薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112(8) 557-562 (1992)

イソプロテレノール投与早期心筋障害における過酸化脂質の変化

並川清博,^{*,a} 岡崎雄交,^a 西田升三,^b 門田永治,^b
戸村隆訓,^b 橋本重夫^b
近畿大学薬学部,^a 近畿大学医学部^b

Studies on Early Stage Changes of Peroxide Lipid in Isoproterenol-Induced Myocardial Injury

Kiyohiro NAMIKAWA,^{*,a} Yuko OKAZAKI,^a Shozo NISHIDA,^b
Eiji KADOTA,^b Takanori TOMURA,^b
and Shigeo HASHIMOTO^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,^a 3-4-1,
Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577, Japan and School of
Medicine, Kinki University,^b 377-2, Ohnohigashi,
Osakasayama, Osaka 589, Japan

(Received January 27, 1992)

The amount of peroxide lipid *in vivo* in the early stage of the experimental model of myocardial infarction in a rat induced by the administration of isoproterenol (Isp) was measured as the value of malonic dialdehyde (MDA). The model of myocardial infarction was made by giving 75 mg/kg of Isp to the rat weighing 270 ± 10 g. After the administration of Isp, the amounts of lipid in the serum and in the myocardial tissue were measured, and a blood chemistry test (glutamic oxaloacetic dehydrogenase, glutamic pyruvic transaminase, lactate dehydrogenase, free fatty acid, creatine kinase) was simultaneously carried out on the serum. The value of the amount of peroxide lipid in the serum began to elevate 3 h after the administration of Isp and reached a maximum value at 6 h. The value of the amount of peroxide lipid in the tissue began to elevate 30 min after the administration and reached a maximum at 3 h. Each blood chemistry disclosed the elevation 30 min after the administration. As mentioned above, the production of peroxide lipid *in vivo* on the myocardial disorder in the early stage after the administration of Isp and the biochemical changes showed a significant correlation.

From these results it is suggested that the myocardial disorder induced by the administration of Isp has already developed at 30 min after the administration.

Keywords—peroxide lipid; isoproterenol; malonic dialdehyde; myocardial infarction experimental model; blood chemistry test

緒

言

虚血心筋への血流再開は障害からの回復のための必須の条件であるが、血流再開による新しい障害を不可逆的に伴っている。その代表的な障害の1つにフリーラジカルによる過酸化障害があり、一定期間虚血後の組織に再循環によって酸素が付加されるとさらに重要な組織障害を引き起こすことが知られており、この虚血・再循環障害に活性酸素が重要な役割を果たしていることが報告され

ている。¹⁾ 心筋障害とフリーラジカルに関する最近の報告では、岡部らの Ca^{2+} 動態から追求した報告、²⁾ さらに Das らの高速液体クロマトグラフィーを用いて検討した報告³⁾ などに見られるようにいずれもヒドロキシラジカルの関与を示唆している。一方、ある種の薬物は生体内でラジカルを生成し、これが酸化的な組織障害を引き起こすと考えられている。^{4,5)} これらはいずれも生体の脂質過酸化と関係があり、この脂質過酸化は生体内の酸化還元酵素による薬物代謝の結果生じるラジカルによる可能性が高いとされている。⁶⁾ 著者らは先に isoproterenol (Isp) 投与による心筋障害について報告した。⁷⁾ その際、Isp による不可逆的障害は投与 30 分後にはすでに始まっていることが示唆され、そしてその障害が最大となる時期は投与 6 時間から 12 時間後であることを明らかにしたが、Isp 投与心筋障害でも冠動脈結紮による虚血モデルでもその障害における過酸化脂質の関与を早期の段階から検討した報告は見あたらない。そこで今回、この Isp 心筋障害について Isp 投与により生じる過酸化脂質は投与後いつごろ生じ、その時の生化学的变化はどのような対応を示すのかを心筋組織及び血清中の過酸化脂質、生化学的变化として glutamic oxaloacetic dehydrogenase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), free fatty acid (FFA) を指標として Isp 投与 30 分後から 1 週間後にかけて検討を試みた。

実 験 の 部

1) 実験試薬及び試液 本実験で用いた試薬は次の通りである。dl-イソプロテレノール塩酸塩はナカライテスク社製、注射用生理食塩水は大塚製薬製、2-チオバルビツール酸 (TBA), リンタングステン酸、塩化カリウム、精密分析用硫酸、精密分析用リン酸、1,1,3,3-tetraethoxypropane, *n*-ブタノールは和光純薬製のものを用い、その他の試薬及び試液は市販の特級品、キットを用いた。

2) 実験動物 日本エスエルシー株式会社から購入した生後 8 週齢の Std: Wistar 系雄性ラットを 1 週間予備飼育したのち、体重が 270 ± 10 g のものを実験に使用した。なおラットは、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ の飼育室にて 5 匹を 1 ケージに入れ繁殖用固形飼料を与え、また飲料水は給水ビンから自由に与え飼育した。

