

開心術における間欠的常温血性心筋保護法の基礎的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安田, 保 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9179

開心術における間欠的常温血性心筋保護法の基礎的研究

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

安 田 保

新しい心筋保護法である持続的常温血性心筋保護法は、従来の低温晶質性心筋保護法に比べ、常温好気性心停止により大動脈遮断中の心筋に十分な酸素を供給し、心拍再開後の心機能回復は良好である。しかし開心術において無血視野を得るため提唱された間欠的常温血性心筋保護法は、常温虚血による心筋障害の合併が懸念される。本研究では、近赤外分光法を利用して心筋組織酸素飽和度および組織ヘモグロビン・ミオグロビン濃度を連続測定することにより、心筋の酸素代謝および血液量変動を解明し、さらに心機能、心筋エネルギー代謝、心筋超微細構造の面から間欠的常温血性心筋保護法の安全性を検討した。雑種の成熟イヌを用い、完全体外循環、大動脈遮断下に、A群では常温血性心筋保護液の5分間の冠灌流に続き、灌流停止を10分間、B群では5分間の冠灌流に続き、灌流停止を20分間行い、両群とも灌流および灌流停止を3回繰り返した。心筋組織酸素飽和度および組織ヘモグロビン・ミオグロビン濃度は、冠灌流および灌流停止を鋭敏に反映した。また冠灌流開始から心筋組織酸素飽和度、ヘモグロビン・ミオグロビン濃度が上昇してプラトーに達するまでの時間は、A群では初回灌流時が最も長かったのに反し、B群では2, 3回目と経時的に延長する傾向にあった。これはB群では虚血再灌流障害により冠血管抵抗が上昇したと推測された。収縮期血圧、心拍出量係数、左室仕事量係数の面から評価した体外循環前後の心機能は、A群では有意な変化はなかったが、B群では体外循環後低下した。1, 2, 3回目の心筋保護液冠灌流直前および大動脈遮断解除直前に心筋内ヌクレオチド含量を測定し、また心筋超微細構造を検索した。心筋内ヌクレオチド含量は、A群では有意な変化はなかったが、B群では経時的にATP含量が低下し、AMP含量が上昇し、高エネルギー磷酸の枯渇が疑われた。心筋超微細構造は、A群では虚血による変化が認められなかったが、B群では3回目の灌流開始直前に虚血性変化が発生し、大動脈遮断解除直前に増悪し、虚血による蓄積性の細胞損傷が示された。以上の結果から、間欠的常温血性心筋保護法における10分間の灌流停止は心筋酸素代謝、心機能、心筋エネルギー代謝、心筋超微細構造の面からみて安全であるが、20分間の灌流停止はその回復により、蓄積性の虚血心筋障害が発生すると結論された。また近赤外分光法による心筋組織酸素飽和度の測定は間欠的常温血性心筋保護法中の心筋モニター法として極めて有用であった。

Key words myocardial protection, intermittent warm blood cardioplegia, myocardial oxygen metabolism, myocardial nucleotides, myocardial ultrastructure

開心術において心筋保護は体外循環と同様に必要不可欠な補助手段である。手術中には、弛緩性心停止状態、無血視野が得られ、術後には速やかな心機能回復が得られることが重要である。これらを可能にすることを目的とした心筋保護法は、現在まで様々な改良、工夫が加えられてきた。Melroseら¹⁾(1955年)が初めてクエン酸カリウムを大動脈基部から注入し、弛緩性心停止状態での手術を提唱したが、Helmsworthら²⁾により心筋硬直、不可逆性心室細動の誘発が報告され、普及しなかった。その後、Bretschneiderら³⁾(1967年)のプロカイン心筋保護液、Kirschら⁴⁾(1972年)のマグネシウム心筋保護液を経て、Hearseら⁵⁾(1976年)のカリウム心筋保護液の発表により、低温晶質性心筋保護法は全盛期を迎え、現在多くの施設で心筋保護の基本として用いられている。

一方、血液付加による酸素運搬作用、アンドローススに対する緩衝作用、虚血心筋におけるカルシウム流入抑制作用、膠質浸

透圧による細胞浮腫の予防等を理由に、1970年後半 Buckbergら⁶⁾が低温血性心筋保護法の有用性を発表し、多く用いられるようになった⁸⁾。さらに、Lichtensteinら⁹⁾(1991年)により、常温血性心筋保護液を持続的に冠灌流することにより弛緩性心停止下で好気性代謝を維持し、低温および再灌流による心筋障害を防止するという持続的常温血性心筋保護法 (continuous warm blood cardioplegia, CWBC) が提唱され、新しい心筋保護法として注目を浴びている^{10)~13)}。しかし、CWBCは近年増加傾向にある冠状動脈バイパス手術において、無血視野を得るためには心筋保護液灌流を一時的に停止する必要があり、心筋の常温虚血が懸念される¹⁴⁾。そこで常温血性心筋保護液を計画的に、間欠的に冠灌流する間欠的常温血性心筋保護法 (intermittent warm blood cardioplegia, IWBC) が1994年以降研究され始め、CWBCと遜色のない方法と報告されている^{15)~18)}。しかし、灌流停止許容時間に関してはまだ議論も多く、安全性は確立してい

平成7年12月7日受付, 平成7年12月27日受理

Abbreviations: CWBC, continuous warm blood cardioplegia; deCL, aortic declamping; Hb+Mb, tissue hemoglobin plus myoglobin concentration; IWBC, intermittent warm blood cardioplegia; Ro₂, tissue oxygen saturation rate; SD, spontaneous defibrillation; So₂, tissue oxygen saturation; VF, ventricular fibrillation; WBC, warm blood cardioplegia; XCL, aortic cross-clamping

ない²⁰⁾。そのため、IWBC を用いた開心術には低温心筋保護法における心筋温度にかかわる術中心筋モニタリングが必要である。

今回著者は、近赤外分光法を利用して心筋組織酸素飽和度 (tissue oxygen saturation, So_2) および組織ヘモグロビン・ミオグロビン濃度 (tissue hemoglobin plus myoglobin concentration, $Hb+Mb$) を連続測定することにより、IWBC 中の心筋組織酸素代謝および血液量変動を解明し、さらに心機能、心筋エネルギー代謝、心筋超微細構造の面から IWBC の安全性を検討した。

対象および方法

I. 実験動物

実験動物として体重 9~15kg (平均 11.0kg) の雑種の成熟イヌ 26頭を用いた。実験群は常温血性心筋保護液の 5 分間冠灌流と 10 分間灌流停止を 3 回繰り返した A 群と、5 分間冠灌流と 20 分間灌流停止を 3 回繰り返した B 群に分けた。 So_2 , $Hb+Mb$ および心機能測定用に 14 頭 (A 群 7 頭, B 群 7 頭), 心筋内スクレオチド含量測定および心筋超微細構造検索用に 12 頭 (A 群 6 頭, B 群 6 頭) を用いた。

II. 実験モデルの作成

塩酸ケタミン (三共, 東京) 20mg/kg を筋肉内に投与後, ペントバルビタールナトリウム (田辺製薬, 大阪) 30mg/kg およびバンクロニウムブロマイド (日本オルガノン, 東京) 0.1mg/

kg を静脈内に投与し, 気管内挿管下に Harvard 型微量式人工呼吸器 (Bodine Electric Company, Chicago, 米国) を用い, 純酸素による調節呼吸を行った。また実験中適宜ペントバルビタールナトリウムを静脈内に追加投与し, 全身麻酔を維持した。四肢誘導で心電図をモニターし, 左大腿動脈よりカテーテルを挿入し動脈圧をモニターした。左腋窩静脈より Swan-Ganz カテーテル (American Edwards Laboratories, Santa Ana, 米国) を挿入し, 心拍出量, 右房圧, 肺動脈圧を測定した。体外循環の送血用に, 右大腿動脈を露出した。右胸骨傍切開により心臓を露出した後, 上下大静脈, 上行大動脈の順に剝離した。ついで右側左房よりカテーテルを挿入, 左房圧をモニターした。心電図, 大動脈圧, 肺動脈圧, 右房圧, 左房圧はポリグラフシステム RM-6000 (日本光電, 東京) にて同時連続記録した。

ヘパリンナトリウム (武田薬品, 大阪) 300単位/kg を静脈内投与した後, 上下大静脈脱血, 右大腿動脈送血による完全体外循環を開始した (図 1)。送血ポンプには遠心ポンプ (Sarns, Ann Arbor, 米国) を, 人工肺には膜型人工肺 (Sarns) を用い, 体外循環充填液として乳酸リンゲル液 (大塚製薬, 東京) と 7% $NaHCO_3$ (大塚製薬) を用いた。人工心肺血の動脈血酸素分圧は 200~300mmHg となるよう人工肺吹送ガスの酸素濃度を調節し, 酸素飽和度はおよそ 100% であった。またヘマトクリットを 25% 前後に維持するように, 供血イヌより採血した血液を輸血した。全身灌流温は 37°C, 灌流量は 80ml/kg, 灌流圧は 60~80mmHg とした。大動脈基部にルートカニューラ (DLP, Grand Rapids, 米国) を留置し, 心筋保護液の注入と大動脈基部圧の測定に用いた。

III. 心筋保護液の組成および注入方法

血性心筋保護液作成回路 (BCD Advanced system, Shiley, Irvine, 米国) を用いて, 臨床に使用している晶質性心筋保護液 (表 1) に, 酸素化した人工心肺血を 1:4 で混合し, さらにカリウム濃度を調節して, 付属の熱交換器で 37°C に加温した (表 2)。ローラーポンプ (泉工医科, 東京) を用い, 作製した血性心筋保護液を毎分 100ml で 5 分間大動脈基部より順行性に冠灌

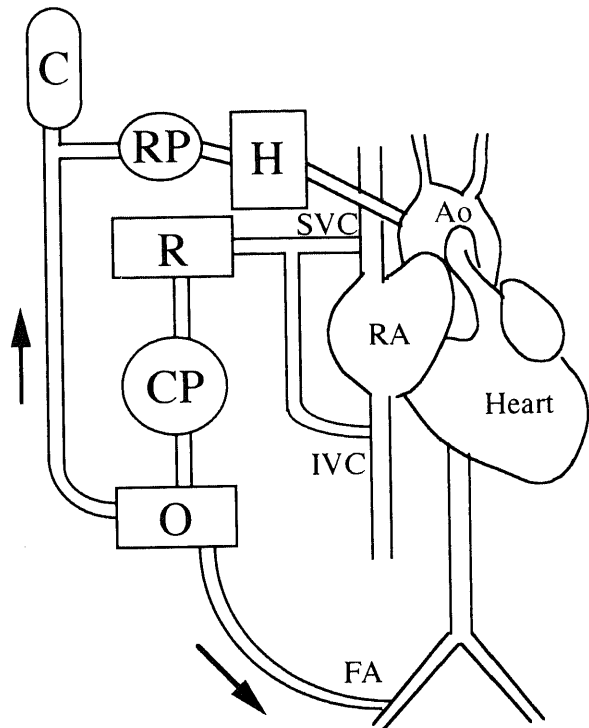


Fig. 1. Schematic diagram of the experiment. Cardiopulmonary bypass was established by cannulation of the superior and inferior vena cavae for venous return, and the femoral artery for systemic arterial inflow. C, cardioplegic solution; RP, roller pump; H, heat exchanger, R, reservoir; CP, centrifugal pump; O, oxygenator with heat exchanger; Ao, aorta; SVC, superior vena cava; RA, right atrium; IVC, inferior vena cava; FA, femoral artery.

