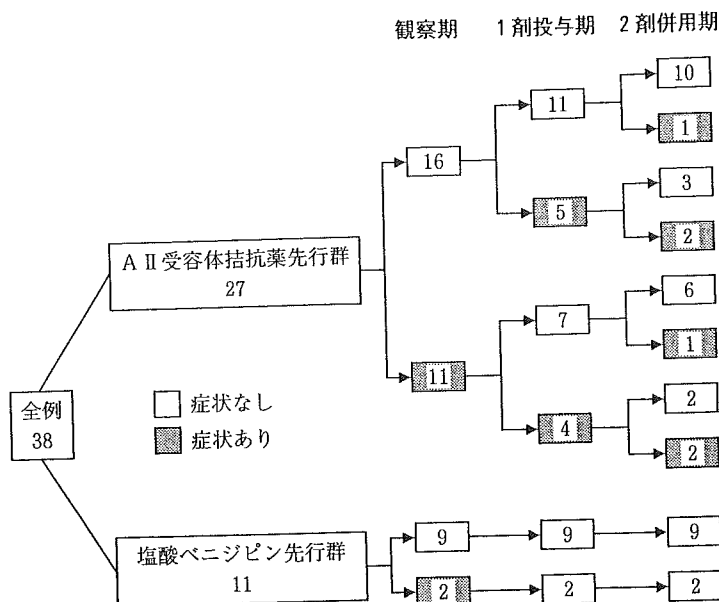


図2 症状の変化



うな自覚症状出現などの副作用もほとんど見られず、両剤の併用は高血圧治療において有用かつ安全であると考えられた。

現在、我が国で最も多く使用されている降圧剤はCa拮抗薬であり、その使用頻度は約70%程度と報告^{3)~6)}されている。Ca拮抗薬が多く用いられる理由として、降圧効果が優れていること、副作用が少ないこと、合併症があっても比較的安全に使用できることが挙げられる。また、我が国の心血管イベントは脳血管障害が多く、STONE¹⁹⁾、HOT study²⁰⁾、Syst-Eur²¹⁾等の大規模介入試験により、Ca拮抗薬は脳血管障害に対しての有用性が確立していることも理由の1つである。

最近発表されたALLHAT⁷⁾やStaessenらのメタ解析⁸⁾では、降圧薬の作用機序よりも積極的降圧が重要であることが示唆されており、その結果はJNC7など診断治療指針にも反映されている。また、十分な降圧効果を得られない場合には多剤併用が勧められており、診断治療指針による違いはあるにしても、合併症のない症例では利尿薬、Ca拮抗薬、ACE阻害薬、A II受容体拮抗薬、β遮断薬の5剤から、2剤または3剤の併用が推奨されている^{9)~13)}。2001

年に行われた我が国でのアンケート調査では、これまで用いた2剤併用の組み合わせとしては、第一位がCa拮抗薬+ACE阻害薬(72.4%)、第二位がCa拮抗薬+A II受容体拮抗薬(16.9%)であったが、将来使用する予定の組み合わせとしては、第一位がCa拮抗薬+A II受容体拮抗薬(56.3%)、第二位がCa拮抗薬+ACE阻害薬(24.7%)であった³⁾。諸外国ではすでに、Ca拮抗薬+ACE阻害薬、利尿薬+ACE阻害薬、利尿薬+A II受容体拮抗薬、利尿薬+β遮断薬などの合剤が販売されており、それらの組み合わせの有用性も報告¹²⁾されているが、Ca拮抗薬とA II受容体拮抗薬併用についての報告²²⁾²³⁾は少なく、塩酸ベニジピンとの併用の評価については今回の報告が初めてである。

今回の検討では、2剤の併用で収縮期血圧 -35 ± 17 mmHg、拡張期血圧 -12 ± 16 mmHgの降圧が得られ、最終的に血圧が140/90mmHgの降圧目標値を達成できた症例は全体の61%であった。これは、我が国の高血圧診療におけるこれまでの報告⁶⁾と同等であるが、JNC7およびESH/ECS2003の診断基準を用いた評価であり、今回の結果を我が国の老年者の高血圧治療ガイドライン¹¹⁾にそって年齢別(70歳未満140/

90mmHg 未満, 70歳代150/90mmHg 未満, 80歳以上160/90mmHg 未満) に評価すると, 70歳未満71%, 70歳代67%, 80歳以上100%, 全体では74%と, 十分な降圧が可能であったと考えられた。

ACE 阻害薬は, すでに国内外での様々な臨床研究によって生命予後の改善効果が報告¹⁾²⁴⁾されており, 心不全など合併症のある症例には積極的に用いるよう推奨されている。A II 受容体拮抗薬も降圧効果が Ca 拮抗薬, ACE 阻害薬と同等で, 副作用の頻度も Ca 拮抗薬, ACE 阻害薬などより少ないこと²⁵⁾, また, LIFE²⁶⁾, CHARM²⁷⁾ などの大規模治験でも心血管イベント抑制効果が示されたことから, 合併症のない高血圧症では第一選択薬の1つとして推奨されている^{9)~11)13)}。また, これら2剤は弱いながらも交感神経活動を抑制することが報告²⁸⁾²⁹⁾されており, Ca 拮抗薬と併用する場合は, Ca 拮抗薬の降圧による反射性交感神経活動性の亢進やレニン-アンジオテンシン系の亢進を抑制することが期待される。

一方, 塩酸ベニジピンは, 降圧効果と安全性について, 単独投与時³⁰⁾³¹⁾, および利尿薬・β遮断薬の効果不十分例における併用時³²⁾, さらに ACE 阻害薬の効果不十分例における併用時³³⁾について報告されており, 我が国においてよく処方されている Ca 拮抗薬の1つである。今回の検討では, 塩酸ベニジピンと A II 受容体拮抗薬の併用においてそのどちらを先行投与しても十分な降圧が得られ, 脈拍数には有意な変化は認められなかった。1剤投与期ではその降圧効果が十分でなかったため交感神経活性の亢進による反射性の頻脈が見られなかったと考えられるが, 2剤併用期においては, 降圧に対する交感神経活性の亢進を A II 受容体拮抗薬と塩酸ベニジピンが抑制した可能性がある。

Singer ら³³⁾ は Ca 拮抗薬 (ニフェジピン 20 mg 徐放剤) と ACE 阻害薬 (カプトプリル 25 mg) の併用の検討を報告しているが, 単独投与より併用投与の降圧効果が大きく, 平均血圧

で -22~28mmHg 降圧し, 投与順序による違いも認められなかったと報告している。しかし, A II 受容体拮抗薬は ACE 阻害薬に比し降圧効果が同等で, 咳などの副作用が少なく, 認容性が大きい点を考慮すれば, A II 受容体拮抗薬の併用の方がより有用である可能性がある。今回の検討でも併用後に重篤な副作用はなく, また 65歳以上の高齢者が 25例 (66%) 含まれており, 高齢者でも安全に使用できると考えられた。

塩酸ベニジピンと併用したロサルタン, カンデサルタン, バルサルタンはそれぞれ, 降圧効果や組織親和性, 代謝系への影響に特徴が見られるか³⁴⁾³⁵⁾, 併用後の降圧度や脈拍数, 検査値の変化に有意な差を認めなかった。しかし, 今回の検討では症例数が少なく, 今後症例数を増やしての検討が必要であると考えられる。また, 今回の検討では, 観察開始時に少数例で他の降圧薬を服用していたが, それらの症例においても重篤な副作用や症状の悪化は認めなかった。2剤で降圧が不十分な症例において, 3剤の併用では降圧効果は増大するが, その反面, 副作用も増加すると考えられるので, 今後十分な症例数で 3剤併用の検討が必要であると考えられる。さらに, 今回の検討では, 投与期間を限定せず評価したため, 症例によってばらつきがあるが, これも投与期間をそろえたプロトコルを用い評価する必要がある。

文 献

- 1) Estacio, R. O., Jeffers, B. W., Hiatt, W. R., Biggerstaff, S. L., Gifford, N., Schrier, R. W. : The effect of nisoldipine as compared with enalapril on cardiovascular outcomes in patients with non-insulin-dependent diabetes and hypertension, *N. Engl. J. Med.* 338, 645, 1998.
- 2) Sowers, J. R. : The fosinopril versus amlodipine cardiovascular events trial (FACET) and combination therapies, *Am. J. Cardiol.* 82, 15R~19R, 1998.
- 3) 医薬イヤーブック2001 : 新薬市場とR&Dの動向,

- 月刊ミクス増刊, 184, 2001.
- 4) Saito, I., Kawabe, H., Tsujioka, M., Hirose, H., Shibata, H. : Trends in pharmacologic management of hypertension in Japan one year after the publication of the JSH 2000 guidelines. First Japanese Society of Hypertension, *Hypertens. Res.* 25, 175~178, 2002.
 - 5) 上島悦子, 藤本勝博, 黒川信夫ほか : 高血圧患者における降圧薬使用動向 最近の変化, *血圧* 5, 595~600, 1998.
 - 6) 大久保孝義, 小原 拓, 舟橋 仁, 菊谷昌浩, 橋本潤一郎, 今井 潤 : 家庭血圧コントロール状況に関する全国調査研究 (J-HOME研究) 中間報告 2003年4月末における対象患者1533人の家庭血圧状況, *Therapeutic Research* 24, 1849~1855, 2003.
 - 7) ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group : The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic, The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT), *JAMA*. 288, 2981~2997, 2002.
 - 8) Staessen, J. A., Wang, J. G., Thijs, L. : Cardiovascular prevention and blood pressure reduction, a quantitative overview updated until 1 March 2003, *J. Hypertens.* 21, 1055~1076, 2003.
 - 9) Guidelines Subcommittee of the WHO-ISH Mild Hypertension Liaison Committee, 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension, *J. Hypertens.* 17, 151~183, 1999.
 - 10) Japanese Society of Hypertension Guidelines Subcommittee for the Management of Hypertension : Guidelines for the management of hypertension for general practitioners, *Hypertens. Res.* 24, 613~634, 2001.
 - 11) 厚生労働省長寿科学総合研究班 : 老年者高血圧治療ガイドライン2002年改訂版, *日老医誌* 39, 322~351, 2002.
 - 12) Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo Jr., J. L., Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright Jr., J. T., Roccella, E. J. : Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute ; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, *Hypertension* 42, 1206~1252, 2003.
 - 13) Guidelines Committee : 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension, *J. Hypertens.* 21, 1011~1053, 2003.
 - 14) de Leeuw, P. W., Notter, T., Zilles, P. : Comparison of different fixed antihypertensive combination drugs, a double-blind, placebo-controlled parallel group study, *J. Hypertens.* 15, 87~91, 1997.
 - 15) Bakris, G. L., Weir, M. R., DeQuattro, V., McMahon, F. G. : Effects of an ACE inhibitor/calcium antagonist combination on proteinuria in diabetic nephropathy, *Kidney Int.* 54, 1283~1289, 1998.
 - 16) 南大阪循環器懇話会 : 塩酸ベニジピンと ACE 阻害薬併用による本態性高血圧症に対する長期投与の有用性の検討, *血圧* 5, 1205~1216, 1998.
 - 17) 佐野博志, 古田 豊, 松岡 彰, 河原 淳, 前橋延光, 池田嘉弘, 金 鐘一 : ACE 阻害薬効果不十分例に対する塩酸ベニジピン (コニール錠) の効果, *Therapeutic Research* 21, 943~

