

## ラット摘出心灌流モデルによるカルシウム拮抗剤(Diltiazem)の虚血心筋保護効果に関する研究

福廣 吉晃

Crystalloid cardioplegia である St. Thomas' solution にカルシウム拮抗剤の一つである Diltiazem を加え isolated working rat heart model を使用して心筋虚血実験を行い Diltiazem の心筋保護効果につき検討した。虚血後、大動脈流量回復率は Diltiazem 添加により  $63.2 \pm 8.6\%$  vs  $79.9 \pm 5.9\%$  (STS vs STS+Diltiazem, mean  $\pm$  S.D.) と有意に ( $p < 0.01$ ) 良好な回復を示し、再冠灌流液中の CPK は  $87.5 \pm 35.8$  IU/20 min/g dry wt vs  $41.7 \pm 14.5$  IU/20 min/g dry wt (STS vs STS+Diltiazem, mean  $\pm$  S.D.) と有意に ( $p < 0.05$ ) 低値を示し、虚血再灌流障害に対する心筋保護効果が認められ、この効果は虚血、再灌流時の細胞内 Ca-overload を軽減したためと思われた。(平成 6 年 10 月 11 日採用)

### The Effect of Diltiazem on Myocardial Ischemia Using an Isolated Rat Heart Perfusion Model

Yoshiaki Fukuhiro

I investigated the effect of the addition of diltiazem to a crystalloid cardioplegic solution (St. Thomas' solution) on myocardial protection during normothermic ischemia using an isolated rat heart perfusion model.

Diltiazem significantly improved to percent recovery ratio of aortic flow after an ischemic arrest ( $63.2 \pm 8.6\%$  vs  $79.9 \pm 5.9\%$ , control vs diltiazem,  $p < 0.01$ ) and reduced CPK leakage during reperfusion ( $87.5 \pm 35.8$  IU/20 min/g dry wt vs  $41.7 \pm 14.5$  IU/20 min/g dry wt, control vs diltiazem,  $p < 0.05$ ), while there were no changes in the recovery of heart rate and coronary flow during reperfusion after the myocardial ischemia. In conclusion, the addition of diltiazem to the crystalloid cardioplegic solution was effective for myocardial protection during normothermic ischemia. (Accepted on October 11, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20(3): 153-158, 1994

**Key Words** ① Calcium antagonist ② Myocardial ischemia  
③ Myocardial protection

#### はじめに

心臓手術成績の向上には手術手技のみならず、

術中の心筋の虚血障害、及び血流再開による再灌流障害を可及的に防止し、術後速やかな心機能の回復を促す心筋保護対策が重要な課題となっている。その障害の 1 つの因子として虚血再

灌流による心筋細胞内の Ca-overload<sup>1)</sup>があり、これをいかに抑制、防止するか諸施設で色々な観点から検討されてきた。今回、現在広く臨床で使用されているカルシウム拮抗剤の1つである Diltiazem を用い、その心筋保護効果につき検討を行った。

### 実験方法

実験装置は Figure 1 に示す isolated working rat heart model<sup>2)</sup> を使用した。Langendorff の逆行性灌流による non-working beat, working beat 中の灌流液は Krebs Henseleit Bicarbonate Buffer (以下 KHBB と略す) に 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> を吹送し、pH 7.5 に調節した液を用いた。心筋保護液は Table 1 に組成を示す高カリウムを主体とした St. Thomas 液を 37°C で pH 7.8 に調整、使用した。これを I 群とし St. Thomas 液に 0.5 μmol/l の diltiazem を加え使用したものを II 群とした。

### 方法と実験プロトコール (Fig. 2)

体重 250~350g のウイスター系雄性ラットをエーテル麻酔下にヘパリン 200 IU を静注後、心臓を速やかに摘出、氷冷した KHBB に浸して心停止させた後、大動脈にカニューレシオンし、Langendorff 逆行性灌流を開始、non-working beat で血液を wash out、肺動脈を切開した。経肺静脈的に左房へカニューレシオンし、working 灌流とした。5分毎に心機能を20分間測定し、虚血前20分間の平均値を虚血前値とした。その後、大動脈を遮断、大動脈側枝より、60 cm

