

原著

ラット摘出心における虚血時間と再灌流不整脈との関係

榎田高士* 田中一彦* 中村正人**
 田倉学* 泉 貴文* 末包慶太*
 古賀義久*

要 約

虚血時間と再灌流不整脈との関係について検討した。ウイスターラット96匹（8群，各群12匹）を用い，ランゲンドルフ法による冠灌流をクレブス液を用いて行なった。左前下行枝の結紮，解除により，虚血および再灌流を行った。虚血時間を5分，10分，11分，12分，13分，15分，20分，30分の8群に分け，再灌流不整脈を検討した。再灌流不整脈の観察時間としては再灌流後，3分間，5分間，10分間の各群とし，検討した。

心室細動（VF）発現頻度は虚血時間10分群で75%，11分～15分群で100%，20分群では92%，30分群では17%と低下した。観察時間（3分間）まで持続した sustained VF 発現率は虚血時間11分群で92%をピークとするベル型を示し，VF 持続時間についても虚血時間11分群をピークとする同様なベル型の曲線を示した。

再灌流不整脈の観察時間についての検討では再灌流後3分での sustained VF の発現率と再灌流5分値の傾向が同じであり，またVF 持続時間でも0-3分，0-5分ではほぼ同様な傾向を示した。

以上より，再灌流不整脈を予防する薬剤の検討を行う場合，重症不整脈の最も発生率の高い虚血時間11分で実験を行うことが望ましく，また再灌流後3分までの観察で実験結果の評価が可能であると考えられた。

緒 言

心筋虚血後に再灌流すると重症不整脈が発生することが知られている¹⁾。臨床的にも虚血心の再灌流療法，心臓手術中の心停止後の再灌流における合併症として注目されている。一方，動物実験モデルにおいては再灌流不整脈発生のメカニズムとその予防法が検討されつつある。しかし，個々の実験の虚血範囲の大きさや虚血時間の違い等の影響により，再灌流性不整脈発現頻度には報告者による差が認められ，十分に検討されていない。そこで，我々はランゲンドルフ灌流モデルを用い，虚血時間と再灌流不整脈発現頻度の関係を分析すると共に，再灌流後の不整脈観察時間についても検討を加えた。

対象および方法

1. 実験動物は273-318gの雄性ウイスター系ラットを用い，各群12匹とした。
2. 灌流モデルの作成および灌流法
 ラットをエーテル麻醉し，ヘパリン200単位を大腿静脈から投与，1分後に心臓を摘出，4℃の灌流液で冷却後，直ちにランゲンドルフ法による冠灌流を開始した。灌流液には95%酸素+5%炭酸ガスで飽和させた37℃の Krebs-Henseleit 緩衝液（mmol/l：NaCl 118.5，NaHCO₃ 25，KCl 3.2，KH₂PO₄ 1.19，MgSO₄7H₂O 1.18，CaCl₂6H₂O 2.5，glucose 11）を用い，100cmH₂Oの静水圧による冠灌流を行った。灌流液は使用前にフィルター（0.45μm，ミリポア）により濾過した。心電図電極を心尖部と大動脈起始部に装着，心電計（HR-3，三栄電子）でモニターしながら，記録

*近畿大学医学部麻醉科学教室

**市立貝塚病院麻醉科

計 (レクチコーダー, 日本光電工業) にて 25mm/sec の紙送り速度で記録して心拍数の計測と不整脈の分析を行った. 心拍数は後述する各測定ポイントの前30秒間の計測値を二倍して算出した. また後述する各測定点において流出する灌流液を前1分間測定し, 各時点における冠灌流量とした.

3. 灌流モデルの経時的变化の観察

23匹の摘出心について, ランゲンドルフ法による冠灌流を60分間にわたって行い, 心拍数, 冠灌流量の経時的变化を観察した.

4. 虚血の作成法と虚血時間

冠状動脈起始部付近の左前下行枝周囲に針付き糸 (5-0 ネスピレン, 日本商事) をまわし, 糸の両端をプラスチックチューブのオクルーダーの中へ通した. 15分間の灌流を行い安定した後, 実験を開始した. 虚血はオクルーダーで前下行枝を結紮することにより作成し, 再灌流はオクルーダーによる結紮を解除することにより行った. 虚血時間を5, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 30分の8群 (各群12匹) に分け検討した.

