

SHR 肥大心における細胞膜透過性亢進と脂質過酸化

鳥井 幹 則 伊 藤 浩 行 鈴 木 庸 之

近畿大学医学部第1病理学教室

Increasing of sarcolemmal permeability by lipid peroxidation in hypertrophied SHR myocardium

Mikinori Torii, Hiroyuki Itoh and Tsuneyuki Suzuki

First Department of Pathology, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

To elucidate the membrane abnormality in hypertrophied SHR myocardium, the sarcolemmal permeability was morphologically examined using horseradish peroxidase (HRP). Doxorubicin was administered to 16-week-old male SHR and age-matched WKY and hearts were examined at the 1st and the 4th day after the administration. In SHR myocardium, HRP were found in the papillary muscle and a part of the subendocardial myocytes on the 1st day, and recognized in many myocytes throughout the entire left ventricular wall on the 4th day. Electron microscopic examination revealed that HRP were located in 1-, t-tubes or intercalated disc. Moreover, abundant HRP were also seen along with myofilaments in markedly degenerated myocytes. However, few HRP were seen in either controls or treated WKY myocardium on either light or electron microscopy.

These findings clearly demonstrate the marked increase in membrane permeability in SHR myocardium at the early stage of membrane change in doxorubicin cardiomyopathy and supports our previous biochemical studies on the membrane vulnerability of SHR heart which may be caused by lipid peroxidation.

Key words : SHR myocardium, membrane permeability, horseradish peroxidase, doxorubicin

緒 言

これまで、SHR 肥大心における障害易発症性の発生病理を明らかにする目的で、SHR 心筋を生化学的に検索し、心筋細胞の細胞膜の異常とそれに関わる脂質過酸化の重要性について報告してきた¹⁻⁶。

今回、脂質過酸化による細胞膜の障害を形態学的に証明することを目的として、フリーラジ

カルによる障害のメカニズムが既に知られている doxorubicin を投与し、その際の細胞膜透過性を WKY と比較検討した。

材料と方法

16週齢雄 SHR と WKY 合計24例ずつを用いた。0.5%の doxorubicin (DOX) 20 mg/kg (協和発酵) を 5 ml/min の投与速度で1回静脈内に投与し、1および4日後の心筋について

形態学的に検討した。それぞれの対照群には生理食塩水を投与した（生食対照群）。

ネブタール麻酔下に horseradish peroxidase (HRP, type II, Sigma) 10 mg/100g 体重を静脈内に投与し、10分後、大動脈より逆行性にヘパリン添加 Krebs-Henseleit 液 (pH 7.4, 37°C) で灌流した後、Karnovsky 液で心臓を灌流固定した（流速 8.0 ml/min）。心臓中央部横断面の約 7 μ m の薄切切片を作成し、Yunge 等の方法⁸に従って 1% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 液に浸漬し、10分間反応させた。常法に従って、脱水、透徹、封入後顕微鏡で観察した。さらに、左心室自由壁の一部を 1% オスミウム酸で後固定し、エポン包埋後、超薄切片を作成し、鉛染色を行い電顕で観察した。

結果および考察

生食対照群や DOX 投与 WKY では、投与 1 日後でも 4 日後でも、顕微鏡的に HRP はほとんど心筋細胞内に認められなかった (Fig. 1)。これに対して、DOX 投与 SHR では、投与 1 日後には、乳頭筋と心内膜下の一部の心筋細胞内に HRP が認められ、投与 4 日後には、左心

室壁全周に亘り、広範囲に認められた (Fig. 2)。強拡大で詳細に観察すると、HRP の認められる心筋細胞質内には筋原線維が明らかに識別できることより、比較的軽度、あるいは、早期の細胞障害で、すでに透過性が亢進していることが示唆された。電顕的には、投与 1 日後には、SHR でも WKY でも細胞間隙に osmiophilic で細顆粒状の HRP が認められ、SHR では細胞質内にも少量の HRP が見られたが、WKY では全く認められなかった。投与 4 日後の SHR では、縦管、横管および介在板に HRP が認められた (Fig. 3)。障害が高度の心筋細胞では、myofilament に沿って、あるいは、膨化したミトコンドリア内に HRP が認められた (Fig. 3)。一方、WKY では、4 日後においても、細胞内に HRP はほとんど認められなかった (Fig. 4)。

