

## 冷却液冠灌流法による心筋保護とその形態学的評価

大堀克己 岡本史之 岩城裕一  
千葉勉夫 安達博昭 安倍十三夫  
安喰 弘 小松作蔵

札幌医科大学外科学第2講座 (主任 小松作蔵教授)

### Protection of the Myocardium under an Ischemic State by a Two Hour Cold Coronary Perfusion and Morphological Evaluation

Katsumi OHORI, Fumiyuki OKAMOTO, Yuichi IWAKI,  
Michio CHIBA, Hiroaki ADACHI, Tomio ABE,  
Hiroshi AJIKI and Sakuzo KOMATSU

*Department of Surgery (Section 2), Sapporo Medical Collage  
(Chief: Prof. S. Komatsu)*

The effects of a 2 hour coronary perfusion with 0-4°C Ringer's lactate solution to protect the myocardium from ischemia were studied by comparing with non-protected group. During this procedure, extracorporeal circulation was employed to perfuse the body under mild hypothermia at 30°C.

In the protected group of 5 dogs, cardiac arrest was induced after 5 minutes of aortic cross-clamping by coronary perfusion via the aortic root with 0-4°C Ringer's lactate solution at 150 cm H<sub>2</sub>O gravity. Myocardial temperature was maintained around 15°C for 2 hours under an ischemic state. In the non-protected group of 5 dogs, myocardium was allowed to enter an ischemic state around 27°C for 2 hours after aortic cross-clamping.

Light microscopic findings revealed no ischemic changes such as necrosis of the cells, bleeding or edema of the myocardium in both groups.

An electron microscopic examination also revealed no ischemic damage of the cells in the protected group, in contrast, irreversible changes such as severe mitochondrial damage in the non-protected group were seen.

No reduction of succinic dehydrogenase activity was revealed in the protected group. However, a marked decrease of the enzymatic activity was observed in the non-protected group.

In conclusion, the myocardium was shown to be protected under an ischemic state with a 2 hour administration of cold coronary perfusion from the morphological evaluations in dogs.

(Received June 1, 1978 and accepted September 5, 1978)

### 1 はじめに

心臓手術においては、手術野の静止と無血視野とを得るために、心拍動の停止を必要とすることがあり、anoxic arrest の場合、虚血状態にある心筋に不可逆性の障害が発生するのを防ぐためには、心筋保護が必要となる。一方心筋が虚血状態でも安全な時間的限界は、その時の心筋の酸素消費量によって異なる<sup>1)</sup>。また、心筋の温度の低下にともなって、心筋の酸素消費量は減少し、ついには心臓の拍動も停止する<sup>1,2)</sup>。これらの事実に基づき、われわれは心筋保護を目的として、冷却液を用いて冠血管床を灌流し、

心臓を冷却する方法を実験的に検討した。すなわち、完全体外循環下に、2時間の大動脈遮断を行い、この間、0~4°Cの乳酸加リンゲル液を遮断部位より中枢側の大動脈根部へ滴下して冠灌流を実施した。その後、心筋の障害の程度を検索するために、心臓を冷却した群と、冷却しなかった群(大動脈遮断のみ実施)との2群に分けて、心筋の組織学的および組織化学的变化について無処置の心筋を対照として比較検討した。

### 2 実験動物および方法

実験には雑種成犬11頭を使用した。ペントバルビター

ル (25 mg/kg) による静脈麻酔後、気管内挿管をし、ハーバード呼吸器へ接続して調節呼吸を行った。犬を背位臥に固定し、胸骨を正中切開し、さらに心膜を縦切開して心臓を露出した。対照としての1頭はそのまま心臓を摘出し、光顕、電顕および組織化学的検索を行った。他の10頭に対しては、30°Cの軽度低体温による完全体外循環下に、2時間の上行大動脈遮断を行った。

ヘパリンを3 mg/kg 静注後、上行大動脈へ送血用カニューレを挿入し、また、右心房より上、下大静脈へ脱血用カニューレを挿入し、それぞれ、動静脈回路へ接続した。ついで、完全体外循環に備えて、上、下大静脈に綿テープをまわし、冠灌流液を排除するために右心房より10号のアンジオ用カテーテル (NIH) を、また、左心房より左室内へ、ventの目的を兼ねて、7号のアンジオ用カテーテル (NIH) をそれぞれ挿入した。人工肺は、デスポーザブルの気泡型人工肺 (札幌医大式)<sup>3)</sup> を、ポンプはローラー型を使用し、人工肺、回路の充填液は同種血および乳酸加リンゲル液を用いて20%の稀釈率となるようにした。静脈回路には、デスポーザブルの熱交換器 (Travenol Laboratories Inc.) 1個を組み込んだ。

