熱傷による心機能低下に関するパッチクランプ法を用いた電気生理学的研究

佐野　和憲

福岡大学薬学部　〒814-0180　福岡市城南区七隈 8-19-1

Electrophysiological study on cardiac hypofunction induced by burn injury

Kazunori Sano

Faculty of Pharmaceutical Science, Fukuoka University,
8-19-1 Nanakuma, Fukuoka, 814-0180, Japan

Abstract

Gut-derived factors in intestinal lymph have been shown to trigger myocardial contractile dysfunction. However, the underlying cellular mechanisms remain unclear. We examined the effects of physiologically relevant concentrations of mesenteric lymph collected from rats with 40% burn injury (burn lymph) on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. 0.5% burn lymph enhanced myocyte contraction and the amplitude of Ca^{2+} transient by reducing transient outward K^+ currents (I_{to}), thereby inducing cardiac hypertrophy. On the other hand, 1% burn lymph initially enhanced myocyte contraction, which was followed by a block of contraction. The initial positive inotropic effect was associated with a prolongation of action potential duration, leading to significant increases in the net Ca^{2+} influx. The negative inotropic effect was accompanied by a decrease in the action potential plateau and membrane depolarization. Voltage-clamp experiments revealed that the positive inotropic effects of 1% burn lymph were due to an inhibition of I_{to}, and the inhibitory effects were due to an inhibition of Ca^{2+} currents (I_{Ca}) and inward rectifier K^+ currents (I_{K1}). Also, ventricular myocytes isolated from hearts of rats at 4 h postburn had an increased contractility and the amplitude of Ca^{2+} transient by a reduced I_{to}, whereas had a decreased contractility and the amplitude of Ca^{2+} transient due to a reduced I_{Ca} at 24 h. These effects were prevented by mesenteric lymph duct ligation. These findings provide strong evidence that mesenteric lymph is involved in the onset of burn-related cardiomyocyte dysfunction, which is associated with the dysfunction of ion channels such as I_{Ca}, I_{to} and I_{K1}.

緒言

外傷，出血，感染などの外科的侵襲は，生体に大きな影響を及ぼしショック（抹消循環不全）を引き起こす．生体循環の中心である心臓は，肺，腎臓，肝臓などと同様にショックによって著しい機能障害を受けやすい．このような病態は非常に重篤であり，対応も困難を極める．実際に，1931年Blalockによって，熱傷は心機能低下を起こすことが報告されており (2)，1984年にはAdamsらがモルモットを用いて熱傷モデルを作成し，全体表面積 (total body surface area : TBSA) の47%以上の熱傷は，左心室の収縮機能を低下させることを明らかにした (3, 4, 5)．近年でも臨床・基礎的研究において，熱傷は心機能の低下を誘発することが多数報告されており (6, 7, 8, 9, 10, 11)，熱傷による心機能の低下にはカルシウムの制御異常が関係していることが知られている (8, 9, 10, 11)．熱傷によるこれらの変化は心不全の症状に似ており，熱傷は心不全のリスクファクターの一つなのかもしれない．心不全とは心臓の血液拍出が不十分であり，全身が必要とするだけの循環量を保てない病態を指し，その前段階の症状として心肥大が誘発される (12)．心不全と心肥大もカルシウム制御異常と密接に関与している (13)．熱傷による心機能低下に関わる液性因子としてアンギオテンシンⅡ，TNF-α，IL-1β，IL-6, TGF-βなどのサイトカイン，リポ多糖体 (LPS, endotoxin), High mobility group box-1 (HMGB-1) など多数の物質が挙げられているが，はっきりとした原因物質は特定されていない．また，その物質が誘導される機序も分かられていない．しかしながら，重症熱傷による多臓器不全患者において，検死解剖によって感染病巣の存在が無いにもかかわらず敗血症症状が観察されることが報告されており，近年，多臓器不全誘発因子の侵入口として腸管が注目されている．熱傷，大出血，敗血症，アナフィラキシーによるショック症状は，全身の低灌流状態を起こす．そのことで腸管虚血が誘発され，小腸繊毛部での血流低下，酸素欠乏が著しくなり腸管粘膜が障害される．このことによって，多臓器不全誘発因子が体循環系へ入り多臓器不全を起こすことが知られている．また，熱傷を処置したラットから収集したリンパ液には心不全を誘発する作用があり (14)，腸間膜リンパ管結紮によって熱傷による心不全症状が改善することが報告されていることから (15)，熱傷によって，腸管内腔から腸間膜リンパ液を介して体循環系へ心機能抑制因子が輸送されることが考えられる．

