

学位論文題名

Carrier-Mediated Norepinephrine Release and Reperfusion Arrhythmias Induced by Prolonged Ischemia in Isolated Perfused Guinea Pig Hearts : Effect of Presynaptic Modulation by α_2 -Adrenoceptor in Mild Hypothermic Ischemia

(モルモット単離心臓モデルの虚血再灌流におけるノルエピネフリン放出と再灌流不整脈：低温虚血における α_2 レセプター調整による効果)

学位論文内容の要旨

はじめに

ノルエピネフリン(NE)は循環系の調整に必要不可欠である一方、過剰な負荷は心血管系に障害をもたらすことが知られている。NE の放出機構には exocytotic release と carrier-mediated release の2つがあり、前者は生理的状态において交感神経終末の脱分極による Ca^{2+} の流入によっておこり、後者は虚血などの病的状態では ATP が不足した際に神経終末での NE 及び Na^+ の集積によって惹起されることが解明されている。心筋虚血では交感神経の過活動により過度の NE 放出が生じて虚血再灌流後の心機能障害や致死性不整脈の原因となり、過度の NE 放出を抑制することにより虚血再灌流障害を軽減しうると考えられる。実際、 α_2 -adrenoceptor inhibitor 投与で NE 放出を抑制することにより虚血再灌流障害を軽減できたとする実験的報告は多く、心臓手術における心筋保護への臨床応用が期待される。心臓手術では心筋保護液で心停止を得るが、従来用いられてきた冷却心筋保護液(cold cardioplegic solution; cold CP)では低温(心筋温 15℃前後)により心筋細胞の酸素需要と代謝を抑制することで虚血許容時間が延長が計られてきた。しかし、cold CP の使用は再灌流後の心機能回復に時間を要することから、最近では軽度低温(30-34℃前後) CP の有用性が報告されて臨床導入されている。一方で、薬剤の心筋保護作用は温度依存性であることが知られている。

本研究では、 α_2 -adrenoceptor inhibitor である Yohimbine の常温での心筋保護効果に着目し、これが軽度低温虚血(32℃；以下低温とする)においても心筋保護効果を有するか否かを、単離摘出心を用い NE 放出と心室性不整脈(Vf)の観点から検討した。

実験材料および方法

モルモット単離摘出心の逆行性冠灌流モデル(Langendorff circuit)を用いた。冠灌流圧 30mmHg とし灌流液には Krebs-Henseleit 液を用いた。心臓摘出後、まず常温(37℃)下で 30 分間の灌流を行い安定化した後、常温(37℃)では 30 分間(常温 control 群)、低温(32℃)では 60 分間(低温 control 群)灌流を停止して全虚血とした。その後 45 分間常温で再灌流し

た。ついで、常温、及び低温虚血実験を同様のプロトコールにて行い、NE transport inhibitor の Desipramine (100nM: DMI 群), Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor の EIPA (10nM: EIPA 群), α 2-antagonist の Yohimbine (1 μ M: Yo 群), α 2-agonist の UK14,304 (10 μ M: UK 群), UK 10 μ M+Yo 1 μ M (UK+Yo 群) をそれぞれの濃度で灌流液に添加し虚血前 30 分, 再灌流 45 分間投与した。各群 (n=6)において再灌流後の冠灌流液を収集し再灌流量とその NE 濃度を HPLC(高速液体クロマトグラフィー)にて測定し, 45 分間の再灌流中に放出された全 NE 放出量を心筋重量あたりで算出した (pmol/g)。また ECG にて再灌流後の心室細動(Vf)の持続時間を(分)測定した。

結 果

(1) 常温虚血: 常温 control 群での NE 放出は 520 ± 21 pmol/g であったが, DMI 及び EIPA の投与により NE 放出量それぞれ 85 ± 8 pmol/g, 163 ± 40 pmol/g と有意に抑制された ($p < 0.01$)。Yo も NE 放出を 284 ± 35 pmol/g に抑制し ($p < 0.01$)。UK は 1289 ± 81 pmol/g に促進した ($p < 0.01$)。UK に Yo を加えることにより, UK の NE 放出促進作用を約 1/2 (512 ± 64 pmol/g) に抑制した ($p < 0.01$ vs. UK 群)。Vf 持続時間は常温 control 群で 3.0 ± 0.5 分に対し, DMI, EIPA, Yo 各群でそれぞれ 0.2 ± 0.1 , 0, 0.4 ± 0.1 分と有意に短縮した ($p < 0.01$)。UK は 4.3 ± 0.4 分に延長したが, Yo を加えることで 1.5 ± 0.2 分と有意に短縮した ($p < 0.01$ vs. UK 群)。

(2) 低温虚血: 低温 control 群での NE 放出は 920 ± 47 pmol/g で, DMI, EIPA 投与によりそれぞれ 100 ± 11 pmol/g, 594 ± 35 pmol/g に有意に抑制された ($p < 0.01$)。Yo も NE 放出を 499 ± 27 pmol/g に抑制し ($p < 0.01$)。UK は 2216 ± 165 pmol/g に促進した ($p < 0.01$)。UK に Yo を加えることにより, UK の NE 放出促進作用を約 1/4 (535 ± 83 pmol/g) に抑制した ($p < 0.01$ vs. UK 群)。Vf 持続時間は低温 control 群で 3.9 ± 0.5 分に対し, DMI, EIPA, Yo 各群でそれぞれ 2.2 ± 0.1 , 0, 1.2 ± 0.5 分と有意に短縮した ($p < 0.01$)。UK は 6.2 ± 0.5 分に延長したが, Yo を加えることで 2.0 ± 0.4 分と Vf 持続時間を有意に短縮した ($p < 0.01$ vs. UK 群)。