- 954, 2000.
- 18) The Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, The National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee, The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure, *Arch. Intern. Med.* **157**, 2413~2446, 1997.
 - 19) Gong, L., Zhang, W., Zhu, Y., Zhu, J., Kong, D., Page, V., Ghadirian, P., LeLorier, J., Hamet, P. : Shanghai trial of nifedipine in the elderly (STONE), *J. Hypertens.* **14**, 1237~1245, 1996.
 - 20) Hansson, L., Zanchetti, A., Carruthers, S. G., Dahlof, B., Elmfeldt, D., Julius, S., Menard, J., Rahn, K. H., Wedel, H., Westerling, S. : Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension, principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial, HOT Study Group, *Lancet* **351**, 1755~1762, 1998.
 - 21) Tuomilehto, J., Rastenyte, D., Birkenhager, W. H., Thijs, L., Antikainen, R., Bulpitt, C.J., Fletcher, A. E., Forette, F., Goldhaber, A., Palatini, P., Sarti, C., Fagard, R. : Effects of calcium-channel blockade in older patients with diabetes and systolic hypertension. Systolic Hypertension in Europe Trial Investigators, *N. Engl. J. Med.* **340**, 677~684, 1999.
 - 22) 吉永 馨, 荒川規矩男, 飯村 攻, 阿部圭志, 猿田享男, 矢崎義雄, 荒川正昭, 荻原俊男, 日和田邦男, 柗山幸志郎 : 本態性高血圧症に対するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 CGP48933 (Valsartan) の臨床評価 Ca拮抗薬併用療法, *臨床医薬* **14**, 1837~1857, 1998.
 - 23) Morgan, T., Anderson, A. : A comparison of candesartan, felodipine, and their combination in the treatment of elderly patients with systolic hypertension, *Am. J. Hypertens.* **15**, 544~549, 2002.
 - 24) Hansson, L., Zanchetti, A., Carruthers, S. G., Dahlof, B., Elmfeldt, D., Julius, S., Menard, J., Rahn, K. H., Wedel, H., Westerling, S. : Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension, principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group, *Lancet* **351**, 1755~1762, 1998.
 - 25) Dickstein, K., Kjerkshus, J. : OPTIMAAL Steering Committee, for the OPTIMAAL Study Group : Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction, the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan, *Lancet* **360**, 752~760, 2002.
 - 26) Dahlof, B., Devereux, R. B., Kjeldsen, S. E., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Ibsen, H., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., Lindholm, L. H., Nieminen, M. S., Omvik, P., Oparil, S., Wedel, H. : LIFE Study Group : Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE), a randomised trial against atenolol, *Lancet* **359**, 995~1003, 2002.
 - 27) Pfeffer, M. A., Swedberg, K., Granger, C. B., Held, P., McMurray, J. J., Michelson, E. L., Olofsson, B., Ostergren, J., Yusuf, S. : for the CHARM Investigators and Committees : Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure, the CHARM-Overall programme, *Lancet* **362**, 759~766, 2003.
 - 28) Noll, G., Wenzel, R. R., de Marchi, S.,

- Shaw, S., Luscher, T. F. : Defferential effects of captopril and nitrates on muscle sympathetic nerve activity in volunteers, *Circulation* 95, 2286~2292, 1997.
- 29) Struck, J., Muck, P., Trubger, D., Handrock, R., Weidinger, G., Dendorfer, A., Dodt, C. S. : Effects of selective angiotensin II receptor blockade on sympathetic nerve activity in primary hypertensive subjects, *J. Hypertens.* 20, 1143~1149, 2002.
- 30) 阿南 太, 鶴田芳男, 油布邦夫, 高橋尚彦, 重松作治, 原 政英, 吉松博信 : 本態性高血圧症患者における長時間作用型Ca拮抗薬の降圧目標値への到達度についての検討 塩酸ベニジピンとベシル酸アムロジピンの比較研究, *Therapeutic Research* 23, 2485~2492, 2002.
- 31) 大塚邦明 : 本態性高血圧症患者における塩酸ベニジピン6mg単独投与による有効性および安全性 家庭血圧による効果判定, *臨牀と研究* 77, 1788~1796, 2000.
- 32) 吉永 馨, 飯村 攻, 阿部圭志, 石井當夫, 猿田享男, 金子好宏, 伊藤敬一, 増山善明, 国府達郎, 荒川規矩男, 清水直容 : 本態性高血圧症に対する Benidipine Hydrochloride (KW-3049) の長期投与時の降圧効果と安全性の検討, *薬理と治療* 18 (Suppl. 4) S763~S784, 1990.
- 33) Singer, D. R., Markandu, N. D., Shore, A. C, MacGregor, G. A. : Captopril and nifedipine in combination for moderate to severe essential hypertension, *Hypertension* 9, 629~633, 1987.
- 34) Conlin, P. R., Spence, J. D., Williams, B., Ribeiro, A. B., Saito, I., Benedict, C., Bunt, A. M. : Angiotensin II antagonists for hypertension, are there differences in efficacy? *Am. J. Hypertens.* 13, 418~426, 2000.
- 35) Kim, S. : Tendency and prospect of the development of new ARBs, *Nippon Rinsho* 60, 1881~1886, 2002.

特集

バイオニックラットからの提言 ：迷走神経の電気刺激療法

佐藤 隆 幸*

はじめに

心不全の病態の解明や治療薬の開発が精力的に行われ、生命予後や生活の質の改善が図られつつある。しかしながら、重症心不全の場合には、現在でも、心移植以外には劇的な効果を期待できる治療法は存在しない。

最新の病態に関する研究により、心不全の重要な予後規定因子として、循環調節機構の破綻が上げられている。当初は、心機能低下の代償機転として適応的にはたらいっていた交感神経系の活性化と副交感神経系の活動低下やレニン・アンジオテンシン系の活性化がしだいに心臓リモデリングを進展・悪化させ、一種の悪循環を形成し、最終的には調節破綻に陥ると考えられるようになってきた¹⁻³⁾。さらに、ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction)⁴⁾ や CIBIS II (Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II)⁵⁾ といった大規模臨床試験により、心臓迷走神経活動の低下や心拍数の増加が予後不良因子であることが確認されるにいたった。

以上のようないわば観察研究から得られた知見をより直接的に検証し、新しい治療法を開発する第一歩として、迷走神経の電気刺激療法が心不全の病態や予後にどのような影響を与えるかを動物実験で検討した。

遠隔操作可能な埋込型迷走神経刺激システム

上記のような研究を行うためには、自由行動ラットの迷走神経を任意の刺激パターンで電気刺激するための埋込型装置が必要である。そこで、無

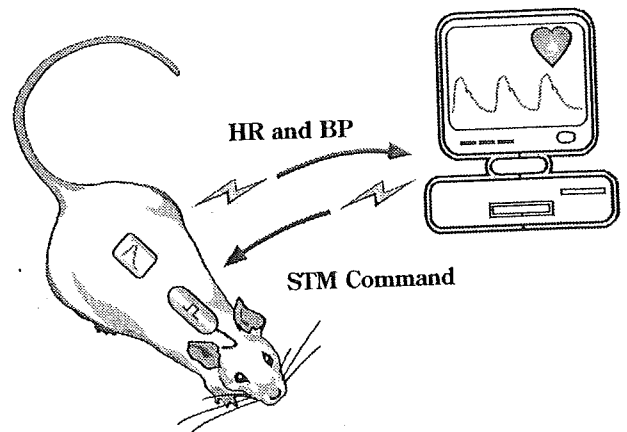


図1 遠隔操作可能な埋込型迷走神経刺激システムの概要

体内に埋め込まれた電気刺激装置は、コンピュータからの指令信号(STM Command)によって遠隔操作される。また、埋め込まれた送信器からは心拍数(HR)と血圧(BP)の情報が送られ、刺激強度の決定に用いられる。

線遠隔操作が可能な小型電気刺激装置および制御システムを構築した。図1に示すように、体内に埋め込まれた送信器から血圧信号が送られ、受信器を介してコンピュータに入力される。コンピュータは血圧信号をストレージするとともに、血圧波形から瞬時心拍を計算し、目標となる心拍数になるように刺激強度を操作する指令信号を電気刺激装置に送っている。

方 法

ハロセン麻酔下でラット左冠状動脈起始部を結紮し、左室の約50%を梗塞にし、実験的心不全モデルとした。心筋梗塞導入術24時間以内の死亡率は約60%であった。

術後7日目に再度麻酔下で刺激用ワイヤ電極を右頸部迷走神経に、刺激装置と送信器を腹部に埋

*高知大学医学部循環制御学教室

め込んだ。7日間の回復期間において、下記の実験プロトコールを開始した。

プロトコール 1：血行動態およびリモデリングに与える影響

梗塞後心不全ラットを無作為に刺激群と非刺激群に割り付け、刺激群では電気刺激時に心拍数が20ないし30拍/分程度減少するような刺激強度を設定し、毎分10秒間の電気刺激を繰り返し行った。なお、予備実験により、この刺激強度では、摂食・飲水行動に異常が見られないこと、痛み刺激とならないことを確認している。6週間の治療終了時に、ハロセン麻酔下で血行動態の測定および組織学的検討を行った。

プロトコール 2：長期生存率および液性因子に与える影響

プロトコール1と同様の治療を行った後、刺激を停止し、治療開始から140日間の生存率曲線を観察した。観察期間終了時まで生存していた例については採血し、血漿ノルエピネフリンおよび脳性ナトリウム利尿ペプチドを測定した。なお、小型電気刺激装置の駆動電源の電池寿命の限界から、その連続使用が制限されるため、治療期間を6週間に設定した。

結 果

A. 心機能およびリモデリングに与える影響

図2に電気刺激の心拍数に与える影響を示している。データは非刺激時の心拍数の24時間平均を一週毎に平均した値である。治療開始時には、梗塞後心不全群では、健常群に比べ心拍数の有意な増加がみられた。しかし、迷走神経刺激療法により、一週後から有意な心拍数の低下がみられ、6週後には、刺激群の心拍数は健常群のものと有意な差がみられなくなった。治療終了時の血行動態の測定結果は、図3に示されている。平均動脈圧は、梗塞後心不全群は、健常群に比べ、有意に低かった。梗塞後心不全群は、健常群に比べ、左室拡張末期圧の有意な上昇と左室圧一次微分最大値の有意な低下を示したが、迷走神経刺激療法により、左室拡張末期圧の有意な減少と左室圧一次微分最大値の有意な上昇が認められた。両心室重量が、梗塞後心不全群では有意な増加を示したが、迷走神経刺激療法により有意に減少した。以上の結果は、6週間の迷走神経刺激療法によってポンプ機能が改善し心室リモデリングが予防されたことを示唆する。なお、梗塞後心不全における刺激群と非刺激群とも梗塞サイズに差はなかった。