先に、SHR 心筋では DOX 投与 1 および 4 日後、WKY より過酸化脂質 (TBA-RS) が増加することを報告した⁷。今回、脂質過酸化による細胞膜障害を透過性に焦点をあて、トレーサーを用いて形態学的に検索した。その結果、SHR では、心筋細胞内に HRP が認められることから透過性の亢進がみられることを確認す

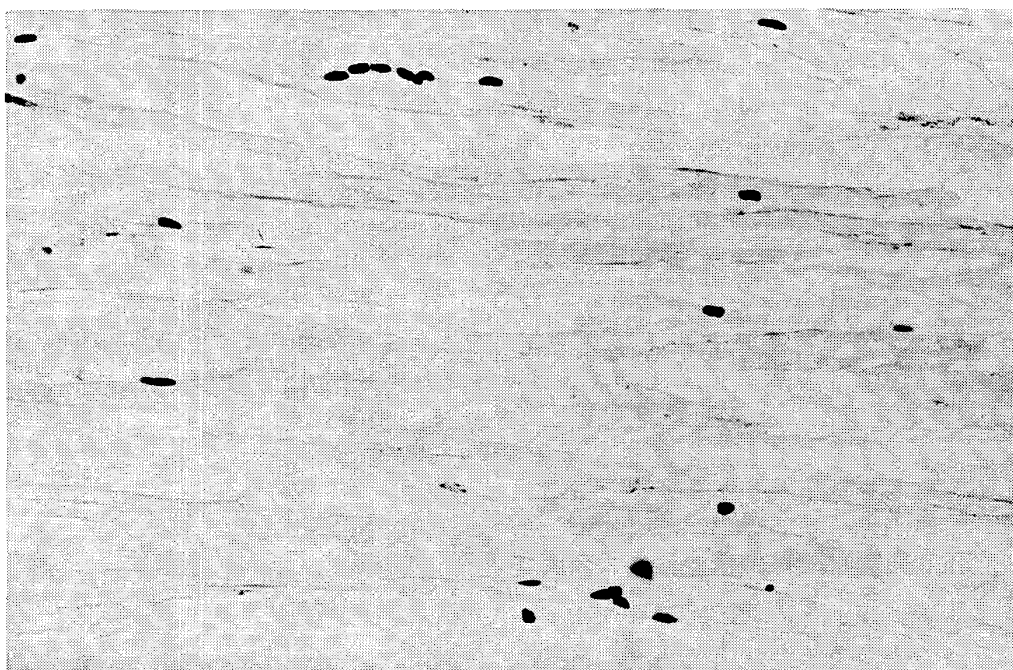


Fig. 1 WKY myocardium on the 4th day. Few HRP are seen in myocytes. ($\times 170$)

