

植込み型突然死防止装置の開発

神経刺激による不整脈の予防的治療法の開発

分担研究者 犬戸 稔聡（国立循環器病センター研究所 室長）

研究要旨：

急性虚血に合併する致死性心室性不整脈(VT/VF)の発生機序の一つとして、虚血による興奮伝播の遅延が指摘されている。また迷走神経刺激は急性虚血のVT/VFを抑制することが動物実験にて確認されているが、その詳細な機序は十分解明されていない。本研究では迷走神経終末からの神経伝達物質であるアセチルコリン(ACh)の虚血心に対する抗不整脈効果とその機序を、電気生理学のおよび免疫組織学的手法により解明した。AChは虚血境界領域の心筋細胞のギャップ結合を維持することで同領域の興奮伝導を改善し、伝導遅延部分を縮小することで急性虚血後のVT/VF誘発率を著しく低下させたと考えられた。

A. 研究目的

心室細動(VF)などの致死性不整脈による心臓性突然死は、米国で年間40万人、我が国においても年間5万人と推測され、その克服は国家的な急務と位置づけられている。心臓性突然死の80~90%は心室細動などの致死性不整脈が原因であることから、致死性不整脈に対しては精力的な研究が行われている。近年では植込み型除細動器(ICD)が致死性不整脈に対して極めて高い有効性を持つことが明らかとなり、また心筋梗塞後などの低心機能患者に対しては突然死の一次予防効果も期待されている。しかしながら、ICDはあくまでも発生した致死性不整脈を停止させる装置であり、不整脈を予防する効果はない。したがって、不整脈予防機能を従来のICDに付加することができれば、その治療効果の飛躍的改善が期待できる。

迷走神経刺激は虚血急性期の致死性不整脈発生を抑制することが動物実験にて確認されているが、その詳細な機序については未だ十

分解明されていない。そこで本研究は、従来のICDを超える突然死防止効果を持つ装置の開発に向けて、迷走神経刺激による致死性不整脈の予防的治療法を開発することを目的とする。急性心筋梗塞に伴う致死性不整脈の発生には、交感神経活動の異常亢進や迷走神経活動の低下など自律神経系のバランスの崩れが関与していると考えられる。また急性虚血は心筋細胞間のギャップ結合(Gap junction)を減弱させ興奮伝播を遅延させるため、VFなどリエントリー性不整脈の発生基盤を増強することが実験結果などから示唆されている。一方、迷走神経終末から分泌される神経伝達物質はアセチルコリン(ACh)であるため、AChの心筋に対する不整脈抑制機序を調べることは、迷走神経刺激による抗不整脈効果の機序を解明する一助となることが期待される。さらに迷走神経刺激あるいはACh投与による治療方法の最も効率的な処方が可能となる。本研究ではランゲンドルフ灌流ウサギ摘出心を用いて、AChの虚血急性期の致死性不整脈

発生に対する効果、さらにはその抗不整脈的機序を電気生理学的・分子生物学的な手法を用いることにより検討した。

## B. 研究方法

### B-1. ランゲンドルフ灌流ウサギ摘出心臓標本を用いた光学マッピング

Japanese-White Rabbit (体重 2-2.5 kg) をネブタール麻酔下に心臓を摘出し、大動脈より逆行性に Tyrode's 液にてランゲンドルフ灌流を行った。摘出心が安定した後、膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS) を加えた Tyrode's 液で 10 分間灌流した。青色発光ダイオードを用いた励起光 (波長 480nm) を照射、摘出心からの蛍光はダイクロイック・ミラーで分岐させた後、各々独立して中心波長 540 nm と中心波長 660nm のバンドパス・フィルタを通過させ、イメージ・インテンシファイアで増幅した後に CMOS(256×256 pixels) センサに入力した。

撮影中も心筋収縮を抑制せずに、フレームレート 500/sec で光学的膜電位記録を行った。心筋拍動による上下左右方向のモーション・アーチファクトの除去のために、直径 0.5mm のジルコニア製ビーズを心表面に数点散布し、我々が独自に開発したマーカートラッキングソフトウェアを使用し、心拍動に伴うマーカートの移動を画像の相互相関を用いて追跡することにより、仮想的に静止した画像を作成し、拍動に伴う 2 次元方向のモーション・アーチファクトを除去した。さらに 2 波長画像の比を計算することにより前後方向の動きによるノイズを除去した。

### B-2. 電気生理学的検査 (EPS)

摘出灌流心は左室前壁の心外膜側から心室ペーシング (基本周期=500ms) を行った。電気生理学的検査 (EPS) は、単回早期刺激 (S1-S2 <500ms) により行い心室性不整脈の誘発性について検討した。また同時にペーシング場所からの興奮伝播等時線図 (isochronal

map)、心表面各点の伝導速度 (CV) のベクトル表示、心筋の線維方向に平行な伝導速度 ( $\theta$  (L)) と直交する伝導速度 ( $\theta$  (T))、活動電位持続時間などを計測した。

### B-3. 急性心筋梗塞の作成

灌流心は EPS①を行った後、無作為に ACh 投与 (ACh(+)) 群または非投与 (ACh(-)) 群に分けた。ACh(+)) 群では ACh 10  $\mu$ mol/L を虚血開始 5 分前から灌流液とともに持続投与した。急性心筋梗塞は左冠動脈前下行枝を起始部で結紮することにより作成し、虚血開始から 30 分後に EPS②を行った。

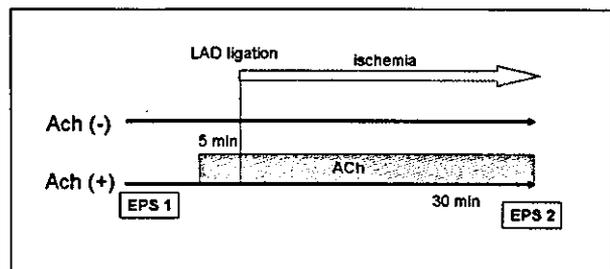


図 B-1 研究プロトコール。

虚血前 (control) と虚血 30 分後に電気生理学的評価 (EPS) を行い、光マッピングにて撮影する。アセチルコリン (ACh) 投与群では、虚血 5 分前から ACh 10  $\mu$ mol/L を持続投与開始し、同様の EPS 検査を行った。

### B-3. Connexin 43 の測定

EPS②終了後、摘出灌流心から心臓マトリックス内にて厚さ 2mm のスライス切片を切り出した。同切片の一部はホルムアルデヒドにより迅速に固定を行い、固定標本は免疫組織学的手法により細胞表面の Connexin-43 の同定と定量化を行った。また組織の一部は Western blotting 法により Connexin-43 の発現の定量化を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)、及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号) に基づき、国立循環器病センター研究所の動物委員会で承認された方法

で行った。適切な麻酔剤を用い動物の苦痛の軽減に努めた。

### C. 研究結果と考察

#### C-1. ウサギ急性心筋虚血後の不整脈誘発性に対するアセチルコリンの影響

虚血前(Control時)のEPS①ではいかなる不整脈も誘発されなかった。刺激に対する不応期は平均 150msec であった。虚血後は ACh 非投与群では 12 例中 10 例で持続する VT または VF が誘発された(図 C-1A)が、ACh 投与群では VT/VF は 8 例中 2 例しか誘発されなかった(図 C-1B)。また EPS 時の刺激間隔(S1-S2)毎に 3 連発以上の非持続性心室頻拍(NSVT)の誘発性を図 C-1C に示す。ACh(-)では S1-S2 が 130msec を頂点に早期刺激により NSVT が誘発されることが多いが、ACh(+)では誘発性は著しく低下した。以上より ACh は虚血後の致死性不整脈の発生閾値を有意に上昇させ、VT/VF が持続しにくくさせる働きが示唆される。

