

心筋細胞内 K^+ 過負荷による心筋保護法： 虚血再灌流後の膜電位早期再分極効果

課題番号：07671446

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書



平成10年2月

研究代表者 山 本 浩 史
(旭川医科大学医学部)

心筋細胞内 K⁺ 過負荷による心筋保護法：
虚血再灌流後の膜電位早期再分極効果

課題番号：07671446

研究組織

研究代表者 山 本 浩 史（旭川医科大学第一外科講師）

研究分担者 郷 一 知（旭川医科大学救急部助教授）

研究協力者 笹 嶋 唯 博（旭川医科大学第一外科教授）
稲 葉 雅 史（旭川医科大学第一外科講師）
真 岸 克 明（旭川医科大学第一外科医員）

研究経費

平成7年度	1 1 0 0 千円
平成8年度	5 0 0 千円
平成9年度	6 0 0 千円

計	2 2 0 0 千円
---	------------

研究発表

<口頭発表>

- (1) 山本浩史、郷 一知、稲葉雅史ら

Terminal warm oxygenated blood cardioplegia 注入中の酸素摂取とカリウムイオン動態

第26回日本心臓血管外科学会学術総会

1996.2.29

- (2) 山本浩史、郷 一知、稲葉雅史、東 信良、笹嶋唯博、久保良彦

Terminal warm oxygenated blood cardioplegia (TWIBC)

-酸素摂取とカリウムイオン (K⁺) 動態からみた有効性-

第60回日本循環器学会学術集会

1996.3.19

- (3) Hiroshi Yamamoto, Kazutomo Goh, Masashi Inaba, Tadahiro Sasajima, Yoshihiko Kubo

Terminally-warm oxygenated blood cardioplegia: Relationship between myocardial oxygen uptake and cation exchange

The 4th Japan-Russia International Medical Symposium

1996.9.4

- (4) 山本浩史、郷 一知、眞岸克明ら

開心術中虚血心筋障害の新しい評価法-単位酸素消費量あたりのカリウムイオン (K⁺) 移動量-

第97回日本外科学会総会

1997.4.11

- (5) 山本浩史、郷 一知、眞岸克明、笹嶋唯博、久保良彦

虚血心筋における酸素負債の定量は可能か

第21回日本心筋保護研究会

1997.4.11

- (6) Hiroshi Yamamoto, Kazutomo Goh, Katsuaki Magishi et al.

Mechanism for protective effect of terminally warm oxygenated blood cardioplegia

23rd World Congress of the International Society for Cardiovascular Surgery

1997.9.23

- (7) 山本浩史、郷 一知、眞岸克明ら

常温酸素加血液心筋保護法：酸 (CO₂) 排泄のメカニズム

第28回日本心臓血管外科学会学術総会

1998.2.19

- (8) 山本浩史、郷 一知、眞岸克明ら

虚血心筋の再灌流にともなう酸素消費とイオン移動に関する研究

第62回日本循環器学会学術集会

1998.3.28 (発表予定)

- (9) 山本浩史、郷 一知、笹嶋唯博ら

常温酸素加血液心筋保護における解糖系の関与：

酸素消費、ブドウ糖消費、イオン移動の関連性

第98回日本外科学会総会

1998.4.8 (発表予定)

- (10) Hiroshi Yamamoto, Kazutomo Goh, Masashi Inaba et al.

Myocardial oxygen consumption and cation movement during oxygenated cardioplegia in cardiac surgery

16th World Congress of the International Society for Heart Research

1998.5.30 (発表予定)

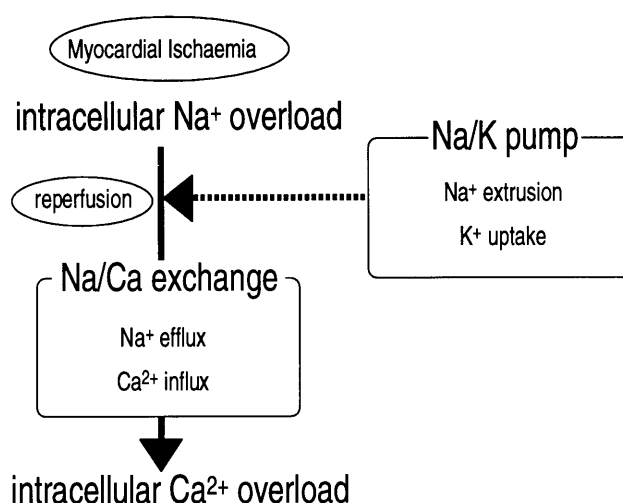
緒 言

心筋において虚血再灌流傷害の本質的な特徴は細胞質のカルシウムイオン(Ca^{2+})過剰負荷であり、特に再灌流後の基本的病理学的特徴である収縮帯壊死はそれと関連が深い。虚血再灌流による形質膜傷害は、細胞外からの大量の Ca^{2+} 流入を引き起こし細胞を死に至らしめる。その機序は、虚血中では細胞質 Ca^{2+} 濃度の増加と Ca^{2+} 依存性酵素の活性化による形質膜の脆弱化^{1,2)}、また再灌流時では急速な Ca^{2+} 流入で発生した収縮蛋白の過剰収縮と、それによる細胞骨格の破壊³⁾や形質膜の破壊⁴⁾等と関連を有している。この収縮蛋白の過剰収縮を生じさせる Ca^{2+} の由来については、虚血中に生じた細胞内pHの低下や細胞内ナトリウムイオン(Na^+)負荷の結果、再灌流時に H^+ - Na^+ 交換機構や Na^+ - Ca^{2+} 交換機構を介して Ca^{2+} が流入するという説や、カルシウムチャネルを介して Ca^{2+} が流入するという説がある⁵⁻⁸⁾。

従って虚血再灌流傷害防止の根本原理のひとつは細胞内 Ca^{2+} 流入の抑制が重要であり、それには大きく3つの方法が考えられる。一つはカルシウムチャネル阻害剤や、 H^+ - Na^+ 交換機構または Na^+ - Ca^{2+} 交換機構に対する阻害剤の利用である。しかしながら阻害剤の利用は直接的ではあるが、同時にさまざまな生理的機能を抑制することになり大きな効果を期待することは困難である。二つ目は、虚血中に脱分極した膜電位⁹⁾を再灌流後、可及的早期に静止膜電位にまで再分極させる方法である。膜電位再分極は、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介する Ca^{2+} 流入の低下と Na^+ - Ca^{2+} 交換機構による Ca^{2+} 排出の促進をもたらす¹⁰⁾。膜電位再分極の方法には Na^+ - K^+ ポンプ活性(Na^+ - K^+ ポンプ外向き電流)の増大と K^+ 流出(K^+ 外向き電流)の増大がよい方法と考えられる。

