

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

井上 聡 巳

札幌医科大学医学部外科学第2講座 (主任 小松作蔵 教授)

Experimental studies on the effects of nicorandil for
the myocardial reperfusion injury.

Satomi INOUE

*Second Department of Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine
(chief : Prof. S. KOMATSU)*

ABSTRACT The cardioprotective effects of nicorandil (NIC) in isolated blood perfused rat hearts using support rat through the ischemia and the reperfusion were investigated. NIC (1 mM) was administered with cardioplegia (group NIC-I, n=8) or at the time of reperfusion (group NIC-R, n=8) or both (group NIC-I+R, n=8), and these groups were compared with a non-ischemic group (group C, n=8) and a vehicle group (group ISC, n=10). After 20 minutes equilibration, the heart was arrested with St. Thomas solution (25°C) and put into 30-min global ischemia (37°C) followed by 40 minutes reperfusion. The parameters of LV function was taken with a intra-ventricular latex balloon (balloon volume: BV 40, 80, 140 μ l) before ischemia and after reperfusion. After this experiment, the heart was divided and the adenine nucleotides and water content of the tissues were measured.

To investigate the effects of NIC during ischemia, tissues from hearts arrested using cardioplegia with NIC (group NI, n=6) were compared with those from hearts arrested without NIC (group NT, n=6).

To investigate the effects of NIC on cardiac functions, NIC was administered into the circuit for 10 minutes after 20 minutes equilibration, the parameters of LV function before and after NIC were compared with each other (n=6).

The recovery values of rate-pressure product (RPP) were better in NIC-I+R than in ISC at BV of 40 and 140, and the values of left ventricular developed pressure (LVDP), peak positive dP/dt (+dP/dt) and peak negative dP/dt (-dP/dt) were also higher at BV of 40 μ l. The recovery values of HR and CF in groups NIC-R and NIC-I+R were significantly higher than in ISC. The ATP/ADP ratio of NIC-R was significantly higher than that of ISC. The water content of the hearts in C was significantly smaller than in all other groups. There were no significant differences in the adenine nucleotides or water content between NI and NT. After perfusion with NIC for 10 minutes, the values of LVDP, RPP, +dP/dt (BV: 40, 80 μ l), -dP/dt (in all BV) and HR (80, 140 μ l) were significantly increased. The level of CF was remarkably increased, almost doubled.

The administration of NIC 1mM during the ischemic period did not provide any cardioprotective effects. Administration in the reperfusion period also did not improve LV function, but it did appear to improve the energy status of the heart because it increased the ATP/ADP ratio. The administration of NIC in both ischemic and reperfusion periods significantly improved LV function. These results indicated that high doses of NIC effect on improvement of LV function in the isolated blood

perfused rat heart, particularly when administered during ischemia and during reperfusion.

(Received November 29, 1995 and accepted January 8, 1996)

Key words: Nicorandil, Ischemic-reperfusion injury, Blood perfusion, Isolated heart, Adenine nucleotides

1 緒 言

狭心症治療薬である nicorandil (以下 NIC と略す) は心筋内で K^+ channel opener としての作用を持ち、細胞膜を過分極させることによって、心筋細胞等に活動電位の短縮¹⁻³⁾、 Ca^{2+} 流入の抑制をもたらし^{4,5)}、また冠血管に対しては拡張作用を示すことが明らかとなってきている^{6,7)}。諸家の研究で NIC は、冠状動脈閉塞・再灌流モデルでの心筋梗塞巣の縮小⁸⁾ および左室壁運動の回復⁹⁾、摘出心における虚血・再灌流傷害に対する抑制効果^{8,10-13)} などの心筋保護効果を示すことが報告されている。

虚血・再灌流傷害の機序は複雑で、種々の要素が相互に関連している。特に好中球に代表される血液成分の役割が重要と考えられている¹⁴⁻¹⁸⁾。しかし、摘出心での研究の多くは Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB) 液灌流モデルを用いて遂行されたものであり、血液灌流時の摘出心における虚血・再灌流傷害に対する NIC の心筋保護効果の有無はまだまだ十分明らかにされていない。

また NIC は、虚血中および再灌流時のいずれにも心筋保護効果を示す可能性があるが、各時点における NIC の作用についても十分に解明されていない。

本研究ではラット摘出心、血液灌流モデルを用い、NIC を虚血時、再灌流時、またはその双方に作用させ、心機能、冠血流量および心筋代謝の面からそ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

日本エスエルシー株式会社で生産された体重 350~420 g の雄性 Inbred Wistar-King-Aptekman (WKA) ラットを実験動物として使用した。

2.2 Support rat

体重 400 g 前後の WKA ラットを support rat として使用した。Support rat はペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与にて麻酔し、酸素マスクより 1 L/min の酸素を投与した。腹部正中切開にて腹部大動脈 (AA)、下大静脈 (IVC) を露出し、ヘパリン 1000 U/

kg を IVC から投与した後、それぞれに 19 ゲージ (G) および 18 G ベニユーラ針を挿入し、切開創を縫合閉鎖した後、血液循環回路に接続した。

2.3 血液循環回路 (Fig. 1)

摘出心への灌流方法は 80 cm H_2O 圧の Langendorff 法とした。回路は脱血用ラットから採取したヘパリン加新鮮血 10 ml と乳酸加リンゲル液 10 ml で充填した。灌流血液は Travenol 社製 MP-I ポンプにより support rat の AA より脱血され、保温槽にて 37°C に加温された後摘出心を灌流し、上記と同一のポンプにて IVC より返血される。灌流血液のヘマトクリット値は 25% 前後に維持し、pH は 7% $NaHCO_3$ 溶液にて 7.4 に補正した。送血液の O_2 分圧は平均 226 mmHg で、120 mmHg 以下の support rat は使用しなかった。 CO_2 分圧は平均 43 mmHg であった。電解質は、カリウム値を 4~5 mEq/l に、イオン化カルシウム値を 1.0 mEq/l 前後に維持した。

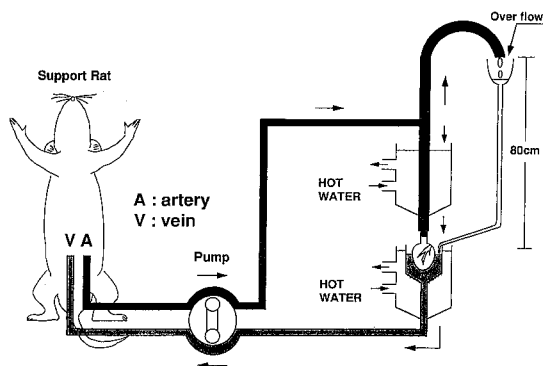


Fig. 1 Schema of the Perfusion System

2.4 摘出心

体重 350~420 g (平均 383 g) の雄性 WKA ラットを同様に麻酔、開胸、ヘパリン投与後心臓を摘出し、速やかに 4°C の生理食塩液中に浸漬した。心停止を得た後、摘出心の大動脈にカニューラを挿入し、直ちに灌流装置に装着した。灌流方法は落差灌流とし、ポンプは over flow vent からわずかに血液が滴下するように調節した。

