心筋虚血・再灌流障害とフリーラジカル

— 心筋小胞体(SR)Ca²⁺ ハンドリングの破綻 —

清瀬隆司・岡部栄逸朗*

Ischemia-reperfusion injury and oxygen-derived free radicals in isolated perfused rat hearts : sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling dysfunction

It has been postulated that disturbances of ionic homeostasis may determine the vulnerability of the heart to reperfusion-induced injury, and that reactive oxygen species produced during reperfusion, cause oxidant stress to membrane protein or lipid that leads to disturbances of ionic homeostasis and arrhythmias. To test this hypothesis, we studied the efficacies of various reactive oxygen species scavengers in reducing ischemia-reperfusion(I/R)-induced myocardial injury in isolated perfused rat hearts. The effect of *in vitro* free radical generating system consisting of hypoxanthine(hyX) and xanthine oxidase(XO) on sarcoplasmic reticulum(SR) function was also investigated. In I/R hearts, the contractile function and coronary flow were reduced ; reperfusion with histidine or a cocktail of superoxide dismutase (SOD)-catalase-mannitol resulted in significant protection against the effect of I/R. The incidence of arrhythmias during reperfusion was 100% in I/R hearts ; the duration of arrhythmias was shortened with histidine or with SOD-catalase-mannitol. The decreased duration of normal sinus rhythm in I/R hearts was also protected with histidine or SOD-catalase-mannitol. The SR function assessed by oxalate-supported Ca²⁺ uptake rate in cell free preparations in the presence or absence of ruthenium red, a selective SR Ca²⁺-release channel blocker, was depressed by exposure to hyX-XO reaction. The observed effect of hyX-XO was SOD-inhibitable and was protected by SOD-catalase-mannitol. In samples where the Ca²⁺-release channel was blocked with ruthenium red, no changes in Ca²⁺ uptake rates were noted after ischemia only ; the Ca²⁺ uptake rates in the presence of ruthenium red decreased in samples from ischemia-reperfused hearts, suggesting Ca²⁺-release channel dysfunction caused by oxygen-derived free radicals generated during reperfusion. Exposure of isolated heavy SR to hyX-XO reaction produced potent increase in Ca²⁺ efflux ; the effect of hyX-XO reaction was protected by SOD or by established optimal conditions for specific closure of heavy SR Ca²⁺-release channel by ryanodine. Based on these lines of results, we conclude that the action of reactive oxygen species(possibly, superoxide radicals or singlet molecular oxygen) may be mediated in part through SR Ca²⁺-release channel, thereby causing Ca²⁺ overload linked to arrhythmogenic electrophysiological changes.

Rec. 12/4/1996, Acc. 1/20/1997, pp 355~364

Takashi Kiyose・Eiichiro Okabe*

key words : free radicals, calcium, ischemia-reperfusion, arrhythmia, sarcoplasmic reticulum

* Department of Pharmacology, Kanagawa Dental College 神奈川歯科大学薬理学教室
Offprint requests to : Eiichiro Okabe, Department of Pharmacology, Kanagawa Dental College, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238, Japan

表 1 Protection afforded by histidine (50 mM) and a cocktail of SOD (30 U/ml)-catalase (60 U/ml)-mannitol (5 mM) against reduction of contractile function and coronary flow, duration of arrhythmias (ventricular tachycardia and ventricular fibrillation) and of normal sinus rhythm after and during 30 min of global ischemia followed by 20 min of reperfusion

Treatment	Developed pressure ^a (%)	Coronary flow ^a (%)	Arrhythmia (min)	Sinus rhythm (min)
Ischemia-reperfusion	48.2±9.5	69.6±10.2	13.6±2.5	5.3±2.1
+Histidine	80.9±7.8*	89.2± 3.9*	3.2±1.1*	18.2±4.2*
+SOD/catalase/mannitol	72.1±6.9*	90.1± 8.3*	4.6±2.0*	16.0±1.9*

^a The functional data after ischemia-reperfusion were expressed as a percentage of the pre-ischemic value. The total time during which each heart remained in normal sinus rhythm during the reperfusion phase was quantified. Mean values±SEM from 10 hearts are shown.

* Significantly ($p < 0.01$, ANOVA followed by Student's t -test if ANOVA was significant) different from corresponding value for ischemia-reperfusion.

