

虚血による崩壊心筋構成蛋白質の心臓リンパ
液中での捕捉および抗狭心症薬開発への応用

研究課題番号
62480429

平成元年度科学研究費補助金
(一般研究B) 研究成果報告書

平成2年3月

研究代表者 市 原 和 夫

(旭川医科大学医学部助教授)

は し が き

心臓が全身に血液を送り出すというポンプ機能を全うするためには、心筋が絶えず、規則正しく、収縮と弛緩を繰り返していなければならない。心筋も骨格筋と同様にミオシンとアクチンのスライディングにより収縮が起こるが、このとき、アデノシン三リン酸(ATP)の加水分解によって得られる化学エネルギーが必要である。したがって、心筋がその収縮のために消費するエネルギーは莫大なものとなる。幸いなことに、心筋はミトコンドリアを多く含み、TCA回路や電子伝達系の発達した臓器であるので、糖質や脂肪酸、時には、アミノ酸などを基質として、好氣的に効率よくエネルギー(ATP)を産生することができる(図1)。好氣的にエネルギーを産生ということは、冠動脈血液によって運ばれてくる酸素を使用して基質を燃焼しなければならない、心筋は運ばれてくる酸素を最大限に摂取して利用している。したがって、もし心筋が利用できる酸素の量が低下すると、即座に心筋は好氣的代謝が営めなくなつて、エネルギー不足が起こり、心筋に種々の変化が起こってくる。

心臓を養っている冠動脈に通過障害が起こると、心筋組織への血液の供給が減少し、心筋細胞に対する酸素の供給が不足して、エネルギー不足となり、狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患が発症する。虚血時間が短時間であったり、酸素不足の程度が軽微であると心筋に対する虚血の影響が可逆的であり、臨床症状は狭心症である。

The citric acid cycle

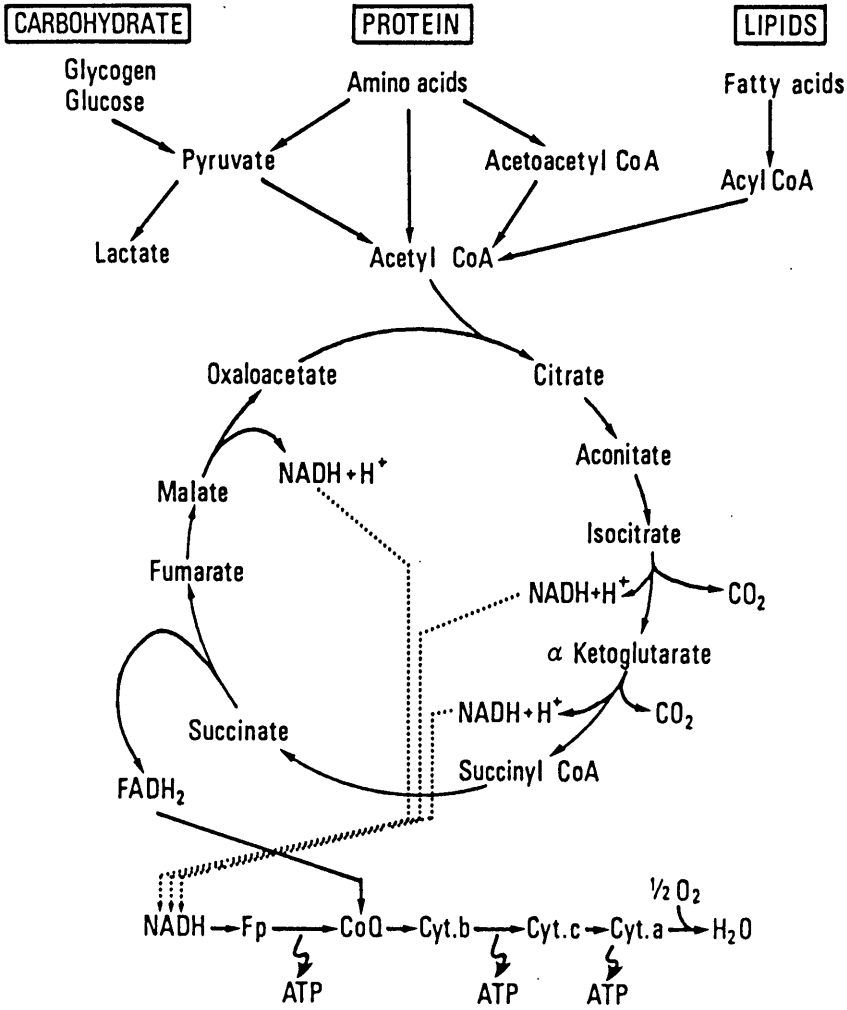


図 1 心筋組織における好氣的エネルギー産生

しかし、虚血時間が長引いたり、酸素不足の程度が重篤になると心筋に対する虚血の影響は不可逆的になり、臨床的には心筋梗塞となる。この狭心症から心筋梗塞へ移行する過程では種々の変化が心筋細胞内で起こっている。虚血になると心筋細胞は酸素不足の程度に応じていろいろな障害を受ける。例えば、虚血早期から心筋組織のエネルギーが不足してATPやクレアチン磷酸などの含量が低下したり、組織乳酸含量や脂肪酸含量が蓄積したり、血中に遊出したりする。また、心筋アシドーシスなども起こる。この時、細胞を障害するフリーラジカルの発生や、カルシウムイオンの異常な蓄積も観察される。虚血の程度が更に進むと、心筋細胞中に存在するリソゾーム顆粒の中に含まれる蛋白分解酵素や核酸分解酵素などが細胞質中に遊離して、活性化される。これら一群の分解酵素が活性化されると心筋細胞の機能蛋白質や構成蛋白質などが分解され、破壊される。虚血の程度が強くなると、乳酸脱水素酵素 (LDH) やクレアチンキナーゼ (CPK)、更には未知の蛋白質などが血中に出てくる。種々の組織で分解した蛋白質の小片や、無機物などは静脈血中に排出されるが、比較的分子量の大きい物質はリンパ液中に排出される。心臓においても、虚血によって分解された心筋細胞中の機能蛋白質や構造蛋白質の一部、特に巨大分子量のものは心臓リンパ液中にでてくることが知られている。したがって、本研究の目的は、血液中では検出されない蛋白質断片を心臓リンパ液中で捕捉し、虚血になった心筋では、どのような機能蛋白質、構造蛋白質が壊れているのかを知り、虚血によって、心筋細胞が死んでいく過程を考察することにある。この

