

# ラット摘出灌流心における ischemic preconditioning および $Ca^{2+}$ preconditioning の 細胞内 $Ca^{2+}$ 動態の検討

東京慈恵会医科大学内科学講座循環器内科 (指導: 望月正武教授)

武田 博 関 晋 吾

(受付 平成 14 年 11 月 16 日)

## EFFECTS OF ISCHEMIC AND $Ca^{2+}$ PRECONDITIONING ON INTRACELLULAR $Ca^{2+}$ DYNAMICS IN ISCHEMIA-REPERFUSED RAT HEARTS

Hiroshi TAKEDA and Shingo SEKI

*Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine*

Ischemic preconditioning (IPC) has been proposed to protect myocardium against ischemia-reperfusion injury in numerous experimental models. Although  $Ca^{2+}$  may play a key role in inducing IPC, the precise mechanism is unclear. We observed changes in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and ventricular contractility in the whole heart during ischemia-reperfusion and compared the cardioprotective effects of IPC and  $Ca^{2+}$  preconditioning (CPC). Hearts from Sprague-Dawley rats were perfused in the Langendorff mode and loaded with  $4 \mu\text{mol/L}$  fura-2/AM to measure the fluorescence ratio as an index of  $[Ca^{2+}]_i$ . Left ventricular pressure and electrocardiograms were simultaneously recorded. Hearts were exposed to 10 minutes of low-flow ischemia, then reperfused. In the IPC group ( $n=5$ ) hearts were exposed to ischemia twice for 2 min before sustained ischemia. In the CPC group, hearts were exposed to a low  $Na^+$  solution ( $70 \text{ mmol/L}$ ; CPLN group,  $n=7$ ) or a high  $Ca^{2+}$  solution ( $3.5 \text{ mmol/L}$ ; CPHC group,  $n=6$ ) twice for 1 minute to induce  $Ca^{2+}$  influx before sustained ischemia. Transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  were observed during preconditioning in all preconditioned groups. The  $[Ca^{2+}]_i$  increased significantly less in the IPC group than in the control group ( $n=6$ ) at 1, 5 and 10 minutes of ischemia and at 1 minute of reperfusion. The increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was also significantly less at 1 minute of ischemia and at 1 minute of reperfusion in the CPLN group but only at 1 minute of reperfusion in the CPHC group. The rate of recovery in the rate-pressure product on reperfusion was significantly higher in all preconditioned groups than in the control group. A transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  may trigger IPC, and a reduction in intracellular  $Ca^{2+}$  overload may be involved in the mechanism of cardioprotection in IPC.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2003 ; 118 : 51-61)

Key words: reperfusion injury, ischemic preconditioning, calcium, fura-2, rats

### I. 緒 言

カルシウム ( $Ca^{2+}$ ) は心筋の収縮に必要不可欠

なものであるが、細胞内に過剰の  $Ca^{2+}$  が存在すると、心筋障害をもたらすことが多くの研究で示されている。心筋における虚血再灌流障害の要因

の一つとしても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷が重要視されており、動物実験モデルで、虚血時および再灌流時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇が確認されている<sup>1)2)</sup>。Murry らの報告<sup>3)</sup>以来、一過性の心筋虚血を繰り返すことにより、その後の虚血再灌流による心筋障害が軽減することは、ischemic preconditioning として知られている。この ischemic preconditioning の虚血耐性の機序については、最終的には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷の軽減効果が重要な因子として考えられている。一方 Ashraf らは、短時間の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の増減が、 $\text{Ca}^{2+}$  過負荷による心筋障害を軽減することを報告し、 $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning と称した<sup>4)</sup>。その後彼らは、この短時間の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の増減が、虚血再灌流においても心筋保護効果を示すことを報告している<sup>5)</sup>。これらの研究から、 $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning の実験系においては、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の評価は、preconditioning の機序の解明の点でも非常に興味もたれる現象である。

しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態については十分な検討はなされていない。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning が、その後の虚血再灌流時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷を抑制しているのか否かについては、明確ではない。Ischemic preconditioning における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態についても、蛍光指示薬<sup>6)</sup> や NMR<sup>7)</sup> を用いて評価した報告がみられるが、充分とは言えない。

そこで今回我々は、蛍光指示薬を負荷したラット摘出灌流心モデルを用いて、虚血再灌流における ischemic preconditioning と  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning の効果について、心機能および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の点から検討した。

さらに  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning については2つの異なる誘発法を施行し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の一過性の増加が preconditioning 効果の発現の trigger となり得るかについて、ischemic preconditioning との対比とともに検討した。

## II. 対象と方法

### 1. ラット摘出灌流心標本

実験は、東京慈恵会医科大学実験動物センターガイドラインに基づいて飼育、管理された雄性 Sprague-Dawley 系ラット (280~360 g) を用い

た。Pentobarbital Na 30 mg/kg の腹腔内投与麻醉下にて開胸し、心臓を摘出した。摘出した心臓は直ちに Langendorff 法にて灌流した。灌流液は Tyrode 溶液 [mmol/L: NaCl 140, KCl 6,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  2, glucose 10, N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 10, pH 7.4, 37°C, 100%  $\text{O}_2$  bubbling] を用いた。冠灌流は peristaltic pump (505S, Watson Marlow, U.K.) を用いて 14 ml/min の定流量灌流とした。

### 2. 心行動態の観察

肺静脈より経左房的に左室内へカテーテル (18G) を挿入し、polygraph system (SEN 3101, AP 641 G, 日本光電) を用いて経時的に左室圧をモニタリングした。

