

Effects of a Calcium Channel Blocker and an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor on Myocardial Collagen Metabolism in Cardiomyopathic Hamsters

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: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8306

心筋症ハムスターのコラーゲン代謝に及ぼすカルシウム拮抗剤 およびアンジオテンシン変換酵素阻害剤の影響

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

荒 木 勉

(平成4年1月14日受付)

ヒト特発性心筋症のモデル動物である心筋症ハムスターのコラーゲン代謝を明らかにする目的で、コラーゲンに特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリンを定量することによりコラーゲンを量的に、また、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いてI型コラーゲンとIII型コラーゲンの比率(I型/III型比)を求めることによりコラーゲンを質的に評価し、さらに、カルシウム拮抗剤ベラパミルまたはアンジオテンシン変換酵素阻害剤カプトプリルを投与し、これらの薬剤がコラーゲン代謝にどのような影響を及ぼすかについて検討した。5週齢の心筋症ハムスター Bio14.6 にベラパミル 40mg/kg/day またはカプトプリル 20mg/kg/day を20週間経口投与し、25週齢における心筋コラーゲン量・I型/III型比を求め、無投薬 Bio14.6 および正常ハムスター F1b と比較した。まず量的には、無投薬 Bio14.6 において加齢とともに心筋コラーゲン量の著明な増加が認められ、ベラパミルおよびカプトプリル投与によりともにその増加が有意に抑制された。この結果は病理組織学的所見と一致した。次に質的には、F1b においては加齢とともにI型/III型比が増加、すなわちI型コラーゲンが優位となるのに対して、無投薬 Bio14.6 においては逆に加齢とともにI型/III型比が減少、すなわちIII型コラーゲンが優位となる所見が認められた。ベラパミルおよびカプトプリル投与によりともにIII型コラーゲンの比率の増加が抑制され、I型/III型比が正常化する傾向が認められた。以上より、ベラパミルおよびカプトプリルが心筋症ハムスターのコラーゲン代謝を量的にも質的にも改善する可能性が示唆された。その作用機序に関しては、すでに心筋症ハムスターの病因として報告されているカルシウム代謝異常やレニン-アンジオテンシン系を介してのものが推定された。

Key words cardiomyopathic hamster, collagen remodeling, calcium channel blocker, angiotensin converting enzyme inhibitor

心筋の実質細胞である心筋細胞は心筋の全細胞数の約3分の1を占めるに過ぎず、残りの約3分の2は間質細胞、すなわち心筋内冠血管を形成する内皮細胞・平滑筋細胞およびコラーゲンを産生する線維芽細胞などより成る。これらの実質・間質細胞はコラーゲンを主体とした結合組織により結合し、心筋としての構造および機能を維持している。したがって、コラーゲンの量的あるいは質的な変動は心筋の構造および機能に何らかの影響を及ぼすものと考えられており、近年 Weber ら^{1)~4)} が“間質性心疾患”あるいは心筋症に対して“心症 (cardiopathy)”という新しい疾患概念を提唱しているように、心筋における間質、特にコラーゲンの重要性が強調されている。

心筋のコラーゲン代謝に関する研究としては、高血圧のモデル動物を対象とした実験がすでに多数報告されているが、近年ではコラーゲンの量的な変動のみならず質的な変動として、特にI型とIII型を中心とした型別コラーゲンの比率およびその比率に及ぼす各種薬剤の影響が検討されており、“コラーゲン・リモデリング”として注目されている^{5)~7)}。

一方、心筋症ハムスターはヒト特発性心筋症のモデル動物としてあらゆる分野の研究に用いられている^{8)~10)}。このハムス

ターは病期の進行とともに心室に広範な線維化を生じることが知られており、この線維化については特殊染色あるいは電子顕微鏡を用いた病理組織学的な検討が一部なされている¹¹⁾、コラーゲン代謝に関する詳細な報告はいまだなされていない。

著者は、心筋症ハムスターのコラーゲン代謝を明らかにする目的で、コラーゲンに特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリンを定量することによりコラーゲンを量的に、また、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) を用いてI型コラーゲンとIII型コラーゲンの比率(I型/III型比)を求めることによりコラーゲンを質的に評価し、さらに、カルシウム拮抗剤またはアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme, ACE) 阻害剤を投与し、これらの薬剤がコラーゲン代謝にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

材料および方法

1. 実験動物

用いた実験動物は表1に示したように以下の4群である。5

Abbreviations: ACE, angiotensin converting enzyme; C, normal control; Ca, calcium channel blocker; CM, cardiomyopathy; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SHR, spontaneously hypertensive rat

週齢雄性の心筋症ハムスター Bio14.6 (Bio Breeders 社, Boston, U.S.A.) にカルシウム拮抗剤ベラパミル (エーザイ, 東京) 40mg/kg/day (calcium channel blocker 群, Ca 群) または ACE 阻害剤カプトプリル (三共, 東京) 20mg/kg/day (angiotensin converting enzyme inhibitor 群, ACE 群) を20週間経口投与したもの, および無投薬 Bio14.6 (cardiomyopathy 群, CM 群) と正常ハムスター F1b (normal control 群, C 群) である。それぞれの実験群の25週齢における心体重比・心筋コラーゲン量・I 型/III 型比を求めた。

II. 方法

1. コラーゲンの抽出

Table 1. Experimental group

Group	Age (weeks)	Number
C : Normal F1b	5	6
	25	6
CM: Untreated Bio 14.6	5	6
	25	6
Ca : Verapamil-treated Bio 14.6 (40mg/kg/day for 20 weeks)	5	—
	25	6
ACE: Captopril-treated Bio 14.6 (20mg/kg/day for 20 weeks)	5	—
	25	6

