



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

脳血管攣縮に関する実験的研究
オキシヘモグロビンの培養平滑筋細胞に対する作用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 深澤, 誠司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/15244

氏名 (本籍) 深澤誠司 (大阪府)
 学位の種類 博士 (医学)
 学位授与番号 乙第1025号
 学位授与日付 平成8年1月17日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位論文題目 脳血管攣縮に関する実験的研究
 オキシヘモグロビンの培養平滑筋細胞に対する作用

審査委員 (主査) 教授 山田 弘
 (副査) 教授 野澤 義 則 教授 野間 昭 夫

論文内容の要旨

破裂脳動脈瘤の手術成績はmicrosurgeryの導入ならびに超急性期手術により、近年飛躍的に向上している。しかし、くも膜下出血後には脳血管攣縮という特異な病態が発生することがあり、そのために手術成績の向上にもかかわらず、いまだ機能予後が制限される症例を多々認めるのが現状である。この脳血管攣縮という特異な病態を解明すべく、多くの研究がおこなわれてきたが、現時点ではいまだその発生機序は解明されず治療法も確立していない。

さて、脳血管攣縮の発生機序において、くも膜下腔に存在する血液ならびにその崩壊産物が攣縮のトリガーであるとの報告が散見され、なかでも赤血球ならびにその崩壊産物が注目を浴びている。そこで申請者は、赤血球の崩壊産物であるオキシヘモグロビンに注目するとともに、脳血管としての反応性を検討する目的でブタの脳底動脈由来の中膜平滑筋細胞を用いて、オキシヘモグロビンの平滑筋細胞収縮刺激作用について実験検討した。さらに、オキシヘモグロビンの脳血管平滑筋細胞に対する器質的障害作用の有無と、その機序解明を目的とした薬剤付加による変化を実験検討した。

対象および方法

対象としてはブタ脳底動脈中膜平滑筋由来の培養平滑筋細胞を用いた。

1) 培養平滑筋細胞内Ca²⁺濃度測定

培養平滑筋細胞に蛍光指示薬であるfura-2/AMをとりこませて、オキシヘモグロビン添加後の細胞内Ca²⁺濃度変化をARGUS-100イメージプロセッサーにて測定検討した。

2) 培養平滑筋細胞の収縮力測定

培養平滑筋細胞の収縮弛緩にともない細胞周囲に皺が増減するモデルを作成し、オキシヘモグロビン添加後の平滑筋細胞の収縮弛緩反応を、皺の増減を写真撮影しイメージスキャナーに取り込みNIH画像解析ソフトを用いることで定量化し測定するとともに、他の収縮刺激物質(塩化カリウム、セロトニン、プロスタグランジンF_{2a}、ノルエピネフリン)による収縮弛緩反応と比較検討した。

3) 培養平滑筋細胞内収縮関連・細胞骨格蛋白質の測定

培養平滑筋細胞にオキシヘモグロビン添加後、37°Cで2・4・6日培養を継続し、おのおの2・4・6日目の細胞内収縮関連蛋白質(α-actin, actin, myosin)ならびに細胞骨格蛋白質(desmin, vimentin)をウェスタンブロッティングにて抽出分離し、デントメーターにてその変化を測定した。これらの測定値とオキシヘモグロビンを添加せずに、37°Cで2・4・6日培養を継続し、2・4・6日目に同様の手技で、細胞内収縮関連・細胞骨格蛋白質を測定したものの値とを、比較検討した。

4) オキシヘモグロビン存在下における薬剤付加による培養平滑筋細胞内収縮関連・細胞骨格蛋白質の測定

培養平滑筋細胞にオキシヘモグロビンを添加するとともにsuperoxide dismutase (以下SOD) ならびに

deferoxamineを付加した後、37°Cで2日培養を継続し、2日目の細胞内収縮関連蛋白質 (α -actin, actin) ならびに細胞骨格蛋白質 (vimentin) をウェスタンブロッティングにて抽出分離し、デンシトメーターにてその変化を測定した。これらの測定値とオキシヘモグロビン単独添加後、37°Cで2日培養を継続し、2日目に同様の手技で、細胞内収縮関連・細胞骨格蛋白質を測定したものの値とを、比較検討した。

結 果

1) オキシヘモグロビンの添加により平滑筋細胞内Ca²⁺濃度が上昇した。細胞内Ca²⁺濃度の上昇は平滑筋細胞において収縮を示すシグナルであることより、オキシヘモグロビンは脳血管由来の平滑筋細胞に対して収縮刺激作用があるものと考えられた。

2) オキシヘモグロビンの添加により培養平滑筋細胞は、緩徐ではあるが持続的かつ長時間の収縮を示した。また、この収縮は細胞外Ca²⁺を除去することで抑制できたことより、オキシヘモグロビンによる培養平滑筋細胞の収縮は細胞外Ca²⁺がトリガーになっているものと考えられた。一方、オキシヘモグロビンとともに長期間(48時間以上)培養を継続すると平滑筋細胞の収縮力は失われるため、長期間のオキシヘモグロビンの持続的接触は平滑筋細胞に機能的障害をもたらすものと考えられた。

3) オキシヘモグロビン添加処置群の培養平滑筋細胞の細胞内収縮関連蛋白質 (α -actin, actin, myosin) ならびに細胞骨格蛋白質 (desmin, vimentin) は、2・4・6日と培養時間が長くなるにしたがって減少した。一方、対照群(非添加処置群)においては、培養時間による細胞内収縮関連・細胞骨格蛋白質の変化は認めなかった。両群において統計学的有意差がみられた ($p < 0.01$)。

4) オキシヘモグロビン添加培養2日目における細胞内収縮関連蛋白質 (α -actin, actin) ならびに細胞骨格蛋白質 (vimentin) の減少は、SODの同時付加により容量依存性に抑制された。オキシヘモグロビン単独添加群とSOD同時付加群の間で統計学的有意差がみられた ($p < 0.01$)。このことより、オキシヘモグロビンによる細胞内収縮関連・細胞骨格蛋白質に対する障害作用はフリーラジカルが関与しているものと考えられた。

一方、deferoxamine付加群においてはオキシヘモグロビンによる収縮関連・細胞骨格蛋白質の減少は、抑制しえなかった。このことより、3価の鉄のキレート剤であるdeferoxamineは細胞内蛋白質に対するオキシヘモグロビンの障害作用に対して無効であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 深澤誠司は、くも膜下出血後の脳血管攣縮発生機序を解明するため、ブタ脳底動脈中膜平滑筋細胞を用いオキシヘモグロビン添加により細胞内Ca²⁺濃度が上昇すること、平滑筋細胞の収縮、弛緩を測定するモデルを作成しオキシヘモグロビン添加により平滑筋細胞が収縮すること、細胞内収縮関連蛋白質ならびに細胞骨格蛋白質がオキシヘモグロビンの添加により経時的に減少することを明らかにした。本研究の成果は脳神経外科学、特に脳血管障害治療の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

脳血管攣縮に関する実験的研究

オキシヘモグロビンの培養平滑筋細胞に対する作用

平成7年11月発行 岐阜大医紀43(6) : 692~711