

原 著

保存心移植の実験的研究

—Terminal crystalloid cardioplegia 法の有効性に関する実験的検討—

阿部吉伸*, 湖東慶樹*, Loisanse D. Y.**

富山医科薬科大学外科学第 1 教室*, パリ第12大学附属研究所**

Yoshinobu ABE*, Keiju KOTOH*, Daniel Y. Loisanse**

First Department of Surgery*, Toyama Medical and Pharmaceutical University,
Toyama 930-01, Japan Centre de Recherches Chirurgicales**, C. H. U. Henri
Mondor, Universite Paris 12eme, Creteil, France

Key words: heart transplantation, crystalloid cardioplegic solution

要 旨

6 時間保存心臓に対する terminal crystalloid cardioplegia の再灌流時心筋障害防止効果について isolated rabbit heart model を用いて検討を行った。4℃の cold crystalloid cardioplegia を terminal cardioplegia として用いた群では、左室コンプライアンスや左室発生圧などに関して他群 (20℃の crystalloid cardioplegia 投与群および非投与群) に比べ有意差をもって良好な心機能を示した。さらに、EDP-LVSP 曲線では Frank-Starling 効果が保持されていた。

心臓移植手術時の再灌流直前に 4℃の crystalloid cardioplegia を投与する試みは、移植心機能保持の立場からみて幅広い臨床応用が期待される。

Summary

Calcium overload and oxygen derived free radicals play an important part in reperfusion injury. Initial reperfusion with warm hyperkalemic blood cardioplegia reduces reperfusion injury. We hypothesize that similar benefits

may be obtained of initial reperfusion with crystalloid cardioplegia with consequent improvement in recovery of myocardial function.

Fifteen rabbit hearts were removed and mounted as a Langendorff preparation. After six hours ischemia, they were divided into three groups and reperfused. Group a (n=5) were reperfused with physiological extracellular buffered salt solution. Group B (n=5) and Group C (n=5) were reperfused with cold (4℃) and warm (20℃) crystalloid hyperkalemic solution, respectively. Left ventricular systolic peak pressure (LVSP) and developed pressure (LVDP) in group B were significantly higher than in group A or C. Left ventricular compliance and the left ventricular end diastolic pressure (LVEDP)-Left ventricular balloon volume relationship in group B showed improved diastolic function. Left ventricular function curves in group B were maintained almost reaching pre-ischemic levels of Frank-Starling effect. Coronary flow in group B was significantly better than group A or C. These results are due to the high potassium concentration, high magnesium

concentration and low temperature of the initial reperfusion cardioplegic solution which reduced calcium overload during the initial stage of reperfusion. This may be a clinically useful technique.

はじめに

心臓移植においては、移植された心臓の機能保持と拒絶反応制御が予後に重大な影響を与える。急性期に問題となるのは移植心の機能であり、移植心保存中の虚血による心筋障害と血流再開時に生ずる再灌流障害が大きく影響する。心臓移植手術に先立って行われる心臓保存法としては、心筋保護液(initial cardioplegia 液)の注入とそれに続く低温単純浸漬の併用が、現時点における臨床的に確立された手法として欧米では広く用いられている。しかし、これによって保存可能な時間は4~6時間以内と制限があり¹⁻³⁾、加えて最近では移植直後の心筋の再灌流障害が問題となっている。再灌流障害の対策に関しては、再灌流直前に terminal cardioplegia 液を投与する方法が試みられており、その有効性に関する報告も散見されるが、その際に使用する cardioplegia 液の最適な組成について結論は得られていない。terminal cardioplegia は血球成分の有無により大別されるが、臨床的には blood cardioplegia を再投与する terminal cardioplegia 法⁴⁻¹¹⁾が試みられている。しかし、crystalloid cardioplegia の至適温度、至適カリウム濃度などに関してはいまだ詳細な検討ははされていない。

今回、著者らは terminal cardioplegia として血液成分を含まない hyperkalemic crystalloid cardioplegia を用い、長時間保存後の心筋の再灌流障害防止効果に関する実験的検討を試みたので報告する。