カーボン電極を表面張力により左室表面に付着させ、心電図 (MIC-8600, フクダ電子) を記録し、心拍数を測定した。

さらに心機能の指標として、左室圧と心拍数の積を、rate pressure product (RPP) として算出し、虚血前値に対する変化率を求めた。

### 3. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態の測定

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態は、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光指示薬である fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM, DOJINDO) を用いて既報の方法<sup>2)8)9)</sup> で観察した。fura-2/AM を界面活性剤とともに Tyrode 溶液に超音波を用いて溶解して  $4 \mu\text{mol/L}$  の loading 溶液を作成した。約 4°C に冷却後、室温で 30 分間灌流することによって経冠動脈的に心筋に負荷し、20 分間 washout を行った。光ファイバー照射測光ユニット (CAF 110, 日本分光) を用いて 340 nm と 380 nm 波長の UV 励起光によるそれぞれの 500 nm 波長の蛍光を採取し、その蛍光強度比を測定し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の指標とした。Fig. 1 に、好氣的条件下の 2 波長励起光による蛍光および  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェント (蛍光強度比)、左室圧の実記録を示した。左室圧に較べて、立ち上がりが急峻で緩やかな減衰を示す  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントのシグナルが得られた。

### 4. 実験プロトコール

Fura-2 の負荷後、好氣的条件下で心行動態、蛍光強度が定常状態に達した後、以下の 4 群の実験

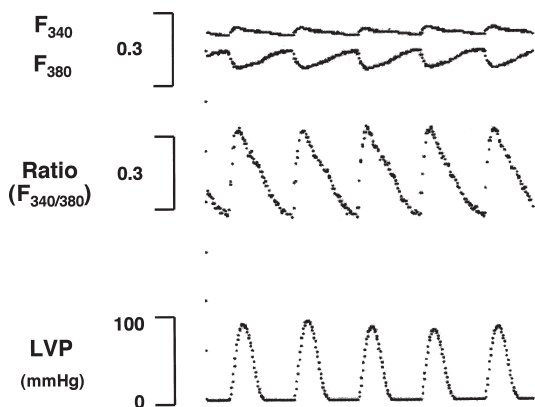


Fig. 1. Original traces showing simultaneous recordings of fura-2 fluorescence excited at 340 nm ( $F_{340}$ ), 380 nm ( $F_{380}$ ), fluorescence ratio (Ratio;  $F_{340/380}$ ) and left ventricular pressure (LVP) during aerobic perfusion without pacing.

を行った。Fig. 2 には、各プロトコルによる  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントと左室圧の変化の実記録を示した。

蛍光指示薬の流出や活性の低下のため、蛍光強度の減弱の問題が生じてくるが、本実験系では蛍光強度は約 40 分間は保持された。したがって、実験プロトコルを 40 分間以内に行うために、以下の時間を設定した。

A) コントロール群 (Control 群:  $n=6$ )

10 分間の虚血操作の後、5 分間の再灌流を行った。虚血は、灌流量を通常の 10% に減じ、140 bpm のペーシングを加える low flow ischemia とした。再灌流開始とともにペーシングは解除した (Fig. 2a)。

B) Ischemic preconditioning 群 (IPC 群:  $n=5$ )

2 分間の短時間の虚血操作および 2 分間の再灌流をそれぞれ 2 回行った後に、Control 群と同様の虚血再灌流を施行した (Fig. 2b)。

C) Low  $\text{Na}^+$  preconditioning 群 (低 NaPC 群:  $n=7$ )

1 分間の低  $\text{Na}^+$  溶液 (70 mmol/L  $\text{Na}^+$ , 70 mmol/L Tris aminomethane にて置換) による灌流および 2 分間の通常の灌流を 2 回行った後に、Control 群と同様の虚血再灌流を施行した。この低  $\text{Na}^+$  溶液の灌流により、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系の reverse mode を介した細胞内 (cytoplasm) への

$\text{Ca}^{2+}$  の流入が亢進し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇する (Fig. 2c)<sup>9)10)</sup>。

D) High  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning 群 (高 CaPC 群:  $n=6$ )

1 分間の高  $\text{Ca}^{2+}$  溶液 (3.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  含有 Tyrode 溶液) による灌流および 2 分間の通常の灌流を 2 回行った後に、Control 群と同様の虚血再灌流を施行した (Fig. 2d)。

5. 統計学的解析

全てのデータは、平均±標準誤差で表記した。各群間の比較は分散分析法 (ANOVA) を用いて、 $p < 0.05$  を有意とした。

### III. 結 果

#### 1. Preconditioning の心機能へ及ぼす影響

Preconditioning 操作前の心拍数は IPC 群において control 群、低 NaPC 群、高 CaPC 群と比較して有意差がみられたが、左室圧は各群間に有意差を認めなかった。また preconditioning 前後の心拍数、左室圧の変化率において、IPC 群にて心拍数の増加傾向がみられたが、各群間に有意差を認めなかった。各群における前後の有意な変動もみられなかった (Fig. 3)。

#### 2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の指標として、収縮期と較べて心周期の変動の影響を受けず一定のレベルを保つ拡張期の蛍光強度比を、diastolic  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  として用いた<sup>2)8)9)</sup>。Control 群においては虚血操作直前の、また IPC 群、低 NaPC 群、高 CaPC 群においては preconditioning 操作直前の diastolic  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  に対する上昇率により、各群の preconditioning 後、虚血 1 分、5 分、10 分、再灌流 1 分、5 分における測定値を比較した (Fig. 4)。上昇率は、蛍光強度比の上昇分を baseline の  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントの振幅で除して算出した。

Fig. 2 に各群の実記録を示す。各群ともに 10 分間の虚血により、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は上昇し左室圧は著明に低下した。再灌流にて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は baseline に戻り、左室圧の回復がみられた。いずれの方法による preconditioning においても左室圧の変動を伴う一過性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が観察された。Control では再灌流直後に心室性不整脈が発生し、diastolic  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の一過性の再上昇が観察された。

