



Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 谷口, 安宏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1255

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 402号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏 名	谷 口 安 宏		
論文題目	Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts (ラット灌流心における虚血／再灌流障害に対する過酸化水素の保護効果)		

博士(医学) 谷 口 安 宏

論文題目

Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts

(ラット灌流心における虚血/再灌流障害に対する過酸化水素の保護効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Ischemic preconditioning (IPC) は短時間の虚血を先行させることでその後に引き続く長時間の虚血/再灌流障害に対して、心筋保護効果をもたらす現象である。活性酸素は従来、虚血/再灌流障害の要因として重要であると考えられてきたが、最近、IPC 中に発生する活性酸素が心筋保護に関与することが報告されている。今回、IPC の心筋保護機構を解明するため、活性酸素の一種である過酸化水素 (H_2O_2) を先行投与し、虚血/再灌流後の心機能および ^{31}P -核磁気共鳴 (NMR) 法を用いたエネルギー代謝と細胞内 pH を測定した。

[材料ならびに方法]

雄性ラットの心臓を麻酔下にて摘出し、Langendorff 装置に接続後に、Krebs-Henseleit 溶液で 90cmH₂O の定圧灌流を行った。左室発生圧 (LVDP)、左室拡張末期圧 (LVEDP) による心機能と冠灌流量を計測した。心筋のエネルギー代謝は、 ^{31}P -NMR 法を用いて、クレアチンリン酸 (PCr)、アデノシン三リン酸 (ATP)、細胞内 pH を測定することにより評価した。実験プロトコールは以下の三群で行った。

- (1) 対照群 (n=8) : 25分間の定圧灌流を行い、35分間の全虚血を行なった後に40分間の再灌流を行った。
- (2) IPC 群 (n=6) : 5分間の虚血と5分間の再灌流をそれぞれ2回行った後、対照群と同様に35分間の全虚血および40分間の再灌流を行った。
- (3) H_2O_2 群 : 0.5 (n=6)、2 (n=8)、10 (n=6) μM の各濃度を用い、5分間の投与と5分間の wash out をそれぞれ2回行った後、35分間の全虚血および40分間の再灌流を行った。

[結果]

- (1) 虚血中には LVDP はほぼ消失し、LVEDP の上昇を認めたが、三群間で有意な差を認めなかった。再灌流40分後の LVDP の回復は、対照群 ($37 \pm 7\%$) に比し、IPC 群 ($84 \pm 4\%$) および $2\mu M H_2O_2$ 群 ($65 \pm 4\%$) で有意に良好であった (平均 $\pm$ SE, $p < 0.05$)。しかし、 $0.5\mu M$ および $10\mu M H_2O_2$ 群では有意な LVDP の回復を認めなかった。再灌流40分後の LVEDP の上昇は、対照群に比し IPC 群で有意に抑制されたが ($p < 0.05$)、 $2\mu M H_2O_2$ 群では抑制される傾向であった。また、再灌流40分後の冠血流量も対照群に比して IPC 群で有意に増加したが、 $2\mu M H_2O_2$ 群では変化を認めなかった ($p < 0.05$)。
- (2) PCr および ATP は虚血中には急速に低下して検出不能となったが、再灌流後は不完全に回復した (PCr: $51 \pm 5\%$ 、ATP: $12 \pm 2\%$)。IPC 群および $2\mu M H_2O_2$ 群では、再灌流40分後の PCr と ATP の回復は対照群に比して良好であった (IPC: $81 \pm 6\%$ 、 $30 \pm 3\%$; $2\mu M H_2O_2$: $82 \pm 5\%$ 、 $29 \pm 2\%$; $p < 0.05$)。
- (3) 対照群および H_2O_2 群において、再灌流40分後の LVDP と PCr の回復の間に有意な正相関関係を認めた ($r = 0.93$, $p < 0.05$)。また、LVDP と ATP の回復の間にも有意な正相関関係を認めた ($r = 0.94$ 、

$p<0.05$)。IPC 群では、 $2\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 群に比し、同程度の PCr および ATP の回復における LVDP の回復はより著明であった。

- (4) 対照群において虚血中の細胞内 pH は有意に低下した ($6.38\pm 0.03, p<0.05$)。IPC 群において細胞内 pH の低下は軽度であったが ($6.65\pm 0.04, p<0.05$)、 H_2O_2 群では対照群と差を認めなかった。また、再灌流後の細胞内 pH は、三群間で有意な差を認めなかった。

