

氏 名	み 三 和 せん 千 り 里
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2517 号
学位授与の日付	平 成 14 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Spaciotemporal alteration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in cardiomyocytes after myocardial infarction in rats. (心筋梗塞後の酸化ストレスの変移に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 日 合 弘 教 授 野 間 昭 典 教 授 米 田 正 始

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

心筋梗塞後の心不全に関して再灌流障害の関与が指摘されておりその際の酸化ストレスの影響が考えられるがその詳細は報告されていない。とくに時間的, 空間的な変移については未だ明らかではない。

我々は心筋虚血再灌流時の酸化障害のマーカーとして 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) による免疫病理的・定量的評価を行った。

#### 【方法】

SD ラット66匹に対して前下行枝を結紮して心筋梗塞を作成し, この心筋を梗塞後 0, 3, 6, 12, 24, 48時間 1, 2, 4, 6 週間後に採取した。この心筋標本に対して 8-OHdG の抗体である N45.1 を用いて ABC 法にて免疫染色し心筋酸化障害の局在を評価した。

さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって核 DNA 中の 8-OHdG を測定し dG/8-OHdG 比にて定量した。またそれぞれの時層におけるアポトーシスの程度を TUNEL 法にて評価した。

また心機能の評価を Hewlett 社製 SONOS1000(7.5MHz) にて行った。

#### 【結果】

免疫染色にて心筋梗塞部の 8-OHdG は梗塞後 6 時間までは梗塞部に高く発現し, 健常部は上昇しなかった。しかし12時間以後は梗塞部・周囲部で一度低下するが1週目を過ぎる頃から周囲部・健常部で上昇し, 4 週後でも周囲部には酸化障害が残存した。

dG/8-OHdG 比も control が  $0.39 \pm 0.17 (\times 10^{-5})$  に対して梗塞 3 時間後の梗塞部では  $1.3 \pm 0.17 \times 10^{-5}$  と有意に上昇し一度減少するが2週間後では梗塞周囲部および健常部において上昇傾向を示した。この傾向は周囲部において遷延した。

アポトーシスの程度は1週間程度まではあまり上昇しないが2週目から上昇しこの変化は心筋梗塞後の心機能の低下と相関があった。

#### 【考案】

心筋虚血後の酸化ストレスは当初心筋の虚血のダメージによって心筋梗塞部に集中するが48時間を超える頃から梗塞部の心筋は壊死し, 心筋周囲部に残存する。その後一度下降するも再度上昇しこのときは非心筋梗塞部にも酸化ストレスがかかっていることが示された。2 回目の上昇は心筋のアポトーシス及び心機能の低下と平行しており酸化傷害によるアポトーシスが心機能と何らかの関連を示していると考えられる。

【結語】心筋梗塞後の酸化ストレスは2 峰性の変化を示し1 つ目が虚血による心壊死, 2 つ目がアポトーシスと関連した心機能不全を示していると考えられた。またこの手法は種々の心不全時の心筋細胞の評価に応用できる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

心筋梗塞後の心不全に関して再灌流障害の関与が指摘されておりその際の酸化ストレスの影響が考えられるがその詳細は報告されていない。とくに時間的、空間的な変移については未だ明らかではない。本研究は心筋虚血再灌流時の酸化障害の免疫病理的・定量的評価を行っている。

SD ラット66匹に対して心筋梗塞を作成し、この心筋を梗塞後0, 3, 6, 12, 24, 48時間1, 2, 4, 6週間後に採取。免疫染色にて心筋酸化障害の局在を評価し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって核 DNA 中の8-OHdG を定量し、アポトーシスの程度を TUNEL 法にて評価している。

免疫染色および dG/8-OHdG 比にて心筋梗塞部の8-OHdG は梗塞後6時間までは梗塞部に高く発現し、健常部は上昇しなかった。しかし12時間以後は梗塞部・周囲部で一度低下するが1週後から周囲部・健常部で上昇し、4週後でも周囲部には酸化障害が残存した。アポトーシスは1週間程度まではあまり上昇しないが2週目から上昇しこの変化は心筋梗塞後の心機能の低下と相関があった。心筋梗塞の診断と治療に新たな方法論を提示したものと考えられる。

心筋梗塞後の酸化ストレスは2峰性の変化を示し1つ目が虚血による心壊死、2つ目がアポトーシスと関連した心機能不全を示していると考えられた。またこの手法は種々の心不全時の心筋細胞の評価に応用できる可能性が示唆された。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学医授与申請者は、平成14年4月2日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。