大阪青山大学紀要　2015 8 巻　19－24.
J. Osaka Aoyama University. 2015, vol. 8, 19- 24.

総　説

マイクロダイアリシス法のラット心筋への応用

小　畑　俊　男 *

大阪青山大学健康科学部看護学科

Application of microdialysis to rat myocardium

Toshio OBATA

Faculty of Health Science, Osaka Aoyama University

Summary　Microdialysis has been developed as a technique to collect biological substances continuously through a semipermeable membrane under physiological conditions with a probe attached on various animal organs. The heart, however, presents several difficulties in the application of this technique, because the heart is beating in vivo in contrast to other organs. I developed a flexibly mounted microdialysis probe technique, which involves synchronized movement of the tip of the probe with the beating heart to reduce tissue injury. With this technique, it become feasible to make stable and long-term measurements of interstitial biological fluid substances. By appling the flexibly mounted microdialysis probe technique to the beating rat heart, I was able to monitor free radical generation and measure the level of adenosine during AMP perfusion that gives an index of the activity of ecto-5'-nucleotidase in the tissue. In the future, this technique will have versatile applications for studies to elucidate actual mechanisms of pathogenesis in heart disorders.

Keywords: Microdialysis, rat myocardium, free radical, nicorandil, ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel
マイクロダイアリシス、ラット心筋、フリーラジカル、ニコランジル、ATP 感受性カリウム（K_{ATP}）チャネル

1．はじめに

微小透析プローブの半透膜を介して、物質を連続的に回収する方法であるマイクロダイアリシス法は生体物質を生理的条件下で経時的かつ連続的に検討できるという利点から発展してきた方法である。特にUngerstedt[1)] らを中心としたグループにより、脳および脊髄から成る中枢領域での研究はパーキンソン病等の神経疾患の解明に画期的なものであった。心臓はエネルギー消費の最も大きい臓器であるので、心臓の酸素摂取には余裕がないため、冠血流供給が制限されると、心臓は容易に虚血に陥りやすい臓器のひとつである。心臓は図に示す通り（Fig1)、3 本の太い血管（右冠動脈、左回旋子、左前下行枝）がある。しかし、心臓は他の臓器と異なり拍動するためマイクロダイアリシス法を応用することは非常に困難で、心臓へ応用した試みはいくつかあるが、それぞれ組織侵襲による問題点をかかえている。すなわち Fig.2 に示すように目的とする心筋領域にマイクロダイアリシスのプローブを装着した後、プローブを固定し、半回転運動させることで、プローブと心臓の動きを連動させることによって、プローブと心臓の動きを一体化させ、プローブと組織との摩擦を除去し、心臓に対する負荷を和らげるよう工夫した。[2),3)] このようにマイクロダイアリシス法によりヒドロキシラジカル（•OH）を測定することにより心筋における生理的意義について議論した。またアデノシンを測定することによりエクト -5'- ヌクレオチダーゼ活性を評価した。この方法（小畑式灌流法；O-System）[2),3)] によって、プローブ装着前後において血圧、心拍数ともに有意な変化は示されなかった (Fig.3)。さらに半透膜を介して得られた試料は直接高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により測定される。この方

*Email: t-obata@osaka-aoyama.ac.jp
〒562-8580　箕面市新稲2-11-1

法により長時間生体物質の測定が可能となった。

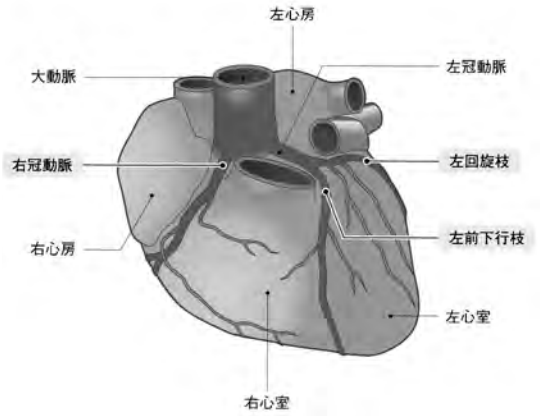
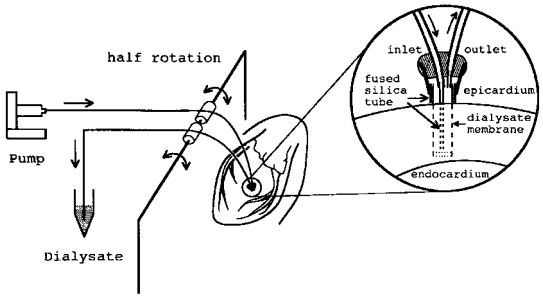