ような研究によって、虚血性心疾患において、狭心症から心筋梗塞へと移行する過程が類推できるかもしれない。

研究組織

研究代表者： 市原 和夫 （旭川医科大学医学部・助教授）

研究経費

昭和62年度	4, 900千円
昭和63年度	1, 500千円
平成 元年度	500千円
計	6, 900千円

研究発表

市原和夫；

虚血障害と心臓リンパ中の蛋白質

第40回日本薬理学会北部会 1990年発表予定

K. Ichihara;

Cardiac lymph in the ischemic heart

Japanese Journal of Pharmacology 投稿予定, 1990年

研 究 成 果

虚血になると、冠動脈によって運ばれてくる血液が来なくなるので、心筋細胞は酸素不足になり、好氣的代謝が行えなくなつて、エネルギー不足になる。エネルギーの供給が不足すると、心筋組織の代謝はいろいろな影響を受ける。私は、昭和60年度科学研究費補助金を得て、虚血になると心筋細胞中に含まれるリソゾーム顆粒が破裂して顆粒内の蛋白質分解酵素、拡散分解酵素などの種々の分解酵素が細胞質中に放出され、細胞構造を破壊するということを見いだした。本研究では、まず、虚血になったときの心筋組織のエネルギー状態がどのように変化するかを調べた。次にリソゾーム内の蛋白質分解酵素が細胞質中に遊離して、細胞の機能蛋白質、構造蛋白質を分解するなら、これら崩壊した蛋白質断片が心臓リンパ液中に捕捉できるか否かを検討した。

実験方法

心筋エネルギー代謝実験

体重10～20kgの雌雄雑犬をペントバルビタールナトリウム 30mg/kg を静脈内投与することによって麻酔をかけ、気管内装管術を施して人工呼吸器で人工呼吸をかけながら左胸部を第5と第6肋間で開胸した。心嚢膜を切開し、心臓の左心室を露出した。左冠動脈前下行枝の起始部から約1cmの部位を丁寧に剥離し、冠血流量測定用の微小電磁血流計プローブ（スカラー社製、MDL-1401）と冠動脈狭窄用のオクルーダーを装着した。冠動脈狭窄によって虚血になると思われる心筋部位に表面心電図導出用の電極を取り付けた。全身動脈圧は左大腿動脈から大動脈弓近傍まで挿入したカニューレから圧トランスデューサーを介し、また、心拍数は第II肢誘導の心電図波形からタコメーターを介して、それぞれポリグラフに入力、記録した。全ての準備が完了して各種のパラメーターが安定する約30分から1時間後に実験を開始した。

心筋組織のエネルギー代謝中間体を生化学的に定量して虚血による心筋のエネルギー状態を調べるために、冠動脈結紮直前、あるいはオクルーダーで冠動脈を結紮3分後、または結紮30分後にその冠動脈支配下の心筋を鉗ですばやく採取し、予め液体窒素で冷却しておいたクランプで瞬時に圧挫凍結固定した。実験プロトコールを図2に示す。このとき、心筋に方向性を持たせてクランプに挟むことに

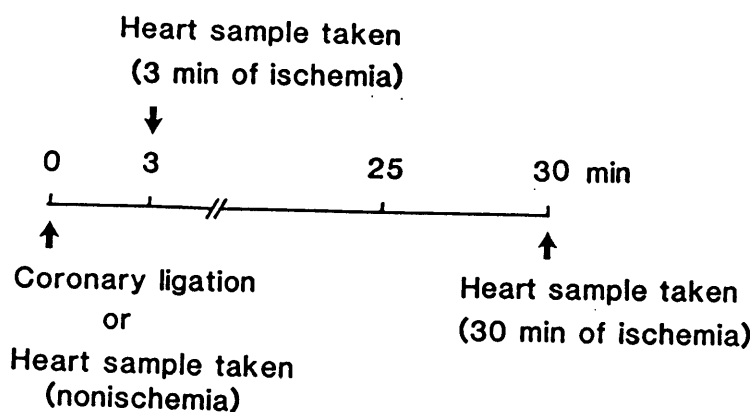


図 2 心筋エネルギー代謝実験のプロトコール

冠動脈結紮直前（0 min）、あるいはオクルーダーで冠動脈を結紮3分後（3 min）、または結紮30分後（30 min）にその冠動脈支配下の心筋を鉗ですばやく採取し、液体窒素で冷凍固定しサンプルとした。

よって心筋内膜側と外膜側に分け、心筋内膜側の心筋のみをサンプルとして採取した。凍結した心筋内膜側のサンプルは液体窒素温度下で乳鉢と乳棒を用いて微細粉末とし、少量の組織粉末をとって一昼夜オープンに入れて組織水分含量を測定し、残りの組織粉末に3倍量の6%過塩素酸を加えて組織抽出液を作製した。11,000 r.p.m., 4°C, 5分間の遠心分離で得られた上清に 1 M の3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid (MOPS) を添加した後、70%KOHで中和した。この中和によって生じた過塩素酸塩を再び11,000 r.p.m., 4°C, 5分間遠心分離することによって取り除き、上清をエネルギー代謝中間体濃度の定量に供した。エネルギー中間体としてはアデノシン一リン酸 (AMP), アデノシン二リン酸 (ADP), ATP、およびクレアチンリン酸 (CrP) の濃度を酵素法によって測定した。心筋組織のエネルギー状態を知るためにエネルギー・チャージ・ポテンシャル (ECP) を次式にしたがって計算した。

$$([ATP] + 1/2[ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP])$$

心臓リンパの実験

体重15～20 kgの雌雄雑犬にペントバルビタールナトリウム30mg/kg を静脈内投与することによって麻酔をかけ、気管内装管術を施して人工呼吸器で人工呼吸をかけながら正中切開を行った。電気メスで出血を抑えながら皮膚、筋肉組織、及び結合組織を切開しながら、胸骨を露出した。胸骨を電動鋸で切開して胸腔を開き心臓を露

