

学位論文題名

イヌ虚血再灌流障害心筋における内因性アデノシン組織
間液濃度とその心筋保護効果に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

虚血再灌流時の可逆性の心筋障害であるstunningが臨床的に問題になっているが、これに対する内因性改善物質としてアデノシンが注目されている。アデノシンは強力な冠血管拡張作用を有するとともに、受容体を介して直接心筋細胞に作用し様々な効果を示し、心筋保護作用を有するものと考えられている。これまで内因性のアデノシンがstunningを改善することを薬理的に示した報告はいくつかあるが、アデノシン受容体が存在する心筋細胞膜表面におけるアデノシンの濃度、つまり組織間液中のアデノシン濃度を測定し、心筋保護作用との関係を直接証明したものはない。本研究は心筋マイクロダイアリシス法を用い、以下のことを確かめる目的で行なった。1)アデノシン再取り込み抑制薬であるジピリダモールが、虚血時の組織間液中アデノシン濃度の増加を、虚血領域で選択的に増強することができるか。2)stunning心において、組織間液中アデノシン濃度の増加により、心機能は改善するか。3)アデノシン受容体非選択的拮抗薬である8-フェニルテオフィリン(8-PT)の投与により、アデノシン濃度は変化するか、また、心機能の悪化が認められるか。

II. 方法

雌雄雑種イヌを麻酔下で開胸し、心臓を心外膜にて固定した。左冠動脈前下降枝(LAD)を第一対角枝直下で15分間結紮して、その後60分間再灌流した。計37匹のイヌを次の4群に分けた。

第1群(n=13):LAD閉塞15分前より45分間生理食塩水を静脈内投与。第2群(n=8):生理食塩水投与前に8-PT(10mg/kg)をbolusで静脈内投与。第3群(n=9):LAD閉塞15分前より45分間ジピリダモール(20 μ g/kg/min)を静脈内投与。第4群(n=7):ジピリダモール投与前に8-PTをbolusで静脈内投与。

実験中は心電図の第2誘導、超音波クリスタル法で計測した局所心筋長、左室圧、dP/dtおよび大動脈圧を8チャンネルのポリグラフでモニタリングおよび記録した。心機能は心拍数、平均大動脈圧、double product (心拍数 $\times$ 収縮期大動脈圧)、左室拡張末期圧、最大dP/dtおよび局所心筋長変化率(%segment shortening;%SS)にて評価した。

マイクロダイアリシスのプローブを虚血領域(LAD領域)、非虚血領域(Left circumflex artery;LCX領域)の心筋内に、それぞれ1本ずつ挿入し、LAD結紮30分前より透析液の回収を

開始した。プローブは分子量カットオフ50,000で、微量注入ポンプにより毎分4 μ l/minの速度で灌流した。灌流液には1mlあたり10単位の低分子ヘパリンを含むRinger液(Na^+ 147 mM, Ca^{2+} 4.5mM, K^+ 4mM, Cl^- 155.5mM)を用いた。高速液体クロマトグラフィー(High-performance liquid chromatography:HPLC)を用い、5分毎に回収した透析液中のアデノシン、イノシン、ハイポキサンチン、キサンチンおよび尿酸の濃度を、外部標準法により測定した。

III. 結果

各群での虚血再灌流によるイヌの死亡率は、第3群で他の群に比べ低い傾向が見られたものの、各群間で有意差は認められなかった。また、実験中を通じて、血行動態変化を示す全ての指標は、double product(心拍数 $\times$ 収縮期血圧)も含め、各群間で有意差を認めなかった。

第1群ではLAD領域において、透析液中アデノシン平均濃度は、ベースラインの0.32 μ Mから再灌流0～5分後には1.90 μ Mへと上昇した。LCX領域ではアデノシンの上昇は小さく、有意な上昇は認められなかった。ジピリダモールが投与された第3群では、虚血後のアデノシンの上昇は約3倍に増強された(LAD領域、LCX領域でそれぞれ最大5.65 μ Mおよび2.04 μ M)。虚血によるイノシン濃度の上昇はアデノシンに比較し大きく、LCX領域でも有意な上昇が認められた(第1群のLAD領域およびLCX領域でそれぞれ0.34 μ Mから最大17.90 μ Mおよび0.36 μ Mから最大3.14 μ M)。ジピリダモールの投与によりイノシン濃度の上昇は逆に第1群に比べ有意に抑制された(第3群で最大9.53 μ M)。ハイポキサンチンはイノシンとはほぼ同様の変化を示した(第1群でベースラインの1.21 μ Mから再灌流0～15分で14.95 μ M, 第3群では再灌流0～15分で7.13 μ M; $p < 0.05$ vs 第1群)。キサンチンと尿酸は虚血により有意に上昇したがその程度は小さく(第1群でキサンチンと尿酸それぞれ0.64 μ M, 2.42 μ Mから最大1.77 μ M, 3.02 μ M)、またこの上昇はジピリダモールにより影響を受けなかった。8-PTの投与は以上の変化に対し影響を与えなかった(第1群と第2群間および第3群と4群間でそれぞれ有意差なし)。

