

## 甲状腺ホルモン投与による心筋虚血再灌流時の超微形態と代謝に及ぼす影響

片山 康\*

### 要 旨

開心術後モデル実験動物を使用し、甲状腺ホルモン triiodothyronine (T<sub>3</sub>) 0.1 μg/kg/min を経静脈性に投与した T<sub>3</sub>投与群 (n=9) と非投与の対照群 (n=7) について心筋虚血再灌流時の超微形態と心筋代謝に及ぼす影響を検討した。両群ともに虚血再灌流後にミトコンドリアの断面積、周囲長の増加、形状係数悪化など、stunned myocardium の状態に陥ったが、T<sub>3</sub>投与群では障害が軽微であった。心筋代謝では T<sub>3</sub>投与群で心筋酸素摂取、心筋ブドウ糖摂取の増加がみられた。甲状腺ホルモン投与は心筋虚血再灌流障害を抑制し、心筋代謝の活性化によって心筋保護効果を有する結果が得られた。

### 諸 言

開心術後、早期の心筋は stunned myocardium<sup>1,2)</sup>、あるいは stunning<sup>3)</sup> と呼ばれる心筋虚血再灌流後障害の状態にある。その際、心筋細胞は超微形態上、心筋壊死を伴わない様々な可逆性心筋障害の状態にあり同時に遷延性心室機能低下の状態にある<sup>4~6)</sup>。超微形態上の変化は筋細胞膜、核小体、筋原線維、グリコーゲン顆粒、ミトコンドリアを中心とし、とりわけミトコンドリアに形態変化は顕著に、かつ鋭敏に現れる<sup>5)</sup>。代謝面では好氣的代謝から嫌氣的代謝に移行し、基質利用の種と量に変化がみられる。また体外循環を用いた開心術後には血中甲状腺ホルモンが低下すること<sup>7~11)</sup>が知られている。甲状腺ホルモンの投与が開心術後

の血行動態の良好な改善をもたらすことを Novitzky<sup>12)</sup> は臨床投与例で、Dyke<sup>13)</sup> は開心術後モデルの動物実験で報告した。

心筋代謝、特に酸化的リン酸化を中心とした ATP 産生のエネルギー代謝の主座は心筋超微構造上、ミトコンドリアに存在する。そこで甲状腺ホルモンとして triiodothyronine (T<sub>3</sub>) を投与し虚血再灌流前後のミトコンドリアを中心とした形態計量法<sup>14)</sup>による心筋超微形態の変化や障害、そして心筋代謝の変化を併せて観察し、甲状腺ホルモンの心筋保護効果について実験的に検討した。

### 方 法

#### 1. 実験モデル

体重 (平均 21.1 ± 1 kg) の雑種イヌを用い、ペントバルビタール (30 mg/kg) にて静脈麻酔後、スキサメトニウム (20 mg/kg) にて筋弛緩を得たのち、気管内挿管し Harvard Apparatus Dual Phase Control Respirometer を用いて調節呼吸を行った。左大腿動脈に採血、圧測定用カテーテルを留置し動脈血を採血した。ヘパリン (3 mg/kg) を全身投与したのち、冠状静脈洞よりバルーン付きカニューレを冠状静脈に挿入し、冠状静脈血を採血した。体外循環を開始し、直ちに左室心尖部から心筋ブロックを採取し固定した。大動脈を遮断し、高カリウム性晶質溶液 (GIK マグネシウム液) の心停止液 (表 1) を注入し常温下虚血心停止を行った。虚血心停止時間を 60 分間とし、その後大動脈遮断を解除し再灌流を行った。120 分間の再灌流の後、動脈血、冠状静脈血、心筋ブロックを採取した。大動脈遮断直後より T<sub>3</sub>投与群 (n=9) は甲状腺ホルモン triiodothyronine (T<sub>3</sub>) 0.1 μg/kg/min

\*獨協医科大学越谷病院心臓血管外科

表1 心停止液の組成

Gulucose	=3861	mg/dl
Insulin	=1	U/dl
K <sup>+</sup>	=29.8	mEq/l
Mg <sup>2+</sup>	=31.8	mEq/l
Ca <sup>2+</sup>	=2.00	mEq/l
Cl <sup>-</sup>	=21.9	mEq/l
D-Mannitol	=1802	mg/dl