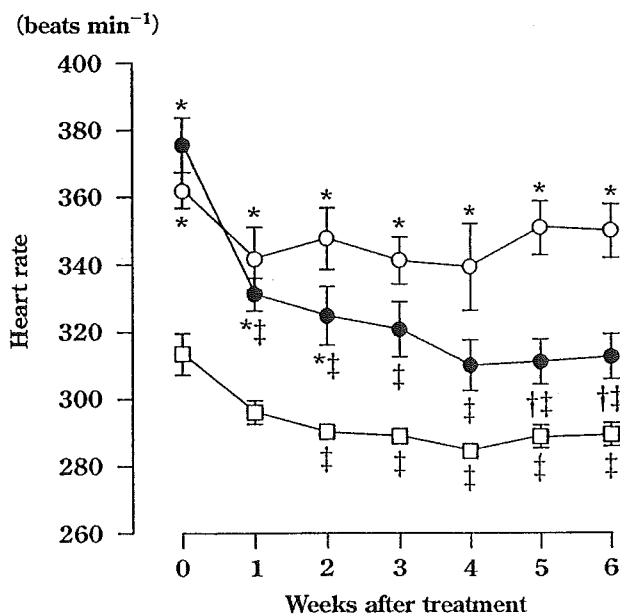


図2 迷走神経刺激の心拍数に与える影響

迷走神経刺激開始に伴う心拍数の変化を示している。健常群(□, n=9), 梗塞後心不全における非刺激群(○, n=13), 梗塞後心不全における刺激群(●, n=11). 値は、平均±標準誤差で示している。*, 健常群との有意差あり (P<0.05); †, 非刺激群との有意差あり (P<0.05); ‡, 各群における刺激前の値からの有意差あり (P<0.05).

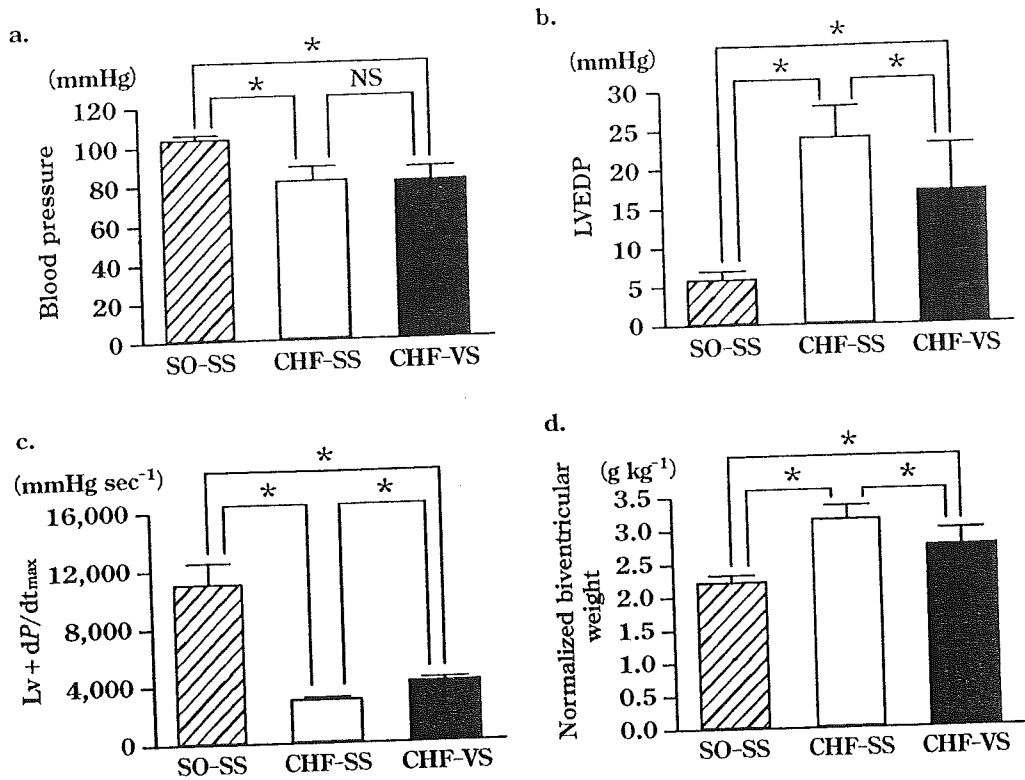


図3 迷走神経刺激の血行動態および両心室重量に与える影響

健常群(SO-SS, n=9), 梗塞後心不全における非刺激群(CHF-SS, n=13)および梗塞後心不全における刺激群(CHF-VS, n=11). 値は, 平均±標準偏差で示している. *, 有意差あり(P<0.05).

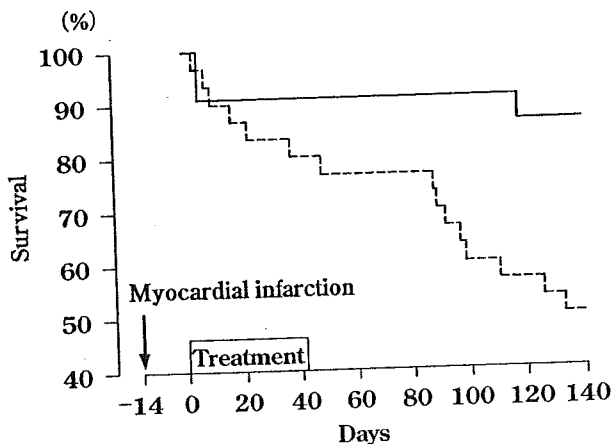


図4 迷走神経刺激の慢性心不全ラットの生存率に与える影響
実線は刺激群(n=22), 破線は非刺激群(n=30)を示す。

B. 長期生存率および液性因子に与える影響

迷走神経刺激療法の生存率に与える影響を Kaplan-Meier 法により解析した. 140日の観察期間における生存率曲線を図4に示す. 刺激群22例のうち死亡は3例, 非刺激群30例のうち死亡は15例であった(P=0.008, Fisherの直接法). このように, 迷走神経刺激療法は相対的死亡リスクを73%も減少させた.

迷走神経刺激療法は, 両心室重量, 血漿ノルエピネフリンおよび脳性ナトリウム利尿ペプチドを有意に減少させた. なお, これらの指標はいずれも臨床試験で明らかにされている予後規定因子で, 高値ほど予後不良とされているものである.

考 察

心筋梗塞後の重症慢性心不全の生命予後は極めて不良で, 2年生存率は約50%である. 心臓移植以外には有効な治療法がなく, 新しい治療戦略の開発が待たれている. そこで, 本研究では, 近年の大規模臨床試験により示されている「循環調節系の悪循環に起因する心臓迷走神経活動の低下や心拍数の上昇が重要な予後不良因子である」という点に着目し³⁻⁵⁾, 迷走神経の電気刺激を用いて, 心拍数を減少させた場合にその長期予後が改善するかどうかを梗塞後心不全モデルを用いた動物実験により検証した.

今回得られた結果は, 迷走神経の電気刺激療法が, 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, さらに, 長期生存率を劇的に改善させることを示唆している. 迷走神経の電気

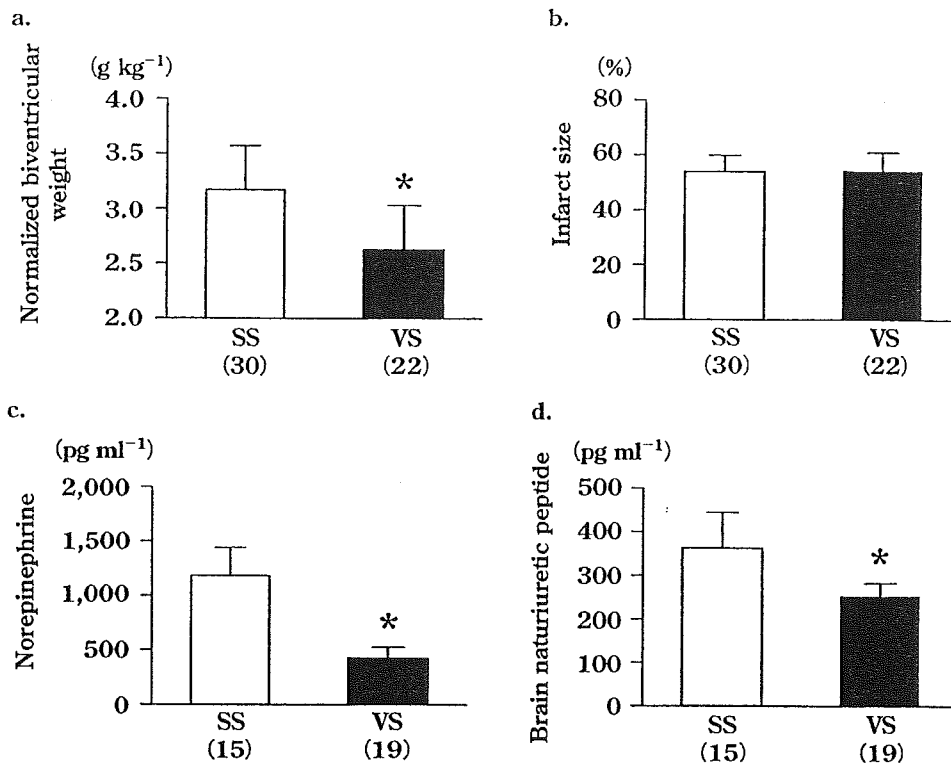


図5 迷走神経刺激の長期効果：両心室重量および液性因子に与える影響

非刺激群(SS)と刺激群(VS)の比較。かっこ内は例数を示す。値は、平均±標準偏差で示している。
*, 有意差あり ($P < 0.05$)。

刺激がこのような治療効果を発揮する機序として、迷走神経電気刺激の遠心性効果と求心性効果が想定される。

遠心性効果としては、心臓に対する交感神経の作用を減弱させる accentuated antagonism⁶⁾、心拍数低下による心臓のエネルギー効率の改善⁷⁾、血管内皮からの一酸化窒素遊離を介する冠循環の改善などが考えられる⁸⁾。その他にも最近、迷走神経刺激により肝臓内系における腫瘍壊死因子の産生が抑制されることが報告されているが⁹⁾、心不全におけるいわゆる悪液質 (cardiac cachexia) がこのような作用によって予防された可能性もある¹⁰⁾。一方、求心性効果としては、心肺受容器反射のように中枢を介した交感神経の抑制によって減負荷がもたらされる可能性がある¹¹⁾。

