

文部省科学研究費補助金

一般研究B

Myocardial hibernation の病態および成因に関する実験的研究

(01480246)

研究成果報告書

滋賀医科大学 内科学第一講座

木之下 正彦



平成4年3月

平成3年度科学研究費補助金（一般研究B） 研究成果報告書

1. 課題番号 01480246
2. 研究課題 Myocardial hibernationの病態および成因に関する実験的研究
3. 研究代表者（所属機関、部局、職）
木之下 正彦（滋賀医科大学、医学部、教授）
4. 研究分担者（所属機関、部局、職）
三ッ浪 健一（滋賀医科大学、医学部、助教授）
福原 武久（滋賀医科大学、医学部、講師）
高橋 正行（滋賀医科大学、医学部、助手）
髙本 尚慶（滋賀医科大学、医学部、助手）

5. 研究経費

平成元年度	5,700千円
平成2年度	700千円
平成3年度	500千円
計	6,900千円

6. 研究発表

Kenichi Mitsunami : The mechanism of pacing-induced left ventricular dysfunction. The XIV World Congress of the International Society for Heart Research. May 14, 1992.

(発表予定)

滋賀医科大学附属図書館



1990026935

序 論

虚血が心筋にもたらす結果は単純ではなく、これまで考えられてきた狭心症と心筋梗塞のほかに、一過性虚血の後に心筋壊死なしにおこる遷延性の心機能障害である myocardial stunning と、慢性の心筋灌流低下により生存してはいるが長期間にわたり心機能が障害される myocardial hibernation があることがわかってきた。

Myocardial stunning は数分から数時間のはっきりした発作の緩解後に数時間から数日にわたっておこる心機能障害であり、myocardial hibernation は数週から数年にわたり虚血が存在する限り持続する心機能障害である。Myocardial stunning については多くの研究がなされてきたが、myocardial hibernation については実験モデル作成の困難性などからその実験的研究は見当らず、その病態および成因については不明の点が多い。

本研究では犬の rapid ventricular pacing により hibernating myocardium 類似状態を作成し、(1) ^{31}P 核磁気共鳴 (NMR) spectroscopy と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による高エネルギーリン酸の測定、(2) Conductance catheter 法による心機能の評価を行うことにより、hibernating myocardium の病態を解析し、その成因を究明しようとした。これにより myocardial hibernation が高エネルギーリン酸の減少によりおこるものなのかどうか、そしてその回復過程が如何なるものであるのかが明らかとなる。

実験方法

1) Hibernating myocardium の作成：雑種成犬をペントバルビタール麻酔下に開胸し、ペースング・リードを右室心尖部心筋に、またNMR用表面コイルを左室側壁部心膜に、それぞれ装着して閉胸した。約2週間回復を待った後、体外式ペースメーカーで頻拍ペースングを250/分で開始し、必要に応じて270/分まで増加させて、2～5週間で心不全状態を作成した。

2) 心機能の評価：心不全状態時およびペースング中止後に、大腿動脈よりマイクロチップ圧力トランスデューサを挿入し、心内圧とその一次微分値、および拡張期

時定数 T を測定した。さらに、コンダクタンス・カテーテルを左室に挿入してオランダ・レイコム社製心室容積測定装置（シグマ 5）で左室圧容積関係から Emax を測定した。ペーシング中止後は、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、1 日、2 日、および 7 日に測定した。

3) ^{31}P NMR spectroscopy: 植え込んだ NMR 用表面コイルは直径 3 ~ 5 cm の円形のもので、その中央にガラス細管に入れた標準物質 hexamethylphosphoric triamide (HMPT) を封入したものである。この表面コイルを用いて、General Electric 社製 NMR 装置 CSI 2T/31 により、中心周波数 34.6346MHz、スペクトル幅 4000Hz、心電図非同期、パルス遅延時間 1 秒で 1536 回加算にて、 ^{31}P NMR スペクトロスコピーを行った。表面コイルに埋め込んだ HMPT に対して 90° パルスとなるようにパルス幅を設定した。得られた FID は、ベースライン補正、zerofill、10Hz の exponential line-broadening を加えた後にフーリエ変換し位相補正を行った後、Lorentzian function による line fitting を行い、各ピークの面積を算出した。測定はペーシング前と、ペーシング中止後 1 時間、2 時間、3 時間、5 時間、および 7 日（犬により異なる）に行い、スペクトルのピークの絶対値と標準物質 HMPT に対する面積比の両方で変化を検討した。各ピークの化学シフト値についても検討した。

