

# Deltorphin (opioid $\delta$ -agonist) が Guinea pig 摘出灌流心臓に及ぼす影響

藤田 智\*，中江 裕理\*\*，土田 英昭\*\*  
長瀬 博\*\*\*，遠藤 孝\*\*\*，並木 昭義\*\*

## 要 旨

Opioid の  $\delta$ -agonist である deltorphin は, guinea pig の摘出灌流心臓において, 細胞外液のカルシウム濃度が一定の状態では, 左室圧, 冠流量に影響を与えないものの, 酸素消費量を減少させた. さらに, 細胞内カルシウム濃度を Indo-1 を使って測定したところ Deltorphin は細胞内カルシウム濃度を低下させるものの, 心筋のカルシウム感受性を変化させて, 左室圧を維持した. これらの作用は, Opioid の  $\delta$ -antagonist である naltriben では部分的にしか拮抗されなかった. この結果から, 麻薬系鎮痛薬の循環に対する抑制の少なさの原因の一つに  $\delta$ -receptor が関与している可能性が示唆された.

## 緒 言

オピオイド系の薬物は, その強力な鎮痛作用から, 術後の疼痛, 癌患者の疼痛を緩和する目的で, また, 循環系への影響の少なさから心機能低下患者の麻酔薬として, 更に吸入麻酔薬の麻酔補助薬として, 臨床において頻用されている. 従来オピオイドの研究は, 中枢神経系への影響を中心に調べられてきた<sup>1,2)</sup>. またその作用機序については近年, オピオイドの各レセプターに対する選択性の高いアゴニスト, アンタゴニストが開発され, 細かく調べられるようになってきた<sup>3,4)</sup>.

一方, オピオイドは中枢以外にも影響を及ぼす.

循環系に対しては, 主に中枢を介して血圧, 心拍数, 収縮力, 血管壁の緊張に影響するといわれてきた<sup>5)</sup>. しかし, 最近の研究では, 心筋にオピオイドのレセプターが存在すること<sup>6)</sup>, オピオイドの刺激によって, 収縮力, 細胞内カルシウム濃度が変化することが報告されている<sup>7-10)</sup>. これらの報告より, オピオイドの心臓への作用の少なくとも一部は, 心筋への直接作用であると考えられる. しかし従来心臓に対する研究は培養心筋等に留まられていて, より生理的条件に近い拍動下の心臓において, オピオイドのアゴニストがどのような作用を心臓に及ぼすかについての報告はない. そこで今回我々は,  $\delta$ -オピオイドのアゴニストである [D-Ala<sup>2</sup>] deltorphin (DTP) が摘出心臓の細胞内カルシウム濃度へどのような影響を与えるかを調べた. さらに, 細胞外カルシウム濃度を変化させることにより細胞内カルシウム濃度, 左室圧を変化させ, これにより心筋のカルシウム感受性の変化も観察した.

## 対象及び方法

### 1. 摘出心臓標本 (Langendorff's preparation)

Medical College of Wisconsin の動物実験委員会承認のもと, 体重250-300g の English short-haired guinea pig 12匹を対象とした. 対象にケタミン 30 mg 及びヘパリン1000単位を腹腔内投与後, 刺激への反応の消失を確認して, 断頭した. 正中開胸後, 大動脈にカニューレーションを行い, 上及び下大静脈を結紮した. すべての心臓は, ただちに97% O<sub>2</sub> と 3% CO<sub>2</sub> で飽和された冷却 modified Krebs-Ringer 液 [以下 KR 液 (Na<sup>+</sup> 137, K<sup>+</sup> 5,