心筋組織・臓器機能障害の原因は、主として灌流不全に基づく低酸素・虚血であることが知られている^{1,2)}。低酸素・虚血ストレスに応答して細胞は好氣的代謝から嫌氣的代謝へと移行し、著しいATP産生効率の低下をきたす。多くのイオンチャネルやイオン交換系・イオンポンプはATP依存性であり、特に細胞内Ca²⁺イオン濃度と連動する筋細胞の収縮・弛緩サイクルは細胞内ATP濃度低下の必然として破綻状態に陥る。しかし、虚血・再灌流に際してみられる可逆性・不可逆性心筋細胞障害は必ずしも細胞内ATP濃度低下では説明しえない^{3~5)}。

これまで、虚血・再灌流障害を成立させる因子としてATP濃度低下以外に、活性酸素フリーラジカルの産生が考えられてきた⁶⁾。活性酸素フリーラジカルの産生は、心筋組織内でのエピソードに関連した因子であるが、好中球が心筋虚血・再灌流過程における産生源であると最初に指摘したのはRomsonのグループ⁷⁾である。彼らは、好中球枯渇動物で再灌流障害が軽減されることを見出し、この効果がsuperoxide dismutase (SOD)やcatalaseを用いた場合の效果に十分匹敵しうることを報告した。補体の活性化や微生物の貪食、あるいはホルボールエステルのような刺激物で好中球を活性化するとsuperoxide anion radical (O₂⁻)産生のための急激な酸素消費が誘発される。産生されたO₂⁻は酵素的あるいは非酵素的にH₂O₂, hydroxyl radical (HO[•]), 一重項酸素(¹O₂),

次亜塩素酸(HOCl)などの活性酸素フリーラジカルや酸化物を生ずる。

心筋虚血・再灌流で、機能的にも超微細構造的にも、もっとも傷害を受けやすい興奮-収縮連関のコンポネントは小胞体(SR)であるといわれる⁸⁾。SRは、筋原線維(収縮蛋白)の周囲を網目状に取り囲む管状膜構造物で、終末槽と縦走管の二つの部分にわかれ、この両者は形態学的にも機能的にも区別される。

縦走管SRにはCa²⁺ポンプATPaseが広汎に存在しており、自身の内腔へのCa²⁺イオンくみ上げを主要な機能としている。これに対し、SRからのCa²⁺イオン放出の場合は終末槽であると推定されている。SRは細胞内Ca²⁺イオン濃度を正確に維持制御する内膜系であり、この機能に破綻が生じた場合には必然的に細胞内Ca²⁺蓄積(Ca²⁺ overload)を招来する。虚血・再灌流時に認められるCa²⁺ overloadが、活性酸素フリーラジカル産生に起因するSR機能破綻と連動したものであると仮定すれば、活性酸素フリーラジカルは*in vitro*でSR機能の破綻を擬似できなければならない。しかも、その破綻様式がCa²⁺ overloadの成立を説明するものでなければならない。たとえばフリーラジカル(O₂⁻, HO[•])はSRのCa²⁺ポンプATPase活性を抑制するが⁹⁾、これは細胞内Ca²⁺イオンのくみ上げを減少とリンクしてCa²⁺ overloadが成立するという説明を可能にする。しかし、SRには受動的Ca²⁺透過性の経路とCa²⁺放

図 1 Ca^{2+} uptake velocity in sarcoplasmic reticulum of whole heart homogenates from intact, ischemic and reperfused hearts, and effects of a cocktail of SOD (30 U/ml), catalase (CAT, 60 U/ml) and mannitol (MAN, 5 mM), and of histidine (50 mM)

Oxalate-supported Ca^{2+} uptake in the presence (solid columns) or absence (open columns) of ruthenium red (20 μM) was determined. Ruthenium red was added 0.5 min before the initiation of the reaction. The results are mean $\pm$ SEM of five independent experiments; five homogenate preparations from different pooled left ventricle cardiac muscles (from 6 hearts each) were studied in parallel.

*Significantly ($p < 0.01$) different from corresponding value for control (homogenates from intact hearts).

†, †† Significantly ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$) different from corresponding value for ischemia.

¶, ¶¶ Significantly ($\text{¶ } p < 0.05$, $\text{¶¶ } p < 0.01$) different from corresponding value for ischemia-reperfusion (I/R).

Intergroup comparisons were performed using ANOVA followed by Student's t -test if ANOVA was significant.

出チャンネルが存在しており, Ca^{2+} ポンプ ATPase に対する活性酸素フリーラジカルの効果だけで Ca^{2+} overload のメカニズムの全貌を説明することはできない。

本研究の目的は, Ca^{2+} イオンに関連する SR の機能が活性酸素フリーラジカルによって受ける修飾を解明することであり, そして, 得られた結果から, Ca^{2+} overload の成立に果たすフリーラジカルの役割を考察した。

方 法

(1) 虚血・再灌流実験モデル

ヘパリン処置 (200 U, iv) SD ラット (体重 190~210 g, 雄) から diethyl ether 麻酔下で心臓を摘出, 左心室内にバルーンを挿入し, 等容積収縮 Langendorff 標本を作成した。Krebs-Henseleit (K-H) buffer (95% O_2 -5% CO_2) による 100 cm H_2O (7.8 kPa) の定圧灌流を行い, 心電図を記録,