対象および方法

対象：

実験は体重 3 ~ 4 kg のニュージーランド種白色家兎15羽を使用した。

方法：

1. Langendorff 灌流法

ペントバルビタールナトリウム (40mg/kg, 静脈内投与)にて麻酔し、気管切開の後、100%酸素下で人工呼吸を行った。1250単位のヘパリン投与後、胸骨正中切開下にすみやかに心臓を摘出し、冷却 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer 液(以下 KHB 液, 組成 glucose 11.1, NaCl 118.5, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, CaCl₂ 2.5mmol/l に浸漬した。次いで大動脈内にカニューレを挿入し、Langendorff circuit (Fig.) に装着した。

動脈カニューレを上行大動脈に固定し、Langendorff 灌流を開始した。灌流回路は Fig. 1 に示したとおりであり、後負荷は 100cmH₂O に設定した。灌流液は前述の KHB 液を 95%酸素及び 5%二酸化炭素の混合ガスで十分に酸素化し 37°C に保温維持した。また、後負荷チャンバーの直前に pore size 1.2µm のフィルターを挿入しこれを通過させた。

2. 循環動態の測定

30分間の Langendorff 灌流で心拍動が十分安定したのを確認した後、左房より左室内にラテックス製バルーン付きのカテーテルを挿入し、左室圧及びその dp/dt, 左室拡張末期圧 (LVEDP) を pressure transducer (Heulett-Packard 社製 Model 7758B) に接続し測定した。

心臓保存前値としての圧測定はまず LVEDP が

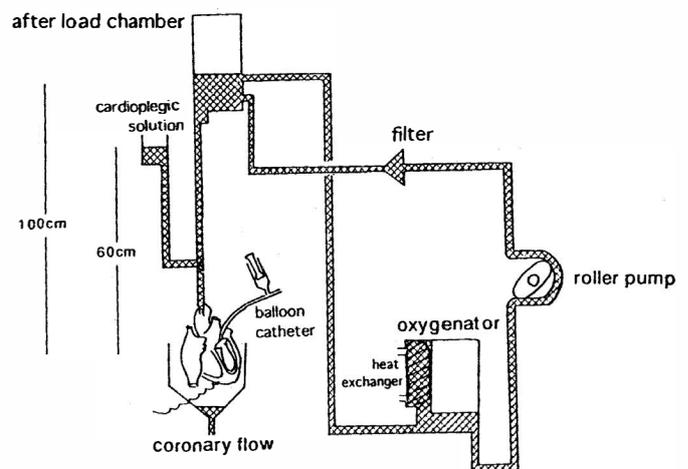


Fig.1 Langendorff circuit. Left ventricular function was measured with a latex intraventricular balloon introduced through the left atrium.

0mmHgとなるようにバルーン容量を決定し、左室コンプライアンスとした。次にバルーン容量を0mlから最終的に0.1mlになるまで0.1ml単位で容量を増加させ、左室圧、dp/dt、心拍数を計測した。左室ピーク圧よりLVEDPを減じた値を左室発生圧(left ventricular developed pressure; LVDP)とした。また、心臓から1分間に駆出される流量を冠流量とし経時的に20分後まで測定し、毎分の流量として記録した。

圧測定を終了した後、4℃のcrystalloid cardioplegic solution (以下CCP液、組成: Na⁺ 147, K⁺ 20, Ca²⁺ 2, Mg²⁺ 16, THAM 3.1, procain 1 mmol/l)を30ml, 60cmH₂Oの注入圧で大動脈から投与して心停止させ、速やかに4℃の乳酸リンゲル液に浸漬したのち6時間保存した。

3. 再灌流方法

再灌流開始時のterminal cardioplegia投与方法により以下の3群に分けた。

A群: terminal cardioplegiaを投与しなかった群 (n=5)

B群: 4℃のCCP液を30ml再灌流直前に投与した群 (n=5)

C群: 20℃のCCP液を30ml再灌流直前に投与した群 (n=5)

6時間の心保存後、A群では直ちに、B、Cではそれぞれのterminal cardioplegiaを30ml, 60cmH₂Oの注入圧にて大動脈から投与した後Langendorff灌流を開始し、30分経過した時点で心臓保存前と同様に循環動態測定を施行した。冠流量は再灌流後経時的に循環動態測定開始から20分後まで測定した。また、すべての測定が終了した後、心筋水分含量を測定した。心筋を採取後、直ちに秤量して湿重量を測定した後、心筋を乾燥機で乾燥させ、再び秤量して乾重量を測定した。心筋水分含量は次式より求めた。