\*北海道恵愛会南一条病院麻酔科

\*\*札幌医科大学医学部麻酔科

\*\*\*東レ(株)基礎研究所

Mg<sup>2+</sup> 1.2, Ca<sup>2+</sup> 2.5, Cl<sup>-</sup> 134, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 15.5, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1.2, glucose 11.5, pyruvate 2, mannitol 16, EDTA (ethylene-diamine tetraacetic acid) 0.05 units · L<sup>-1</sup>, and insulin 5 mmol · L<sup>-1</sup> ] で灌流し, 体外に取り出した. その後, 大動脈より55 mmHgの灌流圧で, 37.0 ± 0.2°CのKR液を灌流した. 左房から僧房弁を通して左室内へバルーンを挿入し, 左室圧を測定した. バルーンの内圧は実験の最初に拡張期圧が0 mmHgとなるように調節した. 一对の心電図電極を右房に装着し, 心拍数をモニター記録した. 冠静脈洞からの流出液は, 肺動脈から右室へ挿入したカニューレから採取した. 冠流量は, 55 mmHgの定圧下で大動脈へのKR液の流入量を, 超音波血流量計 (TX-106, Ithaca, NY) を用いて測定した. 実験に先立ち, 冠血管の反応性を確認するため, 200 μMのアデノシン 0.2 mlを大動脈に挿入したカニューレに注入し, 反応を確かめた.

灌流液及び, 冠静脈洞からの流出液の酸素分圧, 二酸化炭素分圧, pHを測定した. %O<sub>2</sub>E (Extraction) = (inflow O<sub>2</sub> tension-outflow O<sub>2</sub> tension) / (inflow O<sub>2</sub> tension) × 100, 酸素運搬能 (DO<sub>2</sub>) = inflow O<sub>2</sub> tension × 24 × 10<sup>-6</sup> × Coronary flow / 心筋重量, 酸素消費量 = 24 × 10<sup>-6</sup> × (inflow O<sub>2</sub> tension-outflow O<sub>2</sub> tension) × Coronary flow / 心筋重量, Cardiac efficacy = LVP × HR / MVO<sub>2</sub>で, 求めた.

循環動態が安定した後, コントロールの値を測定した. 次いで10<sup>-8</sup>, 5 × 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> MのDTPを含んだKR液をそれぞれ15分間灌流した後に各種パラメータを測定した.

## 2. 細胞内カルシウム測定法

Langendorff法にて摘出心臓を灌流した後, Brandesら<sup>11,12)</sup>の方法に従い心臓の拍動による影響, 自己蛍光を測定した後, 6 × 10<sup>-6</sup>MのIndo-1/

AM (Sigma) を含む室温のKR液に置換し, 暗室にて最低20分間摘出心臓を灌流した. 実験は37.0 ± 0.2°Cに復温した後に開始した.

細胞内カルシウムの測定には, SLM 48000を用いた. SLM 48000よりオプティックファイバーを用いて, 340 nm励起光を摘出心臓の左室にあて, 惹起された385 nmと456 nmの波長の光をオプティックファイバーを用いて再度測定機器本体まで誘導し, 2つの波長の比 (F385/F456) を細胞内カルシウム濃度の指標として計算し心筋のカルシウム感受性を測定するため, KR液または10<sup>-7</sup> MのDTPもしくは10<sup>-7</sup> MのNTBを含んだKR液のカルシウム濃度を0.3–4.5 mMに連続的に変化させ, その時の細胞内カルシウム濃度及び左室圧を1分間隔で2.5秒ずつ測定し, すべてのデータをコンピューターに取り込んだ. カルシウム測定の実験はすべて暗室にて行った.

