

原 著

高負荷ラット灌流心における diltiazem の
心筋保護作用

榎本 温* 日野原真一** 熊沢光生*

田中行夫*

要 旨

Ca拮抗薬はCa⁺⁺イオン流入抑制による心筋収縮力低下、心拍数の減少、末梢抵抗の低下による左室負荷の軽減によって心筋酸素消費量を減少させることが、虚血時に心筋保護作用をもたらす機序のひとつとして考えられている。我々は心仕事量を一定とした場合に、高負荷による心筋虚血に対して diltiazem が保護作用を示すか否かをラットの心肺標本を用い、灌流血液中に流出するCPKの量で検討した。その結果 diltiazem 群では有意に心筋細胞からのCPKの流出が抑制された。diltiazem の心筋細胞への直接の保護効果が示唆された。

序 文

1964年にCa拮抗薬がFleckensteinら¹⁾によって発見されて以来、その抗不整脈作用、抗狭心症作用、降圧作用、虚血心筋保護作用など数々の有効性が知られてきた。Ca拮抗薬はCaイオン流入抑制による心筋収縮力の低下を通して、心筋の酸素消費量を減少させ、さらに心拍数の減少と血管平滑筋の緊張低下による末梢抵抗の減少により、一層の心筋酸素消費量の減少をもたらすとされる。このような機序でもたらされるCa拮抗薬の心筋酸素消費量抑制効果が、虚血時における酸素欠乏による心筋障害に対して有効的に働く機序の1つではないかとされている。我々は、心拍出

量、収縮期圧、心拍数を一定にした場合、はたしてCa拮抗薬が有効であるのかどうかに興味をいだき、ラットの心肺標本²⁾を用いて、心筋より流出するCPKの量を通して diltiazem が高負荷による心筋虚血障害にどのように働くかを検討すべく以下の実験を行なった。

方 法

実験動物として300-360gのウィスター系雌性ラットを使用した。ペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与による麻酔下に気管切開をし、Y字型気管カニューレを挿入、小動物用人工呼吸器で1回換気量1.5ml、換気回数80回の設定で空気を換気させた。次に開胸し、水冷下に大動脈、上大静脈、下大静脈にカニューレを挿入した。大動脈より駆出された血液は空気圧を利用した末梢抵抗を受け、Reservoirに貯まり、下大静脈に戻る系とした。(図1)灌流血液(25ml)は、他のラットより採血した赤血球をpH7.4に調節したKrebs Ringer Bicarbonate Bufferでヘマトクリット25%にし、エネルギー源としてブドウ糖を5.5mMol/Lの割合で添加した。

冷えて停止していた心臓を37°Cの生食で温めながら、灌流を開始した。心拍出量が30ml/minとなるよう右房還流量を調節し、収縮期圧と心拍数をそれぞれ末梢抵抗とpacingによって調節し、150mmHgと300beats/minとなるようにした。血行動態のモニターとしては、血圧を日本光電製トランスデューサーTP-101Tと圧アンブAP-621Gで、心電図を生体アンブAB-621G

