

新生仔および成熟モルモットの working heart model の確立とそれを用いた warm terminal crystalloid cardioplegia 法の実験的検討

新潟大学医学部第2外科（主任：江口昭治教授）

高橋 善樹

The Working Heart Model for Neonatal and
Adult Guinea Pig, and Effect of Warm
Terminal Crystalloid Cardioplegia
Thereupon.

Yoshiki TAKAHASHI

*Second Department of Surgery, Niigata
University School of Medicine.
(Director: Prof. Shoji EGUCHI)*

We established the neonatal (5~7 days) and adult (2 months) guinea pig working heart model and compared myocardial ions, adenosine triphosphate (ATP) contents and Na-K ATPase activity. We found differences in magnesium and adenosine triphosphate content, Na/K ratio and Na-K ATPase activity between the normally perfused neonatal and the adult hearts. To study the effects of warm terminal crystalloid cardioplegia, oxygenated and prewarmed cardioplegic solution was administered at the end-ischemic period. Postischemic cardiac functions were improved in both age groups with this treatment. However, the significant reduction of the incidence of ventricular fibrillation and the lactate dehydrogenase release were observed only in the adult heart. Myocardial calcium tended to be lower and ATP, higher in the treatment group both in the neonatal and adult hearts. These results suggest the effectiveness of warm terminal cardioplegia for reduction of the reperfusion injury and for better recovery of cardiac function.

Key words: guinea pig, working heart model, warm terminal cardioplegia, ischemia-reperfusion injury, myocardial ion content

モルモット、拍出心モデル、加温心筋保護液再灌流直前投与法、虚血—再灌流障害、心筋イオン含量

Reprint requests to: Yoshiki TAKAHASHI,
Second Department of Surgery, Niigata
University School of Medicine, 1-757,
Asahimachi-dori, Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町757
新潟大学医学部第2外科学教室 高橋 善樹

はじめに

現在心臓手術が安全に広く行われるようになったのは、もっぱら心筋保護法の進歩によると言っても過言ではない。しかし、心筋保護液の保護効果は未熟心と成熟心とは異なるといわれており、未熟心に対する効果についてはなお検討の余地が残っている。心筋保護液に関する実験的検討は、これまでほとんど、ウサギ、ラットを用いて行なわれてきているが、心筋保護液の効果には、動物種による差があるといわれている¹⁾。そこで心機能評価実験にわれわれがしばしば用いてきたモルモットを用いて、心筋保護液の効果について再検討を加えた。多くの施設では心腔内に挿入したバルーンにより等容性収縮による圧変化を測定することで心機能を評価する Langendorff 式灌流標本が用いられてきているが、灌流液を拍出し外的仕事を行なっている状態で心機能の評価を行なうことの出来る working heart model を採用し、大動脈流量回復率で心機能を評価するとともに、心室細動発生率、lactate dehydrogenase (LDH) 漏出量、心筋組織イオン含量 (カルシウム、カリウム、ナトリウム、マグネシウム)、心筋組織高エネルギー磷酸化合物含量などについて検討を行なった。モルモット新生仔心で working heart model を作製したという報告はこれまで皆無であり、新生仔心と成熟心との比較にモルモット心 working model を用いたものはこの研究しかない。

本研究では、血液加心筋保護液に比べ、調整や投与手法が簡便で現在も臨床的に広く用いられている晶質保護液により導入された虚血の後の再灌流時にさらに加温酸素化した晶質心筋保護液を投与し、その上で通常の灌流を行なう Warm terminal cardioplegia 法に着目し研究を行なった。1986年に Buckberg らが、虚血後の再灌流を徐々に行なったり²⁾、再灌流時の灌流液組成を変えたりして³⁾⁴⁾、再灌流をいかに行なうかによって心機能の転帰が異なることを示して以来、controlled reperfusion の重要性が認められるようになり、様々な試みがなされているが、これまでの研究にはすべて血液加心筋保護液が用いられており晶質心筋保護液による研究はいまだなされていない。

対象と方法

新生モルモットとして生後5~7日 (体重 80~160 g)、成熟モルモットとして生後2カ月 (体重 460~570 g) のハートレー系モルモットを用いた。動物の扱いは実験動

表 1 新生仔および成熟モルモットの予備実験結果

	neonate n = 5	adult n = 6
体重 (g)	112±2	534±13
収縮期圧 (mmHg)	51±1	83±4
拡張期圧 (mmHg)	35±1	42±3
脈圧 (mmHg)	16±2	41±3
平均大動脈圧 (cmH ₂ O)	60±1	78±4
心拍数 (beats/min)	384±16	332±8

ウレタン麻酔・自発呼吸下でのデータ
値は平均値±標準誤差

物取扱規約に則って行なった。

実験 1

モルモット心の working model については前負荷や後負荷などについて詳細に検討した報告もなく、まして新生仔のモデルについては報告が皆無なので、実験に先立ち Baker⁵⁾ らが用いた手法に準じ適正灌流圧を設定するための予備実験を行なった。実験は新生仔、成熟モルモットそれぞれ6例を用いて行なった。後負荷の設定に使った動物は、実験30分前に体重当たり 500 単位のヘパリンを腹腔内投与した上で、体重あたり 10 mg のウレタンを腹腔内投与して麻酔した。自発呼吸下に頸動脈より大動脈内へ挿入したポリエチレンチューブにより大動脈平均圧と大動脈圧曲線を記録した結果を表 1 に示す。大動脈平均圧は新生仔で、61 cm H₂O、成熟モルモットでは 78 cm H₂O で、成熟心については従来の報告⁶⁾と同様の結果であった。

これら平均大動脈圧を後負荷として実際に working heart model 実験装置を用いて前負荷の決定を行なった。前負荷すなわち左房チャンバーの高さを変化させて心機能曲線を描き (図 1)、得られた大動脈最大流量の75%を与える高さ即ちそれぞれ 5.3 cm H₂O、8.6 cm H₂O を前負荷に選んだ。75%を選んだのは、摘出心臓では最大外的仕事をさせると早い時期に疲労が発現しモデルの経時的安定性が損なわれるからである。灌流実験装置に用いたガラス管は成熟心で最大拍出流量を得るに十分な左房流入量を確保できる内径 2 mm のものを選んだ。摘出心の大動脈に挿入する大動脈カニューレは新生仔で内径 1.4 mm、成熟心で 2 mm のポリエチレン製のものを用いた。working heart model では動脈抵抗を模倣する回路内の緩衝空気室の空気容量も重要であるが、さきのウレタン麻酔下で得られた大動脈圧曲線の脈圧に近似するようその容量を決定し、新生仔心で 4 ml、成

