

## Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換系抑制剤 HOE642 の心筋保護効果

— ラット摘出心を用いた交差灌流式 Langendorff 回路による研究 —

塚本 勝 安倍 十三夫 中島 慎治 光島 隆二

札幌医科大学医学部第2外科 (主任 安倍十三夫 教授)

Effect of Myocardial Protection by a new Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Inhibitor, HOE642

— A Study with Cross-flow Langendorff Circulation Model using Isolated Rat Hearts —

Masaru TSUKAMOTO, Tomio ABE, Shinji NAKASHIMA and Ryuji KOSHIMA

*Second Department of Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine*

(Chief : Prof. T. ABE)

**ABSTRACT** 【OBJECTIVE】 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) on myocardial cell membrane plays an important role in the ionic changes observed during myocardial ischemia and reperfusion. HOE642 is a new NHE inhibitor which has been reported its cardioprotective activity. In this study, we investigated the cardioprotective effect of HOE642 with cross-flow Langendorff circulation model using isolated rat hearts.

【MATERIALS and METHODS】 Isolated rat hearts were perfused with whole blood using cross-flow Langendorff circuit for 20 minutes and were induced to cardioplegic arrest with St Thomas solution (STS) (C group), STS plus HOE642 0.03 mg/kg (H1 group), and STS plus HOE642 0.3 mg/kg (H2 group). Immediately after 30 minutes ischemia at 37°C, the hearts were reperfused again. Left ventricle (LV) performances and Troponin-T (Tn-T) in coronary venous blood were measured at pre-ischemic stage, 30 and 60 minutes after the reperfusion. Then, the hearts were divided into two pieces, and frozen in liquid Nitrogen for further measurements of myocardial high-energy phosphates and the other was evaluated as water content.

【RESULTS】 H2 group indicated significant superior preservation as compared with control group in respect to better recovery of LV performances at 60 min (%LVP<sub>10</sub>; C=46.9% vs H2=71.2% (p<0.02), %dp/dt<sub>10</sub>; C=47.8% vs H2=75.9% (p<0.02)), smaller level of Tn-T (C=104.9±19.8 (mean±SE) ng/ml vs H1=61.9±7.6 (p<0.03), vs H2=51.3±4.9 (p<0.007)), better preservation of myocardial high-energy phosphates of ATP at 60 min (C=0.57±0.14 vs H1=1.21±0.08 (p<0.006), vs H2=1.40±0.19 (p<0.001)), and lower water content in myocardial tissue (C=3.82±0.09 ml/g dry-weight vs H1=3.48±0.05 (p<0.001), vs H2=3.39±0.04 (p<0.0001)).

【CONCLUSIONS】 From these experimental results as shown by H2 group, we proved that HOE642 (0.3 mg/kg) as a additive to cardioplegia resulted in significant myocardial protective effects by preserving high energy phosphates (ATP, ATP/ADP and energy charge), reducing myocardial water content and obtained significantly improved myocardial enzyme level and cardiac functions on ischemic-reperfusion injury under cross-flow Langendorff circuit using isolated rat hearts.

(Received February 25, 1999 and accept October 4, 1999)

**Key words:** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor, HOE642, Myocardial protection, Ischemic-reperfusion injury, Langendorff circulation

## 1 緒 言

近年、心筋保護法の発達により、開心術が安全に行われるようになった。しかし、長時間手術症例や、重症心機能低下例、肥大拡張心筋例における虚血再灌流障害は未だ克服されたとはいえず、その防止策を求めて今なお多くの研究がなされている。その中で最近、細胞膜のイオン輸送系の一つである  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系 (NHE) と心筋における虚血再灌流障害の発生機序との関連が注目されている。

NHE は細胞内外の  $\text{Na}^+$  勾配を原動力に、細胞内 pH と細胞内外の pH 勾配により活性化され、細胞外の  $\text{Na}^+$  を細胞内へ流入させると同時に  $\text{H}^+$  を細胞外へ排出する<sup>1)</sup>。虚血再灌流時の細胞内への  $\text{Na}^+$  蓄積は、次いで  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系を介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  overload を招き、細胞障害が発現するとされている<sup>2,3)</sup>。それ故、心筋の虚血および再灌流時に活性化される NHE を抑制することで、心筋障害の発生を防止しようと考えられ、その抑制剤として知られている amiloride とその誘導物質による心筋保護の研究が数多く報告されている<sup>3-8)</sup>。しかし、amiloride はその NHE 抑制効果が弱く<sup>4)</sup>、また非特異的に他のイオン交換系にも影響することが知られており、副作用も多く報告されている<sup>5,9,10)</sup>。1993年に Sholtz ら<sup>11)</sup> は amiloride 誘導物質以外で初の NHE 抑制剤 HOE694 を、さらに 1995年に

HOE642 を報告した<sup>12)</sup>。これらの薬剤は NHE を特異的に抑制するため、副作用が少なく、その臨床応用が期待されており、すでに、心筋の虚血および再灌流障害を抑制することがいくつかの実験的モデルにおいて報告されている<sup>13-16)</sup>。しかし、従来の摘出心を用いた研究では、灌流液として Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB) 液などの晶質液が用いられており<sup>12,14,16,17)</sup>、虚血再灌流障害では大きな役割を果たしている<sup>18,19)</sup>白血球を含んだ血液灌流モデルでの検討は見あたらない。今回、我々は、より臨床症例に近いモデルとして、交差灌流方式によるラット摘出心 Langendorff 灌流モデルを用いて通常の血液を灌流させ、HOE642 を心筋保護液に添加した際の心筋保護効果について検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 実験動物

実験動物としては、週齢 12~16 週で、体重が 300~400 g のウイスター系 (Wister-King AH) 雄性ラットを用いた。実験動物はすべて『動物実験に関する指針』(日本動物実験学会)に基づき、適正な麻酔のもとに扱った。

### 2.2 Langendorff ラット摘出心灌流モデルの作製

教室の森下<sup>20)</sup>、井上<sup>21)</sup>が報告している、サポートラットを用いた交差血液灌流による Langendorff 灌流モデルを使用した (Fig. 1)。この回路により、冠動脈圧は

