

研究課題名

カルシウムパラドックスの薬物
による抑制とそのメカニズム

(03454140)

平成3年度～平成4年度科学研究費補助金
一般研究(B) 研究成果報告書

平成5年3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

カルシウムパラドックスとは1966年にNature誌に発表されたもので、心臓をカルシウムフリーの栄養液で灌流してから、正常のカルシウム濃度の栄養液で灌流すると、心筋組織が障害を受ける現象をいう。

本研究は、カルシウムパラドックスという現象を利用して、心筋細胞膜が破壊されるメカニズムを調べ、しらべられたメカニズムからどんな薬物が細胞膜の破壊を阻止できるのかを検討したものである。この研究によって、すぐれた虚血心筋保護薬の開発の手がかりが得られると考えられる。虚血心筋保護薬は虚血性心疾患の治療にもちいられるばかりではなく、臓器移植のさいに、とりだされたdonnorの臓器の長期保存液として利用されることが考えられる。本研究の成果から、細胞膜のナトリウムチャンネルを抑制する作用が、心筋をカルシウムパラドックスや虚血再灌流障害から保護するのに、重要である可能性が示唆された。ナトリウムチャンネル抑制作用に関しては、いままであまり重要と考えられていなかった。したがって、これからの新しい心筋保護薬の開発に新しい試金石を投じたといえることができる。

研究組織

研究代表者：安孫子 保 （旭川医科大学医学部教授）

研究分担者：橋爪 裕子 （旭川医科大学医学部助手）

研究分担者：矢沢 和人 （旭川医科大学医学部助手）

研究経費

平成 3 年度 4,100 千円

平成 4 年度 1,900 千円

計 5,520 千円

研究発表

1. 学会誌等

- 1) A. N. Ehsanul Hoque, Yoshihisa Nasa and Yasushi Abiko
Cardioprotective effect of d-propranolol in ischemic-reperfused isolated rat hearts.
Eur. J. Pharmacol. (in press)

- 2) Hiroko Hashizume and Yasushi Abiko
Effects of antiischemic drugs on cell shape change and increase in cytosolic Ca^{2+} induced by veratridine, a sodium channel activator, in rat cardiac myocytes.
Journal of Pharmacol. Exp. Ther. (submitted)

2. 口頭発表

- 1) Ehsanul Hoque, Yoshihisa Nasa, Yasushi Abiko
Cardioprotective effect of d-propranolol on ischemic reperfused rat hearts
The XIV World congress of the International Society for Heart Research, May, 1992

- 2) 橋爪 裕子、安孫子 保
ナトリウムチャンネル毒ベラトリジンによるラット心筋細胞障害に対する β -遮断薬ならびにカルシウムチャンネル遮断薬の作用
第6回薬物作用談話会、1992年8月

- 3) 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による細胞障害に対する各種薬物の作用
第43回日本薬理学会北部会、1992年8月

4) A. N. Ehsanul Hoque、奈佐 吉久、安孫子 保

d-Propranololはdl-propranololと同程度に虚血・再灌流心筋障害を保護する

第43回日本薬理学会北部会、1992年8月

5) 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による細胞過収縮に対するジラゼップの保護効果

第66回日本薬理学会年会、1993年3月発表予定

研究成果

1. 研究目的

心臓はたえず拍動して全身に血液を送っている。その心臓の収縮弛緩する拍動ごとに、細胞内のカルシウム濃度は 10^{-4} Mから 10^{-7} Mへと変化している。このように心筋細胞内のカルシウム濃度を的確に調節することが、心臓の機能を正常に保つことに重要である。心筋細胞が虚血によって障害されるとき、心筋細胞内のカルシウム濃度は上昇している。したがって心筋細胞が虚血障害に陥ったときは、細胞内のカルシウム濃度の調節が、損なわれていると考えられる。したがって、心筋細胞と細胞内のカルシウム濃度との関係を詳しく調べることは、虚血障害がおこるメカニズムを解明し、心筋細胞を虚血障害から保護する薬物を開発するのに、重要な手がかりを与えてくれると考えられる。

本研究の目的は、カルシウムパラドックスという現象を利用して、心筋細胞が破壊されるメカニズムを調べ、調べられたメカニズムからどんな薬物が細胞の障害を阻止できるのかを検討することである。そのために次の4つの実験を行なった。

- (1) 心臓から分離した心筋細胞をもちいて、カルシウムパラドックスのときの、細胞内カルシウム濃度を、蛍光カルシウム指示薬であるfura-2をもちいて測定した。またカルシウム拮抗薬ジルチアゼムと、 β -遮断薬プロプラノロールの作用を検討した。
- (2) 左心房標本をもちいて、カルシウムパラドックス時の張力と細胞内カルシウム濃度を同時に測定し、両者の間の関係を検討した。またプロプラノロールの作用を検討した。
- (3) 分離心筋細胞をもちい、細胞内のナトリウムとカルシウムの両方を増加させて細胞障害をおこすベラトリジン作用させ、この時の細胞障害に対するいろいろな薬物の作用を検討した。
- (4) 灌流ラット心臓をもちい、虚血再灌流障害に対する薬物の作用を検討した。

以下それぞれの実験について述べる。

2. 心筋細胞でのカルシウムパラドックスと細胞内カルシウム濃度

(1) 実験方法

ラットから心臓とりだし、コラゲナーゼ処理することにより心筋細胞を分離した。分離した心筋細胞に蛍光カルシウム指示薬FURA-2をとりこませた。そのうち1 mMのカルシウムをふくむKrebs-Ringer-HEPES バッファー (KR-HEPES液) に浮遊させてから、カルシウムフリーのKR-HEPES液にかえ、ふたたびKR-HEPES液のカルシウム濃度が1 mMになるように、カルシウムをくわえた。この時の細胞内カルシウム濃度を、細胞内カルシウム濃度測定装置 (日本分光CAF-110) を用いて測定した。またカルシウム拮抗薬ジルチアゼム (1 μ M) と β -遮断薬プロプラノロール (1 μ M) の作用を検討した。

(2) 実験結果

細胞外液中 (KR-HEPES液) に1 mMのカルシウムが存在するときの細胞内カルシウム濃度は、約100 nMであった。カルシウムフリーの液にかえると細胞内のカルシウム濃度は、約50 nMに低下した。そこへ1 mMのカルシウムをくわえると、10分後に細胞内カルシウム濃度は、600 nMに上昇した。ジルチアゼムをあらかじめ、KR-HEPES液にくわえておくと、細胞内カルシウム濃度の上昇は、400 nMに抑制された。またプロプラノロールをくわえた場合も、細胞内カルシウム濃度の上昇が、300 nMに抑制された。

(3) 考察

分離心筋細胞において、カルシウムフリーから1 mMのカルシウムをくわえることにより、細胞内カルシウム濃度はカルシウムフリーにする以前の濃度以上に上昇し、心筋細胞に細胞内カルシウム濃度を正常に保つことができない、なんらかの障害がおこっていることが示唆された。ジルチアゼムとプロプラノロールは、この細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制したが、そのメカニズムが、カルシウム拮抗作用や、 β -遮断作用によるものかどうかについては、

この実験からは明らかではない。しかし、今回もちいた細胞は静止した状態にあり、収縮していない。またカルシウムフリーの際に収縮がおこるとは考えにくく、よくいわれる心収縮を抑制するために細胞のエネルギー消費を抑制して、保護効果を表わしたとは考えにくい。現在カルシウムパラドックスが起こるメカニズムに関しては、2つの説がある。1つは、カルシウムフリーのさいに細胞膜が障害されて、カルシウムをふたたびくわえたときに大量のカルシウム細胞内に流入して細胞障害が起こると言う説である。もう1つは、カルシウムフリーのさいに細胞内にナトリウムが貯留し、カルシウムをくわえたときにたまったナトリウムをナトリウム-カルシウム交換系が逆方向にはたらいて、それによって、カルシウムが細胞内に流入するといふ説である。いずれにしても、ジルチアゼムとプロプラノロールは、カルシウムフリーのあいだにおこる心筋細胞に起こる変化を抑制して、カルシウムをふたたびくわえたさいの細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制したと、考えるのがもっとも可能性が高いと思われる。