出した。心嚢膜を切開したのち、上大静脈に絹糸をかけ軽く持ち上げるようにして、胸腺を綿棒で丁寧に分け、心臓リンパ管のリンパ節を露出した。通常、心臓リンパ節は上大静脈と腕頭動脈の間にあった。心臓リンパ節の場所を図3に示す。心臓リンパ節から心臓へ向かって走行するリンパ管を綿棒を用いて丁寧に剥離し、絹糸をかけた。左心室筋に0.5%エバンスブルーを0.2 ml注射して数分経つと、心室筋表面を走行するリンパ管にエバンスブルーが流れ込み、青く染まった。このエバンスブルーが心臓リンパ管を通して、心臓リンパ節に到達する頃、クリニクマイクروسコープ（甲南カメラ研究所製、CLM-150）で覗きながら、心臓リンパ管をマイクロサージョリー用の剪刀で切開した。切開したリンパ管の心臓からリンパ液が流れてくる方向に直径約1 mmのポリエチレンチューブを挿入し、絹糸で固定した。ポリエチレンチューブの他方端を正中切開している上端のところまで導き咽頭のところで皮膚から出して絹糸で固定した。ときどきヘパリン溶液を逆行性にポリエチレンチューブに注入し凝固を防いだ。左冠動脈廻旋枝を剥離し、電磁血流計プローブと冠動脈狭窄用のオクルーダーを装着し、プローブの端子とオクルーダーの先端を背部の皮膚上に出し固定した。以上の準備が終了した後、丁寧に閉胸した。ペニシリン（100万単位）あるいはセフェム系の抗生物質（600mg）を縫合した部位および筋肉内に投与した。、覚醒した後も保温した室内で2日間飼育し実験に供した。ポリエチレンチューブからリンパ液が流出しているのを確認し、ときどきヘパリン溶液でフラッシュした。

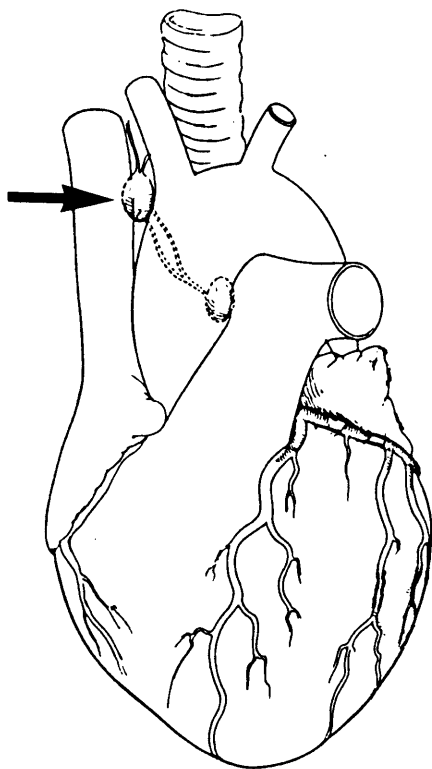


図 3 心臓リンパ節の大体の位置を示す模式図
矢印で示す位置に心臓リンパ節がある。

実験プロトコールとしてははじめにコントロールのサンプルとして、冠動脈結紮前に流出してくるリンパ液を採取し、その後冠動脈を結紮して30分後のリンパ液を採取した。リンパ液を採取するのに約5分必要とした。採取したリンパ液は直ちに尿素と溶解液 (9.5 M urea, 2% Nonidet P-40, 2% Ampholine (pH5-7, pH3.5-10), 5% β -mercaptoethanol) にて溶解し、二次元電気泳動用のサンプルとした。二次元電気泳動法は基本的にはO'Farrell (1975) の方法にしたがった。等電点電気泳動用のゲルはurea 5.52g, acrylamide 1.33ml, 10% Nonidet P-40 2ml, H₂O 1.97ml, Ampholine (pH5-7 0.4ml, pH 3.5-10 0.1ml) を溶解し、10% Ammonium peroxosulfate 10 μ l とN,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 10 μ l を加えて直ちに、直径約3mm、長さ約12cmのガラスチューブに充填し、重合させた。S D S 電気泳動用のゲルは電気泳動用ガラス間隙に分離ゲル (1.5 M Tris-HCl pH8.8, 0.4% SDS, acrylamide 16.12ml, TEMED 27 μ l, Ammonium peroxosulfate 1.07ml) を充填し、直ちに濃縮ゲル (0.5 M Tris-HCl pH6.8, 0.4% SDS, acrylamide 1.5ml, TEMED 10 μ l, Ammonium peroxosulfate 0.4ml) を上部に静かに乗せ、一昼夜放置して重合させた。等電点電気泳動用のゲルを泳動槽にセットし、プレランした後、溶解液に溶解したリンパ液サンプル (20 μ l, 20 μ g protein) をのせ、400voltsで12時間、さらに800voltsで1時間泳動した。等電点電気泳動が終了したゲルをガラスチューブから取り出し、S D S 電気泳動用ゲルの上部にのせ、5mAで約2時間、さらに20 mAでマーカールとして泳動液に添加したブロムフェノールブルーの色

が下方に到達するまで電気泳動を行った。泳動の終了した S D S ゲルはガラスからはずされ、Coomassie B.B.染色、あるいは銀染色にかけられた。

実験結果

心筋エネルギー代謝実験

麻酔開胸犬の左冠動脈前下行枝を30分間結紮したときの動物群の血行動態の変化を図4に示す。冠動脈結紮前5分間血行動態パラメーターを観察してから冠動脈結紮を施行した。冠動脈を結紮する前はほとんど全身血圧（収縮期血圧、拡張期血圧）、心拍数、冠血流量には変化が認められなかった。冠動脈を結紮するともちろん冠血流量は0 ml/min になった。心拍数はほとんど変わらなかったが、収縮期血圧、拡張期血圧ともに冠動脈結紮初期に低下し、結紮30分後にはほとんど結紮前値に回復していた。冠動脈を結紮して心筋を虚血にすると、心室表面心電図上のST部分は上昇し、虚血30分後までほぼ持続していた。

左冠動脈前下行枝を結紮する直前あるいは結紮して3分後と、30分後に取り出した虚血心筋の組織 ATP, ADP, AMPおよび全アデニンヌクレオチド含量を図5および図6に示してある。冠動脈を結紮して心筋が虚血になると、組織ATP含量は虚血3分、30分と次第に減少した。組織ADPは虚血3分後に上昇したが、虚血30分後には虚血前値に戻っていた。組織AMP含量は虚血3分後に増加し、虚血30分後でもその増加は持続していた。組織ATP含量の低下を反映して全アデニンヌクレオチド含量も虚血3分、30分と次第に低下していた。組織 ATP, ADP, AMPおよび全アデニンヌクレオチド含量から計算したエネルギー

ー・チャージ・ポテンシャル (ECP) を図 7 に示してある。虚血前 0.916 ± 0.005 の ECP 値は虚血 3 分後には 0.854 ± 0.007 に減少し、虚血 30 分後には 0.801 ± 0.017 とさらに減少した。