5. 不整脈の解析法および観察時間

心電図を再灌流直前から灌流後10分まで 25mm/sec で連続記録し, 出現した不整脈を Lambeth Conventions ガイドライン²⁾に従って心室頻拍 (VT), 心室細動 (VF) および心室性期外収縮 (PVC) について分析した.

なお再灌流後3分, 5分, 10分の観察時間の終了時に VF の持続を認めたものを各時点での sustained VF とした. また VF 持続時間は再灌流開始から3, 5, 10分の観察時間内に認められた VF の時間総計とした.

6. 冠灌流量の測定法

冠灌流量は虚血前, 虚血中, 再灌流後, 3分, 5分, 10分について各々1分間について流出する灌流液量を測定した.

7. 虚血領域の測定

我々の結紮方法による虚血範囲を求めるため, 実験終了後, 無作為に30匹を選び, 再度左前下行枝を結紮後, 0.5% スルファンブルー (ディスプレインブルー, 東京化成) を大動脈から注入し, 20分間, 灌流液で虚血部以外の領域の色素を洗い流した. その後, 心房および心耳を切除, 心室の染色された虚血領域の部分と染色されていない灌流領域の部分それぞれ切り出し, 濾紙で水分を吸収した後, 染色された虚血領域の湿重量と全心室重量との比 (%) を求めた³⁾.

8. 統計解析

統計処理には χ^2 検定 (Yates の補正) および paired Student's t-test を用い, 群間の検定には分散分析を行い, 有意を認めた場合, unpaired Student's t-test を用いた. なお $p < 0.05$ を有意と判定した. 測定値は平均±標準誤差で表した.

結 果

1. 灌流モデルの経時的变化

冠灌流開始から15分後には冠灌流量, 心拍数は安定し, その後, 冠灌流開始後60分までの45分間は冠灌流量, 心拍数のどちらにも有意差は認められなかった (表1).

2. 虚血時間と冠灌流量および心拍数の変化

冠灌流量については結紮後, 約60%に減少, 心拍数についても結紮後低下した. 再灌流後, 冠灌流量は虚血前より上昇し, 徐々に結紮前値にもどる

Table 1

Duration of perfusion (min)	0	5	10	15	20	30	40	50	60
Heart rate (beats/min)	338±4	309±6 ^a	297±4 ^{ab}	289±4 ^{abc}	289±5 ^{abc}	284±4 ^{abc}	284±4 ^{abc}	284±4 ^{abc}	284±4 ^{abc}
Coronary flow (ml/min)	15.6±0.4	12.7±0.3 ^a	11.4±0.3 ^{ab}	10.5±0.2 ^{abc}	10.2±0.3 ^{abc}	10.2±0.2 ^{abc}	10.1±0.2 ^{abc}	10.3±0.3 ^{abc}	10.4±0.3 ^{abc}

Changes of heart rate and coronary flow during 60min of perfusion period without any intervention. There were no statistically significant changes after 15min of perfusion.

Values are means ± SEM

a : P < 0.05 vs 0min b : P < 0.05 vs 5min c : P < 0.05 vs 10min

傾向を示した。虚血前値、虚血中の心拍数については各群間に統計的有意差は認めなかったが、再灌流後には心室細動の発生で心拍数の測定できた例数が少ないためか一定の傾向は認められなかった(表2, 3)。

3. 虚血時間と不整脈発生についての分析

3-1. VTおよびVFの発現頻度

VTは虚血時間5分群を除く全ての虚血時間群で100%認められた。

VFについても虚血時間5分群を除く群で認め

られ、11~15分群で100%であったが、虚血時間30分群では17%と大きく低下した(図1 a) b))。

3-2. 虚血時間とsustained VFの発現頻度

Sustained VFの発現頻度は再灌流後3分の時点で虚血時間11分群をピークとするベルシェーブを示した(図2 a)。再灌流後5分の時点においても3分の時点と同様虚血時間11分群をピークとするベルシェーブを示した(図2 b)。再灌流後10分の時点ではsustained VFの発現頻度は減少したが、虚血時間11分群、13分群でなお42%認め

