

原 著

Reperfusion-induced arrhythmia に対する
Human SOD の効果に関する検討

(Isolated rat heart preparation を用いて)

山本文雄* 田中一彦* 藤原 良**
平石泰三* 村下十志文* 山本浩史*
吉田成彦* 市川 肇* 藤田 毅*

要 旨

Isolated rat heart model を用いて、灌流液である Krebs-Henseleit bicarbonate buffer の中に、Human SOD を各種濃度にて添加し、Langendorff mode 下、左前下行枝を10分間閉塞、その後3分間の Reperfusion を行い、Reperfusion-induced arrhythmia を作成し、各種不整脈の発生頻度、持続時間について検討した。その結果、心室細動および非可逆性心室細動の発生頻度において10万 unit/l から効果が認められ、30万 unit/l を至適濃度とする bell-shaped dose response curve を示すことが判明した。しかしながら、その作用機序に関しては、今後の検討を要するものと思われた。

はじめに

近年、PTCA、PTCR の普及に伴い、時として生じる Reperfusion-induced arrhythmia の発生機序に関する研究^{1,2)} が盛んになり、発生原因の1つとして Free radical が注目されてきている。この arrhythmia は、一旦生じると、患者の生命を奪う重篤なものであり、迅速な対処を要するが、時としてあらゆる治療に抵抗し、結果的に救命できないこともある。そのためこの予防として、Free radical scavenger の投与が言われている。生体

内に比較的豊富に存在する Free radical scavenger である Superoxide dismutase (SOD) が、Reperfusion-induced arrhythmia に有効であるという報告^{3,4)} が認められるが、これら SOD の報告は、Bovine SOD など、他の動物種から得られたものである。今回我々は、Human SOD の Reperfusion-induced arrhythmia に対する効果について検討したので報告する。

方 法

Isolated rat (Wistar 系、体重 280-320 g) heart preparation を用いて検討を加えた。5分間の Langendorff washing perfusion (100 cmH₂O, 落差灌流) 下に、冠動脈左前下行枝の周囲に 5-0 prolene 糸をかけておき、この糸を直径 1 mm のナイロン製 occluder に通して、10分間の regional ischemia を作成し、その後この occluder を解除し3分間の reperfusion を行った。全経過を通じて、epicardial ECG を monitor し、reperfusion 後の心室細動、心室頻拍、心室性不整脈の発生頻度を検討した。灌流液は Krebs-Henseleit bicarbonate buffer を用い、これに Human SOD を0, 2.5, 5, 10, 30, 60万 unit/l の濃度で添加することにより、比較検討した。それぞれの濃度群に用いた rat の数は、control 群 24匹、SOD 添加群では各12匹である。統計処理は、Control 群と SOD 添加群とにおいて Student t-test または Chi-square test を用いて施行

*国立循環器病センター心臓外科

**日本化薬総合研究所

した。

結 果

表1にその結果を示した。

1) 心室細動の発生頻度：図1に示した如く、その発生頻度は、control群に於いては、100%であり、2.5万unit群では効果を認めず、5万unit群で75%と減少し、10万unit群で66.7% (p<0.05), 30万unit群で50% (p<0.001) と有意にその発生頻度を低下させ、SOD濃度60万unit群では再び増加する mirrored bell-shaped dose response curve を示した。

2) 非可逆的心室細動の発生頻度：図2に示した如く、非可逆性的心室細動の発生頻度は同様に、5万unit群から効果を示し、30万unit群では、12匹中4匹33.3%と最も有効 (p<0.05) であり、60万unit群では50%に再び増加した。

3) 心室細動の持続時間：図3に示した如くcontrol群においては144±10秒であったが、5万unit群、10万unit群ではそれぞれ105±22秒、101±32秒と短縮傾向を見せ、30万unit群では59

±23秒と有意 (p<0.001) に短縮し、60万unitにおいても96±2秒と有意 (p<0.05) に短縮させた。

4) 心室頻拍の発生頻度及び持続時間：表1, 図4, 5に示した如く、これらに対しては、SOD添加群においては、control群とほとんど差を認めなかった。持続時間において、60万unit群では、control群に対して、有意に延長しているものの、その持続時間は短く、特に意味を持っているとは考えにくいと判断された。