* 山梨医科大学麻酔科学教室

** 山梨県立中央病院麻酔科

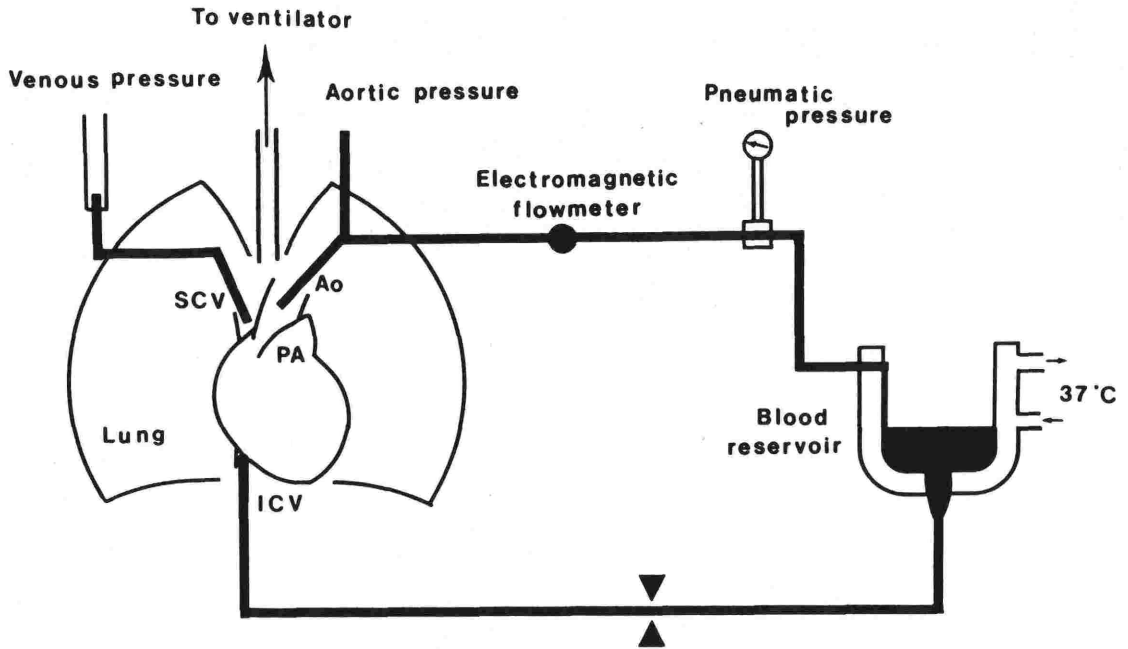


図 1

で、心拍出量を電磁血流計 MFV-1200 でそれぞれ測定した。

灌流は30分間とし、diltiazem 群では diltiazem (CRD-401) を灌流開始 5 分後に $10^{-6}M$ 投与した。Control 群は何も投与しないものとした。循環動態は 5 分間隔で測定し、灌流開始時と終了時にそれぞれ reservoir より採血し、血糖と CPK を新ブラッドシュガーテスト (ベーリンガー・マンハイム) とテトラゾリウム法 (シノテスト) で測定した。Control 群と diltiazem 群の比較には Student's non-paired t test を使用し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結 果

30分間の灌流で、肺うっ血を起こしたものは、control 群 8 例中 4 例、diltiazem 群 7 例中 3 例で、そのうち最後まで心拍出量 30 ml/min で灌流できなかったものは control 群 2 例、diltiazem 群 1 例であった。心不全をおこした control 群の 2 例と diltiazem 群の 1 例は統計処理より除いた。循環動態を表 1 に示す。拡張期圧は、有意差はないものの、diltiazem 群で低い傾向を示した。心拍出量や中心静脈圧に差はなかった。血糖値と CPK 値を表 2 に示す。血糖値に関しては、

表 1: Control 群:c, Diltiazem 群:D 値は平均±標準偏差値

Time (min)	5	10	15	20	25	30
Diastolic pressure (mmHg)						
C	109±9	108±6	107±7	106±7	106±7	107±4
D	100±5	100±6	101±7	99±6	102±7	101±7
Cardiac output (ml/min)						
C	30±1	30±2	29±1	28±4	30±2	30±1
D	30±1	31±1	30±1	30±1	29±1	28±3
Central venous pressure (mmH ₂ O)						
C	32±3	31±5	29±4	29±4	29±3	30±4
D	28±2	29±2	29±2	29±2	30±2	31±5

表 2: 値は平均±標準偏差値, *P<0.025
Control 群:C, Diltiazem 群:D

時間 (分)	0	30	
血糖 (mg/dl)	C	60.2±5.8	35.7±4.6
	D	60.3±6.8	38.4±5.6
CPK (iu/l)	C	3.2±2.7	27.9±9.3
	D	1.1±1.1	16.0±5.2*

30分の灌流でブドウ糖が消費されているが、両群で有意差はなかった。CPK 値は30分の灌流で、control 群 27.9±9.3 IU/l, diltiazem 群 16.0±5.2 IU/l と有意に diltiazem 群で低値を示した。

考 案

通常、ラットの心拍数は 250-400 beats/min, 収縮期圧は 88-184 mmHg であり³⁾, これからは我々が、このラット心肺標本で設定した心拍数 300 beats/min, 収縮期圧 150 mmHg が、心筋障害をもたらす高負荷な条件とはいえない。しかし、control 群では、8 例中 4 例に、diltiazem 群では 7 例中 3 例に肺うっ血が認められ、そのうち control 群では 2 例、diltiazem 群では 1 例が、心拍出量 30 ml/min で 30 分間の灌流に耐えられず心不全を呈した。また、同じ実験標本 3 例で、収縮期圧を 200 mmHg にして灌流を試みたが心不全をおこし、1 例も成功しなかった。したがって、この実験条件が高負荷による心筋障害をもたらすものであることをうらづけている⁴⁾。

