







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第638号	氏名	鬼木 崇裕
審査委員会委員	主査氏名	小野 克重	
	副査氏名	宮本 伸二	
	副査氏名	田中 遼大	
論文題目			
<p>Hyponatraemia aggravates cardiac susceptibility to ischaemia/ reperfusion injury          (低ナトリウム血症は虚血再灌流障害における心筋への影響を悪化させる)</p>			
論文掲載雑誌名			
International Journal of Experimental Pathology			
論文要旨			
<p>低ナトリウム血症は慢性心不全患者で認められる電解質異常であり、心疾患に影響する因子と考えられている。その原因はまだ十分に解明されていないが、低ナトリウム状態における細胞内カルシウム濃度の上昇や活性酸素種の増加が関連すると考えられている。そこで今回の研究では培養心筋細胞と動物モデルを用いてその検討を行った。また、この結果を基にして低ナトリウム状態に曝露された心筋に虚血再灌流障害が起こった時の影響について検討を行った。新生仔ラットの心筋細胞を用いた実験では、ナトリウム濃度を 110, 120, 130 mEq/L (低ナトリウム濃度群), 140 mEq/L (正常ナトリウム濃度群) にそれぞれ調整した DMEM 培地を用いて 72 時間培養を行った。負荷後の細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の変化について検討した。また、酸化ストレスに対する心筋細胞の脆弱性については過酸化水素を添加し評価した。動物モデルを用いた実験では、8 週齢の Sprague Dawley ラットにフロセミドまたは低ナトリウム飼料、その両方をそれぞれ 6 週間投与し、低ナトリウム状態モデル(低ナトリウム群)を作製した。負荷後心筋を取り出し、細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の変化について検討した。形態学的変化を観察するために透過型電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの観察を行った。虚血再灌流後の心筋への影響については、灌流装置を用いて摘出心を一時的に虚血状態とする方法で経時的に左室内圧を測定し、虚血再灌流後の梗塞領域を評価するため灌流後の心臓に TTC 染色を行った。心筋細胞を用いた実験では、低ナトリウム濃度群を正常ナトリウム濃度群と比較したところ、細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の有意な上昇を認めた。過酸化水素による酸化ストレスを心筋細胞に負荷したところ、低ナトリウム濃度群においてより細胞障害を認める結果が得られた。また、動物モデルにおいても心筋細胞を用いた時と同様に細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の有意な上昇を認めた。透過型電子顕微鏡で観察したところ、低ナトリウムモデル群においてミトコンドリアの膨化とクリステの破壊像を認めた。灌流装置を用いた実験では、低ナトリウムモデル群において虚血再灌流後の左室内圧がより低下しており、心筋梗塞領域の有意な拡大を認めた。低ナトリウム状態に曝露されることにより虚血再灌流後の心筋障害の増悪が認められた。これは、低ナトリウム状態で引き起こされるナトリウムカルシウム交換系(NCX)の reverse mode の働きやリン酸化 CaMK-II の増加から起こる細胞内カルシウムの過負荷と活性酸素種の増加による影響が考えられた。</p>			
<p>本研究は、低ナトリウム血症による虚血再灌流後の心筋障害の悪化の原因として細胞内カルシウムの過負荷と活性酸素種の増加による影響を示す意義ある研究であり、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものであると判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第638号	氏名	鬼木 崇裕
審査委員会委員	主査氏名	小野 克重	
	副査氏名	宮本 伸二	
	副査氏名	田中 遼大	
<p>1. Furosemide大量投与にもかかわらず電解質の変化が少ないのはラットのfurosemideに対する感受性が低いということか答えよ。</p> <p>2. これだけの利尿剤を投与されてかなりの脱水になるはずだが、実際の飲料水はどのくらいであったか答えよ。</p> <p>3. Image Jとはどのようなソフトであるのか。また計測は測定者のバイアスのかからない自動読み取りであるのか答えよ。</p> <p>4. ランゲンドルフ実験で低ナトリウム血症であったものが急に正常な細胞外液と接したわけでそれによる影響はどのようなものであったか答えよ。</p> <p>5. 実際は低ナトリウム血症の血液が灌流しているわけであるから、臨牀をそのまま再現したモデルとはいえないのではないかという点を考察せよ。</p> <p>6. ミトコンドリアの形態変化はすべてカルシウム過負荷によるものであるのか答えよ。</p> <p>7. 低ナトリウム血症のIn vitroモデルとIn vivoモデルでは浸透圧補正で差がみられるか否か答えよ。</p> <p>8. 低ナトリウム血症モデルラットの作成にNa-Cl阻害薬ではなくNa-K-2Cl阻害薬を用いた理由は何か答えよ。</p> <p>9. 心筋細胞内カルシウム濃度が極端に高いにもかかわらず、低ナトリウム血症ラットの血圧が正常ラットの血圧より低い理由を考察せよ。</p> <p>10. 心筋細胞内カルシウム濃度が極端に高いにもかかわらず、低ナトリウム血症ラット心のラットランゲンドルフ灌流下での左室収縮張力に差がみられない理由に関して考察せよ。</p> <p>11. 低ナトリウム血症ラットの血圧は正常ラットに比べ有意に低いにもかかわらず心拍数は差がみられない理由を圧受容器反射の作動に関連して考察せよ。</p> <p>12. 一概に活性酸素種といっても、スーパーオキシドやヒドロキシラジカルなど多くの種類がある。細胞実験のCM-H2DCFDAでモニタリングできるのはラジカルのうちどういったものか。それともMDAのように活性酸素種が反応して生成した物質を検出しているのか答えよ。</p> <p>13. 動物モデルでフロセミドの投与量が一日当たり100mg/kgとなっているが、単純にヒトの体重を50kgで計算すると5gに相当する。パイオアベイラビリティに種差があるかもしれないため、そのまま当てはめるべきではないかもしれないが、この投与量の妥当性について説明せよ。</p> <p>14. 論文中の図3で、低ナトリウムの状態で活性酸素種が追加されると、正常のナトリウム濃度と比較して細胞障害性が有意に強まっている。しかし、低ナトリウム状態そのものではROSは産生するが、細胞障害までは生じていない。このデータからでは低ナトリウム血症そのものによって増加したROSは細胞障害を引き起こさないということになるが、この点に関する考えを説明せよ。</p> <p>15. 論文中の図3のIn vitroの実験系で、低ナトリウムの状態そのものは細胞障害までは誘発していない。しかし、In vivoの実験系の図6では、低ナトリウム血症群でミトコンドリアクリステの傷害まで誘発されている。In vivoの実験系では、低ナトリウム状態が心筋細胞以外の細胞を刺激することで血中の酸化ストレスレベルが上昇し、それに伴いミトコンドリアクリステの傷害まで引き起こされた可能性は考えられないか考察せよ。</p> <p style="text-align: center;">これらの質疑に対し、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 鬼木 崇裕

