

血液心筋保護下再灌流時における高濃度

phosphodiesterase III 阻害薬

選択的投与による cyclic AMP 補充の有効性

—— 心筋虚血再灌流障害に対する新たな心筋保護戦略 ——

黄 義 浩 森 田 紀代造 長 堀 隆 一

東京慈恵会医科大学心臓外科学講座

(受付 平成 18 年 11 月 8 日)

CYCLIC AMP AUGMENTATION WITH A HIGH-DOSE

PHOSPHODIESTERASE III INHIBITOR

IN TERMINAL WARM-BLOOD CARDIOPLEGIA

—— A NEW STRATEGY FOR MYOCARDIAL PROTECTION

AGAINST ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY ——

Yoshihiro Ko, Kiyozo MORITA, and Ryuichi NAGAHORI

Department of Cardiovascular Surgery, The Jikei University School of Medicine

Phosphodiesterase (PDE) III inhibitors have a myocardial protective effect by altering various cellular functions. However, caution regarding calcium influx due to increased myocardial cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is essential. We hypothesized that myocardial ischemia/reperfusion injury could be limited by adding a PDE III inhibitor to the terminal warm-blood cardioplegia (TWBCP) solution. Twenty-five infant piglets were placed on cardiopulmonary bypass (CPB). After 90 minutes of cardiac arrest with a single dose of a cold crystalloid cardioplegia solution, the animals were weaned from CPB after 30 minutes of reperfusion. The TWBCP solution was given before aortic unclamping, and the animals were divided into the following 5 groups: group 1, control; group 2, TWBCP; group 3, TWBCP with amrinone; group 4, low-Ca TWBCP; and group 5, low-Ca TWBCP with amrinone. Left ventricular contractility and expansion were evaluated by recording pressure-volume loops before and after CPB. The blood levels of troponin-T and creatine kinase were measured as markers of myocardial injury, and antioxidant reserve capacity was determined from the blood and myocardial levels of lipid peroxide. Myocardial cAMP production was used to assess the influence of the PDE III inhibitor. We also measured the coronary pressure during TWBCP and the total current required for cardioversion. Significant improvement of cardiac functions occurred in the amrinone and low-Ca groups. In particular, the amrinone groups showed the following biochemical changes: an increase of myocardial cAMP ($p < 0.05$, group 5 vs. group 4; $p < 0.01$, group 5 vs. group 1) and suppression of the lipid peroxide level after reperfusion ($p < 0.05$, group 5 vs. group 4; $p < 0.05$, group 3 vs. group 2). The amrinone groups showed a low coronary pressure during TWBCP and spontaneous cardioversion after reperfusion. We conclude that ischemia or reperfusion of both deplete myocardial cAMP, leading to impaired Ca handling and to cardiac dysfunction. A high dose of a PDE III

inhibitor in the TWBCP solution replenished myocardial cAMP and promoted rapid and sustained myocardial functional recovery, increased coronary flow, and inhibited oxidative damage. Decreasing the calcium content of the TWBCP solution was also useful for preventing ischemia/reperfusion injury.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 27-40)

Key words: blood cardioplegia, cyclic AMP, O₂ free radical, ischemic reperfusion injury, phosphodiesterase III inhibitor

I. 緒 言

開心術の成績向上を目標にこれまで多くの心筋保護法が開発されたなか、Buckberg ら¹⁾の提唱する統合型血液心筋保護法 (integrated blood cardioplegia) の有効性が認められ、現在、広く普及するに至っている。一方、小児開心術領域においては、心筋の構造や機能、代謝に関する未熟性²⁾⁻⁴⁾に加えて手術操作の利便性を考慮した場合、理想の心筋保護法はいまだ明確ではなく、従来の間欠的冷却晶質液心筋保護法 (intermittent cold crystalloid cardioplegia) を採用している施設も多い。しかし、近年増加傾向にある重症疾患や手術の複雑化に伴う長時間手術における従来の手法には限界が生じており、新たな心筋保護戦略の開発が急務とされる。本研究で用いた amrinone などの phosphodiesterase (PDE) III 阻害薬は、おもに心筋や血管平滑筋に局在する PDEIII を特異的に阻害することにより、細胞内の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を蓄積させ、強心および血管拡張作用を発現する⁵⁾⁶⁾。PDE III 阻害薬は、本来、心不全治療薬として開発、臨床使用されたものであり、術中の虚血再灌流による心筋障害自体の軽減や myocardial stunning の予防を期待するものではなかった。しかし、これまでの研究において、細胞内の Ca handling⁷⁾⁸⁾、血管平滑筋弛緩⁹⁾、血小板凝集抑制¹⁰⁾、好中球脱顆粒抑制¹¹⁾、superoxide 産生抑制¹²⁾¹³⁾、cytokine 分泌調節¹⁴⁾といった多彩な細胞機能制御作用も有するとされており、多くの側面で心筋保護効果、心機能改善効果が期待できる。一方、同薬剤を虚血再灌流時に投与する際、心筋細胞内の cAMP 増加による再灌流直後の Ca overload 発現¹⁵⁾¹⁶⁾は、最も危惧すべき点であり、本法の有効性については心機能に対する Ca²⁺制御の影響も加えて検討する必要がある。今回、cold

crystalloid cardioplegia (CCP) の単回投与による長時間心停止、心筋虚血後に、血液心筋保護下再灌流 (terminal warm blood cardioplegia reperfusion) 時に高濃度 PDE III 阻害薬を投与する新たな心筋保護法の有効性を前臨床的な実験モデルを用いて検討した。

II. 対象と方法

1. 実験モデル

Large White×Landrace×Duroc 種ブタ (生後 1 カ月、体重 10 kg~12 kg) 25 頭を対象として本実験に用いた。Ketamine hydrochloride 4 mg/kg の静脈内投与後、気管内挿管を行い、以後 1.0~1.5% の sevoflurane 使用下に人工呼吸器 (アコマ社製、ACE-300) による調節呼吸とした。左大腿静脈より中心静脈圧測定用カテーテルを挿入し、pancronium bromide 0.3 mg/kg, heparin sodium 0.3 ml/kg を静脈内投与した。ついで左大腿動脈より大動脈圧測定用カテーテルを挿入した。胸骨正中切開を行い、心膜切開して左心耳より左心房内に左房圧測定兼左房ベント用チューブを挿入した。左室心尖部より microtip catheter pressure transducer (Miller 社製) を左室内に挿入し、左室内圧測定用とした。左室自由壁表面の長軸短軸上最も離れた 4 カ所に crystal tip (Sonometrics 社製) を装着し、sonomicrometry による左室容量測定用とした。奇静脈より冠静脈洞内にカテーテルを留置し、血液採取に用いた。体外循環は、右総頸動脈から 12~14 Fr の経皮的補助循環用送血カニューレ (Medtronic 社製) を挿入、右心房内に 24 Fr の Pacifico 型脱血カニューレを挿入して人工心肺 (Terumo 社製、膜型肺: CapiioxSX SX10, ローラー型ポンプ: Advanced Perfusion System 1) に接続し、肺動脈内にベントチューブを留置した。充填液には heparin を添加した同種新鮮血および Ringer 液

