S-1-4 晶質液心筋保護液を用いた心筋保護法の 問題点とその対策

国立循環器病センター心臓血管外科 大阪大学第 1 外科*

山本文雄 鷲田泰之 大橋壮樹* 鍵崎康治
石川巧 熊田佳孝 小坂井嘉夫 鬼頭義次
川島康生

開心術の成績は心筋保護法の発達により向上したといっても過言でなく、近年臨床成績は各施設安定してきた。しかしながら、術前状態不良例や、長時間の心停止を要する症例に対する心筋保護法は今なお工夫を要し、conventional な晶質液心筋保護法に加え、近年では blood cardioplegia を用いる施設も増加してきた。われわれは、活性化された白血球が重要臓器障害進展に一役を担っているという点^{1,2)}を考慮し、一貫して晶質液心筋保護液を用い、1990 年までは Young 液+GIK 液による心筋保護法を、また 1991 年からは St. Thomas 液を臨床上用いてきた。今回、晶質液の心筋保護能力をさらに向上させる目的で、controlled reperfusion を含むさまざまな modification を実験的にを行い若干の知見を得たので報告する。

方 法

Isolated working rat heart model を用いた。基本的な実験 protocol は以下のごとくである。心臓を摘出し、20 分間の working 灌流後 3 分間 St. Thomas 液を注入し、37℃ 35 分、ないしは 20℃ 150 分の虚血とした。その後 37℃ 15 分間の Langendorff 再灌流を行い、再び working 灌流とした。Working 灌流中 5 分ごとに、大動脈流量、冠灌流量、大動脈圧、心拍数を測定しその平均を虚血前値ないしは虚血後値とし、虚血後値の虚血前値に対する割合を求め心機能回復率とした。また Langendorff 再灌流中の CK 遊出量を測定し、細胞障害の指標とした。各群 $n \geq 6$ 。

結 果

本実験モデルにおいて心機能上最も鋭敏な指標として

大動脈流量回復率と CK 遊出量を用いて判定した。

虚血前 treatment に関する検討

1) 細胞内 Ca-overload に影響を及ぼす各種薬剤の検討

(1) 心筋保護液中の Ca 濃度に関する検討 : St. Thomas 液の Ca 濃度の容量反応曲線は、1.2 mM を至適とする bell 型反応曲線を示し、それより低濃度でも、高濃度でも心筋保護作用は減弱することが判明した³⁾。低温虚血下でも同様に bell 型の容量反応曲線を示したが、この至適濃度は常温虚血時 1.2 mM であったものが低温虚血時には 0.6 mM に shift した⁴⁾。

(2) Ca-antagonists に関する検討 : Verapamil を用い検討を加えると、常温虚血下では、1.0 μ M を至適とする bell 型の容量反応曲線を示し、至適濃度での St. Thomas 液添加は有効であるが、低温虚血下ではその心筋保護効果は消失した⁵⁾。

(3) 筋小胞体 Ca 放出阻害剤に関する検討 : Ryano-dine の St. Thomas 液添加は常温、低温虚血下いずれにおいても 1.75 nM を至適とする bell 型の容量反応曲線を示し、至適濃度添加では有意な心筋保護効果を示した⁶⁾。

(4) ATP sensitive potassium channel opener に関する検討 (表 1) : Nicorandil の虚血前投与においては、常温虚血、低温虚血のいずれにおいても至適濃度添加では有効であった。

(5) カテコールアミンに関する検討 (表 1) : Isoproterenol, Noradrenalin による虚血前 treatment は臨床治療開始量に相当する低濃度では心筋障害を増強させず、Noradrenalin はむしろ心筋保護的に作用するが、高濃度 (臨床治療開始 5 倍量) では心筋障害を増大させることが判明した。Adrenalin, Dopamine は dose dependent に心筋障害を増悪させることが判明した。

2) Free radical scavenger に関する検討

本稿は第 23 回日本心臓血管外科学会学術総会「シンポジウム (1) 現行心筋保護法の問題点とその対策」(1993 年 3 月、福岡) において発表した。

表 1 虚血前 treatment (Normothermic ischemia)

