

心筋梗塞／再灌流後の慢性期における骨格筋適応

小河 繁彦¹⁾ 平井 拓²⁾ 野原 隆司³⁾ 田口 貞善⁴⁾¹⁾ 北テキサス大学フォートワース・ヘルスサイエンス・センター統合生理学部,²⁾ 京都大学大学院医学研究科臨床器官病態学講座 (循環病態学), ³⁾ 北野病院循環器内科,⁴⁾ 京都大学大学院人間・環境学研究科環境生理学研究室

I. はじめに

慢性心不全患者の運動耐容能は、息切れや易疲労感により著しく低下しており、この主な原因は運動時の心拍出量の増加が不十分であると考えられてきた。しかしながら、浮腫のない代償期の心不全では、運動時筋血流量の低下が起こっていない [1]。また薬剤、経皮的僧帽弁切開術などで急性に心拍出量、筋血流を増加させても運動耐容能はすぐに改善しないことが確認されている [2]。また骨格筋の形態的・機能的変化が運動耐容能の低下の一因になることが指摘されている [3, 4]。これまで、心不全患者の骨格筋において遅筋線維の萎縮や減少、有酸素的代謝能の低下、筋グリコーゲン含量の減少などが認められている [5, 6]。さらに、Lipkin et al. [7] は、心不全患者の最大自発筋収縮力の減少を示し、筋代謝の変化だけでなく、筋出力の低下も指摘している。しかしながら、筋代謝の低下や筋力の減少は不活動による廃用性筋萎縮による骨格筋の変化と類似している [8]。つまり、心不全患者は、心拍出量低下など酸素運搬の低下による影響以外にも、運動耐容能の低下に伴う大幅な活動量の減少が骨格筋の生理学的特性の変容を誘因している可能性が考えられている [9]。一方、心不全モデルラットのヒラメ筋と足底屈筋のSDH活性値が対照群と有意差がないことを観察し、骨格筋の代謝特性が変化しないことを示唆した報告もみられる [10]。また筋血流低下が関係している閉塞性下肢動脈症などでは、筋肉生検でミトコンドリアの増加、酸化酵素の増加が観察されており、これらは心不全とはか

なり異なるメカニズムを示唆している [11]。

近年、再灌流療法により心筋虚血領域のかなりの部分が最終的に梗塞に至ることなく救済されるようになった。これらの療法により、stunned myocardiumやhibernating myocardium病態の存在も認められている。一方、心筋梗塞由来の心不全モデルの研究は、運動耐容能の低下による影響に加え、慢性の冠状動脈の梗塞により、死亡率が高く [9, 12]、代償性の因子も強く末梢系に影響していることを指摘している。低下した心機能は再灌流療法により回復している点で、骨格筋への影響は慢性心不全の結果とは全く異なると考えられる。さらに梗塞・再灌流後の心機能の回復過程における骨格筋の形態的・代謝的变化を観察し、慢性心不全のそれと比較することは、末梢の骨格筋適応がいかに関心機能との連関に関わっているかを解析する手掛りとなると考えられる。これまで、心筋梗塞・再灌流後の骨格筋の代謝特性を調査した報告はみられない。

そこで我々は、心筋梗塞・再灌流後では、心不全とは異なり運動耐容能の低下に伴う大幅な活動量の減少による筋萎縮を伴わず骨格筋の代謝特性を変化させるという仮説をたてた。そして本研究は、この仮説を確かめ、さらに心不全モデルの先行研究との比較検討を行うために、ラットを用いて冠状動脈虚血後、再灌流を行い、心筋梗塞／再灌流後の慢性期（再灌流後4週間）での骨格筋の生化学的・組織化学的特性を調べることを目的とした。

II. 方 法

A. 実験動物

実験には8週齢のWistar Kyotoラット(n = 12)を用い、無作為に虚血/再灌流(MI)群(n = 6)とそのSham-operated(Sham)群(n = 6)を設けた。MI群ラットは、左開胸下で冠動脈を結紮し、約30分後に再灌流を行った。Sham群は、MI群と同様の30分間の左開胸手術だけを行った。両群は3週間後に、タリウム201(²⁰¹Tl)とヨード脂肪酸(¹²³I-BMIPP)による断層シンチグラフィ(dual SPECT)を実施した。さらに、12週齢時に、ネブタール麻酔下で生化学分析用に右後肢のヒラメ筋および長指伸筋を摘出し、液体窒素中に瞬間凍結し、また組織化学的分析用に、左後肢から同様の筋を摘出し、液体窒素によって冷却してあるイソペンタン液中で急速凍結を行った。最後に、心臓を摘出し、SPECT画像で評価した虚血部(前壁)と正常部(後壁)に分離し、液体窒素中で瞬間凍結した。生化学用・組織化学用試料は、分析を行うまで-80℃で保存した。

B. 心筋

1. 心筋シンチグラフィ

放射性同位元素(RI)である²⁰¹Tlと¹²³I-BMIPPをラットの大腿静脈より静注してから10分後、ピンホール型SPECT装置によって30分間の画像撮影により血流及び脂肪酸代謝イメージングを行った[13]。²⁰¹Tlは静注後、1回の灌流で約85%が生存している心筋細胞に取り込まれるため、心筋の相対的血流分布や生存能の評価に用いた。またメチル基を側鎖にもつ心筋脂肪酸代謝イメージング製剤である¹²³I-BMIPPを脂肪酸代謝の指標とした。本研究においては、この心筋シンチグラフィから、MI群の心臓において血行再建の成功が認められるか、脂肪酸代謝異常が観察されるかを確認した。本研究では特に、この血行再建が行われているが脂肪酸代謝異常のある部位を虚血部(ミスマッチ部)として評価した。

2. 生化学分析

心筋の機能低下の指標として生化学的分析を行った。Sham群及びMI群の前壁部(ミスマッチ部)と後壁部(正常部)について酸化系酵素活性であるCitrate synthase(CS)活性値及び3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase(HAD)活性値を測定した。この酸化系酵素活性値の測定は、175mM KCl, 10mM GSH, 2mM EDTA pH 7.4のbufferを含む溶液で筋サンプルを摩砕し、ミトコンドリアの膜を十分に壊すため、凍結、解凍を3回繰り返した。CS活性値は、Srere [14]、HAD活性値は、Bass et al. [15]の方法に基づいて行った。

