

薬物による虚血心筋保護のメカニズムに関する研究

(課題番号 01480135)

平成2年度科学研究費補助金 (一般研究B)

研究成果報告書

平成3年7月

研究代表者

安孫子 保

(旭川医科大学 副学長)

はしがき

心筋は休みなく収縮、弛緩を繰り返している臓器であり、このため心筋は莫大なエネルギーを消費している。このエネルギーは冠動脈血に含まれるグルコースなどの熱源と酸素によって心筋のミトコンドリア内において効率よく生産されている。従って、冠動脈に閉塞が起ると心筋はエネルギーを生産出来なくなり、心筋は機能的にも器質的にも障害を受ける。このような障害から心筋を保護するのが、抗虚血薬である。抗虚血薬としては、 β -遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬や硝酸薬があるが、それらの物質の抗虚血作用のメカニズムは必ずしも解明されているとは言えない。

本研究では、抗虚血薬の作用メカニズムを心筋細胞膜の面から追及しようとするものである。まず、心筋細胞膜の酸素透過性について検討した。酸素透過性の指標として、心筋のミオグロビンの酸素飽和度を利用した。次にマグネシウムの虚血心筋保護作用についての研究を行った。3番目にジルチアゼムの虚血心筋保護作用のメカニズムを心筋細胞膜のリン脂質の分解と関連づけて検討した。このため、虚血による遊離脂肪酸の心筋内蓄積を測定し、それに対する薬物の作用を調べた。4番目に、心筋細胞膜のカルシウムチャネルに対する虚血（ATPの低下）の影響について検討した。

このような研究は単に虚血心筋保護のメカニズムを解明するだけでなく、虚血性心疾患の治療方針をたてるに当たって、重要な情報を提供するものであり、より有効な虚血心筋保護薬を見つけるための基礎データを与えるものである。さらに、臓器移植に当たってどのようにすれば臓器を長く保存できるのかという問題を解決するための基礎資料になる筈である。

研究組織

研究代表者 安孫子 保 （旭川医科大学副学長）
 橋爪 裕子（旭川医科大学助手）
 矢沢 和人（旭川医科大学助手）

研究経費

平成元年度	4, 7 0 0 千円
平成2年度	2, 1 0 0 千円
計	6, 8 0 0 千円

研究発表

（1）学会誌等

Nakamura, K., Ichihara, K. and Abiko, Y.: Effect of propranolol on accumulation of NEFA in the ischemic perfused rat heart. Eur. J. Pharmacol. 160: 61-69 (1989).

Hara, A., Matsumura, H. and Abiko, Y.: Effect of nisoldipine on the oxymyoglobin level of myocardial cells in hypoxic, perfused rat heart. Arch. int. Pharmacodyn. 298: 78-89 (1989).

- Nakamura, K., Ichihara, K. and Abiko, Y.: Effect of lidocaine on the accumulation of non-esterified fatty acids in the ischemic perfused rat heart. Eur. J. Pharmacol. 169: 259-267 (1989).
- Nasa, Y., Ichihara, K. and Abiko, Y.: Myocardial non-esterified fatty acids during normoxia and ischemia in Langendorff and working rat hearts. Japan. J. Pharmacol. 53: 129-133 (1990).
- Matsumura, H., Hara, A. and Abiko, Y.: Effect of diltiazem on the oxymyoglobin level of myocardial cells in the isolated, perfused rat heart during hypoxia. Cardiovasc. Drugs and Therapy 4: 719-722 (1990).
- Hara, A., Matsumura, H. and Abiko, Y.: Beneficial effect of magnesium on the isolated perfused rat heart during reperfusion after ischaemia: comparison between pre-ischaemic and post-ischaemic administration of magnesium. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 342: 100-106 (1990).
- Nasa, Y., Ichihara, K. and Abiko, Y.: Both d-cis- and l-cis-diltiazem have anti-ischemic action in the isolated, perfused working rat heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 255: 680-689 (1990).
- Hara, Y., Nakamura, K., Nasa, Y., Ichihara, K. and Abiko, Y.: Changes in myocardial nonesterified fatty acids during ischemia and reperfusion in isolated, perfused, working rat hearts. Heart Vessels 6: 21-31 (1990).
- Yazawa, Y., Kameyama, M. and Kameyama, A.: Tissue distribution of the cytoplasmic protein that protects L-type calcium channel from run-down. Jap. J. Physiol. 39: S63 (1990).
- Yazawa, K., Kaibara, M., Ohara, M. and Kameyama, M.: An improved method for isolating cardiac myocyte useful for patch-clamp studies. Jap. J. Physiol. 40: 157-163 (1990).
- Yazawa, Li J.-M., Yasai, K., Abiko, Y., Kameyama, A. and Kameyama, M.: ATP directly regulates the cardiac L-type calcium channel. Jap. J. Physiol. 40: S262 (1990).

(2) 口頭発表等

- 市原 和夫、安孫子 保：虚血による心筋障害とその対策 第62回日本薬理学会総会（平成元年3月、京都）
- 中村 一博、安孫子 保：ラット虚血灌流心筋標本における遊離脂肪酸の蓄積におよぼすリドカインの効果 第62回日本薬理学会総会（平成元年3月、京都）
- 奈佐 吉久、安孫子 保：虚血によるラット心筋遊離脂肪酸におよぼすdiltiazemの効果 第40回日本薬理学会北部会（平成元年9月、札幌）
- 中村 一博、安孫子 保：ラット虚血心筋におよぼすpropranololの効果は膜安定化作用によるところが大きい 第40回日本薬理学会北部会（平成元年9月、札幌）
- 三浦 格、安孫子 保：虚血によるイヌ心筋遊離脂肪酸蓄積におよぼすbevantololの抑制効果 第40回日本薬理学会北部会（平成元年9月、札幌）
- 奈佐 吉久、安孫子 保：ラット摘出灌流心臓におけるl-cis-Diltiazem(l-D)の虚血による遊離脂肪酸蓄積におよぼす作用 第63回日本薬理学会総会（平成2年3月、東京）
- 奈佐 吉久、市原 和夫、安孫子 保：虚血・再灌流心筋における遊離脂肪酸蓄積と虚血心筋保護効果の関係 第18回薬物活性シンポジウム（平成2年9月、旭川）
- 奈佐 吉久、A.N.Ehsanul Hoque、安孫子 保：Amilorideの虚血・再灌流心筋における遊離脂肪酸の代謝変動におよぼす作用－再灌流障害とNa-H、Na-Ca 交換機構 第41回日本薬理学会北部会（平成2年10月、福島）
- 三浦 格、安孫子 保：虚血によるイヌ心筋遊離脂肪酸蓄積におよぼすAtenololの抑制効果 第41回日本薬理学会北部会（平成2年10月、福島）

矢沢 和人、李 金鳴、安井 健二、安孫子 保、亀山 亞砂子、
亀山正樹：A T PはC aチャンネルを直接活性化させる 第41
回日本薬理学会北部会（平成2年10月、福島）
安孫子 保：虚血性心疾患治療薬 第64回日本薬理学会総会（平
成3年3月、神戸）
安孫子 保：抗狭心症薬の薬理 第13回日本麻酔・薬理学会（平
成3年6月、東京）

第1部 心筋のミオグロビン酸素飽和度に及ぼすジルチアゼムの作用

1 目的

心筋細胞を低酸素状態にすると、その細胞膜の機能が変化する。この機能変化の中には化学的変化の外に物理的変化もある。物理的変化の中でも膜の酸素透過性が低酸素によつてどうなるのか、また、低酸素によって変化した細胞膜の透過性を抗狭心症薬がどのような影響を与えるのかについて検討するのがこの実験の目的である。

2 実験方法

実験にはスプラッグ・ドーリーラットを用いた。ペントバルビタールで麻酔後、心臓を取出し、ランゲンドルフ式に定圧(80mmHg)灌流を行った。灌流液としては、95%酸素と5%二酸化炭素で飽和したクレブスヘンセライト液(高酸素液)を用いた。次に、定流量ポンプを用いて、定流量(9 ml/min)灌流を行った。さらに、電気刺激装置を用いて300/minで心臓をペーシングした。圧トランスジューサーを用いて、灌流圧、左心室圧を測定し、同時に心筋表面の細胞内にあるミオグロビンの酸素飽和度を光学的に連続測定した。ミオグロビンの酸素飽和度を測定する測光器は、ユニオン技研製の瞬間マルチ測光検出器で、波長は580nmと620nmを用いた。

次に、低酸素灌流液(30%酸素と5%二酸化炭素と65%窒素の混合ガスでクレブスヘンセライト液を飽和した液)で心臓を灌流した。心臓の低酸素灌流中にジルチアゼムを灌流液中に投与した。最後に無酸素液(95%窒素と5%二酸化炭素の混合ガスでクレブスヘンセライト液を飽和した液)で灌流し、ミオグロビンの酸素飽和度0のレベルを決定した。

3 実験結果

(1) 低酸素心臓実験 (図1) : 高酸素灌流下では、左室圧と灌流圧はそれぞれ58.2ならびに49.9mmHgであった。ミオグロビンの酸素飽和度は100%であった。低酸素灌流をすると、左室圧、灌流圧、ミオグロビンの酸素飽和度はともに急激に減少した。減少したそれぞれのパラメーターの値は10分間の低酸素灌流中はほぼ一定であった。低酸素灌流から高酸素灌流に戻すと、これらのパラメーターは急速に元のレベルに戻った。ジルチアゼムは低酸素灌流5分後から低酸素灌流が終了するまで灌流液中に投与した。0.72 μ Mのジルチアゼムは低酸素心筋のミオグロビンの酸素飽和度に対して何等の影響も与えなかったが、2.41および4.82 μ Mのジルチアゼムは用量依存的に低酸素によって低下したミオグロビン酸素飽和度を上昇させた。さらに2.41および4.82 μ Mのジルチアゼムは、低酸素によって低下した左室圧をより低下させたが、低酸素によって低下した灌流圧に対しては、ほとんど作用を現わさなかった。以上の事実は、ジルチアゼムが低酸素状態の心筋の左室圧を低下させるとともに、心筋細胞内の酸素濃度を高めるように作用することを示すものであり、ジルチアゼムが低酸素障害に対して良い影響を及ぼしていることを示唆する。

(2) 高酸素心臓実験 (図2) : この実験はジルチアゼムが高酸素心臓 (ふつうは正常酸素心臓と考えている) にどのような作用を及ぼすかを調べたものである。つまり、ジルチアゼムがミオグロビンを正常以上に酸素化するのか否か、また、心臓の機械的仕事に対してどのような作用を与えるのかを調べた。使用したジルチアゼムの濃度は低酸素心臓実験の場合と同じである。図2はジルチアゼムが用量依存的に左心室圧と灌流圧を低下させたが、ミオグロビンの酸素飽和度には影響を及ぼさないことを示している。

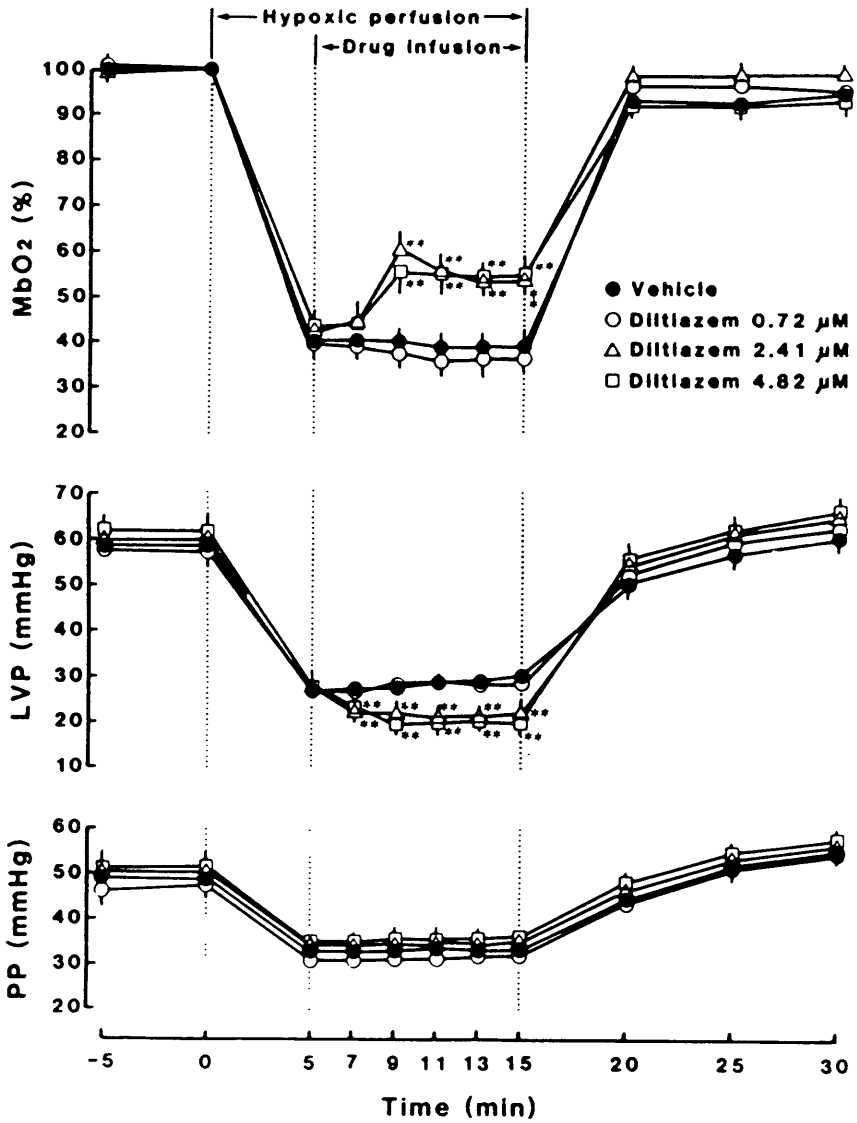


図1 低酸素心臓に対するジルチアゼムの影響。低酸素状態は低酸素液を灌流させることによって作った。ジルチアゼムは低酸素灌流開始5分後に灌流液中に注入した。MbO₂ = ミオグロビンの酸素飽和度
LVP = 左室圧 (左心室内圧) PP = 灌流圧