完全体外循環開始後、電気的誘発により心室細動とし、左心室前壁に thermometer の針型プローブ (日本光電製) を心内膜下筋層に位置するように刺入し、連続して心筋温度を測定した。心筋温度測定後、上行大動脈を遮断し、5頭の心臓冷却群に対しては、0~4°Cの乳酸加リンゲル液 (pH 7.7~8, 浸透圧 266 mosm.) を150 cmの高さより、70 ml/min. の速度で遮断部位より中枢側の上行大動脈へ滴下して冠灌流を行い、2時間の血流遮断中、心内膜下筋層の心筋温度が15°Cに維持されるようにし、必要に応じて間欠的に0~4°Cの乳酸加リンゲル液を滴下した。冠血管床を灌流した冷却液は、右心房および左室内へ挿入されたカテーテルにより体外へ排除された。これに伴って一部失われる人工肺充填血は、その都度、追加補充した。一方、5頭の心臓非冷却群に対しては、2時間の動脈遮断中、特別な処置を加えずに観察した。体外循環中は、人工肺貯血槽内の血液を30分毎に採取して、一般検血、血清電解質、血液ガス測定を行い、必要に応じて、酸化槽内の酸素濃度を変え、また、重曹水の投与を行った。大動脈遮断解除10分前より、人工肺血液を33~35°Cまで加温して遮断鉗子を除去した。心筋温度が30°C以上になり、心室細動が強くなるのを待って除細動を行ったが、この間、心マッサージ、昇圧剤の投与は行わなかった。心拍動再開の有無を心電図で観察後、心臓摘出を行った。

## 2.1 組織学的検索

### 2.1.1 光顕的検索

心臓冷却、非冷却群各5例、対照1例につき検索した。摘出心はただちに、心尖部より1 cm間隔で横断し、3 cmの部位の横断面において、左心室前壁、後壁、中隔、右心室前壁の4カ所より組織片を採取し、4°Cの10%ホルマリン溶液 (pH 7.4) 中で72時間固定した。アルコール脱水後、パラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行い検索した。

### 2.1.2 電顕的検索

心臓冷却、非冷却群各3例、対照1例につき検索した。摘出心の心尖部より3 cmの横断面において、左心室前壁の心内膜下、心外膜下筋層の2カ所より組織片を採取し、約1 mm<sup>3</sup>に細切後、ただちに4°Cの0.1%オスミウム酸溶液中で2時間固定した。冷エタノールで脱水し、プロピレンオキシドを経てエポン包埋した。Ultratome (4801, 4802-A, LKB-PRODUKTER) でガラスナイフを用いて薄切後、クエン酸鉛で染色し、電子顕微鏡 (JEM-100 C, 日本電子製) で観察撮影した。

## 2.2 組織化学的検索

心臓冷却、非冷却群各5例、対照1例につき検索した。摘出心の心尖部より3 cmの横断面において、左心室前壁、後壁、中隔、右心室前壁の4カ所より組織片を採取し、-80°Cのn-ヘキサン溶液へ投入して急速に凍結させた。凍結した組織片をクリオスタット (TM-500, 立安低温工業所製) 内で10 μmに薄切した。こはく酸脱水素酵素 (SDH) の活性を検索するために、基質反応液を Nachlas らの方法<sup>4)</sup> により作成し、染色瓶1個につき、次の試薬量を使用した。

{	0.2 M こはく酸ナトリウム	15 ml
	0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	15 ml
	ニトロ-BT (1 mg/ml)	30 ml

同一染色瓶中に、心臓冷却群、非冷却群、対照の3種類の切片をはったスライドガラスを各3枚ずつ入れ、この染色瓶を37°Cの恒温浴槽内に45分間浸漬し、その後標本を10%ホルマリン溶液で固定した。

