

1 週齢家兔の再灌流心の機能回復に対する カルシウムの有用性について

(平成9年8月11日受付)

(平成11年2月3日受理)

京都府立医科大学附属小児疾患研究施設内科部門
寺町 紳二 糸井 利幸 尾内善四郎

key words : 虚血後再灌流, 未熟心, Ca^{2+} , amiloride, pimobendan

要 旨

一過性の虚血後に遷延する成熟心の機能低下は心筋細胞内 Ca^{2+} の過負荷が一因と考えられている。我々は、1 週齢家兔の摘出灌流心モデルにおいて虚血後再灌流時の心機能回復に対する細胞外 Ca^{2+} 濃度上昇、次に間接的に Ca^{2+} の細胞内流入を抑制する Na^+/H^+ 交換系阻害剤 amiloride 投与、さらには Ca^{2+} 感受性増強剤 pimobendan 投与の影響について検討した。

虚血前後とも同じ灌流液 (Ca^{2+} 濃度 1.75 mM) で灌流すると、40 分の虚血後、再灌流 30 分の左室収縮能回復は虚血前の 45% 程度であった。再灌流時に灌流液の Ca^{2+} 濃度を 2.5 mM にすると再灌流 30 分の心機能は虚血前の 130% であった。そして、成熟心では虚血後再灌流時の心機能回復を促進するとされている amiloride 300 μ M を虚血 5 分前に投与しても、再灌流時の収縮能に有意な変化はなかった。 Ca^{2+} 濃度は 1.75 mM のままで、再灌流開始時に pimobendan 400 μ M を投与すると心機能は虚血前の 113% まで回復した。虚血前後とも Ca^{2+} 濃度を 2.5 mM にすると、虚血前の 96% に回復をしたが、虚血前から pimobendan を投与すると、虚血後に左室は機能しなかった。

これらの結果より、1 週齢家兔心では成熟心と違い 細胞内 Ca^{2+} 過負荷は虚血後の心機能回復障害の原因ではなく、その一因が Ca^{2+} 感受性の低下である可能性が示唆された。

はじめに

未熟心は成熟心よりも心筋虚血に対して耐性が高いと考えられているが¹⁾、開心術後の心機能回復は成人に比べて乳児の方が不良であることも指摘されている。それは、未熟心筋の虚血後再灌流障害の発症機構が十分解明されていないことも一因と考えられる^{2,3)}。

心筋細胞のレベルでみると、未熟心と成熟心の間には多くの相違点が存在する。その大きな違いの一つとしては、未熟心は心筋の収縮活動に必要な Ca^{2+} の多くを細胞外液から得ていることである⁴⁾。それゆえに未熟心では虚血後再灌流時の細胞内 Ca^{2+} 動態が成熟心

の場合と異なると考えられる。心筋虚血中に嫌氣的解糖により産生され心筋内に蓄積した H^+ は Na^+/H^+ 交換系を通じて Na^+ と交換され、細胞内に Na^+ が蓄積する⁵⁾。こうしておこる Na^+ の過剰蓄積は Na^+/Ca^{2+} 交換系を通じて Ca^{2+} の心筋細胞内への流入を引き起こし⁶⁾、虚血後再灌流時の心機能回復を抑制すると考えられている。成熟心においては、一般に Na^+/H^+ 交換系阻害剤である amiloride の投与が、心筋内の Na^+ および Ca^{2+} の蓄積を抑え、虚血後再灌流時の心収縮能の改善を認めると報告されている⁷⁾。このように 細胞外液 Ca^{2+} の細胞内流入が成熟心では再灌流時機能障害の一因であると考えられるが、Itoi ら (1996) は摘出未熟家兔心において、灌流液中 Ca^{2+} の増加が虚血後の心機能回復を促進することを報告し⁸⁾、その中で未熟家兔心の虚血後再灌流障害の一因としての心筋 Ca^{2+} 感受性

別刷請求先: (〒602 8566) 京都市上京区河原町広小路
上る梶井町 465
京都府立医科大学附属小児疾患研究施設
内科部門 寺町 紳二

低下の存在を示唆した。しかしながら、細胞外液 Ca^{2+} の細胞内流入が虚血後の未熟心に好影響を及ぼすということに対する意見の一致はまだ一般には得られていない。

今回の研究で我々は1週齢家兎心の虚血後再灌流時機能回復に対する amiloride 投与の効果、細胞外液 Ca^{2+} 増量の影響を検討し、虚血後再灌流時の心筋 Ca^{2+} 感受性低下の可能性を調べるため Ca^{2+} 感受性増強剤である pimobendan 投与の影響についても検討した。

方 法

摘出心灌流

対象は灌流実験の前日の夜に母兎から離された1週齢の日本白色家兎で、京都府立医科大学動物実験指針に従って取り扱った。

体重 100 g あたり 25 mg の pentobarbital-Na を腹腔内投与した後、素早く胸腔を切り開き、心外膜を取り除いた心臓を摘出した。摘出した心臓は 11 mM のブドウ糖と 1.75 mM の Ca^{2+} を含む Krebs-Henseleit 液で洗浄後、大動脈にカニューレを挿入し、酸素 95% 二酸化炭素 5% の混合ガスで酸素化した pH 7.4 の同じ Krebs-Henseleit 液を用いて逆行性の灌流 (Langendorff 法) で開始した。胸腔を切り開いてから逆行性の灌流を開始するまでにかかる時間は 30 秒以内を目標とした。次に、左房にカニューレを挿入し、逆行性灌流を中止した後、左房から左室、大動脈への順行性灌流 (working mode) を開始した。左房に対する前負荷、左室に対する後負荷を静水圧でそれぞれ 8 mmHg, 30 mmHg となるように設定した。大動脈流出路の側管に取り付けた圧変換器により、心拍数と最大収縮期圧を経時的に計測・記録した。心機能は double product (心拍数と最大収縮期圧の積) にて評価した。working mode の灌流液には 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM パルミチン酸, 5.5 mM ブドウ糖, 3% 牛血清アルブミンそして 1.75 mM CaCl_2 を含んだ Krebs-Henseleit 液を用いた。灌流液中の約 25% の Ca^{2+} はアルブミンと結合するので、実際の遊離 Ca^{2+} 濃度は 1.25 mM ~ 1.32 mM となっていた。パルミチン酸は、あらかじめアルブミンと結合させて用いた。1.2 mM と高濃度のパルミチン酸を用いたのは、心臓手術の際、ヘパリン投与による血中遊離脂肪酸濃度の増加が認められるためである⁹⁾。灌流液は常に酸素 95% 二酸化炭素 5% の混合ガスで酸素化され、pH は 7.4 前後、左房流入部で 37 °C になるように調整した。