心的に循環動態測定開始から20分後まで測定した。また、すべての測定が終了した後、心筋水分含量を測定した。心筋を採取後、直ちに秤量して湿重量を測定した後、心筋を乾燥機で乾燥させ、再び秤量して乾重量を測定した。心筋水分含量は次式より求めた。

$$\text{心筋水分含量(\%)} = (\text{湿重量} - \text{乾重量}) / \text{湿重量} \times 100$$

以上の結果はすべて平均値±標準偏差で記録し、各実験群間の有意差検定にはANOVA法を用いて統計解析を行い、p<0.05をもって有意差ありと判定した。本実験に際し、"Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (The National Institutes of Health Publication No. 85-23, Revised 1985)に準拠し動物を愛護的に取り扱った。

結 果

1. 心拍数

A, B, C群の心拍数はそれぞれ毎分176±12, 183±6, 181±9回と各群間に有意差を認めなかった。また、不整脈の発生も認められなかった。

2. 左室ピーク圧 (LVSP)

A, B, C群のピーク圧の結果はTable 1に示した通りであるが、各群間を比較したところB群が各バルーン容量においてA, C群と比較して有意(p値はTable 1に示した)に高値を示していた。

3. 左室発生圧 (LVDP)

A, B, C群のLVDPとバルーン容量との関係をTable 2に示す。B群がすべてのバルーン容量にお

Table 1 Left ventricular systolic peak pressure of each group

Balloon Volume	Group A	p value*	Group B	Group C	p value*
0.0	63.2±2.2	<0.001	78.8±2.2	67.8±2.2	<0.001
0.1	70.6±2.6	<0.001	88.0±3.2	75.4±3.9	<0.001
0.2	77.2±1.9	<0.001	93.2±3.3	84.4±5.0	0.001
0.3	87.6±2.6	<0.001	100.8±2.8	92.4±4.7	<0.001
0.4	92.8±1.8	<0.001	107.4±3.0	100.6±5.0	0.004
0.5	102.6±2.5	<0.001	114.2±1.3	110.0±4.1	0.03
0.6	107.8±5.5	<0.001	120.0±3.0	114.4±3.6	0.04

*p value versus group B and group A, group B and group C.

(mmHg)

Table 2 Left ventricular developed pressure of each group

Balloon volume	Group A	p value*	Group B	Group C	p value*
0.0	60.0±2.5	<0.001	77.2±2.2	64.8±2.9	<0.001
0.1	66.4±2.0	<0.001	85.2±2.9	70.8±3.6	<0.001
0.2	70.8±2.2	<0.001	88.4±3.0	77.8±4.3	<0.001
0.3	76.8±2.2	<0.001	92.2±2.9	80.8±5.0	<0.001
0.4	77.8±2.2	<0.001	95.2±2.9	84.8±4.3	<0.001
0.5	79.8±2.9	<0.001	95.4±1.8	86.8±3.6	0.0002
0.6	79.8±2.9	<0.001	96.2±2.2	85.8±4.3	0.0001

(mmHg)

*p value versus group B and group A, group B and group C.

Table 3 Left ventricular max. dp/dt of each group

Balloon Volume	Group A	Group B	Group C
0.0	723±78	873±53	721±75
0.1	816±88	882±45	820±83
0.2	906±95	925±75	886±74
0.3	962±85	1023±86	945±87
0.4	973±90	1052±90	962±75
0.5	956±102	1075±102	955±58
0.6	963±95	1065±54	932±102

(mmHg/sec)

Table 4 Coronary flow after store

	Before store	Group A	Group B	Group C
CFR10	79.3±1.9	61.2±6.2*	67.9±3.1	58.3±1.2*
CFR20	74.9±2.3	57.5±5.5*	63.0±3.2	57.8±1.3*

(ml/min)

