

研究課題名

活性酸素による心筋細胞の障害とその防御に関する
薬理学的研究

研究課題番号
05454145

平成5年度－平成6年度科学研究費補助金
(一般研究B) 研究成果報告書



平成 8 年 2 月

研究代表者 安孫子 保

(旭川医科大学医学部薬理学講座)

はしがき

心筋が虚血状態になると、心筋組織のATPが減少し、収縮力は低下して心筋組織に器質的な障害が残る。虚血状態にある心筋を再灌流すると虚血障害は緩解する筈であるが、再灌流時に不整脈その他の重篤な障害がおこることも報告されている。従って、虚血と再灌流による障害をまとめて、虚血・再灌流障害と呼んでいる。

虚血障害に細胞内のATP減少が関連していることは事実であるが、再灌流障害にはATPレベルはあまり関係ない。その理由は、再灌流によって虚血で低下したATPレベルは上昇するからである。最近の研究によれば虚血・再灌流時に心筋内に活性酸素が生じ、この活性酸素がフリーラジカルを発生させ、このために心筋に障害がおこるのであろうという。

もしこの説が正しいとすれば心臓に活性酸素を投与すれば虚血・再灌流障害と同様の障害がおこらなければならないし、フリーラジカルを消去する作用のある薬物は活性酸素による障害ばかりでなく、虚血・再灌流障害をも軽減する筈である。さらに、虚血・再灌流時に心筋にlysophosphatidylcholine(LPC)が蓄積し、このLPCが虚血・再灌流障害の原因物質になっているという推察もある。これが事実とすれば、LPCによる障害も虚血・再灌流障害を軽減する薬物によって、軽減される筈である。

本実験は上記の説を確かめるためにおこなった。活性酸素としては、過酸化水素(H_2O_2)を用いた。 H_2O_2 は Fe^{2+} の存在下で、組織に障害を与える作用の強いhydroxy radicalを生じることが分かっている。また、LPCに関する実験も行った。LPCは心筋の虚血・再灌流時に心筋組織に蓄積するばかりでなく、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、赤血球の溶血をおこすことも分かっている。

そこで、我々は虚血・再灌流によって、まず心筋に活性酸素が生じ、この活性酸素からフリーラジカルが生じ、フリーラジカルは細胞膜のリン脂質を過酸化し、このためphospholipase A_2 の活性が増し、これによって細胞膜のリン脂質からLPCを生じ、このLPCが組織障害をおこすという仮説を立てた。本研究はこの仮説が正しいか否かを確かめるために行った。本研究の中で行われた一連の実験は、すべてこの仮説の妥当性を確かめるためのものである。

研究組織

研究代表者 安孫子 保 (旭川医科大学教授)
研究分担者 橋爪 裕子 (旭川医科大学助教授)
研究分担者 矢沢 和人 (旭川医科大学助手)
研究分担者 原 明義 (旭川医科大学助手)

研究経費

平成5年度	6,300	千円
平成6年度	1,000	千円
計	7,300	千円

研究発表

(1) 学会誌等

Hashizume, H. & Abiko, Y.: Dilazep and d-propranolol attenuates Ca^{2+} overload induced by lysophosphatidylcholine in cardiac myocytes. Experimental and Clinical Cardiology (in press)

Hoque, N., Hoque, A.N.E., Hashizume, H., Ichihara, K. & Abiko, Y.: K-7259, a novel dilazep derivative, and d-propranolol attenuate H_2O_2 -induced cell damage. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (in press)

Hara, A. & Abiko, Y.: Protective effect of dilazep and its novel derivative, K-7259, on mechanical and metabolic derangements induced by hydrogen peroxide in the isolated perfused rat heart. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (in press)

Hashizume, H. & Abiko, Y.: Lysophosphatidylcholine: a potentiator of ischemic injury in the heart - a new approach to the development of anti-ischemic drugs. Japanese Heart Journal (in press)

Chen, M., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Effects of β -adrenoceptor antagonists on Ca^{2+} -overload induced by lysophosphatidylcholine. *British Journal of Pharmacology* (in press)

Magishi, K., Kimura, J., Kubo, Y. & Abiko, Y.: Exogenous lysophosphatidylcholine increases non-selective cation current in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Archives: European Journal of Physiology* (in press)

Kokita, N. & Hara, A.: Propofol attenuates hydrogen peroxide-induced mechanical and metabolic derangements in the isolated rat heart. *Anaesthesiology* (in press)

Hara, A. & Abiko, Y.: Protective effect of hypoxia on mechanical and metabolic changes induced by hydrogen peroxide in rat hearts. *American Journal of Physiology* 268: H614-H620, 1995

Hara, A., Akahira, M. & Abiko, Y.: Effect of K-7259, a novel derivative of dilazep, on cardiovascular actions of adenosine: Comparison with dilazep. *Archives internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 330: 66-75, 1995.

Hoque, A.N.E., Hoque, N., Hashizume, H. & Abiko, Y.: A study of dilazep: I. Mechanism of anti-ischemic action of dilazep is not due to coronary vasodilation but decreased cardiac mechanical function in the isolated, working rat heart. *Japanese Journal of Pharmacology* 67: 225-232, 1995

Hoque, A.N.E., Hoque, N., Hashizume, H. & Abiko, Y.: A study of dilazep: II. Dilazep attenuates lysophosphatidylcholine-induced mechanical and metabolic derangements in the isolated, working rat heart. *Japanese Journal of Pharmacology* 67: 233-241, 1995

原 明義、安孫子 保: 活性酸素によるラット心筋障害に対する内因性アデノシンの保護作用 *病態生理* 14: 717-720, 1995

Hashizume, H., Akiyama, K. & Abiko, Y.: Effects of anti-ischemic drugs on veratridine-induced hypercontracture in rat cardiac myocytes. *European Journal of Pharmacology* 271: 1-8, 1994.

Hara, A., Matsumura, H. & Abiko, Y.: Lidocaine attenuates both mechanical and metabolic changes induced by hydrogen peroxide in the rat heart. *American Journal of Physiology* 265: H1478-H1485, 1993.

(2) 口頭発表

橋爪 裕子、安孫子 保: ラット心筋細胞におけるベラトリジンならびにリゾフォスファチジルコリンによる細胞内カルシウム上昇におよぼすS-2150の抑制作用 第46回日本薬理学会北部会、札幌、平成7年8月

陳 敏、橋爪 裕子、安孫子 保: ラット心筋細胞におけるリゾフォスファチジルコリンによるCa²⁺オーバーロード機構におけるNa⁺の重要性 第46回日本薬理学会北部会、札幌、平成7年8月

眞岸 克明、安孫子 保: モルモット心室筋細胞のnon-selective currentに対するリゾフォスファチジルコリンの影響 第46回日本薬理学会北部会、札幌、平成7年8月

Magishi, K. & Abiko, Y.: Lysophosphatidylcholine activates non-selective cation current in guinea-pig ventricular myocytes. The XV World Congress of the International Society for Heart Research, Prague, Czech Republic, 平成7年7月

Hashizume, H. & Abiko, Y.: Calcium overload induced by lysophosphatidylcholine in isolated rat cardiac myocytes. The XV World Congress of the International Society for Heart Research, Prague, Czech Republic, 平成7年7月 (Poster Award 受賞)

Hoque, A.N.E., Hoque, N., Hara, A., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Beneficial effect of K-7259, a dilazep derivative, on the ischemic-reperfused isolated working rat hearts. The XII Annual Sessions of the North American Session of the International Society for Heart Research, Orange Beach,

Alabama, USA, 平成7年5月

Hoque, A.N.E., Hoque, N., 橋爪 裕子、安孫子 保: ラット灌流心臓における虚血・再灌流障害におよぼすdilazep誘導体K-7259の保護作用
第68回日本薬理学会年会、名古屋、平成7年3月

Hoque, N., Hoque, A.N.E., 橋爪 裕子、安孫子 保: ラット心筋細胞における H_2O_2 による細胞形態変化と遊離脂肪酸蓄積におよぼすdilazepとその誘導体K-7259の作用 第68回日本薬理学会年会、名古屋、平成7年3月

原 明義、安孫子 保: Hydrogen peroxideによるラット心臓障害およびエネルギー代謝障害におよぼすdilazepとその誘導体K-7259の作用第68回日本薬理学会年会、名古屋、平成7年3月

小北 直弘、原 明義、安孫子 保: Hydrogen peroxideによるラットエネルギー代謝障害におよぼすpropofolの抑制作用 第45回日本薬理学会北部会、新潟市、平成6年10月

原 明義、安孫子 保: Hydrogen peroxideによるラット心筋障害におよぼす内因性アデノシンの保護作用 第45回日本薬理学会北部会、新潟市、平成6年10月

Chen, M., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Protective effects of β -adrenoceptor antagonists on Ca^{2+} -overload induced by lysophosphatidylcholine in isolated rat cardiomyocytes. 第45回日本薬理学会北部会、新潟市、平成6年10月

眞岸 克明、矢沢 和人、安孫子 保: モルモット単離心室筋細胞カルシウム電流に対するリゾフォスファチジルコリンの影響とpHによる修飾
第45回日本薬理学会北部会、新潟市、平成6年10月

Hoque, N., Hoque, A.N.E., Hashizume H. & Abiko, Y.: Effect of dilazep and d-propranolol on cell-shape change and NEFA accumulation induced by H_2O_2 in isolated rat cardiac myocytes. 第45回日本薬理学会北部会、新潟市、平成6年10月

Hoque, A.N.E., Hoque, N., 橋爪 裕子、安孫子 保: Dilazepとd-propranololはリゾフォスファチジルコリンによるラット心臓のミトコン

ドリア呼吸機能障害を軽減する 第45回日本薬理学会北部会、新潟市、平成6年10月

橋爪 裕子、安孫子 保: ラット心筋細胞におけるリゾフォスファチジルコリンによる細胞内カルシウム増加のメカニズム 第45回日本薬理学会北部会、新潟市、平成6年10月

Hoque, A.N.E., Hoque, N., 橋爪 裕子、安孫子 保: リゾフォスファチジルコリンによる心臓障害に対するdilazepとd-propranololの減弱作用 第67回日本薬理学会年会、京都、平成6年3月

原 明義、安孫子 保: グリベンクラミドは H_2O_2 の心筋障害に対する低酸素灌流の抑制効果を減弱させる 第67回日本薬理学会年会、京都、平成6年3月

原 明義、安孫子 保: Hydrogen peroxide 投与によるラット心筋障害におよぼす低酸素灌流の抑制効果 第44回日本薬理学会北部会、弘前市、平成5年10月

矢沢 和人、眞岸 克明、秋山 建児、安孫子 保: 心室筋カルシウム電流に対するdilazepの効果 第44回日本薬理学会北部会、弘前市、平成5年10月

橋爪 裕子、安孫子 保: ラット心筋細胞におけるlysophosphatidylcholine による形態変化と細胞内カルシウム濃度上昇におよぼす各種薬物の効果 第44回日本薬理学会北部会、弘前市、平成5年10月

研究成果

- 1 過酸化水素は心臓に虚血・再灌流障害と同様の障害をひきおこすことが出来、lidocaine は過酸化水素による心筋障害を減弱する。

目的

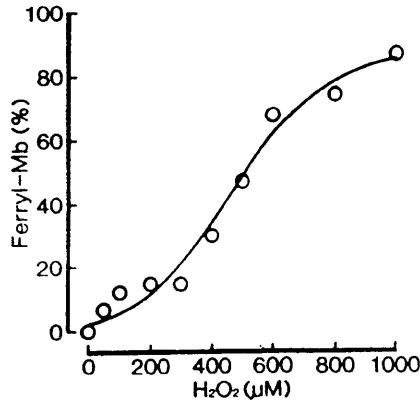
活性酸素は生体内でフリーラジカルを生じることが分かっている。虚血・再灌流障害の原因は活性酸素とフリーラジカルであるとすれば、活性酸素の一種である過酸化水素を心筋に与えると、虚血・再灌流障害に似た障害をひきおこす筈である。また、過酸化水素による心筋の障害の程度は、虚血・再灌流障害を軽減する薬物で軽減できるに違いない。この考え方が正しいか否かを確かめるために、この実験を行った。虚血・再灌流障害を軽減する物質としては、lidocaineを用いた。Lidocaineは虚血・再灌流による不整脈の発生を抑制するが、 β -blocking作用もないし、 Ca^{2+} antagonistic作用もないので、実験結果を分析しやすいと思って、これを用いることにした。

実験方法

ラットの心臓をLangendorff式に灌流し、Pacingすることによって心拍数を一定にした(300/min)。また、冠血管の灌流量を一定(10 ml/min)にした。過酸化水素によって心筋細胞に過酸化がおこっているのを確かめるために、心筋表面のferryl-Mbを光学的手法を用いて測定した。過酸化水素を灌流液中に入れると、心筋のoxy-Mbが減少し、ferryl-Mbが増加した。第1図は投与した過酸化水素が用量依存的にferryl-Mb量を増加させていることを示している。この実験から200 - 600 μM の過酸化水素は確実にMbの過酸化を用量依存的におこしていることが分かったので、実験には200, 400および600 μM の過酸化水素を用いた。

実験結果

第2図は左心室圧(LVP)、灌流圧(CPP)、およびferryl-Mbのレベルが過酸化水素に

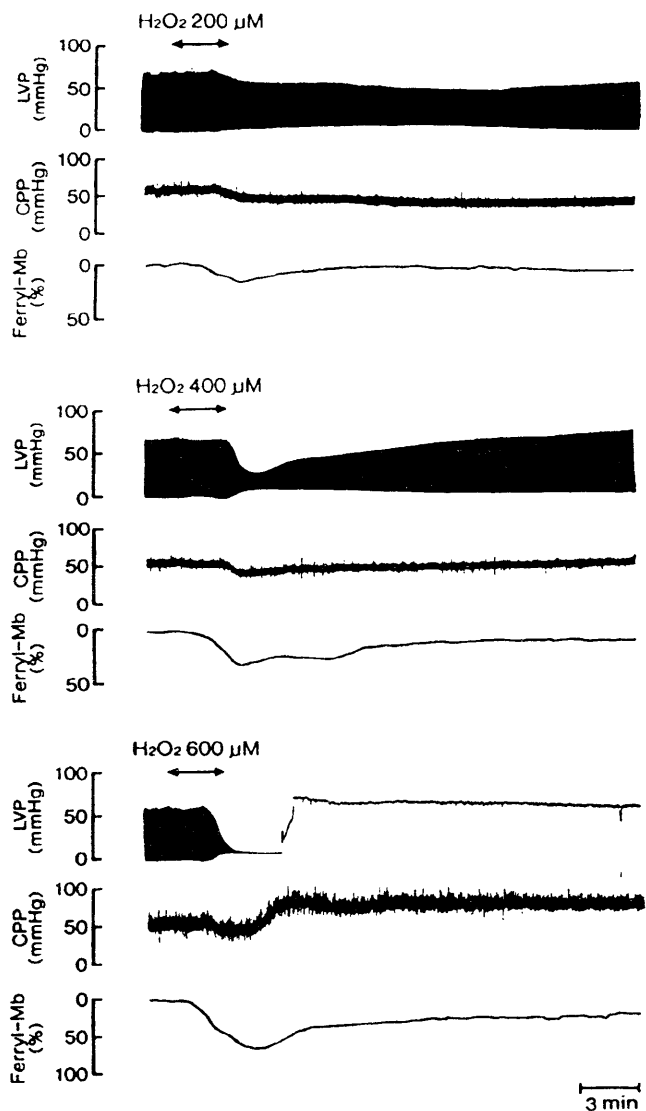


第1図 投与した過酸化水素(H₂O₂)とferryl myoglobin (ferryl-Mb)

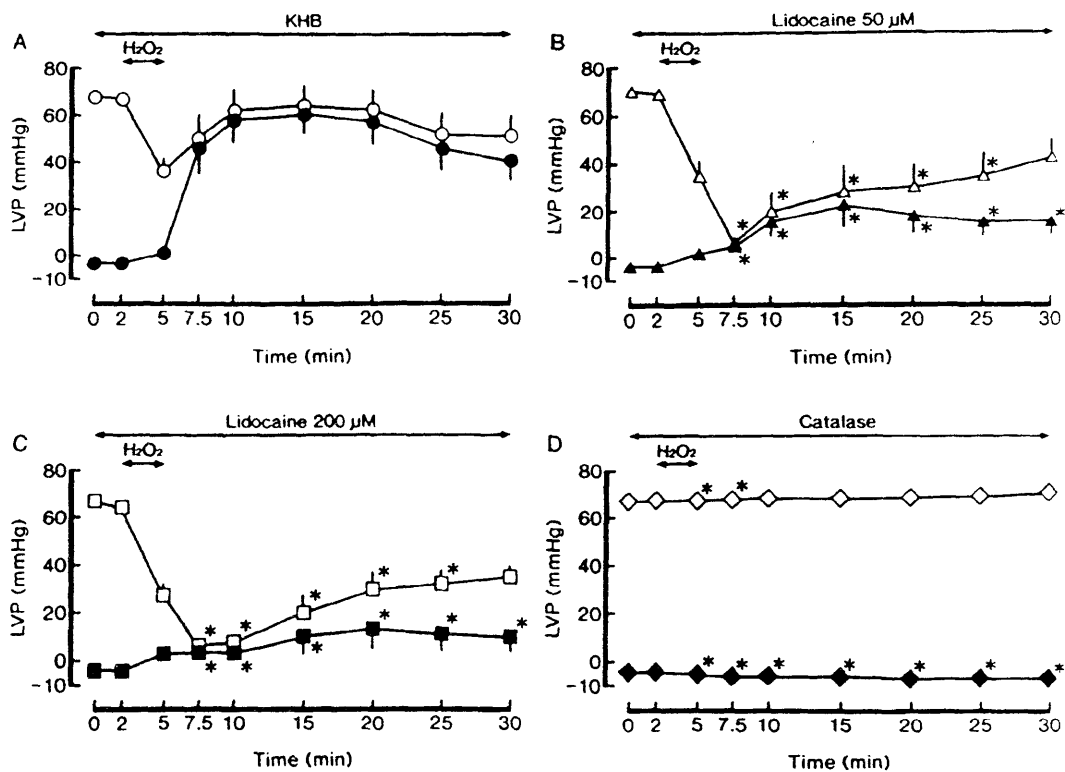
との関係。ランゲンドルフ灌流ラット心臓。Pacing rateは300 beats/min。灌流量は10 ml/min。

よってどのように変化したのかを示している。上から200μM、400μM、および600 μMの過酸化水素を投与した時の変化を示している。過酸化水素は用量依存的に左心室収縮期を低下させ、拡張期圧を上昇させることが分かる。600μMの過酸化水素を投与した時の変化が一番はっきりとしていたので、次の実験からは600μMの過酸化水素による心筋の反応がlidocaineによって軽減するか否かを調べた。Lidocaineは局所麻酔薬であるが、虚血・再灌流時に発生する不整脈に有効であることが認められており、臨床的にも虚血性心疾患に用いられている。まずlidocaineの投与を開始し(30分間連続投与)、lidocaine投与の開始後2分から5分まで(つまり3分間)過酸化水素を投与した。

第3図は600μMの過酸化水素による心臓の機械的活動がlidocaineによって軽減することを示している。AではH₂O₂で600μMの過酸化水素を5分間投与し、KHBでKrebs-Henseleit Bicarbonate bufferを投与している。これによって過酸化水素が心臓の機械的活動に重大な障害を与えていることが分かる(この障害は虚血による障害によく似ている)。BではKHBの代わりにlidocaine 50μMを投与した時の変化である。過酸化水素による左心室収縮期圧の減少が抑制され、左心室拡張期圧の上昇が抑制されている。Cはlidocaineを200μMに上げた時の効果である。Lidocaineは用量依存的に過酸



第2図 H_2O_2 による心機能障害。過酸化水素によって、left ventricular pressure (LVP)の低下、coronary perfusion pressure (CPP)の低下、ferryl myoglobin (ferryl-Mb) の上昇が見られる。しかも、 H_2O_2 の作用はconcentration dependentである。