2・5 Nicorandil

NIC は中外製薬より提供された。粉末を生理食塩液に溶解して使用した。

2・6 実験プロトコール (Fig. 2)

実験群は、NIC の投与法および虚血の有無に基づいて5群に分類した。すなわち、1) control 群(C 群)：非虚血群 (N=8)、2) ischemic 群 (ISC 群)：虚血群 (N=10)、3) NIC-I 群：虚血時 NIC 投与群 (N=8)、4) NIC-R 群：再灌流中 NIC 投与群 (N=8)、5) NIC-I+R 群：虚血時および再灌流中 NIC 投与群 (N=8) と設定し、NIC 投与群では回路血中の NIC 濃度が 1 mM 前後になるように調節した。摘出心は灌流開始後 20 分間常温灌流を行った後、5 分間で左室機能、冠血流量を測定した。その後 25°C の St. Thomas 液を 80 cmH₂O の灌流圧で 15 ml/kg (donor rat 体重) 注入して心停止とした。大動脈カニューラを閉鎖し、St. Thomas 液注入開始時点から 30 分間の常温虚血 (37°C) を行った。再灌流後 40 分間灌流し、左室機能、冠血流量を測定した。実験終了後、摘出心を切除し、直ちに 2 分割した後、液体窒素中にて -190°C 以下に冷却した Wollenberger 鉗子で瞬間的に圧挫冷凍し、アル

ミ箔で被覆して液体窒素中に保存した。2 分割した心筋の一方を adenine nucleotide の定量に、他方を心筋水分含量測定に供した。また虚血中の心筋高エネルギー代謝および心筋水分含量について虚血中の NIC の効果を検討するため、虚血のみで再灌流なしの 2 群、すなわち 6) NT 群：未処置群 (N=6) および 7) NI 群：心停止液中 NIC 投与群 (N=6) を設定し、虚血終了後の心筋を切除、凍結保存し、心筋高エネルギー代謝および心筋水分含量の検討を行った。

2・7 左室機能の測定

左室機能は自作のラテックス・バルーンを僧帽弁から左室に挿入して測定した。バルーンは 180 μ l まで張力を生じず、またバルーン虚脱時の容量が 70 μ l のものを用いた。バルーンは圧トランスデューサー (American Edwards Laboratories 社、59-DTS-H) に接続し、バルーン容量 (BV) を 0 μ l から 20 μ l ごとに連続的に 140 μ l まで増量し、40、80 および 140 μ l の時点において多用途監視装置 (フクダ電子、CS800) にて左室圧および dP/dt を記録した。心拍数 (HR) は記録器に記録された左室圧波形から算出した。左室の収縮機能の指標としては、left ventricular developed pressure (LVDP：左室収縮期圧-左室拡張期圧)、peak positive dP/dt (+dP/dt)、rate-pressure product (RPP：左室収縮期圧×HR) を用いた。また左室拡張機能の指標としては、peak negative dP/dt (-dP/dt) および left ventricular diastolic compliance (LVDC) を用いた。LVDC は Tamiya ら¹⁹⁾ の報告に基づき (Δ 左室容量 (BV)/ Δ 左室拡張終期圧) として計算した。またすべての結果は虚血前値に対する回復率 (%) として表示した。なお、NIC の血液灌流心に対する直接効果を検討するため、別に雄性ラット (N=6) を用い 20 分間の常温灌流の後、NIC 1mM を投与しつつ 10 分間灌流し、投与前後での左室機能および次項の冠血流を測定し、併せ比較検討した。

2・8 冠血流量の測定

冠血流量は、測定時にポンプを送血量と冠血流量が釣り合うように (すなわち血液循環回路の over flow の液面が静止するように) 調節し、このときのポンプ送血量を冠血流量とした。また結果は、虚血前値に対する回復率 (%) として表示した。

2・9 心筋高エネルギーリン酸化合物の代謝の検討

前述した凍結心筋より、adenosine triphosphate (ATP)、adenosine diphosphate (ADP)、adenosine monophosphate (AMP) を定量した。実験終了後、凍結心筋標本を速やかに秤量し、0°C の低温下で 0.6 N の

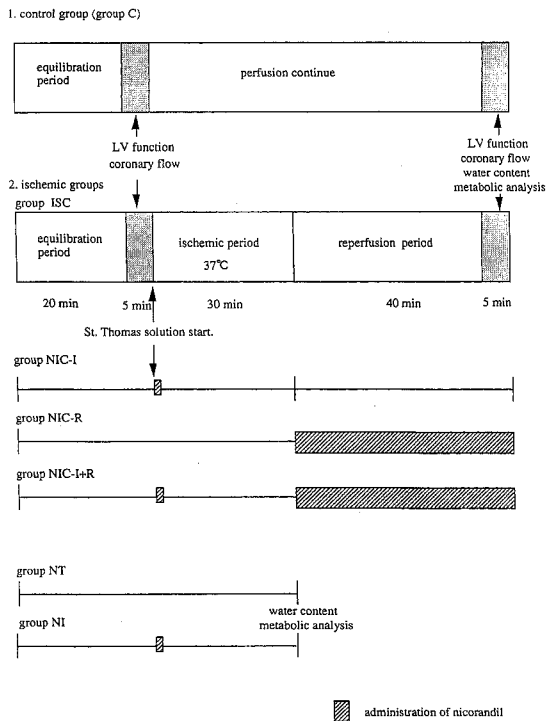


Fig. 2 Experimental Protocol and Group Classifications

過塩素酸 1 ml で除蛋白後, Polytron (Kinematica 社) にて 1 分間磨細した。次いで, 3000 rpm で 20 分間遠心沈殿し, 得られた上清を 3 N および 1 N KOH にて pH 7.0 に滴定中和し, 再び 3000 rpm で 20 分間遠心沈殿し, 得られた上清の容量を測定して試料とした。この試料から adenine nucleotide を High Performance Liquid Chromatography (HPLC) にて測定し, 定量分析した。HPLC は Jasco 800 series (日本分光社) を用いて, 馬見の方法²⁰⁾ に従って測定した。得られた値は, 乾燥重量あたりの含量 ($\mu\text{mol/g}$ dry tissue weight) として算出した。心筋の高エネルギーリン化合物の動的含量の指標として total adenine nucleotide (TAN = AMP + ADP + ATP) および ATP/ADP 比を算出した。