## 3 実験結果

上行大動脈遮断後、約300 mlの0~4°C乳酸加リンゲル液で冠灌流することにより、5分後には心内膜下筋層の温度は15°Cに下降し、同時に心臓は弛緩した状態で停止した。以後は心筋の温度の上昇にともなって、5~10分毎に50~100 mlの冷却液による間欠的灌流で温度を13~15°Cに保つことが可能であった。心臓の冷却灌流のために使用された乳酸加リンゲル液の総量は、約1800 mlであった。一方、注入量の80%が体外に除去されたが、一部分は主として、左心室 vent を経て、人工肺内へ流入したものと

考えられる。また、この冠灌流液の体外排除にともなう、血液も一部分失われるために、体外循環終了までに、全例平均 400 ml の血液を人工肺へ追加補充する必要があった。心臓非冷却群における心筋の温度は幾分、室温の影響を受け、2 時間の冠動脈血流遮断中、全例が平均 27°C で経過した。体外循環終了時の一般検血、血清電解質の測定値は、体外循環開始前に比較して有意の変動は認めなかった。

心臓冷却群は、大動脈遮断解除後、いずれも力強い心室細動を生じ、心筋の温度の上昇にしたがって、全例、自然に心臓の拍動が再開した。一方、非冷却群では、全例、1 回の除細動で心拍動は再開したが、心臓の収縮は弱かった。

### 3.1 肉眼的所見

実験に使用した成犬 11 頭の心臓において、左心室筋層の肥厚は認められず、左心室、右心室重量比は  $1.46 \pm 0.05$  であった。心臓冷却、非冷却群ともに、心内膜下筋層をはじめとして、どの心臓の部位にも、手術操作に起因する以外の出血は認められなかった。

### 3.2 組織学的所見

#### 3.2.1 光顕的所見

心臓冷却、非冷却群ともに、心筋細胞の変性壊死はみられず、また間質に出血も認められなかった(図-1, 2)。左心室前壁、後壁、中隔、右心室前壁の各部位による差異もなく、また、心臓の同一部位においても、心内膜側と心外膜側とで相違のある変化は認められなかった。

#### 3.2.2 電顕的所見

心臓冷却群では、ミトコンドリアの形態に変化はなく、グリコーゲン顆粒も豊富で、対照との間に相違を認めなかった(図-3)。これに対して、非冷却群では、ミトコンドリアの腫大変形を呈するものがほとんどで、完全に内部構造が破壊したものが散在している。対照と比較してミトコンドリアの基質の density および周囲のグリコーゲン顆粒は減少している。一方、筋原線維は整然と配列している(図-4)。

### 3.3 組織化学的所見

心臓冷却群は対照と同様に暗青紫色に染色されたが、非冷却群では青紫色は呈するものの明確な染色性の低下が認められた(図-5)。すなわち、冷却群では対照と同程度に SDH 活性が保持されているのに対して、非冷却群では SDH 活性の低下していることが明かである。一方、両群とも、心臓の部位による染色性の相違は認められなかった。

## 4 考 察

心臓を冷却して、虚血による心筋障害の発生を防ごうとする手段には、心臓表面を直接冷却する方法<sup>5-8)</sup>と、冷却液による冠灌流法<sup>1,9-11)</sup>との二つの方法があるが、前者の

方法は、冷却のための細水に接触する心外膜側の心筋細胞が変性壊死に陥る可能性があり、長時間の実施には制約がある。冷却液による冠灌流法は Urschel and Greenberg<sup>1)</sup>によって、はじめて報告されたが、彼らによると、心筋温度が 16°C 以下になると、心臓の収縮も電気的活性も消失するという。われわれの実験でも、心筋温度が 15°C になると、心室細動は消失し、心臓は弛緩した状態で停止した。この方法において重要なことは、大動脈遮断後、いかに短時間で心停止に至るまで心臓を冷却することができるか、また、虚血中、心筋温度を十分低温に維持することができるかの 2 点である。

Urschel and Greenberg<sup>1)</sup>は、1°C の乳酸加リンゲル液による冠灌流に、2°C の生理的食塩水で心臓表面を冷却する方法を併用し、冷却開始 1 分で心筋温度を 16°C とし、心臓を停止させている。われわれは、0~4°C の乳酸加リンゲル液による冠灌流のみで、心筋温度を 15°C とし、心停止を発生させるまでに 5 分を要した。この間に用いた乳酸加リンゲル液は 300 ml であったが、Urschel and Greenberg<sup>1)</sup>もほぼ同様で 400 ml 程度であると述べている。