(4) 結論

分離心筋細胞において、カルシウムフリーにしてふたたびカルシウムをくわえると、細胞の細胞内カルシウム濃度の調節機能が障害されて、細胞内カルシウム濃度が正常の値をこえて上昇した。ジルチアゼムとプロプラノロールは、この細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制した。

3. 左心房標本でのカルシウムパラドックスのさいの、張力と細胞内カルシウム濃度の関係

(1) 実験方法

ラットから左心房をとりだし、fura-2/AMと3時間から5時間インキュベーションして、fura-2を取り込ませた。この左心房標本をカルシウム濃度測定装置の組織灌流チャンバーに固定し、一端を圧トランスジューサーにつないで、発生張力と細胞内カルシウム濃度を同時に測定できるようにした。静止張力を0.5 gかけ、1 Hzで電気刺激した。この状態でカルシウム2.4 mMをふくむ栄養液で灌流してから、カルシウムフリーの液にかえ10分間灌流したあと、ふたたび2.4 mMのカルシウムをふくむ栄養液にかえて10分間灌流した。この時の張力と細胞内カルシウム濃度の関係を検討した。またカルシウムフリーにする直前からカルシウムフリー終了時までプロプラノロール(1 μ M)が存在した場合についても検討した。

(2) 実験結果

fura-2を取り込ませた左心房標本で、細胞内カルシウムと張力の同時測定が可能であった。カルシウムフリーの液で灌流すると、張力はもとの20%に減少したが、この際収縮時の細胞内カルシウム濃度は減少したが、拡張時の細胞内カルシウム濃度はかえって上昇した。灌流液のカルシウム濃度を2.4 mMにもどすと、張力はカルシウムフリーにする前の43%になった。収縮時の細胞内カルシウム濃度はカルシウムフリーにする前のレベルにまで上昇し、拡張時のカルシウム濃度も、カルシウムフリーの時の濃度以上に上昇して、収縮と拡張時の細胞内カルシウム濃度の差がせまくなった。

プロプラノロールは張力を79%減少させたが、この時細胞内のカルシウム濃度は収縮時、拡張時ともに上昇した。プロプラノロール存在下でカルシウムフリーにすると、張力はプロプラノロール投与以前の値の25%に減少した。この値はプロプラノロールのあるなしで差がなかった。収縮時の細胞内カルシウム濃度は、プロプラノロールがない場合と同様減少した。拡張時の細胞内カルシウム濃度も減少し、プロプラノロールがない場合上昇したのと異なった。灌流液のカルシウム濃度を2.4 mMにもどすと、張力はもとの値の7

9%に回復した。細胞内カルシウム濃度は収縮時、拡張時ともに上昇したが、プロプラノロールがない場合にみられた両者の差がせまくなることはなかった。

(3) 考察

本来であれば、カルシウムパラドックスはカルシウムフリーにした後、カルシウムを再びくわえると、張力が上昇し細胞内カルシウム濃度も異常に上昇するはずである。しかし、この実験では異常な張力と細胞内カルシウム濃度の上昇はみられなかった。その原因は灌流液を切り替えてから、組織灌流チャンバー内の灌流液が完全に入れ替わるまでに時間がかかり、チャンバーの灌流液が完全にカルシウムフリーの状態にならなかったことがあげられる。もう少し長時間カルシウムフリーの灌流液で灌流すればよかったのであるが、左心房に取り込ませたfura-2が時間とともにでてしまい、不可能であった。したがって、この実験では、カルシウムパラドックスの現象を観察することはできなかった。しかし張力と細胞内カルシウム濃度の関係で重要なことがわかった。張力の減少と増加と、細胞内カルシウム濃度とは平行に動かないということである。すなわち細胞外液のカルシウムをフリーにすると、当然張力は減少するが、拡張時の細胞内カルシウム濃度はかえって上昇したのである。したがって、この場合は細胞内カルシウム濃度以外にも張力に影響を与える因子があることになる。またこの時、拡張時の細胞内カルシウム濃度の調節機構が障害されている可能性がある。カルシウムフリーの液で灌流している間は、細胞外から細胞内へ流入するカルシウムの量は減少するはずであるから、収縮時にはおそらく細胞内のカルシウムストアからのカルシウムの放出が増加するであろう。拡張時にはSRのカルシウムの取り込みか、細胞外へのカルシウムの排出が抑制されているの可能性がある。興味があるのは、プロプラノロールはそれ自体で張力を減少させたが、この時細胞内カルシウム濃度を少なくとも減少させなかったことである。このことから、張力を規制するのは細胞内カルシウム濃度だけでないことがわかる。そしてプロプラノロールが、カルシウムフリーの液での灌流のさいにみられた、拡張時の細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制したことから、プロプラノロールはカルシウムフリーの間におこる細胞機能障害を抑制することがわかった。このために灌流液のカルシウム濃度をもとに戻し

た時、張力の回復がプロプラノロールがある場合の方が高かったとかがえられる。

(4) 結論

ラット左心房において、その発生張力は細胞内カルシウム濃度だけで規制されているのではなく、それ以外にも、重要な規制因子があると考えられる。カルシウムフリーで灌流すると、拡張時の細胞内カルシウム濃度を調節する機構が障害される。プロプラノロールはこのカルシウムフリーのあいだにおこる障害を抑制する。

4. 分離ラット心筋細胞におけるベラトリジンがひきおこすナトリウムならびにカルシウムオーバーロードによる細胞障害に対する薬物の効果

(1) 方法

①ラットの心臓から心筋細胞を分離した。心筋細胞は CaCl_2 を最終濃度で 1 mM ふくむ Krebs-Ringer HEPES buffer、pH7.4、37°C (KR-HEPES) に浮遊させて、実験に供するまで十分に酸素を通気した状態で室温にて保存した。

②ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化を観察した。心筋細胞はKR-HEPESに浮遊させて、40倍あるいは100倍で光学顕微鏡をもちいてその形態を観察した。5分間 preincubation したのち、 6.3×10^{-6} M ベラトリジンを心筋細胞にくわえ、その形態変化の時間経過を観察した。形態変化は心筋細胞を100個数えて、そのうちの桿状型を示す細胞の割合で表わした。

③ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化に対する薬物の効果を検討した。薬物存在下で5分間 preincubation したのち、 6.3×10^{-6} M ベラトリジンを心筋細胞にくわえ、5分後に桿状型をしめした細胞の割合で表わした。

④心筋細胞内カルシウム濃度変化を測定した。心筋細胞内カルシウム濃度は、細胞内イオン測定装置(日本分光CAF-110)を用いて細胞内に負荷した fura-2 の蛍光強度で測定した。心筋細胞は 5 nM の fura-2/AM と1時間室温にてインキュベーションして fura-2を負荷し、その後2回 KR-HEPES で洗浄した。測定条件は340 nm と380 nmで励起して、500 nm長波長透過フィルターをもちいてその蛍光を測定した。

(2) 結果

①ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化

ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化を図1に示した。分離した心筋細胞は、70%が桿状型であった。5分間のpreincubationの後に 6.3×10^{-6} M ベラトリジンを心筋細胞浮遊液に加えると、不規則な収縮-弛緩運動が誘発されて、1分以内にすべての細胞は球形に変化した。選択的な電位依存性のナトリウムチャンネル阻害薬テトロドトキシン(TTX)がバッファー中に存在すると、ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化は抑制された。また高濃度(2×10^{-4} M)の局所麻酔