2・10 心筋水分含量の測定

凍結心筋標本を湿重量測定後, 凍結真空乾燥装置 (日本真空技術社, Ulvac DF-01H) 内で 48 時間以上乾燥させ, 速やかに乾燥重量を測定した。心筋水分含量は (湿重量 - 乾燥重量) / (乾燥重量) (ml/g dry weight) として算出した。

2・11 統計処理

測定値は, 平均 ± 標準偏差 (mean ± SD) で示した。Baseline 値に対する群中の有意差の判定には Student two-tailed paired t test, 各群間の比較には, ANOVA 法を用い, Post-Hoc Test として Fisher's protected Least Significant Difference 法を用いた。

有意水準は危険率 5% 未満とした。

なお, 本実験は「動物実験に関する指針」(日本実験動物学会) に基づいて行った。

3 成 績

3・1 左室機能

3・1・1 Left ventricular developed pressure (LVDP) の変動

LVDP 値は, 虚血前値では各群間に有意差は認められなかった (Table 1)。各群における回復率は Table 1 および Fig. 3a に示すごとくで, NIC-I+R 群は, BV 40 μl で C 群, ISC 群, NIC-I 群 ($p < 0.01$) および NIC-R 群 ($p < 0.05$) に対して有意に高値を示した。また BV 140 μl では C 群が ISC 群, NIC-I 群 ($p < 0.05$) および NIC-R 群 ($p < 0.01$) に対して有意に高値を示した。

3・1・2 Rate-pressure product (RPP) の変動

RPP 値は, 虚血前値では各群間に有意差は認められなかった (Table 2)。各群における回復率は Table 2 および Fig. 3b に示すごとくで, NIC-I+R 群は, BV 40 μl で C 群, ISC 群, NIC-I 群 ($p < 0.01$) および NIC-R 群 ($p < 0.05$) に対して有意に高値を示した。また BV 140 μl では C 群および NIC-I+R 群が ISC 群に対して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

3・1・3 Peak positive dP/dt (+dP/dt) の変動

+dP/dt 値は, 虚血前値では各群間で有意差は認め

Table 1. Changes in Left Ventricular Developed Pressure (LVDP)

		(mmHg)		
group		balloon volume (μl)		
		40	80	140
C	pre	48 ± 15	80 ± 19	114 ± 14
	post (%)	88 ± 45	85 ± 37	79 ± 23
ISC	pre	53 ± 17	79 ± 17	116 ± 16
	post (%)	90 ± 33	75 ± 23	60 ± 16
NIC-I	pre	53 ± 10	76 ± 16	106 ± 15
	post (%)	80 ± 23	72 ± 16	62 ± 6
NIC-R	pre	58 ± 25	82 ± 28	117 ± 25
	post (%)	97 ± 54	73 ± 30	55 ± 18
NIC-I+R	pre	42 ± 9	70 ± 14	108 ± 13
	post (%)	145 ± 40	101 ± 31	69 ± 15

There were no significant differences among these groups in the preischemic baseline data. See Fig. 3a for comparison of % recovery.

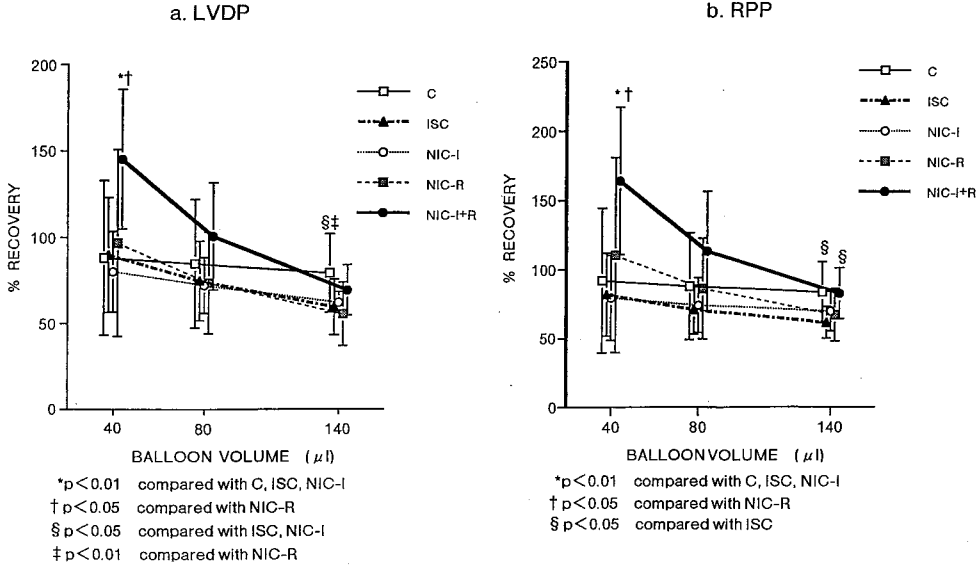


Fig. 3 Changes in LV Functions (1)

Table 2. Changes in Left Ventricular Rate-Pressure Product (RPP) ($\times 10^2$ mmHg/min)

group		balloon volume (μ l)		
		40	80	140
C	pre	141 \pm 58	245 \pm 74	365 \pm 53
	post (%)	92 \pm 52	88 \pm 39	83 \pm 22
ISC	pre	150 \pm 52	234 \pm 51	355 \pm 46
	post (%)	82 \pm 30	71 \pm 18	61 \pm 11
NIC-I	pre	153 \pm 28	229 \pm 52	335 \pm 58
	post (%)	79 \pm 31	74 \pm 20	69 \pm 14
NIC-R	pre	164 \pm 83	241 \pm 97	366 \pm 92
	post (%)	110 \pm 71	86 \pm 37	67 \pm 19
NIC-I+R	pre	118 \pm 32	210 \pm 52	338 \pm 62
	post (%)	164 \pm 53	113 \pm 43	82 \pm 18

There were no significant differences among these groups in the preischemic baseline data. See Fig. 3b for comparison of % recovery.