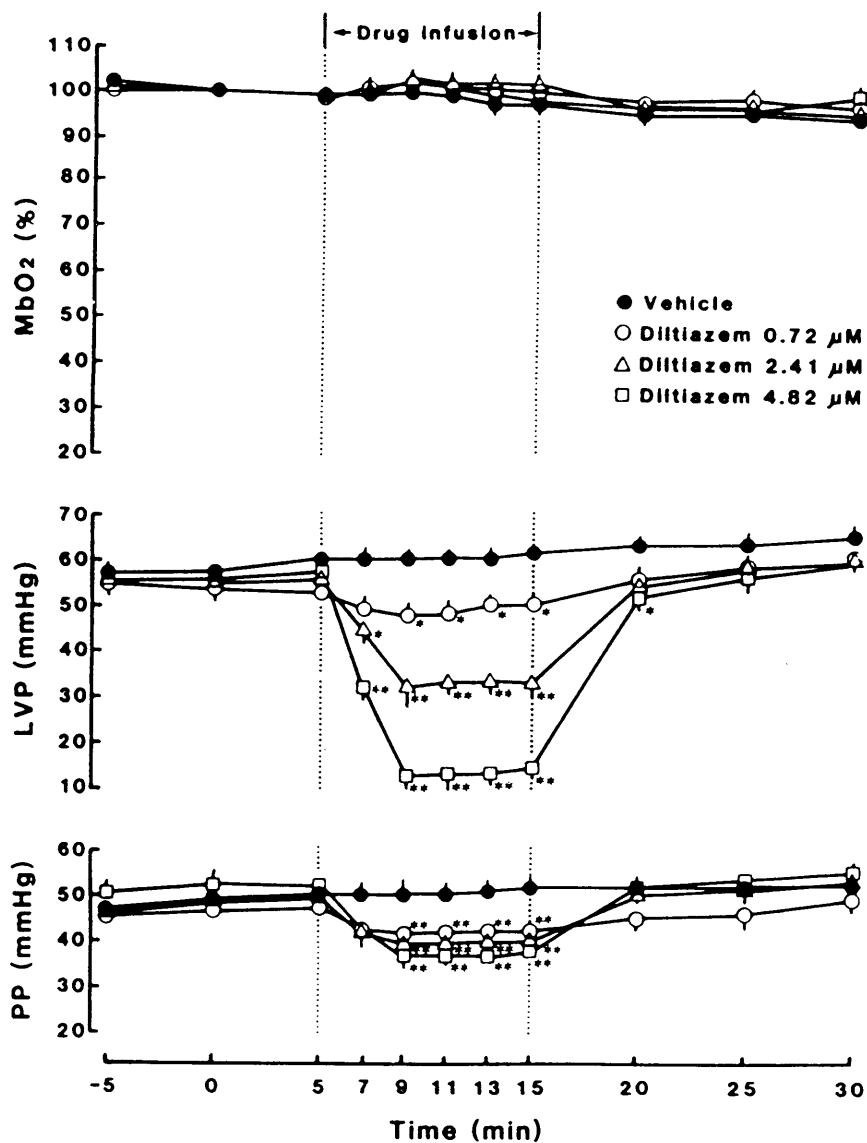


図2 高酸素（正常酸素）心臓に対するジルチアゼムの影響。シンボルは図1に同じ。ジルチアゼムのLVPおよびPP低下作用は低酸素心臓に対するよりも強い。

4 考察

低酸素にすると、心筋細胞内のミオグロビン酸素飽和度が低下し、ジルチアゼムは低酸素によって低下した心臓細胞内のミオグロビン酸素飽和度を用量依存的に上昇させることが、この実験から明らかとなった。ミオグロビンの酸素飽和度は、細胞内の酸素濃度の指標になることは、多くの研究者によって認められている。従って、ジルチアゼムは低酸素によって低下した心筋細胞内の酸素濃度を上昇させたということになる。図2からわかるように、ジルチアゼムはミオグロビンの酸素飽和度に直接影響を与える作用はない。故に、上記の結論は正しいものと思われる。

では、ジルチアゼムが低酸素心筋細胞の酸素濃度を上昇させるメカニズムは何であろうか。細胞内の酸素濃度を上昇させるということの原因は2つ考えられる。その1は細胞に対する酸素の供給が上昇したことであり、その2は細胞の酸素消費が減少したことである。あるいは、その両方があると考えねばならない。まず、第1の可能性について考えてみる。この実験モデルでは、灌流量はポンプによって一定に保たれている。また、灌流液中の酸素濃度は高酸素実験中でも低酸素実験中でも、それぞれ一定に保たれている。従って、低酸素灌流中に灌流液から心筋全体への酸素供給は例えどんな薬物を投与しようと、変化する筈がない。心筋全体への酸素供給が一定であったとしても、もし、ジルチアゼムが低酸素心筋細胞膜の酸素透過性を上昇させるのだとすれば、この実験結果はよく説明できる。しかし、ジルチアゼムが低酸素心筋細胞膜の酸素透過性を上昇するという報告は今までにはなされていない。次に、第2の可能性を考えてみる。ジルチアゼムによって心筋細胞の酸素消費量が減少したために、細胞内の酸素濃度が上昇のではないかという考えである。この考えはかなりの妥当性があると考えられる。というのは、ジルチアゼムは左心室圧を低下させたからである。左心室圧が低下すれば、心筋がなすべき仕事量は減少する。この摘出心筋モデルでは、ペーシングによって心拍数は一定に保たれているので、左室圧の減少はそのまま心筋細胞の酸素消費量の低

下となる。図3は低酸素心臓における左室圧とミオグロビンの酸素飽和度との相関をとったグラフである。このグラフから分るように、左室圧が下がれば、細胞内のミオグロビンの酸素飽和度が上がる。このことは、ジルチアゼムの左室圧減少作用が、細胞内の酸素上昇につながっていることを示唆するものである。ジルチアゼムが左室圧を低下させたのは、そのカルシウムチャネル遮断作用によるものであろう。

ジルチアゼムは高酸素心臓では灌流圧を下げた（つまり冠血管を拡張させた）のに、低酸素心臓では灌流圧を下げなかったのは何故かという疑問もある。これは、低酸素心臓では冠血管は既に拡張している（低酸素にすると灌流圧が減少することからわかる）ので、ジルチアゼムを投与しても、これ以上は拡張しなかったためであると説明できる。低酸素心臓でのジルチアゼムの左室圧低下作用は、高酸素心臓での左室圧低下作用よりも軽度であったという事実も、低酸素自身によって既に左室圧が低下していたためであると説明できる。

以上のことをまとめてみると、ジルチアゼムが低酸素心臓の細胞内酸素濃度を上昇したのは、ジルチアゼムが心筋に直接作用して心筋の機械的活動を低下させ、その結果心筋の酸素消費量を減少させたからであると結論される。もし、ジルチアゼムが心臓の機械的工作に対して何らの影響をも現さなければ、心筋細胞膜の酸素透過性について考察ができた筈であるが、ジルチアゼムが低酸素心臓の機械的工作を低下させたために、初期の目的を達成出来なかった。しかし、このことによってジルチアゼムの心筋細胞膜に対する直接作用が否定されたわけではない。将来、他の方法を用いてジルチアゼムの心筋細胞膜に対する作用、とくに虚血または低酸素下における心筋細胞膜に対してどのような作用を発揮するのかについての研究をすすめる予定にしている。

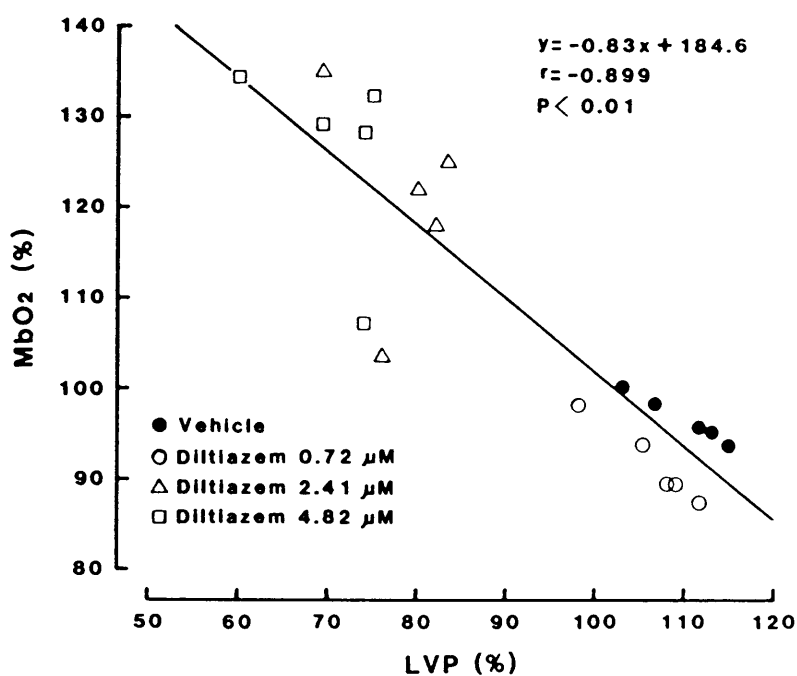


図3 低酸素心臓におけるミオグロビン酸素飽和度 (MbO₂) と左室圧 (LVP) との関係。ミオグロビンの酸素飽和度と左室圧の数字は、薬物投与直前の値を100としている。両者の間に直線関係のあることが分る。

5 要約

ラットの心筋を定流量でランゲンドルフ式に灌流し、灌流液中の酸素濃度を低下させ、低酸素灌流モデル心臓を作った。低酸素によってミオグロビンの酸素飽和度、左室圧、灌流圧がそれぞれ低下した。低酸素灌流開始5分後からジルチアゼムを0.72, 2.41, または4.82 μ M投与すると、用量依存的にミオグロビンの酸素飽和度は上昇し、左室圧は低下し、灌流圧に大きな変化はなかった。この実験結果から、ジルチアゼムは低酸素心筋細胞内の酸素濃度を上昇させることがわかった。この原因はジルチアゼムが心臓機能を抑制したためと考えられる。ジルチアゼムが低酸素心筋細胞膜の酸素透過性に対して何らかの影響をおよぼすのか否かについては、この実験結果からではわからなかった。

第2部 摘出灌流ラット心臓の虚血・再灌流障害に対するマグネシウムの保護効果

1 目的

虚血・再灌流障害の原因としてあげられているものの中で、一番重要なものの一つはカルシウムである。すなわち、虚血によって心筋細胞膜に何らかの障害がおこり、再灌流した時に細胞外液からカルシウムが細胞内に流れ込み（カルシウムオーバーロード）、このために細胞がより大きい障害を受け、時にはそれが非可逆的になるというのである。ところで、マグネシウムはカルシウムと拮抗関係にあり、細胞に対するカルシウムの作用がマグネシウムによって減弱されることがよく知られている。それでは、虚血・再灌流時にみられる細胞内カルシウムオーバーロードの影響も、マグネシウムによって軽減されるのか否かは興味ある問題である。この実験は体外から与えたマグネシウムが虚血・再灌流による心筋細胞の障害を軽減するのか否かを検討するために行われた。とくに、マグネシウム虚血の前に与えた場合と虚血の後に与えた場合の違いについて特別の考慮を計った。投与時期の違いはマグネシウムの作用機序を考える上で大切であるのは勿論であるが、臨床応用を考える上でも重要である。もし、マグネシウムが再灌流時にのみ効くのであれば、マグネシウムは虚血前に与えるよりも再灌流時に与えた方がより有効な筈である。

2 実験方法

実験には雄のスプラグ・ドーリー ラットを用いた。ペントバルビタールで麻酔後、心臓を取出し、ランゲンドルフ式に灌流した。灌流液としては95%酸素と5%二酸化炭素の混合ガスで飽和したクレープスヘンセライト液を用いた。正常マグネシウム灌流液としては、硫酸マグネシウムとして1.2 mM、そのほか浸透圧調整のためマニ

トール 18.7 mM を含む液とし、高マグネシウム灌流液としては、硫酸マグネシウムとして、5, 10 または 15 mM 含む液を用いた。高マグネシウム液のマニトール濃度は、正常マグネシウム灌流液の浸透圧に等しくなるようにそれぞれ調整した。

10 分間のランゲンドルフ灌流の後、定流量灌流 (10 ml/min) に切替えた。拍動数は約 250/min であったが、ペーシングをすることによって、300/min に統一した。

実験プロトコールは次の如くである。10 分間の灌流の後、灌流ポンプを停止させることによって心臓を虚血状態にし、ポンプを再開させることによって再灌流を行った。対照（虚血）群では、15 分間正常マグネシウム灌流液で灌流し、25 分間虚血とし、15 分間再灌流を行った。高マグネシウム（虚血前）群では、まず正常マグネシウム灌流液で 10 分間灌流の後、高マグネシウム液（15 mM）で 5 分間灌流し、次に 25 分間虚血にし、さらに 15 分間の再灌流を行った。高マグネシウム（虚血後）群では、正常マグネシウム灌流液で 15 分間灌流の後、25 分間虚血とし、再灌流初期の 5 分間だけ高マグネシウム液（5, 10 または 15 mM）で灌流し、次の 10 分間は正常マグネシウム灌流液で灌流した。高マグネシウム + 高カルシウム（虚血後）群でのプロトコールは、高マグネシウム（虚血後）群でのプロトコールと同じであったが、マグネシウムの濃度は 15 mM、カルシウムの濃度は 4.5 mM とした。実験終了時には、エネルギー代謝の代謝物を測定した。

心機能のパラメーターとして、収縮期圧（SP）、拡張終期圧（EDP）、脈圧（DP）、左室圧（LVP）とした。DP は SP から EDP を差引いた値である。実験終了後、心筋を冷凍固定し、アデノシン三リン酸（ATP）とクレアチンリン酸（CrP）の心筋内含量を酵素法によって測定した。