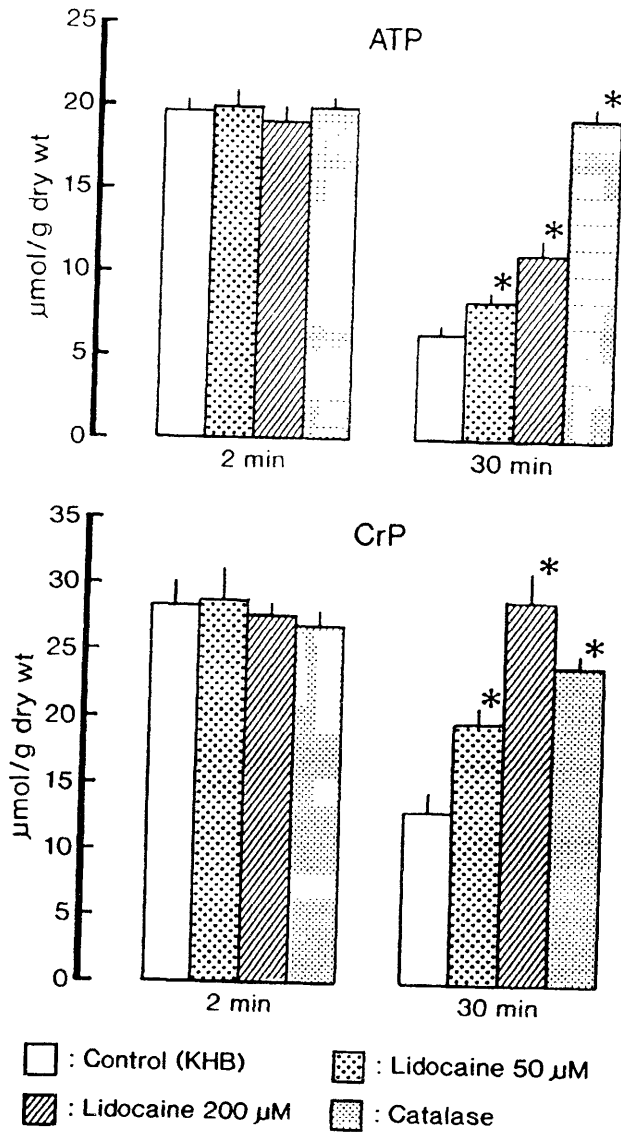
第3図 H₂O₂によるsystolic LVPの低下とend-diastolic LVPの上昇

をlidocaineがconcentration dependentに減弱する。

CatalaseはH₂O₂を分解するから無効である。

化水素による心臓の機械的障害を軽減していることがわかる。Cはlidocaineの代わりにcatalaseを投与した時の結果である。Catalaseは過酸化水素の心臓障害を100%抑制している。これはcatalaseが過酸化水素を分解したためである。つまり、過酸化水素による心臓障害はたしかに過酸化水素によるものであることを裏付けている。

次に、過酸化水素は心臓の機械的活動を障害するだけでなく、心臓の代謝活動も障害するか否を調べた。心筋の虚血は心臓の機械的活動を障害するだけでなく、代謝活動をも障害することが分かっている。第4図は心筋のATPおよびクレアチンリン酸(CrP)の心筋組織の含量を測定した結果である。過酸化水素を投与する前(lidocaine投与後2分)のATPレベルはlidocaine(50 または200 μM)投与に変化しなかったが、過酸化水素投与終了後25分(lidocaine投与後30分)には、過酸化水素投与群ではATPも



第4図 H_2O_2 は心筋のATPとcreatine phosphate (CrP)含量を低下し、lidocaine は H_2O_2 のこれらの作用を抑制する。

CrPも著しく低下していることを示している。ところがlidocaineは用量依存的に過酸化水素投与によるATP とCrP の減少を抑制している。

次に、過酸化水素によるferryl-Mbの上昇をlidocaine が抑制するか否かを調べた。第6図はその結果である。この図からlidocaineは過酸化水素によるferryl-Mb生成には影響を与えないことが分かった。過酸化水素を生体に投与するとFenton反応によって

第1表 Buffer solution 中のH₂O₂の濃度におよぼすlidocaineの影

響。LidocaineはH₂O₂の濃度に何らの影響も及ぼしていない。

Group	H ₂ O ₂ , μM	Lidocaine, μM	Tissue MDA Level, μmol/g dry wt	
			2.5 Min	25 Min
Normal	0	0	8.9±1.7*	7.8±1.4*
Control	600	0	38.6±4.9	24.5±2.3
Lidocaine (50 μM)	600	50	24.9±3.8*	18.1±3.2
Lidocaine (200 μM)	600	200	18.2±1.1*	16.7±1.5*

Values are means ± SE of 7 or 8 hearts for each experiment. MDA, malondialdehyde. For tissue MDA levels, 2.5 and 25 min refer to time after H₂O₂ infusion. * *P* < 0.05 when compared with value in control group.

第2表 Normal, control及びlidocaine群におけるmalon

dialdehyde (MDA)の心筋内のレベル。LidocaineはH₂O₂によるMDAの上昇を抑制している。

Mixture	Fluorescence Intensity, %	H ₂ O ₂ Concentration, μM
H ₂ O ₂ (600 μM)	33.2±1.3	598.2±12.4
H ₂ O ₂ (600 μM) + lidocaine (200 μM)	35.4±1.1	577.8±10.4
H ₂ O ₂ (600 μM) + catalase (440 U/ml)	94.3±0.8*	27.4±7.3*

Values are means ± SE of 4 samples for each experiment. Solvent of mixture is 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Fluorescence intensity was obtained 3 or 30 min after incubation at 37°C in catalase or lidocaine-containing mixture, respectively, and fluorescence intensity of H₂O₂-free buffer solution was taken as 100%. H₂O₂ concentration was estimated from value of fluorescence intensity. * *P* < 0.05 when compared with value in 600 μM H₂O₂ group.

フリーラジカルを生ずることが分かっている。FerryI-MbはFenton反応によって出来ることが分かっているので、lidocaineはFentotonを抑制して過酸化水素の作用を抑制するのではないことが分かる。

次にlidocaineが過酸化水素に直接結合することによって過酸化水素の作用を弱めているのではないかと考え、in vitroでの実験をした。その結果が第1表である。この結果はlidocaineが過酸化水素と直接結合することを否定している。

次に、過酸化水素がフリーラジカルを生じ、その結果、細胞の脂質の過酸化が起こっているか否かを調べた。脂質過酸化の指標としては心筋のマロンジアルデヒド (MDA)を測定した。その結果が第2表にある。この表から明らかなように、過酸化水

素は心筋の脂質の過酸化をおこすがlidocaineは過酸化水素による脂質過酸化を抑制することが明らかとなった。

考察

以上のことから、過酸化水素は虚血による障害に非常によく似た障害を心臓にひきおこすことが分かった。さらに過酸化水素による心臓障害はlidocaineによってかなり軽減されることが分かった。また、lidocaineは過酸化水素がフリーラジカルになる過程は抑制せず、フリーラジカルが脂質の過酸化をおこす過程を抑制することが分かった。しかし、どのような機構でlidocaineは活性酸素による脂質過酸化を抑制するのかはまだ不明である。

以上の考察をまとめてみると、虚血・再灌流によってまず活性酸素が出来、これがフリーラジカルの発生をおこし、フリーラジカルが細胞膜の脂質の過酸化をおこし、このためphospholipase A₂の活性を高め、膜リン脂質の崩壊を招き、細胞障害をおこし、ATPやCrPレベルの減少をおこし、機械的活動を低下させると考えられる。また、Lidocaineはフリーラジカルの脂質過酸化を防止することによって、虚血・再灌流障害を抑制すると考えられる。

結論

過酸化水素は心筋内でフリーラジカルを生じ、このため細胞膜の脂質過酸化をおこし、心臓の機能不全を起こす。Lidocaineはフリーラジカルによる脂質過酸化を抑制するために、過酸化水素による心筋の機械的、代謝的障害を抑制する。

2 過酸化水素は心筋細胞に障害をおこし、dilazepの誘導体K-7259とd-propranololは過酸化水素による細胞障害を軽減する

目的

上記の実験で、過酸化水素はランゲンドルフ心臓で虚血・再灌流障害に似た障害をおこすことが明らかになり、虚血・再灌流不整脈の発生を抑制するlidocaineが過酸化水素による心筋の障害を軽減することがわかった。本実験は、このことが心筋の細胞レベルでもおこるのか否かを確かめるために行った。なお、本実験ではlidocaineの代わりに、dilazepとその誘導体のK-7259を用いた。Dilazepはlidocaineと同様に、虚血・再灌流による障害を抑制するが、 β -blocking作用もないし、強い Ca^{2+} antagonistic作用もないことが分かっている。さらに、d-propranololを用いた。d-propranololは β -blocking作用はpropranololに比べるとずっと弱い、虚血・再灌流障害に対してはpropranololと同程度に有効であることが我々の灌流心臓での実験から分かっている。K-7259はdilazepの誘導体であるが、dilazepのようにadenosineの作用を増強することは証明されていない。

実験方法

ラット心臓から得られた細胞を用いた。この細胞に H_2O_2 と FeSO_4 とdiethyl-triamino pentaacetic acid (DETAPAC)をいれた。 H_2O_2 が細胞障害をおこすためには、 Fe^{2+} が必要であり(Fenton's reaction)、 Fe^{2+} はすぐ Fe^{3+} に酸化されるため、安定した Fe^{2+} の濃度を得るためにDETAPACを用いた。さらに細胞膜の分解の程度をみるため、心筋細胞の中の遊離脂肪酸の濃度も測定した(虚血・再灌流時にも遊離脂肪酸が心筋に蓄積することが分かっている)。

実験結果

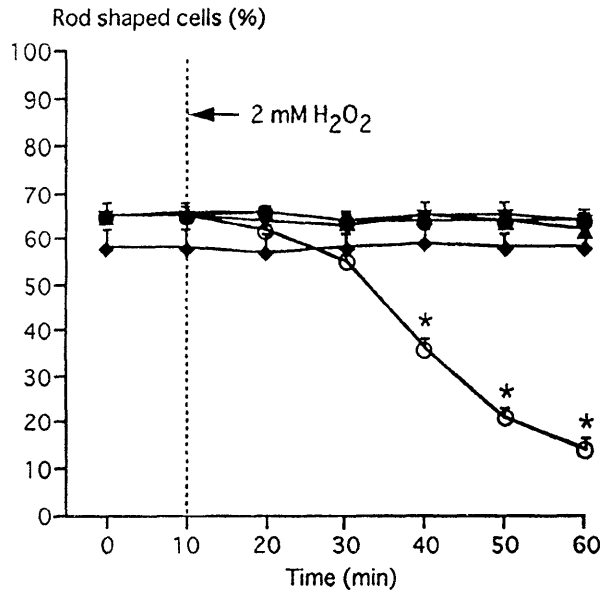
まず、 H_2O_2 の10分間投与によって、心筋細胞の形態がどのように変化するかを観察した。第6図はその実験結果を示している。心筋細胞を調製すると、正常の場合でも約66%の細胞だけが短冊形(rod shape)をしていた。2 mM H_2O_2 単独ではrod shapeの割合には何らの影響をも及ぼさなかったが、 H_2O_2 に2 mM FeSO_4 を入れる

と、rod shapeの細胞が時間とともに減少した。2 mM DETAPAC は Fe^{2+} の安定のために入れた。もちろん、DETAPACのみでは細胞の形態変化に影響をおよぼさなかった。従って、次からは2 mM H_2O_2 + 2 mM FeSO_4 + 2 mM DETAPAC の条件下で実験を行い、 H_2O_2 による細胞障害を各種薬物がどのように軽減するかを観察した。また、 H_2O_2 による細胞障害はMPGによって抑制された。以上のことから、 H_2O_2 と Fe^{2+} を投与すると細胞内でFenton's reactionがおこり、その結果としてhydroxy radicalができることを示している。

第7図は H_2O_2 による細胞の形態変化に対する薬物の効果を示している。この図から分かるように、30 μM dalazepはほとんど効果がなく、50 μM dalazepでは多少の効果があるが、その効果は有意ではなかった。しかし、50 μM d-propranololと30 μM K-7259 は有意に効果があることが認められた。従って、d-propranololとK-7259 には H_2O_2 による細胞の形態変化を抑制する作用のあることが明らかとなった。しかし、そのメカニズムはまだ不明である。Dilazepの作用はadenosine の細胞内へのとりこみを抑制するからであるといわれてきた、つまりdilazep はadenosine の作用をpotentiateする結果であるといわれてきた。たしかに、adenosine は ischemic preconditioning の時に重要な役目をはたし、虚血・再灌流保護をすることが証明されている。しかし、我々K-7259にはdilazep のようなadenosine 増強作用はないことを証明した。従って、K-7259の虚血・再灌流保護 作用はadenosine増強作用のためではないと考えられる。

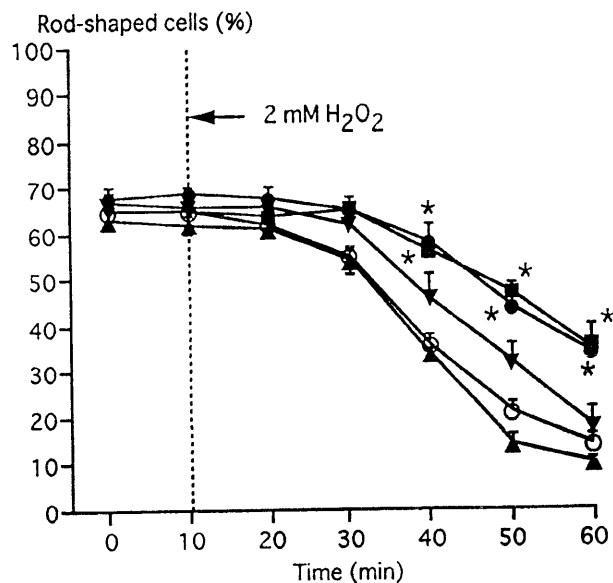
第8図は H_2O_2 が心筋細胞内から長鎖飽和脂肪酸を遊離していることを示している。さらに、この脂肪酸の蓄積を50 μM d-propranololと30 μM K-7259が有意に抑制していることを示している。しかしい、50 μM dalazepには H_2O_2 による脂肪酸の蓄積を抑制する作用はなかった。この実験結果は H_2O_2 による細胞の形態変化の結果と一致する。

第9図は H_2O_2 が心筋細胞内から不飽和脂肪酸を遊離していることを示している。この実験結果も長鎖飽和脂肪酸の場合と同様に、50 μM d-propranololと30 μM K-7259 は H_2O_2 による不飽和脂肪酸を遊離を有意に抑制したが、50 μM dalazepは H_2O_2 による不飽和脂肪酸の蓄積を抑制する作用はなかった。



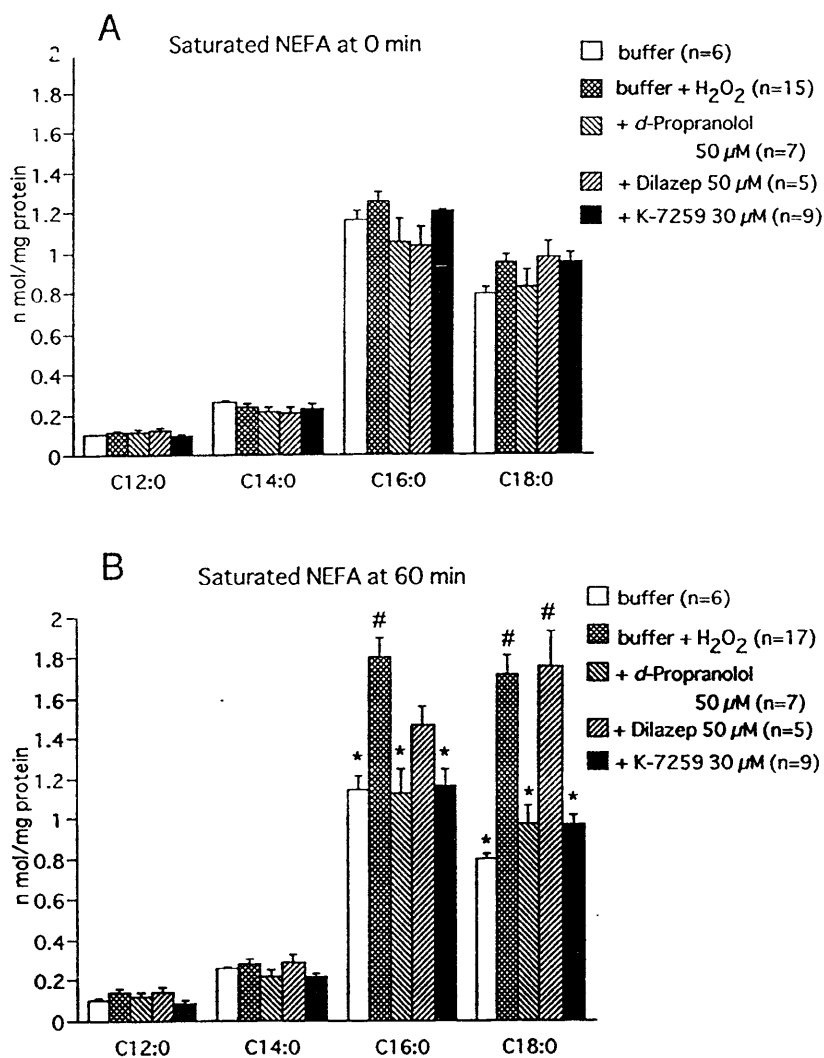
第6図 H_2O_2 による心筋細胞の形態変化。縦軸は細胞全体の中での rod-shape(短冊型)をした細胞の割合。● : Krebs-Ringer (KR) HEPES Buffer 中で心筋細胞を保温。▲ : 2 mM H_2O_2 を含むKrebs-Ringer (KR) HEPES Buffer 中で心筋細胞を保温。▼ : 2 mM DETAPAC + 2 mM FeSO_4 を含むKR-HEPES buffer で心筋細胞を保温。○ : 2 mM DETAPAC + 2 mM FeSO_4 + 2 mM H_2O_2 を含むKR-HEPES bufferで心筋細胞を保温。◆ : 2 mM DETAPAC + 2 mM FeSO_4 + 2 mM MPG (N-(2-mercaptopyrionyl)glycine) + 2 mM H_2O_2 を含むKR-HEPES bufferで心筋細胞を保温。* $P < .05$ (●グループに対して)

H_2O_2 で短冊型の細胞が減る(round型になる)が、これには鉄イオンが必要である。また、 H_2O_2 による細胞の形態変化は hydroxy radical scavengureであるMPGによって抑制される。



第7図 H_2O_2 による心筋細胞の形態変化。縦軸は細胞全体の中での rod-shape(短冊型)をした細胞の割合。○ : 2 mM H_2O_2 + 2 mM DETAPAC + 2 mM FeSO_4 を含むKR-HEPES bufferで心筋細胞を保温。● : ○で用いたKR-HEPES Buffer + 50 μM d-propranolol で心筋細胞を保温。▲ : ○で用いたKR-HEPES Buffer + 30 μM dilazep で心筋細胞を保温。▼ : ○で用いたKR-HEPES Buffer + 50 μM dilazep で心筋細胞を保温。■ : ○で用いたKR-HEPES Buffer + 30 μM K-7259 で心筋細胞を保温。* $P < .05$ (○グループに対して)

H_2O_2 で短冊型の細胞が減る(round型になる)が、この H_2O_2 による H_2O_2 による細胞の形態変化は細胞の形態変化はd-propranololとK-7259で抑止されたが、dilazepによつては抑制されなかった。