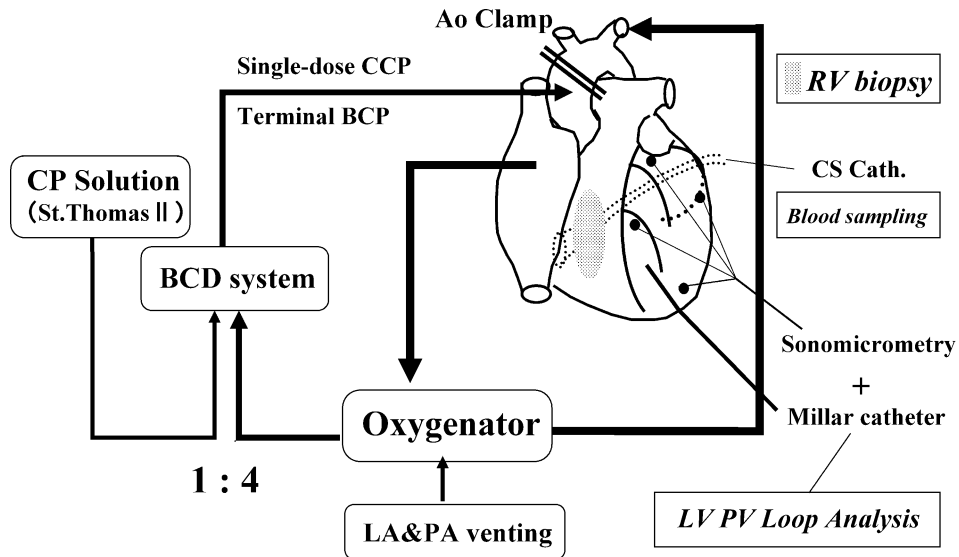


Fig. 1. Experimental model

Large White×Landrace×Duroc piglets (1 month, 10~12 kg)

CCP: cold crystalloid cardioplegia, BCP: blood cardioplegia, CP: cardioplegia, BCD: blood cardioplegia delivery, LV: left ventricle, RV: right ventricle, LA: left atrium, PA: pulmonary artery, CS: coronary sinus

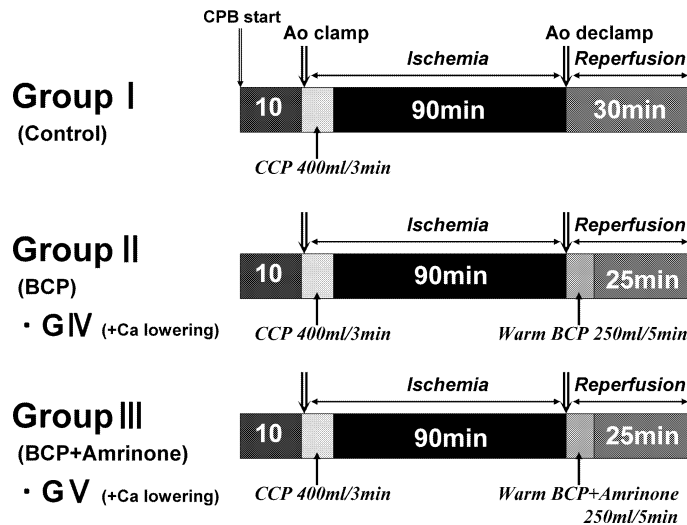


Fig. 2. Experimental protocols

CCP: Miotector®, BCP: Blood 200 ml + Miotector® 50 ml + KCL 5 ml

BCP + Amrinone: BCP + Amrinone 1.5 ml, Ca lowering: BCP + ACD 12 ml

を用いて希釈率を 25% とした。Terminal warm blood cardioplegia (TWBCP) は専用回路により体外循環血液と晶質液心筋保護液を 4:1 で混合して用いた。完全体外循環中は左房および肺動脈カントからの吸引血も静脈回路に回収した

(Fig. 1)。

2. 実験プロトコールおよび実験群

実験プロトコールを Fig. 2 に示す。体外循環開始 10 分間において、体外循環中の送血量は 1.5 ~ 2.0 l/min/m² とし、送血温は常温に保った。こ

の間、動脈圧は 50~80 mmHg, 中心静脈圧 0~5 mmHg, PH 7.35~7.45, PaCO₂ 35~45 mmHg, Ht 20~25% となるように調節した。血行動態の安定を確認後, 上行大動脈を遮断, 冷却 St. Thomas II (持田製薬社製, Miotector®) を大動脈基部に装着した心筋保護回路から流量 400 ml/3 min, 灌流圧 50~80 mmHg で注入し, 心停止を得た。心筋虚血は 90 分間とし, 氷片による心臓内の局所冷却を併用した。この間, 心筋保護液の追加投与はなしとした。大動脈遮断解除後 3 分までに洞調律の自然復帰を認めない場合, 電氣的除細動を用いて洞調律に復帰させ, 遮断解除後 30 分で人工心肺離脱を行った。心血管作動薬は用いなかった。また, 後述の blood cardioplegia (BCP) 使用群においては, warm BCP reperfusion を 250 ml/5 min で注入後に大動脈遮断を解除した。

実験群は大動脈遮断解除直前の心筋保護液の内容により以下の 5 群とし, 各群とも 5 頭での検討とした。

I 群 (Control): Terminal warm BCP reperfusion なし

II 群 (BCP): Terminal warm BCP (= Blood 200 ml + Miotector® 50 ml + KCL 5 ml)

III 群 (PDEIII inhibitor): Terminal warm

BCP + amrinone 1.5 ml

IV 群 (low Ca BCP): Terminal warm BCP + acid citrate dextrose solution (ACD) 12 ml

V 群 (low Ca PDEIII inhibitor): Terminal warm BCP + ACD 12 ml + amrinone 1.5 ml

なお, 心筋保護液の電解質は K⁺: 16~17 mmol/l, Ca²⁺: 1.1~1.2 mmol/l (II, III 群), low Ca²⁺: 0.4~0.5 mmol/l (IV, V 群) で調節とした。Ca 調整は ACD を BCP と reserver 内で混和して行った。Amrinone の添加量は, amrinone とヒト血漿蛋白との結合率が *in vitro* で約 50% であることも加味し, BCP における実測最終濃度が有効血中濃度下限の 15 倍 (15,000 ng/ml) となる様に設定した。

3. 測定項目および方法

1) 心機能

大動脈圧, 左房圧, 中心静脈圧は各々 transducer を用いて測定し, 心拍数とともに polygraph system (日本光電社製: RCM3000) に記録した。miller catheter および sonomicrometry より得られる左室内圧, 左室容量から, 経時的に pressure volume loop を測定用コンピュータに記録した。また, 下大静脈に通したテープを牽引する



Fig. 3. Analysis of LV pressure volume loops by CardioSOFT®

ことで静脈還流による前負荷を変化させ、左室収縮能および拡張能の指標である end-systolic elastance (Ees) と time constant of isovolumic relaxation (Tau) を CardioSOFT® (Sonometrics 社製) で解析した (Fig. 3)。心機能測定は体外循環前、再灌流後 30 分に行い、全項目において体外循環前の測定値に対する体外循環離脱後の値の回復率 (%) として求めた。

2) 血液生化学 (creatinine kinase, troponin-T, lactate, lipid peroxide)

