

学位申請論文

左室拡張障害の発生とその予防に関する実験的検討 —ラット陳旧性梗塞心による検討—

獨協医科大学 内科学 (心血管・肺)

西野 節

要 旨 陳旧性心筋梗塞ラットで、ノルエピネフリン誘発性拡張障害を惹起させ、その発生様式ならびにリアノジン受容体安定化作用を有する1,4-ベンゾチアゼピン誘導体K201の改善作用を調べた。冠動脈結紮10～13週間後、ノルエピネフリン (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$) を30分間投与し、K201投与群 (n=5)、非投与群 (n=5)、sham群 (n=3) で、心拍数、左室収縮期圧、左室拡張期最小圧、左室拡張末期圧、+dP/dt、-dP/dtを測定した。K201 (0.1 mg/kg/分) はノルエピネフリン投与中に10分間投与した。ノルエピネフリン投与により梗塞サイズと左室拡張期最小圧、左室拡張末期圧との間に正相関があり、K201は心拍数、左室収縮期圧、左室拡張期最小圧、左室拡張末期圧を有意に減少させ、非投与群との%変化率でも拡張能を有意に改善させた。以上よりK201は梗塞心におけるノルエピネフリン誘発拡張障害を改善させ、その作用機序としてK201の α_1 受容体遮断作用に加えて、リアノジン受容体安定化作用による細胞内 Ca^{2+} 負荷の改善が示唆された。

Key Words : ラット陳旧性心筋梗塞, ノルエピネフリン, 左室拡張障害, K201

緒 言

近年、虚血性心疾患は経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス術などの観血的治療の進歩により、致死率は低下した。しかし、心筋梗塞後、慢性期における心不全をいかに予防するかが新たな問題となってきた。心不全には収縮不全と拡張不全の2つがある。前者は左室駆出率が45～50%未満、後者は左室駆出率が45～50%以上で心不全症状を有する場合に診断される。拡張不全は梗塞心をはじめ高齢者、女性、高血圧や糖尿病の疾患を有する患者で見られ、左室駆出率の低下を認めず、脳性ナトリウム利尿ペプチドは高値を示す¹⁻⁴⁾。収縮不全に拡張障害が合併することも少なくないが、拡張不全は全心不全の約半数に認められ、予後も収縮不全と同じであると述べられている^{5,6)}。

現在、拡張不全あるいは拡張障害に対する有効な治療薬はない。1,4-ベンゾチアゼピン誘導体、K201はカテコールアミン誘発性 Ca^{2+} 過負荷心筋傷害モデルに対する強

い心筋保護作用効果がある新規物質として創生された⁷⁾。K201には α アドレナリン受容体遮断作用と細胞内カルシウム遮断作用、マルチチャネル遮断作用に加えて、リアノジンレセプター安定化作用などがある⁸⁾。リアノジン受容体は筋小胞体での Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離に関するが、リアノジン受容体のリン酸化により、拡張期に筋小胞体から Ca^{2+} 逸脱がおり、心不全や悪性不整脈が発生することが報告されている^{9,10)}。

最近、我々はラットに Ca^{2+} 負荷後ノルエピネフリンを投与すると左室拡張末期圧の著明な上昇とともに心臓超音波法で左室駆出率は正常であるが拡張能が障害されることを見出した¹¹⁾。またラットを用い慢性梗塞心にノルエピネフリンを投与すると、非梗塞心 (sham群) との比較で、有意に左室拡張末期圧が上昇することを報告した¹²⁾。本研究では、ラットに心筋梗塞を作成し、ノルエピネフリン誘発性拡張障害を作成後、梗塞サイズとの相関を調べると共に、リアノジン受容体安定化作用を有するK201の薬理効果を非投与群と比較して検討した。

実験方法

1. 実験プロトコール

体重260～320 g、8～9週令Wistar系雄性ラットを用いた。ラットを購入後、水分、飼料を自由に与え、購入

平成20年10月31日受付、平成20年11月28日受理

別刷請求先: 西野 節

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880

獨協医科大学 内科学 (心血管・肺)

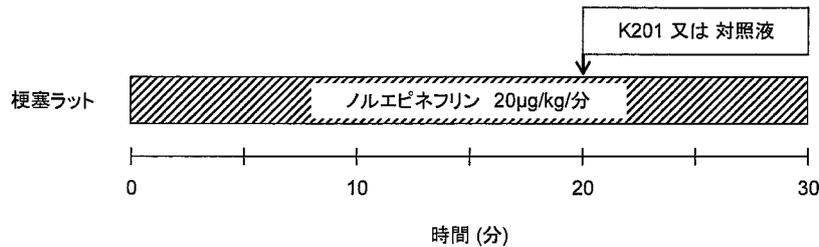


図1 実験1プロトコール。

1週間後に実験に使用した。実験は本学実験動物委員会の許可を得て、獨協医科大学の動物実験倫理規定に基づいて行った。

23匹のラットを用いた。20匹に3%イソフルランを吸入麻酔後、ポリエチレンチューブ (SP102, Natsume社) を気管内挿管し、人工呼吸器 (SN-480-7, シナノ社) を装着した。1.7%イソフルランの吸入麻酔下で、60回/分、1回換気量3mlの呼吸管理をおこなった。左第3肋間で開胸し、心嚢膜を切開後、梗塞群は左冠動脈前下行枝を絹糸 (6.0; Ethicon) で完全結紮し、直ちに閉胸した。非梗塞群3匹 (sham-ope) は梗塞群と同じ方法で開胸し、左冠動脈前下行枝に糸をかける操作のみとし、結紮せずに閉胸した。両群とも、気管内チューブを抜管し覚醒後、飼育室に戻し、上記と同様の環境下で飼育した。