組織クレアチンリン酸 (CrP) の虚血による変化を図 8 に示す。冠動脈結紮によってその初期に、組織 CrP は著明に低下するが、結紮 30 分後には多少回復してくる傾向にあった。

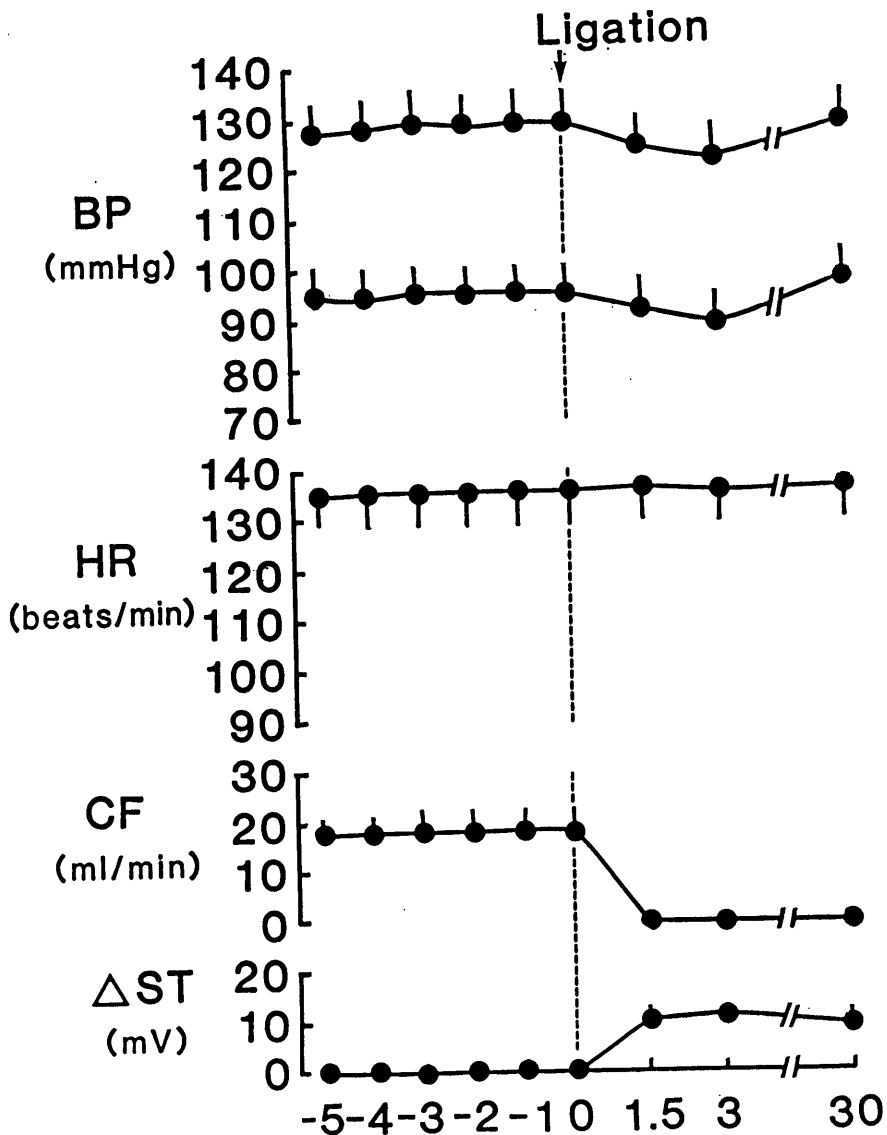


図 4 血行動態におよぼす虚血の影響

BP : 全身動脈圧 (上が収縮期血圧、下が拡張期血圧)

