

審査の結果の要旨

尾崎 晋一

本研究では、心保存時に心筋での代謝を抑制して虚血許容時間の延長を得るために、過冷却物質であるケンフェロールと、低温障害防止効果をもつケルセチンという2つの植物フラボノイドを併用し、ラット同種異所性心移植モデルを用いてその有効性を検討し、以下の結果を得た。

- 1、 HL-60細胞を用いて-5°Cにおけるケンフェロールとケルセチンの混合保存液の低温障害防止効果を検討したところ、無添加の群・ケンフェロールのみの添加の群よりも生存細胞数は多かった。このことから *in vitro* ではケルセチンとケンフェロールの併用により-5°C環境下でも細胞を凍結させることなく、さらに低温による細胞傷害が防止される可能性が示唆された。
- 2、 ケンフェロールとケルセチンを University of Wisconsin(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 vivo* での効果を検討した。まず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(100μg/ml)、③Q群:UW液+KF7G(100μg/ml)+Qu(1μg/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。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。収縮は、24時間保存した群において、再灌流2時間後の評価で、Q群は、U・K群と比較し有意に収縮は良好であった。30時間保存した群では、Q群は他の群と比較し有意差はなかった。心拍数は、有意差はでなかったものの24・30時間保存した両群において、Q群が他の群と比べて高い傾向にあった。
- 3、 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が、K群とQ群に関しては一部出血を起こしていたものの、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。

- 4、 組織切片に TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色を行って、HE 染色ではその違いが不明瞭であった 24 時間保存の K 群と Q 群をアポトーシス陽性細胞数をカウントしてアポトーシスを半定量化し比較した。その結果 Q 群では K 群よりアポトーシス細胞数が有意に少なかった。
- 5、 Western blotting 法を用いて、24 時間保存の K 群と Q 群の組織内の、アポトーシス関連蛋白である cleaved PARP を検出してシグナル強度を測定し、正常心筋との比を求めた。その結果シグナル強度比は K 群と比較し Q 群は有意に低値であった。

以上本論文は、過冷却効果をもつケンフェロールと、低温傷害防止効果をもつケルセチンとを併用して、その有効性を明らかにした。現在の心移植時のドナー心の保存温度は 4℃前後で、虚血許容時間は 4 時間程度であるが、本研究では-5℃保存下で 24 時間の虚血時間が得られた。ラット同種異所性心移植モデルでの結果であるが、今後の心移植時のドナー心保存に貢献することが期待され、学位の授与に値するものと考えられる。