4) HPLC: NMR 測定の直後に摘出した心筋は液体窒素で凍結し、0.6N 過塩素酸で除蛋白後、その上清をメチルオレンジを指示薬として、 K_2CO_3 で中和して、アニオン交換クロマトグラフィー用カラム Shim-pack WAX-1、移動相に 50mM および 750mM KH_2PO_4 を用いた HPLC（文献 1）の変法）で ATP・ADP・AMP・クレアチンリン酸 (PCr) を定量した。

5) 統計: Student の t test (paired あるいは unpaired) を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。結果はすべて平均 ± 標準偏差で示した。

結 果

1) 心機能の評価

1-a) Rapid ventricular pacing 後の心機能回復過程

Rapid ventricular pacing 後に心機能のみを連続的に評価した16頭についてみると、左室 peak dp/dt はペースング終了 60分後に有意に改善し ($1683 \pm 599 \rightarrow 1920 \pm 544$ mmHg/sec, $n=11$, $p<0.02$)、左室収縮期圧も 120分後に有意に上昇して ($107 \pm 16 \rightarrow 122 \pm 15$ mmHg, $n=10$, $p<0.005$)、ペースング中止後早期に収縮能が回復することが示唆された。ただし心室容積測定装置シグマ5システムを用いたコンダクタンス・カテーテル法による心機能の測定では、E_{max}の有意な改善が見られなかったが、これについては $n=1\sim6$ と、例数が少ないことによる可能性がある。一方、左室拡張終期圧はペースング中止後7日して初めて有意な改善を認めたが ($21 \pm 9 \rightarrow 13 \pm 10$ mmHg, $n=3$, $p<0.005$)、左室 peak negative dp/dt ($n=1\sim8$) や左室等容弛緩期圧曲線の時定数 T ($n=1\sim8$) の改善を認めず、左室拡張能の回復には比較的時間がかかることが示唆された。以上より hibernating myocardium の回復過程では、まず収縮能が改善し、続いて拡張能が改善する可能性があることが示唆された。

1-b) 対照群 (Sham operation群) との対比

NMRコイルやペースング・リードは植え込んだがペースングを行わずに6~112日 (66.3 ± 51.0 日) 経過を見た対照群6頭 (体重 12.2 ± 3.4 kg) のうち2頭の圧データと、ペースングを5~35日 (21.5 ± 9.4 日) 行いペースング中止後15分~7日 (5時間、7日が各1頭、他はすべて3時間以内) 経過をみた Hibernation 群 (以下H群) 10頭 (体重 10.7 ± 2.6 kg) のうち6頭のペースング終了直後の圧データを比較すると、左室拡張期末圧 (対照群 5.0 ± 1.4 , H群 31.0 ± 8.1 mmHg, $p<0.005$) と左室 peak negative dp/dt (対照群 2384 ± 37 , H群 876 ± 229 mmHg/sec, $p<0.005$) に有意差を認めた。

2) NMRスペクトロスコピーによるリン酸化合物代謝の評価

Phosphomonoester (PME)、inorganic phosphate (Pi)、phosphodiester (PDE)、phosphocreatine (PCr)、ATPの3つのリン酸基 (α -ATP, β -ATP, γ -ATP) および標準物質HMPTのピークについて、1-b) で述べた対照群のうち3頭とH群のうち9頭で検討した。

対照群では、図1および図2に示すように、手術直後に比べると全般にピークの

減少することはあるが、手術1週間以後は比較的安定した ^{31}P スペクトルが得られた。

H群でペーシング前とペーシング終了直後の比較をすると、図3や図4に示すようにペーシング後に PCr や β -ATP が減少傾向を示すものが多く、 β -ATP、 β -ATP/HMPT および PCr は6例中5例で減少・1例で増加、PCr/HMPT は全6例で減少していた。しかし、データにばらつきが大きく、全体としてみると、表1に示すように有意差が無かった。ペーシング終了直後とペーシング終了後1時間の間で比較してみると、 β -ATPは5例中4例で増加・1例で減少、 β -ATP/HMPT は4例中3例で増加・1例で不変、PCr は5例中4例で減少・1例で増加、PCr/HMPT は4例中3例で減少・1例で増加したが、変化がわずかであるのとばらつきがあるため、表2に示すようにこれらにも有意差を認めなかった。しかし、これらのデータ、特に表1のデータは、今後例数を増加すれば十分有意差が得るものと考えられた。Pi の化学シフトについて検討したが、ペーシング前とペーシング終了直後の比較では、それぞれ 5.15 ± 0.25 ppm, 4.74 ± 0.91 (n=5, p=0.333)、またペーシング終了直後とペーシング終了後1時間の間の比較ではそれぞれ 4.74 ± 0.90 ppm, 4.75 ± 0.69 (n=5, p=0.962) でいずれも有意差を認めなかった。