3 実験結果

(1) 高マグネシウムの虚血前または虚血後投与の再灌流時の心機能におよぼす作用：図4は高マグネシウムを虚血前または虚血後（再灌流時）に与えた時のヘモダイナミックスの変化を示す。高マグネシウム（15 mM、虚血前）投与によって、SPとDPは著しく減少し、EDPはすこし上昇した。虚血にすると、どの群でもSP、EDP、DPはともに0 kPaとなった。対照（虚血）群では、再灌流をしてもDPはほとんど上昇せずにEDPは上昇した。高マグネシウム（15 mM、虚血前）群でも、虚血・再灌流によってもヘモダイナミックスの変化は改善されず、対照（虚血）群での変化とほぼ同じであったが、高マグネシウム（15 mM）を再灌流時に与えると、再灌流によるEDPの上昇が抑制され、DPは上昇した。つまり、高マグネシウムを再灌流時に与えると効くが、虚血前に与えても効かないことがわかった。

高マグネシウムを再灌流時に投与すると効くことはわかったが、投与したマグネシウムの量と有効性との間の関係を検討したの、図5に示されている。このり図からわかるように、5 mMのマグネシウムはあまり有効ではなく、10 mMのマグネシウムはやや有効、15 mMのマグネシウムはたしかに有効であることがわかった。有効性の判定は再灌流時のEDPの上昇の抑制、ならびにDPの上昇で行った。従って、再灌流障害を抑制するには虚血後再灌流時に15 mMのマグネシウムを投与することが必要であることがわかった。

次に、高マグネシウムによる再灌流障害保護効果は、高カルシウムによって拮抗されるのか否を検討した。図6は高マグネシウム（虚血後）投与による再灌流障害は4.5 mMのカルシウムによって拮抗されることを示している。つまり、再灌流時に細胞内に流入するカルシウムイオンの作用にに対して、マグネシウムイオンが拮抗的に作用することを物語っている。このことは、図7からも明らかである。すなわち、15 mMマグネシウムのLVP低下作用は、4.5 mMのカルシウムによってほぼ完全に拮抗されたのである。

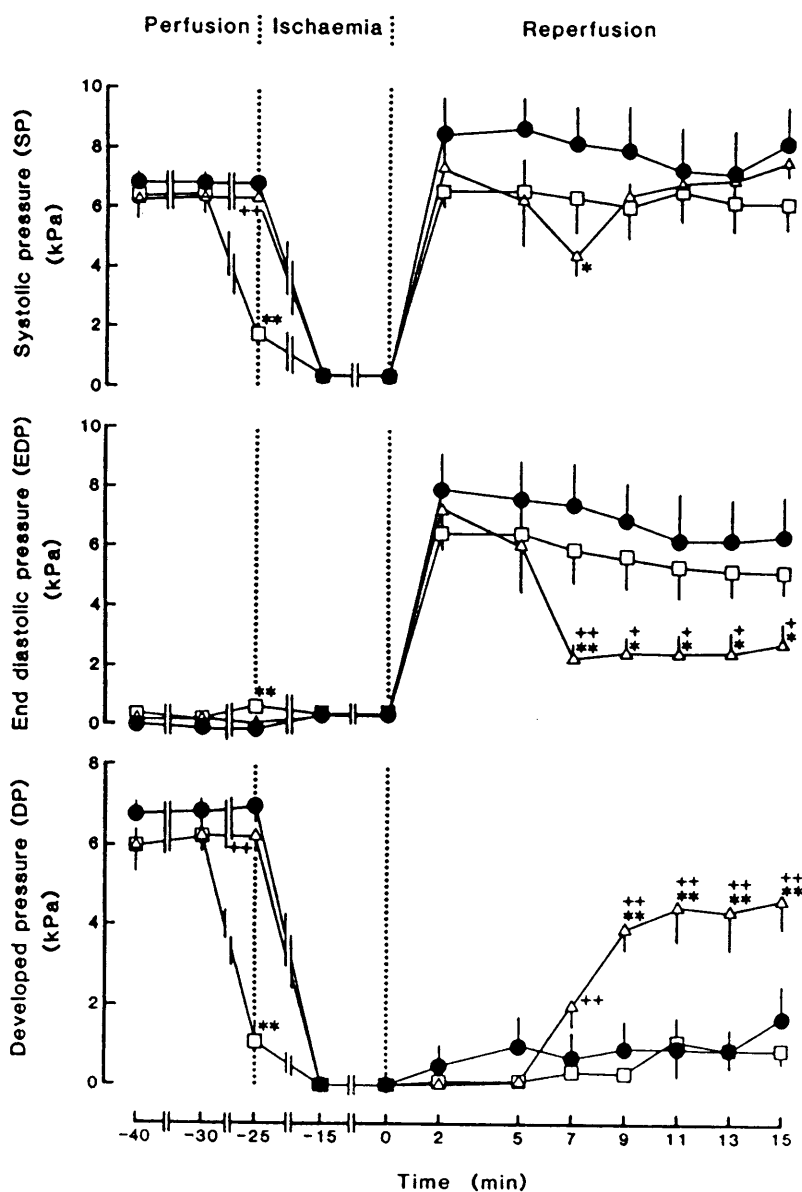


図4 高マグネシウムの虚血・再灌流心臓のヘモダイナミクスにおよぼす作用。黒丸は対照（虚血）群、白四角は高マグネシウム（虚血前）群、白三角は高マグネシウム（虚血後）群をあらわす。

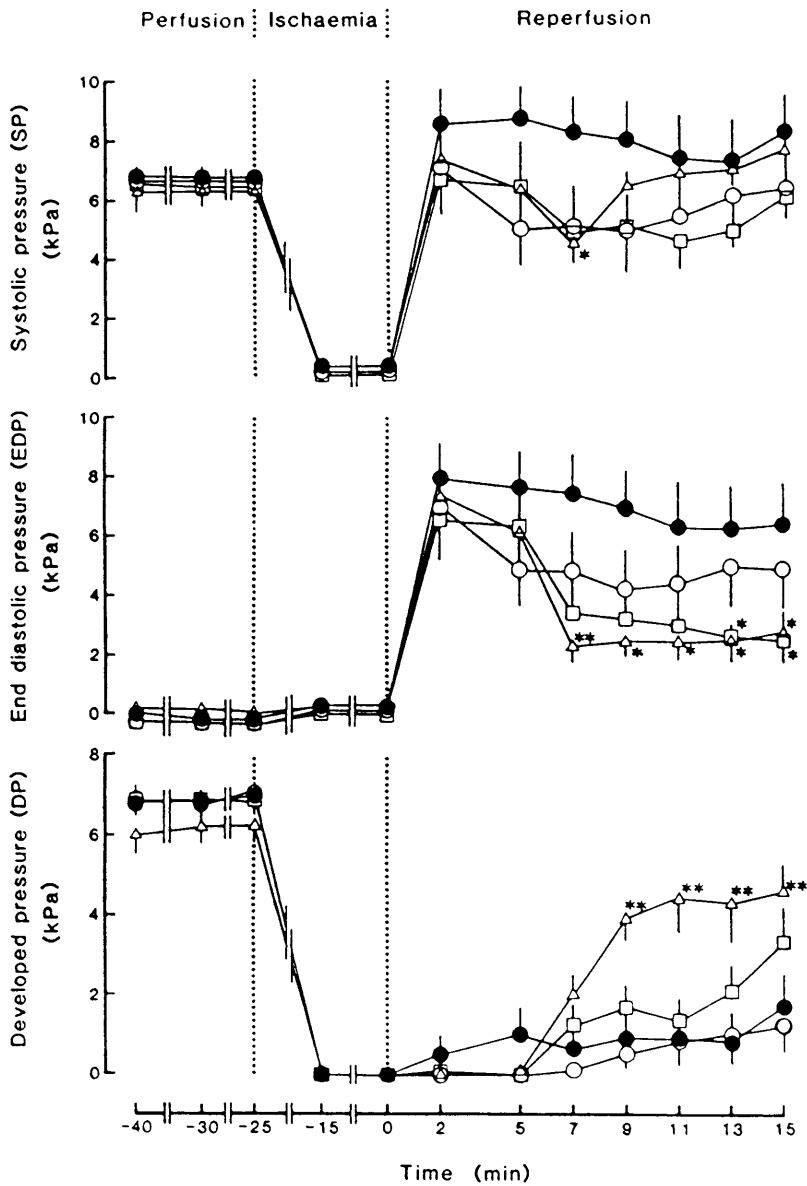


図5 マグネシウムの濃度を変えた場合の虚血・再灌流心臓のヘモダイナミクス。黒丸は対照（虚血）群、白丸はマグネシウム5 m M（虚血後）群、白四角はマグネシウム10 m M（虚血後）群、白三角はマグネシウム15 m M（虚血後）群をあらわす。

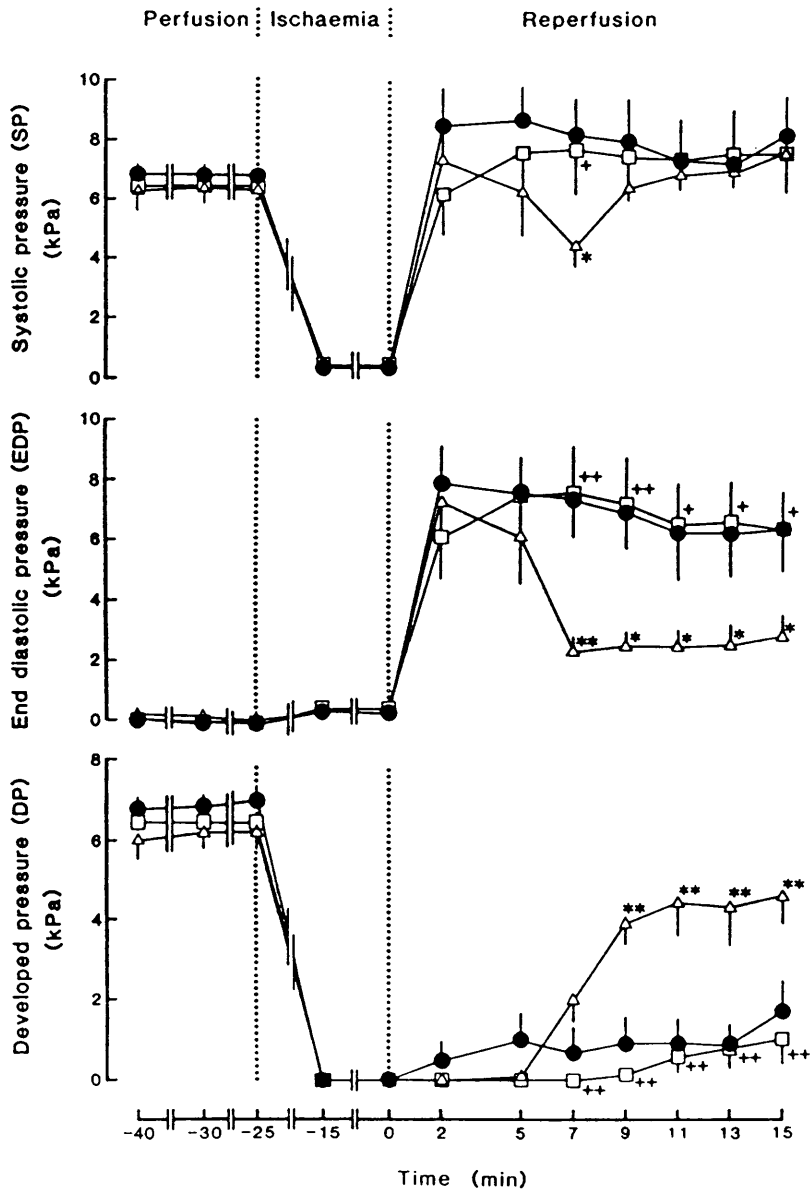


図6 高マグネシウム高カルシウムを加えた群とそうでない群との間における虚血・再灌流時のヘモダイナミクス。黒丸は対照（虚血）群、白四角は1.5 mMマグネシウム+4.5 mMカルシウム（虚血後）群、白三角は1.5 mMマグネシウム（虚血後）群。

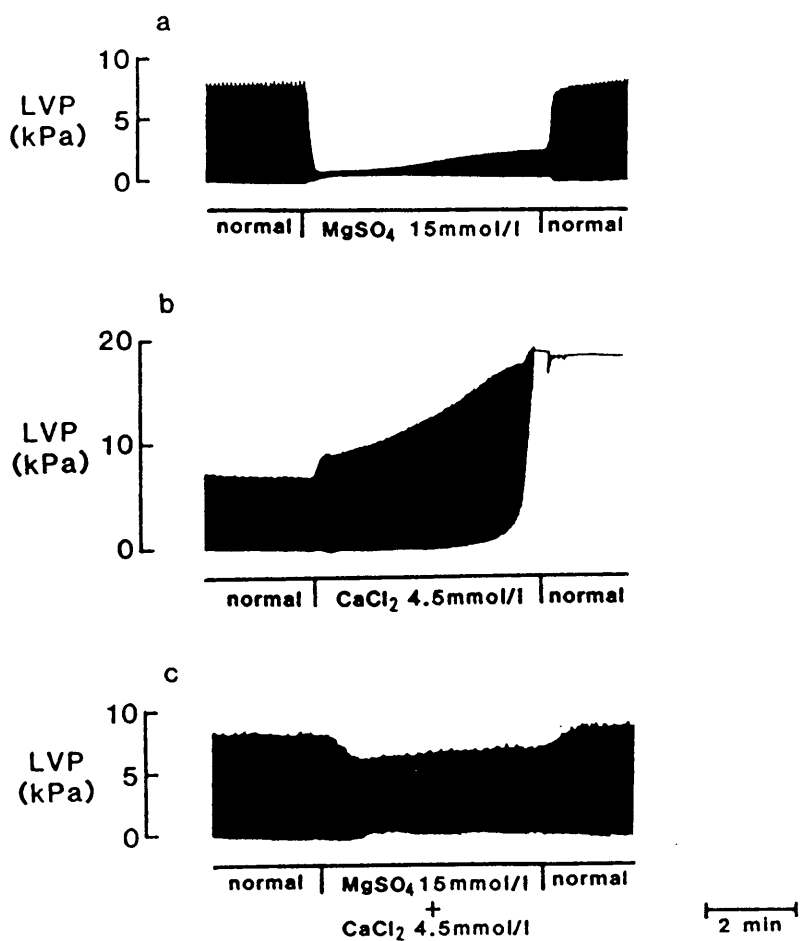


図7 非虚血心臓におけるマグネシウム、カルシウム、およびマグネシウム+カルシウム投与によるLVPの変化。15 mMのマグネシウムのLVP低下作用は4.5 mMのカルシウムによってほぼ完全に拮抗されている。

