) 好中球; PMA, opsonized zymosan, FMLPの3種類の刺激剤にて刺激するとPMA活性化好中球において細胞障害の程度は最も顕著に生じた。各種刺激剤による活性酸素産生量を比較するとスーパーオキシドアニオン、過酸化水素ならびにルミノール化学発光法で測定した活性酸素量はPMAにて有意に大であった。
  - (2) 混合培養系; PMA刺激による混合培養状態でのルミノール化学発光量は好中球単独刺激並びに心筋細胞単独刺激での化学発光量に比較し2倍以上に増強、持続した。脂質過酸化物の生成も混合培養系では好中球ならびに心筋細胞単独群よりも有意に多く、化学発光が持続していた活性化後20分に脂質過酸化物の産生が亢進していた。
3. 活性酸素消去剤の効果; PMA活性化好中球による心筋細胞障害はカタラーゼにより52%の抑制率が認められ有意であったが、SODによる抑制は19%と軽度であった。この際ルミノール化学発光量はカタラーゼ、SODによりそれぞれ46%、14%の抑制率が認められた。

(総括)

活性化好中球が心筋細胞に対して不可逆性細胞障害を惹起し、その成因として少なくともその一部に好中球由来の活性酸素が心筋細胞での脂質過酸化反応を介して細胞障害の増悪をもたらすことが示された。また予め無グルコース・低酸素負荷を行った心筋細胞は低酸素負荷を行わなかった細胞に比較し有意に好中球に対する感受性が高いことが示された。このことは正常心筋細胞に比較して虚血の陥った心筋細胞は活性化好中球により細胞障害を受け易い状態であり、虚血心筋に浸潤した好中球は細胞障害を増悪し得る可能性を示している。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、心筋細胞と好中球の混合培養系モデルを作成し、好中球由来活性酸素の心筋細胞にたいする障害機構を検討したものである。活性化した好中球は好中球の粘着した心筋細胞を不可逆性細胞障害に陥らすのみでなく、好中球の粘着していない心筋細胞へも細胞障害性を示した。かかる現象には、好中球より産生された活性酸素が好中球の粘着した心筋細胞での脂質過酸化反応を惹起し、この脂質過酸化連鎖反応が心筋細胞障害の増悪に関与する可能性が示された。これらの知見は、虚血-再灌流後に組織に浸潤する好中球による心筋組織障害進展・増悪の機構を解明する上で重要であり学位に値すると考えられる。