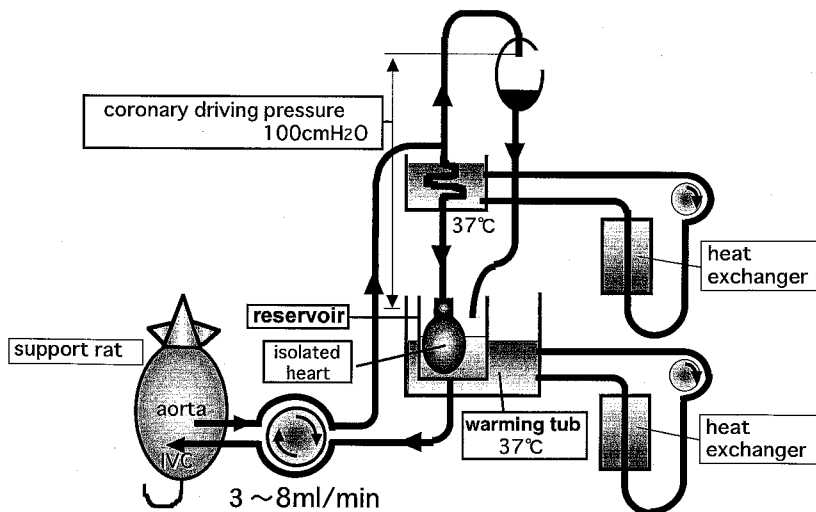


Fig. 1 Schematic drawing of Cross-flow Langendorff circuit.

Using a supporting rat, the isolated heart is perfused with whole blood (Ht 20-25%), and the driving pressure of coronary flow is kept at 100 cm H<sub>2</sub>O with this circuit. The temperature of the heart and perfusing blood are maintained around 37°C by warming tubs.

100 cmH<sub>2</sub>O に保たれ、また、摘出心は一定温度の水を循環させた保温槽内で、37°C に維持した。さらに、回路の血液も、冠灌流直前に保温槽を通過させ、37°C 前後に保った。回路血は定期的に血液ガス分析を行って、ヘマトクリット値を同種血輸血により 20~25% に、また、pH を重炭酸ナトリウム液注入により 7.4 前後に維持した。

### 2.3 HOE642

HOE642 は Hechst-Marion-Roussel 社から提供を受けた。本薬剤の化学名は 4-Isopropyl-3-methylsulfonylbenzoyl-guanidine methanesulfonate であり、分子式は C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> · CH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S、分子量 379.46 の物質である (Fig. 2)。

### 2.4 実験方法

#### 2.4.1 実験プロトコール (Fig. 3)

ドナーラットをエチルエーテルの吸入と、ネプター

4-Isopropyl-3-methylsulfonylbenzoyl-guanidine  
methanesulfonate  
C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> · CH<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S  
Molecular weight ; 379.46

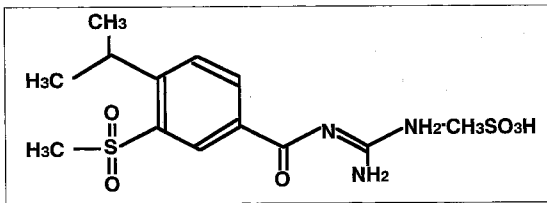


Fig. 2 Chemical and structural formula of HOE642.

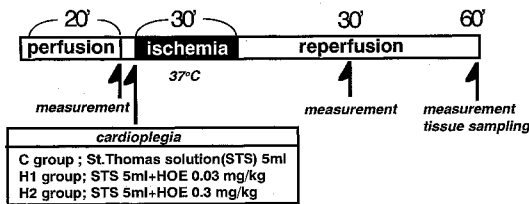


Fig. 3 Protocol of experiment.

Isolated hearts were perfused at least 20 minutes before the first measurement (pre ischemia). Cardioplegic arrest was induced with St. Thomas Solution (STS) and the hearts were kept at 37°C in warmed water-tub for 30 minutes. Subsidiary, they were reperfused and the second and the final measurements were performed at 30 and 60 minutes after the reperfusion. After all the process, the hearts were immediately separated to two pieces and frozen in liquid nitrogen for further measurements.

ル 0.1 mg/kg の陰茎静脈からの静注で麻酔した後、開腹し、腹部大動脈および下大静脈を切断後、直ちに開胸し心臓を摘出した。この摘出心 Langendorff 回路に接続し、まず 20 分間の冠灌流を行う。ここで、虚血前の各測定を行い、ついで摘出心を回路から外し、直ちに常温の St. Thomas 液 (NaCl 110 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 10 mmol/l, KCl 16 mmol/l, MgSO<sub>4</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 16 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 1.2 mmol/l, pH 7.8, Osm, 730 mOsm/l) 5 ml で冠灌流を施行し心停止を得る。摘出心をラップに包み、常温 (37°C) の水槽内で 30 分間放置する (常温虚血 30 分間)。

30 分後、摘出心を Langendorff 回路に再び接続し、再冠灌流を開始。再冠灌流 30 分後および 60 分後に繰り返し各測定を行う。

60 分後の測定終了後、速やかに摘出心を 2 分し、アルミホイルに包んで液体窒素内で凍結させ、後の測定のために超低温冷蔵庫内に保存する。

#### 2.4.2 群別の検討

Control 群 (C 群): 上記のプロトコールに従う (n=8)。

Group I (H 1 群): 心停止を得る際に St. Thomas 液に HOE を、ドナーラットの体重を基準に 0.03 mg/kg を添加 (n=8)。

Group II (H 2 群): 心停止を得る際に St. Thomas 液に HOE を同じく 0.3 mg/kg を添加 (n=8)。

### 2.5 測定項目

#### 2.5.1 冠血流量 (coronary flow ; CF) の測定 (ml/min)

CF は冠静脈還流血流量を 1 分間シリンジに受け、その量を実測した。

#### 2.5.2 心機能の測定

自家製ラテックスバルーンを作成し、これを左心房から左心室に挿入。圧用ラインで血圧測定用トランスデューサー (Model 59-DTS-H, American Edwards 社, 米国) に連結し、得られた信号を増幅器 (CM-800, フクダ電子, 東京) で処理した後、熱パン式記録器 (RF-85A, フクダ電子, 東京) で感熱紙上に記録した。この時、ラテックスバルーンの容量を三方活栓の一方から、微量注射器を用いて 40 μl から 200 μl まで自由に増減し、左心室拡張終期圧 (EDP) を 10 mmHg とした時の LVP (LVP<sub>10</sub>) を記録した。この時、左心室圧変化から左心室圧微分値 (dp/dt<sub>10</sub>) も同時に計測した。

#### 2.5.3 心筋酸素消費量の計測

摘出心の直上の三方活栓から採取した冠灌流血と、シリンジに受けた冠静脈還流血の血液ガス分析を行い、

次の式から心筋酸素消費量 ( $VO_2$ ) を計算した。

$$VO_2 = 0.136 \cdot CF \cdot Hb \cdot (SaO_2 - SvO_2) + 0.0326 \cdot CF \cdot (PaO_2 - PvO_2)$$