4 考察

この実験結果は、高マグネシウムを虚血後（再灌流時）に投与すると、虚血・再灌流による心筋の機械的機能ならびに代謝的機能の障害を減弱させることをはっきりと示している。

多くの薬物による心筋保護効果は、虚血前に投与しておく効果があるが、再灌流時に投与してもほとんど効果がないか非常に弱いのがふつうである。例えば、プラゾシン、ベラパミール、ニフェディピンなどの抗虚血・再灌流効果は、虚血前に投与しなければ発揮されることはない。この理由は、これらの薬物を虚血前に投与すると、心筋の機械的機能が低下するので、この状態で心筋を虚血にしても虚血による障害が少なくすむからである。すなわち、エネルギー・スペアリング効果である。

マグネシウムも心機能を低下させる作用があり、その意味ではエネルギー・スペアリング効果があっても良い筈であるが、この研究の実験結果は、マグネシウムによるエネルギー・スペアリングは虚血・再灌流障害に対する保護効果につながっていないことを示している。マグネシウムの虚血・再灌流障害保護効果は、マグネシウムを再灌流時に投与した場合にのみ発揮されるという事実は、マグネシウムが再灌流時のカルシウムオーバーロードを抑制するか、カルシウムの作用に拮抗することを物語っている。事実、マグネシウムの効果はカルシウムによって拮抗されることが本研究で示されたが、カルシウムオーバーロードの抑制かカルシウムの作用に直接拮抗したのかについては明らかではない。細胞内マグネシウムおよび細胞外マグネシウムの濃度が上昇すると、 $\text{Na}-\text{Ca}$ 交換の抑制がおこることによって、また細胞膜や筋小胞体におけるカルシウムポンプが活性化されることによって、細胞内のカルシウム濃度が低下するという論文がある。今回の実験でも、おそらくマグネシウムは細胞内カルシウム濃度を低下させることによって、虚血・再灌流心臓に対して良い効果を現したものと想像できる。

5 要約

ラットの心臓をランゲンドル式に定流量灌流ポンプを用いて灌流を行い、ポンプを止めることによって心臓を25分間虚血にし、15分間再灌流を行った。高濃度のマグネシウム（15 mM）を虚血前に投与しても、虚血・再灌流による拡張終期圧の上昇を減弱できなかったが、虚血後、つまり再灌流時に投与すると虚血・再灌流による拡張終期圧の上昇を減弱できた。このマグネシウムの虚血・再灌流障害保護作用は、マグネシウムのエネルギー・スベアリング作用によるのではない。おそらくは、マグネシウムが再灌流時におけるカルシウムオーバーロードを抑制したためか、または細胞内カルシウムの作用に拮抗したためか、あるいはその両方のためであろうと考えられる。再灌流時に投与して、虚血・再灌流障害を抑制できる薬物はほとんど知られていないので、虚血・再灌流障害におけるマグネシウムの価値は臨床医学の見地からみても大きい。

第3部 虚血・再灌流による心筋内遊離脂肪酸の上昇と ジルチアゼムの虚血・再灌流障害保護作用のメカニズム

1 目的

ジルチアゼムはカルシウムチャネルを遮断する薬物の一つで、虚血心筋保護をするということがわかっている。では、どんなメカニズムによって虚血心筋保護をするのであろうか。このメカニズムを解明できれば、虚血心筋保護の実態がわかり、これを手掛かりにして抗狭心症作用の強い新しい薬物を開発することができる筈である。このためにこの実験を計画した。虚血・再灌流障害の指標としては、心筋の遊離脂肪酸蓄積を利用した。遊離脂肪酸蓄積の実態のために基礎的な実験をし、その上でd-cis-diltiazem と l-cis-diltiazemの作用を比較した。l-cis-diltiazem のカルシウムチャネル遮断作用はd-cis-diltiazemの約1/20から1/30であるので、この両薬物の虚血・再灌流障害に対する保護効果を比較すれば、カルシウムチャネル遮断が虚血・再灌流障害の保護にどれだけ役に立っているかを明らかにすることができる。

2 実験方法

実験には雄のスプラッグ・ドーリー ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔後、心臓を取出し、まずランゲンドルフ法で10分間灌流し、次に working heart法で灌流した。Working heart 法においては、preload を12cm水、afterload を90cm水とした。

NEFAは次のようにして測定した。液体酸素で冷却したクランプで心筋を挟み、これを液体酸素温度下で粉末とした。脂質の抽出はホルチ法によった。内部標準物質としてはヘプタデカン酸(C17:0)を用いた。抽出物にADAM試薬(カルボン酸に対する蛍光試薬)を作用させて脂肪酸を蛍光ラベルした後、HPLCでNEFAの同定、定量した。NEFAほかに、ATP、CrP、乳酸など代謝物も同時に測定し、心筋内のそれらの物質の含量も算出した。

3 実験結果

(1) 虚血・再灌流による心機能の変化とNEFA含量の変化

図8は虚血時間を変化させた場合、再灌流後の心機能の回復がどのようになるのかをみた基礎的な実験である。この図からわかるように虚血時間10分の場合は、再灌流によって心機能（圧拍動積）が戻ってくる。しかも、心機能が回復する程度は、再灌流の時間によく比例していることがわかる。虚血時間が20分の場合は、再灌流15分までは心機能は全く回復せず、再灌流30分で少し回復がみられただけであった。虚血時間が30分になると、再灌流後の心機能の回復はさらに悪くなった。

図9は虚血時間を変化させ、その後再灌流させた場合の心機能、遊離脂肪酸、ATP、CrP、および乳酸含量の変化を示してる。図8の実線は虚血時間を表し、点線は再灌流時間を表している。虚血だけについてみると、虚血によって心機能は最低になり、NEFAは上昇傾向を示し、ATPとCrPは低下し、乳酸は増加した。面白いのは再灌流をしてからの変化である。心機能は虚血時間が短ければ再灌流後回復したが、虚血によって増加したNEFAは再灌流しても低下するどころか、さらに増加する傾向を示した。ATPとCrPは虚血によって低下し、再灌流によって回復傾向をみせた。乳酸は虚血で増加し、再灌流で元のレベルに低下した。以上のことから、NEFAの虚血・再灌流による変化は、他のパラメーターとは非常に違うことが分った。つまり、虚血によるNEFA含量の上昇は再灌流後さらに上昇したということである。そこで、虚血障害と再灌流障害をわけて考える場合には、NEFAの変化を指標にすると便利であることがわかった。即ち、虚血中のNEFAの上昇は虚血障害のパラメーターとなり、再灌流によるNEFAの上昇は再灌流障害のパラメーターとなり得る。

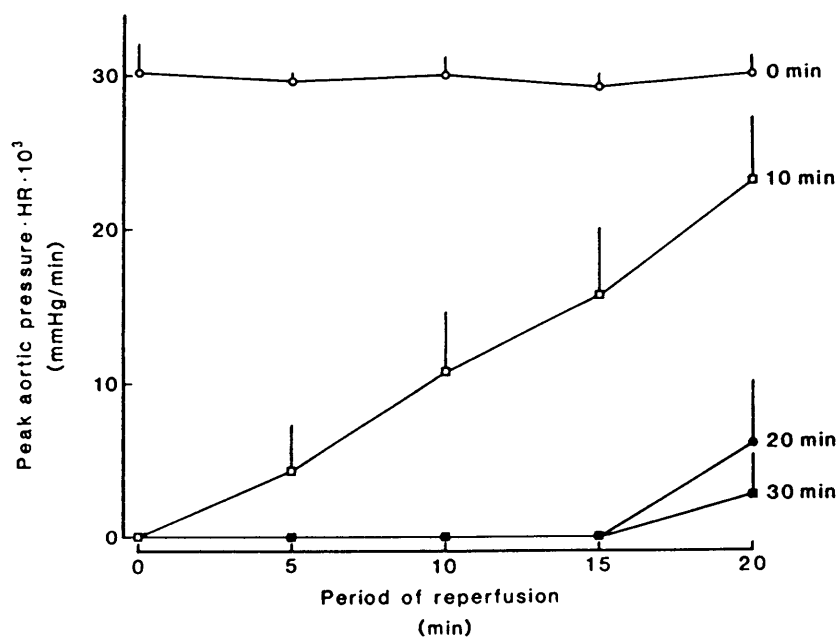


図8 虚血後再灌流時における心機能の回復。虚血時間が長ければ長いほど、心機能の回復が悪いことを示す。

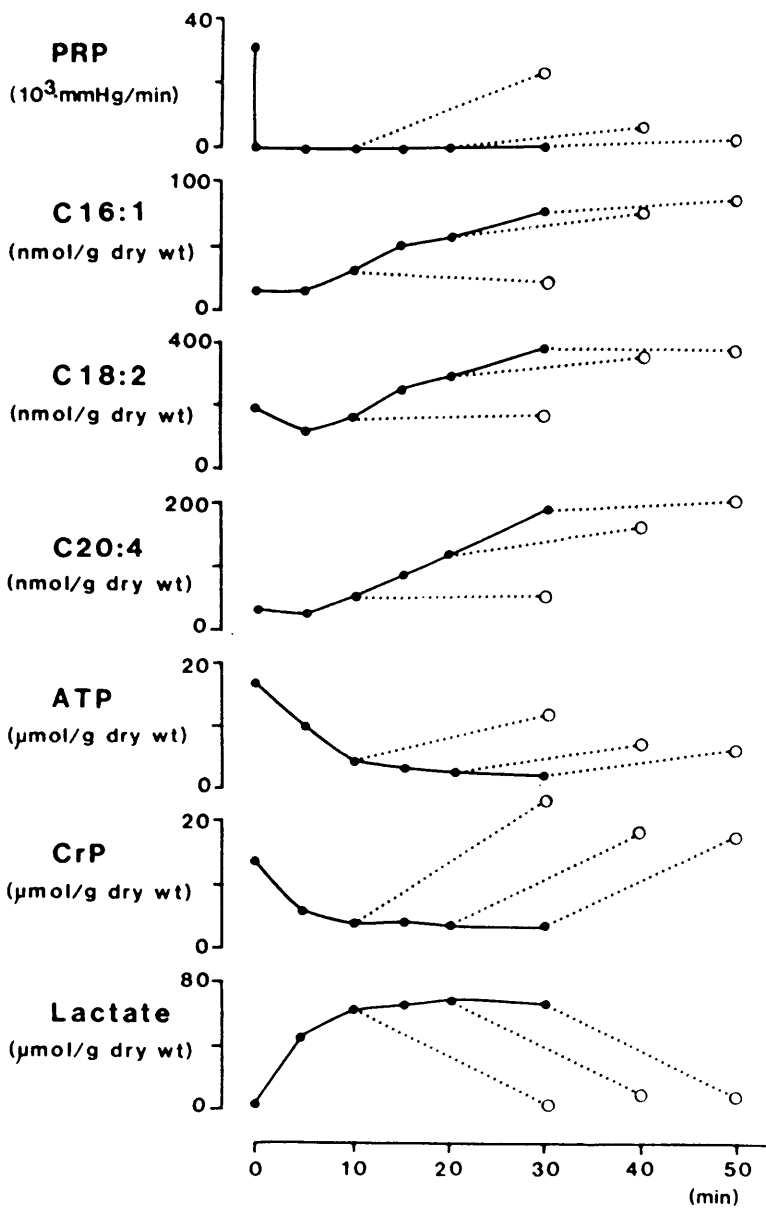


図9 虚血および再灌流後における心機能（PRP）および心筋の遊離脂肪酸、ATP、CrP、乳酸含量。実線は虚血を表し、点線は再灌流を表す。5、10、15、20、25および30分間の虚血群のほか、10分間虚血後20分間再灌流、20分間虚血後20分間再灌流、30分間虚血後20分間再灌流群での実験成績をまとめている。

次に虚血・再灌流によって変化したNEFAの中で最も大きな変化を示したアラキドン酸と心機能および他の代謝物との相関をとった。図10は虚血中（左）および再灌流中（右）におけるアラキドン酸含量とATP含量との相関図である。虚血によってATPが減少して、そのレベルが $5\mu\text{mol/g}$ 以下になると、アラキドン酸が蓄積してくることがわかる。再灌流時のアラキドン酸含量とATP含量との関係は虚血の時の関係と一見似ているが、異なっているようにみえる。図11はアラキドン酸含量とAMP含量との相関をとった図である。AMPが増加すると、アラキドン酸が増加してくることがわかる。図12はATPとAMPの比（ ATP/AMP ）とアラキドン酸含量との相関を表している。この比が1以下になると、アラキドン酸が蓄積してくることがわかる。つまり、虚血によって ATP/AMP が低下することが、アラキドン酸の含量増加に密接に関係しているようである。図13は心機能（圧拍動積）とATPならびにアラキドン酸含量の相関をとったものである。ATPの低下と心機能の減少はよく相関しており、アラキドン酸の増加と心機能の低下もよく相関している。このような事実から、アラキドン酸は虚血・再灌流障害の重要なパラメーターとなることが明らかとなった。とくに、ATPとは異なり、アラキドン酸は再灌流時に増加するので、アラキドン酸の蓄積は再灌流障害の指標となり得ると考えられる。

以上のような基礎実験をふまえて、カルシウム拮抗薬であり、抗虚血作用をもっているジルチアゼムの作用のメカニズムを追及する目的で実験をし、その結果を以下に記載する。ジルチアゼムに関する実験の方法は、薬物投与を除けば、今まで述べてきた基礎的実験の方法と全く同じである。