HR : 心拍数

CF : 冠血流量

ΔST : 表面心電図上のST部分の変化

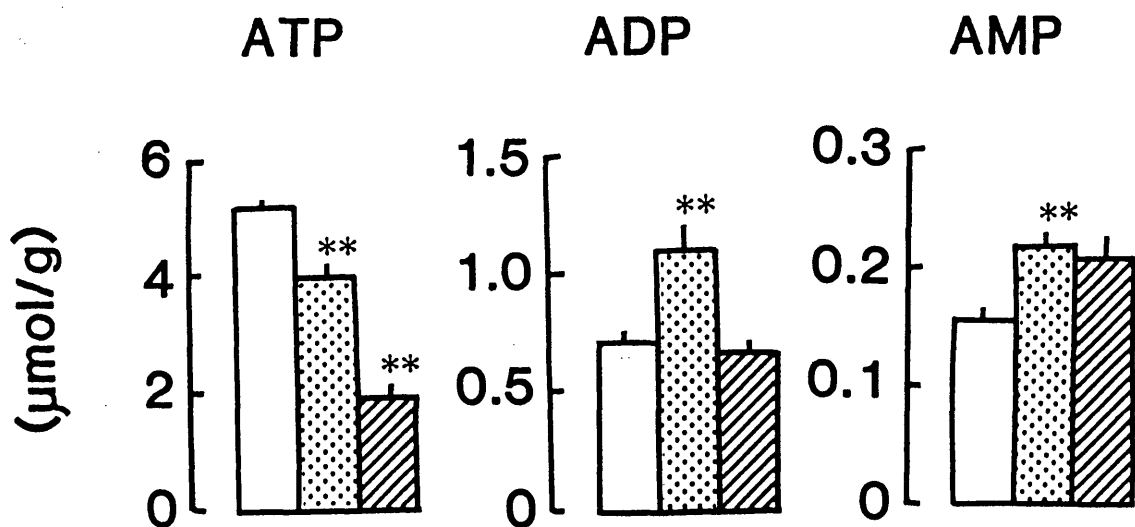


図 5 虚血による心筋 ATP, ADP, AMP 含量の変化

心筋サンプルは冠動脈結紮直前 (□)、結紮3分後 (●)、結紮30分後 (▨) に採取された。

** $P < 0.01$ 結紮直前の値と比較。

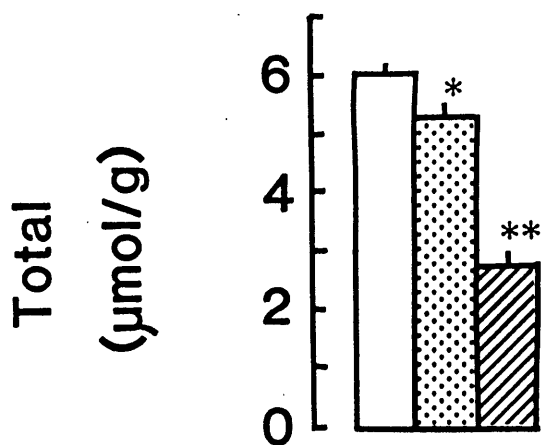


図 6 虚血による全アデニンヌクレオチド含量の変化

Total : 全アデニンヌクレオチド

心筋サンプルは冠動脈結紮直前 (□)、結紮3分後 (▨)、
結紮30分後 (▩) に採取された。

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 結紮直前の値と比較。

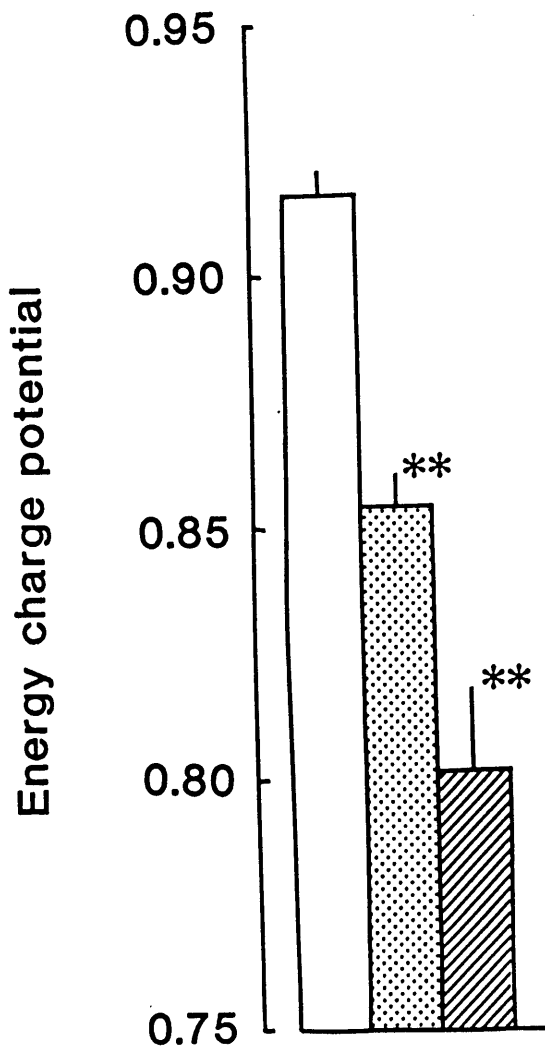


図 7 虚血によるエネルギー・チャージ・ポテンシャルの変化

エネルギー・チャージ・ポテンシャルはATP, ADP, AMPの値から次の式により計算された。

$$([ATP] + 1/2 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$$

心筋サンプルは冠動脈結紮直前 (□)、結紮3分後 (点線)、結紮30分後 (斜線) に採取された。

**P<0.01 冠動脈結紮前値との比較。

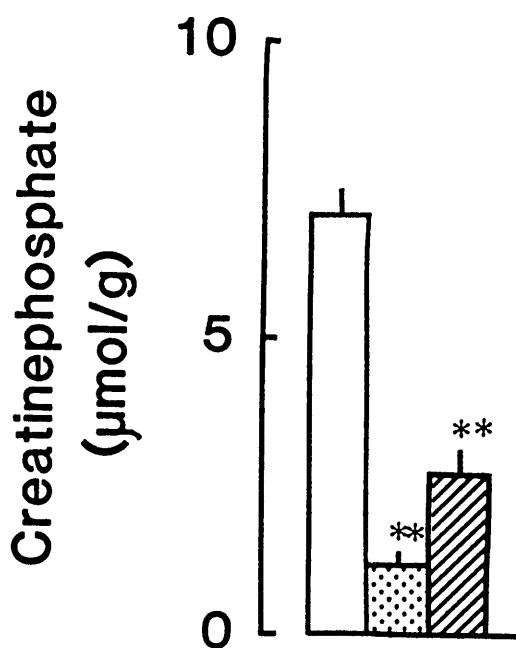


図 8 虚血による心筋クレアチン燐酸含量の変化

心筋サンプルは冠動脈結紮直前 (□)、結紮3分後 (⦿)、結紮30分後 (▨) に採取された。

** $P < 0.01$ 冠動脈結紮前値との比較。

心臓リンパの実験

a. 心臓リンパ管へのカニュレーション

麻酔した犬を正中切開するとき、気をつけなければならなかったのは出血であった。そのため、切開には電気メスを使用し、絶えず止血しながら手術を進めた。また、術後感染を防ぐために手術器具は全て滅菌消毒し、なるべく無菌的に手術を行った。術後の抗生物質の投与もあって、閉胸覚醒後の生存率は90%に達するようになった。心臓リンパ管を見つけるために左心室の心外膜側の筋肉に0.5%エバンスブルーを注射すると1分以内に左心室筋表面を走行するリンパ管が青く染まってきた。約3分位すると図3に示すリンパ管も青く染まってきた。心臓から出て心臓リンパ節にはいる直前のリンパ管を綿棒で丁寧に、約3 cm位剥離し、2本の絹糸をかけた。リンパ管は非常に脆弱であるので、細心の注意を要した。リンパ節側の絹糸でリンパ管を結紮すると、心臓からくるリンパ液でリンパ管が膨らんできた。図9に示すようなマイクロサージェリー用のピンセットと、バネ付きの鉗を用いて、リンパ管を切開した。このとき、膨らんでいたリンパ管からリンパ液が流出するため、リンパ管は瞬時に細くなってしまった。切開部から心臓方向へ、直径約1 mmのポリエチレンチューブを挿入したが、この行程がいちばん困難で、成功率は、約50%であった。リンパ管に挿入したポリエチレンチューブの反対側を咽頭部で体外に出し絹糸で固定した。この後、左冠動脈廻旋枝の起始部を剥離し、電磁血流計プローブと、冠動脈結紮用オクルーター

