

論文の内容の要旨

論文題目 植物性フラボノイド（ケンフェロールおよびケルセチン）による過冷却・低温障害防止効果を用いた超長時間心臓保存の確立

尾崎 晋一

今日の心臓外科手術は、人工心肺の進歩とともに、いかにして安全に心停止を得て、心停止の間に心筋を保護しながら手術を行うかという点に重きを置いて発展してきた。Gerald らは有効な心筋保護に必要な基本原則として 1,心停止をして心収縮を止める、2,低温にする、3,エネルギー生成に必要な基質を供給する、4,pH を適正に保つ、5,心筋細胞の浮腫を予防する、6,細胞膜やミトコンドリアを傷害するフリーラジカルを除去することを提唱した。これらのなかでも虚血による心筋障害を軽減する方法として、心筋酸素消費量を減らすという考えから、心臓を停止させて収縮によるエネルギー損失を減らすということと、心臓を冷却して代謝に消費されるエネルギー損失を減らすということが重要である。特に心臓の酸素需要量は電氣的機械的心停止により拍動心の 10% まで減少することから心拍動を再開させず、心停止を維持しておくことが心筋の保護に重要な役割を果たす。これは、心移植時の心臓保存においても同様である。現在のドナー心は University of Wisconsin(UW)液や Celsior 液などの臓器保存液内で+4℃前後で保存されてレシピエントのもとに搬送されているが、この心臓の臓器虚血許容時間は、肺の 8 時間、肝臓の 12 時間と比較すると、4-6 時間と非常に短い。心停止によりエネルギー損失を軽減する方法に加えて臓器を低温環境下において臓器保存を行う方法が研究されている。しかし単純に低温環境下に保存すると凍結する危険性があり、この凍結によって組織・細胞の viability は著しく低下し、移植に適さない状態となる。そこで凍結することなく、可及的低温状態にすることによって細胞の代謝を抑えることのできる、過冷却下の臓器保存が注目されるようになった。過冷却下の臓器保存には過冷却を促進する過冷却物質が不可欠であり、本研究ではその過冷却物質の一つであるケンフェロール (Kaempferol 7-O-β-D-Glucopyranoside, KF7G) に注目した。ケンフェロールは植物性フラボノイドの一種で、シベリア地方に自生する樹木の氷点下温度への適応機序に関する研究の過程で発見された。Shimada、Fujikawa らが行った実験では、ラットのドナー心を UW+KF7G 液に浸漬・保存し 4℃、-2℃、-5℃で 24、30 時間保存後に、ラット同種異所性心移植モデルを用いてその KF7G の有効性を検討した。その結果-2℃で保存した心臓の収縮が他の保存温度群の心臓よりも良好であった。これらの実験から KF7G の過冷却効果の有効性が見出された。しかし同じ報告の中で-5℃保存では 4℃、-2℃よりもはるかに悪い収縮であったとも述べられている。このことから、KF7G により凍結は防止されたものの、ある温度以下では KF7G の過冷却効果を、低温による傷害作用が上回ってしまう可能性が示唆された。そこで私は、その低温障害を防止できる可能性のある物質としてケルセチン(Qu)を用い、-5℃下でのケルセチンの低温障害防止効果を検討した。Qu も KF7G と同様に植物性フラボノイドの一種であり、近年ヒスタミン生成や遊離などに関与する経路を抑制する抗炎症作用・抗酸化作用を示すことが明らかになっており、研究が進んでいる。本研究では植物性フラボノイドである KF7G と Qu を心筋