3) 血清及び心筋中の過酸化脂質の測定 血清は八木法,⁸⁾ 心筋組織は内山らの方法⁹⁾ に従った。前報⁷⁾ に準じて作製した Isp 投与ラットを 30, 60 分, 3, 6, 12 時間, 1, 3, 7 日後に屠殺し、腹部動脈より採血を行いその 0.05 ml を生理食塩水 1.0 ml と混合した後、八木法に従い *n*-ブタノール層を抽出、日立 650-10S 型分光蛍光光度計にて励起波長 515 nm, 蛍光波長 553 nm にて測定、次式により過酸化脂質の濃度は血液 1 ml 中のマロンジアルデヒド (MDA) 量として求めた。

$$\text{過酸化脂質含量} = f/F \times 21 \text{ (nmol/ml 血液)}$$

$$(F = \text{標準の蛍光強度}, f = \text{検体の蛍光強度})$$

次に心筋中の過酸化脂質は、採血後に経大動脈的に生理食塩水にて灌流しできる限り血液を除き心臓を摘出、左心室前壁の心筋組織を採取して直ちに 1.15% KCl 液にて 10% のホモジネートを作製した。この液 0.5 ml を 10 ml の遠沈管に取り 1% リン酸 3 ml 及び 0.6% tiobarbituric acid (TBA) 試薬 1 ml を加え、 95°C で 45 分間加熱した。冷後、*n*-ブタノール 4 ml を加えて振盪し 1000 g, 15 分間遠心分離を行いブタノール層を分離、このブタノール層を日立 200-10 型、二波長分光光度計にて 535 及び 520 nm で測定し、それぞれの値の差を求めた。また、標準試料としては 1,1,3,3-tetraethoxypropane の 110 mg を正確に採取し、メスフラスコ中にて 50 ml のメタノール溶液としこれを標準溶液とした。これより 0.5 ml を正確に取り、対照には 0.5 ml の生理食塩水を用いて、上記の方法にて比色測定を行い次式により過酸化脂質の濃度を MDA 値として求めた。ま

た, 求めた値は最終的に組織蛋白 100 mg あたりの量に換算した. 蛋白定量の試料は, Lowry 法にて測定した.¹⁰⁾ なおラットは各群 7 匹ずつを用いた.

$$\text{過酸化脂質含量} = f/F \times 10 \text{ (nmol/ml 組織ホモジネート)}$$

(F = 標準試料の吸光度, f = 検体の吸光度)

4) 血清の生化学検査 (GOT, GPT, LDH, CK, FFA) 血清過酸化脂質の測定時に採血した血液を 1000 μ l, 15 分間遠心分離を行いその上清を東芝 TBA-60S, auto analyzer にて測定した.

5) 統計学的処理 各データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (S. E.) で表示し, 平均値の有意差は分散分析を行った後, Newman-Keuls test ($n=7$) にて行った.

結 果

1) 血清及び心筋中の過酸化脂質の経時的变化

血清中の過酸化脂質量は, Fig. 1 に示すように Isp 投与 3 時間後から上昇し始め, 投与 6 時間後には最大値である 9.18 ± 2.20 nmol/ml を示した. その後過酸化脂質量は下降に転じ, Isp 投与 24 時間後には 2.06 ± 0.17 nmol/ml とほぼ control 値まで回復した. 一方心筋中の過酸化脂質は, Fig. 2 に示すように Isp 投与 30 分後より上昇し始め, 投与 3 時間後には control 値の 18.57 ± 0.76 nmol から 36.32 ± 3.15 nmol へと有意 ($p < 0.01$) に上昇し, 最大値を示した. その後過酸化脂質はゆっくりと下降し始め投与 72 時間後には control 値まで回復した.

2) 生化学検査 (GOT, GPT, LDH, CK, FFA) の結果

Table I に示すように GOT は Isp 投与 30 分後には上昇し始め, 投与 12 時間後には最大値である 327.89 ± 50.44 U/l まで上昇しその後下降に転じた. GPT は, GOT と同様に Isp 投与 30 分後より上昇し始め, 投与 12 時間後には最大値である 84.44 ± 10.92 U/l を示しその後下降した. LDH, CK も同様に Isp 投与 30 分後より上昇し始め, LDH は投与 6 時間後, CK は投与 12

Fig. 1. Generation of Peroxide Lipid in Serum after Administration of Isp

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 7 rats. Significantly different from control. a) $p < 0.01$.

Fig. 2. Generation of Peroxide Lipid in Myocardial Tissue after Administration of Isp

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 7 rats. Significantly different from control. a) $p < 0.01$.

