

実験的心筋梗塞の心筋酵素変動に関する研究-1-Isoprotenolによるラット虚血心による検討

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: 川崎, 英 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8750

実験的心筋梗塞の心筋内酵素変動に関する研究

第1報 Isoproterenol によるラット虚血心による検討

金沢大学医学部第二内科 (主任: 竹田亮祐教授)

川 崎 英

(昭和53年10月30日受付)

1954年, Wroblewski¹⁾らにより急性心筋梗塞症において血清 GOT の変動が報告されて以来, 血清酵素の測定は急性心筋梗塞症の診断には不可欠なものとなったが, 臓器特異性に欠けるため, 鑑別診断に困難をきたすことが少なくなかった. この欠点を補い, 血清酵素の診断的価値を非常に高めたものにアイソザイム分画測定の臨床応用があり, 特に血清 LDH アイソザイム, CPK アイソザイム分画の評価は有力な情報を提供するものとして広く応用されている²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾. 著者も従来より急性心筋梗塞時の血清酵素 GOT, CPK, LDH, 血清 LDH アイソザイムの消長を検討し, 心筋に特異的な LDH アイソザイム 1 分画が梗塞後, 血中にピークに達した後の減衰過程は mono-exponential でなく, di-exponential であることを認め, 梗塞心筋内での酵素変動は単純な壊死心筋からの逸脱のみでなく, 周囲の非壊死心筋からの酵素の産生, 逸脱の増加, および体内での消失, 排泄機序が複雑に関係していることを示唆したが⁶⁾, この壊死心筋よりの酵素逸脱の複雑な機構の一端を解明することを目的として, ラットを用いて急性心筋壊死を作製し, その心筋内逸脱酵素変動の動態を観察した.

(F3~6), 24時間(F24), Provocation 後 3~12 時間(S3~12), 24時間(S24), 48~72 時間(S48~72), 192時間(S192)と経時的に瀉血致死させ, 外見および剖面からの観察で心尖部に局限して, 梗塞様変化を示している心筋を各時間ごとに 5~7 個選り, 心基部の健常部, 心尖部の壊死部および心基部と心尖部との間の中間部, すなわち比較的虚血部に三分割し, 心筋 LDH, LDH アイソザイムおよび CPK を測定した. なお血清は各時間ごとに瀉血採血したサンプルのうち溶血のない血清を当量宛混合し, 各時点 1 本として測定した.

心筋酵素の測定

経時的に採取分割した心筋をそれぞれ水水中で 30 倍の pH7.4 磷酸緩衝液を用いて, 定量的に homogenize し, 4,000r.p.m. 30 分, 0°C にて冷凍遠心後その上清について表 1 の如き, Wroblewski, Radue⁷⁾⁸⁾の UV 法の変法により LDH を測定した. LDH アイソザイムの測定は表 2 の如く, Wieme⁹⁾の吉田・北村らの変法による冷却寒天電気泳動法により行なった²⁾³⁾¹⁰⁾. CPK は表 3 の如き Oliver¹¹⁾の UV 法の変法により測定した.

実験方法

ラット虚血心の作製

250~300 gr. の雄性ラット 100 匹に Rona の方法に準じて Isoproterenol hydrochloride 10mg/kg, 皮下注射し, 24 時間後, 再び同量薬物注射による provocation をおこない虚血心筋を作製した. このラットを初回注射前 (Control), 初回注射後 3~6 時間

結 果

1) 心筋 LDH の変動

図 1 はラットの心筋内 LDH の時間的推移を示す. 健常部 LDH は初回注射後 3~6 時間より, provocation 後 192 時間まで S3~12 時間を除き, ほぼ一定した値を示した. S3~12 時間では一過性の上昇を示し, provocation 前の健常部に比し有意の

Studies on enzyme alterations of heart muscle following experimental myocardial infarction. I. Studies on enzyme alterations of heart muscle following myocardial infarction of isoproterenol-injected rats with reference to LDH, CPK, and LDH-isozymes. **Kawasaki Suguru**, Department of Internal Medicine (II), (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University.