3) HPLCによる高エネルギーリン酸化合物の測定

前項で示したように、ペーシング中止後に PCr や β -ATP は NMR でみて有意に回復しなかったため、ペーシング終了後心筋を摘出するまでの時間（1時間4例、3時間2例、7日1例）で区別しないで、ペーシング後のATP、PCr、ADP、AMPを対照群と比較したところ、いずれにも有意差を認めなかった（表3）。しかし例数が少なく、結果は決定的とは言えない。

総括と今後の展望

Hibernating myocardium という用語は Braunwald らの論説²⁾ が発表されてから広く用いられるようになったが、その後現在までのところ、この病態についての詳細

な報告はまだない。それは主に適切な実験モデルが無いためと考えられ、我々は rapid ventricular pacing model がその病態の解明に役立つのではないかとの仮説のもとに、本研究を行った。

Rapid ventricular pacing による心機能障害については、Coleman らは 13~29日間 280/分で心室ペースングした心筋の総クレアチン・クレアチンリン酸 (PCr) ・ATP 貯蔵の減少を認めこれが心筋のエネルギー需要増加によるエネルギー需要供給バランスの破綻によるものとした³⁾。Armstrong らはこの他に血圧の低下や左室拡張期末圧の上昇・左室拡張充満期の短縮による冠灌流の減少も関与しているとしている⁴⁾。いずれにせよ慢性虚血のモデルと考えてよい知見である。

我々の結果は、統計的解析結果のみをみると、rapid ventricular pacing による心機能障害が明かな虚血によるものであるとはいえないことになるが、その結論はまだ早計と思われる。それは、本研究に用いた慢性犬モデルの実験成功率は極めて低率であったため例数が少ないこと、NMR信号がさまざまな因子によって変化し得ること、そして、全体としてはばらついているが個別の例では rapid ventricular pacing による心機能障害と ATP や PCr の減少が対応して見えるものも多かったからである。おそらく例数を増加させれば、有意差がでるものもかなりあると思われる。ただし、ペースング中止後1時間間に左室 peak dp/dt は有意に改善したが、その間の ATP や PCr の変化はあってもわずかなようであるので、rapid ventricular pacing による心機能障害の機序として、虚血だけではなく、excitation-contraction uncoupling の原因としての筋小胞体の機能障害による細胞内カルシウム動態の異常や、筋原線維のカルシウムに対する反応性低下の有無なども今後検討されるべきであろう。今後のデータの蓄積が大いに期待される場所である。

References

- 1) Endo I, et al : Method for Simultaneous Determination of Creatine Phosphate and Adenine Nucleotides in Intestinal Smooth Muscle of Guinea-pig Taenia Caeci using High-performance Liquid Chromatography. *Jpn J Smooth Muscle Res* 24: 127–130, 1988
- 2) Braunwald E, et al : Reversible Ischemic Left Ventricular Dysfunction : Evidence for the "Hibernating Myocardium". *J Am Coll Cardiol* 8: 1467–1470, 1986
- 3) Coleman HN, et al : Congestive Heart Failure Following Chronic Tachycardia. *Am Heart J* 81: 790–798, 1971
- 4) Armstrong PW, et al : Rapid Ventricular Pacing in the Dog : Pathophysiologic Studies of Heart Failure. *Circulation* 74: 1075–1084, 1986

表1 ペーシング前とペーシング終了直後のPCrと β -ATP(^{31}P NMR)

	ペーシング前	ペーシング終了直後	n	p
β -ATP*	5861 \pm 2952	3781 \pm 2758	6	0.262
β -ATP/HMPT	1.00 \pm 0.49	0.51 \pm 0.25	6	0.112
PCr*	4022 \pm 2914	1721 \pm 1126	6	0.128
PCr/HMPT	0.71 \pm 0.52	0.23 \pm 0.15	6	0.105

*単位はarbitrary units

表2 ペーシング終了直後とペーシング終了後1時間のPCrと β -ATP(^{31}P NMR)

	ペーシング終了直後	ペーシング終了後1時間	n	p
β -ATP*	5003 \pm 2524	7741 \pm 8361	5	0.365
β -ATP/HMPT	0.66 \pm 0.26	0.92 \pm 0.64	4	0.325
PCr*	4003 \pm 2077	3814 \pm 2574	5	0.550
PCr/HMPT	0.49 \pm 0.19	0.35 \pm 0.17	4	0.285