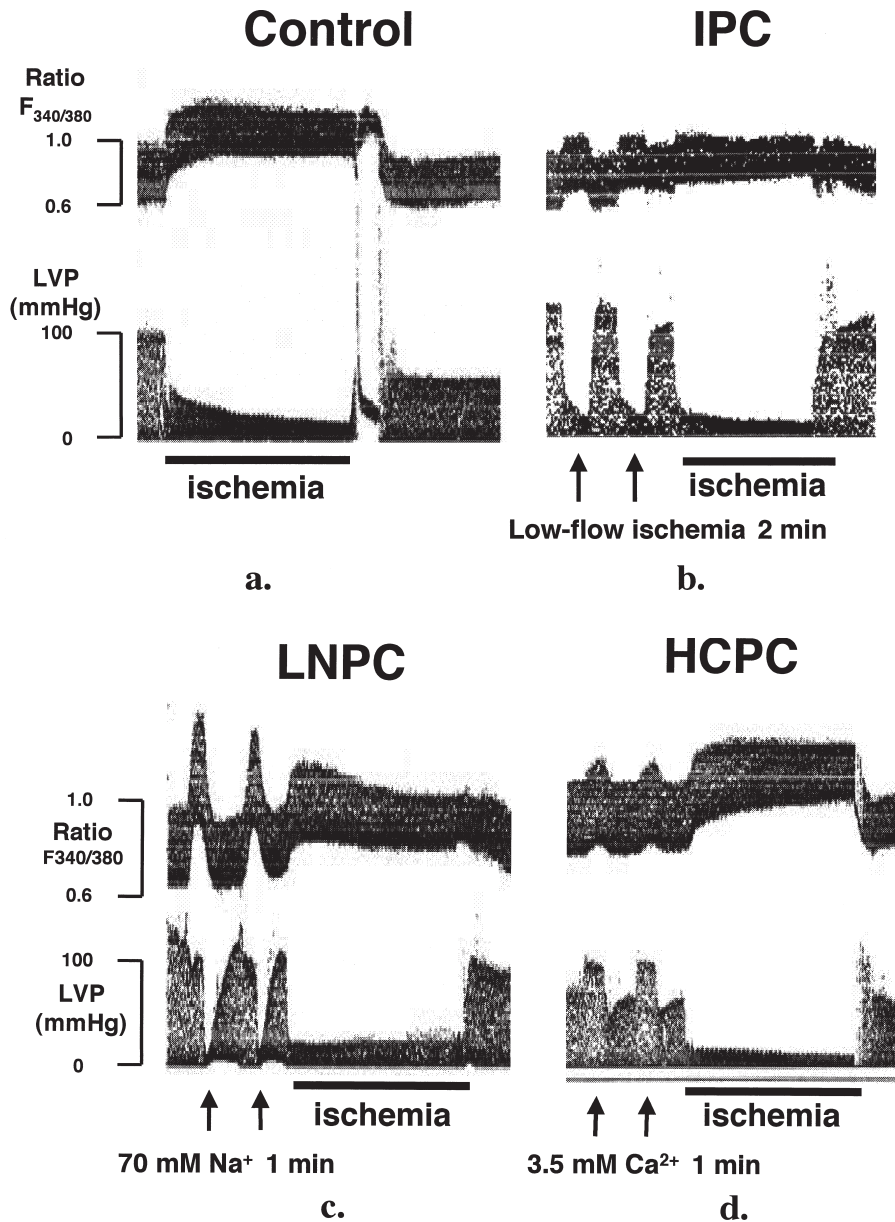


Fig. 2. Typical traces of fura-2 fluorescence ratio (Ratio;  $F_{340/380}$ ) on the top and left ventricular pressure (LVP) on the bottom showing respectively. In the control heart (a.), fluorescence ratio increased during ischemia, and declined after reperfusion. Transient ventricular arrhythmia developed and fluorescence ratio increased further immediately after reperfusion. In the hearts of preconditioning group, fluorescence ratio increased twice during 1 or 2 minutes exposure to low-flow ischemia (b.), low-sodium (c.) and high-calcium (d.) perfusion as preconditioning. In high-calcium preconditioning, LVP increased coupled with an increase in the fluorescence ratio, whereas LVP decreased in low-sodium and ischemic preconditioning.

Diastolic  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は preconditioning 前後において、各群ともに有意な変化を認めず、10分虚血の前値 (上昇率) についても、control 群を含めた

各群間にて有意差を認めなかった (IPC:  $4.6 \pm 12.1\%$ , 低 NaPC:  $-5.0 \pm 6.4\%$ , 高 CaPC:  $5.2 \pm 2.9\%$ )。