そして冠流量を測定した。30 分の global な虚血の後, 20 分間の再灌流心臓モデルでみられる左心室圧, 心拍数および冠流量の変化, そして不整脈の発現に対するラジカスカベンジャーの効果を評価した。不整脈発現の評価は Lambeth Conventions¹⁰⁾ のガイドラインに従った。用いた実験条件で, 再灌流不整脈, 特に心室細動の出現頻度および持続時間と先行する虚血時間との間には bell-shaped curve が成立し, 30 分間虚血後の再灌流時に 100% の頻度で心室細動が出現することを確認している¹¹⁾。用いたスカベンジャーは SOD (30 U/ml), catalase (60 U/ml), mannitol (5 mM), histidine (50 mM) であり, それぞれ示した最終濃度になるようあらかじめ K-H buffer に溶解して再灌流した。また, これらスカベンジャーを含む K-H buffer の pH は 7.4 と安定であり, 浸透圧はスカベンジャーを溶解したとしても 285~323 mosmol の範囲内であった。

図 2 Effect of reactive oxygen species generated from hypoxanthine (hyX, 30 μ M)-xanthine oxidase (XO, 0.1 U/ml) reaction on the Ca^{2+} uptake velocity in sarcoplasmic reticulum of whole heart homogenates from intact hearts, and effects of scavengers. Oxalate-supported Ca^{2+} uptake in the presence (solid columns) or absence (open columns) of ruthenium red (20 μ M) was determined

The time sequence of additions was designed to ensure exposure of the homogenates to reactive oxygen species for 1 min and ruthenium red, SOD (30 U/ml) alone, histidine (50 mM) or a cocktail of SOD (30 U/ml), catalase (CAT, 60 U/ml) and mannitol (MAN, 5 mM) for 0.5 min before the initiation of the reaction. XO alone was run simultaneously in a time-matched manner. The results are mean $\pm$ SEM of five independent experiments; five homogenate preparations from different pooled left ventricle cardiac muscles (from 6 intact hearts) were studied in parallel.

***Significantly (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) different from corresponding value for XO alone.

†, †† Significantly († $p < 0.05$, †† $p < 0.01$) different from corresponding value for hyX plus XO.

Intergroup comparisons were performed using ANOVA followed by Student's t -test if ANOVA was significant.

(2) 心筋ホモジネートの調整と Ca^{2+} 取込み速度 (oxalate-supported Ca^{2+} uptake) の測定
虚血 (30 分) のみおよび虚血・再灌流終了後、心臓の左心室を切り出し、細切、5 倍量の氷冷 10 mM imidazole buffer (pH7.0) で 20 秒間ホモジナイズした (Polytron, PT10 probe)。

ホモジネート SR による Ca^{2+} 取込み速度は、100 mM KCl, 20 mM imidazole, 10 mM NaN_3 , 5 mM ATP, 0.2 mM CaCl_2 , 0.1–0.2 μCi ^{45}Ca /ml, 5 mM MgCl_2 , 10 mM K-oxalate, 37°C の反応条件でミリボア法により測定した。 Ca^{2+} 取込み速度は ruthenium red (20 μM) 存在下と非存在下で決定した¹²⁾。ホモジネートの調整に際しては、無処置群 (6 匹)、虚血群 (6 匹)、虚血・再灌流群 (6 匹) としてスカベンジャー処置群 (各々 6 匹) の心臓をそれぞれプールして用いた。また、実験プロトコルごとに独立して無処置 (6 匹)、虚血処置 (6 匹)、

虚血・再灌流処置 (6 匹) およびスカベンジャー処置 (6 匹) を施したラット心臓からホモジネートを調整、パラレルに評価した。

(3) SR の分離調整

既報に従いマイクロゾーム分画としての SR¹³⁾ と終末槽 SR¹⁴⁾ を分離調整した。それぞれの SR 分離に際しては、無処置ラットの心臓をプールし、8 個からマイクロゾーム分画 SR を、12 個から終末槽 SR を分離して用いた。この操作を実験プロトコルごとに行い、得られた SR の機能を実験プロトコルに従ってパラレルに評価した。

(4) 受動的 Ca^{2+} 透過性 (マイクロゾーム SR)

SR の定常状態 Ca^{2+} 取込みを得た後、 Ca^{2+} ポンプ ATPase を 2.5 mM EGTA で停止させ、受動的に生ずる Ca^{2+} 流出 (拡散) の一次反応速度として算出した¹⁵⁾。定常状態 Ca^{2+} 取込みは、100 mM KCl, 20 mM imidazole buffer (pH7.0), 10 mM