また、われわれは心筋温度を低温に維持することを容易にするために、30°C の軽度低体温で体外循環を行ったが、Urschel and Greenberg<sup>1)</sup>はさらに、Tygon で心臓を包み、周囲組織から隔てることによって、冷却効果をあげている。

Todd and Tyers<sup>11)</sup>は、60 分の虚血に対して本法を用いたが、虚血後、心機能および組織の両面からみて、虚血前の状態には戻らず、また、不整脈が多発したと述べ、乳酸加リンゲル液中の乳酸と低い pH が心筋組織のアシドーシスを進展させたためではないかと推論している。われわれは、pH が 7.7~8.0 の乳酸加リンゲル液を使用したか、0~4°C の低温でも粘稠度が小さく、急速に心筋温度を下げ、心停止を発生させることができ、虚血後も直ちに心拍動が再開し、組織学的にも非虚血対照と比較して、相違を認めなかった。同様に、Tyers ら<sup>9)</sup>も乳酸加リンゲル液を用いた冠灌流法の有効性を認めている。虚血後の心機能の低下、組織学的な変化および不整脈の多発はむしろ、虚血中の心筋温度が十分に低温に維持されていなかったことによる影響が大きいものと推定される。

心臓を摂氏何度まで冷却することが可能であるかということが問題であるが、Urschel and Greeberg<sup>1)</sup>は、1~2°C の乳酸加リンゲル液と生理的食塩水とにより、冠灌流法と心臓表面冷却法を併用して、心筋温度を 4°C まで下降させることができたと報告している。しかし、われわれの実験においては、0~4°C の乳酸加リンゲル液による冠灌流で、心筋温度が 15°C まで下降するのに 5 分を要し、さ

らに 15°C 以下とするためには大量の冷却液と時間を必要とし、なおかつ、13°C まで冷却するのが限度であった。一方、Fuhrman ら<sup>2)</sup>は、ラットの心筋を用いた研究により、37.7°C における心筋の酸素消費量に対して、15°C においては、その 21% に、10°C ではさらに 10% に消費量が減少すると報告している。したがって、15°C より 10°C まで努力して心筋温度を下げても、わずかに、酸素消費量を 10% 減少させることができるのみである。これらの点から、臨床においては、心筋温度を 15°C まで下降させることを目標として心臓を冷却することで十分と考えられる。

ついで、心筋保護を必要とする大動脈遮断時間の設定であるが、大多数の心臓手術においては、1 時間を越えることは少ないが、多弁置換再手術あるいは合併冠動脈バイパス術においては、1~2 時間にわたる虚血状態が発生することがある。これらの点を考慮すると、2 時間の冠動脈血流遮断による不可逆的な障害から心筋を保護することができれば、臨床上の必要性は満たされるものと考えられる。

Iyengar ら<sup>12)</sup>は、60~70 分の大動脈遮断により、心内膜下筋層に出血性壊死が生じたことを報告しているが、これに対して、われわれの実験では、2 時間におよぶ虚血にもかかわらず、冷却群はもちろんのこと、非冷却群においてさえ、肉眼的にも光顕的にも、心筋には、出血、壊死などの変化は認められなかった。この相違の生じた原因は、彼らが常温下で体外循環を行ったのに対して、われわれは、軽度低体温による体外循環を実施したことにあると考えられる。すなわち、大動脈遮断中、非冷却群の心筋温度は 27°C で経過したが、一方、Iyengar ら<sup>12)</sup>の実験では、33°C 以上はあったものと推定される。27°C の低温のために、心筋の酸素消費量が抑制され、そのために、常温の 2 倍もの時間で心筋が虚血にさらされているながら、肉眼的にも光顕的にも明かな変化を呈する程の障害をうけなかったものと考えられる。しかし、電顕的所見は対照と比較するまでもなく、ミトコンドリアは腫大変形し、内部のクリスタの配列も乱れ、基質の density も減少していた。Jennings ら<sup>13)</sup>によれば、このような電顕所見は、30 分以上の常温における虚血によって生じた細胞の変化に相当し、これは不可逆的な障害であると述べている。

SDH<sup>14)</sup>は心筋細胞のミトコンドリアに局在する酵素で、心筋の虚血によりその活性の低下することが知られているが、非冷却群では対照と比較して明かな低下を認めた。