ラット心筋に対する diltiazem の虚血保護作用に関する実験における濃度に関しては、 10^{-5} M⁵⁾ から 10^{-7} M⁶⁾ を使用している報告があり、我々は 10^{-6} M を選んだ。予備実験段階で 2 例ほど 10^{-5} M を投与したところ、2 例とも心不全をおこし灌流を続けることができなかった。 10^{-5} M では陰性変力作用が強すぎるものと考えられる。

Diltiazem の心筋保護効果について、①末梢血管抵抗を減少⁷⁾ させて左室負荷を下げる。②冠動脈の拡張によって冠血流を増加させる^{8)~10)}。③心収縮力¹¹⁾ と心拍数を減少させ¹²⁾、心筋酸素消費量を少なくする¹³⁾。などの理由があげられる。①に関しては、本実験では末梢抵抗が空気圧によって一定に保たれているため、diltiazem 投与の

影響はなかった。③に関しても、心拍出量を 30 ml/min に調節し、心拍数を 300 beats/min と一定に pacing しているため、心仕事量は diltiazem 群、control 群とも差はないと考えられる。血中グルコースの消費も有意差はなかった。②に関しては、冠血流の測定は不可能であるので、diltiazem が冠動脈拡張作用を示したかどうかはわからない。

これら①~③の作用は、特に心筋の虚血状態にとってよい。我々の実験モデルは、虚血モデルではないが、左室への負荷条件が限界に近く、CPK の流出から言っても、酸素の需要と供給の不均衡からくる相対的虚血に陥っていると思われる。そのような状態で diltiazem が①~③の作用ではなく、CPK の流出、すなわち細胞膜の障害を抑制したのはなぜであろうか。diltiazem の虚血心筋への直接の保護作用は、Weishaar ら¹⁴⁾ や Nagao ら¹⁵⁾ によって報告されている。Hamm ら¹²⁾ も末梢循環の影響のない Isolated working rat heart を使って、diltiazem の直接の虚血心筋保護効果を報告している。Chien ら¹⁶⁾ は虚血により増加した細胞内 Ca^{++} により phospholipase が活性化され、膜リン脂質を分解し、膜を障害することで、虚血心筋障害が出現すると報告している。このことは、Ca 拮抗薬の Ca イオン流入の抑制作用が心筋保護効果に直接関与していることを示唆している。実際 diltiazem の前投与により、虚血にした心筋より抽出したミトコンドリアの Ca イオン蓄積量は少なく、ATP 産生機能も保持されることが報告されている¹⁷⁾。また、心筋の虚血状態で生じる無機リンの蓄積によって引き起こされるミトコンドリアの膨化を直接防止するという報告もある¹⁸⁾。以上の事から、高負荷における心筋障害に対して、diltiazem は細胞レベルでの保護作用を示したと考えられる。

ま と め

Diltiazem の Ca イオン流入抑制による心筋収縮力低下、心拍数の減少、末梢抵抗の低下は、心筋酸素消費量の減少をもたらす。虚血時における心筋保護作用を有するのみならず、diltiazem は心筋細胞に(おそらく、細胞膜)に直接に、心筋細胞内酵素逸脱を防ぐことがみとめられ、これは、

