

# 学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 病態解明医学講座 腫瘍集学治療学	氏 名	堀 和一郎
-----	--	-----	-------

## 主論文の題名

Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb

## 主論文の要旨

虚血・再灌流障害(I/R injury)とは、虚血組織に急激な血流再開が起こった際に炎症と酸素負荷が加わることで生じる障害である。四肢骨格筋においても挫滅症候群、コンパートメント症候群、ターニケット障害、遊離筋肉移植などで引き起こされる。局所損傷増大、全身合併症を引き起こすこともあるが、本病態に対する有効な治療手段は未だない。骨格筋 I/R injury の病態は、まず虚血により組織への血流が途絶えると、嫌氣的代謝やフリーラジカルが組織に蓄積し、再灌流によりこれらの蓄積した代謝物やフリーラジカルが放出されることで、酸化ストレスが惹起されると共にサイトカイン放出や接着因子活性化が起き白血球浸潤による組織障害が起こる。フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン(ラジカット®)は、既に神経内科、脳神経外科領域にて 2001 年より臨床応用されており、有用性が確認されている。フリーラジカルに電子を供与することで、フリーラジカルを消失し無害化すると考えられている。脳血管障害における再灌流障害の軽減や脳細胞の保護効果の他、肝臓など他臓器における I/R injury に対しても有用性が報告されている。

本研究の目的は、駆血マウスの骨格筋 を用いて 1)エダラボンによるフリーラジカル除去効果を組織学的に評価すること、2)脂質酸化損傷マーカーである MDA (Malondialdehyde)、酸化ストレス関連マーカーである iNOS(Inducible nitric oxide synthase)を用いて生化学的評価をすることで、エダラボンの I/R injury に対する有用性を検討する事である。

モデルは、C57/BL6 マウス(8-10 週齢、オス)、22-28g、n=40 匹を用いた。ペントバルビタール(50mg/kg)を腹腔内投与して麻酔し、駆血 30 分前にエダラボン(3mg/kg)または同量の生理食塩水を腹腔内投与した。駆血には、2007 年 Crawford にて報告された歯科矯正用輪ゴムを使用した。エダラボン投与群を I/R+Ed 群、生食投与群を I/R 群とし、右大腿部を 1.5 時間駆血し、再灌流後 1 日および 3 日の評価を行った。腓腹筋(GC)、前脛骨筋(TA)を採取し、組織学のおよび生化学的評価を行った。組織学的検討はパラフォームで固定後にパラフィン切片を作成し、HE 染色の短軸像で評価した。組織学的評価は、組織破壊と炎症を 0-3 段階に分けて合計で評価した。筋損傷に関し

では、McCormack の報告に従い筋損傷率を全筋線維数分の損傷線維として算出した。生化学的評価には、MDA 定量と iNOS のウェスタンブロッティング法を行った。MDA は、脂質の過酸化分解生成物の一つで細胞膜の構成成分である脂質過酸化の主要なマーカーであり、フリーラジカルによる細胞障害マーカーとして用いられることが多く、TBARS 法にて定量した。iNOS は、NO 合成酵素一つで他の合成酵素とは異なる炎症などの刺激でマクロファージが産生する誘導型の合成酵素であるが、ウェスタンブロッティング法で評価した。

再灌流 3 日目の腓腹筋 HE 染色は、I/R 群では著明な炎症細胞浸潤を認め、IR+Ed 群では組織間隙浮腫所見を認めたが軽度の炎症細胞浸潤が一部に認められるのみであった。組織学的評価の結果は、I/R 群では GC  $5.55 \pm 0.501$ 、TA  $4.92 \pm 0.853$  に対し、I/R+Ed 群は GC  $2.31 \pm 0.569$ 、TA  $2.22 \pm 0.465$  と低下していた。筋損傷率評価の結果は、再灌流 1 日目で I/R 群の GC 33.4% (363/1085)、TA 20.9% (193/923) に対して、I/R+Ed 群では GC 11.1% (116/1051)、TA 9.1% (83/903) と有意に低下を認めた。また、再灌流 3 日目でも、I/R+Ed 群では GC 7.9% (93/1178)、TA 6.5% (62/957) であり、I/R 群の GC 33.7% (394/1179)、TA 19.7% (192/947) に対して有意に低下していた。これらの結果は、エダラボンが I/R injury の筋保護効果を有する可能性について示唆している。再灌流 1 日目の MDA 定量の結果は、GC では I/R+Ed 群は I/R 群に比較して統計学的有意差を認めないものの、低い傾向にあった。TA においては I/R+Ed 群は I/R 群の結果より有意に低値であった。ウェスタンブロッティング法での iNOS 発現は、I/R+Ed 群は I/R 群より抑制されていた。

以上本研究において、エダラボン投与により筋損傷率は有意に軽減し細胞膜脂質過酸化障害と炎症細胞浸潤が低下したことから、エダラボンは骨格筋 I/R injury に対しても有用である可能性が示唆された。本研究は、駆血マウスを用いて骨格筋 I/R injury に対するエダラボンの有用性を認めた希少な研究である。