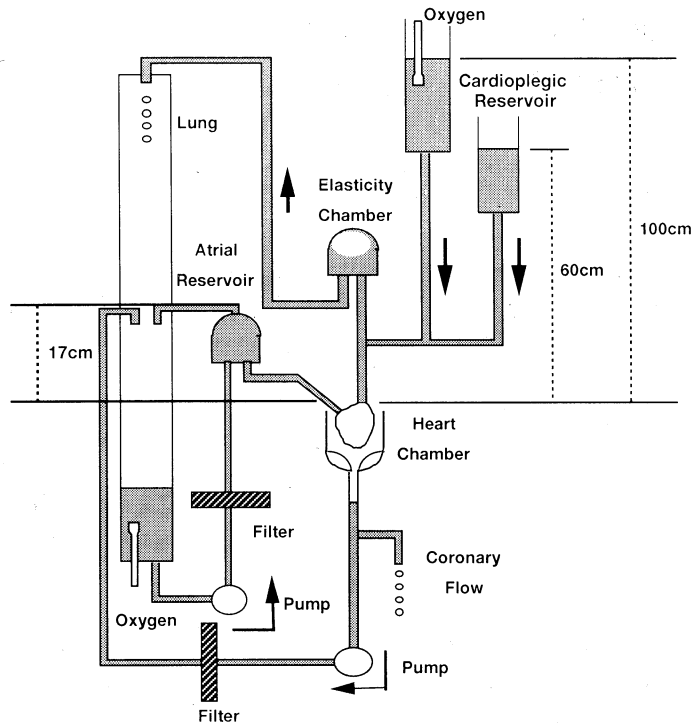


Fig. 1. The isolated working rat heart model

This model in a left heart preparation in which oxygenated perfusion medium at 37°C enters the cannulated left atrium at a pressure equivalent to 17 cmH<sub>2</sub>O and is passed to the left ventricle, from which it is spontaneously ejected via an aortic cannula, against a hydrostatic pressure equivalent to 100 cm.

Table 1. The composition of St. Thomas' cardioplegic solution

| Compound                                  | concentration (mmole/l) |
|---|-------------------------|
| Sodium chloride                           | 110.0                   |
| Potassium chloride                        | 16.0                    |
| Magnesium chloride                        | 16.0                    |
| Calcium chloride                          | 1.2                     |
| Sodium bicarbonate                        | 10.0                    |
| pH adjusted to 7.8                        |                         |
| Osmolarity = 324 mOsm/kg H <sub>2</sub> O |                         |

水柱圧で心筋保護液を3分間注入、心停止とし、37度常温心虚血状態を30分間持続させた後、再び20分間Langendorffの逆行性灌流によるnon-working beatを20分間行い、その間冠静脈からの流出液を採取、再びworking灌流に変更、同様に心機能を測定した。虚血前20分間 work-

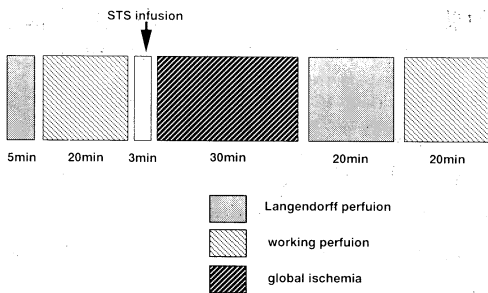


Fig. 2. The experimental time schedule

Hearts were perfused to wash out in the aerobic Langendorff perfusion for 5 min, and next were perfused in the aerobic working perfusion for 20 min. And the end of this time, the St. Thomas' cardioplegic solution was infused for 3 min. This was followed by 30 min of global ischemic arrest at 37°C. After that, the hearts were reperfused in the aerobic Langendorff perfusion for 20 min, and then in the aerobic working perfusion for 20 min.

ing beat の心機能の平均値を心機能虚血前値とし、虚血再灌流後20分後 working beat の値を虚血後値とし、それを虚血前値に対する百分率で表示し、%回復率とした。なお Langendorff の逆行性灌流は 100 cm 水柱圧とし、working 灌流は前負荷を 17 cm 水柱圧、後負荷 100 cm 水柱圧とした。