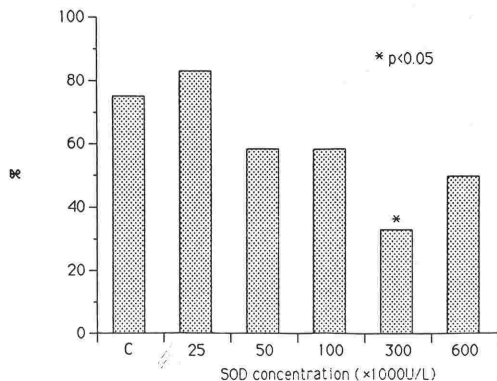


図2 非可逆的心室細動の発生頻度

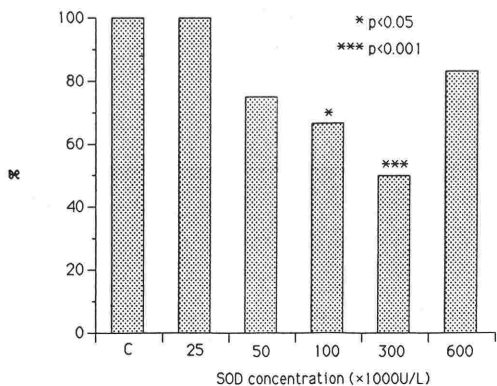


図1 心室細動の発生頻度

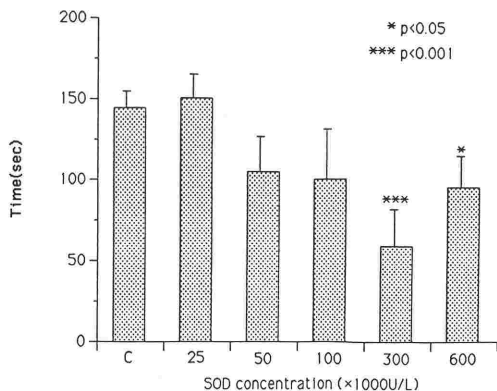


図3 心室細動持続時間

表1 VF, VT, PVC の発生頻度及び持続時間

	Control	2.5万	5万	10万	30万	60万
Incidence of VF (%)	100 (24/24)	100 (12/12)	75 (9/12)	66.7* (8/12)	50*** (6/12)	83.3 (10/12)
Incidence of irre. (%)	75 (18/24)	83.3 (10/12)	58.3 (7/12)	58.3 (7/12)	33.2* (4/12)	50 (6/12)
Duration of VF (秒)	144±10	151±15	105±22	101±32	59±23***	96±2*
Incidence of VT (%)	91.6 (22/24)	100 (12/12)	83.3 (10/12)	91.7 (11/12)	75 (9/12)	100 (12/12)
Duration of VT (秒)	8±1	7±1	11±3	11±2	8±2	19±7**
Number of PVC (counts/3 min)	102±86	105±17	143±39	154±31	101±22	192±74

*p<0.05, **p<0.02, ***p<0.001

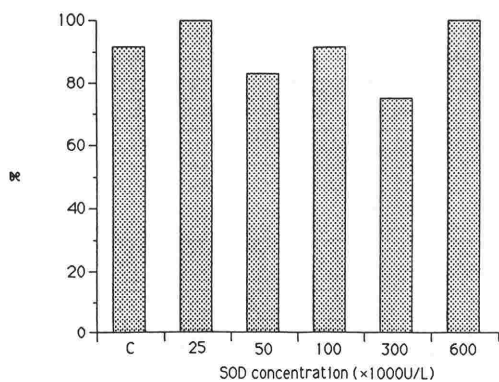


図4 心室頻拍の発生頻度

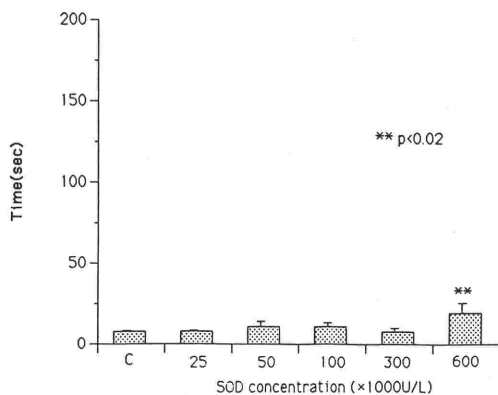


図6 心室性期外収縮の発生頻度

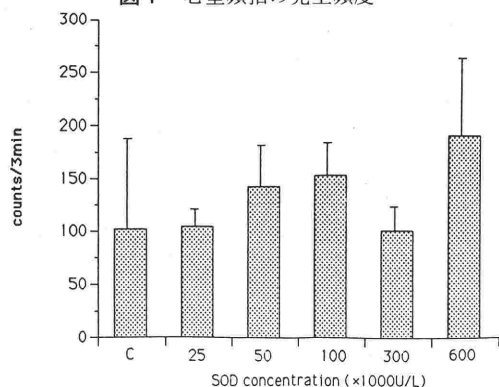


図5 心室頻拍の持続時間

5) 心室性期外収縮の発生頻度: 表1, 図6に示した如く, SOD 添加群において, control 群に比して若干多い傾向にあったが, 統計的に有意差を認めることはできなかった。