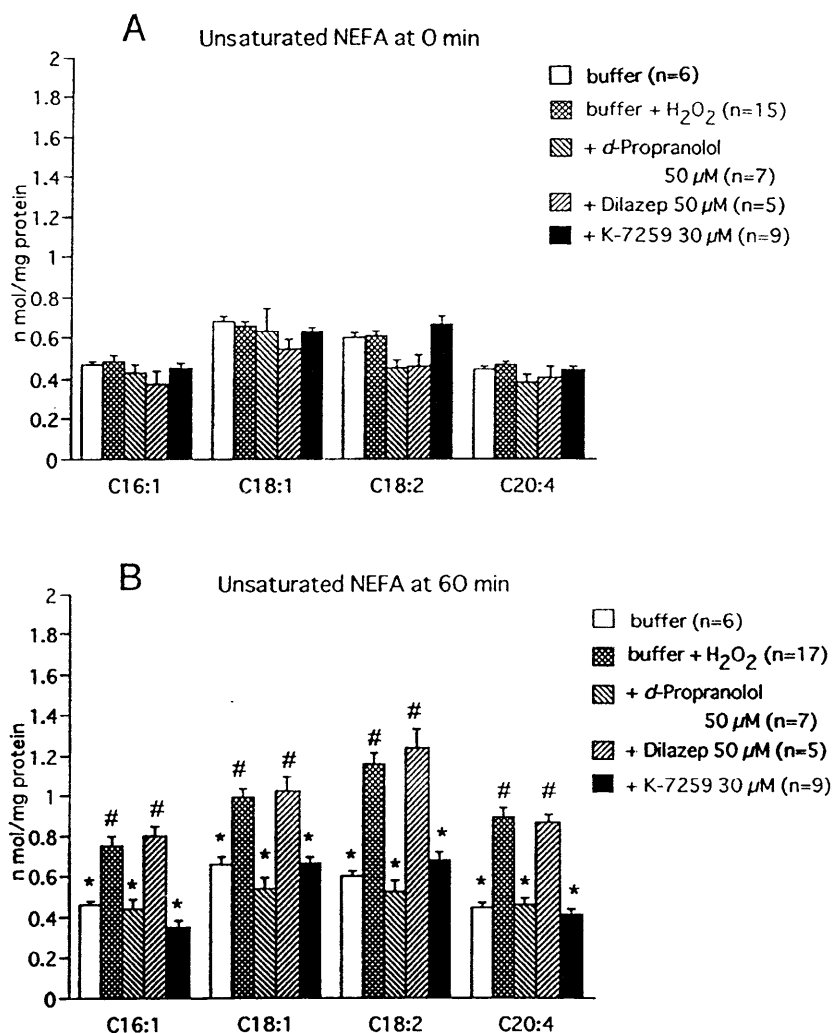


第8図 H₂O₂による心筋細胞の飽和脂肪酸レベル。

A : H₂O₂投与直前。 B : H₂O₂投与60分後。

2 mM DETAPAC + 2 mM FeSO₄ を含むKR-HEPES bufferで心筋細胞を保温。*P<.05 (buffer + H₂O₂群に対して) #P<.05 (buffer群に対して)

H₂O₂は心筋細胞の飽和脂肪酸レベルを上昇させ、この上昇をd-propranololと K-7259が抑制する。



第9図 H₂O₂による心筋細胞の不飽和脂肪酸レベル。

A : H₂O₂投与直前。 B : H₂O₂投与60分後。

2 mM DETAPAC + 2 mM FeSO₄ を含むKR-HEPES bufferで心筋細胞を保温。*P<.05 (buffer + H₂O₂群に対して) #P<.05 (buffer群に対して)

H₂O₂は心筋細胞の不飽和脂肪酸レベルを上昇させ、この上昇をd-propranololと K-7259が抑制する。

考察

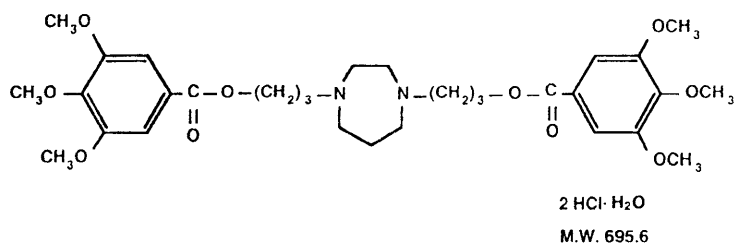
結果の中でも述べたように、 H_2O_2 は心筋細胞の形態をround型に変化させ、脂肪酸の遊離を起こした。 H_2O_2 はFenton's reactionによってhydroxy radicalを生じ、このラジカルが細胞膜にあるリン脂質の主として不飽和脂肪酸の過酸化をおこし、このためphospholipase A_2 が作用しやすくなり、arachidonic acid のような脂肪酸が遊離するものと考えられる。phospholipase A_2 で切断されたリン脂質の残りの部分はリゾリン脂質(lysophospholipids)とよばれる物質であり、細胞膜に対する破壊作用が強いことが分かっている。従って、このlysophospholipids が心筋細胞に作用し、心筋細胞の形態を変化させている可能性がある。

すなわち、虚血になるとATPが低下し、ことため細胞膜のリン脂質の代謝回転が悪くなり、脂肪酸とリゾリン脂質が細胞内に蓄積する。また、再灌流時には活性酸素が生じ、これがフリーラジカルを生じさせ、このフリーラジカルが細胞に悪影響を及ぼすという仮説がなりたつ。この仮説が正しいとすれば、フリーラジカルによる脂質の過酸化を抑制する物質やlysophospholipids の細胞に対する破壊作用を減弱する物質は虚血・再灌流障害から心臓を守ることが出来るはずである。d-PropranololやK-7259にはこれらの作用があると考えられるが、その詳細についてはまだ不明である。なお、K-7259 とdilazepの化学構造を第10 図に示す。

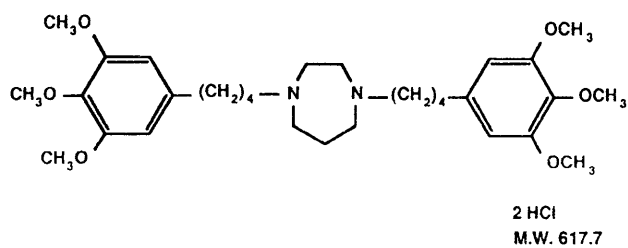
結論

H_2O_2 は Fe^{2+} の存在のもとで、心筋細胞の形態をrod型からround型に変化させ、細胞内に脂肪酸(特に長鎖で不飽和)の遊離を起こした。この細胞障害はMPGによって軽減した。また、d-propranolol とK-7259 も H_2O_2 による細胞障害を軽減した。

Dilazep dihydrochloride



K-7259



第10図 DilazepとK-7259の化学構造。

- 3 Lysophosphatidylcholine (LPC)は心筋の収縮機能とエネルギー代謝を障害し、
dilazepとd-propranolol はLPCによるこれらの障害を軽減する

目的

今までの研究によって、虚血・再灌流障害の究極の原因物質はLPCにあるという仮説を立てると説明しやすいとが分かった。しかし、LPCが虚血・再灌流障害と同じ様な障害をおこすのかどうか分からない。虚血・再灌流障害の特徴は、心臓の収縮機能障害とATPの減少を含めたエネルギー代謝障害である。もし、LPCが虚血・再灌流障害のような障害をおこしたとしても、虚血・再灌流障害を軽減する薬物はLPCによる障害をも軽減することができるのだろうか。このような疑問にこたえるために本実験を行った。

実験方法

ペントバルビタールで麻酔したラットから心臓を摘出し、Langendorff式に灌流した。まず、90 cmH₂Oにて10分間定圧灌流した後、working heart法で灌流した。Working heart灌流条件は左心房圧が12.5 cmH₂O で、後負過が90 cmH₂Oである。この条件で30分間灌流した。灌流液はKrebs-Henseleit buffer (KHB) である。この灌流液を95% O₂ + 5 % CO₂ で飽和した。

次の12群に分けて実験をした。使用したLPCの濃度は10 μMとした。Control群、LPC 5 min 群、LPC 25 min群、LPC (LPC 5 min + KHB 20 min)群、LPC + dilazep (5 μM)群、LPC + dilazep (10 μM)群、LPC + dilazep (20 μM)群、LPC + d-propranolol (30 μM)群、LPC + d-propranolol (50 μM)群、LPC + lidocaine (30 μM)群、LPC + lidocaine (100 μM)群、LPC + bovine serum albumin (BSA) (10 μM)群である。Control群では KHBで35 分間working heart 灌流を行った後、freeze-clampをした。LPC 5 min群、LPC 25 min群 では、LPCで それぞれ5分間、25分間working heart 灌流をしてからfreeze-clampをした。LPC (LPC 5 min + KHB 20 min)群では、5分間LPCで間流した後20分間KHBで灌流してfreeze-clampした。LPC + drug (or BSA) では、LPC (LPC 5 min + KHB 20 min)と同じであるが、LPCで5分間灌流の時にdrugまたはBSAを同時にあたえた。Freeze-clampはあらかじめ-173度に冷却しておいた

Wollenbergerのclampで心臓を圧座冷却した。サンプルは-173度(液体窒素)で保存し、生化学的分析に用いた。

ATPその他のエネルギー代謝中間体、ならびに乳酸は酵素法で測定した。Free fatty acids (FFA) はchloroform/methanolで抽出の後、9-anthryldiazomethaneで蛍光標識し、HPLCで分離定量をした。

実験結果

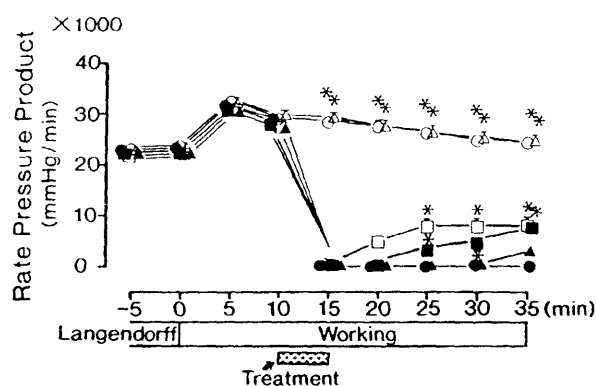
心臓の機械的活動

第11図は心臓の機械的活動(rate pressure product, RPP)の時間経過をあらわしている。灌流をLangendorff式からworking heart 式に変えると、RPPが上昇することが示されている。LPCも薬物も投与していないと、時間経過とともにRPPはやや低下する。しかし、LPCを5分間与えるとRPPはほとんど0 mmHg/minになる。LPCの投与をやめてもRPPは回復しなかった。BSAが存在するとLPCによるRPPの低下は完全に防止された。Dilazepはconcentration dependentにLPCによるRPPの低下を抑制した。

第12図も心臓のRPPの時間経過をあらわしている。この実験ではd-propranololとlidocaineの効果を調べている。この実験から分かるように、d-propranololはconcentration dependentにLPCによる心臓の機械的活動低下を抑制している。しかし、lidocaineは無効であった。

心臓の代謝活動

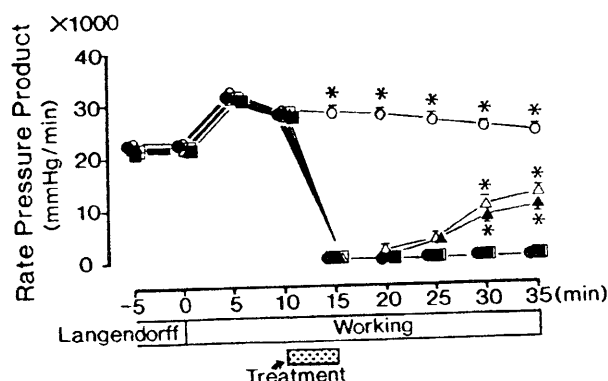
第13図は心筋組織のATPレベルを調べた実験である。LPCを10分間投与しただけでは、ATPのレベルに変化はないが、LPCを25分間投与すると、ATPレベルは著明に減少していることが分かる。面白いことに、LPC5分間投与ではATPレベルに変化がなかったが、その後20分間KHBで灌流すると、ATPは著明に低下した。つまり、LPCの代謝に与える影響はすぐおこるのではなく、時間を必要とすることが分かった。この条件、つまりLPC (LPC 5 min + KHB 20 min)の条件で、LPCとともに薬物を投与すると、その薬物はLPCのATP低下作用にどう影響を与えるかが分かる。この図からわかるように、dilazepとd-propranololはconcentration dependentにLPCによるATPの減少を抑制した。しかし、lidocaineは無効であった。また、BSAはLPCの作用を完全



第11図 Lysophosphatidylcholine (LPC) の心臓の機能(rate pressure product)に及ぼすdilazepの作用。摘出ラット心臓の灌流。

○ : Krebs-Hensileit solution (KHB)で灌流。● : LPC 10 μ Mで5分間灌流。以後はKHBで20分間灌流。△ : LPC 10 μ M + bovine serum albumine (BSA, 10 μ M)で5分間灌流。以後はKHBで20分間灌流。▲ : LPC 10 μ M + 5 μ M dilazepで5分間灌流。以後はKHBで20分間灌流。□ : LPC 10 μ M + 10 μ M dilazepで5分間灌流。以後はKHBで20分間灌流。■ : LPC 10 μ M + 20 μ M dilazepで5分間灌流。以後はKHBで20分間灌流。Langendorff: Langendorff灌流。Working: Working heart法による灌流。Treatment: LPC等の物質の投与。

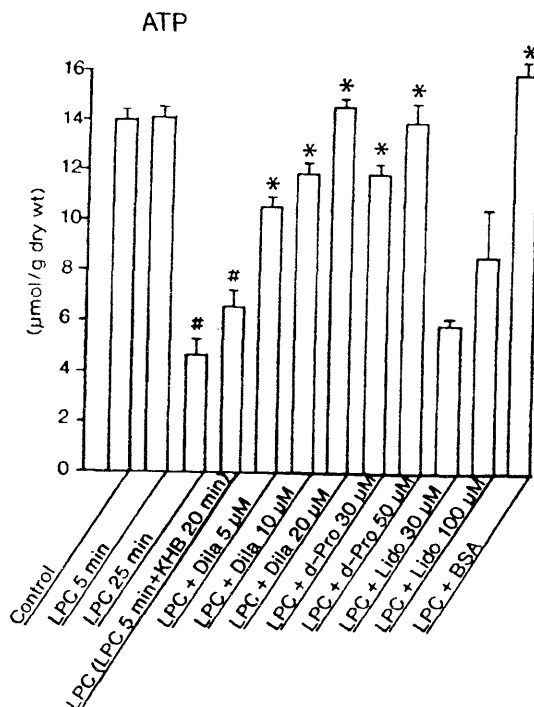
LPCは心筋の収縮機能を障害し、dilazepはconcentration dependentにLPCによる障害を軽減する。



第12図 Lysophosphatidylcholine (LPC) の心臓の機能(rate pressure product)に及ぼすd-propranololとlidocaine の作用。摘出ラット心臓の灌流。

○ : Krebs-Hensleit solution (KHB)で灌流。● : LPC 10 μ M で5分間灌流。以後はKHB で20 分間灌流。△ : LPC 10 μ M + d-propranolol 30 μ M で5分間灌流。以後はKHB で20 分間灌流。▲ : LPC 10 μ M + 50 μ M d-propranololで5分間灌流。以後はKHB で20 分間灌流。□ : LPC 10 μ M + 30 μ M lidocaine で5分間灌流。以後はKHB で20 分間灌流。■ : LPC 10 μ M + 100 μ M lidocaine で5分間灌流。以後はKHB で20 分間灌流。Langendorff: Langendorff 灌流。Working: Working heart 法による灌流。Treatment: LPC等の物質の投与。

LPCは心筋の収縮機能を障害し、lidocaineとd-propranolol はLPCによる障害を軽減する。



第13図 ラット心臓のadenosine

triphosphate (ATP) レベ

ル。Control : KHB で灌

流。LPC 5 min : 10 μM

LPCで5 分間灌流してすぐ心

臓をfreeze-clamp。LPC (5

min + KBH 20 min) : 10

μM LPCで5 分間灌流して、

その後20分間KHB で灌流し

た後にfreeze-clamp。LPC

+ Dila 5 μM : 10 μM LPC +

5 μM dilazepで5 分間灌流

して、その後20分間KHBで灌流した後にfreeze-clampした。

LPC + Dila 10 μM : 10 μM LPC + 10 μM dilazepで5 分間灌流

して、その後20分間KHB で灌流した後にfreeze-clamp。LPC

+ d-Pro 30 μM : 10 μM LPC + 30 μM d-propranololで5 分間

灌流して、その後20分間KHB で灌流した後にfreeze-clamp。

LPC + d-Pro 50 μM : 10 μM LPC + 50 μM d-propranololで5

分間灌流して、その後20分間KHB で灌流した後に、freeze-

clamp。LPC + Lido 30 μM : 10 μM LPC + 30 μM lidocaineで

5 分間灌流して、その後20分間KHB で灌流した後にfreeze-

clamp。LPC + Lido 100 μM : 10 μM LPC + 100 μM

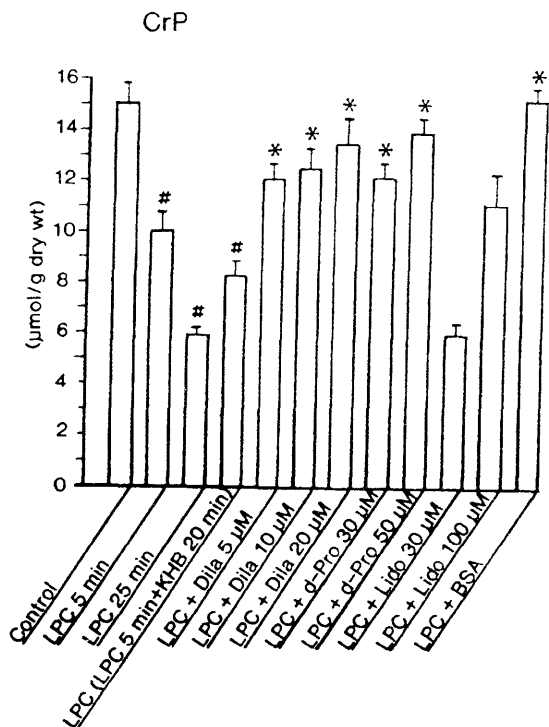
lidocaineで5 分間灌流して、その後20分間KHB で灌流した後

にfreeze-clamp。LPC + BSA : 10 μM LPC + 10 μM bovine

serum albuminで5 分間灌流して、その後20分間KHB で灌流

した後にfreeze-clamp。*P<.05 (LPC (LPC 5 min + KHB 20

min)群に対して) #P<.05 (Control群に対して)

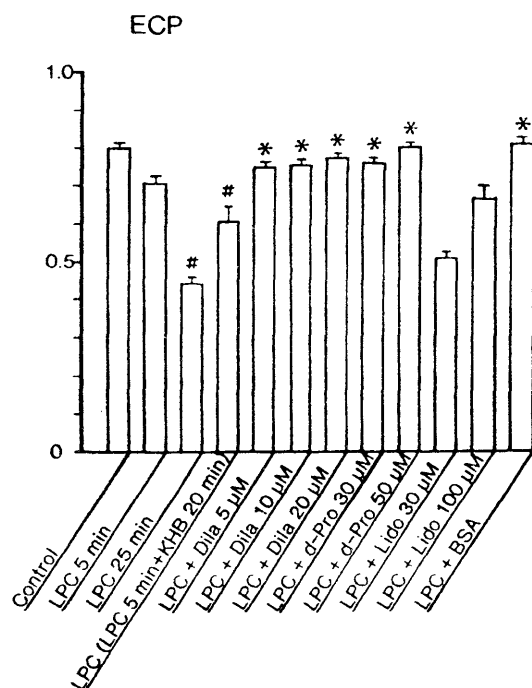


第14図 ラット心臓のcreatine phosphate (CrP) レベル。

Symbol は第13図に同じ。

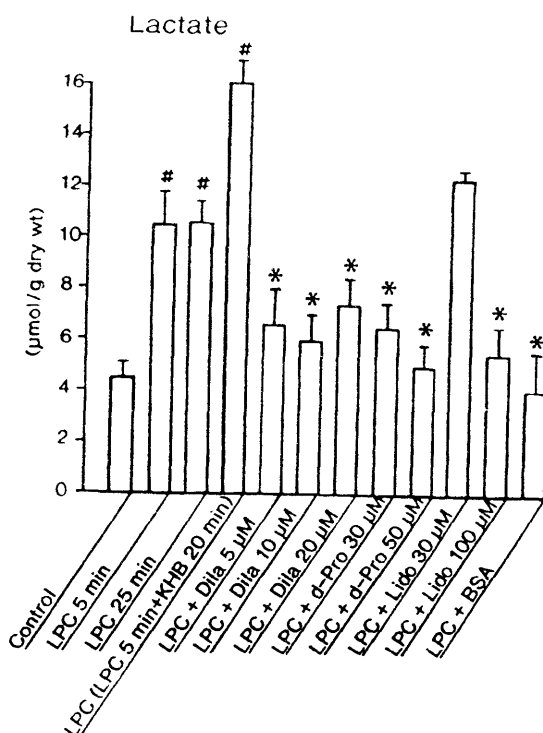
に抑制した。この結果は心機能での実験と基本的には同じであり、これによって、我々の仮説が指示されたことになる。