大動脈遮断前、遮断解除直後、遮断解除 10 分後、遮断解除 30 分後に冠静脈洞血を採取し、全項目において大動脈遮断前を基準にした変化率 (%) で示した。

creatinine kinase (CK) は紫外外部吸光度分析による UV 法、troponin-T は電気化学発光免疫測定法による ECL-IA 法、lactate は lactate oxidase, peroxidase による酵素法、lipid peroxide (LPO) は hemoglobin methylene blue 法を用いて定量測定し、各群間で比較した。

3) 心筋生化学 (cAMP, LPO, vitamin E)

大動脈遮断前、遮断解除直前、遮断解除 30 分後に右室自由壁心筋を採取し、一定量組織内の定量を行った。cAMP の定量は radioimmunoassay 法、vitamin E は蛍光法を用いて測定し、各群間で比較した。

4) 冠灌流圧

BCP 使用群 (II~V 群) において、TWBCP 終了直前の大動脈基部圧を BCP 一定流量下 (50

ml/min) で測定し、各群間で比較した。

5) 不整脈

大動脈遮断解除後から正常心拍再開までに要した除細動の総放電量を各群間で比較した。

6) 心筋組織

実験終了時に採取した左室心尖部心筋において、日立製 H-7500 透過型電子顕微鏡 ($\times 10,000$) で認めた心筋細胞組織の形態変化を I, IV, V 群間で比較した。

7) Amrinone 血中濃度

Pilot study として、TWBCP 後における amrinone 血中濃度の推移を本実験における高濃度群 3 例と低濃度群 3 例において検討した。

8) 統計処理

測定結果はいずれも平均値 \pm 標準偏差で示し、各群間の比較には心機能データでは一元配置分散分析法、血液および心筋生化学データでは繰り返しのない二元配置分散分析法を用い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

なお、すべての動物実験は東京慈恵会医科大学および Terumo Medical Pranex 動物実験施設双方の動物実験指針および倫理規定に則して行った。

III. 結 果

1. 心機能

各群の体外循環開始前に対する体外循環離脱後のパラメーターの変化率 (%) を (Fig. 4) に示した。左室収縮能を示す %Ees は I 群: 48.6 ± 5.1 , II

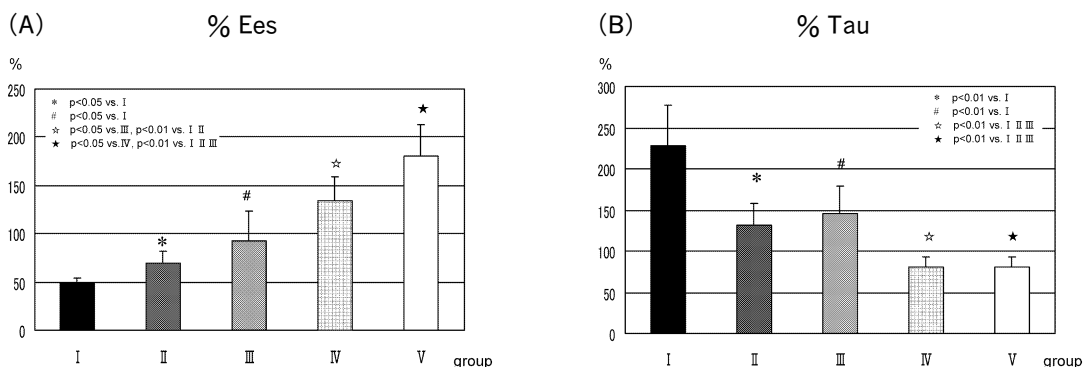


Fig. 4. The changes of LV function after CPB
(A) %recovery of Ees (B) %change of Tau
Ees: end-systolic elastance
Tau: time constant of isovolumic relaxation

群: 69.9 ± 12.7 , III 群: 91.8 ± 31.1 , IV 群: 134.2 ± 24.9 , V 群: 181.0 ± 32.4 と I 群に対して II, III 群で有意に改善を示し ($p < 0.05$), TWBCP の Ca lowering を行った IV, V 群ではさらに良好な改善を得た ($p < 0.01$). 左室拡張能を示す % Tau でも I 群: 228.3 ± 48.8 , II 群: 131.3 ± 27.5 , III 群: 145.3 ± 33.2 , IV 群: 80.0 ± 12.5 , V 群: 80.9 ± 12.6 と I 群に対して II, III 群で有意に改善を示し ($p < 0.01$), Ca lowering を行った IV, V 群では各々 II, III 群に対しても有意な改善を得た ($p < 0.01$). Amrinone 添加 (III, V 群) に対する心機能の変化は, %Ees において, II, IV 群それぞれとの比較から有意差は得られなかったが, ともに改善傾向を認めた.

2. 血液生化学

冠静脈血中濃度の変化率 (%) を Fig. 5 に示した. CK は大動脈遮断解除 10 分後において, IV 群 125 ± 25 で I 群 174 ± 29 に対する有意な改善を認め ($p < 0.05$), 30 分後には IV 群 149 ± 28 , V 群 143 ± 32 で, I 群 249 ± 80 , II 群 198 ± 47 , III 群 193 ± 19 に対する有意な改善を認めた ($p < 0.05$). Troponin-T では大動脈遮断解除 10 分後において, III 群 205 ± 49 , IV 群 200 ± 57 で I 群 325 ± 115 に対する有意な改善を認め ($p < 0.05$), 30 分後には III 群 490 ± 240 , IV 群 371 ± 101 , V 群 337 ± 93 で, I 群 869 ± 280 に対する有意な改善を認めた (vs. III: $p < 0.05$, vs. IV, V: $p < 0.01$). Lactate は大動脈遮断解除 10 分後, 30 分後ともに IV, V 群で I, II, III 群に対する有意な改善を認めた ($p <$