冠動脈結紮を行った20匹中、10匹は結紮後24時間以内に死亡した。10~13週間経過後、再度、上記と同様に、麻酔後気管内挿管した。右総頸動脈から圧測定チップ付カテーテル (2F; SPC-320, ミラー社) を左室内に挿入、また、各種溶液を注入するため、右大腿静脈から試験薬注入用ポリエチレンチューブ (SP10) を挿入し、持続注入器 (KDS210, KDS) を装着し各溶液を一定速度で注入した。心電図は四肢に電極を装着し生体アンブ (P55, GRASS Inc.) により第2誘導をモニターした。10分間の血行動態の安定化を図った後、慢性梗塞ラット群にノルエピネフリン (20 µg/kg/分) を30分間投与した。ノルエピネフリン投与20分後に、5匹にK201を0.1 mg/kg/分で10分間投与し、5匹を対照群とした (図1)。各々溶液の注入速度は1分間当たり 16.6 µl とした。

各群で連続的に1分毎に、心拍数、左室収縮期圧、左室拡張期最小圧、左室拡張末期圧、ダブルプロダクト、左室圧一次微分の最大陽性 dP/dt (+ dP/dt)、左室圧一次微分の最大陰性 dP/dt (- dP/dt) を測定し、5分毎に算出した。ノルエピネフリン投与前、15分後に梗塞サイズと各パラメーターの相関を調べた。また、K201投与前後で各パラメーターを測定し、さらに非投与前後と%変化率 (前値100%に対する変化率) で比較した。左室拡張末期圧の測定は左室等容収縮期の開始時で、この点が特

定できない場合は心電図のR波に一致する圧で測定した¹³⁾。実験終了後、屠殺し心臓を摘出し、梗塞の大きさを測定した。

2. 組織標本の作製と心筋梗塞サイズの測定

摘出した心臓を脂肪や結合組織などを除去、10%ホルマリン溶液にて48時間固定後中央部で横断し、パラフィン包埋し厚さ3 µmの切片を作製、型のごとく脱水脱脂後、ヘマトキシリンエオシンとマッソントリクロム染色を行った。左室中央部の横断切片をコンピューターに取り込み、心筋梗塞の大きさ (梗塞サイズ: %) は以前に報告した Sandmann らの方法¹⁴⁾ に準じて求めた: 心筋梗塞サイズ (%) =

$$\frac{\{(\text{梗塞外周囲径} + \text{梗塞内周囲径}) \div 2\} \div \{(\text{左室外周囲径} + \text{左室内周囲径}) \div 2\}}{\times 100}$$

3. 統計解析

測定値は平均値 ± 標準偏差で示した。各データは、SPSS (バージョン14.0J) を用い paired t-test を用いて解析した。p値0.05以下を有意差ありとした。

結 果

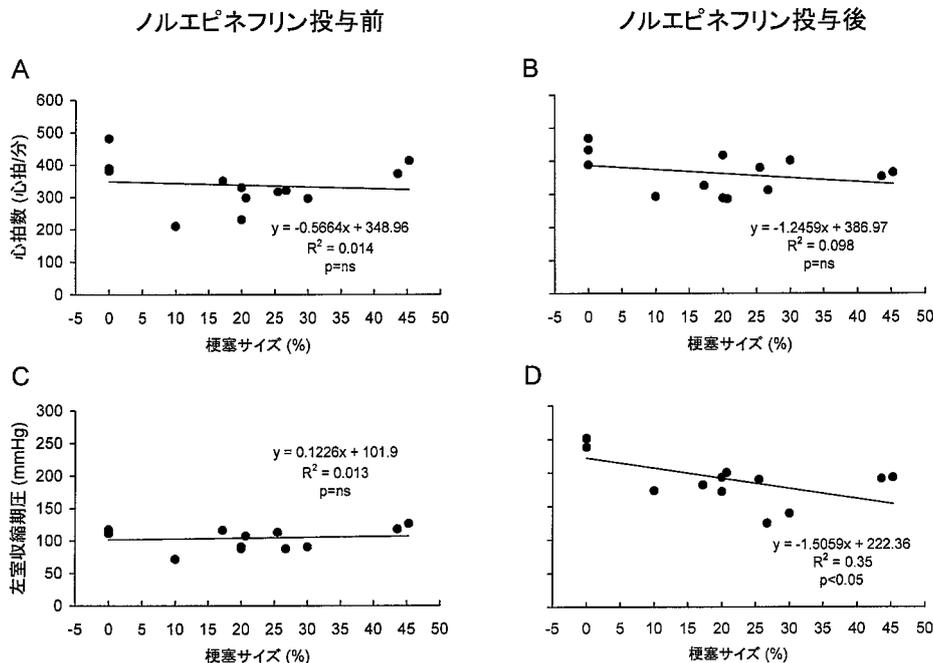
梗塞ラット、sham群の梗塞サイズは各々 25.6 ± 11.2 %, 0%であった。梗塞ラットにおけるノルエピネフリン投与前、ノルエピネフリン投与15分後の血行動態変化を表1に示す。ノルエピネフリン投与により心拍数を除き、全てのパラメーターが有意に増加した。sham群ではノルエピネフリン投与で左室収縮期圧以外には有意な変化を示さなかった。図2, 3, 4に、sham群、梗塞ラットにおける梗塞サイズとノルエピネフリン投与前、後の血行動態の各パラメーターを示す。ノルエピネフリン投与前では梗塞サイズと各パラメーターとは相関がなかった。ノルエピネフリン投与後は梗塞サイズと左室拡張期最小圧、左室拡張末期圧 (図3) とは著しい正相関を示し、左室収縮期圧、+ dP/dt、- dP/dtとも逆の相関を示したが、心拍数とは相関を示さなかった。