TABLE I. Blood Chemistry Test (GOT, GPT, LDH, FFA, CK) after Administration of Isp

Time	GOT (U/l)	GPT (U/l)	LDH (U/l)	CK (U/l)	FAA (mEq/l)
Control	65.63± 4.30	31.25± 1.25	169.05±30.61	172.00±13.42	0.44±0.03
30 min	76.14± 4.14	38.29± 1.49	243.86±24.67	199.38±15.14	1.41±0.06 ^{b)}
1 h	84.02± 5.35	37.43± 2.41	220.20±40.24	196.00±37.14	1.33±0.08 ^{b)}
3 h	148.71±14.19	47.15± 4.97	521.86±69.75 ^{a)}	229.17±25.20	1.92±0.08 ^{b)}
6 h	301.06±22.36 ^{b)}	55.29± 5.11	955.57±66.30 ^{b)}	414.14±35.34 ^{b)}	0.71±0.05 ^{b)}
12 h	327.89±50.44 ^{b)}	84.44±10.92 ^{b)}	940.90±86.76 ^{b)}	421.14±81.31 ^{b)}	0.58±0.04 ^{a)}
24 h	241.86±35.40 ^{b)}	73.43±14.49 ^{b)}	365.05±47.87	217.13±39.26	0.36±0.03
72 h	88.13± 5.35	59.63± 4.73	136.25±11.51	232.01±17.09	0.38±0.02
1 week	84.38± 7.27	34.75± 2.09	165.14±14.02	192.75±58.23	0.31±0.01

Each value represents the mean±S.E. of 7 rats. Significantly different from control. a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$.

時間後にそれぞれ最大値である 955.57 ± 66.30 U/l, 421.14 ± 81.31 U/l を示しその後下降に転じ、回復基調となった。一方、FFA は Isp 投与 30 分後には control 値の 0.44 ± 0.03 mEq/l から 1.41 ± 0.06 mEq/l へと有意 ($p < 0.01$) に上昇し、投与 3 時間後には最大値である 1.92 ± 0.08 mEq/l を示した。その後 FFA は下降を示し、Isp 投与 24 時間後には control 値まで回復した。

考 察

虚血による細胞障害の生化学的過程は虚血中の無酸素下に進行する過程、即ち病巣部位が虚血そのものにより壊死に至る過程と、虚血後の血流再開により不可逆的に生じる活性酸素によって受ける障害過程の 2 つに大別される。我々は Isp を用いて虚血心筋の検討を行ってきたが、この Isp は β -受容体刺激を有しラットに大量投与することによりヒトの心筋梗塞と類似の病変を生じること、すでに多数報告されている。¹¹⁻¹⁷⁾ この Isp による心筋障害の原因としては、従来末梢血管拡張による全身血圧の下降に伴う冠血流量の減少と心拍出量の増加及び心筋収縮力の増強などの心臓興奮による相対的な酸素不足によるものと考えられている。ここで重要なことはこの Isp 投与による心筋障害は、冠状動脈の完全結紮モデルに比べ少ないながらも血流が存在すること、すなわち Isp 投与による心筋障害には必然的に再灌流を伴い活性酸素による障害が生じている可能性が考えられることである。今回我々は、Isp 投与後の過酸化脂質の生成を経時的に検討したところ、血清値では投与 3 時間後から、また心筋組織では投与 30 分後より上昇し始め血清値では投与 6 時間後に、心筋組織では投与 3 時間後に最大値を示した。この結果は、Isp 投与 3 時間から 6 時間後には障害が最大となり同時に膜障害が進行していること、そして Isp 投与心筋障害にも活性酸素障害が関与していることが示唆された。このことは前報で報告した結果とも良く一致する。すなわち、前報では Isp 投与による心筋の不可逆的障害は投与 30 分後には始まっていることが伺えたが、今回行った TBA 法による MDA 値を指標とした過酸化脂質の測定でより明確になったものと思われる。組織中の MDA 値は Isp 投与後 3 時間から 6 時間で最高値を示しているが、それに連れて血中の MDA 値も 6 時間から 12 時間後に最高値を示した。このことは虚血心筋あるいは心筋梗塞における MDA 値についての過去の報告と比較しても、その時間的 factor は異なるものの、障害時における血清 MDA 値は上昇を示したという点で一致する。すなわち、過去の報告のヒトにおける心筋梗塞、あるいはラットを用いての虚血実験における血清 MDA 値の測定は以下にも示すようにその測定時間はいずれも梗塞の診断確定後、あるいは虚血開始 24 時間以降に行ったものでありどの時点で過酸化脂質が上昇するのかわかではなく、今回我々はこの点に注目して実験開始直後からの過酸化脂質の変化を組織と血液中の両者から同時に検討したものである。この内、人体に関する報告で