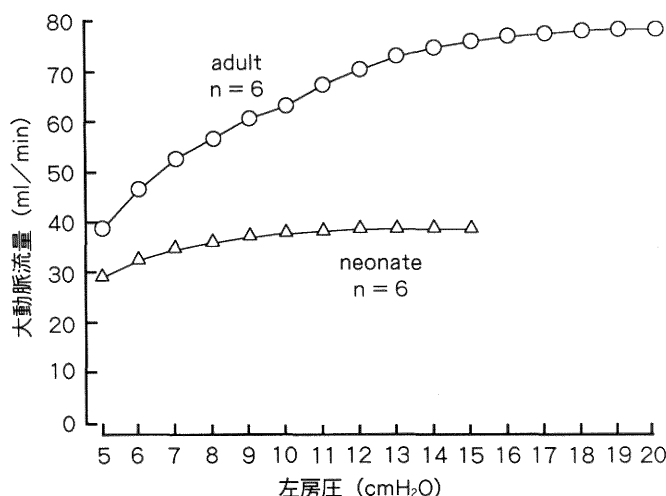


図 1 左房圧を変化させた際の大動脈流量の変化

熟心で 8 ml とした。

実験 2

実験に用いた回路の概略を図 2 に示す。灌流液には Krebs-Henseleit 液 (NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, glucose 5.5, pyruvic acid 2.5, 単位はいずれも mmol/L, pH 7.4) を用い、酸素分圧が 600 torr 以上になる様、回路内の 3 カ所で混合ガス (95% O₂ + 5% CO₂) で十分酸素化した。大動脈より拍出された灌流液は再灌流し、冠灌流液は廃液した。

エーテル麻酔したモルモットより心臓をすばやく摘出し回路に装着、15分の Langendorff 式灌流の後、20分間 working mode で作動させた。終わりの 1 分間の冠灌流液を集めて initial perfusion 時の冠灌流量とした。緩衝空気室に接続した圧トランスデューサーにより大動脈圧を記録し、その信号で心拍数計を駆動して心拍数を記録した。大動脈流量は大動脈流出側回路に設置した電磁流量計を用いて経時的に記録し working mode の最終値を initial perfusion 時の値とした。表 2 に initial perfusion のデータ (虚血導入前値) をまとめて示す。

Working mode 終了時に、新生仔、成熟モルモットそれぞれ 6 例を、虚血導入前細胞内イオン含量測定に、また同じくそれぞれ 6 例の新生仔、成熟モルモットを Na-K ATPase 活性と心筋組織高エネルギー磷酸化合物測定に供した。実験のプロトコルを図 3 に示す。

晶質心筋保護液として臨床で広く用いられている St. Thomas 2 号液 (NaCl 110, KCl 16, MgCl₂ 16, CaCl₂

表 2 虚血導入前の心機能測定値

	neonate n = 6	adult n = 6
大動脈流量 (ml/min)	27.7 ± 3.0	102.3 ± 4.6
冠灌流量 (ml/min)	6.0 ± 1.0	20.4 ± 0.7
心拍数 (beats/min)	270.2 ± 8.7	226.2 ± 4.7

Langendorff 式灌流 15 分に次ぐ working mode 20 分後の測定値。値は平均値 ± 標準誤差

1.2, NaHCO₃ 10, glucose 5.5, lidocaine 1.0, いずれも単位は mmol/L, pH 7.8) を用い、25℃ に加温酸素化した液を体重あたり 20 ml, 後負荷と同じ灌流圧で投与して虚血心停止を起こした。虚血心停止時間は 150 分とした。その間心臓は恒温ジャケットで囲い心筋温を 25℃ に維持した。

対照群は、再灌流の最初の 3 分も含め一貫して 37℃ の Krebs-Henseleit 液で灌流したが、処置群には、再灌流の最初の 3 分間、37℃ に加温酸素化した St. Thomas 液を同じ灌流圧で投与し、その後 Krebs-Henseleit 液の灌流に切り替えた。再灌流開始後最初の 15 分間は Langendorff 式に灌流し、その後 20 分の working mode とし、working mode の終了時に大動脈流量などを測定した。実験に供した動物数はイオン測定に関しては、新生仔心の対照群、処置群が各 6 例、成熟心の対照群例、処置群が各 7 例、また高エネルギー磷酸化合物測定に関しては新生仔心の対照群、処置群が各 6 例、成熟心の対照群 6 例、処置群 7 例であった。再灌流開始直後から Langendorff 式灌流の間の 15 分間の灌流液を集めて LDH

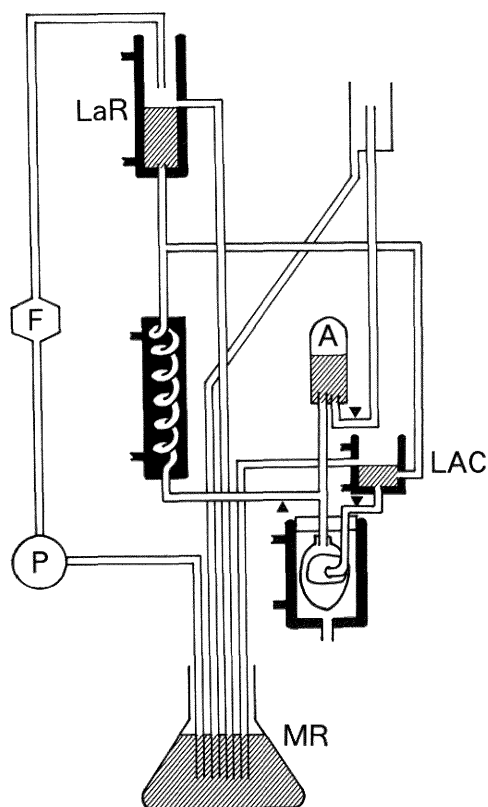


図2 回路模式図

▼: Langedorff 式灌流時には遮断, ▲: working mode 時には遮断, LaR: Langedorff リザーバー, MR: メインリザーバー, LAC: 左房チャンパー, A: 緩衝空気室, F: フィルター, P: ポンプ