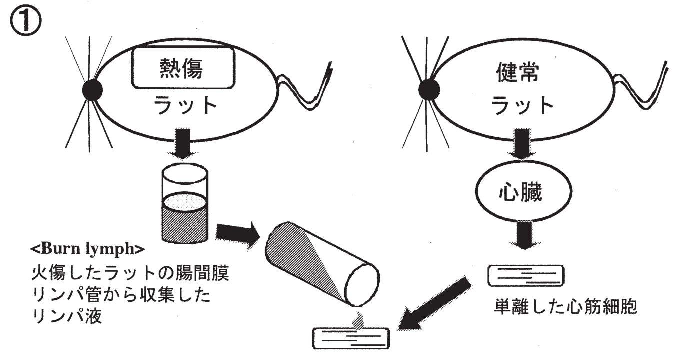
そこで本研究では，① 熱傷を処置したラットから収集した腸間膜リンパ液 (Burn lymph) の心機能に対する影響をパッチクランプ法，Contraction 測定法，Ca-transient 測定法，細胞表面積測定を用いて検討し，次に，② 腸間膜リンパ管結紮 (LDL) によって，熱傷の心機能に対する影響が抑制されるのかどうか，また，その影響が Burn lymph と同様のメカニズムで発現しているかどうかをパッチクランプ法，Contraction 測定法，Ca-

transient 測定法を用いて検討した.

熱傷の処置と心筋細胞の単離方法

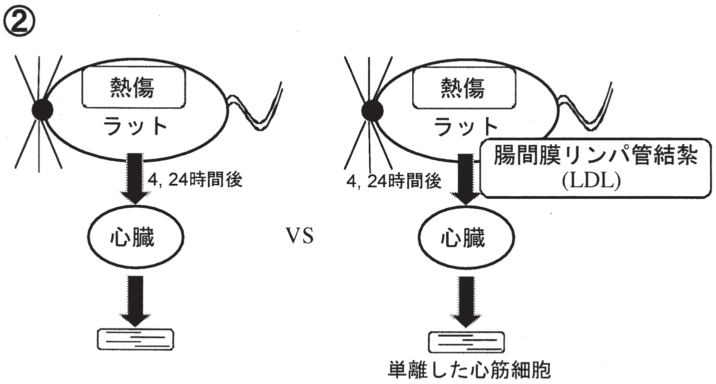
① 熱傷を処置したラットから収集した腸間膜リンパ液 (Burn lymph) の心機能に対する影響

図①のように，麻酔後，ラットの背中部分を 10 秒間 100℃の熱湯中に浸し，その後，腹部分を 5 秒間 100℃の熱湯中に浸すことによって全体表面積の 40%を熱傷処置し，3 時間後にラットの腸間膜リンパ管にカテーテルを挿入し腸間膜リンパ液を収集した． その腸間膜リンパ液を，健常なラットからランゲンドルフ灌流装置によって単離した心筋細胞に直接暴露し測定を行った.



② 熱傷を処置したラットの心機能に対する腸間膜リンパ管結紮 (LDL) の影響

図②のように，麻酔後，ラットを開腹し腸間膜リンパ管を結紮した． その後，熱傷を処置し，ランゲンドルフ灌流装置によって単離した心筋細胞を用いて測定を行った.