Table 1. Composition of crystalloid cardioplegic solution

Na	73 mEq/l
K	30 mEq/l
Cl	102 mEq/l
HCO_3	0.88 mEq/l
Glucose	23 g/l
Mannitol	7 g/l
Osmotic pressure	374 mOsm/l
pH	7.5

Table 2. Final concentration of warm blood cardioplegic solution

Na	127 mEq/l
K (the first infusion)	20 mEq/l
K (the second and third infusions)	12 mEq/l
Cl	100 mEq/l
pH	7.5
Hematocrit	20%

All values are predictive.

流した。A 群では5分間冠灌流と10分間灌流停止を3回繰り返す、B 群では5分間冠灌流と20分間灌流停止を3回繰り返した。

IV. 測定項目と測定方法

1. 近赤外光モニタリング

近赤外光 (700~1200nm) は生体組織に対し良好な透過性を示すが、チトクローム aa₃ の銅蛋白質やヘモグロビン、ミオグロビンの鉄ポルフィリン複合体によって吸収され、酸化還元によりそれらの吸収スペクトルは異なることが知られている。この特異的性質を利用し、700nm, 730nm, 770nm の3波長の近赤外光を用いて、So₂ および Hb+Mb を連続測定可能である。近赤外光による So₂, Hb+Mb 測定装置 (バイオメディカルサイエンス, 金沢) は齊藤ら²¹⁾ (1994年) により開発されたもので、組織に接着するだけで測定が可能という大きな特徴がある。以下にその理論を述べる。

組織の表面 X 点に入射した強度 I₀ の光は、波長が組織を構成する細胞の大きさに比べ短いために散乱し、組織内の光の強度分布は半球状となり、Y 点の透過光は、Z 点の散乱光の強度 I に等しい (図 2)。光の減衰は指数関数になり、Lambert-Beer の法則により次式が成り立つ。

$$-\log (I/I_0) = \epsilon \cdot C \cdot d = K \quad \dots \textcircled{1} \quad (\epsilon, \text{ヘモグロビン} \cdot \text{ミオグロビンの分子吸光係数}; C, \text{単位組織あたりのヘモグロビン} \cdot \text{ミオグロビン重量}; d, X \text{ と } Y \text{ 間における平均光路長}; K, \text{ヘモグロビン} \cdot \text{ミオグロビンの吸光度})$$

ヘモグロビン・ミオグロビンの組織酸素飽和率 (tissue oxygen saturation rate, Ro₂) を Ro₂ (Ro₂=So₂/100) とし、酸化ヘモグロビン・ミオグロビンの分子吸光係数を ε_a, 還元ヘモグロビン・ミオグロビンの分子吸光係数を ε_b とすると①式より

$$K = \{Ro_2 \cdot \epsilon_a + (1 - Ro_2) \cdot \epsilon_b\} \cdot C \cdot d \quad \dots \textcircled{2}$$

波長 λ₁, λ₂ のヘモグロビン・ミオグロビンの吸光度を K₁, K₂ とし、波長 λ₁, λ₂ の酸化ヘモグロビン・ミオグロビンの分子吸光係数を ε_{a1}, ε_{a2}, 還元ヘモグロビン・ミオグロビンの分子吸光係数を ε_{b1}, ε_{b2} とすると②式より

$$K_1 = \{Ro_2 \cdot \epsilon_{a1} + (1 - Ro_2) \cdot \epsilon_{b1}\} \cdot C \cdot d \quad \dots \textcircled{3}$$

$$K_2 = \{Ro_2 \cdot \epsilon_{a2} + (1 - Ro_2) \cdot \epsilon_{b2}\} \cdot C \cdot d \quad \dots \textcircled{4}$$

③, ④式より C・d を消去すると

$$Ro_2 = (K_1 \cdot \epsilon_{b2} - K_2 \cdot \epsilon_{b1}) / \{K_2(\epsilon_{a1} - \epsilon_{b1}) - K_1(\epsilon_{a2} - \epsilon_{b2})\} \quad \dots \textcircled{5}$$

同様に波長 λ₁, λ₃ では次式が成り立つ。

$$Ro_2 = (K_1 \cdot \epsilon_{b3} - K_3 \cdot \epsilon_{b1}) / \{K_3(\epsilon_{a1} - \epsilon_{b1}) - K_1(\epsilon_{a3} - \epsilon_{b3})\} \quad \dots \textcircled{6}$$

波長 λ₁, λ₂, λ₃ における実際の計測データを k₁, k₂, k₃ とし、ヘモグロビン, ミオグロビンを除いた組織吸光度を K_i とすると、近赤外領域では各波長に対し K_i は等しいと考えることができるので²¹⁾, K₁=k₁-K_i, K₂=k₂-K_i, K₃=k₃-K_i が成り立つ。ε_{a1}, ε_{b1}, ε_{a2}, ε_{b2}, ε_{a3}, ε_{b3} はヘモグロビンの分子吸光特性より求めることができるので、⑤, ⑥式より Ro₂ および K_i を求めることが可能となる。また Ro₂ および K_i が求めれば、③式より C・d を求めることができる。

チトクローム aa₃ は酸化型の時に 830nm 付近で極大吸収を持ち、800nm 以下の短波長域では酸化還元による吸収変化はない²²⁾。したがって 700~800nm の間の3波長を選択し、同部位で3波長の同時測定を行えば、チトクローム aa₃ の影響なしにヘモグロビン・ミオグロビンの酸素飽和度、組織濃度を測定することが可能である。ただし Hb+Mb はその単位が示す如く平均光路長、すなわち光子が通過する距離を含んでいる。またヘモグロビンとミオグロビンの近赤外光に対する吸収スペクトルは同一であり、両者を分けて測定することは不可能であるが²³⁾、組織ミオグロビン重量は短時間では不変なので、Hb+Mb の増加分はほとんどヘモグロビン濃度、すなわち血液量によるものと考えられる。

完全体外循環確立後、右室前面に So₂ および Hb+Mb 測定用のプローブ (図 3) を接着した。測定領域が直接心筋に密着するよう注意して、接着面の周辺にアロンアルファを塗布し、実験終了までプローブがはずれないようしっかりと心筋表面に固着させた。

2. 心機能

体外循環開始前の血行動態安定時に右房圧, 左房圧, 心拍

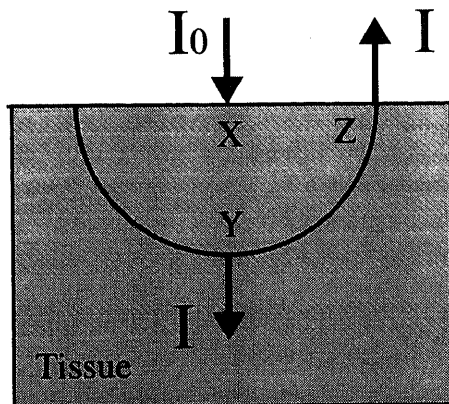


Fig. 2. Schematic presentation of light absorption. The heart is nearly homogeneous and the intensity of reflected light obtained from the heart surface is almost the same as that of transmitted light at the same distance. I₀, intensity of incidental light; I, intensity of transmitted light.

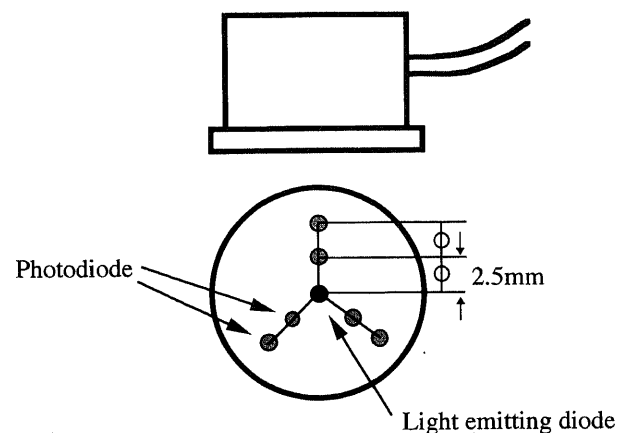


Fig. 3. Schematic presentation of the recording probe. The distance between the light emitting diode and the near photodiode was 2.5 mm, and the distance between the paired photodiodes was 2.5 mm.

数, 収縮期血圧, 平均血圧, 心拍出量を測定し, 心拍出量係数, 末梢血管抵抗, 左室仕事量係数を次式から算出した. 心拍出量係数 (ml/min/kg) = 心拍出量/体重 × 1000, 末梢血管抵抗 (dyne·sec·cm⁻⁵) = (平均血圧 - 右房圧) / 心拍出量 × 80, 左室仕事量係数 (g·m/kg) = 心拍出量/心拍数 × (平均血圧 - 左房圧) × 0.0136/体重.

一連の測定を終了後, 完全体外循環および IWBC を開始した. 大動脈遮断解除後自己心拍の自然再開を比較した. 心室細動となった場合は直ちに電気的除細動を行った. 体外循環灌流量を変えず10分間空打ち心とした後, 収縮期血圧が 80mmHg を越えた時点で灌流量を徐々に減じ, 体外循環から離脱した. 大動脈遮断解除後30分に体外循環前の左房圧と同値になるよう輸液を調節し, 体外循環前と同様の心機能測定を行った.

3. 心筋内ヌクレオチド含量測定

1, 2, 3回の心筋保護液灌流直前と大動脈遮断解除直前, 以上合計4回心筋を採取し, それぞれの心筋組織内 ATP, ADP, AMP 含量を測定した. A 群ではこの4回をそれぞれ群内因子 A₀, A₁, A₂, A₃ とし, B 群では B₀, B₁, B₂, B₃ とした (図 4). 心筋採取に際してはメスを用いて約 5mm 角の全層をすばやく切り取り, 直ちに液化窒素中に浸して保存した. 採取部位はその都度前回の採取部位から十分に離れ, かつ障害を受けない場所を選んで行った. 実験終了後, 凍結心筋片を秤量した後, 氷冷した 0.6N 過塩素酸を加えてよく混和し, 20~25℃ で10分間放置して除蛋白した. これを3000回転で15分間遠心し, 得られた上清を試料として紫外線吸光度測定で ATP, ADP, AMP の定量を行った. 虚血再灌流による心筋細胞の浮腫を考慮し, 心筋内 ATP, ADP, AMP 含量は, 組織重量当たりではなく, 組織蛋白当たりで定量した.