明らかに心筋への直接保護作用となりうると思われた。

Diltiazem を提供して下さった田辺製薬に感謝いたします。

文 献

- 1) Fleckenstein A: History of calcium antagonists. *Circ. Res.* 52, Suppl I: 3-16, 1983.
- 2) 水野 允, 穴沢園子, 望月正武: 研究実験講座, 2) 灌流実験法, a) 心肺標本—とくにラット, モルモットの心肺標本, 代謝 11: 1775-1780, 1974.
- 3) Mitruka BM, Rawnsley HM: Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. MASSON publishing U. S. A. New, York, P5, 1977.
- 4) 榎本 温, 日野原真一, 立沢恵美子, 田中行夫, 熊沢光生: Rate pressure product と心筋代謝. 心筋の構造と代謝 1984. 六法出版社, 東京, (投稿中)
- 5) 市原和夫, 安孫子 保: Propranolol と Diltiazem による虚血心筋保護効果. 心筋の構造と代謝 1983, 六法出版社, 東京, 111-120, 1984.
- 6) 谷口正幸, 望月正武, 小笹春樹, 山岡広紀, 榎田出, 水野朝敏, 石川真一郎, 永野 允: 心筋微小循環からみた心筋保護—diltiazem を用いて—. 心筋の構造と代謝 1983, 六法出版社, 東京, 99-109, 1984.
- 7) Kuriyama H, Itoh Y, Suzuki H, Kitamura K, Itoh T, Kajiwara M, Fujiwara S: Actions of diltiazem on single smooth muscle cells and on neuromuscular transmission in the vascular bed. *Cir. Res.* 52, Suppl I: 92-96, 1983.
- 8) Taira N, Satoh K, Maruyama M, Yamashita S: Sustained coronary constriction and its antagonism by calcium-blocking agents in monkeys and baboons. *Cir. Res.* 52, Suppl I: 40-46, 1983.
- 9) Nagao T, Ikee T, Sato M: Influence of calcium ions on responses to diltiazem in coronary arteries. *Japan. J. Pharmacol.* 27: 330-332, 1977.
- 10) Millard RW, Grupp G, Grupp IL, DiSalvo J, DePover A, Schwartz A: Chronotropic, inotropic, and vasodilator actions of diltiazem, nifedipine, and verapamil. *Cir. Res.* 52, Suppl I: 29-39, 1983.
- 11) Himori N, Ono H, Taira N: Dual effects of a new coronary vasodilator, diltiazem, on the contractile force of the blood-perfused papillary muscle of the dog. *Japan. J. Pharmacol.* 25: 350-352, 1975.
- 12) Hamm CW, Opie LH: Protection of infarcting myocardium by slow channel inhibitors: Comparative effects of verapamil, nifedipine, and diltiazem in the coronary-ligated, isolated working rat heart. *Cir. Res.* 52, Suppl. I: 129-138, 1983.
- 13) Clozel JP, Théroux P, Bourassa MG: Effects of diltiazem on experimental myocardial ischemia and left ventricular performance. *Cir. Res.* 52, Suppl. I: 120-128, 1983.
- 14) Weishaar R, Ashikawa K, Bing RJ: Effect of diltiazem, a calcium antagonist on myocardial ischemia. *Am. J. Cardiol.* 43: 1137-1143, 1979.
- 15) Nagao T, Matlib MA, Franklin D, Millard RW, Schwartz A: Effects of diltiazem, a calcium antagonist on regional myocardial function and mitochondria after brief coronary occlusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12: 29-43, 1980.
- 16) Chien KR, Reeves JP, Buja M, Bonte F, Parkey RW, Willerson JT: Phospholipid alterations in canine ischemic myocardium temporal and topographical correlations with Tc-99m-PPi accumulation and in vitro sarcolemmal Ca²⁺ permeability defect. *Cir. Res.* 48: 711-719, 1981.
- 17) Morad M, Tung L, Greenspan AM: Effect of diltiazem on calcium transport and development of tension in heart muscle. *Am. J. Cardiol.* 49: 595-601, 1982.
- 18) Vaghy PL, Matlib MA, Szekeres L, Schwartz A: Protective effects of verapamil and diltiazem against inorganic phosphate induced impairment of oxidative phosphorylation of isolated heart mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2603-2610, 1981.

Protective effect of diltiazem on pressure-loaded working heart

Satoshi Kashimoto, Shinichi Hinohara, Yukio Tanaka,
Teruo Kumazawa

Department of Anesthesia, Yamanashi Medical College

To investigate a protective action of diltiazem on high afterload, we studied effects on cellular damage in a isolated rat heart lung preparation. Diltiazem appeared to diminish irreversible damage as shown by its effect in reducing CPK release. In

this isolated rat heart lung preparation, effects on the peripheral circulation can be excluded as a site of action. Hence, this study shows a direct protective effect on the heart with high afterload which is not achieved by decreased heart work.

Key words: Calcium channel inhibitor, Creatinephosphokinase, Diltiazem, Heart lung preparation