Table 2

Ischemic time (min)	Control (sec)	Ischemia (sec)	After reperfusion		
			3 min (sec)	5 min (sec)	10min (sec)
5	10.6±0.5	6.7±0.3 ^a	13.1±0.8 ^{ab}	11.8±0.8 ^b	9.8±0.6 ^b
10	11.5±0.5	7.0±0.4 ^a	14.1±0.5 ^{ab}	14.0±0.6 ^{ab}	13.8±0.9 ^{ab}
11	10.9±0.4	6.5±0.2 ^a	15.0±0.6 ^{ab}	15.4±0.6 ^{ab}	14.5±0.8 ^{ab}
12	11.2±0.4	7.0±0.3 ^a	15.1±0.5 ^{ab}	15.5±0.8 ^{ab}	14.8±0.8 ^{ab}
13	10.7±0.3	6.4±0.2 ^a	14.0±0.5 ^{ab}	15.0±0.7 ^{ab}	14.0±0.7 ^{ab}
15	11.0±0.5	7.0±0.3 ^a	14.4±0.6 ^{ab}	13.8±0.5 ^{ab}	13.2±0.6 ^{ab}
20	11.6±0.4	6.7±0.4 ^a	15.5±0.9 ^{ab}	14.6±0.8 ^{ab}	13.5±0.8 ^{ab}
30	11.2±0.4	6.5±0.2 ^a	11.6±0.6 ^b	11.7±0.6 ^b	11.6±0.7 ^b

Changes in coronary flow (ml/min) in each study group. Groups were divided according to the duration of coronary occlusion (Ischemic time).

Ischemic time = Duration of coronary occlusion (min).

Control = Values just before the coronary occlusion.

Ischemia = Values just before the reperfusion.

Values are means ± SEM

a : P < 0.05 vs Control, b : P < 0.05 vs Ischemia

Table 3

Ischemic time (min)	Control (sec)	Ischemia (sec)	After reperfusion		
			3 min (sec)	5 min (sec)	10min (sec)
5	281±6	262±8 ^a	284±7	277±8	268±6
10	288±9	263±8 ^a	274±13 (n=7)	271±13 (n=7)	269±11 (n=8)
11	287±11	269±6 ^a	282 (n=1)	252±8 (n=5)	278±12 (n=6)
12	289±4	269±6 ^a	274±8 (n=5)	276±7 (n=5)	282±6 (n=9)
13	284±9	260±7 ^a	255±16 (n=4)	263±13 (n=4)	267±9 (n=9)
15	283±9	265±9 ^a	256±16 (n=6)	272±11 (n=8)	273±9 (n=9)
20	280±5	249±5 ^a	249±6 (n=8)	251±5 (n=9)	254±5 (n=11)
30	281±6	249±5 ^a	249±7 (n=11)	254±7 (n=11)	261±7 (n=11)

Changes in heart rate (beats/min) in each study group. Groups were divided according to the duration of coronary occlusion (Ischemic time).

Values are means ± SEM

Ischemic time = Duration of coronary occlusion (min).

Control = Values just before the coronary occlusion.

Ischemia = Values just before the reperfusion.

a : P < 0.05 vs Control, b : P < 0.05 vs Ischemia

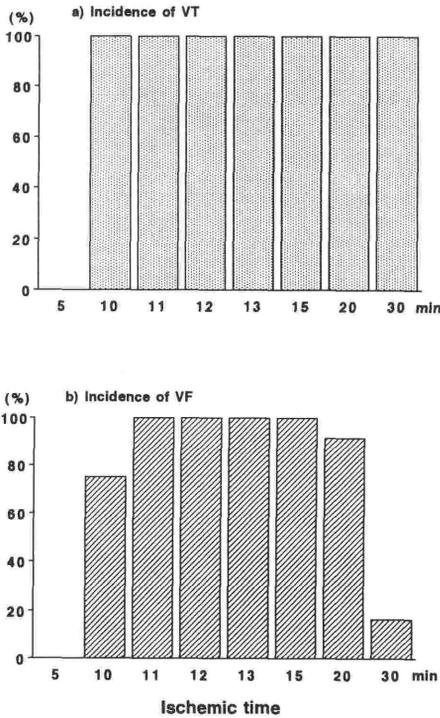


Fig. 1 Incidence of ventricular tachycardia (VT) and ventricular fibrillation (VF)

た (図 2 c).