C. 骨格筋

1. 筋線維組成比率と筋横断面積

ヒラメ筋および長指伸筋は、クリオスタット(Leica社製 JUNG CM1800)チャンバー内(-20℃設定)で10μmの連続横断切片を作成し、各横断切片に、myosin ATPase染色[16]とコハク酸脱水素酵素(SDH)染色[17]、alpha-glycerol phosphate dehydrogenase(α-GPD)染色[18]、amylase-PAS染色[19]を施した。筋線維タイプの分類、筋線維組成比率と単一筋線維の筋横断面積(CSA)の算出は、先行研究による[20]。ヒラメ筋は、slow twitch oxidative(SO)線維、fast twitch oxidative glycolytic(FOG)線維とこのSO線維とFOG線維の間(INT)線維に分類し、また長指伸筋は、SO線維、FOG線維、fast twitch glycolytic(FG)線維に分類した。

2. 単一筋線維のコハク酸脱水素酵素(SDH)及びグリセリン-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(α-GPD)活性

組織化学的手法を用いて、単一筋線維の酸化系酵素活性の指標としてコハク酸脱水素酵素(SDH)活性値を、解糖系酵素活性値の指標としてグリセリン-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(α-GPD)活性値を算出し、比較検討を行った。活性値の測定方法は、先行研究による[21]。

3. 毛細血管密度

amylase-PAS染色切片の画像を顕微鏡(日本

光学社製 Y2F-21) より取り込み、画像処理装置 (ピアス社製 LA-535FB) で各筋線維タイプ別の単一筋線維当たりの毛細血管数と毛細血管密度を Gray and Renkin [22] の方法によって算出した。

4. 生化学的分析

ヒラメ筋及び長指伸筋各全筋の摩砕したサンプルについて、酸化系酵素活性の指標としてCS活性値 [14] 及びHAD活性値 [15], 解糖系酵素活性値の指標としてLactic dehydrogenase (LDH) 活性値 [23] を測定した。各活性の測定は、先行研究による [24]。

D. 統計処理

MI群とSham群の各値の平均値を比較するためにunpaired t-testによって各々の有意性の検定を行った。有意水準は5%未満とした。

III. 結果

A. 体重, 筋重量, 心臓重量

表1に両群の体重, 筋重量 (ヒラメ筋, 長指伸筋) と心重量を示す。体重では, MI群はSham群と比較して10.9%高値を示した ($P = 0.007$)。しかしながら, 筋重量ではヒラメ筋 ($P = 0.744$), 長指伸筋 ($P = 0.436$) とともにMI群とSham群に統計的差異はみられなかった。心重量についてMI群は, Sham群と比較して32.0%の高値 ($P = 0.003$) を示し, 心筋肥大が観察された。

B. 心筋シンチグラフィ及び心筋生化学データ

写真1は放射性同位元素 (RI) を投与して, 臓器に集積したRIを γ 線検出する γ カメラで撮像した画像である。上図にMI群の血流分布を示し (Tl-201), 下図に脂肪酸代謝を示すI-123-BMIPP

の心筋シンチグラフィを表す。それぞれ左上断面が心尖部でそこから短軸断層像を右下断面の心基部まで連続的に表示する (左上断面1～右下断面16)。断面の上側は心臓前壁方向を示し, 色はRIの分布の程度を表している。特に上図断面8～10では, 前壁部も後壁部同様赤色で示されるとおり十分な血流分布が見られるが, 下図の同じ断面での前壁は, 明らかに123I-BMIPPの分布の程度が減少している。201-Tl心筋SPECTからMI群の心臓において前壁部 (虚血部) の血行再建の成功が認められるが, 123I-BMIPPの脂肪酸代謝イメージングより脂肪酸代謝異常が示された。

本研究では, MI群の心筋の正常部とミスマッチ部の生化学分析をおこなった結果 (図1), CS活性値は, Sham群の前壁部で $154.9 \pm 5.6 \mu\text{mol/g/min}$, 後壁部では, $148.5 \pm 4.6 \mu\text{mol/g/min}$ で有意差は見られなかった。一方, MI群も同様に正常部で $136.8 \pm 9.3 \mu\text{mol/g/min}$, ミスマッチ部では $113.7 \pm 10.1 \mu\text{mol/g/min}$ で正常部より16.9%低値を示し, Sham群の前壁部と比較して有意に低い値を示した ($P = 0.005$)。HAD活性値についても同様に, Sham群の前壁部の $99.7 \pm 5.1 \mu\text{mol/g/min}$, に対してMI群ミスマッチ部では, $68.3 \pm 9.5 \mu\text{mol/g/min}$ と有意に低値であった ($P = 0.015$)。

C. 骨格筋のタイプ別筋線維の組成比率と横断面積

表2に各群のヒラメ筋と長指伸筋におけるタイプ別筋線維組成比率とタイプ別の筋線維横断面積を示す。タイプ別筋線維組成比率は, ヒラメ筋, 長指伸筋とも有意差は観察されなかった。タイプ別筋線維横断面積については, ヒラメ筋では,

表1. 体重および骨格筋, 心重量

B. W. g		Soleus		EDL		Heart	
		Mg	mg/100g B. W	mg	mg/100g B. W	mg	mg/100g B. W
MI 群	372.5 ± 9.3	141.5 ± 7.8	37.9 ± 1.5	186.3 ± 8.0	49.9 ± 1.0	$1,178.2 \pm 55.7 *$	$315.9 \pm 11.7 *$
Sham 群	335.8 ± 5.8	130.0 ± 6.6	38.7 ± 1.8	172.0 ± 5.9	51.2 ± 1.2	892.8 ± 22.7	265.9 ± 5.0

数値は平均値 $\pm$ 標準誤差。* $P < 0.05$ (MI群 vs. Sham群)