熱傷を処置したラットから収集した腸間膜リンパ液 (Burn lymph) の心機能に対する影響

【0.5% Burn lymph による影響】

0.5% Burn lymph は，ラット心筋細胞内 Ca^{2+}濃度を増加することによって収縮を増強した (fig.1). 心筋細胞内 Ca^{2+}濃度の増加は， L 型 Ca^{2+}チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+}流入の増加，Na^{+}/Ca^{2+}交換系 (NCX) を介した細胞外からの Ca^{2+}流入の増加，小胞体 (SR: sarcoplasmic reticulum) に含まれる Ca^{2+}含量の増加，K^{+}チャネルの抑制によって起こる． そこで，0.5% Burn lymph の L 型 Ca^{2+}チャネル，NCX，SR Ca^{2+}含量，K^{+}チャネルに

対する影響を検討した．その結果，0.5% Burn lymphは，Ca^{2+}チャネル，NCX，SR Ca^{2+}含量に影響しなかったが，一過性外向き K^+電流（I_{to}）を有意に抑制した（fig.2）．また，0.5% Burn lymphは活動電位持続時間を有意に延長した．0.5% Burn lymphによるCa^{2+}電流（I_{Ca}），SR Ca^{2+}含量の変化を伴わない細胞内 Ca^{2+}濃度の増加は，心肥大の症状と似ている．そこで，0.5% Burn lymphの心肥大作用の有無を更に詳しく検討するため，ラット初代培養心筋細胞を用いて 0.5% Burn lymph の心筋細胞表面積に対する影響を検討した．また，α_1 作動薬である Phenylephrine は，I_{to}を抑制することによって心肥大を誘発することが知られていることから，Phenylephrineと比較検討を行った．その結果，0.5% Burn lymphは細胞表面積を拡大した（fig.3）．この0.5% Burn lymphの影響は20 μM Phenylephrineによる細胞表面積拡大と同様の影響であった．これらのことから，0.5% Burn lymph はI_{to}の抑制を介して活動電位持続時間を延長させ，細胞内 Ca^{2+}濃度を増加することによって心肥大様の症状を起こすことが明らかとなった．

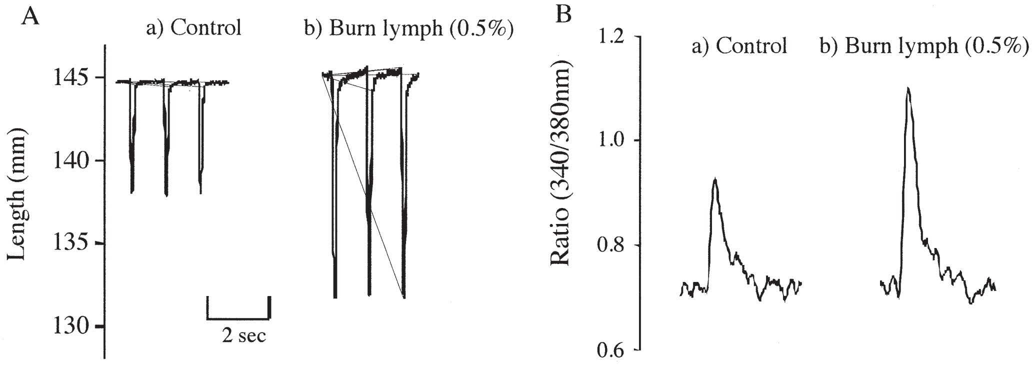


Fig. 1. (A) Example of myocyte contraction. (a) Control. (b) Two minutes after the application of burn lymph (0.5%). (B) Ca^{2+} transients. (a) Control. (b) Two minutes after the application of lymph (0.5%).

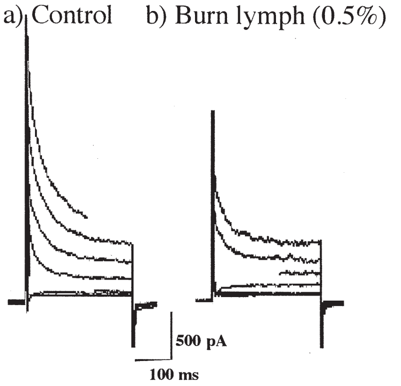


Fig. 2. Effects of burn lymph (0.5%) on Ito. Families of currents elicited by voltage steps from -60 to +60 mV in 20-mV increments from a holding potential of -80 mV. (a) Control. (b) One to two minutes after application of burn lymph.