を経静脈性に実験終了までの再灌流後120分間も持続投与し、非投与の対照群 (n = 7) と比較検討した。

心停止液の投与は常温、順行性、30分毎の間歇投与で投与量は初回15 ml/kg、30分後に7.5 ml/kg追加投与した。人工心肺用装置は Pemco 社 Model 5745を用い、人工肺は Sorin 社 Monolith を使用した。体外循環流量は80 ml/kgで常温体外循環とした。心筋の固定と電顕観察のための処理は前固定として pH7.2-2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、0.05 M カコジル酸で4℃、2時間固定し、8%サッカロース液で水洗後、1%オスミウム酸で1時間の後固定を行った。50%から無水アルコール系列で脱水し、エポキシ樹脂にて包埋した。薄切は RMC 社 MT 6000-XL を用い、酢酸ウランと鉛染色液の二重染色後に、日本電子 EM 1200 EX 型電子顕微鏡で検鏡した。血液ガス分析はラジオメーター社 ABL 50 で行った。

2. 測定項目および方法

ミトコンドリアの超微形態測定：各個体の虚血前および再灌流120分後で採取した2検体から心筋断面で、異なる5切片を作成した。ミトコンドリアの観察は最終倍率×5,000、×10,000にて撮影した写真を使用し、形態計量法<sup>14)</sup>により以下の項目について計測した；ミトコンドリア1個の平均断面積、周囲長、形状係数 (面積 A, 周囲長を L としたとき  $4\pi A/L^2$ )、一定視野内断面数。

心筋代謝：虚血前および再灌流120分後において T<sub>3</sub>・血液ガス・血算・血糖・遊離脂肪酸を大腿動脈 (a) および冠状静脈 (cs) より採血測定した。冠静脈に留置したバルーン付きカニューレのバルーンを拡張することにより冠状静脈血流量を直接測定した。実験終了後に心臓を摘出し心筋重量を計測した。以上の測定結果から下記パラメー

ターを算出した。

$$\text{動脈血酸素含量 (CaO}_2\text{)} = 1.34 \times \text{Hb (g/dl)} \times \text{SaO}_2 (\%) \times 0.01 + 0.003 \text{ PaO}_2 \text{ (mmHg)}$$

$$\text{冠状静脈血酸素含量 (CcsO}_2\text{)} = 1.34 \times \text{Hb (g/dl)} \times \text{ScsO}_2 (\%) \times 0.01 + 0.003 \text{ PcsO}_2 \text{ (mmHg)}$$

心筋冠静脈血流量 (cs-flow)

$$= \text{分時冠静脈血流量 (ml/min)} / \text{心筋重量 (g)}$$

$$\text{心筋酸素摂取量} = (\text{CaO}_2 - \text{CcsO}_2) \times \text{cs-flow}$$

心筋ブドウ糖摂取量

$$= (\text{aGlu (mg/dl)} - \text{csGlu (mg/dl)}) \times \text{cs-flow}$$

心筋遊離脂肪酸摂取量

$$= (\text{aFFA (mEq/l)} - \text{csFFA (mEq/l)}) \times \text{cs-flow}$$

数値は平均±標準偏差 (mean±SD) で表し、統計学的検定は t 検定を用い p<0.05をもって有意とした。

結 果

血中 T<sub>3</sub>濃度は対照群で虚血前の1.07±0.89 ng/mlから再灌流120分後の0.23±0.08 ng/mlに低下した。T<sub>3</sub>投与群は虚血前の1.26±1.83 ng/mlから再灌流120分後の23.34±13.25 ng/mlに上昇した。

ミトコンドリアの超微形態：対照群の虚血前の心筋電子顕微鏡写真像ではミトコンドリアの大きさ、扁平形態、クリスタ、マトリックスおよび内外膜構造は良好に保たれていた (図1)。対照群