Fig1　心臓の模式図



文献 3) より引用

Fig2　In vivo マイクロダイアリシス法

	Before Implantation	After Implantation	Ischemia	Reperfusion
HR	366 ± 29	381 ± 19	331 ± 33	306 ± 32
SBP/ DBP	103 ± 8/ 65 ± 10	108 ± 13/ 69 ± 7	100 ± 20/ 68 ± 8	85 ± 25/ 58 ± 13*

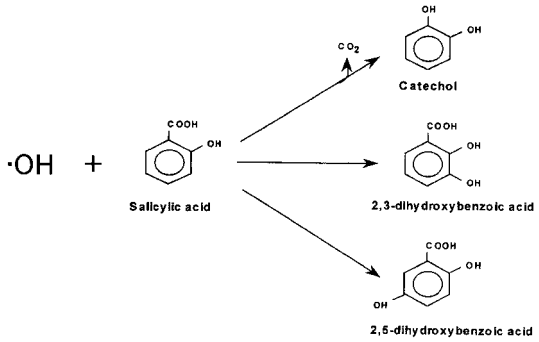
文献 3) より引用

Fig3　プローブ装着前後および虚血 - 再灌流後の心拍数と血圧の変化

2. ヒドロキシラジカルの測定

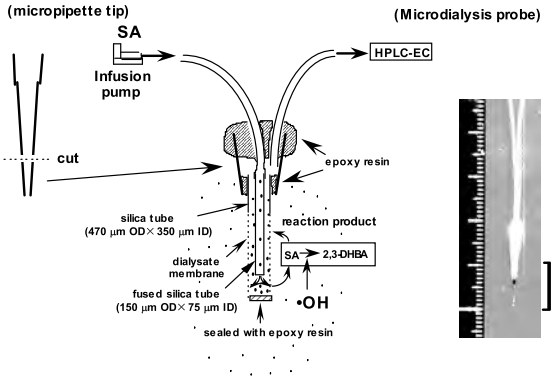
(1) ヒドロキシラジカルの捕捉実験

•OH ラジカルはサリチル酸と反応して 2,3- および 2,5- ヒドロキシ安息香酸（DHBA）とカテコールを生成する [4]（Fig.4）。ラットを麻酔後開胸した後、左心室筋層内にマイクロダイアリシスのプローブを装着後、サリチル酸をトラップ剤として心筋局所灌流により、•OH ラジカルを in vivo で捕捉する [2),3)]。すなわちマイクロダイアリシスのプローブをラット心筋に装着した後、サリチル酸（0.5mM）を毎分 1μL の灌流速度でプローブ中に灌流させて、試料を氷水中に回収し、非酵素的に安定な 2,3-DHBA を電気化学検出機を導入した高速液体クロマトグラフ法により検出する [3)]。このように、サリチル酸を用いた •OH ラジカルの捕捉実験により心筋中に •OH ラジカルが発生することをマイクロダイアリシス法を用いて証明し、心筋における生理的意義について議論する。(Fig5)