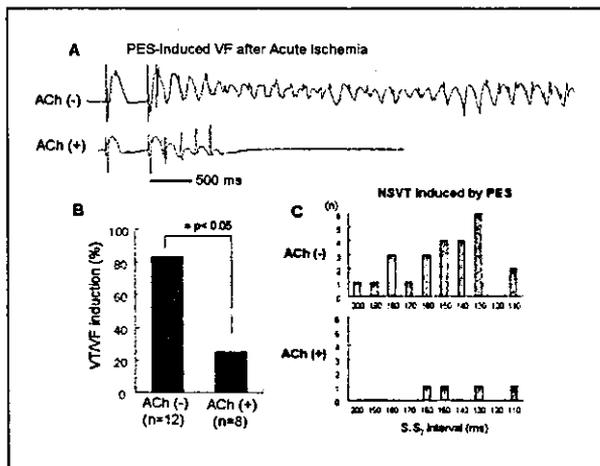


図 C-1 急性心筋虚血時の致死性不整脈誘発性に対するアセチルコリンの効果

アセチルコリン非投与(ACh(-))群では心室のプログラム刺激(PES)により持続性VTまたはVFが高い確率で誘発される(図A)が、ACh(+)群ではVT/VFの誘発率は著しく低下し(図B)、また3連発以上の非持続性心室頻拍(NSVT)の誘発も著明に低下した(図C)。

#### C-2. 急性心筋虚血による伝導遅延とそれに対するアセチルコリンの効果

虚血急性期の致死性不整脈発生の機序とし

ては、虚血による心筋細胞間のGap junction(Gj)の減少と、それに伴う興奮伝播速度(CV)の低下(伝導遅延)が考えられている。我々は虚血による興奮伝播過程の遅延を光マッピング法にて観察した。図C-2はその経時的変化を示すが、虚血開始5分で $\theta(L):59.1 \rightarrow 25.9$ (cm/s),  $\theta(T)27.9 \rightarrow 15.5$ (cm/s)と著しい伝導遅延を認め、20分後でもほぼ同様の伝導の遅れが認められた。

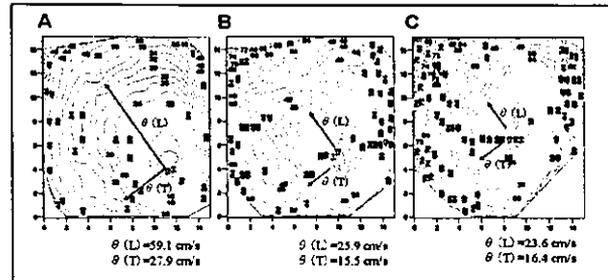


図 C-2 虚血による興奮伝播遅延の経時的変化。

虚血前(A)、5分後(B)、20分後(C)の心表面の興奮伝播等時線図。灌流量 1.5ml/minにて心臓全体を虚血にすると開始5分後(B)ですでに著しい伝導速度の低下を来した。基本周期= 500ms。

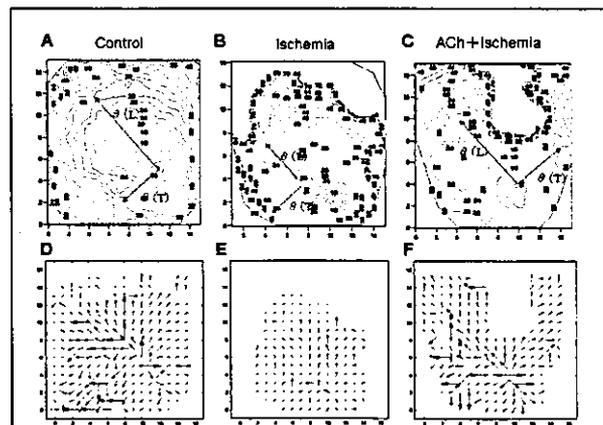


図 C-3 アセチルコリン(ACh)の虚血心筋に及ぼす影響。

A-C:基本周期 500ms 後の早期刺激(150ms)に対する興奮伝播の当時線図。B:虚血後は著しく伝導が遅延し、特に虚血境界領域(border zone)に近い部分での伝導の遅れが目立つ。C:ACh 投与群では虚血後も興奮伝播の落ち込みが小さく、さらに虚血境界領域での伝導の遅れが少ない。

次に ACh 投与例と非投与例での虚血後の興奮伝播過程を比較検討した(図 C-3)。ACh 非投与

例では伝導が途絶した梗塞部(白色)周囲の虚血境界域に著しい伝導遅延が認められるが、ACh 投与例では梗塞部周囲にこのような伝導の遅延箇所は少なく、また全体の伝導速度分布(図D-F)もACh投与群ではControlに近い速度ベクトルの分布を呈していた。

### C-3. アセチルコリンによる急性虚血時の伝導速度の変化

急性虚血後の伝導速度 $\theta$ (L)、 $\theta$ (T)の各刺激間隔による変化をACh投与群と非投与群で比較した(図C-4)。刺激間隔を短くすると $\theta$ (L)、 $\theta$ (T)ともに伝導速度は低下するが、ACh非投与群では虚血後に特に150msecの早期刺激による伝導速度が著しく低下した。一方、ACh投与群では全ての刺激間隔で $\theta$ (T)の伝導速度がACh非投与群よりも著しく向上していた。 $\theta$ (L)については有意な違いは認められなかった。

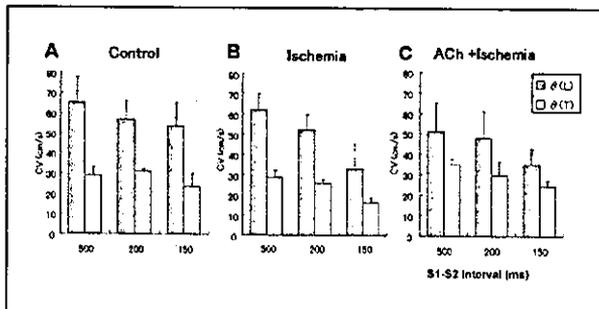


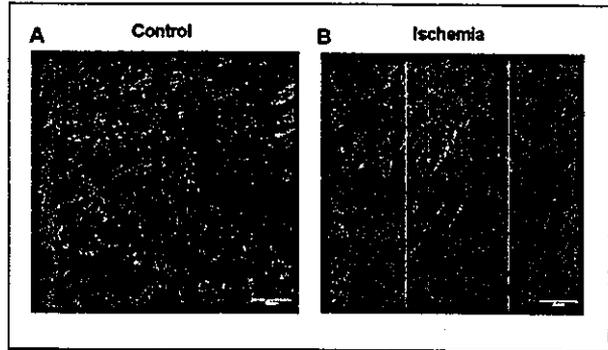
図 C-4 アセチルコリンによる急性虚血後の伝導速度への影響

基本周期 500ms 後の早期刺激により刺激間隔に比例して興奮伝播速度は低下する。虚血時にはその低下度はより顕著となるが、AChを投与しておくとその低下は減弱するのみならず、 $\theta$ (T)はむしろ非虚血時よりもわずかながら増加した。

### C-4. 虚血による心筋ギャップ結合の変化とアセチルコリンによる保護作用

急性虚血による興奮伝導の低下には心筋細胞間のギャップ結合の down regulation が関係していると考えられている。そこで電気生理学的検討を行ったのち、摘出心ホルムアルデヒドにて固定し免疫組織学的手法を用い

てギャップ結合を形成する蛋白 connexin 43 を染色し、現在定性および定量的に評価を行った。その結果、急性虚血によってギャップ結合蛋白が著しく減少しており(図C-4)、これが伝導速度の低下に重要な役割を果たすと考えられた。またAChによるギャップ結合への作用については現在引き続き検討中である。



図C-4 急性心筋梗塞による Connexin-43 発現の変化  
虚血前(A)ではGap junctionを構成するConnexin43は心筋細胞の長軸方向の介在板に密集して存在するが、虚血により細胞表面に存在する同蛋白の数は著しく減少した。