非冷却群では以上の電顕的所見、SDH 活性の低下などの心筋障害の存在を裏付けるように、大動脈遮断解除後の心臓の収縮は弱かった。一方、冷却群においては、ミトコンドリアをはじめとした細胞内構造物には変化を認めず、同様に、SDH の活性も低下を認めなかった。このように

心筋が十分に 2 時間の虚血より保護されたことは、冠血流再開後の力強い心拍動によってもうなづかれる。

冷却液を用いた冠灌流による心筋保護の方法は、われわれの実験でも、その有効性を確認することができたが、留意しなければならぬことは、以上の研究が正常犬に対してのみ行われていることで、日常の临床上、心筋保護が問題となるのは、左心室肥大あるいは不全心に対してであり、したがって、本法が臨床に実施される前には、さらに肥大心などのモデル犬でその有効性が検討されなければならない。

## 5 ま と め

術中における虚血によって生ずる心筋障害を防ぐために、冠血管床を利用して冷却液を灌流させ、心筋代謝を抑制する方法は、心臓の組織学および血行力学的観点からみて、心筋の保護法としては、きわめて有効な手段であると考えられる。そこで、われわれは、雑種成犬を用いて、軽度低体温下に 2 時間の上行大動脈遮断を行い、この間、冷却液による冠灌流を行った群と灌流を行わなかった群とに分け、虚血後の両群の心筋を組織学および組織化学的に検討しつぎの結論を得た。

5・1 大動脈遮断後、0~4°C の乳酸加リンゲル液を 150 cm H<sub>2</sub>O の圧で大動脈根部より注入して冠灌流を行ったところ、5 分後には、心筋温度が 15°C まで下降し、心停止を来した。

5・2 2 時間の心筋虚血中、心筋温度を 15°C に維持することにより、虚血後、組織学および組織化学的所見からみて、心筋の障害は認められなかった。

5・3 冷却液による冠灌流を行わなかった群では、心筋温度が 2 時間の虚血中、27°C 前後で経過し、電顕的所見では不可逆性の変化が認められ、SDH 活性も明らかに低下した。

5・4 乳酸加リンゲル液は 0~4°C の低温でも粘稠度が増大せず、冠血管床の冷却液として有効であった。

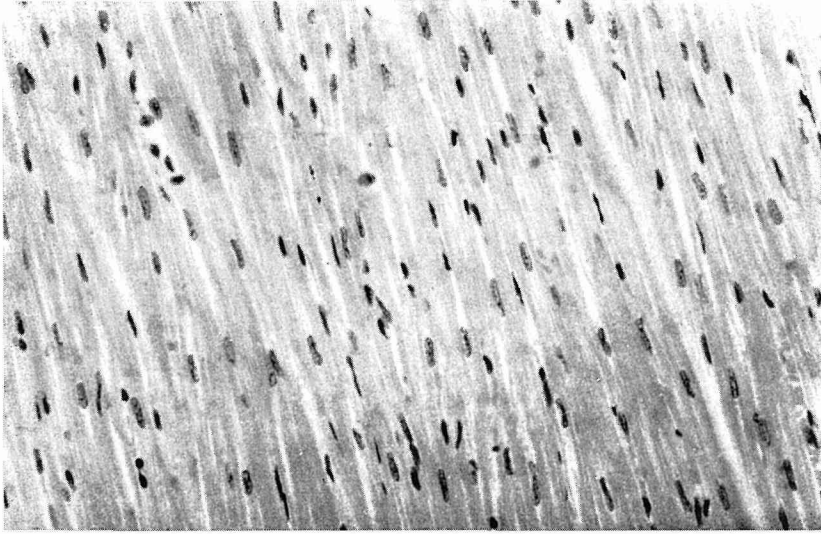
5・5 冷却液を用いた冠灌流法による心筋保護における有効性は、さらに肥大心、不全心の実験モデルで検討される必要がある。