	Nic 濃度		ISP 濃度			NAD 濃度		
	0	3 μ M	0	0.008 μ M	0.04 μ M	0	16 nM	80 nM
%AoF	52.9 $\pm$ 4.6	79.6 $\pm$ 1.5*	73.5 $\pm$ 2.7	75.7 $\pm$ 2.1	12.6 $\pm$ 5.2	73.5 $\pm$ 2.7	89.1 $\pm$ 2.6	17.1 $\pm$ 4.7
CK leakage	70.3 $\pm$ 8.5	27.2 $\pm$ 9.3*	9.3 $\pm$ 1.4	6.8 $\pm$ 1.5	14.9 $\pm$ 3.3	9.3 $\pm$ 1.4	3.1 $\pm$ 0.75	16.6 $\pm$ 3.5

	DOA 濃度			AD 濃度			Ebselen 濃度	
	0	0.52 mM	2.6 mM	0	16 nM	80 nM	0	10 nM
%AoF	65.0 $\pm$ 2.8	37.1 $\pm$ 1.9	8.2 $\pm$ 6.2	73.5 $\pm$ 2.7	52.2 $\pm$ 5.1	26.9 $\pm$ 5.9	53.0 $\pm$ 2.1	57.0 $\pm$ 3.1
CK leakage	7.6 $\pm$ 1.1	11.4 $\pm$ 2.0	28.4 $\pm$ 6.0	9.3 $\pm$ 1.4	11.4 $\pm$ 3.3	54.1 $\pm$ 10.8	60.5 $\pm$ 4.0	50.7 $\pm$ 7.3

Nic: Nicorandil, ISP: Isoproterenol, NAD: Noradrenalin, DOA: Dopamine, AD: Adrenalin,

%AoF: percent recovery of aortic flow, CK leakage: IU/15 min/g dry weight, * $p<0.05$.

表 2 再灌流時 treatment (Normothermic ischemia)

	Nic 濃度		Ebselen 濃度		Rya 濃度	
	0	0.1	0	10 nM	0	1.75 nM
%AoF	49.5 $\pm$ 7	81.0 $\pm$ 6.4*	50.1 $\pm$ 1.8	68.0 $\pm$ 2.9*	59.3 $\pm$ 3.1	33.3 $\pm$ 5.3*
CK leakage	42.5 $\pm$ 12	15.5 $\pm$ 1.5*	56.1 $\pm$ 6.5	36.6 $\pm$ 12.0	51.0 $\pm$ 11.6	83.4 $\pm$ 16.4

	K=10 mM				pH		
	37°C	29°C	25°C	20°C	5.6	6.8	7.5
%AoF	70.9 $\pm$ 1.3	69.8 $\pm$ 2.0	62.2 $\pm$ 2.1*	40.3 $\pm$ 4.8*	45.5 $\pm$ 3.8	60.1 $\pm$ 2.1*	51.9 $\pm$ 2.1
CK leakage	23.2 $\pm$ 3.4	23.3 $\pm$ 2.6	48.3 $\pm$ 8.1*	63.1 $\pm$ 6.2*	35.3 $\pm$ 12.1	12.1 $\pm$ 2.0*	40.9 $\pm$ 4.9

	pH 6.8						
	0 min	0.5 min	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
%AoF	47.5 $\pm$ 0.6	44.8 $\pm$ 4.0	58.0 $\pm$ 4.1*	55.8 $\pm$ 4.2	52.8 $\pm$ 2.7	37.1 $\pm$ 3.5	35.7 $\pm$ 2.6
CK leakage	42.0 $\pm$ 8.4	52.7 $\pm$ 14.8	38.8 $\pm$ 9.4	21.8 $\pm$ 5.1	36.1 $\pm$ 13.4	44.6 $\pm$ 12.7	46.1 $\pm$ 3.4

Nic: Nicorandil, Rya: Ryanodine, ISP: Isoproterenol, NAD: Noradrenalin, DOA: Dopamine,

AD: Adrenalin, %AoF: percent recovery of aortic flow, CK leakage: IU/15 min/g dry weight,

* $p<0.05$.

心筋保護液中に recombinant human SOD または Ebselen を添加し検討すると, SOD は bell 型の容量反応曲線を示し, 100 万 units/l の濃度で心筋保護作用を示した⁶⁾. 一方 Ebselen (表 1) の添加は心筋保護作用を示さず, 高濃度 (1,000 nM) で心筋障害を増悪させた.