ただし,  $SaO_2$  は冠灌流血中酸素飽和度 (%),  $SvO_2$  は冠静脈還流血中酸素飽和度 (%),  $Hb$  は血色素値 (g/dl),  $CF$  は冠血流量 (ml/min),  $PaO_2$  は冠灌流血中酸素分圧 (mmHg),  $PvO_2$  は冠静脈血中酸素分圧 (mmHg) である。

#### 2・5・4 冠静脈血中トロポニン T (Tn-T) の測定

摘出心から直接シリンジに受けた冠静脈還流血液の一部を採血管にとり, 高速遠心分離の後, 血清を直ちに冷凍保存した。これをエス・アール・エル社に依頼し, 『エンチムンテスト トロポニン T』(ペーリンガー・マンハイム社, ドイツ) を用いた, EIA 法による心筋 Troponin-T 値 (Tn-T) を計測した。

#### 2・5・5 心筋内高エネルギーリン酸化合物 (AMP, ADP, ATP) の測定

2分された凍結心筋の一方を秤量した後, 0.5 N の過塩素酸 1ml を加え, 低温下に homogenizer (Kinematica Polytron 社, 米国) で磨細し, 3000 rpm, 15分間の遠心分離を2回繰り返す, 上清を採った。これを pH meter F-8 (Horiba 社製) を用いて, KOH 溶液を適量加えて pH 7.0 に調整した。これを再び 3000 rpm で遠心分離し, その上清の量を計り, 試料とした。この試料から高速液体クロマトグラフィー (HPLC: Jasco 800 series, 日本分光) を用いて教室の馬見<sup>22)</sup>が報告した方法に従い心筋組織内 AMP, ADP, ATP を秤量した。測定値は, 乾燥重量あたりの含量 ( $\mu\text{mol/g dry tissue weight}$ ) で表した。また, 心筋内のエネルギー量の指標として, energy charge (EC) を次の式から計算した。

$$\text{Energy charge} = (2 \text{ ATP} + \text{ADP}) / (2 \text{ AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})$$

また, 心筋のリン酸化能の指標として ATP/ADP 比を計算した。

#### 2・5・6 心筋組織水分含量 (water content ml/g dry weight) の測定

残ったもう一方の凍結心筋を, まず凍結状態でその重量を計測し (湿重量; ww), ついで凍結真空乾燥器 (Ulvac DF-01H, 日本真空技術社) 内にて 48 時間真空乾燥させ, 乾重量 (dw) を計測した。心筋組織水分含量 (water content) を次の式で求めた。

$$\text{water content (ml/g} \cdot \text{dryweight)} = (\text{ww} - \text{dw}) / \text{dw}$$

#### 2・6 統計処理

統計処理は Macintosh コンピューター上で StatView J-4.5 (Abacus Concept 社) を用いて行った。測定値はすべて平均値  $\pm$  標準誤差で表し, 実験の各段階における 3 群間の比較には分散分析 (One-way factorial ANOVA 法) を, また, 個別の 2 群間の比較には Fisher の PLSD 法を用いた。さらに, 各群における経時的変化の検定には同じく分散分析の One-way Repeated Measures ANOVA 法を用い, 有意の変化と認められたときに, 虚血前値と再灌流後 30 分値, および再灌流後 60 分値の各 2 群間で Wilcoxon signed rank test (以下 W 法) を用いて検定した。有意差の検定は p 値が 5% 以下であるときに有意とした。

なお,  $CF$ ,  $LVP_{10}$ ,  $dp/dt_{10}$  および  $VO_2$  の各数値は虚血前値に対する回復率も併せて計算した (% $CF$ , % $LVP_{10}$ , % $dp/dt_{10}$ , % $VO_2$ )。

### 3 結 果

#### 3・1 冠血流量 (CF) の変化 (Table 1)

冠血流量は虚血再灌流後, C 群と H 2 群はともに有意に低下し (C 群,  $n=8$ ;  $p<0.001$  (ANOVA), 30 分値および 60 分値ともに  $p<0.05$  vs 虚血前値 (W 法), H 2 群,  $n=8$ ;  $p<0.002$  (ANOVA), 30 分値および 60 分値ともに  $p<0.05$  vs 虚血前値), H 1 群も経過を通して有意の変化があり ( $p<0.02$ , ANOVA), 30 分値が虚血前値よりも有意に低下した ( $p<0.05$ , W 法)。しかし各段階において 3 群間に有意差は認めなかった。

Table 1 Transition of coronary flow (ml/min) and %CF

group	n	pre-ischemia	reperfusion 30'	reperfusion 60'	ANOVA <sup>#</sup>
C(%CF)	8	3.84 $\pm$ 0.25	2.63 $\pm$ 0.40 <sup>§</sup> (70.3%)	2.11 $\pm$ 0.37 <sup>§</sup> (54.1%)	$p<0.001$
H1(%CF)	8	3.16 $\pm$ 0.25	1.96 $\pm$ 0.31 <sup>§</sup> (55.5%)	1.89 $\pm$ 0.40 (48.7%)	$p<0.02$
H2(%CF)	8	3.11 $\pm$ 0.43	2.09 $\pm$ 0.50 <sup>§</sup> (62.0%)	2.13 $\pm$ 0.62 <sup>§</sup> (58.0%)	$p<0.002$
ANOVA*		ns	ns	ns	

<sup>§</sup>;  $p<0.05$  vs pre-ischemia by Wilcoxon signed rank test.

ANOVA\*, Oneway Factorial ANOVA, ANOVA<sup>#</sup>, Oneway Repeated Measures ANOVA.

%CF, percent recovery of coronary flow after the reperfusion.

3・2 心機能の変化

3・2・1 左心室圧回復率 (%LVP<sub>10</sub>) (Table 2, Fig. 4)

%LVP<sub>10</sub> は C 群では再灌流後に有意な低下を示し (p<0.0003, ANOVA), 30 分後には 56.8%, 60 分後には 46.9% となった (ともに p<0.05 vs 虚血前値, W 法). 一方, H1 および H2 群も, 再灌流後に有意の低下を示す (H1 群 p<0.0001, H2 群 p<0.002, ANOVA, p<0.05, W 法) が C 群よりも高値を保ち (30 分値 79.5% および 72.2%, 60 分値 58.7% および 71.2%), 特に 60 分後に H2 群が C 群に比較して有意に良好な回復を示した (p<0.02).