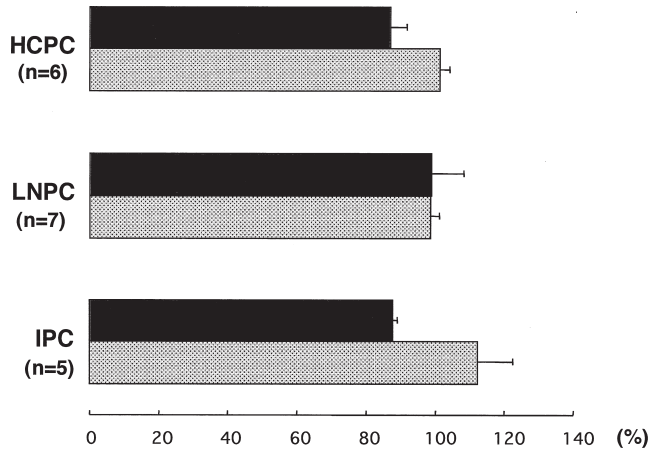


Fig. 3. Percentile of basal value in left ventricular pressure (LVP—solid bar) and heart rate (HR—dotted bar) after high-calcium preconditioning (HCPC), low-sodium preconditioning (LNPC), and ischemic preconditioning (IPC). In HCPC group, LVP decreased to  $86.8 \pm 4.9\%$  and HR increased to  $101.3 \pm 2.6\%$ . In LNPC group, LVP decreased to  $98.6 \pm 9.3\%$  and HR decreased to  $98.6 \pm 2.7\%$ . In IPC group, LVP decreased to  $87.6 \pm 1.5\%$  and HR increased to  $112.3 \pm 10.0\%$ . No significant difference was found among these groups. Data are means  $\pm$  S.E.

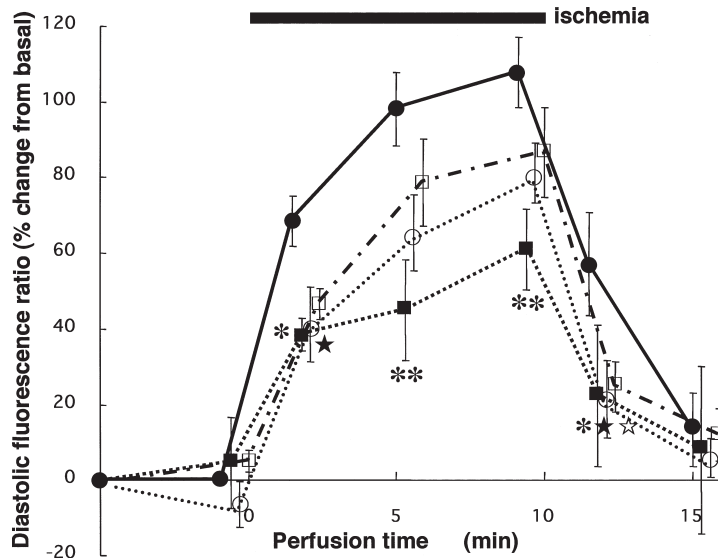


Fig. 4. Mean changes in diastolic fura-2 fluorescence ratio as an index of  $[Ca^{2+}]_i$  in hearts exposed to 10 min of low-flow ischemia followed by reperfusion. The bar indicates the 10 min of low-flow ischemia. (—●—) control heart, (.....■.....) ischemic preconditioned heart (IPC), (.....○.....) low-sodium preconditioned heart (LNPC), (---□---) high-calcium preconditioned heart (HCPC). \* $p < 0.05$  IPC vs. control, \*\* $p < 0.01$  IPC vs. control, \* $p < 0.05$  LNPC vs. control, \* $p < 0.05$  HCPC vs. control. Data are means  $\pm$  S.E.

虚血中においては、diastolic  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇率は control 群で 1 分後  $68.5 \pm 6.7\%$ 、5 分後  $98.0 \pm 9.8\%$ 、10 分後  $107.7 \pm 9.4\%$  であったが、IPC 群では全ての時間において diastolic  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇

が有意に抑制された (1 分後  $38.5 \pm 4.2\%$ 、5 分後  $45.0 \pm 13.4\%$ 、10 分後  $61.1 \pm 10.6\%$  : いずれも  $p < 0.05$  vs. control 群)。また低 NaPC 群では、1 分後 ( $41.2 \pm 9.9\%$ )、5 分後 ( $65.5 \pm 10.1\%$ ) において



有意な ( $p < 0.05$ ) 抑制を認めたが、10分後においては  $81.1 \pm 8.0\%$  と抑制傾向は認められたものの、統計学的な有意差は得られなかった ( $p = 0.10$ )。これに対し、高 CaPC 群では1分後に  $46.6 \pm 4.1\%$  と抑制傾向を認めたが ( $p = 0.054$ )、5分後  $78.8 \pm 11.5\%$  ( $p = 0.23$ )、10分後  $86.7 \pm 11.2\%$  ( $p = 0.21$ ) と虚血後半では有意な抑制は得られなかった。

再灌流後においては、1分後 control 群の上昇率が  $57.1 \pm 13.7\%$  と依然として baseline より高値を示したのに対し、preconditioning を施行した3群ではともに速やかな低下を認めた (IPC 群  $22.4 \pm 8.3\%$ 、低 NaPC 群  $21.5 \pm 10.1\%$ 、高 CaPC 群  $24.7\% \pm 6.7\%$  : いずれも  $p < 0.05$  vs. control 群)。再灌流5分後においては、各群間で有意差は認めなかった (control 群  $13.3 \pm 9.7\%$ 、IPC 群  $7.9 \pm 9.9\%$ 、低 NaPC 群  $5.8 \pm 4.9\%$ 、高 CaPC 群  $11.9\% \pm 6.8\%$ )。

### 3. 心行動態 (Table 1)

心拍数は、control 群の虚血前値、低 NaPC 群、高 CaPC 群の preconditioning 後の値と比較し、IPC 群で preconditioning 施行後、有意に高値を示し ( $p < 0.01$ )、虚血1分後、再灌流1分後においてもその差は有意であった ( $p < 0.05$ )。しかし、再灌流5分後においては有意差は認めなかった。