三つ目は、細胞内の Na^+ 過負荷軽減と K^+ 負荷増強である。特に Na^+ - K^+ ポンプ活性の増大は、虚血中に生じた細胞内 Na^+ 負荷を軽減することによって Na^+ - Ca^{2+} 交換機構を介する細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制したり(右図)、細胞内 K^+ 負荷により K^+ 外向き電流を増大し心筋保護的に作用すると予想される。

本研究では、1) Na^+ - K^+ ポンプ活性化条件を電気生理学的に検討し、2) その条件下で再灌流した際の心筋酸素消費とイオン移動の関連に着目し、 Na^+ - K^+ ポンプのイオン移動効果とイオン移動効率について検討した。



方 法

1. 単離心筋細胞のパッチクランプ法を用いた電気生理学的検討

●単離心筋細胞の採取

体重 300g から 500g の雌性モルモットにペントバルビタール・ナトリウム塩 (100mg/kg) を投与することによって麻酔し、人工呼吸器下で胸部を切開し、心臓を摘出しランゲンドルフ灌流を行った。その摘出心に 37°C で以下の溶液を灌流した。(1) Tyrode 液 3 分間、(2) nominally 無カルシウム Tyrode 液 5 分間、(3) 0.07mg/ml の collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA) と 0.09mg/ml の protease (Nagase Biochemicals, Tokyo, Japan) を含む nominally 無カルシウム Tyrode 液 10 分間、(4) 高 K⁺ 細胞保存液に 10 分間浸漬後、心房を除去し、心室を小片に刻んだ後、心筋細胞が単離されるよう攪拌した。心筋組織を含む溶液を 210μm のステンレス製のメッシュで濾過した後、4°C に保存した。

●溶液組成

(1) Tyrode 液 (mmol/L) : NaCl 143、KCl 5.4、CaCl₂ 1.8、MgCl₂ 0.5、NaH₂PO₄ 0.25、HEPES 5、glucose 5.6、pH は NaOH で 7.4 に調節された。

(2) nominally 無カルシウム Tyrode 液 : 上記 (1) の溶液から CaCl₂ を含まない溶液である。

(3) 高 K⁺ 細胞保存液 (mmol/L) : KOH 70、KCl 40、L-glutamic acid 50、taurine 20、KH₂PO₄ 20、MgCl₂ 3、glucose 10、HEPES 10、EGTA 0.5、pH は KOH で 7.4 に調節された。

(4) test 液 (mmol/L) : NaCl 140、CsCl 2、NiCl₂ 2、BaCl₂ 1、HEPES 5、Glucose 5.5、MgCl₂ 1、pH は NaOH で 7.4 に調節された。KCl は 5 か 20 mM とした。

(5) pipette 液 (mmol/L) : NaCl 30、CsOH 100、L-aspartic acid 100、tetraethylammonium (TEA) (Br) 20、MgCl₂ 2、MgATP 5、creatine phosphate (Tris) 5、HEPES 10、EGTA 5、glucose 10、pH は aspartic acid で 7.4 に調節された。

カルシウム電流は無カルシウム test 液で防ぎ、電位依存性カルシウムチャネルを介するバリウム電流は 2mmol/L の NiCl₂ で抑制した。電位依存性ナトリウムチャネルを介するナトリウム電流は電圧プロトコールによって抑制した。カリウム電流は細胞内液 (pipette 液) のカリウムを 100mmol/L のセシウムに置換すること、pipette 液に TEA を入れること、さらに細胞外液 (test 液) にバリウムを入れることによって抑制した。Na⁺-Ca²⁺ 交換電流は test 液内の 2mmol/L の NiCl₂ と pipette 液内の 10mM の EGTA によって抑制された。これらの条件で電位変化によって生じた電流は小さく概ね時間非依存性であった。Tyrode 液と test 液は water jacket によって 37°C に維持された。Na⁺-K⁺ ポンプ電流の温度依存性を調べるために test 液が 18°C と 28°C に維持できるようにした。

●Na⁺-K⁺ ポンプ電流 (Ip) の測定

モルモット心室筋単離細胞の whole cell clamp technique は Hamil らの方法¹¹⁾で行われた。pipette の seal は Tyrode 液内で行われ、whole cell clamp が確立した後、Tyrode 液を test 液に変更した。Ip は -40mV の固定電位の後、ramp pulse protocol で測定され、膜電位と Ip の関係を明らかにするには ramp pulse protocol (18mV/sec) を行った。電位依存性ナトリウムチャネルの活性化を防ぐため negative ramp (+50 から -130mV へ) を用いた。test 液による測定を終了した後、ouabain 溶解 test 液 (ouabain 100μmol/L) に変更し再び測定した。電流信号は 5kHz のフィルターを通し on-line data acquisition system を使ってコンピューター (9801RL, NEC, Tokyo, Japan) に保存された。

●実験プロトコール

- A. 細胞外 (test 液) K⁺ 濃度 : 5、20 (mmol/L)
- B. 灌流温 (test 液) : 18、28、37 (°C)

2 . 開心術中における心筋酸素消費とイオン動態

開心術において大動脈遮断解除直前に常温酸素加血液心筋保護 (OBC) 液を投与した際 (OBC 液による再灌流中) の、心筋酸素摂取、心筋の K⁺ の取り込み (K⁺ 内向き移動量) と Na⁺ の排出 (Na⁺ 外向き移動量) を検討した。

●対象

対象は開心術 44 例 (表 2) で、平均年齢 49 ± 4 歳、男女比 26 / 18 であった。

●サンプリングのシステムと方法

体外循環開始後大動脈基部と冠静脈洞にカニユーラを挿入した。冠静脈洞に留置されたカニユーラと体外循環回路を接続しているチューブの途中に 8 個の三方活栓を設置し、それらより連続して 8 点のサンプルを採取することができるようにした。大動脈基部から OBC 液が注入されている間に、OBC 液注入中に冠静脈洞液 (CS 液) を採取した。

●心筋保護 (OBC) 液組成

OBC 液は注入直前に体外循環回路からの酸素加血液と晶質液 (Na⁺:145.3 ; K⁺:33.2 ; Ca²⁺:2.4 ; Mg²⁺:22.6 mmol/L) を 1 : 1 に混合して作られた。注入直前の各イオン濃度を表 1 示す。

表 1 心筋保護液組成 (mean ± SEM)

Na ⁺ :	134.8±0.4 (mmol/L)	pH:	7.37±0.01 (unit)
K ⁺ :	18.7±0.1 (mmol/L)	pCO ₂ :	38.4±0.8 (mmHg)
Cl ⁻ :	134.5±0.4 (mmol/L)	Hb:	3.5±0.1 (g/dL)
Glu:	204.3±14.0 (mg/dL)	SO ₂ :	99.6±0.1 (%)