### E. 結論

AChは急性虚血後のVT/VF誘発率を著しく低下させた。その電気生理学的機序として、AChは虚血境界領域の伝導を改善することにより伝導遅延部位を縮小し、VT/VFの発生基盤を修飾したと考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### G-1. 論文

なし

#### G-2. 学会発表

1. Kazunori Uemura, Toru Kawada, Toshiaki Shishido, Takeshi Aiba, Kenji Sunagawa, Masaru Sugimachi. Estimation of preload recruitable

stroke work relationship from steady-state hemodynamics without recording ventricular pressure-volume relationship. 第 69 回日本循環器学会 Circulation Journal Supplement I , vol.69, 522, 2005

2. Tadayoshi Miyamoto, Masashi Inagaki, Hiroshi Takaki, Toshiaki Shishido, Toru Kawada, Kenji Sunagawa, Masaru Sugimachi. Regular exercise training attenuates exercise hyperpnea through desensitization of the respiratory central controller. 第 69 回日本循環器学会 Circulation Journal Supplement I , vol.69, 643, 2005

#### G-3.新聞報道

なし

#### H.知的所有権の取得状況

なし

植込み型突然死防止装置の開発

心機能モニター（コンダクタンス法による心室容積または心駆出率）の開発

分担研究者 上村 和紀（国立循環器病センター研究所循環動態機能部 研究室員）

**研究要旨：**ICD埋め込み患者において心機能推移を把握するために、①右心室コンダクタンス信号より左心室機能を推定し、②肺コンダクタンス法により胸郭水分量（肺水腫の重傷度）を推定するシステムの開発を行った。システムはICDに統合可能で、ICD既存の機能・形態を保持し利用することを前提とし、本体と電極リードを用いてコンダクタンス信号を得た。右心室コンダクタンス信号・肺コンダクタンス信号を活用することで臨床上有用な心機能モニターとなりうると期待された。

A.研究目的

植込み型突然死防止装置の開発において、心機能を長期連続してモニターすることは致死性不整脈の早期診断に必要であるのみならず、心不全慢性期の病態把握の点でも極めて重要である。本モニター装置では心機能推移を把握するために、①右心室コンダクタンス法により左心室容積・駆出率を推定する、②肺コンダクタンス法により胸郭水分量（肺水腫の重傷度）を推定することを考えている。このシステムに用いる電極は、ICDシステムに統合可能で長期に留置でき、かつ動脈血栓症などの合併症のリスクを最小限に出来る部位に設定されなくてはならない。

B.研究方法

実験には①および②とも麻酔下成犬を用いた（図1）。

B-1. 右心室コンダクタンス法による左心機能推定に関する研究

(A) 右心室心尖部に楔入したカテーテル先端の電極を2個ある刺激電極のうちの1個とする。対応する刺激電極として、左前胸部皮下に埋め込んだ Generator①、Coronary Sinus

に留置した電極②、腕頭動脈内に留置した電極③を設定する（図2）。刺激電極間に定電流

実験方法(図1)

動物	犬(20~30kg)
麻酔	吸入イソフルレン(0.5~1.0%)
操作	コンダクタンスカテーテルは右頸静脈より逆行性に右心室内へ挿入。左前胸部皮下にICD-Generatorを埋め込む
	心室内圧・心電図・コンダクタンス信号は200Hz・12bitでAD変換し保存後解析した

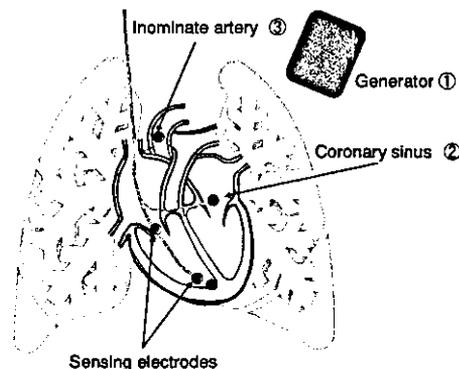
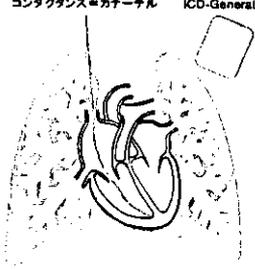


図2

(20kHz, 0.03mA-RMS)を注入する。右心室内カテーテル上の2電極を測定電極とし、この間でコンダクタンスを計測する。このようにして得られたコンダクタンス容積信号と、実際に左心室内にコンダクタンスカテーテル挿入して得られた信号と比較した。

(B) 刺激電極を Generator と右心室心尖部電極とし、右心室内カテーテル上の2電極を測定電極とし、得られるコンダクタンス信号がどちらの心室のコンダクタンスを反映するか検討した。下大静脈から飽和食塩水を注入し左右心室のコンダクタンス信号を解析した。  
 (C) 刺激電極を Generator と右心室心尖部電極とし、冠静脈洞内と右心室カテーテル上の1電極を測定電極とし得られた信号を左心室コンダクタンス信号と比較した。

### B-2. 肺コンダクタンス法による胸郭内血液量(肺水腫の重傷度)推定に関する研究

肺コンダクタンスと血液電気抵抗率を同時にモニターすることで、胸郭内血液量 (Central blood volume,  $V$ ) の増減を推定することにより、心不全 (おもに左心不全) 増悪を早期に診断できるようにする。

(システム概要) 右心室心尖部に楔入したカテーテル先端の電極1と、左前胸部皮下に埋め込んだ Generator 間に定電流 (20kHz, 0.03mA-RMS)を注入する (図3)。

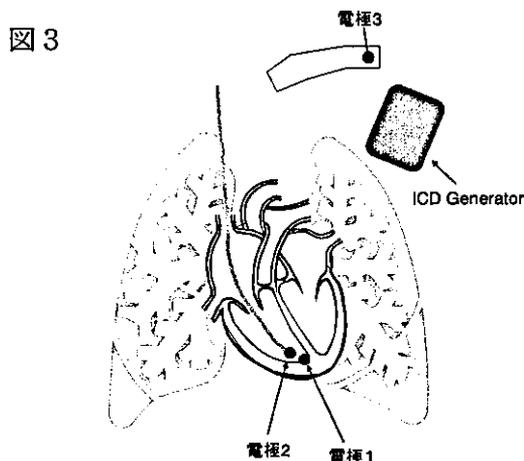


図3

右心室内カテーテル上の電極2と左鎖骨下静脈内に留置した電極3の間でコンダクタンス ( $G$ )を計測する。同時に血液抵抗率( $\rho$ )を計測する(最終的に血液抵抗率は、カテーテル上に近接配置した4電極にて計測する予定だが当座は採血し体外キュベットで計測)。電極2と3の間の極間距離が安定して一定であれば

$$V \propto \rho \cdot G$$

であるので、 $V$ の個体内での相対的増減は $\rho \cdot G$ によりモニターでき、心不全増悪は $\rho \cdot G$ 増加にて検出する。

犬にて虚血性心不全を作成し、 $G$ 、 $\rho$ 、肺動脈楔入圧(PAWP)を計測。算出 $\rho \cdot G$ とPAWPの相関を見る。

(倫理面への配慮)

動物実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」、及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に基づき、国立循環器病センター研究所の動物委員会で承認された方法で行った。

### C. 研究結果

#### C-1. 右心室コンダクタンス法による左心機能推定に関する研究

(A) いずれの電極配置でも左心室コンダクタンスとほぼ時相の一致する信号を得ることができた。しかしながらこれらの信号は、血液抵抗率・カテーテル上の測定電極間距離を考慮にいれても小さな振幅の信号しかえられない。(図4)

