

学 位 論 文 題 名

虚血再灌流障害における心機能低下と内在性サイトカイン

学位論文内容の要旨

はじめに

心筋における虚血再灌流障害とは、一度虚血に陥った心筋組織が血流再開により虚血が改善されたにもかかわらず、さらに障害が進行する現象である。臨床的には心筋梗塞発症早期のPTCR（経皮的冠動脈内血栓溶解術）及びPTCA（経皮的冠血管形成術）施行時や、心臓手術時の血流遮断解除後に重篤な心機能低下が引き起こされる現象がこれに相当する。

本研究ではラット摘出心灌流モデルを用い、再灌流障害における心機能障害、接着分子及びサイトカインの発現、組織学的変化について検討を加えた。

材料と方法

1. 灌流回路

ペントバルビタール麻酔下に雄 WKA ラット（体重450-550グラム）の右頸静脈と大腿動脈にカニューレを留置して動脈圧を持続的に測定した。灌流血液は採決用ラット2匹からエーテル麻酔下に腹部大動脈より採血し、回路内に充填した。灌流血液は足流量ローラーポンプを用いて大腿動脈から脱血され、摘出心は大動脈より逆行性灌流（Langendorff 灌流）して、落差返血にて頸静脈へと返血された。灌流血液は摘出心の温度が37.5℃となるように回路周囲を恒温槽からの温水にて灌流した。

2. 灌流心の摘出と心機能のモニタリング

雄 WKA ラット（平均体重270グラム）の心臓をペントバルビタール麻酔下に摘出しカニューレに接続した後、左室ベント及び左室内圧測定用バルーンを経膈帽弁的に挿入した。バルーン内に左室拡張末期圧 Left Ventricular End Diastolic Pressure (LVEDP) が10mmHg になるように生理食塩水を注入し、左室収縮末期圧 Left Ventricular End Systolic Pressure (LVESP) を測定した。また冠灌流圧 Coronary Perfusion Pressure (CPP) も測定した。

感電極を右室に挿入し、不感電極を上行大動脈とし心室ペースングを行った。また温度プローブを右室内に挿入し摘出心の温度を持続的にモニターした。

3. 血液中の好中球上に発現している接着分子の解析

1) 抗体

1次抗体は抗 CD11a 抗体 (LFA-1 の α 鎖に対する抗体), 抗 CD11b 抗体 (Mac-1 の α 鎖に対する抗体), 抗 CD45 抗体 (ICAM-1 に対する抗体), 抗好中球抗体, 抗好中球・マクロファージ抗体を用いた。

2次抗体は fluorescence isothiocyanate (FITC) 標識抗ラット Ig (G+M) 抗体及び FITC 標識抗マウス Ig κ 鎖抗体を用いた。

2) Flow cytometry による解析

摘出心灌流後の血液から好中球を単離し, 1次抗体を加えて 4℃にて30分間静置した。次に細胞を遠心して上清を捨てた後, FITC 標識 2次抗体を加え 4℃にて30分間静置した。その後 Propidium iodide を加え遠心し, 細胞をリン酸緩衝液 pH7.2に浮遊させ Flow cytometry にて解析した。

4. Semiquantitative Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Semiquantitative RT-PCR)

1) primer

β -actin, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ に対する Primer は文献を参照した。IL-1 α , IL-3, TNF- α , MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), IL-1ra (interleukin-1receptor antagonist) に対する primer は今回の実験のために新たに設計した。

2) semiquantitative RT-PCR

灌流実験終了後の摘出心は冠血管内及び心腔内を 4℃のリン酸緩衝液 pH7.2にて洗浄した後, guanidine thiocyanate solution を加えホモジェナイズし RNA を抽出した。抽出した RNA は逆転写酵素により complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を作製後 PCR を行った。増幅後の PCR 産物からサンプルを一部とり 2%アガロース上で電気泳動を行った後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線下で目的のバンドを確認した。残りのサンプルはさらに 5 サイクル増幅後同様にサンプルの一部をとり目的のバンドを確認した。これらの操作を繰り返すことにより 20, 25, 30, 35, 40 の各サイクルにおける PCR 産物のバンドを確認した。摘出心灌流後の血液も, 溶血により白血球のみとした後, 同様に Semiquantitative RT-PCR を行った。

5. 組織学的分析

実験終了後の摘出心は10%ホルマリン固定後、水平断方向のパラフィン切片とし、hematoxylin-eosin 染色 (HE 染色), Bodian 染色を行い、形態学的変化を検討した。

6. 実験プロトコール

1) control perfusion 群 (対照群): 摘出心を100分間にわたり灌流した。

2) reperfusion 群 (再灌流群): 摘出心を血液灌流回路に接続し、15分間安定化のため灌流した後、血液灌流回路を停止して37.5°C, 20分間の global ischemia とし、その後さらに60分間の再灌流を行った。なお虚血中はペーシングは停止していた。

なお両群とも灌流前と灌流後の灌流血液中のヘモグロビン濃度, pH, 酸素分圧, 二酸化炭素分圧, BE を測定した。

結 果

1. support rat の安定性

1) 血液ガス分析

灌流前及び灌流後において2群間に有意差を認めなかった。

2) support rat の収縮期血圧

対照群及び再灌流群における収縮期血圧は実験期間中きわめて安定した状態に維持されており、2群間に有意差を認めなかった。

2. 灌流心の心機能

1) 左室収縮機能

実験開始15分後と100分後を比較すると、左室拡張末期圧 (LVEDP) は対照群で 87.5 ± 11.6 %, 再灌流群では 55.1 ± 5.8 %にまで低下しており、対照群と比較し再灌流群において有意な低下を認めた。