図5に梗塞ラット例におけるノルエピネフリン投与

表1 ノルエピネフリン投与前後の血行動態

	投与前	投与後	p値
心拍数 (心拍/分)	337.7 ± 25.8	362.2 ± 59.4	ns
左室収縮期圧 (mmHg)	104.3 ± 16.4	192.4 ± 38.0	< 0.005
ダブルプロダクト	36111.7 ± 12085.7	70826.0 ± 23287.4	< 0.005
左室拡張期最小圧 (mmHg)	4.2 ± 2.4	13.0 ± 8.1	< 0.005
左室拡張末期圧 (mmHg)	6.0 ± 2.3	17.1 ± 8.5	< 0.005
+ dP/dt	6030.9 ± 2199.3	14312.9 ± 8745.4	< 0.005
- dP/dt	5441.0 ± 2189.0	6050.2 ± 4192.8	ns

ns: 有意差なし

図2 梗塞サイズと心拍数 (A, B), 左室収縮期圧 (C, D) の関係。
ns: 有意差なし。

前, ノルエピネフリン投与後K201投与前, K201投与後の左室内圧曲線, dP/dt, 心電図の同時記録を示す。ノルエピネフリン投与により左室拡張末期圧 (矢印) は上昇し, K201投与により低下する。

図6, 7, 8にノルエピネフリン投与下におけるK201の投与前後の血行動態変化を示した。K201投与後, 心拍数 ($p < 0.05$), 左室収縮期圧 ($p < 0.005$), ダブルプロダクト ($p < 0.01$) (図6), 左室拡張期最小圧 ($p < 0.05$), 左室拡張末期圧 ($p < 0.05$) (図7) は有意に低下した。しかし, + dP/dt, - dP/dtはK201投与前後で有意な変化を認めなかった (図8)。

ノルエピネフリン投与下でのK201投与群と非投与群との血行動態の変化率 [投与前値を100%として表示]を

示す (図9, 10, 11)。K201投与群, 非投与群の梗塞サイズは各々 $23.0 \pm 8.1\%$, $26.8 \pm 11.8\%$ で両者間に有意差を認めなかった。K201投与群では対照群に比べ, 心拍数 ($p < 0.05$), 左室収縮期圧 ($p < 0.05$), ダブルプロダクト ($p < 0.01$) (図9) を有意に低下させた。さらに左室拡張期最小圧 ($p < 0.005$), 左室拡張末期圧 ($p < 0.05$) (図10), - dP/dt ($p < 0.05$) を有意に改善させたが, + dP/dtは有意な変化を示さなかった (図11)。

考 察

カテコールアミンは心筋の収縮, 弛緩に密接に関わっている。心臓において, 神経終末よりノルエピネフリンが分泌され, 主として β_1 受容体作用として, 心筋収縮力