Sham 群のSO 線維の $2530 \pm 176 \mu\text{m}^2$ に対して、MI 群は $3306 \pm 441 \mu\text{m}^2$ 、FOG 線維は、 $2546 \pm 159 \mu\text{m}^2$ に対して、MI 群は $2976 \pm 445 \mu\text{m}^2$ であり、MI 群で筋線維の肥大が観察された。しかしながら、長指伸筋では両群で顕著な差異は観察されなかった。

D. 骨格筋の単一筋線維の酵素活性

図2にヒラメ筋と長指伸筋の各筋線維タイプの平均単一筋線維SDH 活性値及び α -GPD 活性値を示す。単一筋線維のSDH 活性値をみると、MI 群では、長指伸筋については有意差が認められなかったが、ヒラメ筋での単一筋線維のSDH 活性値は、SO 線維で9.8% ($P = 0.027$)、FOG 線維で

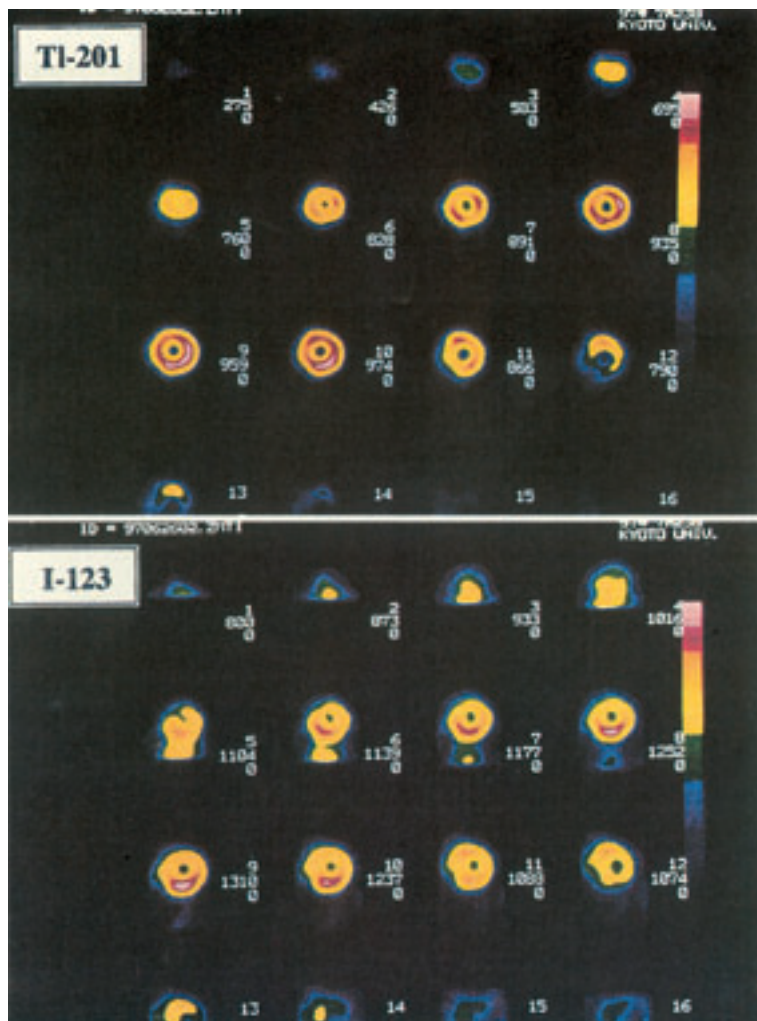


写真1. 心筋シンチグラフィ

写真1は放射性同位元素 (RI) を投与して、臓器に集積したRIを γ 線検出する γ カメラで撮像した画像である。上図にMI群の血流分布を示し (Tl-201)、下図に脂肪酸代謝の心筋シンチグラフィ (I-123-BMIPP) を表す。それぞれ左上断面が心尖部でそこから短軸断層像を右下断面の心基部まで連続的に表示する (左上断面1～右下断面16)。断面の上側は心臓前壁方向を示し、色はRIの分布の程度を表している。特に上図断面8～10では、前壁部も後壁部同様赤色で示されるとおり十分な血流分布が見られるが、下図の同じ断面での前壁は、明らかにI-123-BMIPPの分布の程度が減少し、脂肪酸代謝異常が示された。

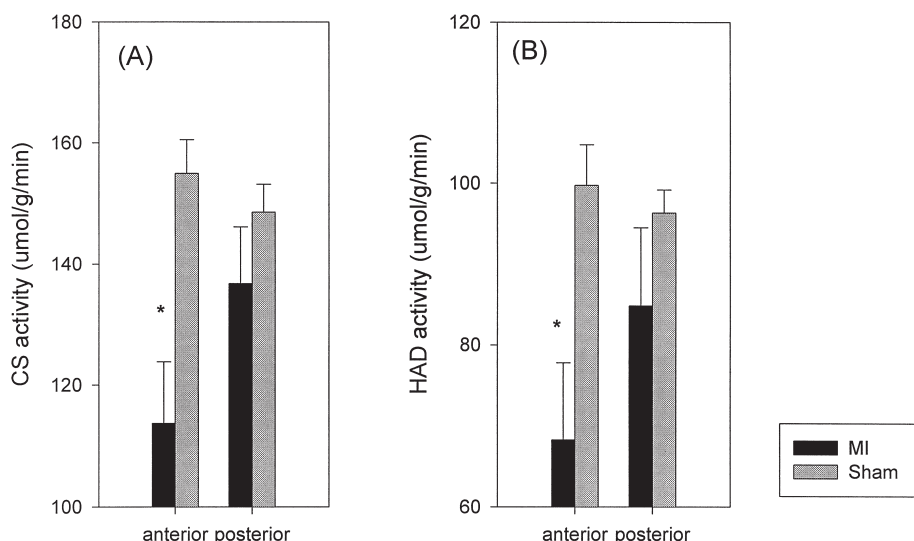


図1. 心筋正常部（後壁部）及びミスマッチ部（前壁部）のCS (A), HAD (B) 活性値
数値は平均値±標準誤差. * P < 0.05 (MI群 vs. Sham群)