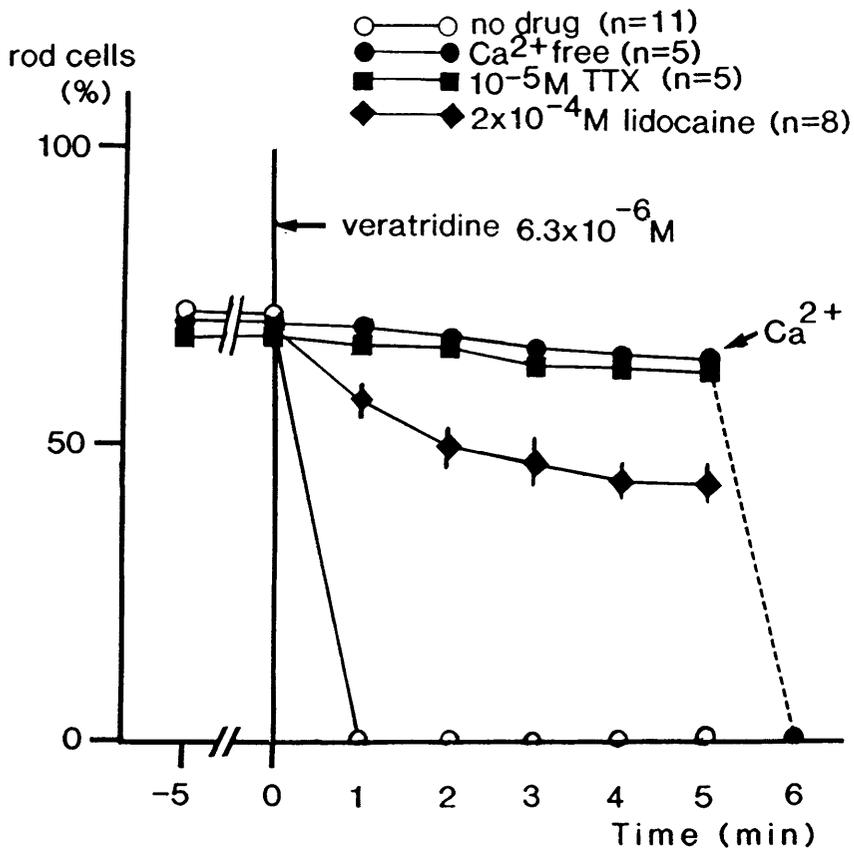


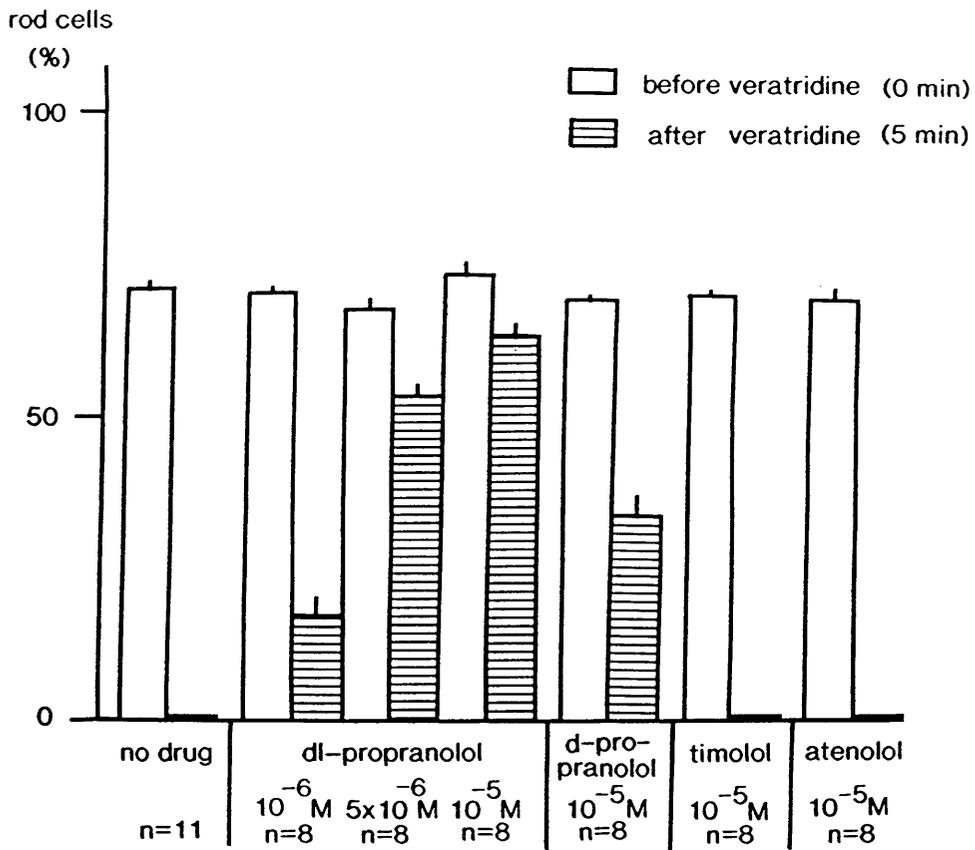
Fig 1 Cell shape change of cardiac myocytes induced by veratridine, and the effects of TTX, lidocaine, and calcium-free buffer on the veratridine-induced cell shape change. The percentage of the number of rod cells in the total number of cells is plotted as ordinate. The values are expressed as mean \pm S.E.M.

薬リドカインでも抑制がみられた。さらにカルシウムフリーのバッファーをもちいた場合も、ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化は抑制されたが、この状態で1mMのカルシウムをくわえると、1分以内に全ての細胞が球型に変化した。このことより、ベラトリジンはナトリウムチャンネルを開いて、さらになんらかの経路を介してカルシウムオーバーロードをおこし細胞を障害することがわかった。

②ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化に対する薬物の効果

ベラトリジンは①でしめしたように、ナトリウム、カルシウムオーバーロードをおこして心筋細胞障害をひきおこすが、抗狭心症薬がこれを抑制できるか否か検討した。図2と図3に、 β -遮断薬をもちいた場合の結果をまとめた。薬物が存在しない場合は、ベラトリジン投与5分後の桿状型細胞の割合は0%で、全ての細胞が球型に変化していた。まず代表的な β -遮断薬であるd l-プロプラノロールについて検討した。 10^{-6} M、 5×10^{-6} M、 10^{-5} Mのd l-プロプラノロールが存在すると、ベラトリジン投与5分後の桿状型をしめす細胞の割合はそれぞれ17%、54%、64%であり、濃度依存的に抑制した。 β -遮断作用はないが、d l-プロプラノロールと同程度のナトリウムチャンネル抑制作用があるとされるd-プロプラノロール(10^{-5} M)も抑制した(34%)。ところが β -遮断作用はあるが、ナトリウムチャンネル抑制作用はないチモロールとアテノロールは抑制しなかった。また β -遮断作用とナトリウムチャンネル抑制作用の両方をもつアセプトロールも抑制しなかった。 β -遮断作用とナトリウムチャンネル抑制作用の両方をもつl-ペンブトロール(10^{-6} M、 5×10^{-6} M、 10^{-5} M)は、濃度依存的に抑制した(それぞれ7%、52%、61%)。d-ペンブトロールはl-ペンブトロールの光学異性体であり、 β -遮断作用がなくナトリウムチャンネル抑制作用があるものであるが抑制した。

図4にはカルシウム拮抗薬と血管拡張薬であるジラゼップとニトログリセリンの効果についてまとめた。カルシウム拮抗薬ではニフェジピン(10^{-5} M)は抑制しなかったが、同じdihydro-pyridine系のカルシウム拮抗薬であるニソルジピン(5×10^{-6} M、 10^{-5} M)は抑制した(それぞれ28%、63%)。ジルチアゼム(10^{-5} M)は抑制しなかった。またニトログリセリン(2.2×10^{-5} M)は抑制



☒ 2 Effects of *dl*-propranolol, *d*-propranolol, timolol and atenolol on the veratridine-induced cell shape change. The ordinate is that in fig. 1. The values (mean \pm S.E.M.) are those before and 5 min after addition of veratridine.