3・2・2 左心室圧微分値 (%dp/dt<sub>10</sub>) (Table 2, Fig. 5)

%dp/dt<sub>10</sub> も %LVP<sub>10</sub> と同様の傾向であり, 再灌流後

60 分において H2 群 (75.9%) が C 群 (47.8%) に対し有意の回復率を示した (p<0.02).

3・3 心筋酸素消費量 (VO<sub>2</sub>) (Table 3)

各群の VO<sub>2</sub> の変化を Table 3 に示す. C 群および H1 群では虚血後に有意の低下を示している (p<0.0001 および p<0.01, ANOVA) が, H2 群のみがその変化に有意差がなく, 心筋代謝が良好に維持されている事を示唆する. しかし, 各時相における群間の有意差は認めなかった.

3・4 冠静脈還流血中 Tn-T (Table 4, Fig. 6)

3 群における Tn-T の変動を比較すると, 虚血再灌流後に有意な上昇を示すパターンは 3 群で差はないが, H1 群および H2 群では再灌流後 60 分において 61.9±7.6 ng/ml および 51.3±4.9 ng/ml と C 群 (104.9±19.8 ng/ml) に比し有意の低値に留まった (p<0.03 および

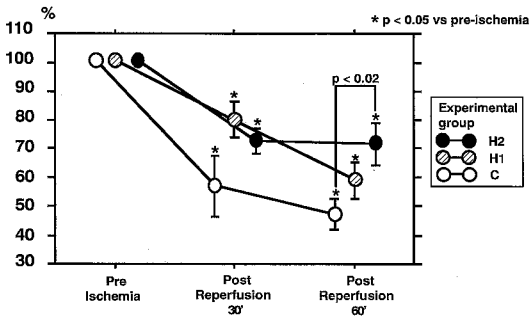


Fig. 4 Transition of %LVP<sub>10</sub> of the three groups. In C and H1 groups, LV pressure kept deteriorating after the reperfusion whereas, in H2 group, the value stayed around 75% with significant difference comparing to C group (p<0.02) at 60 min after the reperfusion.

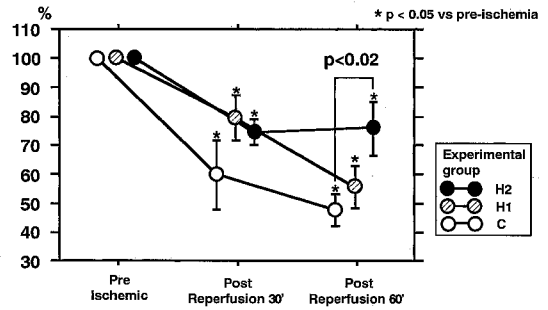


Fig. 5 Transition of %dp/dt<sub>10</sub> of the three groups. The values show similar change as that of %LVP<sub>10</sub>. At 60 min after the reperfusion, H2 showed significant higher recovery than C group (p<0.002).

Table 2 Transition of Left Ventricular Function

parameter	group	n	pre-ischemia	reperfusion 30'	reperfusion 60'	ANOVA <sup>#</sup>
LVP <sub>10</sub> (%LVP <sub>10</sub> )	C	8	116.5±7.3	62.8±10.9 <sup>§</sup> (56.8%)	54.1±6.2 <sup>§</sup> (46.9%)	p<0.0003
	H1	8	110.5±8.1	87.8±8.9 <sup>§</sup> (79.5%)	64.6±8.0 <sup>§</sup> (58.7%)	p<0.0001
	H2	8	114.5±8.9	83.8±4.9 <sup>§</sup> (72.2%)	81.1±6.0* <sup>§</sup> (71.2%*)	p<0.002
	ANOVA*		ns	ns	p<0.04 (p<0.05)	
dp/dT <sub>10</sub> (%dp/dt <sub>10</sub> )	C	8	3300±371	1825±400 <sup>§</sup> (59.8%)	1581±246 <sup>§</sup> (47.8%)	p<0.003
	H1	8	3238±365	2563±365 <sup>§</sup> (79.5%)	1825±323 <sup>§</sup> (55.6%)	p<0.0003
	H2	8	3312±401	2400±242 <sup>§</sup> (74.3%)	2325±207 <sup>§</sup> (75.9%*)	p<0.02
	ANOVA*		ns	ns	ns (p<0.04)	

\*; p<0.02 vs C group by Fisher's PLSD. §; p<0.05 vs pre-ischemia by Wilcoxon signed rank test. ANOVA\*, One-way factorial ANOVA, ANOVA<sup>#</sup>, One-way Repeated Measures ANOVA.

Table 3 Transition of  $VO_2$  ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ) and % $VO_2$ 

group	n	pre-ischemia	reperfusion 30'	reperfusion 60'	ANOVA <sup>#</sup>
C(% $VO_2$ )	8	37.8±4.6	22.2±4.4 <sup>§</sup> (60.9%)	16.8±3.4 <sup>§</sup> (43.2%)	p<0.0001
H1(% $VO_2$ )	8	34.5±2.3	19.3±3.4 <sup>§</sup> (59.7%)	22.2±3.7 (68.7%)	p<0.01
H2(% $VO_2$ )	8	29.5±3.3	19.6±3.7 (72.3%)	20.7±4.5 (76.0%)	ns
ANOVA*		ns	ns	ns	

<sup>§</sup>; p<0.05 vs pre-ischemia by Wilcoxon signed rank test.

ANOVA\*, Oneway factorial ANOVA, ANOVA<sup>#</sup>, Oneway Repeated Measures ANOVA.

$VO_2$ , oxygen consumption of the heart, % $VO_2$ , %recovery of  $VO_2$ .

Table 4 Transition of Tn-T (ng/ml) in coronary returned blood

group	n	pre-ischemia	reperfusion 30'	reperfusion 60'	ANOVA <sup>#</sup>
C	8	7.3±0.8	58.8±10.5 <sup>§</sup>	104.9±19.8 <sup>§</sup>	p<0.0001
H1	8	4.6±0.4	42.2±5.7 <sup>§</sup>	61.9±7.6* <sup>§</sup>	p<0.0001
H2	8	8.8±1.9	39.1±5.0 <sup>§</sup>	51.3±4.9** <sup>§</sup>	p<0.0001
ANOVA*		ns	ns	p<0.02	

\*; p<0.03 vs C group, \*\*; p<0.007 vs C group by Fisher's PLSD.

<sup>§</sup>; p<0.02 vs pre-ischemia by Wilcoxon signed rank test.

ANOVA\*, One-way factorial ANOVA, ANOVA<sup>#</sup>, One-way Repeated Measures ANOVA.