今回の研究成果で最も重要なのは、迷走神経刺激による予後改善効果が顕著である点である。アンジオテンシン変換酵素阻害薬カプトプリルが梗塞後心不全の生命予後を改善することを示した Pfeffer ら¹²⁾の成績は、用いられたモデルや治療開始時期が全く同じであることから、良い比較となる。彼らの成績でも、非治療群の平均的生存期間

はほぼ 140 日で我々の結果と同じであった。カプトプリル投与群では、140 日間の生存率が 60% で非治療群に比べわずかの改善にとどまっているのに対し、今回の成績では治療群における生存率が 86% であり、その効果はカプトプリルに比べ大きなものになっている。

これまでに我々は、生体制御系とインターフェイスしたり、生体制御系を機能的に置換して機能再建したり、あるいは治療する戦略をバイオニック医療と名付け、さまざまな具体的手法を示してきた^{13,14)}。例えば、心不全における循環調節破綻を中枢神経系に介入して是正し、その結果、心臓リモデリングを予防し心機能を温存できる可能性を報告している¹⁵⁾。今回用いた手法も同じような治療戦略に則ったものであるが、治療に用いた個々の要素的技術や装置はすでに臨床的に用いられているものである。例えば、埋込型の迷走神経刺激電極は難治性癲癇の治療に用いられている¹⁶⁾。また埋込型電気刺激装置は、心臓ペースメーカをはじめ数多くの治療機器として使用されている。今後は、より大規模で長期の試験を動物実験で繰り返し、安全性および有効性を検証し、有用性が

確認された場合には、万全の体制を組み、臨床試験へと展開したいと考えている。

ま と め

迷走神経の電気刺激は、梗塞後心臓リモデリングの予防と心機能の改善効果を有し、さらに、長期生存率を劇的に改善した。この新しい治療戦略「バイオニック医療」の今後の展開が期待される。

文 献

- 1) Pfeffer MA: Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med* 1995; 46: 455-66.
- 2) Cerati D, Schwartz PJ: Single cardiac vagal fiber activity, acute myocardial ischemia, and risk for sudden death. *Circ Res* 1991; 69: 1389-401.
- 3) Schwartz PJ, La Rovere MT, Vanoli E: Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation* 1992; 85 (suppl I): I 77-91.
- 4) La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, et al: Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351: 478-84.
- 5) Lechat P, Hulot JS, Escolano S, et al: Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II trial. *Circulation* 2001; 103: 1428-33.
- 6) Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, et al: Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res* 1991; 68: 1471-81.
- 7) Burkhoff D, Sagawa K. Ventricular efficiency predicted by an analytical model. *Am J Physiol* 1986; 250: R1021-7.
- 8) Zhao G, Shen W, Xu X, et al: Selective impairment of vagally mediated, nitric oxide-dependent coronary vasodilation in conscious dogs after pacing-induced heart failure. *Circulation* 1995; 91: 2655-63.
- 9) Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, et al: Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor- κ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* 2003; 107: 1189-94.
- 10) Mann DL: Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 2002; 8 (suppl): S379-86.
- 11) Mark AL: Sensitization of cardiac vagal afferent reflexes at the sensory receptor level: an overview. *Fed Proc* 1987; 46: 36-40.
- 12) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, et al: Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72: 406-12.
- 13) Sato T, Kawada T, Sugimachi M, et al: Bionic technology revitalizes native baroreflex function in rats with baroreflex failure. *Circulation* 2002; 106: 730-4.
- 14) Li M, Zheng C, Sato T, et al: Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 2004; 109: 120-4.
- 15) Sato T, Yoshimura R, Kawada T, et al: The brain is a possible target for an angiotensin-converting enzyme inhibitor in the treatment of chronic heart failure. *J Card Fail* 1998; 4: 139-44.
- 16) Reid SA: Surgical technique for implantation of the neurocybernetic prosthesis. *Epilepsia* 1990; 31 (suppl 2): S38-9.

特集

神経インターフェイス技法を用いた 心不全治療と術中血圧制御

佐藤 隆幸*

はじめに

循環器疾患では、心不全や圧反射失調のように制御機構の機能破綻が病態の悪化や予後を規定する因子になることが多い。そこで、積極的に循環制御機構の機能再建や最適化を図るための新しい治療戦略として、神経インターフェイス技法を用いたバイオニック療法が提唱されている¹⁾。

本研究では迷走神経の電気刺激による心不全治療²⁾および脊髄交感神経刺激による術中自動血圧制御に関する我々の研究成果について紹介する。

迷走神経刺激による慢性心不全治療

慢性心不全においては、呼吸性心拍変動の低下や心拍数増加が予後不良因子として知られている

が、これらはいずれも心臓迷走神経活動の低下を反映したものである³⁻⁷⁾。そこで、「迷走神経を電気刺激する (Vagal Nerve Electrical Stimulation, VES) 神経インターフェイス療法」が生命予後を改善するか否かを心不全モデル動物を用いて実験的に検証した。左冠状動脈起始部の結紮により、左室の40~50%が梗塞におちいった慢性心不全ラットの右迷走神経に刺激電極を固定し、植え込み型電気刺激装置と接続した。刺激強度は、心拍数が10~20%低下する程度にした。VES療法は6週間うち切り、血行動態・心臓リモデリングに与える影響と140日間の長期生存率を観察した。

A. 心機能およびリモデリングに与える影響

図1は、治療終了時の血行動態の比較を示している。平均動脈圧は、梗塞後心不全群は、健常群

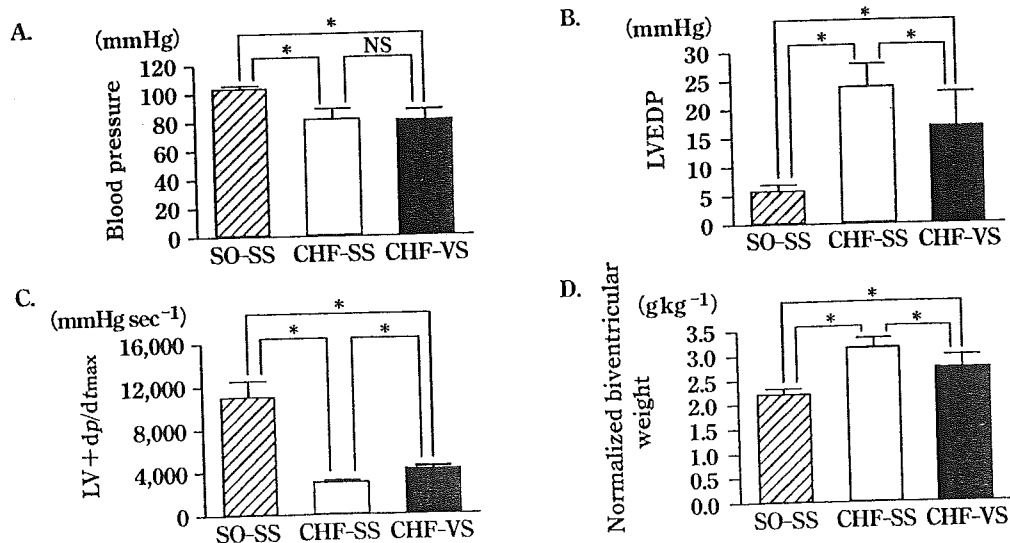


図1 迷走神経刺激の血行動態および両心室重量に与える影響

健常群 (SO-SS, n=9), 梗塞後心不全における非刺激群 (CHF-SS, n=13) および梗塞後心不全における刺激群 (CHF-VS, n=11). 値は、平均±標準偏差で示している。*, 有意差あり (p<0.05)。

*高知大学医学部循環制御学教室

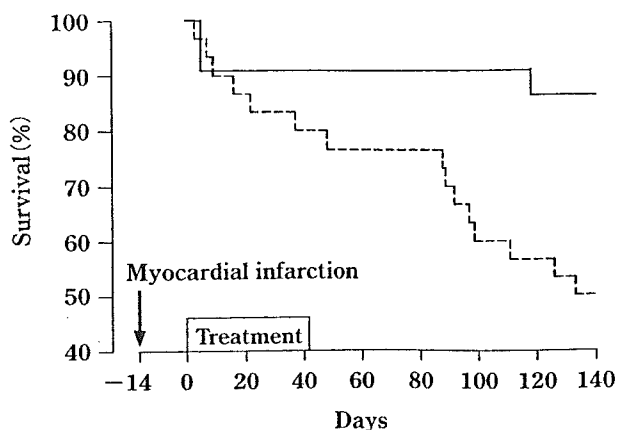


図2 迷走神経刺激の慢性心不全ラットの生存率に与える影響

実線は刺激群 (n=22), 破線は非刺激群 (n=30) を示す。迷走神経刺激により, 生存率は有意に改善した (p=0.008)。

に比べ, 有意に低かった。梗塞後心不全群は, 健常群に比べ, 左室拡張末期圧の有意な上昇と左室圧一次微分最大値の有意な低下を示したが, 迷走神経刺激療法により, 左室拡張末期圧の有意な減少と左室圧一次微分最大値の有意な上昇が認められた。両心室重量が, 梗塞後心不全群では有意な増加を示したが, 迷走神経刺激療法により有意に減少した。以上の結果は, 6週間の迷走神経刺激療法によってポンプ機能が改善し心室リモデリングが予防されたことを示唆する。なお, 梗塞後心不全における刺激群と非刺激群とも梗塞サイズに差はなかった。

B. 長期生存率および液性因子に与える影響

迷走神経刺激療法の生存率に与える影響をKaplan-Meier法により解析した。140日の観察期間における生存率曲線を図2に示す。刺激群22例のうち死亡は3例, 非刺激群30例のうち死亡は15例であった (p=0.008, Fisherの直接法)。このように, 迷走神経刺激療法は相対的死亡リスクを73%も減少させた。この効果は, アンジオテンシン変換酵素阻害薬によるものよりもさらに良好な成績であった⁸⁾。

迷走神経刺激療法は, 両心室重量, 血漿ノルエピネフリンおよび脳性ナトリウム利尿ペプチドを有意に減少させた。なお, これらの指標はいずれも臨床試験で明らかにされている予後規定因子で, 高値ほど予後不良とされているものである。