Table 1. Method for Determining LDH in Heart Muscle and Serum

Heart Muscle, about 0.5g
↓
Homogenate pH 7.4 Phosphate Buffer ×30
↓
4,000 r. p. m., 0°C., 30 min. Supernatant ×100 (or Serum) 0.1 ml + 3 ml Reagent: 50 mM Phosphate Buffer pH 7.4, 0.6 mM Pyruvate, 0.18 mM NADH
↓
366 mμ, 25°C. Δ E366/min. /μg. ml/3: Heart Muscle Δ E366/min.: Serum

Table 2. Method for Analysis of Lactate Dehydrogenase Isozyme

Agar gel electrophoresis
1. Supporting medium:
agar (Special Agar Noble) 0.8g
Barbital Buffer (pH 8.4) 100ml
(5,5-Diethylbarbituric Acid 8.5g/L, 1N-HCl 11.5ml/L)
2. Electrophoresis:
5.6 mA/cm, (60 mA, 100 V) 60 min. 10-14°C.

Detection of enzyme activity

1. Reagent:

A: Tris-HCl Buffer (pH 7.4) 56ml,
(Tris 7.2g/L, 1N-HCl 50ml/L)
KCN 5ml (KCN 0.4g in Tris-HCl
Buffer 100ml), 2M-Sodium Lactate 4ml
(Sodium Lactate 30ml in Water 70ml),
PMS 5ml
(PMS 20mg in Tris-HCl Buffer 100ml)
Stored at -20°C.

Add immediately before use:

NAD 40mg, NBT 30mg/70ml of A.

2. Incubation:

37°C., 60 min.

上昇 ($P < 0.01$) を認めた。これに対し壊死部 LDH は F3 ~ 6 時間より健常部に比し低下し、時間経過と共にその傾向は明瞭となり、provocation 後 S24 時間で最低値となり、S48 ~ 72 時間、S192 時間では旧に復する傾向を示した。また S3 ~ 12 時間より S48 ~ 72 時間にいたるまでは健常部との間に有意の低下 ($P < 0.01$) を認めた。中間部の比較的虚血部 LDH はほぼ健常部と同様の動きを示し、S3 ~ 12 時間を

Table 3. Method for Determining CPK in Heart Muscle and Serum

Heart Muscle, about 0.5g
↓
Homogenate pH 7.4 Phosphate Buffer ×30
↓
4,000 r. p. m. 0°C. 30 min. Supernatant ×100 (or Serum) 0.1 ml + 3 ml Reagent: 0.1 M Triethanolamine Buffer pH 7.0, 20 mM Glucose, 10 mM AMP, 0.6 mM NADP, 35 mM Creatine Phosphate, HK-50 μg. G-6-PDH-25 μg, 9.0 mM Glutathione
↓
366 mμ, 25°C. Δ E366/min. /μg. ml/3: Heart Muscle Δ E366/min.: Serum

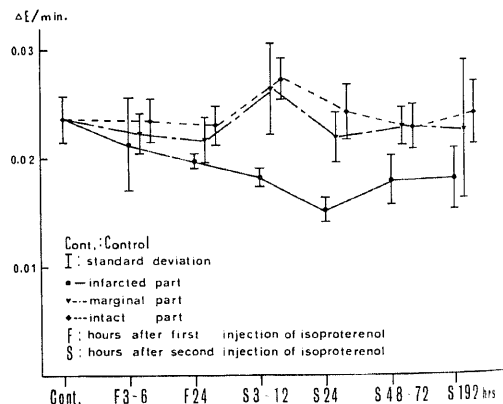


Fig. 1. Serial alterations of LDH in heart muscle of isoproterenol-injected rats.

除き、ほぼ一定した値を示した。S3～12時間では一過性の上昇をみた。

2) 心筋LDHアイソザイムの変動

図2はラット心筋LDHアイソザイム分画の百分率中、1分画(LDH1)とV分画(LDH5)の時間的推移を示す。まづ健常部のLDH1は初回注射では殆んど変化なかったが、provocation後3～12時間から軽度の減少を示し、provocation前の健常部に比し、S24時間、S48～72時間で有意に減少し(P<0.01)。S192時間では再び旧に復する傾向を示した。これに対し壊死部のLDH1は初回注射では健常部と同様の変動を示したが、provocation後の減少は健常部に比べより著明であり、S24時間、S48～72時間では健常部に比し有意の減少(P<0.01)を示した後、S192時間では健常部と同様旧に復する傾向を示した。また比較的虚血部のLDH1は初回注射ではF24時間で健常部や壊死部より若干増加したが有意ではなかった。このLDH1の変動に対し、LDH5は健常部、壊死部、比較的虚血部共に、LDH1とほぼ鏡像的变化を示した。健常部のLDH5は、LDH1と同様F3～6時間、F24時間では殆んど変動せず、provocation後増加しはじめ、provocation前の健常部に比し、S24時間、S48～72時間で有意に増加し(P<0.01)S192時間で旧に復している。壊死部のLDH5はLDH1と同様に初回注射後は変動を示さずprovocation後増加しS3～12時間、S24時間、