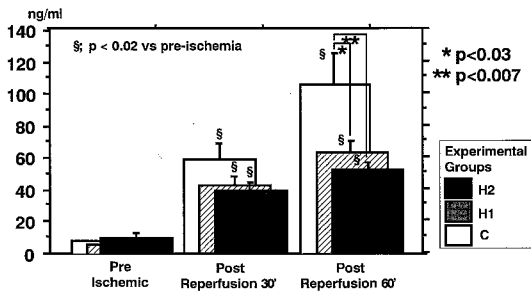


Fig. 6 Transition of Troponin-T in coronary returned blood.

Though the values increased remarkably after reperfusion in all groups, H1 and H2 groups kept significant lower level than C group (p<0.03 and p<0.007, respectively) at 60 min after the reperfusion.

p<0.007).

### 3.5 心筋組織内 AMP, ADP, ATP 量 (Table 5, Fig. 7)

再灌流 60 分後に採取した心筋内の AMP および ADP 量は 3 群間に有意差はないが, ATP は H1 群および H2 群 (1.21±0.08 および 1.40±0.19  $\mu\text{g}/\text{g}$  dry-weight) が C 群 (0.57±0.14  $\mu\text{g}/\text{g}$  dry-weight) に比しそれぞれ有意に高値を示した (p<0.006 および p<0.001). また, 心筋内のエネルギー量を示す Energy Charge (Fig. 8) は H2 群 (24.9±5.0) において C 群

(0.57±0.14) より有意の高値を示し (p<0.02), また心筋のリン酸化能を示す ATP/ADP 比においても H1, H2 両群 (0.53±0.03 および 0.54±0.03) とともに C 群 (0.26±0.05) に比し有意の高値を示した (ともに p<0.0001).

### 3.6 心筋組織水分含量 (water content) (Table 5, Fig. 9)

虚血再灌流後 60 分後の心筋組織水分含量は H1 および H2 の両群 (3.48±0.05 および 3.39±0.04) がともに, C 群 (3.82±0.09) に比し有意の低値を示し, 心筋組織浮腫が有意に抑制されていた (p<0.001 および p<0.0001).

## 4 考 案

### 4.1 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換系の役割

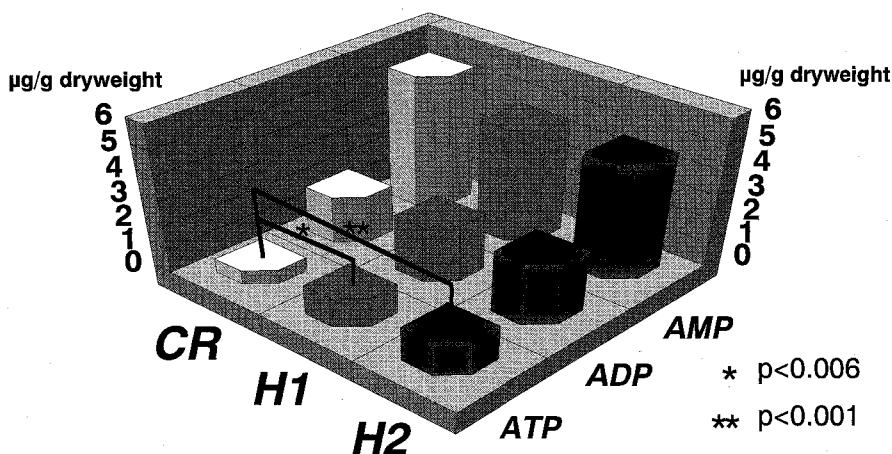
$\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系は細胞内の pH の調節, 細胞容量の調節などに関わっている細胞膜のイオン輸送系の一つであり. これまで 5 つのサブタイプ (NHE1~5) が知られている. cloning によりそのアミノ酸配列からなる分子構造がすでに明らかとなっており<sup>23-25)</sup>, このうち, ほ乳類の心筋細胞には NHE1 が存在していることが知られている<sup>23)</sup>.

NHE は細胞質側に存在する  $\text{H}^+$  制御部位 (pH センサー) の pH の変化を感知することによって活性化し, 細胞内外の濃度差に依存した細胞内への  $\text{Na}^+$  流入と細

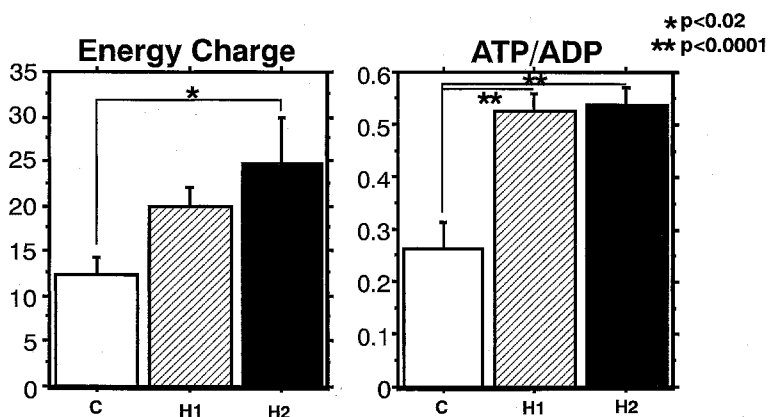
**Table 5** Adenosine phosphates and water content of myocardium after 60 min of reperfusion

group	n	AMP ( $\mu\text{g/g dry-weight}$ )	ADP ( $\mu\text{g/g dry-weight}$ )	ATP	Energy Charge	ATP/ADP	Water Content ( $\text{ml/g dry-weight}$ )
C	8	5.47 $\pm$ 0.39	1.97 $\pm$ 0.17	0.57 $\pm$ 0.14	12.5 $\pm$ 1.9	0.26 $\pm$ 0.05	3.82 $\pm$ 0.09
H1	8	4.66 $\pm$ 0.55	2.34 $\pm$ 0.17	1.21 $\pm$ 0.08**	19.9 $\pm$ 2.3	0.53 $\pm$ 0.03 <sup>§</sup>	3.48 $\pm$ 0.05 <sup>†</sup>
H2	8	4.75 $\pm$ 0.52	2.55 $\pm$ 0.24	1.40 $\pm$ 0.19 <sup>†</sup>	24.9 $\pm$ 5.0*	0.54 $\pm$ 0.03 <sup>§</sup>	3.39 $\pm$ 0.04 <sup>§</sup>
ANOVA*		ns	ns	p<0.002	p<0.05	p<0.0001	p<0.0001

\*; p<0.02 vs C group, \*\*; p<0.006 vs C group, †; p<0.001 vs C group,  
<sup>§</sup>; p<0.0001 vs C group by Fisher's PLSD.  
 Energy Charge = (2ATP+ADP)/2(ATP+ADP+AMP).  
 Water content = (wet weight-dry weight)/dry weight  
 ANOVA\*, One-way Factorial ANOVA.