心機能の測定

心機能の指標として大動脈流量、心拍数、大動脈圧を測定、冠灌流量は冠静脈流出量とした。大動脈流量測定には日本光電社製 FF 型電磁流量計プローブ、電磁流量計 MVF 3100を用いた。大動脈圧測定には、SPECTRAMED 社製血圧キット、フクダ電子製ポリグラフを用いた。心拍数は記録した大動脈波形より算出、冠静脈流出量は心臓より摘下さる液を集め測定した。

CPK 測定

心筋障害の指標として再 Langendorff 逆行性灌流中の冠静脈流出液中の CPK を Oliver-UV 法にて測定し、心臓乾燥重量 1g 当り20分間再 Langendorff 逆行性冠灌流液中の総遊出量とし、IU/20 min/g dry wt と略記した。

結果の表現および統計処理

Table 2. Preischemic cardiac function

|               | STS        | STS+Diltiazem |
|---------------|------------|---------------|
| n             | 7          | 8             |
| AF(ml/min)    | 64.1±2.6   | 66.6±2.5      |
| CF(ml/min)    | 19.8±1.2   | 21.4±2.8      |
| CO(ml/min)    | 83.9±2.9   | 88.0±2.5      |
| HR(beats/min) | 297.7±21.1 | 296.8±24.2    |

Values were expressed as mean±S. D.

AF, aortic flow ; CF, coronary flow ; CO, cardiac output ; HR, heart rate.

Table 3. Recovery of cardiac function and CPK leakage

|                                 | STS       | STS+Diltiazem |
|---------------------------------|-----------|---------------|
| %AF (%)                         | 63.2±8.6  | 79.9± 5.9*    |
| %CF (%)                         | 90.0±7.1  | 92.7±12.1     |
| %CO (%)                         | 69.5±7.4  | 83.0± 6.7     |
| %HR (%)                         | 92.8±4.0  | 96.1± 6.5     |
| CPK leakage (IU/20min/g dry wt) | 87.5±35.8 | 41.7±14.5**   |

Values were expressed as mean±S. D.

%AF, recovery of aortic flow ; % CF, recovery of coronary flow ; %CO, recovery of cardiac output ; %HR, recovery of heart rate.

\* p<0.01 ; \*\* p<0.05

結果は、平均値±標準偏差で表し、統計学的検討は分散分析を行った後、unpaired t-test で各群間の検定を行い、p<0.05を有意とした。

結 果

1. 虚血前心機能 (Table 2)

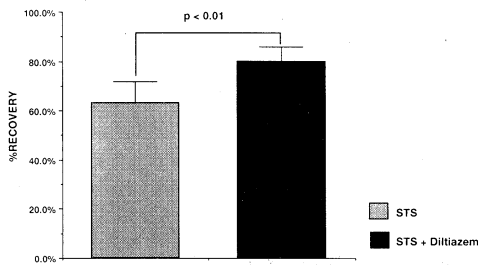
虚血前の大動脈流量、冠静脈流出量、心拍数、大動脈圧は I, II 群間で有意差は認められなかった。

2. 心機能回復率 (Table 3, Fig. 3)

大動脈流量の回復率は I 群63.2±8.6%、II 群79.9±5.9%と Diltiazem 添加の II 群で有意に (p<0.01) 良好な回復を示した。冠灌流量回復率、大動脈圧回復率、心拍数回復率は両群間で有意差は認めなかった。

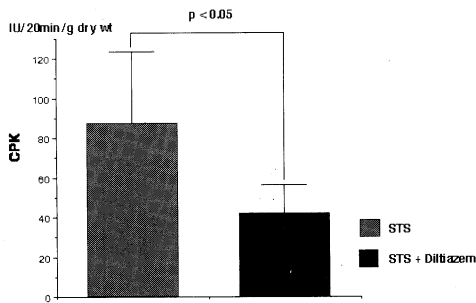
3. 酵素遊出 (Table 3, Fig. 4)

虚血後 Langendorff 逆行性再灌流中の冠静脈流出液中の CPK 総遊出量は I 群87.5±35.8



**Fig. 3.** Effect of diltiazem for % recovery of aortic flow

This graph was shown as mean of % recovery of aortic flow. The vertical bars indicated S. D. Addition of diltiazem improved postischemic recovery of aortic flow (from  $63.2 \pm 8.6\%$  to  $79.9 \pm 5.9\%$ ,  $p < 0.01$ )