3-3. VF 持続時間

VF の持続時間について、観察時間 3 分、5 分、10 分とも虚血時間 11 分の群をピークとするベルシェーブを示した。これらの結果は各々の観察時間 3 分、5 分、10 分ではほぼ同様なカーブを示した (図 3)。

3-4. VT の持続時間、PVC の数

VT は虚血時間 5 分群では認めず、虚血時間 15 分以上で増加の傾向を示した。PVC については群間に差を認めなかった (表 4)。

4. 虚血領域の測定

虚血領域は全心室重量の $37.9\% \pm 6.7\%$ (平均土標準偏差) で、最大値は 48.8%，最小値は 25.7% であった。

考 察

再灌流直後に発生する心室細動、心室粗動、心室頻拍などの重篤な不整脈発生原因についてカルシウムイオンの overload⁴⁻⁶⁾、活性酸素ラジカル⁷⁻⁹⁾などが関与することが報告されているが、ま

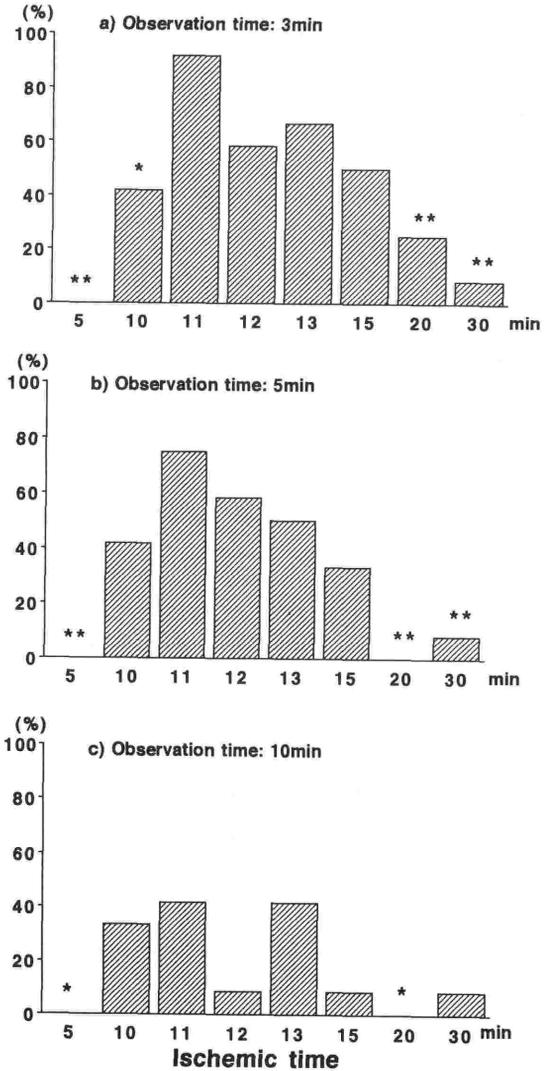


Fig. 2 Incidence of sustained ventricular fibrillation (VF).

Sustained VF is defined as VF that continued at the end of 3, 5 or 10 minutes of observation time after reperfusion.

** : $P < 0.01$ vs 11 min group * : $P < 0.05$ vs 11 min group

だ不明な点もあり確定されるには至っていない。しかし、左前下行枝結紮による局所の虚血モデルについてはすでに多くの研究がなされており、本モデルによる再灌流不整脈は虚血領域の大きさ³⁾、¹⁰⁾、¹¹⁾、虚血時間の長さ¹⁾、¹¹⁾、¹²⁾、¹³⁾、心拍数¹³⁻¹⁴⁾、灌流液の組成¹²⁾などにより発生頻度が異なることが報告されている。また灌流圧、灌流液の温度な