灌流プロトコール

上述の摘出灌流心に対して 20 分間の有酸素灌流を行い、安定したところで灌流遮断による 25 °C の室温での 40 分間の虚血、その後 30 分間の再灌流を施行した。図 1 は虚血再灌流実験を行った群の灌流プロトコールである。1 群 (n=8) は虚血前灌流、虚血後再灌流ともに 1.75 mM の Ca^{2+} を含んだ灌流液を用いた。2 群 (n=7) は 1 群と同じ灌流液を用いて、虚血 5 分前に灌流液中濃度が 300 μM になるように amiloride を投与した。3 群 (n=8) は 1.75 mM の Ca^{2+} を含んだ液で灌流を開始し、再灌流時に Ca^{2+} 濃度を 2.5 mM に増量した。4 群 (n=8) は 1 群と同じ灌流液で、再灌流時に灌流液中濃度が 400 μM になるように pimobendan を投与した。pimobendan は灌流液に溶解困難であるため、あらかじめ 1 ml の polyethylene glycol #200 に溶いて、超音波処理してから投与した。実験当日の個体の体重および心臓湿重量について 1 から 4 の各群間における有意な差は認めなかった (表 1)。

また、虚血前からの投与による再灌流時の心機能回復に対する影響を調べるため、虚血前から灌流液中 Ca^{2+} 濃度を 2.5 mM にした群 (5 群, n=8) と、虚血前から pimobendan を投与した群 (6 群, n=6) についても 1 群と比較検討してみた (図 1)。兎の体重と心臓湿重量の比較では (表 1) 5 群と 6 群で 1 群に較べてやや軽いが、心臓湿重量/体重の値を比較すると、差はなく、実験結果には影響ないものと判断した。

さらに、灌流液 Ca^{2+} 濃度増加および pimobendan の心収縮亢進作用に対する虚血の影響を調べるため、持続灌流中の灌流液中 Ca^{2+} 増量群 (5 群, n=6) および pimobendan 投与群 (6 群, n=6) の心機能の変化を灌流液 Ca^{2+} 濃度を 1.75 mM のまま灌流を続けた群 (1' 群, n=4) と比較した (図 2)。1' 群および 5 群, 6 群の体重と心臓湿重量の間には差は認めなかった (表 2)。

乳酸とクレアチンホスホキナーゼ (CPK) の測定

1~6 群の虚血による心筋障害の程度を比較するために、肺動脈から流出する灌流液を冠静脈洞からのものとして採取し、乳酸濃度と CPK 活性を測定した。灌流液は虚血直前 (虚血前灌流 20 分)、再灌流 1 分、5 分および 30 分に採取し、乳酸濃度と CPK 活性の測定にはそれぞれ、デタミナー LA (協和メデックス、東京) およびユニメイト CK (日本ロシュ、東京) の測定キットを使用した。また、 Ca^{2+} 及び pimobendan 投与による心筋への影響を見るために、1', 5', 6' 群についても投与前、投与 5 分、投与 30 分に肺動脈からの灌流液中の

表1 体重と心湿重量の比較

	体 重 (g)	心湿重量 (g)
1 群 (n = 8)	137.5 ± 7.0	1.03 ± 0.11
2 群 (n = 7)	125.7 ± 5.1	1.00 ± 0.05
3 群 (n = 8)	140.0 ± 9.5	1.06 ± 0.07
4 群 (n = 8)	143.8 ± 11.1	1.12 ± 0.08
5 群 (n = 8)	103.8 ± 2.3*	0.77 ± 0.03*
6 群 (n = 8)	115.8 ± 6.6	0.74 ± 0.02*

1 から 4 群の間で体重および心湿重量に有意差はみとめなかった . 5 群と 6 群はやや軽い が , 心湿重量 / 体重の比では群間に差はなかった .

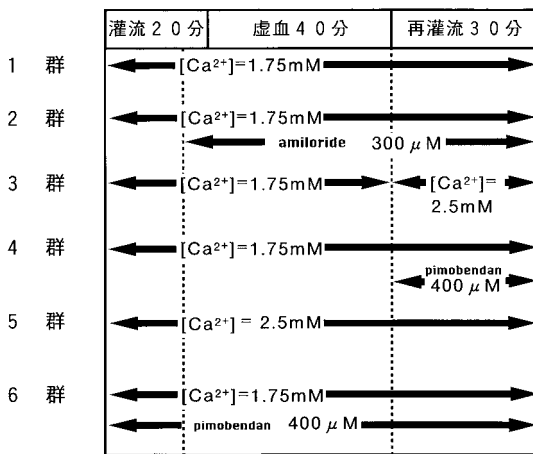


図1 実験のプロトコール(各群の灌流液組成の差異) 実験は 20 分間の灌流の後 , 40 分間の虚血 , そして 30 分間の再灌流を行った . 1 群は対照群として灌流液は一定 (Ca²⁺ 濃度 1.75 mM) で灌流 . 2 群は虚血 5 分前に 300 μM の amiloride (H⁺/Na⁺ 交換系阻害剤) を投与 . 3 群は再灌流時に灌流液中 Ca²⁺ 濃度を 2.5 mM に増量した . 4 群は灌流液中 Ca²⁺ 濃度 1.75 mM のままで , 再灌流時に 400 μM の pimobendan (Ca²⁺ 感受性増強剤) を投与した . 5 群は灌流開始から Ca²⁺ 濃度は 2.5 mM で一定 . 6 群は Ca²⁺ 濃度 1.75 mM で はじめから 400 μM の pimobendan を投与した .

乳酸濃度と CPK 活性について調べて見た .

統計処理

結果を群間において比較するためには分散分析を用いて評価し , 有意である場合にはその多重比較として Fisher の PLSD の解析を施行した . 単一の群における経時的変化の評価には Paired t 検定を施行した .

有意水準はすべて 5% とし , 測定結果は平均 ± 標準誤差で表記した .

表2 体重と心湿重量の比較 2

	体 重 (g)	心湿重量 (g)
1 群 (n = 4)	138.8 ± 13.0	0.96 ± 0.08
5 群 (n = 6)	134.2 ± 11.6	0.95 ± 0.06
6 群 (n = 6)	130.0 ± 2.9	0.95 ± 0.06

非虚血灌流実験を行った 3 つの群の間に体重および心湿重量に有意差は認めなかった .