4. 心筋超微細構造

心筋内ヌクレオチド含量測定用に採取した組織の一部をとりわけ, 心筋超微細構造検索用とした. 心筋組織は速やかに 0℃ に冷却した切り出し台にて 1~1.5mm 角に細断し, 1% グルタルアルデヒドおよび 4% パラフォルムアルデヒド (0.05M カコジル酸緩衝液 pH 7.4) にて 4℃, 60分間前固定後, 2% 四酸化オスミニウム (0.05M カコジル酸緩衝液 pH 7.4) にて 4℃, 60分間後固定を行った. ついでエタノール系列で脱水し,

エポンにて包埋した. 試料はウルトラトームにて 750~900 Å の超薄切片を作成し, 5% 酢酸ウラニールと鉛の 2重染色を行った. 標本観察には日立 H-600 型電子顕微鏡にて直接倍率 2,000~10,000倍で観察した.

各因子間の比較検討を目的に, 電子顕微鏡所見における超微細構造変化の各項目を半定量化した. その基準を以下に述べる.

1) ミトコンドリア

クリスタの配列が密で基質の淡明化が認められないものを (-), 軽度に膨化しているものを (+), 膨化し, 基質の淡明化が認められるものを (++) , 著明に膨化し, クリスタの著しい空胞化, 崩壊, 濃染物質の出現が認められるものを (+++) とした.

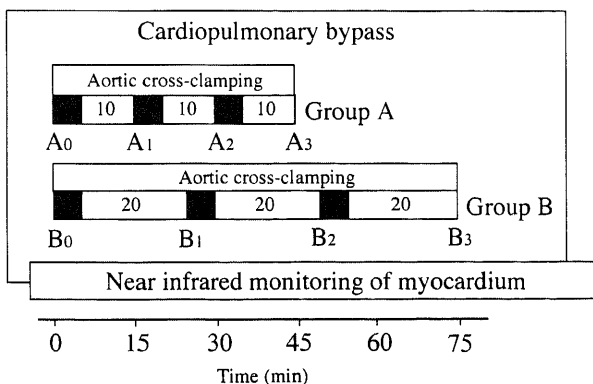


Fig. 4. Technique of intermittent warm blood cardioplegia. The dogs received three 5-minute periods of warm blood cardioplegia, interrupted by three 10-minute episodes of ischemia in group A, or three 20-minute episodes of ischemia in group B. ■, warm blood cardioplegia; □, interruption.

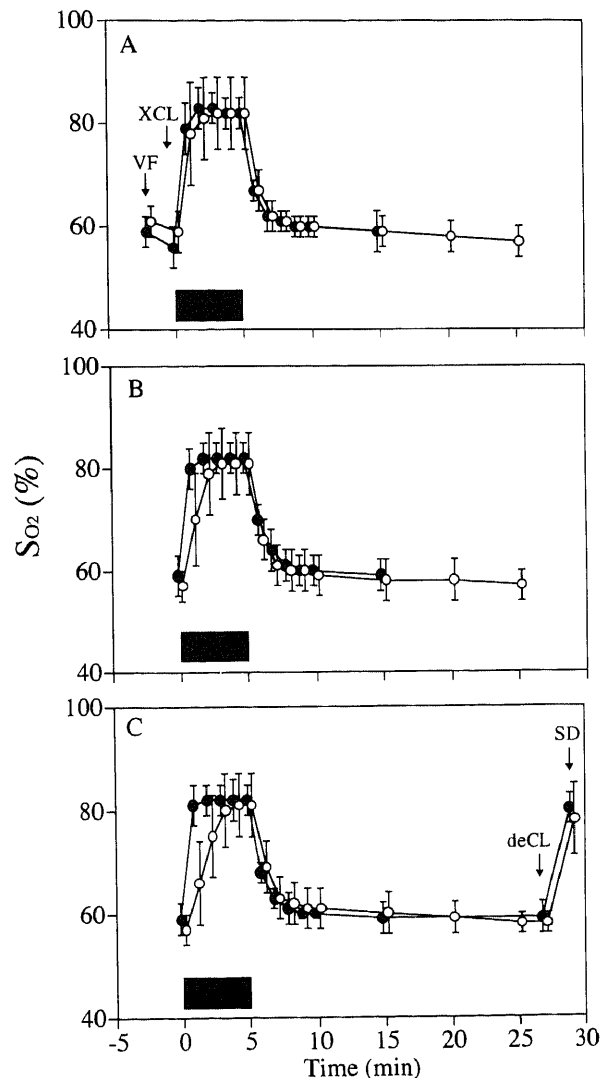


Fig. 5. Comparison of myocardial tissue oxygen saturation measured in hearts receiving intermittent warm blood cardioplegia in groups A and B. Graphs (A), (B) and (C) show the first, second and third cardioplegic infusions and interruptions, respectively. So₂, tissue oxygen saturation; VF, ventricular fibrillation; XCL, aortic cross-clamping; ■, warm blood cardioplegia; deCL, aortic declamping; SD, spontaneous defibrillation; ●, group A; ○, group B. Each value represents $\bar{x} \pm SD$.

2) 核

核クロマチン顆粒が均一に分布し、核膜内側の縁取りや核質内での凝集化が認められないものを(-), 軽度凝集化が認められるものを(+), 均一性が失われ、縁取りや凝集化が認められるものを(++)、著明な縁取りと凝集化が認められるものを(+++)とした。

3) グリコーゲン顆粒

核周囲、筋原線維間、ミトコンドリア周囲に豊富にグリコーゲン顆粒が認められるものを(-), グリコーゲン顆粒が軽度に減少しているものを(+), グリコーゲン顆粒がかなり減少し、集合密度が低いものを(++), グリコーゲン顆粒が全く認められないものを(+++)とした。

4) 細胞内水腫

筋原線維、ミトコンドリアが密に配列しているものを(-), 密に配列しているが疎な部分もあるものを(+), 大部分疎に配列しているものを(++), 疎に配列しているものを(+++)とした。

5) リソソーム

リソソームの腫大が認められないものを(-), 軽度に腫大しているものを(+), 中等度に腫大しているものを(++), 腫大し、破綻が認められるものを(+++)とした。

6) 筋小胞体, T系

筋小胞体, T系の拡張が認められないものを(-), 軽度に拡張しているものを(+), 中等度に拡張しているものを(++), 著明に拡張しているものを(+++)とした。

7) 介在盤

介在盤離開が認められないものを(-), 軽度に離開がみられるものを(+), 中等度に離開がみられるものを(++), 著明に離開がみられるものを(+++)とした。

V. 統計学的検定法

結果はすべて平均±標準偏差で表記した。近赤外光モニタリング、心筋内ヌクレオチド含量測定における群内因子の差の検定には一元配置分散分析法を、多重比較には Scheffe の方法を用いた。体外循環前後の心機能の差の検定には paired t 検定を用いた。いずれの場合も $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

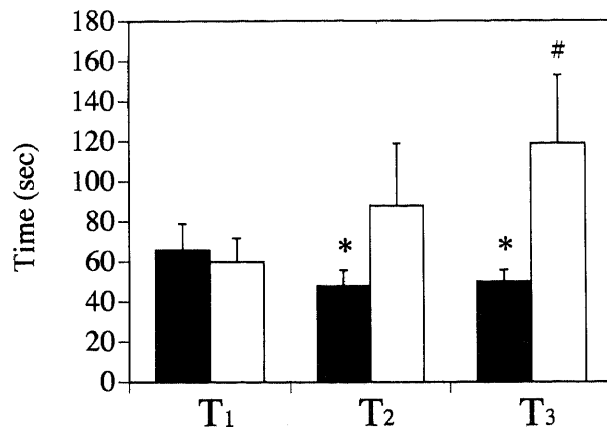


Fig. 6. The time required to reach a plateau in myocardial tissue oxygen saturation during the first (T_1), second (T_2) and third (T_3) cardioplegic infusion. *, $p < 0.05$ versus T_1 by Scheffe's comparison; #, $p < 0.01$ versus T_1 by Scheffe's comparison; ■, group A; □, group B; bar, SD.

成 績

I. 近赤外光モニタリング

1. SO_2 測定

A, B両群とも冠灌流および灌流停止は SO_2 に良好に反映され、灌流を開始すると SO_2 は $82 \pm 5\%$ に、灌流を停止すると $60 \pm 2\%$ となり、灌流および灌流停止を反復して行っても SO_2 の推移は基本的に変わらなかった。A, B両群における SO_2 は完全体外循環後、心室細動時にそれぞれ $59 \pm 3\%$ および $61 \pm 3\%$ を示した。大動脈を遮断し、心筋保護液冠灌流を開始すると SO_2 は $83 \pm 4\%$ および $82 \pm 7\%$ まで上昇し、プラトーに達した。冠灌流を停止すると SO_2 は速やかに低下して3分でプラトーに達し、 $60 \pm 2\%$ および $60 \pm 2\%$ となった(図 5A)。2、

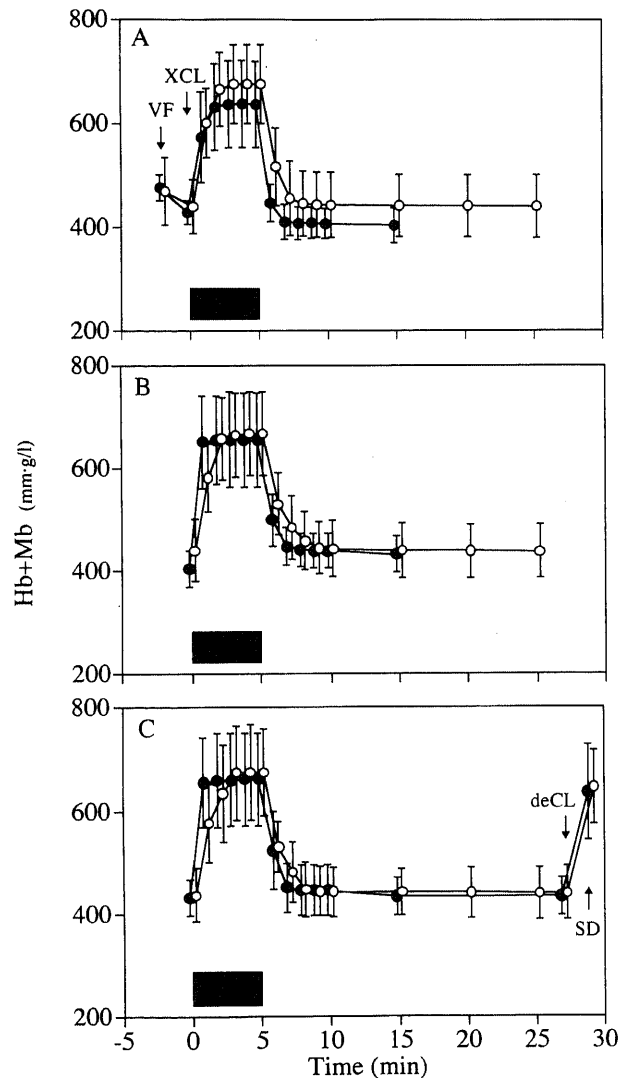


Fig. 7. Comparison of myocardial tissue hemoglobin plus myoglobin concentration measured in hearts which received intermittent warm blood cardioplegia in groups A and B. Graphs (A), (B) and (C) show the first, second and third cardioplegic infusions and interruptions, respectively. Hb+Mb, tissue hemoglobin plus myoglobin concentration; VF, ventricular fibrillation; XCL, aortic cross-clamping; ■, warm blood cardioplegia; deCL, aortic declamp; SD, spontaneous defibrillation; ●, group A; ○, group B. Each value represents $\bar{x} \pm SD$.