*p <0.01 versus before store

いて高値を示しており、各群間の比較ではやはり B 群が他の 2 群に比べて有意に (p 値は表に示した) 高値を示していた。

4. max dp/dt

等容収縮の指標として測定した max dp/dt の結果を Table 3 に示したが dp/dt に関しては各群間有意差は認められなかった。

5. 左室コンプライアンス

LVEDP が 0 mmHg のバルーン容積より勘案した左室コンプライアンスは A, B, C 群でそれぞれ 0.41±0.04, 0.61±0.08, 0.49±0.06ml であり、B 群が A, C 群に較べてより有意に (p<0.05) 高値を示した。

また、心筋の拡張性を評価するため左室拡張終期

圧(EDP)-心室内バルーン容積(balloon volume)関係を Fig. 2 に示した。A, C 群ではバルーン容量の増加に伴い EDP は著しく上昇し左上方に偏位して

いたが、B 群では有意な偏位は認められず、他の 2 群に比べて有意に ($p < 0.05$) 低い値を示していた。
6. 左心室機能曲線 (Fig. 3)

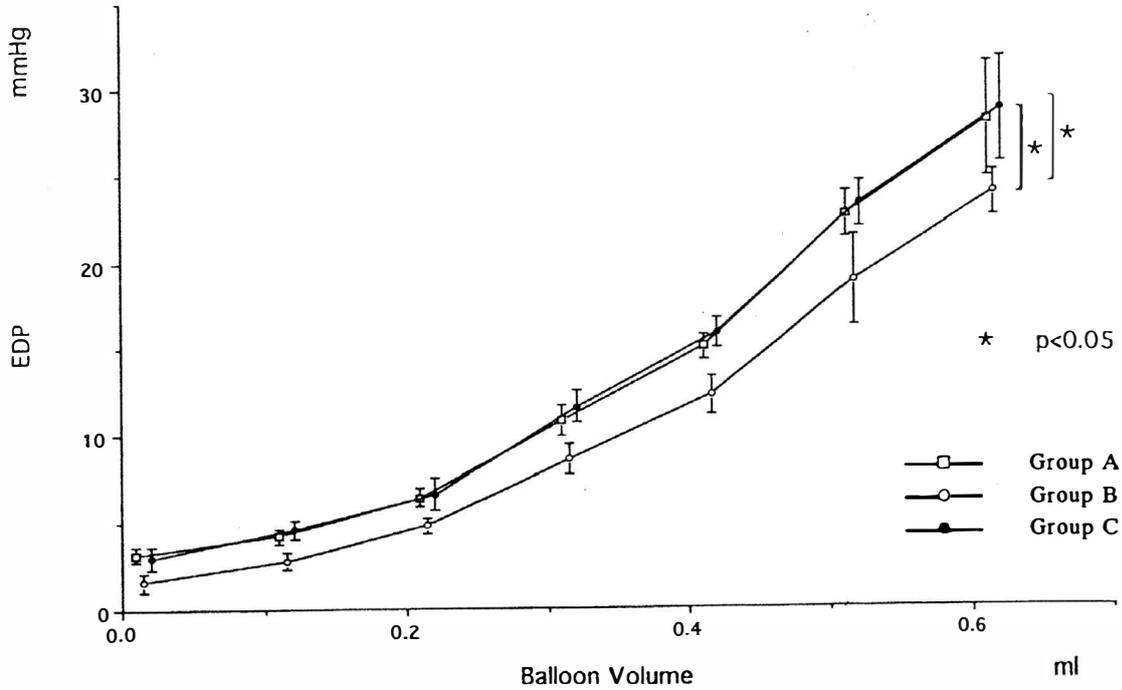


Fig. 2 Relationship between balloon volume and end-diastolic pressure

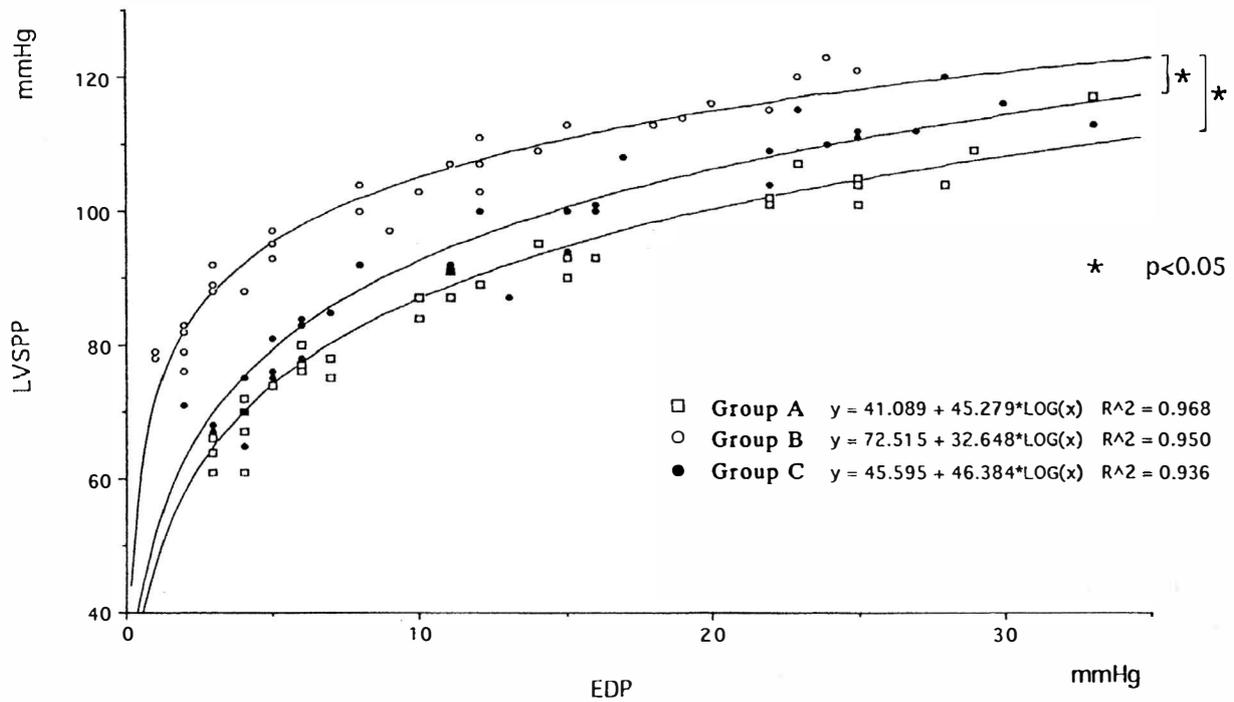


Fig. 3 Plot of left ventricular systolic peak pressure vs. left ventricular end-diastolic pressure.

左室容量負荷に対する Frank-Starling 効果を検討するため、個々の検体における各バルーン容量時の LVSP と EDP とをプロットし、best fit curve を求めて心機能曲線を作製した。B 群では Frank-Starling 効果が有意に良好に保たれていたが、A、C 群では心機能曲線が有意に左下方に偏位しており心機能が低下した状態を示唆していた。