2) 冠灌流圧 (CPP)

冠灌流圧は2群間において有意差を認めなかった。

3. 血液中の好中球に発現している接着分子の解析

正常血液, 対照群, 再灌流群の好中球上の接着分子の発現量は変化を認めなかった。

4. Semiquantitative RT-PCR によるサイトカイン産生の解析

1) 心筋組織におけるサイトカイン mRNA の発現

正常心筋組織において IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α の発現を認めた。15分間の灌流

で MCP-1 の発現が新たに認められた。25分間の虚血により新たに IL-1 β , IL-1ra の発現が認められた他, IL-6, IL-8 の発現が増強した。再灌流20分後, 40分後, 60分後では新たに IL-1 α の発現が認められた他, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-1ra の発現が増強した。なお IL-2, IL-3, IL-4 はすべての組織において発現を認めなかった。

2) 灌流血液中の白血球におけるサイトカイン mRNA の発現

正常血液中の白血球において IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1ra の発現を認めた。15分間の灌流では大きな変化は認められなかった。25分間の虚血後新たに IL-1 α の発現が認められた他, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1ra の発現が増強した。再灌流60分で IL-1 α の発現が増強した。なお IL-2, IL-3, IL-4, IL-8, MMCP-1 はすべてのサンプルにおいて発現を認めなかった。

5. 組織学的解析

HE 染色では対照群において若干の間質における浮腫性変化を認めたが, 再灌流群では間質における顕著な浮腫性変化や一部では間質内出血, 炎症細胞浸潤を認めた。しかし心筋細胞の変性は認めなかった。Bodian 染色にて比較しても各群とも心筋細胞の横紋が明瞭に認められた。

考 察

接着分子や発現量に変化は認めなかったが, 接着分子の活性化が質的調節を受けている可能性や, 血管内皮細胞側の接着分子や好中球側の LECAM-1 (lectin adhesion molecule-1) などの接着分子が関与している可能性があり, 再灌流障害への関与は否定できない。

サイトカイン mRNA の発現は IL-1 β , IL-1ra が虚血により, IL-1 α が虚血に引き続く再灌流により新たに発現することが認められた。IL-1 と心機能低下との関係を示唆する報告としては, 前もって IL-1 を投与しておくことにより再灌流障害を軽減したという報告や, IL-1 を投与することにより心機能低下や心筋細胞における RNA 及び蛋白の合成阻害を誘導したという報告がある。さらに組織学的に軽度の炎症細胞浸潤しか認めていないことから, 従来 regional ischemia のモデルで報告されている大量の炎症細胞浸潤や心筋細胞の壊死性変化を伴う心機能障害過程とは異なった心機能障害過程が, global ischemia に引き続く再灌流障害において存在する可能性が示唆された。

結 論

再灌流障害早期において、大量の炎症細胞浸潤や心筋細胞の壊死性変化を伴わない IL-1 等の液性因子を介した心機能障害過程の存在が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 邊 達 三

副 査 教 授 劔 物 修

副 査 教 授 上 出 利 光

心筋の虚血再灌流障害は虚血心筋組織に対する冠循環の再開により引き起こされる。その機序としてこれまで好中球と内皮細胞の接着にみられるような免疫学的応答が、重要な役割を果たしていることを示唆する実験結果が示されてきた。本研究では再灌流障害による心機能低下と免疫学的応答をサイトカイン及び接着分子の発現の面から検討した。

実験は support rat を使用したラット摘出心血液灌流モデル (Langendorff モデル) を用いて 37.5°C、25分の虚血及び60分の再灌流を行い、心機能低下及び免疫学的応答を調べた。心機能は左室内バルーンを用い測定し、左室収縮期圧の回復率は対照群で 87.5 ± 11.6%, 再灌流群で 55.1 ± 5.8% であった。

灌流血液中の好中球における接着分子の発現は、再灌流障害により影響を受けないことが Flow cytometry による分析により示された。

血液灌流を受けた摘出心におけるサイトカイン mRNA の発現について、Semiquantitative Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Semiquantitative RT-PCR) により解析した。IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α は正常心筋組織において低いレベルで発現したが、虚血及び再灌流により発現の増強を認めた。IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-1 receptor antagonist は正常心筋組織において発現しなかったが、MCP-1 は15分の血液灌流、IL-1 β , IL-1 receptor antagonist は25分の心筋虚血、IL-1 α は虚血心筋の再灌流によりその発現が認められた。

組織学的検討では再灌流群は心筋細胞間における浮腫性変化や間質内出血を示したが、大量の炎症細胞浸潤や心筋細胞の壊死性変化は認めなかった。

以上の結果から global ischemia に引き続く再灌流の早期には、炎症細胞反応や心筋壊死などの組織学的変化を伴わない心機能障害過程が存在することが示唆された。

口頭発表において劔物教授より実験プロトコルの想定法、IL-1 を介する心機能障害、収縮能の検討、フリーラジカルの関与、サイトカイン間の相互調節作用、上出教授より global ischemia と regional ischemia の臨床的意味、再灌流障害における虚血時間の関係などの質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答を行った。また劔物、上出両教授には個別に審査を受け合格と判定された。

心筋における虚血再灌流障害は今日重要な課題となっているが、本研究は独特の摘出心血液灌流モデルを用い、心機能、接着分子、サイトカインについて詳細な検索を行い、早期の IL-1 などの液性因子を介した心機能障害過程の存在を示したものであり、学位授与に値するものと考えられる。