

学 位 論 文 題 名

虚血再灌流障害時における活性酸素消去剤の
血管内皮細胞に対する効果について

学位論文内容の要旨

I 緒 言

心筋虚血再灌流障害時に産生される活性酸素とその消去剤の作用部位として血管内皮細胞が注目されている。これまで血管内皮細胞の関与については病理組織学的検討からなされているが、血管内皮細胞の機能面からの検討は少ない。本研究はsupport rat を使用した血液灌流回路に接続したラット摘出心モデルを考案して、superoxide dismutase(SOD),カタラーゼの虚血再灌流障害軽減効果とともに、その効果発現における血管内皮細胞の関与について検討した。

II. 材 料 と 方 法

体重450～550gの Wister ラットをsupport ratとして、ポンプを用いて大腿動脈から3ml/minの一定速度で脱血し頸静脈へ返血する血液灌流回路を作製した。体重270gのラット摘出心をLangendorff灌流し、350beats/minでペーシングを行った。左室に挿入したバルーンで左室内圧を測定し、冠灌流圧を摘出心接続カニュラの側枝から持続的に測定した。実験モデルの安定性を検討する予備実験として、90分間の摘出心灌流を行い左室収縮末期圧(LVESP), 冠灌流圧を測定した(n=8)。本実験は15分間の安定化の後、虚血前値の測定を行い大動脈カニュレを遮断して37.5℃、20分間のglobal ischemiaとし、その後35分間の再灌流を行い、この時点における諸指標を虚血前値と比較して心機能回復の評価を行った。実験群を2群(n=8/群)に分け、虚血前10分間と虚血後20分間 SODとカタラーゼをそれぞれ毎分1,000U 灌流血液中加入したものをSOD,カタラーゼ投与群（以下投与群）とし、薬剤を用いなかったものを非投与群とした。

収縮機能は、左室拡張末期圧(LVEDP)が10 mmHgでのLVESPを測定した。拡張機能は、虚血前にLVESPが0mmHgからLVEDPが10mmHgになるまでのvolumeをV10とし、虚血後にV10を負荷したときのLVEDPの値を測定した。LVEDPが0mmHgから10mmHgの間、直線的に変化すると仮定しcomplianceを求めた。冠灌流圧を測定し冠血管抵抗を求めた。血管内皮細胞の機能はアセチルコリンを灌流血液中の濃度が 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} (M)となるように注入し、冠灌流圧の変化

を測定し変化率を求めた。同様にニトログリセリン(総量 0.05mg)を灌流血液中に注入し、冠灌流圧の変化を測定し変化率を求めた。実験終了後、心筋の wet weightを測定し、100°Cで24時間乾燥した後 dry weightを測定し、心筋組織水分含量を求めた。

III 結 果

予備実験では、灌流開始時に比し90分後のLVESPは $14.8 \pm 3.9\%$ 低下し、冠血管抵抗は $20.6 \pm 6.1\%$ 上昇した。本実験では、虚血前の収縮機能、拡張機能、冠血管抵抗はいずれも2群間に有意差はなかった。収縮機能の指標であるLVESP回復率は非投与群で $59 \pm 2\%$ 、投与群で $67 \pm 2\%$ であり投与群で有意に高かった($P < 0.05$)。拡張機能も、虚血後のV10における LVEDP は非投与群で 23.6 ± 3.6 mmHg、投与群で 12.3 ± 0.2 mmHgであり、非投与群で有意に高値を示した($P < 0.05$)。虚血後の compliance は非投与群で 1.28 ± 0.12 μ ml/mmHg、投与群で 1.61 ± 0.11 μ ml/mmHgであり、投与群で有意に高値を示した。虚血後の冠血管抵抗は非投与群で 29.3 ± 4.3 mmHg $\cdot$ min/ml、投与群で 22.1 ± 3.2 mmHg $\cdot$ min/mlであり、有意差は認めなかったが投与群で冠血管抵抗は低い傾向が認められた。血管内皮細胞機能の評価では、冠灌流圧の変化はアセチルコリンの灌流血液中濃度が 1×10^{-6} から 1×10^{-10} (M)までの範囲では非投与群の反応を除き濃度増加により反応も増大した。アセチルコリン濃度 1×10^{-6} において、虚血前には $15.7 \pm 1.1\%$ 低下であったが、虚血後非投与群で $5.9 \pm 0.7\%$ 、投与群で $10.0 \pm 0.6\%$ の低下であり、虚血前に比べて両群において有意($P < 0.05$)に冠灌流圧反応の低下を示した。しかし、投与群では非投与群に比べ有意($P < 0.05$)に冠灌流圧の反応は改善した。ニトログリセリンに対する反応は、虚血前には $19.4 \pm 2.5\%$ 、投与群で $21.3 \pm 1.9\%$ 、非投与群で $15.9 \pm 2.4\%$ の低下であり、虚血前後いずれの群間でも有意差は認めなかった。心筋組織水分含有量は、非投与群で 3.98 ± 0.11 (ml/g $\cdot$ dry weight)、投与群で 3.81 ± 0.13 (ml/g $\cdot$ dry weight)であり、有意差は認めなかったが投与群で少ない傾向が認められた。