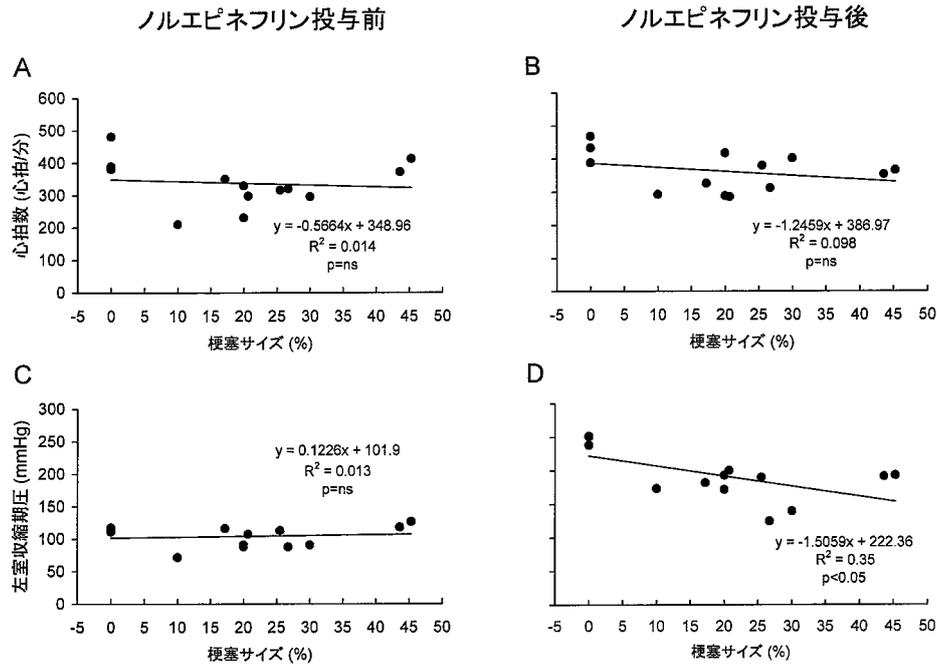


図3 梗塞サイズと左室拡張最小圧 (A, B), 左室拡張末期圧 (C, D) の関係。
ns ; 有意差なし。

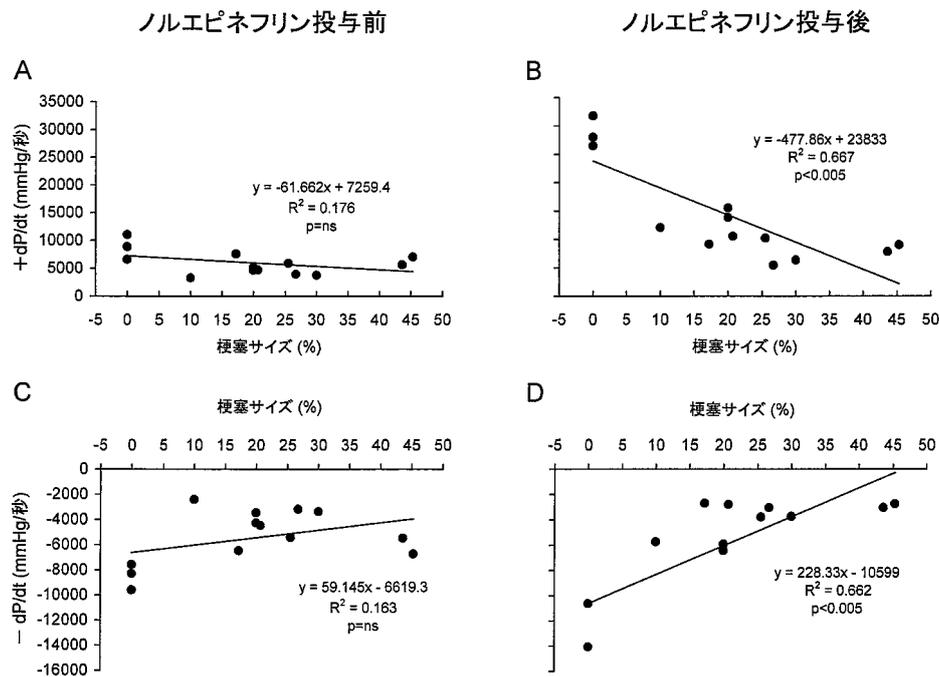


図4 梗塞サイズと +dP/dt (A, B), -dP/dt (C, D) との関係。
ns ; 有意差なし。

の増加, 心拍数の増加をもたらす。血管平滑筋に対しては α_1 受容体刺激作用により血管収縮を起こすことは周知のことである。しかし, ノルエピネフリンの拡張機能に及ぼす影響については十分にはわかっていない。

すでに狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患において

で, 心不全を有する患者の血漿中ノルエピネフリン濃度が高値であることが知られている。Cohnらは, 血中ノルエピネフリン濃度が800 pg/ml以上の心不全患者の予後は不良であると報告した¹⁵⁾。また, Benedictらは, 左室機能障害駆出率が35%以下の無症状の患者において, 血