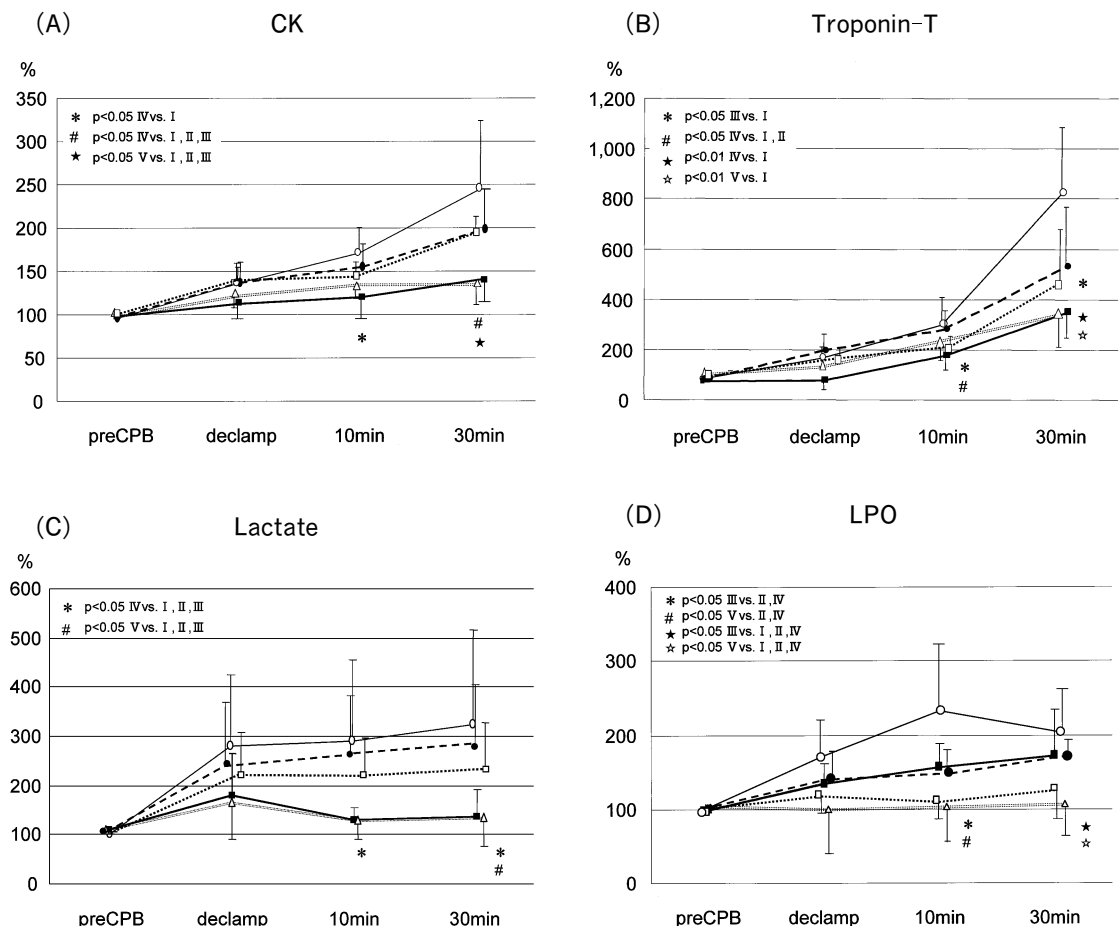


Fig. 5. Time course of biochemical changes in coronary venous blood
(A) creatine kinase (B) troponin-T (C) lactate (D) lipid peroxide
(○ group I ● group II □ group III ■ group IV △ group V)

0.05). LPO では amrinone を添加した III, V 群において、大動脈遮断解除 10 分後の II, IV 群, 30 分後の I, II, IV 群に対して有意な改善を認めた ($p < 0.05$).

3. 心筋生化学

心筋中の cAMP (pmol/mg w.w.) の推移は Fig. 6 で示される様に、心筋虚血中は各群間において同様に減少傾向を認めた。I 群では再灌流後さらに減少、IV 群でも軽度減少傾向を認めたが、V 群においては有意に増加し、大動脈遮断解除 30 分後での I 群 0.41 ± 0.12 , IV 群 0.60 ± 0.14 に対し、V 群は 1.03 ± 0.14 (vs. I: $p < 0.01$, vs. IV: $p < 0.05$) と前値以上の回復を認めた。

4. 冠灌流圧 (Fig. 7)

TWBCP 終了直前における大動脈基部圧 (mmHg) は、II 群 26.8 ± 14 , III 群 12.4 ± 5 , IV 群 25.2 ± 10 , V 群 10.2 ± 4 と amrinone を添加した III, V 群において、冠動脈拡張作用によると思われる有意な低下を認めた ($p < 0.05$).

5. 不整脈 (Fig. 8)

大動脈遮断解除後に認めた不整脈はおもに心室細動、心室頻拍であり、洞調率回復に要した除細動総放電量 (J) は I 群 51.4 ± 29 , II 群 39.1 ± 22 , III 群 21.9 ± 13 , IV 群 16.3 ± 10 , V 群 11.2 ± 11 と III, IV, V 群においては心室細動の発現が少なく、また、除細動に対する反応が良好なため、洞調律回復までに要した総放電量は I, II 群に比べ有意に抑えられた ($p < 0.05$).

6. 心筋組織

実験終了時の左室心尖部心筋組織の電子顕微鏡像 (Fig. 9) を I, IV, V 群間で比較評価したところ I 群では著しい mitochondria の膨化、細胞膜や筋線維の破綻を認めたのに対し、IV, V 群ではその変化が軽微であり、とくに V 群における mitochondria の膨化は明らかに抑制されていた。

7. Amrinone 血中濃度

Fig. 10 で示される様に、reserver 内の BCP における amrinone 濃度 ($2,964 \sim 16,894$ ng/ml) に関わらず、TWBCP 終了時点の動脈血中濃度はすでに $33 \sim 614$ ng/ml まで低下しており、全例とも amrinone の inodilator 作用が生じるとされる $1,000$ ng/ml 以上には達しなかった。この結果から、TWBCP solution 自体の濃度、すなわち心筋