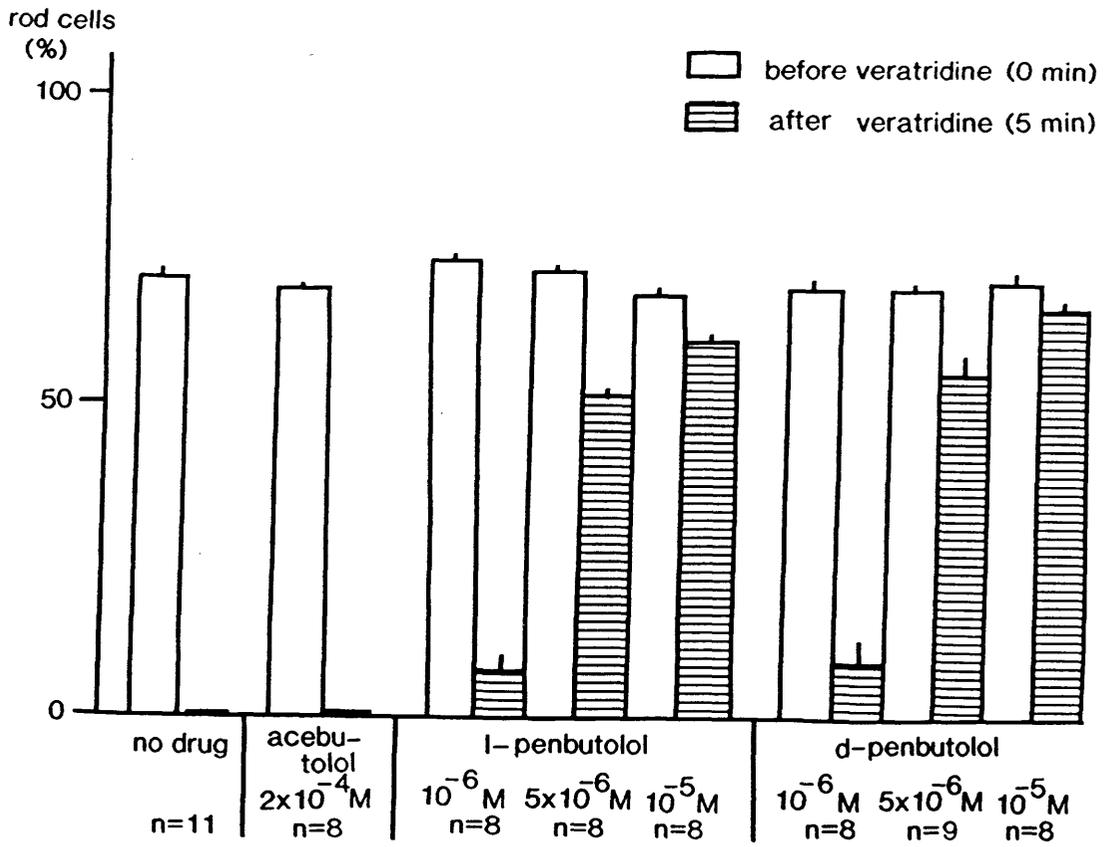
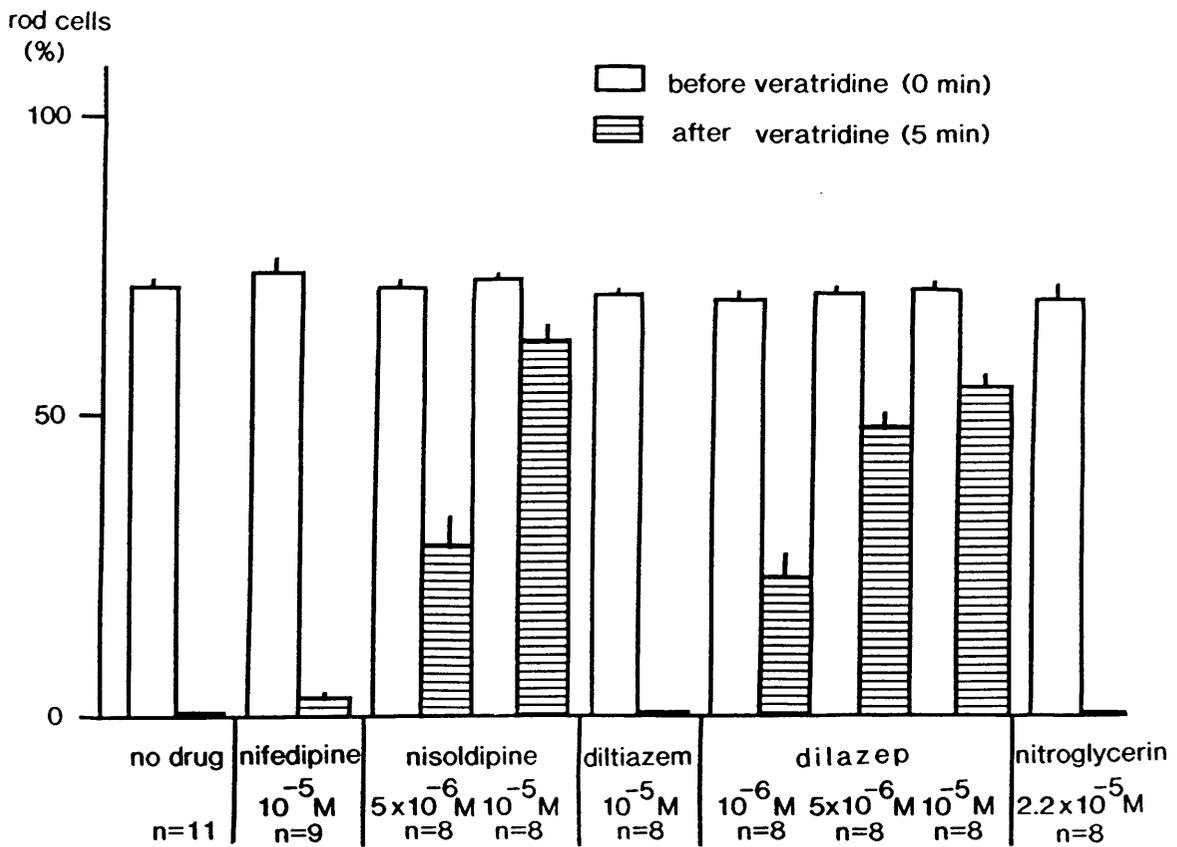


Fig. 3 Effects of acebutolol and l-penbutolol and d-penbutolol on the veratridine-induced cell shape change. Symbols are those given in fig. 2.



⊠ 4. Effects of calcium channel blockers and vasodilators on the veratridine-induced cell shape change. Symbols are those given in fig. 2.