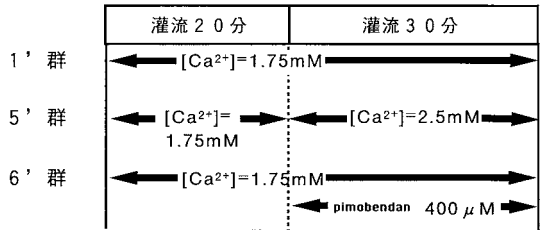


図2 実験のプロトコール(非虚血実験の灌流液組成) 実験は 20 分間の灌流の後 , 1' 群は対照群として 30 分間の有酸素灌流を継続 . 5' 群は灌流液 Ca²⁺ 濃度を 2.5 mM に増量して 30 分間の灌流を行った . 6' 群は 400 μM の pimobendan を投与して 30 分間の灌流を続けた .

結 果

心収縮能

虚血前後とも同じ 1.75 mM の Ca²⁺ を含む灌流液で灌流した 1 群では 40 分間の灌流遮断による虚血後 , 再灌流 5 分で心機能は虚血前の 53.7% に回復し , 10 分で 59.6% , その後の心機能がほぼ安定した状態の再灌流 30 分では虚血前 45.0% の心機能を示した (図 3) . この再灌流後の心機能の低下は心拍数および最大収縮期圧両方の低下によるものであった (表 3) . 成熟心において虚血後再灌流時の心機能回復を促進するとされている amiloride を虚血 5 分前に投与した 2 群では虚血前後の心拍数および収縮期圧に 1 群との有意な差は認められず , 再灌流時の心機能の回復は促進されなかった . ところが , 2.5 mM Ca²⁺ で再灌流した 3 群は再灌流初期には明らかな収縮期圧の上昇をみとめ , 再灌流 30 分では収縮期圧と心拍数のいずれも 1 群よりも高値を示し , 再灌流 5 分 , 10 分 , 30 分 の心機能回復率も 133.0% , 126.8% および 129.8% と明らかに良好な心機能の回復を認めた . この結果は虚血後の心機能回復に Ca²⁺ 濃度の上昇は有害であるとする成熟心の場合と対照的であった . 再灌流時に Ca²⁺ 感受性増強剤 pimobendan を投与した 4 群も 3 群と同じ傾向を示し , 再灌流 5 分 ,

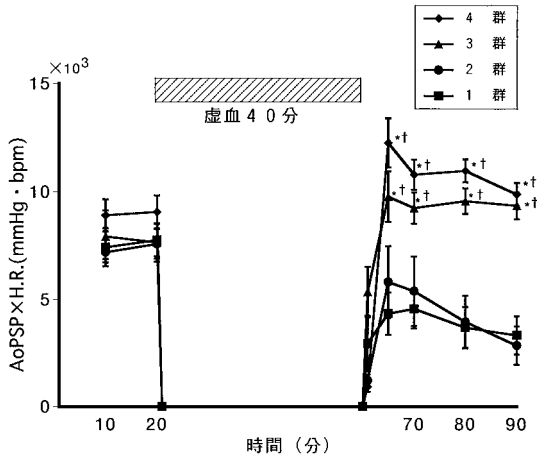


図3 心機能の比較

対照である1群とamiloride(H^+/Na^+ 交換系阻害剤)を投与した2群の間には有意差は認めなかった。灌流液 Ca^{2+} を追加した3群とpimobendan(Ca^{2+} 感受性増強剤)を投与した4群はともに再灌流5分からは有意に1群および2群よりも良好な心機能回復を認めた。また、3群と4群の間に有意差は見られなかった。
 AoPSP = 大動脈最大収縮期圧, H.R. = 心拍数, *, $p < 0.05$ 対1群, †; $p < 0.05$ 対2群

10分および30分の心機能回復率は143.4%, 125.2%, 113.0%であり,心機能は3群と4群の間に有意差は認めなかった。

虚血中の心筋内 Ca^{2+} 環境を変化させる目的で,虚血前から2.5 mM Ca^{2+} (5群),pimobendan投与(6群)を行い,虚血後の心機能への影響を検討した。 Ca^{2+} およびpimobendanはamilorideとは異なり心機能を亢進させるので,虚血前の心機能に1群との間で有意差が出る。そこで,それぞれの群の虚血直前の心機能を100%とした回復率のみで比較することにした(図4)。5群は再灌流1分から急激に回復をし,5分で90%近く,10分からは90%以上の回復率を維持し,再灌流30分でも $96.2 \pm 9.1\%$ というほぼ100%に近い回復率を示した。成熟心の場合の参考として同じ施設で行われた2つの実験を比較しても,成熟したラットの心臓では1.25 mMの Ca^{2+} が含まれる灌流液で再灌流すると,35分間の虚血後の再灌流で虚血前の44%まで回復する¹⁰⁾のに対し,2.5 mMで灌流すると30分間の虚血後でさえ37%の回復しか見られず¹¹⁾,灌流液中 Ca^{2+} 濃度増加による心機能回復の促進は認められない。一方,再灌流時の投与では Ca^{2+} 追加群と同じく良好な心機能の回復を示したpimobendanをはじめから

表3 心拍数および大動脈最大収縮期圧

	心拍数 (beats·min ⁻¹)	大動脈最大収縮期圧 (mmHg)
虚血前		
1群	206.5 ± 17.2	37.9 ± 3.0
2群	188.6 ± 12.6	39.9 ± 1.6
3群	215.8 ± 12.2	35.3 ± 3.0
4群	209.3 ± 16.9	43.3 ± 1.2
再灌流		
5分		
1群	181.8 ± 22.2	23.8 ± 3.8
2群	175.7 ± 30.4	29.7 ± 6.6
3群	240.5 ± 18.5	39.6 ± 2.6*
4群	226.5 ± 15.7	53.8 ± 2.4**§
30分		
1群	152.5 ± 26.0	20.3 ± 3.8
2群	136.3 ± 24.7	18.7 ± 4.1
3群	218.8 ± 9.0*†	42.5 ± 1.5*†
4群	203.3 ± 7.7†	48.5 ± 1.1*†

1群(n=8)はコントロール群で,虚血前後とも Ca^{2+} 濃度1.75mMの同じ灌流液で灌流した。2群(n=7)は1群と同じ灌流液で虚血5分前に300 μ Mのamilorideを投与した。3群(n=8)は虚血後再灌流時に灌流液中 Ca^{2+} 濃度を1.75mMから2.5mMに増加した。4群(n=8)は1群と同じ灌流液を用いて再灌流時に400 μ Mのpimobendanを投与した。3群と4群では1群と2群に比べて再灌流中に心拍数および大動脈最大収縮期圧の上昇を認めた。