**Fig. 7** Comparison of AMP, ADP and ATP level in sampled myocardial tissue between three groups is shown. H1 and H2 group have higher ATP content than C group (p<0.006 and p<0.001, respectively).



**Fig. 8** Energy status of sampled myocardium. Energy charge, representing total amount of energy in myocardial tissue, and ATP/ADP ratio, representing phospholization activity of the tissue, are compared among the three groups. H2 group reveals higher energy charge than C group with significant difference, while both of HOE groups show significantly higher ATP/ADP ratio than C group.

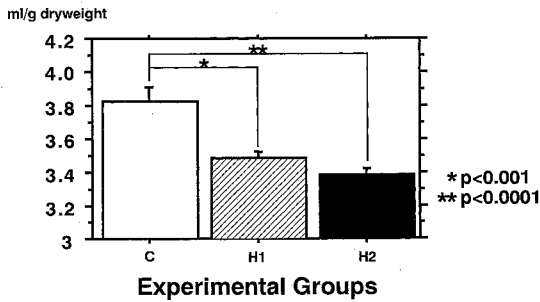


Fig. 9 Comparison of water content of three groups. Both of HOE groups have less water content than C group with significance ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ , respectively).

胞内からの  $H^+$  排出を行い、その結果細胞内の pH を調節する<sup>1)</sup>。すなわち、虚血時における嫌気性代謝の結果、細胞内 pH が acidosis に傾くと、NHE が活性化される。しかし、細胞内への  $Na^+$  流入は、細胞内外の  $Na^+$  勾配に依存している細胞膜  $Na^+/Ca^{2+}$  交換系の順行回転を低下させるため、細胞外への  $Ca^{2+}$  排出が停滞し、また更に細胞内  $Na^+$  濃度が上昇すると同交換系の逆行回転による  $Ca^{2+}$  の細胞内流入を引き起こすともいわれ、結果的に細胞内への  $Ca^{2+}$  overload を招くことになる<sup>2,3)</sup>。これにより、 $Ca^{2+}$  依存性 ATPase を過剰に活性化し、心筋細胞の硬直、過収縮などが発現した後、最終的に ATP が枯渇し細胞死に至る。

また、虚血後の再灌流の際には、低 pH の細胞内液に比し高い pH の液が細胞外を灌流することになり、細胞内外の pH 勾配が大となる。これが、再び NHE を活性化することとなり、細胞内の  $Ca^{2+}$  overload をさらに進行させ、再灌流障害を誘発する (pH paradox)。

したがって、これらの連鎖の第 1 歩である NHE を抑制することにより、急激な細胞内の  $Ca^{2+}$  overload を抑え、ひいては細胞障害を軽減できると考えられている。

#### 4.2 HOE642

Sholtz ら<sup>11)</sup> はそれまでの非特異的な細胞膜イオン輸送抑制剤 amiloride にかわる新たな選択的 NHE 抑制剤として、まず HOE694 を、そしてその NHE 抑制作用と NHE 1 に対する特異性を高めた HOE642 を開発した。彼らのウサギ赤血球への  $Na^+$  流入に対する阻害作用の検討で、amiloride による最大阻害濃度  $300 \mu M$  に対し、HOE642 は  $3 \mu M$  で同等の阻害効果が得られたとしている。また、HOE642 の NHE アイソフォーム (NHE 1, NHE 2, NHE 3) に対する特異性を線維芽細胞への  $^{22}Na^+$  流入に対する阻害作用で検討しており、その  $K_i$  値は NHE 1 に対し  $0.05 \mu M$ 、NHE 2 に

対し  $3 \mu M$ 、そして NHE 3 に対し  $1 mM$  であり、NHE 1 に対して選択的に阻害作用があることを示した。

このような、本剤の優れた NHE 1 に対する選択制と副作用の少ない点から、西欧では臨床応用に向け幅広い研究が行われている<sup>13-16,26,27)</sup>。特に、心筋保護に関しては、その虚血再灌流時の不整脈抑制作用<sup>13,15)</sup> や、心機能保存効果<sup>12,14,16)</sup> が注目され、急性心筋梗塞患者に対する再灌流時の治療法、開心術における心筋保護法、そして心臓移植における donor 心の保存法<sup>27)</sup> としての研究が報告されている。

#### 4.3 本実験の意義

##### 4.3.1 交差灌流式 Langendorff 回路

これまで、いくつかの摘出心を用いた Langendorff モデルの実験も行われている<sup>12,14,16)</sup> が、これらはすべて KHB 液による灌流実験であり、本研究のような全血を用いての報告は見あたらない。特に、白血球は再灌流障害を引き起こす原因として重要であり<sup>18,19)</sup>、その存在は臨床的な再灌流障害の予防を検討する際、無視できない。本実験に用いた交差灌流式 Langendorff 回路は、補助動物を用いることにより、全血による Langendorff 灌流を可能としたモデルであり、より臨床における開心術の心筋保護法に近い形といえる。

虚血再灌流障害における白血球の役割として、再灌流時の毛細血管における内皮への接着と閉塞による no reflow 現象<sup>18)</sup> が重要であり、この際冠血流量は低下する。本実験においても、3 群ともに再灌流後の冠血流量が有意に低下しており、HOE の有無に関わらず白血球の影響による no reflow 現象があったと考えられる。

##### 4.3.2 HOE642 の心筋保護効果

本研究は心筋保護液 (St. Thomas 液) に追加された HOE が、従量的に心筋保護効果を表す事を示している。すなわち、1) 心機能の回復率 (%LVP<sub>10</sub> および %dp/dt<sub>10</sub>)、2) 冠静脈環流血中 Tn-T 値、3) 心筋組織 ATP 濃度およびエネルギー保存効果 (energy charge, ATP/ADP 比)、4) 実験終了時の心筋組織水分含量 (water content) に関して、H 1 群 (HOE  $0.03 mg/kg$ ) では Control 群に比し上記の 2)、3) の一部 (ATP 濃度と ATP/ADP 比)、および 4) で有意差を認め、ある程度の心筋保護効果がみられた。一方、H 2 群 (HOE  $0.3 mg/kg$ ) は虚血再灌流 60 分で上記 1) ~ 4) 測定値の全てにおいて Control 群に比し有意に優れた成績を示した。これらの結果より、HOE  $0.3 mg/kg$  投与群は NHE 1 を心筋虚血時に選択的に抑制することにより、虚血再灌流障害を抑制して心筋細胞内のエネルギー代謝を維持し、心筋細胞の浮腫を抑制し、再灌流後の心