S48～72時間ではいずれも健常部に比して有意の増加(P<0.01)を示し、S192時間では健常部と同様に旧に復する傾向を示した。比較的虚血部のLDH5も初回注射後は変動を示さず、provocation後増加しはじめ、S24時間で最大値を示すが、その増加は壊死部ほど著明ではなく、S192時間では旧に復する傾向を示した。以上の如く、Isoproterenol注射ラット心筋の壊死部ではLDH総活性値が減少すると共にアイソザイム分析では明瞭なLDH1の減少とLDH5の上昇が認められたが、肉眼的、光顕的健常部でLDH総活性値にはあまり変動がなかったものでもLDH1減少とLDH5上昇が軽度ながら認められた。このLDHアイソザイム1、V分画の変動はLDH総活性値の変動に重層して動いているため、各分画を絶対値として把握することを目的として(LDHアイソザイム1、V分画%)×(LDH総活性値)、即ちLDH1、LDH5相対活性値に換算し表現すると、図3に示す如く壊死部のLDH5相対活性値は健常部に比してS3～12時間、S24時間、S48～72時間において有意に上昇しており(P<0.01)。このLDH5の変動はLDH1の減少による百分率上の見かけの変化でないことが示された。

3) 血清LDHおよび血清LDHアイソザイム1分画の変動

Abbreviation
Cont.: Control
I: standard deviation
● - infarcted part
▼ - marginal part
◆ - intact part
F: hours after first injection of isoproterenol
S: hours after second injection of isoproterenol

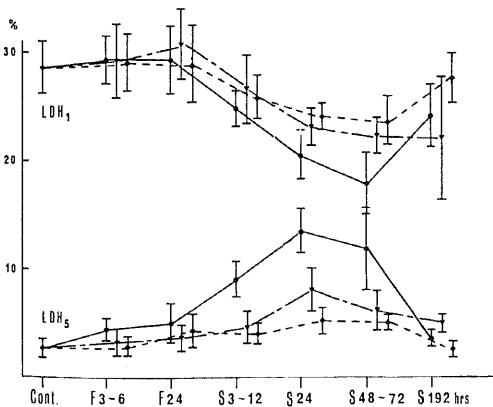


Fig. 2. Serial alterations of LDH₁ and LDH₅ fraction in heart muscle of isoproterenol-injected rats.

Abbreviation
Cont.: Control
I: standard deviation
● - infarcted part
▼ - marginal part
◆ - intact part
F: hours after first injection of isoproterenol
S: hours after second injection of isoproterenol

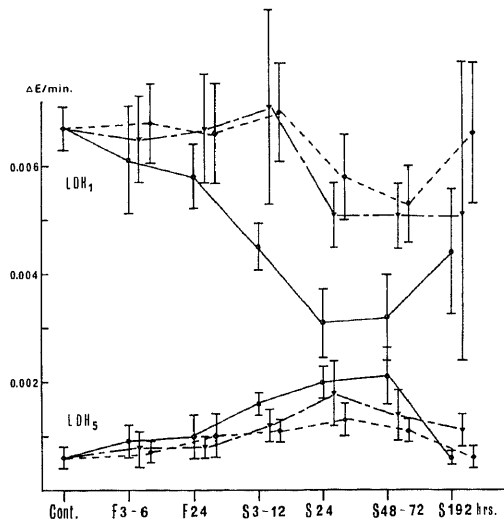


Fig. 3. Serial alterations of LDH₁ and LDH₅ fraction in heart muscle of isoproterenol-injected rats.