保護としての心筋内投与濃度に対して、大動脈遮断解除後の体外循環中の血中濃度は持続的な心血管への作用はないと考えられた。

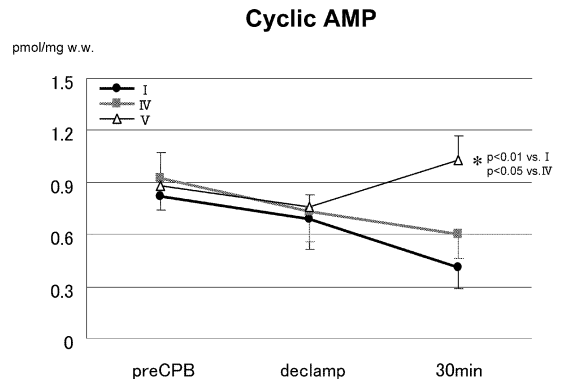


Fig. 6. Time course of concentrations of cyclic AMP in ventricular myocardium

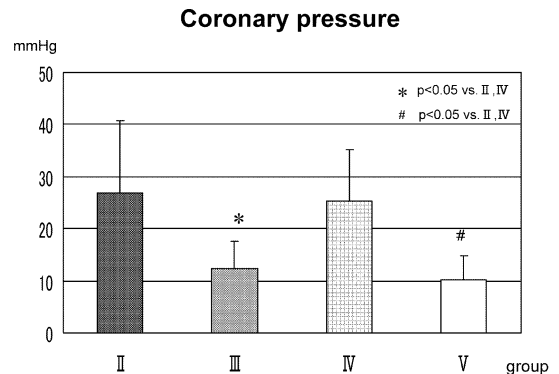


Fig. 7. Coronary pressure at just before completion of terminal warm BCP

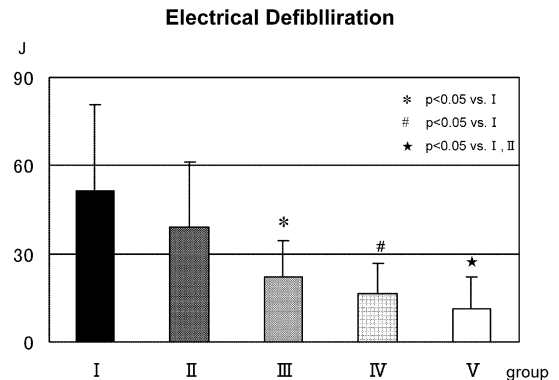


Fig. 8. Total current dosage of cardioversion after CPB

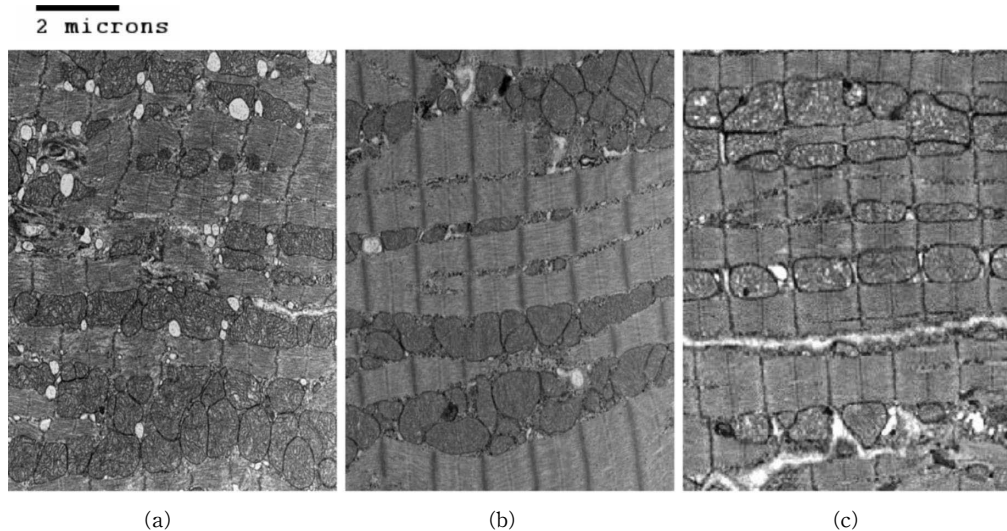


Fig. 9. Electron micrographs of left ventricular myocardium ($\times 10,000$) (a: group I b: group IV c: group V)
 (a) The picture shows clearly swelling of the mitochondria and breakdown of the myofibrils.
 (c) The mitochondria are less swollen than them of group IV.

Concentration of Amrinone

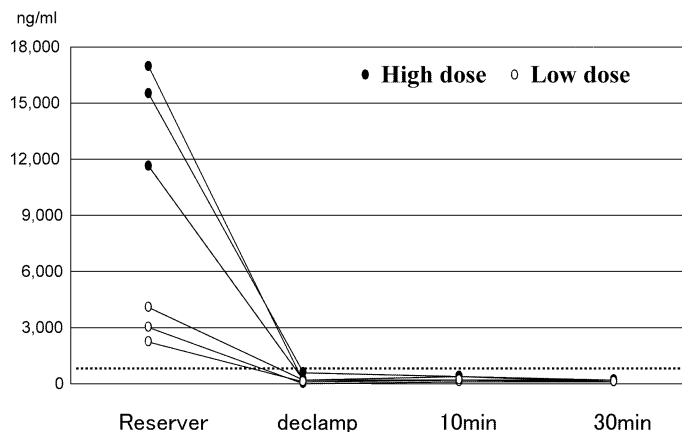


Fig. 10. Time course of concentration of amrinone in blood
 A dotted line is accounted to be a minimum limit of the pharmacological effects.

IV. 考 察

近年、増加傾向にある術前低心機能例、長時間手術例に対する成績向上への努力は重要であり、中でも心筋保護法のさらなる改良、開発は急務と思われる。とくに小児心疾患領域においては、未熟心筋の Ca^{2+} 調節機構、興奮収縮連関における特性³⁾⁴⁾¹⁷⁾ や多くの natural antioxidant の存在、

優れた pH buffering とエネルギー保持能などから、acidosis や虚血への耐性¹⁸⁾ があるとする一方、正常児においても心筋収縮蛋白や mitochondria、交感神経分布の未熟性、心筋内 catecholamine や Ca^{2+} の低含量から心室の compliance は不良とされており²⁾、心筋肥大や cyanosis の存在下ではさらに酸素供給、予備能の面からも心筋保護に不利¹⁸⁾⁻²⁰⁾ とする報告も多い。また、血

液希釈や凝固系の相違、側副血行路や短絡血流による至適灌流量への対応など、成人例とは異なる循環管理に加えて術野の維持や術操作の利便性にも考慮した場合、従来の小児心筋保護法において改良すべき点はいまだ多く、新たな視点からの開発と独自の心筋保護戦略が求められる。

そこで、本研究では小児開心術に準じた single dose CCP による 90 分間心虚血モデルに高濃度 amrinone を添加した TWBCP を controlled reperfusion することで、枯渇した cAMP の心筋細胞内補充を再灌流早期に行い、心筋細胞の Ca handling を早期に回復させ、inodilator 効果、O₂ free radical scavenger 効果とともに心筋の虚血再灌流障害を総合的に抑制し得るとの仮説を検証した。

1. PDE III 阻害薬の心筋保護効果

すでに臨床で広く使用されている PDE III 阻害薬は、心筋ではおもに筋小胞体膜に局在する PDE III を選択的に阻害して cAMP の分解を抑制することで細胞内の cAMP 濃度上昇を得るため、 β 受容体経路の他の強心剤に見られるような ATP 依存や β 受容体の down regulation の影響が少ない⁵⁾⁶⁾。また、細胞内シグナル伝達経路の代表的 second messenger である cAMP は直接 protein kinase A を活性化することで、筋小胞体を介した Ca-induced Ca release や phospholamban を介した筋小胞体への Ca²⁺ 取り込み促進による心筋収縮・拡張作用の増強を促すため⁷⁾⁸⁾、基質や ATP が枯渇した虚血心筋における cAMP の早期補給が再灌流後の速やかな Ca handling の是正、心機能改善に大きく寄与する可能性がある。さらに、PDE III 阻害薬は他にも myosin 軽鎖のリン酸化活性低下に伴う血管平滑筋弛緩作用⁹⁾のみならず、血小板凝集抑制¹⁰⁾、好中球走化脱顆粒抑制¹¹⁾、superoxide 産生抑制¹²⁾¹³⁾、cytokine 分泌調節¹⁴⁾といった虚血再灌流障害と関わりの深い多くの事象に対する抑制効果を有することが多く報告されており、PDE III 阻害薬を用いた心筋保護法は、多くの傷害因子とその相互作用によって複雑な病態を呈する開心術後の虚血再灌流障害に対して、より有効な治療戦略となり得る可能性を持つと考える。しかしながら、PDE III 阻害薬を用いた心筋保護の研究報告はまだ少なく、虚血前投