結論および考察

NE 放出機序には exocytotic release と carrier-mediated release (CMR) の二つがあり, 後者は前者に比べ多量の NE を放出する。脱分極による Ca²⁺ の流入が強く関与する exocytotic release では α 2 レセプターは N-type Ca²⁺ channel と Gi 蛋白により共役しているため, 生理的状态では α 2 刺激は NE 放出抑制に働く。一方では, 長時間の虚血により惹起される CMR では, 交感神経終末での ATP の枯渇により Na⁺/K⁺-ATPase の失調と細胞内の H⁺ の増加により Na⁺/H⁺ exchanger が活性化され細胞内での Na⁺ の蓄積と vesicle への NE の貯蔵が破綻して細胞質への NE 蓄積が起こるとされる。本実験でも, 常温虚血後の NE 放出が, DMI, EIPA 投与により有意に抑制されたことより CMR によるものであることが確認された。また α 2 レセプターには, Na⁺/H⁺ exchanger との相乗効果 (synergism) が報告されており, 本実験結果からも α 2-antagonist である Yohimbine 投与により Na⁺/H⁺ exchanger が抑制され CMR による NE 放出が抑制されたものと考えられる。

これらの常温虚血における薬理学的効果は, 低温虚血 (32°C 60 分) 再灌流のモデルにおいても全く同様の結果が得られた。虚血後の NE 放出が常温, 低温の両条件下で α 2-antagonist である Yohimbine 投与により有意に抑制され, さらに Vf 持続時間も有意に短縮したことから, 低温においても Yohimbine が心筋保護効果をもつことが示され, 心臓手術での低温虚血において同薬剤の有用性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

Carrier-Mediated Norepinephrine Release and Reperfusion Arrhythmias Induced by Prolonged Ischemia in Isolated Perfused Guinea Pig Hearts : Effect of Presynaptic Modulation by α 2-Adrenoceptor in Mild Hypothermic Ischemia

(モルモット単離心臓モデルの虚血再灌流におけるノルエピネフリン放出と再灌流不整脈：低温虚血における α 2 レセプター調整による効果)

心筋虚血再灌流では carrier-mediated release(CMR)によって交感神経終末から過度のノルエピネフリン(NE)が放出され、これを抑制することで虚血再灌流障害を軽減することができる。常温虚血で薬理的に NE 放出を抑制する研究報告は多数あるが、低温虚血での研究は殆どみられない。本研究では、軽度低温(32℃)虚血における α 2-antagonist ; Yohimbine(Yo)の心筋保護効果について NE 放出と心室性不整脈(Vf)の観点から検討した。

実験材料および方法：モルモットの単離心臓全虚血モデルを用い、常温(37℃)では 30 分、低温(32℃)では 60 分虚血とし、その後 45 分間常温で再灌流した。冠灌流液を収集し、NE を HPLC にて測定、ECG にて再灌流後の Vf 持続時間を観察した。NE transporter inhibitor の DMI(100nM)、Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor の EIPA(10nM)、 α 2-antagonist の Yohimbine(Yo,1 μ M)、 α 2-agonist の UK14,304(UK,10 μ M)をそれぞれ(n=6)灌流液に添加し虚血前より投与した。

結 果：常温虚血(control)での NE 放出は 520 \pm 21pmol/g であったが、DMI と EIPA によりそれぞれ 1/6、1/3 に抑制された(p<0.01)ことから、この NE 放出は CMR であるこ

とが示された。Yo は NE 放出を 1/2 に抑制し、UK は 2 倍に促進した($p<0.01$)。UK に Yo を加えることにより、UK の NE 放出促進作用は 1/2 に抑制された($p<0.01$)。Vf 持続時間は常温 control で 3.0 ± 0.5 分に対し、Yo により 0.4 ± 0.1 分と短縮された($p<0.01$)。UK は Vf 時間を 4.3 ± 0.4 分に延長したが、Yo を加えることで 1.5 ± 0.2 分に短縮した($p<0.01$)。一方、低温虚血(control)での NE 放出は 920 ± 47 pmol/g で、DMI、EIPA によりそれぞれ 1/9、1/2 に抑制された($p<0.01$)。これより軽度低温虚血での NE 放出は CMR であることが示された。Yo は NE 放出を 1/2 に抑制、UK は 2.5 倍に促進した($p<0.01$)。UK に Yo を加えることにより UK の NE 放出促進作用を 1/4 に抑制した($p<0.01$)。再灌流時の Vf 持続時間は低温 control で 3.9 ± 0.5 分に対し、Yo で 1.2 ± 0.5 分と短縮された($p<0.01$)。UK は Vf 持続時間を 6.2 ± 0.5 分に延長したが、Yo を加えることでこれを 2.0 ± 0.4 分に短縮した($p<0.01$)。32°C60 分の低温虚血において虚血前の Yohimbine 投与を行うことによって、NE 放出抑制と Vf 持続時間短縮効果がみられ、心筋保護効果が認められた。

公開発表に際し、副査の川口教授から心筋保護液の使用による NE 放出への影響について、主査の北島教授から虚血時間時間と NE 放出抑制との関係、安田教授から低温心筋保護液の今後の位置付けについて質問があり、申請者は関連論文および実験成績をもとに誠実に、概ね妥当な回答をなし得た。この論文は、心虚血再灌流における NE 放出と再灌流不整脈の抑制に α_2 遮断が軽度低温虚血において有用であることを示した点で高く評価され、今後の開心術における心筋保護法での臨床応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。