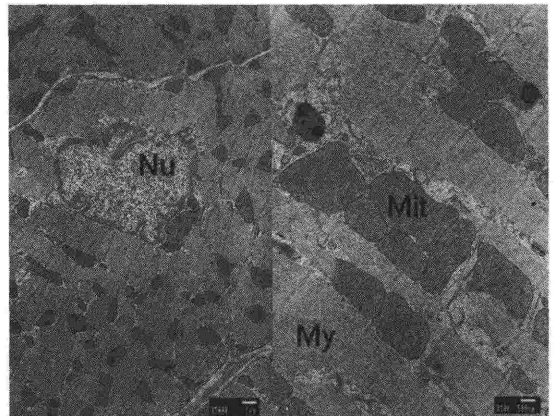


図1 虚血前心筋電顕像

正常な心筋像を示す。正常なミトコンドリア構造が観察できる。核、筋原線維、細胞膜にも虚血変化はない。Nu：核。Mit：ミトコンドリア。My：筋原線維。図左×5,000、図右×10,000

の再灌流120分後の心筋ではミトコンドリアの膨化拡大, 円形化やミトコンドリア内のクリスタ柵状配列の不整, マトリックス拡大など虚血後再灌流障害像がみられた (図2). 一部ではあるが障害がより高度になるとクリスタの無構造化や断裂破壊, マトリックス高度拡大, 内外膜構造破壊がみられた (図3). それに対し T<sub>3</sub>投与群の再灌流120分後の心筋像は T<sub>3</sub>非投与の対照群に比べ, ミトコンドリアの膨化拡大, ミトコンドリア内の障害は軽度であった (図4). 形態計量法による両群の断面積, 周囲長, 形状係数, 断面数を示す

(表2). 対照群では虚血前値に比べて再灌流120分後で断面積, 周囲長の増加, 形状係数増加がみられ (p<0.05), 断面数では変化がみられなかった. T<sub>3</sub>投与群では断面積, 周囲長の増加がみられ (p<0.05), 形状係数, 断面数で変化はみられなかった. 再灌流120分後の対照群と T<sub>3</sub>投与群の比較では断面積の周囲長で T<sub>3</sub>投与群が有意に低く (p<0.05), 形状係数, 断面数で差はみられなかった.

心筋代謝の変化を表3に示した. 心筋酸素摂取量では対照群で再灌流120分後に心筋酸素摂取の

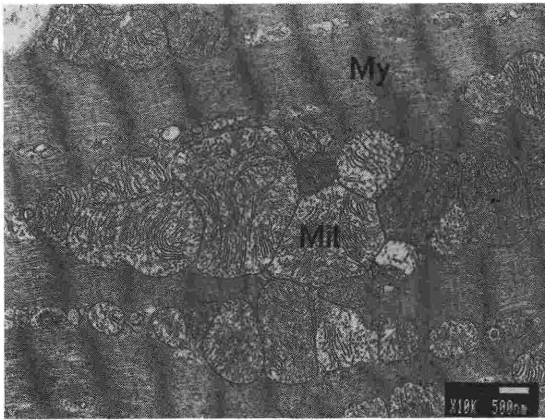


図2 対照群120分再灌流後心筋電顕像

ミトコンドリアの膨隆とクリスタの柵状構造の彎曲不整, マトリックス構造の拡大が観察できる. ミトコンドリア内外膜構造に変化はなく可逆性変化の状態である. ×10,000

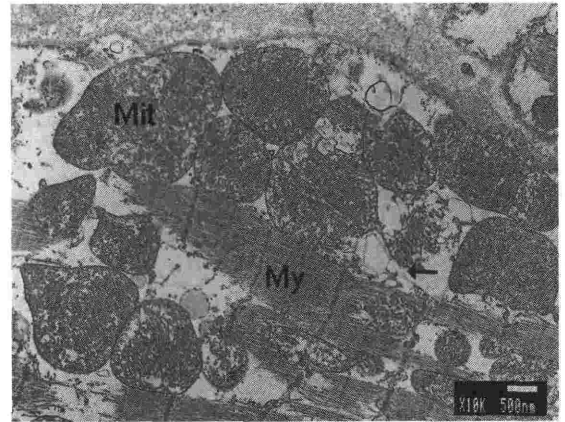


図3 対照群120分再灌流後心筋電顕像

虚血再灌流障害がより高度になるとミトコンドリアの膨化は進行し, ついには内外膜構造が破断し (←) 非可逆性の変化にいたる. ×10,000

表2 ミトコンドリアの超微形態測定

	対 照 群		T <sub>3</sub> 投 与 群	
	虚血前	再灌流後	虚血前	再灌流後
断面積 μm <sup>2</sup>	0.65±0.06	1.11±0.12	0.66±0.06	0.90±0.16
周囲長 μm	3.08±0.20	3.80±0.19	3.07±0.22	3.48±0.40
形状係数	0.86±0.05	0.96±0.03	0.88±0.07	0.93±0.06
断面数	33.4±6.15	32.5±6.49	33.1±5.67	34.2±7.89