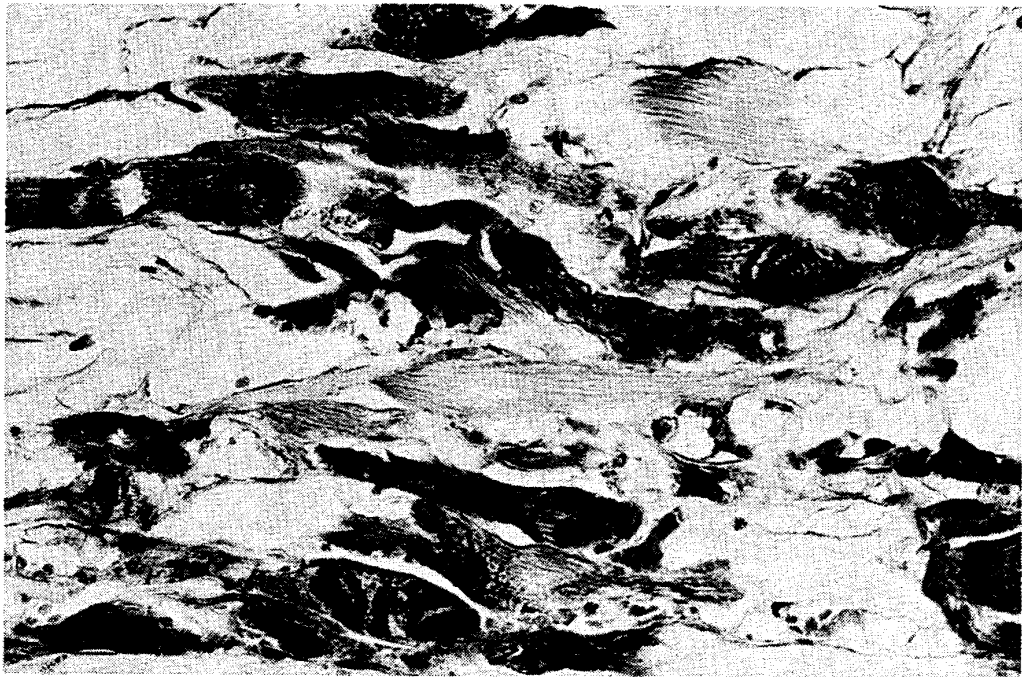


Fig. 2 SHR myocardium on the 4th day. HRP are seen in many myocytes of the left ventricle. ($\times 170$)

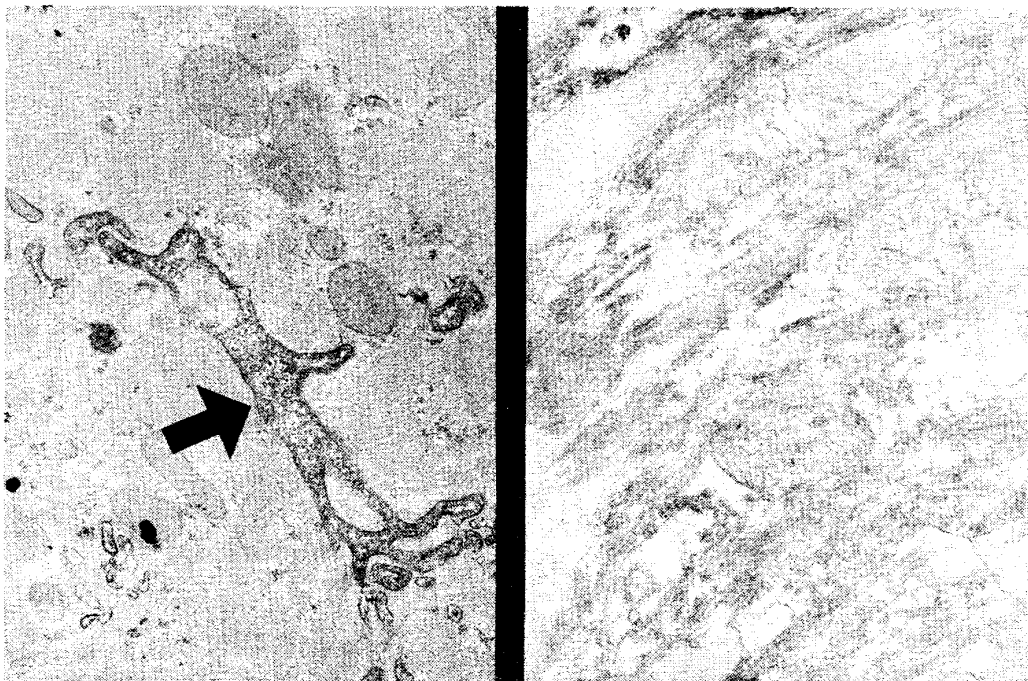


Fig. 3 SHR myocardium on the 4th day (EM picture). Some HRP in 1-tube (left, arrow) and abundant HRP along myofilaments (right) are seen in the left ventricular myocyte. ($\times 12,000$)

ることができた。WKY では、心筋細胞間隙には HRP が認められたが、細胞内にはほとんど認められなかった。これらの所見は、SHR では DOX 投与後早期に細胞膜障害が生じること