値は平均±標準誤差.*; 対1群 $p < 0.05$ †; 対2群 $p < 0.05$ §; 対3群 $p < 0.05$

投与した6群では虚血後再灌流時に左室の収縮能は全く回復しなかった。

非虚血での2.5 mM Ca^{2+} , 400 μ M pimobendanの心機能への影響を検討した。2.5 mM Ca^{2+} 投与(5群)では,投与後1分で心機能の有意な上昇を認め,追加前の123.6%となり,その後,やや低下するが追加後5分さらに30分でも119.5%,112.6%で有意に高い心機能を維持していた。400 μ M pimobendan投与(6群)では,投与後1分および5分で135.9%,113.8%の有意に高い心機能を示したが,その後徐々に低下し,投与30分後には111.8%となり,投与前の心機能と統計的に有意差を認めなくなった(図5)。また,1.75 mM Ca^{2+} のまま灌流を持続した1群を含む3つの群の群間比較では,投与後1分において5群,6群ともに1群よりも明らかに高い心機能となったが,その後は有意な差は認めなかった。

CPK と乳酸

40分間の虚血直後の再灌流1分で,心臓から流出するCPKは虚血前より増加しており,その値はそれぞれ

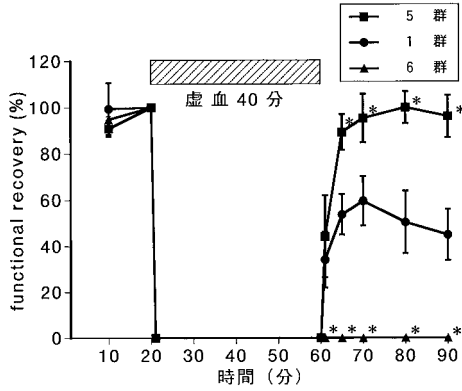


図4 虚血前投与による心機能回復率の比較

対照群である1群と灌流を開始時から $Ca^{2+}=2.5\text{ mM}$ の5群、灌流開始時から pimobendan $400\ \mu\text{M}$ を投与した6群を虚血前の心機能を100%とした虚血後の回復率で比較。5群は良好な回復を示し、6群は虚血後再灌流時に全く心室の収縮が起こらなかった。

* ; $p < 0.05$ 対1群

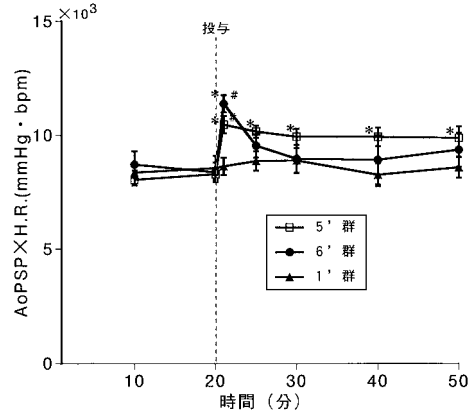


図5 持続灌流中 Ca^{2+} 、pimobendan 投与による心機能変化

Ca^{2+} 投与群である5'群は投与1分後より著明な心機能の上昇を認め、投与30分後まで投与前に比べ、有意に高い値を維持した。pimobendan 投与群の6'群は投与1分後に一過性に心機能の上昇を認めたが、5分後にはすでに低下傾向を示し、投与後10分以降は投与前と比較して有意差を認めなくなった。

* ; 対投与前 $p < 0.05$

れの群間で有意な差は認められなかった。つまり、40分間の虚血による心筋細胞の障害はどの群も同じ程度であると考えられた。その後、1~3群は再灌流30分まで同じようなCPKの流出を示したが、4群では再灌流5分、さらに30分とCPK濃度は上昇し、1群に対し明らかに高い値を示した(表4)。虚血前から虚血中さらに再灌流時にわたる高 Ca^{2+} および pimobendan の影響を調べるための5群および6群の1群とのCPKの

比較(表4)では、5群に関しては1群との間に違いは見られなかったが、6群では虚血前にすでにやや高い値であり、再灌流1分では明らかな高値となった。6群は心室の収縮能が全く回復しなかったため、再灌流5分以降の冠静脈洞から流出する灌流液の採取は不可能であった。

表4 冠静脈洞流出液中のCPK活性

	虚血前	1分	再灌流5分	30分
1群	75.4 ± 15.3	95.1 ± 19.1 *	96.1 ± 17.9	109.3 ± 20.8 *
2群	56.9 ± 13.3	125.7 ± 45.5	85.9 ± 26.9	82.3 ± 18.9 *
3群	97.8 ± 24.0	140.3 ± 39.0 *	116.4 ± 29.6 *	125.3 ± 26.2 *
4群	80.5 ± 11.6	120.5 ± 21.3 *	226.6 ± 51.9 * [§]	289.0 ± 44.3 * [§]
5群	76.6 ± 19.3	124.3 ± 30.7 *	96.0 ± 22.2 *	102.1 ± 21.6 *
6群	135.3 ± 16.8 [§]	514.8 ± 184.4 [§]		

1群 (n = 8) はコントロール群で、虚血前後とも Ca^{2+} 濃度 1.75 mM の同じ灌流液で灌流した。2群 (n = 7) は1群と同じ灌流液で虚血5分前に $300\ \mu\text{M}$ の amiloride を投与した。3群 (n = 8) は虚血後再灌流時に灌流液中 Ca^{2+} 濃度を 1.75 mM から 2.5 mM に増加した。4群 (n = 8) は1群と同じ灌流液を用いて再灌流時に $400\ \mu\text{M}$ の pimobendan を投与した。5群 (n = 8) は虚血前後とも Ca^{2+} 濃度 2.5 mM の灌流液で灌流、6群 (n = 6) は1群と同じ灌流液で、始めから $400\ \mu\text{M}$ の amiloride を投与した。6群は心室の収縮能が全く回復せず、再灌流5分以降の冠静脈洞から流出する灌流液の採取は不可能であった。1群と比較して、pimobendan が投与された4群の虚血後および6群が有意に高い値を示した。

