

Single ischemic preconditioning (PC) と異なり Repetitive PC (5分虚血・5分再灌流2回) はウサギ60分虚血モデルにおいても梗塞縮小効果を持つ

宇野嘉弘*, 湊口信也*, 荒井正純*, 西田佳雄*
 荻谷達也*, 橋本和明*, 藤原久義*, 藤原兌子**

Abstract

(目的) 冠動脈側副血行を持たないウサギ心臓において, 5分虚血・5分再灌流1回の ischemic preconditioning (single PC) による梗塞縮小効果は, 30分虚血では認めるが, 60分虚血では効果が無い。しかし, 5分虚血・5分再灌流2回の反復 PC (repetitive PC) は, single PC と異なるメカニズムでウサギ30分虚血の梗塞 size を縮小するとされる。本研究の目的は, i) PC による梗塞縮小効果が無いとされる60分虚血モデルにおいて repetitive PC が梗塞サイズを縮小させるが, ii) そのメカニズムに lactate と glycogen 含有量が関与するかを明らかにすることである。(方法) i) 日本白色種ウサギを対照群, single PC 群, repetitive PC 群の3群に分け, pentobarbital 麻酔・人工呼吸下に梗塞モデルを作成, 60分虚血再灌流48時間後に sacrifice, monastral blue を注入し虚血/非虚血領域を決定, 組織学的に梗塞巣を定量化し虚血領域中の梗塞サイズを%にて求めた。ii) 対照群, single PC, repetitive PC について, 60分虚血後に sacrifice し, 生化学的アッセイを行った。(結果) i) 60分虚血に対し repetitive PC は, single PC (71.8±7.3%, n=7), 対照群 (74.1±5.2%, n=9) に比し梗塞縮小効果(31.8±5.4%, p<0.05, n=7)を示した。ii) 心筋虚血領域内の glycogen 減少量は60分虚血後の3群間では有意差を認めな

かった。心筋虚血領域内 lactate 増加量は60分虚血後では対照群 (n=6) に比し repetitive PC 群 (n=8) にて有意の低下を認めた (1.6±0.4 vs 0.8±0.3 mg/g wet tissue)。(結語) repetitive PC はウサギ60分虚血モデルにおいて, single PC では認めない梗塞サイズ縮小効果を示し, sustained ischemia 中の心筋内 lactate 産生の減少が関与することが示された。

背景

短時間の虚血・再灌流が, 引き続き長時間の虚血に対し心筋保護的に働く ischemic preconditioning (PC) についてはラット¹⁾, ウサギ²⁾, イヌ^{3,4)}およびブタ⁵⁾について報告されている。しかし, この心筋保護効果は引き続き長時間虚血の長さに依存し, ウサギにおいては5分虚血・5分再灌流1回の PC (single PC) による梗塞縮小効果は, 30分虚血に対し protective であるが, 60分虚血に対しては効果が無いとされている⁶⁾。しかし, 5分虚血・5分再灌流2回の反復 PC (repetitive PC) を行うことにより, single PC では30分虚血に対して protein kinase 阻害剤の staurosporine によってブロックされる梗塞縮小効果が, repetitive PC により梗塞縮小効果が保持される⁷⁾という報告がなされていることから, 60分虚血に対しても効果のある可能性がある。

また著者らは, 虚血中の心筋内嫌気性糖代謝による細胞内 pH 上昇と lactate の貯留が虚血心筋障害の1機序であることより, ウサギモデルにおいて glycogen 脱分枝酵素 α -glucosidase の阻害作用

*岐阜大学医学部第二内科

**京都女子大学家政学部食物栄養科

を有す N-methyl-1-Deoxynojirimycin (MOR-14) が30分虚血・再灌流モデルにて梗塞縮小効果を持つことを示している⁸⁾。

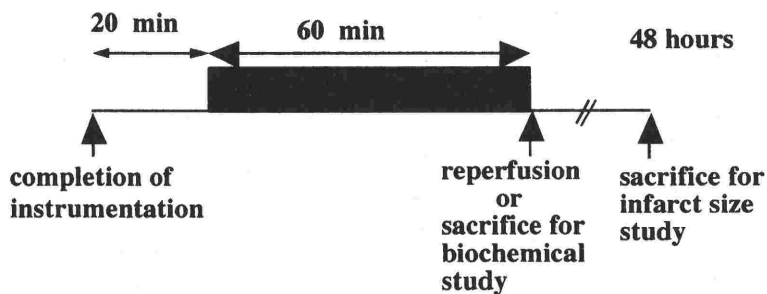
以上のことより本研究では、冠動脈側副血行を持たないウサギ心臓において、

- 1) Repetitive PC が60分虚血に対し梗塞縮小効果を持つか。
- 2) Repetitive PC の梗塞縮小効果発現の際、心筋内嫌気性糖代謝は如何に変化しているかについて検討する。

