

学位論文題名

糖尿病ラット摘出心における

L-カルニチンの虚血再灌流障害抑制効果

学位論文内容の要旨

はじめに

糖尿病は動脈硬化の重要な危険因子の一つであり、冠動脈病変合併により心筋梗塞及び心機能低下を引き起こす事がある。しかし糖尿病患者の中には、明らかな冠動脈病変なしに心機能が低下している症例を認め、これは微小血管病変と代謝異常によると考えられている。この代謝異常の一つとしてL-カルニチン減少がある。L-カルニチンは長鎖脂肪酸がミトコンドリア内へ輸送される際の共輸送体であり、脂質代謝及びエネルギー産生における必須物質である。糖尿病や心筋梗塞においてはL-カルニチンが減少しており、これらの疾患による心機能低下患者にL-カルニチンを長期投与すると症状改善あるいは生命予後の改善が得られたとの報告がみられる。

現在、心臓手術を受ける患者の糖尿病併存率は高く、これらの症例では冠動脈病変の有無に関わらず心機能が低下している可能性があり、術中の心筋保護がより重要になってくる。本研究では、長期投与にて認められるL-カルニチンの心機能改善効果が虚血再灌流の急性期投与にても同様に得られるかを、糖尿病ラットを作成し検証した。

対象と方法

6週齢時にストレプトゾトシン 65mg/kg 静注し糖尿病ラット(n=12)を作成し、対照として溶解液のみを静注した非糖尿病ラット(n=12)を作成した。心灌流実験に先立ち、薬剤投与1ヶ月後に採血を行い、血糖値、遊離脂肪酸、総カルニチン、遊離カルニチン、アシルカルニチン濃度を測定した(各 n=6)。心筋内の総カルニチン、遊離カルニチン、アシルカルニチン濃度の測定も行った(各 n=3)。

心灌流実験は、薬剤投与1ヶ月後に心臓を単離し逆向性灌流(ランゲンドルフ灌流)による左心灌流モデルを用いた。灌流圧は100cmH₂Oとし、灌流液はmodified Krebs-Henseleit溶液(KHS)または同液にL-カルニチン(5mmol/l)を添加した溶液の何れかを用いた。ランゲンドルフ灌流開始5, 10, 15, 20分後に心機能(心拍数、冠灌流量、左室収縮期-拡張期圧較差(LVDP)、左室圧一次微分値)を測定した。左室拡張末期圧は4-6mmHgに維持した。次いで、常温(37℃)20分の全虚血とした後、虚血前と同様にKHSまたはL-カルニチン添加KHSにてランゲンドルフ再灌流を45分間行った。再灌流開始後20分までは毎分冠灌流量を計量し、洞調律復帰後は5分毎に心機能を測定した。再灌流後、心室細動(Vf)発生の有無とその持続時間を計測した。再灌流後の心機能回復率を、再灌流45分後値の虚血前値に対する百分率で表した。結果は平均値±標準誤差で表記し、P<0.05を有意とした。

結果

血液データでは、非糖尿病及び糖尿病ラットの血糖値は各々 $170 \pm 5 \text{ mg/dl}$, $423 \pm 11 \text{ mg/dl}$ であった($p < 0.0001$)。非糖尿病ラットのアシルカルニチン濃度およびアシルカルニチン/遊離カルニチン比は $21.0 \pm 2.0 \mu\text{mol/l}$, 0.50 ± 0.03 だったのに対して糖尿病ラットでは $40.9 \pm 2.7 \mu\text{mol/l}$, 1.61 ± 0.28 と何れも有意な上昇を認めた($p < 0.05$)。心筋含量でも、糖尿病ラットでアシルカルニチン濃度及びアシルカルニチン/遊離カルニチン比の有意な上昇を認めたのに加え、総カルニチン、遊離カルニチン濃度が、糖尿病ラット($436.0 \pm 17.8 \text{ nmol/g}$, $273.8 \pm 8.3 \text{ nmol/g}$)では、非糖尿病ラット($493.5 \pm 4.4 \text{ nmol/g}$, $400.8 \pm 13.8 \text{ nmol/g}$)より有意に低かった($p < 0.05$)。