● OBC 液投与方法

心筋保護の順序は Young 氏液 (2 ml/kg) による心停止後、初回から 30 分毎に 18°C で 15 ml/kg の量を投与し、最後に 34°~36°C の OBC 液を 10 ml/kg 注入した。

● 測定指標と評価

A. 体外循環中虚血前

体外循環回路血液と冠静脈洞液の Hb 濃度、酸素飽和度、 $[Na^+]$ 、 $[K^+]$ を測定した。

B. terminally warm OBC 液注入中

OBC 液と冠静脈洞液の Hb 濃度、酸素飽和度、 $[Na^+]$ 、 $[K^+]$ を測定する。

OBC 液 1L あたりの酸素消費量と K^+ 移動量は以下の式によって算出する。

$$\text{酸素消費量 (ml O}_2\text{ / L)} = 1.39 \cdot \text{Hb} \cdot (\text{S}_{\text{OBC}}\text{O}_2 - \text{S}_{\text{CS}}\text{O}_2) / 100 \cdot 10 \quad (\text{a})$$

$$\text{イオン移動量 (mmol / L)} = ([K^+]_{\text{OBC}} - [K^+]_{\text{CS}}) \quad (\text{b})$$

C. 単位酸素消費量あたりの K^+ 移動量 (E_k)

式 (a)、(b) より (b) / (a) によって E_k (mmol / ml Oxygen) を求める。

$$E_k = 7.194 \cdot ([K^+]_{\text{OBC}} - [K^+]_{\text{CS}}) / \text{Hb} / (\text{S}_{\text{OBC}}\text{O}_2 - \text{S}_{\text{CS}}\text{O}_2)$$

ここで、

Hb : ヘモグロビン濃度 (g/dl)、 $\text{S}_{\text{OBC}}\text{O}_2$: OBC 液酸素飽和度 (%), $\text{S}_{\text{CS}}\text{O}_2$: 冠静脈洞液酸素飽和度 (%), $[K^+]_{\text{OBC}}$: OBC 液 K^+ 濃度 (mmol/L), $[K^+]_{\text{CS}}$: 冠静脈洞液 K^+ 濃度 (mmol/L)。

3. 心筋保護液自体による影響

OBC 液 (組成 : 表 1 参照) 中の赤血球によるイオン移動や蛋白に結合したイオン解離の影響を検討するため、以下の条件下で pH、 $p\text{CO}_2$ 、 $[Na^+]$ 、 $[K^+]$ を測定した。

A. 5% CO_2 と 95% N_2 吹送による低酸素の状態

B. 100% CO_2 吹送による低酸素、高二酸化炭素、アシドーシスの状態

両プロトコールにおいて心筋保護液を 37°C に保ち、吹送前、吹送開始 5 分、10 分、20 分、30 分でのサンプリングした。

4. 結果の表現と統計処理

結果の数値は平均値 ± 標準誤差で表した。統計処理は、二群間の差の検定は Student t test で 5% 以下の危険率で差をみとめるものを有意とし、複数の群と対照群との間の差の検定は、F 検定で有意であった群間の中で Dunnett's t test で 5% 以下の危険率で差をみとめるものを有意とした。

本研究は動物実験に関する指針 (日本動物実験学会) に基づいて行なわれた。

表2 対象症例の年齢、性、手術術式、大動脈遮断時間

Patient	Age	Sex	Procedure	Aortic cross clamp time (min)
1	0	F	VSD closure	76
2	0	F	VSD closure	88
3	0	M	VSD closure	69
4	0	F	VSD closure	90
5	1	M	VSD closure	35
6	1	F	VSD closure	98
7	6	F	ASD closure	29
8	15	F	ASD closure	23
9	16	F	DCRV repair, VSD closure	74
10	27	F	ASD closure	29
11	37	M	AVR	94
12	38	M	MVR (s/pAVR)	117
13	49	M	MV tumor resection	40
14	50	M	MVR, TAP	100
15	51	M	CABG	113
16	52	M	CABG	97
17	54	F	MVR (s/p MAZE)	179
18	56	M	MVR (s/p MAZE,MVP)	130
19	57	F	MEIZ, PDA closure	117
20	57	F	MAZE, MVR	140
21	57	M	AVR	125
22	61	M	AVR	74
23	61	M	MAZE, AVR, MVP	214
24	61	M	MVR	76
25	62	M	CABG	107
26	62	M	CABG	97
27	62	F	MVR	209
28	63	M	CABG	90
29	63	M	AVR	158
30	64	M	MVP, AVP	148
31	65	M	MVR	104
32	68	F	MVR	60
33	68	M	AVR	104
34	69	M	MAZE, AVR	186
35	69	M	CABG	99
36	69	F	AVR	171
37	70	M	Myxoma resection	56
38	71	M	MAZE, MVP	175
39	71	M	MAZE, MVP	192
40	72	F	LA tumor resection	64
41	72	F	MAZE, MVP	154
42	72	F	AVR	115
43	73	M	CABG	82
44	74	F	CABG	140

結 果

1. 単離心筋細胞のパッチクランプ法を用いた電気生理学的検討

pipette の電気抵抗は 2.4-4.0 Gohm であった。test 液が 37°C、KCl 5 mmol/L (mEq/L) の条件で、ouabain free test 液と ouabain 溶解 test 液における電流電圧関係 (I-V relation) を図 1 に示す。ouabain 溶解 test 液における I-V relation (B) は、ouabain free test 液における I-V relation (A) より大きく下方に移動し、測定電圧域 (+50 から -130mV へ) で電流の変化が小さな I-V relation となった。両者の差 (A-B) は ouabain sensitive current で、 Na^+ - K^+ ポンプ電流 (外向き電流)、 I_p を示す。

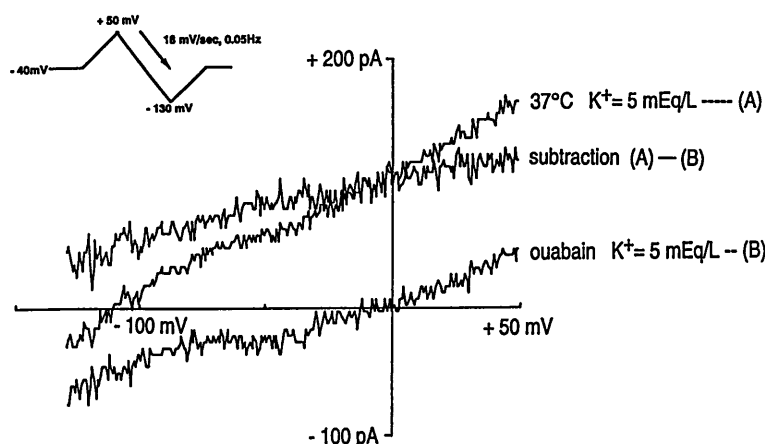


図 1 : negative ramp (+50 から -130 mV) によって記録された ouabain free test 液下での current (A) と ouabain (100 $\mu\text{mol/L}$) 溶解 test 液下での current (B)、及び subtraction (A-B) で得られた ouabain sensitive current (Na^+ - K^+ pump current)。左上図 : voltage-ramp protocol

