

## 論文内容の要旨

論文題目 虚血心筋の時間依存的変化とカルシウムチャンネル  
ブロッカーの保護作用との関連

氏 名 佐 藤 隆 一

Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーは、虚血や再灌流による障害から心筋を保護することが報告されているが、Ca<sup>2+</sup>チャンネルの抑制作用あるいはその結果である心機能抑制作用と、心筋保護効果が直接的に連関するかについては明確ではない。それを明らかにするには、心機能抑制を等しく示す濃度を注意深く設定しながら、種々のCa<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーやその類似体の作用を比較することが重要である。

心筋虚血時には細胞外にK<sup>+</sup>とH<sup>+</sup>が蓄積し、組織内のATP含量が低下することが知られている。また、虚血時の細胞外K<sup>+</sup>濃度の上昇は、初期相(0-8分)、プラトー相(8-15分)および後期相(15-30分)の特徴的な3相性を示す。この現象は虚血中に起きる細胞の生理学的経時的変化の推移を反映していると考えられる。実際に、K<sup>+</sup>濃度上昇は初期相ではATP感受性K<sup>+</sup>チャンネルの開口が関与していることが報告されており、後期相では嫌氣的解糖の中断とNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプの不活性化を反映していると考えられている。しかしながら、虚血後の時間経過に伴うこれらの変化との関連で、Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーのイオン動態、代謝指標および心機能についての詳細な研究はなされていない。

本研究ではモルモット摘出灌流心筋を用い、虚血中の細胞外K<sup>+</sup>濃度、細胞外pHを同時に測定する実験系を確立した。その手技を用いて、細胞外イオン濃度、更には再灌流後の機械的および代謝的指標に注目し、代表的な3種のCa<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーであるジルチアゼム、ベラパミル、ニフェジピンを処置したモルモット摘出灌流心臓の虚血後の時間依存的変化と心筋保護作用の関連について検討した。更に、ジルチアゼムとその光学異性体の一つである*l-cis* ジルチアゼムの比較を通じて、Ca<sup>2+</sup>チャンネルブロッカーのL型Ca<sup>2+</sup>チャンネル抑制作用と心筋保護作用の関連を検討した。

## I. モルモットの摘出心臓灌流標本を用いた心機能、細胞外 K<sup>+</sup>および細胞外 H<sup>+</sup>濃度の同時測定方法の開発

虚血心臓では、虚血部位の細胞外イオン濃度変化が複雑な挙動を示し、不整脈等の原因になる事が知られている。pH の低下すなわち H<sup>+</sup>の蓄積は心筋の嫌氣的代謝と密接な関連があり、K<sup>+</sup>の蓄積は、ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャネルの開口あるいは Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプの活性低下など代謝因子に影響される。従って、これらの関連について研究するためには、これらを同一の標本で経時的に測定し比較することが重要である。本研究では、この目的を達成するために微小なイオン選択性電極を作成し、摘出心臓灌流標本において細胞外 K<sup>+</sup>、H<sup>+</sup>濃度および心機能を同時かつ経時的に測定する方法を確立した。この標本において、栄養液の灌流を停止することにより虚血を模倣し、薬物の作用を検討した。

## II. 虚血後の細胞外 K<sup>+</sup>濃度、pH、心機能および高エネルギー磷酸化合物含量に対するカルシウムチャネルブロッカーの作用の時間的差異

代表的な Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカーとしてジルチアゼム (0.1, 1, 10 μM)、ベラパミル (0.03, 0.1, 3 μM)、ニフェジピン (0.01, 0.1, 1 μM) を用いた。各薬物の濃度は左室内圧抑制の程度が同程度となるように設定した。薬物は虚血 10 分前から灌流液中に投与し、虚血後 30 分間の K<sup>+</sup>および pH の時間的推移を比較した。

3 種の Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカーは、それぞれ初期相の細胞外 K<sup>+</sup>濃度上昇を濃度依存的に遅延させた。第 2 相の K<sup>+</sup>濃度にはいずれの薬物も影響しなかった。ジルチアゼムおよびベラパミルは後

