

論 文 要 旨

Taurine at early reperfusion significantly reduces myocardial damage and preserves cardiac function in the isolated rat heart.

〔ラット摘出灌流心における虚血再灌流障害において再灌流早期のタウリン投与は心筋障害を減弱し，心機能を温存する。〕

上野 隆幸

【序論および目的】

心筋内で全遊離アミノ酸の約 50%を占めている Taurine (TA)は心筋保護薬として近年注目されており，calcium overload から心筋組織を保護すること，低酸素負荷後の再酸素化に伴う free radical 発生による心筋障害の軽減であると報告されている。TA の至適投与時期の十分な検討が単一実験モデルではなされていないため，本研究では虚血再灌流実験モデルにおいて，TA よる心筋保護効果のメカニズムとその至適投与時期に関して検討した。

【材料および方法】

ラット摘出心灌流モデルを用い，20 分の単純虚血後再灌流 60 分 (GI; n=8)，虚血前 10 分間の 10 mM TA 投与後 20 分の単純虚血後再灌流 60 分 (Pre-TA; n=8)，20 分の単純虚血後再灌流 10 分間の 10 mM TA 投与，再灌流 50 分 (Post-TA; n=8)の 3 群に分けた。心機能評価は虚血前，再灌流 60 分後に Left ventricular developed pressure (LVDP)，Rate pressure product (RPP)，Maximum positive or negative first derivative of left ventricular pressure ($\pm dP/dt \max$)を測定し，虚血前に対する回復率 (%)で表示した。心筋障害として全冠灌流流出中の CK 漏出量 (IU/g dry wt)を，酸化ストレスとして LPO 漏出量 (nmol/g dry wt)を再灌流 60 分後に測定した。終了後は 10% Evans blue で area at risk (AAR)，1% TTC で infarct size (IS)を決定し，IS/AAR (%)で表示した。各群間は one-way ANOVA with Scheffe's test で解析し， $P < .05$ を有意差ありとした。

【結 果】

各群の虚血前の心機能に有意差はなかった。LVDP, RPP, $\pm dP/dt \max$ 回復率では Post-TA は GI に比べ有意に改善した。さらに LVDP, RPP 回復率では Post-TA は Pre-TA に比べ有意に改善した。CK 漏出量では Post-TA は GI に比べ有意に減少した。LPO 漏出量では Pre, Post-TA とともに GI に比べ有意に減少し，特に Post-TA が酸化ストレスの軽減に有効であった。IS/AAR では Pre-TA, Post-TA は GI に比べ有意に減少したが，Pre-TA と Post-TA 間では有意差はなかった。

【結論及び考察】

TA は再灌流初期投与で特に強い心筋保護効果があり，その効果の一つの機序として TA の抗酸化作用が示唆された。

(Resuscitation Vol.73, No.1 2007 年掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1445 号	氏名	上野隆幸
審査委員	主査	鄭 忠和	
	副査	亀山正樹	宮田篤郎

Taurine at early reperfusion significantly reduces myocardial damage and preserves cardiac function in the isolated rat heart.

〔ラット摘出灌流心における虚血再灌流障害において再灌流早期のタウリン投与は心筋障害を減弱し、心機能を温存する。〕

今日の心臓血管外科の進歩は、体外循環の発展と心筋保護の進歩によると言っても過言ではない。特に、開心術中の心筋保護は近年、飛躍的に向上したが、今日でも虚血再灌流による心筋の質的異常、いわゆる虚血再灌流障害を免れることは不可能である。その問題を解決すべく薬物投与による付加的な心筋保護は、虚血再灌流障害を更に軽減させるために常に重要な意義を有する。近年はタウリンの心筋保護作用が注目されている。タウリンが虚血障害を予防するならタウリンは虚血前投与が有効であろう、再灌流障害を予防するなら、タウリンは再灌流初期投与が有効であろうと推察される。しかし、この点に関して検討した報告は無い。今回、虚血再灌流心モデルにおいて、タウリンの心筋保護作用のメカニズムとその至適投与時期に関して検討した。