※: P<0.05

表3 心筋代謝

	対 照 群		T <sub>3</sub> 投 与 群	
	虚血前	再灌流後	虚血前	再灌流後
心筋酸素摂取量 ml/min/g	2.46±0.75	1.10±0.42	2.67±1.77	3.80±2.79
心筋ブドウ糖摂取量 ml/min/g×10 <sup>-2</sup>	0.98±1.07	1.11±0.72	1.11±1.17	4.05±2.40
心筋遊離脂肪酸摂取量 ml/min/g×10 <sup>-5</sup>	1.89±1.48	0.29±0.38	1.11±2.22	1.17±2.57

※: P<0.05

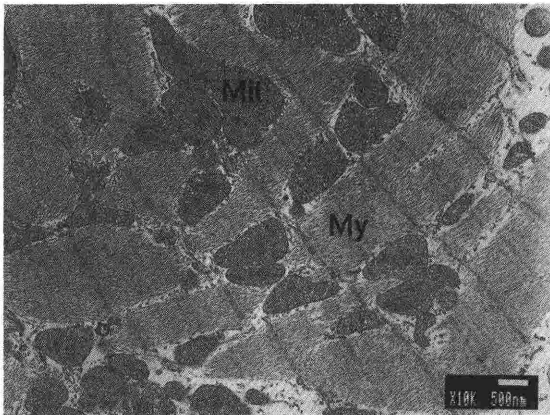


図4 T<sub>3</sub>投与群再灌流後心筋電顕像  
甲状腺ホルモン投与群では対照群に比較してミトコンドリアの障害は軽度でクリスタ、内外膜構造ともに比較的保たれている。×10,000

低下が見られるのに対し、T<sub>3</sub>投与群では酸素摂取量の増加が見られたが有意差はなかった(図5)。心筋ブドウ糖摂取量は再灌流120分後にT<sub>3</sub>投与群で有意な上昇がみられた(p<0.05)(図6)。心筋遊離脂肪酸摂取量に虚血再灌流の前後および両群間ともに差はなかった(図7)。

考 案

甲状腺疾患以外の疾患で種々の全身性消耗疾患、飢餓、薬物投与、外科手術侵襲後などにみられる血中T<sub>3</sub>濃度の低下を特徴的にきたす病態を euthyroid sick syndrome, low T<sub>3</sub> syndrome<sup>15,16)</sup>と定義された。同様に体外循環を用いた開心術後においても血中甲状腺ホルモンが低下すること<sup>7~11)</sup>が知られている。甲状腺ホルモンは心筋に直接作用

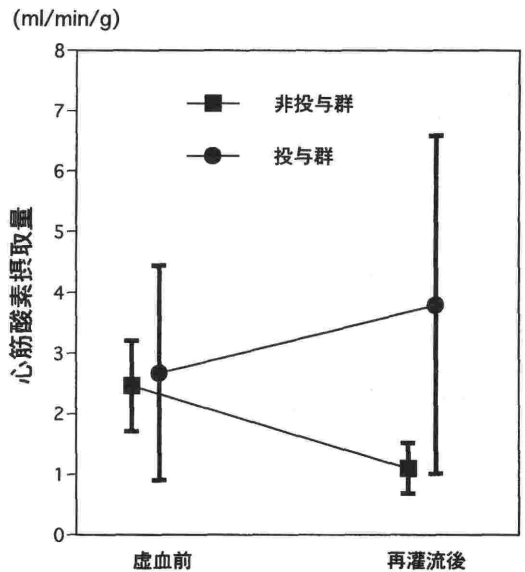


図5 心筋酸素摂取量の推移  
統計学的有意差はないものの甲状腺ホルモン非投与群は前値に比し、後値で酸素摂取の低下が見られるのに対し、投与群では酸素消費増加が見られる傾向にあった。