第14図は心筋組織のクレアチンリン酸(CrP)レベルを調べた実験である。LPCはCrPのレベルを低下させ、dilazepとd-propranololは、LPCによるCrPの低下を抑制した。従って、CrPのdataは基本的にはATPのdataと同じである。第15図は心筋組織のenergy charge potential (ECP)レベルを調べた実験である。この実験結果も基本的にはATPやCrPのdataと同じで、dilazepとd-propranololは、LPCによるECPの低下を抑制した。第16図は心筋組織の乳酸(lactate)レベルを調べた実験である。LPC投与によって、lactateレベルは上昇した。LPCによるlactateの上昇は、dilazepとd-propranololによって抑制された。Lidocaineは無効であった。



第15図 ラット心臓のenergy charge potential (ECP) レベル。

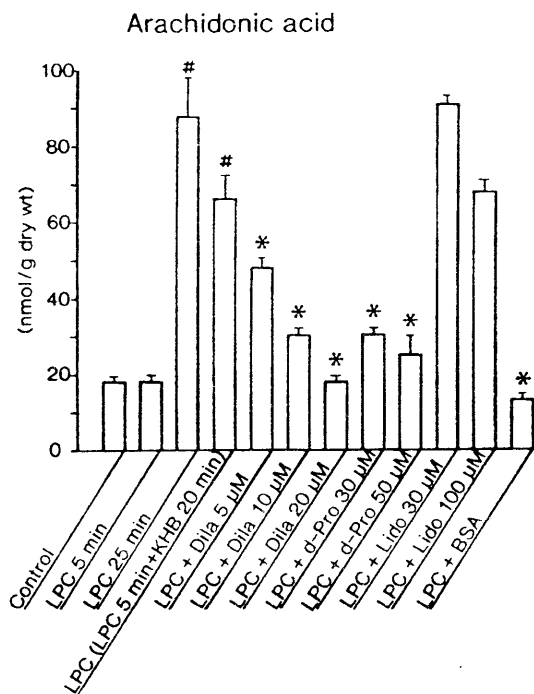
Symbol は第13図に同じ。



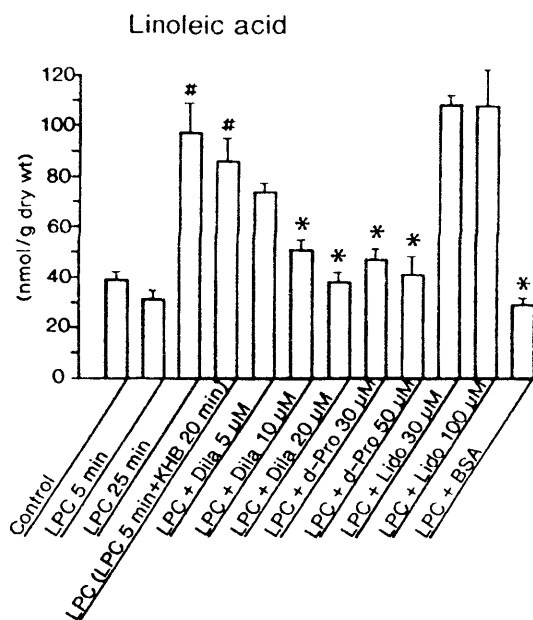
第16図 ラット心臓の乳酸

(lactate) レベル。

Symbol は第13図に同じ。

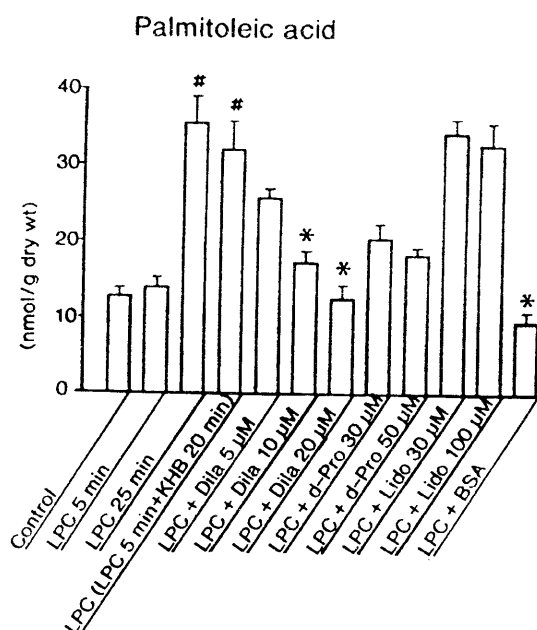


第17図 ラット心臓のアラキドン酸 (arachidonic acid) レベル。Symbol は第13図に同じ。

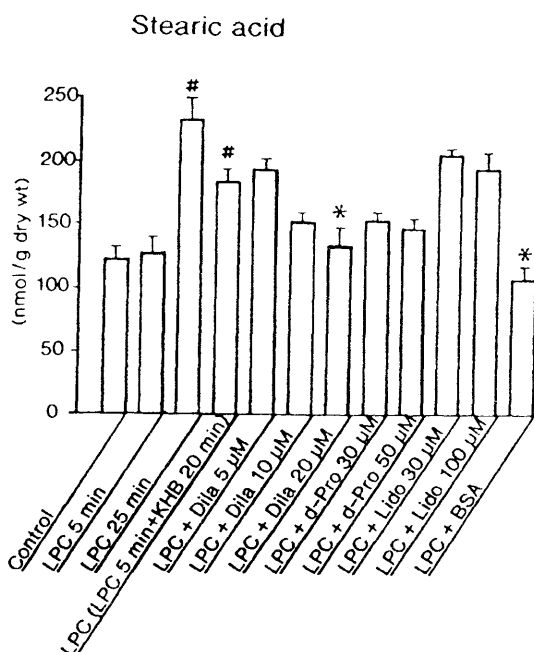


第18図 ラット心臓のリノール酸 (linoleic acid) レベル。Symbol は第13図に同じ。

第17図は心筋組織のアラキドン酸レベルを調べた実験である。LPC投与によって、アラキドン酸レベルは著明に上昇した。LPCによるアラキドン酸レベルの上昇にも時間がかかるらしく、LPCを与えて5分後には上昇しなかったが、その後KHBで20分間灌流すると、アラキドン酸レベルは著明に上昇した。この上昇は、dilazepとd-propranolol によって抑制されたが、lidocaineによっては抑制されなかった。第18図は心筋組織のリノール酸レベルを調べた実験である。LPC によってリノール酸レベルは上昇した。この上昇はdilazepとd-propranolol によって抑制されたが、lidocaine によっては抑制されなかった。第19図は心筋組織の パルミチン酸レベルを調べた実験である。LPC によってパルミチン酸レベルは上昇した。この上昇はdilazepとd-propranolol によって抑制されたが、lidocaineによっては抑制されなかった。第20図は心筋組織のステアリン酸レベルを調べた実験である。LPC によってステアリン酸レベルは上昇した。この上昇はdilazepとd-propranolol によって抑制されたが、lidocaineによっては抑制されなかった。



第19図 ラット心臓のパルミチン酸 (palmitoleic acid) レベル
Symbol は第13図に同じ。



第20図 ラット心臓のステアリン
酸 (stearic acid) レベル
Symbol は第13図に同じ。

考察

本実験の結果から、LPCは心臓の機械的活動(収縮力)と代謝活動を低下させることが分かった。これらの変化は虚血による変化とよく似ており、LPCは虚血・差灌流障害の原因物質である可能性がある。

大変面白いことに、LPCによる心筋障害はdilazepとd-propranololによって軽減されることが分かった。この二つの物質は Ca^{2+} antagonistでもなければ、 β -adrenoceptor antagonistでもない。たしかに、 Ca^{2+} antagonistや β -adrenoceptor antagonistは虚血・再灌流障害に有効であるが、その作用メカニズムは収縮力や拍動数の減少や後負荷の低下である。従って、心臓をとりまく因子に作用した結果、虚血心筋保護をしたという可能性がある。しかし、本実験の場合、心臓は摘出してあるし前負荷も後負荷は一定にしてあるので、dilazepやd-propranololの作用メカニズムは心臓をとりまく因子に効いた結果ではなく、心臓自身に作用した結果であると考えられる。このように、虚血・再灌流障害を防止する薬物は心臓の細胞を保護する薬物であると考えた方がよいであろう。

ではなぜ、dilazep とd-propranololはLPCの作用を保護するのであろうか。この疑問に対しては、まだ答えることができない。この問題を解決するためには、心筋細胞そのものに対して、LPC は害作用があるのか、またLPCによる細胞障害に対して、dilazep とd-propranololは有効なのかどうかについても研究しなければならない。

結論

虚血・再灌流時に蓄積するLPCは虚血・再灌流と同じような障害を心臓にあたえることが分かった。Dilazep とd-propranololはLPCによる心臓障害を軽減することが分かった。

- 4 Dilazepとd-propranolol はlysophosphatidylcholine (LPC)による心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制する。

目的

今までの研究によって、LPCは虚血・再灌流と同じような障害を心臓にあたえ、dilazep とd-propranololはLPCによる心臓障害を軽減することが分かった。虚血・再灌流障害の時には細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するので、本研究では、LPCは心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させるのかどうか、また、LPCによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はdilazep やd-propranololによって、抑制されるのかどうかを確かめるために行った。

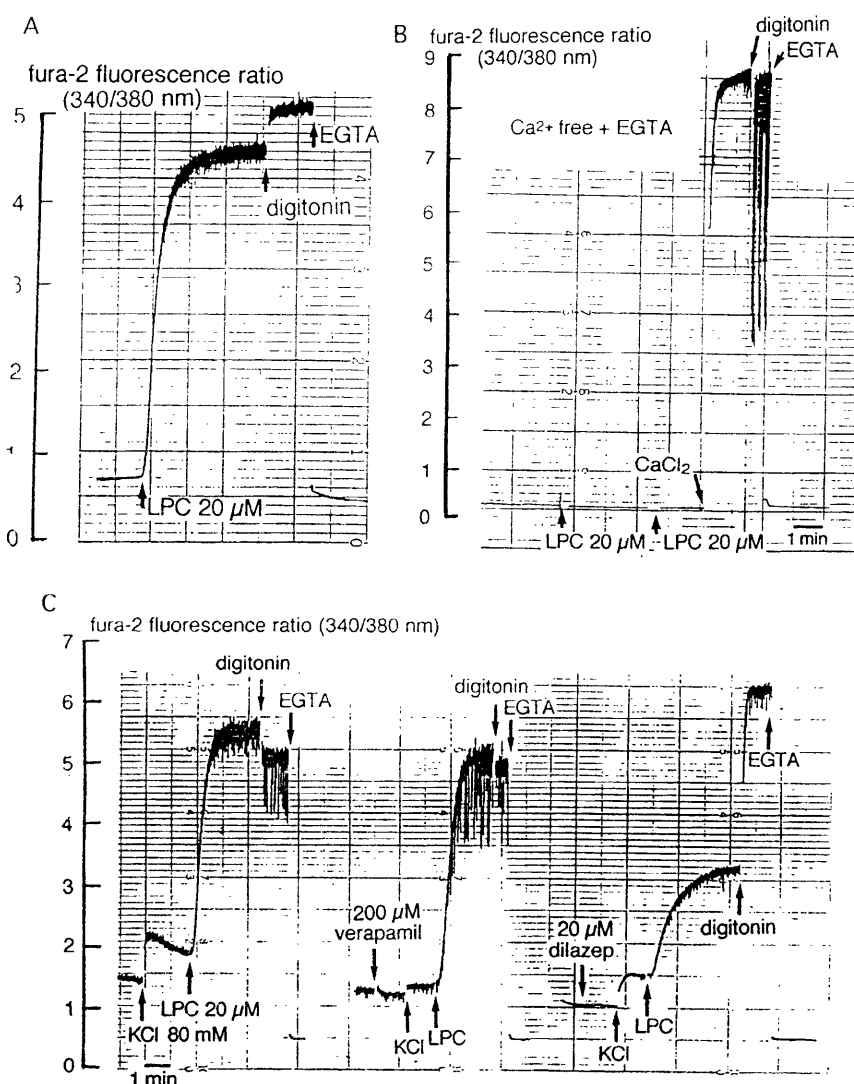
実験方法

ラットから心臓を摘出し、心室筋細胞を分離し、Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) bufferに浮遊させた。ある実験ではEGTAを含む Ca^{2+} -free KRB bufferを用いた。細胞内 Ca^{2+} 濃度はfura-2を細胞内にloadし、その蛍光を蛍光光度計で測定することによって得られた。また、細胞の形態変化も測定した。

実験結果

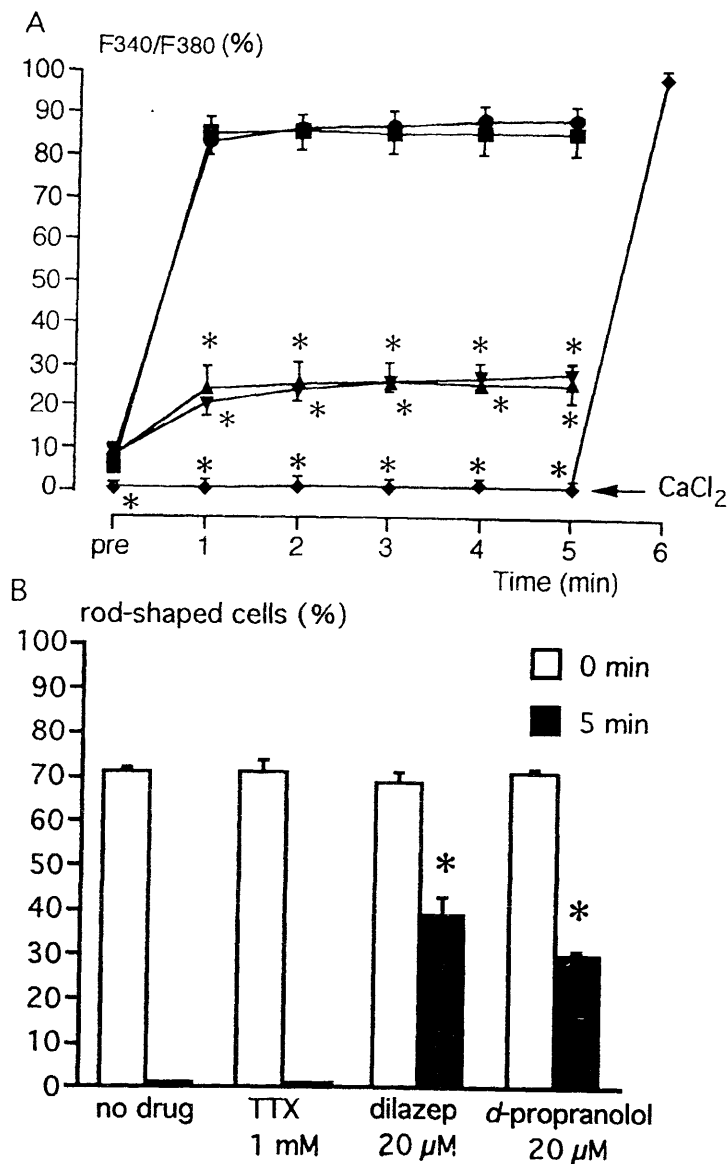
LPCを与える前の蛍光比(340 nmと500 nmの比で、これによって Ca^{2+} 濃度を測定出来る)は0.77であり、71%の細胞は短冊形(rod shape)をしていた。20 μM のLPCを投与すると、蛍光比は急激にしかも著明に上昇した(4.69になった)。つまり、LPCは細胞内 Ca^{2+} 濃度を著明に上昇した。また、LPC投与によってすべての細胞は丸形(round shape)になった。つまり、rod shapeは0%になった。 Ca^{2+} -free KRB buffer中では、LPCは細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させなかった。この状態下で1 mM CaCl_2 投与すると細胞内 Ca^{2+} 濃度を著明に上昇した。80 μM のKCl投与で細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇し、この上昇は200 μM のverapamilによって抑制された。しかし、LPCによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は200 μM のverapamilによって抑制されなかった。

Tetrodotoxin (TTX, 0.1 mM)はLPCによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制しなかった。Dilazep (20 μM)はKCLによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制しなかったが、LPCによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を著明に抑制した。d-Propranololもdilazep同様の作用を示し



第21図 Fura-2でloadされた分離ラット心室筋細胞のoriginal recordingを示す。A: Lysophosphatidylcholine (LPC) の20 μ Mを1 mM CaCl_2 を含むKrebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer中の心筋細胞に与えると、細胞内 Ca^{2+} 急激に上昇した。Digitoninで細胞膜を破壊しても細胞内 Ca^{2+} は大きくは上昇しなかったため、LPCは細胞外液の Ca^{2+} 濃度近くまで細胞内 Ca^{2+} を大きく上昇したと思われる。B: 1 mM EGTAを含む Ca^{2+} -free KRB buffer中でのLPCに対する心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の反能。LPCは心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させない。し

かし、外液中に CaCl_2 を入れれば細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇する。C: LPCによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に及ぼす verapamil と dilazep の影響。Dilazep は LPC による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制したが、verapamil は KCl による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制する濃度で LPC による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制しなかった。



第22図 LPC作用に対する各種薬物などの影響。A: LPC (20 μM) による細胞内Ca²⁺濃度上昇に及ぼすCa²⁺-free KRB buffer, tetrodotoxin (TTX), dilazepならびにd-propranololの作用。● (no drug), ◆ (Ca²⁺-free KRB buffer), ■ (1 mM TTX), ▲ (20 μM dilazep), ▼ (20 μM d-propranolol) B: LPCによる心筋細胞の形態変化に及ぼす各種薬物などの影響。LPC投与によって心筋細胞はrod型からround型に形態変化する。1 mM TTX はLPCによる心筋細胞の形態変化を

抑制しなかったが、20 μ M dilazepと20 μ M d-propranololは抑制した。 $*P < .05$ (●群に対して)

た。この結果は第21図に示してある。第22図は形態変化についての実験結果を示してある。LPCによる形態変化はdilazepとd-propranololによって抑制されたが、TTXによっては抑制されなかった。つまり、dilazep とd-propranolol はLPCによる心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制し、LPCによる細胞の形態変化を抑制したが、TTX はLPCによる心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇も、LPCによる細胞の形態変化も抑制しなかった。

考察

Verapamil がLPCによる心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を抑制したが、verapamil によるこの作用は Ca^{2+} channel に対する拮抗作用ではない。理由は、LPC 実験に用いられた濃度で電位依存性 Ca^{2+} channelを遮断することが分かっているからである(本実験でもKClに対する作用は抑制している)。この考えが正しいことはd-propranololがLPCの作用を抑制することからも支持される。また、LPCの作用には、TTXに感受性をもつ Na^{+} channelの部分にも関係がない。しかし、 Na^{+} channelの他の部分に参与しているかどうかは分からない。

LPCは Na^{+} channelのinactivation processを抑制するという報告がある。もしこれが事実とすれば、LPCは Na^{+} の細胞内への移動を促進することになる。細胞内の Na^{+} 濃度が上昇すれば、 Na^{+}/Ca^{2+} exchange mechanism によって細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をおこす。LPCの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機構のメカニズムはこのようなprocessであるかも知れない。もし、そうだとすると、dilazepやd-propranololはなぜLPCの作用を抑制するのであろうか。この問いに対する答えはまだない。