与や摘出心^{21)–23)}における虚血再灌流障害抑制効果などは散見されるが、開心術 *in vivo* モデルで PDE III 阻害薬を心筋再灌流に用いた報告はない。また、虚血再灌流前の catecholamine 投与による Ca overload の危険性¹⁵⁾¹⁶⁾なども多く指摘されており、Ca²⁺ と cAMP の心筋組織内動態の機序についてはいまだ不明な点が多い。Shahid ら⁸⁾は、cAMP が心筋細胞質の Ca²⁺ efflux と endoplasmic reticulum への Ca²⁺ 取り込みから細胞質内の Ca overload の抑制に関与すると報告し、cAMP が再灌流後の良好な Ca handling における重要な factor であることを示唆した。PDE III 阻害薬の心筋投与に関し、Endoh ら⁵⁾はイヌの摘出右室心筋を用いた *in vitro* モデルにおいて、amrinone の心筋投与量と心筋収縮力および心筋 cAMP 濃度の関係は容量依存で相関するとしており、本研究同様、PDE III 阻害薬による心筋 cAMP 濃度の増加と心機能改善との関連を示唆している。Ishikawa ら²⁴⁾はイヌの肝臓において、虚血再灌流早期における細胞内 cAMP の減少に対して amrinone 投与を行い、cAMP の補充による組織障害の軽減効果が得られたとしており、他臓器ではあるが本研究の PDE III 阻害薬投与による心筋 cAMP の補充療法を裏付ける事象の 1 つと言える。また、amrinone の心筋代謝および体内動態は心筋保護効果を考える上で重要な検討項目であり、ラットの検討では amrinone の心筋への組織移行性は速やかで、排泄性も血中と同様に良好であるとされる²⁵⁾。当初より懸念していた血中の残存 amrinone による血行動態への影響に関しては、本研究での amrinone 血中濃度は TWBCP 直後から一貫して 1,000 ng/ml 以下で、本来の inodilator 作用を与え得る閾値⁵⁾には達していないことより、今回の amrinone の心機能への影響は選択的再灌流時のみによるものであることが確認された。また、IV、V 群で施行した追加実験 (Fig. 11) において、V 群では遮断解除 30 分後と比べ 60 分後での心機能 (%Ees, %Tau) 低下は見られず、生化学的心筋障害 (troponin-T, LPO) 抑制作用とともにその効果の持続性も示された。このことは、本研究でも認められた PDE III 阻害薬の選択的投与による有効な心筋 cAMP の replenishment が、虚血再灌流後の持続的な

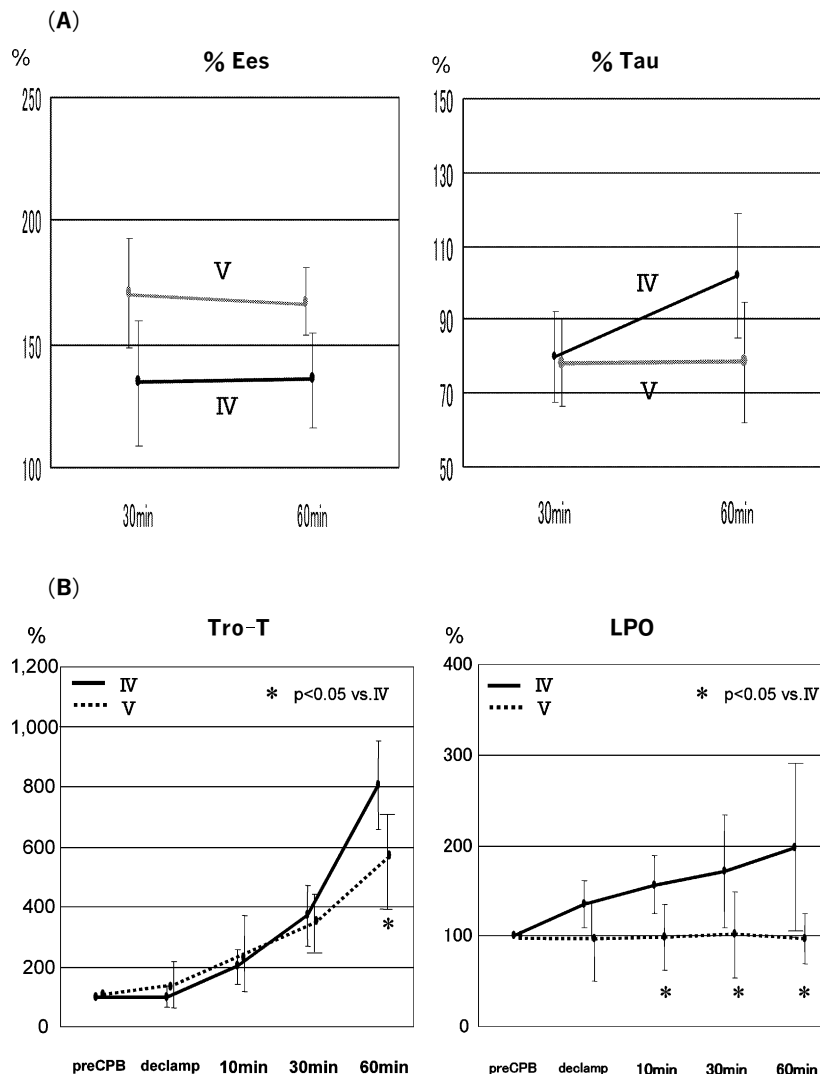


Fig. 11. Pilot studies of LV function and blood biochemistry

The time course is extended to 60 min after CPB in group IV and V.

(A) It was maintained LV contractility and expansion together to the last in group V.

(B) Production of LPO was suppressed through the period in group V.

inotropic effect や細胞障害防止効果に寄与している可能性が示唆された。なお、PDE III 阻害薬の中でも種別によりその作用は臨床での効果と同様、異なる場合があり⁷⁾¹³⁾²³⁾、target PDE や作用発現濃度および時間に違いを持つ可能性がある。本研究での amrinone の使用は、PDE III 阻害薬の中でも比較的 positive inotropic effect が少なく、free radical scavenger としての優位性が高いこと¹²⁾¹³⁾ に基づいたものである。また、今回の BCP における amrinone 最終濃度も Mikawa

ら¹³⁾ の報告を参考に、free radical scavenger 効果が確実に見込める設定とした。

2. 心筋保護効果の考え得る機序

1) O₂ free radical scavenger 効果

虚血再灌流時の心筋細胞では虚血域への O₂ 再供給下に arachidonic acid や xanthine の各代謝過程や mitochondria 電子伝達系経路などにおいて多くの O₂⁻ が生成される。また、浸潤好中球においても活性酸素は生成され、傷害細胞に偽足で食空胞を形成、脱顆粒とともに lysosome 蛋白分

解酵素を分泌し、細胞の崩壊融解を来す²⁶⁾。その対策としては、これまでも CoQ10, NKH477, Nicorandil, SOD といった antioxidant の投与¹⁸⁾¹⁹⁾²⁷⁾ や白血球去 filter²⁶⁾, 抗好中球免疫血清²⁸⁾ などが試みられているが、開心術モデルでの効果は定まっておらず、一般的な臨床使用にはまだ至っていないのが現状である。本研究においては、O₂ free radical の代謝産物である LPO が amrinone により再灌流後早期から持続して有意に抑制され、心筋細胞障害の指標である CK, troponin-T の上昇も抑えられたことから、free radical scavenger としての amrinone の心筋保護効果が示唆された。虚血再灌流における活性酸素産生が主として虚血部位への O₂ 再供給によるものか、浸潤好中球を介するものかはまだ明らかではないが、PDEIII 阻害薬の効果として、Matsumori ら¹⁴⁾ は腫瘍壊死因子などの心筋障害性 cytokine 産生抑制効果、Chang ら¹¹⁾ は好中球浸潤凝集の抑制効果を報告している。一方、Mikawa ら¹³⁾ はヒト好中球刺激で産生される活性酸素および無細胞系で産生された活性酸素に対する OH⁻ 産生抑制効果、Mitsuyama ら¹²⁾ は活性化 protein kinase A による O₂⁻ の産生抑制効果を報告しており、PDE III 阻害薬の O₂ free radical scavenger としての役割は、好中球や補体, cytokine 等の炎症反応物質の制御に加え、直接的な活性酸素種の産生抑制にも寄与している可能性がある。