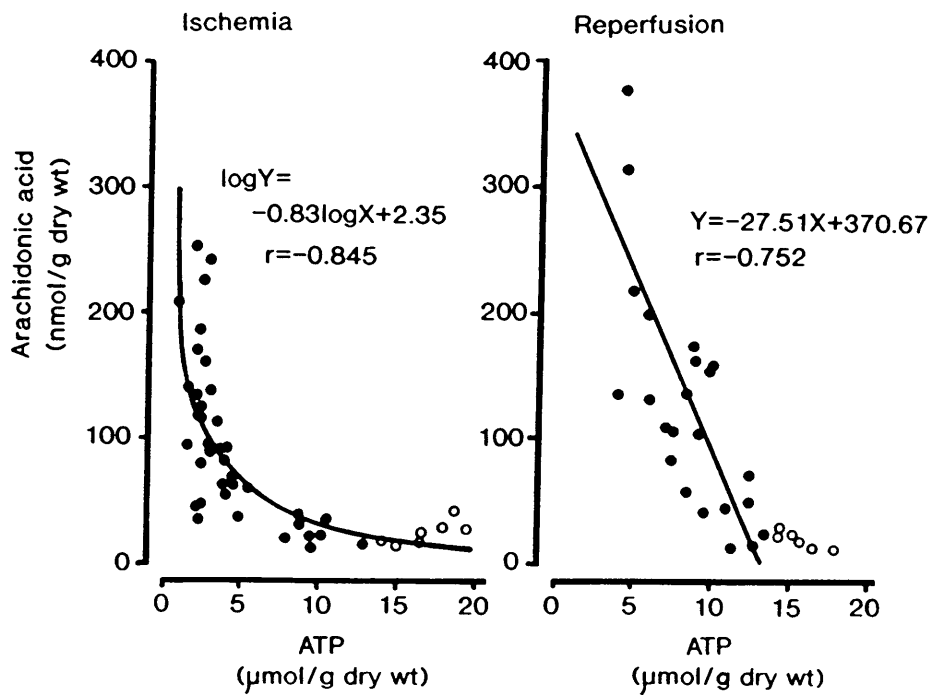


図 10 心筋のアラキドン酸含量と A T P 含量との関係。左は虚血時における関係で、右は再灌流時における関係を表す。

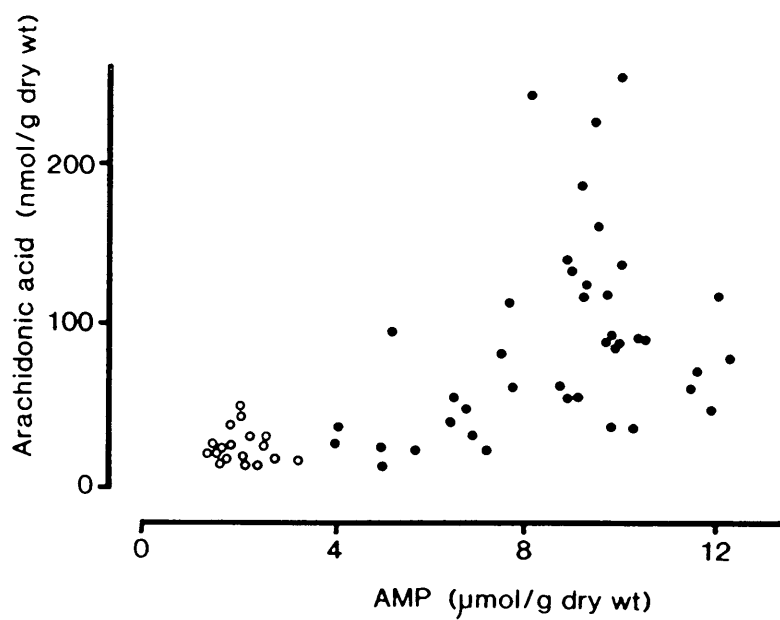


図 1 1 心筋のアラキドン酸含量と A M P 含量との関係。黒丸は虚血時における関係、白丸は再灌流時における関係を表す。

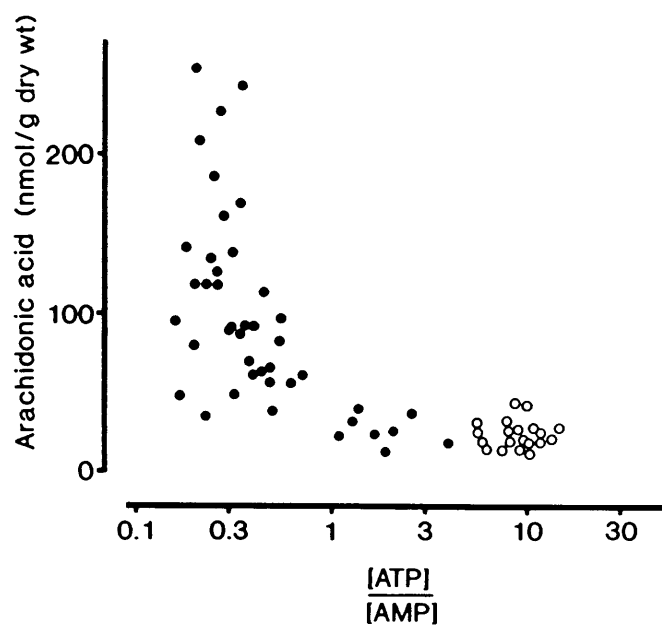


図 1 2 心筋のアラキドン酸含量と A T P / A M P 比の関係。黒丸は虚血時における関係で、白丸は再灌流時における関係を表す。

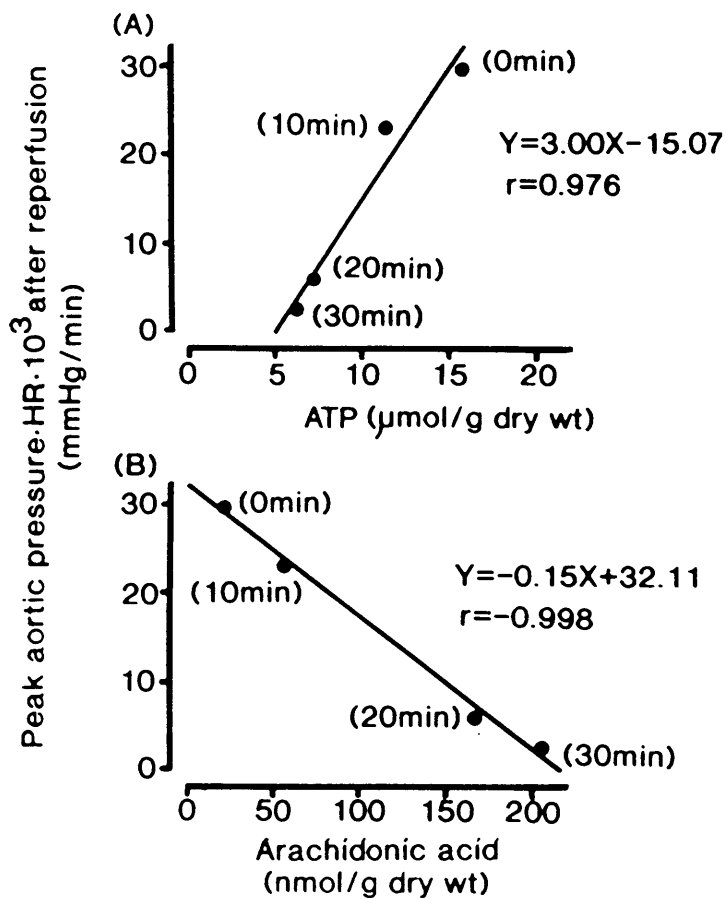


図13 心機能と心筋内ATP含量との関係(A)および心機能とアラキドン酸含量との関係。虚血後再灌流した心臓についての実験結果をまとめたもの。

（２）ジルチアゼムの虚血・再灌流心臓の機能におよぼす作用

図 1 4 は非虚血正常心臓に薬物を投与した場合のヘモダイナミックスに与える影響を示す。D-cis-diltiazem は圧拍動積、拍動数、最大動脈圧はすべて減少させ、その程度は用量依存的であった。L-cis-diltiazem の作用は d-cis-diltiazem に比べると弱く、しかも最大動脈圧は上昇した。低カルシウム（1 mM）によっても、d-cis-diltiazem と同じようなヘモダイナミックスの減少がみとめられた。但し、拍動数の減少の程度は d-cis-diltiazem に比べると弱かった。図 1 5 は虚血前から薬物を投与した場合の再灌流時の心機能の回復を調べたものである。虚血時間はすべて 20 分とし、薬物投与は虚血 5 分前から始めた。ただし、再灌流時には薬物が入っていない。まず、対照実験（薬物なし）をみると、虚血の後に再灌流しても心機能はほとんど回復せず、再灌流 20 分後にわずかに回復したのみであった。ところが、d-cis-diltiazem を投与しておく、と、用量依存的に再灌流後に心機能の回復がみられた（上段）。ところが、カルシウムチャネル遮断作用の弱い筈の L-cis-diltiazem も再灌流後の心機能を回復する作用のあることがわかった（下段）。しかも、L-cis-diltiazem の再灌流後の心機能を回復する作用の強さは d-cis-diltiazem の作用の強さに匹敵していた。この事実はジルチアゼムの虚血・再灌流障害保護作用は、カルシウムチャネル遮断作用のみでは説明できないことを示す。図の 1 6 は薬物による心機能の抑制（下向き）と再灌流後の心機能の回復（上向き）を示している。d-cis-diltiazem は用量依存的に心機能を抑制し、その抑制の程度に反比例して再灌流後の心機能の回復^がみられた。つまり d-cis-diltiazem は心筋のエネルギー消費を減少させることによって、再灌流時の心機能を回復させたのである（エネルギー・スベアリング効果）。しかし、L-cis-diltiazem は心機能低下作用は小さいのに、再灌流後の心機能を回復させた。故に、L-cis-diltiazem の虚血・再灌流障害保護作用は虚血時にではなく、再灌流時にこそ発揮されたものと考えることが出来る。では、L-cis-diltiazem を再灌流時にのみ投与したらどうなるかという実験をする必要がある。図の 1 7 は再灌流時にのみ薬物を投与した場合の実験結果を示している。

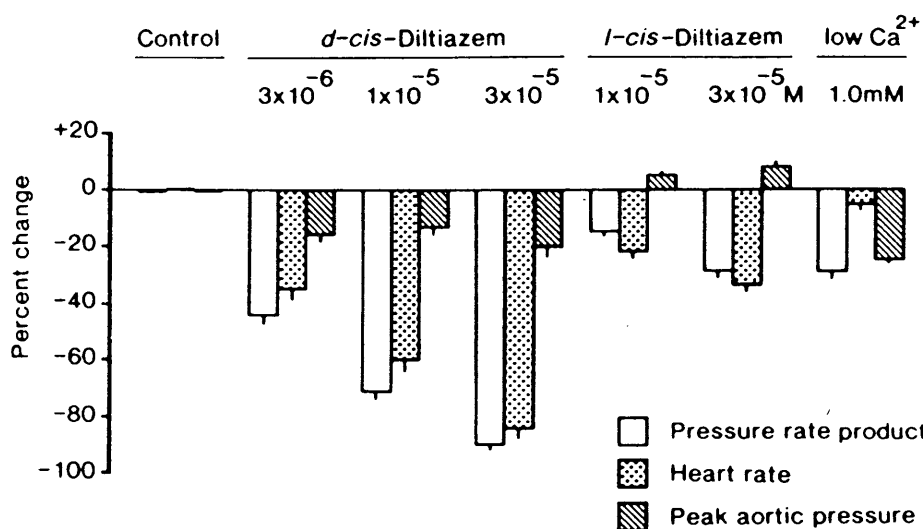


図1 4 圧拍動積 (Pressure rate product)、拍動数 (Heart rate), および最大動脈圧(Peak aortic pressure)の薬物投与による変化。薬物投与前と投与5分後の値のパーセント変化。薬物としては、*d-cis*-diltiazem と *l-cis*-diltiazemを用いた。Low calcium 灌流液による効果も調べた。

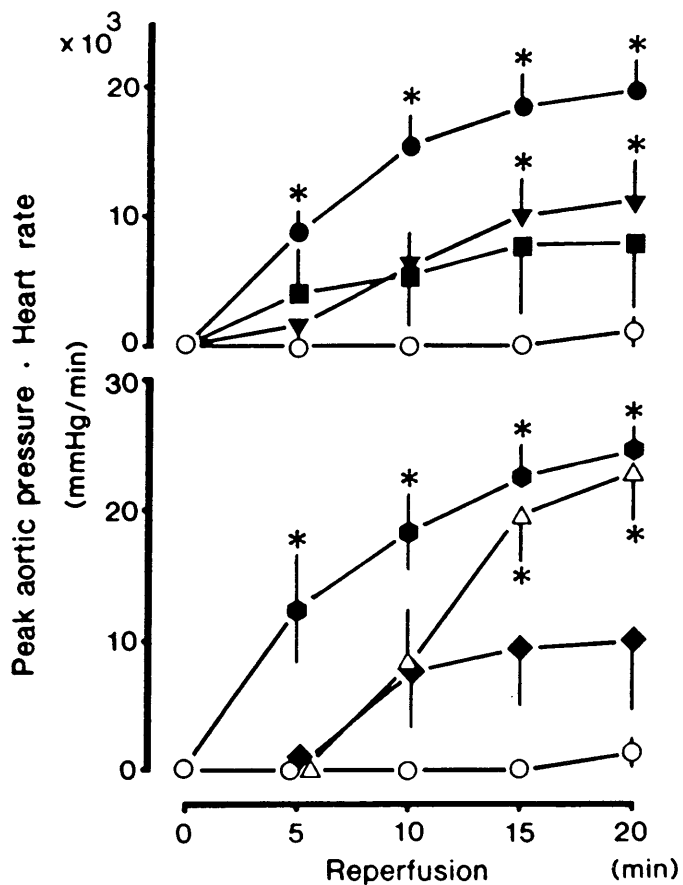


図15 虚血後再灌流時における圧拍動積の回復。虚血は20分間行い、再灌流も20分間行った。白丸はno drug。黒四角はl-cis-diltiazem 3×10^{-6} M。黒三角はd-cis-diltiazem 1×10^{-5} M。黒丸はd-cis-diltiazem 3×10^{-5} M。黒菱形はl-cis-diltiazem 1×10^{-5} M。黒六角はl-cis-diltiazem 3×10^{-5} M。白三角はlow Ca。