*単位はarbitrary units

表3 ペーシング前後の高エネルギーリン酸化合物(HPLCによる測定)

	ペーシング後(n)	対照群(n)	p
ATP	4.68 \pm 1.76(7)	6.33 \pm 1.70(4)	0.174
PCr	8.28 \pm 4.12(4)	12.76 \pm 6.51(2)	0.499
ADP	1.53 \pm 0.75(7)	1.38 \pm 0.34(4)	0.648
AMP	0.35 \pm 0.31(7)	0.19 \pm 0.13(4)	0.260

単位： μ moles/g wet tissue

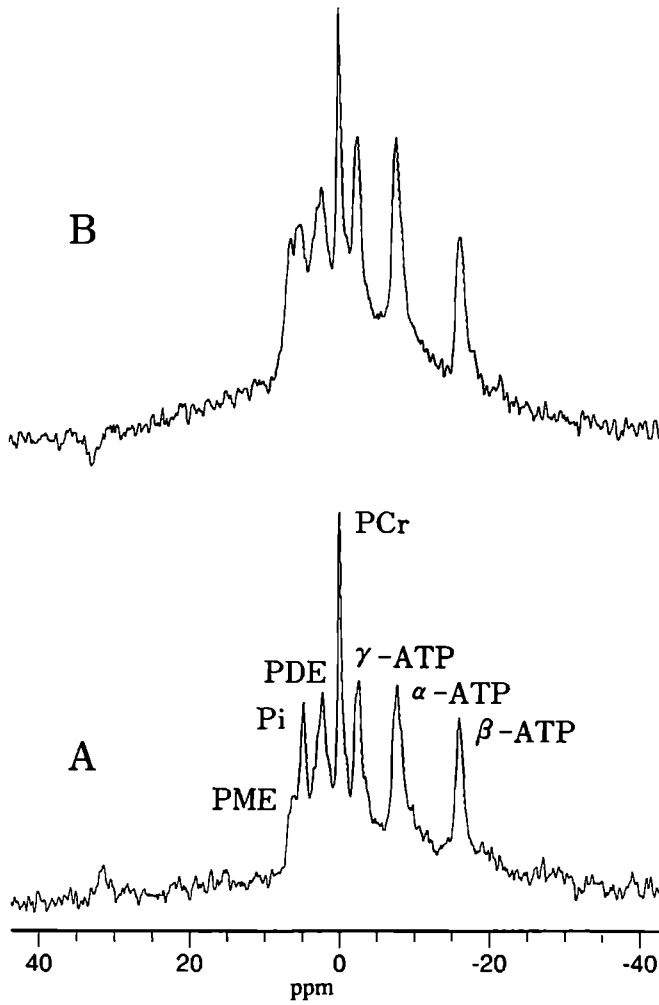


図1 対照群の ^{31}P NMRスペクトル

A : 手術1週間後