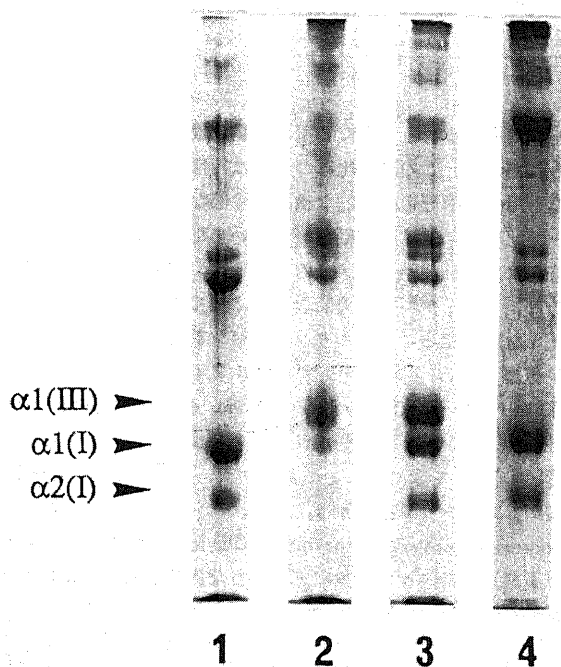


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of pepsin-extracted collagen from the myocardium of the hamster. Lanes 1 and 2 showed the electrophoretic pattern of the standard type I and type III collagen (reduced) from porcine skin for control. Lanes 3 and 4 were those of pepsin-extracted collagen from the myocardium of the hamster which was reduced (lane 3) and not reduced (lane 4). Samples were reduced with 0.1M dithiothreitol.

各群とも体重を測定した後, エーテル麻酔下に心臓を摘出し, 心房・大血管を摘除した後, 心重量を測定した。ハイドロキシプロリン定量用の心筋を一部切除した後, 5mM エチレンジアミン四酢酸と 1M 塩化ナトリウムを含む 0.05M トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 中にて細切・ホモジナイズした。引き続き同緩衝液にて 4℃ 下に24時間洗浄し, 遠心 (3000g, 15分) にて上清を除去した。次に沈殿部分を 0.5M 酢酸にて同様に 4℃ 下に24時間洗浄し, 遠心 (3000g, 15分) にて上清を除去した。この沈殿部分はコラーゲンを含む心筋組織 (湿重量約 1g) で, 次にこれに湿重量の10倍量の 0.5M 酢酸と湿重量の 1/100量のペプシン (Boeringer 社, Ingelheim, Germany) を加え, コラーゲン

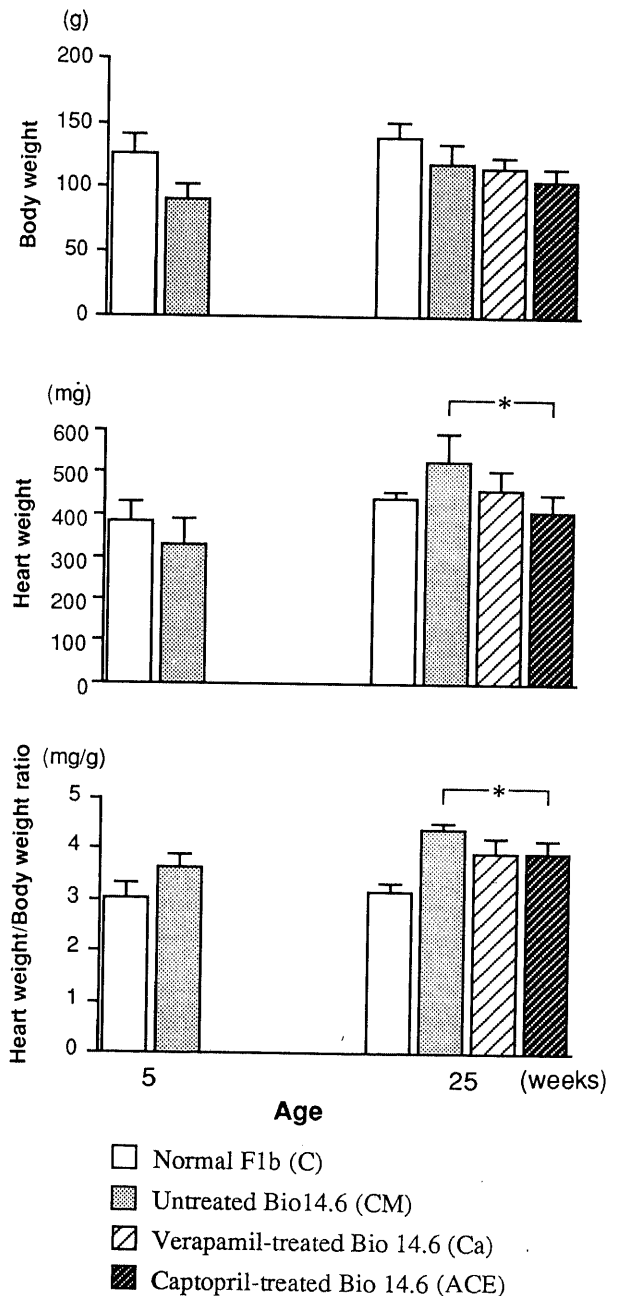


Fig. 2. Effects of verapamil and captopril on body weight, heart weight and heart weight/body weight ratio in cardiomyopathic hamsters. Each bar represents mean±S.D. *, p<0.05.