虚血中の%SSの低下には4群間で有意差を認めなかった(第1, 第2, 第3および第4群で虚血14分後の%SS:-57.0%,-71.6%,-55.3%および-50.9%)。再灌流60分後の%SSは第1群で36.8%の回復に留まったが、第3群では61.9%と第1群に比し有意な改善がみられた。また第2群では-15.2%と第1群に比し有意な回復の悪化を認めた。第4群の%SSは36.3%と、第3群に比べ改善効果の消失が認められた。

IV. 考察

アデノシンはアデノシン三リン酸(ATP)より生成され、虚血時にその産生が増すことが知られている。種々の機序によりアデノシンは虚血再灌流時の心筋障害を軽減することが示唆され、なかでもその強い冠血管拡張作用に基づく心筋保護効果について多数の研究がなされてきた。Stunningに対する内因性のアデノシンの心機能改善効果については、アデノシン増強薬を用いた報告がいくつかあるが、心筋組織間液中アデノシン濃度と心機能改善効果との間の関係を詳細に検討した報告はない。

本研究においてジピリダモールは虚血再灌流時の組織間液中アデノシン濃度を無投薬群に比べ約3倍に増加させ、それに伴い心機能は有意に改善された。また、アデノシンの非選択的拮抗薬である8-PTの前投与はこの心機能改善効果をアデノシン濃度に影響を与えずに消失させた。さらに、第2群において、8-PTの前投与は第1群より心機能を悪化させた。血行動態諸指標については、各群間で有意差を認めなかった。以上の結果より、虚血により増加する内因性のアデノシンは、薬物非投与下でも心筋保護に関与し、その組織間液中濃度を上昇させることにより、心筋保護作用が増強されることが示された。心筋マイクロダイアリシス法は現在、心筋組織間液中の物質濃度を測定するうえで最も有用な方法と考えられている。本実験で*in vitro*の回収率から推定されたアデノシンの組織間液中濃度は、ベースラインで約1.6 μ Mであり、他の報告とはほぼ一致する。また虚血再灌流時のアデノシン濃度は、無投薬群（第1群）でも最大値で約9.5 μ Mと推定され、アデノシンが薬理作用を実際に発揮し得る濃度と考えられる。これも内因性アデノシンが虚血再灌流時の心筋保護に関与し得ることと合致する。

ジピリダモールはアデシン増強作用のほかcGMP phosphodiesteraseの抑制や白血球でのロイコトリエン(LTB₄, LTC₄)産生の抑制、プロスタサイクリン生成促進などの作用を有するが、これらの作用の影響は、本実験で測定した血漿中ジピリダモール濃度(約1 μ M)から、ほとんどないものと思われる。またジピリダモール投与により、イノシンおよびハイポキサンチンの濃度が低下したが、これもフリーラジカルの産生抑制という観点から、心筋保護に関与した可能性がある。*In vitro*の研究ではジピリダモールはアデノシンデアミナーゼの抑制作用を有することが報告されており、イノシンおよびハイポキサンチンの低下には、この作用が働いたものと考えられるが、他の可能性についても検討する必要がある。

アデノシンの心筋保護効果の機序については、陰性変時変力作用による心筋酸素消費量の軽減、血小板凝集抑制作用、フリーラジカル産生の抑制作用、冠血流増加作用、 β 刺激抑制作用、解糖亢進作用、ATP再合成のための供給源、側副血流の増加作用など様々な作用が考えられているが、明確にはされていない。最近アデノシン受容体を介する心筋保護効果が、ATP感受性Kチャンネル(K⁺ATP)の活性化によりもたらされとする報告があるが、これについては反論も多い。これらの点については今後の検討が必要と考えられる。

V. 結語

本研究は内因性アデノシンに由来するstunning改善効果を、心筋組織間液中アデノシン濃度の測定により、初めて直接的に証明したものだといえる。近年PTCAやPTCRなどの冠動脈再灌流療法の導入により早期に虚血心筋を壊死から防ぐ手段が確立されたが、stunningを含めた再灌流障害が問題となっている。また心筋保護液を用いた心臓手術においても術後のstunningは重要な問題である。本研究で用いたジピリダモールを始めとする内因性アデノシン増強薬や、アデノシン生成物質の投与により、心筋組織間液アデノシン濃度を増加させることが、これらの問題の解決策となる可能性が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 小 山 富 康