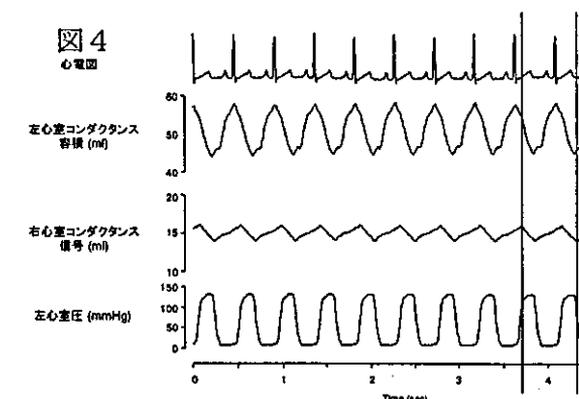
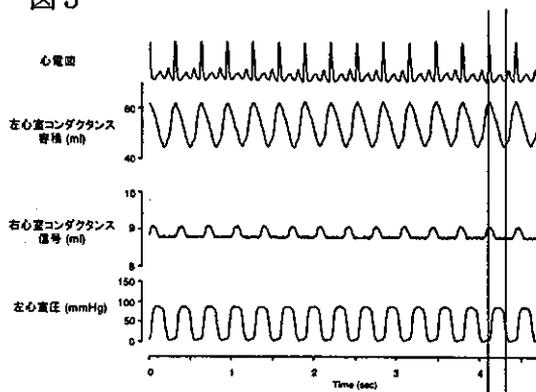


図4  
心電図

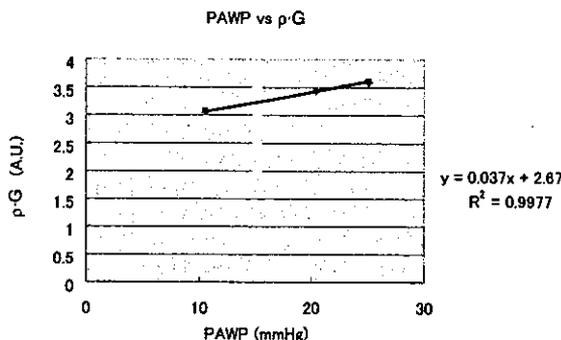
(B) 高調食塩水により右心室カテーテルから得られる信号はあきらかに左心室カテーテルから得られる信号より時相が早く、得られる信号は右心室心尖部付近の限局した部位の容積を反映しているに過ぎないと考えられた。(C) 冠静脈洞内と右心室カテーテル上の1電極を測定電極とし得られた信号は左心室信号と同相だが、その形態は心室容積を反映しているとはいいがたく、左心室容積コンダクタンスの推定には使えない(図5)

図5



### C-2. 肺コンダクタンス法による胸郭水分量(肺水腫の重傷度)推定に関する研究

1例にて検討した。p-GはPAWPと強く相関した。



### D. 考察

#### D-1. 右室コンダクタンス信号の心機能モニターとしての有効性、および肺コンダクタンス法による胸郭水分量(肺水腫の重傷度)推定の有効性

得られた結果より、右心室内カテーテルから得られる信号は、右心室心尖部の限局した

部位の容積増減しか反映していないと考えられる。しかしながら先行研究(Woodard JC et al. Pacing Clin Electrophysiol. 10(4 Pt 1):862, 1987.)では、このようにして得られた信号と一回心臓拍出量が相関することが示されており、心拍出量の相対的变化はモニターしうる可能性がある。この点に関する検討を要する。

肺コンダクタンス法にて胸郭水分量が推定できる可能性が示された。胸郭水分量およびその増減を鋭敏に反映するPCWPは心不全患者の予後を最も強く予測する血行動態指標として知られており、この方法を使うことで心不全患者の水分バランス管理が容易になると考えられる。

#### D-2. 今後の課題・検討すべき点

まず、右心室コンダクタンスによる心拍出量推定がどの程度の精度・再現性で可能かを検討する。右心室コンダクタンス信号を取りながら肺動脈主幹部に血流計を装着し、コンダクタンス信号と血流信号の相関を観察する。

肺コンダクタンス信号がさまざまな病態下でも胸郭水分量およびPCWPの変化をモニターしうるか検討する。特に肺炎などを併発した際、肺コンダクタンス信号が実際の胸郭水分量を反映しづらくなる可能性があり、検討を要する。

### E. 結論

右心室コンダクタンス信号・肺コンダクタンス信号を活用することで臨床上有用な心機能モニターとなりうると期待される。しかしながら、ICDに統合して臨床応用するには更なる検討・開発を要するといえる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

### G-1. 論文

1, Kashihara K, Kawada T, Uemura K, Sugimachi M, Sunagawa K. Adaptive predictive control of arterial blood pressure based on a neural network during acute hypotension. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32: 1365.

2, Uemura K, Kawada T, Sugimachi M, Zheng C, Kashihara K, Sato T, Sunagawa K. A self-calibrating telemetry system for measurement of ventricular pressure-volume relations in conscious, freely moving rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:H2906, 2004.

3, Uemura K, Kawada T, Kamiya A, Aiba T, Hidaka I, Sunagawa K, Sugimachi M. Prediction of circulatory equilibrium in response to changes in stressed blood volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Feb 11; [Epub ahead of print]

### G-2. 学会発表

1, Uemura K, Kashihara K, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. A comprehensive physiological model of circulation for automatic piloting hemodynamics in patients with acute heart failure. *Experimental Biology 2004. The FASEB Journal A647*, 2004

2, 上村 和紀, 柏原 考爾, 川田 徹, 杉町 勝, 砂川 賢二 覚醒・非拘束ラットにおける、Bluetooth 無線を用いた植込み型心室圧容積遠隔測定システム 第 43 回日本エム・イー学会大会 医用電子と生体工学 第 42 巻 368、2004

3, 上村 和紀, 川田 徹, 柏原 考爾, 杉町 勝, 砂川 賢二 覚醒・非拘束ラットにおける、Bluetooth を用いた埋め込み型心室圧容積遠隔測定システム 第 25 回日本循環制御医学会総会 循環制御 91、2004

### G-3. 新聞報道

無し

### H. 知的所有権の取得状況

無し

植込み型突然死防止装置の開発  
致死性不整脈例へのICD植込みの適応に関する研究

分担研究者：鎌倉史郎（国立循環器病センター 心臓血管内科 医長）

研究要旨：突然死の原因として近年注目され、かつその原因遺伝子が解明されつつあるQT延長症候群(LQTS)、およびカテコラミン誘発性多形性心室頻拍(CPVT)の病態、治療法と、ICD植込み適応基準を文献的に考察した。先天性LQTSでは、 $\beta$ 遮断薬、メキシレチン等が突然死予防に用いられているが、それらの治療にも関わらず、失神を伴うTorsade de Pointesや心室細動を繰り返す例の二次予防にICD植込みが必要と考えられた。CPVTでは厳重な運動制限と $\beta$ 遮断薬投与にも関わらず、失神や心室細動を生じる例がICDの適応と考えられた。一方、遺伝子解析で重症型と診断された例や、突然死の家族歴を有する例への一次予防目的のICD植込みも今後検討する必要があると思われた。

### A. 研究目的

植え込み型除細動器(ICD)は1970年にMirowskiらによって考案され、心室頻拍、心室細動等の致死性不整脈の治療の切り札として1980年に初めて臨床応用された。当初の機器は大型で、開胸手術により体内に植え込まれ、除細動機能だけを有していたが、その後ペースメーカー等種々の機能が備わり、小型軽量化されてペースメーカーと同様な胸壁植込みが可能になった。ICDは1995年以降に施行された種々の大規模臨床試験で他の治療法を凌ぐ生命予後延長作用が確認され、その適応症が漸次拡大しており、欧米諸国では本邦の5倍～数十倍もの植込みがなされている。昨年度の研究では虚血性心疾患、非虚血性心筋症のICD植込

み適応基準を考察したが、本年度はQT延長症候群(LQTS)、ならびに小児の突然死の原因として注目されているカテコラミン誘発性多形性心室頻拍(CPVT)のICD適応基準を検討した。