られなかった (Table 3)。各群における回復率は、Table 3 および Fig. 4a に示すごとく、NIC-I+R 群は、BV 40 μ l で C 群、ISC 群、NIC-I 群 ($p < 0.01$) および NIC-R 群 ($p < 0.05$) に対して有意に高値を示した。BV80 および 140 μ l では各群間に有意差は認められなかった。

3.1.4 Heart rate (HR) の変動

HR は、虚血前値では各群間に有意差は認められな

かった (Table 4)。また HR は BV の変化に対してほとんど影響を受けなかった。各群における回復率は Table 4 および Fig. 5a に示したが、C 群、NIC-R 群および NIC-I+R 群はすべての BV で ISC 群に対して有意に高値を示した (Fig. 5a)。

3.1.5 Peak negative dP/dt ($-dP/dt$) の変動

$-dP/dt$ 値は、虚血前値では各群間で有意差は認め

Table 3. Changes in Peak Positive dP/dt (mmHg/sec)

group		balloon volume (μ l)		
		40	80	140
C	pre	1431 \pm 515	2362 \pm 702	3487 \pm 626
	post (%)	100 \pm 54	94 \pm 46	84 \pm 32
ISC	pre	1460 \pm 553	2205 \pm 567	3315 \pm 651
	post (%)	97 \pm 39	79 \pm 30	60 \pm 21
NIC-I	pre	1544 \pm 383	2313 \pm 562	3244 \pm 578
	post (%)	88 \pm 29	74 \pm 23	60 \pm 10
NIC-R	pre	1694 \pm 781	2419 \pm 986	3563 \pm 1023
	post (%)	112 \pm 66	83 \pm 38	59 \pm 21
NIC-I+R	pre	1181 \pm 291	1988 \pm 484	3163 \pm 553
	post (%)	176 \pm 50	120 \pm 44	76 \pm 20

There were no significant differences among these groups in the preischemic baseline data. See Fig. 4a for comparison of % recovery.

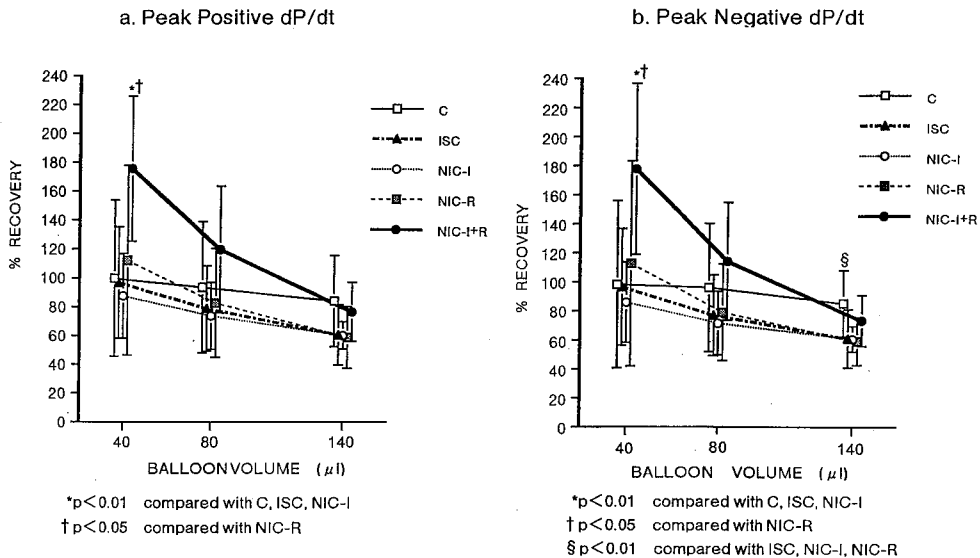


Fig. 4 Changes in LV Functions (2)

られなかった (Table 5)。回復率は Table 5 および Fig. 4b に示すごとくで、NIC-I+R 群は BV 40 μ l で、C 群、ISC 群、NIC-I 群 ($p<0.01$) および NIC-R 群 ($p<0.05$) に対して有意に高値を示した。BV 140 μ l では C 群が ISC 群、NIC-I 群および NIC-R 群に対して有意に高値であった ($p<0.01$)。

3・1・6 左室拡張期コンプライアンス (LVDC) の変動

LVDC 値は、虚血前値は C 群 8.9 \pm 1.0、ISC 群

15.6 \pm 9.6、NIC-I 群 10.9 \pm 2.7、NIC-R 群 10.5 \pm 3.2、NIC-I+R 群 10.9 \pm 2.4 μ l/mmHg で、各群間に有意差は認められなかった。再灌流後の各群における回復率は Fig. 6 に示すごとく、C 群 89 \pm 17、ISC 群 62 \pm 39、NIC-I 群 59 \pm 25、NIC-R 群 67 \pm 23、NIC-I+R 群 69 \pm 25% で、各群間に有意差は認められなかった。

3・2 冠血流量

Coronary flow (CF) は、虚血前値では各群間に有

Table 4. Changes in Heart Rate(HR) (beats/min)

group		balloon volume (μ l)		
		40	80	140
C	pre	291 \pm 17	293 \pm 17	291 \pm 18
	post(%)	102 \pm 6	102 \pm 6	101 \pm 6
ISC	pre	287 \pm 31	289 \pm 31	288 \pm 27
	post(%)	83 \pm 20	83 \pm 19	82 \pm 18
NIC-I	pre	294 \pm 20	291 \pm 23	291 \pm 23
	post(%)	89 \pm 15	89 \pm 12	90 \pm 11
NIC-R	pre	284 \pm 17	284 \pm 14	287 \pm 12
	post(%)	99 \pm 10	100 \pm 10	99 \pm 9
NIC-I+R	pre	289 \pm 29	291 \pm 29	291 \pm 30
	post(%)	100 \pm 9	99 \pm 9	99 \pm 9

There were no significant differences among these groups in the preischemic baseline data. See Fig. 5a for comparison of % recovery.

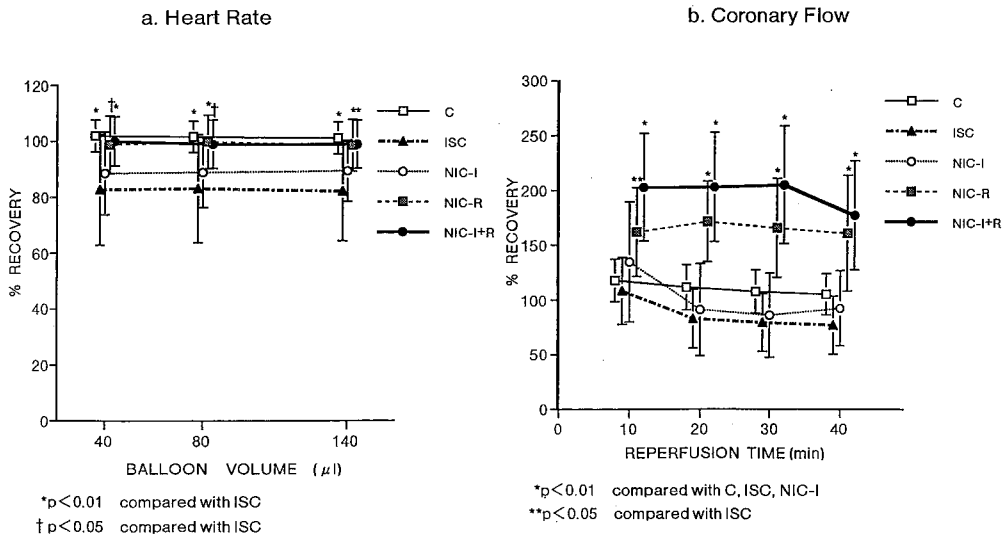


Fig. 5 Changes in LV Functions (3)

意差は認められなかった (Table 6). 虚血前値に対する各群の回復率では, NIC-R 群および NIC-I+R 群で 10 分~40 分のいずれにおいても CF は有意に増加した ($p<0.01$). また ISC 群では 40 分で有意な CF の低下を認めた ($p<0.05$). 各群間の比較では Table 6 および Fig. 5b に示すごとく, 再灌流後 10 分では NIC-R 群は ISC 群に対して ($p<0.05$), NIC-I+R 群では, C 群, ISC 群および NIC-I 群に対して ($p<0.01$) 有意に高値であった. また 20 分から 40 分では NIC-R 群およ

び NIC-I+R 群で C 群, ISC 群および NIC-I 群に対して有意に高値を示した ($p<0.01$).