7. 冠流量 (Table 4)

心機能測定開始後10分後および20分後の冠流量をそれぞれ CRF10 及び CRF20 として表わした。A、C 群は心臓保存前値より有意に ($p < 0.01$) 低下していたが、B 群においてのみ有意差を認めなかった。また、各群間での有意差は認められなかった。

8. 心筋水分含量

心筋水分含量は A 群 $86.1 \pm 0.47\%$ 、B 群 $85.7 \pm 0.98\%$ 、C 群 $85.1 \pm 0.76\%$ であり、各群間での差は認められなかった。

考 察

心臓移植手術時の再灌流障害の対策に関しては、現在臨床的に再灌流直前に加温された blood cardioplegia 液を投与する方法が試みられており、その有効性に関する報告も散見されてはいるが⁴⁻¹¹⁾、crystalloid cardioplegia 液の有効性やその最適な組成については結論は得られていない。そこで、initial cardioplegia として、ドナー心停止の際に臨床応用されている CCP 液を terminal cardioplegia として用いることを試み、terminal cardioplegia を用いない A 群との比較を行った。さらに灌流液の温度についても 4℃ (B 群) および 20℃ (C 群) の 2 種類について吟味し、それらの再灌流障害防止効果の検討を行った。

虚血再灌流後の心機能異常の特徴としては左室拡張末期圧の上昇、左室 dp/dt の低下、一回心拍出量の低下が挙げられる。また、左室コンプライアンスの低下や心筋浮腫、冠血流量の低下をきたすことも知られており、これらの状態を検討する指標として左室内バルーン法による左室コンプライアンス測定を行い、心筋浮腫の指標として心筋水分含量を測定した。