を抽出した。抽出操作は4℃下に24時間行い、遠心(10000g, 1時間)にて上清を得た。上清中のペプシンを不活性化するために5Nの酸化ナトリウムを加えpHを8とし、室温にて24時間放置すると、コラーゲンはゲル状の沈殿となる。これを遠心(10000g, 1時間)にて集め5mM酢酸に溶解後、以下の方法でSDS-PAGEによりコラーゲンの分析を行った。

2. SDS-PAGEによるI型/III型比の算出

SDS-PAGEはSDS-トリス・グリシン系で5%の泳動用ゲルと3%の濃縮用ゲルの組み合わせを用い、Hayashiら¹²⁾の方法に準じて3M尿素存在下に電気泳動を行った。尿素を含む系を用いることにより、尿素非存在下では同じ移動度を示すα1(I)鎖とα1(III)鎖の分離が得られた(図1)。デンストメーターPDS-15(小西六, 東京)を用いて得られた各バンドのデンストグラム上のピークの面積をプランメーターPLANIX(玉屋, 東京)にて測定し、I型コラーゲンとIII型コラーゲンの相対的な比率であるI型/III型比を算出した。対照としてブタ皮膚から抽出されたI型およびIII型コラーゲン溶液(和光, 大阪)を同時に泳動した。還元剤としては0.1Mジチオスレイトール(和光)を使用した。

3. ハイドロキシプロリンの定量

ハイドロキシプロリンは部分切除した心筋組織に湿重量の100倍量の6Nの塩酸を加え110℃下に24時間加水分解した後、Inayamaら¹³⁾の方法を用いて定量した。すなわち、抽出されたハイドロキシプロリンとエールリッヒ試薬とを反応させ、分光光度計200-20型(日立, 東京)にて560nmにおける吸光度を測定し、既知の濃度のハイドロキシプロリン溶液(和光)を用いて作成した標準曲線から心筋1g当たりのハイドロキシプロリン含量を求めた。さらに、コラーゲンは通常約13.4%のハイドロキシプロリンを含むとする報告¹⁴⁾に基づき、ハイドロキシプロリン含量に7.46をかけることにより心筋1g当たりのコラー

ゲン含量をmg単位で算出した。

4. 病理組織学的検討

病理組織学的な検討を行うために、各群の25週齢における左室心筋の一部を摘出後直ちに10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィン包埋後、厚さ4μmに薄切し、マロリー・アザン染色を施した。この染色により青く染まる結合組織の程度を定性的に評価し、各群で比較した。

5. 統計学的検定

測定値はすべて平均値±標準偏差で示した。各群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析後、Scheffeの多重比較を用いて行い、危険率p<0.05を有意差ありと判定した。

成 績

I. 心体重比(図2)

CM群において心重量は5週齢331±57mgから25週齢529±66mgへと、心体重比は5週齢3.64±0.23mg/gから25週齢4.42±0.11mg/gへと、C群に比し著明な心重量・心体重比の増加が認められた。これに対してACE群においては心重量が412±37mg、心体重比が3.91±0.27mg/gと、CM群において認められた心重量・心体重比の増加が有意に抑制された(p<0.05)。Ca群においても心重量が461±46mg、心体重比が3.95±0.27mg/gと、ともに減少傾向が認められたが、CM群と有意差はなかった。

II. 心筋コラーゲン量(図3)

CM群において単位心筋当たりのコラーゲン量は5週齢3.80±0.52mg/gから25週齢6.14±0.48mg/gへと、C群に比し著明な増加が認められた。これに対してCa群においては4.59±0.85mg/g、ACE群においては4.53±0.48mg/gと、ともにCM群において認められたコラーゲン量の増加が有意に抑制された(p<0.01)。

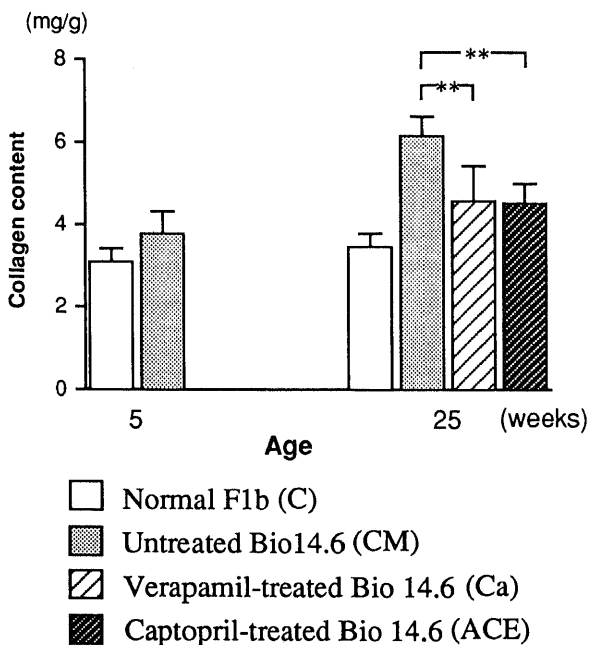


Fig. 3. Effects of verapamil and captopril on the collagen content in cardiomyopathic hamsters. Each bar represents mean±S.D.. ***, p<0.01.

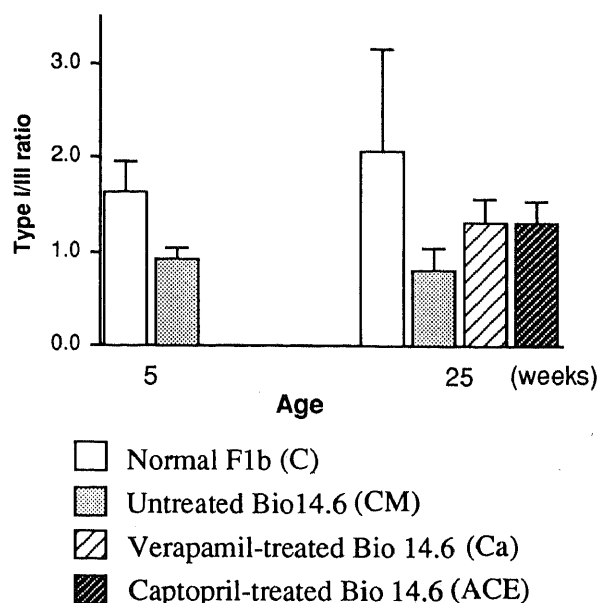


Fig. 4. Effects of verapamil and captopril on the ratio of type I to type III collagen (type I/III ratio) in cardiomyopathic hamsters. Each bar represents mean±S.D..