3・3 心筋高エネルギー代謝および水分量

3・3・1 AMP の比較

虚血直後に心筋標本を採取した NT 群, NI 群では, AMP は虚血・再灌流後に心筋標本を採取した各群に対し有意に高値であった ($p<0.01$). 他の群間に有意差は認められなかった (Table 7).

Table 5. Changes in Peak Negative dP/dt (mmHg/sec)

group		balloon volume (μ l)		
		40	80	140
C	pre	1075 \pm 370	1713 \pm 481	2313 \pm 329
	post (%)	98 \pm 58	96 \pm 44	85 \pm 23
ISC	pre	1115 \pm 424	1685 \pm 406	2345 \pm 378
	post (%)	97 \pm 40	77 \pm 28	61 \pm 20
NIC-I	pre	1131 \pm 227	1675 \pm 372	2206 \pm 353
	post (%)	86 \pm 28	72 \pm 22	61 \pm 9
NIC-R	pre	1300 \pm 593	1819 \pm 635	2463 \pm 373
	post (%)	113 \pm 71	79 \pm 33	59 \pm 16
NIC-I+R	pre	863 \pm 222	1500 \pm 385	2231 \pm 344
	post (%)	178 \pm 59	114 \pm 40	73 \pm 17

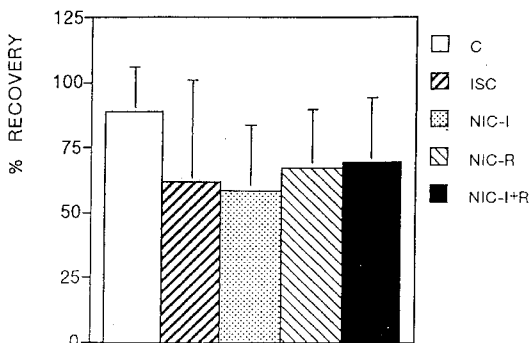
There were no significant differences among these groups in the preischemic baseline data. See Fig. 4b for comparison of % recovery.

Table 6. Coronary Flow (%)

group	pre (ml/min)	reperfusion time (in min)			
		10	20	30	40
C	3.3 \pm 0.6	118 \pm 20	111 \pm 21	107 \pm 20	105 \pm 19
ISC	3.2 \pm 0.5	108 \pm 30	83 \pm 27	79 \pm 26	77 \pm 26*
NIC-I	3.1 \pm 0.6	134 \pm 55	91 \pm 42	86 \pm 38	92 \pm 34
NIC-R	3.4 \pm 1.0	162 \pm 41**	171 \pm 37**	166 \pm 45**	161 \pm 53**
NIC-I+R	3.3 \pm 1.2	203 \pm 49**	203 \pm 50**	205 \pm 54**	177 \pm 50**

There were no significant differences among these groups in the preischemic baseline data. See Fig. 5b for comparison of % recovery.

*p<0.05 compared with pre data **p<0.01 compared with pre date



There were no significant differences among these groups.

Fig. 6 Left Ventricular Diastolic Compliance (LVDC)

3.3.2 ADP の比較

ADP は、C 群は他のすべての群に対して有意に高値を示した (Table 7)。また、NT 群では NIC-R 群に対して有意に高値であった ($p < 0.05$)。

3.3.3 ATP の比較

ATP は逆に再灌流後の各群で高く、それぞれ NT 群、NI 群に対して有意差が認められた (Table 7)。C 群は他のすべての群に対して著明に高値であった ($p < 0.01$)。再灌流後の各群間には有意差は認められなかった。NT 群および NI 群間にも有意差は認められなかった。

3.3.4 TAN の比較

TAN は C 群、NT 群および NI 群で高い傾向にあり、NT 群および NI 群は ISC 群に対して有意差が認められ

Table 7. Adenine Nucleotide Metabolites

(μ mol/g·dry wt)

group	AMP	ADP	ATP	TAN	ATP/ADP
C	2.30±1.11	6.25±1.82 ^{††}	10.12±2.20 ^{§§}	18.7±3.6 ^{§§}	1.73±0.61 ^{††}
Ischemia only					
NT	5.95±1.74*	5.03±1.14 [§]	2.94±0.85	13.9±1.6 ^α	0.58±0.11
NI	6.86±1.03*	4.47±0.80	2.61±0.62	13.9±1.0 ^α	0.58±0.06
Ischemia and reperfusion					
ISC	2.18±0.40	4.18±0.79	5.06±1.99 ^{**†}	11.4±2.5	1.20±0.43 ^{††}
NIC-I	2.20±0.86	4.45±0.89	6.09±1.50 ^{††}	12.7±1.4	1.43±0.46 ^{††}
NIC-R	1.99±0.33	3.56±0.50	5.98±1.72 ^{††}	11.5±2.2	1.66±0.32 ^{α††}
NIC-I+R	1.93±0.31	3.99±1.11	5.85±1.39 ^{††}	11.8±2.3	1.51±0.35 ^{††}

*p<0.01 compared with C, ISC, NIC-I, NIC-R, NIC-I+R

^{§§}p<0.01 compared with all other groups

**p<0.01 compared with NI

[†]p<0.05 compared with NT[§]p<0.05 compared with NIC-R^αp<0.05 compared with ISC^{††}p<0.01 compared with ISC, NIC-I, NIC-R, NIC-I+R, NI^{††}p<0.01 compared with NT, NI, ISC^{††}p<0.01 compared with NT, NI

Table 8. Tissue Water Content

group	Tissue Water (ml/g·dry wt)
C	3.33±0.32*
Ischemia only	
NT	3.98±0.13
NI	3.93±0.15
Ischemia and reperfusion	
ISC	3.87±0.34
NIC-I	4.08±0.13
NIC-R	3.84±0.33
NIC-I+R	3.87±0.19

*p<0.01 compared with all other groups

た (p<0.05). C 群は他のすべての群に対して有意に高値であった (p<0.01). 再灌流後の各群間には有意差は認められなかった (Table 7).