A. I_p に対する test 液 $[\text{K}^+]$ の効果

37°C の条件で、KCl 5 と 20 mmol/L (mEq/L) における I_p を図 2 に示す。test 液の $[\text{K}^+]$ 上昇は測定電圧域でほぼ 30 mV の I_p -V relation の上方偏位 (より大きな外向き電流) となった。さらに KCl 20 mmol/L (mEq/L) において test 液を 37°C から 28°C へ低下させると I_p -V relation は下方偏位した (図 2)。

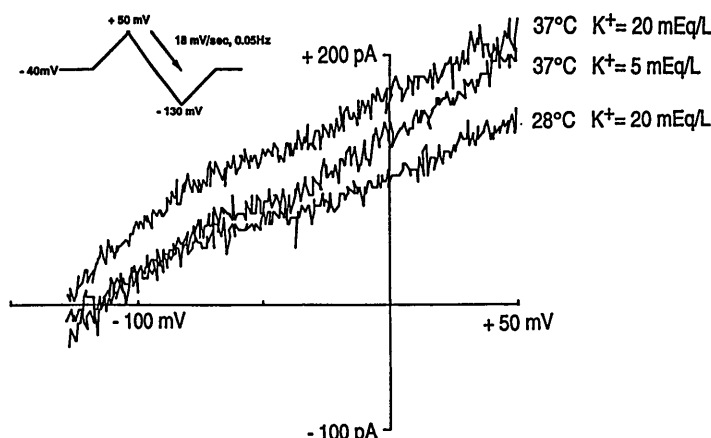


図 2 : 37°C で $\text{K}=5$ と 20 mmol/L、 $\text{K}=20$ mmol/L で 37° と 28°C における ouabain sensitive current (Na^+ - K^+ pump current)。左上図 : voltage-ramp protocol

B. Ip に対する test 液温度の効果

test 液 KCl 5 mmol/L (mEq/L) の条件で、-40mV における Ip の温度依存性を調べた。18°、28°、37°C における Ip 値 (Na⁺-K⁺ pump current) を図 3 に示す。Ip 値は 18°C で 22.7±1.2、28°C で 67.7±3.8、37°C で 114.3±17.2 (pA) で、温度が高いほど高値を示した。

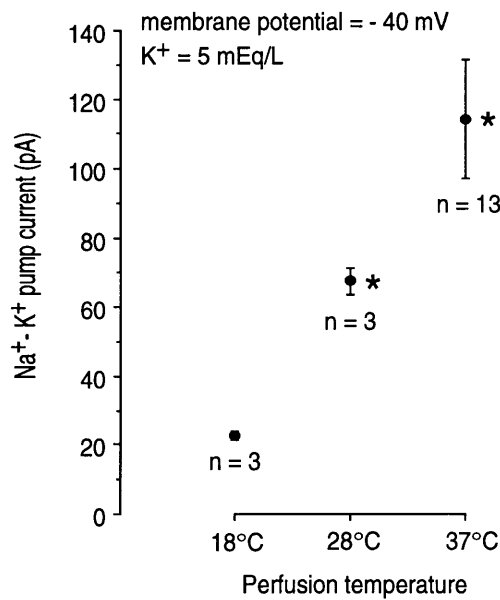


図 3 : test 液温度 (perfusion temperature) と Ip 値 (Na⁺-K⁺ pump current) の関係。膜電位 (membrane potential) = -40 mV、test 液 [K⁺] = 5 mmol/L の条件で、18°C、28°C、37°C における Ip 値を示す。数値は平均値±標準誤差を示し、*はp<0.05で18°Cと有意差があることを示す (n: 標本数)。

2. 開心術中における心筋酸素消費とイオン動態

A. 虚血前における心筋酸素消費とイオン動態

体外循環開始後で虚血前、低負荷拍動中における回路血 (C) と冠静脈洞液 (CS) の [Na⁺]、[K⁺]、酸素飽和度 (SO₂) を図 4 に示す。[Na⁺] と [K⁺] に関しては回路血と冠静脈洞液の間に差がみられなかったが ([Na⁺] : それぞれ 134.1±0.8 と 134.6±0.8 mmol/L、[K⁺] : それぞれ 3.9±0.2 mmol/L と 3.8±0.1 mmol/L どちらも NS)、SO₂ に関しては冠静脈洞液は回路血に比し有意に低い値を示した (それぞれ 61.5 ± 4.2% と 100 ± 0%、p<0.05)。

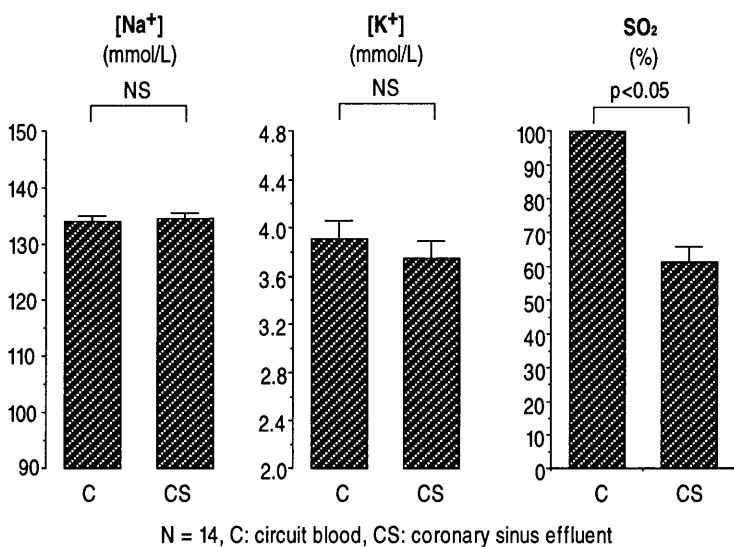


図 4 : 虚血前、低負荷拍動中における回路血 (C) と冠静脈洞液 (CS) の Na⁺ 濃度 ([Na⁺])、K⁺ 濃度 ([K⁺])、酸素飽和度 (SO₂) 数値は平均値±標準誤差を示す (N: 標本数)。NS=not significant