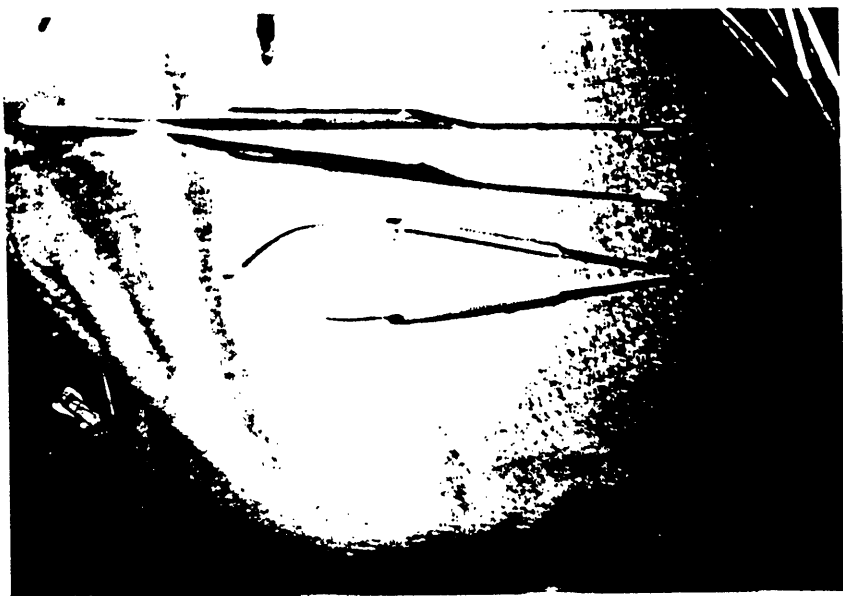


図 9 心臓リンパ管にカニューレを挿入した時に用いたピンセットと鉗

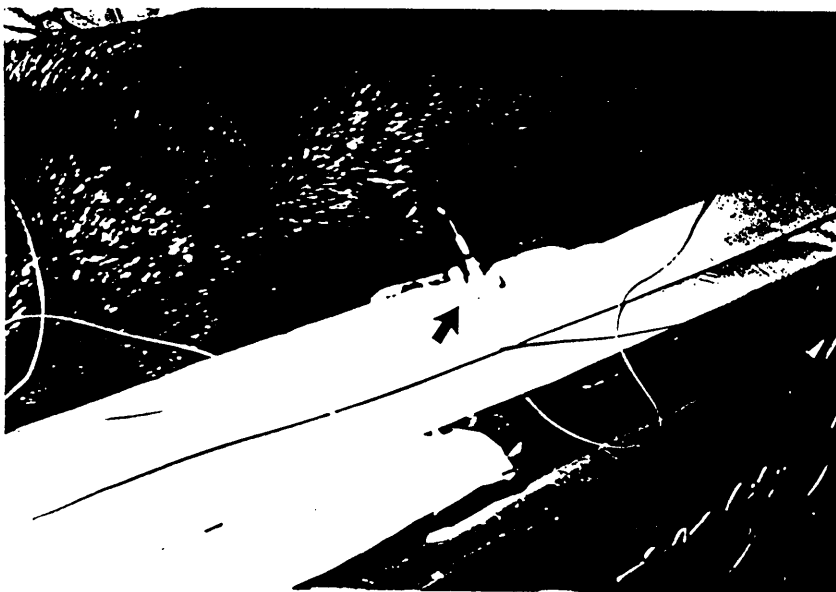


図 10 冠動脈結紮用オクルーダーの体外に出た部分

を装着し、それぞれの反対側を背部で体外に出した。図10に冠動脈結紮用オクルーダーの生理的食塩水注入部が体外に出ているところを示してある。

b. 心臓リンパ液の二次元電気泳動

心臓リンパ管にカニューレを挿入して約2時間後に採取した心臓リンパ液の二次元電気泳動のゲルを coomassie B.B. 染色したときの結果を図11と図12に示す。図11では、一次目の等電点電気泳動に溶解液で処理した心臓リンパ液サンプルを40 μ g proteinアプライし、図12では、15 μ g proteinアプライした。図からも明らかなように蛋白量に比例して各スポットの大きさが異なっていた。ただし、図11の左上部にアルブミンの大きなスポットが見られるので、余り大量のサンプル（少なくとも40 μ g protein以上）は等電点電気泳動のゲル中に入って行かないことがわかった。したがって、以後の等電点電気泳動にアプライするサンプルの蛋白量は多くても20 μ g protein以下とした。

心臓リンパ管にカニューレを挿入した後2日間飼育してから動物が覚醒している条件下で、採取した心臓リンパ液の二次元電気泳動パターンを図13と図14に示す。図13には冠動脈結紮前に採取した心臓リンパ液の、図14には冠動脈を結紮してから30分後に採取した心臓リンパ液の電気泳動パターンを示す。冠動脈結紮30分後に採取した心臓リンパ液の二次元電気泳動パターンでは、全体に細かいスポットが数多く現れ、また図14中に矢印で示すクレアチンキナーゼと思



図 1 1 心臓リンパ管に挿管した2時間後に得られたリンパ液の
二次元電気泳動パターン
蛋白量として $40\mu\text{g protein}$ のサンプルが一次元目の等
電点電気泳動にかけられた。



図 1 2 心臓リンパ管に挿管した2時間後に得られたリンパ液の
二次元電気泳動パターン
蛋白量として $15\mu\text{g protein}$ のサンプルが一次元目の等
電点電気泳動にかけられた。



図 13 心臓リンパ液の二次元電気泳動パターン

心臓リンパ管にポリエチレンカニューレを挿入する手術終了後2日目、冠動脈を結紮する直前にサンプルを採取した。蛋白量として $20\mu\text{g protein}$ のサンプルが一次元目の等電点電気泳動にかけられた。

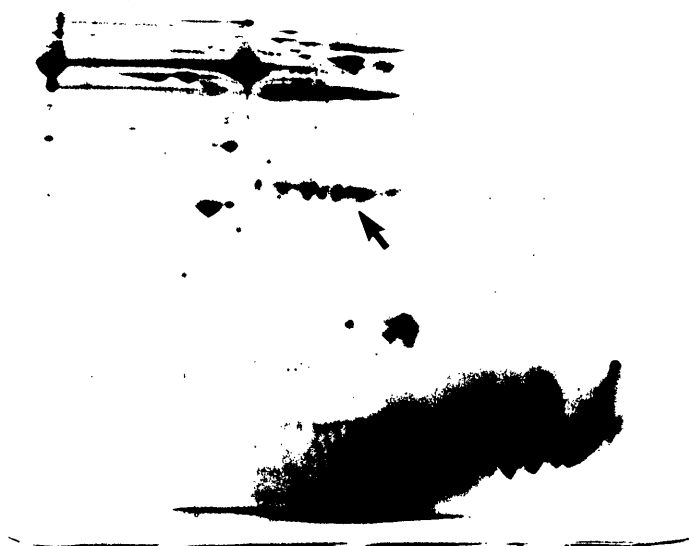


図 14 心臓リンパ液の二次元電気泳動パターン

心臓リンパ管にポリエチレンカニューレを挿入する手術
終了後2日目、冠動脈を結紮して30分後にサンプルを採取
した。蛋白量として $20\mu\text{g protein}$ のサンプルが一次元
目の等電点電気泳動にかけられた。