結論

LPC は心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と細胞の形態変化(rod 型からround型) をおこす。
LPC のこれらの作用はdilazep とd-propranololによって抑制される。しかし、これら薬物による抑制のメカニズムはまだ明らかではない。

5 Lysophosphatidylcholine (LPC)による心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に及ぼす各種 β -adrenoceptor antagonistsの作用。

目的

今までの研究によって、LPCは心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、diltiazem とd-propranololはLPCによる心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制することが分かった。d-propranololは β -遮断作用が弱いとはいえ、propranololの約1/50 はある。そこで、d-propranololのanti-LPC作用には β -遮断作用が本当に関係していないのかどうかを確かめるために本実験を行った。

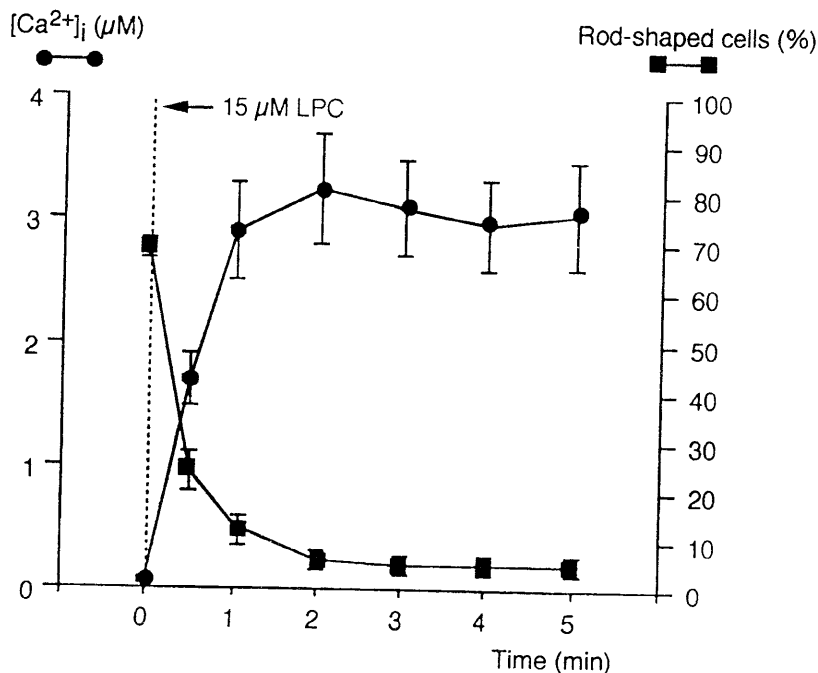
実験方法

ラットから心臓を摘出し、心室筋細胞を分離し、Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) bufferに浮遊させた。細胞内 Ca^{2+} 濃度はfura-2を細胞内にloadし、その蛍光を蛍光光度計で測定することによって得られた。また、細胞の形態変化も測定した。 β -遮断薬としては、l-propranolol, d-propranolol, l-penbutolol, d-penbutolol, acebutolol, timolol, atenolol, practololを用いた。これらの β -遮断薬の薬理学的性質は第3表に示してある。

実験結果

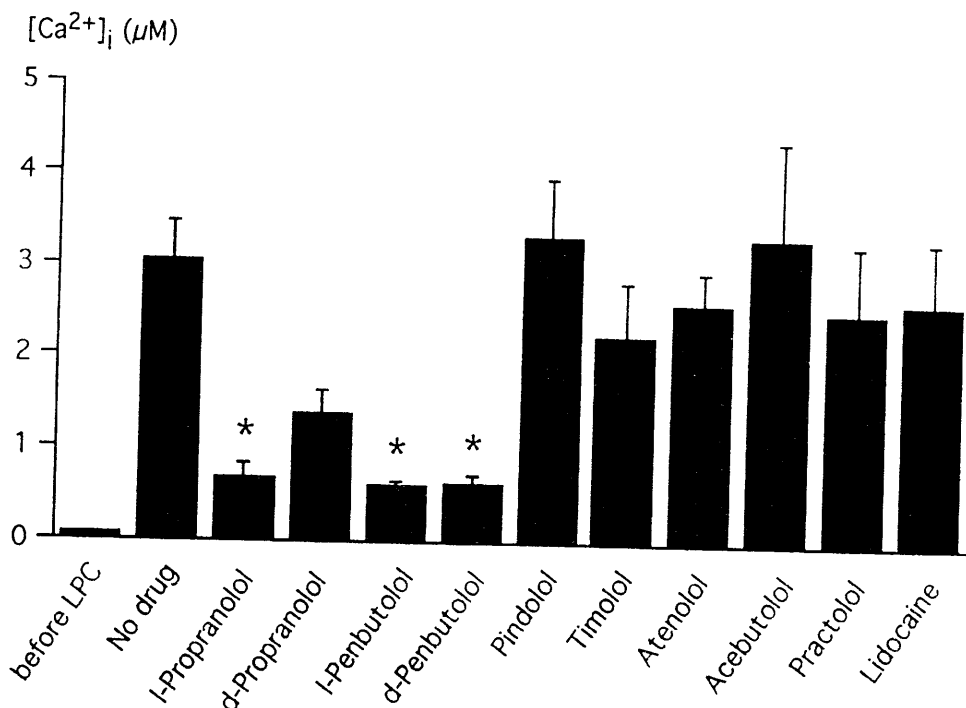
心筋細胞に15 μM のLPCを投与すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)は72 nM から3042 nMへ上昇し、短冊形(rod shape)の細胞数の全体の細胞数に対する割合は、69 %から5 %へと減少した。LPC のよるこれらの変化は、投与2 分後の変化である。つまり、LPC の心筋細胞に対する変化は急激でしかも著明である。第23図はLPC投与による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化と細胞の形態変化の時間経過を示してある。この図から分かるようにLPC投与5 分後には $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と形態の変化はほぼ最大に達している。このため、以後おこなわれるLPCに対する薬物作用の実験では、LPC投与後5 分の時点での $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と形態の変化を観察した。

第24 図は各種 β -遮断薬(20 μM)による前処置がLPC(15 μM)の15分間投与による変化に対してどのような影響を及ぼすかが示してある。 β -遮断作用(βAA)と膜安定化作



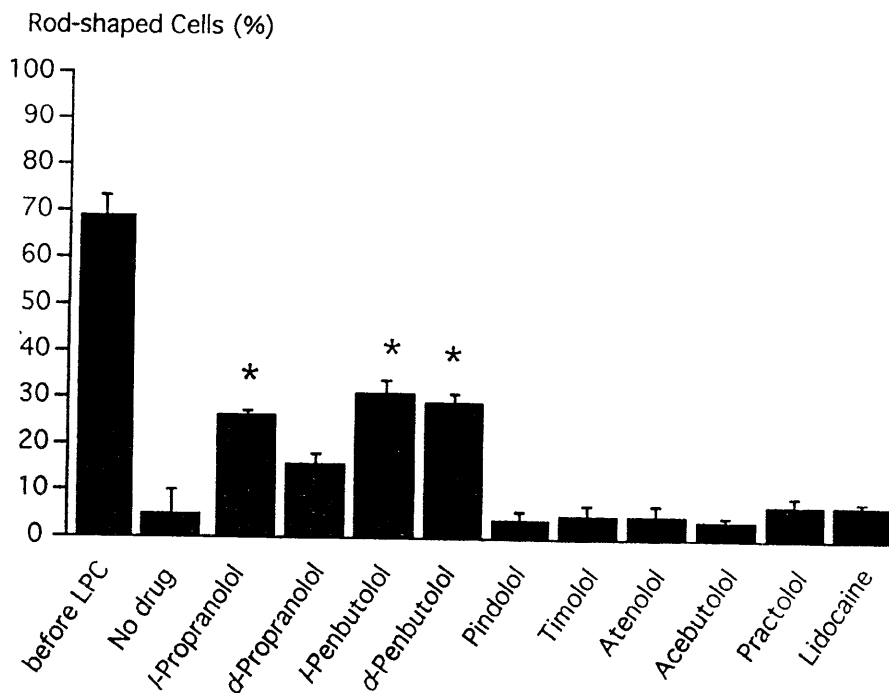
第23図 心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)上昇ならび心筋細胞の形態変化に及ぼすLPC (15 μM)投与の影響。LPC は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を急激にしかも著明に上昇させ、細胞の形態をrod型からround型へ変化させている。

用(MSA)を合わせ持つl-propranololとl-penbutololはLPCによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を著明に抑制した。 βAA は弱いがMSAを持つ d-propranolol とd-penbutololもLPCによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を著明に抑制した。第26図(a)に示してあるように、これらの β -遮断薬の作用は投与した濃度に依存していた。第3表にはLPCによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を50 %抑制した時の薬物の濃度(IC_{50})も記載されている。Pindolol とacebutololは βAA とMSAの両方を持つが、LPCによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制しなかった。Timolol, atenololおよびpractololは βAA をもつがMSAを持たないが、これらの薬物もLPCによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制しなかった。ある実験では、pindololとacebutololの濃度を200 μM に上げて実験をしたが、LPCを投与すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は66 nM から1863 nMへ上昇した。つまり、pindololとacebutololはLPCによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制しなかった。Lidocaine (100 μM)もLPCによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制しなかった(第24図)。

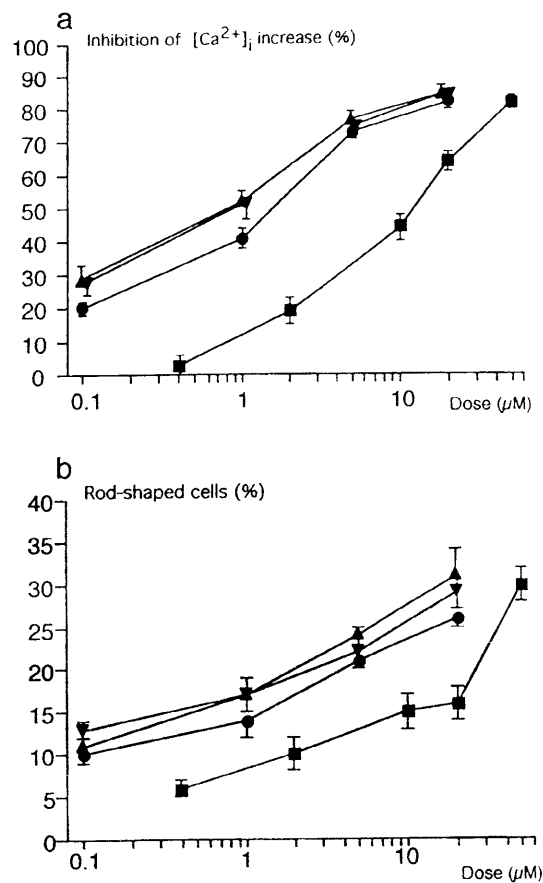


第24図 LPC (15 μ M)の5分間投与による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に及ぼす各種 β -遮断薬 (いずれも20 μ M)とlidocaine(100 μ M)の影響。 β -遮断薬の種類によって、LPCの作用に対する効果が異なっている。この図から、 β -遮断薬のanti-LPC作用の差異は β -遮断の強さの差異によるものではないことが分かる。

第25図はLPCによる心筋細胞の形態変化にたいする各種 β -遮断薬(20 μ M)前処置の影響が示されている。I-Propranolol, I-penbutololならびにd-penbutololはLPCによる心筋細胞の形態変化(round型への移行)を有意に抑制した。しかも、これらの薬物の作用は濃度依存的であった(第26図(b))。d-Propranololは20 μ MではLPCによる心筋細胞の形態変化を抑制しなかったが、50 μ Mでは抑制した。IC₅₀値は計算出来なかった。その理由は、使用した最大濃度でも、形態変化を100 %抑制出来なかったからである。Timolol, pindolol, acebutolol, atenolol, practololおよびlidocaineはLPCによる形態変化を抑制しなかった。



第25図 LPC (15 μ M)の5分間投与による心筋細胞の形態変化に及ぼす各種 β -遮断薬 (いずれも20 μ M)とlidocaine(100 μ M)の影響。 β -遮断薬の種類によって、LPCの作用に対する効果が異なっている。この図からも、 β -遮断薬のanti-LPC作用の差異は β -遮断の強さの差異によるものではないことが分かる。



第26図 l-Propranolol, d-propranolol, l-penbutololおよび d-penbutolol の LPC (15 μM) の心筋細胞作用に対する用量依存的な抑制作用。

(a) LPC (15 μM) 投与による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に及ぼすl-propranolol, d-propranolol, l-penbutololおよび d-penbutolol の用量作用曲線。

(b) (15 μM) 投与による心筋細胞の形態変化に及ぼすl-propranolol, d-propranolol, l-penbutololおよび d-penbutolol の用量作用曲線。

●: l-propranolol, ■: d-propranolol, ▲: l-penbutolol, ▼: d-penbutolol

第3表 各種β-遮断薬の薬理学的性質と物理化学的性質。

Drugs	BAA potency ratio ^(a) (<i>dl</i> -propranolol = 1)	MSA ^(a)	log octanol/water coefficients ^(a) (at 37°C, pH 7.4)	IC ₅₀ ^(b) (μM)
<i>dl</i> -Propranolol	1	+	20.2	
<i>l</i> -Propranolol	2	+	20.2	1.28
<i>d</i> -Propranolol	0.01 - 0.02	+	20.2	10.5
<i>l</i> -Penbutolol	4	+	179.0	0.64
<i>d</i> -Penbutolol	?	+	179.0	0.74
Acebutolol	0.3	+	0.02	>200
Pindolol	6	+	0.82	>200
Timolol	6	-	1.16	>20
Atenolol	1	-	0.68	>20
Practolol	0.3	-	0.15	>20

a: All values were cited from Cruickshank and Prichard (1987).

b: The concentration required to inhibit the LPC-induced [Ca²⁺]_i increase by 50 %, calculated from the results of Figure 3.

MSA: Membrane stabilizing activity indicated by local anesthetic action

BAA: β-adrenoceptor antagonistic action

第4表 各種β-遮断薬のLPCによるクレアチンキナーゼ(CPK)遊離に
及ぼす作用。

treatment	n	CPK release %
no drug - LPC	6	9 ± 1
no drug + LPC (15 μM)	20	45 ± 2 †
l-propranolol (20 μM) + LPC	9	31 ± 3 *†
d-propranolol (50 μM) + LPC	10	32 ± 2 *†
acebutolol (20 μM) + LPC	5	48 ± 3 *†
timolol (20 μM) +LPC	5	46 ± 7 *†

* significantly different from no drug + LPC group.

† significantly different from no drug - LPC group.

All data are shown in mean ± s.e. mean.

第4表は各種β-遮断薬のLPCによるクレアチンキナーゼ(CPK)遊離作用に対する抑制効果を示してある。LPCなしの時は遊離したCPKの値はtotal CPKの9 %であった。LPCを5 分間作用させると、CPKの値はtotal CPK値の45 %となった。l-Propranolol (20 μM)とd-propranolol (50 μM)はLPC によるCPK 遊離を有意に抑制したが、acebutolol (20 μM) とtimolol (20 μM)は抑制しなかった。

考察

LPC は[Ca²⁺]_i を上昇させ、細胞の形態を変化させた。本研究の結果は各種β-遮断薬のLPC作用に対する効果は一樣ではないということである。各種β-遮断薬のβAAだ

けでは説明できない。MSAは細胞の膜安定化に関連しているので、LPCの作用に拮抗する重要な候補であるが、acebutololが無効であったことから、MSA の関与も大きくないと考えられる。しかし、pindolol やacebutololのMSAはそれぞれ、300 μ M及び134 μ Mであるとする報告があるので、MSA の関与を完全に否定するわけにはいかない。そこで200 μ Mのpindololとacebutololで実験をしたが、それでもこの両薬物はLPCによる作用を減弱できなかった。従って、MSAのみでanti-LPC作用を説明することも出来ない。

l-Propranolol, d-propranolol, l-penbutololおよびd-penbutolol は他の β -遮断薬に比べてanti-LPC作用が高かったが、脂溶性も高い。l-Penbutololとd-penbutololは最も脂溶性が高く、最も強いanti-LPC作用を示した。LPCは両親媒性のために細胞膜にとけ込み、細胞の内外にある蛋白質と結合する。このために、LPC は細胞膜にたいする障害作用が強いと考えられる。脂溶性の強い β -遮断薬は活性酸素による脂質過酸化を、その脂溶性のためい膜において、よく抑制するという報告がある。またLPCによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をflunaridineが抑制するが、flunaridineは脂溶性が高いという。従って、本実験で得られた結果は、 β -遮断薬のanti-LPC作用はその脂溶性に依存しているであろうことを示している。

結論

LPC は $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、細胞の形態を変化させるという細胞障害作用を持っているが、ある種の β -遮断薬はLPCによるこれらの作用を抑制した。最もよく抑制したのは、脂溶性の高い β -遮断薬であるl- and d-propranololとl- and d-penbutololであった。 β -遮断薬のanti-LPC作用は β AAとMSAだけでは説明できない。

- 6 Lysophosphatidylcholine (LPC)はモルモット心筋細胞膜のnon-selective cation currentを増加させる。

Lysophosphatidylcholine decreases L-type Calcium Current in Guinea-pig Ventricular Myocytes

Katsuaki Magishi¹, Kazuto Yazawa², Yasushi Abiko², Kazuo Ichihara³ and Yoshihiko Kubo¹

First Department of Surgery¹, Department of Pharmacology ², and Department of Clinical Pharmacology³, Asahikawa Medical College, Asahikawa 078, Japan

Running head: Lysophosphatidylcholine on L-type calcium current

Address for correspondence:

Yasushi Abiko, M.D.

Department of Pharmacology, Asahikawa Medical College

Asahikawa 078, Japan

Telephone: (+81)-166-65-2111 ext. 2360

Fax: (+81)-166-65-5016

ABSTRACT

We conducted experiments in order to examine whether lysophosphatidylcholine (LPC) decreases the L-type Ca^{2+} current (I_{Ca}) at pH 7.4 and pH 6.4 in guinea-pig ventricular myocytes by the use of whole-cell voltage clamp technique. At pH 7.4, LPC (3 μM) did not affect I_{Ca} , but LPC (10 μM) decreased I_{Ca} (the mean rate of decrease was 60.0 %) without affecting shape of the current-voltage curve (though amplitude of I_{Ca} was reduced), relative inactivation curve and inactivation time constants. In addition, LPC (10 μM) shifted the holding current abruptly to an inward direction, suggesting that LPC increases non-selective leaky current. At pH 6.4, LPC (3 μM) decreased I_{Ca} gradually (the mean rate of decrease was 49.4 %). The following results were also obtained at pH 6.4. LPC (3 μM) did not change shape of the I-V curves (though amplitude of I_{Ca} was reduced), and also did not change the inactivation time constants. The inactivation curve, however, shifted to negative potentials by LPC (3 μM). LPC (10 μM) reduced also I_{Ca} , the mean rate of decrease was 89.9 % but increased the holding current to inward direction greatly. In conclusion, LPC decreased I_{Ca} at both pH 7.4 and 6.4 in the guinea-pig myocyte, and the inhibitory action of LPC on I_{Ca} was greater at pH 6.4.

Keywords: calcium channels; lysophosphatidylcholine; whole-cell patch clamp; guinea pig ventricular myocyte; pH modulation

Introduction

Both ischemia and reperfusion of the heart produce accumulation of Ca^{2+} in the myocardial tissue (Das and Engelman, 1993). The mechanism of accumulation of Ca^{2+} induced by ischemia and reperfusion, however, is not fully understood. One of the candidates responsible for accumulation of Ca^{2+} is lysophosphatidylcholine (LPC), because LPC accumulates during both ischemia and reperfusion in the myocardium (Corr *et al.*, 1987; Kinnair *et al.*, 1988) and increases intracellular Ca^{2+} concentration markedly when given exogenously (Sedlis *et al.*, 1983 ; Ver Donck *et al.*, 1992; Das and Engelman, 1993; Hashizume and Abiko, in press). LPC was shown to cause long-lasting bursts of opening and prolongation of the inactivation process of the Na^+ channel, leading to abnormal opening of the Na^+ channel (Burnashev *et al.*, 1991), and therefore it increases the intracellular Na^+ concentration and then the intracellular Ca^{2+} concentration through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange system. In addition, we have reported that exogenous LPC increases non-selective cation current (including Ca^{2+} current) in the guinea-pig ventricular myocytes (Magishi *et al.*, in press), being another mechanism of the LPC-induced increase in the intracellular Ca^{2+} level. There is also other possibility that LPC may increase the voltage-dependent Ca^{2+} current. If LPC opens the voltage-dependent L-type Ca^{2+} channel (L-type Ca^{2+} channel), the mechanism of the LPC-induced increase in the intracellular Ca^{2+} concentration can be more clearly understood. However, the effect of LPC on L-type Ca^{2+} current has not been adequately examined.