漏出量を測定した。

細胞内イオン含量測定

イオン測定は Alto-Dahlla らの方法⁷⁾に従って作成し、氷冷した sucrose-histidine buffer (sucrose 0.35 M, histidine 5 mM, pH 7.4, カルシウム, ナトリウム, マグネシウム, カリウムはいずれも検出されない) を流出側回路を遮断した上で大動脈カニューレの基部より新生仔心では 6 ml, 成熟心では 12 ml, 約90秒かけて注入し、いわゆる flush-out 法で細胞外液を洗い出した上で行なった。切除した心室筋部分は、さらに 2~3 ml の sucrose-histidine buffer で洗った上で濾紙で buffer を十分除去し、液体窒素で -80℃ に凍結し粉末とした。以後の操作に用いた実験器具はイオンの混入を避けるため、すべて 1N の塩酸処理を行なった。湿重量測定後、90℃ で24時間オープンで乾燥させ乾燥重量を測定してから Sparrow-Johnstone らの方法⁸⁾でイオンの抽出を行なった。%水分含量は次式に従って算出した。

$$(1 - (\text{dry weight} / \text{wet weight})) \times 100$$

イオン濃度の測定には原子吸光分光高度計 (日立 180-30) を用い、カルシウム、マグネシウムは原子吸光法で、ナトリウム、カリウムは炎光度法で測定した。

Na-K ATPase 活性

大動脈遮断後すばやく切除した心室筋をただちに Wollenberger tongs で -80℃ に凍結し粉末化した。このようにして得られた試料を氷冷磷酸緩衝液中で Kinematica 社製ポリトロンホモゲナイザーで、ダイヤ

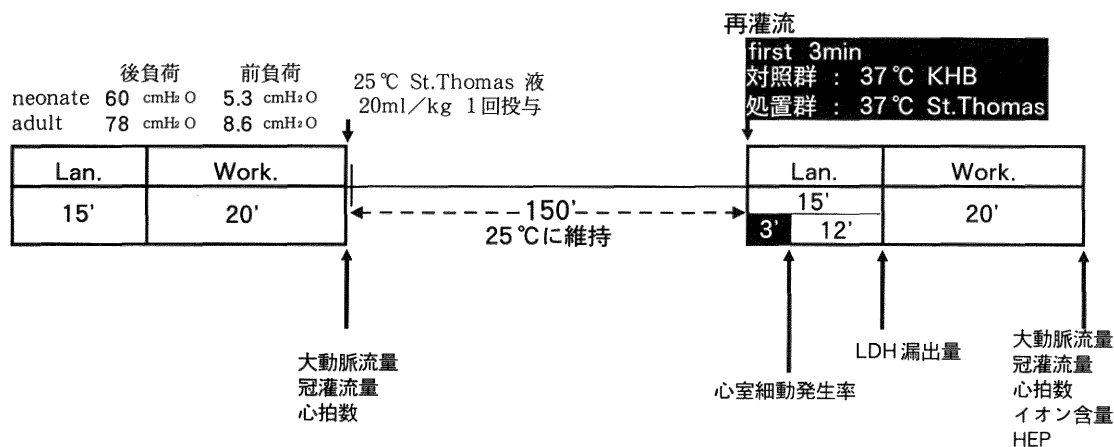


図3 実験プロトコル

Lan.: Langedorff 式灌流, Work.: Working mode, KHB: Krebs-Henselite 液, HEP: High energy phosphates

ル8で30秒の間隔をおき15秒間4回ホモゲナイズした。得られたホモジェネートを Imai らの方法⁹⁾にしたがい 1 mM の ouabain 存在下と非存在下に、正確に37℃, 20分, 測定試薬 (NaCl 130, KCl 20, Tris-malate 20 (pH 7.5), EGTA/Tris 1, NaN₃ 10, MgCl₂ 2, ATP/Tris 2, 単位はいずれも mM) と反応させ、遊離する無機リンを malachite green method¹⁰⁾ で測定し、ouabain 存在下の値と非存在下の値の差を Na-K ATPase 活性とした。

心筋高エネルギー磷酸化合物

前項と同様の方法で得られた心筋の凍結粉末に 0.6 N

の過塩素酸を加えて除蛋白した抽出液を Khym の方法¹¹⁾で中和した後 Sellevold らの方法¹²⁾に従い High performance liquid chromatography を用いて測定した。分離カラムにはウォーターズ社製 Radial-Pak μ Bondapak C 18 を使用し、移動相担体には KH₂PO₄ 120 mM (pH 6.25), tetrabutylammonium hydrogen sulfate 2.3 mM, acetonitrile 4.5 % の組成の緩衝液を用い、210 nm の波長で吸光度を測定した。