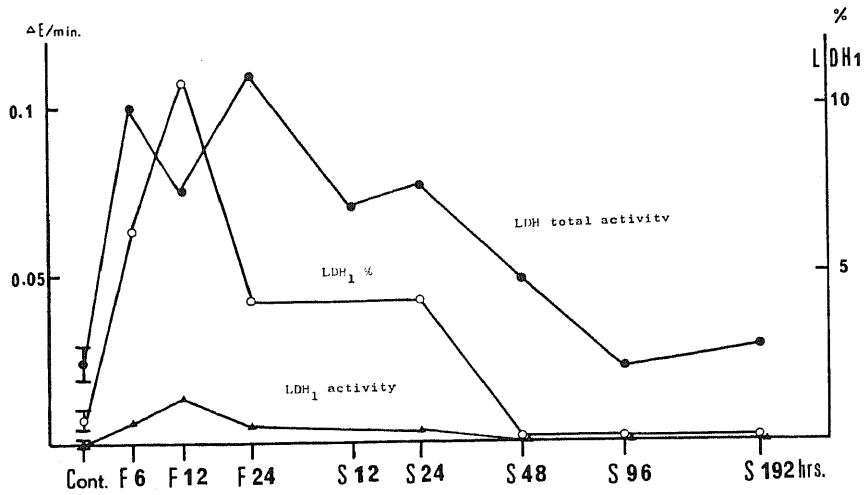


Fig. 4. Serial alterations of LDH and their isozyme fraction in heart muscle and serum of isoproterenol-injected rats.

図4はラット血清LDHおよび血清LDHアイソザイム1分画の経時的変動を示したものである。Isoproterenolは全身の影響の強い薬剤であるため、血清LDH中の心筋由来成分は一部にすぎないと思われるが、F24時間で最大となり、以後減少の傾向を示した。またIsoproterenol注射という条件下であっても臓器特異性の高いと思われる血清LDH1は初回注射後6時間からすでに上昇を示し、F12時間で10.6%と最高を示し、以後漸減してS48時間ではすでに正常ラット血清と同様に1%以下しか検出されなかった。この血清LDH1と心筋LDH1の変動を比較すると、初回注射のみでは心筋LDH1は減少の傾向を示すのとどまるのに対し、血清LDH1は著明な上昇を示し、provocationにより血清LDH1は殆んど変動しないのに対し、心筋LDH1は著明に減少するという相異を示した。

4) 心筋CPKの変動

図5はラットの心筋内CPKの経時的変動をみたものである。LDHと同様健常部ではほぼ一定の値をとり、F3~6時間より、provocation後192時間までprovocation前の健常部に比し有意の変動を示さなかった。これに対し壊死部のCPKの傾向は健常部に比しF3~6時間より低下し、時間と共に明瞭となりLDHと同様provocation後24時間で最低値となった。その後S48~72時間、S192時間で旧に復する傾向を示した。また壊死部CPKは、S3~12時間からS48~72時間にいたるまでは健常部に比し有意の低下($P < 0.01$)を示した。中間部の比較的虚血部

Abbreviation

- Cont.: Control
- I: standard deviation
- : infarcted part
- : marginal part
- : intact part
- F: hours after first injection of isoproterenol
- S: hours after second injection of isoproterenol

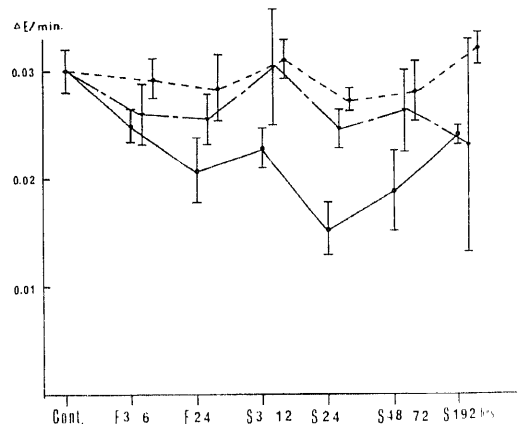


Fig. 5. Serial alterations of CPK in heart muscle of isoproterenol-injected rats.

CPKはS3~12時間で一過性の上昇を示す以外ほぼ一定した値をとった。

考 按

1) 心筋LDHおよびCPKの変動

Catecholamine投与により心筋に壊死がおり、これが組織学的に心筋梗塞と類似の所見を示すことはRonaら^{12)~15)}により報告されている。RonaはIsoproterenolの投与量と心筋壊死の程度との間に

は密接な関係があり、極めて高頻度に心筋壊死が生ずることをみている。一方、Handforth¹⁶⁾は冠血管系の変化に注目し、Isoproterenol 投与により著しく冠循環が障害されることを認め、これは低血圧による hypoxia 及び同時におこる心筋線維の酸素需要の増大によるためであるとしている。Raab¹⁷⁾¹⁸⁾らも同様、上記の障害は心筋の hypoxia に起因することを認めている。今回著者は Isoproterenol 注射によるラット虚血心の実験で、壊死部心筋内の酵素が著明に減少することをみたが、この心筋内酵素の経時的減衰過程を検討した結果、臨床酵素学上、血中上昇が最も遅く、消失も遅いとされている LDH³⁾⁴⁾、一方血中上昇が最も早く、消失も極めて早いとされる CPK³⁾⁴⁾ が共にほぼ平行した変動を示すことが明らかにされた。