•OH；ヒドロキシラジカル

Fig4　サリチル酸とヒドロキシラジカルの反応



SA；サリチル酸

•OH；ヒドロキシラジカル

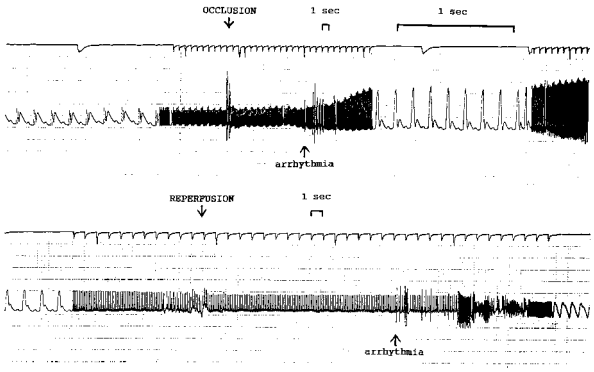
HPLC-EC; 電気化学検出機を導入した高速液体クロマトグラフ法

Fig5　サリチル酸灌流下におけるヒドロキシラジカルの測定原理

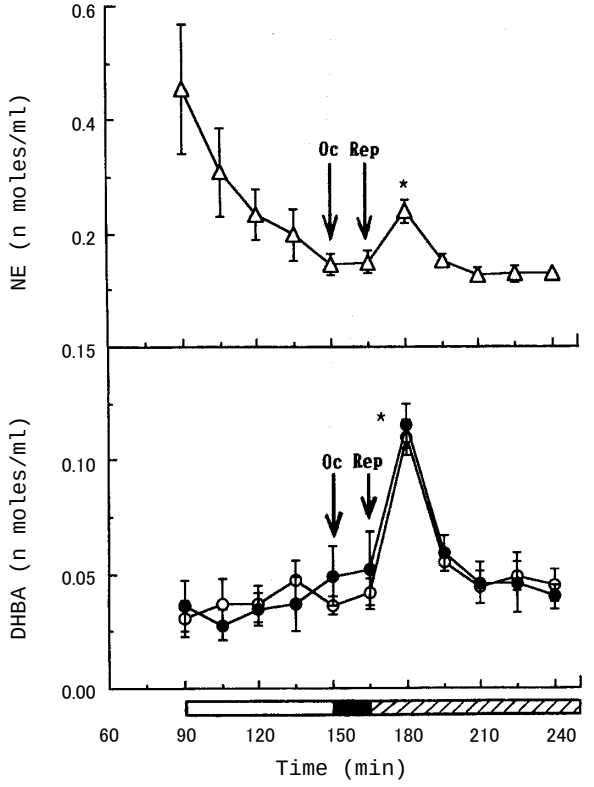
(2) 虚血 - 再灌流によるヒドロキシラジカル産生

マイクロダイアリシスのプローブ (Fig5)[5] をラット心臓の虚血領域に装着後、サリチル酸灌流下で 15 分毎に灌流液を回収し、2,3-DHBA のレベルが一定であることを確かめた後、冠動脈（左前下行枝）を 15 分間閉塞し、再灌流すると、再灌流性不整脈が発生した（Fig6）。このときノルアドレナリンの放出が認められる [3)]（Fig7）。•OH ラジカルの産生と思われる高いレベルの 2,3-DHBA および 2,5-DHBA が認められる [3)]。このように虚血 - 再灌流によりノルアドレナリンと •OH ラジカルが放出することを、マイクロダイアリ

シス法を用いた実験により証明した。



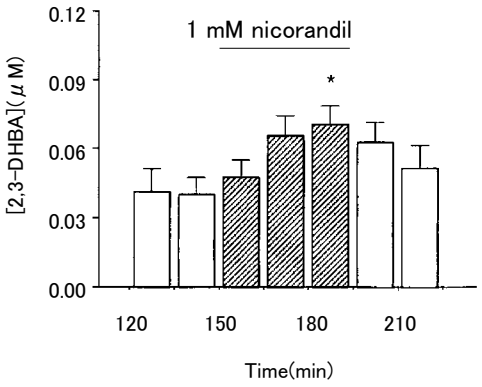
occulsion；虚血　arrhythmia；不整脈
reperfusion；再灌流
文献 3) より引用
Fig6　虚血 - 再灌流によるラットの心電図



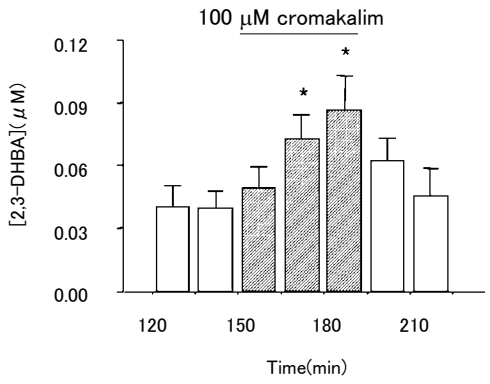
Oc；occulsion　NE；ノルエピネフリン
Rep；reperfusion　DHBA；ヒドロキシ安息香酸
文献 3) より引用
Fig7　ノルエピネフリンとヒドロキシラジカルの関係

(3) ニコランジルとフリーラジカル

ATP 感受性カリウム（K_{ATP}）チャネル[6]の開口はラジカルを産生するか否かについてマイクロダイアリシス法を用いた実験により検討した。K_{ATP} チャネルの開口薬としても心筋保護作用を有すると言われるニコランジル (Fig8) またはクロマカリム (Fig9) を投与するとラジカルが産生する[7]。これは K_{ATP} チャネルのブロッカーであるグリベンクラミドまたは 5- ハイドロキシデカノエイトにより抑制された。K_{ATP} チャネルが 開口するとラジカルが産生されると考えられ、高いレベルのラジカルは心筋障害を引き起こすが低いレベルのラジカルは反対に心筋保護的に作用することが知られています[8),9)]。K_{ATP} チャネルが開くとミトコンドリアのボリュームが増え ATP の産生が増加し、電子伝達系のラジカルが増加することが知られています。このラジカルはプロテインカイネースＣ（ＰＫＣ）を活性化することから心筋保護作用に関与しているものと考えられます。このように K_{ATP} チャネルが開口すると、•OH ラジカルが発生し、心筋保護作用を示す可能性があることをマイクロダイアリシス法を用いた実験により証明した。