## 論 文 題 目

Hyponatraemia aggravates cardiac susceptibility to ischaemia/ reperfusion injury

(低ナトリウム血症は虚血再灌流障害における心筋への影響を悪化させる)

## 要 旨

緒言(目的):

低ナトリウム血症は慢性心不全患者で認められる電解質異常であり、心疾患に影響する因子と考えられている。その原因はまだ十分に解明されていないが、低ナトリウム状態における細胞内カルシウム濃度の上昇や活性酸素種の増加が関連すると考えられている。そこで今回の研究では培養心筋細胞と動物モデルを用いてその検討を行った。また、この結果を基にして低ナトリウム状態に曝露された心筋に虚血再灌流障害が起こった時の影響について検討を行った。

方 法:

新生仔ラットの心筋細胞を用いた実験では、ナトリウム濃度を 110, 120, 130 mEq/L (低ナトリウム濃度群), 140 mEq/L (正常ナトリウム濃度群)にそれぞれ調整した DMEM 培地を用いて 72 時間培養を行った。負荷後の細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の変化について検討した。また、酸化ストレスに対する心筋細胞の脆弱性については過酸化水素を添加し評価した。動物モデルを用いた実験では、8 週齢の

Sprague Dawley ラットにフロセミドまたは低ナトリウム飼料、その両方をそれぞれ 6 週間投与し、低ナトリウム状態モデル(低ナトリウム群)を作製した。負荷後心筋を取り出し、細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の変化について検討した。形態学的変化を観察するために透過型電子顕微鏡を用いてミトコンドリアの観察を行った。虚血再灌流後の心筋への影響については、灌流装置を用いて摘出心を一時的に虚血状態とする方法で経時的に左室内圧を測定し、虚血再灌流後の梗塞領域を評価するため灌流後の心臓に TTC 染色を行った。

結 果：

心筋細胞を用いた実験では、低ナトリウム濃度群を正常ナトリウム濃度群と比較したところ、細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の有意な上昇を認めた。過酸化水素による酸化ストレスを心筋細胞に負荷したところ、低ナトリウム濃度群においてより細胞障害を認める結果が得られた。また、動物モデルにおいても心筋細胞を用いた時と同様に細胞内カルシウム濃度と活性酸素種の有意な上昇を認めた。透過型電子顕微鏡で観察したところ、低ナトリウムモデル群においてミトコンドリアの膨化とクリステの破壊像を認めた。灌流装置を用いた実験では、低ナトリウムモデル群において虚血再灌流後の左室内圧がより低下しており、心筋梗塞領域の有意な拡大を認めた。

考 察：

低ナトリウム状態に曝露されることにより虚血再灌流後の心筋障害の増悪が認められた。これは、低ナトリウム状態で引き起こされるナトリウムカルシウム交換系(NCX)の reverse mode の働きやリン酸化 CaMK-II の増加から起こる細胞内カルシウムの過負荷と活性酸素種の増加による影響が考えられた。

結 語(まとめ)：

低ナトリウム血症により虚血再灌流後の心筋障害はより悪化しており、その原因として細胞内カルシウムの過負荷と活性酸素種の増加による影響が考えられた。