3回目の冠灌流では、A群は1回目と同様に速やかな組織酸素化を認めたが、B群は灌流を繰り返すごとに組織酸素化が遅延する傾向を示した。3回目の冠灌流停止を終了後、大動脈遮断を解除すると SO_2 は両群とも急速に上昇し、A群は SO_2 が $80 \pm 3\%$ に達した時点で全例自己心拍の自然再開を認めた。B群は4例において、 SO_2 が $78 \pm 7\%$ に達したところで自己心拍の自然再開を認めたが、3例で心室細動となり、除細動を必要とした(図5B, C)。1, 2, 3回目の心筋保護液冠灌流開始から SO_2 が上昇し、プラトーに達するまでの時間を T_1, T_2, T_3 とすると、A群では T_2, T_3 が T_1 に比べて有意に低値であり、B群では T_3 が T_1 に比べて有意に高値であった(図6)。

2. Hb+Mb 測定

A, B群とも SO_2 と同様、冠灌流および灌流停止は Hb+Mb に良好に反映された。A, B両群における Hb+Mb は完全体外循環後、心室細動時にそれぞれ $477 \pm 25 \text{ mm} \cdot \text{g/l}$ および $470 \pm 65 \text{ mm} \cdot \text{g/l}$ を示した。大動脈を遮断し、心筋保護液冠灌流を開始すると Hb+Mb は $638 \pm 84 \text{ mm} \cdot \text{g/l}$ および $676 \pm 76 \text{ mm} \cdot \text{g/l}$ まで上昇し、プラトーに達した。冠灌流を停止すると Hb+Mb は速やかに低下して、3分でプラトーに達し、 $407 \pm 29 \text{ mm} \cdot \text{g/l}$ および $443 \pm 63 \text{ mm} \cdot \text{g/l}$ となった(図7A)。2, 3回目の冠灌流では、A群は1回目と同様に速やかな Hb+Mb の増加を認めたが、B群は徐々に増加が遅延する傾向を示した。3回目の冠灌流停止を終了後、大動脈遮断を解除すると Hb+Mb は両群とも急速に増加した(図7B, C)。1, 2, 3回目の心筋保護液冠灌流開始から Hb+Mb が上昇し、プラ

トーに達するまでの時間を t_1, t_2, t_3 とすると、A群では t_2, t_3 が t_1 に比べて有意に低値であり、B群では t_3 が t_1 に比べて有意に高値であった(図8)。

II. 心機能

心拍数は、A群では有意な変化はなかったが、B群では有意に低下した。平均左房圧は、両群とも有意な差はなかった。収縮期血圧は、A群では体外循環後低下の傾向にあったが、有意差はなかった。B群では体外循環後有意に低下した。心拍出量係数は、A群では体外循環後上昇の傾向にあったが、有意差はなかった。B群では体外循環後有意に低下した。末梢血管抵抗は、A群では体外循環後低下の傾向にあったが、有意差はなかった。B群では体外循環後有意に上昇した。左室仕事量係数は、A群では有意な変化はなかったが、B群では体外循環後有意に低下した(表3)。

III. 心筋内ヌクレオチド含量測定

1. 心筋内 ATP 含量

A群における心筋内 ATP 含量は有意な変化を示さなかった。B₀, B₃における心筋内 ATP 含量はそれぞれ $7.2 \pm 3.3 \text{ nmol/mg 蛋白}$, $2.1 \pm 1.5 \text{ nmol/mg 蛋白}$ であり、有意に変化し、B₃における ATP 含量は B₀ に比べ有意に低値であった(図9)。

2. 心筋内 ADP 含量

A群における心筋内 ADP 含量は有意な変化を示さなかった。B群における心筋内 ADP 含量も、A群と同様に有意な変化を示さなかった(図10)。

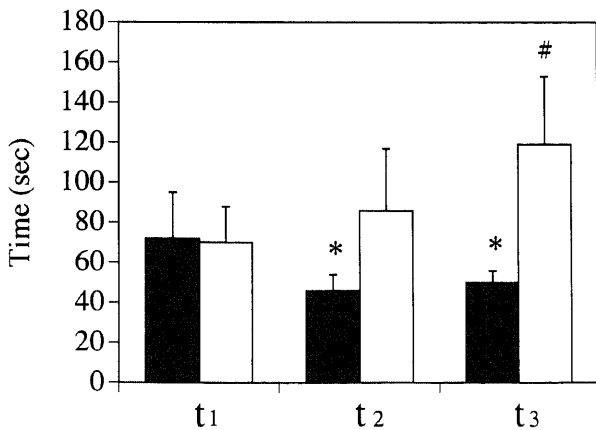


Fig. 8. The time required to reach a plateau in myocardial tissue hemoglobin plus myoglobin concentration at the first (t_1), second (t_2) and third (t_3) cardioplegic infusion *, $p < 0.05$ versus t_1 by Scheffe's comparison; #, $p < 0.01$ versus t_1 by Scheffe's comparison; ■, group A; □, group B; bar, SD.

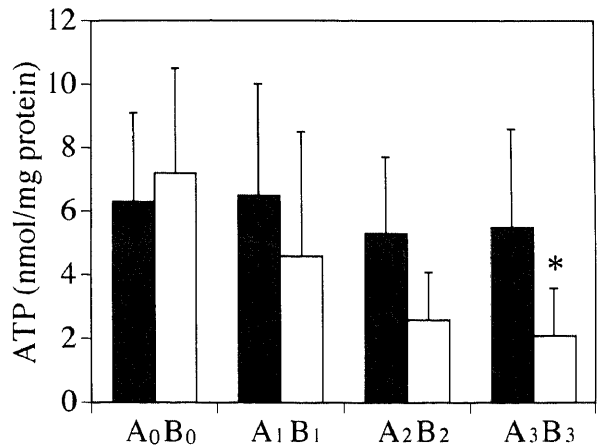


Fig. 9. Myocardial ATP content. Samples were taken before the first (A₀, B₀), second (A₁, B₁), and third (A₂, B₂) cardioplegic infusions, and before aortic declamping (A₃, B₃). *, $p < 0.05$ versus B₀ by Scheffe's comparison; ■, group A; □, group B; bar, SD.

Table 3. Comparisons of cardiac function

Group	Number of dogs	Heart rate (beats/min)	Left atrial mean pressure (mmHg)	Systolic blood pressure (mmHg)	Cardiac index (ml/min/kg)	Systemic vascular resistance (dyne · sec · cm ⁻⁵)	Left ventricular stroke work index (g · m/kg)
A Before CPB	7	144 ± 16	8 ± 2	148 ± 15	178 ± 33	4842 ± 988	1.81 ± 0.46
After CPB	7	153 ± 15	8 ± 2	143 ± 15	187 ± 32	4201 ± 583	1.72 ± 0.39
B Before CPB	7	158 ± 12	9 ± 3	151 ± 24	177 ± 18	4880 ± 557	1.74 ± 0.27
After CPB	7	102 ± 15 #	9 ± 3	91 ± 16 #	75 ± 21 #	6077 ± 1000 *	0.59 ± 0.28 #

CPB, cardiopulmonary bypass; *, $p < 0.05$ versus before CPB by paired t test; #, $p < 0.0005$ versus before CPB by paired t test.

3. 心筋内 AMP 含量

A₀, A₃における心筋内 AMP 含量はそれぞれ 2.1±0.6nmol/mg 蛋白, 3.5±1.6nmol/mg 蛋白であり, 上昇傾向を示したが有意差はなかった. B₀, B₃における心筋内 AMP 含量はそれぞれ 2.3±0.7nmol/mg 蛋白, 6.9±2.6nmol/mg 蛋白であり, 有意に変化し, B₃における AMP 含量は B₀に比べ有意に高値であった(図11).

IV. 心筋の超微細構造

心筋の超微細構造を, A, B 群の群内因子それぞれについて以下に述べる.

1. A₀

筋原線維間には円形ないし楕円形のミトコンドリアが整然と並んでいた. 大多数のミトコンドリアの内部構造はよく保たれ, 基質の淡明化, クリスタの崩壊は認められなかった. 核クロマチン顆粒の分布はほぼ均一で, グリコーゲン顆粒も豊富に認められた(図 12A).

2. A₁

核, ミトコンドリアの変化はほとんど認められなかった. ミトコンドリアは筋原線維間に整然と密に配列し, 内部構造はよ

く保たれていた. 介在盤の離開はなく, 細胞内水腫も認められなかった(図 12B).

3. A₂

核, ミトコンドリアの変化はほとんど認められなかった. グリコーゲン顆粒は軽度減少していた. 筋原線維, ミトコンドリアがやや粗に配列しており, 軽度の細胞内水腫が認められた(図 12C).

4. A₃

軽度の細胞内水腫が認められたが, 核, ミトコンドリアの変化はほとんど認められなかった. 介在盤の離開, T 系の膨化は認められなかった(図 12D).

5. B₀

核クロマチン顆粒が均一に分布しており, ミトコンドリアの内部構造はよく保たれていた. グリコーゲン顆粒は豊富に存在していた(図 13A).

6. B₁

核, ミトコンドリアにほとんど変化は認められなかったが, グリコーゲン顆粒は減少していた. 細胞内水腫や筋小胞体, T 系の拡張は認められなかった(図 13B).

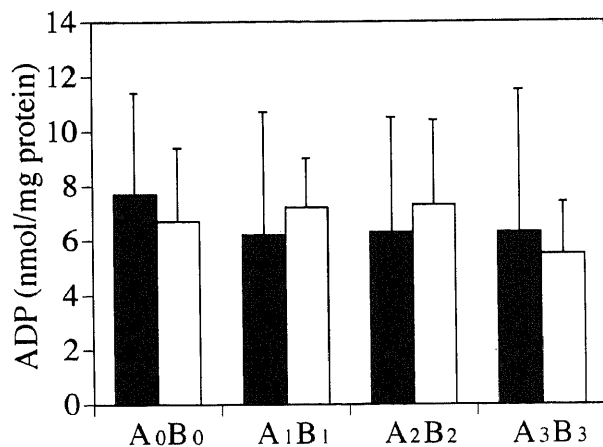


Fig. 10. Myocardial ADP content. Samples were taken before the first (A₀, B₀), second (A₁, B₁), and third (A₂, B₂) cardioplegic infusions, and before aortic declamping (A₃, B₃). There were no significant changes in group A or B, by one way analysis of variance. ■, group A; □, group B; bar, SD.