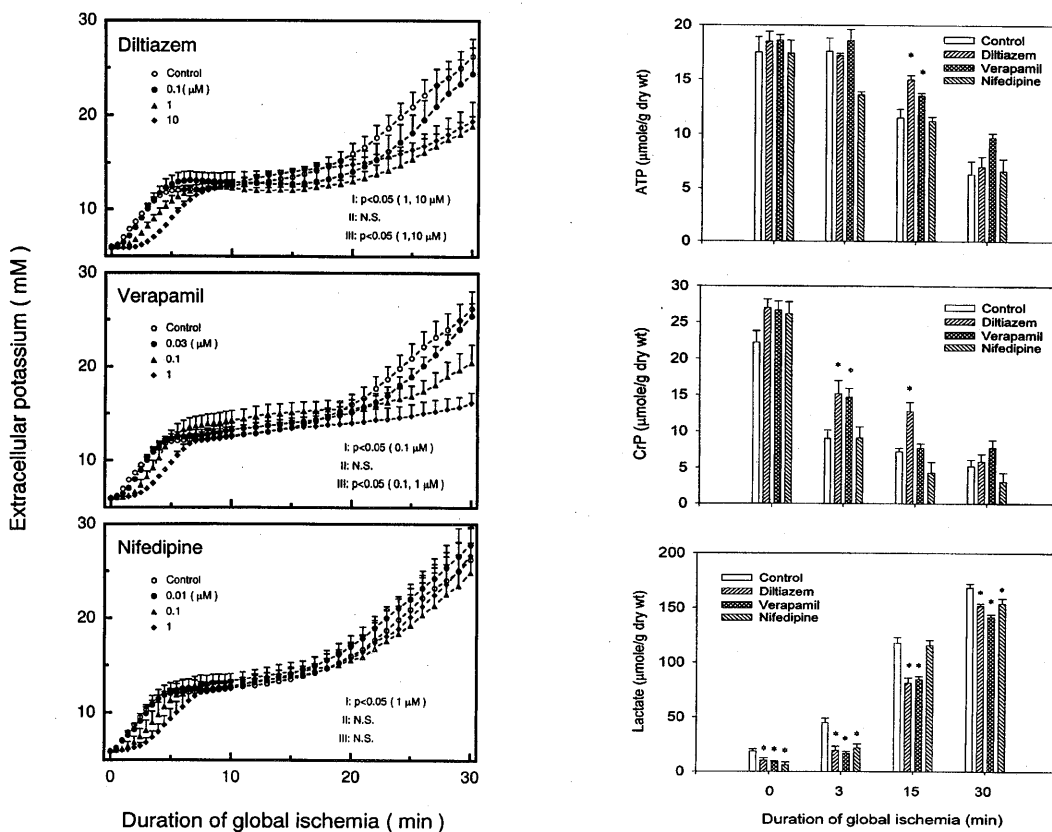


図1 モルモット摘出灌流標本における完全虚血中の細胞外 K<sup>+</sup>濃度上昇に対するジルチアゼム、ベラパミルおよびニフェジピンの作用

図2 ジルチアゼム、ベラパミルおよびニフェジピンの虚血前および虚血後 3、15、30 分後の組織中 ATP、クレアチンリン酸および乳酸含量に対する作用

期相の細胞  $K^+$ 濃度を濃度依存的に抑制したが ニフェジピンは抑制しなかった (図 1)。

pH に対しては、ジルチアゼム (0.1 および  $1 \mu M$ ) は初期相において抑制する傾向を示したが、虚血時間の終わりには対照群とほぼ同じ程度 pH 低下を有意に抑制した。ニフェジピンの pH 変化に対する作用は濃度依存性を欠いていた。ジルチアゼム ( $0.1 \sim 10 \mu M$ ) および ベラパミル ( $0.03 \sim 1 \mu M$ ) は、30 分虚血中の拘縮の程度を抑制したが、ニフェジピン ( $0.01 \sim 1 \mu M$ ) は抑制しなかった。また、30 分再灌流後の左心室終拡張期圧の上昇に対して、ジルチアゼムおよびベラパミルは濃度依存的かつ有意に抑制したが、ニフェジピンは抑制しなかった。

左心室内圧 (LVDP) に対する作用が同等の濃度のジルチアゼム ( $10 \mu M$ )、ベラパミル ( $1 \mu M$ ) および ニフェジピン ( $0.3 \mu M$ ) を用いて、心筋組織中の高エネルギーリン酸化合物である ATP、クレアチンリン酸および 嫌氣的解糖産物である乳酸含量に対する作用を経時的に測定した (図 2)。ジルチアゼムおよびベラパミルは虚血 3 分後から 15 分の心筋組織中の ATP およびクレアチンリン酸含量を保持し、乳酸の上昇を抑制したが、ニフェジピンにはこの作用は見られなかった。