B. terminally warm OBC 液による再灌流中の心筋酸素消費とイオン動態

OBC 液と冠静脈洞液の間における $[\text{Na}^+]$ 較差および $[\text{K}^+]$ 較差と、酸素消費量（OBC 液 1L あたりに換算）をプロットすると（図 5）、高い酸素消費のサンプルほど、より大きな Na^+ の外向き移動（心筋からの Na^+ 排出）と K^+ の内向き移動（心筋への K^+ の取り込み）が認められた。また 18. C の OBC 液（cold OBC）注入中では酸素消費もイオン移動も顕著な変化を示さなかった。

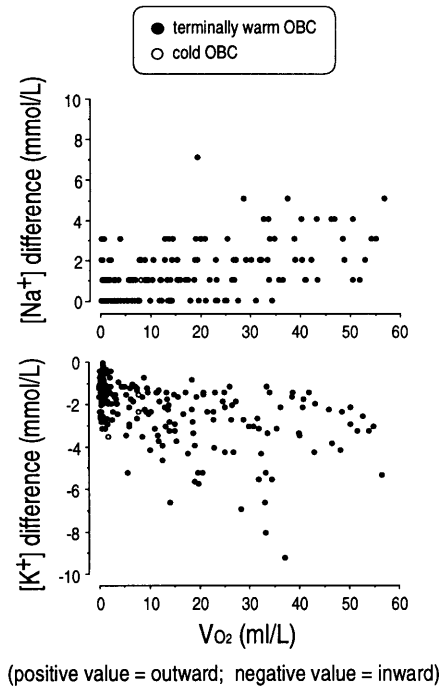


図 5：心筋保護液 1L あたりの酸素消費量 (Vo_2) と $[\text{Na}^+]$ 較差（上段）および $[\text{K}^+]$ 較差（下段）の散布図。 正値は外向き移動、負値は内向き移動を表す。●は常温心筋保護液（terminal warm OBC）再灌流時のサンプル、○は 18°C の心筋保護液（cold OBC）注入中のサンプル

OBC 液と冠静脈洞液の間における $[\text{Na}^+]$ 較差（横軸）と $[\text{K}^+]$ 較差（縦軸）をプロットすると（図 6）、より大きな Na^+ の外向き移動を示すサンプルほど、より大きな K^+ の内向き移動を示した。

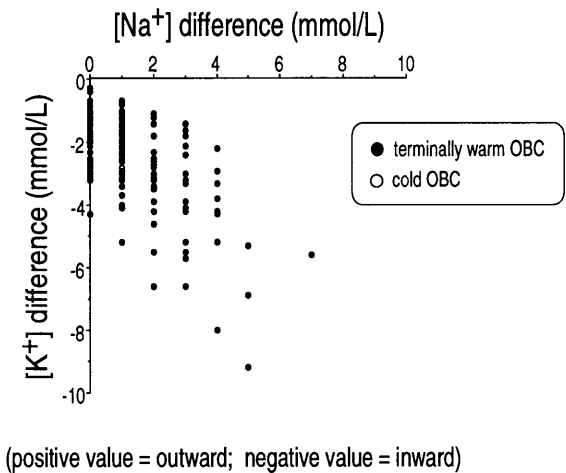


図 6： $[\text{Na}^+]$ 較差（横軸）と $[\text{K}^+]$ 較差（縦軸）の散布図。正値は外向き移動、負値は内向き移動を表す。●は常温心筋保護液（terminal warm OBC）再灌流時のサンプル、○は 18°C の心筋保護液（cold OBC）注入中のサンプル

OBC 液と冠静脈洞液（最初に採取されたサンプル）の pH を図 7 に示す。冠静脈洞液の pH は有意に心筋保護液の pH より低い値を示した（それぞれ 7.16 ± 0.02 vs 7.36 ± 0.01 unit、 $p < 0.05$ ）。

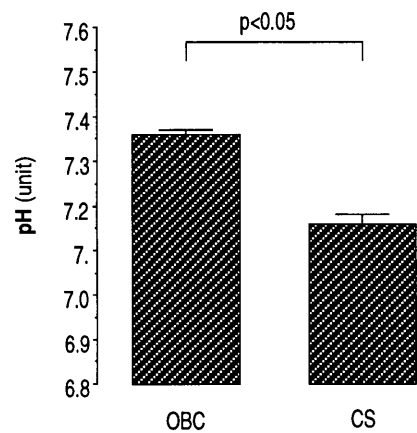


図 7：心筋保護液（OBC）と冠静脈洞液（CS）の pH 値。数値は平均値±標準誤差を示す（N：標本数）。

N = 44, OBC: oxygenated blood cardioplegia, CS: coronary sinus effluent

C. 単位酸素消費量あたりのイオン移動

個々の症例について OBC 液－冠静脈洞液間の $[K^+]$ 較差と酸素消費量の関連性を検討すると、 $r = 0.9$ 以上の相関係数が得られた（図 8）。単位酸素消費量あたりの K^+ 移動量（ K^+ 移動効率、 E_k ）として回帰直線の傾きを算出すると、対象症例すべてについて平均 E_k は 0.095 ± 0.008 mmol/min ($0.227 - 0.019$ mmol/min) であった。

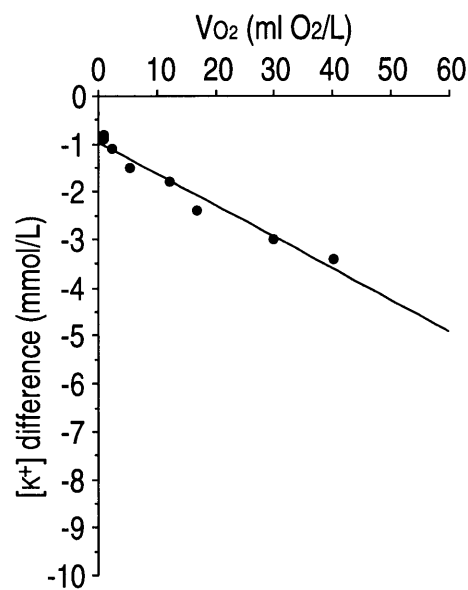


図 8：一例における心筋保護液 1L あたりの酸素消費量（ VO_2 ）と $[K^+]$ 較差の関係（負値は内向き移動を表す）。直線は回帰直線を示す。

平均大動脈遮断時間は 108±7 分（23-214 分）であった。全症例について大動脈遮断時間とEk の関係を図 9 に示す。Ek は大動脈遮断時間の延長とともに低下した。