LDH 測定は酵素法¹³⁾にて行なった。なお心筋保護液が混入することによる測定上の影響がないことを確認した。

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。心室細

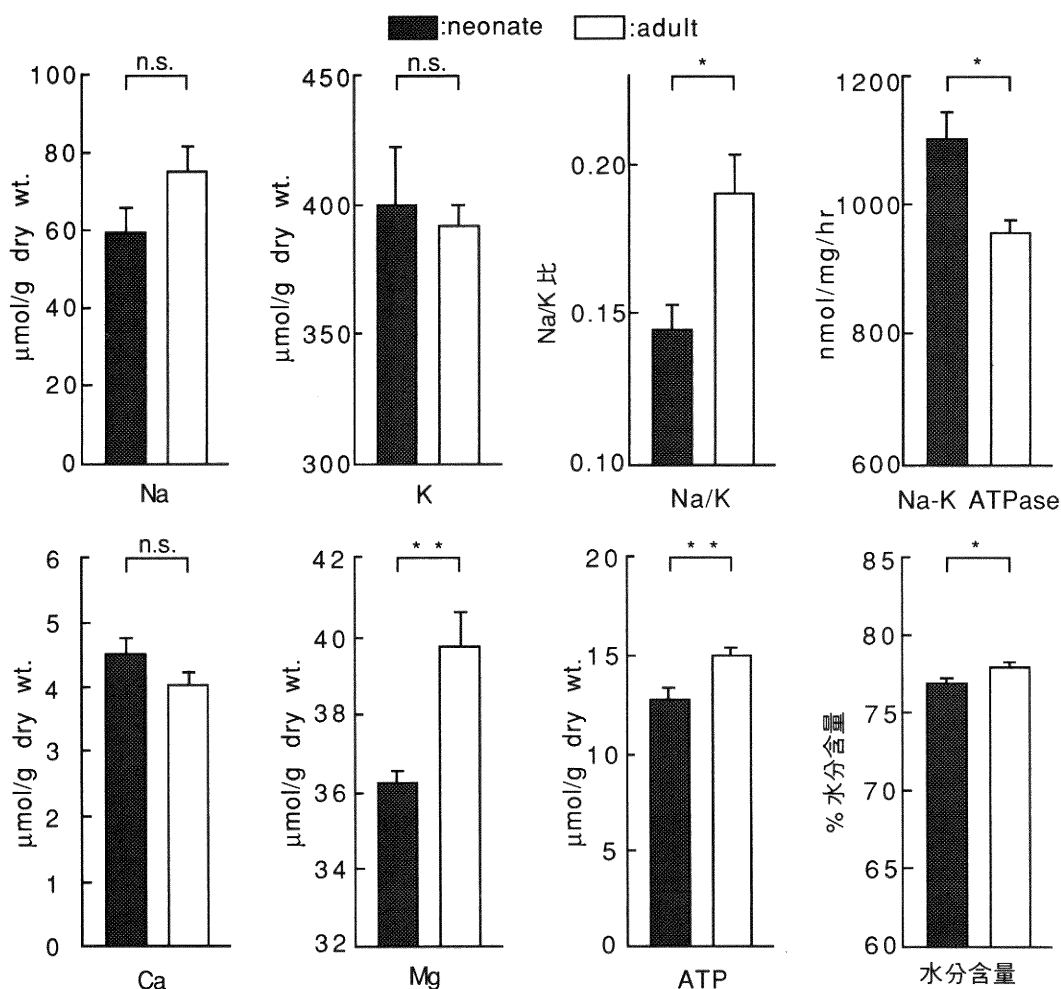


図4 虚血導入前の新生仔および成熟心のデータ
値は平均値±標準誤差 *p<0.05 **p<0.01

動の発生頻度についてはカイ2乗検定を、それ以外のデータについては non-paired t test を用いて検定を行ない、有意水準 0.05 をもって有意とした。

結 果

1. 虚血導入前値の比較 (図 4)

細胞内ナトリウムは新生仔で 58.5 ± 5.7 , 成熟モルモットで $74.9 \pm 6.1 \mu\text{mol/g dry weight}$ で新生仔で低い傾向にあったが両者の間に有意の差は認められなかった。細胞内カリウムは新生仔で 399.9 ± 18.5 , 成熟モルモットで $390.9 \pm 8.8 \mu\text{mol/g dry weight}$ と新生仔で高い傾向を認めた。Na/K 比は新生仔で 0.145 ± 0.008 , 成熟モルモットで 0.191 ± 0.012 と新生仔の方が有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。Na-K ATPase 活性は新生仔で 1100 ± 43 , 成熟モルモットで $957 \pm 18 \text{ nmol/mg protein/hr}$ と新生仔で有意 ($p < 0.05$) に高く, Na, K に関する所見を支持する結果であった。細胞内カルシウムは新生仔で 4.53 ± 0.23 , 成熟モルモットで $4.06 \pm 0.16 \mu\text{mol/g dry weight}$ と有意ではないが新生仔で高い傾向を示した。これに対して Mg は新生仔で 36.2 ± 0.3 , 成熟モルモットで $39.8 \pm 0.9 \mu\text{mol/g dry weight}$ と新生仔で有意 ($p < 0.01$) に低値を示した。％水分含量は新生仔, 成熟モルモットでそれぞれ 77.0 ± 0.3 , 78.2 ± 0.3 % であり新生仔で低かった。

2. 大動脈流量回復率 (図 5)

大動脈流量回復率は新生仔で対照群 62 ± 5 %, 処置群 76 ± 3 %, 成熟心で対照群 41 ± 3 %, 処置群 58 ± 4 % であり, 対照群での比較では新生仔心の方が回復率は有意 ($p < 0.01$) に高かった。新生仔でも成熟心でも処置群で再灌流後の心機能回復は有意に高かった。

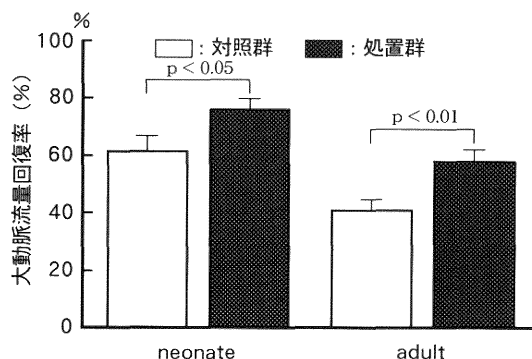


図 5 大動脈流量回復率
値は平均値 ± 標準誤差

3. 心室細動発生率 (図 6)

再灌流後の心室細動発生率は, 新生仔心では対照群で 36%, 処置群で 45% と両者に有意の差を認めなかった。これに対し成熟心では対照群 69%, 処置群 14% と対照群では新生仔心より不整脈の発生頻度は高率であるのに, 処置群では新生仔よりも低く, 処置による改善は有意であった。なお成熟心の対照群につき再灌流時に心室細動を認めたものと認めなかったものを分けて, 再灌流後の心機能を比較してみたが有意な差は認められず, 心室細動の有無は再灌流後の心機能には影響しないと考えられた。なお再灌流時に心室細動が認められても 5 分以内にいずれも自然除細動となった。

4. LDH 漏出量 (図 7)

再灌流開始後 15 分間の灌流液中への LDH の漏出量は新生仔心では, 対照群で 6.51 ± 0.98 , 処置群で 4.69 ± 0.76 と処置群で低い傾向が認められたが, 有意の差ではなかった。これに対し成熟心では対照群 3.19 ± 0.43 ,