The present study therefore was designed to examine the effect of LPC on the

L-type Ca^{2+} current in the guinea-pig ventricular myocytes. In addition, influence of acidic condition on the effect of LPC was investigated, because pH of the myocardial tissue decreases during ischemia and optimum pH of the phospholipase A_2 , which is responsible for release of LPC from membrane phospholipids, is at the acid pH (Das and Engelman, 1993), and because the effect of LPC on the electrical property of the heart increases under the acidic conditions (Snyder *et al.*, 1981).

Materials and Methods

Preparation of ventricular myocytes

Single ventricular myocytes of a guinea-pig were prepared as described by Yazawa *et al.* (1990). Briefly, a female guinea-pig weighing 300-500 g was anesthetized by intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg). After thoracotomy under artificial respiration, the heart was taken and mounted on a Langendorff perfusion system for retrograde perfusion of the coronary artery. The heart was perfused with the following oxygenated solutions in the following order at 37 °C; (1) Tyrode solution for 3 min, (2) nominally calcium-free Tyrode solution for 10 min, (3) nominally calcium-free Tyrode solution containing collagenase 0.08 mg/ml (Yakult, Tokyo, Japan) for about 5-10 min, and (4) the high-K⁺ solution for storage of the myocytes (storage solution) for 10 min. Subsequently, the atria were dissected away and the ventricles were cut into pieces, which were placed in a beaker containing the storage solution and then gently shaken to disperse the isolated myocytes. The small pieces of myocardial tissue were filtered by a 210 μ m stainless steel mesh. Ventricular myocytes were incubated with deoxyribonuclease 0.02 mg/ml (Tokyo Kasei, Tokyo, Japan) and protease 0.09 mg/ml (alkaline protease, Nagase Biochemicals, Tokyo, Japan) at 37 °C for 10 min. Finally myocytes were washed twice with the storage solution after centrifugation at 1000 rpm (about 90 G) for 5 min at room temperature, and then stored in the storage solution at 4 °C.

Solutions

Tyrode solution (mM): NaCl, 143; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 0.5; NaH₂PO₄, 0.25; HEPES, 5; Glucose, 5.6; pH 7.4 adjusted with NaOH. Nominally calcium-free solution: this solution was identical with the standard Tyrode solution except that CaCl₂ was omitted. Storage solution (mM): KOH, 70; KCl, 40; L-glutamic acid, 50; taurine, 20; KH₂PO₄, 20; MgCl₂, 3; glucose, 10; HEPES, 10; EGTA, 0.5; pH 7.4 adjusted with KOH. Test solution (pH 7.4) (mM) for isolation and measurement of L-type Ca²⁺ current (*I_{Ca}*): CsCl, 130; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 0.5; 4-aminopyridine, 3; HEPES, 10; pH 7.4 adjusted with CsOH. Test solution (pH 6.4): test solution (pH 7.4) in which 10 mM MES was added in place of HEPES and pH was adjusted to 6.4. Pipette solution (pH 7.4) (mM): CsOH, 110; CsCl, 20; MgCl₂, 1; K₂ATP, 5; potassium creatine phosphate, 5; HEPES, 5; EGTA, 10; CaCl₂, 1.43; pH 7.4 adjusted with aspartic acid. When the test solution (pH 6.4) was used, the following pipette solution (pH 6.4) (mM) was used: CsOH 110; CsCl, 20; MgCl₂, 1; K₂ATP, 5; potassium creatine phosphate, 5; MES, 5; EGTA, 10; CaCl₂ 0.015; pH 6.4 adjusted with aspartic acid. The amounts of Ca²⁺ in the pipette solution (pH 7.4) and that in the pipette solution (pH 6.4) were calculated according to the equation of Fabiato and Fabiato (1979) corrected by Tsien and Rink (1980), so that pCa in both solutions could be 8. External solutions including Tyrode and test solutions were warmed to 35-37 °C by the use of a warm water jacket before use, and the pipette solutions were also warmed to 35-37 °C before use. L- α -lysophosphatidylcholine (palmitoyl) (abbreviated as LPC) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was dissolved in distilled water to make a solution containing 10 mM LPC, which was frozen and stored at - 20 °C. The frozen and stored LPC was thawed and diluted to

appropriate concentrations with the test solution before use. All the experiments were performed at 35-37 °C.

Recording of I_{Ca}

The whole-cell clamp technique employed in the present study was essentially the same as that described by Hamill *et al.* (1981). The resistance of the pipette filled with the pipette solution was 1.8-3.6 MΩ. A tight seal was established with Tyrode solution. After whole-cell clamp was established, the perfusate was changed from the Tyrode solution to the test solution. Depolarization square pulses having 150 msec in duration were applied to the cell with the frequency of 0.14 Hz. Membrane holding potential was kept at -40 mV. Current signals were filtered at 5 kHz, stored in a computer (9801 RL, NEC, Tokyo, Japan) using an on-line data acquisition system and also in a video tape recorder (Panasonic Macload, National, Tokyo, Japan). The peak amplitude of I_{Ca} (simply expressed as amplitude of I_{Ca} or I_{Ca} in the present study) was defined as the difference between the peak of the inward current and the current taken immediately after the end of a depolarization pulse.

I_{Ca} was recorded in the test solution, in which other ionic currents, such as Na^+ current, inward rectifier K^+ current (I_{K1}), electrogenic Na^+/Ca^{2+} exchange current and Na^+-K^+ pump current were eliminated because neither Na^+ nor K^+ existed in the test solution. The delayed outward potassium current (I_K) was suppressed by application of Cs^+ in both extra (test)- and intracellular (pipette) solutions. Under the conditions of the present study, T-type calcium channels should not be activated because the holding potential was maintained as -40 mV

(Bean, 1985; Mitra and Morad, 1986).

Data analysis

The rate of decrease in I_{Ca} induced by LPC was calculated as $\{[(I_{Ca} \text{ without LPC}) - (I_{Ca} \text{ with LPC})] / (I_{Ca} \text{ without LPC})\} \times 100 (\%)$. (I_{Ca} without LPC means I_{Ca} under the control conditions.) All the values were expressed as mean $\pm$ s.e. Statistical analysis of difference among means was performed by Student's t test.

Results

Effects of LPC on I_{Ca} at pH 7.4

After whole cell patch clamp was established using Tyrode solution, the external solution was changed to the test solution (pH 7.4). The holding potential was kept at -40 mV. The depolarizing pulses (from the holding potential to -30 mV - +40 mV) having 150 msec in duration were applied to the myocyte at a frequency of 0.14 Hz. Figure 1 shows original tracings (A-D) and current-voltage relationships (I-V curves; bottom panel) of I_{Ca} in the absence or presence of 10 μ M LPC at pH 7.4; A and B were taken before application of LPC, and C and D were taken 5 min after the application of LPC. LPC (10 μ M) decreased the amplitude of I_{Ca} and increased background current; the LPC-induced increase in background current can be recognized when tracings of C and D are compared with those of A and B, i.e. LPC shifted the holding current to the inward direction or increased the inward current even when the membrane potential was kept at the holding potential. Nevertheless, LPC did not modify the shape of the I-V curve and did not shift the range of membrane potential at which the peak current was attained. The range of membrane potential, at which peak current was attained, was between 0 and +10 mV regardless of the application of LPC.

Application of a low concentration of LPC (3 μ M) did not change the amplitude of I_{Ca} , however. We also tried to examine the effect of 20 μ M LPC. After application of 20 μ M LPC, the myocyte began to beat and round up within 3 min after the application. Therefore we were not able to make any further

experiments with 20 μ M LPC.

Effects of LPC on I_{Ca} at pH 6.4

The conditions of the experiments with pH 6.4 were similar with those of the experiments with pH 7.4 except for pH. It is known that L-type Ca^{2+} current decreases when intracellular and/or extracellular medium becomes acidic (Yatani and Goto, 1983; Sato *et al.*, 1985 ; Irisawa and Sato, 1986), and therefore pH of both pipette and external was changed from 7.4 to 6.4 before application of LPC. The pipette solution was changed to the pipette solution (pH 6.4) from the beginning of all the experiments in this series of study. The whole cell patch clamp was then established in Tyrode solution at pH 7.4, and next the Tyrode solution was changed to the test solution (pH 6.4). When the external solution (pH 7.4) was changed to the solution (pH 6.4), the amplitude of I_{Ca} began to decrease and stopped to decrease attaining a steady state. After the steady was established, LPC was applied to the myocyte. Although 3 μ M LPC did not change the amplitude of I_{Ca} at pH 7.4 as stated earlier, it had the effect on the amplitude of I_{Ca} at pH 6.4. Figure 2 shows original tracings and I-V relations of I_{Ca} in the presence or absence of 3 μ M LPC at pH 6.4 (A and B are tracings in the absence of LPC, and C and D are those in the presence of LPC). LPC (3 μ M) decreased I_{Ca} at pH 6.4 slowly, but it did not change the shape of the I-V relation and did not shift the range of membrane potential at which peak current was attained. LPC (3 μ M) did not change the holding current either. Because LPC (10 μ M) decreased the amplitude of I_{Ca} markedly and hence the amplitude of I_{Ca} became very small, and because it increased the holding current

(inward current) very markedly, reliable data on I-V curves and inactivation curves of I_{Ca} in the presence of LPC ($10\ \mu\text{M}$) were not obtainable.

Effects of LPC on the time-course change in I_{Ca} at pH 7.4

After the whole-cell patch clamp was established using Tyrode solution, the external solution was changed to the test solution (pH 7.4). The holding potential was kept at -40 mV, and the pulses (150 msec in duration and 0.14 Hz in frequency) depolarized to 0 mV were applied. Spontaneous run down of I_{Ca} was not observed at least within 40 min after the start of experiments under the control conditions. Figure 3A illustrates the time-course change of amplitude of I_{Ca} before and during application of $10\ \mu\text{M}$ LPC. The amplitude of I_{Ca} began to decrease within 7~350 sec after the application of LPC; there was a time-delay in the appearance of the effect of LPC and the mean time-delay being 88.4 ± 22.5 sec ($n=16$). In an experiment with a myocyte shown in Figure 3, LPC ($10\ \mu\text{M}$) decreased the amplitude of I_{Ca} from 1.52 nA (before application of LPC) to 0.81 nA (immediately after the end of application of LPC), and therefore the rate of LPC-induced decrease in I_{Ca} was 47.0 %. In 16 myocytes, the mean decrease in I_{Ca} induced by LPC was 60.0 ± 4.64 % immediately after the end of LPC application.

Figure 3B shows original tracings taken at a, b and c in Figure 3A. LPC not only decreased the amplitude of I_{Ca} , but also shifted the holding current to an inward direction in 11 out of 16 cells (Fig. 3B (b,c)), while it did not change the holding current in 5 other cells. In 2 out of 11 cells, in which the holding current that had been shifted to the inward direction, the holding current fluctuated like an oscillation

wave. Microscopic examination revealed that some myocytes contracted and rounded up, while others did not change their shape, in 11 cells in which the holding current had been shifted to the inward direction.

Effects of LPC on the time-course change in I_{Ca} at pH 6.4

After the whole-cell patch clamp was established using the pipette solution (pH 6.4) and Tyrode solution, the external solution was changed to the test solution (pH 6.4). The holding potential was kept at -40 mV, and I_{Ca} was elicited by the pulses (150 msec duration, 0.14 Hz) depolarized to 0 mV. Spontaneous run down of I_{Ca} was not observed at least within 40 min after the start of experiments under the control conditions. LPC ($3\mu\text{M}$) decreased the amplitude of I_{Ca} as was described earlier. Figure 4 shows the time-course change in amplitude of I_{Ca} after application of $3\mu\text{M}$ LPC. The rate of decrease in the amplitude of I_{Ca} induced by LPC was $49.4 \pm 8.85\%$ ($n=12$). There was also a time-delay in the appearance of the effect of LPC, and the mean time-delay was $59.5 \pm 17.7\text{ sec}$ ($n=12$). The holding current shifted abruptly to an inward direction during application of LPC in 4 of 12 cells.

A high concentration of LPC ($10\mu\text{M}$) decreased the amplitude of I_{Ca} markedly from $0.99 \pm 0.22\text{ nA}$ to $0.09 \pm 0.04\text{ nA}$ within $270 \pm 60.9\text{ sec}$ ($n=5$). The mean rate of decrease was $89.9 \pm 2.32\%$.

Effects of LPC on the voltage-dependent inactivation of I_{Ca} at pH 7.4

The effects of LPC on the voltage-dependent inactivation of I_{Ca} were examined by using a double-pulse protocol, which is shown in the inset of the left panel of Figure 5. The holding potential was kept at -40 mV. A pre-pulse, which was hyperpolarized or depolarized from the holding potential to various potentials ranging from -80 to +10 mV, was applied to the myocyte. The duration of a pre-pulse was 500 msec, because this was the time sufficient to attain a steady-state inactivation of I_{Ca} . After 10 msec of the end of a pre-pulse (i.e. after clamp back to the holding potential), a test pulse (a pulse depolarized from the holding potential to 0 mV) having a 150 msec duration was applied to the myocyte. Figure 5 shows voltage-dependent inactivation of I_{Ca} in the absence or presence of 10 μ M LPC at pH 7.4. The data were fitted to the Boltzmann equation formulated as follows:

$$I = \frac{I_{max}}{1 + \exp((V - V_h)/K)}$$

where I is the normalized peak current at any pre-pulse potential, I_{max} is the maximum peak current evoked by such a step, V_h is the pre-pulse potential at which inactivating current is half inactivated, V is the pre-pulse potential and K is a slope factor of the curve.

In the absence of LPC, the mean values of V_h and K were -20.6 ± 1.98 mV and 4.50 ± 0.29 (n=5), respectively. LPC (10 μ M) decreased the amplitude of I_{Ca} . In the presence of 10 μ M LPC, the mean values of V_h and K were -21.0 ± 0.49 mV and 4.42 ± 0.36 (n=5), respectively. The relative values of the amplitude of I_{Ca} were plotted against the pre-pulse voltage (right panel of Fig. 5). There was no significant difference in the relative value of the amplitude of I_{Ca} between the presence and the absence of LPC (10 μ M). These results suggest that LPC (10 μ M) does not affect the inactivation state of the L-type Ca^{2+} channel.

We then calculated the time constant of the inactivation phase of I_{Ca} . The inactivation phase of I_{Ca} was plotted on a semi-logarithmic scale and fitted by double-exponential components. The values of the fast and slow components in the absence of LPC were 9.54 ± 0.16 and 70.2 ± 0.54 msec (n=16), respectively. In the presence of $10 \mu\text{M}$ LPC, the values of the fast and slow components were 9.60 ± 0.31 and 75.2 ± 0.38 msec (n=16), respectively. There was no significant difference between the data in the absence and in the presence of $10 \mu\text{M}$ LPC.

Effects of LPC on the voltage-dependent inactivation of I_{Ca} at pH 6.4

Voltage-dependent, steady-state inactivation curve of the amplitude of I_{Ca} was constructed by the double-pulse protocol at pH 6.4 as shown in the experiments at pH 7.4. Amplitude and relative amplitude of I_{Ca} were plotted against the pre-pulse potential, and curves were fitted to the Boltzmann equation. When LPC ($3 \mu\text{M}$) was applied, the value of V_h of I_{Ca} inactivation curve changed from -19.4 ± 1.00 mV to -24.8 ± 0.89 mV (n=5). The difference in the V_h value between the absence and the presence of $3 \mu\text{M}$ LPC was significant when evaluated by Student's t test (p value = 0.008), suggesting that $3 \mu\text{M}$ LPC had an effect on the inactivate-state of I_{Ca} at pH 6.4. The slope factors in the absence and presence of $3 \mu\text{M}$ LPC were 4.04 ± 0.26 and 4.37 ± 0.69 , respectively.

There were slow and fast components in the inactivation phase time constant of I_{Ca} at pH 6.4 as was observed at pH 7.4. The data on inactivation phase of I_{Ca} were plotted against the pre-pulse potential on a semi-logarithmic scale. In the

absence of LPC, the time constant of the fast phase was 8.70 ± 0.28 msec, and that of the slow phase was 70.4 ± 0.52 msec. Upon application of $3 \mu\text{M}$ LPC, the time constant of the fast phase became 9.98 ± 0.34 msec and that of the slow phase became 69.6 ± 0.96 msec ($n=12$). There was no significant difference in the value of time constant between the data in the presence and absence of LPC ($3 \mu\text{M}$), suggesting that LPC ($3 \mu\text{M}$) had no effect on the inactivation phase of I_{Ca} at pH 6.4.

Discussion

On the contrary to our expectation, the results of the present study clearly indicated that exogenous LPC ($10\ \mu\text{M}$) did not increase but decreased I_{Ca} . Therefore, the mechanism by which LPC increases intracellular Ca^{2+} cannot be an increase in L-type Ca^{2+} current. It also became clear that LPC reduced I_{Ca} without markedly affecting the voltage-dependence of both activation and inactivation of the L-type Ca^{2+} channel, suggesting that the effects of LPC on I_{Ca} are independent of channel state at pH 7.4 and that LPC reduces the maximum conductance of I_{Ca} .

Interestingly, Wu and Corr (1992) have demonstrated that long-chain acylcarnitine (LCAC), a substance having similar structure with LPC, decreases the L-type Ca^{2+} current. Because both LPC and LCAC are amphiphiles, these substances may have an action on the cell membrane. Nevertheless, the mechanism of the inhibitory action of LPC on the L-type Ca^{2+} channel remains unsolved.

A direct action of LPC on the membrane can be a candidate for the mechanism of action of the inhibitory action of LPC on the L-type Ca^{2+} channel, because LPC forms micelle at the concentration above $2\ \mu\text{M}$ (Weltzien, 1979), $7\ \mu\text{M}$ (Stafford *et al.*, 1989), or $40\ \mu\text{M}$ (Bergmann *et al.*, 1981). If $10\ \mu\text{M}$ LPC (the concentration of LPC we used in the present study) forms micelle, it would affect lipid bilayers of the cell membrane markedly. According to Gross *et al.* (1982), incorporation of LPC into the cell membrane elicits electrophysiological derangements in canine Purkinje fiber and ventricular muscle. It is possible that incorporation of LPC into the cell membrane phospholipid bilayers results in perturbation of the orderly packing of adjacent phospholipid molecules and a conformational change in integral membrane

proteins including Ca^{2+} channel. In fact, low concentrations of LPC bind with membrane proteins (Weltzien, 1979).

Modification by changes in pH of the effect of LPC on the L-type Ca^{2+} current induced by pH change is another feature of the results of the present study. Although 3 μM LPC was not effective in decreasing I_{Ca} at pH 7.4, it decreased I_{Ca} at 6.4. Under control conditions, a decrease in extra- and/or intracellular pH results in reduction of magnitude of I_{Ca} (Yatani and Goto, 1983; Sato *et al.*, 1985; Kaibara and Kameyama, 1988) without alternation of steady-state inactivation of I_{Ca} (Kohlhardt *et al.*, 1976). The inhibitory effect of LPC on the L-type Ca^{2+} channel, however, was augmented by a decrease in pH in both intra- and extracellular solutions. This indicates that the inhibitory effect of LPC on the L-type Ca^{2+} channel is greater under acidic conditions like ischemia (Lange *et al.*, 1983; Abiko *et al.*, 1984). These findings accord with those of Pacini and Kane (1991) and Boachie-Ansah *et al.* (1992), who demonstrated that the effect of LPC on the cardiac action potential in the acidic external solution is greater than that in the control external solution.