機能の回復を良好にすることが示された。

#### 4・3・3 HOE642 の至適投与量

HOE642 はその濃度がある範囲内で従量的にその効果を表す。Sholtz ら<sup>12)</sup> はヒト血小板の NHE を抑制する実験で、HOE642 の amiloride 感受性 NHE に対する 50% 最大抑制濃度 (IC 50) は 0.2 μM/l, またラットの心筋細胞を塩化アンモニウムに繰り返し浸し、その細胞内 pH の回復を観察する実験で、同 IC 50 は 0.1~1 μM/l であったとしている。我々の実験系では全血を使用するため、HOE の濃度設定は困難であるが、Aye ら<sup>13)</sup> の報告を本実験における投与量の参考とした。彼らはラットの冠動脈を結紮・解放するモデルで、HOE を 0.01 mg/kg から 3 mg/kg まで投与し、その再灌流後不整脈予防効果を検討し、虚血前投与では 0.1 mg/kg 以上で、また虚血後の投与では 0.3 mg/kg 以上で優れた効果が示され、また、1 mg/kg では 0.3 mg/kg と同等の効果にとどまったと報告している。本実験においては、H1 群でドナーラットの体重を基準に 0.03 mg/kg を、また H2 群で 0.3 mg/kg を 5 ml の St. Thomas 液に添加して投与した。単純な濃度計算としては、ドナーラットの体重が 300 g とすると、それぞれ 4.75 μM/l および 47.5 μM/l であり、Sholtz らの報告における IC 50 値の約 5 倍から 500 倍である。しかし、虚血開始時 1 回投与であり、効果を得るには高濃度を要し、結果としては、0.03 mg/kg 投与 (H1) 群は心筋組織 ATP 量、ADP/ATP 比、心筋組織水分含量、および Tn-T に関しては有意の改善を示したが、心機能の回復に関して充分量ではなく、Aye らの結果と同様に、0.3 mg/kg が本実験上至適投与量と考えられる。

#### 4・3・4 トロポニン-T (Tn-T) 値測定の意義

Tn-T は、横紋筋の筋収縮を調節するトロポニン複合体のサブユニットの一つを形成する塩基性タンパクであり<sup>28)</sup>、心筋と骨格筋ではそのアミノ酸構造が異なる。本研究において用いた『エンチムンテストトロポニン T』<sup>29)</sup> は心筋 Tn-T を特異的に計測するキットであり、心筋障害に特異的な指標<sup>30,31)</sup> として、臨床の間においても用いられている。通常の Langendorff 回路における実験では、LDH や CPK 等の、心筋逸脱酵素を用いることが多いが、本実験においては、補助動物の腹部大動脈以下の血流を遮断するため、骨格筋にも含まれるこれらの酵素は異常値を示し、指標としては適さない。この点、心筋 Tn-T は心筋組織に特異的であり、冠静脈還流血中の濃度を計測することにより、その心筋障害の程度を知ることが可能であり、また、もし虚血前値が異常高値であれば、摘出心の Langendorff 灌

流に問題があると判断され、これを除外することもでき、実験の精度を高める上で有用である。

#### 4・4 本研究の限界と課題

##### 4・4・1 補助動物の液性因子の影響

Langendorff 灌流回路に補助動物を用いることで、全血による摘出心灌流が可能となったが、補助動物から産出される液性因子に影響される可能性がある。補助動物の血圧は同種血輸血により調整したが、個体差があり、特に補助動物の血圧が低下した場合には、ある程度のカテコラミンの産生が予想され、排除するのが困難な因子である。

##### 4・4・2 HOE642 の作用機序と投与至適時期

本実験では臨床的開心術を想定し、HOE は心筋保護液に添加して虚血開始時に投与しており、従って、その作用機序としては NHE 抑制による虚血心筋障害の予防が主たるものと考えられる。しかし、再灌流後も HOE が心筋内に残留している可能性があり、再灌流障害をも軽減させているとも考えられ、どちらが主たる作用であるか本実験からは明らかではない。HOE 投与時期に関する報告から推察すると、虚血前あるいは本実験と同様の虚血開始時に心筋保護液としての投与方法が、Langendorff 灌流モデルにおける虚血再灌流後の心機能回復効果や<sup>14,16)</sup>、冠動脈閉塞・解放モデルにおける梗塞サイズの抑制効果および抗不整脈効果<sup>32)</sup> が最も高く、再灌流直前や、再灌流時のみの投与ではその効果は部分的であるとされている<sup>14,16,32)</sup>。Garcia-Dorado ら<sup>32)</sup> は HOE による虚血収縮を予防する作用が心筋保護効果に強く影響しており、十分な保護効果を得るためには虚血時の NHE 抑制が必要であると述べている。また、Chakrabarti ら<sup>33)</sup> は虚血時の心筋 apoptosis の程度を検討し、虚血開始 10 分には既に apoptosis が見られ、30 分以後に最大値を示すとし、HOE の虚血前投与で、著明に apoptosis が抑制されると報告しており、10 分以上の虚血時間がある場合、その虚血障害を完全に防止することは困難であることを示唆している。

以上の諸家の報告から HOE は虚血前および虚血時投与がより効果的であると考えられ、この点からも開心術における心筋保護法において有望な薬剤といえる。本実験では少なくとも心筋保護液に本剤を添加することで、全血灌流モデルにおいても有意の心筋保護効果が得られた事を証明した。今後は、心筋保護液に本剤を併用することに加え、全血による再灌流時にも本剤の持続投与を併用することで、再灌流障害予防の上で相加効果があるか、更なる検討を行う予定である。

一方、心筋梗塞に対する治療を考える場合、虚血前

投与は困難であるが、PTCA などによる intervention 中の虚血時投与や、緊急冠動脈バイパス術中における再灌流前投与および再灌流時投与が有効となる可能性があり<sup>26)</sup>、その最適な方法の究明も必要であろう。