虚血前心機能は何れの群間においても有意差を認めなかった。LVDP 回復率は、L-カルニチン添加灌流非糖尿病及び糖尿病ラットにおいて、それぞれ $87.3 \pm 1.5\%$, $85.9 \pm 10.6\%$ と、L-カルニチン非添加灌流糖尿病ラットの $52.3 \pm 6.7\%$ に対し有意な回復率の上昇を認めた($p < 0.05$)。他の心機能回復率は何れの群間でも有意差を認めなかった。

Vf は、L-カルニチン非添加灌流非糖尿病及び糖尿病ラットのそれぞれ 6/6(100%), 4/6(66.7%)で認めたのに対し、L-カルニチン添加灌流非糖尿病及び糖尿病ラットではそれぞれ 2/6(33.3%), 0/6(0%)と有意な発生率の低下を認めた($p < 0.05$)。Vf 持続時間は、L-カルニチン添加非糖尿病ラットで 36.8 ± 28.5 秒と、L-カルニチン非添加の 868.2 ± 171.3 秒より有意に短縮した($p < 0.05$)。

再灌流後冠灌流量は、非糖尿病ラットではL-カルニチン添加灌流群で8分後までは非添加灌流群に比し有意に増加したが、その後は差が無くなり再灌流45分後では同量となった。糖尿病ラットではL-カルニチン添加灌流の有無で、何れの時点でも冠灌流量に差を認めなかった。

考察

L-カルニチンの心筋虚血再灌流時の急性期投与は、非糖尿病、糖尿病モデル何れにおいても有意に虚血再灌流障害を抑制したとの報告がある一方、非糖尿病モデルでは心機能の改善は得られなかったとする報告もみられる。本研究では、糖尿病ラットにおいては心筋虚血再灌流時のL-カルニチン急性期投与により有意にLVDPが回復し心収縮能保持による虚血再灌流障害抑制、心筋保護効果を認めたが、非糖尿病ラットではL-カルニチン投与にてLVDPの回復傾向は認められるものの統計学的有意差はなかった。しかしながらL-カルニチン急性期投与により再灌流後不整脈の発生は糖尿病の有無に関わらず有意に抑制され、このことは、非糖尿病心でもL-カルニチン急性期投与により虚血再灌流障害が抑制されたことを示唆する。糖尿病においては、糖取り込み低下のため、脂質代謝にエネルギー産生能を依存する割合が増加するが、L-カルニチン濃度の低下によりエネルギー産生能が低下すると考えられる。また、心筋は虚血時に細胞内に蓄積したL-カルニチンを放出する。L-カルニチン減少は、遊離脂肪酸並びにアシルカルニチンの細胞内蓄積を引き起こし、これらにより細胞膜および細胞膜上の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaseなどの酵素蛋白が障害され、細胞構造の不安定化や静止膜電位低下による不整脈発生を惹起すると考えられる。L-カルニチンの心筋血流量に及ぼす効果は、犬の正常心においてL-カルニチン投与により有意に冠血流量が増加し、冠血管抵抗は有意に減少したとする報告があるのみである。本研究では、虚血前においてはL-カルニチン投与により冠灌流量の変化は認められなかったが、再灌流後においては非糖尿病ラットでL-カルニチン投与により再灌流早期の冠灌流量増加を認めたのに対し、糖尿病ラットではその効果は認められなかった。これは、糖尿病心における微少循環障害が虚血後のhyperemia、冠予備能を低下させている可能性があるが、L-カルニチ

ンの関与，効果等を含め今後の検討が必要である．また，本研究では L-カルニチンが心筋代謝障害を改善することにより常温全虚血後の心機能回復に寄与することが示唆されたが，本実験は晶質液を灌流液とする non-working の非生理的な実験系を用いており，L-カルニチンの臨床応用には血液灌流モデルなどのより生理的な実験系による検討が必要である．