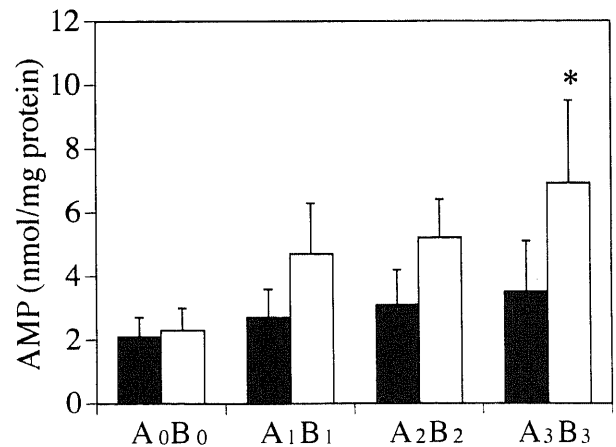


Fig. 11. Myocardial AMP content. Samples were taken before the first (A₀, B₀), second (A₁, B₁), and third (A₂, B₂) cardioplegic infusions, and before aortic declamping (A₃, B₃). *, p<0.01 versus B₀ by Scheffe's comparison; ■, group A; □, group B; bar, SD.

Table 4. The semiquantitative evaluation of ischemic change

Organelle	Ultrastructural change ^{a)}							
	Group A				Group B			
	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃	B ₀	B ₁	B ₂	B ₃
Mitochondria	-	-	-	-	-	-	+	+
Nucleus	-	-	-	-	-	-	+	+
Glycogen granule	-	-	+	+	-	+	+	+
Intracellular edema	-	-	+	+	-	-	+	+
Lysosome	-	-	-	-	-	-	-	-
Sarcoplasmic reticulum, T system	-	-	-	-	-	-	+	+
Intercalated disk	-	-	-	-	-	-	-	-

The samples were taken before the first (A₀, B₀), second (A₁, B₁), and third (A₂, B₂) cardioplegic infusions, and before aortic declamping (A₃, B₃).

a) -, unchanged; +, mild; ++, moderate; +++, severe.

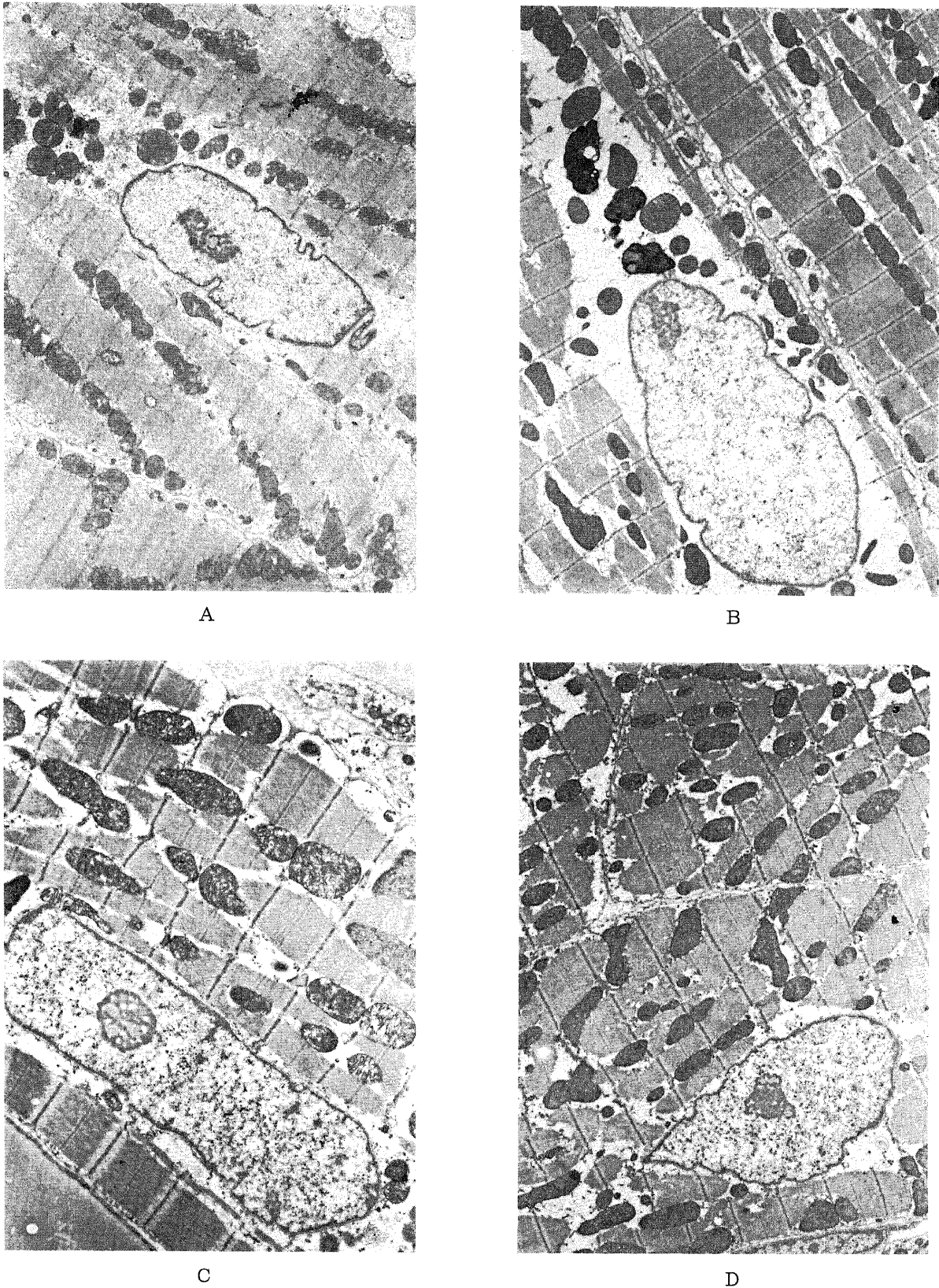
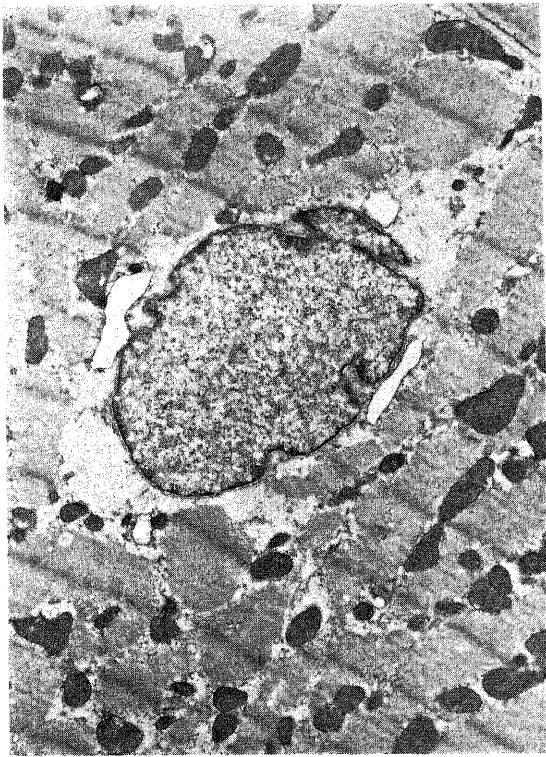
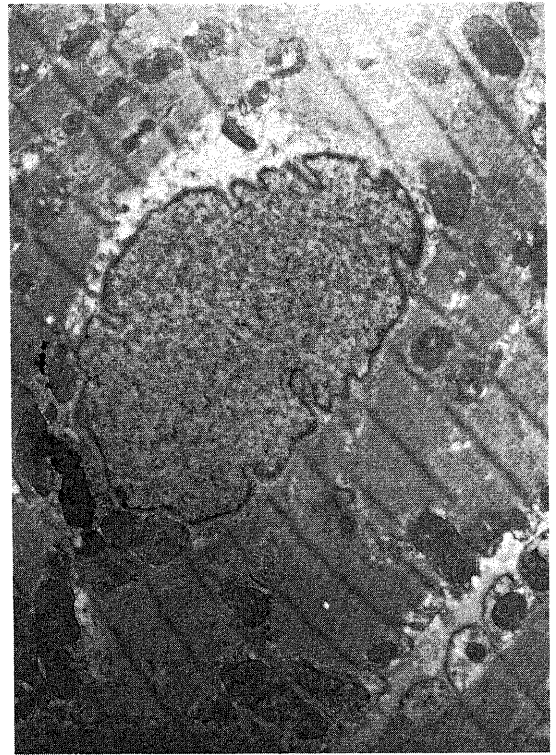


Fig. 12. Electron micrograph of biopsy taken from the right ventricle in group A. (A) Before the first cardioplegic infusion (A_0). The cristae and matrices of mitochondria are normal. The nuclear chromatin is evenly arranged. There are normal amounts of glycogen at perinuclear and perimitochondrial sites ($\times 7,000$). (B) Before the second cardioplegic infusion (A_1). The mitochondria have moderately dense matrices and a normal pattern of cristae, and do not contain any dense granules ($\times 7,000$). (C) Before the third cardioplegic infusion (A_2). The amount of glycogen is slightly diminished and intracellular edema is seen. The appearance is otherwise unremarkable ($\times 7,000$). (D) Before aortic declamping (A_3). Apart from some depletion of glycogen and intracellular edema, the appearance is normal ($\times 7,000$).



A



B



C



D

Fig. 13. Electron micrograph of biopsy taken from the right ventricle in group B. (A) Before the first cardioplegic infusion (B_0). The nuclear chromatin is evenly arranged. The mitochondria have moderately dense matrices. There are normal amounts of glycogen at perinuclear and perimitochondrial sites ($\times 7,000$). (B) Before the second cardioplegic infusion (B_1). Apart from some depletion of glycogen, the appearances are normal ($\times 7,000$). (C) Before the third cardioplegic infusion (B_2). The nucleus shows dispersion and some margination of chromatin material. The mitochondria are slightly swollen and the sarcolemma is flattened ($\times 7,000$). (D) Before aortic declamping (B_3). The chromatin margination in the nucleus is more striking and mitochondrial changes are more advanced. In some mitochondria, the cristae are disrupted. Intracellular edema is seen ($\times 7,000$).