### B. 研究方法

OVID/MEDLINE(1966～2005年)、医学中央雑誌(1983～2005年)を用いて、LQTS並びにCPVTの診断・治療と、ICD植込みに関して記述した代表的な論文を抽出し、そこから現時点で最も妥当と思われる適応基準を求めた。本研究は文献に基づく研究であるため、倫理面の問題はないと考えられる。

### C. 研究結果

## 1. QT延長症候群

LQTSは、心電図上QT時間の延長を伴い、Torsade de Pointes(TdP)という非持続性多形性心室頻拍や心室細動のために失神や突然死が生じる疾患である。LQTSは遺伝的な背景を有する先天性(家族性)のものと、薬剤や低K血症等に由来する後天性(二次性)のものに分類できる。先天性のLQTSは1990年代になって、その原因が心筋のイオンチャネル遺伝子の変異に基づく”遺伝子病”であることが判明し、後天性のLQTSもその成因を遺伝子変異や遺伝子多型に求める報告が相次いでいる。また多くのLQTSがチャネルの機能消失または低下(loss of function)に基づいて生じるのに対し、チャネルの機能亢進(gain of function)に基づくQT短縮症候群(SQTS)も近年報告され、今ひとつの突然死の原因として注目されている。

### 1)先天性LQTSの診断

先天性LQTSでは心筋のイオンチャネルや調節蛋白の機能異常に基づいて心筋細胞の活動電位が延長し、再分極のばらつきが増大してTdPが生じる。LQTSでは従来から常染色体優性遺伝のRomano-Ward症候群と、常染色体劣性遺伝で両側感音性難聴を伴うJervell&Lange-Nielsen症候群が存在することが知られていた。前者では、現在までに7つの遺伝子型が報告されており、頻度の少ない後者の一部はKCNQ1またはKCNE1の変異遺伝子のホモ接合体であることが報告されている。遺伝子診断では60~70%の家系で遺伝子異常が同定される。遺伝子型の頻度はLQT1(40~50%)、LQT2(40%)、LQT3(10%)、LQT5,6(2~5%)の順で多く、LQT1~3の3型ではほぼ大部分が占められる。

先天性LQTSの診断は1993年に発表されたSchwartzの診断基準に基づいて行われることが多い。Schwartzの基準では各点数の合計が4点以上で診断確実、2または3点は疑わしく、1点以下は可能性が低いと判定する(ただしストレスに伴う失神発作とTdPを両方認める場合は合計2点とする)。

### 2)臨床所見

LQTSの臨床所見は遺伝子型毎に異なることが知られている。心電図上は、LQT1例では幅の広い(broad-based)T波が、LQT2では2峰性(bifid)T波やノッチを伴う平低化した(low-amplitude, notched)T波が多く、LQT3ではST部分が長く(late-appearing)、かつ2相性(biphasic)または先鋭化した(peaked)T波が認められやすい。しかしながら安静時のT波パターンから遺伝子型を推定することは必ずしも容易でない。そこで運動負荷検査中のT波形や、エピネフリン負荷検査におけるQTc時間の反応に基づいて遺伝子型を診断する方法が報告されている。特にLQT1例ではLQT2やLQT3例に比べて安静時のQT時間が正常または境界域の非浸透例が比較的多く存在するため、その検出にエピネフリン負荷が有用とされている。

臨床症状と遺伝子型との関連はLQTSの国際登録データで検討されている。それによるとLQT1では心事故(失神発作、蘇生に成功した心停止、突然死)の62%が運動時におこり、特に水泳中に心事故を起こしやすいと報告されている。一方、LQT1は睡眠時に心事故が起こるのは3%にすぎない。このためLQT1は交感神経刺激に対し、最も感受性が高いと考えられる。LQT2では43%が精神的ストレス(恐怖、驚愕、音によ

る覚醒)による急激な交感神経緊張状態で生じる。特に出産前後や、目覚まし時計等の聴覚刺激時の心事故はLQT2に特徴的とされる。それに対し、LQT3では39%が睡眠中や安静時に生じるとされている。

### 3) 予後と重症度

心事故は男性では15才以前に発生しやすく、女性よりも頻度が高い。特にLQT1でQTc時間が500msec以上の男性でそれが顕著である。一方、女性は15才以降で、より心事故が発生しやすくなる。40才までに初回の心事故が発生する確率はLQT1が30%であるのに対し、LQT2は46%、LQT3は42%と高く、LQT3では女性よりも男性に心事故が起こりやすい。QTc時間の延長はLQT1,LQT2では独立した危険因子であるが、LQT3ではQTcが500msec未満の例でも比較的予後が悪い。Prioriらはこれら頻度の高いLQT1,LQT2,LQT3の3つの遺伝子型についてQTc時間と性別を考慮に入れたリスク層別を報告している。すなわち、QTc $\geq$ 500msecのLQT1,LQT2と男性のLQT3を高リスク群(40才までに50%以上の確率で心事故が生じる)、QTc<500msecのLQT1,LQT2の男性を低リスク群(心事故30%未満)とし、それ以外を中間群に分類している。

### 4) 治療

心電図、臨床症状、または遺伝子診断で遺伝子型がある程度同定可能となった現在では、それぞれの遺伝子型に特異的な治療を行うのが望ましい。交感神経の感受性の高いLQT1では運動制限と共に、 $\beta$ 遮断薬が第1選択薬であり、他にメキシレチン、ベラパミルが使用される。LQT2例も心事故に急激な交感神経緊張が関与するため、 $\beta$

遮断薬が第1選択薬となるが、LQT1例に比べて有効性が低く(59%)、メキシレチン、ベラパミルの併用が必要な場合が多い。LQT3例ではlate I<sub>Na</sub>チャンネル遮断作用を有するメキシレチンが第1選択薬と考えられるが、症例数が少ないため長期的な有用性に関しては未だ不明である。 $\beta$ 遮断薬の効果は期待できず、動物実験ではむしろ増悪させる可能性が示唆されている。LQT3例では心拍数の増加によりQT時間が著明に短縮するため、徐脈例でペースメーカー治療が有用である。中間のリスクまたは高リスクを有するLQT1,LQT2例では一次予防に $\beta$ 遮断薬が用いられるが、 $\beta$ 遮断薬を投与をしても、LQT1で19%、LQT2で41%に心事故が生じ、4%には突然死や心停止が生じると報告されている。左交感神経節切除は日本ではあまり行われていないが、症状の軽快に有用で、心事故を約1/6に減少させる。ただ無症状になるのは46%にすぎず、心停止や死亡は23%に起こると報告されている。本手術はLQT1やLQT3に比し、LQT2では効果が劣り、施行後QTc時間が500msec以上を保つ場合は症状が残存する可能性が高い。しかしながら、 $\beta$ 遮断薬の投与後に失神のみを繰り返す例や、ICDの植込みが困難な例、ICDを植込んだ後、electrical stormのために頻回作動を生じる例では本手術を試みる価値があると考えられている。

## 2. カテコラミン誘発性多形性心室頻拍

カテコラミン誘発性多形性心室頻拍(CPVT)は、Leenhardtらにより命名された致死性不整脈で、QT時間が正常で、器質性心疾患を伴わない若年者が、運動や精神的ストレスによる交感神経刺激で、2方向性ま

たは多形性心室頻拍を生じて失神または突然死をきたす病態をさす。現在までに常染色体優性遺伝形式の CPVT では、心筋に分布するリアノジン受容体である RyR2 の変異が、常染色体劣性遺伝形式の CPVT ではカルセクエストリン遺伝子(CASQ2)の変異が報告されている。前者では筋小胞体に存在する RyR2 に変異があるために、 $\beta$  受容体刺激に伴って筋小胞体から過剰の  $Ca^{2+}$  放出が起こり、細胞内の Ca 過負荷から遅延後脱分極が起こって多形性心室頻拍が発生すると考えられている。また後者では、筋小胞体に存在する  $Ca^{2+}$  結合蛋白であるカルセクエストリンの変異により、 $Ca^{2+}$  放出機構に異常が生じて遅延後脱分極が生じると考えられている。