## 結 果

表1に示すごとく, 各濃度のDTPは灌流量, 左室圧に大きな変化を与えなかったが, 肺動脈の酸素分圧と動静脈の酸素分圧較差を濃度依存性に増大させた. O<sub>2</sub> Extraction, 酸素消費量は濃度依存性に減少し, 酸素運搬能と酸素消費量の比, Cardiac Efficacyは濃度依存性に増大した (表1). また, 細胞外液のカルシウム濃度を連続的に変化させた場合, 各濃度, DTPは左室圧を上昇させた. この作用は, NTBを用いても完全には拮抗されなかった (図1). 細胞外カルシウム濃度が2.5 mMの時点で比較すると, DTPは左室収縮期圧を20%上昇させた. 細胞外液のカルシウム濃度を連続的に変化させた場合, DTPは各濃度で収縮期のカルシウム濃度を低下させた. 細胞外カルシウム濃度が2.5 mMの時点で比較すると, その低下はコントロールに比べ7.5%であった. NTB

表1 デルトルフィン (δ-アゴニスト) の循環動態へ及ぼす影響

濃度 (nM)	%Cardiac Efficacy (%)	%酸素消費量 (%)	% (酸素運搬能/酸素消費量) (%)	%O <sub>2</sub> Extraction (%)	冠静脈洞液の酸素分圧 (mmHg)	左室圧 (mmHg)	冠流量 (ml · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> )
0	—	—	—	—	140 ± 10	99 ± 2	6.5 ± 0.2
10	+8.3 ± 3.3*	-6.7 ± 3.2*	+3.6 ± 2.5*	-3.6 ± 2.6*	156 ± 14*	98 ± 3	6.6 ± 0.3
50	+8.5 ± 3.5*	-12.9 ± 3.8*	+8.5 ± 3.8*	-7.9 ± 3.4*	174 ± 18*	97 ± 2	6.4 ± 0.2
100	+12.1 ± 3.0*	-21.3 ± 3.4*	+20.8 ± 5.5*	-17.1 ± 4.4*	216 ± 22*	95 ± 3	6.6 ± 0.3

\*p < 0.05 vs Control

(平均 ± 標準誤差)

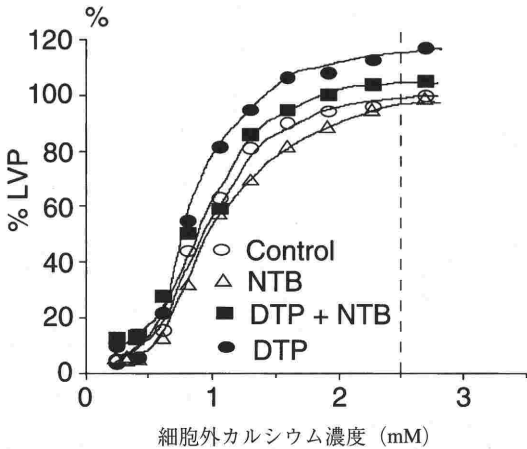


図1 細胞外カルシウム濃度を連続的に0.3 mM から4.5 mM まで変化させた時の収縮期左室圧の変化をカルシウム濃度を変化させる前 (2.5 mM) をコントロールとして表した。破線はカルシウム濃度が2.5 mM の点を表している。

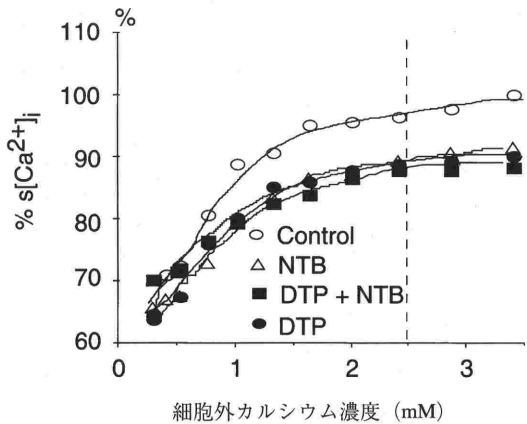


図2 細胞外カルシウム濃度を連続的に0.3 mM から4.5 mM まで変化させた時の収縮期細胞内カルシウム濃度の変化を細胞外カルシウム濃度を変化させる前 (2.5 mM) をコントロールとして表した。破線は細胞外カルシウム濃度が2.5 mM の点を表している。