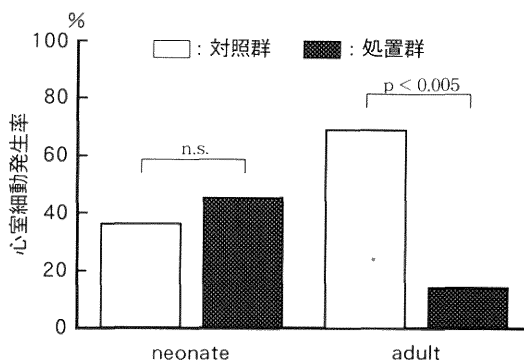


図 6 心室細動発生率

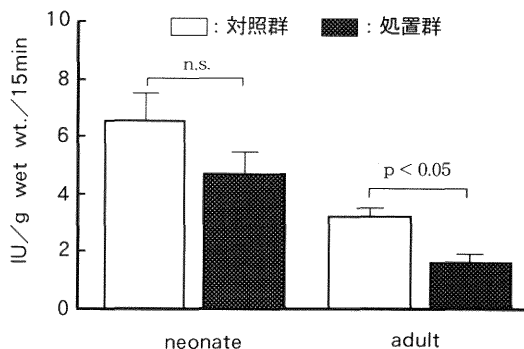


図 7 再灌流 15 分間の LDH 漏出量
値は平均値 ± 標準誤差

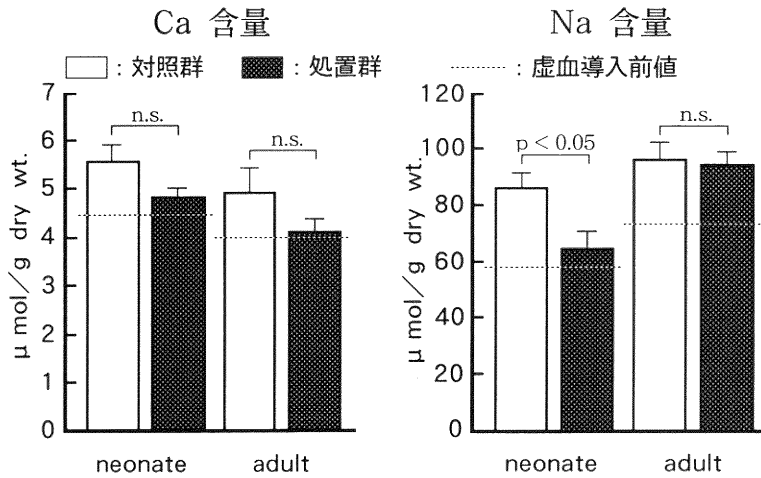


図 8 細胞内カルシウムとナトリウム含量の変化
値は平均値±標準誤差

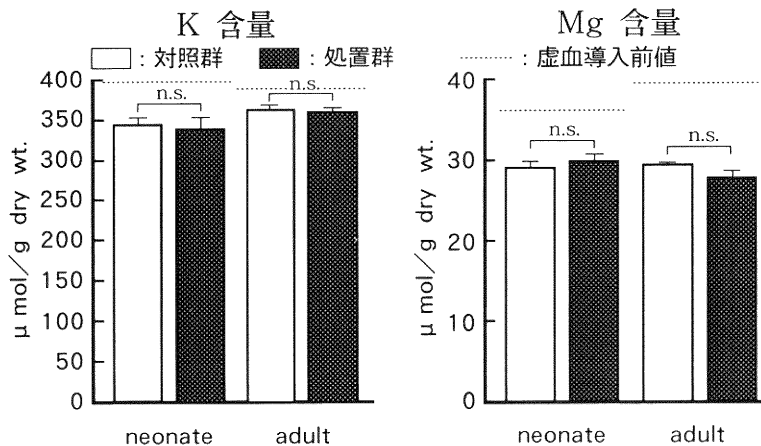


図 9 細胞内カルシウムとマグネシウム含量の変化
値は平均値±標準誤差

処置群 1.59 ± 0.39 IU/g·wet wt./15 min と処置群で有意に低かった。

5. 心筋細胞内イオン含量

カルシウム含量 (図 8)

新生仔心では対照群 5.63 ± 0.36 , 処置群 4.90 ± 0.17 , 成熟心では対照群 4.94 ± 0.50 , 処置群 4.13 ± 0.26 μ mol/g·dry wt. といずれの心臓でも有意ではなかったが処理により細胞内カルシウム含量上昇は軽減する傾向を示した。

ナトリウム含量 (図 8)

新生仔心は対照群 87.29 ± 5.55 , 処置群 65.22 ± 6.86 で両者の間に有意差が認められたが, 成熟心では, 対照群で 96.3 ± 6.1 , 処置群で 94.8 ± 4.3 μ mol/g·dry wt. とどちらの群も同程度の上昇を示し, 処置による変化は認められなかった。

カリウム含量 (図 9)

新生仔心では対照群 343.1 ± 9.0 , 処置群 337.8 ± 14.7 , 成熟心では対照群 360.9 ± 7.6 , 処置群 360.2 ± 4.6 μ

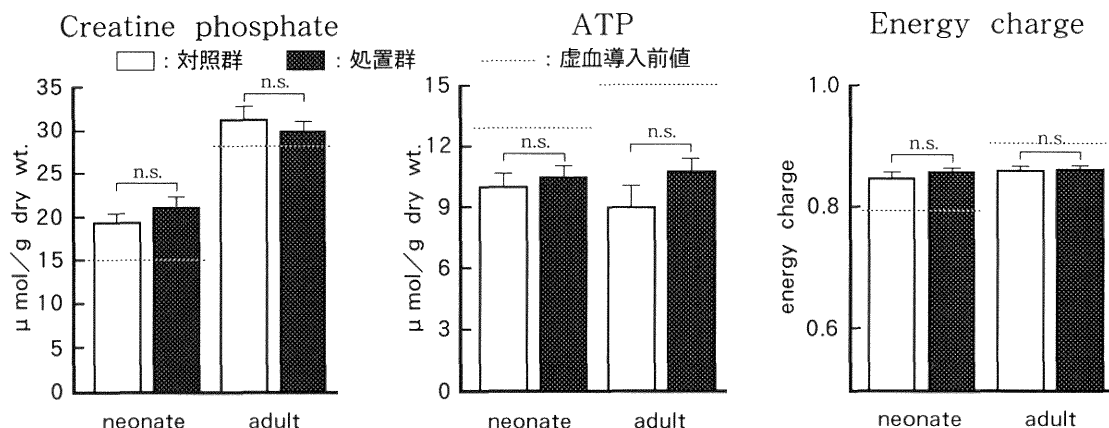


図 10 高エネルギー磷酸化合物含量の変化
値は平均値±標準誤差

mol/g·dry wt. といずれにおいても処置による有意な変化は認められなかった。いずれの群においても再灌流後の値は、虚血導入前値よりも有意（新生仔および成熟心ともに $p < 0.05$ ）に低かった。