One of the other important findings in the present study is that LPC increased the background leak current of the myocyte. This suggests that LPC may increase the non-selective current. In fact, we demonstrated that LPC increased the non-selective cation current in the guinea-pig ventricular myocyte (Magishi *et al.*, in press). Liu *et al.* (1991) and Sato *et al.* (1992) also reported that LPC increased the inward current at the holding potential (holding current). Lee and Chan (1977) have reported that LPC forms an ion channel (through which europium ion can pass) in the phosphatidylcholine bilayer membrane. This ion channel formed by LPC may increase the inward current at the holding potential of -40 mV.

It has been reported that LCAC shifts voltage-dependence of activation and

inactivation of I_{Ca} to positive potentials (Inoue and Pappano, 1983; Wu and Corr, 1992), probably because LCAC reduces surface negative charge of the cell membrane (Mészáros *et al.*, 1988). LPC, however, did not change the voltage-dependency of I_{Ca} at pH 7.4, suggesting that LPC does not affect surface charge of the membrane at pH 7.4. Nevertheless, LPC shifted the voltage-dependent inactivation at pH 6.4 toward negative potentials, suggesting that the action of LPC on the cardiac cell membrane is different from that of LCAC.

We conclude that LPC (10 μ M) at pH 7.4 decreased I_{Ca} without affecting the state of the L-type Ca^{2+} channel in guinea-pig myocyte. LPC (3 μ M), the concentration of LPC that did not affected I_{Ca} at pH 7.4, reduced I_{Ca} and affected inactivation state of I_{Ca} at pH 6.4.

References

- ABIKO Y, ICHIHARA K, SAKAI K, 1984. Myocardial pH: a useful indicator for evaluation of antianginal drugs. *Trends Pharmacol Sci* **5**: 513-517.
- BEAN BP, 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. *J Gen Physiol* **86**: 1-30.
- BERGMANN SR, FERGUSON JR TB, SOBEL BE, 1981. Effects of amphiphiles on erythrocytes, coronary arteries, and perfused hearts. *Am J Physiol* **240**: H229-237.
- BOACHIE-ANSAH G, KANE KA, RANKIN AC, 1992. Effects of a combination of acidosis, lactate, and lysophosphatidylcholine on action potentials and ionic currents in guinea pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* **20**: 538-546.
- BURNASHEV, NA, UNDROVINAS AI, FLEIDERVISH IA, MAKIELSKI JC, ROSENSHTRAUKH LV, 1991. Modulation of cardiac sodium channel gating by lysophosphatidylchoiline. *J Mol Cell Cardiol* **23** (Suppl. I): 23-30.
- CORR PB, YAMADA KA, CREER MH, SHARMA AD, SOBEL BE, 1987. Lysophosphoglycerides and ventricular fibrillation early after onset of ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **19**: Suppl. V 45-53.
- DAS DK, ENGELMAN RM, 1993. Phospholipids in myocardial reperfusion injury. In: DAS DK, Ed, *Pathophysiology of reperfusion injury*. Baco Raton: CRC Press, 149-179.
- FABIATO A, FABIATO F, 1979. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol (Lond)* **75**: 463-505.

GROSS RW, CORR PB, LEE BI, SAFFITZ JE, CRAFFORD WA Jr, SOBEL BE, 1982.

Incorporation of radiolabeled lysophosphatidyl choline into canine Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res* **51**: 27-36.

HASHIZUME H, ABIKO Y, (in press). Dilazep and d-propranolol attenuate calcium overload induced by lysophosphatidylcholine in cardiac myocytes. *Clin Exp Cardiol*

HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH J, 1981. Involved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**: 85-100.

INOUE D, PAPPANO AJ, 1983. L-palmitoylcarnitine and calcium ions act similarly on excitatory ionic currents in avian ventricular muscle. *Circ Res* **52**: 625-634.

IRISAWA H, SATO R, 1986. Intra-and extracellular actions of proton on the calcium current of isolated guinea pig ventricular cells. *Circ Res* **59**: 348-355.

KAIBARA M, KAMEYAMA M, 1988. Inhibition of the calcium channel by intracellular protons in single ventricular myocytes of the guinea pig. *J Physiol (Lond)* **403**: 621-640.

KINNAIR AAA, CHOY PC, MAN RYK, 1988. Lysophosphatidylcholine accumulation in the ischemic canine heart. *Lipids* **23**: 32-35.

KOHLHARDT M, HAAP M, FIGULLA HR, 1976. Influence of low extracellular pH upon the Ca inward current and isometric contractile force in mammalian ventricular myocardium. *Pflügers Arch* **366**: 31-38.

LANGE R, KLONER AR, ZIELER M, CARLSON N, SEILER M, KHURI SF, 1983. Time course of ischemic and alterations during normothermic and hypothermic arrest and its reflection by on-line monitoring of tissue pH. *J Thorac Cardiovasc Surg* **86**: 418-434.

- LEE Y, CHAN SI, 1977. Effect of lysolecithin on the structure and permeability of lecithin bilayer vesicles. *Biochem* **16**: 1303-1309.
- LIU E, GOLDBERGER JL, WEISS JN, 1991. Effects of lysophosphatidylcholine on electrophysiological properties and excitation contraction coupling in isolated guinea pig ventricular myocytes. *J Clin Invest* **88**: 1819-1832.
- MAGISHI K, KIMURA J, YOSHIHIKO KUBO, ABIKO YASUSHI, (in press). Exogenous lysophosphatidylcholine increases non-selective cation current in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch*
- MÉSZÁROS J, VILLANOVA L, PAPPANO AJ, 1988. Calcium ions and 1-palmitoyl carnitine reduce erythrocyte electrophoretic mobility : Test of a surface charge hypothesis. *J Mol Cell Cardiol* **20**: 481-492.
- MITRA R, MORAD M, 1986. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5340-5344.
- PACINI DJ, KANE KA, 1991. Effects of components of myocardial ischemia on cardiac action potentials in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* **18**: 261-266.
- SATO R, NOMA A, KURACHI Y, IRISAWA H, 1985. Effects of intracellular acidification on membrane currents in ventricular cells of the guinea pig. *Circ Res* **57**: 553-561.
- SATO T, KIYOSUE T, ARITA M, 1992. Inhibitory effects of palmitoylcarnitine and lysophosphatidylcholine on the sodium current of cardiac ventricular cells. *Pflügers Arch* **420**: 94-100.
- SEDLIS SP, CORR PB, SOBEL BE, AHMUDA GG, 1983. Lysophosphatidylcholine potentiates Ca^{2+} accumulation in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* **244**: H32-38.
- SNYDER DW, CRAFFORD WAJR, GLASHOW JL, RANKIN D, SOBEL BE, CORR

- PB, 1981. Lysophosphoglycerides in ischemic myocardium effluents and potential of their arrhythmogenic effects. *Am J Physiol* **241**: H700-707.
- STAFFORD RE, FANNI T, DENNIS EA. 1989. Interfacial properties and micelle concentration of lysophospholipids. *Biochemistry* **28**: 5120-5127.
- TSIEN RY, RINK TJ, 1980. Neural carrier ion-selective microelectrodes for measurement of intracellular free calcium. *Biochem Biophys Acta* **599**: 623-638.
- VER DONCK LV, VERELLEN G, GEERTS H, BOGERS M, 1992. Lysophosphatidylcholine-induced Ca²⁺-overload in isolated cardiac myocytes and effect of cytoprotective drugs. *J Mol Cell Cardiol* **24**: 977-988.
- WELTZIEN HU, 1979. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochem Biophys Acta* **559**: 259-287.
- WU J, CORR PB, 1992. Influence of long-chain acyl carnitines on voltage-dependent calcium current in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* **263**: H410-H417.
- YATANI A, GOTO M, 1983. The effect of extracellular low pH on the plateau current in isolated, single rat ventricular cells - a voltage clamp study. *Jpn J Physiol* **33**: 403-415.
- YAZAWA K, KAIBARA M, OHARA M, 1990. An improved method for isolating cardiac myocytes useful for patch-clamp study. *Jpn J Physiol* **40**: 157- 163.

Figure legends

Figure 1 Effects of LPC on I_{Ca} at pH 7.4. A-D illustrate original tracings of I_{Ca} under voltage clamp. The holding potential (HP) was kept at -40 mV. The membrane currents were elicited with a depolarization pulse having 150 msec in duration (0.14 Hz) to -30 mV - +40 mV. A and B are tracings of I_{Ca} before application of LPC, and C and D are those after application of LPC (10 μ M). The bottom is the current-voltage (I-V) relationship in the absence (●) or presence of 10 μ M LPC (▲). The amplitude of I_{Ca} was defined as the difference between the peak value of the inward current and the current taken immediately after the end of a depolarization pulse. Note that LPC decreased I_{Ca} (bottom) and increased the background current (C and D compared with A and B), but it did not affect the shape of the I-V curve in respect to the membrane potentials (bottom).

Figure 2 Effects of LPC on I_{Ca} at pH 6.4. A-D illustrate original tracings of I_{Ca} under voltage clamp. The holding potential was kept at -40 mV. The membrane currents were elicited with a pulse having 150 msec in duration (0.14 Hz) depolarized to -30 mV - +40 mV. A and B are tracings of I_{Ca} before application of LPC, and C and D are those after application of LPC (3 μ M). The bottom is the current-voltage (I-V) relationship in the absence (●) or presence of 10 μ M LPC (▲). Note that LPC (3 μ M) decreased I_{Ca} , but it did not affect the shape of the I-V curve in respect to the membrane potentials.

Figure 3 Time-course change in I_{Ca} at pH 7.4 before and during application of

10 μ M LPC. The holding potential (HP) was kept at -40 mV. I_{Ca} was elicited by clamp pulses (150 msec in duration, 0.14 Hz) depolarized to 0 mV. A: Time-course change in I_{Ca} . B: I_{Ca} tracings before (a), 1.7 min after, and (c) 5 min after the application of 10 μ M LPC. Tracings a, b, and c in the panel B correspond to those in the panel A, respectively.

Figure 4 Time-course change in I_{Ca} at pH 6.4 before and during application of 3 μ M LPC. The holding potential was kept at -40 mV. I_{Ca} was elicited by clamp pulses (150 msec duration, 0.14 Hz) depolarized to 0 mV. A: Time-course change in I_{Ca} . B: I_{Ca} tracings before (a) and 3.5 min after (b) the application of LPC. Tracings a and b in the panel B correspond to those a and b in the panel A, respectively.

Figure 5 Effect of 10 μ M LPC on the steady-state inactivation curve of I_{Ca} at pH 7.4. The holding potential was kept at -40 mV. Inactivation of I_{Ca} was induced by a 500 msec pre-pulse to various potential levels ranging from -80 to +10 mV. After 10 msec of clamp back to -40 mV, a test pulse (to 0 mV) having 150 msec in duration was applied. Peak I_{Ca} recorded during the test pulse (ordinate) was plotted against pre-pulse potentials (abscissa). A: I_{Ca} values at individual pre-pulse in the absence (●) and in the presence of 10 μ M LPC (▲) at pH 7.4. B: Relative I_{Ca} values at individual pre-pulse in the absence (●) and in the presence of 10 μ M LPC (▲) at pH 7.4.

Figure 6 Effect of 3 μ M LPC on the steady-state inactivation curve of I_{Ca} at pH

6.4. The holding potential was kept at -40 mV. Inactivation of I_{Ca} was induced by a 500 msec pre-pulse to various levels ranging from -80 to +10 mV. After 10 msec of clamp back to -40 mV, a test pulse (to 0 mV) having 150 msec in duration was applied. Peak I_{Ca} recorded during the test pulse (ordinate) was plotted against pre-pulse potentials (abscissa). A: I_{Ca} values at individual pre-pulse in the absence (●) and in the presence of 10 μ M LPC (▲) at pH 6.4. B: Relative I_{Ca} values at individual pre-pulse in the absence (●) and in the presence of 10 μ M LPC (▲) at pH 6.4.

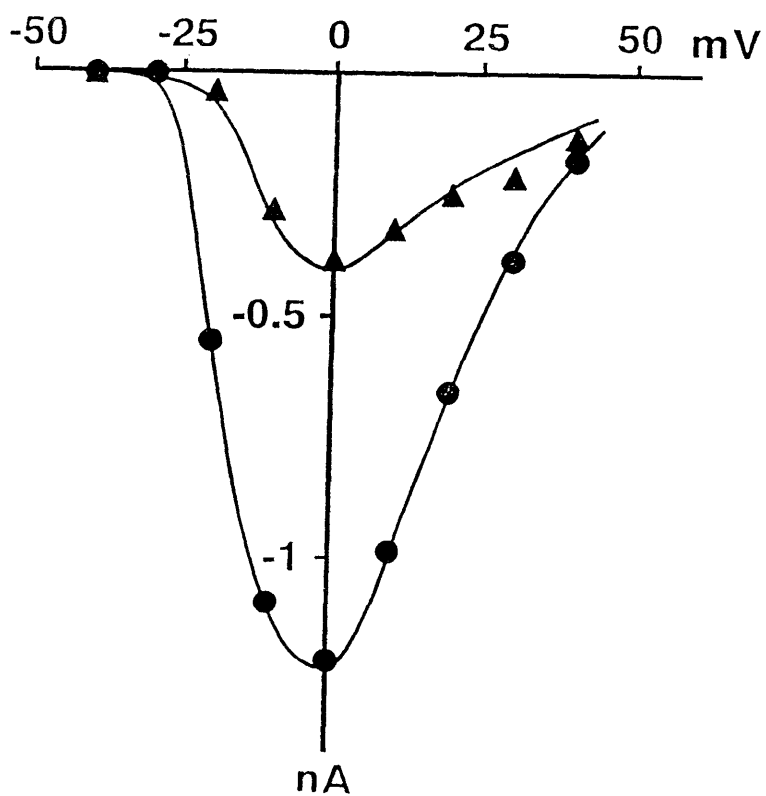
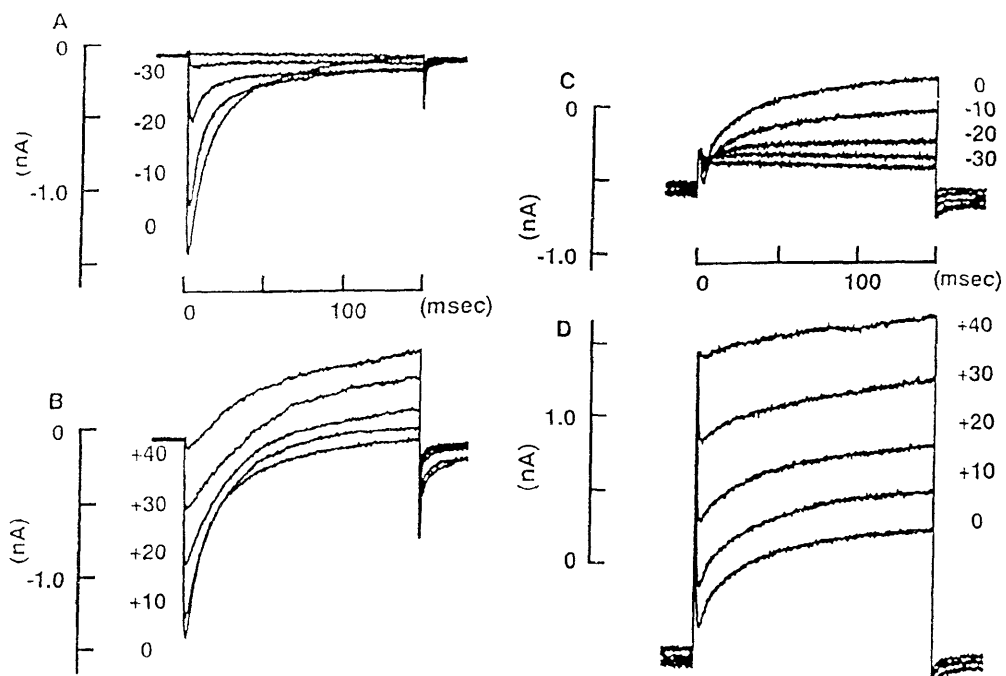
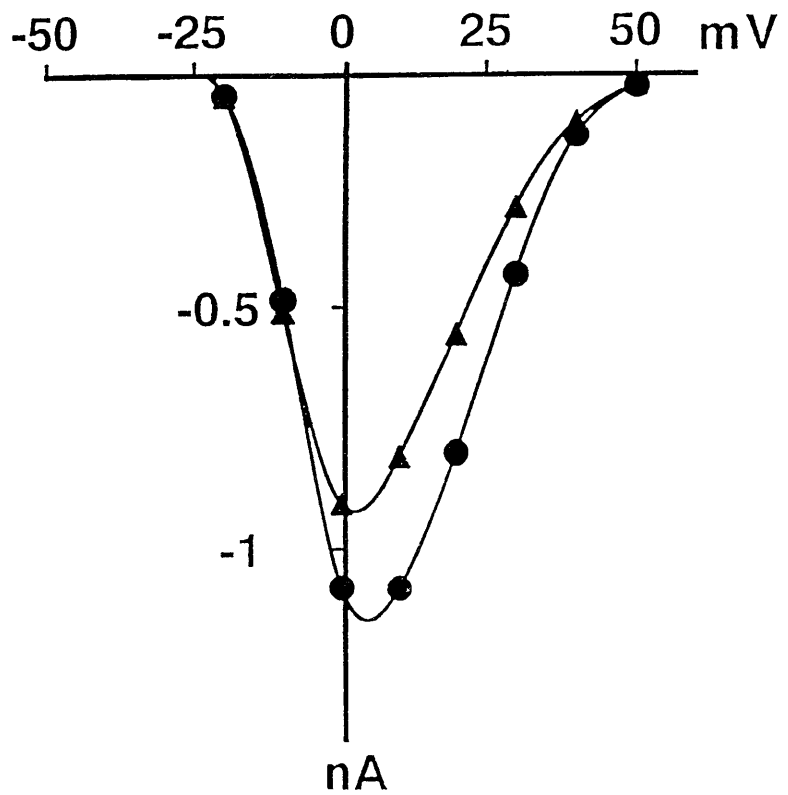
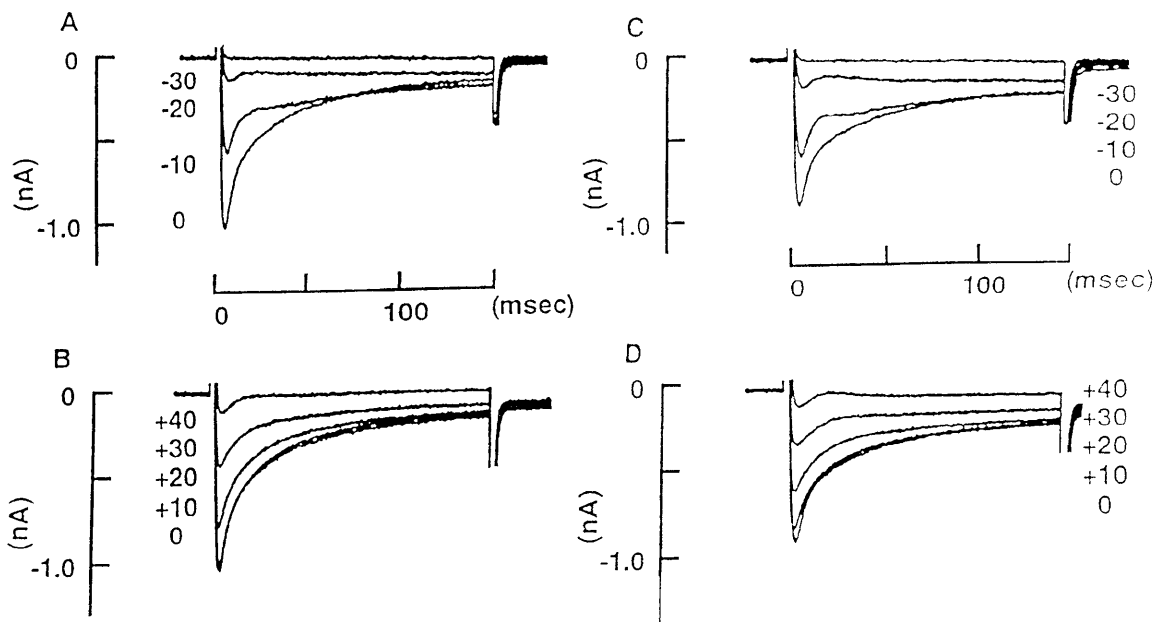