表2. 骨格筋の筋線維タイプ別組成比率と筋線維タイプ別の筋横断面積

		Fiber type distribution (%)		CSA (μmm^2)	
		MI 群	Sham 群	MI 群	Sham 群
Soleus	SO 線維	85.8 ± 2.1	79.8 ± 2.1	3,306 ± 180 *	2,529 ± 72
	FOG 線維	7.3 ± 2.1	9.6 ± 2.3	2,976 ± 182	2,546 ± 65
	INT 線維	7.0 ± 0.8 *	10.6 ± 1.3	2,772 ± 161 *	2,220 ± 51
EDL	SO 線維	4.4 ± 0.6	4.0 ± 0.5	1,211 ± 47	1,201 ± 28
	FOG 線維	46.5 ± 0.9	48.2 ± 2.3	1,850 ± 97	1,813 ± 81
	FG 線維	49.1 ± 1.1	47.8 ± 2.0	3,808 ± 228	3,867 ± 236

数値は平均値±標準誤差. * P < 0.05 (MI 群 vs. Sham 群)
CSA; 筋横断面積

8.0% (P = 0.044), INT 線維で 10.2% (P = 0.012) の有意な低下が認められた. 一方, α -GPD 活性値は, MI 群と Sham 群に有意差は認められなかった.

E. 毛細血管密度

図3にヒラメ筋と長指伸筋の筋線維タイプ別毛細血管密度を示す. MI 群では, Sham 群と比較して筋線維タイプ別毛細血管密度は, ヒラメ筋の SO 線維で 18.5% (P = 0.033), FOG 線維で 18.2% (P = 0.109), INT 線維で 14.4% (P = 0.224) の低下が観察された. また長指伸筋につ

いても MI 群の SO 線維で 12.6%, FG 線維で 7.6% の低下が観察された.

F. 骨格筋の生化学的特性

表3にヒラメ筋と長指伸筋の生化学的分析 (CS 活性値, HAD 活性値及び LDH 活性値) の結果を示す. MI 群のヒラメ筋では, 酸化系酵素である CS と HAD は Sham 群より低い活性値を示したが, 有意差は認められなかった. LDH 活性値及び長指伸筋の CS 活性値と HAD 活性値は, MI と Sham はほぼ同値を示した.

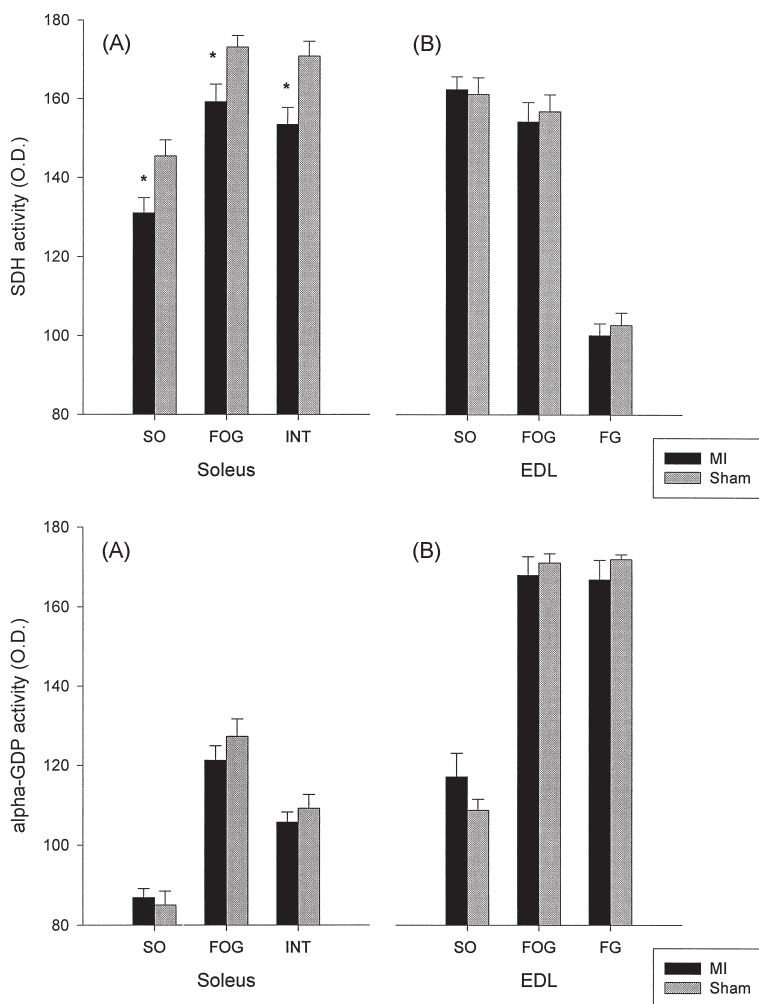


図2. ヒラメ筋 (A) 及び長指伸筋 (B) の単一筋線維のSDH (上グラフ), α -GPD (下グラフ) 活性値
 数値は平均値 $\pm$ 標準誤差. * $P < 0.05$ (MI群 vs. Sham群)
 SO ; SO線維, FOG ; FOG線維, FG ; FG線維, INT ; 中間線維

IV. 考 察

本研究では、ラットを用いて冠状動脈結紮後、再灌流を行い慢性期（再灌流後4週間）での骨格筋に及ぼす影響について検討した。 ^{201}Tl による血流イメージングからみると、血行再建が観察されるが、 ^{123}I -BMIPPの脂肪酸代謝イメージングでは脂肪酸代謝異常が確認された。再灌流直後には心筋は、stunned myocardiumの状態であり、この心機能が回復するためには、数日から2週間程度

かかるので、この期間中は壊死心筋量が小さくても心機能が著しく低下している [25]。しかしながら、慢性期では心機能が回復しているため、骨格筋に及ぼす影響は慢性心不全の結果と異なることが予期された。本研究の実験結果では、慢性心不全でみられるような筋萎縮、筋線維組成比率の変化は観察されなかった。しかしながら、遅筋における毛細血管密度の選択的な低下に伴い、単一筋線維の酸化系酵素活性が有意に低下していることが明らかになった。