**Fig. 4.** Effect of diltiazem for CPK leakage

This graph was shown as mean of CPK leakage during reperfusion. The vertical bars indicated S. D. Addition of diltiazem reduced CPK leakage during reperfusion ( $87.5 \pm 35.8$  IU/20 min/g dry wt vs.  $41.7 \pm 14.5$  IU/20 min/g dry wt, control vs diltiazem,  $p < 0.05$ )

IU/20 min/g dry wt, II群  $41.7 \pm 14.5$  IU/20 min/g dry wt と Diltiazem 添加の II 群で有意に ( $p < 0.05$ ) 低値を示した。

## 考 案

Ca 拮抗剤は Ca イオンの流れ ( $Ca^{2+}$  influx) を修飾することにより心血管系に対し強い作用を發揮し、これまで高血圧、虚血性心疾患に対する治療薬として広く臨床に使用され、また L 型 Ca チャンネルに作用し、虚血、再灌流時に  $Ca^{2+}$  の細胞内流入を抑制する<sup>3), 4)</sup> ことから心筋保

護効果が期待されている。心臓手術中、各種心筋保護液を使用した心停止後の心筋虚血障害に対する Ca 拮抗剤の効果についても検討されてきたが<sup>3)-9)</sup>、いまだ統一した見解はない。

著者は、ラット摘出心を用い St. Thomas 液による常温30分虚血、再灌流実験で Diltiazem の効果について検討した。0.5  $\mu\text{mol/l}$  の Diltiazem を St. Thomas 液に加えることにより虚血後大動脈流量の良好な回復と冠静脈流出液中 CPK 遊出の減少を認め、心筋保護の効果を明らかにした。Yamamoto ら<sup>5)</sup> は、ラット摘出心を用いた虚血、再灌流実験で Diltiazem の心筋保護作用至適濃度を 0.5  $\mu\text{mol/l}$  とし、心筋保護効果を認め、Vouhé ら<sup>6)</sup> も人工心肺下の犬で2時間の低温虚血実験を行い、Diltiazem 添加心筋保護液投与群で良好な左心機能の回復を認めたと報告している。

本実験では虚血後の冠灌流量の回復率は両群間で有意差を認めず、摘出心を用いたことから虚血中の心外からの側副血流は無視され、心筋保護効果としては、Diltiazem の虚血心筋に対する直接保護作用の存在が示唆され、細胞内 Ca-overload の軽減にもとづくものと思われた。

原田<sup>10)</sup> は冠動脈狭窄犬での検討で Diltiazem により虚血領域での心筋血流量、分布は有意な変化はなかったが、収縮能力の改善と虚血部灌流域での乳酸摂取率の増加を認めたとし、また田村ら<sup>7)</sup> はラットの心筋内酸素濃度を検討し、Diltiazem 投与により心停止状態でも心筋内酸素濃度の上昇を認めたとし、著者の結果と同様、Diltiazem の虚血心筋に対する直接保護作用の存在を示唆している。Ca 拮抗剤の心拍数減少作用<sup>11)</sup>、心筋収縮力抑制作用<sup>12), 13)</sup> などの陰性変力作用は心筋酸素需要量低下には有効であるが、心臓手術では再灌流後速やかな心機能の回復を必要とし、陰性変力作用を可及的に少なくし、かつ有効な心筋保護を保つためには Ca 拮抗剤の濃度設定に問題を有すると考えられる。

著者が用いた 0.5  $\mu\text{mol/l}$  の低濃度では、虚血後心拍数の回復は両群間で有意差はなく、心拍数への影響は認められず、かつ虚血後大動脈

流量も対象群と比較して有意に増加し、Diltiazemにより虚血後収縮力の改善が認められ、低濃度使用下では陰性変力作用は問題とならなかった。

開心術例でChristakisら<sup>8)</sup>は心筋保護液中のDiltiazem至適濃度を150 µg/kgとしているが多くの例で再灌流時 pacing を必要とし、森ら<sup>9)</sup>は術後心筋逸脱酵素の低下、冠動脈スパズムの予防には有効であったが、総投与量250 µg/kg以上、また60歳以上の症例では再灌流時房室ブロック、徐脈がしばしば見られたとし、Yamamotoら<sup>5)</sup>は高濃度のDiltiazem投与により虚血後心機能の回復低下、再灌流時CPK遊出量の増加を認めたとし、濃度や、投与方法のさらなる検討が望まれる。