稿を終るに臨み、ご指導、ご協力いただいた病理学講座、小野江為則教授、伝法公磨講師に感謝致します。

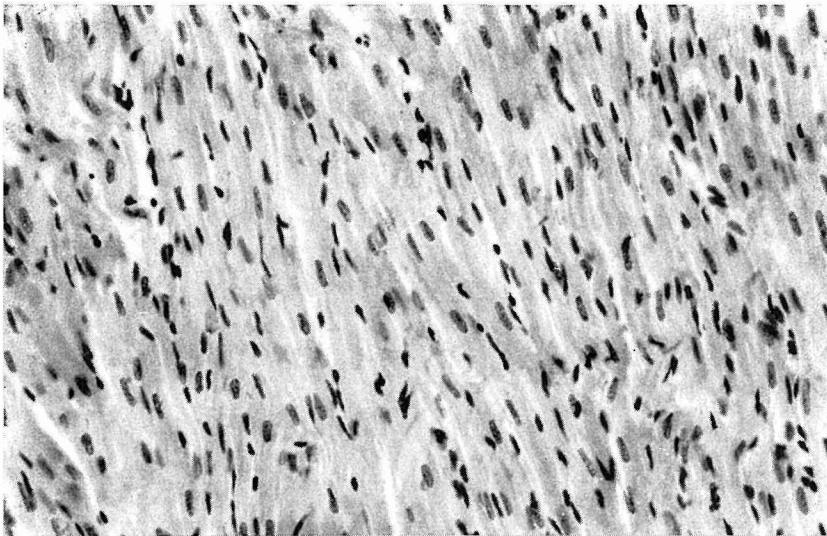
## 文 献

1. Urschel, H. C. Jr. and Greenberg, J. J.: Differential cardiac hypothermia for elective cardioplegia. *Ann. Surg.* **152**, 845-855 (1960).
2. Fuhrman, G. J., Fuhrman, F. A. and Field, J.:

- Metabolism of rat heart slices, with special reference to effects of temperature and anoxia. *Am. J. Physiol.* **163**, 642-647 (1950).
3. 長谷川正, 大堀克己, 長谷川恒彦, 宇野弘昌, 金子正光: All-In-One 人工肺による稀釈体外循環. *臨床外科* **26**, 345-352 (1971).
  4. Nachlas, M. M., Tsou, K. C., De Souza, E., Chang, C. S. and Seligman, A. M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new P-Nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420-436 (1957).
  5. Griep, R. B., Stinson, E. B. and Shumway, N. E.: Profound local hypothermia for myocardial protection during open-heart surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **66**, 731-741 (1973).
  6. Cohn, L. H. and Collins, J. J. Jr.: Local cardiac hypothermia of the myocardial protection. *Ann. Thorac. Surg.* **17**, 135-140 (1974).
  7. Brody, W. R. and Reitz B. A.: Topical hypothermic protection of the myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* **20**, 66-71 (1975).
  8. 村上泰治: 心筋局所冷却法に関する実験的研究, とくに左室肥大心の局所冷却について. *日胸外会誌* **24**, 894-908 (1976).
  9. Tyers, G. F. O., Hughes, H. C. Jr., Todd, G. J., Williams, D. R., Andrews, E. J., Prophet, G. A. and Waldehausen, J. A.: Protection from ischemic cardiac arrest by coronary perfusion with cold Ringer's lactate solution. *J. Thorac. Cardiovasc.* **67**, 411-418 (1974).
  10. 川上敏晃, 石坂昌則, 高橋順一郎, 黄 書成, 竹内克彦, 松山陸奥彦, 松倉裕美, 本間伏价, 片岡和夫, 笹 尚, 田村正秀, 黒島振重郎, 杉江三郎: Modified Krebs 液の灌流心筋冷却による心筋 Viability の保存効果. 一基本的実施手技と阻血心停止 120 分後の蘇生状態の検討一. *胸部外科* **29**, 27-33 (1976).
  11. Todd, G. J. and Tyers, G. F. O.: Amelioration of the effects of ischemic cardiac arrest by the intracoronary administration of cardioplegic solutions. *Circulation* **52**, 1111-1117 (1957).
  12. Iyengar, S. R. K., Ramchand, S., Charrette, E. J. F., Iyengar, C. K. S. and Lynn, R. B.: Anoxic cardiac arrest: An experimental and clinical study of its effects, part I. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **66**, 722-730 (1973).
  13. Jennings, R. B., Baum, J. H. and Herdson, P. B.: Fine structural changes in myocardial ischemic injury. *Arch. Path.* **79**, 135-143 (1965).
  14. Nachlas, M. M. and Schnitka, T. S.: Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Amer. J. Path.* **42**, 379-405 (1963).