し心筋の超微形態を保持し<sup>13)</sup>細胞内カルシウム濃度を調節し<sup>17)</sup>、拡張能および収縮能を改善させ<sup>18~20)</sup>、カテコラミンに対する感受性を高めると<sup>21)</sup>報告されている。血中甲状腺ホルモン投与による虚血再灌流後心筋、特に開心術後の心筋の超微形態と基質を中心とした代謝に関する検討がなされた報告は少ない。

心筋細胞が虚血にさらされると心筋は直ちにその収縮能を失い組織学的にはまず可逆性心筋障害が生じ、更に虚血が持続すると不可逆性心筋障害すなわち壊死へと進行する。急性心筋梗塞の再灌

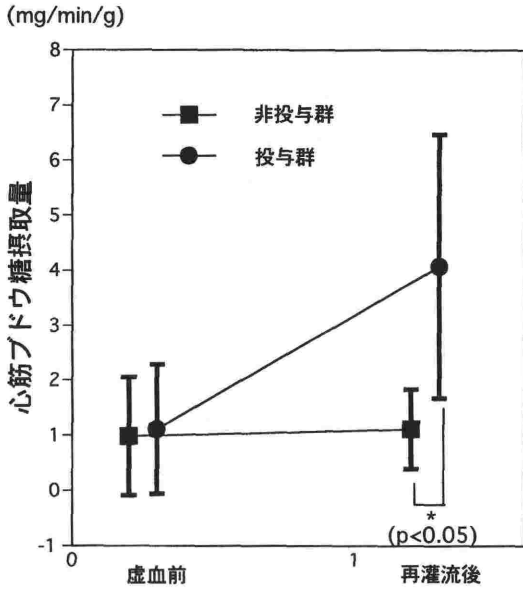


図6 心筋ブドウ糖摂取量の推移  
 甲状腺ホルモン非投与群は前値と後値でブドウ糖摂取に差がないのに対し、投与群ではブドウ糖摂取増加が見られた。

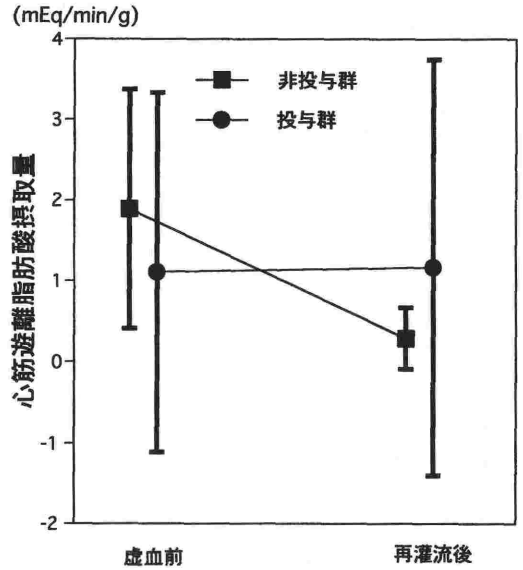


図7 心筋遊離脂肪酸摂取量の推移  
 甲状腺ホルモン投与による遊離脂肪酸の摂取増加は見られなかった。

流療法後、PTCA 後、不安定狭心症、労作性狭心症の発作時ないし労作時、移植心、高度左室肥大例、開心術後早期の心筋は可逆性心筋障害の状態にあり stunned myocardium<sup>1-2)</sup>、stunning<sup>3)</sup>と呼ばれる心筋虚血後再灌流後障害の状態にある。その際、心筋細胞は超微形態上、心筋壊死を伴わない様々な可逆性心筋障害の状態にあり超微形態上の変化は特にミトコンドリアに顕著に、かつ敏感に現れ<sup>4-6)</sup>、膨大化し、正円変形化、マトリクス内重金属沈着、クリスタの彎曲、クリスタの断裂破壊、マトリックス拡大無構造化に進行し、最終的には内外膜構造破綻に至る。