学 位 論 文 題 名

イヌ虚血再灌流障害心筋における内因性アデノシン組織 間液濃度とその心筋保護効果に関する研究

I.研究目的

虚血再灌流時の可逆性の心筋障害であるstunningが臨床的に問題になっているが、これに対して、内因性のアデノシンが改善作用を有することを薬理学的に示した報告はいくつかある。しかし、アデノシン受容体が存在する心筋細胞膜表面におけるアデノシンの濃度、つまり組織間液中のアデノシン濃度を測定し、心筋保護作用との関係を直接証明したものはない。本研究は心筋マイクロダイアリシス法を用い、アデノシン増強薬と拮抗薬の投与による、心筋組織間液中アデノシン濃度変化を測定し、内因性アデノシンのstunning改善効果を検討した。

II.方法

雌雄雑種イヌを麻酔下で開胸し、左冠動脈前下降枝(LAD)を第一対角枝直下で15分間結紮して、その後60分間再灌流した。計37匹のイヌを4群に分けた。

第1群(n=13):LAD閉塞15分前より45分間生理食塩水を静脈内投与。第2群(n=8):生理食塩水投与前に8-PT(10mg/kg)をbolusで静脈内投与。第3群(n=9):LAD閉塞15分前より45分間ジピリダモール(20 μ g/kg/min)を静脈内投与。第4群(n=7):ジピリダモール投与前に8-PTをbolusで静脈内投与。

心機能は心拍数、平均大動脈圧、double product (心拍数 $\times$ 収縮期大動脈圧)、左室拡張末期圧、最大dP/dtおよび局所心筋長変化率(%segment shortening;%SS)にて評価した。

マイクロダイアリシスのプローブを虚血領域、非虚血領域(Left circumflex artery;LCX領域)の心筋内に、それぞれ1本ずつ挿入し、LAD結紮30分前より透析液の回収を開始した。高速液体クロマトグラフィー(High-performance liquid chromatography:HPLC)を用い、5分毎に回収した透析液中のアデノシン、イノシン、ハイポキサンチン、キサンチンおよび尿酸の濃度を、外部標準法により測定した。

III. 結果

各群で実験中を通じて、血行動態変化の指標は、double product(心拍数x収縮期血圧)も含め、有意差を認めなかった。

第1群ではLAD領域において、透析液中アデノシン平均濃度は、0.32 μ Mから再灌流0～5分後には1.90 μ Mへと上昇したが、LCX領域では有意な上昇は認められなかった。第3群では、虚血後のアデノシンの上昇は約3倍に増強された。虚血によるイノシン濃度の上昇はアデノシンに比較し大きく、LCX領域でも有意な上昇が認められた。ジピリダモールの投与により、この上昇はアデノシンとは逆に、抑制された。ハイポキサンチンはイノシンとほぼ同様の変化を示した。キサンチンと尿酸は虚血により有意に上昇したがその程度は小さく、ジピリダモールにより影響を受けなかった。8-PTの投与は以上の変化に対し影響を与えなかった(第1群と第2群間および第3群と4群間でそれぞれ有意差なし)。

虚血中の%SSの低下には4群間で有意差を認めなかった。再灌流60分後の%SSは第1群で36.8%の回復に留まったが、第3群では61.9%と第1群に比し有意な改善がみられた。また第2群では-15.2%と第1群に比し有意な回復の悪化を認めた。第4群の%SSは36.3%と、第3群に比べ改善効果の消失が認められた。

IV. 考察

本研究においてジピリダモールは虚血再灌流時の組織間液中アデノシン濃度を無投薬群に比べ約3倍に増加させ、それに伴い心機能は有意に改善された。また、アデノシンの非選択的拮抗薬である8-PTの前投与はこの心機能改善効果をアデノシン濃度に影響を与えずに消失させた。さらに、第2群において、8-PTの前投与は第1群より心機能を悪化させた。血行動態諸指標については、各群間で有意差を認めなかった。以上の結果より、虚血により増加する内因性のアデノシンは、薬物非投与下でも心筋保護に関与し、その組織間液中濃度を上昇させることにより、心筋保護作用が増強されることが示された。

ジピリダモールはアデノシン増強作用のほかにいくつかの作用を有するが、本実験で測定した血漿中ジピリダモール濃度(約1 μ M)から、この影響はほとんどないものと思われる。またジピリダモール投与により、イノシンおよびハイポキサンチンの濃度が低下したが、これもフリーラジカルの産生抑制という観点から、心筋保護に関与した可能性がある。In vitroの研究ではジピリダモールはアデノシンデアミナーゼの抑制作用を有することが報告されており、イノシンおよびハイポキサンチンの低下には、この作用が働いたものと考えられる。アデノシンの心筋保護効果の機序については、様々な機序が考えられており、今後の検討が必要と考えられる。

口頭発表の審査会において、小山教授より、アデノシンの冠動脈血流増加作用と、心筋保護作用との関係などについて、質問がなされた。また、安田教授より、常温心筋保護液におけるアデノシン増強薬の果たす役割について、質問がなされた。これらに対して、申請者は、

概ね妥当な回答を行い、その後行われた、両教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は、虚血再灌流時における、内因性アデノシンの果たす役割について、新しい手法である心筋マイクロダイアリス法を用いて、詳細に検討したものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。