Ⅲ. I型/Ⅲ型比 (図4)

C群では5週齢 1.62 ± 0.32 から25週齢 2.07 ± 1.08 へと加齢とともにI型/Ⅲ型比が増加, すなわちI型コラーゲンが優位となる傾向が認められた. これに対してCM群では5週齢 0.93 ± 0.11 から25週齢 0.81 ± 0.21 へと, C群とは逆にI型/Ⅲ型比が低下, すなわちⅢ型コラーゲンが優位となる傾向が認められた. Ca群においては 1.30 ± 0.27 , ACE群においては 1.32 ± 0.22 と, ともに有意差は認められなかったが, Ⅲ型コラーゲンの比率の増加が抑制され, I型/Ⅲ型比が正常化する傾向が認められた.

Ⅳ. 病理組織学的所見

各群の25週齢における左室心筋のアザン染色標本写真を図5に示す. CM群 (図5, 上段右) において明らかな結合組織の増加および石灰化が認められたのに対して, Ca群 (図5, 下段左) およびACE群 (図5, 下段右) においては結合組織, 石灰化とも減少し, 組織所見の改善が認められた.

考 察

コラーゲンは, 生化学的には α 鎖と呼ばれる約1000個のアミノ酸残基より成る分子量約10万のポリペプチド鎖3本の3重らせん構造により構成されている. アミノ酸残基はグリシンを中心にプロリン・ヒドロキシプロリンなどで構成されているが, このうちヒドロキシプロリンはコラーゲンに特異的なアミノ酸として数多くの定量法が確立され¹³⁻¹⁵⁾, コラーゲンの量

的な変動の指標として用いられている. またコラーゲンは, α 鎖の一次構造の違いにより, 現在までに少なくとも11の分子種が存在することが知られている. このうち心筋はI・Ⅲ・Ⅳ・Ⅴ・Ⅵ型コラーゲンの5種類が存在するとされているが¹⁶⁻¹⁸⁾, 量的には間質型コラーゲンと呼ばれるI型とⅢ型で90%以上を占めることから⁹⁾, 特にI型とⅢ型を中心とした型別コラーゲンの比率がコラーゲンの質的な変動の指標として注目されている. I型コラーゲンは $\alpha 1(I)$ 鎖2本と $\alpha 2(I)$ 鎖1本より, Ⅲ型コラーゲンは $\alpha 1(Ⅲ)$ 鎖3本より構成されているが, I型とⅢ型の分離にはSDS-PAGEが用いられることが多く, Hayashiら¹⁹⁾は3M尿素存在下にSDS-PAGEを行うことにより, 尿素非存在下では同じ移動度を示す $\alpha 1(I)$ 鎖と $\alpha 1(Ⅲ)$ 鎖が明瞭に分離されたと報告している. 今回著者もHayashiらの方法に準じてSDS-PAGEを行うことにより, 図1のように $\alpha 1(I)$ 鎖と $\alpha 1(Ⅲ)$ 鎖を明瞭に分離することができ, I型/Ⅲ型比をコラーゲンの質的な変動の指標として用いることができた.

一方ヒト肥大型心筋症は, 病理組織学的には心筋細胞の肥大, 錯綜配列と間質の線維化を特徴とし, 病期の進行とともに線維化の増加および心機能の低下が認められる疾患である. この線維化の大部分は前述したコラーゲン線維であり, したがって心筋症の病因あるいは病態の進行にコラーゲン代謝異常が関与している可能性が推定されるが, 十分な検討はまだまだなされていない. 今回対象とした心筋症ハムスター Bio14.6 は常染色