IV 考 察

虚血再灌流障害を軽減する上で活性酸素消去剤投与の有効性が報告されているが、消去剤の効果に疑問の持たれる報告もみられる。本実験では収縮能、拡張能の両面において消去剤投与の効果が示された。SOD、カタラーゼは通常の投与方法では心筋内に移行しないと考えられているが、投与により心筋壊死範囲が減少す

ることから、消去剤の効果発現は血管内皮細胞または白血球を介して作用するものと推測されてきた。本実験では血液灌流モデルを用いて灌流圧の変化から血管内皮細胞の機能を調べ、SOD,カタラーゼが血管内皮細胞に作用していることを証明した。また、support rat血液灌流回路モデルは系のそろった多数例について実験を施行でき、灌流に血液を用いるため虚血再灌流に及ぼす血液成分の影響を心機能の面から検索する上で有用である。

再灌流障害における微小循環障害について血管閉塞を解除しても再灌流されない領域のみみられることは no reflow phenomenon と呼ばれ、発生機序として血管内皮細胞の障害と好中球による毛細血管塞栓が考えられている。本実験では投与群で冠血管抵抗が低い傾向を示し、SOD,カタラーゼが白血球の活性酸素産生作用を抑制しno reflow phenomenonを軽減することが示唆された。組織水分含量の増加に白血球が関与することが報告されている。本実験でも組織水分含量は投与群で低値で浮腫の程度が軽度になり、SOD,カタラーゼが白血球の活性酸素産生を抑え微小血管の透過性を抑制した可能性も示唆された。

血管内皮細胞の機能の一つに血管収縮因子、血管内皮細胞由来弛緩因子(Endothelium-Derived Relaxing Factor:EDRF)などの血管拡張因子の産生による血管壁の緊張度の調節が知られている。本実験では血管内皮細胞障害の程度を、EDRF産生を介し血管拡張を起こすアセチルコリンに対する冠血管抵抗の変化を指標として検討した。また同時に、血管平滑筋依存でEDRF非依存性のニトログリセリンに対する反応も検討し、SOD,カタラーゼの投与でアセチルコリンによる血管拡張反応が改善される結果から、SOD,カタラーゼが血管内皮細胞に対し障害軽減作用を持つことを証明した。心筋虚血再灌流障害時には活性酸素が産生されるとともに消去剤が血管内皮細胞を介して作用するものとみられ、血管内皮細胞の保護が虚血再灌流障害による心筋細胞障害を軽減するために重要であることを示唆している。

V 結 語

血液灌流ラット摘出心における研究からSOD,カタラーゼの投与により心機能障害、血管内皮細胞障害はともに回復が認められた。SOD,カタラーゼ投与の有効性の機序として血管内皮細胞の障害を軽減することが示唆された。血液灌流ラット摘出心モデルは心機能、血管内皮細胞機能の両面から虚血再灌流障害を検討するとともに、血液成分の関与を研究する上で有用であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 邊 達 三

副 査 教 授 古 舘 正 徳

副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

虚血再灌流障害時における活性酸素消去剤の
血管内皮細胞に対する効果について

心臓外科において虚血再灌流による障害が注目され、その対策が研究されている。心筋虚血再灌流障害時に産生される活性酸素とその消去剤の作用部位としてこれまで血管内皮細胞の関与については病理組織学的検討からなされているが、血管内皮細胞の機能面からの検討は少ない。本研究はsupport ratを使用した血液灌流回路に接続したラット摘出心モデルを考案して、superoxide dismutase(SOD)、カタラーゼの虚血再灌流障害軽減効果とともに、その効果発現における血管内皮細胞の関与について検討した。

実験はWisterラットをsupport ratとして、ポンプを用いて大腿動脈から3ml/minの一定速度で脱血し頸動脈へ返血する血液灌流回路を作製した。体重270gのラット摘出心をLangendorff灌流し、350beats/minでペーシングを行った。左室に挿入したバルーンで左室内圧を測定し、冠灌流圧を摘出心接続カニューラの側枝から持続的に測定した。実験モデルの安定性を検討する予備実験として、90分間の摘出心灌流を行い左室収縮末期圧(LVESP)、冠灌流圧を測定した(n=8)。本実験は15分間の安定化の後、虚血 前値の測定を行い大動脈カニューレを遮断して37.5℃、20分間のglobal ischemiaとし、その後35分間の再灌