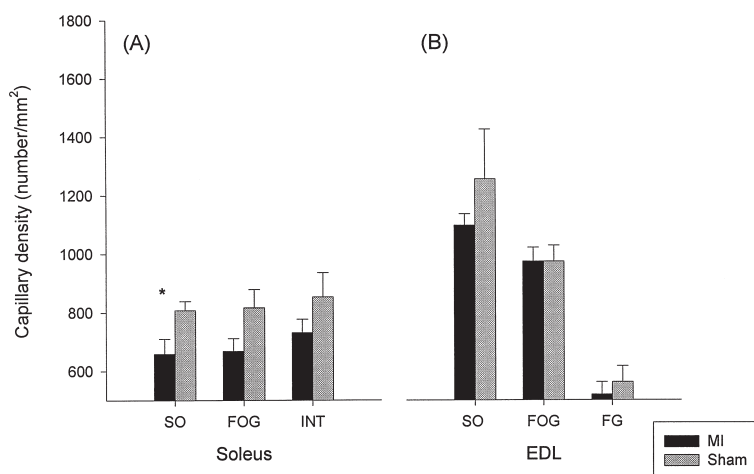


図3. ヒラメ筋 (A) 及び長指伸筋 (B) の単一筋線維の毛細血管密度
 数値は平均値±標準誤差. * $P < 0.05$ (MI群 vs. Sham群)
 SO ; SO 線維, FOG ; FOG 線維, FG ; FG 線維, INT ; 中間線維

表3. 骨格筋の生化学的分析

		CS ($\mu\text{mol/g/min}$)	HAD ($\mu\text{mol/g/min}$)	LDH ($\mu\text{mol/g/min}$)
Soleus	MI 群	24.0 $\pm$ 0.5	11.5 $\pm$ 1.2	225.1 $\pm$ 7.0
	Sham 群	28.4 $\pm$ 2.0	13.4 $\pm$ 0.5	225.6 $\pm$ 11.2
EDL	MI 群	19.9 $\pm$ 1.9	5.9 $\pm$ 0.5	577.7 $\pm$ 19.1
	Sham 群	20.5 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 0.6	569.1 $\pm$ 33.7

数値は平均値±標準誤差.

CS ; Citrate synthase

HAD ; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

LDH ; Lactic dehydrogenase

A. 再灌流後の心肥大と骨格筋重量の変化

骨格筋 (ヒラメ筋, 長指伸筋) の重量は, MI 群と Sham 群と比較して, 差異はみられなかったが, 心重量で顕著な差が観察され, MI ラットの心重量は, 18.8% の増加が観察され, 代償性心肥大が生じたと考えられる. また心肥大は, 梗塞後遅延して形成されるが [26], 1 週間以内の早期に起こる [27] という先行研究の結果に一致するものであった. Anversa et al. [28] は, ラットの心筋梗塞後の心肥大について心重量から検討し, 右心室でその増大は顕著で 30% の増加を示しているが, 全心重量は 10% の増加であることを報告している. 我々の結果は, この先行研究の

結果と比較して梗塞後の全心重量の増加がより大きいことが認められた.

先行研究により, 心筋梗塞後の慢性期に非梗塞部の生存心筋は, 容量負荷のために肥大し, 梗塞により障害された左室収縮機能の改善に寄与することが報告されており [29, 30], 虚血による心肥大反応は, 心筋梗塞後の心臓やその局所的心筋の機能回復に重要な役割をもつと考えられる. この心肥大形成のメカニズムには, 心筋細胞に加わる機械的な伸展負荷 [31] やカテコラミン, アンジオテンシン等の液性因子による負荷 [32] に対する適応現象と考えられている. 我々の研究 (未発表資料) によれば, 虚血部位の心筋では, SDH

活性が減少し、 α -GPD 活性が骨格筋の運動刺激の有無にかかわらず上昇していることを確認している。これは酸化能という観点からみれば、正常部位における代謝的代償性と考えられる。骨格筋についても持久性トレーニングにおいて、さほど筋肥大が生じないのはこの生理的メカニズムに基づくからである。一方、梗塞発生後の再灌流に関する心肥大を含む remodeling についての報告も行われている。Kambayashi et al. [33] は、再灌流された梗塞部の生存心筋も肥大が起こることを明かにしている。しかしながら、再灌流により梗塞巣の伸展、左室拡張が有意に抑制されていることが実験的に確かめられている [34, 35]。また臨床的にも再灌流が remodeling の抑制に有効であることが報告されており [36, 37]、心不全における remodeling とは、差異があることが示唆されるが、本研究の再灌流における remodeling の抑制の程度については、重量データの推測からは明らかではない。

B. 再灌流後の筋線維組成比率の変化

骨格筋の筋線維組成比は、循環系疾患のリスクファクターである高血圧やインスリン抵抗性、肥満により変化することが報告されている [38]。また循環系疾患についても、Drexler et al. [6] や Sullivan et al. [5] は、慢性心不全患者の外側広筋の筋線維組成比が Type I から Type II に移行することを示し、さらに冠状動脈を結紮した慢性心不全ラットについても、Type I 線維の減少が報告されている [9]。骨格筋線維の中で Type II (速筋線維) が増加する理由については明らかではないが、交感神経ホルモンや甲状腺ホルモンなど自律神経調節因子や循環動態に関連性のあるインスリン抵抗性が筋線維組成比の変化に影響していることが考えられる [21, 39]。このことから、心不全による心機能低下に伴う末梢循環異常 [40, 41] や自律神経調節異常 [42] が関与していることが考えられる。一方、骨格筋の不活動によっても同様に Type II (速筋線維) が増加することから、心不全における筋線維組成比の変化の原因が心機能の低下に伴う活動量の減少である可能