以上より, VES療法が心機能の改善とリモデリ

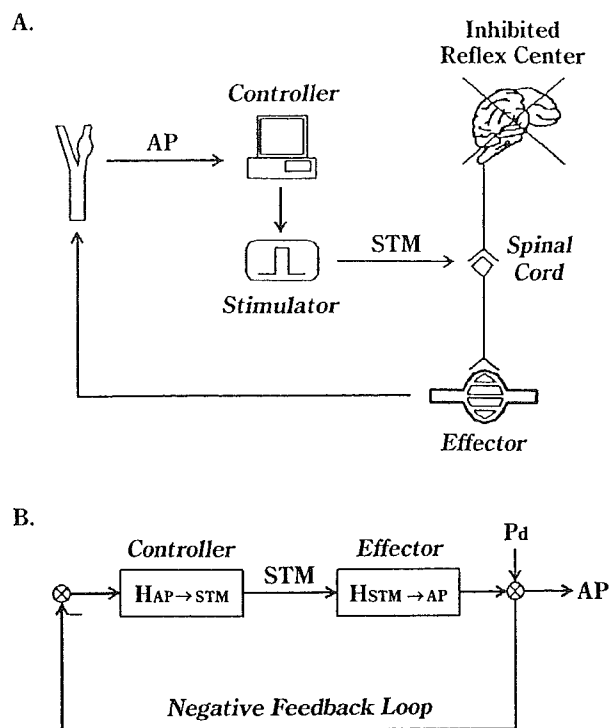


図3 バイオニック圧反射装置

バイオニック圧反射装置の概要(A)とブロック線図(B)。

ングを予防し, さらに, 長期予後を著明に改善することが明らかになった²⁾。今後は, 迷走神経電気刺激が予後改善効果を発揮するメカニズムの解明が待たれる。

脊髄交感神経刺激による術中血圧の自動制御

動脈圧受容器反射は短期血圧調節にきわめて重要な役割を果たしているが⁹⁾, 多くの麻酔薬がこの機能を抑制するため^{10,11)}, 少量の出血などでも予期せぬ血圧低下を来たすことがある^{12,13)}。そこで, 図3のように, 圧センサー→コンピュータ→電気刺激装置→硬膜外カテーテル電極を用いたバイオニック圧反射装置(Bionic Baroreflex System, BBS)を用いて, 血圧の自動制御を試みた。

A. 動作原理の開発戦略

サーボコントロールの原理を応用してBBSを試作した。サーボコントローラの動作原理としては, いわゆる, 比例・積分補償型のネガティブフィードバックを採用した¹⁴⁾。被制御変数である瞬時血圧 $AP(f)$ の標的 blood pressure $AP_t(f)$ からの偏差, すなわち, 制御誤差 $E(f)$ は, $E(f) = AP_t(f) - AP(f)$ とあらわされる。 $E(f)$ から脊髄交感神経刺激 $STM(f)$ までの伝達関数 $H_1(f)$ は, 比例補償係数 K_p と積分補償係数 K_i およびラプラス演算子 $s = 2\pi f j$ を用いると

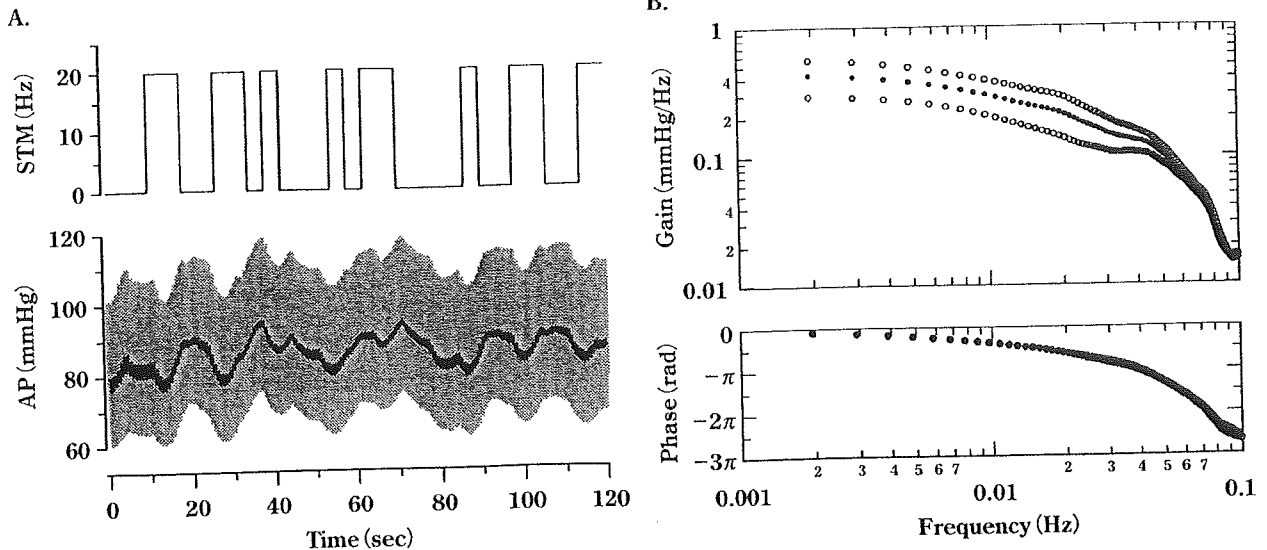


図4 脊髄交感神経の不規則刺激の例と伝達関数

不規則刺激 (STM) に対する動脈圧 (AP) の応答は緩徐である。伝達関数により刺激に対する動脈圧応答が定量的に推定可能になる。

次のようにあらわされる。

$$H_1(f) = K_p + \frac{K_i}{s}$$

また、脊髄交感神経刺激に対する血圧の応答特性を示す伝達関数を $H_2(f)$ とすると、被制御変数は次のようにあらわされる。

$$AP(f) = \frac{H_1(f)H_2(f)}{1+H_1(f)H_2(f)} AP_t(f) + \frac{1}{1+H_1(f)H_2(f)} AP_d(f)$$

ここで、 $AP_d(f)$ は、サーボコントロールシステムに加わる外乱である。上の式から明らかなように、外乱の影響は、 $1/(1+H_1(f)H_2(f))$ に抑制されることがわかる。

したがって、外乱に抗して血圧安定化を図るためには、 $H_1(f)$ の最適設計が必要である。そこで、まず、計測可能な $H_2(f)$ を次項のような方法で求め、次いで、数値シュミレーションにより $H_1(f)$ の係数 K_p および K_i を設計した。

B. サーボコントローラ的设计

頸椎手術症例で、術中に脊髄誘発電位検査を施行予定の患者を対象にした。吸入麻酔薬による全身麻酔の導入後、経皮的に硬膜外カテーテル電極を挿入し、第9ないし第12胸椎レベルに電極を留置した。次いで刺激パルズのパラメータをパルス幅 0.1 ミリ秒、刺激頻度 20Hz に設定した。刺激強度は、この刺激パルスにより平均動脈圧がおおむね 10mmHg だけ上昇する電流値に調整した。筋弛

緩薬投与下で、電気刺激装置に白色雑音様の不規則なトリガー信号を入力しながら、動脈圧の変動を 15 分間記録した。刺激パルスの頻度は、0 か 20Hz かのいずれかになるように 8 秒間隔毎に不規則に切り替えた。不規則刺激中の血圧応答の例を図 4A に、また推定された伝達関数 $H_2(f)$ を図 4B に示す。ついで、20 例で求めた平均的 $H_2(f)$ を用いて、ステップ状の血圧低下 (-20mmHg) に対する血圧サーボシステムの振る舞いを比例補償係数 $K_p=0, 1, 2$ 、積分補償係数 $K_i=0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2$ の組み合わせでシュミレーションした。 $K_p=1, K_i=0.1$ に決定した。

C. BBS の有効性の検証

膝の人工関節置換術時の下肢止血帯解除に伴う血圧低下を外乱と見なし、BBS の有効性を検証した。その結果、図 5 に示すように、BBS を用いることにより、迅速で安全な自動血圧管理が可能であることが明らかになった。

まとめ

神経インターフェイス技法に基づいたバイオンック療法が、慢性心不全に対する画期的な治療戦略となりうること、および、バイオンック圧反射装置により術中血圧を自動管理しうることを示唆する臨床研究結果を得ることができた。

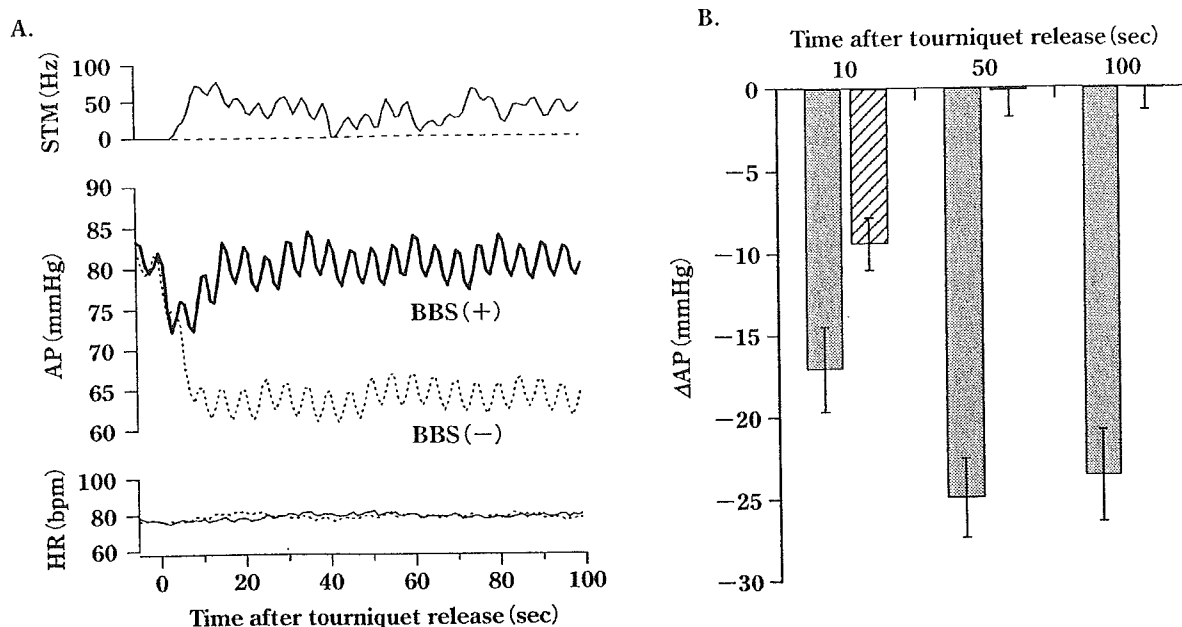


図5 バイオニック圧反射装置を用いた術中血圧制御
タニケット解除によって生ずる低血圧がバイオニック装置により防止された。

文 献

- 1) Sato T, Kawada T, Sugimachi M, et al: Bionic technology revitalizes native baroreflex function in rats with baroreflex failure. *Circulation* 2002; 106: 730-4.
- 2) Li M, Zheng C, Sato T, et al: Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 2004; 109: 120-4.
- 3) Pfeffer MA: Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med* 1995; 46: 455-66.
- 4) Cerati D, Schwartz PJ: Single cardiac vagal fiber activity, acute myocardial ischemia, and risk for sudden death. *Circ Res* 1991; 69: 1389-401.
- 5) Schwartz PJ, La Rovere MT, Vanoli E: Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation* 1992; 85(suppl. I): I 77-91.
- 6) La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, et al: Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351: 478-84.
- 7) Lechat P, Hulot JS, Escolano S, et al: Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II trial. *Circulation* 2001; 103: 1428-33.
- 8) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, et al: Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72: 406-12.
- 9) Sato T, Kawada T, Inagaki M, et al: New analytic framework for understanding sympathetic baroreflex control of arterial pressure. *Am J Physiol* 1999; 276: H2251-61.
- 10) Tanaka M, Nishikawa T: Arterial baroreflex function in humans anaesthetized with sevoflurane. *Br J Anaesth* 1999; 82: 350-4.
- 11) Keyl C, Schneider A, Hobbhahn J, et al: Sinusoidal neck suction for evaluation of baroreflex sensitivity during desflurane and sevoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 2002; 95: 1629-36.
- 12) Tarkkila PJ, Kaukinen S: Complications during spinal anesthesia: a prospective study. *Reg Anesth* 1991; 16: 101-6.
- 13) Kahn RL, Marino V, Urquhart B, et al: Hemodynamic changes associated with tourniquet use under epidural anesthesia for total knee arthroplasty. *Reg Anesth* 1992; 17: 228-32.
- 14) Kawada T, Sunagawa K, Takaki H, et al: Development of a servo-controller of heart rate using a treadmill. *Jpn Circ J* 1999; 63: 945-50.