も同様に収縮期カルシウム濃度を低下した (図2)。DTP は拡張期カルシウム濃度を上昇させた。その程度は、細胞外カルシウム濃度が2.5 mM の時点で6.6%であった。この作用はNTB では完全には拮抗できなかった (図3)。これらの結果から、Range (収縮期と拡張期の差) 細胞内カルシウム濃度は40%減少した。収縮期細胞内カルシ

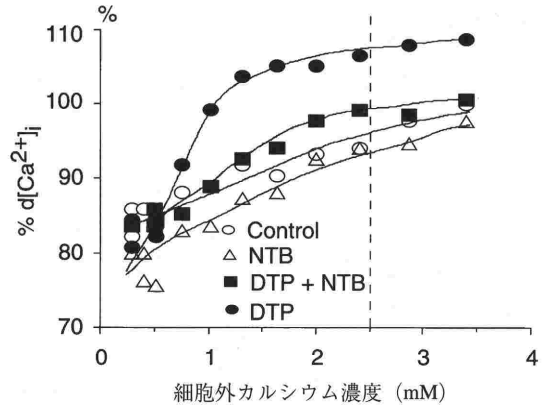


図3 細胞外カルシウム濃度を連続的に0.3 mM から4.5 mM まで変化させた時の拡張期細胞内カルシウム濃度の変化を細胞外カルシウム濃度を変化させる前 (2.5 mM) をコントロールとして表した。破線は細胞外カルシウム濃度が2.5 mM の点を表している。

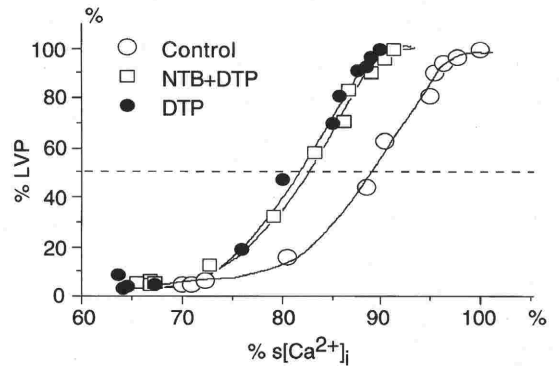


図4 細胞外カルシウム濃度を連続的に0.3 mM から4.5 mM まで変化させた時の収縮期細胞内カルシウム濃度、収縮期左室圧の変化を細胞外カルシウム濃度を変化させる前 (2.5 mM) をコントロールとして表した。破線は、50%収縮期左室圧を表している。

ウム濃度と左室圧から心筋のカルシウム感受性を計算すると、図4のようになり、DTP は感受性のカーブを左室圧が50%のところと比較すると7.3% 左方移動させた。NTB はこの作用を完全には拮抗しなかった (図4)。

### 考 察

今回の研究より、摘出心臓において、DTP が心臓の収縮力と心筋のカルシウム感受性を増大させることが明らかになった。また、DTP は拡張

期細胞内カルシウム濃度を上昇させ、収縮期細胞内カルシウム濃度を低下させた。静的状態では、心収縮力の変化は認められなかったが摘出心臓の酸素バランスを、冠流量、血圧に影響を与えることなく改善した。

過去の報告<sup>8,10)</sup>と同様に今回用いた $\delta$ -オピオイドアゴニストであるDTPは、収縮期細胞内カルシウム濃度を低下させた。過去の報告においては、今回我々が観察した様な拡張期細胞内カルシウム濃度の上昇を観察した報告はない。拡張期細胞内カルシウム濃度は、主に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系、筋小胞体の $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseが規定すると考えられている。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系は、Guinea pigとratの間では種差があり<sup>13,14)</sup>、ライアノジンを投与したときの心筋の拡張期細胞内カルシウム濃度はGuinea pigでは上昇し、ratでは変化がないという報告もある<sup>15)</sup>。我々の観察した変化は、従来いわれていた、 $\delta$ -オピオイドがL-typeのカルシウムチャンネルに作用して細胞内カルシウム濃度を低下させる<sup>16)</sup>だけでなく、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系、筋小胞体にも働く可能性も示唆している。