われる部分のスポットが強く出現する傾向が認められた。

Coomassie B.B. で染色した場合、二次元電気泳動パターン上の小さいスポットがはっきりしないので、次に染色性能がより鋭敏な銀染色法を用いて実験を行った。はじめに、染色性能を比較するために犬の血漿をサンプルとして、血漿中のタンパク質を二次元電気泳動で展開した。結果を図15と図16に示す。図15は血漿サンプルの二次元電気泳動ゲルをCoomassie B.B.で染色した場合、図16は同一のサンプル、同量の二次元電気泳動ゲルを銀染色法で染めた場合を示してある。図からも明らかなように、銀染色では無数のスポットが検出されるのに対し、Coomassie B.B. で染色した場合はに検出されるスポット数は非常に少ない。

冠動脈を結紮する直前に得られた心臓リンパ液の二次元電気泳動の銀染色されたパターンを図17に、冠動脈結紮30分後に採取された心臓リンパ液の二次元電気泳動の銀染色パターンを図18に示してある。銀染色の場合は感度が増すので、一次元目の等電点電気泳動にアプライするサンプルの蛋白量は $5\mu\text{g protein}$ に減らしてある。図18に示すように、冠動脈結紮30分後の心臓リンパ液の二次元電気泳動パターンには、クレアチンキナーゼと思われるスポットが強く、しかも広がりを持って検出された。また、図18中に矢印で示すように、図17では認められなかったようなスポットがいくつか見いだされた。

冠動脈結紮30分という時間は、心筋の一部では不可逆性の変化が起こるような時間なので、心臓リンパだけでなく、全身のリンパ液

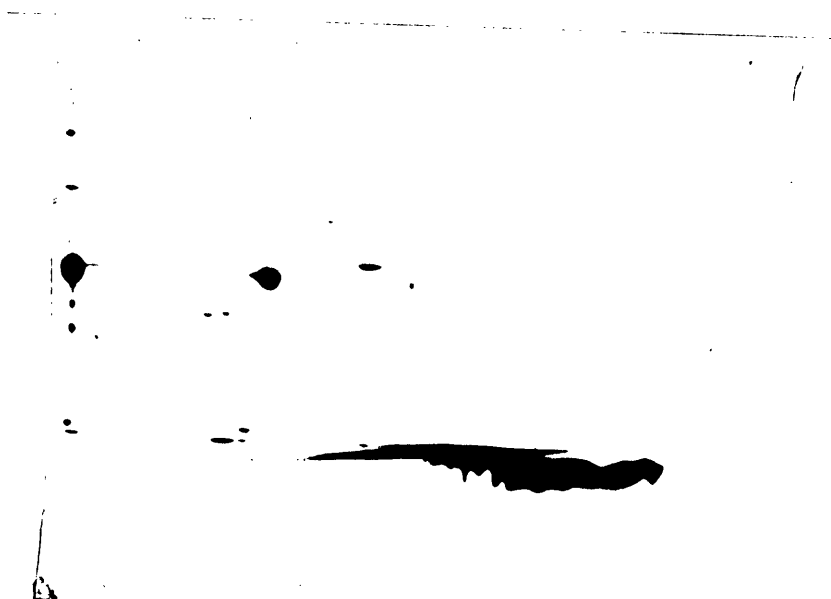


図 15 Coomassie B.B.で染色した血漿蛋白質の二次元電気泳動
パターン

蛋白質として $10\mu\text{g}$ proteinの血漿サンプルを一次元目の
等電点電気泳動にかけた。

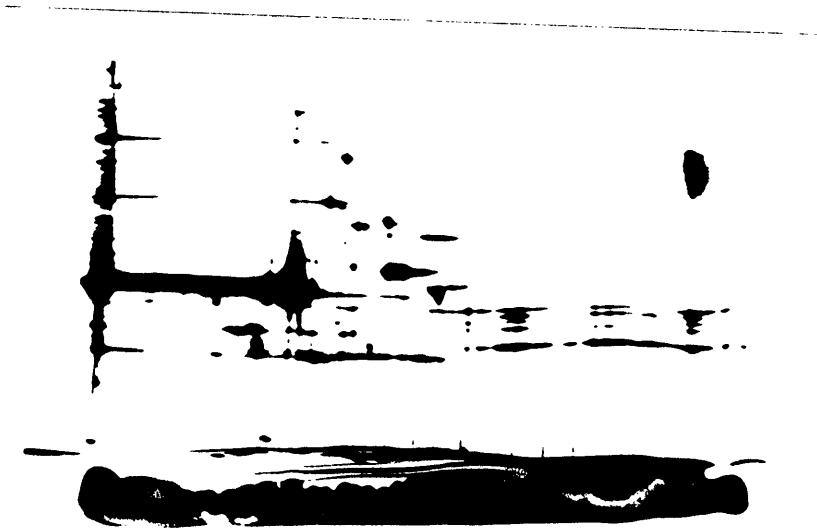


図 16 銀染色した血漿蛋白質の二次元電気泳動パターン
蛋白質として $10\mu\text{g}$ proteinの血漿サンプルを一次元目の
等電点電気泳動にかけた。



図 17 銀染色による心臓リンパ液の二次元電気泳動パターン
冠動脈結紮直前に採取した心臓リンパ液 $5\mu\text{g protein}$
を一次元目の等電点電気泳動にアプライした。



図 18 銀染色による心臓リンパ液の二次元電気泳動パターン
冠動脈結紮30分後に採取した心臓リンパ液サンプル
5 μ g proteinを一次元目の等電点電気泳動にアプライし
た。冠動脈結紮前には認められなかったスポット（矢印）
が散見される。



図 19 銀染色による鼠径部リンパ液の二次元電気泳動パターン
冠動脈結紮直前に鼠径部リンパ管から採取したリンパ液
サンプル 5 μ g proteinを一次元目の等電点電気泳動に
アプライした。