脊髄硬膜外電気刺激を応用した周術期自動血圧管理システムの開発

健常者においては血圧の低下や上昇が引き起される状態に陥った場合でも圧受容器から延髄、交感神経系あるいは血圧関連ホルモンなどの受容器反射系のフィードバック機能 (baroreflex) によっておおむね恒常的に維持されている。しかし、周術期においては麻酔薬や手術操作の影響で圧受容器反射系の正常な機能が破綻したり、出血などの影響により予期せぬ血圧低下を引き起すことがある。そこで今回われわれは手術中に硬膜外を電気刺激する手法を応用してコンピュータ制御により自動的に血圧制御するシステムを開発したので報告する。

方法：本学で承認されたプロトコルに同意した整形外科手術患者 (20 例) に対して、動脈より A-line を確保してオンタイムで動脈圧情報を取り出し、制御用コンピュータに入力する。周術期に血圧制御中枢が機能不全に陥った状態においては A-line からの圧情報をもとに、血圧低下時にはコンピュータからの指令であらかじめ Th 10~Th 12 硬膜外腔に挿入していたカテーテル電極で、胸髄を介して腹部交感神経を刺激することで自動的に血圧管理を行う (図 1)。

検証項目：① 1 Hz の刺激がどれだけの速度でどれだけの血圧を上昇させる効果があるかを示すステップ応答関数の算出、② 脊髄刺激時のノルアドレナリンの血中濃度測定を行う、加えて③ 下肢止血帯を解除したときに起る血圧低下を本システムが自動的に血圧管理を行うことができるかの検証試験

を行う。

実施結果：

1) ステップ応答関数の算出：本法により 14 ± 5 秒で定常状態の 90%、ゲインは 1.0 ± 0.3 mmHg/Hz と俊敏で十分な血圧上昇応答が得られた (図 2)。

2) 血中ノルアドレナリン濃度：硬膜外刺激前後の血中ノルアドレナリンの濃度は刺激により有意な変化は認めなかった。このことは、本システムで引き起される血圧上昇がカテコラミン系を介していないことを示すものであり、交感神経系の賦活によるものと考えられた。このことはカテコラミン製剤薬剤感受性の低下を防ぐ手段にもなると考えられ、将来 ICU などにおける血圧管理法としても有効な手法になることが示唆された。

3) 自動血圧管理検証：本システムを使用せず、大腿部の止血帯を解放すると 25 ± 7 mmHg の血圧低下が引き起された。一方、本システム下では血圧は 30 秒以内に 1 例を除いて全例止血帯解除前の基準レベルに補正しえた。

まとめ：本自動血圧コントロールシステムは、① 血圧の補正時間が早いこと低血圧状態に伴う合併症が防げる、② 薬剤を使用しないので薬剤による副作用が予防できる、③ 従来の麻酔法と併用することで麻酔管理が容易になる、④ 血中ノルエピネフリン濃度の上昇を認めないことが証明された。今後は脳などの重要臓器血流量の検証などの問題について検証を行う必要があると考えている。

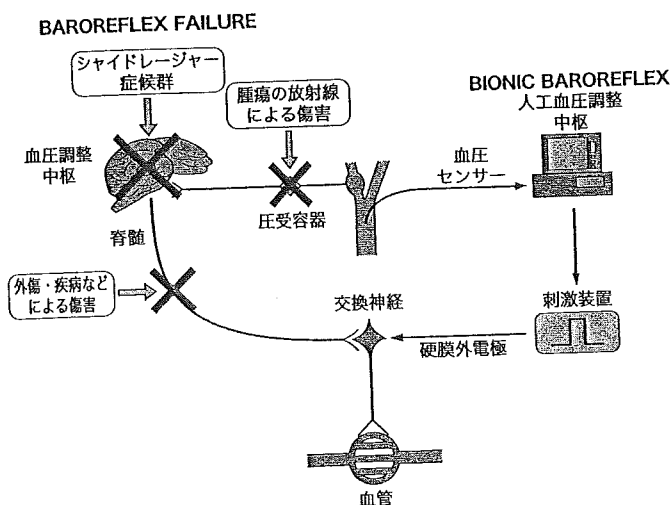


図 1. 概念図。周術期にはかならずしも本来備わっている baroreflex は機能しない (X) ため、体内に埋め込んだ血圧センサーから収縮期-拡張期血圧を感知し、自動血圧コントロールシステムを用いて脊髄硬膜外腔から交感神経を刺激して血圧をコントロールする。

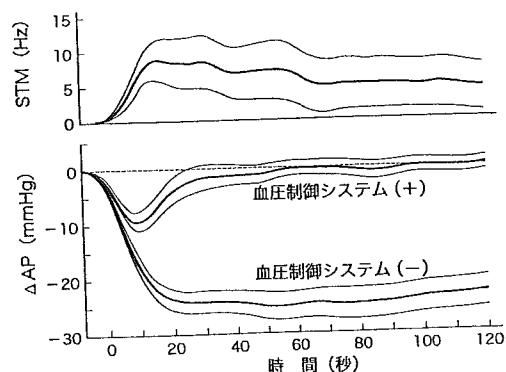


図 2. 血圧制御システムによる下肢止血帯解除時の血圧コントロール

(高知大学整形外科・牛田 享宏, 同麻酔科
・横山 武志, 同検査部・山崎 文靖, 同
整形外科・池本 竜則, 谷 俊一, 同循
環制御学・佐藤 隆幸)

が、今後注意深い観察が必要と思われる。

文 献

- 1) Moore TM, Klein JP, Patzakis MJ et al: Result of compression-plating of closed Galeazzi fractures. J Bone Joint Surg 67-A : 1015-1021, 1985
- 2) 鈴木雅博, 西川真史, 長沼慎二ほか: 当科における Galeazzi 骨折の 1 例. 東北整災外紀 43 : 283-285, 1999
- 3) Odena IC : Bipolar fracture-dislocation of the forearm. J Bone Joint Surg 34-A : 968-976, 1952
- 4) Mikic ZD : Galeazzi fracture-dislocations. J Bone Joint Surg 57-A : 1071-1080, 1975
- 5) 香月憲一, 田野確郎, 廣島和夫ほか: Galeazzi 骨折における遠位橈尺関節脱臼の治療. 骨折 23 : 298-301, 2001
- 6) 山下 寿, 後藤琢也, 賀茂和典ほか: Galeazzi 骨折の治療経験. 中部整災誌 37 : 779-780, 1994
- 7) 樋口晴久, 露口雄一, 濱田泰彦ほか: 当科における Galeazzi 骨折新鮮例の治療成績. 骨折 22 : 612-615, 2000

*

*

*

お知らせ

第 10 回 スポーツ傷害フォーラム

会 期 2005 年 1 月 15 日 (土) 9 : 30 ~ 17 : 00
会 場 グランキューブ大阪 (大阪国際会議場) [大阪市北区中之島 5-3-51
TEL 06-4803-5555 (代表)]

代表世話人 吉矢 晋一 (神戸大学整形外科)

内 容 1. 特別講演 「コーチングの心理学」 武田 建 (前関西学院理事長・元関西学院大学
アメリカンフットボール部ヘッドコーチ)

2. シンポジウム 「コンタクトスポーツにおけるメディカルサポート」

演題募集 スポーツ傷害 (外傷・障害) に関する一般演題を募集

応募方法 抄録 (本文 600 字前後), 演題名, 所属機関, 専門科名 (または職種名), 氏名 (演者に○
印) を E-mail : sports-injury@e-seikei.jp に送信. なお受信通知のため, メールアドレ
ス, 連絡先住所, 電話番号・FAX 番号も記入

応募締切 2004 年 11 月 12 日 (金)

事務局 ☎ 565-0871 吹田市山田丘 2-2

大阪大学大学院医学系研究科・器官制御外科学 (整形外科)
[TEL 06-6879-3552/FAX 06-6879-3559]

Efferent Vagal Nerve Stimulation Protects Heart Against Ischemia-Induced Arrhythmias by Preserving Connexin43 Protein

Motonori Ando, PhD; Rajesh G. Katare, MD; Yoshihiko Kakinuma, MD; Dongmei Zhang, MD; Fumiyasu Yamasaki, MD; Kazuyo Muramoto, PhD; Takayuki Sato, MD

Background—Myocardial ischemia (MI) leads to derangements in cellular electrical stability and the generation of lethal arrhythmias. Vagal nerve stimulation has been postulated to contribute to the antifibrillatory effect. Here, we suggest a novel mechanism for the antiarrhythmogenic properties of vagal stimulation during acute MI.

Methods and Results—Under anesthesia, Wistar rats underwent 30 minutes of left coronary artery (LCA) ligation with vagal stimulation (MI-VS group, n=11) and with sham stimulation (MI-SS group, n=12). Eight of the 12 rats in the MI-SS group had ventricular tachyarrhythmia (VT) during 30-minute LCA ligation; on the other hand, VT occurred in only 1 of the 11 rats in the MI-VS group (67% versus 9%, respectively). Atropine administration abolished the antiarrhythmogenic effect of vagal stimulation. Immunoblotting revealed that the MI-SS group showed a marked reduction in the amount of phosphorylated connexin43 (Cx43), whereas the MI-VS group showed only a slight reduction compared with the sham operation and sham stimulation group ($37 \pm 20\%$ versus $79 \pm 18\%$). Immunohistochemistry confirmed that the MI-induced loss of Cx43 from intercellular junctions was prevented by vagal stimulation. In addition, studies with rat primary-cultured cardiomyocytes demonstrated that acetylcholine effectively prevented the hypoxia-induced loss of phosphorylated Cx43 and ameliorated the loss of cell-to-cell communication as determined by Lucifer Yellow dye transfer assay, which supports the in vivo results.

Conclusions—Vagal nerve stimulation exerts antiarrhythmogenic effects accompanied by prevention of the loss of phosphorylated Cx43 during acute MI and thus plays a critical role in improving ischemia-induced electrical instability. (*Circulation*. 2005;112:164-170.)