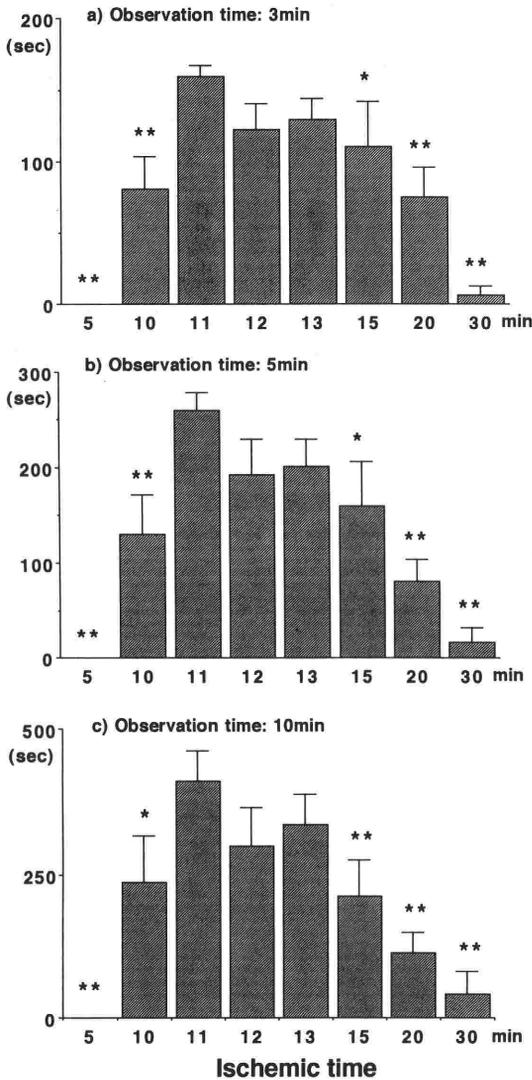


Fig. 3 Duration (sec) of reperfusion-induced ventricular fibrillation in each study group. 0-3, 0-5, 0-10 min mean the observation time after reperfusion.

Values are means \pm SEM

** : $P < 0.01$ vs 11 min group * : $P < 0.05$ vs 11 min group

ども再灌流不整脈発生頻度に影響を与えることが予想される。抗不整脈作用薬等の効果判定のためには高率に再灌流不整脈を安定して発現させることが必要であり、これらの因子について十分検討を行っておく必要がある。

灌流モデルの経時的变化、安定性について検討したが、灌流開始後15分で標本の心拍数、冠灌流

量は平衡状態になり、その後、安定が持続した。そのため、実験は灌流開始後15分後から開始した。

虚血領域の大きさについては、我々の結果は $37.9 \pm 6.7\%$ であったが、Curtis ら³⁾ は同様な結紮方法でその虚血領域は $45.8 \pm 1.7\%$ 、Kusama ら⁷⁾ は $43.3 \sim 44.7\%$ と報告している。また大井ら¹⁰⁾ は $39.4 \pm 11.8\%$ と報告し、再灌流性不整脈実験の結果の評価において虚血領域の測定が重要であると述べている。これらの結果の違いは前下行枝を結紮する際、糸をかける位置、深さの違いによって起こるものと考えられ、虚血時間を一定した場合、この虚血領域の違いが不整脈発現頻度に大きな影響を与えるものと推察された。不整脈発生率を安定されるためには一定の位置に結紮用の糸をかけることが重要と考えられる。

虚血時間と再灌流時の VF 発現頻度で、VF 出現頻度のピークになる虚血時間は Tosaki¹²⁾、牧野ら¹³⁾ は 10 分、Shuter ら¹¹⁾ は 12 分から 16 分、Manning ら¹⁾ は 15 分、Bernier ら¹⁴⁾ は 15 分であったと述べている。我々の結果では、虚血時間 11 分 ~ 15 分群で VF 発現頻度が 100% であったが、sustained VF 発現頻度、VF 持続時間については虚血時間 11 分群をピークとするベルシェーブ型を示した。このベルシェーブ型をとることは多く報告¹⁾¹¹⁻¹⁴⁾ され、ベルシェーブを描く理由については、心筋障害の不可逆的な変化のおこる時間に関係していると考えられている。即ち、虚血時間が短い間は心筋の傷害が少なく、心筋の興奮性は高まり不整脈が発生しやすくなるが、虚血がある時間より長くなると、心筋障害の程度が強くなりすぎ不可逆的な変化が起こり、かえって不整脈が発生しなくなるのではないかと推察されている¹⁾。

