

論文内容の要旨

論文提出者氏名 池本 公紀

論文題目

Raman Spectroscopic Assessment of Myocardial Viability in Langendorff-Perfused Ischemic Rat Hearts

論文内容の要旨

心臓の冠動脈血流が途絶えると、その灌流域の心筋は虚血に陥り、酸素や代謝基質が枯渇することによりミトコンドリアにおけるATP生成が阻害され、その収縮能は速やかに低下する。また早期の虚血心筋ではミトコンドリア電子伝達系における複合体IVによって行われるシトクロムcの酸化反応が進まなくなること、還元型シトクロムcの割合が増加する。こうしたミトコンドリアの変化は心筋が虚血に曝されている限り進行し、ついには不可逆的となりそのviability(生存能)は失われる。心筋viabilityの評価は虚血性心疾患患者に対する外科的治療の方針を決定する上で重要であり、実臨床では心筋シンチグラフィやMRIがその評価に用いられているが、これらでは術中リアルタイムにviabilityを直接評価することはできない。このような問題に対し申請者は、心筋にRaman分光法を適用すれば心筋のviabilityの評価が可能となるのではないかと考えた。

Raman分光法は分子振動に基づくラマン散乱光を利用し、非標識に物質の分子構造を同定する手法である。これまでにRaman分光法を用いてラットの健常心筋と梗塞心筋とを識別したり、ラット心のglobal ischemiaにより虚血早期に還元型シトクロムcのピークが増強したりすることが報告されてきた。このような成果から、申請者は虚血心筋に再灌流・再虚血状態を誘導することで、viableな心筋に比べnon-viableな心筋ではシトクロムcの酸化還元状態の変化が乏しくなるとの仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証するために摘出ラット灌流心の冠動脈を結紮、その後解除することにより短時間(30分)および長時間(120分)の虚血心筋を作成し、それぞれの条件下における心筋をRaman分光法により経時的に評価した。併せて心筋の組織形態学的評価や超微細構造の評価を行い、さらにこれに伴うミトコンドリア複合体の活性・タンパク定量との比較も行った。

Wister Rat(male, 200-300g)に全身麻酔を施し、下大静脈からヘパリンを投与した後、心臓を速やかに摘出し、カニューラを上行大動脈から挿入、37℃ Tyrode液で冠動脈の灌流を開始した。灌流開始30分後に2, 3-butanedione monoxime(BDM)含有Tyrode液に変更し心拍動を停止させた。さらに30分間の灌流により定常状態とした後、冠動脈左前下行枝を手術用結紮糸で結紮し、それより下流を虚血域、上流を非虚血域とした。初回の冠動脈結紮時間により30分虚血群および120分虚血群に分け、初回虚血後それぞれ再灌流20分、再虚血30分を結紮解除・再結紮することにより誘導した。各々の領域における心外膜直下

心筋をRaman分光顕微鏡(532nm励起)で観察し、Ramanスペクトルを経時的に記録した。また30分および120分虚血心筋について、Triphenyl tetrazolium chloride(TTC)染色でミトコンドリア活性を評価した。さらに心臓を4% paraform aldehydeで浸漬固定後作成した薄切標本をHematoxylin-Eosin(HE)染色し組織形態を、2% glutaraldehydeで固定後作成した超薄切片を電子顕微鏡で観察し超微細構造の変化を評価し、Ramanスペクトル変化との関連性について評価した。加えてホモジネートした心筋組織を用いてミトコンドリア複合体I、IVの活性を測定し、Western blot法でミトコンドリアタンパク量についても評価した。

初回虚血誘導後、非虚血域ではRamanピーク強度に経時的な変化は認めなかったが、虚血域において両群ともに747 cm^{-1} および1124 cm^{-1} のRamanスペクトルのピーク強度(還元型シトクロムcを反映)は速やかに上昇し、おおよそ30分以内に概ね定常状態となった。結紮した冠動脈を解除し再灌流すると、これらのスペクトルピークは低下したが、その低下は30分虚血心筋で10分程度で前値に復したのに対し、120分虚血心筋ではピークの低下が遅く不完全であった。さらに再度冠動脈を結紮するとスペクトルピークは30分虚血心筋ではほぼ初回の虚血と同程度にまで上昇したが、120分虚血では初回虚血時の半分程度の上昇に留まった。また747 cm^{-1} (還元型シトクロムc)について、虚血負荷中に変化が少ないと考えられる脂質由来のband(1447 cm^{-1})で比を取り標準化を行ったが、ピーク強度の変化と同様の傾向を示した。

TTC染色において、120分虚血心筋には30分虚血心筋で見られない不染域が観察され、長時間虚血心筋ではミトコンドリア複合体IIの活性が障害されていることが示唆された。また電子顕微鏡による観察では、非虚血心筋および30分虚血心筋と比較し120分虚血心筋においてミトコンドリアの浮腫状変化が見られ、内膜構造は破壊されていた。これより120分虚血心筋ではミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系の活性が障害されていることが示唆され、120分虚血心筋における再灌流・再虚血誘導時のRamanスペクトル変化の鈍化を反映し、ミトコンドリア電子伝達系の不可逆的な障害を反映しているものと考えられた。一方、複合体I、IVの活性およびタンパク量、シトクロムcのタンパク量に関しては両群間で差は認めず、複合体I、IVに比べIIの方が虚血に対し脆弱である可能性が示唆された。

以上、Raman分光顕微鏡によって再灌流・再虚血を誘導した心筋のシトクロムcの酸化還元状態の変化を観察することで、その心筋のviabilityを非標識で評価できることが明らかとなった。Raman分光法による虚血心筋の評価は虚血性心疾患患者により正確で効果的な外科的治療を提供する上で有用な判断手法になり得ると考えられた。