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 三 輪 聡 一

副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

糖尿病ラット摘出心における

L-カルニチンの虚血再灌流障害抑制効果

本研究の目的は、糖尿病及び非糖尿病ラットにおける、L-カルニチン急性投与による心筋虚血再灌流抑制効果について検討することである。

ウィスターラットにストレプトゾトシン静注し糖尿病ラットを作成し、対照非糖尿病ラットと比較検討した。薬剤投与1ヶ月後に血糖値、血中遊離脂肪酸濃度、血中カルニチン分画測定と心筋内カルニチン分画測定を行った。次いで、ラット単離心を用い、ランゲンドルフ灌流による左心灌流実験を行った。灌流圧 100cmH₂O, 左室拡張末期圧 4-6mmHg とし、modified Krebs-Henseleit 溶液またはL-カルニチン(5mmol/l)添加溶液にて灌流した。灌流開始5分毎20分まで心機能(心拍数、冠灌流量、左室収縮期-拡張期圧較差(LVDP)、左室圧一次微分値)を測定した。次いで、常温(37℃)20分の全虚血とした後、虚血前と同じ灌流液で再灌流を45分間行った。再灌流20分後までは毎分冠灌流量を計量し、洞調律復帰後5分毎に心機能を測定し再灌流後心機能回復率を再灌流45分後値の虚血前値に対する百分率で評価した。再灌流後、心室細動(Vf)発生の有無とその持続時間を計測した。

糖尿病ラットの血糖値、血中アシルカルニチン濃度、血中アシルカルニチン/遊離カルニチン比及び心筋内アシルカルニチン含量、アシルカルニチン/遊離カルニチン比は有意な上昇を認め、また、心筋内総カルニチン及び遊離カルニチン含量の有意な低下を認めた。

虚血前心機能は群間に有意差を認めなかった。再灌流後の心機能は、糖尿病ラットにおいて、L-カルニチン非投与群に比して投与群で有意なLVDPの回復を認めた。他の心機能回復率は群間に有意差を認めなかった。Vf発生率は、糖尿病、非糖尿病ラット双方においてL-カルニチン投与により、非投与群に比し有意に低下した。また、Vf持続時間もL-カルニチン投与により非糖尿病ラットにおいて、有意な短縮を認めた。冠灌流量経時的変化は、虚血前値に群間に有意差は認められないが、非糖尿病ラットにおいて、L-カルニチン投与群で再灌流後2-8分後まで非投与群に比し有意に増加した。一方、糖尿病ラットにおいては、L-カルニチン投与の有無で、何れの時点においても冠灌流量に有意差を認めなかった。

以上より、糖尿病ラットにおいて、L-カルニチン急性投与により心収縮能が保持され、心筋虚血再灌流障害抑制効果を認めた。非糖尿病ラットにおいては、L-カルニチン投与にてLVDPの有意な回復は認められなかったが、再灌流後不整脈は有意に抑制され、この事は、非糖尿病心においてもL-カルニチン急性投与により虚血再灌流障害抑制効果が得られた事を示唆する。L-カルニチン急性投与による心筋虚血再灌流障害抑制効果は、糖尿病または心筋虚血時に減少するL-カルニチンを補充する事により、心筋代謝障害が改善され、エネルギー産生能が保持された為と考えられる。また、アシルカルニチンなどの細胞障害物

質の蓄積抑制による効果も考えられる。犬の正常心においてL-カルニチン投与により冠血管抵抗が有意に減少し、冠灌流量が増加したとする報告があり、本研究においても、非糖尿病ラットにおけるL-カルニチン急性投与による再灌流後早期冠灌流量増加は、同様の機序によるものと考えられた。一方、糖尿病ラットにおいて同様の結果が得られなかったのは、糖尿病心における内皮障害や血管外構造異常など他の因子が関与しているためと考えられた。なお、本実験は晶質液を灌流液とする non-working の非生理的な実験系を用いており、L-カルニチン臨床応用には血液灌流モデルなどのより生理的な実験系による検討が必要である。

公開發表では、副査の筒井教授から、本研究で用いた糖尿病ラットの心筋障害の程度、カルニチン投与量増減による効果の変化、臨床応用時の投与対象について、三輪教授から、糖尿病におけるカルニチン分画変化の機序、重度の糖尿病性心筋障害モデルの作成方法について、主査の安田教授から、実験動物モデル及び心機能測定項目の妥当性、臨床応用への課題、問題点について、などの質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は本研究の実験結果や臨床経験、この分野に関してこれまでに発表された論文などをもとに、誠実かつ妥当な回答を成し得た。

この論文は、開心術における新たな心筋保護剤の可能性を示したものとして評価され、今後の研究発展により、その臨床応用及び虚血再灌流障害機序解明に寄与することが期待される。

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。