Wenzel¹⁹⁾は Isoproterenol 100mg/kg、注射によるラット梗塞様心筋の心筋 LDH は、48 時間後で最低値となり 4 日で旧に復するとの成績を示し、この心筋 LDH の減少は血中への逸脱であり、その証拠として同時に心筋 LDH1 の減少が認められること、および梗塞後の血中 LDH1 は上昇するという文献的事実をあげている。今回の実験では Isoproterenol 10mg/kg、2 回注射であり、Wenzel らの方法とは若干異なるが provocation 後 24 時間、初回注射より 48 時間で最低を示した後旧に復する傾向を示した。また Wexler²⁰⁾はラットに Isoproterenol 500mg/kg を皮下注射し 24 時間後同量の薬剤負荷を行ない梗塞様心を作製し、血清 CPK の経時変化と心筋壊死を対比、2 回注射では 5～6 時間で血中の CPK は最高に達するとしている。心筋壊死による心筋酵素の血中逸脱の報告は多く¹⁵⁾²¹⁻²⁴⁾、梗塞後 4～6 時間で酵素上昇がおこり、9～24 時間で最高値に達するとするものが大部分である。また日常臨床の成績からも梗塞後の血清酵素の上昇は 24～36 時間で最高に達するとされている。前述した如く、Isoproterenol 注射ラット虚血心において心筋と血中 LDH¹⁾⁹⁾、CPK²⁰⁾ の変動を検討した報告はあるが、今回の実験の如く心筋梗塞後血中における経時的過程が異なる LDH と CPK の心筋内酵素変動を同時に観察し得た成績はみあたらない。著者の成績から虚血による酵素の逸脱は血中消失の遅い LDH も、比較的消失の速い CPK もほぼ同様に起こり、血中消失過程の遅速に関係のないものと推定される。

2) 心筋 LDH および LDH1 と血清 LDH1 との関係
梗塞時の血清 LDH1 の上昇が心筋からの逸脱によることは上記の如くであるが、今回の成績から Isoproterenol 注射ラット虚血心では、心筋 LDH の

減少は血清 LDH1 の上昇を伴うが、その上昇極期は初回注射後 24 時間であり、心筋 LDH との間に時間的ズレが認められた。また心筋 LDH1 と対比した場合にも心筋 LDH1 は、血清 LDH1 が最高値を示す時期では殆んど減少せず、血清 LDH1 が消失して以後はじめて酵素逸脱では証明し得ないような最低値を示した。また今回正常ラット血清 LDH アイソザイムを測定したが血清 LDH1 は検出されず⁴⁾⁶⁾²⁵⁾殆んど存在しないのではないかと思われる。血清中に増加した LDH1 は心筋由来によるものが主たる役割を果たしていると考えられる。従って虚血心筋では酵素の逸脱と同時に心筋内での能動的な酵素変動という修飾をうけるものと推定された。

3) LDH アイソザイム分画の変動

心筋からの酵素の逸脱が単なる放出でないことは、虚血心筋 LDH アイソザイム分画像が LDH の減少に伴って大きく変化してゆく事実がこれをあらわしている。ラット心筋 LDH1 の変動は、壊死部では心筋 LDH の動態と同じ動きを示し、provocation 後著明に減少し 192 時間後で旧に復する傾向を示した。また LDH5 は LDH1 と鏡像的カーブを描いて上昇し、provocation 後 24 時間を頂点とする山型を示した。これに対し健康部心筋 LDH は provocation 後 24 時間、48～72 時間において正常範囲内にとどまっているにもかかわらず、軽度ではあるが有意に減少し、一方 LDH5 には上昇がおこっていたことは注目し得る。Isoproterenol 注射による虚血心は、前述の Rona²⁾、Handforth¹⁶⁾、Raab¹⁸⁾らの報告の如く心筋の強い一過性の hypoxia により惹起されるものと考えられるが、梗塞様所見を呈する心尖部と、肉眼的、光顕的に正常である心基部およびその中間部とした比較的虚血部における hypoxia は絶対的な有無というより相対的程度の差をもつにすぎない。強度の hypoxia で心筋壊死にまで至れば心筋 LDH と LDH アイソザイム分画の変動は同時におこるが、比較的弱い hypoxia では心筋 LDH は不変で LDH アイソザイム像の変化のみが起ると思われる。今回の成績で比較的虚血部の LDH および LDH アイソザイム分画が hypoxia の強弱如何にかかわらず健康部に似た動態を示したことは、この部分の実験条件が心基部に近かったことを示すものであり、またあるいは Braunwald²⁶⁾のいう如く propranolol 等の薬剤により梗塞巣が縮小する可能性のあるいわゆる twilight zone に該当する部分であるためかもしれない。心筋 LDH5 の変動は LDH1 と鏡像を示したが相対的変動ではなく、LDH 総活性値が減少しているにもかかわらず