流を行い、この時点における諸指標を虚血前値と比較して心機能回復の評価を行った。実験群を2群(n=8/群)に分け、虚血前10分間と虚血後20分間SODとカタラーゼをそれぞれ毎分1,000U灌流血液中加入したものをSOD、カタラーゼ投与群(以下投与群)とし、薬剤を用いなかったものを非投与群とした。

収縮機能は、左室拡張末期圧(LVEDP)が10mmHgでのLVESPを測定した。拡張機能は、虚血前にLVESPが0mmHgからLVEDPが10mmHgになるまでのvolumeをV10とし、虚血後にV10を負荷したときのLVEDPの値を測定した。LVEDPが0mmHgから10mmHgの間、直線的に変化すると仮定しcomplianceを求めた。冠灌流圧を測定し冠血管抵抗を求めた。血管内皮細胞の機能はアセチルコリンを灌流血液中の濃度が 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} (M)となるように注入し、同様にニトログリセリン(総量0.05mg)を灌流血液中に注入し、冠灌流圧の変化を測定し変化率を求めた。実験終了後、心筋のwet weightを測定し、100℃で24時間乾燥した後dry weightを測定し、心筋組織水分含量を求めた。

予備実験では、灌流開始時に比し90分後のLVESPは $14.8 \pm 3.9\%$ 低下し、冠血管抵抗は $20.6 \pm 6.1\%$ 上昇した。本実験では、収縮機能の指標であるLVESP回復率は非投与群で $59 \pm 2\%$ 、投与群で $67 \pm 2\%$ であり投与群で有意に高かった($p < 0.05$)。拡張機能も、虚血後のV10におけるLVEDPは非投与群で 23.6 ± 3.6 mmHg、投与群で 12.3 ± 0.2 mmHgであり、非投与群で有意に高値を示した($p < 0.05$)。虚血後のcomplianceは非投与群で $1.28 \pm 0.12 \mu\text{ml/mmHg}$ 、投与群で $1.61 \pm 0.11 \mu\text{ml/mmHg}$ であり、投与群で有意に高値を示した。虚血後の冠血管抵抗は非投与群で 29.3 ± 4.3 mmHg $\cdot$ min/ml、投与群で 22.1 ± 3.2 mmHg $\cdot$ min/mlであり、有意差は認めなかったが投与群で冠血管抵抗は低い傾向が認められた。血管内皮細胞機能の評価では、冠灌流圧の変化はアセチルコリンの灌流血液中濃度が 1×10^{-6} 、 1×10^{-10} (M)までの範囲では非投与群の反応を除き濃度増加により反応も増大した。アセチルコリン濃度 1×10^{-6} において、虚血前には $15.7 \pm 1.1\%$ 低下であったが、

虚血後非投与群で $5.9 \pm 0.7\%$ 、投与群で $10.0 \pm 0.6\%$ の低下であり、虚血前に比べて両群において有意($p < 0.05$)に冠灌流圧反応の低下を示した。しかし、投与群では非投与群に比べ有意($p < 0.05$)に冠灌流圧の反応は改善した。ニトログリセリンに対する反応は、虚血前には $19.4 \pm 2.5\%$ 、投与群で $21.3 \pm 1.9\%$ 、非投与群で $15.9 \pm 2.4\%$ の低下であり、虚血前後いずれの群間でも有意差は認めなかった。心筋組織水分含有量は、非投与群で $3.98 \pm 0.11(\text{ml/g} \cdot \text{dry weight})$ 、投与群で $3.81 \pm 0.13(\text{ml/g} \cdot \text{dry weight})$ であり、有意差は認めなかったが投与群で少ない傾向が認められた。

以上の研究においてSOD、カタラーゼの投与により収縮機能、拡張機能は改善され、アセチルコリン投与、ニトログリセリン投与による冠灌流圧の変化の検索から血管内皮細胞に作用していることが証明され、心機能障害、血管内皮細胞障害はともに回復が認められた。本研究で用いた血液灌流ラット摘出心モデルは心機能、血管内皮細胞機能の両面から虚血再灌流障害を検討し、血液成分の関与を研究する上で有用であると考えられた。

口頭発表にあたって、北畠教授から収縮機能補助の意義、ブラドキニなど他の薬剤の検討、古舘教授から白血球の関与、内因性SODとの関係などについて質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。また副査の北畠教授、古舘教授とは個別に審査を受け合格と判定された。

心筋虚血再灌流障害についてラット摘出心モデルを考案し、SOD、カタラーゼの効果を心機能、血管内皮細胞の機能面から検討した本研究は、学術的意義が大きく学位授与に値すると思う。