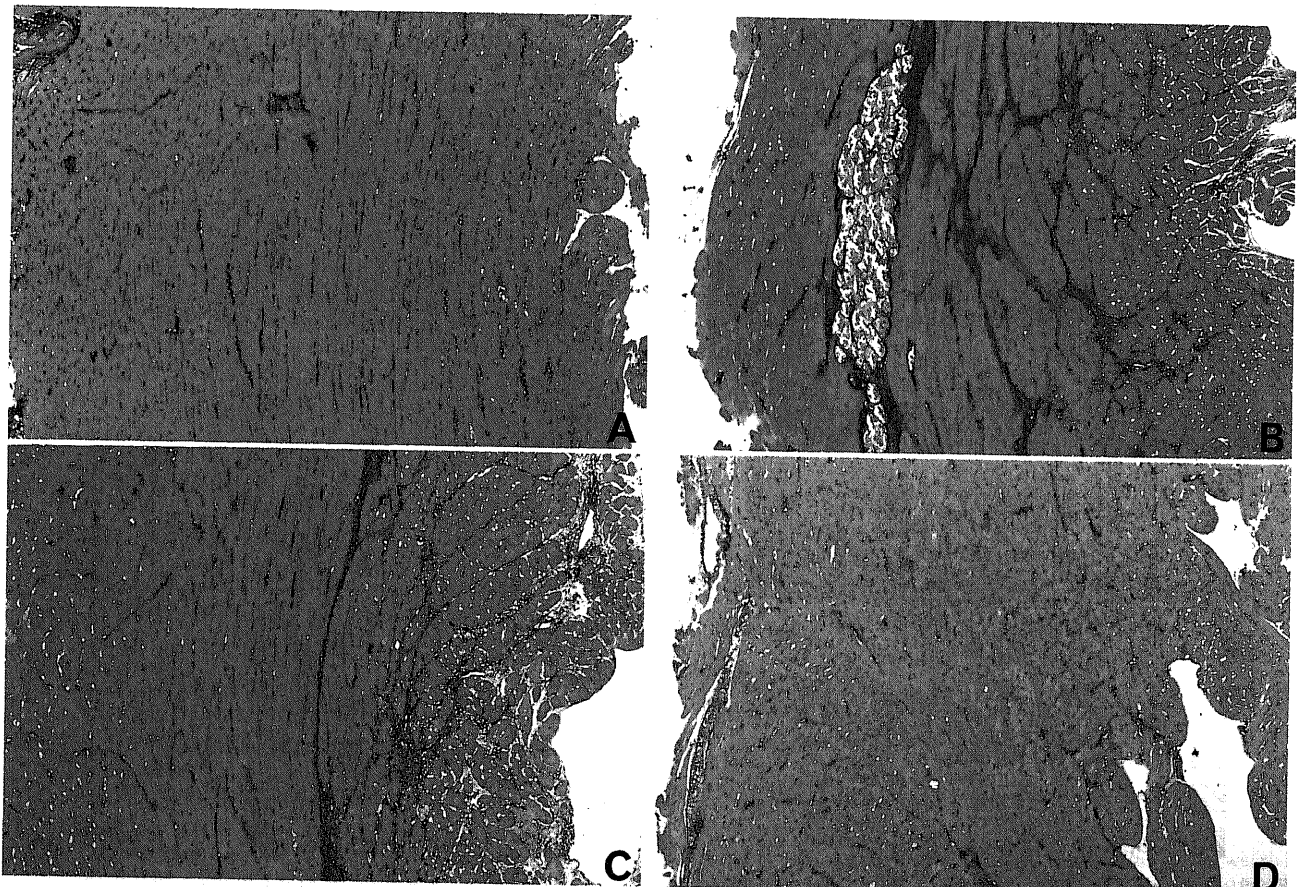


Fig. 5. Histological findings of the myocardium in 25-week-old hamsters. A, Normal F1b (C); B, Untreated Bio14.6 (CM); C, Verapamil-treated Bio14.6 (Ca); D, Captopril-treated Bio14.6 (ACE). (Mallory-Azan stain, original magnification $\times 25$).

体劣性の遺伝形式を示すヒト特発性心筋症のモデル動物であり⁸⁻¹⁰、1) 壊死期 (30~100日齢)、2) 線維化期 (100~160日齢)、3) 肥大・拡張期 (160~200日齢)、4) 不全期 (200~300日齢) と病期が進行するとともに心室に広範な線維化が生じ、慢性進行性心不全にて1年以内に90%以上が死亡するとされている。そこで著者は、このモデル動物を用いて心筋症におけるコラーゲン代謝異常の有無について検討した。その結果、CM群においては加齢とともに心筋コラーゲン量の有意な増加が認められ、また質的には、C群において加齢とともにI型/III型比が増加、すなわちI型コラーゲンが優位となる所見が認められるのに対して、CM群においてはC群とは逆に加齢とともにI型/III型比が減少、すなわちIII型コラーゲンが優位となる所見が認められ、心筋症ハムスターにおけるコラーゲン代謝異常の存在が示された。

心筋症におけるコラーゲン・リモデリングの機序、意義に関しては全く不明であるが、ヒト拡張型心筋症では病理組織学的所見よりIII型コラーゲンの比率が増加していることが報告されており³⁴、このIII型コラーゲンの増加が心筋症の病因あるいは病態の進行に関与している可能性が推定されている。III型コラーゲンはI型コラーゲンに比し、線維が細く、張力も弱いいため断裂しやすいとされており^{19,20}、したがってIII型優位の心筋ではその構造を維持できず、内腔が拡張し、壁が非薄化するとともに心機能が低下することが予想されている³⁴。実際、III型が極端に優位となる銅欠乏ラットにおいては心室瘤や心破裂の発生率が高いと報告されており^{21,22}、また自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat, SHR) においては、心機能が保たれている代償期にはI型が優位であるが、末期で心機能が低下した非代償期にはIII型が優位となると報告されている⁷。ヒト心筋症においても、病期の進行とともに心室腔の拡大・心室壁の非薄化・収縮力の低下などが進展していく機序としてIII型コラーゲンの増加に関与している可能性が推定される。

心筋症ハムスターの病因に関しては、以前より心筋細胞のカルシウム代謝異常²³が指摘されており、特に心筋細胞内のCa²⁺過剰²⁴が重要な因子として注目されている。Katoら²⁵は心筋形質膜におけるNa⁺,K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, Na⁺/Ca²⁺交換機構の低下を報告しており、結果として細胞質内のカルシウム濃度が上昇し、Spallaら²⁶はこれがある種のタンパク分解酵素 (calcium-activated protease) を活性化し、ミオシンを融解するという機序を推定している。一方Factorら^{27,28}は微小冠血管の攣縮が心筋症ハムスターにみられる巣状心筋壊死の原因であると報告している。さらにこれらの病因と関連して、心筋細胞内のCa²⁺過剰の軽減あるいは微小冠血管の攣縮の抑制という機序を介してのカルシウム拮抗剤の有効性を指摘する報告が数多くなされている。Factorら²⁹は50日齢の心筋症ハムスターBio53.58にベラパミル20mg/dayを50・100・200日間経口投与し、250日齢における心筋の壊死率が無投薬群の12.45に対してベラパミル投与群ではそれぞれ5.04・4.61・1.73に低下したと報告している。またKobayashiら³⁰は20日齢の心筋症ハムスターBio14.6にベラパミル5mg/kg/dayを70日間腹腔内投与したところ、無投薬群に比し、90日齢における心筋の壊死率が0.54から0.16へ、線維化率が4.63から0.17へ、石灰化率が1.90から0.09へと組織学的所見の改善が認められたと報告している。以上のように、心筋症ハムスターに対するカルシウム拮抗