## 5 結 論

ラット摘出心による交叉灌流式 Langendorff 全血灌流モデルを用い、新しい Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換系抑制剤 HOE642 の心筋保護効果について検討した。実験は、摘出心を全血で 20 分間 Langendorff 灌流、St Thomas 液による心停止後 30 分間の 37°C 虚血、その後 60 分間の再灌流で行った。HOE642, 0.3 mg/kg を St. Thomas 液に添加し、虚血直前に心筋保護液として投与した H 2 群では、Control 群に比し再灌流 60 分後の計測値で 1) 左心室圧と左室圧 dp/dt 回復率が高値、2) 冠静脈還流血中 Tn-T 値が低値、3) 心筋組織 ATP 量が高値、4) 心筋組織 energy charge および ATP/ADP 比が高値、5) 心筋組織水分含量が低値、など、いずれも有意に良好な結果が得られた。これらの結果より、HOE642 は全血灌流による摘出心モデルにおいても心筋保護液に添加することで優れた心筋保護効果を示し、今後の臨床における、新たな心筋保護法として有用な薬剤であることを証明できた。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に施設をご提供くださった衛生学講座浦沢正三教授、生化学第 1 講座秋野豊明前教授、生理学第 1 講座藪英世前教授と當瀬規嗣教授、および教室員の皆様に謝辞を申し上げます。

## 参 考 文 献

- Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 1985, 17: 1029-1042.
- Nayler WG, Panagiotopoulos S, Elz JS, Daly MJ. Calcium-mediated damage during post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1988, 20 (SII): 41-54.
- Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circ Res* 1989, 65: 1045-1056.
- Kinsella JL, Aronson PS. Amiloride inhibition of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Am J Physiol* 1981, 241: F374-379.
- Siegl PK, Cragoe EJ, Jr., Trumble MJ, Kaczorowski GJ. Inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in membrane vesicle and papillary muscle preparations from guinea pig heart by analogs of amiloride. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81: 3238-3242.
- Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange. *Am J Physiol* 1988, 255: H608-615.
- Meng HP, Pierce GN. Protective effects of 5-(N, N-dimethyl) amiloride on ischemia-reperfusion injury in hearts. *Am J Physiol* 1990, 258: H1615-619.
- Scholz W, Albus U, Linz W, Martorana P, Lang HJ, Scholkens BA. Effects of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors in cardiac ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1992, 24: 731-739.
- Pierce GN, Cole WC, Liu K, Massaelli H, Maddaford TG, Chen YJ, McPherson CD, Jain S, Sontag D. Modulation of cardiac performance by amiloride and several selected derivatives of amiloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1993, 265: 1280-1291.
- Meng HP, Maddaford TG, Pierce GN. Effect of amiloride and selected analogues on postischemic recovery of cardiac contractile function. *Am J Physiol* 1993, 264: H1831-1835.
- Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, Scholkens BA. Hoe 694, a new Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. *Br J Pharmacol* 1993, 109: 562-568.
- Scholz W, Albus U, Counillon L, Gogelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Scholkens BA. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1995, 29: 260-268.
- Aye NN, Xue YX, Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of cariporide, a novel Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor, on reperfusion ventricular arrhythmias in rat hearts. *Eur J Pharmacol* 1997, 27: 121-127.
- Shipolini AR GM, Edmondson SJ, Hearse DJ, Avkiran M. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor HOE-642 improves cardioplegic myocardial preservation

- under Both normothermic and hypothermic conditions. *Circulation* 1997, 96: II-266-273.
15. Xue YX, Aye NN, Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of HOE642, a novel Na (+) -H<sup>+</sup> exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in animal hearts. *Eur J Pharmacol* 1996, 317: 309-316.
  16. Tritto FP IJ, Gracia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Soler-Soler J. Sodium/hydrogen exchanger inhibition reduces myocardial reperfusion edema after normothermic cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998, 115: 709-715.
  17. Eng S MT, Kardami E, Pierce GN. Protection against myocardial ischemic/reperfusion injury by inhibitors of two separate pathways of Na<sup>+</sup> entry. *J Mol Cell Cardiol* 1998, 30: 829-835.
  18. Forman MB, Puett DW, Virmani R. Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: pathogenesis and therapeutic implications. *J Am Coll Cardiol* 1989, 13: 450-459.
  19. Mehta J, Dinerman J, Mehta P, Saldeen TG, Lawson D, Donnelly WH, Wallin R. Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* 1989, 79: 549-556.
  20. 森下清文. ラット心の常温虚血後の再灌流障害に対する FK 506 の効果. *札幌医学雑誌* 1996, 65: 113-119
  21. 井上聡巳. 虚血・再灌流傷害に対する Nicorandil の心筋保護効果に関する実験的研究. *札幌医学雑誌* 1996, 65: 133-146.
  22. 馬見知大. 弓部大動脈再建における Open Distal Anastomosis 時の腎虚血許容温度に関する実験的研究. *札幌医学雑誌* 1993, 62: 19-29.
  23. Fliegel L, Dyck JR, Wang H, Fong C, Haworth RS. Cloning and analysis of the human myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Mol Cell Biochem* 1993, 125: 137-143.
  24. Fliegel L, Dyck JR. Molecular biology of the cardiac sodium/hydrogen exchanger. *Cardiovasc Res* 1995, 29: 155-159.
  25. Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orłowski J, Otterud BE, Leppert M. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* 1995, 25: 615-622.
  26. Klein HH, Bohle RM, Pich S, Lindert-Heimberg S, Wollenweber J, Schade-Brittinger C, Nebendahl K. Time-dependent protection by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition in a regionally ischemic, reperfused porcine heart preparation with low residual blood flow. *J Mol Cell Cardiol* 1998, 30: 795-801.
  27. Kim YI, Herijgers P, Van Lommel A, Verbeken E, Flameng W. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition improves post-transplant myocardial compliance in 4-hour stored donor hearts. *Cardiovasc Surg* 1998, 6: 67-75.
  28. Perry SV, Cole HA. Phosphorylation of the "37000 component" of the troponin complex (troponin-t). *Biochem J* 1973, 131: 425-428.
  29. 宇治義則, 岡部紘明, 杉内博幸. エンチムンテストトロポニンTの評価. *医学と薬学* 1991, 26: 519-527.
  30. Katus HA, Remppis A, Looser S, Hallermeier K, Scheffold T, Kubler W. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol* 1989, 21: 1349-1353.
  31. Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, Scheffold T, Diederich KW, Vinar G, Noe A, Matern G, Kuebler W. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991, 83: 902-912.
  32. Garcia-Dorado D G, Barrabes JA, Ruiz-Meana M, Solares J, Lindon RM, Blanco J, Puigfel Y, Piper HM, Soler-Soler J. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na (+) -H<sup>+</sup> exchange. *Cardiovasc Res* 1997, 35: 80-89.
  33. Chakrabarti S, Hoque ANE, Karmazyn M. A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE642 (cariporide). *J Mol Cell Cardiol* 1997, 29: 3169-3174.

別刷り請求先

(〒060-8543) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部外科学第2講座 塚本 勝