Loeper 等は、心筋梗塞を伴った患者からの血清 MDA 値を測定し、血管特に動脈が無酸素症や虚血、あるいはまた再灌流を伴う時は脂質過酸化が増加することから、血清 MDA レベルでは、血漿中の脂質濃度と動脈の障害に相関性があると報告している。¹⁸⁾ また Rao らは左冠状動脈結紮法により心筋虚血ラットを作製し、2 日後の虚血部の心筋組織中の MDA 値を測定したところ有意に増加を示したとしている。¹⁹⁾ しかしいずれも脂質過酸化がどのようなメカニズムによって始まるのかは、明らかではないとしている。そこで Rao 等は虚血心筋部での free radicals 産生に関する間接的証拠として、1) 膜リン脂質からの不飽和脂肪酸の損失、2) MDA 値による測定での脂質過酸化の増加、3) glutathione peroxidase の枯渇、4) アスコルビン酸の消費をあげている。これについて Spector は、フリー・ラジカルが生成されることにより中枢神経系の ascorbate が消失したことを報告している。²⁰⁾ 今回、我々が行った実験においても同様に、Isp 障害心筋及び血清中で MDA 値による脂質過酸化の増加を認めた。そして同時期に血中への GOT, GPT, LDH 及び CK の明らかな逸脱も認められた。以上の結果は、Isp 投与による低酸素細胞障害においても脂質過酸化が促進され、それが障害の原因の 1 つになっている可能性が示唆された。すなわち、血液供給再開に伴う酸素の供給により生体膜の脂質過酸化が促進され、その結果生じた過酸化脂質によって一部では生体膜の障害が生じているものと考えられる。さらに血清 FFA 値が Isp 投与 30 分後にはすでに有意 ($p < 0.01$) に上昇し、投与 3 時間後に最大値を示したことは、前報で報告したように Isp 投与による心筋での脂肪変性の組織学的観察の結果、Isp 投与 1 時間後にはすでに脂肪変性が心内膜側の一部で認められ、さらに投与 3 時間から 6 時間後にはこの脂肪変性筋が多数出現しておりこの結果は、血中 FFA の増加にもよるが Isp の持つ β -受容体刺激作用による他臓器からの遊離脂肪酸の増員と ATP 減少による acetyl CoA を介した triglyceride の蓄積に伴う血清遊離脂肪酸の増加が原因と考えられる。したがって、血中の FFA は Isp 投与後早期に増加したと思われる。以上今回の実験より、Isp 投与心筋障害は Isp 投与 30 分後にはすでに生じていることが今回の実験における生化学検査の結果からも示唆された。しかしながら、脂質過酸化から細胞障害に至る過程及び修復の機構については不明な点が多く今後さらに検討したいと考えている。

引用文献

- 1) P. J. Simpson, B. R. Lucchesi, *J. Lab. Clin. Med.*, **110**, 13 (1987).
- 2) 岡部栄逸朗, 藤巻力也, 高橋俊介, *Pham. Med.*, **8**, 37 (1990).
- 3) D. K. Das, A. George, P. S. Rao, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1004 (1989).
- 4) 内藤周幸, 織田敏次, 最新医学, **33**, 735 (1978).
- 5) 松尾光芳, 変異原と毒性, **5**, 212 (1982).
- 6) 新井洋由, 蛋白質・核酸・酵素, **36**, 453 (1991).
- 7) 並川清博, 岡崎雄交, 西田升三, 戸村隆訓, 橋本重夫, 薬誌, **111**, 247 (1991).
- 8) K. Yagi, *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
- 9) M. Uchiyama, M. Mihara, *Anal. Biochem.*, **86**, 271 (1978).
- 10) O. H. Lowry, N. F. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randal, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 11) G. Rona, Cl. Chappel, T. Balasa, R. Gaudry, *Arch. Pathol.*, **67**, 443 (1959).
- 12) B. C. Wexler, G. W. Kettinger, *Circ. REs.*, **13**, 159 (1963).
- 13) H. C. Stanton, G. Brenner, E. D. Mayfield, *Am. Heart J.*, **77**, 72 (1969).
- 14) E. D. Kahn, G. Rona, Cl. Chappel, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **156**, 285 (1969).
- 15) J. T. Judd, B. C. Wexler, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 1302 (1969).

- 16) B. C. Wexler, *Am. Heart J.*, **79**, 69 (1970).
- 17) M. Ahmad, B. M. Mathew, S. A. Salahuddin-Jameel, T. D. Seth, M. Z. Hassen, S. A. Kummar, *Immunol. Ther. Exp.*, **27**, 383 (1979).
- 18) J. Loeper, J. Goy, L. Rozenstain, O. Bedu, P. Moisson, *Clin. Chem. Acta*, **196**, 119 (1991).
- 19) P. S. Rao, H. S. Mueller, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **161**, 347 (1983).
- 20) R. Spector, *New Eng. J. Med.*, **296**, 1393 (1977).