を明瞭に示している。

心筋細胞における透過性亢進のメカニズムについて、Yunge 等は、ラットにおけるイソプロテレノール心筋障害モデルを用いて細胞膜障

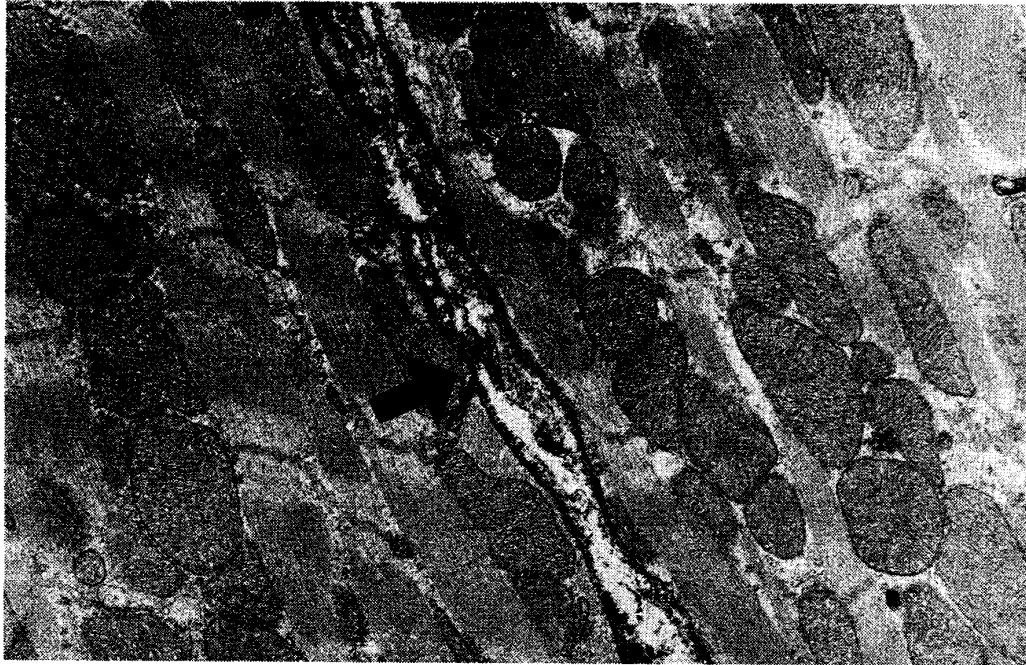


Fig. 4 WKY myocardium on the 4th day (EM picture). Plenty of HRP are seen in extra-cellular space (arrow), but not within cytoplasm in the left ventricular myocyte. ($\times 12,000$)

害を詳細に観察し、凍結切断電顕所見から、膜蛋白の消失と膜における裂隙の出現が透過性亢進に関係することを示唆している⁸。すでに我々は、SHRSP にイソプロテレノールを投与すると WKY に比べより重度の心筋障害が発生することを報告しており⁹、SHR 心筋においても、DOX 投与後早期に膜脂質過酸化に起因した膜の構造変化が生じているものと推察される。

この実験結果は、SHR 肥大心における細胞膜の脆弱性を形態学的に明らかにするもので、これまで我々が示してきた膜異常に関する生化学データを裏づけるものと考えられる。

文 献

1. 伊藤浩行, 鳥井幹則, 鈴木庸之: SHR の肥大心における細胞内小器官の病態. 近畿大医誌 1988; 13 (補冊): 25-28.
2. Torii M, Ito H, Suzuki T. Influence of aging on spontaneously hypertensive rat (SHR) myocardium. Jpn Heart J 1988; 29: 534.
3. Torii M, Ito H, Suzuki T. Morphological and biochemical studies on hypertrophied SHR myocardium mitochondria and plasma membrane. Jpn Heart J 1989; 30: 586.
4. Torii M, Ito H. Some enzyme characteristics of spontaneously hypertensive rat myocardium. Jpn Circ J 1990; 54: 688-694.
5. Torii M, Ito H, Suzuki T. Spontaneously hypertensive rat (SHR) myocardium glutathione peroxidase and membrane-lipid peroxidation. Jpn Heart J 1990; 31: 562.
6. 伊藤浩行, 鳥井幹則, 鈴木庸之: SHR の肥大心における脂質の過酸化と心筋障害. 近畿大医誌 1989; 14 (補冊): 23-27.
7. 鳥井幹則, 伊藤浩行, 鈴木庸之: SHR 肥大心における細胞障害易発症性と脂質過酸化. 近畿大医誌 1990; 15 (補冊): 23-25.
8. Yunge L, Bruneval P, Cokay MS, Berry B, Peters H, Poulsen R, Huttner I. Perturbation of the sarcolemmal membrane in isoproterenol-induced myocardial injury of the rat. Am J Pathol 1989; 134: 171-185.
9. Ito H, Ohta Y. Electrocardiographical and morphological examinations of myocardial changes in SHRSP after injection of isoproterenol. Jpn Heart J 1984; 25: 850.