マグネシウム含量 (図 9)

新生仔では対照群 29.0 ± 0.8 , 処置群 29.9 ± 0.9 , 成熟心では対照群 29.5 ± 0.3 , 処置群が $27.9 \pm 0.8 \mu\text{mol/g} \cdot \text{dry wt.}$ といずれにおいても処置による有意な変化はなかった。いずれの群においても再灌流後の値は虚血導入前の値よりも有意（新生仔心 $p < 0.05$, 成熟心 $p < 0.01$ ）に低かった。

6. 心筋組織高エネルギー磷酸化合物 (図10)

クレアチン磷酸は新生仔の対照群で 19.7 ± 1.1 , 処置群で 21.4 ± 1.3 , 成熟心の対照群で 31.3 ± 1.6 , 処置群で $29.8 \pm 1.3 \mu\text{mol/g} \cdot \text{dry wt.}$ と再灌流心では虚血導入前値に比べ有意ではないものの高い傾向を示したが、処置による有意な変化は認められなかった。再灌流後の adenosine triphosphate (ATP) は虚血導入前値に比べ低値で、新生仔の対照群で 10.1 ± 0.7 , 処置群で 10.5 ± 0.6 , 成熟心の対照群で 9.0 ± 1.1 , 処置群で $10.8 \pm 0.7 \mu\text{mol/g} \cdot \text{dry wt.}$ であった。処置心での ATP の回復は有意ではないが、対照群よりやや高い傾向を示した。energy charge $((\text{ATP} + \text{ADP}/2)/\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ は、新生仔の対照群で 0.85 ± 0.01 , 処置群で 0.86 ± 0.01 , 成熟心の対照群で 0.86 ± 0.01 , 処置群で 0.86 ± 0.01 といずれにおいても対照群と処置群との間には有意な差は認められなかったが、虚血導入前値と比較すると新生仔では高くなる傾向を、成熟心では低くな

る傾向を示した。

7. %水分含量

新生仔の対照群で 78.5 ± 0.4 , 処置群 $77.9 \pm 0.3\%$, 成熟心の対照群で 80.5 ± 0.2 , 処置群 $80.2 \pm 0.2\%$ と処置による有意な変化は認められなかった。

考 察

小動物の摘出心を用いた心筋組織障害の研究には、従来 Langendorff 式灌流標本が広く用いられてきた。大動脈を介して灌流装置に装着され、酸素化した灌流液を逆行性に冠状動脈に流すことで栄養された心臓で、左室内に挿入したバルーンの内圧の変化を記録することによって心機能の評価するこの標本には、装置が簡便で冠灌流圧のみ決定してやればよいという長所がある反面、外的仕事が少ないという欠点がある。これに対して Neely ら¹⁴⁾ が報告した Working Heart model は、灌流液を拍出している心臓で大動脈拍出量をもって心機能の評価できるのが長所であるが、前負荷や後負荷、実際の動脈系と同じような弾性抵抗をもつ緩衝空気室を回路内にもうけなければならず回路が複雑になるので、小動物への応用は必ずしも容易でない。そこで、1. 心拍数が増加すると拍出量も増加する positive staircase phenomenon を有する、2. 活動電位に plateau phase がある、3. 強心配糖体に対する反応やヒスタミンに対する反応などがヒト心筋と類似している¹⁵⁾ 等の性質を持ち、モデルとして使用するにはラットよりも適していると思われるモルモットでは、これまで新生仔心と成熟心の比較検討に working model を用いた報告はなかった。一方、

本論文の主題である心筋保護液の未熟心と成熟心とでの効果の違いには、動物の種による差があると言われており¹⁾、ラットやウサギ以外の動物を用いた研究も必須と考え、モルモット心の working model の作製を志し in vivo での予備実験を行ない working model の作製に必要な各種のパラメータを決定した。なお、成熟モルモットについても予備実験を行なったが、得られた各種のパラメータは従来の報告¹⁵⁾ とほぼ同じであった。

心筋保護法において現在使用されている St. Thomas 液などの心筋保護液はラット成熟心筋を用いて実験的にその組成が決定されたという経緯があり¹⁶⁾、動物種差はさておくとしてもそのまま未熟心筋にも通用するものかどうか明らかでなく現在も議論のあるところである。未熟心筋では収縮連関に関与する細胞質内 Ca の代謝調節機構が成熟心のそれとは異なること¹⁷⁾、Na-K ATPase 活性¹⁸⁾、Ha-H exchange 活性¹⁹⁾、Na-Ca exchange 活性²⁰⁾ が高いことなどが報告されており、当然細胞内のイオン環境は成熟心とは異なると想像されるが、今回の実験でも虚血導入前の比較で、新生仔心と成熟心との間には、細胞内カリウムやナトリウムに有意な差はなかったが、Na/K 比は新生仔で有意に低く、Na-K ATPase 活性は有意に高かった。Uemura らも、有意差は認めていないが、細胞内カリウム含量は、成熟心で 397 mmol/kg dry weight、新生仔心で 480 mmol/kg dry weight と新生仔心で高い傾向を認めている²¹⁾。細胞内マグネシウムはその大部分が ATP と複合体を作って存在すると言われているが、新生仔心筋の細胞内マグネシウム、ATP は、成熟心筋に比し有意に低かった。また、%水分含量は未熟心筋では成熟心筋に比べ低いとされている²²⁾ が今回の実験の結果も同様であった。これらの差異が存在することをふまえ、今後未熟心筋に対する心筋保護液の組成に関してはさらに研究を重ねる必要がある。