ラット摘出心灌流モデルを用い、20分の単純虚血後再灌流 60分 (n=8)、虚血前 10分間の 10 mM タウリン投与後 20分の単純虚血後再灌流 60分 (n=8)、20分の単純虚血後再灌流初期 10分間の 10 mM タウリン投与、再灌流 50分 (n=8)の 3群に分けた。心収縮力は虚血前、再灌流 60分後に測定し、虚血前に対する回復率 (%)で評価した。心筋障害の指標として全冠灌流液中の Creatine kinase (CK) 漏出量を、酸化ストレスの指標として Lipid peroxide (LPO) 漏出量を再灌流 60分後に測定した。終了後は組織染色を行い、左室領域; Left ventricular area (LV area)、虚血領域; Area at risk (AAR)、梗塞領域; Infarct size (IS)を決定し、AAR/LV area (%), IS/AAR (%)で評価した。

本研究で得られた知見は以下の通りである。

- 1) 心収縮力回復率ではタウリン再灌流初期投与群は単純虚血群およびタウリン虚血前投与群に比べ有意に回復した。
- 2) CK 漏出量ではタウリン再灌流初期投与は単純虚血群に比べ有意に減少した。LPO 漏出量ではタウリン再灌流初期投与群は単純虚血群およびタウリン虚血前投与群に比べ有意に減少し、タウリン再灌流初期投与群が特に酸化ストレスの軽減に有効であった。
- 3) タウリン再灌流初期投与群において組織染色からも虚血領域、梗塞領域が単純虚血群やタウリン虚血前投与群に比べて抑制された。