Key Words: arrhythmia ■ connexins ■ electrical stimulation ■ gap junctions ■ vagus nerve

Acute myocardial ischemia results in a dramatic reduction of tissue pH, an increase in interstitial potassium levels, an increase in intracellular calcium concentration, and neurohumoral changes, all of which contribute to the development of electrical instability that leads to life-threatening cardiac arrhythmias.^{1,2} In particular, cell-to-cell electrical uncoupling of ventricular myocytes plays an important role in arrhythmogenesis during acute and chronic ischemic heart disease.³⁻⁶

Gap-junction channels, composed of highly homologous proteins known as connexins in vertebrate species, have been implicated in the electrical coupling of excitable tissues, such as cardiac muscles. There are essentially 2 subtypes of connexins (Cx), Cx40 and Cx43, in the adult heart muscle. Cx43 is predominantly expressed in ventricular tissue, whereas Cx40 is mainly found in atrial tissue and in the conduction system.⁷ The protein content of ventricular Cx43 is remarkably reduced in ischemia^{8,9} and heart failure.^{10,11}

Gene-targeting studies demonstrate that reduced expression of Cx43 increases the incidence of ventricular tachyarrhythmias¹² and causes a significant reduction in conduction velocity in mice during acute myocardial ischemia.¹³ These results suggest that the dysfunction of Cx43 in cardiomyocytes could be one of the components of the substrate that promotes lethal ventricular tachyarrhythmias.

With regard to life-threatening arrhythmias in acute ischemia, the effect of vagal nerve stimulation (VS) has been reported to prevent ventricular fibrillation in dogs.¹⁴ Recently, VS therapy markedly improved long-term survival in an animal model of chronic heart failure after myocardial infarction,¹⁵ and earlier studies have demonstrated that ventricular arrhythmia is one of the major causes of death in chronic heart failure conditions.¹⁶ However, the mechanisms of VS on myocardial infarction remain unknown. With these in mind, we hypothesized that VS would exert an antiarrhythmogenic effect even in acute myocardial ischemia by target-

Received June 21, 2004; de novo received November 28, 2004; revision received March 25, 2005; accepted March 30, 2005.

From the Department of Cardiovascular Control (M.A., R.G.K., Y.K., D.Z., T.S.), Kochi Medical School, Nankoku, Japan; Department of Clinical Laboratory (F.Y.), Kochi Medical School, Nankoku, Japan; and Department of Integrative Physiology (K.M.), Kochi Medical School, Nankoku, Japan. Correspondence to Takayuki Sato, Department of Cardiovascular Control, Kochi Medical School, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan. E-mail tacsato-kochimed@umin.ac.jp

© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.525493

ing the gap junctions. Therefore, in the present study, using both an *in vivo* acute ischemia model in rats and *in vitro* primary cultured cardiomyocytes from neonatal rats, we examined the effects of VS on arrhythmogenesis during acute myocardial ischemia.

Methods

The care and use of animals were in strict accordance with the guiding principles of the Physiological Society of Japan.

In Vivo Arrhythmia Study

Male Wistar rats (SLC, Japan) weighing 270 to 300 g were assigned to 6 groups receiving the following treatments: sham-operated rats treated with sham stimulation (SO-SS, $n=6$), sham-operated rats treated with vagal stimulation (SO-VS, $n=5$), myocardial ischemia rats with sham stimulation (MI-SS, $n=12$), myocardial ischemia rats with vagal stimulation (MI-VS, $n=11$), myocardial ischemia rats with both vagal stimulation and atropine administration (MI-VS-Atr, $n=6$), and myocardial ischemia rats preconditioned by vagal stimulation (pcVS-MI, $n=9$).

Acute Ischemia Model

After induction of anesthesia, the rat was ventilated artificially with a volume-controlled rodent respirator (model 683, Harvard Apparatus) at 80 strokes per minute. Anesthesia was maintained through the use of 1.2% halothane during surgical procedures and 0.6% halothane during data recording. Left ventricular MI was induced by 30 minutes of left coronary artery (LCA) ligation. In sham-operated rats, we loosely tied a suture around the LCA without arterial occlusion. For measurement of arterial pressure, a polyethylene tubing (PE-10, Becton Dickinson) that was filled with saline and connected to a fluid-filled transducer (DX-300, Viggo-Spectramed) was cannulated into the right femoral artery. Experimental solutions were infused through another polyethylene tubing, which was cannulated into the right femoral vein. Atropine sulfate (1 mg/kg) (Sigma) was administered as vagal efferent muscarinic blockade. For the prevention of dehydration during experiments,¹⁷ physiological saline was continuously infused at a rate of $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ with a syringe pump (CFV-3200; Nihon Kohden).

Vagal Nerve Stimulation

The right vagal nerve was identified, isolated, and cut in the neck region. Only the distal end of the vagal nerve was placed on a pair of platinum wires and was used for stimulation to exclude the effects of vagal afferent. The electrode was connected to an isolated constant voltage stimulator (SS-202J and SEN-7203, Nihon Kohden). The vagal nerve was stimulated with electrical rectangular pulses of 0.1-ms duration at 10 Hz during LCA ligation. The electrical voltage of pulses was optimized in each rat to obtain a 10% reduction in heart rate before LCA ligation. The actual electrical voltage was in the range of 2 to 6 V. VS was started at 1 minute before LCA ligation and continued for 30 minutes after LCA ligation. A run of first spontaneous ventricular tachyarrhythmia (VT) was defined as 10 or more beats with a cycle length $<100 \text{ ms}$.

To exclude vagally induced bradycardiac effects during MI and to investigate whether or not a heart preconditioned by VS (pcVS) was insusceptible to ischemia-induced VT, we also examined the effect of 10-minute VS only before LCA ligation. After a 5-minute stabilization period for the recovery of heart rate, the rat was subjected to 30-minute LCA ligation.

Risk Area Assessment

To confirm the ischemic area induced by LCA ligation, 2 mL of 2% Evans blue dye was injected via the femoral vein at the end of 30 minutes of coronary artery ligation. The area at risk was determined by negative staining with Evans blue. Area measurements were determined with Image-Pro version 4.0 (Media Cybernetics).

Excised Heart Study

We conducted this protocol separately from the *in vivo* arrhythmia study because the experimental preparation of Evans blue dye injection for risk area assessment did not allow us to perform immunoblotting and immunohistochemical assay of excised hearts. For each group, we prepared and analyzed 5 hearts.

Protein Preparation and Immunoblotting

Pulverized frozen left ventricle samples were suspended in 40 vol of ice-cold 10% trichloroacetic acid and homogenized with a tissue homogenizer (2 bursts, 30 seconds each).¹⁸ Homogenates were centrifuged at 10 000g for 10 minutes. Supernatants were discarded, and the remaining pellets were resuspended in sampling solution (9 mol/L urea, 0.065 mol/L dithiothreitol, 2% Triton X-100) and sonicated. After addition of 0.37 mol/L lithium dodecylsulfate, the protein-containing solution was neutralized by 1 mol/L Tris solution, and sonicated again. For immunoblot analysis, proteins separated by SDS-PAGE with 15% polyacrylamide gels were transferred electrophoretically to polyvinylidene difluoride sheets (Millipore). After 1 hour of blocking in the 4% skimmed milk solution, the membrane was incubated overnight with anti-Cx43 antibody (71-0700, Zymed) diluted 1:1000. Blots were then incubated for 1 hour with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, developed with an ECL chemiluminescence reagent (Amersham), and exposed to a medical x-ray film. Equal protein content in all the samples was confirmed by Coomassie brilliant blue staining.

Immunohistochemistry and Confocal Microscopy

Transmural blocks of left ventricular myocardium from selected hearts were immersed in a fixative containing 4% paraformaldehyde and 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4), embedded in paraffin, and sectioned at a thickness of 4 μm . Sections were deparaffinized, placed in citrate buffer, and boiled in a microwave oven for 10 minutes to enhance specific immunostaining. The sections were then incubated overnight with anti-Cx43 antibody diluted 1:100 and then incubated for 2 hours in Alexa546-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluted 1:100. Fluorescence of Alexa546 was observed with a confocal laser scanning microscope system (FV300, Olympus). Reconstructed projection images were obtained from serial optical sections recorded at an interval of 0.5 μm .

Primary Culture Study

We used neonatal rat primary cultured cardiomyocytes to investigate the direct action of acetylcholine (ACh), a neurotransmitter released by VS, on phosphorylated Cx43. Hearts were excised from 1- to 2-day-old neonatal Wistar rats and digested with 0.03% type IV collagenase (Sigma) and 0.03% trypsin (Invitrogen). After digestion, cardiomyocytes were washed repeatedly in serum containing culture medium and were preplated for 90 minutes in the noncoated culture dish in the presence of DMEM medium (Sigma) with 10% FBS to remove the contaminating noncardiomyocytes. Next, cardiomyocytes were plated and cultured in gelatin-coated culture dishes in DMEM medium with 10% FBS. New medium was replaced every day, and all experiments were performed after 4 days of culture.

Hypoxia and Immunoblotting

For hypoxia experiments, cardiomyocytes in serum-deficient DMEM were transferred into an airtight incubator and maintained at a humidified hypoxic atmosphere of $<2\% \text{ O}_2$ with nitrogen and 5% CO_2 for 30 minutes. Cells were treated either with ACh (0.5 mmol/L) alone or with both ACh and atropine (0.1 mmol/L) 10 minutes before the cells were subjected to hypoxia. After 30 minutes, the treated cells were sampled for immunoblotting.

Dye Transfer Assay

To assess the effect of ACh on cell-to-cell communication, we monitored dye transfer in primary cultured cardiomyocytes with Lucifer Yellow CH (LY; lithium salt, Molecular Probes). Cells in the culture medium were viewed on a Zeiss microscope equipped with fluorescence illumination and FITC filters. The emitted fluorescent light was projected onto a CCD camera system (C4742-98-24ER,

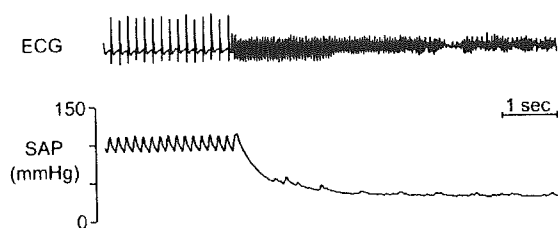


Figure 1. Example of run of VT induced by LCA ligation in rat treated with sham stimulation. In this case, ventricular fibrillation was initiated after ventricular tachycardia. SAP indicates systemic arterial pressure.