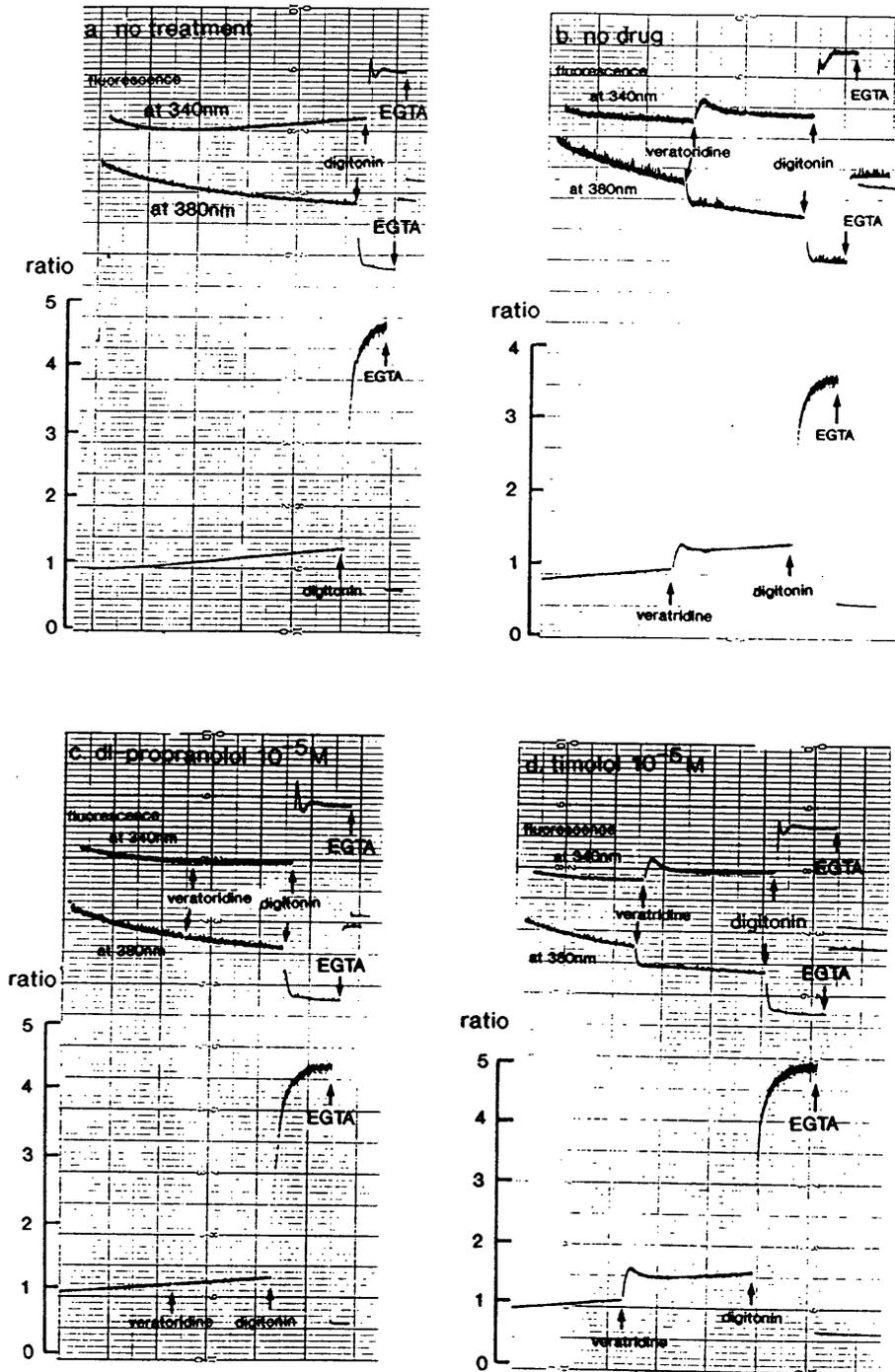


Fig. 5 Original recordings of fluorescence of fura-2 that has been loaded in the isolated cardiac myocytes. (a) no treatment (no veratridine, no drugs); (b) no drug (veratridine only, no other drugs); (c) *dl*-propranolol (veratridine + 10^{-5} M *dl*-propranolol); (d) timolol (veratridine + 10^{-5} M timolol).

しなかった。ジラゼップ (10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 10^{-5}M) は濃度依存的にベラトリジンによる心筋細胞の形態変化を抑制した (23%、48%、55%)。

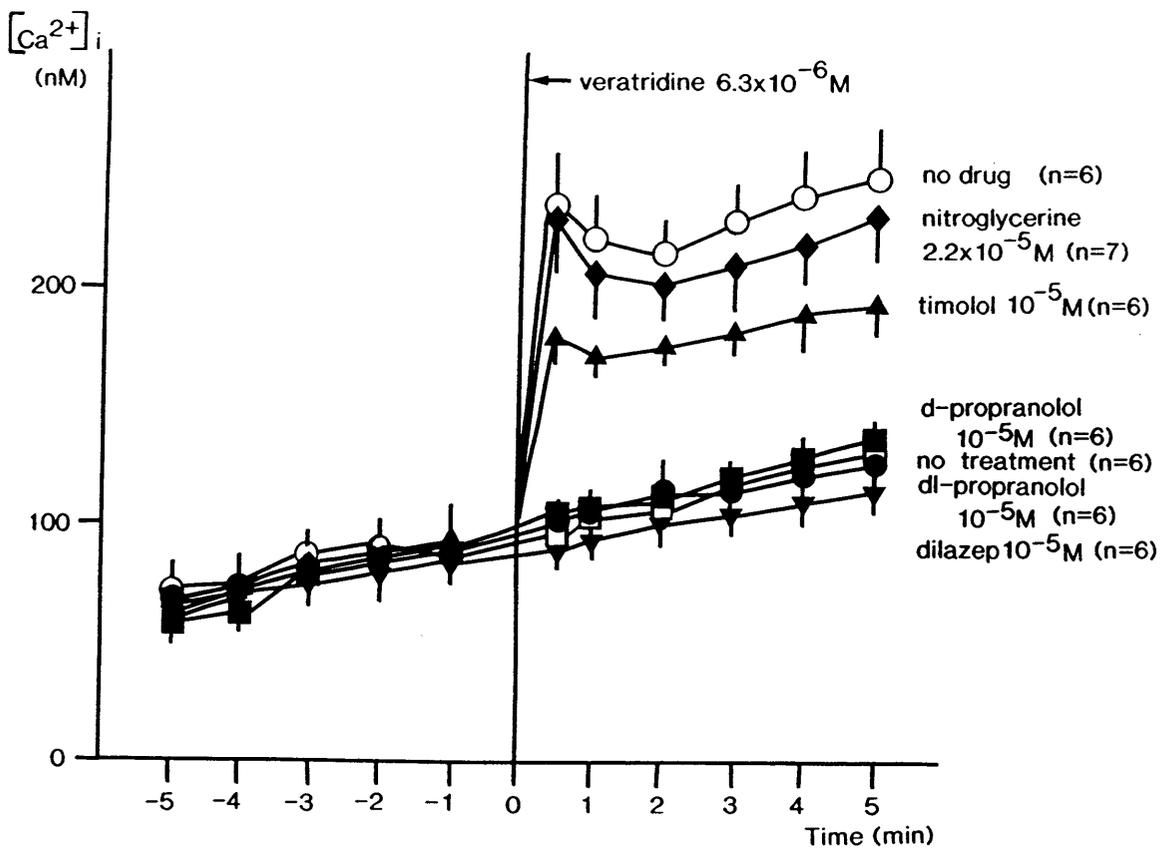
③心筋細胞内カルシウム濃度変化と薬物の効果

図5にfura-2によって測定した細胞内カルシウム濃度変化のoriginal traceを示した。340 nmで励起した場合と380 nmで励起した場合の蛍光強度の比 (ratio) は、なにも処理しない場合 (図5(a)) 変化しない。しかし、薬物非存在下でベラトリジンを加えると (図5(b))、ratioは増加して細胞内カルシウム濃度が上昇したことを示した。ベラトリジンによる形態変化を抑制したプロプラノロール (10^{-5}M) が存在すると、ratioは変化せず、ベラトリジンによる細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制した (図5(c))。しかし形態変化を抑制しなかったチモロール (10^{-5}M) は、ベラトリジンによってratioが上昇して細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制しなかった (図5(d))。

図6はoriginal traceから得られたデータを、Tsien *et al* の式 (1) にしたがって計算した細胞内カルシウム濃度にまとめたものである。

$$[\text{Ca}^{2+}] = \text{Kd} \cdot \frac{\text{R} - \text{Rmin}}{\text{Rmax} - \text{R}} \cdot \frac{\text{Sf2}}{\text{Sb2}} \quad (1)$$

R: ratio
 Kd: fura-2とカルシウム解離定数(224 nM)
 Rmin: fura-2がすべて遊離型のときのratio
 Rmax: fura-2がすべて結合型のときのratio
 Sf2: fura-2がすべて遊離型のときの380 nmで励起したときの蛍光強度
 Sb2: fura-2がすべて結合型のときの380 nmで励起したときの蛍光強度



☒ 6 Changes in $[Ca^{2+}]_i$ induced by veratridine in the absence or presence of antiischemic drugs.