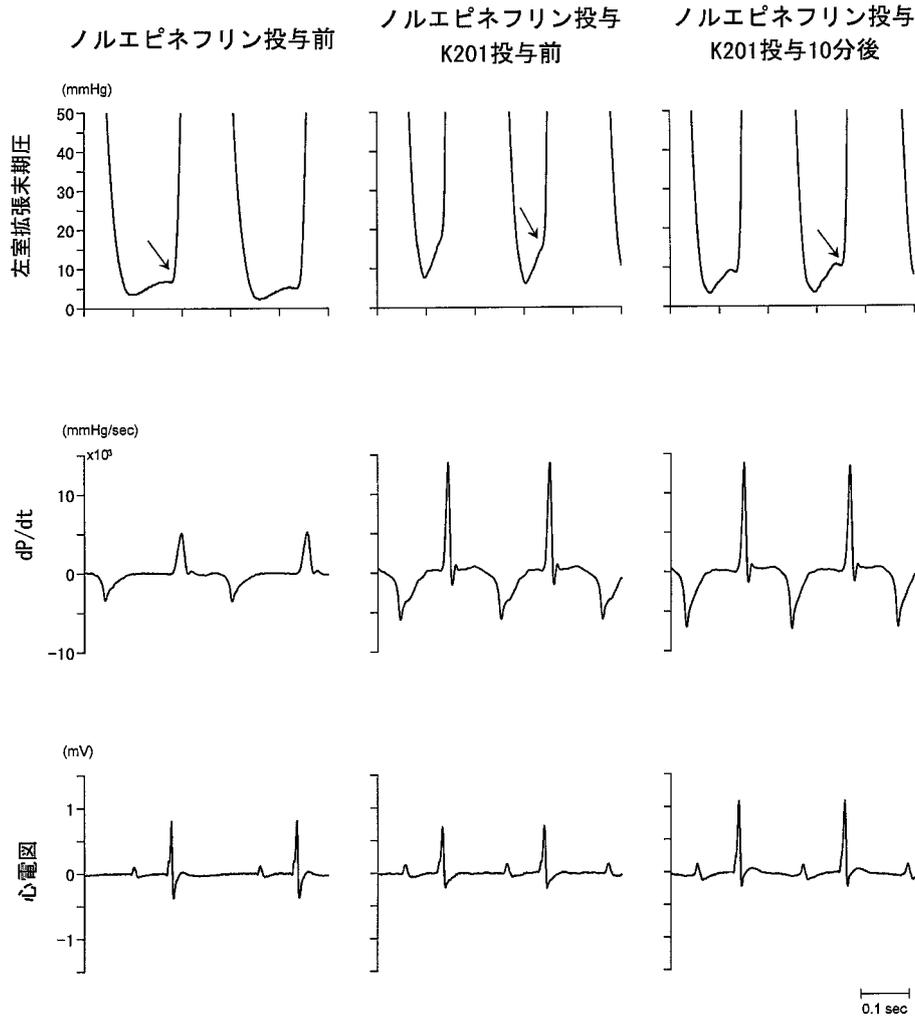


図5 左室圧曲線, dP/dt, 心電図の同時記録。
 ノルエピネフリン投与後左室拡張末期圧 (矢印) は上昇し (中央列, 最上図), K201投与後改善した (右列, 最上図)。

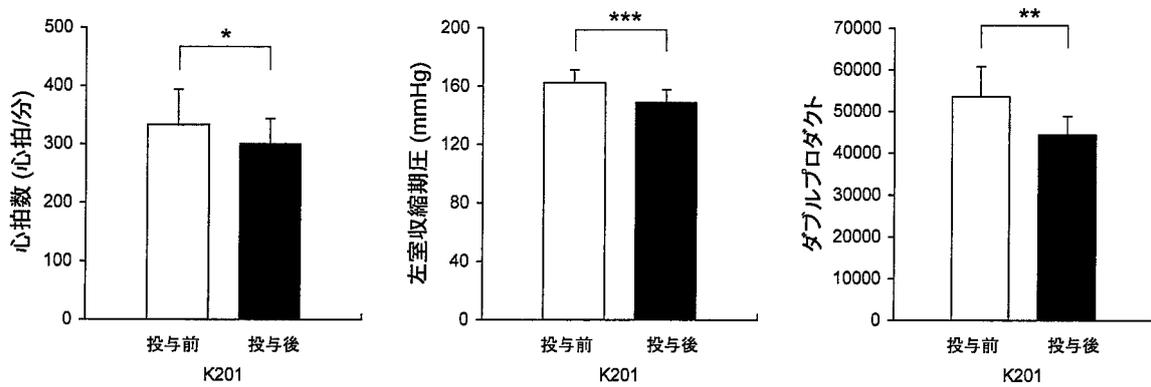


図6 K201投与前後の心拍数, 左室収縮期圧, ダブルプロダクト.

* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$, *** ; $p < 0.005$.

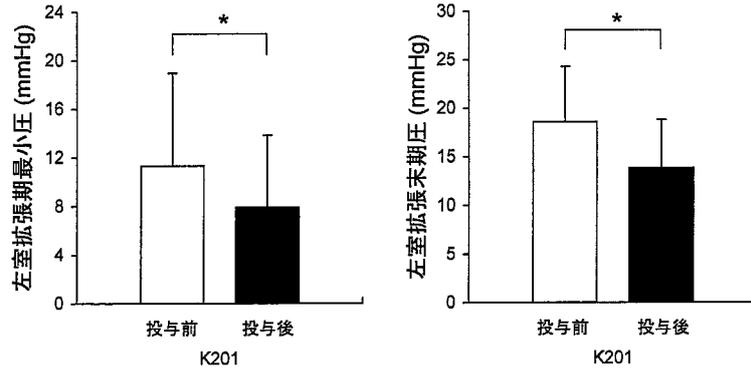


図7 K201投与前後の左室拡張最小圧, 左室拡張末期圧.
* ; p < 0.05.