本研究はラット摘出心虚血再灌流モデルを用いてタウリンの心筋保護作用のメカニズムとその至適投与時期を観察し、タウリンは再灌流初期投与で再灌流障害過程に発生する酸素フリーラジカルを抑制して心筋保護作用を示すという臨床上有益な知見を提供した。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1445 号	氏名	上野隆幸
審査委員	主査	鄭 忠和	
	副査	亀山正樹	宮田篤郎
<p>主査および副査の3名は、平成19年9月27日、学位請求者 上野隆幸 氏に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p>			
<p>質問1) タウリンの生理的濃度は文献的には6-35mMと報告されているが、タウリンの細胞内局在について何か分かっているのか。</p> <p>(回答) 哺乳動物の種差によってタウリンの生理的濃度には6~35 mMと幅があります。今回実験で使用したラットのタウリン心筋内組織濃度は23 mM、血漿中濃度は230 μMで [Tau] i/ [Tau] o=100、ヒトのタウリン心筋内組織濃度は6.5 mM、血漿中濃度は70 μMで [Tau] i/ [Tau] o=92と報告され、心筋細胞内に高濃度局在しています。細胞内の局在については細胞質 (cytosol) にあると考えられています。</p> <p>質問2) タウリンの輸送タンパクについてはどうか？</p> <p>(回答) タウリンの輸送タンパクについては現在まで明らかではありませんが、タウリンとNa⁺イオンとの共同輸送系(Na/taurine cotransport system)が報告されており、タウリンは細胞内外のNa⁺イオンの濃度較差で共同輸送されると報告されています。</p> <p>質問3) タウリンはシステインから生成されているが、タウリンはシステインとして取り込まれて、細胞内でタウリンが生成される可能性もあるのか。</p> <p>(回答) タンパク質の構成成分で含硫アミノ酸であるシステインからシステインオキシダーゼによりシステインスルフィン酸が合成されます。このシステインスルフィン酸がシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼにより脱炭酸され、ハイポタウリンとなります。さらにこのハイポタウリンが酸化されて、タウリンが合成されます。ヒトはこの合成経路の両酵素をもつため、システイン含有タンパク質を摂取していれば、タウリンの形での積極的摂取は不要であります。この合成経路は種差はありますが、一般的に肝臓と脳内で発見されています。哺乳動物の心臓ではシステインスルフィン酸デカルボキシラーゼが存在しないことが報告されていることから、心筋細胞内でシステインとして取り込まれてタウリンが合成される経路は存在しないと考えます。</p> <p>質問4) タウリンはシステインを酸化することで生成されるわけであるが、そのタウリンがなぜ脂質の過酸化を防ぐのか。</p> <p>(回答) タウリンの持つスルホン酸基 (HO₃S-) が再灌流で発生したヒドロキシラジカル (・OH)と化学反応したと推測されます。</p> <p>質問5) タウリンの濃度について本論文では1, 5, 10, 20 mMと予備実験で検討した結果、その効果は10 mMが最適で、逆に20 mMの時は10 mMに比べて効果が低かった理由はなぜか。</p> <p>(回答) タウリンとCa²⁺イオンとの相互作用が報告されており、心収縮力に対するタウリンの効果は細胞内または外のCa²⁺濃度が高い場合は抑制的に、逆に低い場合は促進的にと、その効果が逆転します。さらに1996年 Arizona 大学 Ryan J. Huxtable が行ったタウリン濃度(0, 4, 20 mM)とCa²⁺濃度との関係から心収縮力を観た実験でCa²⁺濃度が1.8 mM以下であれば、タウリンは濃度依存性に心収縮力を増強させたが、Ca²⁺濃度が1.8 mM以上であれば、高濃度タウリン(20 mM)は心収縮力をむしろ低下させたとの報告があります。今回使用したKHB灌流液中のCa²⁺濃度は2.5 mMで、タウリン1, 5, 10, 20 mMと予備実験で検討した結果、その効果は10 mMが最適であり、逆に20 mMの時は10 mMに比べて効果が低かったと考えます。</p> <p>質問6) 実験中虚血再灌流障害の程度を時間的変化で調べていればもっとよかったと思われるが。</p> <p>(回答) タウリン再灌流初期投与群では再灌流開始10分間はタウリンを投与しましたので、各群すべて再灌流開始後10分で一度、心機能評価、生化学的パラメーターを測定しました。その結果は再灌流60分後とほぼ同じ結果で、同様の有意差がありました。</p> <p>質問7) 実験中に不整脈は発生しなかったか。</p> <p>(回答) 摘出心を動脈カニューラに固定し、灌流直後が最も不整脈(心室性期外収縮)が発生しました。しかし、20分間の安定期間をおきますと、各群すべて不整脈もほぼ消失し、安定した状態で実験が開始できました。</p>			

質問 8) タウリンの半減期はどのぐらいか。

(回答) タウリンの半減期はタウリンの外的投与(薬物投与, 食事摂取)の影響を受け, 半減期には幅があります。すなわち, タウリン過剰な状態ではタウリンの排出は促進され, タウリン欠乏時にはタウリンの排出は著明に抑制され, 高濃度を維持しようとし, ラットの実験でタウリンの半減期は3~24日との報告があり, さらに極端にタウリン投与を抑制すると, その半減期は220日まで延びたとの報告もあります。

質問 9) 今回の実験では3群ともすべて虚血を加えているが, 虚血なしでタウリンを投与した場合はどのぐらいの改善が得られるのか, intactと比較して何%ぐらい改善したのか。

(回答) 今回の本実験, 予備実験も含めて虚血なしでタウリン投与と非投与を比べていないため, その改善程度がどのぐらいであったのか不明であります。

質問 10) 今回はラット摘出心で検討されたが, ラットの心筋梗塞モデルでもタウリンの保護効果は期待できるか。

(回答) 今回の実験結果からラット摘出心における全虚血モデルでタウリンは心筋保護効果を示しましたので, in vivoでのラットの心筋梗塞モデルでもその効果は充分期待できると考えます。しかし, in vivoでのラットの心筋梗塞モデル作成には現在その技術がないため, ブタを使用した大動物実験でin vivoの心筋梗塞モデルを作成し, タウリンの保護効果を調べることは可能と思われます。in vivoでのラットの心筋梗塞モデル作成は今後の課題と考えます。