虚血後 treatment に関する検討

1) 再灌流液の組成に関する検討: St. Thomas 液による常温虚血後の再灌流に際して Krebs-Henseleit bicarbonate buffer を modify することにより, Na⁷⁾, K⁸⁾, Ca⁹⁾, Mg¹⁰⁾, Cl, inorganic phosphate, glucose, 浸透圧¹¹⁾, pH および緩衝剤の dose response curve を用い, 至適条件を求めた. その結果, Na は 110 mM 以上, K は 10mM, Ca および Mg は 1.2mM, 浸透圧 290 mOsm/l を維持することが心機能の回復を高め, CK の遊出を低下させることが判明した. Cl, inorganic phosphate, glucose の添加非添加は有意な心筋保護作用の変

化を示さなかった. しかしながら, 常温再灌流で心筋保護効果を示した K 10mM は, 25°C 以下の低温再灌流ではむしろ大動脈流量回復率は低下, CK 遊出を増加させることが判明した. 再灌流中の pH に関しては, pH を 5.8, 6.8, 7.4 に変化させ 3 群で比較検討すると, pH は 6.8 を維持することが重要であるものの, その液での灌流は 1~3 分以内にとどめることが肝要であり, これより長い acidic reperfusion は心筋障害を増悪させることが判明した. 緩衝剤に関しては, bicarbonate buffer は心筋保護作用を示さず, HEPES 等の他の緩衝剤による pH 調節が必要であることが判明した.

2) Ca-movement に影響を及ぼす各種薬剤の再灌流時投与に関する検討: Verapamil⁴⁾ Ryanodine (表 2) の再灌流時投与は有意な心筋保護作用を示さなかったが, Nicorandil は虚血前投与と同様に心筋保護作用を示した.

3) Free radical scavenger の再灌流時投与に関する検討: SOD, Ebselen (表2) 共に再灌流時投与は有意な心筋保護作用を示した。

考 察

近年虚血再灌流障害の主因が明らかにされ主として“*Intracellular Ca-overload*”をいかに阻止するか、また、それに連動する心筋障害発生 mechanism をいかに inhibit するかが心筋保護を改善するうえでの大きな課題である。また、一方、外科的心筋保護法を考慮する場合、低温という強力かつ安定した保護手段を用いるために、心筋障害発生機構が低温によりいかなる修飾を受けるかという点も考慮すべき問題である。また、再灌流時心筋障害発生機構は虚血心筋障害のそれと異なることが推測されるが、再灌流時心筋障害は虚血心筋障害の程度にも左右されることは諸家の認めるところである。

われわれの常温虚血の実験結果では細胞外 Ca 濃度, Verapamil, Ryanodine, Nicorandil が心筋保護作用を示したが、低温虚血下では Verapamil は有効性を示さなかった。こういった事実は、虚血心筋障害の発生機序が常温と低温では若干異なることを意味し、slow Ca-channel を介する Ca entry は低温虚血下ではそれほど大きな意味を持たないと推測される。

また free radical scavenger の有効性に関しては、常温虚血時には SOD は有効であるが、低温虚血では無効であり、さらに Ebselen は常温虚血時には無効であるものの、reperfusion 時には SOD, Ebselen は両者ともに有効であり、free radical scavenger も虚血時の温度ならびに、投与時期によりその薬効が異なることが判明した。

こういった種々の薬剤は、ほとんどが bell shaped dose response curve を有している点も重要である。虚血時または再灌流時の各種薬剤の検討ではそのほとんどが bell shaped dose response curve を有し、低濃度では無効、高濃度ではむしろ心筋障害を増悪させることが示され、こういった事実は厳密な dose response curve を得たうえで薬剤の有効性を判断しなければ、その有効性を捕えられない可能性を有し、かつ臨床応用する場合に非常に危険であることを示唆している。

術前状態不良例にときとしてカテコールアミンが投与されるがこれらの虚血再灌流障害に及ぼす影響は今なお不明であり、また適切なカテコールアミンの選択に関する報告はない。そこでこういった問題解決に資する目的で今回のごとき実験を施行したが、低濃度では Iso-

proterenol, Noradrenalin はむしろ心筋保護作用を有するが、Adrenalin, Dopamine 等は濃度依存的に心筋障害を増強させることが判明した。詳細な mechanism は不明であるが、開心術前の患者に対するカテコールアミンの選択は、低濃度の Isoproterenol, Noradrenalin を選択することが望ましいことが示唆された。