文献 7) より引用
Fig8　サリチル酸潅流下におけるニコランジルの効果



文献 7) より引用
Fig9　サリチル酸潅流下におけるクロマカリムの効果

3．心筋エクト -5'- ヌクレオチダーゼ活性

(1) アデノシン産生経路

アデノシンの産生は生理的条件あるいは病態で異なる。アデノシンは虚血や低酸素下で心筋から大量に産生され、血管を拡張させ冠血流量増大、心筋代謝改善に作用する。Fig10 に示すように細胞内のアデノシン

産生経路としてはアデノシン一リン酸（AMP）から 5'- ヌクレオチダーゼを介してアデノシンが産生される系と S- アデノシルホモシステイン（SAH）から SAH- ヒドロラーゼによりアデノシンが産生される系とが存在する。非虚血下では SAH- ヒドラーゼ系、虚血下では 5'- ヌクレオチダーゼ系が主たる産生経路とされている。虚血下ではアデノシン産生量は約 50 倍に増加するにもかかわらず SAH- ヒドラーゼ活性は 1.5 倍にしか増えず、基質である SAH もほとんど増えない。これに対し、5'- ヌクレオチダーゼ活性は著名に増加し、基質の AMP も ATP より大量に産生される。したがって、虚血下では 5'- ヌクレオチダーゼを介したアデノシン産生系が重要である。さらに、この 5'- ヌクレオチダーゼは細胞内のサイトソリックと細胞膜上のエクト -5'- ヌクレオチダーゼが存在し、分子量と活性化・阻害物質が異なることから、両者は異なった酵素であると考えられている 3)。しかし、サイクリック -5'- ヌクレオチダーゼは蛋白として単離されたという報告はあるものの追試はなされておらず、いまだその一次構造が決定されていない。また、エクト -5'- ヌクレオチダーゼは AMP に対する Km 値（～ 20μM）がサイクリック -5'- ヌクレオチダーゼの Km 値（～ 3 mM）より低く、アフィニティーは高いということを示しています [10),11)]。少なくとも虚血、低酸素下では 5'- ヌクレオチダーゼがアデノシン産生に大きく寄与しており、アデノシンの病態生理的役割を考える上で 5'- ヌクレオチダーゼ、特にエクト - タイプが重要と考えられます。

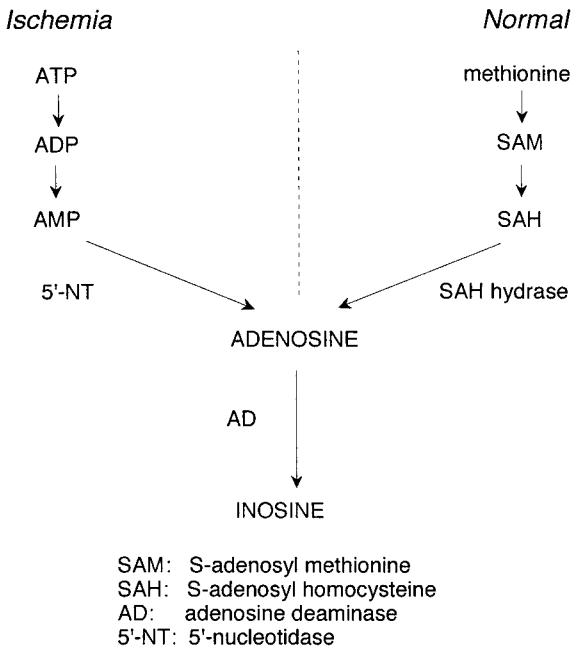
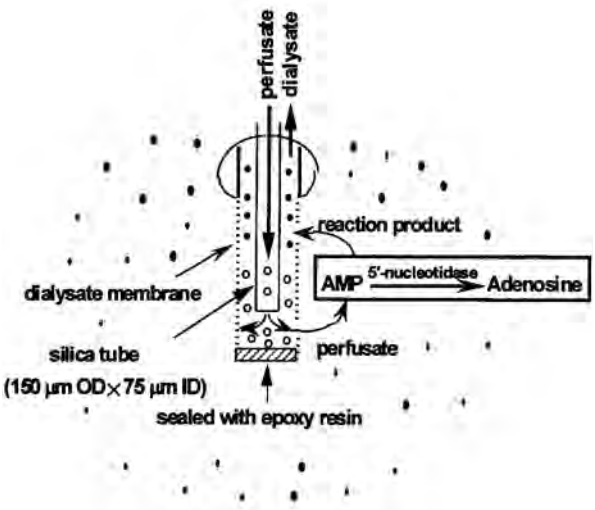