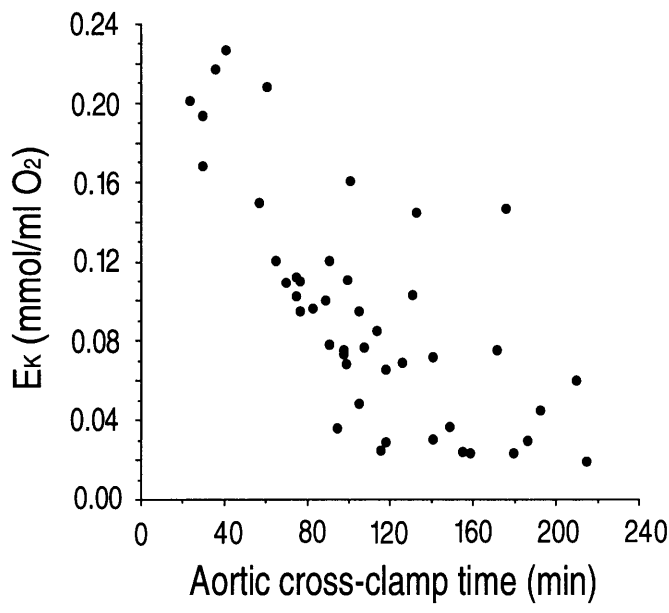


図 9：大動脈遮断時間（Aortic cross-clamp time）と Ek

3．心筋保護液自体による影響
A. 低酸素の効果（5% CO₂ と 95% N₂ 吹送）
pH と pCO₂ がほぼ正常に保たれた条件で心筋保護液が低酸素に曝露された場合のイオン濃度変化を表 3 に示す。[Na⁺]、[K⁺] とともに有意な変化を示さなかった。

表 3 5% CO₂ と 95% N₂ 吹送による低酸素の影響 数値は平均 ±SEM *p<0.05 vs 0 分値 (n=3)

time (min)	0	5	10	20	30
[Na ⁺] (mmol/L)	134.0±0.6	134.3±0.7	134.3±0.7	134.7±0.3	134.7±0.3
[K ⁺] (mmol/L)	18.9±0.4	18.9±0.4	19.0±0.5	19.1±0.5	19.1±0.6
SO ₂ (%)	99.7±0.2	88.1±3.5*	67.4±6.3*	34.6±6.5*	15.5±4.3*
pCO ₂ (mmHg)	39.6±0.8	41.5±1.6	40.4±0.6	40.2±0.6	40.4±0.6
pH (unit)	7.39±0.01	7.37±0.02	7.38±0.01	7.39±0.01	7.39±0.01

B. 低酸素、高二酸化炭素、アシドーシスの効果（100% CO₂ 吹送）

100% CO₂ 吹送下ではpHの著しい低下とpCO₂の著しい上昇がみられた。この条件で心筋保護液が低酸素に曝露された場合のイオン濃度変化を表4に示す。[Na⁺]はわずかではあるが有意な上昇を示したが、[K⁺]は有意な変化を示さなかった。

表4 100% CO₂ 吹送による低酸素、高二酸化炭素、アシドーシスの影響
数値は平均 ±SEM *p<0.05 vs 0 分値 (n=6)

time (min)	0	5	10	20	30
[Na ⁺] (mmol/L)	134.2±1.1	136.3±1.2	136.7±1.2	136.8±1.1*	137.7±1.2*
[K ⁺] (mmol/L)	18.3±0.3	18.4±0.3	18.4±0.3	18.3±0.3	18.3±0.3
SO ₂ (%)	99.0±0.4	83.0±3.9*	59.7±4.4	26.5±3.1*	12.7±1.6*
pCO ₂ (mmHg)	38.1±1.2	372.2±45.9*	532.0±27.0*	609.7±10.2*	634.9±12.4*
pH (unit)	7.40±0.02	6.51±0.05*	6.36±0.05*	6.31±0.01*	6.30±0.01*

考 察

本研究では虚血再灌流による心筋傷害のメカニズムの点から、Na⁺とK⁺の移動を操作する心筋保護法を検討した。いわゆる「terminally warm oxygenated blood cardioplegia（常温高K⁺酸素加血液による再灌流）」は、弛緩性心停止（K⁺脱分極）、常温、酸素加血液の3条件下による再灌流が以下の機序によって心筋保護に大きく寄与すると考えられる（図10）。

1）筋小胞体Ca²⁺ポンプによるエネルギー消費は心拍数依存性であり¹⁰⁾、弛緩性心停止という筋小胞体内外のCa²⁺移動が少ない状態ではそのエネルギー消費は低いと考えられるため、産生されたエネルギーの殆どはNa⁺-K⁺ポンプによるイオン移動に使われる。

2）常温および酸素加血液再灌流では、十分な酸素供給による好氣的代謝の促進によりエネルギー依存性のイオンポンプが活性化される。Na⁺-K⁺ポンプ活性化により細胞内Na⁺過負荷が正常化されたり細胞内K⁺喪失が改善（またはK⁺負荷が促進）されたりする。

3）これら3条件下による再灌流が終了した後もNa⁺-K⁺ポンプ電流（外向き電流）の増大は維持され再灌流時早期に膜電位を正常化する。

本研究ではNa⁺-K⁺ポンプの活性化条件を明らかにし、その条件を有する心筋保護液再灌流（常温高K⁺酸素加血液による再灌流）時のイオン移動の有無を開心術において明らかにすること、さらに虚血による細胞内イオン環境異常からの回復能力の指標として再灌流時のK⁺イオン移動能力（Na⁺-K⁺ポンプによるイオン移動能力の近似）の定量を試みた。

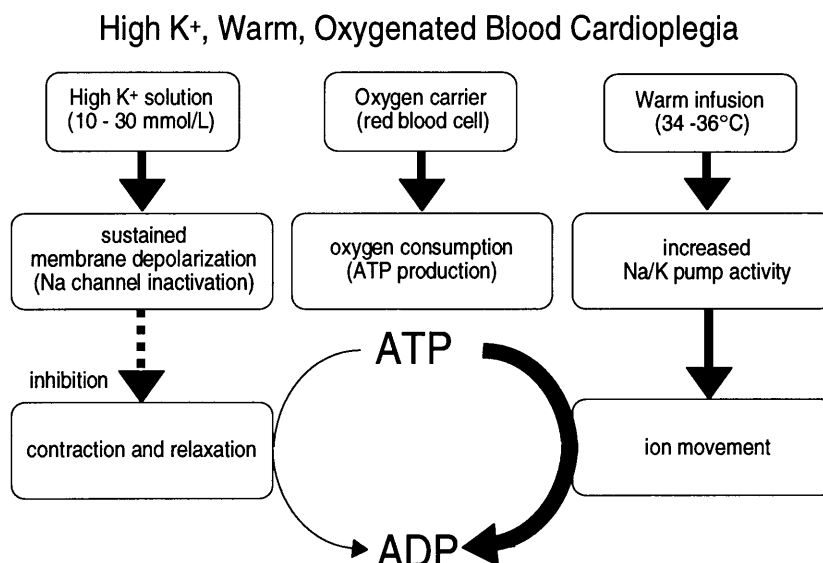


図 1 0 : terminally warm oxygenated blood cardioplegiaの作用機序から見た効果発現のための 3 条件。
ATP = adenosine triphosphate、ADP = adenosine diphosphate