2) Ca overload の軽減と cAMP 補充による Ca handling の改善

虚血再灌流障害のもう 1 つの要因として、細胞内の Ca overload が指摘されている。特に虚血再灌流時の細胞内 Ca²⁺ 上昇が著しい場合、心筋細胞の過収縮による心筋線維の断裂や心筋細胞の分離が起こり、不可逆的な心筋障害を来す恐れがあるため、一般的に心筋保護液における Ca lowering や Mg supplement は重要とされている¹⁾。Baker ら³⁾ の報告を参考に、BCP 中の Ca²⁺ 濃度は control 群の 1.2 mmol/l に対し、Ca lowering 群は 0.4~0.5 mmol/l で調節とし、心機能(Ees, Tau), CK, troponin-T, lactate, 不整脈において Ca lowering 群での有意な改善効果が認められた。一方、未熟心筋では元来心筋 Ca²⁺

が低く Ca²⁺ 流入抵抗性であるため心収縮には多くの Ca²⁺ が必要とされ、low Ca²⁺ の心筋保護は危険とも報告されており³⁾, Ca²⁺ の至適濃度のさらなる検討が必要である。

本研究では PDE III 阻害薬による心筋細胞内 cAMP 上昇と Ca overload との関連を危惧したが、心血管に対する明らかな negative effect は認めず、III, V 群ともに心機能, 生化学データ上の改善を示した。あくまでも仮説の域を超えないが、PDE III 阻害薬と心筋 Ca²⁺ の動態に関しては、まず、PDE III 阻害薬は他の β 受容体を介する catecholamine と違って down regulation や ATP の過剰消費を抑え、心停止下でも確実に心筋 cAMP の蓄積が可能なこと。また、同薬剤は筋小胞体膜の PDE III を選択的に阻害するため、cAMP の局在蓄積から細胞内 Ca²⁺ 濃度のおもな調節器官である筋小胞体の活動性、とくに Ca²⁺ の取り込みが維持、強化されること。さらに、細胞内 Ca²⁺ 流入の要因の 1 つとされる細胞膜損傷²⁹⁾ を O₂ free radical の抑制により軽減しうることなどが挙げられ、その結果 sarcoplasmic reticulum や sarcolemmal membrane での Ca²⁺ ATPase による positive lusitropic effect が比較的保持される。また、本法での PDE III 阻害薬投与は心停止下に行っており、大動脈遮断解除後に電位依存性細胞膜 Ca²⁺ channel や acidosis で抑制されている Na⁺-Ca²⁺ 交換機構が十分に活性化され、細胞質内への Ca²⁺ 大量流入を来す前に cAMP 補充による Ca handling の是正準備がなされるため、再灌流早期からの十分な心筋 cAMP と良好な Ca handling により Ca overload の軽減と心機能の早期回復、維持が可能になると思われる。

虚血における心筋細胞内の基質や ATP の枯渇は、mitochondria や筋小胞体機能の低下を招き、心筋細胞のエネルギー産生や Ca handling に支障を来す。そして、その悪循環から myocardial stunning に陥るともされている³⁰⁾。それに対して、おもに Buckberg ら¹⁾ が提唱する BCP による心筋保護法は、虚血心筋への血液を用いた酸素や基質の供給により、心筋酸素消費、組織内高エネルギーリン酸化合物のレベル保持に優れており、虚血による ATP 低下および myocardial stunning の予防、心機能の回復に大きく貢献してい

る。また、大動脈遮断解除直前の TWBCP は、心停止下の血液を介した心筋加温により、過剰な乳酸除去、高エネルギーリン酸化合物の貯蓄、微小管の再重合に寄与することが小児臨床例においても認められており³¹⁾、心筋収縮再開前に細胞内の物質輸送能や小器官の回復をもたらす点で広く受け入れられている。本研究ではこれらの TWBCP に高濃度 PDE III 阻害薬を添加することで、さらなる心機能の早期回復、維持を示した。

3) No-reflow phenomenon の予防

いわゆる no-reflow phenomenon と言われる現象は、虚血再灌流による血管組織傷害だけでなく、血管内皮細胞自身の機能的変化や好中球との相互反応に起因するものとされる³²⁾。すなわち、再酸素化による血管内皮細胞での代謝産物、活性化白血球から cytokine、好中球の遊走・粘着因子が産生され、好中球の局所集中・内皮接着を来す。また、好中球脱顆粒による微小血管床の循環障害 (PMNs plugging)、心筋細胞浮腫、白血球の組織浸潤なども加わり、冠血流の低下から心機能不全を増悪させる。さらに、血管拡張効果を有する cAMP や cyclic guanosine monophosphate (cGMP) が虚血により枯渇していることも循環障害を助長することとなる。それらに対してこれまで nicorandil や adenosine 投与の有効性が報告²⁷⁾³³⁾されているが、PDE III 阻害薬が有する効果は、本研究でも示された血管拡張機能をはじめ、血小板凝集抑制、好中球脱顆粒抑制、cytokine 分泌調節、心筋浮腫抑制²⁹⁾など、虚血再灌流後の冠血流不全をきたす緒因子に亘ることから、状況の改善は包括的に得られるものと容易に推測される。PDE III 阻害薬投与による心筋梗塞モデルでの有意な梗塞領域の軽減効果も散見²¹⁾²²⁾されており、no-reflow phenomenon の予防、軽減において本法は有用と思われる。

4) 虚血再灌流後の不整脈に対する影響

一般的に再灌流後の心室性不整脈は、虚血再灌流における Ca overload や O₂ free radical が誘因とされており³⁴⁾³⁵⁾、自然除細動は良好な心筋保護の指標であると考えられる。本研究においては、再灌流後から洞調律を得るまでの電氣的除細動使用は III, IV, V 群で有意に抑えられた。その理由として、amrinone による心筋 cAMP の補充や

Ca lowering などにより、再灌流直後から良好な Ca handling が得られ、myocardial stunning が回避されたものと考えられる。また、今回の心筋組織の電顕像においても認められた様に、cAMP による組織浮腫の抑制が不整脈予防に寄与した可能性もある。

以上より、心筋代謝に様々な作用機序を有する PDE III 阻害薬を心筋保護に活用することは、複雑で多彩な病態を呈し、その予防と治療を困難にしている開心術後の虚血再灌流障害に有用と思われる。心筋への cAMP 補充効果も加え、速やかな心機能回復に大きな役割を果たす可能性が高い。また、本研究は臨床使用されている薬剤を用いた前臨床的な実験モデルでの検討であり、その手法も簡便であることから、とくに小児領域での早期臨床応用の期待も大きい。