心筋細胞の細胞内カルシウム濃度は約100nMであり、なにも処理をしなければ、10分間はこのレベルを維持した。ベラトリジンを加えると、100 nMからほぼ倍の200 nMに細胞内カルシウム濃度は上昇した。d l-プロプラノロール、d-プロプラノロール、ジラゼップがいずれも 10^{-5} M存在すると、ベラトリジンによる細胞内カルシウム濃度の上昇は抑制された。しかし、ニトログリセリン(2.2×10^{-5} M)、チモロール(10^{-5} M)はこれを抑制しなかった。この結果はほぼ形態変化の結果と一致した。

(3) 考察

①ベラトリジンが心筋細胞の形態変化をおこす機序

ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化はTTXで抑制されたことから、ベラトリジンは膜電位依存性のナトリウムチャンネルに作用している。またカルシウムをKRBから除くと形態変化がおこらず、細胞内のカルシウム濃度がベラトリジンによって増加した。以上のことを考慮すると、ベラトリジンの心筋細胞の形態変化をおこすメカニズムは、ナトリウムチャンネルを開けてナトリウムオーバーロードが起こり、さらにカルシウムオーバーロードが起こって形態変化にいたると考えられる。

②ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化を抑制した薬物の作用機序

実験結果からd l-プロプラノロール、d-プロプラノロール、l-ペンブトロール、d-ペンブトロール、ニソルジピンならびにジラゼップが、ベラトリジンによる心筋細胞の形態変化を抑制することがわかった。またこれらの薬物のうちd l-プロプラノロール、d-プロプラノロールとジラゼップは、ベラトリジンによる細胞内カルシウム濃度の上昇も抑制した。 β -遮断薬やカルシウム拮抗薬で効果のあるものとなないものがあるが、これはベラトリジンによる細胞障害を抑制するメカニズムが、 β -遮断作用やカルシウム拮抗作用とは異なることを示唆している。

効果のあった薬物の共通点は、いずれも①ナトリウムチャンネル抑制作用をもっていることと、②脂溶性が高いことがあげられる。ナトリウムチャンネル抑制作用は、ベラトリジンの作用メカニズムからも重要と思われる。しかし、ナト

TABLE Inhibition of cell shape change induced by veratridine, Na⁺ channel blocking action, and lipid solubility of antiischemic drugs.

agent	IC50* (μ M)	Na ⁺ channel blocking action	log octanol/water partition coefficient (at 37°C, pH7.4)
dl-propranolol	2.1	++	1.31
d-propranolol	10	++	1.31
dilazep	2.2	+	2.40 (at 25°C)
l-penbutolol	2.9	+	2.25
d-penbutolol	2.2	+	2.25
nisoldipine	5.4	?	4.04
acebutolol	>200	+	-0.17
timolol	>200	-	0.06
atenolol	>200	-	-1.83
diltiazem	>10	+>100 μ M	1.57 (at 20°C)
nifedipine	>10	-	3.22 (at pH6.8)
nitroglycerin	>22	-	2.06

* Concentration of agent required to inhibit veratridine-induced cell shape change by 50%.

リウムチャンネル抑制作用のあるとされるアセプトロールが効果がなかったことから、これのみでは説明できない。またベラトリジンによる心筋細胞形態変化の IC_{50} は、プロプラノロールは $2.1 \times 10^{-6}M$ であったが、プロプラノロールのナトリウム抑制作用は $10^{-4}M$ にならないと十分でないといわれる。また同程度のナトリウムチャンネル抑制作用を持っていると考えられるd-プロプラノロールとプロプラノロールはその IC_{50} の値が異なる。これらのことから、ナトリウムチャンネル抑制作用のみでは説明できない。

脂溶性については、Table に文献から引用した脂溶性の指標となる「オクタノール／水分配係数の対数值」をまとめた。またTable 2. に、ベラトリジンによる細胞の形態変化に対する抑制率から求めた各薬物の IC_{50} をまとめた。両者を比較すると、形態変化を抑制した薬物は、オクタノール／水の分配係数（対数值）が1以上であったことがわかった。

（4）結論

- ① d l-プロプラノロール、d-プロプラノロール、l-ペンブトロール、d-ペンブトロール、ニソルジピンならびにジラゼップは、ナトリウム、カルシウムオーバーロードをおこすベラトリジンによる心筋細胞障害を抑制した。
- ② その作用メカニズムは β -遮断作用やカルシウム遮断作用では説明できない。
- ③ いずれの薬物も脂溶性が高いことと、ナトリウムチャンネル抑制作用をあわせもっている。このことからナトリウム抑制作用は、ベラトリジンによる細胞障害を抑制するのに重要な作用メカニズムと考えられる。

5. ラット灌流心臓における虚血-再灌流障害に対するd-プロプラノロールの効果

(1) 方法

心筋保護薬におけるナトリウムチャンネル抑制作用の重要性を検討するためにラットの灌流心臓をもちいてd-プロプラノロールの虚血再灌流障害に対する作用を、dl-プロプラノロールの作用と比較した。またナトリウムチャンネル抑制作用のないチモロールの作用も検討した。

ラットの心臓をLangendorff式に灌流したのちWorkingモードにする。後負荷をとり除くことにより、15分間心臓を虚血にし20分間再灌流した。薬物の投与方法は2通り行なった。虚血にする5分前から薬物投与を開始し、虚血終了時まで投与した群(R群)と、虚血にする5分前から薬物投与を開始し、再灌流10分後まで投与した群(RD群)である。もちいた薬物は、dl-プロプラノロール10 μ Mと30 μ M、d-プロプラノロール10 μ Mと30 μ M、ならびにチモロール50 μ Mである。

心機能の指標として大動脈圧 \times 心拍数 (Rate Pressure Product、RPP) をモニターした。また、心筋エネルギー状態の指標として、心筋組織のAdenosine Triphosphate (ATP)と Creatine Phosphate (CP)含量の変化を、酵素法で測定した。さらに細胞膜障害の指標として、心筋組織の遊離脂肪酸含量の変化をHPLCをもちいて測定した。

(2) 結果

図7にRPPの変化を示す。10 μ Mのdl-プロプラノロールならびにd-プロプラノロールは薬物非投与群と比較して大きな差はなかった。しかし、30 μ Mのdl-プロプラノロールならびにd-プロプラノロールは、虚血前のRPPを有意に減少させて、再灌流後のRPPの回復も有意に促進した。チモロールは再灌流後のRPPを回復させなかった。

図8に心組織のATPとCrP含量の変化を示す。いずれの濃度のdl-プロプラノロール、d-プロプラノロールともに虚血時、再灌流時のATPならびにCrP含量は、薬物非投与群よりも有意に高かった。しかしチモロール投与群では、有意な差がなかった。

図9と図10に、心筋組織中の遊離脂肪酸含量の変化を示す。アラキドン酸、パルミトレイン酸、リノレイン酸、ならびにステアリン酸の含量は虚血時に増加して、再灌流するとさらに上昇した。d1-プロプラノロールとd-プロプラノロールは、再灌流による遊離脂肪酸のさらなる上昇を有意によくせいでいた。その効果は、d1-プロプラノロールとd-プロプラノロールで大きな差はなかった。チモロールは再灌流による遊離脂肪酸の上昇を全く抑制しなかった。

(3) 考察

β -遮断作用のないd-プロプラノロールの虚血再灌流障害に対する作用は、d1-プロプラノロールの作用とあまり差がなかったのにもかかわらず、 β -遮断作用がd1-プロプラノロールの6倍強いといわれるチモロールは、虚血再灌流障害を抑制しなかった。このことからd1-、ならびにd-プロプラノロールの考えられる虚血再灌流障害抑制メカニズムとして、 β -遮断作用以外の作用がまず考えられる。虚血再灌流障害時の遊離脂肪酸の増加を、これらの薬物が抑制することから、細胞膜を保護する作用と関係があると考えられる。直接の証拠はないが、ナトリウムチャンネル抑制作用が関与している可能性も十分あると思われる。そのほか、再灌流時に発生するラジカルを抑制している可能性のある。また、心機能を抑制して組織ATP含量を保持したことから β -遮断作用も関係して可能性も否定できない。

(4) 結論

d-プロプラノロールはd1-プロプラノロールと同程度に虚血再灌流障害を抑制する。このことは、 β -遮断作用のほかにも細胞保護に重要な作用があることを示している。そのひとつにナトリウムチャンネル抑制作用の考えられる。