左室圧については、虚血1分後においては低

NaPC 群で control 群に比較して有意に低値であったが ( $p = 0.03$ )、その他は各群間の有意差は認めなかった。

Fig. 5 に各群の RPP の変化率の推移を示した。Preconditioning そのものは RPP に対して有意な影響を及ぼさなかった (IPC 群  $101.3 \pm 6.4\%$ 、低 NaPC 群  $96.3 \pm 7.0\%$ 、高 CaPC 群  $84.4\% \pm 5.9\%$ )。虚血1分値は、control 群  $35.1 \pm 6.8\%$ 、IPC 群  $31.2 \pm 9.1\%$ 、低 NaPC 群  $22.8 \pm 2.4\%$  であり、各群間で有意差を認めなかった。5分、10分値においても同様に有意差はなく、それぞれ control 群  $22.5 \pm 3.5\%$ 、 $17.1 \pm 3.6\%$ 、IPC 群  $23.0 \pm 7.1\%$ 、 $17.8 \pm 5.0\%$ 、低 NaPC 群  $15.0 \pm 2.5\%$ 、 $12.3 \pm 2.1\%$ 、高 CaPC 群  $19.9 \pm 2.2\%$ 、 $11.3 \pm 2.9\%$  であった。再灌流後1分の値は、control 群  $46.3 \pm 11.6\%$ 、IPC 群  $79.0 \pm 6.5\%$ 、低 NaPC 群  $85.1 \pm 6.6\%$ 、高 CaPC 群  $86.1 \pm 11.3\%$  であった。再灌流1分後の RPP の回復は、preconditioning を施行した3群いずれにおいても、control 群と比較して有意に改善し、この現象は5分後においても同様で、control 群  $60.5 \pm 8.6\%$ 、IPC 群  $96.4 \pm 6.0\%$ 、低 NaPC 群  $98.6 \pm 8.8\%$ 、高 CaPC 群  $94.9 \pm 7.8\%$  であった。

Table 1. Hemodynamic data pre and after preconditioning, ischemia and reperfusion

	Pre	After preconditioning	Ischemia 10 min	Reperfusion 1 min	Reperfusion 5 min
control					
HR (bpm)	$174.3 \pm 5.3$	—	$140.0 \pm 0.0$	$146.8 \pm 33.3$	$181.8 \pm 10.0$
LVP (mmHg)	$72.5 \pm 9.5$	—	$28.3 \pm 2.8$	$35.0 \pm 8.9$	$42.5 \pm 9.3$
IPC					
HR (bpm)	$213.8 \pm 16.2^*$	$243.8 \pm 12.7^{**}$	$148.0 \pm 8.0$	$237.0 \pm 18.8^*$	$231.8 \pm 15.9$
LVP (mmHg)	$70.4 \pm 9.2$	$61.2 \pm 7.1$	$16.6 \pm 4.3$	$49.6 \pm 6.1$	$65.6 \pm 8.9$
LNPC					
HR (bpm)	$182.6 \pm 8.4$	$180.1 \pm 9.9$	$140.0 \pm 0.0$	$163.3 \pm 21.6$	$215.2 \pm 16.7$
LVP (mmHg)	$71.4 \pm 9.8$	$69.9 \pm 10.8$	$10.7 \pm 2.3$	$59.3 \pm 14.8$	$55.7 \pm 7.6$
HCPC					
HR (bpm)	$167.0 \pm 10.9$	$156.2 \pm 12.3$	$140.0 \pm 0.0$	$150.0 \pm 14.5$	$197.5 \pm 17.1$
LVP (mmHg)	$70.0 \pm 8.2$	$62.5 \pm 7.8$	$9.2 \pm 2.7$	$65.0 \pm 8.3$	$55.8 \pm 7.2$

Hemodynamic data for control group (control), ischemic preconditioning group (IPC), low-sodium preconditioning group (LNPC), and high-calcium preconditioning group (HCPC).  $^{**}p < 0.01$  IPC vs. control (pre), LNPC and HCPC.  $^*p < 0.05$  IPC vs. control, LNPC and HCPC. Data are means  $\pm$  S.E.

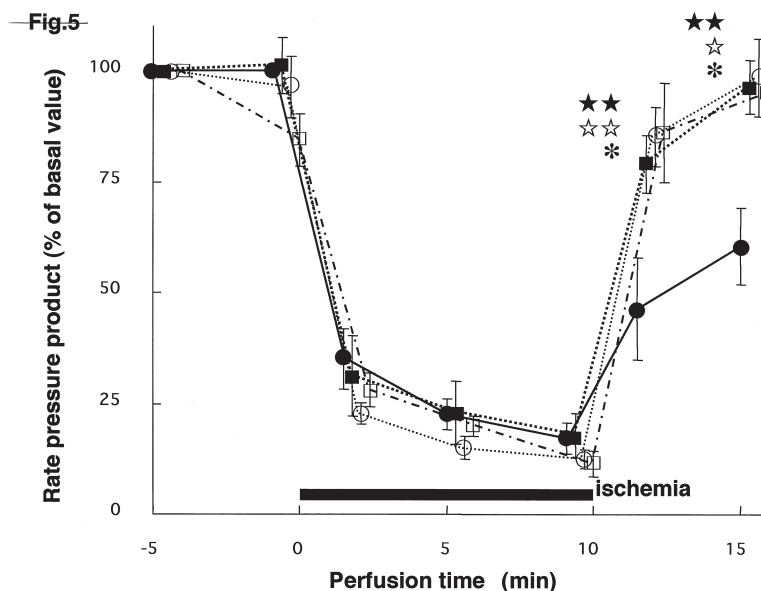


Fig. 5. Mean changes in rate-pressure product in hearts exposed to 10min of low-flow ischemia followed by reperfusion. The bar indicates the 10min of low-flow ischemia. (●—) control heart, (■·····) ischemic preconditioned heart (IPC), (○·····) low-sodium preconditioned heart (LNPC), (□---) high-calcium preconditioned heart (HCPC). \* $p < 0.05$  IPC vs. control, \*\* $p < 0.01$  LNPC vs. control, \* $p < 0.05$  HCPC vs. control, \*\* $p < 0.01$  HCPC vs. control. Data are means  $\pm$  S.E.