質問 11) タウリンを人に応用することができるか。

(回答) タウリンの内服薬はすでに臨床応用されており, 効能書にはその内服量は1日3g内服とあります。臨床データで慢性うっ血性心不全患者にタウリン100mg/kg/day連日長期投与した場合, 非投与群に比べて累積生存率を有意に改善したという報告があります。今回の実験では急性期の虚血再灌流障害におけるタウリンの心筋保護効果を観察し, 再灌流初期投与が最も有効でした。これを臨床応用すれば開心術中の大動脈遮断解除時の投与になりますが, タウリンの注射剤が現在ないため今後の課題だと考えます。

質問 10) 実際に臨床でタウリンを応用するとすれば, この実験結果からタウリンの投与をどの時点ですれば良いと考えるか。

(回答) この実験結果から臨床応用すれば, 開心術中の大動脈遮断解除時の投与になります。タウリンの注射剤が現在ないため, 今後の課題だと考えます。また, タウリン虚血前投与もコントロール群に比べてある程度有効であったことを考えますと, 外科の立場からは開心術待機前の患者にタウリン内服を行っていくことも有効であると考えます。実際, すでに同様のことを行って検討した報告もあり, 術前のタウリン内服は有効であったことが確認されています。

質問 11) 今回の実験でタウリンの有効な作用は抗酸化作用であると結論づけているが, 抗酸化薬としてタウリン以外のその他の薬はどうか。

(回答) 本実験は摘出灌流心モデルのため, 好中球の関与がありません。近年は虚血再灌流時のフリーラジカルの発生は好中球がその主体であると言われており, 好中球エラスターゼ阻害剤シベレスタット(エラスポール[®])もフリーラジカスカベンジャー作用があり, タウリンと同様の効果が期待されます。

質問 12) タウリンの機序としてコントロール群と比較して, タウリン虚血前投与も有効であったことを考えると, 再灌流障害を軽減するだけでなく, 虚血障害も軽減する可能性はないのか。

(回答) 今回の実験ではタウリンの抗酸化作用が示され, 再灌流障害を軽減することが解明されましたが, タウリン虚血前投与もコントロール群に比べて有効であったことを考えますと, 虚血障害も軽減していることが推測されます。心臓ではありませんが, 肝臓の虚血再灌流モデルにおいてタウリンが肝細胞内のATP低下を有意に抑制したという実験結果もあり, この結果から虚血障害を軽減していることが分かります。心臓でも同様のことが起きている可能性が推測されます。

質問 13) 20年程前に拡張型心筋症の治療でタウリンは一時脚光を浴びたが, 現在はあまり使われなくなった。今回の実験結果から拡張型心筋症に限らず, その他の心不全疾患を含めてタウリンはまたもう一度期待されると考えているか。

(回答) 今回の実験結果からタウリンの心筋保護効果が改めて確認されましたので, 拡張型心筋症に限らず, その他の心不全疾患も含めてタウリンの臨床応用を再検討していくべきと考えます。

質問 14) 心筋虚血の場合, hibernationとかstunningとか言われている。hibernatingな状態の時というのはこの虚血再灌流障害に対してはその病態は保護的に働くと言われているが, その場合の機序とタウリンの効果の機序は相通するものであるのか, 異なるものであるのか, Speculationでもいいが。

(回答) この実験結果および現在の知見からhibernationが虚血再灌流障害に対して保護的に働く機序とタウリンの効果の機序が相通するものか否かは不明であると考えます。

質問 15) 急性心筋梗塞における虚血再灌流障害に関して臨床的に短期・長期予後については再灌流障害の有無で有意差があるとは言われていない。開心術中の心筋保護という外科的立場ではなくて, 内科的立場からタウリンの有効性はどうか。

(回答) 急性心筋梗塞において内科的治療であるPCI後の再疎通に伴う再灌流障害は今回の実験と類似した病態と考えられますので, 再灌流時のタウリン投与は内科的立場からみても有効ではないかと考えます。

以上の結果から, 3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等の学力と見識を具備しているものと判断し, 博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。