今回の結果をみると、常温間欠的で単純な高カリウム性晶質溶液 (GIK マグネシウム液) 注入による心停止モデルを作成しており、臨床例と比較してかなり過酷な条件下の虚血再灌流を反映して、対照群ではミトコンドリアの膨大化と形状係数の増加を認めた。形状係数の低下は形状の楕円、扁平構造を反映し、正円が1.00でその上昇はミトコンドリアの形態からみた虚血再灌流障害を反映する<sup>14)</sup>。T<sub>3</sub>投与群では同様な変化がみられるがより軽微で、両群間の比較から甲状腺ホルモン投与

がミトコンドリアの形態保持の観点からその心筋保護効果を反映する結果と考えられた。この結果は Dyke のブタ心筋を用いた実験の結果とほぼ一致した<sup>13)</sup>。しかし、甲状腺ホルモンの過剰投与は心毒性による形態異常も報告されており<sup>22, 23)</sup> euthyroid sick syndrome もしくは low T<sub>3</sub> syndrome 状況下における甲状腺ホルモン負荷の急性期の特異反応とも考えられた。ミトコンドリアの数量的変化は虚血再灌流および甲状腺ホルモン投与の影響は無く、ラットに L-thyroxine を9日間投与しその数量増加を認めた報告<sup>22)</sup>と一致しなかったことから甲状腺ホルモン投与は急性期にはミトコンドリアの数量的増加効果は無いと考えられた。

心筋代謝の面では甲状腺ホルモン投与が虚血再灌流心筋に対し酸素摂取を高めブドウ糖の代謝率を高めている可能性が考えられた。好氣的代謝におけるエネルギー産生の酸化的リン酸化反応の首座はミトコンドリアの内外膜構造部にありその形態保持はエネルギー効率の保持改善を反映するものと考えられた。しかし、脂肪酸代謝は開心術後などの虚血心筋では利用されにくい状況にあるとされており<sup>24)</sup>、我々の実験でも甲状腺ホルモン投

与により虚血再灌流後の遊離脂肪酸の利用に変化はなく嫌気性代謝の完全な改善は成されていないものと推察された。

本実験ではATP等の心筋エネルギー等の直接定量は行っていないが、今後代謝の最終過程の直接評価も必要である。心筋ミトコンドリアの虚血時の障害程度と心筋代謝の相関は明確ではないが、甲状腺ホルモン投与が心筋保護効果を有する可能性を示唆した。

## 結 論

甲状腺ホルモンとして triiodothyronine (T<sub>3</sub>) 0.1 μg/kg/min を経静脈性に投与し投与群と非投与群について60分の心筋虚血と120分の再灌流を行い、超微形態と心筋代謝に及ぼす影響について検討した。

1) 対照群, T<sub>3</sub>投与群ともに虚血再灌流後にミトコンドリアの断面積, 周囲長の増加, 形状係数悪化等, stunned myocardium の状態に陥るが, T<sub>3</sub>投与群の障害が軽微であった。

2) 心筋代謝面では投与群で心筋酸素摂取, 心筋ブドウ糖摂取の増加がみられた。

甲状腺ホルモン投与は心筋虚血再灌流障害を抑制し, 心筋代謝を活性化する心筋保護効果を有する結果が得られた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたりご指導とご校閲をいただいた獨協医科大学越谷病院心臓血管外科 山田崇之教授に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Braunwald E, Kloner RA : The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66 : 1146-1149, 1982
- 2) Braunwald E : The stunned myocardium: newer insights into mechanisms and clinical implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 100 : 310-311, 1990
- 3) Boli R : Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 82 : 723-738, 1990
- 4) Herdson PB, Sommers HM, Jennings RB : A comparative study of the fine structure of normal and ischemic dog myocardium with special reference to early changes following temporary occlusion of a coronary artery. *Am J Pathol* 46 : 367-386, 1965
- 5) Jennings RB, Herdson PB, Sommers HM : Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. *Lab Inv* 20 : 548-557, 1969