Priori らは CPVT 発端者の 30 例とその家族 118 例の遺伝子型と表現型を検討している。それによると発端者 14 例と、その家族の 9 例に RyR2 遺伝子の変異を認め、それらの約半数が男性であったが、RyR2 遺伝子変異が見つからなかった例ではほとんどが女性であった。変異保因者では非保因者に比べ、初回の失神年齢が低く、かつ保因者の男性は保因者の女性に比べ明らかに失神出現率が高かった。心電図上、CPVT 例の 36% は 2 方向性 VT を、58% は多形性 VT を、50% はカテコラミン誘発性心室細動を呈していた。電気生理学的検査では 11% で、イソプロテレノール点滴では 42% で多形性 VT が誘発され、運動負荷検査では 80% で 4 連発以上の VT が出現した。治療法として、 $\beta$  遮断薬は不整脈を減少させるが、40% で再発し、全体の 30% の症例で ICD が植え込まれた。また約 2 年間の経過観察中、その半数で ICD の作動が認められたと報告して

いる。最近 Choi らは水泳で心事故が生じる原因として、LQT1 の他に、RyR2 に変異を有する CPVT が 2 割程度あるとし、LQTS の診断基準点数(Schwartz 法) が 4 点未満の例ではその 9 割が CPVT であったと報告している。

#### D. 考察

以上より、現時点では LQTS、ならびに CPVT の ICD 適応を下記のようにするのが望ましいと考えられる。

##### 1) LQTS の ICD 適応

先天性 LQTS では、運動制限に加え、 $\beta$  遮断薬、メキシレチン等が TdP や突然死予防に用いられている。ICD は一般に一次予防には用いられないが、薬剤を用いて突然死を生じた家族歴を有する場合には適応となると考えられる。

一方、 $\beta$  遮断薬、メキシレチン等による治療を行っているにも関わらず、失神を伴う TdP を頻回に生じたり、心室細動/心停止を生じた先天性 LQTS の二次予防には ICD 植込みが最も確実な治療法となる。また後天性 LQTS においても TdP とその誘因が容易に惹起される例では ICD 植込みが必要と考えられる。

##### 2) CPVT の ICD 適応

これまで CPVT の予後を検討した大規模な臨床報告はない。Sumitomo らは  $\beta$  遮断薬と Ca 拮抗薬が突然死予防にある程度有効だが、Na 遮断薬は無効と報告している。またアミオダロンの有効性も報告されていない。本例では  $\beta$  遮断薬に加え、厳重な運動制限が必要で、それらにも関わらず失神を繰り返したり、心室細動を生じた例では、二次予防目的で ICD 植込みが必要と思われ

る。また重症型になりやすい RyR2 変異例の男性や、CASQ2 変異例では、突然死の一次予防に ICD の植込みを検討してもよいかもしれない。

#### E. 結論

LQTS、ならびに CPVT の ICD 植込み適応は TdP または心室細動を繰り返す重症例への二次予防が中心となる。一方、遺伝子解析で重症型と診断された例や、突然死の家族歴を有する例への一次予防目的の植込みも検討する必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

鎌倉史郎：心臓 36 suppl5: 15-26, 2004

Shimizu W, Kamakura S, et al: JACC 44: 117-125, 2004

Noda T, Kamakura S, et al: Eur Heart J 25: 2149-2154, 2004

Kandori A, Kamakura S, et al: Phys Med Biol 49: 2103-2115, 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

植込み型突然死防止装置の開発

虚血心における心臓リモデリングおよびその神経制御の検討：

迷走神経刺激による電気的リモデリングと細胞生存シグナルへの作用

分担研究者 佐藤 隆幸（高知大学医学部循環制御学 教授）

研究要旨：

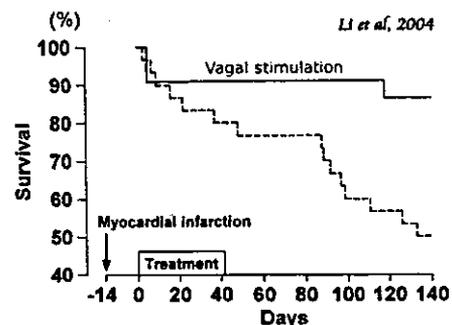
心筋梗塞急性期および慢性期における迷走神経刺激の心臓リモデリング抑制効果のメカニズムを解明するために、心筋組織および細胞レベルにおける迷走神経刺激の細胞-細胞間コミュニケーション維持機構と細胞保護作用に着目した解析を行った。迷走神経刺激によるマクロな心臓リモデリング抑制効果は、アセチルコリンから始まる一連の細胞内情報伝達系の活性化による、①ギャップ結合タンパク質（コネクシン43）の翻訳後修飾すなわちタンパク質分解系の抑制による電気的安定性の維持、②細胞生存シグナル（PI3K/Akt）を介する抗アポトーシス作用の増強、③心筋細胞からのTNF- $\alpha$ 産生とその受容体TNFR2のmRNAの誘導、という遺伝子およびタンパク質の発現調節を介するこれまでにない全く新しい作用機序による表現型であることがわかった。

A.研究目的

A-1.背景

重篤な心疾患における病態進行や致死性不整脈発生に、循環器系の神経性調節の破綻が深く関わっていることが明らかとなってきた。近年、Liらは慢性心不全動物を用いて、迷走神経刺激が心不全動物の相対的死亡率を大幅に改善し、心臓リモデリングの抑制作用を示すことを報告した（図A-1）。この効果はこれまでの心不全動物を用いた薬物療法による治療効果を大きく上回るもので、神経インターフェース療法が不全心に対する新たな予防的治療法になりうる可能性を示している。しか

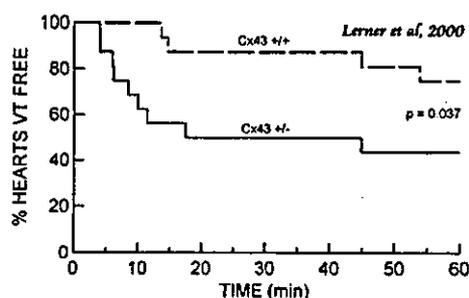
しながらその作用機序は未だ不明であり、迷走神経刺激療法の有効性・安全性を検討する上で、実際に生体内で迷走神経刺激により調節される標的となる分子を同定することが必要不可欠であると考えられる。



図A-1.迷走神経刺激による慢性心不全動物の生存率の改善効果

## A-2. 本研究課題を立案するに至った経緯

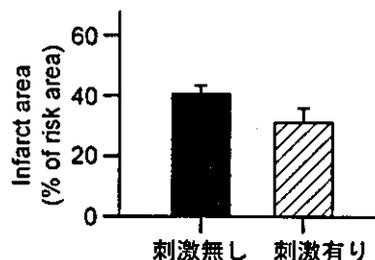
不全心に対する迷走神経刺激療法の死亡率の劇的な改善効果の一因としてその抗不整脈作用がある。心筋虚血時の不整脈発生機序としては、虚血部位のATP枯渇により心筋の電気活動を担う一連の膜輸送分子の連携が障害され局所的な興奮の伝導遅延が起こりリエントリー性の心室性頻拍が誘発されると説明されている。これら膜輸送分子の中で、近年の遺伝子ターゲティング法をもちいた一連の研究成果から、心室に大量に発現しているギャップ結合タンパク質ファミリーの1つであるコネクシン43 (Cx43) の機能障害が致死性不整脈の発生機序にかかわっていることが明らかになりつつある。Cx43のヘテロノックアウトマウス (Cx43<sup>+/-</sup>/Cx43<sup>-/-</sup>) に心筋梗塞を作成すると野生型に比べて心室性頻拍の発生率が3倍に増加すること(図A-2)、コンディショナルノックアウトマウス (Cx43<sup>+/+</sup>/Cx43<sup>-/-</sup>) では電気活動の伝導速度が有意に低下することが報告された。本研究ではこの細胞-細胞間コミュニケーション装置であるギャップ結合タンパク質が迷走神経刺激療法における標的分子の候補の一つと考えた。