〔考察〕

心機能とエネルギー代謝を同時に測定することにより、至適濃度の H_2O_2 はエネルギー代謝を改善させることで心筋保護効果をもたらすことが示唆された。 H_2O_2 による保護効果のメカニズムとして、ミトコンドリア内膜にある ATP 感受性カリウムチャネルやミトコンドリアの permeability transition pore を介してミトコンドリア機能を保持したことが考えられた。

IPC は H_2O_2 と同程度のエネルギー代謝の回復で心機能のより大きな回復を認めた。IPC による保護効果のメカニズムは、エネルギー代謝の回復のほかに、細胞内 pH の低下の軽減など他の保護作用も関与していることが示唆された。

〔結論〕

IPC および至適濃度の H_2O_2 の投与は、虚血／再灌流障害に対して心機能およびエネルギー代謝を改善した。IPC による心筋保護効果の機序として、IPC 中に発生する活性酸素が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Ischemic preconditioning (IPC) は短時間の虚血を先行させることでその後に引き続く長時間の虚血／再灌流障害に対して、心筋保護効果をもたらす現象である。活性酸素種は従来、虚血／再灌流障害の要因として重要であると考えられてきたが、最近、IPC 中に発生する活性酸素種が心筋保護に関与することが報告されている。そこで、申請者は IPC の心筋保護機構に活性酸素種の関与があるかどうかを虚血／再灌流後の心機能および ^{31}P -核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて検討した。

方法は以下の通りである。

雄性ラットの心臓を麻酔下にて摘出し、Langendorff 装置に接続後に心機能と心筋のエネルギー代謝を評価した。

実験プロトコールは以下の三群で行った。

- (1) 対照群 ($n=8$) : 25分間の定圧灌流を行い、35分間の全虚血を行なった後に40分間の再灌流を行った。
- (2) IPC 群 ($n=6$) : 5分間の虚血と5分間の再灌流をそれぞれ2回行った後、対照群と同様に35分間の全虚血および40分間の再灌流を行った。
- (3) H_2O_2 群 : H_2O_2 0.5 ($n=6$)、2 ($n=8$)、10 ($n=6$) μM の各濃度を用い、5分間の投与と5分間の wash out をそれぞれ2回行った後、35分間の全虚血および40分間の再灌流を行った。

以上の実験で得られた結果は以下の通りである。

- (1) 虚血中には Left ventricular developed pressure (LVDP) はほぼ消失し、Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) の上昇を認めたが、三群間で有意な差を認めなかった。再灌流40分後の LVDP の回復は、

対照群に比し、IPC 群および $2\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 群で有意に良好であった。しかし、 $0.5\mu\text{M}$ および $10\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 群では有意な LVDP の回復を認めなかった。再灌流40分後の LVEDP の上昇は、対照群に比し IPC 群で有意に抑制されたが、 $2\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 群では抑制される傾向であった。また、再灌流40分後の冠血流量も対照群に比して IPC 群で有意に増加したが、 $2\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 群では変化を認めなかった。

- (2) PCr および ATP は虚血中には急速に低下して検出不能となったが、再灌流後は不完全に回復した。IPC 群および $2\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 群では、再灌流40分後の PCr と ATP の回復は対照群に比して良好であった。
- (3) 対照群および H_2O_2 群において、再灌流40分後の LVDP と PCr あるいは ATP の回復の間に有意な正相関関係を認めた。IPC 群では、 $2\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 群に比し、同程度の PCr および ATP の回復における LVDP の回復はより著明であった。
- (4) 対照群において虚血中の細胞内 pH は有意に低下した。IPC 群において細胞内 pH の低下は軽度であったが、 H_2O_2 群では対照群と差を認めなかった。また、再灌流後の細胞内 pH は、三群間で有意な差を認めなかった。

以上の結果から申請者は IPC による心筋保護効果の機序として、IPC 中に発生する活性酸素種の関与の可能性を示した。委員会は、活性酸素種が虚血再灌流障害による心機能低下を抑制することを示したことと、それが IPC のメカニズムの一部である可能性を示したことを高く評価した。

本論文内容の説明の後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

- 1) NMR の設定条件について
- 2) 心臓の拍動が NMR 信号に与える影響について
- 3) IPC の虚血時間と頻度の設定条件について
- 4) IPC の保護作用の持続時間について
- 5) IPC の細胞内 pH への影響について
- 6) 細胞内アシドーシスと心機能について
- 7) ミトコンドリア K_{ATP} チャネルについて
- 8) 5-HD の薬理作用について
- 9) IPC に対するラジカルスカベンジャーおよび 5-HD の影響について
- 10) IPC 時に産生される活性酸素種の産生部位と種類について
- 11) IPC の臨床応用について

以上の質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしい内容を備えていると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 梅 村 和 夫
副査 数 井 暉 久 副査 渡 邊 裕 司