#### IV. 考 察

##### 1. $Ca^{2+}$ preconditioning と虚血耐性

心臓を  $Ca^{2+}$  を含まない条件で灌流 ( $Ca^{2+}$  depletion) した後に  $Ca^{2+}$  含有液で灌流 ( $Ca^{2+}$  repletion) すると、強い細胞障害が生じることが知られており、この現象は  $Ca^{2+}$  paradox と呼ばれている<sup>11)</sup>。また Ashraf らは、ラットの摘出灌流心において、1分間の  $Ca^{2+}$  depletion と5分間の  $Ca^{2+}$  repletion を5回反復すると、これに続く、より高度な  $Ca^{2+}$  paradox (10分間の  $Ca^{2+}$  depletion と10分間の  $Ca^{2+}$  repletion) に対し心保護効果を発揮することを報告し、この現象を  $Ca^{2+}$  preconditioning と呼んだ<sup>4)</sup>。また彼らは同様の実験系において、 $Ca^{2+}$  preconditioning が虚血再灌流においても心保護効果を示すことを報告し<sup>5)</sup>、さらにこの虚血再灌流に対する  $Ca^{2+}$  preconditioning の効果は、短時間の高  $Ca^{2+}$  溶液 (3.5 mmol/L  $Ca^{2+}$ ) 灌流を繰り返すことによっても得られることを報告している<sup>12)</sup>。これらの心保護効果については、心筋細胞構造が維持されることや、lactate dehydrogenase (LDH) の放出が減少する

こと、ATP の含量が保持されることによる評価が主たるものであり、実際の  $[Ca^{2+}]_i$  動態については観察されていない。虚血再灌流に対する preconditioning の心筋保護効果の機序としては、細胞内  $Ca^{2+}$  過負荷の軽減は重要であり、虚血前の preconditioning における一過性の  $Ca^{2+}$  の増加、すなわち  $Ca^{2+}$  ストレスが trigger となっている可能性が示唆されている。しかしすでに報告されてきた  $Ca^{2+}$  preconditioning は、虚血再灌流時の細胞内  $Ca^{2+}$  過負荷を軽減しているか否かについても明確にされておらず、したがって  $Ca^{2+}$  preconditioning のプロトコルにおける細胞内  $Ca^{2+}$  動態の解明は、非常に興味あるところである。今回我々は、高  $Ca^{2+}$  溶液灌流および低  $Na^+$  溶液灌流の異なる方法による  $Ca^{2+}$  preconditioning において、心機能と  $[Ca^{2+}]_i$  動態について観察した。このいずれの  $Ca^{2+}$  preconditioning も虚血再灌流後の RPP を有意に改善し、 $[Ca^{2+}]_i$  は、低  $Na^+$  溶液灌流群において虚血中および再灌流直後、高  $Ca^{2+}$  溶液灌流群では再灌流直後において有意に低下していた。これらの結果から、 $Ca^{2+}$  preconditioning の虚血再灌流に対する耐性発現

に,  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷の抑制が関与していることが明らかとなったといえる。

## 2. $\text{Ca}^{2+}$ preconditioning と ischemic preconditioning との関連性

虚血再灌流により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇し心筋障害を起こすことは良く知られたことである。心筋標本を用い低酸素および解糖系阻害薬 2-deoxy D-glucose 添加の条件下で fura-2 を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  測定<sup>13)</sup>, 摘出心を用いた灌流モデルでは NMR を用いたラット心臓の実験<sup>17)</sup>, 蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬エクオリンによるフェレットの心臓の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定<sup>14)</sup> のいずれの方法によっても, 虚血後の再灌流時に上昇が認められ, また, 虚血中においても  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が上昇することが確認されている<sup>1)</sup>。著者らも蛍光指示薬 fura-2 を摘出灌流ラット心に負荷し, 虚血再灌流による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を確認し, 虚血時間を延長するとその程度が増すことを報告した<sup>2)</sup>。

Preconditioning の概念は, 最初 Murry ら<sup>3)</sup> によって報告された。彼らは, イヌの実験的心筋梗塞モデルにおいて, 短時間の虚血操作を繰り返すことにより梗塞サイズが減少することを, preconditioning with ischemia として報告している。

今回は, 2つの  $\text{Ca}^{2+}$  preconditioning 群とともに ischemic preconditioning についても検討した。いずれの preconditioning も, protein kinase C 阻害薬<sup>5)15)–17)</sup>, あるいは ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャネル阻害薬<sup>18)–25)</sup> を preconditioning とともに投与することにより, その心筋保護効果が阻害されることが確認されるなど, 両者の反応経路には共通点が多い。また, ischemic preconditioning が,  $\text{Ca}^{2+}$  paradox に対する心保護効果を発揮することも報告されている<sup>26)27)</sup>。したがって, ischemic および  $\text{Ca}^{2+}$  いずれの preconditioning においても一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇が protein kinase C を活性化し, 最終的に ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャネルの開口を起こし, 保護効果を誘導することも考えられる。本研究で興味深い点は, ischemic preconditioning においても一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇が観察されたことであり, 前述の仮説を支持するものと思われる。短時間の虚血においても,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は軽度上昇することはすでに報告されている<sup>13)28)</sup>。