考 察

Tennant and Wiggers ら⁵⁾により, Reperfusion-induced arrhythmia の報告がなされて以来, その mechanism に関する検討がなされてきたが, 未だ定説を見ていない。一方, PTCA, PTCR などの普及に伴い, 時として生じるこの種の致命的不整脈が, 死と直結することから, 精力的な研究により, この防止法が臨床医から熱望されていることは諸家の認めるところであろう。電気生理学的には, re-entry 説が有力な発生機序^{6,7,8)}として支持を受けているようであるが, この生化学的 mechanism の解明に関し様々な報告がなされ, 未だ混沌としているのが現状である。現在までの報告においては, alpha および beta-receptor に対する刺激^{9,10,11)}, lysophosphatide の形成¹²⁾, arachidonic acid pathway に

おける代謝産物¹³⁾, 細胞内外の ion balance の不均衡^{14,15)}, cytotoxic な free radical^{3,4)}, などが原因として報告されているが, 今なお詳細は不明である。さらに, この種の不整脈の発生に関しては, Intracellular Ca-overloading が, その mechanism の一因との見地から Ca-blocker の応用¹⁶⁾, 高 Mg 液の応用¹⁷⁾ などがなされその有効性を認めているが, 完全には防止できていない。我々もその発生機序として oxygen-derived free radical が何らかの関与をしているのでは, との見地から, その scavenger の一つで, 生体内に比較的豊富に存在する Human SOD の効果について検討してみた。従来より用いられているこの種の薬剤は, 他の動物種由来のものが多く, Human SOD を用いて検討を加えたものは少ない。Human SOD による効果は30万 unit/l の濃度を至適とする bell-shaped dose response curve を示した。この理由は定かではないが, 構造的に2価の ion を含み, これが濃度を増す毎にある種的作用を発揮し, それが有効性消失につながる一因ではないかとの推測も可能であり, 今後の検討を要するものと思われる。この bell-shaped dose response curve を示す理由は別として, 至適投与量を用いる限りにおいて, この致死的不整脈を減少させるということは, とりもなおさず Reperfusion-induced arrhythmia の発生に対する superoxide radical の関与は否定できないことを示唆するものであろう。こう言った報告は散見され, xanthine oxidase inhibitor である allopurinol¹⁴⁾, また glutathione, bovine SOD の有効性の報告³⁾ などが認められる。しかしながら, もしこの SOD が radical scavenger として働き, それが reper-

fusion-induced arrhythmia にきくとするなら、どのような機序で働くのであろうか。その疑問点として 1) 分子量30000以上の物質が果たして細胞膜を通過するかどうか。2) 虚血により細胞膜の構造が変化し、通過可能となるかどうか。3) 血管内皮細胞に対してどのように作用しているかどうか。4) 細胞内に入った SOD が, superoxide radical を scavenge し, その結果生じる過酸化水素, hydroxycal radical などがさらに同様の病態を発生するかどうか, 等数多くの未解決の問題がある。こう言った問題が徐々に解決されれば, Reperfusion-induced arrhythmia の mechanism 解明と治療に大いに役立つものと思われる。