図 3 Rates of O_2^- (A) and H_2O_2 (B) production by hypoxanthine (5 to 50 μM)-xanthine oxidase (0.1 U/ml) in the absence (●) or presence of scavengers (30 U/ml SOD, □; 60 U/ml catalase, ○), and effect of hypoxanthine-xanthine oxidase on the Ca^{2+} uptake velocity in sarcoplasmic reticulum of whole heart homogenates from ischemic (○) and intact (●) hearts (C and D)

Oxalate-supported Ca^{2+} uptake in the presence (D) or absence (C) of ruthenium red (20 μM). In panels C and D, the time sequence of additions was designed to ensure exposure of the homogenates to reactive oxygen species for 1 min and ruthenium red for 0.5 min before the initiation of the reaction. The experiments at hypoxanthine dose zero (in the presence of xanthine oxidase) were run simultaneously in a time-matched manner.

The results are mean $\pm$ SEM of four (A and B) or five (C and D) independent experiments; five homogenate preparations from different pooled left ventricle cardiac muscles (from 6 hearts each) were studied in parallel (C and D).

NaN_3 , 100 μM Na_2ATP , 2.1 mM $MgCl_2$, 4 μM $CaCl_2$, 0.1 μCi ^{45}Ca /ml, 27°Cの反応条件でSRに Ca^{2+} ポンプを介して負荷することによって得た¹⁵⁾.

(5) SR内自由 Ca^{2+} 量と Ca^{2+} -ATPase 活性(ミクロゾームSR)

定常状態 Ca^{2+} 取込みと同様の実験条件下で、

SRを含む反応槽の Ca^{2+} コンパートメント (SR外 Ca^{2+} , SR外結合 Ca^{2+} , SR内結合 Ca^{2+} , SR内自由 Ca^{2+}) を想定し、それぞれのパラメータからSR内自由 Ca^{2+} ($Ca^{2+}i$) を求めた¹⁶⁾. Ca^{2+} -ATPase 活性は, $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ からの ^{32}Pi の遊離速度として測定した¹⁷⁾.

(6) SRからの Ca^{2+} イオン放出(終末槽SR)

分離SRを氷冷 2 mM $^{45}CaCl_2$, 150 mM KCl, 20 mM MOPS (pH6.8) で一昼夜インキュベートし, 20 倍量の Ca^{2+} 放出メディウム (150 mM KCl, 20 mM MOPS, EGTA/ Ca^{2+} buffer, pCa 5) 中での Ca^{2+} 放出量を測定した¹⁸⁾.

(7) 活性酸素フリーラジカル発生システム

in vitro で活性酸素フリーラジカルを発生させるため, hypoxanthine-xanthine oxidase 反応を用いた. この発生システムでの 5 分間の反応から, O_2^- 産生速度を ferricytochrome C 法で, H_2O_2 産生速度は 4-aminoantipyrine および phenol との反応によって生ずる quinoneimine を 505 nm でモニターすることによってそれぞれ測定した.

結 果

(1) 虚血・再灌流実験モデル

表 1 に虚血・再灌流時にみられる心機能パラメータの変化と活性酸素フリーラジカルスカベンジャーの効果をまとめて示す. 左心室 developed pressure (systolic-diastolic pressure, mmHg) は虚血・再灌流によって 162 ± 7 から約 52%, 冠流量 (ml/min) は 20.3 ± 2.0 から約 30% 減少した. この減少は, SOD-catalase-mannitol カクテルおよび histidine の再灌流によって有意に抑制された. 一方, 再灌流不整脈の持続時間および再灌流による正常洞調律の短縮も SOD-catalase-mannitol カクテルあるいは histidine 処置で抑制された.

ホモジネート Ca^{2+} 取込み速度は 30 分虚血で有意に, 虚血・再灌流によってはさらに著明な低下を示した (図 1). Ruthenium red 存在下では虚血の影響を認めることができず, しかし, 虚血・再灌流によるきわめて強い Ca^{2+} 取込み速度の低下がみられた. 虚血・再灌流によって引き出される Ca^{2+} 取込み速度を低下させる作用は SOD-

表 2 Effect of reactive oxygen species generated from hypoxanthine(hyX, 25 μ M)-xanthine oxidase(XO, 0.05 U/ml) reaction on the passive Ca^{2+} permeability (the initial apparent first-order rate constant, K/ν), Ca^{2+} -ATPase activity and intravesicular free Ca^{2+} (Ca^{2+}_i), in the presence or absence of ruthenium red(RR, 20 μ M), and effect of SOD(30 U/ml), in isolated microsomal SR