1. Na⁺-K⁺ポンプの活性化条件

Na⁺-K⁺ポンプ活性化条件の設定として細胞外灌流（test液）温度と細胞外K⁺濃度に関して実験的に検討した。Na⁺-K⁺ポンプ電流（外向き電流）は灌流温が18°Cの時よりも28°Cや37°Cの時の方で大きく、高い温度依存性を示した。このことは心筋保護液の灌流温度が低温（18°C）の時よりも常温（37°C）の時のほうがエネルギー依存性イオンポンプが活性化することを示唆している。さらに灌流液（test液）のK⁺濃度が5 mmol/Lよりも20 mmol/Lで大きなNa⁺-K⁺ポンプ電流が得られ、Na⁺-K⁺ポンプが細胞外K⁺濃度にも依存し、高濃度ほどポンプ活性が高いことを示している。これにより臨床的に使用される高K⁺性心筋保護液が、常温で使用されるかぎりにはNa⁺-K⁺ポンプ活性を少なくとも低めることはないと考えられる。Koらは16 mmol/LのK⁺濃度を有するwarm cardioplegiaの投与時にNa⁺-K⁺ATPase活性が上昇することを生化学的に明らかにした¹²⁾。一方、Na⁺-K⁺ポンプは細胞内Na⁺濃度にも依存し高濃度ほどその活性が高いことが明らかにされている^{13,14)}。虚血中に生じる細胞内イオン環境異常の重要な要素はNa⁺過負荷であるため、虚血に暴露された心筋細胞ではNa⁺-K⁺ポンプ活性がより増大していることが予想される。

2. 開心術における再灌流時イオン移動の検討

常温高K⁺酸素加血液による再灌流（terminally warm oxygenated blood cardioplegia）時には、心筋温の上昇による心筋代謝の回復とともに酸素と基質の消費が増大して高エネルギー磷酸の産生が亢進する結果、エネルギー依存性のイオン移動が生じると考えられる。本研究では冠静脈液のイオン濃度を測定した結果、注入された心筋保護液がcold OBCでは酸素消費の程度とイオン濃度の変化が乏しいのに対し、terminally warm OBCではK⁺濃度がより低く、Na⁺濃度がより高くなる

ことがわかった。この時、酸素消費量の大きい（酸素含量が低い）サンプルほどイオン濃度の変化が大きいことから、それらのイオン濃度の変化が酸素消費依存性（エネルギー依存性）であると考えられる。冠静脈液の K^+ 濃度を低下させる他の機構として $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransportが関与する可能性もあるが、これはエネルギー依存性ではなく Na^+ 流入を伴うため、本研究の結果と合致し得ないと考えられる。

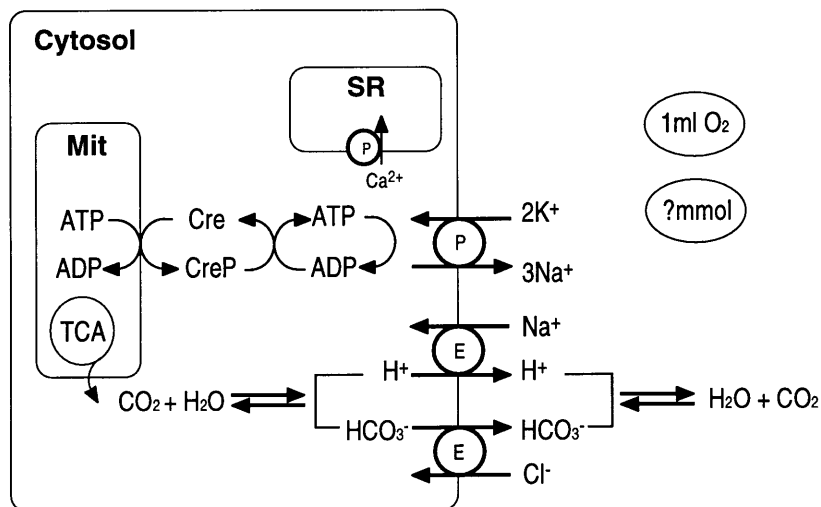


図 1 1：酸素消費依存性（エネルギー依存性）イオン移動。Mit = mitochondria、SR = sarcoplasmic reticulum、ATP = adenosine triphosphate、ADP = adenosine diphosphate、Cre = creatine、CreP = creatine phosphate、P = energy dependent ion pump、E = exchanger

3. エネルギー依存性イオン移動の効率（酸素消費1 mlあたりの K^+ 移動量）

心筋の弛緩には、収縮期に上昇した細胞質 Ca^{2+} が筋小胞体膜の Ca^{2+} ポンプによって筋小胞体に取り込まれる。その際、1 mmolのATPが加水分解する毎に2 mmolの Ca^{2+} が取り込まれる¹⁵⁾。一方、 Na^+-K^+ ポンプでは1 mmolのATPが加水分解する毎に3 mmolの Na^+ が排出され、2 mmolの K^+ が取り込まれる¹⁰⁾。虚血（30分間の常温虚血）では細胞内 Na^+ 濃度は30-40 mmol/L（正常の600%程度¹⁶⁾、正常域：5-6 mmol/L¹⁷⁾）まで上昇し、hypoxia（75分間の常温hypoxia）では細胞内 Na^+ 濃度は40 mmol/L（hypoxia前は約8 mmol/L）まで上昇する¹⁸⁾のに対し細胞内 Ca^{2+} 濃度は2-3 μ mol/L程度¹⁹⁾であり、再灌流時においてイオン濃度の低下に要するATP量は Na^+ に比し Ca^{2+} で極めて小さいと考えられる。また心拍動が生じていない弛緩性心停止下においても細胞質 Ca^{2+} 濃度は300 nmol/L以下¹⁹⁾であり、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプに消費されるATP量は少ないと考えられる。従って本研究の条件における再灌流時のエネルギー依存性イオン移動は主として Na^+-K^+ ポンプによる Na^+ 排出と K^+ 取り込みであり、この能力を評価することによって細胞内高 Na^+ 状態からの回復能力が近似可能と考えられる。単位酸素消費量あたりの K^+ 移動量は酸素消費からイオン移動までの間のすべての効率の積であり、ATP産生効率、CPKによるADPへのリン酸基転移効率などが関与すると考えられる（図 1 1）。