虚血後の再灌流をいかに行うかという controlled reperfusion の概念が心筋保護液によりもたらされた虚血心停止後の再灌流にも導入され、様々な検討がなされているが、これまでの研究は主に blood cardioplegia について行われており、crystalloid cardioplegia についての検討はない。crystalloid cardioplegia の代表である St. Thomas 2 号液を加温、酸素化して再灌流時に投与するという warm terminal cardioplegia 法についての今回の検討で、crystalloid cardioplegia でも心機能の有意の改善がもたらされることが初めて明らかとなった。

虚血に対する抵抗性や心筋保護液の保護効果が未熟心

筋と成熟心筋とで異なることについては既に広く論じられている。未熟心筋では glycogen 含量が成熟心よりも高いので、虚血に陥った場合も glycolysis により心筋は良く虚血に耐えるが²³⁾、心筋保護液を繰り返し投与した場合の保護効果は、成熟心に比べ劣っており、低温のみの方がよいとか、(虚血導入前の) St. Thomas 液一回投与の方が頻回投与より再灌流後の心機能回復は良いとか²²⁾、一回投与では成熟心より高い保護効果が得られるといった²⁴⁾ 報告がなされている。今回の実験も一回投与であり新生仔心の方が心機能の回復はよいという結果であった。

虚血心筋ではその早期より細胞内カリウムが低下し、その後ナトリウムが上昇し²⁵⁾、再灌流時に Na/Ca exchange が働き、細胞内カルシウムが上昇する²⁶⁾ こと、再灌流後の障害の程度はこれらのイオンの変化に依存することはこれまでにも言われているが、虚血再灌流障害の指標としての再灌流後の細胞内イオン含量の変化は今回の実験でも認められた。虚血再灌流による心筋イオン動態の変化の未熟心と成熟心とでの差異については Langendorff 灌流モデルを用いた実験で Ca, Na について検討されており、成熟心筋で有意な上昇を認めない虚血時間で未熟心筋では再灌流直前にすでに細胞内カルシウム、ナトリウム含量の有意な上昇が認められ、再灌流前の細胞内ナトリウムのこのような上昇が再灌流による更なるカルシウムの上昇をきたすと報告され、その原因として、虚血中の膜イオン透過性や Na/Ca exchange, Ca channel の特性の違いが推定されている²⁷⁾。今回の実験では、細胞内カルシウム蓄積は、新生仔においても成熟心においても、warm terminal crystalloid cardioplegia 処置により有意ではないが抑制される傾向を示したが、細胞内ナトリウムに関しては、新生仔心では改善方向への有意な変化が認められているのに、成熟心では明らかな変化は認められず、両者の反応に差異があることが判明した。細胞内カリウムやマグネシウムの動きには、新生仔心でも成熟心でも、warm terminal cardioplegia 処置による変化は認められなかったが、マグネシウムについては、30分の global ischemia の後の再灌流でもその 2% が失われるにすぎず虚血再灌流後の心機能低下の主原因とは考えられないと言う報告があるが²⁸⁾、今回の実験ではマグネシウムは新生仔心で約 20%、成熟心で約 35% も喪失していた。

Warm terminal blood cardioplegia 法では、通常の血液による再灌流に比べ再灌流時の心室細動が抑制され、心外膜下のクレアチン磷酸、ATP の回復がよくなり、

組織学的にも細胞障害の軽減が見られ、心筋の収縮能は改善すると報告されている²⁹⁾が、cardioplegia に晶質液を用いた今回の実験でも、成熟心では心室細動の有意の改善が認められた。再灌流時の心室細動発現の抑制には、心筋保護液中に 1 mmol と多量に含まれる lidocaine が成熟心では大きな意味を持つものと思われたが、新生仔心において心室細動の抑制効果が認められなかった理由については不明である。今回の実験では lidocaine の作用についての検討は加えていないが、最近の報告では、不整脈の抑制のみならず free radical scavenger として作用することにより再灌流時の細胞膜障害を軽減し³⁰⁾、虚血によって引き起こされる静止張力の増加や心筋組織へのカルシウム蓄積、心筋からの Creatine Phosphokinase 漏出も抑制すると報告され³¹⁾ている。今回の実験で成熟心で認められた LDH 漏出量の有意の減少や心機能の改善にも何らかの効果を及ぼしているものと考えられる。LDH は心筋細胞質内に広く存在する cytosolic enzyme であり、その漏出の軽減は再灌流による膜障害の軽減を意味するものと考えられる。カルシウム蓄積の抑制傾向も含め、ここで認められた心機能の改善には膜障害の軽減が少なからず関与しているであろう。

Warm terminal crystalloid cardioplegia を用いた今回の実験で、ATP は、新生仔および成熟心の両者で有意ではないものの高い傾向を示したが、新生仔心では、energy charge は、対照群、処置群いずれにおいても虚血前値より高くなっているのに、成熟心では低下していた。虚血再灌流後の心機能はどちらでも明らかに低下しているので、新生仔では高エネルギー磷酸化合物の利用障害が、成熟心では高エネルギー磷酸化合物の産生障害が再灌流後の心機能低下の主因をなしていたものと思われる。

結 論

新生仔モルモットの working heart model を確立し、細胞内イオン含量および心筋組織高エネルギー磷酸化合物、Na-K ATPase 活性について成熟心との比較検討をおこない、両者の間にはいくつかの差異があることを明らかにした。

また、このモデルを用いて warm terminal crystalloid cardioplegia 法に関する実験的検討を行ない、心機能の改善が得られることを認めた。細胞内カルシウムの蓄積抑制傾向や LDH 漏出軽減に見られる膜障害の改善、ATP の改善傾向から読み取れるエネルギー代謝の改善