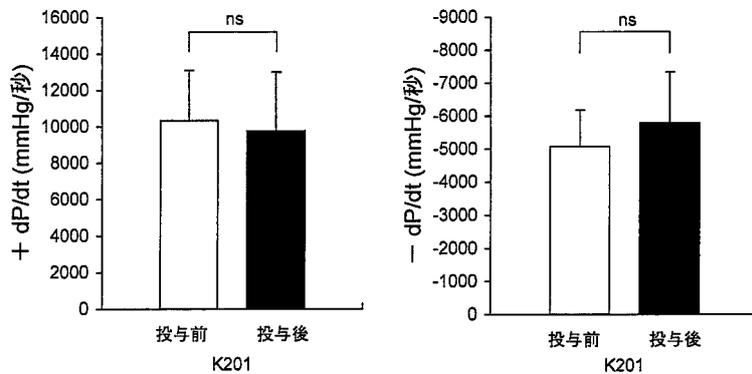


図8 K201投与前後の+dP/dt, -dP/dt.
ns ; 有意差なし.

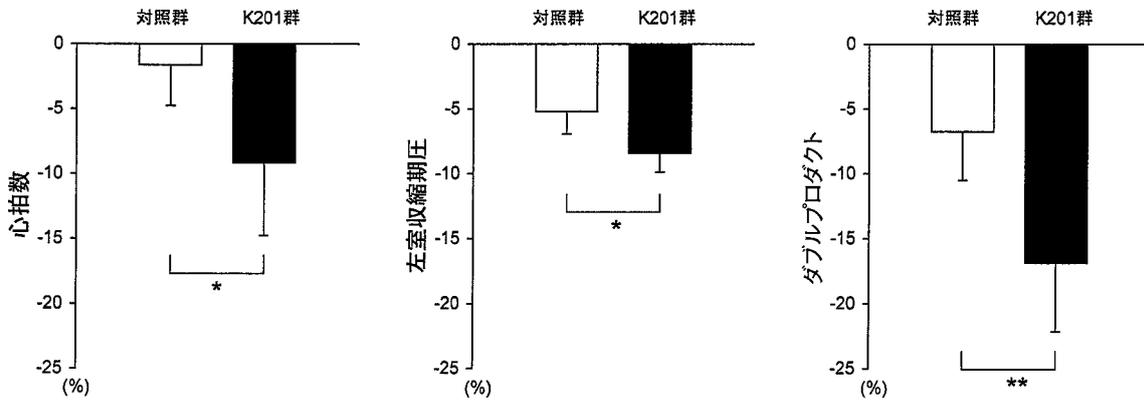


図9 対照群とK201群の心拍数, 左室収縮期圧, ダブルプロダクトの変化率 [投与前値を100%として表示].
* ; p < 0.05, ** ; p < 0.01.

中ノルエピネフリン値が高い患者 (393 pg/ml以上) では, それより低い濃度の患者に比べ, 全死亡率, 心血管死亡率, 心不全による入院率, 虚血性心疾患のイベント率が, いずれも有意に高いと報告している¹⁶⁾.

心臓は一定の心周期を有して収縮, 弛緩, 拡張を行っている. 収縮期は僧帽弁閉鎖から大動脈弁閉鎖まで, 拡

張期は大動脈閉鎖から僧帽弁閉鎖までであるが, 収縮期はさらに, 僧帽弁閉鎖から大動脈弁開放までの等容収縮期, 大動脈弁開放から大動脈弁閉鎖までの駆出期に, さらに拡張期は大動脈弁の閉鎖から僧帽弁の開放までの等容弛緩期, 早期血液流入期, 緩徐血液流入期, 心房収縮による血液流入期の4相に分けられる. 拡張障害では早

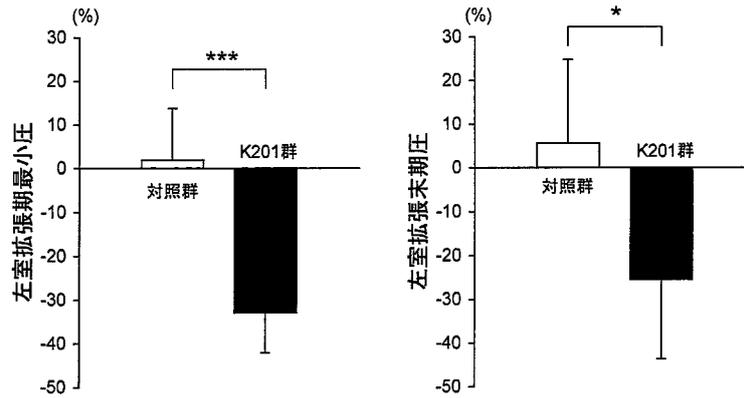


図 10 対照群と K201 群の左室拡張期最小圧, 左室拡張末期圧の変化率 [投与前値を 100% として表示].

* ; $p < 0.05$, *** ; $p < 0.005$.