保護液に添加し、KF7G のもつ過冷却効果と Qu のもつ低温障害防止効果の二重効果を検討した。まず HL-60 細胞を用いて -5°C における KF7G と Qu の混合保存液の低温障害防止効果を検討したところ、 -5°C 下で KF7G と Qu の併用により、凍結させることなく、さらに低温による細胞障害が防止できる可能性が示唆された。この結果を踏まえ KF7G と Qu を UW 液に添加し、ラット同種異所性心移植モデルを用いて *in vitro* での効果を検討した。ラットのドナー心を -5°C 下で、①U 群:University of Wisconsin(UW)液、②K 群:UW 液+KF7G(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、③Q 群:UW 液+KF7G(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+Qu(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の 3 群に分けて 24・30 時間保存後、ラット同種異所性心移植モデルを用いて評価した。評価方法としては、収縮の程度を 15 分間の再灌流ののち、移植心の拍動をビデオテープで撮影し、半定量的に次に記載する基準でスコア化した。0(no contraction)、1(poor or sporadic contractions)、2(poor to mild contractions)、3(mild to moderate contractions)、4 (moderate to good contractions)、5(good contractions)、6(excellent contractions)。同僚の心臓外科医にビデオテープを見てもらい点数をつけてもらった。また心拍数を以下の基準で heart rate score としてスコア化した。0(0 回/分)、1(1~40 回/min)、2(41-80 回/min)、3(81-120 回/分)、4(121-160 回/分)、5(161-200 回/分)、6(201-240 回/分)、7(241-280 回/分)、8(281-320 回/分)、9(321-360 回/分)、10(361-400 回/分)。またヘマトキシリン—エオジン染色により再灌流した心臓を組織学的に観察した。 -5°C 、24 時間・30 時間保存下では、すべての群で保存液の凍結は認めなかった。また再灌流後 2 時間観察後に犠牲死させるまでの間に死亡したレシピエントラットはいなかった。24 時間保存では再灌流後、U 群は心全体に表面の凹凸を認め心筋内に出血を起こしていた。K 群や Q 群では部分的には U 群と同所見を認めるものの、全体的には表面は平滑で再灌流 2 時間後の表面の色調も褐色であるものが多かった。30 時間保存では、どの群とも表面は暗黒色に変化し、有効な収縮を認めなかった。viability score (平均値 \pm 標準誤差)では、24 時間保存した群において、再灌流 15 分後では、K 群 1.8 ± 0.5 と Q 群: 2.8 ± 0.5 との間では収縮に明らかな差は認めなかった。しかし U 群: 0.8 ± 0.4 と Q 群 2.8 ± 0.5 との間には視覚的収縮に有意差を認めた($p=0.01$)。また再灌流 2 時間後では、Q 群 2.1 ± 0.4 は、U 群 0.8 ± 0.4 、K 群 0.8 ± 0.4 と比較し有意に収縮は良好であった($p=0.03$)。30 時間保存した群では、再灌流 15 分後、再灌流 2 時間後とも Q 群は他の群と比較し有意差はなかった。24 時間保存した群において、heart rate score (平均値 \pm 標準誤差)は、再灌流後 15 分時は Q 群 4.8 ± 0.5 は U 群 1.8 ± 0.6 と比較し、有意に心拍数は高かった($p=0.04$)。しかし K 群 2.8 ± 0.8 と比較すると有意差はなく、また再灌流後 2 時間では group Q は他群と比較し有意差を認めなかった。HE 染色では 24 時間、 -5°C 保存下では、U 群では明らかに細胞は膨化し、観察した広範囲で出血を起こしており、視覚的評価と所見は一致していた。K 群と Q 群に関しては一部出血を起こしていたが、細胞の構造・配列は比較的保たれており、HE 染色上はその違いをはっきりと見出すことはできなかった。30 時間、 -5°C 保存下では各群とも観察した広範囲で組織の配列は乱れて、出血していた。以上から K・Q 群の 2 群を比較するため、アポトーシスの程度を定量化することとした。組織切片に TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色を行って、アポトーシス陽性細胞数を 2 群間で比較することとした。さらに Western blotting を行い、アポトーシスの初期にカスパーゼによってポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼから切

断されるカスパーゼ切断フラグメントの cleaved PARP の検出により正常心筋での cleaved PARP 蛋白との比を求めてアポトーシスの定量化を行った。その結果 TUNEL 染色では-5°C,24 時間保存した場合、アポトーシスを起こしたとみなされる細胞数(平均値±標準誤差)は、K 群は 155±32 個、Q 群は 83±45 個で、K 群と比較し、Q 群で有意に少なかった(p=0.04)。また Western blotting では-5°C,24 時間保存した場合、シグナル強度比は、group K:2.6±0.3、group Q:1.5±0.1 で、group K と比較し、group Q で有意に低値であった(p=0.02)。今回の実験によりラット同種異所性心移植モデルを用いて、KF7G・Qu がもつ過冷却効果および低温障害防止効果による非凍結超低温下での心保存を行うことが可能であり、KF7G および Qu は心移植の臨床場面においても移植心保存に有効となる可能性が示唆された。ただし保存時間の延長には、保存期間中の保存液の pH 変化による劣化の可能性も考慮する必要があり、また収縮においては臨床での使用には不十分であるため本研究を基礎として大動物などを用いて更なる研究が必要である。