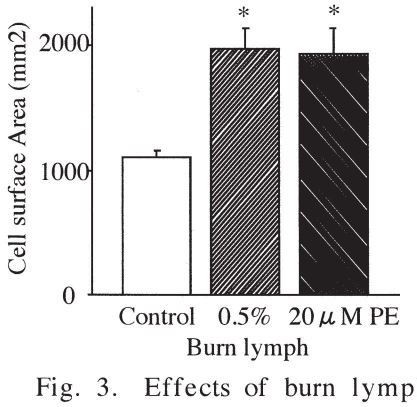


Fig. 3. Effects of burn lymph (0.5%) and phenylephrine (20 μM) on cellular surface area.

【1% Burn lymph による影響】

1% Burn lymph は，処置 10 ～ 30 秒後においてラット心筋細胞の Contraction を増大し，収縮を増強した (fig.4)．この作用は 2 ～ 3 分間持続し，0.5% Burn lymph と同様であった．　Contraction と同様に Ca-transient においても，1% Burn lymph 処置後初期では Ca-transient を増大し，0.5% Burn lymph と同様な作用を示した (fig.5)．これらのことから，1% Burn lymph 処置後初期では，0.5% Burn lymph と同様に細胞内 Ca^{2+}濃度を増加し，収縮を増強することが示唆された．また，1% Burn lymph は処置 1 分後，0.5% Burn lymph と同様に活動電位持続時間を有意に延長した (fig.6)．この活動電位持続時間の延長が起こる 1% Burn lymph 処置 1 分後は，Contraction, Ca-transient が増大する時間帯 (処置 30 秒 ～ 3 分後) と類似していた．したがって，1% Burn lymph 処置後初期に起こる Ca-transient を増大することによる心筋細胞の収縮増強は，0.5% Burn lymph と同様に活動電位持続時間の延長による影響だと予測される．そのことを支持するように，1% Burn lymph は有意に I_{to} を抑制し，0.5% Burn lymph と同様な作用を示した (fig.7)．このように，1% Burn lymph は処置後初期においては，0.5% Burn lymph と同様に I_{to} の抑制を介して活動電位持続時間を延長させ，細胞内 Ca^{2+}濃度を増加することによって心筋細胞の収縮を増強し，心肥大様の症状を誘発すことが明らかとなった．

1% Burn lymph 処置後初期における Contraction, Ca-transient の増大後，Contraction, Ca-transient の減少が見られ，処置後 6 ～ 10 分後では完全に抑制し 0.5% Burn lymph では観察されなかった作用を誘発した (fig.4,5)．このように，1% Burn lymph は，処置後後期には Ca-transient を完全に抑制することによって収縮を完全に抑制し，処置後初期と併せて二相性の作用を示した．また，1% Burn lymph は処置後初期における活動電位持続時間の延長後，活動電位構成の異常を誘発した．処置 3 分以降では有意にプラトー相電位の低下が見られ，処置 5 ～ 7 分後では活動電位は完全に再分極出来ず，静止膜電位は通常よりも脱分極側に移行した (fig.6)．この活動電位構成の異常が起こる 1% Burn lymph 処置 3 ～ 7 分後は，Contraction, Ca-transient が完全に抑制する時間帯 (処置 6 ～ 10 分後) と類似していた．したがって，1% Burn lymph 処置後後期に起こる Ca-transient を完全に抑制することによる収縮抑制は，プラトー相電位の低下，静止膜電位の脱分極側への移行による活動電位構成の異常による影響だと予測される．1% Burn lymph は，0.5% Burn lymph と同様に有意に I_{to} を抑制するだけではなく内向き整流型 K^+電流 (I_{K1}) も抑制した (fig.8)．I_{K1} は常に開閉していて静止膜電位を維持しており，I_{K1} の抑制は活動電位の不完全な再分極を誘発することが知られている．このことより，1% Burn lymph による静止膜電位の脱分極側への移行は，I_{K1} の抑制が関与していることが考えられる．