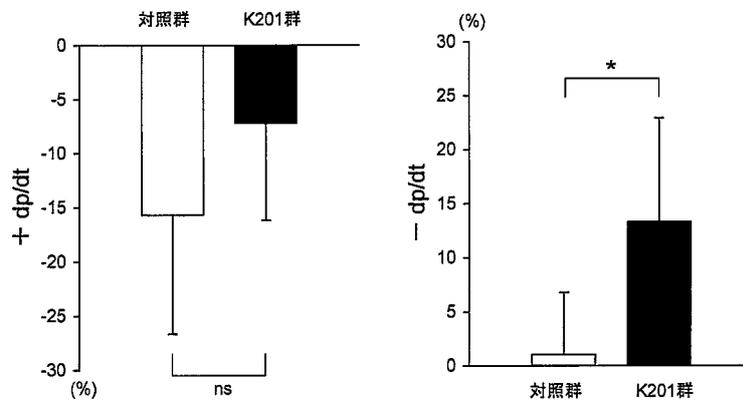


図 11 対照群と K201 群の + dp/dt, - dp/dt の変化率 [投与前値を 100% として表示].

* ; $p < 0.05$, ns ; 有意差なし.

期血液流入, 緩徐血液流入, 心房収縮による血液流入が障害される結果として, $-dp/dt$ の減少や左室最小拡張期圧, 左室拡張末期圧の上昇などを認める. 臨床では, 拡張障害の診断に組織ドップラー法心臓超音波検査や脳性ナトリウム利尿ペプチド測定が用いられている^{17,18)}.

これまで, 心不全における血漿ノルエピネフリンの高値は心不全に伴う交感神経の緊張によると理解されてきた. しかし, カルシウム負荷下でのノルエピネフリンが拡張障害を起こすこと¹¹⁾, 慢性梗塞心でノルエピネフリンにより拡張障害が起こること¹²⁾が分かってきた. また, K201が Ca^{2+} 負荷下ノルエピネフリン誘発性拡張障害に対して改善する働きがあること¹⁹⁾が明らかされてきた.

Ca^{2+} 動態は心筋の興奮-収縮連関の基本である. 細胞外から流入する Ca^{2+} 増加は筋小胞体膜のリアノジン受容体に作用し, 筋小胞体の貯蔵 Ca^{2+} が細胞質内に放出される. 狭心症や実験的虚血心筋の拡張期拘縮の原因として, 細胞内 Ca^{2+} 過負荷が報告されている^{20,21)}. 虚血心筋における細胞内 Ca^{2+} の過負荷は, 細胞内 Ca^{2+} 流入の増

加, 拡張期の筋小胞体への Ca^{2+} 再摂取 (calcium reuptake) の低下によると考えられている²²⁾. 最近, β_1 受容体刺激により protein kinase A (PKA) を介して, リアノジン受容体が過リン酸化されると, リアノジン受容体と FK506 結合蛋白質 (FKBP) が解離し, 筋小胞体から拡張期に Ca^{2+} 漏出がおり, 悪性不整脈や心不全を引き起こすことが報告されている^{9,10)}.

本研究では, 陳旧性心筋梗塞ラットにノルエピネフリン投与し, K201の抑制効果を調べた. ノルエピネフリン投与により左室拡張期最小圧, 左室拡張末期圧は上昇し, $+dp/dt$, $-dp/dt$ の増加を認めた. K201は心拍数, 左室収縮期圧 (LVP max) を低下させ, ダブルプロダクトを減少させた. また, K201は梗塞ラット心のノルエピネフリン誘発性拡張障害に対し左室拡張期最小圧, 左室拡張末期圧を有意に改善させた. しかし, $+dp/dt$ には有意の変化を示さなかった. 以上の結果は, K201はノルエピネフリン誘発拡張障害に対して, 収縮性に影響を与えず, 拡張障害を改善することを示している.

K201が病的状態で筋小胞体での拡張期Ca²⁺逸脱を抑制すること、K201がFKBPと結合し、筋小胞体を安定化させる作用^{9,10)}が示されてきた²³⁾。また、K201がアネキシンVと結合し、病的状態でCa²⁺流入を抑制することが知られている^{24,25)}。ノルエピネフリンは α_1 アドレナリン受容体刺激によりprotein kinase C (PKC)、 β_1 受容体刺激作用ではprotein kinase A (PKA)を介して心筋細胞内Ca²⁺濃度を調整している²⁶⁾。K201は α_1 受容体の遮断作用を有することはすでに確認されている⁷⁾。本研究において、K201は梗塞心におけるノルエピネフリン誘発拡張障害を改善させたが、その作用機序としてK201の α_1 受容体遮断作用に加えて、リアノジン安定化作用による細胞内Ca²⁺負荷の改善が示唆された。今後、拡張期のCa²⁺動態と拡張障害発生との関係について更なる検討が必要と考えられる。