$Na^+-K^+$ ポンプの抑制薬であるウアバインが選択的に後期相の  $K^+$ 濃度を増強することが報告されていることから、解糖による ATP 合成が後期  $K^+$ 上昇の抑制に影響する可能性が考えられる。実際に、本研究では虚血初期の高エネルギーリン酸化合物の保存が期待される低カルシウム処置、あるいは低頻度による刺激は後期  $K^+$ 上昇を顕著に抑制した。以上から、ジルチアゼムとベラパミルは虚血中の ATP およびクレアチンリン酸の保存能を有し、さらに解糖による ATP 合成が可能な期間を延長させることにより、おそらくは  $Na^+-K^+$  ATPase 活性の維持を介して後期  $K^+$ の上昇および虚血性拘縮を抑制すると考えられた。

一方、 $Ca^{2+}$ チャンネルブロッカーの心機能抑制作用 (陰性変力および陰性変時) が後期の  $K^+$ 濃度上昇およびアシドーシスを抑制するかどうかを検証するために、低  $Ca^{2+}$ 灌流液による収縮力低下および低頻度刺激による心拍数低下の作用を見たところ、 $K^+$ 濃度上昇の初期相およびプラトー相は低  $Ca^{2+}$  心拍数低下に影響されなかったが、 $K^+$ 濃度上昇の後期相、pH の低下および虚血性拘縮は有意に抑制された。

また、虚血時の細胞外  $K^+$ 濃度上昇による脱分極状態で、 $Ca^{2+}$ チャンネルブロッカーの作用に差異が生じる可能性を検討するために、 $K^+$ 濃度の異なる灌流液を用いて心収縮力抑制作用を検討した (図 3)。その結果、灌流液の  $K^+$ 濃度を増やすとジルチアゼムとベラパミルの陰性変力作用が増強した。しかし、ニフェジピンは高  $K^+$ 濃度下において活性が増大しなかった。

この結果から、虚血により上昇した細胞外  $K^+$ 濃度によって細胞膜が脱分極し、ジルチアゼムおよびベラパミルの陰性変力作用が増強されたことが、虚血心臓におけるこれらの薬物の強力な保護作用に寄与していることが考えられた。

## II. 虚血および再灌流モルモット心臓におけるジルチアゼム光学異性体の保護作用の差異

II と同様の方法で、ジルチアゼムの光学異性体であり

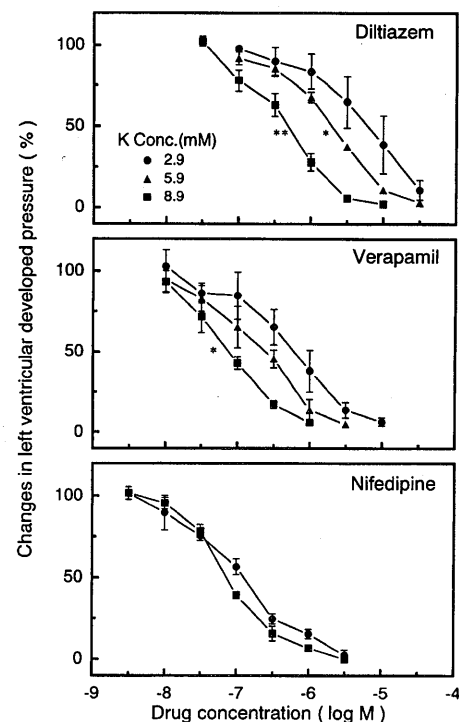


図 3 モルモット灌流心臓における、ジルチアゼム、ベラパミル、ニフェジピンの陰性変力作用への栄養液  $K^+$ 濃度の作用

L型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの抑制作用が遙かに弱い *l-cis* ジルチアゼムの細胞外  $\text{K}^+$ 濃度、アシドーシスおよび虚血後心機能回復に対する作用を検討した。 *l-cis* ジルチアゼムは  $\text{K}^+$ 濃度の上昇および pH 低下を僅かに抑制したにすぎなかったが、虚血性拘縮は有意に抑制した。 *d-cis* 体（ジルチアゼム）は低用量でも  $\text{K}^+$ 濃度の上昇および pH 低下を顕著に抑制した。