カルシウム感受性の変化は、Cross-bridge formationの増加、カルシウムと、actomyosinの相互作用を促進していると考えられる。Xiaoら<sup>10)</sup>の報告では、 $\delta$ -オピオイドは収縮力を抑制するとしているが、彼等は心筋長(細胞の長さ)を収縮力としているため、等尺性の収縮力を見ていないこと、動物の種類が違うこと、使用した薬物の選択性の違い等が今回の研究との差になったと考えられる。また、静的状態では左室圧の上昇が認められず、細胞外カルシウム濃度を変化させたときには、左室圧の上昇が認められたのは、静的状態での計測が、DTP灌流後15分の値であるのに対して、カルシウム測定時のデータは、DTP灌流直後からのものであったことによるか、またはカルシウム感受性の変化が左室圧により大きな影響を及ぼした可能性がある。

NTBがDTPの作用を完全に拮抗できなかったのは、両薬物間のレセプター親和性の違いのためと考えられた。

## 結 論

今回の結果から、オピオイド、特に $\delta$ オピオイドアゴニストは、心臓の酸素消費需要バランスを

循環動態に影響を与えることなく改善し、また、カルシウム感受性を亢進することから、心不全状態に対しては、有効な薬物になりえると考えられた。

## 文 献

- 1) Bixby JL, Spitzer NC : Enkephalin reduces quantal content at the frog neuromuscular junction. *Nature Lond* 301 : 431-432, 1983
- 2) Cherubini E, North RA : Mu and kappa- opioids inhibit transmitter release by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* 82 : 1860-1863, 1985
- 3) Lord JAH, Waterfield AA, Hughes J, et al : Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature Lond* 267 : 495-499, 1977
- 4) Goldstein A, James IF : Multiple opioid receptors: criteria for identification and classification. *Trends Pharmacol Sci* 5 : 503-505, 1984
- 5) Holaday JW : Cardiovascular effect of the endogenous opiate system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23 : 541-594, 1983
- 6) Ventura C, Bastagli L, Bernardi P, et al : Opioid receptors in cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol. *Biochem Biophys Acta* 987 : 69-74, 1989
- 7) Ventura C, Capogrossi MC, Spurgeon H, et al : Kappa-opioid peptide receptor stimulation increases cytosolic pH and myofilament responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 261 : H1671-H1674, 1991
- 8) Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, et al : Kappa and delta-opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and  $\text{Ca}^{2+}$  release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ Res* 70 : 66-81, 1992
- 9) Xiao RP, Spurgeon H, Capogrossi MC, et al : Stimulation of opioid receptors on cardiac ventricular myocytes reduces L type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current. *J Mol Cell Cardiol* 25 : 661-666, 1993
- 10) Xiao RP, S Pepe, HA Spurgeon, et al : Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells. *Am J Physiol* 272 : H797-H805, 1997
- 11) Brandes R, Figueredo VM, Camacho SA, et al : I. Quantitation of cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  in whole perfused rat hearts using indo-1 fluorometry. *Biophysical Journal* 65 : 1973-1982, 1993
- 12) Brandes R, Figueredo VM, Camacho SA, et al : II. Investigation of factors affecting fluorometric quantitation of cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  in perfused hearts. *Biophysical Journal* 65 : 1983-1993, 1993
- 13) Shattock MJ, Bers DM : Rat vs rabbit ventricle:  $\text{Ca}^{2+}$  flux and intracellular  $\text{Na}^+$  assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 256 : C813-C822, 1989
- 14) Lewartowski B, Zdanowski K : Net  $\text{Ca}^{2+}$  influx and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in resting single myocytes of rat heart: comparison with guinea pig. *J Moll Cell Cardiol* 22 : 1221-1229, 1990
- 15) Janiak R, Lewartowski B, Langer GA : Functional coupling between sarcoplasmic reticulum and  $\text{Na}/\text{Ca}$  exchange in single myocytes of guinea-pig and rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 28 : 253-264, 1996
- 16) Xiao RP, Spurgeon HA, Capogrossi MC, et al : Stimulation of opioid receptor on cardiac ventricular myocytes reduces L type  $\text{Ca}^{2+}$  channel current. *J Mol Cell Cardiol* 25 : 661-666, 1993