剤の有効性に関してはすでに多数の報告がなされているが、カルシウム拮抗剤のコラーゲン代謝に及ぼす影響についてはほとんど検討されていない。

一方、心筋症ハムスターの病因として、近年、レニン-アンジオテンシン系の関与も注目されている。以前より、心筋の局所組織内のレニン-アンジオテンシン系の存在が指摘され³¹、後述するように、肥大心においてこのレニン-アンジオテンシン系と心筋細胞の肥大あるいは間質の線維化との関連が推定されているが、Hirakataら³²が300日齢の心筋症ハムスターBio14.6の左室においてアンジオテンシンIIに対する受容体の親和性が正常ハムスターに比し35%高かったと報告しているように、心筋症ハムスターにおいてもその病因にレニン-アンジオテンシン系が関与している可能性が推定されている。レニン-アンジオテンシン系に関連して、心筋症ハムスターに対するACE阻害剤の有効性が期待されるが、実際に心筋症ハムスターにACE阻害剤を投与した報告は非常に少ない。Katoら³³は5週齢の心筋症ハムスターJ-2-Nにカプトプリル15mg/kg/dayを10週間経口投与し、心電図所見の改善 (QSパターンの消失)、クレアチニンフォスフォキナーゼの増加の抑制 (2231→685mU/ml)、ミオシンアイソザイムパターンの正常化 (V₃優位→V₁優位)、線維化率の低下 (8.0→4.8%) が認められたと報告しているが、ACE阻害剤のコラーゲン代謝に及ぼす影響については検討されていない。そこで次に著者は、心筋症におけるコラーゲン・リモデリングに及ぼすカルシウム拮抗剤とACE阻害剤の影響について検討した。その結果、Ca群・ACE群においてはともにCM群において認められた心筋コラーゲン量の増加が有意に抑制され、また質的には、III型コラーゲンの比率の増加が抑制され、I型/III型比が正常化する傾向が認められた。すなわち、ベラパミルおよびカプトプリルが心筋症ハムスターにおけるコラーゲン代謝を量的にも質的にも改善する可能性のあることが示された。

心筋のコラーゲン代謝に関しては、近年、主に肥大心において、コラーゲンの量的な変動のみならず質的な変動として、特にI型とIII型を中心とした型別コラーゲンの比率およびその比率に及ぼす各種薬剤の影響が検討されている。Motzら³⁴は、20週齢のSHRにカルシウム拮抗剤ニフェジピン30mg/kg/dayを20週間経口投与し、40週齢における左室体重比およびハイドロキシプロリン含量を求めたところ、ニフェジピン非投与群の2.34mg/gおよび2.92mg/gに比し、投与群において2.13mg/gおよび2.66mg/gと有意に減少したと報告している。またMukherjeeら⁷は、10週齢のSHRにカプトプリル50mg/kg/dayを6週間経口投与し、コラーゲン代謝に及ぼす影響について検討しているが、ハイドロキシプロリンの定量より求めた単位心筋当たりのコラーゲン量は、カプトプリル非投与群の4.49mg/gに対して投与群では4.37mg/gと有意差はないものの減少傾向を示し、一方SDS-PAGEより求めたI型/III型比は、カプトプリル非投与群の10.31に対して投与群では7.06と正常化したと、今回の実験結果と同様の結果を報告しており、カプトプリルは量的のみならず質的にもコラーゲン代謝を改善する可能性が期待できると結論している。さらにBrillaら³⁵は、腎動脈結紮あるいはアルドステロン持続投与により作成した高血圧ラットに抗アルドステロン剤であるスピロノラクトンを投与し、左室体重比・線維化率・ハイドロキシプロリン含量が有意に減少したと報告している。

以上のように、肥大心において、カルシウム拮抗剤・ACE阻害剤・抗アルドステロン剤などの薬剤に間質の線維化を抑制する作用(抗線維化作用)のあることが報告されているが、近年、その作用機序の可能性の一つとして、肥大心における間質の線維化とレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の関連が注目を集めている。以前より、心筋の局所組織内のレニン-アンジオテンシン系の存在が指摘されており³⁾、特にアンジオテンシンⅡは末梢動脈を収縮し後負荷を増大させるとともに心筋の収縮力を増大させ、血圧を上昇させることにより間接的に、また、心筋の蛋白合成を促進させることにより直接的に心筋細胞の肥大に関与していると推定されているが、近年では、アンジオテンシンⅡあるいはアルドステロンが心筋細胞の肥大だけでなく間質の線維化にも関与しているのではないかと推定されている。すなわち Weber⁴⁾は、アンジオテンシンⅡあるいはアルドステロンが心筋の間質に存在する線維芽細胞の膜表面あるいは細胞質内の受容体に結合し、細胞内のセカンドメッセンジャーであるカルシウムイオンを介して、あるいは核内の DNA に直接作用して、線維芽細胞の増殖あるいはコラーゲン合成を促進し、間質の線維化を増加させると推定しており、カルシウムチャンネルをブロックするカルシウム拮抗剤、アンジオテンシンⅠからアンジオテンシンⅡへの変換を阻害する ACE 阻害剤、アルドステロンと受容体を競合する抗アルドステロン剤など各々の薬剤の抗線維化作用の機序を説明している。

今回対象とした心筋症ハムスターは心室に広範な線維化を生じることが知られているにもかかわらず、その線維化の成因は明らかでない。しかしすでに述べたように、病因としてレニン-アンジオテンシン系の関与が推定されており、心筋症ハムスターにおいても肥大心と同様の機序を介して線維化が生じている可能性があり、したがってカルシウム拮抗剤や ACE 阻害剤に抗線維化作用のあることが期待される。