性についても指摘されている [5]。Simonini et al. [9] は、心筋梗塞ラットのヒラメ筋の Type I 線維と心機能 (LVWDP, 左心室拡張終期血圧) と有意な逆相関関係 ($r = -0.83$, $p < 0.01$) にあることを示している。しかしながら、本研究では、MI 群の心機能は、明らかに低下しているにもかかわらず、慢性心不全の先行研究の結果と異なり、MI 群の筋線維組成比は、Sham 群と比較して顕著な差異が観察されなかった。筋線維組成比に与える影響について慢性心不全と虚血/再灌流モデルとの差異は明確ではないが、運動耐容能の低下に伴う大幅な活動量の減少の影響または、心機能低下やそれに伴う末梢循環異常及び自律神経調節異常の程度の違いが、これらの筋線維組成比の差異に関係していることが示唆される。

C. 心筋梗塞後の筋線維横断面積の変化

心不全により筋萎縮が起こることが既に報告されている [5, 6]。この原因としては筋肉を使わないことによるもの (disuse atrophy) の他に慢性の血流不足、または神経性・内分泌性異常が考えられる。心機能低下による交感神経活動亢進やレニン-アンジオテンシン系の賦活化に伴う過剰な血管収縮 [43]、内皮由来依存性血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) の産生減少による血管拡張能の低下 [44] が心疾患での筋血流量の低下 [45] を惹起している。この点に関して、再灌流直後の MI 群骨格筋においても末梢循環異常が起こっていることが考えられる。さらに心筋梗塞後の Type I 線維に選択的な血流低下 [11] が観察されていることから、本研究においても心筋梗塞直後の筋血流量の低下による筋線維萎縮が生じたと推測できる。しかしながら、MI 群の筋線維タイプ別横断面積を Sham 群と比較すると長指伸筋では、各筋線維タイプにおいて有意差がみられなかったが、ヒラメ筋については、MI ラットで有意に高値を示し、筋線維肥大が認められた。Kambayashi et al. [33] や Bush et al. [46] は、梗塞後再灌流による心機能の変化を経時的に観察しており、梗塞後に心機能は著しく低下するが、数週間で心機能が回復することを示している。本研究

のMI群においても心機能の回復により末梢循環異常が改善されたことが考えられる。したがって、MI群で観察された筋線維の肥大は、この末梢循環異常の改善及び心筋梗塞直後の筋萎縮に対するタンパク合成促進などが寄与していることが考えられるが明らかではない。

D. 再灌流後の骨格筋の単一筋線維酵素活性、生化学的特性と毛細血管密度

心筋梗塞に伴い骨格筋の酸化系代謝レベルが減少することが報告されている [4-6, 9, 12, 47]。中でも、Wiener et al. [47] や Massie et al. [4] の報告から、心不全で観察されるこれらの変化は、末梢骨格筋での血流量の低下 [45] により誘因されていることが考えられ、本実験でも同様の知見が得られることが予想された。心不全ラットのヒラメ筋と足底屈筋のSDH活性に変化がないことを報告している先行研究もみられる [10] が、ほとんどの先行研究では、心筋梗塞に伴い骨格筋の代謝の変化、特に酸化系代謝レベルの減少を報告している。Sullivan et al. [5] や Drexler et al. [6] は、慢性の心不全患者の骨格筋の筋生検において、ミトコンドリアの容積密度の減少、ミトコンドリア酸化系酵素の減少を認めている。また Massie et al. [48] や Arnolda L. et al. [12] は、心不全により骨格筋クレアチン燐酸の減少が大きく、細胞内のpHが低いことを報告している。本研究のMI群では、長指伸筋については差が認められなかったが、ヒラメ筋について選択的に単一筋線維及び全筋の酸化系酵素活性は低下しており、これは、毛細血管密度の結果と一致するものであった。長指伸筋とヒラメ筋の差異は、筋代謝における酸素供給能の依存度の差によるものと考えられる。再灌流後4週間では、心機能改善に伴い筋血流も改善していることが考えられ、実際、単一筋線維当たりの毛細血管数に差は認められなかった。しかしながら、再灌流後4週間では、ヒラメ筋において筋線維肥大が起こっているため、結果として毛細血管密度はMI群は、Sham群と比較して低値を示した。つまり再灌流後4週間では、筋血流の改善が行われているが、筋肥大に伴う毛細血管

床の発達が不十分であるため、末梢での酸素供給能が減少し、有酸素代謝の低下、酸化系酵素活性の低下が誘因されたと考えられる。Arnolda et al. [12] は、心不全ラット骨格筋のCS活性は有意な低下を示しているが、解糖系酵素活性のPFK活性やLDH活性に差がみられないことを認めている。本研究においても解糖系酵素活性については、MI群とSham群に差は認められず、心機能低下に伴う末梢循環異常は、骨格筋の解糖系代謝特性に影響を与えないことが示唆された。

E. まとめ

本研究は冠動脈結紮後の再灌流による心機能と骨格筋の組織化学的・生化学的特性への影響を検討した。先行研究では、慢性心不全の場合について、Type I 線維の減少、酸化系酵素活性の減少 [9]、ミトコンドリアの容積密度及び酸化系酵素の減少 [5, 6] が示されている。また骨格筋の運動中のエネルギー代謝についてはクレアチン燐酸の減少が大きく、細胞内のpHが低値を示し [12, 48]、さらに筋出力の低下 [7] が報告されている。一方、Birnbbaum et al. [49] は、冠状動脈虚血/再灌流前の骨格筋への電気刺激により梗塞サイズが減少していることを報告している。したがって、心機能と骨格筋の生理学的特性の関連性が心臓循環系疾患において重要である可能性が考えられる。急性心筋梗塞の治療は大きく変化し、血栓溶解薬や血管形成術などにより発症後数時間以内に再灌流療法が行われるようになった。心筋梗塞後の再灌流により、心機能の改善 [25] が認められており、骨格筋への影響も心不全とは異なる。また心機能の回復過程においても、骨格筋への反応は異なることが考えられる。再灌流後4週間では、心機能の改善により筋萎縮は観察されなかったが、タンパク合成に伴う毛細血管床の発達が不十分なため毛細血管密度は結果として低下しており、それに伴い酸化系の代謝レベルも低下を示した。末梢での送血能の変化により特に代謝に影響を受けやすい筋、筋線維において選択的に有意な変化をおこしたと考えられる。このような心機能の改善に伴う骨格筋の反応の差異は、骨格筋と心