今回の各実験群間における差異については、B 群

と A 群との間では再灌流時の灌流液あるいは心筋保護液の K 濃度 (20 と 4.7mmol/l)、および Mg 濃度 (16 と 1.2mmol/l) が異なり、また、B 群 (4℃) と C 群 (20℃) との間では、電解質組成は同じであるが、CCP 液の温度が異なっている。虚血心における組織内 pH の低下と H⁺ イオンの増加は心筋障害の原因となり、さらに低温下では心筋細胞内環境の恒常性を維持する細胞膜機能が低下するために、細胞内への Na の流入、細胞外への K の流出とそれによる心筋浮腫¹²⁻¹⁴⁾、及び Ca の細胞内流入による心筋障害をきたす¹⁵⁾。B、C 群で使用した高 K 濃度の terminal cardioplegia は再灌流直後に生ずる心筋興奮に伴って生ずるイオンチャンネルを介した Ca イオンの急速な細胞内流入や高濃度 K 液により生じた心筋細胞膜の脱分極によって各イオンの移動を妨げ、再灌流早期の Ca イオンの細胞内蓄積を抑制する作用¹²⁻¹⁵⁾があるため、再灌流障害が防止されるものと考えられた。また、terminal cardioplegia 中の高 Mg 濃度についても、Mg イオンが Ca イオンと同じイオンチャンネルを介して心筋細胞内外を移動し、競合することによって Ca イオンの細胞内流入を抑制すること¹⁵⁾が知られており、心機能保持に有効であったと考えられた。ただし、心筋水分含量からみた心筋浮腫の状態に各群間の差はなく今回の検討では明らかではなかった。また、B 群と C 群とにおける灌流液の温度の差異に関する点では、4℃の CCP 液では 20℃の CCP 液に比べて良好な結果が得られた Hearse らの報告¹⁴⁾では心筋細胞膜の Ca チャンネルの機能は温度に依存するとされ、Ca チャンネルは低温下では開放せず、細胞内への Ca イオンの流入は低温下では生じないと報告されている。一方、常温下では Ca チャンネルの開放によって細胞内への Ca イオン流入が可能となり、Ca イオンの細胞内貯留による心筋障害が惹起される。今回の B 群と C 群の心機能の差はこの Ca チャンネルの温度依存性に依るものと考えられた。また、開心術中での常温 CCP 液の使用による心筋障害の例¹⁶⁾も報告されている。

crystalloid cardioplegia の terminal cardioplegia としての有用性やその再灌流時心筋障害防止要因については、これまで詳細な検討がなかったが、今回の実験結果に鑑みると、とくに 4℃の CCP 液

を terminal cardioplegia として用いた B 群において、すべてのバルーン容積における左室ピーク圧及び左室発生圧が他群と比較して有意に高値を示した。また EDP-LVSP 曲線による心機能比較では B 群において Frank-Starling 効果が有意に正常に近い状態で保たれていた。また、左室バルーン容量と EDP との関係からは 3 群間のなかでも有意に心筋壁の拡張性が保たれており、加えて左室コンプライアンスも有意差をもって高値を示した。以上より CCP 液を terminal cardioplegia として投与した群の移植心は他群に較べて有意に良好な心機能を維持し、6 時間の長時間虚血後も心筋の良好な拡張能を保持していたことが示された。これらより、crystalloid cardioplegia の terminal cardioplegia としての有用性が認識されるとともに、その保護効果の機序としては crystalloid cardioplegia 中の高 K 濃度による各種イオンの移動の防止効果、および高 Mg 濃度による Ca イオンとの拮抗に基づく細胞内 Ca 過負荷防止効果、さらに再灌流早期に低温を保つことによる Ca チャンネルの不活性化などが主要要因としてあげられると考えた。これらの知見は cold crystalloid cardioplegia の長時間保存心臓に対する再灌流障害防止効果の可能性を示し、かつ心臓移植時の terminal cardioplegia 法の新しい臨床応用に役立つものと思われる。