値は平均 ± 標準誤差 (U/I)。* ; 対虚血前 $p < 0.05$;[§] ; 対1群 $p < 0.05$

表 5 冠静脈洞流出液中の乳酸濃度

	虚血前	1分	再灌流5分	30分
1群	1.24 ± 0.36	5.11 ± 1.25*	2.43 ± 0.43*	2.35 ± 0.44*
2群	0.90 ± 0.10	11.23 ± 1.99*	3.84 ± 1.28†	2.40 ± 0.34*†
3群	1.14 ± 0.17	6.43 ± 1.16*	2.05 ± 0.30*†	2.15 ± 0.21*†
4群	1.16 ± 0.22	8.83 ± 1.90*	2.65 ± 0.35*†	2.24 ± 0.27*†
5群	1.09 ± 0.15	5.86 ± 1.25*	1.55 ± 0.16†	1.71 ± 0.16*†
6群	1.60 ± 0.22	7.77 ± 2.57		

1群 (n = 8) はコントロール群で、虚血前後とも Ca²⁺濃度 1.75mM の同じ灌流液で灌流した。2群 (n = 7) は1群と同じ灌流液で虚血5分前に 300 μM の amiloride を投与した。3群 (n = 8) は虚血後再灌流時に灌流液中 Ca²⁺濃度を 1.75mM から 2.5mM に増加した。4群 (n = 8) は1群と同じ灌流液を用いて再灌流時に 400 μM の pimobendan を投与した。5群 (n = 8) は虚血前後とも Ca²⁺濃度 2.5mM の灌流液で灌流、6群 (n = 6) は1群と同じ灌流液で、始めから 400 μM の amiloride を投与した。6群は心室の収縮能が全く回復せず、再灌流5分以降の冠静脈洞から流出する灌流液の採取は不可能であった。どの群も虚血前にくらべて虚血後は高い値を示したが、それぞれの群間に有意差は認めなかった。

値は平均 ± 標準誤差。(mg/dl)。* ; 対虚血前 p < 0.05 † ; 対再灌流1分値 p < 0.05

表 6 非虚血 Ca²⁺追加投与時の心機能と冠静脈洞流出液中 CPK 活性と乳酸濃度

	投与前	1分	投与後5分	30分
Double product (mmHg · bpm)	8,298 ± 226	10,477 ± 377*	10,165 ± 267*	9,893 ± 506*
CPK (U/l)	78.2 ± 12.7	79.5 ± 13.3	83.7 ± 13.8*	97.8 ± 16.1*
lactate (mg/dl)	1.38 ± 0.21	1.58 ± 0.28	1.63 ± 0.28*	1.80 ± 0.28*

灌流液中 Ca²⁺濃度を 1.75mM から 2.5mM に上げた5群では、Ca²⁺投与後に心機能は有意に高い値を維持し、CPK 活性は投与後徐々に上昇し続ける。乳酸濃度も投与後は投与前よりも高い値をしめした。

値は平均 ± 標準誤差。* ; 対投与前 p < 0.05

1~4のどの群においても、再灌流1分で著明な乳酸の流出が認められた(表5)。再灌流1分の乳酸流出量は、虚血中に細胞外に蓄積された乳酸および再灌流開始直後にブドウ糖から代謝産生された乳酸の総量を反映している。虚血中に蓄積された乳酸の流出量は再灌流5分までに速やかに減少するが、その後は変化なく、どの群においても再灌流30分でも虚血前より有意に高い値が維持されていた。amiloride投与やCa²⁺追加、さらにはpimobendanの投与でも乳酸の流出に関しては影響は見られず、すべての群間に有意差を認めなかった。虚血前、中、後にわたる高Ca²⁺およびpimobendanの影響を調べるための1群と5群および6群の乳酸値の比較(表5)でも差は認められなかった。

虚血にせずにCa²⁺を追加した5群では追加投与後、CPKおよび乳酸値ともに徐々に増加し、追加後5分以上で投与前に比べて有意に高い値となった(表6)。虚血なしでpimobendanを投与した6群でも投与後に

CPK値と乳酸値が上昇し、乳酸値は投与後1分ですですに有意な上昇を認め、それが維持され、CPKの値も投与後30分には有意に高い値を示した(表7)。しかし、1群を含む3つの群間の比較では有意差は認められなかった。

考 察

虚血後再灌流心の収縮力回復不全はスタニングとして知られているが、その一因として再灌流時の細胞内カルシウム過負荷が報告されている¹²⁾。

虚血により細胞内では嫌氣的解糖によるH⁺の蓄積がおこり、細胞内のpHは低下する。成熟心では細胞内pHの補正のためにNa⁺/H⁺交換系が働き、H⁺との交換に伴うNa⁺の流入が細胞内のNa⁺濃度を上昇させる¹³⁾(図6)。この細胞内Na⁺の過剰はNa⁺/Ca²⁺交換系をCa²⁺が細胞内へ流入する方向へ活性化し、多量のCa²⁺の細胞内流入を引き起こすことになる。再灌流初期の細胞内Ca²⁺濃度の過剰は心筋の収縮に關与する

表7 非虚血 pimobendan 投与時の心機能と冠静脈洞流出液中 CPK 活性と乳酸濃度

	投与前	1分	投与後5分	30分
Double product (mmHg・bpm)	8,382 ± 428	11,393 ± 375 *	9,543 ± 511 *	9,372 ± 747
CPK (U/l)	50.7 ± 8.8	62.8 ± 9.6 *	144.3 ± 56.3 *	160.8 ± 79.5 *
lactate (mg/dl)	1.05 ± 0.12	1.60 ± 0.16 *	1.63 ± 0.21 *	1.37 ± 0.14 *

灌流液中に pimobendan を投与した 6' 群では 400 μ M の pimobendan 投与後、心機能は一過性に上昇してから徐々に低下するが、CPK 活性は逆に投与後徐々に上昇し続ける。乳酸濃度は投与後は常に投与前よりも高い値を示した。

値は平均 ± 標準誤差。*；対投与前 $p < 0.05$

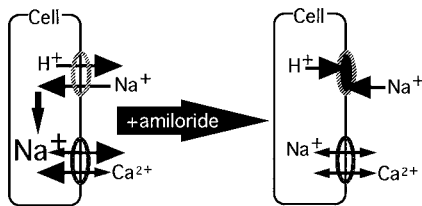


図6 amiloride の作用

成熟心では虚血により蓄積された H^+ は、再灌流開始直後に細胞内 pH の補正のために Na^+/H^+ 交換系により排出され、それに伴う Na^+ の流入が細胞内の Na^+ 濃度を上昇させる。この細胞内 Na^+ の過剰は Na^+/Ca^{2+} 交換系を Ca^{2+} が細胞内へ流入する方向へ活性化し、多量の Ca^{2+} の細胞内流入を引き起こす(左側)。amiloride を投与すると(右図) Na^+/H^+ 交換系が阻害されるため Na^+ 濃度を上昇が起こらず、結果的に Ca^{2+} の細胞内流入が抑制される。