左心室内圧、心拍数の両パラメータに同程度の抑制を示す濃度で比較すると、 *l-cis* 体は *d-cis* 体より再灌流後の左室拡張終期圧（LVEDP）および心拍数を大きく回復させた（図4）。これらの結果は、 *l-cis* 体は *d-cis* 体に比べて弱い  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断作用、即ち弱い細胞外  $\text{K}^+$ 濃度および pH に対する作用を有するが、それ以外の虚血後の機能を改善させる作用を有することを示す。

#### IV. まとめ

1. モルモット摘出心臓灌流標本と組み合わせることが可能な、フレキシブルなイオン選択性電極を作成した。これにより、虚血中の細胞外  $\text{K}^+$ 、pH の変化が同時かつ経時的に測定可能となった。
2. 3 種類の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーを用いた比較の結果、虚血初期の細胞外  $\text{K}^+$ 濃度上昇による脱分極状態における作用の違いが、虚血中の高エネルギー磷酸化合物含量の保存程度の差異を生じ、これが虚血後期相における細胞外  $\text{K}^+$ 濃度、pH、虚血性拘縮および再灌流後の保護作用の著しい相違に繋がり得ることを病態生理学的に示すことができた。
3. ジルチアゼムの光学異性体の一つである *l-cis* ジルチアゼムは、細胞外  $\text{K}^+$ 濃度上昇による心機能抑制作用の増強が少ないうえに、再灌流後の心機能の改善に著効を示したことから、 *l-cis* ジルチアゼムの心筋保護作用には L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル抑制による心機能抑制作用だけでは説明できない因子が関与していることが示唆された。

以上、本研究では、摘出心臓灌流標本を用い、細胞外  $\text{K}^+$ 濃度、pH および心機能を同時かつ経時的に測定する試験系を確立し、虚血中のこれらのパラメータに対する典型的な 3 種の  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーの作用および光学異性体間の作用を比較した。その結果として、心筋虚血時における細胞外  $\text{K}^+$ 濃度上昇による脱分極状態での作用の違いが、  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルブロッカーの虚血心筋保護の差異において重要である事を明らかとし、本薬剤群の心筋保護機序の解明に貢献した。更に、ジルチアゼムの光学異性体を用いた研究から、 *l-cis* ジルチアゼムの保護作用が L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断に伴う心筋収縮力抑制以外による可能性を示し、同剤の心筋保護作用の機序解明に寄与した。また、本研究で使用したイオン選択性電極を用いた簡便かつ安定した試験法は、心筋保護を標的とした今後の薬剤の薬効評価法の一つとして有用と考える。

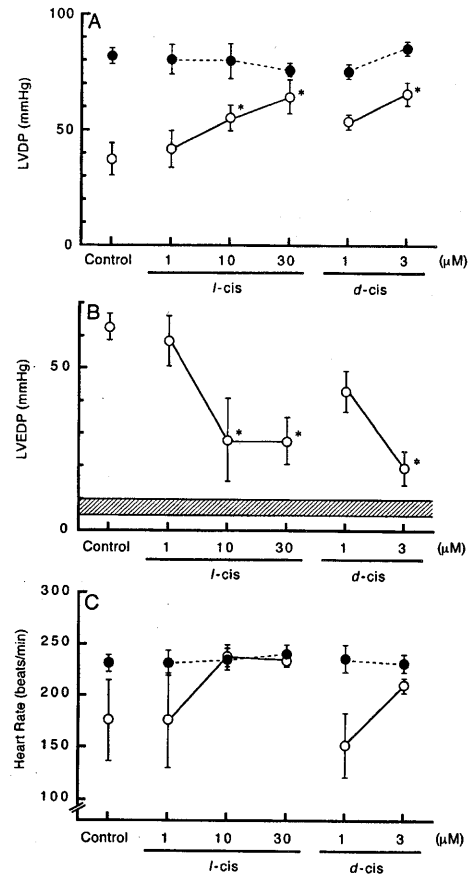


図4 虚血後の左心室圧（LVDP）、左心室拡張終期圧（LVEDP）および心拍数の回復に対するジルチアゼムの *l-cis* 体と *d-cis* 体の作用 ●はそれぞれの虚血前値を示す。