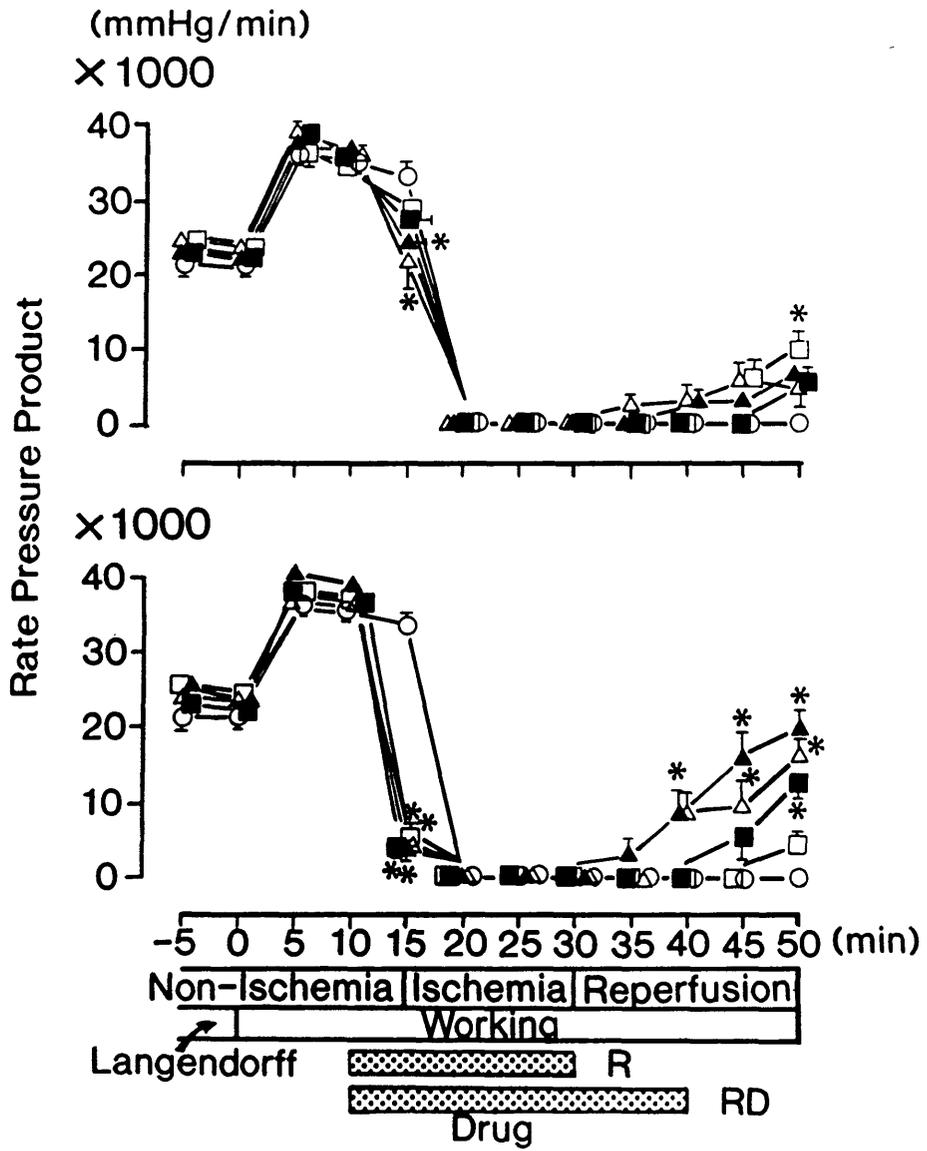


图 7

☒ 7 Effects of 10 μ M *dl*- and *d*-propranolol (upper panel) and of 30 μ M *dl*- and *d*-propranolol on the cardiac function (rate pressure product). After 10 min of preliminary perfusion, the perfusion was continued for 5 min with either normal perfusate (control group) or solution containing 10 or 30 μ M *d*- or *dl*-propranolol. Drugs were administered 5 min before ischemia until the end of ischemia (R group) or until the first 10 min after reperfusion (RD group). In the control group, drugs were not administered. (NI) Non-ischemic group; (I) Ischemic group; (R) Reperfused without any drug group; (RD) Reperfused with a drug group. Note that in both R and RD groups drugs were administered 5 min before ischemia, and the difference between R and RD is the time of removal of the drugs; in R group the drug administration was stopped at the end of ischemia, and in the RD group the drug administration was stopped at the first 10 min after reperfusion.

(○) Control group; (△) *d*-Propranolol:R group;

(□) *d*-Propranolol:RD group; (▲) *dl*-Propranolol:R group;

(■) *dl*-Propranolol:RD group. All data are expressed as means \pm S.E.M. * $p < 0.05$ compared between each of the drug-treated groups and the control group at a certain time.

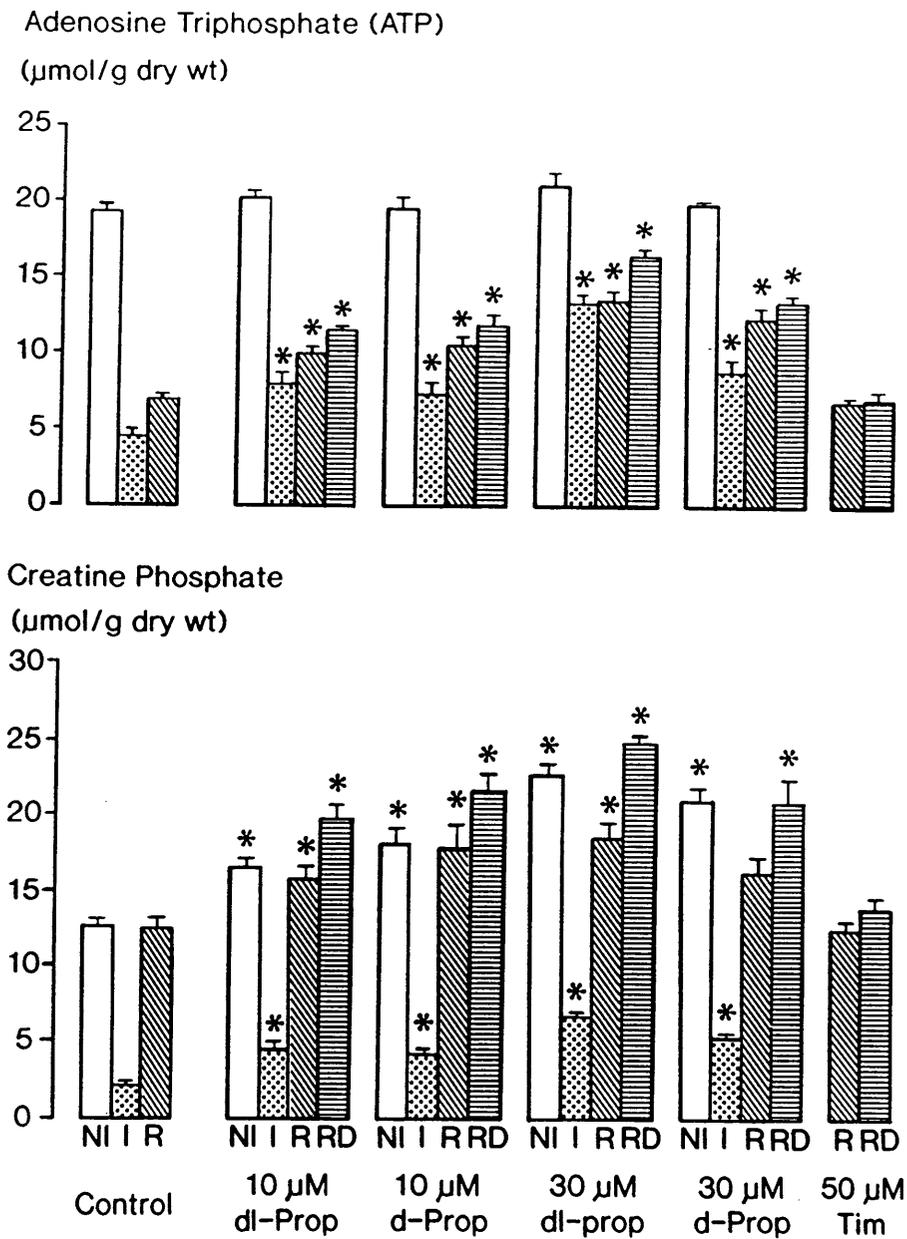
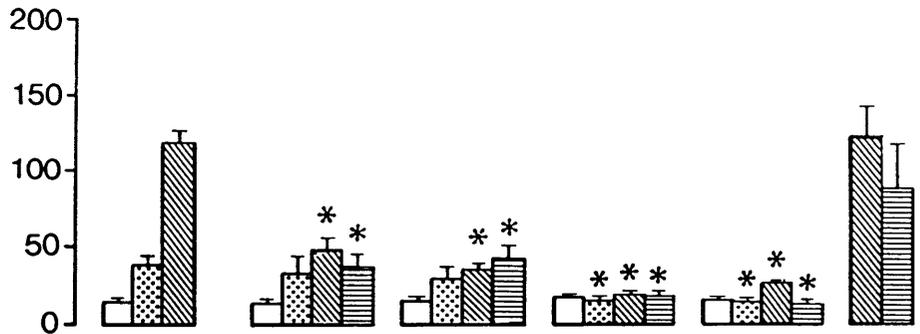