Experimental addition	K/ν (min^{-1})	Ca^{2+} -ATPase (nmol Pi/mg/min)	Ca^{2+}_i (nmol/mg)
None	1.4 ± 0.3	52.8 ± 9.5	21.9 ± 4.1
XO	1.2 ± 0.4	49.3 ± 6.0	22.3 ± 5.5
RR	$2.9 \pm 0.7^*$	50.1 ± 7.3	$46.0 \pm 10.8^*$
hyX+XO	$3.6 \pm 1.2^*$	48.9 ± 8.5	$5.1 \pm 1.8^*$
RR+hyX+XO	4.9 ± 1.5	53.0 ± 5.8	$4.2 \pm 2.6^\dagger$
SOD+hyX+XO	$1.8 \pm 0.9^\ddagger$	48.0 ± 10.2	$29.6 \pm 9.5^\ddagger$

Time sequence of additions was designed to ensure exposure of microsomal SR to reactive oxygen species for 1 min and RR or SOD for 0.5 min before the initiation of the reaction. None-controls, XO alone or RR alone were also run simultaneously in a time-matched manner. The results are mean $\pm$ SEM of six independent experiments; six SR preparations isolated from different pooled left ventricle cardiac muscles (from 8 hearts) were studied in parallel.

*Significantly ($p < 0.01$) different from corresponding value for XO alone.

† Significantly ($p < 0.01$) different from RR alone. ‡ Significantly ($p < 0.01$) different from hyX plus XO. Intergroup comparisons were performed using ANOVA

followed by Student's t -test if ANOVA was significant.

catalase-mannitol カクテルによっても、あるいは histidine によっても有意に抑制されるものであった。図 1 に示した結果は、虚血自身に Ca^{2+} ポンプ ATPase を抑制する能力があることを示唆するとともに、再灌流に伴う活性酸素フリーラジカルの産生にリンクした SR Ca^{2+} 放出チャネルの障害を示唆して興味深い。

(2) ホモジネート Ca^{2+} 取込み速度と *in vitro* 活性酸素フリーラジカル発生系

虚血・再灌流の効果を hypoxanthine-xanthine oxidase 反応で発生する活性酸素フリーラジカルが擬似できるか否か検討した結果を図 2 に示す。Hypoxanthine-xanthine oxidase は ruthenium red の存在、非存在にかかわらず、SOD 単独あるいは SOD-catalase-mannitol 抑制性にホモジネート Ca^{2+} 取込み速度を低下させた。この低下は、ruthenium red が存在した場合には虚血・再灌流時にみられた低下と同様にきわめて強く認められた。Histidine は hypoxanthine-xanthine oxidase の効果にはなんら影響を及ぼすものではなかった。

Hypoxanthine-xanthine oxidase 反応の性格

を検討した結果と、これに対する虚血心筋と無処置心筋の感受性比較を図 3 に示す。 O_2^- の発生速度は 0.1 U/ml xanthine oxidase 存在下で hypoxanthine 濃度依存性に増加し、SOD によってほぼ完全に抑制された(図 3 A)。一方、 H_2O_2 のそれは O_2^- と同様に増加するが、SOD が添加された場合にはさらに増強された(図 3 B)。Catalase はほぼ完全に H_2O_2 発生を抑制した。したがって、hypoxanthine-xanthine oxidase 反応を用いる限り、この反応の効果が SOD で抑制できる場合には O_2^- の仲介によって引き出される効果であり、 H_2O_2 によるものではないと推測できる。虚血心筋ホモジネートの Ca^{2+} 取込み速度-hypoxanthine 濃度反応曲線は、無処置心筋ホモジネートのそれよりも明らかに左下方にシフトしており、さらには、ruthenium red 存在下で急激な Ca^{2+} 取込み速度の低下を示した(図 3 C, D)。

(3) SR の Ca^{2+} ハンドリングと *in vitro* 活性酸素フリーラジカル発生系

Ruthenium red による SR Ca^{2+} 放出チャネル閉口固定作用に依存したホモジネート Ca^{2+} 取込み速度の増加部分が活性酸素フリーラジカルに強

図 4 Effect of reactive oxygen species generated from hypoxanthine (hyX, 30 μ M)-xanthine oxidase (XO, 0.1 U/ml) reaction on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux from isolated heavy SR vesicles, and effects of SOD (30 U/ml) and ryanodine (Rydn, 300 μ M)

The time sequence of additions was designed to ensure exposure of the SR to reactive oxygen species for 1 min before the initiation of the reaction. SOD was added 0.5 min before the reactive oxygen exposure. The SR vesicles were preincubated with or without ryanodine for 10 min, then the reaction was initiated.

The results are mean $\pm$ SEM of five independent experiments; five heavy SR preparations from different pooled left ventricle cardiac muscles (from 12 intact hearts) were studied in parallel.

*Significantly ($p < 0.01$) different from XO alone.

†Significantly ($p < 0.01$) different from hyX plus XO.