7. B₂

核クロマチン顆粒の凝集化が認められた。ミトコンドリアの軽度膨化が認められたが内部構造は保持されていた。軽度の細胞内水腫や筋小胞体, T系の膨化が認められた。介在盤の離開はなかった(図13C)。

8. B₃

核クロマチン顆粒の凝集化, 縁取りが認められた。ミトコンドリアの一部は膨化しており, 基質の淡明化, クリスタの崩壊が認められた。軽度の細胞内水腫が認められたが, 介在盤の離開はなかった(図13D)。

次に各群内因子の半定量的評価を表4に示した。総括すると, A群では, A₂, A₃でグリコーゲン顆粒の減少, 軽度の細胞内水腫を認めたのみで, ミトコンドリアや核に虚血性変化を認めなかった。B群では, B₁で大きな変化を認めなかったが, B₂で核クロマチンの凝集化, ミトコンドリア基質の淡明化, 軽度の細胞内水腫を認め, B₃ではそれらがいずれも増悪傾向にあった。したがってB群ではA群と異なり, 虚血による蓄積性の細胞損傷が起きることが示唆された。

考 察

CWBCは, 開心術の歴史上画期的な心筋保護法であり, その有用性は教室の藤井²⁴⁾をはじめとして最近多く報告されている^{10)~13)}。しかし, CWBCにおける冠灌流の一時停止¹⁴⁾やIWBCでの常温虚血による心筋障害が懸念され, その安全性の確立が望まれている。著者は雑種の成熟イヌを用い, 近赤外分光法を利用した組織酸素飽和度測定装置を心臓に応用して, IWBC中のSo₂およびHb+Mbを連続測定することにより心筋組織酸素代謝を解明し, さらに心機能, 心筋エネルギー代謝および心筋超微細構造の面からIWBCの安全性を検討した。その結果, 正常犬では, IWBC中の10分間の冠灌流停止は安全であるが, 20分間の冠灌流停止は蓄積性の心筋障害を生じることが判明した。また近赤外分光法を用いた心筋So₂, Hb+Mbの連続測定はIWBC中の有用な心筋モニターとなることが示された。

心筋保護の歴史は開心術とともに始まり, 現在の心筋保護液使用の時代以前からその概念があった。非拍動状態での心臓手術は, Senning²⁵⁾(1952年)の体外循環下心室細動法により初めて可能となった。しかしこの方法は心内膜下層の血流量が心外膜側に比べ少ないため, 特に肥大大心では心内膜下虚血が誘発されることが報告され²⁶⁾²⁷⁾, この方法は心房中隔欠損閉鎖術などの短時間で終了する一部の開心術にのみ用いられている。1960年代には, 無血視野を得るため中等度低体温体外循環下で大動脈遮断と解除を繰り返し, 冷却した体外循環血液で間欠的に冠灌流するという間欠的大動脈遮断法が登場した。この方法は心室が細動状態となり, 術後の心機能低下を認めるという理由で衰退した。その後, 大動脈遮断下に晶質性低温心筋保護液を間欠的に冠灌流して心停止を得る心筋保護法が主流となった^{3)~5)}。さらに血液付加による種々の有用性を理由に間欠的血性心筋保護法が開発された^{6)7)28)~30)}。

間欠的血性心筋保護法が間欠的大動脈遮断法と異なる所は,

1) 冠灌流する心筋保護液のカリウム濃度が20~30mEq/lと高い, 2) 冠灌流液が晶質液でヘマトクリット20%前後に希釈されている, 3) 冠灌流量, 灌流温度を正確に決定できる, の3点である。1)は最も重要な相違点であり, 高カリウムによる脱分極で心臓の電気的機械的停止を得るため, 拍動心や細動

心に比べ心筋の酸素消費量を著明に減少させることができる。Buckbergら³¹⁾は, 常温(37℃)では空打心臓の酸素消費量は5.59ml/min/100g心筋であり, 細動心では6.50ml/min/100g心筋であるが, 心臓が電気的機械的に停止すると酸素消費量は1.10ml/min/100g心筋に低下し, その状態で低温(28℃)にすると酸素消費量はさらに0.59ml/min/100g心筋に低下すると述べている。すなわち心筋保護液の使用によって電気的機械的心停止を得ることが心筋保護上最も重要である⁵⁾⁶⁾。

間欠的低温心筋保護法の弱点, すなわち低温による心筋障害や再灌流障害を克服する目的で, 常温血性心筋保護液を持続的に冠灌流し, 好気性代謝を維持しつつ弛緩性心停止を得るCWBCが開発された。さらに無血視野を得るために常温血性心筋保護液を間欠的に冠灌流するIWBCが提唱された。しかし, CWBCの一時停止やIWBCでは, 灌流停止中の心筋保護効果そのものについての解明が必要となった。

今回著者はIWBC中の心筋酸素代謝のモニターとして近赤外分光法を利用したSo₂測定装置を用いた。近赤外光は生体組織に対し良好な透過性を有するが, ヘモグロビンおよびミオグロビンの鉄ポルフィリン複合体, チトクロームaa₃の銅蛋白質によって吸収され, 酸化還元によりその吸光度が異なることが知られている。この特異的な性質を利用してChance³²⁾(1951年)は2波長スペクトル分光測定装置を開発し, Jöbsis³³⁾(1977年)は近赤外分光法による酸素代謝及び血流測定を生体組織へ応用した。それ以後この原理による生体モニタリングは脳, 骨格筋, 腎臓などの分野で臨床応用され^{34)~36)}, 無侵襲で酸素代謝や血液量が測定できる生体モニタリング装置として近年注目を浴びている。心臓においては1990年頃よりParsonsら³⁷⁾³⁸⁾が近赤外分光法を用いて, 虚血や反応性充血について詳細な報告を行っている。しかし, 今回のように体外循環下で血性心筋保護液冠灌流による電気的機械的停止状態での心筋酸素代謝, 血液量変動を近赤外分光法を用いて検討した報告はこれまでにない。今回心臓用に開発したプローベは接地面積が小さく心筋に接着するだけで測定が可能であるという利点があり, また冠灌流時だけでなく灌流停止時, さらに心拍動再開時にも測定を継続することが可能である。

心筋酸素代謝の研究は1950年頃よりなされ³⁹⁾⁴¹⁾, 様々な条件下での心臓の酸素消費量が計測されたが, その測定方法は基本的に冠動脈と冠静脈洞の酸素濃度較差を利用するものであった。心室細動時の酸素消費量は4~7ml/min/100g心筋であり³⁹⁾⁴²⁾, 血性心筋保護液冠灌流時では, 心筋は電気的機械的に停止しているため細動時に比べ酸素消費量はかなり小さく, 0.6~1.8ml/min/100g心筋程度と報告されている^{43)~45)}。本研究の心筋組織の測定値では電気的機械的心停止時のHb+Mbは400~450mm·g/lである。成熟イヌの心臓の水分含有量は80%前後と報告されており⁴⁶⁾, 本実験における心筋組織の平均光路長を, Wrayら⁴⁷⁾の脳組織の報告と同じく照射受光間距離の4.34倍と仮定すると, 平均光路長で除したHb+Mbは35~40g/lとなる。成熟イヌのミオグロビン心筋内含有量は4.8mg/g湿重量と報告されているので⁴⁸⁾, Hb+Mbにおけるミオグロビン濃度の割合は10~15%と予測される。加えて, 心筋組織において静脈血液量は動脈血液量に比べはるかに多く⁴⁹⁾, その結果, 本モニターの心筋So₂の測定値はその大部分を心筋組織内静脈血によっていると考えることができる。本研究でのSo₂の測定値は, 先に述べた酸素消費量における冠静脈血の酸

素飽和度とおよそ合致していた。実際には細動脈、毛細管内の血液も併せて測定しており、冠静脈血の酸素飽和度より幾分高いことが予測される。

チトクローム aa_3 はミトコンドリア呼吸鎖の末端に位置し、自己の水素電子を酸素分子に渡すことで酸化される³⁴⁾。還元チトクローム aa_3 は低酸素に平衡してミトコンドリアの酸化的磷酸化能、すなわち ATP 生成能の低下を表現するといわれる⁵⁰⁾。脳チトクローム aa_3 では、これの酸化還元に伴う吸光変化量がヘモグロビンの 1/10 以下である。測定波長を選択すれば心筋のチトクローム aa_3 の計測も可能であるが、実際の心臓の測定においては測定感度を高める必要がある²⁰⁾。このような理由から今回の実験ではチトクローム aa_3 の酸化還元レベルの測定は行わなかった。

IWBC における冠灌流時の心筋組織酸素代謝の検討から SO_2 測定装置は IWBC に伴う虚血再灌流障害の有益なモニターとなる可能性が示唆された。A 群における T_1 は T_2 , T_3 に比べて、また t_1 は t_2 , t_3 に比べて有意に長く、初回の常温血性心筋保護液冠灌流時に Hb+Mb の増加が遅延し、それに伴い心筋組織の酸素化も遅延した。これは初回冠灌流前の心室細動が心筋組織内圧を上昇させ、心筋内冠血管を圧迫するため、冠血管抵抗を上昇させた結果と考えられる^{26,27)}。これに反し B 群では、 T_1 , T_2 , T_3 の順で延長し、 t_1 , t_2 , t_3 も同様の傾向を示した。すなわち、2, 3 回目の灌流時に Hb+Mb の増加が遅延し、それに伴い心筋組織酸素化の遅延が生じた。20分間の常温虚血の反復は、電気的機械的心停止状態すなわち低代謝状態であっても虚血再灌流障害が発生し、血管拡張物質の減少をもたらし、それにより冠血管抵抗が上昇し、低灌流現象が生じるものと考えられた⁵¹⁻⁵³⁾。虚血再灌流障害モデルにおける近赤外光モニタリングの方法は腎臓においても報告されており、Vaughan ら³⁸⁾ は 45 および 80 分間のラット腎虚血において、再灌流時の酸化ヘモグロビン濃度の増加が 45 分虚血に比べて 80 分虚血では遅延すると述べている。

本研究は IWBC の臨床応用を想定して、体外循環前後での心機能測定を行った。A 群では体外循環後、左室仕事量係数に有意差はなかったが、収縮期血圧は低下し、心拍出量係数は増加し、末梢血管抵抗は低下する傾向にあった。この理由として 10 分間灌流停止の IWBC の良好な心筋保護効果と、常温体外循環による末梢血管拡張が挙げられる^{24,54)}。B 群では体外循環後、収縮期血圧、心拍出量係数が低下し、末梢血管抵抗が上昇し、左室仕事量係数が低下した。電気的機械的心停止下でも、20分間に及ぶ合計 3 回の心筋保護液灌流停止は心筋虚血障害を引き起こし、術後心機能に重大な影響を及ぼすと推測された。そこで心機能低下の原因を心筋エネルギー代謝および心筋超微細構造の面から検討した。

今回著者は心筋内 ATP, ADP, AMP 含量を測定し、心筋組織酸素エネルギー代謝を検討した。心筋細胞におけるエネルギー代謝は ATP の産生と利用のバランスの上に成り立っており、虚血時には酸化的磷酸化反応の停止により ATP レベルが低下し、これが細胞内諸機能の停止につながる⁵⁵⁾。しかし虚血時の心筋拘縮の発生は拘縮前の ATP 値と解離しているとの報告もあり⁵⁶⁾、ATP の測定は、心筋超微細構造の変化や虚血性心筋拘縮のような不可逆的虚血障害を直接的に観察する点に関して代用となるものではない。Jennings ら⁵⁷⁾ は高エネルギー磷酸の変動と超微細構造の面からみた拍動心筋の虚血について報告

しており、15, 30, 40, 60 分間の常温虚血における心筋内 ATP 含量は非虚血時のそれぞれ 35%, 9%, 7%, 5% であると、同時に行った心筋超微細構造の観察から 15 分以内の虚血を可逆的障害、40 分以上の虚血を不可逆的障害と結論した。Tian ら²⁰⁾ は豚の心臓に IWBC を施行し、心臓が電気的機械的に停止していれば、10 分間の灌流停止では心筋エネルギー代謝の変化は軽度かつ可逆的であり、蓄積性でないことを示した。本研究において、A 群では心筋内 ATP 含量は良好に温存され、虚血による心筋障害が存在してもごく軽度であると推測された。これに反し B 群では経時的な ATP 含量の低下と AMP 含量の増加が認められ、心筋内の高エネルギー磷酸が枯渇し、これが IWBC 後の体外循環離脱後心機能に重大な影響を及ぼしたと推測された。従って心筋エネルギー代謝の面から見た IWBC における灌流停止の安全時間は 10 分間であり、20 分間の灌流停止は危険であるといえる。