図A-2.ギャップ結合発現量と不整脈発生頻度の関係

また、迷走神経刺激療法は梗塞後心臓リモデリングを予防し心機能の改善をもたらすこ

とから、迷走神経刺激は梗塞部と健常部の境界領域において心筋に対する細胞保護作用を有するものと予想された。そこで予備実験として、急性心筋虚血3時間後の梗塞領域を調べたところ、迷走神経刺激によりリスクエリア(虚血部)に対するインファクトエリア(梗塞部)の割合が減少することがわかった(図A-3)。

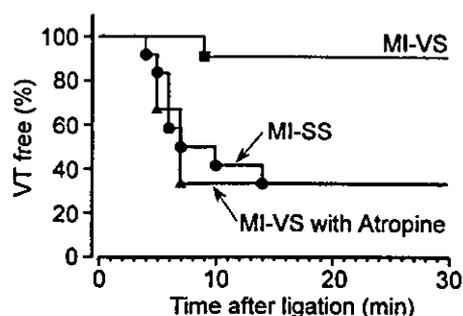


図A-3.心筋虚血3時間に対する迷走神経刺激の有無と梗塞領域の関係

## A-3. これまでの研究成果の概要

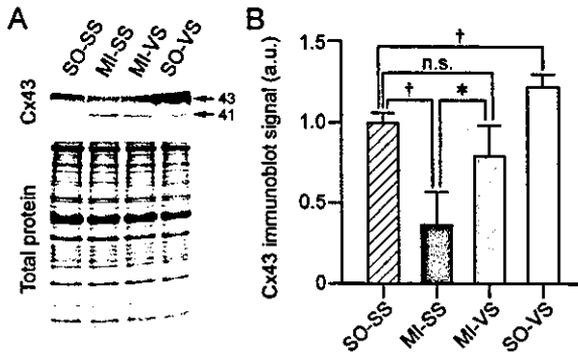
### A-3-1. 迷走神経刺激による抗不整脈作用

ラット左冠状動脈起始部の結紮により、急性心筋虚血(MI)動物を作製し、迷走神経刺激群(MI-VS)、偽刺激群(MI-SS)、コントロール群(偽手術-偽刺激, SO-SS)に分けた。その結果、急性心筋虚血時に誘発される致死性不整脈の発生が迷走神経刺激により抑制された、その抗不整脈作用はアトロピンでブロックされた(図A-4)。



図A-4.急性心筋虚血による致死性不整脈誘発に対する迷走神経刺激の抗不整脈作用

迷走神経刺激の有無とリン酸化 Cx43 の発現量が連動しており、虚血によりリン酸化 Cx43 (PCx43) の発現量が減少するのに対して、迷走神経刺激によりその発現量が保存されることがわかった (図 A-5)。



図A-5.迷走神経刺激の有無とリン酸化 Cx43 の発現の関係 (A) とそのデンストメトリー (B)

迷走神経刺激の有無と Cx43 の局在との関係を調べたところ、MI-SS 群 (非刺激群) では、虚血部位に限局してコネクシン 43 の陽性シグナルが减弱しているのに対して、MI-VS 群 (刺激群) では SO-SS 群 (コントロール群) と同様に介在板に局在して陽性シグナルが観察された (図 A-6)。

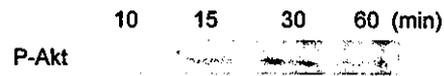


図A-6.迷走神経刺激の有無と Cx43 の局在の関係

### A-3-2.迷走神経刺激による細胞保護作用

迷走神経刺激により虚血モデル心の梗塞領域が減少することから (図 A-3), 迷走神経刺激は心筋細胞保護作用を有すると考えられた。また、迷走神経刺激の抗不整脈作用はアトロピンでブロックされることから (図 A-4), 迷走神経の電気刺激に始まる一連の情報伝達は

アセチルコリン (ACh) のムスカリニック受容体を介する反応から始まることが示唆された。そこで、ACh により活性化される一連の細胞内情報伝達系を明らかにするために心筋細胞初代培養系を用いて解析をおこなったところ、ACh の培養上清への添加により細胞生存シグナルの一つと考えられている Akt (protein kinase B) のリン酸化 (P-Akt) が誘導されることがわかった (図 A-7)。



図A-7.ACh による Akt のリン酸化作用

また最近の報告から、迷走神経刺激がマクロファージにおける TNF- $\alpha$  産生の抑制を介して抗炎症作用を持つことが明らかとなっている。そこで予備実験として急性心筋虚血モデル動物における迷走神経刺激の TNF- $\alpha$  の発現調節の有無を、心筋組織の RT-PCR で検討したところ、予想に反して虚血条件下での迷走神経刺激により TNF- $\alpha$  の mRNA が増加することがわかった (図 A-8)。



図A-8.迷走神経刺激による TNF- $\alpha$  mRNA の誘導

### B.研究方法

虚血モデル動物実験から明らかとなった迷走神経刺激の抗不整脈作用および細胞生存シグナルの増強作用の詳細なメカニズムを明らかにするためには、in vitro の実験系による解析が不可欠となる。そこで、本年度は心筋細胞初代培養系および心筋細胞由来の細胞株

HL-1を用いた解析システムを確立し(図B-1)、細胞レベルにおける ACh の心筋細胞への直接作用を調べた。

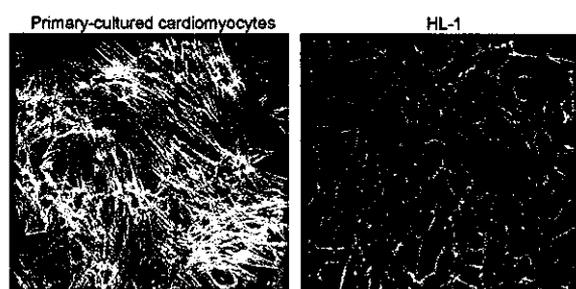


図 B-1. 心筋細胞初代培養系と心筋由来細胞株 HL-1 のCx43 (赤) とアクチン (緑) の2重染色

### B-1.ACh による電氣的リモデリング抑制効果

迷走神経刺激により虚血心において Cx43 の発現量が保存されることから、虚血条件下で迷走神経刺激をおこなえば心筋の細胞間コミュニケーション機能が增強されることが予想される。迷走神経刺激中の心臓表面での興奮伝導を膜電位感受性色素を利用した光学マッピングで検討することも考慮されたが、現段階で迷走神経を保存した状態での摘出心の標本作製技術が未完成であるため、本年度は単離心筋細胞をいったん培養系におとしてギャップ結合を再構築させた *in vitro* 解析系を確立した。ACh を培養上清に添加することにより *in vitro* 実験系において *in vivo* 実験系を再現できるアッセイ系を構築した。

#### B-1-1.ACh の Cx43 の発現量に与える影響

培養系に低酸素条件を負荷した。酸素を酸素ガスで置換し酸素濃度を 2%以下に保持したインキュベータ内に培養シャーレを挿入し、30 分後にサンプリングした。低酸素条件下の

心筋細胞初代培養系における ACh の Cx43 の発現量に対する影響を検討した。また迷走神経刺激のリン酸化 Cx43 の保存効果を証明するため、タンパク分解系の阻害剤 (MG132, proteasomal inhibitor) を用いてその効果を検証した。

#### B-1-2.ACh の細胞間コミュニケーションに与える影響

ACh の細胞-細胞間コミュニケーションに与える影響を検討するため、細胞内微小電極により電気泳動的にルシファーイエロー色素 (LY) を培養細胞内に注入し、実時間で LY の拡散を観察した。LY 注入細胞からその周辺細胞への LY の拡散を指標にして、ギャップ結合を介する細胞間コミュニケーション機能を判定した。塩化コバルトによる化学的低酸素負荷に対する ACh の影響を検討した。