B : 手術7週間後

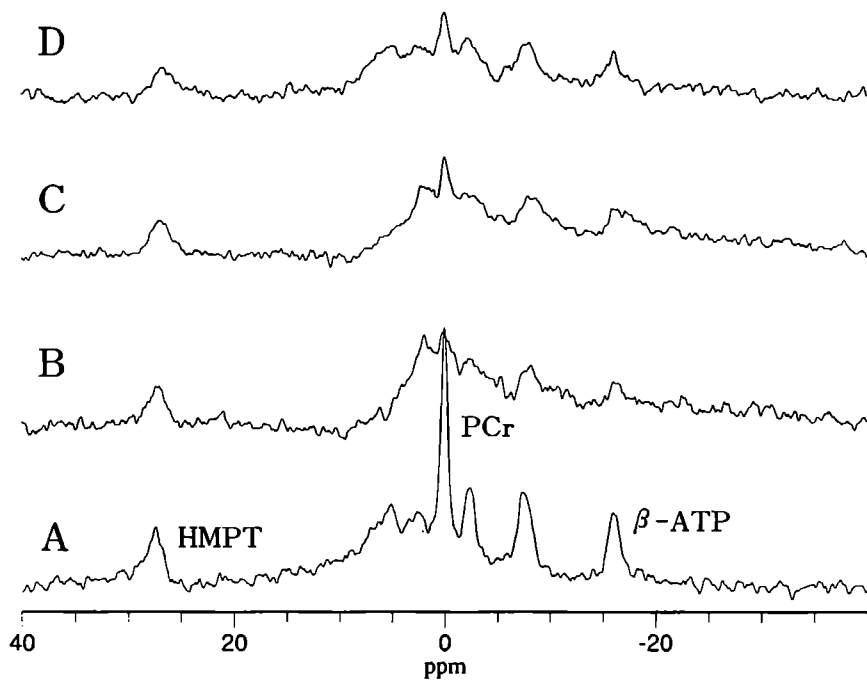


図2 対照群の ^{31}P NMRスペクトル

A：手術直後 B：手術3週間後

C：手術4週間後 D：手術15週間後

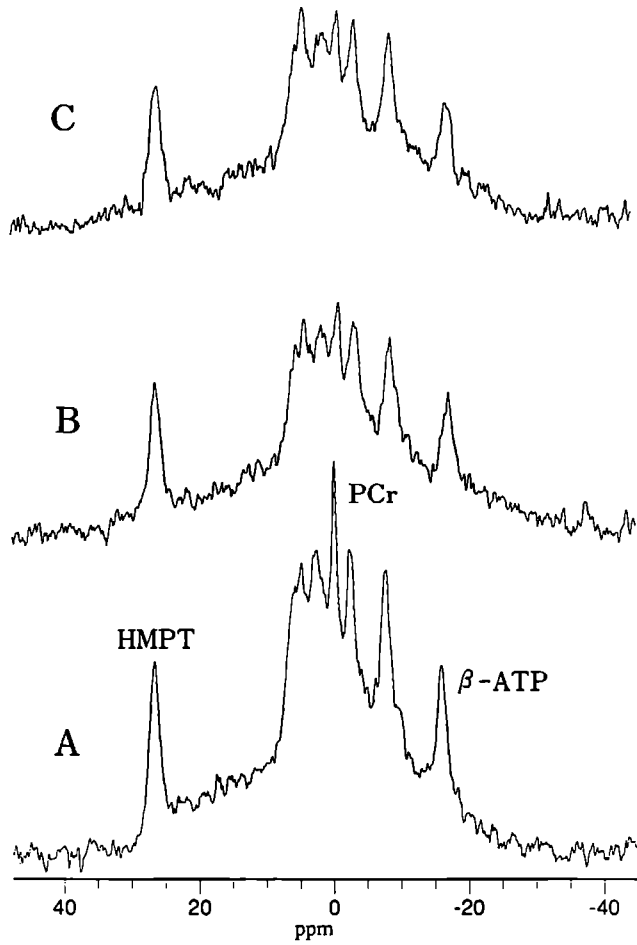


図3 ペーシング犬の心³¹P NMRスペクトル
 A：ペーシング前(手術後3週) B：ペーシング(250回/分)を
 5週間行った直後 C：ペーシング中止1時間後

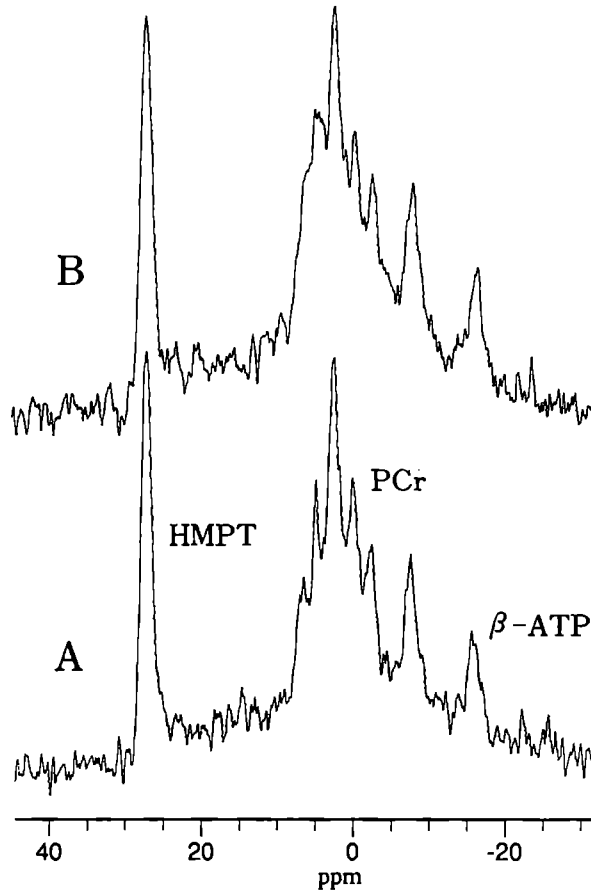


図 4 ペーシング犬の心³¹P NMRスペクトル
 A : ペーシング前(手術後3週)
 B : ペーシング(250回/分)を3週間行った直後