ま と め

1. 6 時間保存心臓に対する terminal crystalloid cardioplegia の再灌流時心筋障害防止効果について isolated rabbit heart model を用いて検討を行った。
2. 4℃ の cold crystalloid cardioplegia を terminal cardioplegia として用いた群では、左室ピーク圧、左室発生圧、左室コンプライアンスなどに関して他群に比べ有意差をもって良好な心機能の回復傾向を示した。さらに、左室バルーン容積-EDP 曲線では心筋の拡張性が良好に保たれており、EDP-LVSP 曲線では Frank-Starling 効果が保持されていた。
3. Terminal crystalloid cardioplegia における再灌流障害防止機序としては、高 K 濃度 (20mmol/l) による各種イオン移動防止効果、高 Mg 濃度 (16

mmol/l)、低温 (4℃) による Ca イオン拮抗作用を指摘することが出来ると考えられた。

4. 心臓移植手術時の再灌流直前に 4℃ の CCP 液を投与する試みは、移植心機能保持の立場からみて terminal cardioplegia 法への幅広い臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Molina J. E., Heil J., Dunning M. et al. : Factors determining survival of the donor organ in cardiac transplantation. *J. Cardiovasc. Surg.* **26** (Suppl.) : 76, 1985.
- 2) English T. A. H., Spratt T., Wallwork J. et al. : Selection and procurement of hearts for transplantation. *Br. Med. J.* **288** : 1889—1891, 1984.
- 3) Sweeney M. S., Lammermeier D. E., Frazier O. H. et al. : Extension of donor criteria in cardiac transplantation ; Surgical risk versus supply-side economics. *Ann. Thorac. Surg.* **50** : 7—11, 1990.
- 4) Lazar H. L., Buckberg G. D., Manganaro A. J. et al. : Reversal of ischemic damage with secondary blood cardioplegia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **78** : 688—697, 1979.
- 5) Lazar H. L., Buckberg G. D., Manganaro A. J. et al. : Myocardial energy replenishment and reversal of ischemic damage by substrate enhancement of secondary blood cardioplegia with aminoacids during reperfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **80** : 350—359, 1980.
- 6) Teoh K. H., Christakis G. T., Weisel R. D. et al. : Accelerated myocardial metabolic recovery with terminal warm blood cardioplegia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **91** : 888—895, 1986.
- 7) Kirklin J. K., Neves J., Naftel D. C. et al. : Controlled initial hyperkalemic reperfusion after cardiac transplantation : Coronary

- vascular resistance and blood flow. *Ann. Thorac. Surg.* **49** : 625—631, 1990.
- 8) Bottner R. K., Wallace R. B., Visner M. S. et al. : Reduction of myocardial infarction after emergency coronary artery bypass grafting for failed coronary angioplasty with use of a normothermic reperfusion cardioplegia protocol. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **101** : 1069—1075, 1991.
- 9) Julia P. L., Buckberg G. D., Acar C. et al. : Studies of controlled reperfusion after ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **101** : 303—313, 1991.
- 10) Beyersdorff F., Sarai K., Maul F. D. et al. : Immediate functional benefits after controlled reperfusion during surgical revascularization for acute coronary occlusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **102** : 856—866, 1991.
- 11) Beyersdorff F., Kirsh M., Buckberg G. D. et al. : Warm glutamate/aspartate enriched blood cardioplegic solution for perioperative sudden death. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104** : 1141—1147, 1992.
- 12) Steenbergen C., Perlman M. E., London R. E. et al. : Mechanism of preconditioning ionic alteration. *Circ. Res.* **72** : 112—125, 1993.
- 13) Abbott A., Hill R., Shears L. et al. : Effects of calcium chloride administration on the postischemic isolated rat heart. *Ann. Thorac. Surg.* **51** : 705—710, 1991.
- 14) Hearse D. J., Yamamoto F., Shattock M. J. et al. : Calcium antagonists and hypothermia. *Circulation* **70** : 154—164, 1984.
- 15) Tani M., Neely J. R. et al. : Role intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. *Circ. Res.* **65** : 1045—1056, 1989.
- 16) Acar C. et al. : Studies of controlled reperfusion after ischemia : Detrimental effect of initial asanguineous cardioplegic washout after acute coronary occlusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **101** : 294—302, 1991.