

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—在留中国人研究者研究助成—

2002年 2月 28日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 曹 永彤
所属機関名 愛知医科大学第二外科
指導責任者氏名 永田昌久
職 名 教授
所在地 〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町
電話 0561-62-3311 内線 2141

1. 研究テーマ

虚血再灌流心筋障害に対するNOの心筋保護作用について
— NO供与体FK409添加心筋保護液の検討 —

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ (学会名・演題)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

モルモット虚血再灌流障害に対するNOの心筋保護作用のメカニズムについて

- ①ランゲンドルフ心臓を作成して、ESR器械で虚血と再灌流中の酸素ラジカルを測定する。
- ②NO供与体FK409をランゲンドルフ心臓に投用して、ESR器械で虚血と再灌流中の酸素ラジカルを測定して、酸素ラジカルを減少させることが確認する。
- ③通常電顕でのミトコンドリアの形態学観察。
- ④凍結切片のcytochrome c, caspase 3, caspase 9, bcl-2, bax等apoptosis関連蛋白の免疫組織化学染色して、心筋細胞apoptosisとの関連を調べる。

4. 指導責任者の意見

研究者は愛知医科大学当講座に籍を置いて以来、外科臨床をやりながら積極的に研究活動を行って来ました。すでに研究成果を上げており、特にモルモットLangendorff心臓モデルを用いて心筋細胞虚血再灌流障害に対するNOの心筋保護作用が明らかにしております。現在、さらに研究を進展させており、NO供与体を含む心筋保護液分野での新たな成果が大いに期待できます。

指導責任者氏名 永田 昌久



5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、**日中医学協会助成金**による旨を明記して下さい。

虚血再灌流心筋障害に対するNOの心筋保護作用について

— NO 供与体 FK409 添加心筋保護液の検討 —

研究者氏名	曹 永彤
中国所属機関	中国北京中日友好病院
日本研究機関	日本愛知医科大学第二外科
指導責任者	教授 永田 昌久
共同研究者名	堀田芳弘, 塩井健介, 永田昌久, 川井範夫, 石川直久

Summary

Effects of FK409 were investigated in perfused guinea-pig Langendorff hearts subjected to ischemia and reperfusion. Nitric oxide electrode, fluorometry and ^{31}P -NMR were used to monitor the changes in the cellular high phosphorous energy and NO and Ca^{2+} content in the heart together with simultaneous recordings of left ventricular developed pressure. An NO electrode was placed in the right atrium of a fura-2 loaded heart. After cardioplegic arrest with St. Thomas' Hospital solution, normothermic (37°C) global ischemia was induced for 40 min, and the hearts were reperfused for 40 min. FK409 at 10^{-8}M , which has a minimum inotropic effect on nonischemic hearts, was added to the cardioplegic solution. Treatment with FK409 reduced the left ventricular end-diastolic developed pressure during and after the ischemia and improved the post-ischemic recovery of LVDP from 55.4% at 40 min of reperfusion in FK409-free hearts up to 80.4% in hearts treated with FK409 ($p < 0.01$). The flow rate (ml/min) at 1.5 min after treatment with STS was 27.7 in hearts treated with FK409 compared with 21.2 in drug-free hearts ($p < 0.01$). Treatment with FK409 had a significant preservation effect on the tissue level of β -ATP at the end of ischemia or reperfusion. During ischemia, arrested with STS, the intracellular Ca^{2+} accumulation and NO release were reduced. At the end of the 40 min period of ischemia in FK409-treated hearts, NO release was 86% greater than in drug-free hearts without reference to the Ca^{2+} concentration. In cardiac surgery, normothermic arrested hearts are subject to damage by oxygen-free radicals in reperfusion-injury. Therefore, NO exogenously supplied by FK409 was responsible for the cardioprotective action, presumably by acting directly as an oxygen radical scavenger during reperfusion. It is suggested that a specific NO-donor, like FK409, has potential therapeutic use as an NO-mediated vasorelaxer and additional protective action of the NO-donor for reperfusion-injury hearts if added before ischemia.

Keywords: FK409, nitric oxide electrode, Ca^{2+} -fluorometry, ^{31}P -NMR, ischemia-reperfusion.