Hamamatsu Photonics). LY was injected electrophoretically via a conventional intracellular microelectrode made from borosilicate glass capillaries. The outer diameter of microelectrodes was 0.15 to 0.25 μm , and the tip resistance of these electrodes filled with 3% LY was 0.6 to 1.4 G Ω . An inward square-pulse current (20 to 40 nA) of 0.5-second duration was injected at a frequency of 1 Hz for 2 to 3 minutes using the circuitry of an amplifier (707, WPI) and a voltage pulse generator (SEN7203, Nihon Kohden). For induction of the hypoxic condition, cardiomyocytes were treated for 5 hours with 0.2 mmol/L CoCl_2 ,¹⁹ because microinjection methods are not suitable for gas-tight chamber experiments with N_2 substitution. Cells were treated either with ACh (0.5 mmol/L) alone or with both ACh and atropine (0.1 mmol/L) before chemical hypoxia. Dye injection was performed at room temperature (24°C to 26°C).

Statistical Analysis

Time of onset of the first run of VT was analyzed by the Kaplan-Meier method, and comparisons were made with the Mantel-Haenszel log-rank test. A nonparametric test for comparison of treatments with a control was performed by a Mann-Whitney *U* test with Bonferroni adjustment. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Values are expressed as mean \pm SD.

Results

In Vivo Arrhythmia Study

Effects of VS on Acute Ischemia-Induced VT

Figure 1 illustrates an example of the VT observed after LCA ligation with sham stimulation in the MI-SS group. As demonstrated in this case, VT followed by ventricular fibrillation was often detected after LCA ligation without VS. Figure 2 shows the time of onset and the incidence of the first spontaneous VT after LCA ligation. Eight of 12 rats in the MI-SS group experienced VT; on the other hand, only 1 of 11 in the MI-VS group developed VT during the 30-minute LCA ligation (67% versus 9%, $P = 0.005$). VS achieved an 87% reduction in the relative incidence ratio of VT. In all cases, the first runs of VT were observed within 15 minutes after LCA ligation. Atropine administration abolished the anti-VT effects of VS; 4 of 6 rats developed VT (Figure 2). No VT was detected in either the SO-SS or SO-VS groups.

To exclude vagally induced bradycardiac effects on the incidence of VT, a group of 9 rats were subjected to preconditioning by VS (pcVS-MI group; see Methods). There was no significant difference in heart rate between the MI-SS and pcVS-MI groups immediately before and after LCA ligation (Table). Nevertheless, only 2 of 9 rats in the pcVS-MI group developed VT (22%, $P = 0.04$ versus the MI-SS group).

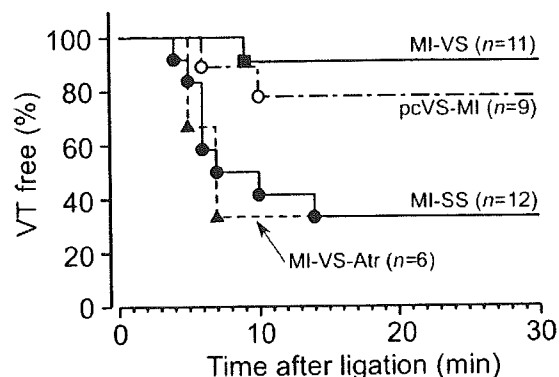


Figure 2. Incidence and onset of first VT after LCA ligation. Myocardial ischemia rats treated with sham stimulation (MI-SS, \bullet , $n = 12$) and with vagal stimulation (MI-VS, \blacksquare , $n = 11$). VS significantly ($P = 0.005$ vs MI-SS group) decreased incidence of ischemia-induced VT. In contrast, atropine administration blocked antiarrhythmic effect by VS during acute MI (MI-VS-Atr, \blacktriangle , $n = 6$). Preconditioning by VS significantly ($P = 0.04$ vs MI-SS group) decreased incidence of ischemia-induced VT (pcVS-MI, \circ , $n = 9$).

Risk Area Assessment and Hemodynamic Parameters

There was no significant difference in risk area between the MI-SS and MI-VS groups ($55 \pm 6\%$ versus $59 \pm 3\%$). The differences in heart rate between groups with or without VS reached ≈ 50 bpm, and after 30-minute ischemia, only the MI-VS group had a significantly lower arterial pressure than the SO-SS group (Table).

Excised Heart Study

Effects of VS on Cx43 Expression

The polyclonal anti-Cx43 antibody in the present study showed closely spaced bands migrating between 43 and 46 kDa and a faint band migrating at 41 kDa. Previous reports²⁰ demonstrated that the higher- and lower-molecular-weight bands represent phosphorylated and nonphosphorylated isoforms of Cx43, respectively. Figure 3A shows a representative immunoblot prepared with anti-Cx43 antibody. The phosphorylated isoform of Cx43 (bands with 43 kDa) in the MI-VS group was preserved compared with that in the MI-SS group. Quantitative densitometric analysis revealed the level of the phosphorylated isoform of Cx43 in the MI-VS group was maintained at $79 \pm 18\%$ of that in the SO-SS group; on the other hand, the level of phosphorylated Cx43 in the MI-SS group was reduced significantly to $37 \pm 20\%$ of that in the SO-SS group (Figure 3B). The phosphorylated Cx43 in the SO-VS group was increased significantly to $120 \pm 8\%$ of that in the SO-SS group. Atropine inhibited the preserving effects of VS on Cx43 in the MI-VS-Atr group ($47 \pm 12\%$). In addition, protein analysis also confirmed that the phosphorylated Cx43 in the pcVS-MI group was at almost the same level as in the SO-SS group ($97 \pm 20\%$).

Effects of VS on Cx43 Localization

To investigate the distribution of Cx43 during acute ischemia with or without VS, we performed confocal image analysis of left ventricular tissues stained with anti-Cx43 antibody. As shown in Figure 4A, localization of immunoreactive signals

Heart Rate and Mean Arterial Pressure Immediately Before and After 30-Minute LCA Ligation

Group	n	Heart Rate, bpm		Mean Arterial Pressure, mm Hg	
		Before	After 30-Minute Ligation	Before	After 30-Minute Ligation
SO-SS	6	404±24	414±24	118±14	116±13
SO-VS	5	362±10*	348±15*	106±9	96±6
MI-SS	12	395±22	365±43	117±7	102±10
MI-VS	11	354±12*	353±31*	102±13	90±6*
MI-VS-Atr	6	409±20	362±48	103±8	94±15
pcVS-MI	9	391±33	372±36	109±11	103±10

VS was started at 1 minute before LCA ligation and continued for 30 minutes after LCA ligation. pcVS was performed during 10 minutes without LCA ligation, and after a 5-minute stabilization period for recovery of heart rate, rats were subjected to a 30-minute LCA ligation. Values are mean±SD immediately before and after 30-minute LCA ligation.

* $P < 0.05$ vs SO-SS group.

in the SO-SS group was restricted to intercellular junctions, consistent with the gap junctions and intercalated disks. In contrast, the Cx43 signal was reduced dramatically in the MI-SS group (Figure 4B); however, the Cx43 signal in the MI-VS group was almost comparable to the level in the SO-SS group (Figure 4C). These observations indicate that the loss of phosphorylated Cx43 during acute ischemia was prevented by VS.

Primary Culture Study

Effects of Hypoxia and ACh on Cx43 Expression

To examine the muscarinic effect on hypoxia-induced loss of phosphorylated Cx43, immunoblot analysis was performed in

primary cultured cardiomyocytes. Under normoxic conditions, addition of ACh for 30 minutes significantly increased the phosphorylated isoform of Cx43 compared with the control group (Figure 5). Although hypoxia for 30 minutes decreased phosphorylated Cx43, ACh treatment prevented this hypoxia-induced loss of Cx43. Atropine inhibited the preserving effects of ACh. Thus, these results indicate that ACh preserved phosphorylated Cx43 through a muscarinic receptor during 30-minute hypoxia.

Effects of Hypoxia and ACh on Intercellular Coupling and Beating Rate

To assess whether the induction of phosphorylated Cx43 by ACh results in a functional effect on cell-to-cell communication, LY dye transfer analysis was performed in primary cultured cardiomyocytes. As shown in Figure 6A, under normoxic conditions, LY injected into a cardiomyocyte diffused into other cardiomyocytes around the injected cell. In contrast, LY injected into a cardiomyocyte under chemical hypoxic conditions was confined to the injected cell, and no dye coupling with other cardiomyocytes was observed (Figure 6B); on the other hand, ACh administration preserved cell-to-cell communication (Figure 6C). Atropine treatment inhibited the preventive effect of ACh on hypoxia-induced uncoupling (Figure 6D). Under normoxic conditions, ACh treatment remarkably induced dye coupling between cardiomyocytes (Figure 6E).

Under normoxic conditions, the rate of spontaneous beating was 62 ± 13 bpm ($n = 5$ experiments), and ACh did not slow the beating rate. Chemical hypoxia with CoCl_2 stopped the beating; however, even under hypoxic conditions, ACh preserved spontaneous beating. In the presence of atropine, ACh failed to prevent the hypoxia-induced cessation of beating. The results of Cx43 immunoblotting under chemical hypoxic conditions were identical to those under hypoxia with $< 2\%$ O_2 (data not shown).

Discussion

In the present study, we investigated whether VS could attenuate acute MI-induced arrhythmogenic properties via modulation of a principal cardiac gap-junction protein, Cx43. Our results provide novel evidence that VS effectively

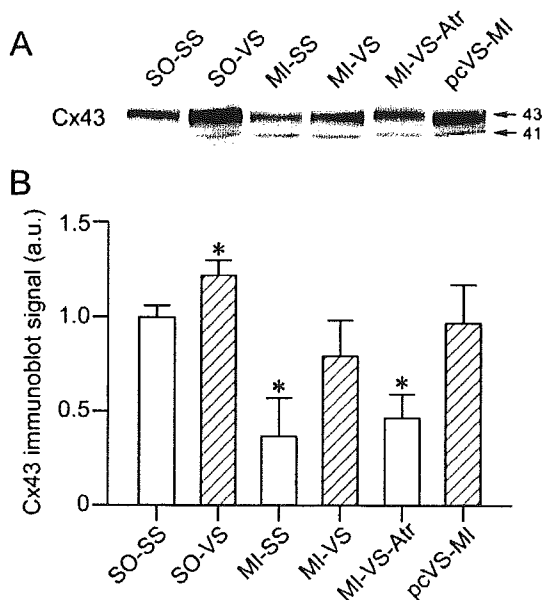


Figure 3. A, Representative immunoblots of homogenate of left ventricles from SO-SS, SO-VS, MI-SS, MI-VS, MI-VS-Atr, and pcVS-MI rats, probed with polyclonal Cx43 antibody. Arrows indicate position of phosphorylated isoform of Cx43 (43 kDa) and nonphosphorylated isoform of Cx43 (41 kDa) bands, respectively. B, Quantitative densitometric analysis of phosphorylated isoform of Cx43 in SO-SS, SO-VS, MI-SS, MI-VS, MI-VS-Atr, and pcMI-VS groups. Data are expressed as mean±SD. a.u. indicates arbitrary units. $n = 5$ for each group. * $P < 0.05$.