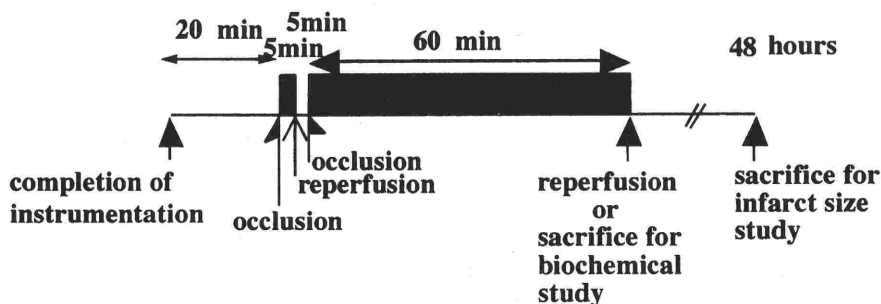
方 法

1) 対象は、日本白色種ウサギ(雄)を用いた(n=44, 体重2.1±0.1 kg)。Pentobarbital (50 mg/kg) を耳静脈より静注し麻酔後、気管内挿管, tidal volume 30 ml, 呼吸数30回/分にて人工呼吸を行い、左頸動脈から血圧をモニターした。次いで、第3肋間から開胸し、心臓を露出、左冠動脈前側壁枝の周囲に糸をかけ、occluderにて結紮し、心筋虚血を生ぜしめるようにし、梗塞モデルを作成、Fig. 1 に示すプロトコールにしたがい、対照群、

1) control :



2) 1 x PC+60' :



3) 2 x PC+60' :

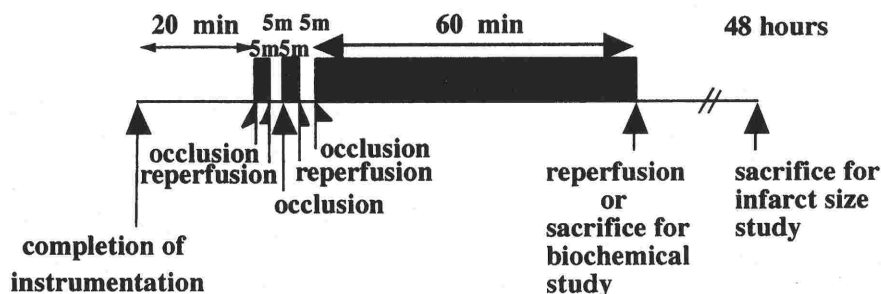


Fig. 1 Experiment schedule

single PC 群, repetitive PC 群の3群に分け, 梗塞を作成した. 60分虚血終了後切開部を縫合, 麻酔覚醒後ウサギをケージに戻し, 再灌流48時間後に屠殺した. 心臓を摘出し, 糸をかけた左冠動脈前側壁枝を再結紮, ランゲンドルフ法にて monastral blue を注入し虚血領域と非虚血領域を決定した. ひき続いて左室を分離し TTC 染色⁹⁾により梗塞巣を染色しスライド写真に撮像, personal computer にデジタル入力し梗塞領域, 虚血領域と非虚血領域を定量化, 左室当たりの虚血領域量 (% area at risk) および虚血領域中の梗塞サイズ (% infarct size) を求めた.

2) 対照群, single PC 群, repetitive PC 群について1)と同様の処置を行い, 60分虚血直後に屠殺, 虚血領域と非虚血領域にわけ組織を採取, 直ちに -80°C で凍結保存した. 組織は測定直前に解凍・ホモジネートし, lactate については NADP linked spectrophotometry にて, glycogen 含有量は lactate oxidase による hydrogen peroxidase formation の spectrophotometry で心筋内 glycogen と lactate を測定した¹⁰⁾.

結 果

1) 左室当たりの虚血領域を示した % area at risk にては, 対照群 ($26.2 \pm 1.9\%$, $n=9$), single PC ($29.9 \pm 3.6\%$, $n=7$), repetitive PC ($30.8 \pm 4.9\%$, $n=7$, $p<0.05$) と3群間に有意差を認めなかった. 虚血領域中の梗塞サイズ (% infarct size) は, 対照群 ($74.1 \pm 5.2\%$), single PC ($71.8 \pm 7.3\%$) に比し repetitive PC は, 梗塞サイズ縮小効果 ($31.8 \pm 5.4\%$, $p<0.05$) を示した.

2) 虚血領域内の60分虚血直後の glycogen 減少量は, 対照群: 5.7 ± 1.0 mg/kg (wet tissue) ($n=6$), single PC 群: 7.2 ± 1.2 mg/kg ($n=7$), repetitive PC 群: 5.9 ± 1.0 mg/kg ($n=8$) と3群間では有意差を認めなかった. 虚血領域内 lactate 増加量は60分虚血直後は対照群: 1.6 ± 0.4 mg/kg (wet tissue) ($n=6$), single PC 群: 1.1 ± 0.2 mg/kg ($n=7$), repetitive PC 群: 0.8 ± 0.3 mg/kg ($n=8$) で, repetitive PC 群で対照群に比し有意の低下 ($p<0.05$) を認め, また虚血領域内 lactate 含有量の絶対値でも対照群: 2.7 ± 0.4 mg/kg (wet tissue) ($n=6$), single PC 群: 2.0 ± 0.2 mg/kg ($n=7$), repetitive PC 群: 1.6 ± 0.4 mg/kg ($n=$

8) と repetitive PC 群で対照群に比し有意の低下 ($p<0.05$) を認めた.