目 的

一酸化窒素 (NO) は冠血管平滑筋を弛緩、ATP の減少を抑制し、心筋細胞内 Ca^{2+} レベル低下や酸素ラジカルを減少することによって心筋保護できる一方、スーパーオキシド (O_2^-) と共存するとパーオキシナイトライト (ONOO^-) を産生し、むしろ細胞障害を引き起こす可能性がある。本研究ではNO供与体FK409 (藤沢薬品K.Kより供与) を用いてモルモット摘出心臓に対する虚血再灌流心筋保護作用を検討した。ランゲンドルフ心臓に St. Thomas液と薬液を注入して心臓を停止させ、再灌流を行い、虚血前(100%)と再灌流後の左室内圧の変化 (left ventricular developed pressure : LVDP, left ventricular end diastolic developed pressure : LVEDP)

冠血流量(FR)の回復率(%)を求めると同時に、 ^{31}P -NMRを測定し、高エネルギーPの動態について、薬物投与群と比較した。また、NO-meterとFluorometerを用いて、虚血再灌流中のコントロール、St.Thomas液のみ、St.Thomas+FK409投与群の Ca^{2+} 、NO動態について経時的に測定し比較検討した。

方法

A. モルモット摘出心灌流

摘出モルモット(♂♀、400g前後)心臓の大動脈にカニューレを挿入し、Krebs-Henseleit液(KH液、 Ca^{2+} 2.0mM、pH7.4、37°C、95% O_2 +5% CO_2 混合ガス飽和)で灌流(75cmH₂O)し、Langendorff(LN)心臓を作成した。コントロール(C group, n=8)として、KH液で30分間灌流安定化させた後、40分間灌流停止し、40分間KH液で再灌流した。また、一群のモルモットLN心臓(T group, n=8)をKH液で30分間安定化した後St.Thomas液を注入して、心臓を停止させて、40分間灌流停止し、40分間KH液で再灌流した。また、別の一群のモルモットLN心臓(F group, n=8)をNOの供与体FK409を含むSt.Thomas液で心臓を停止させて、40分間灌流停止し、40分間FK409含有しない新しいKH液で再灌流した。各群のモルモットのLN心臓の左心室にバルーンを挿入し、左室内圧(LVDP)と左室拡張期圧(LVEDP)を経時的に測定した。大動脈に連結したカニューレに電磁流量計を付けて、冠血流量(FR)を経時的に測定した。下のプロトコールに従い、各群の再灌流後のLVDPの回復率(%)を虚血前100%として求めた。

B. ^{31}P -NMRの測定方法

上に述べた群のモルモットのLN心臓はGSX400 FT-NMR装置(JEOL)の直径20mmのP核種専用プローブ中に設置し、虚血前、虚血再灌流中の高エネルギーPの動態を経時的に同時に測定した。

C. NO・とFura-2 Ca^{2+} signalの測定

1) NO電極の設置とFura-2の負荷

摘出モルモット(♂♀、400g前後)心臓の大動脈にカニューレを挿入し、KH液を流量7~9ml/minの速度でポンプを用いて送液し、Langendorff心臓を作成した。収縮力は左心室にバルーンを挿入し、左室内圧(LVDP)を測定した。NO選択電極は心臓の右心房(冠状静脈洞)に挿入され心臓から流出するNO \cdot の変化を測定した。対照カーボン電極は心臓の外の外液中に置き、NO電極を安定化させながら心臓にfura-2 AM 5 μM (25% Cremophore EL)含有KH液を30分間灌流しfura-2を心臓に負荷した。負荷後に新しいKH液で洗浄して、心筋細胞外のfura-2 AMを完全に除去し、20分間安定化させた後、実験を行った。(Eur J Pharmacol. 1995; 282: 121.) 2) NO測定法 NO選択電極は心臓の右心房(冠状静脈洞)に挿入され、電磁波の影響を受けない環境下で測定した。NO電極は、直径0.2mmでplatinumとiridiumの合金(Pt 90%, Ir 10%)よりなり、KCl膜、NO選択性セルロースレジン膜、ガス透過性シリコン膜の3層より構成されている。NO選択電極と対照カーボン電極のpAレベルの還元電流をNO-meter (NO-501, Inter Medical Co.)を用いて50/60Hz Noise eliminator (Hum Bug Quest Scientific Instrument, Canada)を介してノイズを除去して測定した。NOレベルは、定流量灌流で基礎値が安定した電流値(pA)をゼロとした。