また開心術においては個々の症例により術前の心筋障害の程度が異なり、また心停止時間も数時間に及ぶ例も少なからず存在する。より安全な心臓手術のため心筋保護液も電解質の組成、血液加心筋保護液、心筋保護液の温度、全身低体温併用など様々工夫がなされているが、いま

だ理想的な心筋保護法はなく今後のさらなる研究を要する分野である。

## ま と め

1) ラット摘出心を用い心停止、心筋保護液による常温虚血再灌流実験によりDiltiazemの心筋保護効果を検討した。

2) St. Thomas液にDiltiazemを添加することにより虚血後の心拍出量の回復率は上昇し、再灌流時のCPK遊出量の減少をみた。

3) この効果は虚血、再灌流時の細胞内Ca-overloadを軽減したためと思われる。

稿を終えるのに当たりご指導いただきました本学心臓外科教授 藤原 巍教授、並びに教室諸兄に深謝すると共に、ご協力をいただきました国立循環器病センター心臓血管外科 山本文雄先生に感謝の意を表します。

本研究は本学プロジェクト研究No. 4-103. 1992, No. 5-210. 1993の援助により行った。

## 文 献

- 1) Fleckenstein A, Janke J, Doring HG, Lender O: Key Role of Ca<sup>2+</sup> in the production of non-coronarogenic myocardial necrosis. *In* Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, vol 6, ed by Haris P, et al., Baltimore, University park press. 1975, p 21
- 2) Hearse DJ, Braimbridge MV, Jynge P: Protection of the Ischemic myocardium: Cardioplegia ed 1, New York, Raven Press. 1981, p 59
- 3) Opie LH: Reperfusion in injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 80: 1049-1062, 1989
- 4) 小池 龍, 佐々木貞男, 中垣育子, 志熊 肅, 木村 弘, 佐藤晴瑞, 沢田吉英, 佐々木進次郎, 武内敦郎: Diltiazemが開心術時の心筋細胞内電解質動態に及ぼす影響. *薬理と治療* 15: 661-616, 1987
- 5) Yamamoto F, Manning AS, Braimbridge MV, Hearse DJ: Calcium antagonists and myocardial protection: Diltiazem during cardioplegic Arrest. *Thorac Cardiovasc Surgeon* 31: 369-373, 1983
- 6) Vouhé PR, Hélias J, Grondin CM: Myocardial protection through cold cardioplegia using diltiazem, calcium channel blocker. *Am Thorac Surg* 30: 342-348, 1980
- 7) 田村正秀, 橘 秀光: Ca拮抗剤の心筋保護作用. *薬理と治療* 18: 3425-3434, 1990
- 8) Christakis GT, Fremes SE, Weisel RD, Tittley JG, Mickle DAG, Ivanov J, Madonik MM, Benak AM, McLaughlin PR, Baird RJ: Diltiazem Cardioplegia. Ablance of risk and benefit. *J Thorac Cardiovasc Surg* 91: 647-661, 1986
- 9) 森 義雄, 村川真司, 佐々木裕茂, 山田 拓, 東健一郎, 小久保光治, 梅田正五, 広瀬 一: Diltiazem添加心筋保護液の臨床使用経験. *薬理と治療* 18: 347-535, 1990

- 10) 原田頼統：虚血心筋に及ぼす  $Ca^{2+}$ 拮抗剤の影響に関する研究. 川崎医会誌 10 : 47—65, 1985
- 11) Kusakawa R, Kinoshita M, Shimono Y, Tomonaga G, Hoshino T : Hemodynamic effects of new antianginal drug diltiazem hydrochloride. *Arzneim Forsch* 27 : 878—883, 1977
- 12) Henry PD : Comparative pharmacology of calcium antagonists, nifedipine, verapamil and diltiazem. *Am J Cardiol* 46 : 1047—1058, 1980
- 13) Nabata H : Effects of calcium antagonistic coronary vasodilators on myocardial contractility and membrane potentials. *Jpn J Pharmacol* 27 : 239—249, 1977