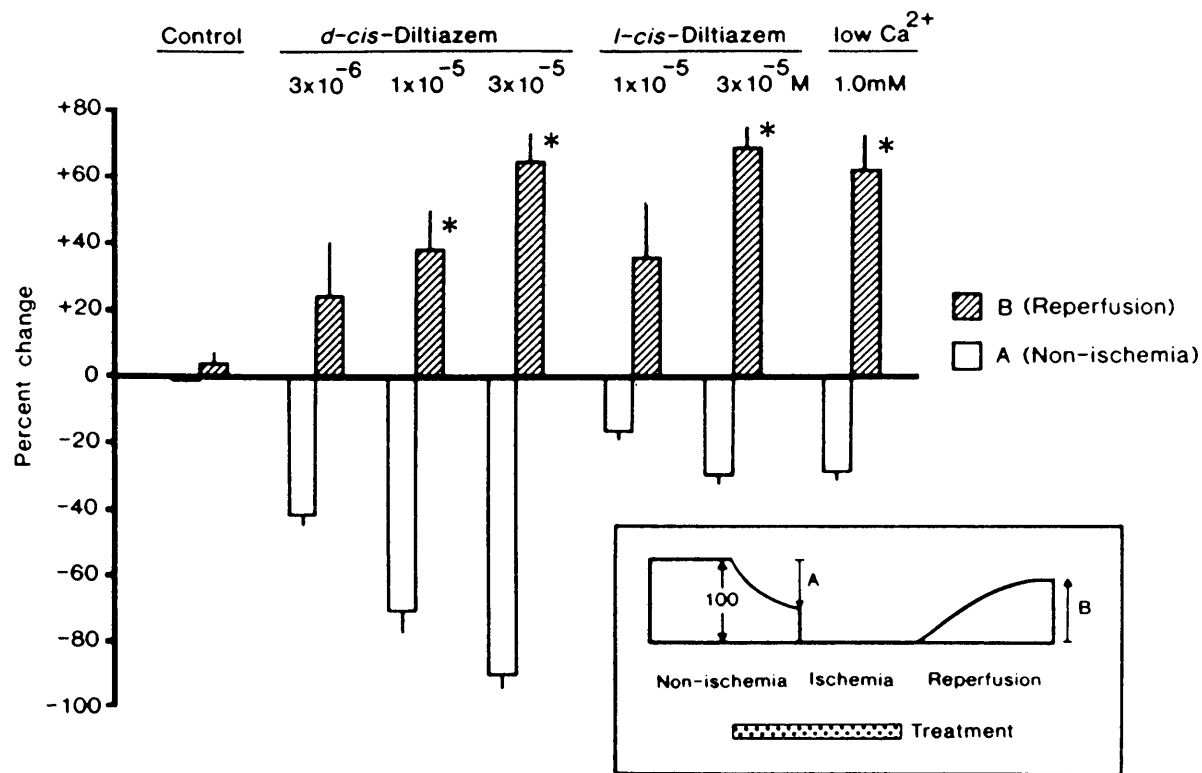


図16 圧拍動積の虚血前値と再灌流後値とのパーセント比較。Aは非虚血時の値でBは再灌流後の値。パーセントの計算方法は右下の小さい枠で示してる。

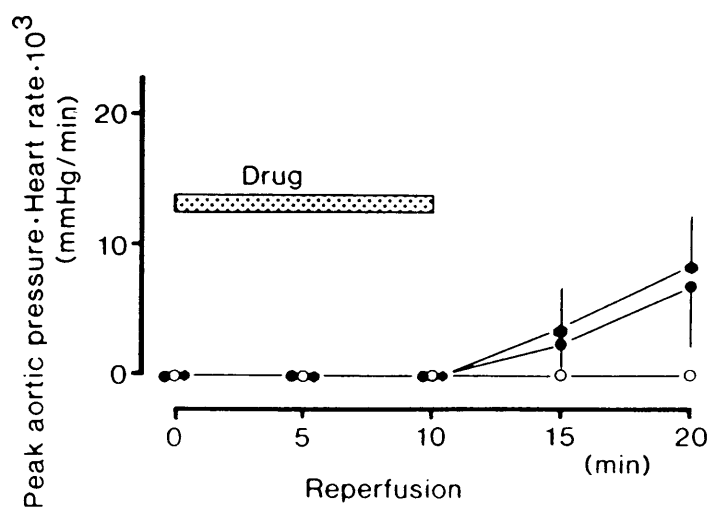


図 17 薬物を再灌流開始 10 分間のみ投与した場合の再灌流時の心機能の回復。白丸は薬物処置のない対照実験。黒丸は 3×10^{-5} M の d-cis-diltiazem。黒六角は 3×10^{-5} M の l-cis-diltiazem。

図17は再灌流時にのみ投与^した d-cis-diltiazem も l-cis-diltiazem も、再灌流時の心機能を少しであるが回復させることを示している。従って、ジルチアゼムは再灌流時に受ける細胞膜の障害を、おそらくはカルシウムチャネルの遮断以外のメカニズムによって抑制していることがわかる。

(3) ジルチアゼムの虚血・再灌流心臓の代謝におよぼす作用

図18は虚血・再灌流による心筋の全NEFA含量の変化と、それにおよぼす薬物の影響をみたものである。まず、対照(no drug)実験からみとみると、虚血によってNEFAは心筋内にかなり蓄積し、再灌流をすると蓄積したNEFAが少なくなるどころか、もっと蓄積することがわかった。つまり、NEFAは虚血の時ばかりではなく再灌流の時にも蓄積するのである。灌流液の中には脂肪ないし脂肪酸は全く入っていないので、心筋の蓄積したNEFAは心筋自身から出てきたことになる。おそらくは、心筋のリン脂質から切り出されてきたものと思われる。D-cis-diltiazem の前投与は、虚血によるNEFAの蓄積をほぼ完全に抑制したが、再灌流によるNEFAの蓄積は完全には抑制しなかった(3×10^{-6} 、 1×10^{-5} M)。しかし、d-cis-diltiazemの濃度が 3×10^{-5} M と高くなると、再灌流によるNEFAの蓄積は完全に抑制された。l-cis-diltiazem は虚血によるNEFAの蓄積を全く抑制しなかったが、再灌流によるNEFAの蓄積を高濃度で完全に抑制した。つまり、d-cis-diltiazem はエネルギースペアリング作用のために虚血によるNEFAの蓄積を抑制し、高濃度ではおそらくは非特異的作用のために再灌流による細胞膜の障害を減弱させたと考えられる。これに反して、l-cis-diltiazem は再灌流時の障害のみを減弱させたと考えられる。面白いことに、d-cis-diltiazem を投与した群でもl-cis-diltiazem を投与した群でも、再灌流後におけるNEFAの含量は同じであった。このことは、虚血・再灌流による心機能障害をd-cis-diltiazem やl-cis-diltiazem が抑制するのによく似ていた。低カルシウム液の影響は、l-cis-diltiazem による影響とほぼ同じであった。

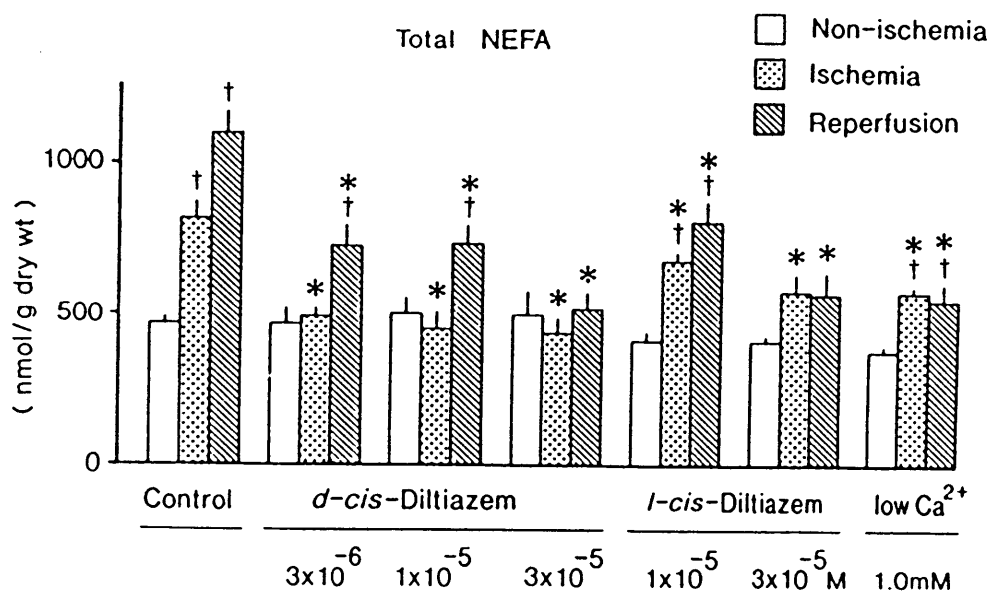


図18 虚血前、虚血後、および再灌流後における心筋の全遊離脂肪酸量 (total NEFA) と薬物作用。虚血によってNEFAは上昇し、再灌流するとNEFAはさらに上昇した。*D-cis-diltiazem* は虚血によるNEFAの上昇をよくよくせいし、*l-cis-diltiazem* は再灌流によるNEFAの上昇をよく抑制した。従って、虚血・再灌流後の心筋のNEFAの含量は *d-cis-diltiazem* を与えた場合も *l-cis-diltiazem* を与えた場合もほとんど同じであった。

図19は高エネルギーリン酸化合物の心筋内含量の虚血時、再灌流時における変動と、それに対する薬物作用を示す。対照実験では、虚血によって心筋のATPとADPの含量が低下し、AMPの含量が増加した。再灌流によってこれらの変化した代謝物の含量は元のレベルに戻る傾向を示した。D-cis-diltiazemは虚血による変動をよく抑制した。これに対して、l-cis-diltiazemは虚血による代謝物の変動をあまり抑制しなかった。再灌流時の代謝物の変動はl-cis-diltiazemの方がむしろよく抑制したので、再灌流後における最終的な高エネルギーリン酸化合物の心筋内含量は、d-cis-diltiazemを投与した場合でもl-cis-diltiazemを投与した場合でも、ほぼ同じになった。低カルシウム灌流液の場合は、l-cis-diltiazem投与の場合とほぼ同じような結果となった。図20はATP、ADP、AMPの含量から計算したエネルギー・チャージ・ポテンシャルの変化を示している。この変化はATPの変化とよく似ており、d-cis-diltiazemは虚血心筋を保護する作用が強く、l-cis-diltiazemは再灌流障害をより効果的に防止し、結局はどちらの薬物を用いても、再灌流後のエネルギー・チャージ・ポテンシャルは同じレベルになった。図20は心筋クレアチンリン酸の虚血・再灌流による変動を示している。クレアチンリン酸の変動もATPとほぼ同じで、d-cis-diltiazemは虚血によるクレアチンリン酸の低下を抑制し、l-cis-diltiazemは再灌流時により効果を発揮しているようにみえた。結局、どちら型のジルチアゼムを与えても、再灌流後の最終的なクレアチンリン酸の値はほぼ同じであった。図22は心筋の乳酸の含量を示す。虚血によって乳酸含量は増加し、再灌流によってほぼ元のレベルに戻った。D-cis-diltiazemもl-cis-diltiazemも虚血・再灌流による乳酸レベルに大きな影響は与えなかった。低カルシウム灌流液も大きな影響を与えなかった。図23は再灌流を始めてから、心臓が動き出すまでの時間を比べたものである。低カルシウム液では、再灌流をしたあと心臓が動き始めるのに約10分かかったのに対し、d-cis-またはl-cis-diltiazemを投与した群では心臓が動き出すまでの時間が5分以下であり、ここでd-cis-dil-

