

氏 名 (本 籍) 黄 瀬 一 慶 (京 都 府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 3 4 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 7 年 9 月 1 4 日

学 位 論 文 題 目 Teratogenic Effects of Bis-diamine on the Developing Cardiac Conduction System  
(Bis-diamine が 刺 激 伝 導 系 の 発 生 に 与 える 影 響)

審 査 委 員

主 査 教 授 松 浦 博

副 査 教 授 陣 内 皓 之 祐

副 査 教 授 大 久 保 岩 男

## 論文内容要旨

*整理番号	338	(ふりがな) 氏名	きせ かずよし 黄瀬 一慶
学位論文題目	Teratogenic Effects of Bis-diamine on the Developing Cardiac Conduction System (Bis-diamine が刺激伝導系の発達に与える影響)		
<p>目的：先天性心疾患にはしばしば不整脈が合併することが知られている。円錐動脈幹奇形も不整脈を伴う心奇形の一つである。筆者らは妊娠ラットに bis-diamine を投与することで、その胎仔に円錐動脈幹奇形を作成し、円錐動脈幹奇形における不整脈の発生機序を解明する目的で、この動物モデルの刺激伝導系の発生について形態学的に検討した。</p> <p>方法：受精後 10.5 日の Wistar 系母ラットに bis-diamine 200mg を経口投与し、受精後 11.5 日から 15.5 日に胎仔を摘出した。胎仔を 2%パラホルムアルデヒドで固定後、ゼラチンあるいはパラフィンで包埋した。ゼラチン包埋した胎仔の標本からは厚さ 25 <math>\mu</math>m の連続切片を作成し、抗 HNK-1 抗体、抗 connexin40 抗体を用いて免疫組織染色を行うとともに、刺激伝導系周囲の TUNEL 陽性細胞の分布についても共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。HNK-1、connexin40 については、抗 HNK-1 抗体、抗 connexin40 抗体を用いて二重染色を行った。TUNEL 陽性細胞については HNK-1 との二重染色を行い、心室中隔の刺激伝導系周囲の単位体積(100 <math>\mu</math>m<math>\times</math>100 <math>\mu</math>m<math>\times</math>100 <math>\mu</math>m)あたりの TUNEL 陽性細胞数を計測し、統計学的に評価した。パラフィン包埋した標本からは厚さ 5 <math>\mu</math>m の連続切片を作成し、抗 connexin43 抗体を用いて免疫組織染色後、光学顕微鏡下に観察した。コントロール群についても同様の操作を行ない、比較検討した。</p> <p>結果：HNK-1 陽性細胞はコントロール群、bis-diamine 投与群とも受精後 11.5 日胚(ED11.5)から心室中隔周辺に認められた。一方、connexin40 陽性細胞は、コントロール群では ED13.5 に心室中隔から肉柱部にかけて His 束と脚に一致して連鎖状に認められたが、bis-diamine 投与群では ED14.5 で同部分に断続的に確認できる程度であった。connexin43 の労作心筋内での発現も ED13.5 の bis-diamine 投与群では、コントロール群に比べ発現が低下していた。またコントロール群の抗 HNK-1 抗体と抗 connexin40 抗体の二重染色では、ED11.5 では HNK-1 陽性細胞はわずかに connexin40 を発現しているのみであったが、ED13.5 では HNK-1 陽性細胞が顕著に connexin40 を発現していた。心室中隔周囲の TUNEL 陽性細胞はコントロール群では ED12.5、bis-diamine 投与群では ED13.5 に最も多く認められた。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

TUNEL 陽性細胞が最も多く発現する時の単位体積あたりの TUNEL 陽性細胞数は bis-diamine 投与群では、コントロール群に比べ有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。またこれらの TUNEL 陽性細胞は HNK-1 陰性であったが、vimentin および alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) は陽性で、myofibroblast に一致した性状を示していた。

**考察:** bis-diamine 投与群において connexin40、connexin43 の発現が低下していたことから bis-diamine はギャップ結合蛋白の発達を阻害することが明らかになったが、これは刺激伝導系に特異的ではなく、bis-diamine が心筋細胞全体の増殖、成長を抑制したことによる二次的な結果と考えられた。一方、HNK-1 の発現において両群間で大きな差を認めなかった。

HNK-1 と connexin40 の二重染色から HNK-1 は刺激伝導系の原基となる細胞に発現していると考えられたが、HNK-1 の発現において両群で差がないことは刺激伝導系の原基が bis-diamine 投与以前に既に完成していることを示唆していると考えられた。つまり、bis-diamine は刺激伝導系の原基の形態形成そのものには影響を及ぼさないと考えられた。また、コントロール群において TUNEL 陽性細胞は、刺激伝導系の原基と考えられる HNK-1 陽性細胞周辺に分布し、myofibroblast と一致した性質を持っていることから、刺激伝導系の発生において刺激伝導系周囲の線維化を促進することで伝導系そのものと周囲との境界を形成している可能性が示唆された。bis-diamine 投与群では、TUNEL 陽性細胞数が減少しており、bis-diamine が心筋全体の増殖、成長を抑制していることと関係があると考えられた。本研究から、円錐動脈幹奇形における不整脈発生の機序は、刺激伝導系の形態学的異常そのものよりも、刺激伝導系細胞間のギャップ結合蛋白の発達の遅れによる刺激伝導系の未熟性によることが示唆された。

**結論:** bis-diamine 投与ラット胎仔の心臓では、ギャップ結合蛋白の正常な発達及び刺激伝導系組織周囲での myofibroblast のアポトーシスが阻害されていることが明らかになったが、これは bis-diamine が心筋細胞の増殖、成長を抑制した結果であると考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	338	氏名	黄瀬 一慶
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>円錐動脈幹奇形である総動脈幹症や Fallot 四徴症では房室ブロック等の不整脈を伴うことが知られている。本論文は bis-diamine を妊娠ラットに投与して胎仔に円錐動脈幹奇形を誘発し、それに伴う不整脈発生機転を形態学的に検討したものである。正常群と比較すると bis-diamine 投与群では、心臓の刺激伝導系の原基と考えられる human natural killer (HNK)-1 陽性細胞の発現には差はなかったが、connexin 40 および connexin 43 の発現が大きく低下していた。この結果により、円錐動脈幹奇形に伴う房室ブロック等の伝導障害の発生にギャップ結合蛋白の発現低下が関与している可能性が示唆された。一方、TUNEL 陽性細胞（アポトーシス細胞）は myofibroblast の性状を示し HNK-1 陽性細胞周辺に分布していたことから、刺激伝導系とその周囲との境界形成に関与すると考えられた。bis-diamine 投与群では心室中隔周辺の TUNEL 陽性細胞数が有意に減少しており、bis-diamine 投与により心筋全体の増殖・成長が抑制されていることと関連している可能性が考えられた。</p> <p>以上のように、本研究は円錐動脈幹奇形に伴う不整脈の発生機転に関して新しい知見を示したものであり、博士（医学）の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(平成 17 年 8 月 31 日)			