細胞内小器官を障害し、短時間虚血後の心機能低下遷延を生じさせる。従って、虚血および再灌流時に Na^+/H^+ 交換系阻害剤である amiloride を投与すると Ca^{2+} の細胞内流入が抑制され、再灌流成熟心の心機能回復が良好であると報告されている⁷⁾。

Nakanishi らは NH_4Cl を加えて作成したアシドーシスモデルを用いて新生仔心筋の H^+ 排出機構を検討した。彼等は未熟心筋では HCO_3^- 依存の機構 (HCO_3^-/Cl^- 交換系) の活性は成熟心筋よりもかなり高いことを示し¹⁴⁾、未熟心筋のアシドーシスの補正は Na^+/H^+ 交換系よりも HCO_3^-/Cl^- 交換系による部分が遥かに多いことも明らかにした。もし、未熟心における虚血後再灌流時の pH の補正も Na^+/H^+ 交換系に頼らないのであれば、再灌流時の細胞内 Na^+ 濃度上昇は急激には起こらないと考えられる。このことは 2 週齢家兔の虚血後再灌流時に細胞内の Ca^{2+} および Na^+ の蓄積を認めなかった Pridjian らの報告¹⁵⁾ を裏付ける。amiloride の投与にもかかわらず、再灌流時の心機能回復が促進

も阻害もされなかったのは、未熟心筋の再灌流障害に対する Na^+/H^+ 交換系の関与は大きくないことを示唆している。

細胞内 pH を補正するもう一つの重要な機構は乳酸の細胞外への排出である。再灌流初期には今回の実験のどの群も高濃度の乳酸排出が認められ、それぞれの群間に明らかな差は見られなかった。つまり、灌流液中の Ca^{2+} 濃度増加や amiloride または pimobendan の投与は乳酸排出による細胞内 pH の補正を抑制も促進もしなかった。

灌流液の Ca^{2+} 濃度を 1.75 mM から 2.5 mM に増加させると再灌流未熟心の心機能回復が促進される現象は成熟心の場合とは対照的である。このような未熟心と成熟心と細胞外液 Ca^{2+} 濃度に対する反応の差異には、心筋細胞レベルでの違いが関係していると思われる。新生児の心臓では、成熟心と違い、収縮に際し必要な Ca^{2+} の多くを細胞外液に依存している¹⁶⁾。心筋細胞内の筋小胞体は成熟心の方が未熟心よりも数的に多く、 Ca^{2+} -ATPase の含有量、 Ca^{2+} 取り込み能そして Ca^{2+} 依存性 ATPase の活性は未熟心筋のほうが低いと報告されている。最近の家兔の心筋を用いた研究では心筋筋小胞体の ryanodine 受容体 (カルシウム放出チャンネル) のメッセンジャー RNA の発現は新生仔から成兔になるまで、出生後徐々に増加してゆくことが明らかにされた¹⁷⁾。これらの報告は心筋の収縮に伴い筋小胞体から細胞質へ放出される Ca^{2+} の量は未熟心の方が成熟心よりも少ないことを示唆している。未熟心の細胞膜における Na^+/Ca^{2+} 交換系の活性は成熟心と同程度であり、筋小胞体の成熟が完成する以前から細胞内外の Ca^{2+} の出入りは十分にコントロールされている¹⁸⁾。従って、筋小胞体のみでは補えない未熟心筋の収縮のために必要な Ca^{2+} は細胞外から心筋内へ取り込まれると考えられ、Riva と Hearse はラットの未熟心は安定した収縮のためには成熟心よりも高濃

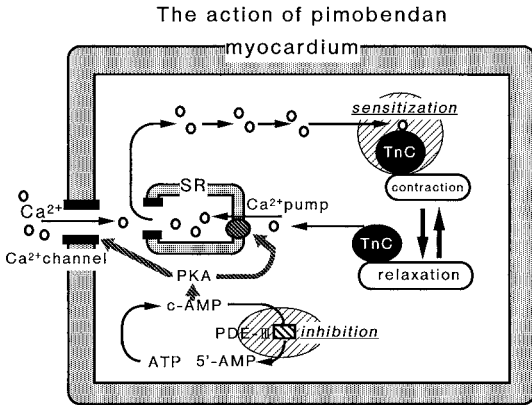


図7 pimobendan の心筋細胞に及ぼす作用

pimobendan はトロポニン C の Ca²⁺ 感受性増強作用とホスホジエステラーゼ III 活性抑制作用を有している。ホスホジエステラーゼ III の活性が抑制されると、間接的に心筋内への Ca²⁺ 取り込みが増加し、その刺激で筋小胞体からの Ca²⁺ 放出が促進される。この両方の作用により心筋の収縮力は増強する。

SR = 筋小胞体, TnC = トロポニン C, PKA = プロテインキナーゼ A, PDE III = ホスホジエステラーゼ III

度の細胞外液 Ca²⁺ を必要とすることを報告している¹⁹⁾。

pimobendan は心筋の収縮調節蛋白であるトロポニン C の Ca²⁺ に対する感受性増強と共にホスホジエステラーゼ III 活性抑制作用を有しており²⁰⁾²¹⁾(図7), それにより心筋細胞内の c-AMP の濃度が上昇する。そのため、プロテインキナーゼ A の活性化が進み、細胞膜の Ca²⁺ チャンネルおよび筋小胞体の Ca²⁺ ポンプがリン酸化される。Ca²⁺ チャンネルはリン酸化により開口率が上昇し、細胞内への Ca²⁺ 流入が促進される。流入した Ca²⁺ は筋小胞体からの Ca²⁺ 放出を誘発し、トロポニン C に対する Ca²⁺ 感受性増強作用と共に心筋の収縮力を増強する。また、筋小胞体の Ca²⁺ ポンプのホスホランパンがリン酸化されることにより、筋小胞体への Ca²⁺ の取り込みが促され、トロポニン C からの Ca²⁺ 解離が進んで心筋の弛緩も促進されることになる。ただし、未熟心においては前述のような特徴のため、筋小胞体への作用による心機能への影響は少ないと考えられる。再灌流時に pimobendan を 400 μm 投与することにより、虚血後再灌流 1 週齢家兎心の心機能回復は灌流液中 Ca²⁺ 濃度を 2.5 mM にした時と同じく促進された。一方、虚血状態にしなかった群について見ると Ca²⁺ を追加した群は追加後 30 分まで追加前