Fig10　アデノシンの産生経路

従来、5'- ヌクレオチダーゼ活性は摘出あるいは生検標本から酵素測定法で測定されていた。ここでは、*in vivo* での組織間液中のアデノシンの濃度をマイクロダイアリシス法を用いて測定し、エクト -5'- ヌクレオチダーゼ活性を經時的かつ連続的に評価する方法を紹介する。マイクロダイアリシス法を心臓に応用することは拍動によるマイクロダイアリシス用プローブでの留置部位での損傷のために非常に困難とされていました。しかし、Van Wylen ら [12)] が 1990 年に初めてマイクロダイアリシス法を心筋に導入し、現在では心筋組織間液中の物質濃度を生理的条件下で經時的かつ連続的に測定できるので最も有用な方法と考えられている [3),13)]。AMP (10 ～ 1000μM) をマイクロダイアリシスプローブ中に灌流させると濃度依存的にアデノシン産生量は増加する。ラットの心筋を用いた場合、ミカエリス - メンテンの式により、その Km 値は 107.2 μM であった [14)]。5'- ヌクレオチダーゼはエクトおよびサイトソリック -5'- ヌクレオチダーゼが存在しますが、この値はサイトソリック -5'- ヌクレオチダーゼ（3 mM）に比べてかなり小さくエクト -5'- ヌクレオチダーゼ（20μM）に近い値 [15)] を示した。このように Km 値から 100μM AMP 灌流下で得られるアデノシンの濃度はエクト -5'- ヌクレオチダーゼの活性を反映していると考えられる。(Fig11)



AMP；アデノシン一リン酸

Fig11　アデノシンの測定法

（2）病態生理的意義

アデノシンがプレコンディショニングといかにかかわるかは、いまだ十分に解明されていないが、アデノシン産生増大が壊死縮小の一因となっている可能性が示唆されている [15)]。虚血プレコンディショニングは短時間先行虚血が心筋壊死（ネクローシス）とい

う不可逆的な心筋障害だけでなく、最近ではもう一つの不可逆的細胞障害であるアポトーシスや不可逆性虚血障害である（心筋スタンニング）にも改善作用をもつことが報告されている。プレコンディショニングによりアデノシン産生酵素であるエクト -5'- ヌクレオチダーゼが活性化され [15]、この酵素を阻害すると虚血プレコンディショニングによる心筋保護効果が減弱する。実際エクト -5'- ヌクレオチダーゼ阻害剤 α,β- メチレンアデノシン 5'- ジホスフェイト（AOPCP）をプレコンディショニング操作中に投与するとプレコンディショニングの心筋保護作用は減弱する [16]。アデノシン A_1 受容体は 7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体であり、細胞内情報伝達をになう PKC を活性化する。薬理学的・生理学的に K_{ATP} チャネルの存在は明らかである。しかし、現在までのところ、surface K_{ATP} チャネルの構造は解明されているものの、ミトコンドリア K_{ATP} チャネルについては、存在が示唆されているのみで [17),18]、構造の解明には至っていない。このチャネルのクローニングはなされておらず今後の課題といえよう。α_1- アドレナリン受容体の刺激による PKC- エクト -5'- ヌクレオチダーゼ誘導によるアデノシンの産生増加がプレコンディショニングの心筋保護作用の獲得に寄与している可能性をマイクロダイアリシス法を用いた実験により証明した。