VF 出現頻度は虚血 11 分 ~ 15 分群では 100% であり、これらの結果からは実験のコントロールとして虚血時間は 11 分から 15 分が適切と考えられた。しかし、再灌流後 3 分、5 分、10 分間での sustained VF 出現頻度からみた場合、虚血時間 11 分から 15 分の中でも虚血 11 分群が最も sustained VF の発生が高率であり、また再灌流後 3 分間、5 分間、10 分間に発生する VF 時間についても 11 分虚血群が虚血群の中で最も長く、これらの結果から、虚血時間 11 分が不整脈を高率に発生させる実験のコントロールとして最も適していると考えられた。

Table 4

Ischemic time (min)	Duration of VT			Number of PVC		
	3 min (sec)	5 min (sec)	10min (sec)	3 min (number)	5 min (number)	10min (number)
5	—	—	—	3±1	3±1	3±1
10	9.7±2.8	9.8±2.9	16.8±7.0	105±28	108±30	190±83
11	9.0±1.8	10.9±2.7	23.0±4.8	99±15	109±22	282±70
12	7.8±1.7	9.5±2.2	19.6±4.3	90±18	96±22	208±34
13	6.3±0.9	11.2±3.1	23.1±7.9	98±23	129±24	288±95
15	20.2±5.8	22.2±6.4	40.1±11.6	157±45	186±54	365±105
20	35.7±9.0 ^b	42.5±9.0 ^c	62.8±14.7	409±103	468±103	652±156
30	57.4±7.5 ^a	59.2±8.2 ^a	59.3±8.3	438±1049	1461±1054	1475±1056

Variables of reperfusion-induced ventricular arrhythmias in each study group. In this table, 3, 5, 10minutes means observation time after reperfusion. PVC : Ventricular premature contraction.

Values are means ± SEM

a : P < 0.01 vs 10, 11, 12, 13, 15 and 20 min group.

b : P < 0.01 vs 10, 11, 12, 13 and 15 min group.

c : P < 0.05 vs 13 min group. d : P < 0.05 vs 10, 11, 12 and 13 min group.

観察時間の問題であるが、再灌流不整脈を灌流直後から3, 5, 10分間にわたって観察、分析したが、VTは再灌流後2-3秒後に発現し、VFに移行するものがほとんどであり、一旦VFになったものは5分以上連続する傾向を示した。その後、VFは時間経過とともに正常調律に復したが、その経過中にVT、PVCが発現した。そのためVT時間、PVCの数は観察時間の5分から10分間で増加した。

左前下行枝結紮および解除による実験モデルを虚血、再灌流障害の防止薬剤の評価に用いる場合には、一般にVFの発現頻度、sustained VFの発現頻度、VF持続時間が薬効の判定指標として用いられている。そのため実験のコントロールとしては高率に再灌流不整脈が発現し、また再現性が高いことが必要である。sustained VF出現率は再灌流3分、5分の時点でほぼ同様の出現傾向を示し、またVF持続時間についても3分値、5分値はsustained VFの存在のため各虚血群ほぼ同様な増加を示した。このことから、再灌流障害の防止を評価するための実験においてはその観察時間は再灌流後3分間の値まで分析すれば再灌流不整脈の評価が可能と考えられた。

ま と め

ラット摘出心、ランゲンドルフ灌流モデルを用

い、虚血時間と再灌流不整脈およびその観察時間について検討した。

左前下行枝の結紮による虚血範囲(37.9±6.7%)においては、sustained VFの出現頻度、VF持続時間は虚血時間11分群をピークとするベルシェーブ型を示し、再灌流不整脈を指標とする実験では虚血時間11分が適当と考えられる。また再灌流不整脈の観察時間については再灌流後3分で評価が可能と考えられた。