に比べて有意に高い心機能を維持しているが、pimobendan を投与した群では投与直後に一過性に心機能の上昇が見られたが、30 分後には投与前と変わらない値に落ち着いている。これらのことより、pimobendan の強心作用は虚血後の再灌流心に対する方が、非虚血灌流中の心臓に対するよりも強く現われると考えられ、1 週齢家兎心では再灌流時収縮能低下の一因として Ca²⁺ 感受性の低下も疑われる。

本実験の 1~4 群のうち、pimobendan を投与した群のみ再灌流中に CPK の流出量が増加し、再灌流 5 分、30 分で他の群と比べても明らかに高い値になっていた。良好な心機能回復と共に虚血中に蓄積した CPK が一度に排出され、一過性に単位時間あたりの CPK 流出が増加した可能性が考えられるが、心機能の回復がほぼ同程度の Ca²⁺ 追加投与群よりも CPK の流出が多いことは説明できない。また、乳酸の流出に関しては群間に差が認められない。虚血中に蓄積した CPK は乳酸と同時に排出されるので、CPK だけが一気に排出されるとは考えにくい。やはり、再灌流中に新たに心筋細胞からの CPK 漏出があると考えられる。400 μM という pimobendan の投与量は濃度依存的に Ca²⁺ 感受性増強効果が現われると報告されている最高の濃度である。再灌流中の心機能が虚血前より高くなっていることから、今回の灌流システムでは灌流液の酸素化は虚血前後で一定であるにも関わらず、pimobendan 投与による心筋仕事量の増加に伴う酸素需要が増大し、相対的に低酸素状態になった可能性も考えられる。虚血にせずに pimobendan を投与した場合でも、CPK 活性の値は徐々に上昇し、投与後 30 分では double product の値は統計的に有意でない程度の軽度上昇を維持しているにもかかわらず、CPK 活性は投与前に比べて有意に高くなった(表7)。さらに pimobendan 投与後の乳酸濃度は常に投与前よりも高い値を維持していた。従って、pimobendan の投与は一時的に機械的心機能を上昇させるが、同時に酸素需要も増大させるために相対的低酸素状態でのエネルギー供給増大を必要としており、十分な酸素が投与(摂取)できない状況では時間と共に心筋に障害をもたらす可能性がある。虚血にせずに Ca²⁺ 追加投与した群についてみると、冠静脈洞から流出する灌流液の CPK 活性と乳酸濃度については pimobendan 投与群と同様の傾向を示し(表6)、両群に差はなかった。つまり、この灌流システムでは有酸素灌流中の Ca²⁺ 追加投与と pimobendan 投与の両方とも心機能上昇と共に同程度の相対的

低酸素状態になっていそうである。しかし、虚血後再灌流時というさらに不利な条件下では pimobendan 投与の方が明らかに CPK 活性の値も高く、 Ca^{2+} 追加投与よりもより多くの酸素供給を必要としていると考えられる。

再灌流未熟心に対する高濃度 Ca^{2+} の影響については、いまだに議論的である。Pearlらは子豚を用いて、正常 Ca^{2+} 濃度での心停止のほうが低 Ca^{2+} 濃度の場合よりも良好な結果が得られたと報告した²²⁾。一方、Aokiら、そして Caspiらは心停止液中の Ca^{2+} 濃度を正常値以下に減少させる方が、再灌流時の左室機能が良好であるとしている²³⁾。今回、ここにはデータを出していないが、5.0 mM Ca^{2+} を含む灌流液での再灌流を1週齢家兔の摘出心3例について施行したところ、double product による心機能は 2.5 mM Ca^{2+} で再灌流したときと同様に高い値を維持していたが、再灌流5分において激しい心室性不整脈が出現した。この結果から推測すると、虚血後再灌流未熟心は細胞外からの Ca^{2+} 流入に対して成熟心よりも高い耐性を有しているものの、その耐性は無制限なものではなさそうである。この未熟心の高い耐性の理由として、心筋細胞が障害される心筋内 Ca^{2+} 濃度が成熟心よりも高い。または心筋細胞が障害される Ca^{2+} 濃度は成熟心と同じであるが細胞外から Ca^{2+} が流入する割に細胞内の Ca^{2+} 濃度が高くないだけということが考えられるが、本実験では、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定しておらず、そのどちらであるかは断定することはできない。

結 論

我々は、1週齢家兔摘出心を用いた虚血後再灌流実験において amiloride 投与は再灌流時の心機能回復に何も影響なく、再灌流時の灌流液中の Ca^{2+} 濃度の上昇 (1.75 mM → 2.5 mM) や Ca^{2+} 感受性増強剤の pimobendan 投与により良好な心機能回復が認められることを報告した。このことより、未熟心の一過性虚血後再灌流時心機能回復障害の原因の一つとして Ca^{2+} の過負荷は否定的であり、心筋 Ca^{2+} 感受性低下が一因である可能性が示唆され、未熟心の虚血再灌流時は成熟心とは違い、 Na^+/H^+ 交換系を阻害することによって細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制するよりも、むしろ細胞外液中の Ca^{2+} 濃度を上昇させたり、 Ca^{2+} 感受性増強剤を投与することにより Ca^{2+} 流入を促進したり、細胞内での Ca^{2+} の作用を増強することのほうが再灌流直後の心機能回復には有益であると考えられた。

Ca^{2+} 感受性増強剤の投与については再灌流時の

CPK 流出を増加させる作用があるが、そのメカニズムは不明であり、低酸素状態での投与はむしろ心筋を障害する可能性があることも認められたため、更に検討する必要がある。

謝辞 本実験に使用した amiloride を御提供いただいた MERCK Research Laboratories および pimobendan を御提供いただいた Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd. に深謝いたします。