今回の実験結果より、心筋症ハムスターにおいて病期の進行とともにコラーゲンが量的に増加し、質的にはⅢ型コラーゲンの比率が増加することが示された。また、ベラパミルおよびカプトプリルがコラーゲンの増加、特にⅢ型コラーゲンの比率の増加を抑制することが示され、これらの薬剤が心筋症ハムスターにおけるコラーゲン代謝を量的にも質的にも改善する可能性が推定された。その作用機序に関しては詳細は不明であるが、心筋症ハムスターの病因としてすでに報告されているカルシウム代謝異常やレニン-アンジオテンシン系を介してのものが推定された。

結 論

心筋症ハムスター Bio14.6 におけるコラーゲン代謝を明らかにする目的で、コラーゲンに特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリンを定量することによりコラーゲンを量的に、また、SDS-PAGE を用いてⅠ型コラーゲンとⅢ型コラーゲンの比率であるⅠ型/Ⅲ型比を求めることによりコラーゲンを質的に評価し、さらに、カルシウム拮抗剤ベラパミルまたは ACE 阻害剤カプトプリルを投与し、これらの薬剤がコラーゲン代謝にどのような影響を及ぼすかについて検討し、以下の結論を得た。

1. 心筋症ハムスターにおいて加齢とともに心筋コラーゲン量の著明な増加が認められ、ベラパミルおよびカプトプリル投

与によりともにその増加が有意に抑制された。この結果は病理組織学的所見と一致した。

2. 正常ハムスターにおいては加齢とともにⅠ型/Ⅲ型比が増加、すなわちⅠ型コラーゲンが優位となるのに対して、心筋症ハムスターにおいては逆に加齢とともにⅠ型/Ⅲ型比が減少、すなわちⅢ型コラーゲンが優位となる所見が認められた。ベラパミルおよびカプトプリル投与によりともにⅢ型コラーゲンの比率の増加が抑制され、Ⅰ型/Ⅲ型比が正常化する傾向が認められた。

これらの結果から、ベラパミルおよびカプトプリルが心筋症ハムスターのコラーゲン代謝を量的にも質的にも改善する可能性のあることが示唆された。その作用機序に関しては、すでに心筋症ハムスターの病因として報告されているカルシウム代謝異常やレニン-アンジオテンシン系を介してのものが推定された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導頂きました清水賢巳講師、杉原範彦助手に深く感謝し、本研究の遂行に際し多大なる御協力を頂きました金沢大学医学部第二内科第四研究室の各位に感謝致します。さらに、コラーゲンの解析に関して御指導を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室の岡田仁克講師に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、日本循環器学会第86回東海・第71回北陸合同地方会、第14回心筋代謝研究会において発表した。

文 献

- 1) Weber, K. T. & Brilla, C. G.: Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*, 83, 1849-1865 (1991).
- 2) Eghbali, M. & Weber, K. T.: Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol. Cell. Biochem.*, 96, 1-14 (1990).
- 3) Weber, K. T.: Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 13, 1637-1652 (1989).
- 4) Weber, K. T., Pick, R., Janicki, J. S., Gadodia, G. & Lakier, J. B.: Inadequate collagen tethers in dilated cardiopathy. *Am. Heart J.*, 116, 1641-1646 (1988).
- 5) Weber, K. T., Janicki, J. S., Shroff, S. G., Pick, R., Chen, R. M. & Bashey, R. I.: Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ. Res.*, 62, 757-765 (1988).
- 6) Iimoto, D. S., Covell, J. W. & Harper, E.: Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circ. Res.*, 63, 399-408 (1988).
- 7) Mukherjee, D. & Sen, S.: Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, 67, 1474-1480 (1990).
- 8) Bajusz, E.: Hereditary cardiomyopathy: A new disease model. *Am. Heart J.*, 77, 686-696 (1969).
- 9) Gertz, E. W.: Cardiomyopathic Syrian hamster: A