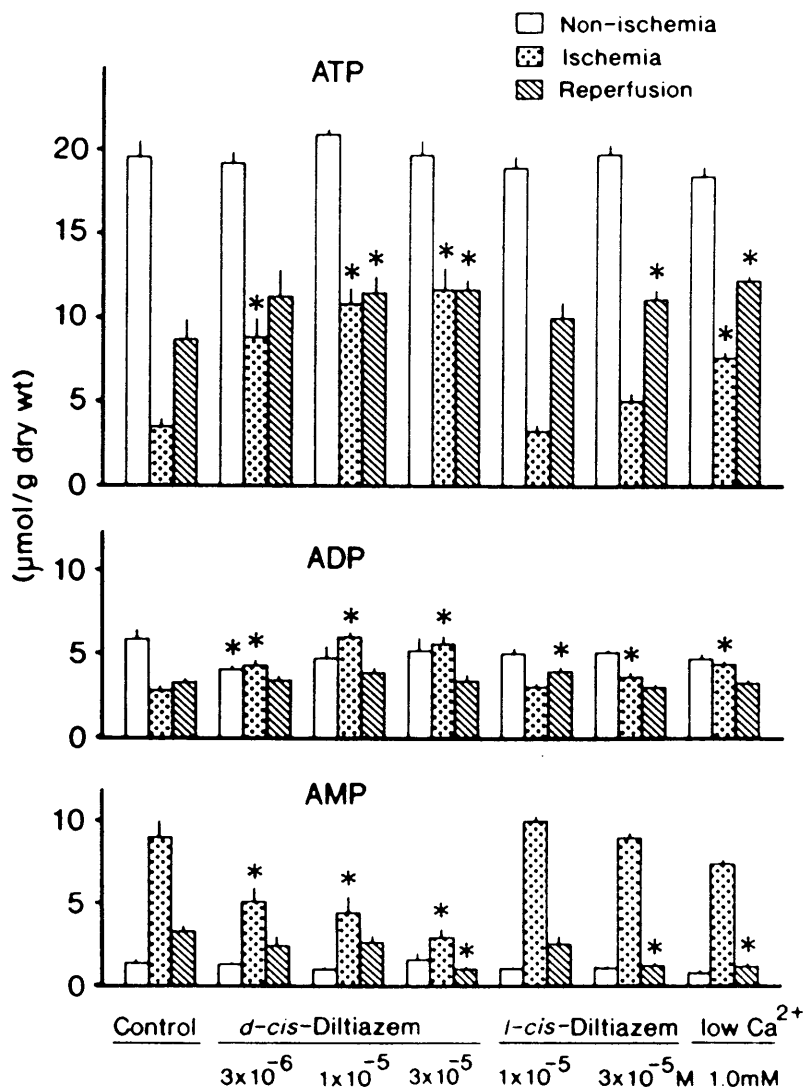


図19 図18と同じ実験でのATP、ADPおよびAMPの心筋含量。

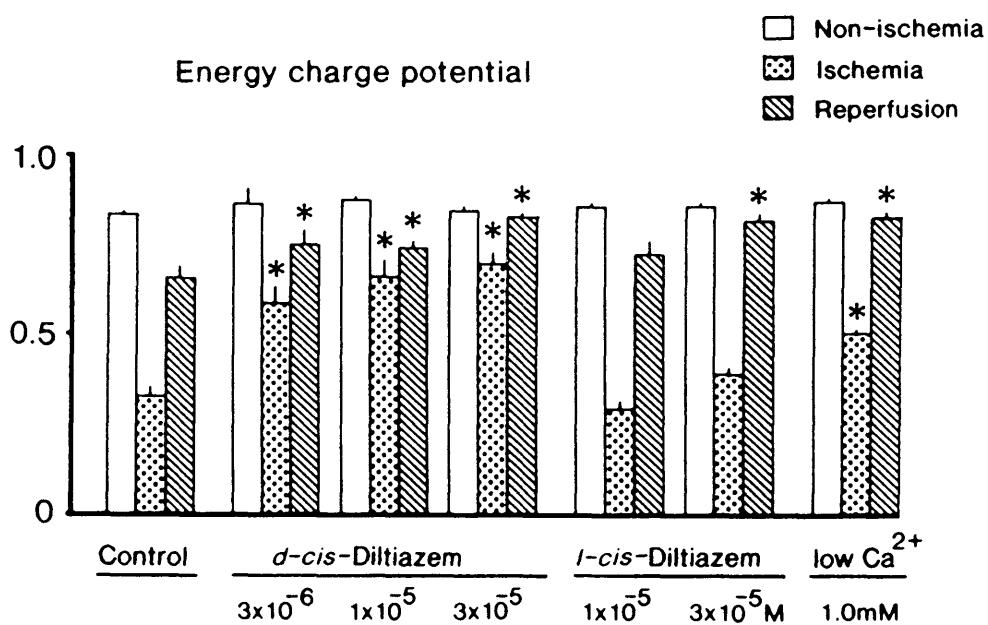


図 20 図 18と同じ実験でのエネルギー・チャージ・ポテンシャルの変化と薬物の影響。

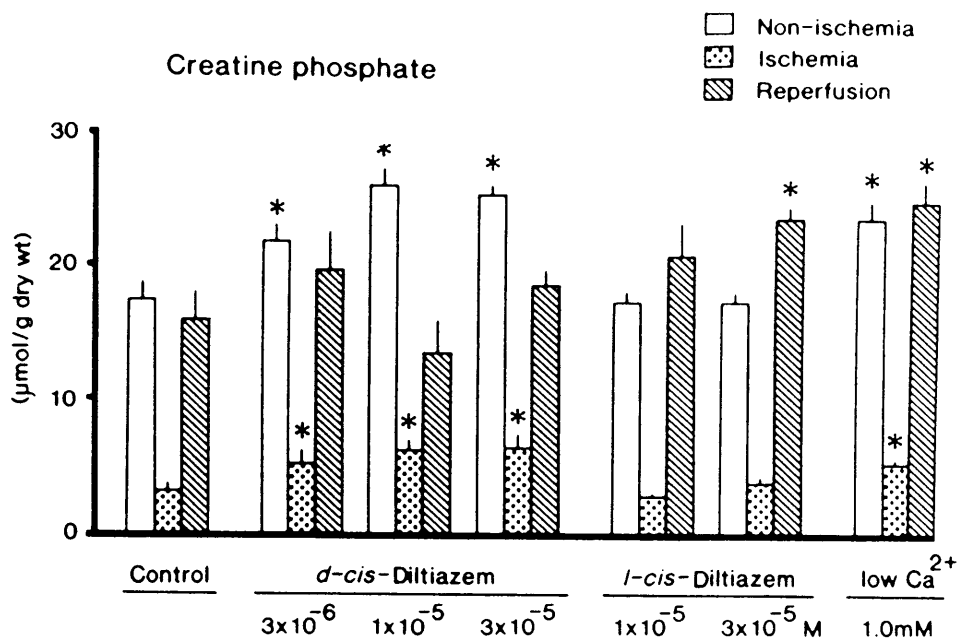


図2 1 図1 8と同じ実験での心筋クレアチンリン酸の含量変化と薬物作用。

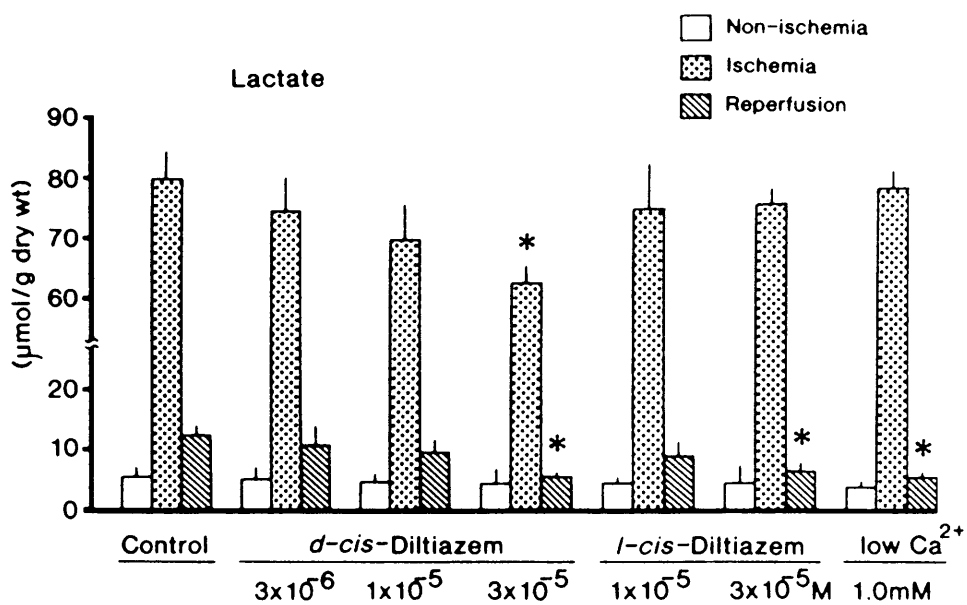


図 2 2 図 1 8 と同じ実験での心筋中の乳酸含量の変化と薬物作用。

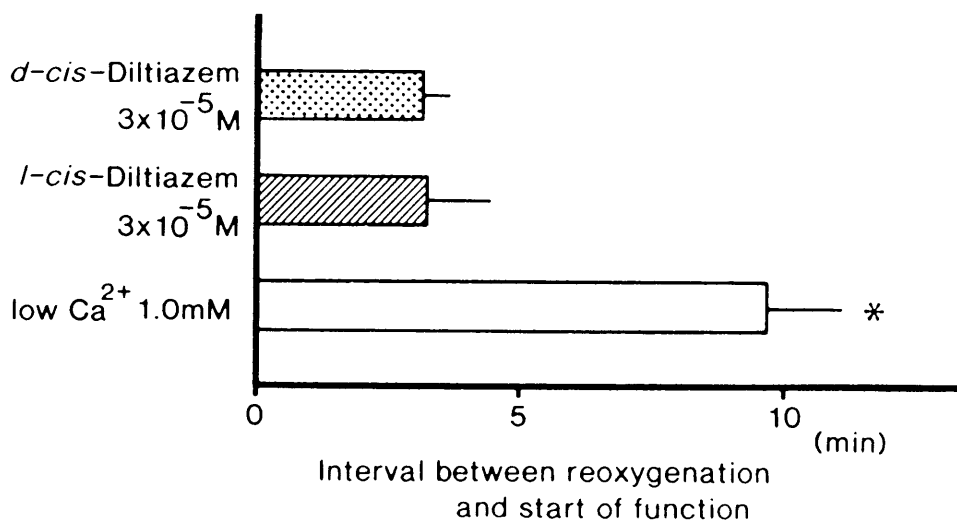


図 2 3 再灌流開始から心筋が収縮活動を始めるまでの時間。

tiazemやl-cis-diltiazemを与えたことと、灌流液を低カルシウムにしたこととは、同じではなく、意味が全く異なることがわかった。

4 考察

この実験では虚血・再灌流によって心機能が非可逆的に障害を受けた場合、心筋にアラキドン酸のようなNEFAが蓄積することが明らかとなった。脂肪酸はリパーゼによって脂質（リン脂質や中性脂肪など）から切り出されてくるが、アセチルC○A合成酵素などの酵素によって、脂質に再合成されるというサイクルを回っている。従って、脂肪酸が蓄積するのは、リパーゼ（とくにホスホリパーゼ）による切り出しが速くなったためか、脂質（とくにリン脂質）への合成が遅くなったためか、あるいはその両方のためであろうと推察出来る。さて、虚血中にはATPが低下するとともにAMPが上昇する。ところで、アセチルC○A合成酵素がその機能を発揮するためには、ATPを補助因子として必要であり、またAMPによってアセチルC○A合成酵素の活性が抑制される。虚血中の心筋では、ATPの低下とAMPの上昇があるので、アセチルC○Aの活性は低下していることが予想される。従って、虚血中の遊離脂肪酸の蓄積はATPの減少とAMPの上昇では説明出来る。D-cis-diltiazemはエネルギーの消費を低下させることによって虚血中のATPの低下とAMPの上昇を防止するので、虚血中のNEFAの蓄積が少なくてすんでいると考えてよいであろう。エネルギー・スペアリング効果はd-cis-diltiazemにかぎらず、心機能を低下させてエネルギーの消費を低下させる薬物を投与すれば、現れると考えてよい。しかし、これらの薬物は心機能を減少させるわけであるから、再灌流後にこれらの薬物が残れば、再灌流した心臓の収縮力は低下する筈で、これは虚血・再灌流障害から心筋を保護することに水をさす結果となる。この意味では、心機能をほとんど低下させなかったl-cis-diltiazemが虚血・再灌流による障害を保護したという成績は特筆すべきものである。同時に、再灌流時における心筋保護は虚血時における心筋保護とはそのメカニズムが異なることを示唆する。ここで、虚血による障害と再灌流による障害とは基本的

に異なることを再確認する必要が出てきた。

虚血による障害の基本にあるのは、エネルギーの減少であることは前述した。しかし、再灌流による障害はエネルギーの減少では説明できない。なぜなら、再灌流によってATPやCPのレベルが上昇し、乳酸やpHの値が正常の値に向かっても、なお、障害が進行するからである。障害が進行していることは、NEFAの値が再灌流後も上昇し続けることからわかる。このことは、再灌流時もNEFAが切り出されていることを物語っている。おそらく、再灌流によって細胞内のカルシウム濃度が上昇したためにホスホリパーゼ活性が上昇し、これがNEFA含量の上昇につながったのであろう。これが事実だとすれば、ホスホリパーゼを抑制する薬物は再灌流障害を減弱させることになる。事実、ホスホリパーゼが再灌流障害を減弱したという報告はある。しかし、本実験ではl-cis-diltiazem が再灌流障害を減弱させたという結果が出た。この作用メカニズムは今のところ不明である。心筋の細胞膜に対してl-cis-diltiazem は何らかの保護作用をもっているものと考えられる。もちろんd-cis-diltiazem にも同じ作用があるが、この場合にはカルシウムチャネル遮断作用（エネルギー・スベアリング作用）のために、膜に対する作用が隠されてしまったのであろう。このように考えてゆくと、再灌流障害に対しては膜安定化作用をもつ薬物が有効であるということになる。ホスホリパーゼを抑制する物質もその中に入るが、細胞膜に対して非特異的に作用する物質、例えばリドカインもこの中に入る。現段階ではリドカインの細胞膜に対する作用メカニズムがはっきりとはわかっていない。ジルチアゼムもカルシウムチャネル遮断作用の他にリドカイン様の作用をもっている。この細胞膜安定化作用の本態を解明することが将来の研究の重要な課題である。この点に関してはプロプラノロールの作用とも関連する。プロプラノロールは β -遮断作用の他に細胞膜安定化作用をもっているからである。膜安定化作用をもつ薬物が虚血心筋の保護に役に立つという事実は、膜安定化作用が実は虚血後の再灌流に有効であることを強く示唆するものである。

5 要約

心筋中に含まれる NEFA の含量を指標として虚血ならびに再灌流障害を推測できることを実験によって示した。NEFA は高エネルギーリン酸化合物や乳酸含量とは異なる情報を提供するもので、とくに再灌流障害を判定するのに便利であることがわかった。虚血によっておこる心筋中への NEFA の蓄積は、ATP の減少と AMP の増加によってアセチル CoA 合成酵素の活性が抑制され、このため NEFA のリン脂質への再合成が抑制されたからであろう。再灌流によっておこる NEFA の蓄積は、再灌流によって生じたカルシウムオーバーロードのために細胞内カルシウム濃度が上昇し、このためホスホリパーゼの活性が上昇し、リン脂質からの脂肪酸の切り出しが増えたためであろう。D-cis-diltiazem は心機能を抑制するので、このために虚血心筋のエネルギー消費を減少させ、その結果として虚血心筋を保護することがわかった。L-cis-diltiazem は主として再灌流時の心筋細胞膜を保護することによって、再灌流障害から心筋を保護することが示唆された。D-cis-diltiazem も再灌流障害を保護する作用をもっているが、エネルギー・スベアリング作用があまり強いために、表面には出にくかったのでであろう。虚血・再灌流障害から心筋を保護するには従来から言われているエネルギー・スベアリング効果の他に、心筋細胞膜を強化する効果を考える必要があることが示唆された。