Fig. 1



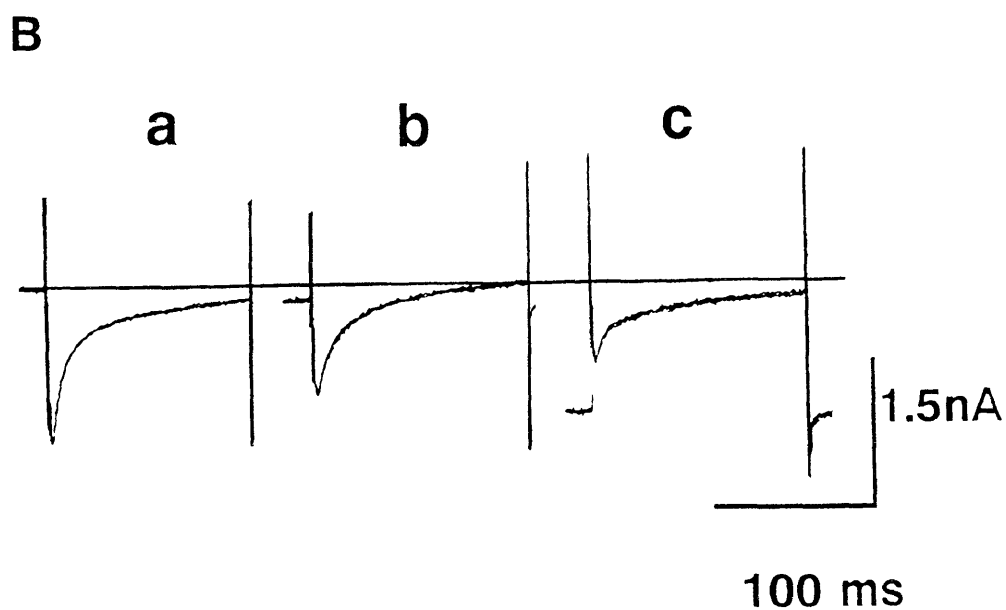
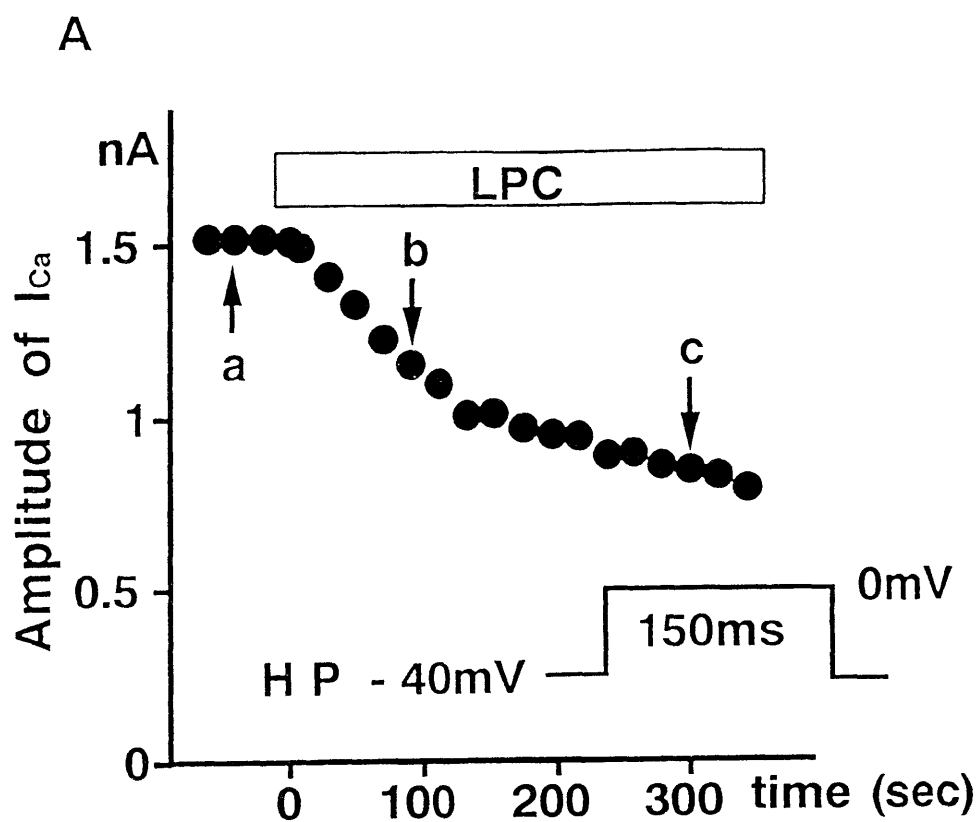


Fig. 3

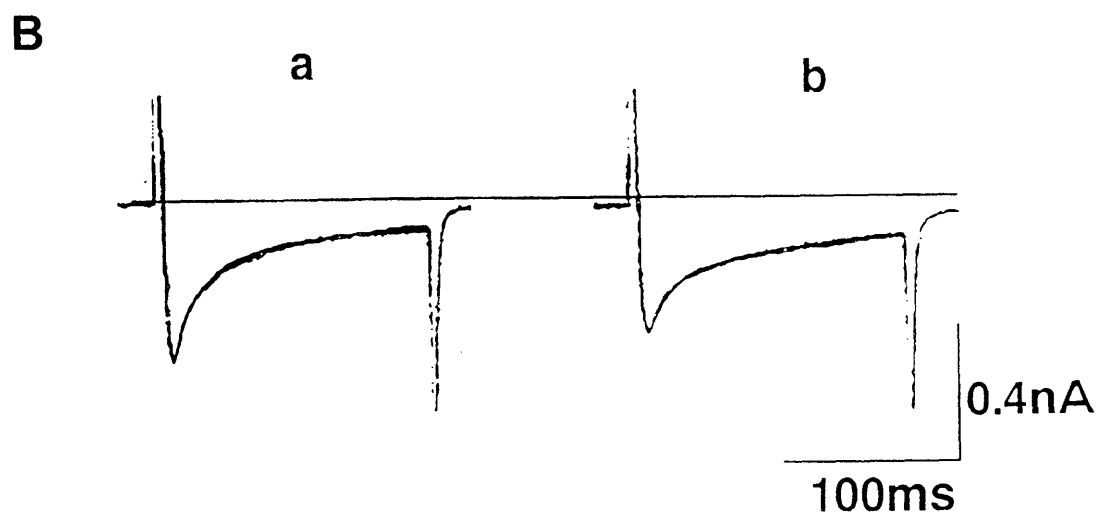
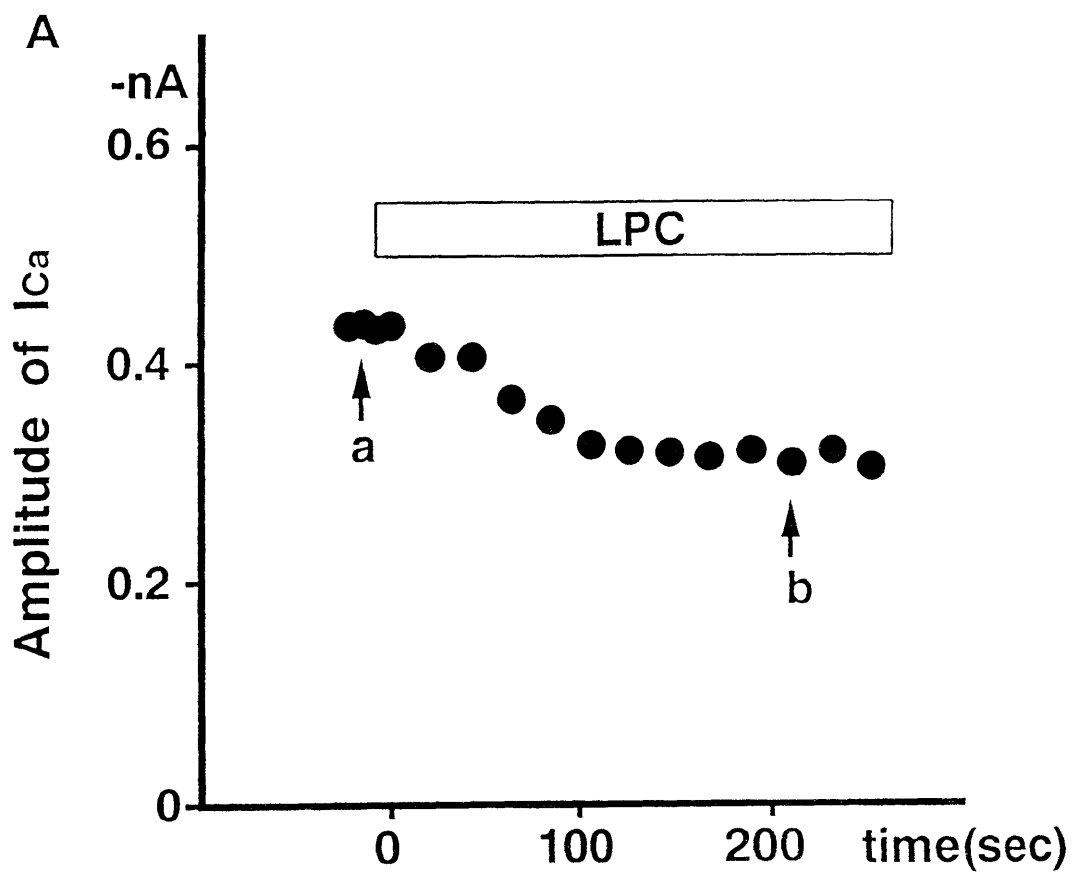


Fig. 4

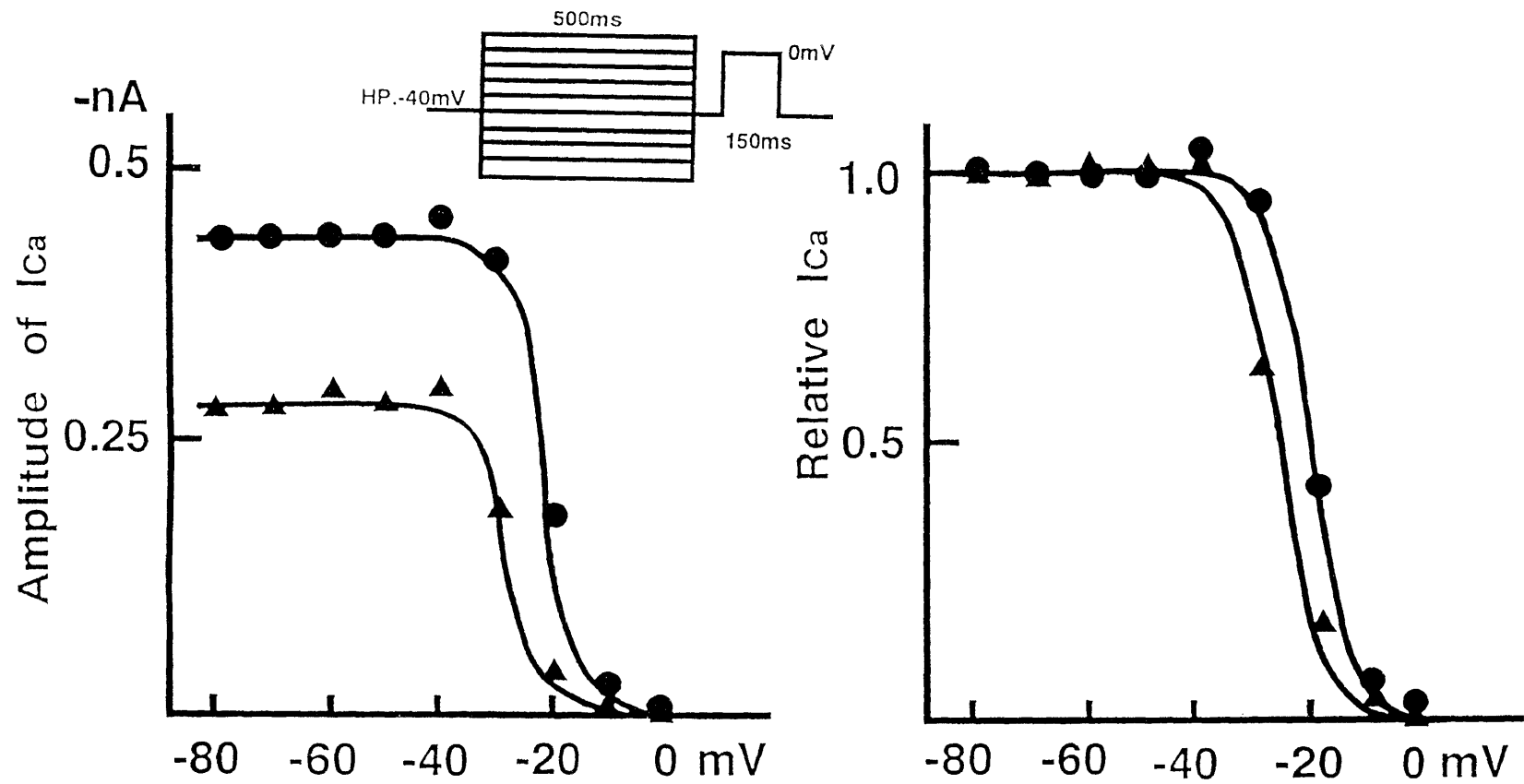


Fig. 5

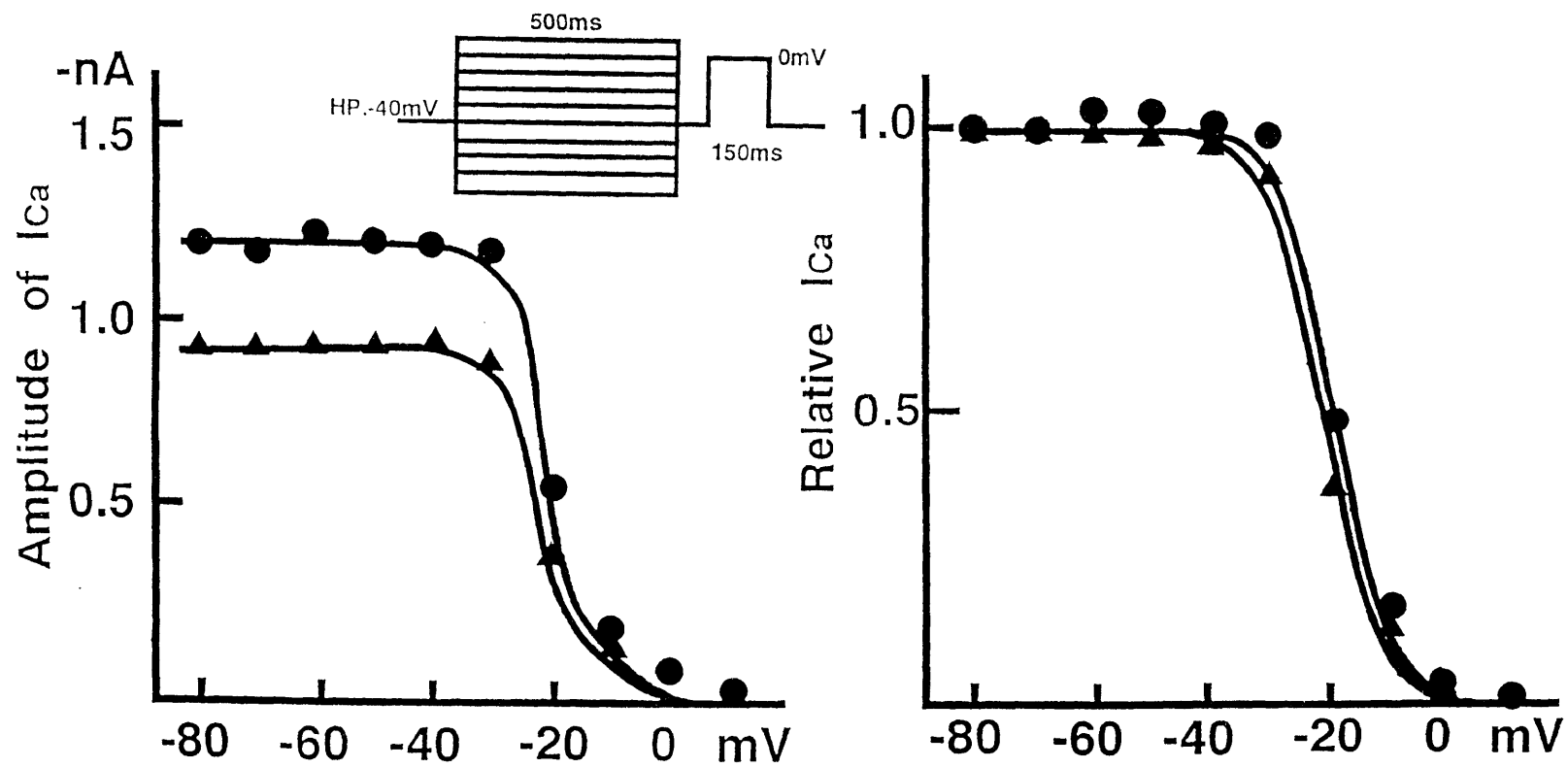


Fig. 6

おわりに

本研究は、虚血・再灌流によって、まず心筋に活性酸素が生じ、この活性酸素からフリーラジカルが生じ、フリーラジカルは細胞膜のリン脂質を過酸化し、このためphospholipase A₂の活性が増し、これによって細胞膜のリン脂質からLPCを生じ、このLPCが組織障害をおこすという仮説が正しいか否かを確かめるために行った。

実験結果を総合すると次のようになる。

1. 灌流心臓において、過酸化水素は虚血による変化によく似た変化をおこし、心筋細胞の脂質を過酸化する。過酸化水素による虚血様心臓変化と脂質過酸化は、lidocaine によって抑制される。Lidocaine はradical scavengure作用があり、このradical scavengure作用が過酸化水素による変化を抑制したものと考えられる。
2. 分離心筋細胞において、過酸化水素は細胞の形態を変化させ、遊離脂肪酸の蓄積をおこす。過酸化水素の作用は、lidocaine では抑制出来なかったが、d-propranololとK-7259が抑制した。Lidocaine のradical scavengure作用は弱いので、細胞レベルでは発揮出来なかったものと思われる。d-PropranololとK-7259はradical scavengure作用、もしくはcytoprotective effectによって過酸化水素による障害を抑制したのであろう。
3. 灌流心臓において、LPC は虚血同様の作用をあらわした。このLPCの作用は、lidocaine では抑制出来なかったが、d-propranolol, dilazep, K-7259によって抑制された。
4. 分離心筋細胞において、LPC は細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、形態変化をおこした。LPC によるこれらの変化は、dilazepとd-propranolol によって抑制された。
5. 分離心筋細胞において、LPC は細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、細胞の形態変化をおこした。LPC によるこれらの変化は、l- および d-propranolol, l- およびd-pembutolol など、脂溶性の高いβ- 遮断薬によって抑制された。βAAやMSAは関係していなかった。

6. 分離心筋細胞において、LPC はnon-selective cation current を増加させた。LPCによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用の一部はこれによって説明がつく。

以上のことから、我々の仮説は一部証明出来たと思われる。しかし、問題はまだある。分離心筋細胞において、過酸化水素作用は、なぜlidocaineでは抑制出来なかったのか不明である。また、LPCがどのようなメカニズムで遊離脂肪酸を蓄積したのかが分からない。虚血・再灌流によって生じたLPCが膜のリン脂質を分解して新たなLPCをつくると考えられ、LPCは虚血・再灌流障害における中心的な役割を担う悪玉物質で、しかも新たなLPCを作り出すという悪循環をしていることが分かる。なぜ、d-propranolol やK-7259がLPCの作用を抑制するのかを解明することが、今後の最大の問題である。