Fig 8 Effects of 10 and 30 μM *dl*- and *d*-propranolol and 50 μM timolol on the tissue levels of ATP (upper panel) and creatine phosphate (lower panel) in the myocardium. The heart was removed immediately before ischemia (NI), at the end of ischemia (I) or at the end of reperfusion (R or RD).

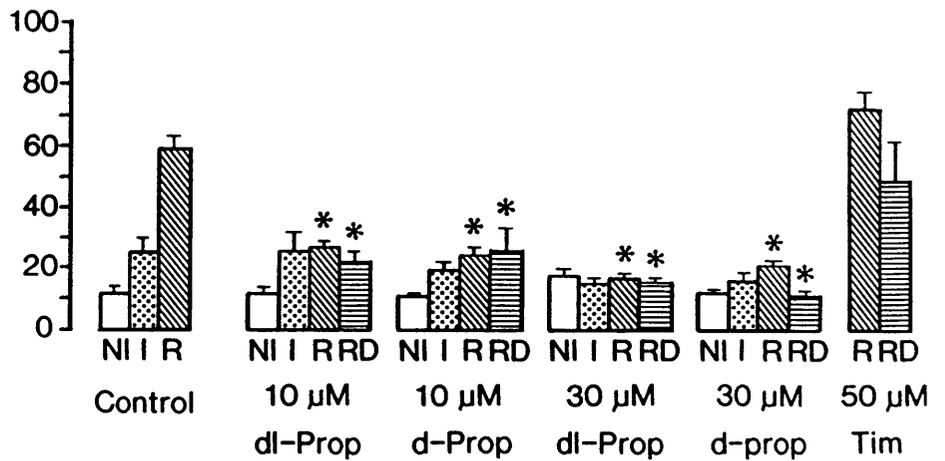
Arachidonic Acid (C20:4)

(nmol/g dry wt)



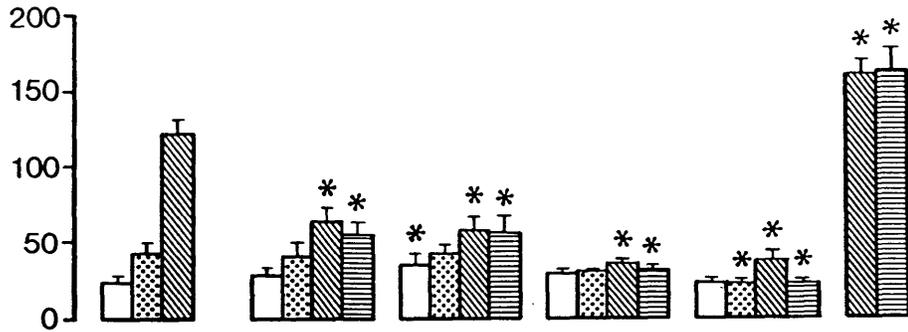
Palmitoleic Acid (C16:1)

(nmol/g dry wt)



9 Effects of 10 and 30 μ M *dl*- and *d*-propranolol and 50 μ M timolol on the tissue levels of arachidonic acid (upper panel) and palmitoleic acid (lower panel).

Linoleic Acid (C18:2)
(nmol/g dry wt)



Stearic Acid (C18:0)
(nmol/g dry wt)

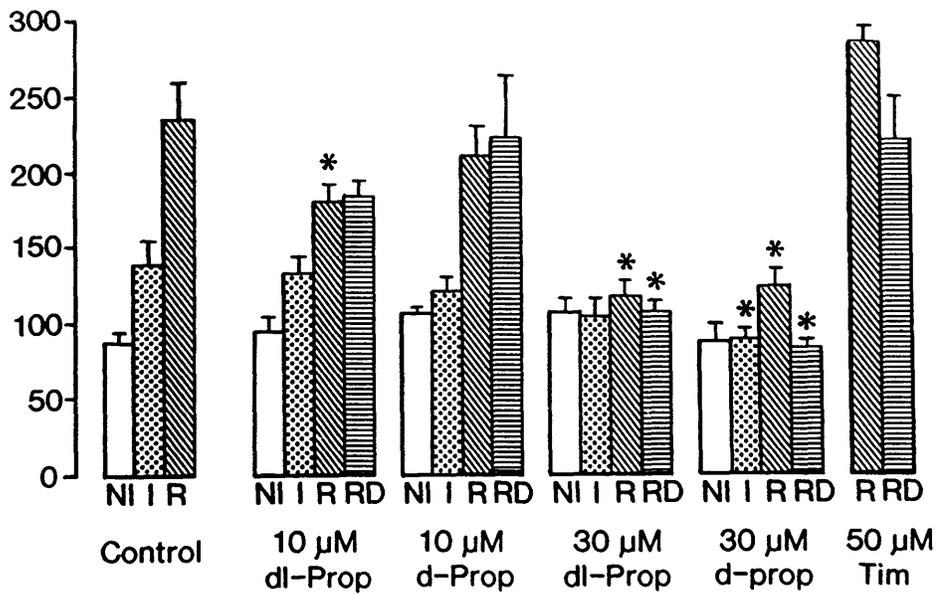


Fig 10 Effects of 10 and 30 μ M *dl*- and *d*-propranolol and 50 μ M timolol on the levels of linoleic acid (upper panel) and stearic acid (lower panel).

6. 全体のまとめ

1) ラットから分離した心筋細胞を、カルシウムフリーの栄養液で灌流すると細胞内カルシウム濃度の調節機構が障害される。ジルチアゼムとプロプラノロールはこの細胞内カルシウム濃度調節機構の障害を抑制した。

2) ラット左心房標本でのカルシウムパラドックスの実験から、発生張力と細胞内カルシウム濃度とは、パラレルではないことがわかった。カルシウムフリーの栄養液での灌流の間に、とくに拡張時の細胞内カルシウム濃度調節機構が、障害されることがわかった。プロプラノロールは、この障害を抑制した。

3) ナトリウムチャンネル抑制作用があって、脂溶性の高い薬物（d l- ならびに d-プロプラノロール、l- ならびに d-ペンブトロール、ニソルジピン、ジラゼップ）は、ベラトリジンによる心筋細胞のナトリウムならびにカルシウムオーバーロードによる細胞障害を抑制した。このことから、ナトリウムチャンネル抑制作用は、心筋細胞の細胞障害を抑制するのに重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

4) ラット灌流心臓において、虚血再灌流障害に対する d-プロプラノロールの作用は、d l-プロプラノロールの作用と大きな差がなかった。このことより、ナトリウムチャンネル抑制作用は虚血再灌流障害から心筋を保護するのに関与している可能性が示唆された。