らず LDH5 は明らかな上昇を示していた。心筋虚血時に LDH1 の減少に伴って LDH5 の増量が起ることは、嫌気性代謝への変換を意味する。Isoproterenol 注射によるラット虚血心筋の心筋 LDH 総活性値と心筋 LDH アイソザイム分画の変動を検討した Wenzel¹⁹⁾ の成績では、注射後 24 時間から 72 時間の間で総活性値は最少となり、LDH3、LDH4、および LDH5 は注射後 48 時間で最大値を示した後、徐々に減じ 10 日後に旧に復することが記載されている。一方 LDH1、LDH2 は注射後 48 時間で最も著しい減少を示すという。正常の好気性環境にある心筋は、H 型 tetramer に豊んでいるため焦性ブドウ酸の TCA cycle 代謝に対応して乳酸は円滑に焦性ブドウ酸に変換するが、虚血環境下では焦性ブドウ酸の代謝が中断し、LDH1 の触媒作用は容易に阻害されてしまい、これが虚血下でも乳酸増量が起る原因と考えられる²⁷⁾。更にこの虚血が慢性化した場合でも解糖は H⁺ イオンの処理以外の方法では進行し得ないため、LDH アイソザイムが嫌気性像へ移行することにより、焦性ブドウ酸の代謝を行うものと推定される²⁷⁾。Zinkham²⁸⁾ は同一個体における LDH アイソザイム像の移動について、胎児心筋では LDH5 に豊んでいるが以後急速に LDH1 優性型になることを示し、Dawson²⁹⁾ らも個体発生、成熟に伴う LDH アイソザイムの移動を認め、移動に関して遺伝的役割が重要であるといっている²⁸⁾⁻³⁰⁾。また嫌気性条件下における LDH1 優勢型から LDH5 優勢型への移動は、心筋や肝の組織培養で条件を変えることによって容易に示され³¹⁾³²⁾、この移動はこれら酵素の代謝率の変化や相異によるものではなく、別の条件によって規定されているものと推定している³¹⁾³²⁾。これらの知見からすれば、Isoproterenol によるラット虚血心筋内の LDH の減少と LDH1 の変動との間、LDH1 の変動と LDH5 の変動との間にみられた時間的ずれは、LDH アイソザイム像の変動を起こさう hypoxia の条件と心筋酵素逸脱の虚血条件とが本来別々の条件に左右されている結果であり、また LDH1 と LDH5 の増減も別の条件によって規定されていることを示唆していると思われる。

以上 Isoproterenol 注射によるラット虚血心筋の心筋 LDH とそのアイソザイム、血清 LDH とそのアイソザイム及び心筋 CPK とそのアイソザイムの経時的変動から、いわゆる逸脱酵素 LDH、CPK の動態は単に虚血心筋からの放出のみでなく、この際心筋内に起る能動的な酵素変動の過程による修飾をうけることが示された。またこの変動には虚血の程度、時間的關係などが複雑に関係し、さらにその個体の genes 等の支配

による調節等も関与すると考えられた。

結 語

Isoproterenol 注射によるラット虚血心筋の心筋内酵素変動を検討し、次の結果を得た。

1) 心筋内酵素の経時的変化では、健常部、比較的虚血部、虚血部とも、心筋内 LDH、CPK はほぼ平行に変動し、酵素の相異による逸脱の時間的差異は認められなかった。

2) 心筋 LDH の経時的変化は、健常部および比較的虚血部ではほぼ一定しているのに対し、虚血部では provocation 後 24 時間で最低値を示し、以後旧に復する傾向を示した。

3) 心筋 LDH アイソザイム分画像では、LDH 総活性値の変動しなかった健常部および比較的虚血部においても provocation 後 24 時間、48～72 時間では LDH1 の減少と LDH5 の上昇が認められ、虚血部では同時期を中心として著明な LDH1 の減少と LDH5 の上昇が認められた。