更に，1% Burn lymph は，0.5% Burn lymph の処置で観察されなかった I_{Ca} の抑制を誘発した (fig.9)． L 型 Ca^{2+}チャネルから流入する Ca^{2+}は活動電位のプラトー相の形成に関与していることから，1% Burn lymph によるプラトー相電位の低下は I_{Ca} の抑制によるものだと考えられる． 1% Burn lymph によって後期で観察されたカルシウム制御異常による収縮の低下は，心不全症状に似ており，心不全症状では，I_{K1} の低下や L 型 Ca^{2+}チャネル活性の低下が見られることが報告されている． これらのことから，1% Burn lymph は後期において，I_{K1} を抑制することによって活動電位の不完全な再分極，静止膜電位の脱分極側への移行を引き起こし，I_{Ca} を抑制することによってプラトー相電位を低下させ，これらのことが活動電位構成の異常を誘発し，心筋細胞の収縮を完全に抑制したと考えられる． そして，これらの影響は心不全症状に似ていることが示唆された．

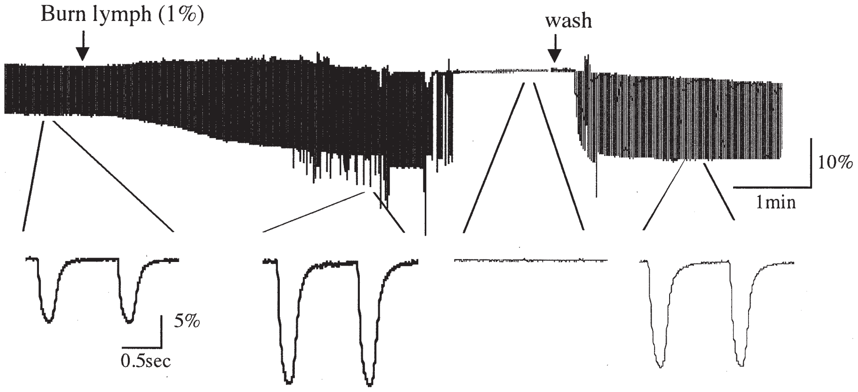


Fig. 4. Dual stimulatory and inhibitory inotropic effects of burn lymph on myocyte contraction. Time courses of changes of twitch contractions. Twitch contractions taken from indicated times are shown below continuous recordings.

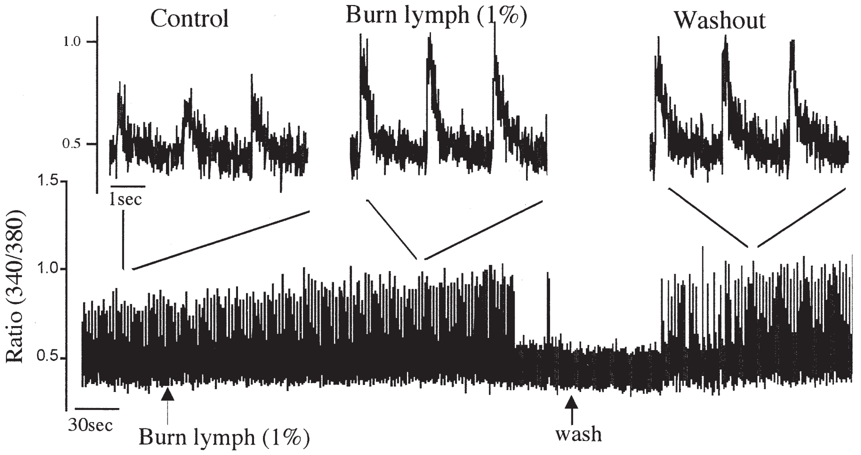


Fig. 5. Effects of burn lymph on Ca^{2+} transients. Ca^{2+} transients recorded before (control), in the presence of burn lymph, and after washout are shown on expanded timescale.