3) 蛍光測定

Fura-2を負荷した摘出心臓はFluorometer (CAF-100, JASCO)の測定ユニットの恒温槽の中に心臓の左心室表面部分に光が当たるように設置した。KH液を灌流しながら心筋に340と380nmの励起光を当て、蛍光波長500nmでの蛍光強度の比(ratio)340/380を記録計に心臓内 Ca^{2+} 濃度変化として記録させた。C group, T group, F group, 各n=8についてFura-2 Ca^{2+} signal、NO signalおよびLVDPを同時に記録した。

D. 虚血再灌流後の心筋のミトコンドリアの電顕観察 各組モルモットのLN心臓の虚血直前、虚血40分間後、再灌流40分間後に左心室から心筋組織を摘出して、超薄切片を作製し、酢酸ウラン電子染色とクエン酸鉛染色を行い、乾燥して透過電顕でミトコンドリアを観察した。

結果

1 ATP、LVDP回復率とFRの変化率

虚血再灌流40分後のLVDPの回復率はF:81% T:55% C:33%の順に有意に存在を認めた。虚血40分後のATP回復率はF:91% T:74% C:57%の順に有意 ($p<0.05$) に存在を認めた。

St. Thomas 液注入直後のFRの増加率はF:187% T:145% C:100%の順に有意 ($p<0.05$) に増加し、再灌流40分後のFRの回復率もF:81.4% T:64.8% C:41.7%の順に有意 ($p<0.05$) に増加した。

2 虚血再灌流中のNOとCa²⁺の濃度

T groupはC groupより虚血後半のCa²⁺濃度を低下させた (C: ratio 1.09→ T: ratio 0.94 $p<0.05$)。

F group (ratio 0.88) は虚血後半のCa²⁺濃度がT groupと同程度 (TとN.S.) で示されたが、NOのみ上昇していた (T: 302 pA→ F: 533 pA $p<0.05$)。再灌流後のNO、Ca²⁺濃度は各群有意差は認めなかった。

3 心筋細胞のミトコンドリアの電顕観察

F groupは再灌流40分後にC group、T groupに比べ、ミトコンドリアの膨化拡大、ミトコンドリア内の障害が軽度で、虚血前の心筋電子顕微鏡像と同様、ミトコンドリアの大きさ、扁平形態、クリスタ、マトリック、および内外膜構造は良好に保たれていた。

考 察

1. NO供与体FK409は³¹P-NMRの測定においてコントロール、St. Thomas液のみに比べて虚血後半にATPの存在を認め、虚血後の再灌流によりLVEDP、LVDP、FRおよびATP、PCrなどの高エネルギーPの回復を示し心筋保護作用が認められた。

2. これに加えて、FK409投与後の虚血再灌流後の心臓の電顕所見においてもATPを産生するミトコンドリアの保持が認められた。

3. St. Thomas液停止心臓においてコントロールよりも再灌流後の収縮力の回復は良くなるが虚血後半のCa²⁺およびNO[•]を低下させた。これにFK409を加えた心臓では虚血後半にCa²⁺はほぼ同程度であるがNO[•]のみ上昇し、更に再灌流による収縮の回復を高めた。

4. FK409投与群は再灌流直後にもNOの大きなトランジェントを示した。

以上より、虚血中のNO増大は、ミトコンドリアにおいて再灌流時に発生し、障害を起こす $\cdot O_2^-$ に作用し、ミトコンドリア機能を保持し、心筋の保護作用を示すと思われる。