本研究における「単位酸素消費量あたりの K^+ 移動量」という指標の意義は、この指標が虚血再灌流によって生じた高度障害細胞または死細胞の関与を含まず生存心筋（スタン心筋）のイオン移動能力を定量しており、虚血中に生じた細胞内高 Na^+ 状態からの回復能力を評価していると考えられる。従ってこの数値が高ければ高いほど細胞内高 Na^+ 状態からの回復能力が良好で、 Na^+-Ca^{2+} 交換機構を介して流入する Ca^{2+} が少ないことが予想される。本研究では単位酸素消費量あたりの K^+ 移動量は大動脈遮断時間（心筋虚血時間）の延長にともない低下すること（イオン移動効率の低下）が明らかとなった。これは細胞内イオン環境異常からの回復能力が虚血時間が長くなるほど低下することを意味している。換言すれば、効率低下によって細胞内イオン環境異常からの回復により多くの酸素消費が必要となり、もし単位時間あたりの酸素摂取量に限界がある場合は、回復により長い時間がかかることを示している。スタン心筋では高酸素消費の割に心機能が低下しており²⁰⁾、これは酸素の利用効率が低下し正常のイオン環境を維持できない状態であることも考えられ今後の検討が必要と思われる。

4. 心筋保護液自体による影響

低酸素、高二酸化炭素、アシドーシスなど細胞内外の環境変化の中で心筋保護液中の赤血球がイオン移動を行ったり蛋白からイオンが解離し、冠静脈洞から得られた結果に影響を及ぼすことがあり得る。本研究では低酸素のみと低酸素およびアシドーシスの二種類の低酸素環境下におけるイオン濃度の変化を調べた。結果は低酸素のみでは Na^+ 濃度や K^+ 濃度に影響を与えなかったのに対し、低酸素およびアシドーシスでは Na^+ 濃度にわずかであるが統計学的に有意な変化を与えた。この Na^+ 濃度の上昇の原因は不明であるが、冠静脈液のpHは低下していることから、本研究の結果に影響していると思われる。

5. 本研究の問題点と今後の研究展開

本研究では虚血再灌流心筋における膜電位の変化を測定するの至らなかった。その理由は適切な虚血再灌流心筋細胞モデルの作成が困難であったためである。間接的な知見として以下の2点が結論できる。1) Na^+-K^+ ポンプ電流の増大条件を満たす常温高 K^+ 酸素加血液心筋保護液で再灌流すると、開心術において採取された冠静脈洞液の Na^+ 濃度がより高く、 K^+ 濃度がより低いことより、 Na^+-K^+ ポンプ活性増大によるイオン移動が考えられる。2) Na^+-K^+ ポンプ活性増大は心筋保護液再灌流から体外循環血液（常温酸素加血液）に切り替えられても持続すると考えられるため、そのイオン移動にともなう外向き電流によって膜電位が早期に再分極へ向かうことが推測できる。

他の問題点として虚血再灌流心筋における細胞内 K^+ 濃度の測定が困難であった。その理由は K^+ 濃度測定用イオン感受性蛍光プローブであるPBFIでは10 mmol/Lの K^+ 濃度変化でも捉えにくく、さらに Na^+ 濃度変化も影響するため、本研究の目的完遂には不適と考えられたためである。

今後の研究展開は 1) 上記の問題点を克服すべく他の方法を試みることに、2) 心筋虚血時間の延長とともにイオン移動効率が低下することから、スタン心筋の特徴である酸素消費増大をとまなう心機能低下がイオン移動効率の低下によるものかどうかを研究して行きたい。

文 献

- 1) Chien KR, Han A, Sen A, Buja LM, Willerson JT: Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium. Relationship to a phosphatidylcholine deacylation-reacylation cycle and the depletion of membrane phospholipids. *Circ Res* 54:313-322, 1984
- 2) Corr PB, Snyder DW, Lee BI, Gross RW, Keim CR, Sobel BE: Pathophysiological concentrations of lysophosphatides and the slow response. *Am J Physiol* 243 (Heart Circ Physiol 12):H187-H195, 1982
- 3) Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB: Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: Changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ Res* 60:478-486, 1987
- 4) Ganote CE, Liu SY, Safavi S, Kaltenbach JP: Anoxia, calcium and contracture as mediators of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 13:93-106, 1981
- 5) Tani M, Neely JR: Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts: Possible involvement of H^+ - Na^+ and Na^+ - Ca^{2+} exchange. *Circ Res* 65:1045-1056, 1989
- 6) Grinwald PM, Brosnahan C: Sodium imbalance as a cause of calcium overload in post-hypoxic reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol* 19:487-495, 1987
- 7) Yamamoto F, Manning AS, Braimbridge MV, Hearse DJ: Calcium antagonists and myocardial protection: diltiazem during cardioplegic arrest. *Thorac Cardiovasc Surg* 31:369, 1983
- 8) Yamamoto F, Manning AS, Braimbridge MV, Hearse DJ: Cardioplegia and slow-channel blockers: studies with verapamil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 84:897-905, 1982
- 9) Cole WC, McPherson CD, Sontag D: ATP-regulated K^+ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 69:571-581, 1991

- 10) Opie LH: Channels, pumps, and exchangers. In: Opie LH, ed. The heart. Physiology and metabolism. 2nd ed. New York: Raven Press: 67-101, 1991
- 11) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*. 391:85-100, 1981
- 12) Ko T, Ohtani H, Imamura H, Omori K, Inagaki C: Role of sodium pump activity in warm induction of cardioplegia combined with reperfusion of oxygenated cardiopkgic solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110:103-110, 1995
- 13) Nakao M, Gadsby DC: [Na] and [K] dependence of the Na/K pump current-voltage relationship in Guinea Pig ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 94:539-565, 1989
- 14) Shattock M, Matsuura H: Measurement of Na⁺-K⁺ pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell voltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxydant stress. *Circ Res* 72:91-101, 1993
- 15) Opie LH: Intracellular calcium fluxes and sarcoplasmic reticulum. In: Opie LH, ed. The heart. Physiology and metabolism. 2nd ed. New York: Raven Press: 127-146, 1991
- 16) Pike MM, Kitakaze M, Marban E: ²³Na -NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 259 (Heart Circ Physiol):H1767-H1773, 1990
- 17) Wang GX, Schmied R, Ebner F, Korth M: Intracellular sodium activity and its regulation in Guinea-pig atrial myocardium. *J Physiol* 465:73-84, 1993
- 18) MacLeod KT: Effects of hypoxia and metabolic inhibition on the intracellular sodium activity of mammalian ventricular muscle. *J Physiol* 416:455-468, 1989
- 19) Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, Yue DT, Chacko VP, Pike MM: Quantification of [Ca²⁺]_i in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ Res* 66:1255-1267, 1990
- 20) Ohgoshi Y, Goto Y, Futaki S, Yaku H, Kawaguchi O, Suga H: Increased oxygen cost of contractility in stunned myocardium of dog. *Circ Res* 69:975-988, 1991