文 献

- 1) Corr, P. B., Witkowski, F. X.: Potential electrophysiologic mechanisms responsible for dysrhythmias associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation*. **68(Supple 1)**:16-24, 1983.
- 2) Manning, A. S., Hearse, D. J.: Reperfusion-induced arrhythmia: mechanism and prevention. *J. Mol. Cell Cardiol.* **16**:497-518, 1984.
- 3) Woodward, B., Zakaria, M. V. M.: Effect of some free radical scavengers on reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **17**:485-493, 1985.
- 4) Manning, A. S., Coltart, D. J., Hearse, D. J.: Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xantine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res.* **55**:545-548, 1984.
- 5) Tennant, R., Wiggers, C. J.: The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am. J. Physiol.* **112**:351, 1935.
- 6) Kaplinsky, E., Ogawa, S., Michelson, E. L., and Dreifus, L. S.: Instantaneous and delayed ventricular arrhythmias after reperfusion of acutely ischemia myocardium: Evidence for multiple mechanisms. *Circulation* **63**:333-340, 1981.
- 7) Levites, R., Banka, V. S., and Helfant, R. H.: Electrophysiologic effects of coronary occlusion and reperfusion. *Circulation* **32**:760-765, 1975.
- 8) Murdock, D. K., Loeb, J. M., Ealer, D. E., and Randall, W. C.: Electrophysiology of coronary reperfusion: A mechanism for reperfusion arrhythmias. *Circulation* **61**:175-182, 1980.
- 9) Sheridan, D. J., Penloske, P. A., Sobel, B. E., Corr, P. B.: Alpha adrenergic contributions to dysrhythmia during myocardial ischemia and reperfusion in cats. *J. Clin. Invest.* **65**:6-7, 1980.
- 10) Corbalan, R., Verrier, R. L., Lown, B.: Differing mechanisms for ventricular vulnerability during coronary artery occlusion and release. *Am. Heart J.* **223-230**, 1976.
- 11) Kimura, S., Cameron, J., Kozlovstis, P., Bassort, A., Myerberg, R. J.: Delayed after depolarization and triggered activity induced in feline Purkinje fibers by alpha-adrenergic stimulation in the presence of elevated calcium levels.
- 12) Coll, P. B., Cain, M. E., Witkowski, F. X., Price, D. E.: Potential arrhythmogenic electrophysiological derangement in canine Purkinje fibers induced by lysophosphoglycerides. *Circ Res.* **44**:822-832, 1979.
- 13) Jugdutt, B. I., Hutchins, G. M., Bilkley, B. H., Becker, L. S.: Salvage of ischemic myocardium by ibuprofen during infarction in the conscious dog. *Am. J. Cardiol.* **46**:74-82, 1986.
- 14) Hill, J. L., Gattes, L. S.: Effects of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K⁺ activity in swine. *Circulation* **61**:768-772, 1980.
- 15) Hirche, H. H. J., Friedrich, R., Kebble, U., McDonald, F. M., Zylka, V.: Early arrhythmias, myocardial extracellular potassium and Ph. In: *Early Arrhythmias Resulting from Myocardial Ischemia Mechanism and Prevention by Drugs*. Ed. JR Parratt. McMillan Press 1982: London 113-124.
- 16) Marshall, R. J., Campbell, J., and Winslow, E.: Comparison of effects of bepridil and verapamil on reperfusion-induced dysrhythmias and anoxia-induced coronary vasoconstriction. *J. Moll. Cell. Cardiol.* **13(Supple 1)**:54 (abstract).
- 17) Manning, A. S., Hearse, D. J.: Reperfusion-induced arrhythmia-mechanisms and prevention. *J. Moll. Cell. Cardiol.* **16**:497-518, 1984.

The Effects of Human SOD upon Reperfusion-induced arrhythmia (Using the isolated rat heart preparation)

Fumio Yamamoto, Kazuhiko Tanaka, Ryo Fuziwara,
Taizo Hiraishi, Toshifumi Murashita, Hiroshi Yamamoto,
Shigehiko Yoshida, Hazime Ichikawa and Tsuyoshi Fujita

Department of Cardiovascular Surgery National Cardiovascular Center
5-7-1, Fujishiro-dai, Suita city Osaka, 565 Japan

Using the isolated rat heart preparation, the effects of Human SOD upon reperfusion-induced arrhythmia were evaluated in this study. Under the condition of Langendorff perfusion with Krebs-Henseleit bicarbonate buffer containing various concentration of Human SOD, left anterior descending coronary artery was occluded for 10 min to produce regional ischemia. After this, reperfusion was performed by releas-

ing the occluder. Epicardial ECG was analysed in terms of incidence of ventricular fibrillation (VF) and the duration of VF. Human SOD had the bell-shaped dose response curve and its optimal dose was 30×10^4 unit/l to prevent the reperfusion-induced arrhythmia. It was concluded that Human SOD has the beneficial effect upon reperfusion-induced arrhythmia when 30×10^4 unit/l of optimal dose was employed.

Key words: Reperfusion induced arrhythmia, Human SOD, Free radical, Regional ischemia, Rat heart