機能が連関していることを示しており、さらに心臓循環系疾患の骨格筋代謝特性の変容は、運動耐容能の低下に伴う大幅な活動量の減少の影響だけではないことを示唆している。

文 献

1. Wilson J.R, Wiener D.H, Fink L.I and Ferraro N : Vasodilatory behavior of skeletal muscle arterioles in patients with nonedematous chronic heart failure. *Circulation*. 74 : 775-779, 1986.
2. Wilson J.R, Martin J.L and Ferraro N : Impaired skeletal muscle nutritive flow during exercise in patients with congestive heart failure : role of cardiac pump dysfunction as determined by the effects of dobutamine. *Am. J. Cardiol*. 53 : 1308-1315, 1984.
3. Minotti J R, Christoph I, Oka R, Wiener M. W, Wells L and Massie B. M : Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure : relationship to systemic exercise performance. *J. Clin. Invest.* 88 : 2077-2082, 1991.
4. Massie B, Conway M, Yonge R, Frostick S, Ledingham J, Sleight P, Radda G, and Rajagopalan B : Skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure : relation to clinical severity and blood flow. *Circulation*. 76 : 1009-1019, 1987.
5. Sullivan M.J, Green H.J and Cobby F.R : Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation*. 81 : 518-527, 1990.
6. Drexler H, Reide U and Just H : Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation*. 85 : 1751-1759, 1992.
7. Lipkin D.P, Jones D.A, Round J.M and Poole-wilson P. A : Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol*. 18 : 187-195, 1988.
8. Minotti J.R, Christoph I and Massie B. M : Skeletal muscle function, morphology, and metabolism in patients with congestive heart failure. *Chest*. 101 : 333S-339S, 1992.
9. Simonini A, Long C.S, Dudley G.A, Yue P, McElhinny J. and Massie B. M : Heart Failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circulation Reserch* 79 : 128-136, 1996.
10. Musch T.I, Moore R.I, Leathers D.J, Bruno A and Zelis R : Endurance training in rats with chronic heart failure induced by myocardial infarction. *Circulation*. 74 : 431-441, 1986.
11. Bylund A.C, Hammarsten J, Holm J and Schersten T : Enzyme activities in skeletal muscles from patients with peripheral artery insufficiency. *Eur. J. Clin. Invest.* 6 : 425-429, 1976.
12. Arnolda L, Brosnan J, Rajagopalan B and Radda G. K. C : Skeletal muscle metabolism in heart failure in rats. *Am. J. Physiol*. 261 : H434-H442, 1991.
13. Hirai T, Nohara R, Ogoh S, Chen L, Hosokawa R, Li X, Fujita M, Matsumori A, Taguchi S and Sasayama S : Serial evaluation of fatty acid metabolism in rat with myocardial infarction by pinhole SPECT. *J. Nucl. Cardiol*. 8 : 472-481, 2001.
14. Srere P.A : Citrate Synthase : Methods in Enzymology 13 : 3-11, 1969.
15. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S and Pette D. : Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur. J. Biochem*. 10 : 198-206, 1969.
16. Padykula H.A and Herman E. : The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem*. 3 : 170-195, 1955.
17. Nachlas M.M, Tsou K, DeSousa E, Cheng C and Seligman A.M : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem*. 5 : 420-436, 1957.
18. Martin T.P, Vailas A.C, Durivage J.B, Edgerton V.R and Castleman K.R : Quantitative histochemical determination of muscle enzymes : biochemical verification. *J. Histochem. Cytochem*. 10 : 1053-1059, 1985.
19. Anderson P : Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta Physiol. Scand*. 95 : 203-205, 1975.
20. 小河繁彦, 山崎先也, 岡本 啓, 福田 俊, 家森幸男, 田口貞善. : 模擬無重力による高血圧自然発症ラット骨格筋の組織化学的特性及び骨代謝への影響. *日本生理学雑誌* 57 : 419-426, 1995.
21. 小河繁彦, 岡本 啓, 山崎先也, 飯田治三, 福田 俊, 家森幸男, 田口貞善. : 脳卒中易発症高血圧自然発症ラットにおける骨格筋の組織化学的・生化学的特性. *日本生理学雑誌* 58 : 321-330, 1996.
22. Gray S.D and Renkin E.M : Microvascular supply in relation to fiber metabolic type in mixed skeletal muscle of rabbits. *Microvascular Research* 16 : 406-425, 1978.
23. Pesce A, McKay R.H, Stolzenbach F, Cahn R.D and Kaplan N.O : The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. *J. Biol. Chem*. 239 : 1753-1761, 1964.
24. 小河繁彦, 津田謹輔, 田口貞善. : ACE阻害剤に対する脳卒中易発症高血圧ラットの骨格筋線維の形態的・酵素化学的適応. *日本生理学雑誌* 61 : 295-304, 1999.
25. Braunwald E. and Kloner R.A : The stunned myocardium : prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 66 : 1146-1149, 1982.
26. Olivetti G, Capasso J.M, Meggs L.G, Sonnenblick, E.