再灌流液に関する検討でも、前述のごとき注意が必要であることはもちろんのことである。すなわち、近年注目されている controlled reperfusion ないしは terminal cardioplegia なる概念は再灌流時に心機能回復をより正常に回復させるための手段として有効であることは諸家の報告から明らかであるが、われわれの K 濃度と温度との関係に関する実験的検討は、重大な問題を提起しているものと考ええる。すなわち、生理的濃度である K 6 mM ではいずれの温度でも心機能回復率ならびに、CK 遊出量に影響を及ぼさないが K 10 mM では再灌流温が 25℃以下となると心筋障害に働くという結果は灌流温により至適電解質濃度が異なることを示唆しているのみならず、高 K 液による controlled reperfusion を行う場合は温度を常温に維持することが重要であることを示唆している。

さらに、controlled reperfusion に際しての pH の問題も重要である。われわれの今回の結果は pH 6.8 での灌流は有効であるものの、1~3分を維持すべきでこれ以上長い灌流ではむしろ心筋障害的に働くことを示唆しており、注意を要するものと思われた。また、その pH の調節に関しては bicarbonate によるよりは HEPES buffer などの他の緩衝剤により行うことが肝要であり、acidic reperfusion あるいは bicarbonate free reperfusion solution の有効性の mechanism は Na-H 交換系、Cl⁻-HCO₃⁻ 交換系の関与を示唆するものである。いずれにせよ、terminal cardioplegia ないしは controlled reperfusion を臨床応用する際には心筋保護液添加薬物と同様、各種組成の容量、時間、温度反応曲線を検討し応用することが重要である。

ま と め

Isolated working rat heart model を用いて、ischemia reperfusion injury の key mechanism である intracellular Ca-overload を考慮した各種薬剤の添加効果を検討した。

その結果、Ca-movement に影響を及ぼすさまざまな薬剤の添加効果を検討したところ、常温虚血、低温虚血、再灌流時における効果がそれぞれ異なることが判明

した。また、有効と判断された場合でも、それら薬剤のほとんどが bell shaped dose response curve を示しこれら薬剤の臨床応用にはこういった点を考慮し行うことが望ましい。さらに、controlled reperfusion を施行する場合も同様であり、とくに acidic reperfusion を行う場合は、容量反応曲線、温度依存性のみならず、時間的要素も重要であり、とくに pH 6.8 の液による acidic reperfusion は 1～3 分にとどめることが望ましい。

文 献

- 1) 山本文雄, 田中一彦, 高橋玲比古ほか: 開心術とケミルミネッセンス. Free Radicals in Clinical Medicine. vol 4, 大柳善彦, 吉川敏一編. pp. 111-119. 日本医学館, 1990.
- 2) 山本文雄: 開心術後臓器障害と発光. 活性酸素と発光. 第 1 版, 中野 稔, 吉川敏一編. pp. 119-126. 日本医学館, 1990.
- 3) Yamamoto, F., Braimbridge, M., and Hearse, D.: Calcium and cardioplegia. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. **87**: 908-912, 1984.
- 4) 高橋玲比古, 山本文雄, 田中一彦ほか: 低温単純浸漬心保存における心筋保護液中の至適カルシウム濃度の検討. 日心外会誌 **19**: 548-550, 1989.
- 5) Yamamoto, F., Manning, A., Braimbridge, M. et al.: Cardioplegia and slow calcium channel blockers. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. **86**: 252-261, 1983.
- 6) Yamamoto, F., Yamamoto, H., Yosida, S. et al.: The effects of several pharmacologic agents upon postischemic recovery. Cardiovasc. Drugs Ther. **5**: 301-308, 1991.
- 7) 大橋壮樹, 山本文雄, 山本浩史ほか: 再灌流液中ナトリウム濃度の心筋保護効果に関する検討. 日胸外会誌 **40**: 554-559, 1992.
- 8) 大橋壮樹, 山本文雄, 山本浩史ほか: 再灌流液中カリウム濃度の心筋保護効果に関する検討. 日胸外会誌 **40**: 1998-2004, 1992.
- 9) 大橋壮樹, 山本文雄, 山本浩史ほか: 再灌流液中カルシウム濃度の心筋保護効果に関する検討. 日胸外会誌 **39**: 1972-1975, 1991.
- 10) 大橋壮樹, 山本文雄, 山本浩史ほか: 再灌流液中マグネシウム濃度の心筋保護効果に関する検討. 日胸外会誌 **39**: 2134-3139, 1992.
- 11) 大橋壮樹, 山本文雄, 山本浩史ほか: 再灌流液中浸透圧の心筋保護効果に関する検討. 日胸外会誌 **40**: 951-956, 1992.