結 論

1. 梗塞心において、ノルエピネフリン投与により、左室拡張期最小圧、左室拡張末期圧と梗塞サイズとは著明な正相関があったが、心拍数とは相関を示さなかった。
2. K201は、左室拡張末期圧、左室拡張期最小圧を有意に低下させ、非投与群との比較でも%変化率を有意に低下させた。
3. 梗塞心でのノルエピネフリンは梗塞サイズに比例して、左室拡張末期圧、拡張期最小圧を増加させ、K201は収縮機能には影響を与えずにノルエピネフリン誘発拡張障害を改善した。
4. K201の梗塞心におけるノルエピネフリン誘発拡張障害改善作用として、 α_1 受容体遮断作用に加えてリアノジン受容体安定化作用による細胞内Ca²⁺負荷の改善作用が示唆された。

謝 辞 稿を終えるにあたり、本研究のご指導を賜りました獨協医科大学心血管・肺内科学教室、金子昇教授に深甚なる謝意を表します。また、ご協力いただいた松田隆子准教授、心血管・肺内科学研究生、篠崎誠氏、並びに浅石理恵氏、教室員の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Wong WF, Gold S, Fukuyama O, et al : Diastolic dysfunction in elderly patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* **63** : 1526-1528, 1989.
- 2) Aronow WS : Left ventricular diastolic heart failure with normal left ventricular systolic function in older persons. *J Lab Clin Med* **137** : 316-323, 2001.

- 3) Kitzman DW : Diastolic heart failure in the elderly. *Heart Failure Rev* **7** : 17-27, 2002.
- 4) Gandhi SK, Powers JC, Nomeir A-M, et al : The pathogenesis of acute pulmonary edema associated with hypertension. *N Engl J Med* **344** : 17-22, 2001.
- 5) Owan TE, Hodge DO, Herges RM, et al : Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* **355** : 251-259, 2006.
- 6) Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, et al : Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med* **355** : 260-269, 2006.
- 7) Kaneko N : New 1,4-benzothiazepine derivative, K201, demonstrates cardioprotective effects against sudden cardiac cell death and intracellular blocking action. *Drug Dev Res* **33** : 429-438, 1994.
- 8) 金子昇, 島本健, 松田隆子ら : K201の特性と臨床応用. *循環器科* **62** : 506-512, 2007.
- 9) Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, et al : PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor) : defective regulation in failing hearts. *Cell* **101** : 365-376, 2000.
- 10) Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, et al : Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* **304** : 292-296, 2004.
- 11) Kaneko N, Matsuda R, Nakajima T, et al : Norepinephrine-induced diastolic dysfunction with aortic valve opening under calcium-loading in rats. *Drug Dev Res* **67** : 511-518, 2006.
- 12) 小田和彦 : ラット梗塞心におけるノルエピネフリンの左室血行動態に及ぼす影響. *Dokkyo J Med Sci* **34** : T13-T19, 2007.
- 13) Braunwald E : Ventricular pressure. In "Braunwald's Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine" vol.1. 7th edition ed by Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Elsevier Inc., Philadelphia, pp409, 2005.
- 14) Sandmann S, Class R, Cleutjens JPM, et al : Calcium channel blockade limits cardiac remodeling and improves cardiac function in myocardial infarction-induced heart failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **37** : 64-77, 2001
- 15) Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al : Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* **311** : 819-823, 1984.

- 16) Benedict CR, Shelton B, Johnstone DE, et al : Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* **94** : 690-697, 1996.
- 17) Bursi F, Weston SA, Redfield MM, et al : Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA* **296** : 2209-2216, 2006.
- 18) Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, et al : Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction. Comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* **105** : 595-601, 2002.
- 19) Kaneko N, Matsuda R, Ohtani N, et al : K201 improves norepinephrine-induced diastolic dysfunction with preserved ejection fraction. *Drug Dev Res* **67** : 852-861, 2006.
- 20) Mohabir R, Lee H-C, Kurz RW, Clusin W : Effects of ischemia and hypercarbic acidosis on myocyte calcium transients, contraction, and pHi in perfused rabbit hearts. *Circ Res* **69** : 1523-1537, 1991.
- 21) Meisser A, Morgan JP : Contractile dysfunction and abnormal Ca^{2+} modulation during postischemic reperfusion in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **37** : H100-H111, 1995.
- 22) Morgan JP, Erny RE, Allen PD, et al : Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation* **81** (suppl III) : III-21-III-32, 1990.
- 23) Loughrey CM, Ohtani N, Seidler T, et al : K201 modulates excitation-contraction coupling and spontaneous Ca^{2+} release in normal adult rabbit ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **76** : 236-246, 2007.
- 24) Kaneko N, Ago H, Matsuda R, et al : Crystal structure of annexin V with its ligand K-201 as a calcium channel activity inhibitor. *J Mol Biol* **274** : 16-20, 1997.
- 25) Kaneko N, Matsuda R, Toda M, et al : Inhibition of annexin V-dependent Ca^{2+} movement in large unilamellar vesicles by K201, a new 1,4-benzothiazepine derivative. *Biochim Biophys Acta* **1330** : 1-7, 1997.
- 26) Bers DM : Cardiac inotropy and Ca mismanagement. In "Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force" 2nd ed. By Bers DM. Springer Pub. Dordrecht. The Netherland., pp275-285, 2001.