REFERENCES

1. Neely JR, Grotyoharn LW. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium: dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res* 1984; 55: 816-24.
2. Hendriks M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Hecke PV, Vanstapel F, Lommel AV, Verbeken E, Lauweryns J, Flemeng W. New Na⁺-H⁺ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca²⁺ overload in isolated perfused rabbit heart. *Circulation* 1994; 89: 2787-98.
3. Hotta Y, Fujita M, Nakagawa J, Ando H, Takeya K, Sakakibara J. Contribution of cytosolic ionic and energetic milieu change to ischemia- and reperfused-induced injury in guinea-pig heart: Fluorometry and nuclear magnetic resonance studies. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 146-56.
4. Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, Nakagawa J, Yajima M, Ishikawa N, Kawai N, Masumizu T, Kohno M. Protective role of nitric oxide synthase in myocardial mitochondria against ischemia-reperfusion injury in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 1999; 380: 37-48.
5. Hotta Y, Nakagawa J, Wakida Y, Ishikawa N, Ando H, Takeya K, Ohashi N, Matsui K. Protective effect of SM-20550, a selective Na⁺-H⁺ exchange inhibitor, on ischemia-reperfusion injured hearts. *J*

Cardiovasc Pharmacol in press.

6. Crompton M, Heid I. The cycling of calcium, sodium, and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria. *Eur J Biochem* 1978; 91: 599-608.
7. Duan J, Karmazyn M. Relationship between oxidative phosphorylation and adenine nucleotide translocase activity of two populations of cardiac mitochondria and mechanical recovery of ischemic hearts following reperfusion. *Can J Physiol Phamacol* 1989; 67: 704-9.
8. Karmazyn M. Ischemic and reperfusion injury in the heart. Cellular mechanisms and pharmacological interventions. *Can J Physiol Phamacol* 1991; 69: 719-30.
9. Ruß U, Balsler C, Scholz W, Albus U, Lang HJ, Weichert A, Schölkens BA, Gögeleine H. Effects of the Na^+/H^+ -exchange inhibitor Hoe 642 on intracellular pH, calcium and sodium in isolated rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 1996; 433: 26-34.
10. Flaherty JT, Weisfeldt ML, Bulkley BH, Gardner TJ, Gott VL, Jacobus WE. Mechanisms of ischemic myocardial cell damage assessed by phosphorus-31 nuclear resonance. *Circulation* 1982; 65: 561-71.
11. Kirkles JH, Ruigrok TJC, Van Echteld CJA, Meijler FL. Low Ca^{2+} reperfusion and enhanced susceptibility of the postischemic heart to the calcium paradox. *Circ Res* 1989; 64: 1158-64.
12. Hotta Y, Ishikawa N, Ohashi N, Matsui K. Effects of SM-20550, a selective Na^+/H^+ exchange inhibitor, on the ion transport of myocardial mitochondria. *Mol Cell Biochem* in press.
13. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446-56.
14. Kaneko M, Matsumoto Y, Hayashi H, Kobayashi A, Yamazaki N. Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. *Mol Cell Biochem* 1994; 139: 91-100.
15. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takesita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999; 85: 357-63.
16. Kita Y, Hirasawa Y, Yoshida K, Maeda, K. Antiplatelet activities of FK409, a new spontaneous NO releaser. *Br J Phamacol* 1994; 113: 385-88.
17. Isono T, Sato N, Yamamoto T, Sawada T, Yamazaki S, Miura S, Furuichi A, Ozaki R, Koibuchi Y, Ohtsuka M. Tolerance to the vascular effect of a novel nitric oxide-donating vasodilator, FK409. *Eur. J. Pharmacol* 1994; 260: 163-68.
18. Hotta Y, Ando H, Takeya K, Sakakibara J. Direct measurement of increased myocardial cellular ^{23}Na NMR signals in perfused guinea-pig heart induced by dihydroouabain and grayanotoxin-I. *Mol cell Biochem* 1994; 139: 59-70.
19. Koike A, Abe T, Hotta Y, Takeya K, Kodama I, Toyama J. Protective effects of dimethyl amiloride, a potent Na^+/H^+ exchange inhibitor, against post-ischemic myocardial dysfunction: ^{31}P -NMR measurements of pH_i and cellular energy in isolated perfused rabbit hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 112: 765-75.
20. Moon RB, Richards JH. Determination of intracellular pH by ^{31}P magnetic resonance. *J Biol Chem* 1973; 248: 7276-78.

注: 本研究を英文に書き直して、年末或いは来年の春に投稿します。

作成日 : 2002年2月28日