

氏名	やまわき まさひろ 山 脇 理 弘
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第487号
学位授与年月日	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Protective effect of edaravone against hypoxia-reoxygenation injury in rabbit cardiomyocytes (家兎心筋細胞の低酸素・再酸素化障害に対するエダラボンの細胞保護効果)
学位論文審査委員	(主査) 山田 一夫 (副査) 渡辺 高志 重政 千秋

学位論文の内容の要旨

急性心筋梗塞 (AMI) の治療は血栓溶解やカテーテルインターベンションなどの早期再灌流療法の普及により大きな発展を遂げた。しかし、一方で、再灌流時に発生する不整脈や気絶心筋の存在が急性期の重大な問題となっている。これらの再灌流障害には Reactive oxygen species (ROS) が関与しており、特に虚血中だけでなく、再灌流時に大量発生する ROS (ROS burst) が重要な役割を果たしているといわれている。これまで ROS 産生を標的とした抗酸化剤の有効性が報告されているが、いまだ一致した結果が得られていない。

最近、脳梗塞に対し臨床応用されたエダラボン (Eda) はその強力な抗酸化作用により、脳浮腫の改善作用が示されている。Eda の心筋保護効果についても、家兎 AMI モデルにおいて既に報告されているが、心保護効果の詳細な機序についてはほとんど解明されていない。今回、単離心筋細胞を用いて Eda が心筋細胞内の ROS burst を抑制することで直接的な細胞保護効果を示すか否か、さらにより効果的な Eda の投与時期について検討した。また逆に、細胞外からの酸化ストレス (H_2O_2) に対しても同様な効果を示すか否かも検討した。

方 法

実験には 1.3~1.6 kg の雄性の New Zealand white rabbit を用いた。麻酔後、速やかに心臓を取り出して Langendorff 灌流装置に取り付けた後、コラゲナーゼ処理し、心室筋細胞を単離した。得られた細胞を遠心管に分注、 $80\times g$ で 1 分間遠心分離した後、0.2 ml 上清を除去し、代わりに 0.2 ml

の mineral oil を重層して外気と遮断した。37°C、60 分間保温して低酸素状態にした後、外気に触れないようピペットで慎重に細胞のみを取り出し、Tyrode 液内で再酸素化した。上記の低酸素-再酸素化(A/R)刺激と H₂O₂ 添加条件下において、細胞死については Propidium Iodide(PI)、ROS については 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)で染色し、これらを flow cytometry で客観的に評価した。また patch clamp 法を用いて、H₂O₂ 暴露 2 分後の action potential duration(APD)と細胞死までの時間を計測した。

結 果

A/R 刺激は細胞死の割合を増加させた。15 μ M の Eda を A/R 刺激前から測定時まで投与した場合 (Throughout 群)、再酸素化直後に投与した場合 (Reox 群)、いずれにおいても、有意に細胞死は抑制され ($P < 0.05$ vs. Control)、両群とも有意に ROS の産生も抑制された ($P < 0.05$ vs. Control)。Eda の細胞保護効果と ROS 低下率の関係においても、ともに有意な正の相関を示した (Eda-Throughout: $R = 0.65$, $P < 0.05$, Eda-Reox: $R = 0.91$, $P < 0.05$)。しかし、Eda を再酸素化 10 分後に投与した場合は、その細胞保護効果は消失した。他の抗酸化剤であるビタミン C や superoxide dismutase(SOD)投与でも、同様な傾向が観察されたが、いずれも有意差を認めなかった。また Eda は細胞外からの酸化ストレス (H₂O₂:20~1000 μ M) に対しても ROS 産生低下と細胞保護効果を示し、APD 延長の抑制と細胞死までの時間を延長した。

考 察

Eda は再酸素化直後に投与しても細胞内の ROS 産生を抑制することから、その抗酸化作用により直接的な細胞保護効果を示したと考えられる。この効果はビタミンCやSODより優れていたが、再酸素化 10 分後の投与では細胞保護効果は認められなかった。これらの結果から、再灌流直後の細胞内における ROS burst が細胞死に重大な結果をもたらすが、再灌流直後の Eda 投与が優れた ROS 軽減作用を有することで細胞保護効果を発揮する可能性が示唆された。また、Eda は細胞外からの酸化ストレスに対しても細胞保護効果を示し、patch clamp 法による beating cell の検討でも同様に細胞死までの時間を延長した。

現在、再灌流障害の治療薬は確立していない。これに対する予防薬として、抗酸化薬は注目されているが、その効果が一致しないのは、薬剤によって細胞への移行性が異なっているためと考えられる。つまり、ROS burst により重大な障害が起こる前に、薬剤が細胞内に到達できなければ、十分な細胞保護効果を発揮することはできない。脂溶性で細胞内移行性に優れ、強力な抗酸化作用を有する Eda は、既にその有効性は *in vivo* でも証明されており、今後、早期再灌流療法を受ける AMI 患者の補助治療薬として応用が期待できる薬剤である。

結 論

Eda は ROS 産生を抑制することで、直接的な細胞保護効果を示した。Eda は、早期再灌流療法の補助治療薬として今後臨床応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は家兎単離心筋細胞を用いて Cell-pelleting model 法で低酸素-再酸素化刺激を行い、エダラボンによる直接的な細胞保護効果を検討したものである。その結果、エダラボンは再酸素化時に生ずる reactive oxygen species burst の発生を強く抑制することにより、細胞保護効果をもたらすことが明らかになった。本研究は、心筋細胞におけるエダラボンの強力な抗酸化薬としての作用を単離心筋細胞において直接証明したものである。今後早期再灌流療法を受ける急性心筋梗塞患者の補助治療として、臨床応用への道を開くと同時に、本研究で用いた客観的な評価法とその結果は今後の虚血再灌流障害研究に貢献するものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認める。