

氏名・（本籍）	ふく はら たけ ひさ 福原武久（岡山県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	論医博第10号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与年月日	昭和60年12月23日
学位論文題目	<b>Histochemical, ultrastructural and cytochemical study of reperfusion effect on ischemic myocardial injury.</b> (虚血心筋への血流再開効果に関する組織化学的、超微細構造 的および細胞化学的研究)

審査委員	主査 教授	前田 敏博
	副査 教授	河北 成一
	副査 教授	挾間 章忠

## 論文内容の要旨

最近、急性心筋梗塞患者に冠動脈血流再開を試みる治療が行われ始めた。つまり短時間の虚血心筋には、不可逆性変化に陥った細胞と障害を生じて、血流再開により回復する可逆性変化の細胞が存在すると推測されている。本研究は、急性局所虚血心筋巣を作製し、虚血後および血流再開後の虚血障害域の広がり組織化学的に判定し、虚血や再灌流早期と後期の超微細形態の変化を、定量的に評価して虚血後の血流再開の効果を検討した。また細胞化学的にCa<sup>2+</sup>-ATPase活性を検出し、細胞のviability保持の考察に供した。

### 〔方法〕

雑種成犬をペントバルビタール麻酔下に左冠動脈前下行枝を剝離し、第一対角枝分岐直下を結紮した後、結紮を解除し血流再開を行った。チアノーゼ不十分な例は除外し、計22頭を60分結紮のみのA群（8頭）、結紮後血流再開を120分行ったB群（14頭）に分け研究対象とした。A群は60分虚血後、チアノーゼ境界を中間に含む、心外膜側から心内膜側までの長方形の立方体として心筋片を摘出し、超微形態と細胞化学的検索用の心筋片を非虚血部と虚血部（心外膜側と心内膜側）より採取し、残りを液体窒素にて凍結した。B群は60分虚血後、チアノーゼ域の中心より生検針にて心内外膜両側の心筋を採取し、その後結紮を解除した。血流再開5分後に再度生検針にて虚血部心筋を採取した。血流再開120分後には、A群と同様に心筋片を摘出し、同様のサンプリングを行なった。電顕的超微形態の観察には、通常の方法で固定・包埋し、電子染色を行い、H-500型電顕で観察した。細胞化学的Ca<sup>2+</sup>-ATPase検出には、安藤らのクエン酸鉛法

にて反応させ、電子染色を行わずにH - 500型電顕で観察した。組織化学的には、10 $\mu$ の凍結切片を作製し(A群は連続切片を作製)、PAS染色を行った。超微細構造観察は、細胞障害を半定量的に評価する為、1標本につき70~100個の細胞を次の基準にて評価し、平均値を算出してその標本の障害度とした。基準は0度は正常、1度は軽度のグリコーゲン(G)の減少と空胞出現、ミトコンドリア(Mit)の軽度の基質密度の低下。2度は大半のGの消失、Mitの基質密度の消失とクリスタの一部破壊、中等度の筋原線維間浮腫。3度はGの消失、著名な浮腫、Mitのクリスタの破壊と消失、細胞膜のZ帯部での離開。4度は著しい細胞構築の破壊やMit内のamorphous dense bodyの出現である。統計的評価は、60分虚血後A B両群での心内膜側と心外膜側間の障害度の差異と、B群で心内外膜側について60分虚血後と120分再灌流後間における障害度の差異を、paired t testを用いて判定した。