文 献

- 1) Manning AS, Hearse DJ : Reperfusion-induced arrhythmias : mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 16 : 497-518, 1984
- 2) Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, et al : The Lambeth Conventions : Guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22 : 447-455, 1988
- 3) Curtis MJ, Hearse DJ : Reperfusion-induced arrhythmias are critically dependent upon occluded zone size : relevance to the mechanism of arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 21 : 625-637, 1989
- 4) Opie LH : Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 80 : 1049-1062, 1989
- 5) Smith GL, Allen DG : Effects of metabolic blockade on intracellular calcium concentration in isolated ferret ventricular muscle. *Circ Res* 82 : 1223-1236, 1988
- 6) Tanaka K, Nakamura M, Umeda T, et al : Effects of sevoflurane and halothane on reperfusion-induced arrhythmia in the isolated rat heart. *Clin Ther* 15 : 1085-1093, 1993

- 7) Kusama Y, Bernier M, Hearse DJ : Exacerbation of reperfusion arrhythmias by sudden oxidant stress. *Circ Res* 67 : 481~489, 1990
- 8) Manning AS, Coltart DJ, Hearse DJ : Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effect of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res* 55 : 545~548, 1984
- 9) Manning A, Bernier M, Crome R, et al : Reperfusion-induced arrhythmias : a study of the role of xanthine oxidase-derived free radical in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 20 : 35~45, 1988
- 10) 大井至, 小沢尚美, 中村敬太 : 麻酔ラット心臓における再灌流性不整脈の病因解析 : 虚血領域の大きさおよび血行動態の影響. *日薬理誌* 100 : 87~95, 1992
- 11) Shuter SL, Bernier M, Hearse DJ, et al : Manipulation of myocardial alpha-tocopherol level fails to affect reperfusion arrhythmias or functional recovery following ischemic challenge in the rat heart. *Basic Res Cardiol* 84 : 421~430, 1989
- 12) Bernier M, Curtis MJ, Hearse DJ : Ischemia-induced and reperfusion-induced arrhythmias : importance of heart rate. *Am J Physiol* 256 : H21~H31, 1989
- 13) Tosaki A, Hearse DJ : Protective effect of transient calcium reduction against reperfusion-induced arrhythmias in rat hearts. *Am J Physiol* 253 : H225~H233, 1987
- 14) 牧野直樹, 矢野健一, 矢永尚士 : 再灌流不整脈の発生におけるフリーラジカルの役割. *心電図* 11 : 159~164, 1991

The Effects of the Duration of Preceding Ischemia on the Reperfusion-induced Arrhythmias in Isolated Perfused Rat Hearts

Takashi Umeda, Kazuhiko Tanaka, Masato Nakamura,
Manabu Takura, Takafumi Izumi, Keita Suekane and Yoshihisa Koga

Department of Anesthesiology, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

Abstract

The effects of the duration of the preceding ischemia were investigated using isolated perfused rat hearts. Hearts ($n = 12$ per group) were subjected to various times (0, 5, 10, 11, 12, 13, 15, 20, or 30 min) of regional ischemia induced by the occlusion of left anterior descending artery followed by 10 min of reperfusion.

In 100% of hearts, VT occurred after more than 5 min of ischemia. The incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation (VF) was highest after 11-15 min of coronary artery occlusion (100%).

With increasing and decreasing durations of ischemia, there were decreasing incidence of VF (after 10, 20, and 30 min of ischemia resulted in

75%, 92%, and 17% of the hearts exhibiting VF respectively. The incidence of irreversible VF and the duration of VF were shown to have similar bell-shaped time dependency curves with the peak at the duration of 11 min of ischemia and 3 min observation time.

Observation times of 3, 5, 10 min after reperfusion for analysis of arrhythmia were investigated too. There were not remarkable changes during 3 groups. So 3 min observation time was enough for analysis of arrhythmia.

We therefore concluded that a 11-min period of ischemia and 3 min observation time is appropriate in attempting to assess the ability of any agent to inhibit reperfusion arrhythmias in isolated perfused rat heart model.

Key words : Reperfusion, Arrhythmia, Ventricular fibrillation, Ischemia