考 案

本実験において, 5分虚血・5分再灌流1回の ischemic preconditioning (single PC) による梗塞縮小効果は, 60分虚血に対しては効果が無いが, 5分虚血・5分再灌流2回の反復 PC (repetitive PC) により60分虚血での梗塞縮小効果が発現した. 従来, ウサギにおいては5分虚血・5分再灌流1回の PC (single PC) による梗塞縮小効果は, 30分虚血に対し protective であるが, 60分虚血に対しては効果が無いとされているが, repetitive PC を行うことにより, single PC より強力な梗塞縮小効果が今回認められた. repetitive PC については, single PC では30分虚血に対して staurosporine によってブロックされる梗塞縮小効果が, repetitive PC により梗塞縮小効果が保持される⁷⁾ ことより, repetitive PC のメカニズムとしては protein kinase C 活性化によって引き起こされる一連の細胞内情報伝達系の心筋保護効果以外のものの関与が考えられる. 昨今 PC における KATP channel 開口の関与が報告されるようになり¹¹⁾, ウサギにおいては著者らも, KATP channel opener の nicorandil にて梗塞縮小効果の発現を認め, KATP channel blocker の glibenclamide によりブロックされることを報告している¹²⁾. 今後 KATP channel の, ウサギ60分虚血における repetitive PC による梗塞縮小効果増強への関与が検討課題とされる.

一方, repetitive PC により嫌気性糖代謝による心筋内 lactate 産生が single PC 以上に抑制されたことについては, 以下の仮説が考えられる. single PC に比し repetitive PC の方が虚血領域内の glycogen をより多く消費したことにより, 引き続き60分間の sustained ischemia 中に発生する lactate の基質である glycogen の絶対量に有意差が生じ, その結果, 60分虚血直後の虚血領域内 lactate 増加量が repetitive PC 群で有意に減少したと推測する. 虚血領域内 lactate 産生が PC によって抑制されることは以前より報告されているが¹²⁾, repetitive PC によりその効果が増強されることについては今まで報告がなく, この虚血領域内 lactate 増加量の減少も梗塞縮小効果の一機序と考え

られる。

結 語

repetitive PC はウサギ60分虚血モデルにおいて、single PC では認めない梗塞サイズ縮小効果を認め、sustained ischemia 中の心筋内 lactate 産生の減少が関与することが示された。

文 献

- 1) Li YW, Whittaker P, Kloner RA : The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J* 123 : 346-353, 1992
- 2) Thornton J, Striplin S, Downey JM, et al : Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am J Physiol* 259 : H1822-H1825, 1990
- 3) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, et al : Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124-1136, 1986
- 4) Li GC, Vasquez JA, Lucchesi BR, et al : Myocardial protection with preconditioning. *Circulation* 82 : 609-619, 1990
- 5) Schott RJ, Rohmann S, Sehaper W, et al : Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 66 : 1133-1142, 1990
- 6) Miura T, Imura O : Infarct size limitation by preconditioning : its phenomenological features and the key role of adenosine. *Cardiovasc Res* 27 : 36-42, 1993
- 7) Miura T, Kawamura S, Shimamoto K, et al : Effect of protein kinase C inhibitors on cardioprotection by ischemic preconditioning depends on the number of preconditioning episodes. *Cardiovasc Res* 37(3) : 700-709, 1998
- 8) Arai M, Yoshikuni Y, Fujiwara H, et al : N-methyl-1-deoxynojirimycin (MOR-14), an α -glucosidase inhibitor, markedly reduced the infarct size in rabbit hearts. *Circulation* 97(13) : 1290-1297, 1998
- 9) Fishbein MC, Meerbaum S, Ganz W, et al : Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 101 : 593-600, 1981
- 10) Bergmyer HU. In : *Methods of enzymatic analysis*. New York and London: Academic Press Inc, vol.4, 1446-1451, 1974
- 11) Gross GJ, Auchampach JA : Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70 : 223-233, 1992
- 12) Ohno Y, Minatoguchi S, Fujiwara H, et al : Nicorandil reduces myocardial infarct size by opening the KATP channel in rabbits. *Int J Cardiol* 62 : 181-190, 1998
- 13) Asimakis OK, Inners-McBride K, Conti YR, et al : Ischemic preconditioning attenuates acidosis and post-ischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol* 263 : H887-H894, 1992
- 14) Jennings RB, Murry CE, Reimer KA, et al : Energy metabolism in preconditioned and control myocardium : effect of total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 23 : 144-145, 1998