- possible model of human disease. *Prog. Exp. Tumor Res.*, **16**, 242-260 (1972).
- 10) 加藤光敏, 永野 允: 心筋症の実験モデルと研究の動向. *日本臨床*, **49**, 239-245 (1991).
- 11) Cohen-Gould, L., Robinson, T. F. & Factor, S. T.: Intrinsic connective tissue abnormalities in the heart muscle of cardiomyopathic Syrian hamsters. *Am. J. Pathol.*, **127**, 327-334 (1987).
- 12) Hayashi, T. & Nagai, Y.: Separation of the α chains of type I and III collagens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.*, **86**, 453-459 (1979).
- 13) Inayama, S., Shibata, T., Ohtsuki, J. & Saito, S.: A new microanalytical method for determination of hydroxyproline in connective tissues. *Keio J. Med.*, **27**, 43-46 (1978).
- 14) Henneman, D. H. & Nichols, G.: Technique for the study of hormone effect on collagens. *In* B. W. D'Malley & J. G. Hardman (eds.), *Methods in Enzymology*, vol 40, 1st ed. p367-369, Academic Press Inc., New York, 1975.
- 15) Kivirikko, K. I., Laitinen, O. & Prockop, D. J.: Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.*, **19**, 249-255 (1967).
- 16) McLain, P. E.: Characterization of cardiac muscle collagen. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2303-2311 (1974).
- 17) Borg, T. K., Gay, R. E. & Johnson, L. D.: Changes in the distribution of fibronectin and collagen during developmental rat heart. *Collagen Relat. Res.*, **2**, 211-218 (1982).
- 18) Adomian, G. E.: Existence of type VI collagen in the extracellular network surrounding myocytes in the newborn and adult human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **17**, 15 (1985).
- 19) Fleischmajer, R., Timpl, R., Tuderman, L., Raisher, L., Wiestner, M., Perlsh, J. S. & Graves, P. N.: Ultrastructural identification of extension aminopeptides of type I and III collagens in human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 7360-7364 (1981).
- 20) Miller, E. J.: Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens. *Mol. Cell. Biochem.*, **130**, 165-192 (1975).
- 21) Dawson, R., Milne, G. & Williams, R. B.: Changes in the collagen of rat heart in copper-deficiency-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.*, **16**, 559-565 (1982).
- 22) Borg, T. K., Klevay, L. M., Gay, R. E., Siegel, R. & Bergin, M. E.: Alteration of the connective tissue network of striated muscle in copper deficient rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **17**, 1173-1183 (1985).
- 23) Lossnitzer, K., Janke, J., Hein, B., Stauch, M. & Fleckenstein, A.: Disturbed myocardial calcium metabolism: A possible pathogenetic factor in the hereditary cardiomyopathy of the Syrian hamster. *In* A. Fleckenstein & G. Rona (eds.), *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*, vol. 6, 1st ed. p207-217, University Park Press, Baltimore, 1975.
- 24) Wiederhold, K. F. & Nilius, B.: Increased sensitivity of ventricular myocardium to intracellular calcium-overload in Syrian cardiomyopathic hamster. *Biomed. Biochim. Acta*, **45**, 1333-1337 (1986).
- 25) Kato, M., Nagai, M. & Nagano, M.: Perturbation of calcium transport system of cardiomyopathic Syrian hamster. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **21** (suppl. 2), 82 (1989).
- 26) Spalla, M., Kuo, T. H. & Wiener, J.: Calcium-activated protease in hamster cardiomyopathy. *Muscle Nerve*, **10**, 54-59 (1987).
- 27) Factor, S. M., Minase, T., Cho, S., Dominitz, R. & Sonnenblick, E. H.: Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: A preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation*, **66**, 342-354 (1982).
- 28) Sonnenblick, E. H., Fein, F., Capasso, J. M. & Factor, S. M.: Microvascular spasm as a cause of cardiomyopathies and the calcium-blocking agent verapamil as potential primary therapy. *Am. J. Cardiol.*, **55**, 179B-184B (1985).
- 29) Factor, S. M., Cho, S., Scheuer, J., Sonnenblick, E. H. & Malhotra, A.: Prevention of hereditary cardiomyopathy in the Syrian hamster with chronic verapamil therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **12**, 1599-1604 (1988).
- 30) Kobayashi, A., Yamashita, T., Kaneko, M., Nishiyama, T., Hayashi, H. & Yamazaki, N.: Effects of verapamil on experimental cardiomyopathy in the Bio 14.6 Syrian hamster. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **10**, 1128-1134 (1987).
- 31) Dzau, V. J.: Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects. *Am. J. Med.*, **84** (suppl. 3A), 22-27 (1988).
- 32) Hirakata, H., Fouad-Tarazi, F. M., Bumpus, F. M., Khosla, M., Healy, B., Husain, A., Urata, H. & Kumagai, H.: Angiotensins and the failing heart. Enhanced positive inotropic response to angiotensin I in cardiomyopathic hamster heart in the presence of captopril. *Circ. Res.*, **66**, 891-899 (1990).
- 33) Kato, M., Takeda, N., Takeda, A., Ohkubo, T., Nagai, M. & Nagano, M.: Inhibitory effects of captopril on the onset of cardiomyopathy in cardiomyopathic hamsters. *In* B. Korecky & N. S. Dhalla (eds.), *Subcellular Basis of Contractile Failure*, 1st ed. p193-208, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1990.
- 34) Motz, W. & Strauer, B. E.: Left ventricular function and collagen content after regression of hypertensive hypertrophy. *Hypertension*, **13**, 43-50 (1989).
- 35) Brilla, C. G. & Weber, K. T.: Prevention of myocardial fibrosis in hypertension: role of fibroblast corticoid receptors and spironolactone. *FASEB*, **5**, A1256 (1991).

Effects of a Calcium Channel Blocker and an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor on Myocardial Collagen Metabolism in Cardiomyopathic Hamsters Tsutomu Araki, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **101**, 155—162 (1992)

Key words cardiomyopathic hamster, collagen remodeling, calcium channel blocker, angiotensin converting enzyme inhibitor

Abstract

To clarify myocardial collagen metabolism in the cardiomyopathic hamster, which is an animal model of human cardiomyopathy, the collagen content was measured by determining the hydroxyproline content within the myocardium, and the ratio of type I to type III collagen (type I/III ratio) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Also studied were the effects of the calcium channel blocker verapamil and the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on the collagen content and type I/III ratio. Five-week-old Bio 14.6 cardiomyopathic hamsters were treated with verapamil (40 mg/kg/day) or captopril (20 mg/kg/day) in drinking water for 20 weeks, and the collagen content and type I/III ratio at 25 weeks were compared with those in 25-week-old untreated Bio 14.6 and normal hamster Flb. Quantitatively, there was a marked increase in the collagen content with ageing in the untreated Bio 14.6, while verapamil or captopril treatment significantly reduced the collagen content. Qualitatively, in Flb, there was an increase in the type I/III ratio: type I collagen became dominant. Conversely, in the untreated Bio 14.6, there was a decrease in the type I/III ratio in that type III collagen became dominant, with ageing. Verapamil or captopril treatment tended to retard the increase in the ratio of type III collagen and normalize the type I/III ratio. These results suggest that verapamil and captopril may improve myocardial collagen metabolism in the cardiomyopathic hamster not only quantitatively but also qualitatively, and that the mechanism of this improvement may be related to myocardial calcium metabolism and the cardiac renin angiotensin system.