‡Significantly ($p < 0.05$) different from hyX alone.

Intergroup comparisons were performed using ANOVA followed by Student's t -test if ANOVA was significant.

い感受性を示したことから, Ca^{2+} ポンプ ATPase に影響を及ぼさない条件の hypoxanthine (25 μ M)-xanthine oxidase (0.05 U/ml) 反応が SR からの Ca^{2+} イオン放出経路に与える効果を検討した。

用いた実験条件下で, hypoxanthine-xanthine oxidase は Ca^{2+} ポンプ ATPase に影響することなしに受動的 Ca^{2+} 透過性を増加させ Ca^{2+} i を減少させた (表 2)。また, ruthenium red は Ca^{2+} i および受動的 Ca^{2+} 透過性を増加させるが, ruthenium red 依存性 Ca^{2+} i の増加は, hypoxanthine-xanthine oxidase 反応によって著しく抑制された。しかし, 受動的 Ca^{2+} 透過性の増加傾向が認められたものの, その変化は有意なものではなかった。Hypoxanthine-xanthine oxidase 反応がもたらす効果は, SOD によって阻止されるものであった (表 2)。

これらの結果から判断する限り, $\text{O}_2^{\cdot -}$ はあたかも受動的 Ca^{2+} 透過性の経路を促進することによって Ca^{2+} i を減少させているかのようにみえ

る。しかし, この経路は, SR 内腔 Ca^{2+} イオンの濃度を左右するに足る経路ではなく¹⁹⁾, したがって, Ca^{2+} i の減少は Ca^{2+} 放出チャネルの機能障害に基づくものであると考えるべきである。その根拠は, ruthenium red 依存性 Ca^{2+} i の増加が $\text{O}_2^{\cdot -}$ に対して強い感受性を示したことである。この可能性を支持する結果を図 4 に示す。Ruthenium red は, ryanodine 受容体 Ca^{2+} 放出チャネルからの Ca^{2+} 放出を抑制することが知られているが²⁰⁾, さらに強固にこのチャネルを閉口状態に固定する条件の ryanodine (300 μ M, 10 分間処置)¹⁴⁾ は, Ca^{2+} 放出チャネルが局在する終末槽 SR からの Ca^{2+} 放出を消失させるとともに, hypoxanthine-xanthine oxidase による Ca^{2+} 放出増大を強力に阻止した (図 4)。この作用は, SOD に匹敵するものであった。

考 察

血球成分の関与を無視できる Langendorff 心

臓標本を用い、虚血・再灌流障害が活性酸素フリーラジカルによって仲介されている可能性を明確にした。これを支持する根拠は、SOD-catalase-mannitol カクテルおよび histidine が再灌流誘発性不整脈を強力に阻止したことである(表 1)。これは、再灌流に際して、 O_2^- に端を発する $HO^\cdot$ ラジカルの生成、そして 1O_2 の生成が誘起されることをも示唆している。Histidine は $HO^\cdot$ と反応するが、 1O_2 のすぐれたスカベンジャーである²¹⁾。

また、光増感剤 rose bengal を光励起させることによって発生する 1O_2 が、histidine 抑制性に不整脈を誘発すること²²⁾、さらには心筋 SR からの Ca^{2+} イオン放出を増大すること²³⁾も知られている。Zhai ら²⁴⁾はラット心臓虚血・再灌流モデルを用い、histidine の効果を評価することによって 1O_2 がもっとも有力な心筋傷害性の活性酸素種であると結論した。Histidine のもつスカベンジ能特異性を考慮すれば、 1O_2 と $HO^\cdot$ とによる心筋機能障害を区別することは困難であるが、しかし、得られた実験結果から推測する限り、 O_2^- と H_2O_2 との Haber-Weiss 反応、 $HO^\cdot$ の H^+ の引き抜きによって開始される脂質過酸化反応などが 1O_2 生成と密接にリンクしていると考えられることができる。

再灌流早期に認められる不整脈の発生と活性酸素フリーラジカルとの関連性を証明するためには、活性酸素フリーラジカルの生成を直接的に検出する必要がある。これに関して電子スピン共鳴法(ESR)を用いた報告がある²⁵⁾。Garlic ら²⁵⁾は、15 分間虚血後、酸素化した buffer で再灌流すると、再灌流早期に冠流出液中にラジカルスピンドクトが増加することを確認した。臨床的にも急性心筋梗塞に対する primary PTCA 施行例で、冠動脈再灌流時に活性酸素フリーラジカルの生成増加が認められている²⁶⁾。

再灌流不整脈の発生には、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} など細胞内外イオン分布の変化が関与する²⁷⁾。活性酸素フリーラジカルがこの不整脈発生の主要なメディエーターであるとはいえ、イオンバランスの変化を擬似できるかどうか確認しなければ発生原因と考えることはできない。本研究では Ca^{2+} イオンの動態に焦点を絞り、SR 機能との関連で活性酸

