



Title	細胞骨格障害からみたstunned myocardiumの発生機序に関する研究：再灌流時におけるmicrotubules障害に対するカルシウム過負荷とカルシウム依存性中性プロテアーゼの関与
Author(s)	雨宮， 彰
Citation	大阪大学，1993，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38152
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	あめ みや あきら 雨 宮 彰
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	細胞骨格障害からみた stunned myocardium の発生機序に関する研究 —再灌流時における microtubules 障害に対するカルシウム過負荷とカルシウム依存性中性プロテアーゼの関与—
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松田 暉 (副査) 教 授 井上 通敏 教 授 田川 邦夫

論 文 内 容 の 要 旨

(背 景)

心筋虚血再灌流障害のうち, stunned myocardium は可逆的な一過性の心機能低下を示す心筋障害であり, その発生は臨床上しばしば問題となるが, その病態および発生機序は十分に解明されていない。心筋虚血再灌流障害の病態の 1 つとして, 細胞骨格障害が注目されており, このうち特に microtubules は他の細胞骨格に比し, 可逆的心筋障害時にも障害を受けること, 細胞内 Ca^{2+} の上昇により障害されることが報告されているが, stunned myocardium における microtubules の障害に関して詳細な検討は行われていない。一方, stunned myocardium の発生機序として, 細胞内カルシウム (Ca) 過負荷の関与が示唆され, 興奮収縮連関の障害が可逆的心機能低下の機序の 1 つであると報告されている。さらに, 細胞質内に存在するカルシウム依存性中性プロテアーゼ (CANP) は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化され, 細胞骨格障害を惹起することが推察されている。

(目 的)

stunned myocardium を想定した虚血心筋における microtubules 障害の推移を再灌流早期より経時的に明らかにするとともに, その発生に対する Ca 過負荷および CANP の関与を明らかにすることを目的とした。

(対象および方法)

1) 実験プロトコール: 雑種成犬摘出心を 30 分間の常温虚血の後, 再灌流初期 10 分間を灌流圧 90mmHg で, 酸素化同種血による controlled reperfusion を行った。この後, 交差灌流下に 170 分間, 計 180 分間の再灌流を行った。経過中, 摘出心より心筋の生検を行うとともに, 左室機能の指標として, 前負荷, 後負荷への依存性が少ない指標である preload recruitable stroke work (PRSW) を測定した。

2) 組織学的検討: 経時的に採取した左室内心膜側より 5 mm までの心筋組織について, microtubules と actin filaments の免疫組織学的二重染色を行った。その後, 各生検標本 1 個から得られる無作為に選んだ 2 ~ 3 視野をすべて一定の露出時間で写真撮影した。写真上, 心筋細胞について正常の蛍光染色パターンが観察される細胞 (intact cell) と蛍光染色パターンが減弱ないし消失している細胞 (injured cell) に判別した。写真上の全視野における心筋細胞 (100 ~ 150 個) をこの二種類に判別, intact cell ratio (IR: intact cell 数 / 全心筋細胞数) を算出し, 細胞骨格障害の程度を評価した。

3) 左室機能測定法: 多極式コンダクタンスカテーテルおよびかて先マノメーターを左室心尖より左室内に挿入し,

心摘出前は下大静脈閉塞により、再灌流後は左房に挿入したカテーテルから容量負荷することによりそれぞれ算出される PRSW を求めた。再灌流後の PRSW の値の摘出前値に対する割合を左室機能回復率として算出した。

4) 実験グループ：(実験 1) 再灌流初期 10 分間の灌流血中 Ca^{2+} 濃度を变化させて microtubules 障害の発生を検討した。正常 Ca^{2+} 濃度 ($0.92 \pm 0.1 \text{ mEq/L}$) で再灌流した群 (N 群; $n = 6$)、EDTA を添加し Ca^{2+} 濃度 ($0.29 \pm 0.07 \text{ mEq/L}$) を低下させた群 (LC 群; $n = 6$) および CaCl_2 を添加し Ca^{2+} 濃度 ($5.3 \pm 0.6 \text{ mEq/L}$) を上昇させた群 (HC 群; $n = 6$) とした。