3・3・5 ATP/ADP 比の比較

ATP/ADP 比は, 再灌流後の各群および C 群で高く, それぞれ NT 群, NI 群に対して有意差が認められた (p<0.01). また C 群および NIC-R 群では ISC 群に対しても有意に高値を示した (Table 7). NT 群, NI 群間には有意差は認められなかった.

3・3・6 心筋水分含量の比較

虚血直後の NT 群, NI 群間には有意差は認められなかった (Table 8). C 群では他のすべての群に対し有意に低値であった (p<0.01).

3・4 NIC の血液灌流心に対する直接作用

摘出心の心機能からみた NIC の作用では, DP, RPP, +dP/dt 値は BV 40 および 80 μ l で NIC 投与前に比較して有意に上昇した (p<0.01). また -dP/dt ではすべての BV で有意に上昇し, HR 値でも BV80 および 140 μ l で有意に増加した (Table 9). また CF は

Table 9. Direct Effects of Nicorandil (1)

		balloon volume (μ l)		
		40	80	140
DP (mmHg)	pre	51 \pm 14	73 \pm 15	99 \pm 10
	post (%)	85 \pm 12**	95 \pm 14**	108 \pm 17
RPP ($\times 10^2$ mmHg/min)	pre	169 \pm 46	243 \pm 50	339 \pm 31
	post (%)	281 \pm 45**	324 \pm 43**	378 \pm 54
+dP/dt (mmHg/sec)	pre	1436 \pm 421	2093 \pm 454	2907 \pm 347
	post (%)	2743 \pm 430**	3057 \pm 519**	3479 \pm 636
-dP/dt (mmHg/sec)	pre	1086 \pm 318	1514 \pm 330	1964 \pm 185
	post (%)	2021 \pm 294**	2179 \pm 302**	2293 \pm 349*
HR (beats/min)	pre	309 \pm 16	305 \pm 17	305 \pm 17
	post (%)	316 \pm 11	317 \pm 9*	317 \pm 9*

*p<0.05 compared with pre date +dP/dt: peak positive dP/dt
**p<0.01 compared with pre date -dP/dt: peak negative dP/dt

Table 10. Direct Effects of Nicorandil (2)

		pre	post
CF	(ml/min)	3.1 \pm 0.6	6.0 \pm 0.8*
LVDC	(μ l/mmHg)	14.3 \pm 7.4	15.9 \pm 7.8

*p<0.01 compared with pre date CF: coronary flow

NIC 投与後有意に増加したが (p<0.01) (Table 10), LVDC 値では有意な変化は認められなかった。

3・5 NIC 濃度の変動

回路中の NIC 濃度は、再灌流直前 1.14 \pm 0.16 mM, 実験終了時 2.20 \pm 1.09 mM, 心筋保護液中 0.89 \pm 0.31 mM であった。

4 考 察

4・1 NIC の薬理作用について

NIC は本邦で開発された硝酸基を持つニトロ化合物であり、狭心症治療薬として用いられてきた。その後の研究で K⁺channel opener (KCO) の作用を持つことが明らかになり¹⁾, その心筋保護作用が注目されるようになった。ATP sensitive K⁺channel は通常は閉じているが、虚血や低酸素状態で細胞内 ATP の減少とともに開く。その結果、心筋細胞内 K⁺が細胞外へ流出し、膜電位の過分極、心筋活動電位の短縮、心筋収縮の減弱を生じ、細胞内のエネルギーを保存し、心筋傷害を軽減すると考えられている。KCO はこの channel を細胞内 ATP レベルと無関係に開放することにより心

筋保護効果を示すと考えられている。また、冠血管に対しては抵抗血管の拡張作用により冠血管抵抗を減少させ、冠血流量の増大を促している。NIC は硝酸基を持つために同じニトロ化合物であるニトログリセリン、ニトロプルシッドなどと比較されるが、これらのニトロ化合物に KCO 作用および心筋保護作用は認められず^{8,21)}, また冠血管拡張作用も guanylate cyclase を介した太い血管の拡張のみで抵抗血管の拡張作用は認められていない。これに対して NIC は硝酸基、KCO 作用の両方を併せ持ち、太い血管と抵抗血管の両方の拡張作用を持つ²²⁾ため、他のニトロ化合物とは根本的に違うと考えられる。

NIC の心筋保護における有効血中濃度は Grover ら¹³⁾, Ohta ら⁴⁾によるとラット摘出心の 25 分間虚血では 300 μ M 以上の高濃度とされ、以後濃度依存的に心筋保護効果が高まるとされている。このため、本研究では確実に効果が期待される 1 mM に血中濃度を調節した。

4・2 NIC の摘出心に対する作用

高濃度の NIC ではその KCO 作用から陰性変力作用

が期待され²³⁻²⁶⁾、NIC-R 群および NIC-I+R 群の再灌流後の心機能に影響を与える可能性がある。一方 Ohta ら⁴⁾、Shiraki ら²⁷⁾ のように NIC の陰性変力作用を否定する報告もあり、評価が一定していない。CF に関してはこれらの報告では、KHB 液灌流下で、いずれも NIC により変化を認めなかったが、血液灌流での報告はない。

NIC の血液灌流心に対する作用の検討結果は Table 9 および 10 に示すごとく、NIC により LVDP, RPP, +dP/dt, -dP/dt, CF, HR が有意に上昇した。特に CF が 2 倍と著明に増加しており、心機能に影響を与えている可能性がある。また高濃度の NIC の作用で血圧が低下している support rat が、カテコラミンなどの陽性変力作用を持つ物質を放出している可能性もあるが、本研究では確認し得なかった。

4・3 虚血・再灌流後の左室収縮機能

左室の収縮機能は LVDP, RPP, +dP/dt の回復率で評価した。NIC-I+R 群は、LVDP および +dP/dt において BV 40 μ l で ISC 群に対して有意に高かった。RPP では BV 40 および 140 μ l で ISC 群に対して有意に高かった。すなわち、特に低左室容量時に NIC は心機能を高めた。この作用は NIC の摘出心に対する機能亢進作用で説明がつけられるが、NIC-R 群の回復率に対しても有意差があることから NIC-I+R 群の左室収縮機能がより保存されていると考えられた。すなわち、心停止中における NIC が有効であると考えられた。

4・4 虚血・再灌流後の左室拡張機能

左室の拡張機能の評価には -dP/dt と LVDC を指標とした。-dP/dt は NIC-I+R 群において、BV 40 で ISC 群、NIC-I 群および NIC-R 群と比較して有意に高かった。しかし、LVDC では各群間に有意差は認められなかった。-dP/dt は左室収縮時からの動的拡張機能を示すと考えられ、特に低左室容量時に NIC はその機能を高めたと考えられた。また、LVDC は容量に対する左室の拡張機能、すなわち、静的拡張機能を示すと考えられるが、NIC の虚血中あるいは再灌流中の投与でその効果は認められなかった。