V. 結 語

1. 血液心筋保護下再灌流時における高濃度 PDEIII 阻害薬の選択的投与により、虚血時に減少した心筋内 cAMP の補充がなされ、活性酸素由来の心筋障害軽減効果、冠血流の有意な改善効果とともに心機能改善が見られた。
2. 虚血再灌流時の Ca lowering の併用は有用と考えられた。
3. 虚血再灌流に伴う心筋細胞内の cAMP 減少は、心筋の Ca handling を低下させ、持続する心機能低下を招くため、PDE III 阻害薬による心筋内 cAMP 補充療法は、とくに開心術において重要な役割を担う可能性を示した。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東京慈恵会医科大学心臓外科学講座 橋本和弘主任教授に謹んで謝意を表すとともに、本研究に御協力下さった同心臓外科の諸先生方、技術的助力を頂いた Terumo Medical Pranex の皆様に厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は第 42 回日本小児循環器学会総会 (2006 年 7 月 名古屋)、第 59 回日本胸病外科学会定期学術集会 (2006 年 10 月 東京) において発表した。

文 献

- 1) Buckberg GD, Beyersdorf F, Allen BS, Robertson JM. Integrated myocardial management: background and initial application. *J Card Surg* 1995; 10: 68-89.
- 2) Jonas RA. Myocardial protection for neonate and infants. *Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 46(suppl): 288-91.
- 3) Backer EJ, Backer JE. Calcium and cardioplegic protection of the ischemic immature heart: impact of hypoxemia from birth. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 1123-30.
- 4) Nayler WG, Fassold E. Calcium accumulating and ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum before and after birth. *Cardiovasc Res* 1977; 11: 231-7.
- 5) Endoh M, Yamashita S, Taira N. Positive inotropic effect of Amrinone in relation to cyclic nucleotide metabolism in the canine ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 221: 775-83.
- 6) 大内章吉, 長田直美, 鹿島幸子, 下山由美, 名倉純, 蜂須 貢 ほか. アムリノンの陽性変力作用発現のメカニズム. *薬理と治療* 1990; 18: 41-8.
- 7) Endoh M, Yanagisawa T, Taira N, Blinks JR. Effects of new inotropic agents on cyclic nucleotide metabolism and calcium transients in canine ventricular muscle. *Circulation* 1986; 73(supplIII): 117-33.
- 8) Shahid M, Rodger IW. Enhancement of Amrinone-induced positive inotropy in rabbit papillary muscle with depressed contractile function: effects on cyclic nucleotide levels and phosphodiesterase isoenzymes. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43: 88-94.
- 9) Van der Zyppe A, Rechtman M, Majewski H. The role of cyclic nucleotides and calcium in the relaxation produced by amrinone in rat aorta. *Gen Pharmacol* 2000; 34: 245-53.
- 10) Sill JC, Bertha B, Berger I, Uhl C, Nugent M, Folts J. Human platelet Ca^{2+} mobilization, glycoprotein IIb/IIIa activation, and experimental coronary thrombosis *in vivo* in dogs are all inhibited by the inotropic agent Amrinone. *Circulation* 1997; 96: 1647-53.
- 11) Chen CC, Matsuda H, Sawa Y, Kaneko M, Sakagoshi N, Nishimura M, et al. Effect of a cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase inhibitor, DN-9693, on myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1991; 52: 495-9.
- 12) Mitsuyama T, Takeshige K, Minakami S. Cyclic AMP inhibits the respiratory burst of electroporabilized human neutrophils at a downstream site of protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1177: 167-73.
- 13) Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, et al. The effect of phosphodiesterase III inhibitors on human neutrophil function. *Crit Care Med* 2000; 28: 1001-5.
- 14) Matsumori A, Shioi T, Yamada T, Matsui S, Sasayama S. Vesnarinone, a new inotropic agent, inhibits cytokine production by stimulated human blood from patients with heart failure. *Circulation* 1994; 89: 955-8.
- 15) Komai H, Yamamoto F, Tanaka K, Ichikawa H, Shibata T, Koide A, et al. Harmful effects of inotropic agents on myocardial protection. *Ann Thorac Surg* 1991; 52: 927-33.
- 16) Shimada Y, Yamamoto F, Yamamoto H, Newling R. Is the use of catecholamine before ischemic arrest safe? *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 47: 299-312.
- 17) Nishioka K, Nakanishi T, George BL, Jarmakani JM. The effect of calcium on the inotropy of catecholamine and paired electrical stimulation in the newborn and adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1981; 13: 511-20.
- 18) Ihnken K. Myocardial protection in hypoxic immature hearts. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 48: 46-54.
- 19) Dhaliwal H, Kirshenbaum LA, Randhawa AK, Singal PK. Correlation between antioxidant changes during hypoxia and recovery on reoxygenation. *Am J Physiol* 1991; 261: H632-8.
- 20) Morita K, Ihnken K, Buckberg GD, Sherman MP, Young HH. Studies of hypoxemic/reoxygenation injury without aortic clamping. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 1235-44.
- 21) Saltman AE, Gaudette GR, Levitsky S, Kruckenamp IB. Amrinone preconditioning in the isolated perfused rabbit heart. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 609-13.
- 22) Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Asanuma H, Node K, Takashima S, et al. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors. *Cir-*

- culatation 2001 ; 104 : 705-10.
- 23) Besirli K, Burhani SM, Arslan C, Suzer O, Sayin AG. Effect of combining phosphodiesterase III inhibitors with St Thomas hospital's solution used as transplantation preservative solution in isolated rat hearts. *Transplantat Proc* 2006 ; 38 : 1253-8.
 - 24) Ishikawa H, Jin MB, Ogata T, Taniguchi M, Suzuki T, Shimamura T, et al. Role of cyclic nucleotides in ischemia and reperfusion injury of canine livers. *Transplantation* 2002 ; 73 : 1041-8.
 - 25) 江角凱夫, 南保俊雄, 大槻俊治, 二宮真一, 横田喬枝, 小林伸一郎. Amrinone の体内動態. ラットおよびイヌにおける静脈内投与時の分布および排泄. *応用薬理* 1989 ; 38 : 131-44.
 - 26) Martin J, Krause M, Benk C, Lutter G, Siegenthaler M, Beyersdorf F. Blood cardioplegia filtration. *Perfusion* 2003 ; 18 : 75-80.
 - 27) Ito H, Taniyama Y, Iwakura K, Nishikawa N, Masuyama T, Kuzuya T, et al. Intravenous nicorandil can preserve microvascular integrity and myocardial viability in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999 ; 33 : 654-60.
 - 28) Rossen RD, Swain JL, Michael LH, Weakley S, Giannini E, Entman ML. Selective accumulation of the first component of complement and leukocytes in ischemic canine heart muscle. *Circ Res* 1985 ; 57 : 119-30.
 - 29) Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986 ; 18 : 769-80.
 - 30) Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990 ; 82 : 723-37.
 - 31) Toyoda Y, Yamaguchi M, Yoshimura N, Oka S, Okita Y. Cardioprotective effects and the mechanisms of terminal warm blood cardioplegia in pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 ; 125 : 1242-51.
 - 32) Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "No-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974 ; 54 : 1496-508.
 - 33) Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, et al. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987 ; 76 : 1135-45.
 - 34) Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. *Circulation* 1989 ; 80 : 1115-27.
 - 35) Thandroyen FT, Morris AC, Hagler HK, Ziman B, Pai L, Willerson JT, et al. Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. *Circ Res* 1991 ; 69 : 810-9.