#### 〔結果〕

組織化学的観察では、Gは60分虚血部で減少し、G豊富な非虚血部と境界鮮明に接しており、虚血域内にもGがpatchyに残存し(特に心外膜側に多い)、連続切片でみると血管に沿って連なっていた。120分再灌流後は、心外膜側にGの中等度以上含有細胞が広く比較的均一に存在し、心内膜側にも多くのG存在域が出現していた。超微細構造的観察では、非虚血部細胞は少数の空胞がみられる以外は正常形態を示した。60分虚血後心筋細胞は、筋原線維のI帯が開大し、障害度1~4度の変化を示した。障害度は隣接する細胞間で差があった。60分虚血後のA B両群合わせて、半定量的に求めた障害度のmean  $\pm$  S Dは、心外膜側1.25  $\pm$  0.71, 心内膜側1.99  $\pm$  1.18であり、心内膜側が有意( $p < 0.01$ )に障害が強かった。5分再灌流後の虚血心筋は、60分虚血後と比し著明な変化を呈した。Mitや細胞質の著しい浮腫、筋原線維の過収縮、多数の空胞形成、Mitの一部はクリスタ消失し空胞化していた。120分再灌流後では、浮腫や空胞は多いがI帯開大なく、Gを多く含有する細胞がみられた。心外膜側は、障害度0~2度の細胞が大部分をしめた。心内膜側は改善を示す細胞と高度障害細胞が隣接して存在した。B群において半定量的に60分虚血後と120分再灌流後を対比すると心外膜側では、有意に改善を示し(1.46  $\pm$  0.53  $\rightarrow$  1.09  $\pm$  0.65,  $p < 0.05$ )たが、心内膜側は2.12  $\pm$  0.96  $\rightarrow$  2.15  $\pm$  1.36で有意な変化はなかった。 $Ca^{2+}$ -ATPaseは、正常心筋では、Mit、筋小胞体、筋原線維に活性がみられ、60分虚血後では減少し、120分再灌流後で障害度の軽い細胞は、活性の保持が良好であった。

#### 〔考察〕

本研究は同一犬の拍動心を用いて行なった。Gの分布と電顕的観察で、心外膜側は障害軽度で血管に沿って障害のない細胞が存在した。またG消失域でも軽度障害細胞が存在し、血流再開で救済され得る可能性を示した。臨床的に再灌流によりreperfusion injuryが指摘されているが、今回再灌流5分後にみられた著しい形態上の変化が、 $Ca^{2+}$ -paradoxや $O_2$ -paradoxの所見に一致し、reperfusion injuryと関連があると考えられた。しかし120分再灌流後に示したように心外膜側で有意な改善が見られ、細胞膜のZ帯部での離開のない障害細胞は、回復する可能性を示した。

#### 〔結語〕

60分虚血心筋では、血流再開により心外膜側は、救済され得る可能性がある。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、心臓壁の壁応力や心筋内圧が、心外膜側と心内膜側とで差があり、また冠動脈副血行路も個体により異なるものである事を考慮して、急性心筋梗塞巣の分布と障害程度、及び血流再開早期と後期における細胞障害と回復性を、犬を用いて詳細に研究したものである。

実験は、左冠動脈前下行枝を60分結紮し、急性局所虚血性心筋変化を作製し、その後結紮を解除して血流再開早期（5分後）と後期（120分後）の変化を追跡した。超微細構造上の変化は、障害程度により0～4度と判定し、同一犬から生検法で経時的に採取した心室壁組織を心外膜側、心内膜側に分け、半定量的に検討した。また細胞化学的にCa<sup>2+</sup>-ATPase活性を検出して比較検討を行った。

虚血によって、心筋細胞のグリコーゲン（G）は著明に減少するが、60分虚血後でもGを含有する細胞が心外膜側に多く存在し、これらは血管に沿って連続していた。120分再灌流後で、心外膜側にG含有細胞が広範囲にみられた。超微細構造的には、60分虚血後では隣接する細胞間に障害度の差が見られたが、心外膜側では、心内膜側より障害が有意（ $p < 0.01$ ）に軽度であった。再灌流5分後では、ミトコンドリアのクリスタが消失して空胞化したり、筋原線維の過収縮、著しい浮腫等の著明な変化を呈するものが、特に心内膜側に多くみられた。120分再灌流後では、著しく障害された細胞と、極めて形態の良好な回復した細胞を認め、半定量的評価にて、心外膜側のみ有意（ $p < 0.05$ ）な回復が見られた。ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>-ATPase活性は、形態の良好な細胞に見られ形態良好な細胞は生活力のある細胞である事を示唆した。

本研究は、心筋の持つ生物学の特殊性の一面を形態学的に明らかにすると同時に、急性心筋梗塞の冠血流再開治療時における、細胞障害に関する基礎的実験結果を提供したものである。