虚血心筋に対する電子顕微鏡を用いた超微細構造変化の検討は、先に述べた Jennings らを中心に数多くなされてきた⁵⁷⁻⁶¹⁾。それらによると、虚血 5~10 分後には超微細構造上の変化としてすでにミトコンドリアの形態学的変化やグリコーゲン顆粒が観察されており、短時間虚血における電顕の鋭敏性が唱えられている。開心術中の心筋保護における心筋超微細構造の変化については 1970 年代から研究がなされ⁶²⁻⁶⁵⁾、CWBC に関しては Rainio ら⁶⁶⁾ (1995 年) が電顕的に軽度な変化を生じさせるが、基本的に可逆的な変化であることを報告した。IWBC は新しい心筋保護の概念であり、IWBC 施行時の心筋超微細構造の面から見た安全な灌流停止時間に関する報告はこれまでにみられない。拍動心と電気的機械的停止心は先に述べたように心筋酸素消費量が異なり、明らかに後者の方が虚血による心筋障害の度合いは少ないと考えられる。本研究では、A 群は A_3 においてもグリコーゲン顆粒の減少を認めたのみで、ミトコンドリアや核にみられる超微細構造上の虚血性変化は認められなかった。逆に B 群では B_2 ですでにミトコンドリアや核に変化が認められ、 B_3 ではそれらの虚血性変化が増悪していた。 B_3 の変化は、犬拍動心の回旋枝を 15~30 分間結紮した虚血性変化と同等であった⁵⁸⁾。さらにこれらの心筋超微細構造の結果は、組織採取により測定した心筋内ヌクレオチド含量の結果とも符合していた。心筋超微細構造から見た場合、IWBC における 10 分間の冠灌流停止は安全であるが、20 分間の灌流停止は蓄積性の細胞損傷が生じ、IWBC による保護効果が不良となることが示された。本研究では正常犬を対象としたが、肥大大心や虚血心では冠灌流停止許容時間はこれより短くなると推測される。

近赤外分光法を利用した SO_2 の連続測定は、臨床における血性心筋保護法の有用な心筋モニターとしてだけでなく、今後血性心筋保護法に伴う虚血再灌流障害の指標や心拍再開時の拍動心の酸素代謝の解明など、幅広い発展が期待される。

結 論

近赤外分光法を利用して SO_2 および Hb+Mb を連続測定することにより IWBC 中の心筋の酸素代謝および血液量変動を解明し、さらに心機能、心筋エネルギー代謝、心筋超微細構造の面から IWBC の安全性を検討し、次の結果を得た。

1. 近赤外分光法を利用した SO_2 , Hb+Mb の測定は常温血性心筋保護液の冠灌流、灌流停止を鋭敏に反映した。また冠灌流開始から SO_2 , Hb+Mb が上昇してプラトーに達するまでの時

間は、A群では初回冠灌流時が長かったが、B群では経時的に延長する傾向にあった。B群では虚血再灌流障害により冠血管抵抗が上昇し、 SO_2 , Hb+Mbの上昇が遅延すると推測された。

2. 体外循環前後の心機能を収縮期血圧、心拍出量係数、末梢血管抵抗、左室仕事量係数の面から評価した。A群では心機能は低下しなかったが、B群では収縮期血圧、心拍出量係数は低下し、末梢血管抵抗が上昇し、左室仕事量係数が低下し、心機能が低下した。

3. 心筋内クレオチド含量において、A群ではATP, ADP, AMP含量のいずれも有意な変化を示さなかったが、B群ではATP含量が低下し、AMP含量が上昇し、高エネルギー磷酸の枯渇が認められた。

4. 心筋超微細構造において、A群では経時的な虚血性変化が認められなかった。B群では3回目の灌流開始直前に、ミトコンドリアや核に変化が認められ、大動脈遮断解除直前にそれらが増悪し、虚血による蓄積性の細胞損傷が示された。

以上の研究結果から、近赤外分光法を利用した心筋モニタリングは常温血性心筋保護法において有用であった。また正常犬におけるIWBCの安全な灌流停止時間は10分間であり、20分間の灌流停止はその回復により、蓄積性の心筋障害が発生すると結論された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御指導を賜りました川筋道雄助教授、電顕像に関し御助言、御指導を賜りました病理学第一講座中西功夫教授、統計学的処理に関し御助言を賜りました衛生学講座谷井秀治助教授に深く感謝いたします。また、電顕像作成に御協力をいただきました病理学第一講座徳田良子主任に深く感謝いたします。最後に本研究の遂行に御協力をいただきました金沢大学第一外科学教室員各位に厚くお礼を申し上げます。

なお、本論文の一部は第19回日本心筋保護研究会(1995年、名古屋)、第48回日本胸部外科学会総会(1995年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Melrose, D. G., Dreyer, B., Bentall, H. H. & Baker, J. B. E.: Elective cardiac arrest. *Lancet*, 2, 21-22 (1955).
- 2) Helmsworth, J. A., Kaplan, S., Clark, L. C., McAdams, A. J., Matthews, E. C. & Edwards, F. K.: Myocardial injury associated with asystole induced with potassium citrate. *Ann. Surg.*, 149, 200-206 (1959).
- 3) Reidemeister, J. C., Heberer, G. & Bretschneider H. J.: Induced cardiac arrest by sodium and calcium depletion and application of procaine. *Int. Surg.*, 47, 535-540 (1967).
- 4) Kirsch, U., Rodewald, G. & Kalmar, P.: Induced ischemic arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 63, 121-130 (1972).
- 5) Hearse, D. J., Stewart, D. A. & Bainbridge, M. V.: Cellular protection during myocardial ischemia. *Circulation*, 54, 193-202 (1976).
- 6) Follette, D. M., Mulder, D. G., Maloney J. V. & Buckberg G. D.: Advantages of blood cardioplegia over continuous coronary perfusion or intermittent ischemia: experimental and clinical study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 76, 604-617 (1978).
- 7) Buckberg, G. D.: A proposed "solution" to the

cardioplegic controversy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 77, 803-815 (1979).

- 8) Lary, A. R. G., Douglas, S., David, B. G., William H. F. & Timothy A. G.: Myocardial protection for acquired heart disease surgery: Results of a national survey. *Ann. Thorac. Surg.*, 59, 361-372 (1995).
- 9) Lichtenstein, S. V., Kassam, A. A., Dalati, H. E., Cusimano, R. J., Panos, A. & Slutsky A. S.: Warm heart surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 101, 269-274 (1991).
- 10) Lajos, T. Z., Espersen, C. C., Lajos, P. S., Fiedler, R. C., Bergsland, J. & Joyce, L. T.: Comparison of cold versus warm cardioplegia. Crystalloid antegrade or retrograde blood? *Circulation*, 88 (part 2), 344-349 (1993).
- 11) Brown III, W. M., Jay, J. L., Gott, J. P., Huang, A. H., Horsley, W. S., Dorsey, L. M. A., Katzmark, S., Siegel, R. J. & Guyton, R. A.: Warm blood cardioplegia: Superior protection after acute myocardial ischemia. *Ann. Thorac. Surg.*, 55, 32-42 (1993).
- 12) Menasché, P., Haydar, S., Peynet, J., Du Buit, C., Bloch, G., Piwnica, A. & Tedgui, A.: A potential mechanism of vasodilation after warm heart surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 107, 293-299 (1994).
- 13) Buckberg, G. D.: Normothermic blood cardioplegia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 107, 860-867 (1994).
- 14) Matsuura, H., Lazar, H. L., Yang, X. M., Rivers, S., Treanor P. R. & Shemin R. J.: Detrimental effects of interrupting warm blood cardioplegia during coronary revascularization. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 106, 357-361 (1993).
- 15) Landymore, R. W., Marble, A. E. & Fris, J.: Effect of intermittent delivery of warm blood cardioplegia on myocardial recovery. *Ann. Thorac. Surg.*, 57, 1267-1272 (1994).
- 16) Pelletier L. C., Carrier, M., Leclerc, Y., Cartier, R., Wesolowska, E. & Solymoss, B. C.: Intermittent antegrade warm versus cold blood cardioplegia: A prospective, randomized study. *Ann. Thorac. Surg.*, 58, 41-49 (1994).
- 17) Ali, I. M. & Kinley, C. E.: The safety of intermittent warm blood cardioplegia. *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.*, 8, 554-556 (1994).
- 18) Mezzetti, A., Calafiore, A. M., Lapenna, D., Deslauriers, R., Tian, G., Salerno, T. A., Verna, A. M., Bosco, G., Pierdomenico, S. D. & Caccurullo, F.: Intermittent antegrade warm cardioplegia reduced oxidative stress and improves metabolism of the ischemic-reperfused human myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 109, 787-795 (1995).
- 19) Isomura, T., Hisatomi, K., Sato, T., Hayashida, N. & Ohishi, K.: Interrupted warm blood cardioplegia for coronary artery bypass grafting. *Eur. J. Cardio-thorac. Surg.*, 9, 133-138 (1995).
- 20) Tian, G., Xiang, B., Butler, K. W., Calafiore, A. M., Mezzetti, A., Salerno, T. A. & Deslauriers, R.: A ^{31}P -nuclear magnetic resonance study of intermittent warm