## The Effects of Deltorphin ( $\delta$ -opioid agonist) on the Isolated Guinea Pig Heart

Satoshi Fujita\*, Yuri Nakae\*\*, Hideaki Tsuchida\*\*, Hiroshi Nagase\*\*\*,  
Takashi Endo\*\*\*, Akiyoshi Namiki\*\*

\*Department of Anesthesiology, Hokkaido Keiaiikai Minami 1 Jyo Hospital

\*\*Department of Anesthesiology, Sapporo Medical University School of Medicine  
Sapporo, Japan

\*\*\*Basic Research Lab. Toray Inc., Kamakura, Japan

**Introduction:** [D-Ala<sup>2</sup>]-deltorphin (DTP) is a synthetic opioid peptide that acts predominantly as a  $\delta$  agonist. There is a controversy whether opioid receptors of the  $\delta$  subtype that are found in cardiac tissue have a role in cardiac function and it is unclear if there is any direct myocardial effect of various opioid peptides when they are perfused. We explored the effect of  $10^{-7}$  M DTP on altering the left ventricular pressure (LVP) /intracellular  $Ca^{2+}$  transient relationship in intact, beating hearts.

**Methods:** The hearts of 5 anesthetized guinea pigs were isolated and perfused at constant pressure (55 mmHg) with a Krebs's solution (2.5 mM  $CaCl_2$ ). Heart rate (HR), coronary flow (CF) and LVP were monitored. LV surface  $Ca^{2+}$  transients were measured by the ratio of fluorescence emission at F386/F456 nm with the free  $Ca^{2+}$  fluorescent indicator indo 1. After insertion of a saline filled balloon to measure LVP, and loading and washout of  $6 \mu$ M indo 1 AM, hearts were exposed to Krebs's solution containing 0.3 to 4.5 mM  $CaCl_2$  and LVP and  $Ca^{2+}$  transients were

recorded before (control) and after perfusion of DTP. After correcting for autofluorescence and mitochondrial uptake, the emitted fluorescence ratio, F386/F456, indicated relative but proportional changes in diastolic (d) and systolic (s) free  $Ca^{2+}$ . Data were expressed as  $sCa^{2+}$  and  $dCa^{2+}$  as a function of  $CaCl_2$ , and sLVPmax (control) as a function of  $sCa^{2+}$ max transients (control). Results: As a function of extracellular  $CaCl_2$ , DTP decreased  $sCa^{2+}$ max by 7.5% but increased  $dCa^{2+}$ max by 6.6% (measured at 2.5 mM  $CaCl_2$ ) so that  $s$ - $dCa^{2+}$ max (total) decreased by 40%, indicating markedly reduced total  $Ca^{2+}$  for a given extracellular  $CaCl_2$ . But DTP increased sLVPmax at  $sCa^{2+}$ max by 20%, indicating enhanced contractile effort for a given  $sCa^{2+}$  by DTP. The figure shows that when sLVPmax for DTP was normalized to control sLVPmax at  $sCa^{2+}$ max (F386/F456) (i.e. to 1) there was a 7.3% leftward shift in the sLVPmax / $sCa^{2+}$ max relationship at 50% sLVPmax. This is indicative of enhanced myofibrillar responsiveness to  $Ca^{2+}$  in the presence of DTP compared to control.

**Key words :** Deltorphin, Intracellular calcium, Isolated heart, Calcium sensitivity

(Circ Cont 19:237~241, 1998)