今回の実験において, IPC 群と他の  $\text{Ca}^{2+}$

preconditioning 2 群との効果の相違点は, 虚血中の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇の抑制である。IPC 群, 低 NaPC 群, 高 CaPC 群の 3 群間での有意差は認めなかったものの, 虚血 10 分間を通して Control 群に対し有意な抑制を示したのは, IPC 群のみである。再灌流時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の低下については 3 群とも同様であった。RPP を指標とした心機能評価においては 3 群とも同程度に改善効果を示した。これらのことから, 再灌流時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の baseline 値への回復 (低下) が虚血耐性の機序としてより重要である可能性が示唆された。また, preconditioning は ischemic,  $\text{Ca}^{2+}$  いずれによっても, 再灌流時  $\text{Ca}^{2+}$  のホメオスタシスを改善し, 心機能の回復をもたらしたと考えられる。

## 3. 本実験系の limitation

今回我々が示した実験系である whole heart における fura-2 を用いた蛍光強度比による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の測定は, 既に報告されたもの<sup>2)8)9)29)–31)</sup> であるが, 摘出灌流心の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の測定が妥当であるかという問題の検証は重要である。問題点として, 血管内皮細胞, 平滑筋細胞, mitochondria 内の  $\text{Ca}^{2+}$  の影響などが挙げられる。内皮細胞の影響については, bradykinin の投与による評価が報告されている。Indo-1 を用いたウサギの心臓においては, bradykinin の投与により蛍光強度が著明に増加することが示された<sup>32)</sup> が, 同様にウサギの心臓で fura-2 を用いた報告には, 殆ど影響がなかったとするものもある<sup>33)</sup>。一方で, ラットの心臓においてはその影響は軽度であり, 有意な影響は認めなかったとの報告がある<sup>34)35)</sup>。これらの報告では, whole heart model における血管内皮細胞, 平滑筋細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は, 収縮弛緩による変動は小さく, たとえ bradykinin 投与により内皮細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が増加しても,  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントのシグナル特性はほとんど影響を受けないとされている。mitochondria については, total fluorescence への影響は明白で, Field らは, その 43.9% を mitochondria の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が占める<sup>30)</sup> と報告した。しかし, 単離心筋細胞あるいは心筋細胞培養においては mitochondria の影響が大きいとの報告<sup>36)</sup> がある一方で, whole heart においては  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル特性への影響が少ないことを示唆する報告<sup>28)</sup> もある。また, Ylitalo らは,  $\text{Mn}^{2+}$  を負荷するこ



とにより fura-2 シグナルにおける mitochondria の影響を検証しており、これによれば、340 nm, 380 nm それぞれの励起光における蛍光強度はそれぞれ約 60% は mitochondria からのものであるが、その蛍光強度比は影響を受けなかったとしている<sup>31)</sup>。fura-2 非依存性, NADH 依存性の自家蛍光すなわち autofluorescence については, total fura-2 fluorescence の約 10%<sup>30)</sup>~25%<sup>31)</sup> を占めるとされている。Autofluorescence は虚血により増加するため<sup>2)31)</sup>, fura-2 の蛍光強度比にも少なからず影響を与えるが、個々の心臓について虚血中に測定する total fluorescence から, autofluorescence の増加分を抽出することは技術的に困難である。本研究では各群における虚血条件は同一であり autofluorescence の変動もほぼ同一と考えられ、群間での fura-2 蛍光強度比の比較は可能と思われた。

## V. 結 語

蛍光指示薬を負荷したラット摘出灌流心を用い、虚血再灌流における ischemic preconditioning,  $Ca^{2+}$  preconditioning の効果を、心行動態および細胞内  $Ca^{2+}$  動態から比較検討した。

1. 虚血中の diastolic  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、IPC 群において有意に抑制され、低 NaPC 群では虚血早期においてのみ抑制された。これに対し、高 CaPC 群においては有意な抑制は認められなかった。

2. 虚血再灌流後の diastolic  $[Ca^{2+}]_i$  は、再灌流 1 分後においては、IPC 群、低 NaPC 群、高 CaPC 群の全てで control 群と比較して有意に低下した。

3. 虚血再灌流後の RPP の回復は、IPC 群、低 NaPC 群、高 CaPC 群いずれにおいても control 群と比較して良好であった。

以上より、虚血再灌流障害における ischemic preconditioning, および  $Ca^{2+}$  preconditioning の心保護効果には、再灌流時の  $Ca^{2+}$  過負荷の抑制が関与していることが示唆された。また、ischemic preconditioning の効果発現機序の一つとして、preconditioning における短時間虚血時の  $Ca^{2+}$  上昇が trigger として関与している可能性が示唆された。

本研究の一部は第 22 回 Congress of the European Society of Cardiology (2000 年 8 月 Amsterdam. Eur Heart J 2000; 21 (Abstr. Suppl.): 253), 第 23 回 Congress of the European Society of Cardiology (2001 年 9 月 Stockholm. Eur Heart J 2001; 22 (Abstr. Suppl.): 669) で発表した。本研究は平成 12 年度-13 年度科学研究費補助金 (奨励研究 A. 課題番号 12770362) によった。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました、東京慈恵会医科大学内科学講座循環器内科望月正武教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevated in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 1987; 60: 700-7.
- 2) Seki S, Horikoshi K, Takeda H, Izumi T, Nagata A, Okumura H, et al. Effects of sustained ischemia and reperfusion on  $Ca^{2+}$  transients and contractility in perfused rat hearts. *Mol Cell Biochem* 2001; 216: 111-9.
- 3) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36.
- 4) Ashraf M, Suleiman J, Ahmad M.  $Ca^{2+}$  preconditioning elicits a unique protection against the  $Ca^{2+}$  paradox injury in rat heart. Role of adenosine. *Circ Res* 1994; 74: 360-7.
- 5) Miyawaki H, Zhou X, Ashraf M. Calcium preconditioning elicits strong protection against ischemic injury via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1996; 79: 137-46.
- 6) Okumura H, Seki S, Taniguchi M.  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger and protective effect of ischemic preconditioning in perfused rat hearts. *Jikeikai Med J* 2000; 47: 153-66.
- 7) Steenbergen C, Perlman ME, Murphy E. Mechanism of preconditioning: ionic alterations. *Circ Res* 1993; 72: 112-25.
- 8) Miyoshi K, Taniguchi M, Seki S, Mochizuki S. Effects of magnesium and its mechanism on the incidence of reperfusion arrhythmias following severe ischemia in isolated rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 2000; 14: 623-31.
- 9) Seki S, Taniguchi M, Takeda H, Nagai M, Taniguchi I, Mochizuki S. Inhibition by KB-