素フリーラジカルとの連携を探索した。

虚血・再灌流によって障害を受けた心筋組織から分離調整した SR 機能は、受けた障害を反映しないことが知られている²⁸⁾。そのため心筋をホモジネートし、その Ca^{2+} 取込み速度(oxalate-supported Ca^{2+} uptake として測定)を SR 機能として評価した^{20,28)}。ホモジネート Ca^{2+} 取込み速度は、虚血・再灌流による心機能変化と平行して変動し(図 1)、しかも、*in vitro* での活性酸素フリーラジカル発生系はこの効果を擬似した(図 2)。ただ、用いた hypoxanthine-xanthine oxidase 反応は 1O_2 を発生させる系ではないため、必然的に histidine は無効である(図 2)。

一方、虚血・再灌流心筋ホモジネートを用いた場合でも、また、*in vitro* 活性酸素フリーラジカル発生系と無処置心筋ホモジネートを反応させた場合でも、ruthenium red 存在下での Ca^{2+} 取込み速度に高い感受性が認められたこと(図 2, 3)、また、ruthenium red 存在下での Ca^{2+} 取込み速度は虚血になんら影響を受けず、これに対して、 Ca^{2+} ポンプ ATPase に依存した Ca^{2+} 取込み(ruthenium red 非存在下での Ca^{2+} 取込み速度)は虚血によって有意に低下したことは、活性酸素フリーラジカルの標的が主として Ca^{2+} 放出チャネルであることを示唆する。虚血自身、心筋細胞内 ATP 濃度を減少させるので、これが Ca^{2+} ポンプ ATPase 活性を低下させた原因であると推定できる。また、虚血心筋は、少なくともホモジネート Ca^{2+} 取込み速度を指標とした場合には、活性酸素フリーラジカルに対して障害を受けやすいことが明らかとなった(図 3)。

直接的に分離 SR に与える活性酸素フリーラジカルの影響を解析した実験結果(表 2, 図 4)は、活性酸素フリーラジカルの標的が Ca^{2+} 放出チャネルである可能性をさらに強く裏づけている。それは、① hypoxanthine-xanthine oxidase 反応が Ca^{2+} ポンプ ATPase に影響を与えずに Ca^{2+} i を低下できること、② hypoxanthine-xanthine oxidase 反応は放出チャネルを通過する Ca^{2+} イオンを増加できること、そして ③ ryanodine でチャネルを閉口状態にしかも強力にロックする

と, hypoxanthine-xanthine oxidase の効果を消失できること, などである。これらの効果は, SOD 抑制性であるため, 主要なラジカル種は $O_2^{\cdot-}$ であると解釈できる。Holmberg ら²⁹⁾は SR を人工脂質膜に融合させ, 再構成された Ca^{2+} 放出チャネルの単一電流を記録することによって, 1O_2 がチャネル開口活性を上昇することを確認している。したがって, 虚血・再灌流時に産生された $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$ あるいは 1O_2 は, Ca^{2+} ポンプ ATPase よりもむしろ Ca^{2+} 放出チャネルに強い障害性を持ち, このチャネルを通過する Ca^{2+} 放出を増大させると考えることは可能である。

活性酸素フリーラジカル生成に基づく Ca^{2+} イオンバランスの変化, 特に SR からのチャネルを通過する Ca^{2+} 放出の増大が Ca^{2+} overload に寄与する要因であり, これが再灌流不整脈の発生原因の一つであるという可能性を支持することができた。そしてこれが, 心筋細胞レベルでの自動反復放電を導くことになろう。特に $O_2^{\cdot-}$, $HO^{\cdot}$ と 1O_2 は, 直接あるいは間接的に心筋細胞膜を過酸化し, 膜局在蛋白機能を障害することができ, これによって Ca^{2+} 障壁である心筋細胞膜系機能を破綻させ, ついには細胞障害を導くと考えるのがより理論的である。 Ca^{2+} イオンが細胞内情報伝達のメッセンジャーとして機能するのは, その細胞内濃度が正常に維持されている場合であって, 活性酸素フリーラジカルによって濃度維持機能が障害されたときには細胞死を招く。この Ca^{2+} イオン依存性細胞障害は, したがって, 特定の組織・臓器に限定されるものではないと考えるべきであろう。