4．おわりに

心臓は生体の恒常性、生命維持に必要なエネルギーや物質を全身に供給するという重要な働きをになっている。少ない侵襲で心臓においてさまざまな生体物質をモニターできる *in vivo* マイクロダイアリシス法は臨床応用にも試みられつつある。そこで、心臓にマイクロダイアリシス法を適用することにより、心筋中で産生される •OH ラジカルを直接測定した。また、アデノシンは multifactorial に作用し、心筋保護物質として再認識され、今後はアデノシン産生酵素であるエクト -5'- ヌクレオチダーゼに関するさらなる検討がなされ、治療に直結する更なる基礎研究の進展が必要と考えられる。しかし、この方法は人工呼吸下で開胸しなければならないので、麻酔による影響は避けられない問題も残されている。これらの方法によって得られた *in vivo* 評価法は種々の心疾患の病態解明に多大な情報をもたらすものと確信している。「心筋保護」というごく狭い領域でも、ATP が、細胞内カルシウム蓄積が、フリーラジカルが、受容体が、細胞内情報伝達機構が（切りがない）心筋障害の原因であり、ここを是正すれば心筋保護に繋がる。「心筋保護」は、脳・心・血管疾患による死亡率が高いことから、外科的領域はもちろん内科領域でも必要不可欠な学問であり、臨床に直接結びつく研究である。「心筋保護」を極めれば「脳保護」も見えてくるに違いない。本総説が「新しいアイデア、新しい発想に基ずく複合的な intervention を発見する」きっかけになることを願い、今後の研究の発展にも期待したい。

References

1) Ungerstedt U, Measurement of neurotransmitter rerease by intracranial dialysis. *In* Measurement of Neurotransmitter Release in vivo. Edited by Marsden CA. 81-105, John Wiley and Sons, Chichester. England 1984

2) 小畑俊男 . ラット心筋 in vivo マイクロダイアリシス法（実験技術）. 日薬理誌 2001, 118, 379-382.

3) Obata T, Hosokawa H, Yamanaka Y. In vivo monitoring of norepinephrine and •OH generation on myocardial ischemic injury by dialysis technique. Am. J. Physiol. 1994, 266, H903-H908.

4) Halliwell B, Kaur H. Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: a cautionary note visited for the third time. Free Radic Res. 1997, 27, 239-44.

5) Obata T, Yamanaka Y, Chiueh CC. In vivo release of dopamine by perfusion of l-methyl-4-phenylpyridinium ion in the striatum with a microdialysis technique. Japan J Pharmacol. 1992, 60, 311-313.

6) Hearse DJ. Activation of ATP-sensitive potassium channels: a novel pharmacological approach to myocardial protection? Cardiovasc Res. 1995, 30, 1-17.

7) Obata T, Yamanaka Y. Block of cardiac ATP-sensitive K^+ channels reduces hydroxyl radicals in the rat myocardium. Arch Biochem Biophys. 2000, 378, 195-200.

8) Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. J Mol Cell Cardiol. 1997, 29, 207-216.

9) Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A,

De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. Circ. Res. 1997, 80, 743-748.

10) Sullivan JM, Alpers JB. In vitro regulation of rat heart 5'-nucleotidase by adenine nucleotides and magnesium. J Biol Chem. 1971, 246, 3057-3063.

11)Truong VL, Collinson AR, Lowenstein JM. 5'-Nucleotidases in rat heart. Evidence for the occurrence of two soluble enzymes with different substrate specificities. Biochem J. 1988, 253, 117-121.

12)Van Wylen DG, Willis J, Sodhi J, Weiss RJ, Lasley RD, Mentzer RM Jr. Cardiac microdialysis to estimate interstitial adenosine and coronary blood flow. Am J Physiol. 1990, 258, H1642-H1649.

13)Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I. In vivo monitoring of myocardial interstitial norepinephrine by dialysis technique. Am J Physiol. 1991, 261, H1643-H1647.

14)Sato T, Obata T, Yamanaka Y, Arita M, Protein kinase C mediated activation of ecto-5'-nucleotidase in rat hearts in vivo. J Physiol (Lond) 1997, 4503, 119-127.

15)Kitakaze M, Hori M, Kamada T. Role of adenosine and its interaction with alpha adrenoceptor activity in ischaemic and reperfusion injury of the myocardium. Cardiovasc. Res. 1993, 27,18-27.

16)Kitakaze M, Hori M, Morioka T, Minamino T, Takashima S, Sato H, Shinozaki Y, Chujo M, Mori H, Inoue M, Kamada T. Infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning is blunted by inhibition of 5'-nucleotidase activity and attenuation of adenosine release. Circulation. 1994.89, 1237-1246.

17)Clement JP 4th, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. Neuron. 1997, 18, 827-838.

18)Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial KATP channels in cell survival and death. J Mol Cell Cardiol. 2005, 39, 7-16.