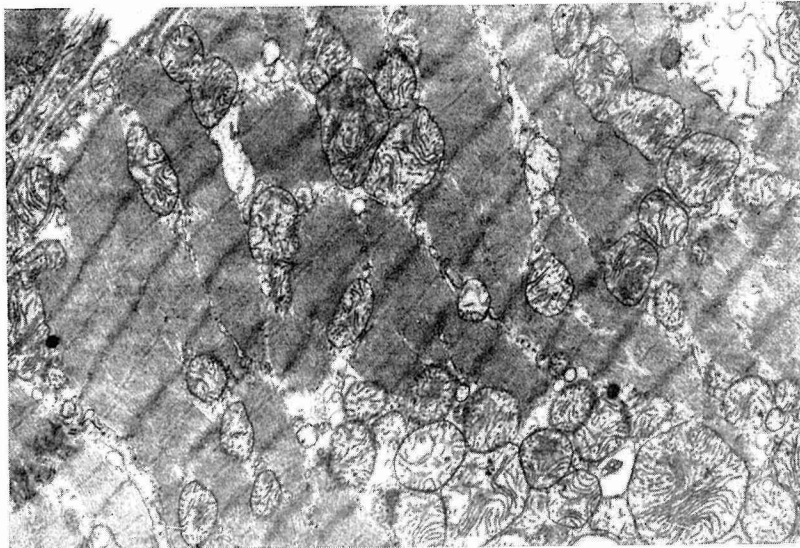
図一1 心臓冷却例 (左心室前壁, 心内膜下筋層). 心筋細胞の変性壊死はみられず, 間質への出血も認められない (光顕, H-E 染色,  $\times 250$ ).



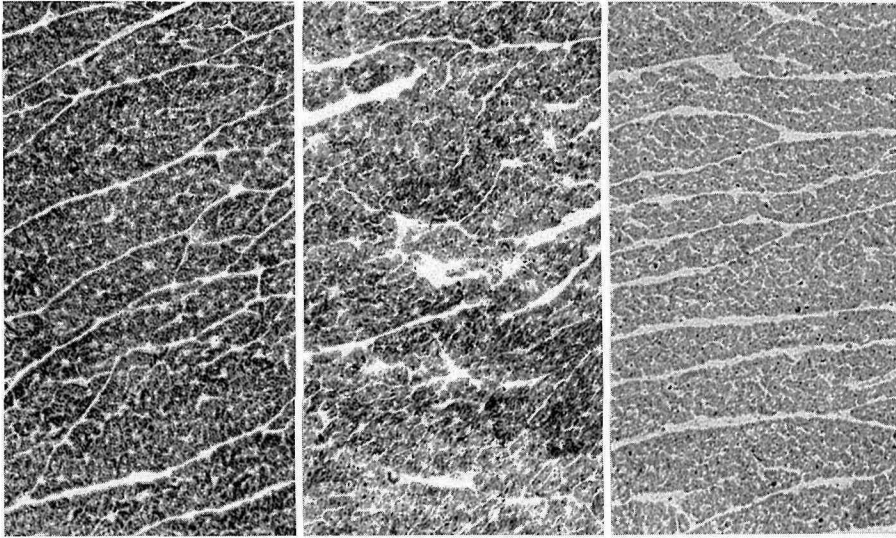
図一2 心臓非冷却例 (左心室前壁, 心内膜下筋層). 心筋細胞の変性壊死はなく, 間質に出血, 浮腫も認められない (光顕, H-E 染色,  $\times 250$ ).



図—3 心臓冷却例 (左心室前壁, 心内膜下筋層). ミトコンドリアの形態に変化はなく, 周囲のグリコーゲン顆粒も豊富である. 筋原線維は整然と配列している (電顕,  $\times 8300$ ).



図—4 心臓非冷却例 (左心室前壁, 心内膜下筋層). ミトコンドリアは腫大変形し, 内部のクリスタの配列は乱れており, 基質の density は減少している. ミトコンドリア周囲のグリコーゲン顆粒も対照に比較して減少している (電顕,  $\times 5000$ ).



図—5 左心室前壁，心内膜下筋層のSDH活性。対照（左），心臓冷却例（中央），非冷却例（右）。冷却例は対照と同様に暗青紫色に染色されたが，非冷却例では青紫色は呈するものの明確な染色性の低下が認められた（光顕，SDH染色， $\times 100$ ）。