文 献

- Braunwald E, Kloner RA : The stunned myocardium : prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66 : 1146-1194, 1982.
- Braunwald E, Kloner RA : Myocardial reperfusion : a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76 : 1713-1719, 1985.
- DeWitt DF, Jochim KE, Behrendt DM : Nucleotide degradation and functional impairment during cardioplegia : amelioration by inosine. *Circulation* 67 : 171-178, 1983.
- Neely JR, Grottyohann LW : Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ. Res.* 55 : 816-824, 1984.
- Taegtmeyer H, Roberts AFC, Raine AEG : Energy metabolism in reperfused heart muscle : metabolic correlates to return function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 6 : 864-870, 1985.
- Hess ML, Okabe E, Kontos HA : Proton and free radical interaction with the calcium transport system of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13 : 767-772, 1981.
- Romson JL, Hook BJ, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR : Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67 : 1016-1023, 1983.
- McCallister LP, Daiello DC, Tyers GFO : Morphometric observations of the effects of normothermic ischemic arrest on dog myocardium ultrastructure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10 : 67-80, 1978.
- Okabe E, Hess ML, Oyama M, Ito H : Characterization of free radical-mediated damage of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 225 : 164-177, 1983.
- Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ et al. : The lambeth conventions : guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 22 : 447-455, 1988.
- Okabe E, Takahashi S-s, Norisue M, Manson NH, Kukreja RC, Hess ML, Ito H : The effect of hypochlorous acid and hydrogen peroxide on coronary flow and arrhythmogenesis in myocardial ischemia and reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.* 248 : 33-39, 1993.
- Okabe E, Kato Y, Kohno H, Hess ML, Ito H : Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of the effect of acidosis on calcium transport by masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Pharmacol.* 34 : 961-968, 1985.
- Okabe E, Kato Y, Sasaki H, Saito G, Hess ML, Ito H : Calmodulin participation in oxygen radical-induced sarcoplasmic reticulum calcium uptake reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 255 : 464-468, 1987.
- Okabe E, Kuse K, Sekishita T, Suyama N, Tanaka K, Ito H : The effect of ryanodine on oxygen free radical-induced dysfunction of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256 : 868-875, 1991.
- Okabe E, Sugihara M, Tanaka K, Sasaki H, Ito H : Calmodulin and free oxygen radicals interaction with steady-state calcium accumulation and passive calcium permeability of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250 : 286-292, 1989.
- Okabe E, Odajima C, Taga R, Kukreja RC, Hess ML, Ito H : The effect of oxygen free radicals on calcium permeability and calcium loading at steady state in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 34 : 388-394, 1988.

- 17) Feher JJ, Briggs FN : The effect of calcium oxalate crystallization kinetics on the kinetics of calcium uptake and calcium ATPase activity of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Cell Calcium* 1 : 105-118, 1980.
- 18) Zahradníková A, Bak J, Mészáros L : Heterogeneity of the cardiac calcium release channel as assessed by its response to ADP-ribose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 : 457-463, 1995.
- 19) Katz AM, Repke DI, Dunnett J, Hasselbach W : Dependence of calcium permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles on external and internal calcium ion concentrations. *J. Biol. Chem.* 252 : 1950-1956, 1977.
- 20) Feher JJ, Manson NH, Poland JL : The rate and capacity of calcium uptake by sarcoplasmic reticulum in fast, slow and cardiac muscle : effects of ryanodine and rethenium red. *Arch. Biochem. Biophys.* 265 : 171-182, 1988.
- 21) Ishibashi T, Lee C-i, Okabe E : Skeletal sarcoplasmic reticulum dysfunction induced by reactive oxygen intermediates derived from photoactivated rose bengal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277 : 350-358, 1996.
- 22) Kusama Y, Bernier M, Hearse DJ : Singlet oxygen-induced arrhythmia : dose-response and light-response studies for photoactivation of rose bengal in the rat heart. *Circulation* 80 : 1432-1448, 1989.
- 23) Stuart J, Abramson JJ : Photooxidation of SR vesicles results in rapid calcium release. *Biophys. J.* 55(Abtract) : 15a, 1989.
- 24) Zhai X, Zhou X, Ashraf M : Interaction of singlet oxygen with 5'-nucleotidase in rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27 : 2453-2464, 1995.
- 25) Garlic BP, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF : Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ. Res.* 61 : 757-760, 1987.
- 26) Grech ED, Dodd NJF, Bellamy CM et al : Free radical generation during angioplasty reperfusion for acute myocardial infarction. *Lancet* 341 : 990-991, 1993.
- 27) Hearse DJ, Tosaki A : Free radicals and calcium : simultaneous interacting triggers as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrhythmias in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20 : 213-223, 1987.
- 28) Rapundalo ST, Briggs FN, Feher JJ : Effects of ischemia on the isolation and function of canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18 : 837-851, 1986.
- 29) Holmberg SRM, Cumming DVE, Kusama Y, Hearse DJ, Poole-Wilson PA, Shattock MJ, Williams AJ : Reactive oxygen species modify the structure and function of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel. *Cardioscience* 2 : 19-25, 1991.