- H. and Anversa, P. : Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ. Res.* 68 : 856-869, 1991.
27. Rockman H.A, Ross R.S, Harris A.N, Knowlton K.U, Steinhilper M.E, Field L.J, Ross J. Jr. and Chien, K.R : Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88 : 8277-8281, 1991.
28. Anversa P, Beghi C, McDonald, S.L, Levicky V, Kikkawa Y and Olivetti G : Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *Am. J. Pathol.* 116 : 504-513, 1984.
29. Rubin S.A, Fishbein M.C, Swan H.J.C and Rabines A : Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1 : 1435-1441, 1983.
30. Ginzton L.E, Conant R, Rodrigues D.M and Laks M.M : Functional significance of hypertrophy of the noninfarcted myocardium after myocardial infarction in humans. *Circulation.* 80 : 816-822, 1989.
31. Kumuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Takaku F and Yazaki Y : Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 266 : 1265-1268, 1991.
32. Simpson P.C, Kariya K, Karns L.R, Long C.S and Karliner J.S : Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth (review). *Mol. Cell Biochem.* 104 : 35-43, 1991.
33. Kambayashi M, Miura T, Oh B. H, Murata K, Rockman H.A, Parra G and Ross Jr J : Myocardial cell hypertrophy after myocardial infarction with reperfusion in dogs. *Circulation.* 86 : 1935-1944, 1992.
34. Hochmann J.S and Choo H : Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation.* 75 : 299-306, 1987.
35. Hale S.L and Kloner R.A : Left ventricular-topographic alterations in the completely healed rat infarct caused by early and late coronary artery reperfusion. *Am. Heart J.* 116 : 1508-1513, 1988.
36. Braunwald E : Myocardial reperfusion, limitation and improved survival : should the paradigm be expanded. *Circulation.* 79 : 441-444, 1989.
37. Bonaduce D, Petretta M, Villari B, Breglio R, Conforti G, Montemurro M.V, Lanzillo T, and Morgano G : Effect of late administration of tissue-type plasminogen activator on left ventricular remodeling and function after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 16 : 1561-1568, 1990.
38. Bassett, D.R. : Skeletal muscle characteristics : relationships to cardiovascular risk factors. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26 : 957-966, 1994.
39. Ogoh S, Yamasaki S, Okamoto H, Fukuda S and Taguchi S : The comparison of oxidative enzyme activity in skeletal muscle from stroke-prone spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Jpn Heart J* 37 : 579, 1996.
40. 廣岡良隆, 竹下 彰 : 末梢循環の役割. *最新医学.* 50 : 1531-1536, 1995.
41. Zelis R and Flaim S.F : Alterations in vasomotor tone in congestive heart failure. *Prag. Cardiovasc. Dis.* 24 : 437-459, 1982.
42. Leimbach W.N, Wallin B.G, Victor R.G, Aylward P.E, Sundlof G and Mark A.L : Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation.* 73 : 913-919, 1986.
43. Zucker I.H, Wang W, Brandle M, Schultz, H.D. and Patel, K.P. : Neural regulation of sympathetic nerve activity in heart failure. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 37 : 397-414, 1995.
44. Drexler, H. : Changes in the peripheral circulation in heart failure. *Curr. Opin. Cardiol.* 10 : 268-273, 1995.
45. Zelis R, Longhust J, Capone R.J and Mason D.T : A comparison of regional blood flow and oxygen utilization during dynamic forearm exercise in normal subjects and patients with congestive heart failure. *Circulation.* 50 : 137-143, 1974.
46. Bush L.R, Buja M, Samowitz W, Rude R.E, Wathen M, Tilton G.D and Willerson J.T : Recovery of left ventricular segmental function after long-term reperfusion following temporary coronary occlusion in conscious dogs. *Circ. Res.* 53 : 248-263, 1983.
47. Wiener D.H, Fink L.I, Maris J, Jones R.A, Chance B and Wilson J.R : Abnormal skeletal muscle bioenergetics during exercise in patients with heart failure : role of reduced muscle blood flow. *Circulation.* 73 : 1127-1136, 1986.
48. Massie B.M, Conway M, Rajagopalan B, Yonge R, Frostick S, Ledingham J, Sleight P and Radda G : Skeletal muscle metabolism during exercise under ischemic conditions in congestive heart failure : evidence for abnormalities unrelated to blood flow. *Circulation.* 78 : 320-326, 1988.
49. Birnbaum Y, Hale S.L and Kloner R.A : Ischemic preconditioning at distance Reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation.* 96 : 1641-1646, 1997.

Adaptation in Properties of Skeletal Muscle to Coronary Artery Occlusion/Reperfusion in Rats.

Shigehiko OGOH¹⁾, Taku HIRAI²⁾, Ryuuji NOHARA³⁾ and Sadayoshi TAGUCHI⁴⁾.

¹⁾Department of Integrative Physiology, Health Science Center at Fort Worth,
University of North Texas, Texas, U.S.A. 760107-2699

²⁾Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University

³⁾Division of Cardiology, Department of Medicine, Kitano Hospital, Osaka, Japan 530-8480

⁴⁾Department of Environmental Physiology, Graduate School of Human and
Environmental Studies, Kyoto University
(e mail: staguchi@fischer.jinkan.kyoto-u.ac.jp)

The present study was designed to determine if changes in function and metabolism of heart muscle induce alterations in characteristics of skeletal muscle. We investigated the histochemical and biochemical properties of soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles in Wistar rats at the chronic phase after coronary artery occlusion/reperfusion. The size of myocardial infarct region was evaluated using a high resolution pinhole single photo emission computed tomography (SPECT) system. 4wk after left coronary artery occlusion/reperfusion, the SOL and EDL of hindlimb were dissected out and immersed in isopentane cooled with liquid nitrogen for subsequent histochemical and biochemical analysis. From SPECT imaging, the blood circulation was recovered, but the recovery of fatty acid metabolism was not observed in infarct region of heart. Citrate synthase (CS) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) activities in infarct region of heart were lower in the myocardial infarction (MI, n=6) group compared with that of age-matched sham-operated (Sham, n=6) group. In addition, heart muscle hypertrophy caused by the dysfunction in MI group was observed. In skeletal muscle, the atrophy and transition of fiber type distribution in MI group, reported in previous studies of heart failure, were not observed. However, the succinate dehydrogenase (SDH) activity in the slow twitch oxidative (SO) from SOL of MI group decreased by 9.8% and in the fast twitch oxidative glycolytic fibers (FOG), 8.0% as compared with sham group. Capillary density of the SO fibers from SOL of MI group also reduced by 18.5% and in the FOG fibers, 18.2 % as compared with Sham group. Decreased capillary density in this study related significantly to decreased SDH activity of single muscle fibers in chronic phase of perfusion after surgical infarction. Our results make it clear that there is a difference in the reaction of skeletal muscle to coronary artery occlusion/reperfusion compared with chronic heart failure. However, our data would support the notion that there is a linkage between the function of heart and physiological properties of skeletal muscle.

Key words: coronary artery occlusion, reperfusion, skeletal muscle, metabolism, rat