- R7943 of the reverse mode of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger reduces  $\text{Ca}^{2+}$  overload in ischemic-reperfused rat hearts. *Circ J* 2002; 66: 390-6.
- 10) Mochizuki S, Macleod KT. Effects of hypoxia and metabolic inhibition on increases in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced by  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in isolated guinea-pig cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2979-87.
  - 11) Zimmerman ANE, Hulsmann WC. Paradoxical influences of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 1966; 211: 646-7.
  - 12) Miyawaki H, Ashraf M.  $\text{Ca}^{2+}$  as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1997; 80: 790-9.
  - 13) van-Hardeveld C, Schouten VJ, Muller A, van der Meulen ET, Elzinga G. Exposure of energy-depleted rat trabeculae to low pH improves contractile recovery: role of calcium. *Am J Physiol* 1995; 268: H1510-20.
  - 14) Kihara Y, Crossman W, Morgan JP. Direct measurement of changes in intracellular calcium transient during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ Res* 1989; 65: 1029-44.
  - 15) Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266: H1145-52.
  - 16) Speechly Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C: its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 1994; 75: 586-90.
  - 17) Kitakaze M, Node K, Minamino T, Komamura K, Funaya H, Shinozaki Y, et al. Role of activation of protein kinase C in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through activation of ecto-5'-nucleotidase. *Circulation* 1996; 93: 781-91.
  - 18) Auchmpach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 1054-62.
  - 19) Walsh RS, Tsuchida A, Daly JJ, Thornton JD, Choen MV, Downey JM. Ketamine-xylazine anesthesia permits a KATP channel antagonist to attenuate preconditioning in rabbit myocardium. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1337-41.
  - 20) Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol* 1994; H1341-52.
  - 21) Speechly Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent  $\text{K}^+$  channel? *Circ Res* 1995; 30: 222-30.
  - 22) Armstrong SC, Liu GS, Downey JM, Ganote CE. Potassium channels and preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: effects of glyburide and pinacidil. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1765-74.
  - 23) Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res* 1996; 78: 1100-4.
  - 24) Koning MM, Gho BC, van Klaarwater E, Opstal RL, Duncker DJ, Verdouw PD. Rapid ventricular pacing produces myocardial protection by nonischemic activation of KATP channels. *Circulation* 1996; 93: 178-86.
  - 25) Kouchi I, Murakami T, Nawada R, Akao M, Sasayama S.  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels are common mediators of ischemic and calcium preconditioning in rabbits. *Am J Physiol* 1998; 274: H1106-12.
  - 26) Kawabata K, Osada M, Netticadan T, Dhalla NS. Beneficial effect of ischemic preconditioning on  $\text{Ca}^{2+}$  paradox in the rat heart. *Life Sci* 1998; 63: 685-92.
  - 27) Kawabata K, Netticadan T, Osada M, Tamura K, Dhalla NS. Mechanisms of ischemic preconditioning effects on  $\text{Ca}^{2+}$  paradox-induced changes in heart. *Am J Physiol* 2000; 278: H1008-15.
  - 28) Lee HC, Mohabir R, Smith N, Franz MR, Clusin WT. Effect of ischemia on calcium-dependent fluorescein transients in rabbit hearts containing indo 1. *Circulation* 1988; 78: 1047-59.
  - 29) Ataka K, Chen D, Levitsky S, Jimenez E, Feinberg H. Effect of aging on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}_i$ , and contractility during ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992; 86: II-371-6.
  - 30) Field ML, Azzawi A, Styles P, Henderson C,

- Seymour AML, Radda GK. Intracellular  $Ca^{2+}$  transients in isolated perfused rat heart : measurement using the fluorescent indicator Fura-2/AM. *Cell Calcium* 1994 ; 16 : 87-100.
- 31) Ylitalo KV, Ala-Rami A, Liimatta EV, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. Intracellular free calcium and mitochondrial membrane potential in ischemia/reperfusion and preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2000 ; 32 1223-38.
- 32) Lorell BH, Apstein CS, Cunningham MJ, Schoen FJ, Winberg EO, Peeters GA, et al. Contribution of endothelial cells to calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts loaded with Indo-1. *Circ Res* 1990 ; 67 : 415-25.
- 33) Jimenez E, del Nido P, Feinberg H, Levitsky S. Redistribution of myocardial calcium during ischemia : relationship to onset of contracture. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 ; 105 : 988-94.
- 34) Camacho SA, Figueredo VM, Brandes R, Weiner MW.  $Ca^{2+}$ -dependent fluorescence transients and phosphate metabolism during low-flow ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 1993 ; 265 : H114-22.
- 35) Wikman-Coffelt J, Wu ST, Parmley WW. Intracellular endocardial calcium and myocardial function in rat hearts. *Cell Calcium* 1990 ; 12 : 39-50.
- 36) Blatter LA, Wier WG. Intracellular diffusion, binding, and compartmentation of the fluorescent calcium indicators indo-1 and fura-2. *Biophys J* 1990 ; 58 1491-9.