等を含む総合的ないわゆる再灌流障害軽減作用がその原因と思われるが、確実な証拠は得られていない。今後の更なる検討が必要と考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました江口昭治教授、研究に際して直接御指導、御助言を賜りました本学薬理学教室今井昭一教授に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Baker, J.E., Boerboom, L.E. and Olinger, G.N.: Is protection of ischemic neonatal myocardium by cardioplegia species dependent?. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **99**: 280~287, 1990.
- 2) Okamoto, F., Allen, B.S., Buckberg, G.D., Bugyi, H.I. and Leaf, J.: Reperfusion conditions: Importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **92**: 613~620, 1986.
- 3) Rosenkranz, E.R., Okamoto, F., Buckberg, G.D., Roberstone, J.M., Vinten-Johansen, J. and Bugyi, H.: Safety of prolonged aortic clamping with blood cardioplegia. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **92**: 428~435, 1986.
- 4) Okamoto, F., Allen, B.S., Buckberg, G.D., Young, H., Bugyi, H. and Leaf, J.: Reperfusate composition: Interaction of marked hyperglycemia and marked hyperosmolarity in allowing immediate contractile recovery after four hours of regional ischemia. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **92**: 538~593, 1986.
- 5) Baker, J.E., Boerboom, L.E. and Olinger, G.N.: Age-related changes in the ability of hypothermia and cardioplegia to protect ischemic rabbit myocardium. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **96**: 717~724, 1988.
- 6) Marshall, R.W. and Hanna, C.H.: Direct measurement of arterial blood pressure in the guinea pig. Proc. soc. Exp. Bio. Med., **92**: 31~32, 1956.
- 7) Alto, L.E. and Dhalla, N.S.: Myocardial cation contents during induction of calcium paradox.

- Am. J. Physiol., **237**: H713~719, 1979.
- 8) **Sparrow, M.P. and Johnstone, B.M.**: A rapid micro-method for extraction of Ca and Mg from tissue. *Biochem. Biophys. acta.*, **90**: 425~426, 1964.
- 9) **Imai, S., Yoshida, Y. and Sun, H-T.**: Sarcolemmal ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase of vascular smooth muscle and the effect of protein kinase thereupon. *J. Biochem.*, **107**: 755~761, 1990.
- 10) **Chan, K-M., Delfert, D. and Junger, K.D.**: A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.*, **157**: 357~380, 1986.
- 11) **Khym, J.X.**: An analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low pressure on conventional anion exchangers. *Clin. Chem.*, **21**: 1245~1252, 1975.
- 12) **Sellevoid, O.F.M., Jynge, P. and Aarstad, K.**: High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **18**: 517~527, 1986.
- 13) **Bergmeyer, H.U. and Bernt, E.**: Lactate Dehydrogenase in Method of Enzymatic Analysis Vol.2, 574~579: Verlag chemie Academic Press, New York and London, 1974.
- 14) **Neely, J.R., Liebermeister, H., Battersby, E.J. and Morgan, H.E.**: Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am. J. Physiol.*, **212**: 804~814, 1967.
- 15) **Flynn, S.B., Gristwood, R.W. and Owen, D.A.A.**: Characterization of isolated, working guinea-pig heart including effects of histamine and noradrenaline. *J. Pharmacol. Method.*, **1**: 183~195, 1978.
- 16) **Hearse, D.J., Braimbridge, M.V. and Jynge, P.**: Protection of the ischemic myocardium: cardioplegia. 1st ed.: Raven press, New York, 1981.
- 17) **Nakanishi, T. and Jarmakani, J.W.**: Developmental changes in myocardial mechanical function and subcellular organelles. *Am. J. Physiol.*, **246**: H615~625, 1984.
- 18) **Marsh, A.J., Lloyd, B.L. and Taylor, R.R.**: Age dependence of myocardial $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ activity and digitalis intoxication in the dog and guinea pig. *Circ. Res.*, **48**: 329~333, 1981.
- 19) **Meno, H., Jarmakani, J.M. and Philipson, K.D.**: Developmental changes of sarcolemmal Na-H exchange. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **21**: 1179~1185, 1989.
- 20) **Vetter, R. and Will, H.**: Sarcolemmal Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium uptake in developing chick heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **18**: 1267~1275, 1986.
- 21) **Uemura, S., Young, H., Matsuoka, S. and Jarmakani, J.M.**: Low sodium attenuation of the Ca^{2+} paradox in the newborn rabbit myocardium. *Am. J. Physiol.*, **248**: H345~349, 1985.
- 22) **Baker, J.E., Boerboom, L.E. and Olinger, G.N.**: Age-related changes in the ability of hypothermia and cardioplegia to protect ischemic rabbit myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **96**: 717~724, 1988.
- 23) **Young, H.H. and Jarmakani, J.M.**: Effect of hypoxia and reoxygenation on mitochondrial function in neonatal myocardium. *Am. J. Physiol.*, **245**: H998~1006, 1983.
- 24) **Yano, Y. and Hearse, D.J.**: Protection of the pediatric myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **94**: 887~896, 1987.
- 25) **Fozzard, H.A., Haber, E., Jennings, R.B., Katz, A.M. and Morgan, H.E.**: The heart and cardiovascular system. Vol.2, 1133~1202: Raven press, New York, 1986.
- 26) **Nayler, W.G., Perry, S.E., Elz, J.S. and Daly, M.J.**: Calcium, sodium, and the calcium paradox. *Circ. Res.*, **55**: 227~237, 1984.
- 27) **Pridjian, A.K., Levitsky, S., Krukenkamp, I., Silverman, N.A. and Feinberg, H.F.**: Developmental changes in reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **96**: 577~581, 1988.
- 28) **Kirkels, J.H., van Echteld, C.J.A. and Ruigrok, T.J.C.**: Intracellular magnesium during ischemia and reperfusion: Possible consequences for postischemic recovery. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **21**: 1209~1218, 1989.
- 29) **Vinten-Johansen, J., Rosenkranz, E.R.,**

- Buckberg, G.D., Leaf, J. and Bugyi, H.:** Metabolic and histochemical benefits of regional blood cardioplegic reperfusion without cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **92**: 535~542, 1986.
- 30) **Lesnefsky, E.J., VanBenthuyzen, K.M., McMurtry, I.F., Shikes, R.H., Johnstone, Jr R.B. and Horwitz, L.D.:** Lidocaine reduced canine infarct size and decreases release of a lipid peroxidation product. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **13**: 895~901, 1989.
- 31) **Takeo, S., Tanonaka, K., Shimizu, K., Hirai, K., Miyake, K. and Minematsu, R.:** Beneficial effects of lidocaine and disopyramide on oxygen-deficiency-induced contractile failure and metabolic disturbance in isolated rabbit hearts. *J. Pharmacol. Experi. Therapeut.*, **248**: 306~314, 1989.
- (平成5年2月12日受付)
-