- 6) Jennings RB, Ganote CE : Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Cir Res Suppl* III 34, 35 : 156-172, 1974
- 7) Macdonald RG, Chapman C, Franklin H : Thyroidpituitary response to cardiopulmonary bypass. *Br J Anaesth* 48 : 225-230, 1976
- 8) Bremner WF, Taylor KM, Baird S, et al : Hypothalamo-pituitary-thyroid axis function during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 75 : 392-399, 1978
- 9) Holland WF, Brown PS Jr, Weintraub BD, et al : Cardiopulmonary bypass and thyroid function: a "euthyroid sick syndrome". *Ann Thorac Surg* 52 : 46-50, 1991
- 10) Robushi G, Medici D, Fesani F : Cardiopulmonary bypass: "a low T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> syndrome" with blunted thyrotropin (TSH) response to thyrotropin-release hormone (TRH). *Horm Res* 23 : 151-158, 1986
- 11) Chu S-H, Hunang T-S, Hsu R-B, et al : Thyroid hormone changes after cardiovascular surgery and clinical implication. *Ann Thorac Surg* 52 : 791-796, 1991
- 12) Novitzky D, Cooper DKC, Barton CI : Triiodothyronine as an inotropic agent after open heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 98 : 972-978, 1989
- 13) Dyke CM, Abd-Elfattah AS, Loesser K, et al : Effects of triiodothyronine supplementation after myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg* 56 : 215-222, 1993
- 14) Weibel ER : Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 26 : 235-302, 1969
- 15) Sullivan PRC, Bollinger JA, Redlin S : Selective deficiency of tissue triiodothyronine. A proposed mechanism of elevated free thyroxin in euthyroid sick. *J Clin Invest* 52 : 83 a (abst 306), 1973
- 16) Wartofsky L, Burman KD : Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: "euthyroid sick syndrome". *Endocrine Reviews* 3 : 164-217, 1982
- 17) Levey, GS : Catecholamine sensitivity, thyroid hormone and the heart, A reevaluation. *Am J Med* 50 : 413-420, 1971
- 18) Holland II FW, Brown PS Jr, Clark RE : Acute severe postischemic myocardial depression reversed by triiodothyronine. *Ann Thorac Surg* 54 : 301-305, 1992
- 19) Gay RG, Graham S, Aguirre M, et al : Effects of 10-to 12-day treatment with L-thyroxine in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol* 255 : 801-806, 1988
- 20) Morkin E, Pennock GD, Raya TE, et al : Studies on the use of thyroid hormone analogue in the treatment of congestive heart failure. *Ann Thorac Surg* 56 : 54-60, 1993
- 21) Walker JD, Crawford FA, Kato S, et al : The novel effect of 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine on myocyte contractile function and β-adrenergic responsiveness in dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108 : 627-679, 1994
- 22) 瀧島輝男, 後藤 忠 : サイロキシン投与によるラット心筋の微細構造的変化: 定量的研究. *埼玉医科大学雑誌* 9 : 227-233, 1982
- 23) 甲谷憲治 : L-thyroxine 投与によるラット心筋の超微形態像の年齢差. *日老医学会誌* 28 : 24-28, 1991
- 24) Opie LH : 心筋代謝. *HBJ* 出版局, 東京, 1993, pp. 112-129

## Effect of Thyroid Hormone on the Ultrastructure and Myocardial Metabolism of the Postischemic Reperfusion Injury

Yasushi Katayama\*

\*Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Dokkyo University Koshigaya Hospital, Saitama, Japan

The effect of triiodothyronine (T<sub>3</sub>) on the myocardial ultrastructure and metabolism was studied using dogs with 60 minutes of normothermic global ischemia and 120 minutes of reperfusion. Dogs were divided into 2 groups ; Control group (n = 7) and T<sub>3</sub> group (n=9) with an intravenous administration of T<sub>3</sub> (0.1 μg/Kg/min) immediately after cross-clamping of the aorta. Myocardial ultrastructure and metabolism was studied before cross-clamping of the aorta, at declamping and 120 minutes after reperfusion of the

heart. Control group showed mitochondrial swelling, low uptake of oxygen and glucose, while T<sub>3</sub> group showed slight changes in the morphology of mitochondria and considerably higher myocardial uptake of oxygen and glucose in the reperfusion period. From these studies, it is concluded that T<sub>3</sub> infusion during global ischemia and reperfusion period preserved mitochondrial ultrastructural morphology and resulted in the increased rate of myocardial substrates uptake.

**Key Words** : Thyroid hormone, Reperfusion injury, Ultrastructure, Myocardial metabolism

(Circ Cont 19 : 76~82, 1998)