第4部 心筋細胞膜のカルシウムチャネルに対する虚血の影響

1 目的

虚血によって心筋内のATP含量が低下することは、すでに証明済みの事実である。ところで、細胞内のATPが低下すると細胞膜のカルシウムチャネル活性に何らかの影響が出てくることが示唆されてきた。しかし、ATPとカルシウムチャネル活性との間を正確に関連づけることは難しい。なぜかという、ATPを減少させると細胞内のカルシウム濃度が上昇し、このためCa induced Ca inactivationという現象がおこる。つまり、細胞内ATP減少のカルシウムチャネル活性におよぼす影響は、ATPの減少そのものによる直接的な影響の他に、細胞内カルシウム濃度上昇に由来する二次的な影響がある。この他、ATPの減少は収縮をひきおこすので、これもカルシウムチャネル活性を正確に見ることを妨げる。故に、whole-cellを用いた実験では、ATP減少のカルシウムチャネルにおよぼす影響を正確に見ることが出来ない。この問題を解決するには、単離した心筋細胞をinside-outの状態にし、この細胞膜に対してパッチクランプ法を用いてカルシウムチャネルの状態をみるのがよい。そうすれば、Ca induced Ca inactivationの問題も収縮の問題もなくなる。しかし、このような標本を用いて実験をしても、まだ問題が残る。それは、inside-outの標本を使って実験すると、Caチャネルの活性が時間の経過とともに減少するからである。この現象をrun-downと呼んでいる。最近、この問題が解決した。すなわち、心筋組織の抽出液を用いると、run-down現象が出ないことがわかった。そこで本実験は、run-downしない条件下でATPとカルシウムチャネル活性との間の関係を求めるのを目的として行った。

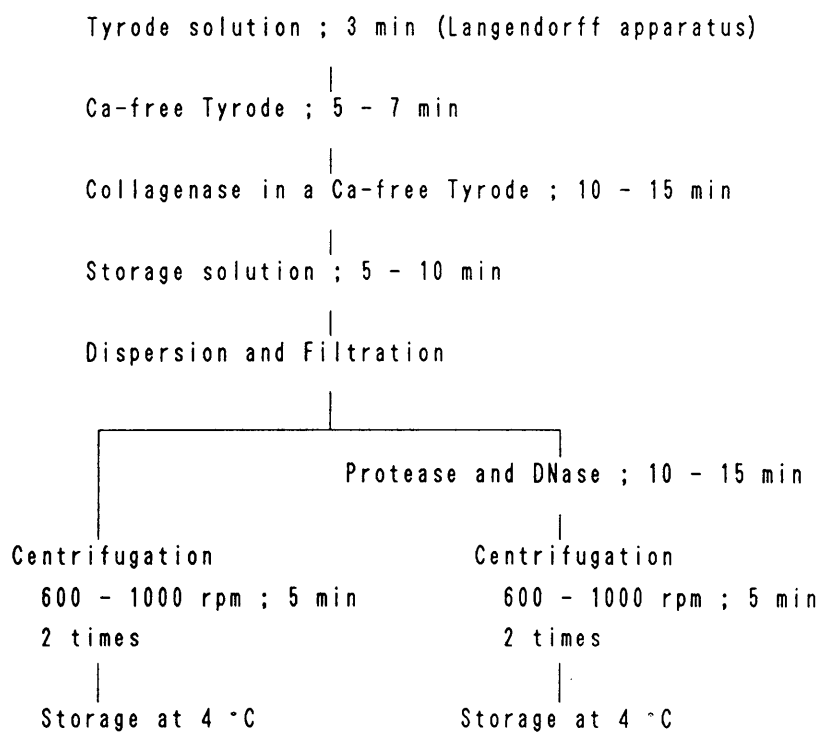
2 実験方法

実験には雌モルモット（体重300-600 g）を用いた。モルモットから心臓を取出し、これをコラゲナーゼ（Yakult社）で処理し、図24に示す方法で心室筋細胞を単離した。

まず、心筋組織液からタンパク質を抽出し、これをDEAEセロロースカラムを用いて分離し、run-downしたカルシウムチャネルの活性を回復させるタンパク質は、カラムによる分離のどの部分にあるかを電気生理学に確認した。このタンパク質を部分精製Caチャネル活性蛋白（Partially purified Ca channel activating protein; PCAP）と呼ぶ。このPCAPを高カリウム液（inside-out液）で透析して得られた液をrun-downを防止する液として用いた。

実験方法の概要は図25示されている。まず、Normal Tyrode 液中でcell-attached patch を作り（図25-1）、その後、外液をhigh K 溶液に変えた（図25-2）。これをControl とし、holding potential が-60 mV、depolarizing potentialが0 mV、durationが200 msec、main interval が2 sec の刺激を与えた。次に、inside-outにしてカルシウムチャネルの活性をrun-downさせた（図25-3）。次にPCAPを図25-4に示してあるbathに入れ、その中またはその入口にpatch 膜を近づけた。電極内成分（pipette solution）はBa電極にBay K 8644を加えたものである。Inside-out液はhigh Kの溶液である。

実験槽は倒立顕微鏡（Nikon TMD）のステージに固定し、この中には35-37℃に加温した外液を入れた。

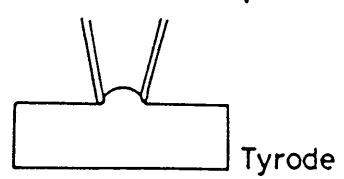


All steps are done at 37 °C except storage

図24 モルモット心室筋細胞の単離方法

ランゲンドルフ灌流心臓にProteaseとDNaseを流し、effluent中に出てきた細胞を遠心して得る。

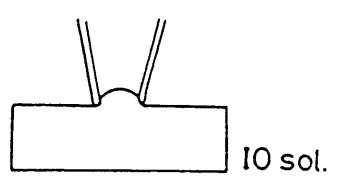
1. Cell-attached patch



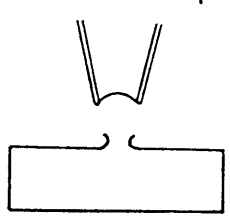
Pipette Solution

BaCl ₂	50mM
CholineCl	70
HEPES	10
EGTA	0.5
pH 7.4	
Bay K 8644	3μM

2.



3. Inside-out patch



Inside-out Sol.

K Asp	90
KCl	30
KH ₂ PO ₄	10
HEPES	10
EGTA	1
pH 7.5	

4.

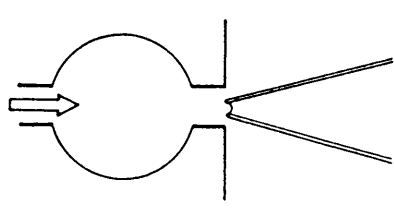


図 2 5 心筋細胞のパッチクランプ実験の手順

3 実験結果

Run-downしたCaチャネルの活性を回復させるタンパク質がDEAE-セルロースカラムのどのバンドにあるのかを電気生理学的に調べると、電気泳動のパターンから50-360mMのKClで溶出してくるタンパク質(PCAP)が考えられた。PCAPをinside-out液で透析して得られた物質を用いて、Caチャネルに対するATPの効果を調べた。

実験結果をまとめると次の如くである。

- (1) ATP単独ではCaチャネルの活性は回復しなかった。
- (2) ATPが存在しなくても、PCAPが存在すればCaチャネルの活性は回復した。
- (3) MgATPが存在すると、PCAPのCaチャネル活性回復作用はより顕著に現れた。
- (4) K₂ATPが存在すると、PCAPのCaチャネル活性回復作用はより顕著に現れた。
- (5) ATPのアナログであるが加水分解しないAMP-PNP (5'-adenylylimidodiphosphate) が存在すると、PCAPのCaチャネル活性回復作用はより顕著に現れた。

Cell attach にした場合のCaチャネルのNP_o (開口確率×チャネルの数であり、チャネルの活性を表す) を1にした場合、inside-out にするとNP_oは0.05に低下した。これにPCAPを加えると、NP_oは0.17と少し上昇し、さらに10mMのMgATPを加えるとNP_oは0.83とかなり上昇した。この様子は表1と図26に示されている。

さらに、AキナーゼでCaチャネルをリン酸化しておくと、ATP + PCAPのCaチャネル活性回復作用はより顕著であった。

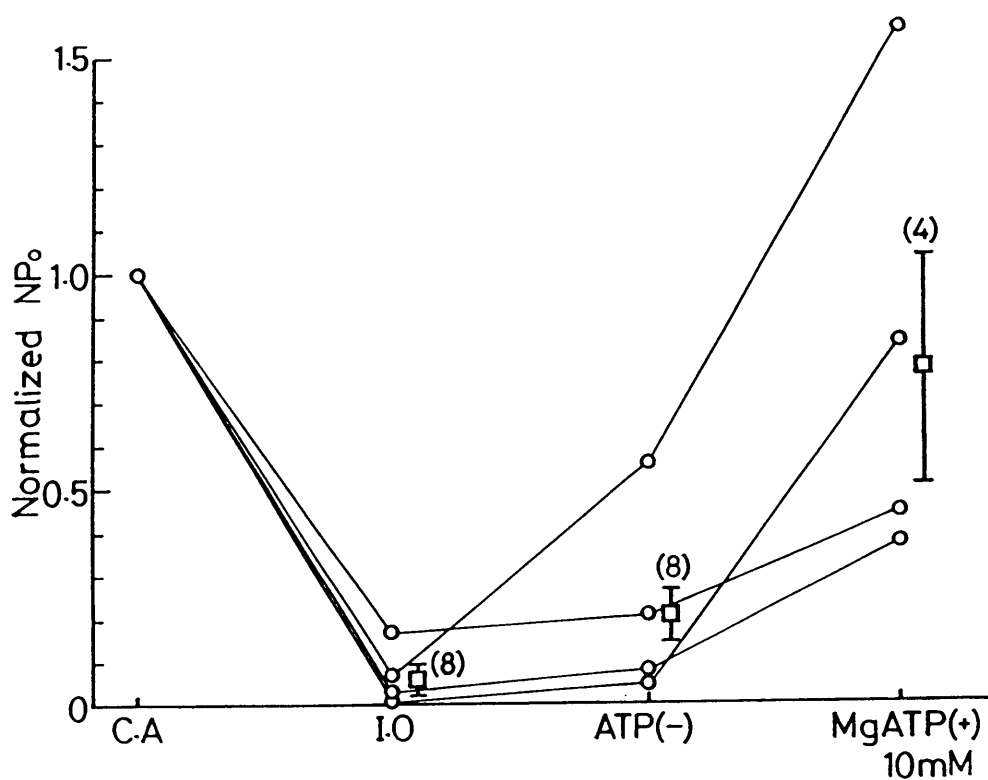


図 26 Caチャネルの活性 (NP_o) と ATP と PCAP の作用

縦軸：正常化された NP_o 値 (開口確率 × チャネルの数)

横軸：C. A.....Cell attach の状態

I. O.....Inside-out の状態

ATP (-)PCAP は投与したが ATP のない場合

MgATP.....PCAP + 10 mM MgATP 投与

PCAP.....Partially purified Ca channel protein

表 1 C a チャンネルの活性

値は N P o (開口確率 x チャンネルの数) を表す。

	mean $\pm$ S. E.	n
Cell attached	1.00	
Inside-outにして 1 分後	0.05 $\pm$ 0.02	10
PCAP 単独	0.17 $\pm$ 0.05	10
PCAP + 10 mM MgATP	0.83 $\pm$ 0.22	5

(値は 1 分間の平均加算をとっている)

4 考察

本実験の結果は、ATPはrun-downしたCaチャネルの活性を回復させないが、PACPはCaチャネルの活性を回復させることがわかった。また、PACPによるCaチャネル活性の回復はATPの存在によって、より顕著となることがわかった。PACPのこの作用はAキナーゼを介していないことが示唆された。その理由としては、PACPのCaチャネル回復作用は、MgATP存在下の時ばかりではなくK₂ATPまたはAMP-PNP存在下でも同様に発現したことがあげられる。

ATPはCaチャネルをリン酸化することによって、Caチャネルの活性を修飾することは、以前から知られている事実である。本実験によって、ATPはCaチャネルのリン酸化ばかりではなく、他の方法（おそらくはATPそのものによる直接作用）によってもCaチャネルの活性を修飾することがわかった。また、Caチャネルをリン酸化した後においても、MgATP+PCAPはCaチャネルを活性化する効果があったことから、ATPの2つの作用（Caチャネルのリン酸化とCaチャネルに対する直接作用）は互いにadditiveであることが示唆された。

以上の実験結果から、細胞内ATPの減少はCaチャネルの活性を低下させることが明らかとなった。従って、心筋が虚血になった場合には、Caチャネルは閉じる方向にあることが示唆された。虚血・再灌流によってカルシウムオーバーロードがおこるが、その時にはカルシウムチャネルは閉じていることが予想される。故に、虚血・再灌流による障害に対してカルシウムチャネル遮断薬が有効なのは、虚血・再灌流時にカルシウムチャネルを通して細胞内に入るカルシウムの量を減らしているからではなく、カルシウムチャネル遮断薬のそれ以外の作用（例えばエネルギー・スペアリング効果）によるものと考えられる。

5 要約

モルモット心筋細胞膜をinside-outにすると、Caチャネルの活性は次第に低下する（run-down）するが、これにPCaPとATPを加えると、チャネルの活性が回復した。虚血心筋中のATPは低下しているから、この時にはカルシウムチャネルの活性は低下しているものと考えられる。