4・5 冠血流量

ISC 群では、再灌流後 40 分に冠血流量が有意に減少し、no-reflow 現象²⁸⁾が生じていると考えられた。NIC-R 群と NIC-I+R 群では著明に再灌流時の冠血流量は増加した。No-reflow 現象は再灌流に伴う好中球などからの各種のサイトカインによる血管収縮、血管内皮の器質的傷害、好中球による毛細血管の clumping から生じるといわれている^{14,29,30)}。しかし NIC は抵抗

血管拡張作用、Ca 拮抗作用による心筋および血管内皮細胞の保護作用、好中球に対する抑制作用⁸⁾により no-reflow 現象を抑制しようと考えられた。No-reflow 現象の成因の一つとして虚血・再灌流時に増大する心筋浮腫³¹⁾による血管の圧迫も考えられるが、Wilson ら¹⁴⁾や Byrne ら³⁰⁾はこれに否定的である。本研究では再灌流時に有意な CF の増大を認めた NIC-R 群および NIC-I+R 群でも心筋水分含量は他の群との差が認められず、心筋浮腫の no-reflow 現象への関与は否定的であった。この結果は Wilson らおよび Byrne らの報告を支持するものと考えられた。

4・6 心筋高エネルギー代謝

虚血直後の adenine nucleotide では AMP の値が高く、ATP は逆に低下しており虚血中の ATP の消費が反映された。TAN も C 群と比較して有意に低下しており、これは虚血により ADP, AMP などの adenine nucleotide が分解し、細胞外に流出してしまうためであり、心筋傷害の指標と考えられている³²⁾。また NT 群と NI 群に有意差はなく、虚血中の NIC 投与による効果は認められなかった。虚血・再灌流後の各群では ATP および ATP/ADP 比が虚血直後の群に比較して有意に増加していた。TAN は NT 群に比較して ISC 群で有意に低下しており、再灌流傷害による adenine nucleotide の喪失が示唆された。虚血・再灌流後の各群間では TAN に有意差を認めず、NIC が再灌流中の adenine nucleotide の減少に無効であることを示した。ATP/ADP 比はミトコンドリア中の酸化的リン酸化能を表す³³⁾が、NIC-R 群が ISC 群と比較して有意に高く、再灌流中の NIC の投与が ATP の回復に有効であると考えられた。NIC-I+R 群でも ATP/ADP 比が高い傾向にあるが、有意差が認められないのは再灌流後の心仕事量の増大 (RPP) による ATP 消費の増大が影響していると考えられた。

4・7 心筋水分量

NI および NT 群と再灌流後の各群の間に差は認められなかったが、これらの群はすべて C 群に対し有意に水分量が高値を示した。このことから心筋水分量は虚血中に増加し、再灌流中には CF の多少にかかわらず水分量は変化しないと考えられた。NIC は虚血中にも影響を与えなかった。

4・8 NIC の心筋保護効果

以上のように虚血・再灌流傷害に対する NIC の投与は、特に虚血時、再灌流中の双方への投与で有効であった。虚血時または再灌流中の単独投与では、再灌流中投与で ATP 回復が改善されたのみで心機能に対する保

護効果は認められなかった。効果の機序としては虚血時では心筋高エネルギー代謝への関与が予想されたが、本研究では adenine nucleotide に差はなく、虚血中の Ca 代謝の改善などの因子の関与が示唆された。再灌流中では、①本実験系における NIC の陽性変力作用②心筋高エネルギー代謝の回復促進作用で効果があったと考えられた。また文献的には $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機能の活性化による心筋への Ca^{2+} 負荷の軽減⁵⁾ および好中球抑制作用⁶⁾ が報告されており、いずれも KCO の作用と考えられている。

心筋保護液中の NIC については、Irie²⁴⁾ および Sugimoto ら²⁴⁾ によって心筋保護効果が認められているが、 K^+ と NIC の相互作用については次のように説明が可能である。心筋のプルキンエ線維では神経線維と違い、静止電位の大小によって膜のコンダクタンスが変化することが知られている³⁵⁾。すなわち、血清 K^+ 値が高いときには静止電位が減少し、脱分極の際、膜コンダクタンスが増加し、外向きの K^+ 電流が大きくなる。これが再分極電流となり、活動電位は著明に短縮する。NIC の作用は K^+ channel を開放し、外向きの K^+ 電流を増加させることによって膜電位を過分極させ、また脱分極時には再分極電流を増加させ、活動電位の短縮を生じると考えられている。したがって、NIC は高 K^+ の存在下でさらに再分極電流を増加し、活動電位を短縮し、 K^+ の心筋保護作用を増強する可能性があり実験結果に矛盾しない。

5 要 約

1. Support rat を使用したラット摘出心血液灌流モデルを作製し、常温虚血 30 分および再灌流 40 分を行い、NIC 1mM を虚血時、再灌流中、およびその双方に投与しその効果を検討した。

2. 虚血時のみの投与では再灌流後の心機能および心筋高エネルギー代謝の改善は認められなかった。

3. 再灌流中のみの投与では再灌流後の心機能は HR 以外は改善を認めなかったが、ATP/ADP 比の有意な増加が認められ、心筋高エネルギー代謝の改善効果が示唆された。

4. 虚血時、再灌流中双方への投与では、再灌流後の心機能が、特に低左室容量時に著明に改善された。このことは NIC が虚血時、再灌流中双方に対して有効であったことを意味すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導、ご校閲を賜った小松

作蔵教授に深謝するとともに、研究に際しご教示、ご助言をいただいた本学生理学第一講座薮英世教授に深謝いたします。またご協力いただいた安倍十三夫助教授をはじめ教室員各位、お世話になった動物実験施設部の各位に感謝いたします。