4) 血清 LDH1 の経時的観察では、初回注射後 12 時間で最高となり、provocation 後 48 時間では殆んど検出されなかった。

5) 心筋 CPK の経時的変化では、健常部および比較的虚血部はほぼ一定した値を示したのに対し、虚血部では provocation 後 24 時間で最低値を示し、以後旧に復する傾向を示した。以上から、心筋酵素の虚血時の血中逸脱は単なる放出ではなく心筋内での複雑な酵素変動に基づくものであると推論した。

謝辞：稿を終るに臨み御懇篤なる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。また直接の御指導と御教示を賜りました元田憲講師に深甚なる謝意を表します。また日夜御協力下さいました舟津敏朗博士、追分久憲学士、浜田希臣学士および研究室諸先生に感謝いたします。

なお本論文の要旨は第 39 回日本循環器学会総会で発表された。

文 献

- 1) J. S. LaDue, and F. Wroblewski : The Significance of the Serum Glutamic Oxalacetic Transaminase Activity Following Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, **11**, 871 - 877 (1955).
- 2) 元田 憲・加藤紀久・渡辺哲也・石見善一・北村元仕・橋本史子・原田紀久子・吉田光孝：うっ血性心不全時の血清酵素変動-LDH アイソザイム分画を中心に-*心臓*, **5**, 1369 - 1377 (1973).

- 3) 元田 憲・渡部哲也・石見善一・原田紀久子・中山年正・北村元仕：急性心筋硬塞症における血清LDHアイソザイムおよびCPKアイソザイムの臨床的意義，最新医学，29，130 - 137 (1974).
- 4) 元田 憲・川崎 英・追分久憲・中山 章・金谷法忍・浜田希臣・竹田亮祐：実験的心筋硬塞の心筋内酵素変動に関する研究-LDHアイソザイムを中心に-日本臨床代謝学会記録，13，33 - 34 (1976).
- 5) 元田 憲・渡部哲也・石見善一・中山年正・原田紀久子・北村元仕：老年者虚血性心疾患の血清酵素診断，Geriat. Med. 12，99 - 110 (1974).
- 6) 元田 憲・川崎 英・追分久憲・中山 章・金谷法忍・浜田希臣・神川 繁・多賀邦章・太田 茂・竹田亮祐：LDHアイソザイム-急性心筋梗塞症の血清LDHアイソザイムの変動を中心に-現代医療，9，739 - 747 (1977).
- 7) H. U. Bergmeyer：Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Z. Klin. Chem. u. klin. Biochem. 10，182 - 192 (1972).
- 8) H. U. Bergmeyer：Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8，658 - 660 (1970).
- 9) R. J. Wieme, M. Van Sande, D. Karcher, A. Lowenthal, and H. J. Van Der Helm：A modified technique for direct staining with nitroblue tetrazolium of lactate dehydrogenase isoenzymes upon agar gel electrophoresis. Clin. Chim. Acta. 7，750 - 754 (1962).
- 10) 吉田光孝・北村元仕：LDHアイソザイム，臨床病理，19，96 - 109 (1967).
- 11) I. T. Oliver：A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. Biochem. J., 61，116 - 122 (1955).
- 12) G. Rona, C. I. Chappel, T. Balazs, and R. Gaudry：An Infarct-like Myocardial Lesion and other Toxic Manifestations produced by Isoproterenol in the Rat. A. M. A. Archives of Pathology. 67，443 - 455 (1959).
- 13) I. Rosenblum, A. Wohl, and A. A. Stein：Studies in Cardiac Lesions with Sympathomimetic Amines. Toxicology and Applied Pharmacology. 7，1 - 8 (1965).
- 14) I. Rosenblum, A. Wohl, and A. A. Stein：Studies in Cardiac Necrosis 2. Cardiovascular Effects of Sympathomimetic Amines Producing Cardiac Lesions. Toxicology and Applied Pharmacology, 7，9 - 17 (1965).
- 15) B. C. Wexler, and G. W. Kittinger：Myocardial Necrosis in Rats：Serum Enzymes, Adrenal Steroid and Histopathological Alterations. Circ. Res., 13，159 - 171 (1963).
- 16) C. P. Handforth：Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Animals. Archives of Pathology, 73，83 - 87 (1962).
- 17) Von O. Strubelt und H. Breining：Zur Pathogenese und pharmakologischen Beeinflussung der durch Isoprenalin-Vergiftung hervorgerufenen Myocardnekrosen. Arzneim. Forsch., 14，1196 - 1198 (1964).
- 18) W. Raab, P. V. Lith, E. Lepeschkin, and H. C. Herrlich：Catecholamine-Induced Myocardial Hypoxia in the Presence of Impaired Coronary Dilatability Independent of External Cardiac Work. Am. J. Cardiol., 9，455 - 470 (1962).
- 19) D. G. Wenzel, and J. P. Lyon：Sympathomimetic Amines and Heart Lactic Dehydrogenase Isozymes. Toxicol and Applied Pharmacol., 11，215 - 228 (1967).
- 20) B. C. Wexler：Serum creatine phosphokinase activity following isoproterenol-induced myocardial infarction in male and female rats with and without arteriosclerosis. Am. Heart J., 79，69 - 79 (1970).
- 21) W. E. Shell, J. F. Lavelle, J. W. Covell, and B. E. Sobel：Early Estimation of Myocardial Damage in Conscious Dogs and Patients with Evolving Acute Myocardial Infarction. J. Clin. Invest., 52，2579 - 2590 (1973).
- 22) P. Rueggsegger, I. Nydick, A. Freiman, and J. S. LaDue：Serum Activity Patterns of Glutamic Oxaloacetic Transaminase, Glutamic Pyruvic Transaminase and Lactic Dehydrogenase Following Graded Myocardial Infarction in Dogs. Circ. Res., 52，4 - 10 (1959).
- 23) W. E. Shell, J. K. Kjekshus, and B. E. Sobel