(実験 2) CANP の選択的阻害剤である E-64 の効果を検討した。本阻害剤の投与濃度は、 $6 \mu\text{M/L}$ とした。再灌流初期 10 分間に、正常 Ca^{2+} 濃度同種血に E-64 ($6 \mu\text{M/L}$) を添加した群 (N+E64 群; $n = 6$) と CaCl_2 添加により Ca^{2+} 濃度を上昇させた同種血に同量の E-64 を添加した群 (HC+E64 群; $n = 6$) の 2 群を作成し比較した。なお対照群は、実験 1 の正常 Ca^{2+} 濃度再灌流群を用いた。

(結 果)

(実験 1) N 群の IR は、再灌流 5 分後 ($53 \pm 3\%$) に虚血終了時 ($66 \pm 3\%$) に比しさらに低下し ($P < 0.05$)、再灌流 60 分後に虚血終了時 ($62 \pm 4\%$) と同程度まで回復した。しかし、再灌流 180 分後 ($75 \pm 4\%$) においてなお虚血前に比し有意 ($P < 0.05$) に低値であった。LC 群の IR は、再灌流 5 分後 ($66 \pm 2\%$)、60 分後 ($78 \pm 4\%$) において同時点の N 群に比し有意 ($P < 0.05$) に高値を示し、HC 群の IR は、再灌流 5 分後 ($42 \pm 2\%$) から 180 分後 ($42 \pm 3\%$) までの各時点において有意 ($P < 0.05$) に低値であった。一方、再灌流 60 分後の PRSW 回復率は、LC 群 ($79 \pm 2\%$) において N 群 ($63 \pm 3\%$) に比し有意 ($P < 0.05$) に高く、HC 群 ($44 \pm 3\%$) において N 群に比し有意 ($P < 0.05$) に低かった。

(実験 2) 再灌流 5 分後および 60 分後の IR は、N+E64 群 ($65 \pm 3\%$, $74 \pm 4\%$) および HC+E64 群 ($64 \pm 2\%$, $71 \pm 3\%$) がそれぞれ N 群に比し有意 ($P < 0.05$) に高値であり、再灌流 180 分後では、N+E64 群 ($77 \pm 4\%$)、HC+E64 群 ($72 \pm 3\%$) と、N 群との間に有意差が認められなかった。再灌流 60 分後の PRSW 回復率は、N+E64 群 ($77 \pm 3\%$) および HC+E64 群 ($72 \pm 4\%$) において N 群に比し有意 ($P < 0.05$) に高値、再灌流 180 分後では、N+E64 群 ($73 \pm 3\%$)、HC+E64 群 ($70 \pm 6\%$) と N 群との間に有意差を認めなかった。

(総 括)

雑種成犬摘出心を 30 分間の常温虚血後、交差灌流下に 180 分間の再灌流を行い、microtubules 障害の推移を経時的に検討した。

1) microtubules は再灌流早期に虚血終了時と比しさらにその構造の崩壊が進行した。一方 actin filaments は、この間その構造に変化を示さなかった。

2) 再灌流時の microtubules の崩壊は、低カルシウム再灌流により有意に軽減され、高カルシウム再灌流により有意に高度となった。

3) カルシウム依存性中性プロテアーゼの選択的阻害剤 (E-64) の再灌流時投与により、microtubules の崩壊は再灌流初期のカルシウム濃度にかかわらず有意に軽減された。

4) 異常より、30 分常温虚血後の再灌流心において、再灌流により microtubules の崩壊が亢進し、その機序として細胞内カルシウム過負荷と、カルシウム依存性中性プロテアーゼの活性化が関与していることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、雑種成犬摘出心における 30 分間常温虚血後減負荷状態の再灌流時の microtubules 障害を免疫組織化学的手法により検討し、その回復過程および障害の発生機序におけるカルシウム過負荷とカルシウム依存性中性プロテアーゼの関与を明らかにせんとしたものである。その結果、stunned myocardium を想定した 30 分常温虚血心において再灌流により microtubules の崩壊が亢進し、細胞内カルシウム過負荷の抑制およびカルシウム依存性中性プロテアーゼ選択的阻害剤の投与によりこの崩壊が軽減されることが明らかとなった。

この成績は、stunned myocardium の発生機序解明において有用な知見であり、開心術における再灌流障害軽減への応用が期待され、学位に値するものと考えられる。