本研究は文部省科学研究費 No. 07457599 の助成をうけた。

本論文の要旨の一部は第32回日本小児循環器学会総会(1996, 大阪)および第33回日本小児循環器学会総会(1997, 京都)において発表した。

文 献

- 1) Itoi T, Huang L, Lopaschuk GD : Glucose use in neonatal rabbit hearts reperfused after global ischemia. *Am J Physiol* 1993 ; 265(Heart Circ. Physiol. 34): H 427 H 433
- 2) Sawa Y, Matsuda H, Shimazaki Y, Hirose H, Kadoba K, Takami H, Nakada T, Kawashima Y : Ultrastructural assessment of the infant myocardium receiving crystalloid cardioplegia. *Circulation* 1987 ; 76(suppl V): V 141 V 155
- 3) del Nido PJ, Mickle DAG, Wilson GJ, Benson LN, Weisel RD, Coles JG, Trusler GA, Williams WG : Inadequate myocardial protection with cold cardioplegic arrest during repair of tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988 ; 95 : 223 229
- 4) Jarmakani JM, Nakanishi T, George BL, Bers D : Effect of extracellular calcium on myocardial mechanical function in the neonatal rabbit. *Dev Pharmacol Ther* 1982 ; 5 : 1 13
- 5) Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE : Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990 ; 66 : 135 146
- 6) Tani M : Mechanisms of Ca^{2+} overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu Rev Physiol* 1990 ; 52 : 543 559
- 7) Mochizuki S, Seki S, Ejima M, Onodera T, Taniguchi M, Ishikawa S : Na^+/H^+ exchanger and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in isolated perfused heart : possible role of amiloride. *Mol Cell Biochem* 1993 ; 119 : 151 157
- 8) Itoi T, Lopaschuk GD : Calcium improves mechanical function and carbohydrate metabolism following ischemia in isolated bi-ventricular work-

- ing hearts from immature rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 1996 ; 28 : 1501 1514
- 9) Lopaschuk GD, Collins-Nakai R, Olley PM, Montague TJ, McNeil G, Gayle M, Penkoske P, Finegan BA : Plasma fatty acid levels in infants and adults following myocardial ischemia. *Am Heart J* 1994 ; 128 : 61 67
- 10) Broderick TL, Quinney HA, Lopaschuk GD : Beneficial effect of carnitine on mechanical recovery of rat hearts reperfused after a transient period of global ischemia is accompanied by a stimulation of glucose oxidation. *Circulation* 1993 ; 87 : 972 981
- 11) McVeigh JJ, Lopaschuk GD : Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. *Am J Physiol* 1990 ; 259(Heart Circ. Physiol. 28) : H 1079 H 1015
- 12) Kusuoka H, Marban E : Cellular mechanisms of myocardial stunning. *Annu Rev Physiol* 1992 ; 54 : 243 256
- 13) Vandenberg JI, Metcalfe JC, Grace AA : Mechanism of pH_i recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circ Res* 1993 ; 72 : 993 1003
- 14) Nakanishi T, Gu H, Seguchi M, Cragoe Jr EJ, Momma K : HCO_3^- -dependent intracellular pH regulation in the premature myocardium. *Circ Res* 1992 ; 71 : 1314 1323
- 15) Pridjian AK, Levitsky S, Krukenkamp I, Silverman NA, Feinberg H : Developmental change in reperfusion injury. A comparison of intracellular cation accumulation in the newborn, neonatal, and adult heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987 ; 93 : 428 433
- 16) Nakanishi T, Jarmakani JM : Developmental changes in myocardial mechanical function and subcellular organelles. *Am J Physiol* 1984 ; 246 (Heart Circ. Physiol. 15) : H 615 H 625
- 17) Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Periasamy M : Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. *Am J Physiol* 1992 ; 262(Cell Physiol. 31) : C 614 C 620
- 18) Artman M : Sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchange activity and exchanger immunoreactivity in developing rabbit hearts. *Am J Physiol* 1992 ; 263 (Heart. Circ. Physiol. 32) : H 1506 1513
- 19) Riva E, Hearse DJ : Isolated, perfused neonatal rat heart preparation for studies of calcium and functional stability. *Ann Thorac Surg* 1991 ; 52 : 987 992
- 20) Fujimoto S : Effect of pimobendan, its active metabolite UD-CG 212, and milrinone on isolated blood vessels. *Eur J Pharmacol* 1994 ; 265 : 159 166
- 21) van Meel JCA, Entzeroth M, Redemann N, Haigh RM : Effect of Pimobendan and Its Metabolite on Myofibrillar Calcium Responsiveness and ATPase Activity in the Presence of Inorganic Phosphate. *Arzneim-Forsch Drug Res* 1995 ; 45(I) , 2 : 136 141
- 22) Pearl JM, Laks H, Drinkwater DC, Meneshian A, Sun B, Gates RM, Chang P : Normocalcemic blood or crystalloid cardioplegia provide better neonatal myocardial protection than does low-calcium cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 ; 105 : 201 206
- 23) Aoki M, Nomura F, Kawata H, Mayer E : Effect of calcium and preischemic hypothermia on recovery of myocardial function after cardioplegic ischemia in neonatal lambs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 ; 105 : 207 213

The Benefit of Calcium of The Mechanical Functional Recovery of Reperfused
Isolated one-week-old rabbit hearts

Shinji Teramachi, Toshiyuki Itoi and Zenshiro Onouchi

Division of Pediatrics, Children's Research Hospital, Kyoto Prefectural University of Medicine

We studied whether increased Ca^{2+} influx into myocardium is detrimental for reperfused immature hearts.

Isolated working hearts from 1-week-old rabbits were subjected to 40 min period of global ischemia followed by 30 min of aerobic reperfusion. Perfusate contained 5.5 mM glucose, 1.2 mM palmitate, 3% albumin, containing either : Group 1 : 1.75 mM Ca^{2+} throughout the perfusion period. Group 2 : 1.75 mM Ca^{2+} +300 μM amiloride (inhibitor of Na^+/H^+ exchanger) from 5 min before ischemia. Group 3 : 2.5 mM Ca^{2+} following ischemia. Group 4 : 1.75 mM Ca^{2+} +400 μM pimobendan (calcium sensitizer) following ischemia. Pimobendan enhances the Ca^{2+} sensitivity of troponin C. It also increases Ca^{2+} inflow into myocardium and enhance the Ca^{2+} release and uptake of sarcoplasmic reticulum with decrease of activity of phosphodiesterase III. Mechanical function of hearts was evaluated by heart rate \times aortic peak systolic pressure.

The functional recovery of hearts in Group 1 after ischemia was 45% of preischemia. It has been reported that addition of amiloride resulted in improving functional recovery of reperfused adult hearts by limiting Ca^{2+} entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. But, there was no significant difference between Group 1 and Group 2. The significant improvements of contractile function were seen in Group 3 and Group 4. The mechanical function of hearts in Group 3 recovered to 130% of preischemia and in Group 4, it recovered to 113% of preischemia. These data suggested that not the Ca^{2+} overload but the decrease of Ca^{2+} sensitivity be one cause of functional depression of reperfused immature hearts and that the increase of Ca^{2+} influx into myocardium to a certain degree or the rise of Ca^{2+} sensitivity of myocardium be not detrimental but beneficial for functional recovery of reperfused immature hearts just after ischemia.