- : Quantitative Assessment of the Extent of Myocardial Infarction in the Conscious Dog by Means of Analysis of Serial Changes in Serum Creatine Phosphokinase Activity. *J. Clin. Invest.*, **50**, 2614-2625 (1971).
- 24) **I. Nydick, F. Wroblewski, and J. S. LaDue** : Evidence for Increased Serum Glutamic Oxalacetic Transaminase (S - GOT) Activity Following Grated Myocardial Infarcts in Dogs. *Circulation*, **12**, 161-168 (1955).
- 25) **S. Kawasaki, A. Genda, H. Oiwake, K. Mori, T. Saga, S. Saiki, K. Masuya, S. Ishise, T. Funatsu, and R. Takeda.** : Studies on enzyme alterations of heart muscle following isoproterenol-induced myocardial infarction in rats with reference to LDH, CPK, and their isozymes. *Jap. Circ. J.*, **39**, 1090 (1975).
- 26) **E. Braunwald** : Introductory remarks. *Circulation*, **53**(Suppl.1), 1-2 (1976).
- 27) **G. L. Hammond, B. Nadal-Ginard, N. S. Talner, and C. L. Markert** : Myocardial LDH Isozyme Distribution in the Ischemic and Hypoxic Heart. *Circulation*, **53**, 637-643 (1976).
- 28) **W. H. Zinkham, A. Blanco, and L. Kupchik** : Isozymes : Biological and Clinical Significance. *Pediatrics*, **37**, 120-131 (1966).
- 29) **D. M. Dawson, T. L. Goodfriend, and N. O. Kaplan** : Lactic Dehydrogenases : Functions of the Two Types. *Science*, **143**, 929-933 (1964).
- 30) **H. J. Shelley** : Glycogen reserves and their changes at birth and in anoxia. *Brit. med. Bull.*, **17**, 137-143 (1961).
- 31) **G. Johansson** : Influence of oxygen on the lactate dehydrogenase isozyme pattern in chang liver cells. *Exptl. Cell Res.*, **43**, 95-97 (1966).
- 32) **D. M. Dawson and N. O. Kaplan** : Factors Influencing the Concentration of Enzymes in Various Muscles. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3215-3221 (1965).

A b s t r a c t

To elucidate the release mechanism of enzymes from the heart muscle in myocardial infarction, enzyme activities in the heart muscle were measured in three portions : 1) ischemic portion 2) relative ischemic portion 3) intact portion, in myocardial infarction of a rat which was produced by intracutaneous injection of 10 mg/kg isoproterenol-HCl.

The results were as follows :

- 1) LDH and CPK activities in the intact and the relative ischemic portions maintain an almost constant level.
- 2) In 24 hours after provocation, the diminution of LDH and CPK activities in the ischemic portion was remarkable compared with that in the others. After this, they gradually increased approximately to their original level.
- 3) In 24 to 48-72 hours after provocation, the alteration of LDH-1 isozyme fraction of the ischemic portion was remarkably decreased.

On the other hand, LDH-5 isozyme fraction revealed an abnormal elevation.

- 4) The level of LDH-1 isozyme fraction in serum was at its highest point 12 hours after the first injection.

From these data it is possible to conclude that, instead of a passive mechanism, the mechanism of enzyme release from the ischemic heart muscle is an active enzyme release mechanism.