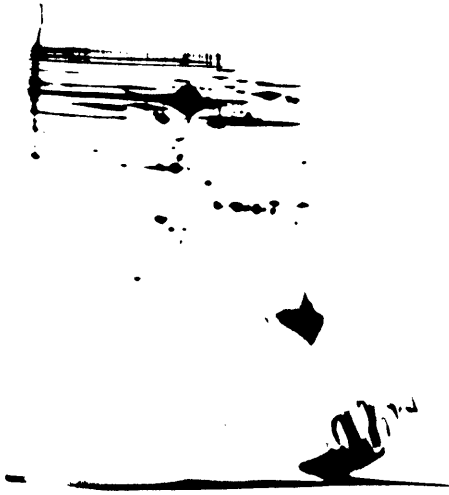


図 20 銀染色による鼠径部リンパ液の二次元電気泳動パターン
冠動脈結紮30分後に鼠径部リンパ管から採取したリンパ
液サンプル 5 μ g proteinを一次元目の等電点電気泳動
にアプライした。

中でも何か変化が観察されるのではないかと考え、鼠径部リンパ節よりリンパ液を採取し、二次元電気泳動で展開し、銀染色を施した。結果を図19と図20に示す。冠動脈結紮直前に鼠径部リンパ管から採取したリンパ液の二次元電気泳動パターンを図19に、冠動脈結紮30分後に採取したサンプルのパターンを図20に示してある。心臓リンパ液の二次元電気泳動パターンと比較して、鼠径部リンパ液のパターン中のスポットの数は少なかった。また、クレアチンキナーゼと思われるスポットもSDSゲル上で上下の広がりも観察されず分子量的には単一と思われた。冠動脈を結紮すると、クレアチンキナーゼと思われる部分のスポットが強く現れ、スポット数も増えていた。また、冠動脈結紮前には検出されなかった小さなスポットもいくつか検出されるようになった。したがって、心臓リンパ液で観察されたと同様の変化が鼠径部リンパ液でも観察されることになった。

考 察

本研究ではまず、冠動脈結紮による虚血心筋のエネルギー状態が調べられた。冠動脈結紮初期から組織ATP、クレアチンリン酸含量が低下し、エネルギー・チャージ・ポテンシャルが低下した（図5,7,8）。エネルギー・チャージ・ポテンシャルは、アデニンヌクレオチドの中に細胞がエネルギーとして使用できる高エネルギーリン酸がどのくらい存在するかを示す指標であり、この値が低くなるということは、その細胞のエネルギー状態が悪化していることを示す。虚血が30分も続くと、その状態がさらに悪くなっていた。虚血30分後では心筋ADP含量が虚血3分後よりも低下していた（図5）が、これは、図6で全アデニンヌクレオチドが減少していることからわかるように、ATPの分解産物がどんどん細胞外に流出していることを反映していると考えられる。虚血が長く続くと、心筋組織の収縮機能が低下するだけでなく、細胞構造にも破綻がくる。心筋細胞中のリソゾーム顆粒が破裂して、中に含まれる種々の蛋白質分解酵素が細胞質中に放出され、細胞の機能蛋白質や構造蛋白質を破壊する（Ichihara et al., 1987）。分解されたり、切断されたりした蛋白質は、心臓リンパ液中に排泄されることが知られている（Michael et al., 1979）。

本研究では、虚血によるエネルギー状態がかなり悪化している冠動脈結紮30分後の心臓リンパ液を二次元電気泳動法を使用して調べた。結紮30分後の心臓リンパ液の二次元電気泳動パターンでは、結紮前には認められなかった小さな蛋白質のスポットがたくさん見ら

れ、特に銀染色したときは、その傾向が強く現れた（図18）。また、クレアチンキナーゼと思われるスポットは心臓リンパ液では、虚血前でもSDSゲルの上下に多少広がっており、分子量の異なるいくつかの断片になったものが、心臓リンパ液中に出ていることが示唆された（図17）。冠動脈結紮30分後ではその傾向がさらに強くなっていた。これらの結果は、もともと心臓リンパ液中には、心筋細胞で処理された蛋白質が排出されているが、虚血になると切断される蛋白質の量も増え、断片の種類も増えてくるものと思われる。驚いたことに、心臓リンパ液中のみならず、鼠径部のリンパから採取したリンパ液中にも冠動脈結紮によると思われる蛋白質断片が検出され、クレアチンキナーゼの分解も認められた。特に、虚血前のクレアチンキナーゼは等電点電気泳動で分別されるいくつかのアイソマーは認められたが、分子量的には、ほぼ均一であった（図19）。しかし、虚血30分するとSDSパターンがブロードになり、多少分解したクレアチンキナーゼが鼠径部リンパにも認められることになった。虚血前に採取した鼠径部リンパ液の二次元電気泳動パターンと比較すると、心臓リンパ液では、虚血前でも分解したクレアチンキナーゼが認められることがよくわかる（図17、図19）。今回、心臓リンパのみならず、鼠径部リンパでも認められた蛋白質断片が何であるか、クレアチンキナーゼを除いては弁別する手段がなく、今後の問題として残った。また、クレアチンキナーゼにしてもどのような崩壊の仕方をしているのかにも非常に興味がある。二次元電気泳動によって、蛋白質量が定量されることもわかったので、崩壊蛋白

質の量を測定することによって、虚血の程度を推測することができるかもしれないという期待ももたれる。これらの虚血による心筋細胞内機能蛋白質や構造蛋白質を抑制する薬物の開発についてはさらに検討を要する。カルシウム拮抗薬であるジルチアゼム (Ichihara et al., 1987)、蛋白質分解酵素阻害薬であるNCO-700 (Ichihara et al., 1990) が虚血による心筋細胞内リソゾーム顆粒の破裂を抑制することを報告しているので、これらの薬物が虚血による心筋蛋白質の崩壊を抑える可能性は十分に考えられる。

引用文献

O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** 250: 4007-4021, 1975.

Ichihara, K., Haneda, T., Onodera, S. and Abiko, Y.: Inhibition of ischemia-induced subcellular redistribution of lysosomal enzymes in the perfused rat heart by the calcium entry blocker, diltiazem. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 242: 1109-1113, 1987.

Michael, L.H., Lewis, R.M., Brandon, T.A. and Entman, M.L.: Cardiac lymph flow in conscious dogs. **Am. J. Physiol.** 237: H311-H317, 1979.

Ichihara, K., Hayase, N., Chiba, K., Parvez, H. and Abiko, Y.: Effects of NCO-700, an inhibitor of protease, on lysosomal rupture in the ischemic myocardium. **J. Pharmac. Sci.** in press, 1990.