参考文献

1. Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983, 305: 147-148.
2. 牧田政明, 小林 毅, 酒井寛人, 佐久間一郎, 安田寿一, 武田洋司, 中谷晴昭, 菅野盛夫. 虚血心筋における細胞外 K^+ と乳酸の蓄積に及ぼす K^+ チャネルオープナーおよびブロッカーの影響—心筋 Microdialysis 法を用いた検討—. *Ther Res* 1991, 12: 1872-1874.
3. Yanagisawa T, Satoh K, Taira N. Circumstantial evidence for increased potassium conductance of membrane of cardiac muscle by 2-nicotinamidoethyl nitrate (SG-75). *Jpn J Pharmacol* 1979, 29: 687-694.
4. Ohta H, Jinno Y, Harada K, Ogawa N, Fukushima H, Nishikori K. Cardioprotective effects of KRN2391 and nicorandil on ischemic dysfunction in perfused rat heart. *Eur J Pharmacol* 1991, 204: 171-177.
5. Warltier DC, Auchampach JA, Gross GJ. Relationship of severity of myocardial stunning to ATP dependent potassium channel modulation. *J Card Surg* 1993, 8 Suppl: 279-283.
6. 本原征一郎, 上島 拓, 玉井秀男, 山形高志, 小田原健一, 上田欽造, 許 永勝, 富田哲也, 小屋光雄. Nicorandil 静脈注射による心行行動態および冠循環動態の変化. *Ther Res* 1989, 10: 1307-1312.
7. 松村泰志, 平山篤志, 山本一博, 三嶋正芳, 児玉和久. Nicorandil の冠行行動態に及ぼす作用. *Ther Res* 1989, 10: 1313-1320.
8. Gross GJ, Auchampach JA, Maruyama M, Warltier DC, Pieper GM. Cardioprotective effects of nicorandil. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992, 20 Suppl 3: S22-S28.
9. Auchampach JA, Cavero I, Gross GJ. Nicorandil attenuates myocardial dysfunction associated with transient ischemia by opening ATP-dependent potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992, 20: 765-771.
10. 河崎春洋, 中村保幸, 三ツ浪健一, 木之下正彦. 虚血・再灌流障害に対する Nicorandil の効果—³¹P-MRS 摘出心灌流標本を用いての検討—. *Ther Res* 1991, 12: 1886-1892.

11. 河崎春洋, 中村保幸, 木之下正彦. ニコランジルの虚血・再灌流心筋保護効果—³¹P NMRスペクトロスコピーを用いた実験的検討—. 心筋の構造と代謝 1992, 14: 335-342.
12. Mitani A, Kinoshita K, Fukamachi K, Sakamoto M, Kurisu K, Tsuruhara Y, Fukumura F, Nakashima A, Tokunaga K. Effects of glibenclamide and nicorandil on cardiac function during ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Physiol* 1991, 261: H1864-H1871.
13. Grover GJ, Sleph PG, Parham CS. Nicorandil improves postischemic contractile function independently of direct myocardial effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990, 15: 698-705.
14. Wilson IC, DiNatale JM, Gillinov AM, Curtis WE, Cameron DE, Gardner TJ. Leukocyte depletion in a neonatal model of cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 1993, 55: 12-19.
15. Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, Harlan JM, Rice CL. Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. *Surgery* 1989, 106: 509-516.
16. Ma X-l, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992, 86: 937-946.
17. 葛谷恒彦, 大江洋史. 虚血—再灌流による血管内皮・白血球相互反応異常—アラキドン酸リポキシゲナーゼ代謝系による調節—. 医学のあゆみ 1991, 157: 288-291.
18. Kawata H, Aoki M, Hickey PR, Mayer Jr JE. Effect of antibody to leukocyte adhesion molecule CD18 on recovery of neonatal lamb hearts after 2 hours of cold ischemia. *Circulation* 1992, 86 Suppl II: II-364-II-370.
19. Tamiya Y, Yamamoto N, Uede T. Protective effect of monoclonal antibodies against LFA-1 and ICAM-1 on myocardial reperfusion injury following global ischemia in rat hearts. *Immunopharmacology* 1995, 29: 53-63.
20. 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. 札幌医誌 1993, 62: 19-29.
21. Nakamura Y, Kojima S, Mori H, Nagata M, Miyazaki T, Miyamori R, Hattori S, Takahashi M. Examination of the direct effects of antianginal agents on the hypoxic canine Myocardium. *Jpn Heart J* 1987, 28: 737-746.
22. Cavero I, Pratz J, Mondot S. K⁺ channel opening mediates the vasorelaxant effects of nicorandil in the intact vascular system. *Z Kardiol* 1991, 80 Suppl 7: 35-41.
23. Yanagisawa T, Hashimoto H, Taira N. The negative inotropic effect of nicorandil is independent of cyclic GMP changes: a comparison with pinacidil and cromakalim in canine atrial muscle. *Br J Pharmacol* 1988, 95: 393-398.
24. Sugimoto S, Puddu PE, Monti F, Schiariti M, Campa PP, Marino B. Pretreatment with the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener nicorandil and improved myocardial protection during high-potassium cardioplegic hypoxia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994, 108: 455-466.
25. 中川正康, 中西 徹, 松岡一志, 鬼平 聡, 田近武彦, 齊藤 崇, 吉田功一, 阿部 徹, 小野一弘, 木村衛, 照井 元, 木村 裕, 伏見悦子, 高橋和人, 池田成昭, 三浦 傳, 阿部芳久, 小野幸彦. 反復性心筋虚血に及ぼす Nicorandil の影響. 心筋の構造と代謝 1991, 13: 283-290.
26. Taira N, Satoh K, Yanagisawa T, Imai Y, Hiwatari M. Pharmacological profile of a new coronary vasodilator drug, 2-nicotinamidoethyl nitrate (SG-75). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1979, 6: 301-315.
27. Shiraki Y, Akima M, Nabata H, Ohba Y, Hoshino E, Sakai K. The hypotensive mechanisms of the new anti-anginal drug, N-(2-hydroxyethyl) nicotinamide nitrate (SG-75) in beagle dogs. *Jpn J Pharmacol* 1981, 31: 921-929.
28. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974, 54: 1496-1508.
29. 神山 宏, 桜井文雄, 今井邦彦, 金古善明, 中野正幸, 小山幸男, 岡本正司, 飯塚利夫, 今井 進, 鈴木忠, 村田和彦. イヌ再灌流心における No-reflow 現象の成因. 心筋の構造と代謝 1990, 12: 329-343.
30. Byrne JG, Smith WJ, Murphy MP, Couper GS, Appleyard RF, Cohn LH. Complete prevention of myocardial stunning, contracture, low-reflow, and edema after heart transplantation by blocking neutrophil adhesion molecules during reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992, 104: 1589-1596.
31. Pogatsa G, Dubez E, Gabor G. The role of myocardial edema in the left ventricular diastolic stiffness. *Basic Res Cardiol* 1976, 71: 263-269.
32. Meno H, Kanaide H, Okada M, Nakamura M. Total adenine nucleotide stores and sarcoplasmic reticular Ca transport in ischemic rat heart. *Am*

- J Physiol 1984, 247: H380-H386.
33. Vary TC, Angelakos ET, Schaffer SW. Relationship between adenine nucleotide metabolism and irreversible ischemic tissue damage in isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1979, 45: 218-225.
34. Irie H. Experimental studies on ischemic injury and reperfusion injury to the cardiac sarcoplasmic reticulum—The myocardial protective effect of nicorandil—. *Jpn Circ J* 1988, 52: 563-569.
35. Noble D 著, 有田 真訳. 心臓拍動の生理—心筋細胞膜イオン電流から心電図まで. 東京, 学会出版センター 1981.
-

別刷請求先:

(〒060) 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 井上聡巳