#### B-2.ACh による細胞生存シグナルの増強作用

急性心筋虚血に対して迷走神経刺激を行うと、刺激をしない場合より梗塞領域が減少すること (図 A-3)、ACh により細胞生存シグナルの一つである Akt のリン酸化が誘導されることから (図 A-7)、虚血にさらされる領域の心筋細胞は ACh により、より細胞生存の方向に傾くことが予想された。そこで細胞培養系を用いて、ACh の培養上清への添加による細胞生存シグナルの変化を検討した。

#### B-2-1.ACh と PI3K/Akt カスケードの関係

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の阻害剤 (wortmannin) を用いて、ムスカリニッ

ク受容体を介する ACh の心筋細胞への作用が実際に PI3K/Akt カスケードを介するのかどうかを検討した。

#### B-2-2.ACh のミトコンドリア機能への作用

ACh による心筋細胞保護作用を証明するために、化学的低酸素負荷に対するミトコンドリア障害性を指標にした ACh の作用を検討した。アポトーシスの過程で生じるミトコンドリア膜電位の消失を検出することができる陽イオン性色素の DePsipher (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcyanine iodide) を用いて、ACh の培養上清への添加による化学的低酸素負荷に対するミトコンドリア機能の変化を調べた。アポトーシスに関係するカスパーゼ 3 の活性化状態の変化を調べた。同様に、アポトーシスに関係するチトクローム C の動態を、細胞分画とミトコンドリア分画に区別して詳細に解析した。

#### B-3.ACh による TNF- $\alpha$ 誘導作用

虚血条件下での迷走神経刺激により心筋組織における TNF- $\alpha$  の mRNA が増加することから (図 A-8)、迷走神経刺激により心筋細胞から TNF- $\alpha$  が合成されている可能性があるかと予想された。そこで、化学的低酸素負荷条件下で ACh を培養上清へ添加した場合に、実際に心筋細胞で TNF- $\alpha$  が合成されているかどうかを、イムノプロテイングと免疫組織化学により検討した。また、TNF- $\alpha$  の受容体である TNFR1 と TNFR2 の mRNA の発現と ACh の関連について RT-PCR により調べた。

#### B-4.動物実験における倫理面への配慮

全ての動物実験は、「動物の保護および管理に関する法律, 法律第 105 号, 平成 11 年改定」および「実験動物の飼養及び保管等に関する基準, 昭和 55 年総理府告示第 6 号」に基づく日本生理学会による「生理学領域における動物実験に関する基本的指針, 平成 15 年改定」に従い、高知大学医学部附属動物実験施設の承認を得て行った。

### C.研究結果

#### C-1.ACh による電気的リモデリング抑制効果

心筋細胞初代培養系に低酸素負荷 (hypoxia) をかけると PCx43 の発現量は減少するのに対して、ACh (ACh+Hypoxia) によりその発現量はコントロールレベルに保存され、その効果はアトロピンによりブロックされた (図 C-1)。ACh の単独投与では PCx43 の発現量はコントロールレベルより増加する傾向にあった。培養細胞系においても、虚血モデル動物を用いた迷走神経刺激の効果を再現することができた。

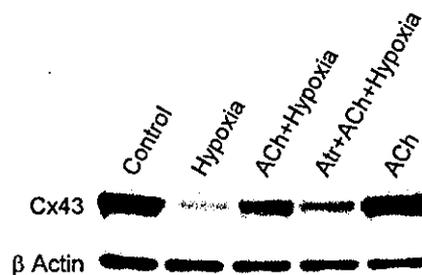


図 C-1. 心筋細胞初代培養系における ACh の Cx43 の発現に与える影響

ACh の PCx43 に与える効果が、その合成系に関係するのか、あるいは分解系に関係するのかを明確にするために、低酸素負荷条件

下の心筋細胞初代培養系にプロテアソーム阻害剤の MG132 を添加したところ (図 C-2), 30 分の低酸素負荷にもかかわらず Cx43 の発現量が保存されることがわかった。

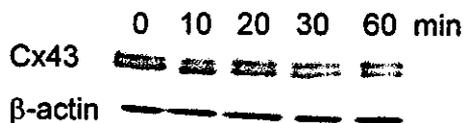


図 C-2. タンパク分解系阻害剤 MG132 の Cx43 の発現に与える影響

ACh により PCx43 の発現量が保存されることから, 低酸素条件下においても心筋細胞どうしの細胞間コミュニケーション機能が正常に維持されていることが予想された。LY 色素 (黄) 注入法により細胞間コミュニケーションの状態を調べたところ (図 C-3), コントロールで色素注入細胞から周辺細胞への色素の拡散が確認された。化学的低酸素負荷条件下 (CoCl<sub>2</sub>) では色素は注入細胞に留まったのに対して, ACh の添加により (ACh+CoCl<sub>2</sub>) 周辺細胞への色素の拡散が生じた。この効果はアトロピンでブロックされた。ACh 単独投与では色素の拡散と自発収縮による同期性が著しく増強された。

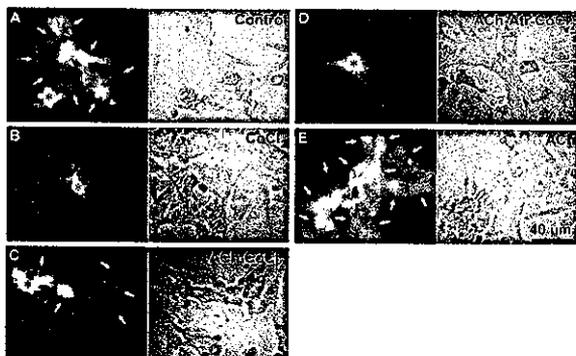


図 C-3. ACh の細胞間コミュニケーション機能への作用

### C-2. ACh による細胞生存シグナルの増強作用

用

ACh により誘導される Akt のリン酸化作用が, wortmannin でブロックされることから (図 C-4), ACh から始まるシグナル伝達系が, 細胞生存シグナルの一つである PI3K/Akt 系を介することが証明された。

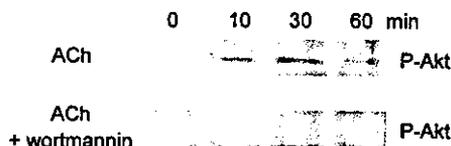


図 C-4. ACh による PI3K/Akt カスケードを介する細胞生存シグナルの増強作用

化学的低酸素負荷 (CoCl<sub>2</sub>) に対して DePsipher によるミトコンドリア内膜の膜電位由来の蛍光が消失するのに対して, ACh の添加により (ACh+CoCl<sub>2</sub>) その膜電位に由来する蛍光 (赤) が観察された (図 C-5A)。また, 低酸素負荷で増大するカスパーゼ 3 の活性化が ACh の添加により時間経過とともに抑制されることがわかった (図 C-5B)。

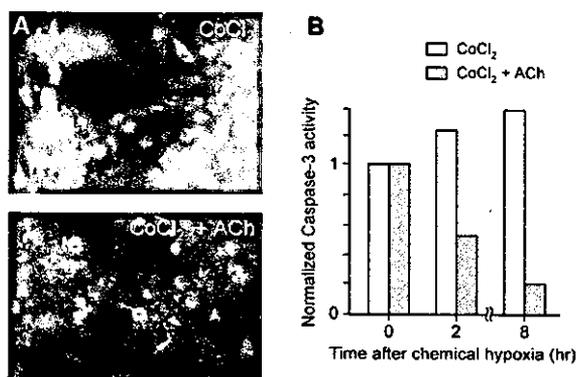


図 C-5. 化学的低酸素負荷に対する ACh のミトコンドリア保護作用

心筋細胞内でのチトクローム C の動態を調べたところ, 化学的低酸素負荷 (CoCl<sub>2</sub>) により細胞質に分布するチトクローム C が増大するのに対して, ACh の添加により