- blood cardioplegia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **109**, 1155-1163 (1995).
- 21) 酒井秋男, 斉藤建夫, 東 弘三, 柳平坦徳, 浅野功治: 組織酸素飽和度 (StO₂) およびヘモグロビン量 (Hb vol) 測定装置の開発. *医科器械学*, **64**, 8-13 (1994).
- 22) 田村正秀, 一色 学, 橘 秀光, 田村知巳: 近赤外分光法を用いる無侵襲生体計測. *呼と循*, **37**, 997-1002 (1989).
- 23) Parsons, W. J., Rembert, J. C., Bauman, R. P., Greenfield Jr., J. C. & Piantadosi, C. A.: Dynamic mechanisms of cardiac oxygenation during brief ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.*, **259**, H1477-H1485 (1990).
- 24) 藤井 奨: 常温血性心筋保護液による開心術中の心筋保護法に関する研究. *十全医会誌*, **103**, 293-309 (1994).
- 25) Senning, A.: Ventricular fibrillation during extracorporeal circulation used as a method to prevent air-embolism and to facilitate intracardiac operation. *Acta Chir. Scand.*, **171** (Suppl.), 1-79 (1952).
- 26) Hottenrott, C. & Buckberg, G. D.: Studies on the effects of ventricular fibrillation on the adequacy of regional myocardial flow. II. Effects of ventricular distention. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **68**, 626-633 (1974).
- 27) Hottenrott, C., Maloney Jr, J. V. & Buckberg, G. D.: Studies on the effects of ventricular fibrillation on the adequacy of regional myocardial flow. III. Mechanism of ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **68**, 634-645 (1974).
- 28) Adappa, M. G., Jacobson, L. B., Hetzer, R., Hill, J. D., Kamm, B. & Kerth, W. J.: Cold hyperkalemic cardiac versus intermittent aortic cross-clamping and topical hypothermia for coronary bypass surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **75**, 171-178 (1978).
- 29) Follette, D. M., Steed, D. L., Foglia, R., Fey, K. & Buckberg, G. D.: Advantages of intermittent blood cardioplegia over intermittent ischemia during prolonged hypothermic aortic clamping. *Circulation*, **58**, (Suppl. I) 1200-1209 (1978).
- 30) 澤 重治: 血液性心筋保護液による開心術中心筋保護の研究. *十全医会誌*, **99**, 490-503 (1990).
- 31) Buckberg, G. D., Brazier, J. R., Nelson, R. L., Goldstein, S. M., McConnell, D. H. & Cooper, N.: Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. I. The adequately perfused beating, fibrillating and arrested heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **73**, 87-94 (1977).
- 32) Chance, B.: Rapid and sensitive spectrophotometry. III. A double beam apparatus. *Rev. Sci. Instrum.*, **22**, 634-638 (1951).
- 33) Jöbsis, F. F.: Non-invasive infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, **198**, 1264-1266 (1977).
- 34) Jöbsis, F. F.: Oxidative metabolic effect of cerebral hypoxia. *Advances in Neurology*, **26**, 299-318 (1979).
- 35) Narita, N., Tominaga, T., Kosu, K., Mizoi, K. & Yoshimoto, T.: Monitoring of brain tissue haemoglobin concentration and oxygen saturation using a three wavelen-
gth spectrophotometric method. *Neurol. Res.*, **16**, 428-432 (1994).
- 36) Hampson, N. B. & Piantadosi, C. A.: Near infrared monitoring of human skeletal muscle oxygenation during forearm ischemia. *J. Appl. Physiol.*, **64**, 2449-2457 (1988).
- 37) Cheatle, T. R., Potter L. A., Cope, M., Delpy, D. T., Colerige Smith, P. D. & Scurr J. H.: Near-infrared spectroscopy in peripheral vascular disease. *Br. J. Surg.*, **78**, 405-408 (1991).
- 38) Vaughan, D. L., Wickramasinghe, Y. A. B. D., Russell, G. I., Thorniley, M. S., Houston, R. F., Ruban, E. & Rolfe, P.: Near infrared spectroscopy: Blood and tissue oxygenation in renal ischemic-reperfusion injury in rats. *Int. J. Angiol.*, **4**, 25-30 (1995).
- 39) Parsons, W. J., Rembert, J. C., Bauman, R. P., Duhaylongsod, F. G., Greenfield Jr., J. C. & Piantadosi, C. A.: Myocardial oxygenation in dogs during partial and complete coronary artery occlusion. *Circ. Res.*, **73**, 458-464 (1993).
- 40) Berglund, E., Monroe, R. G. & Schreiner, G. L.: Myocardial oxygen consumption and coronary blood flow during potassium-induced cardiac arrest and during ventricular fibrillation. *Acta Physiol. Scand.*, **41**, 261-268 (1957).
- 41) McKeever, W. P., Gregg, D. E. & Canney, P. C.: Oxygen uptake of the nonworking left ventricle. *Circ. Res.*, **6**, 612-623 (1958).
- 42) Monroe R. G. & French, G.: Ventricular pressure-volume relationships and oxygen consumption in fibrillation and arrest. *Circ. Res.*, **8**, 260-266 (1960).
- 43) Klocke, F. J., Kaiser, G. A., Ross Jr., J. & Braunwald, E.: Mechanism of increase of myocardial oxygen uptake produced by catecholamines. *Am. J. Physiol.*, **209**, 913-918 (1965).
- 44) Bretshneider, H. J., Hubner, G., Knoll, D., Lohr, B., Nordbeck, H. & Spieckermann, P. G.: Myocardial resistance and tolerance to ischemia. Physiological and biochemical basis. *J. Cardiovasc. Surg.*, **16**, 241-260 (1975).
- 45) Nozawa, T., Yasumura, Y., Futaki, S., Tanaka, N. & Suga, H.: No significant increase in O₂ consumption of KCl-arrested dog heart with filling and dobutamine. *Am. J. Physiol.*, **255**, H807-H812 (1988).
- 46) Yee, E. S. & Ebert, P. A.: Effect of ischemia on ventricular function, compliance, and edema in immature and adult canine hearts. *Surg. Forum*, **30**, 250-252 (1979).
- 47) Wray, S., Cope, M., Delpy, D. T., Wyatt, J. S. & Reynolds, E. O. R.: Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa₃ and haemoglobin for the non-invasive monitoring of cerebral oxygenation. *Biochem. Biophys. Acta*, **933**, 184-192 (1988).
- 48) Millikan, G. A.: Muscle hemoglobin. *Physiol. Rev.*, **19**, 503-523 (1937).
- 49) Figulla, H. R., Leitz K. H., Hoffmann, J. & Kreuzer, H.: A new technique for measuring oxygen saturations of hemoglobin and myoglobin and its application in open heart

- surgery. *Thorac. Cardiovasc. Surgeon*, 33, 352-353 (1985).
- 50) 田村正秀, 高木 勇, 竹内克彦, 久保良彦, 鮫島夏樹, 田村 守: 心筋細胞内酸素濃度と心筋保護. *日胸外会誌*, 30, 1121-1134 (1982).
- 51) Forman, M. B., Puett, D. W. & Virmani, R.: Endothelial and myocardial injury during ischemia and reperfusion: Pathogenesis and therapeutic implications. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 13, 450-459 (1989).
- 52) Nichols, W. M., Mehta, J. L., Donnelly, W. H., Lawson, D., Thompson, L. & Riet, M. T.: Reduction in coronary vasodilator reserve following coronary occlusion and reperfusion in anesthetized dog: Role of endothelium-derived relaxing factor, myocardial neutrophil infiltration and prostaglandins. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 20, 943-954 (1988).
- 53) Headrick, J. P., Angello, D. A. & Berne, R. M.: Effects of brief coronary occlusion and reperfusion on porcine coronary artery reactivity. *Circulation*, 82, 2163-2169 (1990).
- 54) Christakis, G. T., Koch, J. P., Deemar, K. A., Fremes, S. E., Sinclair, L., Chen, E., Salerno, T. A., Goldman, B. S. & Lichtenstein, S. V.: A randomized study of the systemic effects of warm heart surgery. *Ann. Thorac. Surg.*, 54, 449-459 (1992).
- 55) Hearse, D. J., Garlick, P. B. & Humphrey, S. M.: Ischemic contracture of the myocardium: Mechanism and prevention. *Am. J. Cardiol.*, 39, 986-993 (1977).
- 56) Bricknell O. L., Daries, P. S. & Opie, L. H.: A relationship between adenosine triphosphate, glycolysis and ischemic contracture in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13, 941-945 (1981).
- 57) Jennings, R. B., Hawkins, H. K., Lowe, J. E., Hill, M. L., Klotman, S. & Reimer, K. A.: Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am. J. Pathol.*, 92, 187-214 (1978).
- 58) Jennings, R. B., Baum, J. H. & Heardson, P. B.: Fine structural changes in myocardial ischemic injury. *Arch. Pathol.*, 79, 135-143 (1965).
- 59) Jennings, R. B. & Ganote, C. E.: Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ. Res. Suppl.* III, 34 and 35, III 156-III 172 (1974).
- 60) Jennings, R. B. & Ganote, C. E.: Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury. *Circ. Res. Suppl.* I, 38, 180-191 (1976).
- 61) Jennings, R. B. & Reimer K. A.: Lethal myocardial ischemic injury. *Am. J. Pathol.*, 102, 241-255 (1981).
- 62) Stremmer, E. A., McCart, P., Stanton, W. W., Thibault, W., Dearden, L. S. & Connolly, J. E.: Functional and structural alterations in the myocardium during aortic cross-clamping. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 66, 755-770 (1973).
- 63) Baribrea, J. L., Bullon, A., de la Fuente, A., de la F. Alarcon, A., Farinas, J., Collantes, P., Gil, M., Gombau, M., Morales, R. & Sanchez, F.: Myocardial ultrastructural changes during extracorporeal circulation with anoxic cardiac arrest and its prevention by coronary perfusion. *Thorax*, 30, 371-381 (1975).
- 64) 羽柴 厚: 大動脈遮断下心筋保護法の研究. [I] 実験的研究. *日外会誌.*, 80, 451-465 (1979).
- 65) 羽柴 厚: 大動脈遮断下心筋保護法の研究. [II] 臨床的研究. *日外会誌.*, 80, 557-571 (1979).
- 66) Rainio, P., Sormunen, R., Lepojärvi, M., Nissinen, J., Kaukoranta, P. & Peuhkurinen, K.: Ultrastructural changes during continuous retrograde warm and mild hypothermic blood cardioplegia for coronary bypass operations. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 110, 81-88 (1995).

Fundamental Study of Myocardial Protection with Intermittent Warm Blood Cardioplegia Tamotsu Yasuda, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **105**, 2—16 (1996)

Key words myocardial protection, intermittent warm blood cardioplegia, myocardial oxygen metabolism, myocardial nucleotides, myocardial ultrastructure

Abstract

Continuous warm blood cardioplegia prevents myocardial ischemia, reperfusion injury and side effects of hypothermia, and facilitates good functional recovery. Intermittent warm blood cardioplegia (IWBC) has been proposed for better visualization of the surgical field. However, it may result in warm ischemic injury. This experimental study investigated myocardial oxygen metabolism during IWBC by near infrared spectrophotometry and investigated the safety of IWBC in relation to cardiac function, myocardial nucleotide, and ultrastructure. Fourteen dogs were divided into two groups. During cardiopulmonary bypass (CPB), the hearts received three 5-minute periods of warm blood cardioplegia, interrupted by three 10-minute episodes of ischemia (37°C) in group A (n=7) or three 20-minute episodes of ischemia in group B (n=7). Myocardial tissue oxygen saturation (So₂) and tissue hemoglobin plus myoglobin concentration (Hb+Mb) were measured by near infrared spectrophotometry and revealed dynamic changes during coronary perfusions and interruptions. The time required to reach a plateau level in So₂ and Hb+Mb during the first cardioplegic infusion was significantly longer than that during the second or third infusion in group A. However, the time gradually became prolonged in group B. Cardiac functions evaluated by systolic blood pressure, cardiac index and left ventricular stroke work index showed no change after CPB in group A, but they were aggravated after CPB in group B. Myocardial ATP, ADP and AMP contents were measured, and myocardial ultrastructures were studied in twelve dogs before the first, second, and third cardioplegic infusions and before aortic declamping. Myocardial adenine nucleotides did not significantly change in group A, but the ATP content decreased, and the AMP content increased gradually in group B. Only mild myocardial ultrastructural changes were observed in group A, but cumulative ischemic changes occurred in group B. In conclusion, three 10-minute interruptions of warm blood cardioplegia was safe with regard to cardiac function, myocardial oxygen metabolism, myocardial nucleotides and ultrastructure. However, three 20-minute interruptions of warm blood cardioplegia caused a cumulative ischemic injury. Continuous monitoring of So₂ and Hb+Mb using near infrared spectrophotometry is a promising new technique for investigating myocardial oxygenation and ischemia during warm heart surgery.