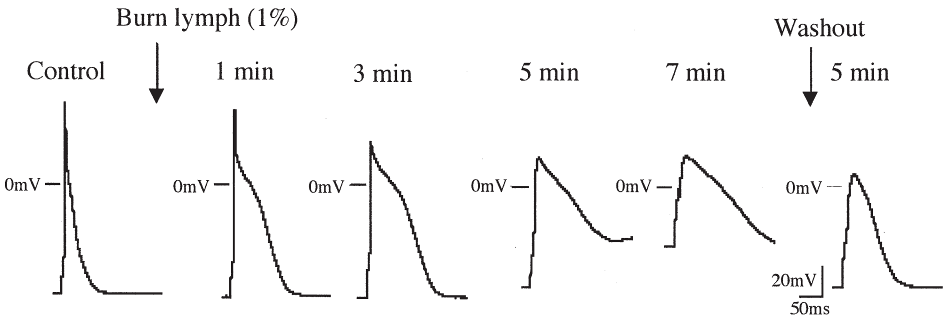


Fig. 6. Effects of burn lymph (1%) on action potential recorded in rat ventricular myocytes at different time points: control (before burn lymph application), during application (between 1 and 7 min), and after washout.

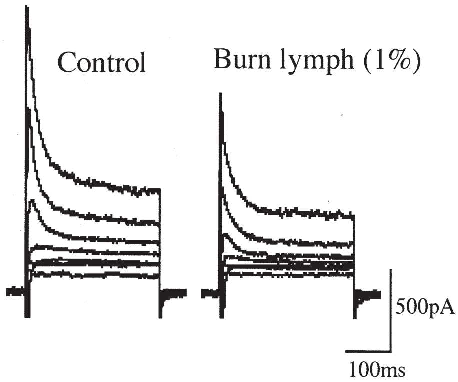


Fig. 7. Effects of burn lymph (1%) on Ito. Families of currents elicited by voltage steps from -60 to +60 mV in 20-mV increments from a holding potential of -80 mV.

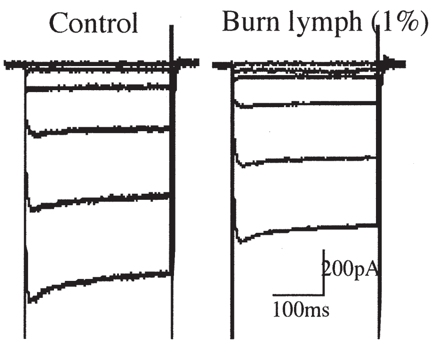


Fig. 8. Effects of burn lymph (1%) on inward rectifier K^+ currents (I_{K1}). A family of currents elicited from a holding potential of –40 mV by voltage steps from –50 to –100 mV in 10-mV increments before control and after 5-min application of burn lymph.

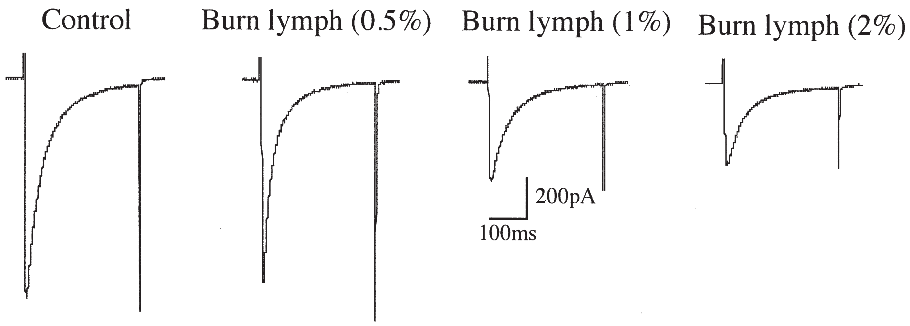


Fig. 9. Concentration-dependent block of I_{Ca} by burn lymph. Current traces in the absence and presence of burn lymph. I_{Ca} was elicited by test pulses to +10 mV from a holding potential of –50 mV at 0.1 Hz.

熱傷を処置したラットの心機能に対する腸間膜リンパ管結紮 (LDL) の影響

熱傷は処置 4 時間後において, 有意にラット心筋細胞の Contraction, Ca-transient を増大した (fig.10,11). このことから, 熱傷は処置 4 時間後において, 細胞内 Ca^{2+}濃度を増大することによって収縮を増強することが示唆された. また, 熱傷は処置 24 時間後において, 有意にラット心筋細胞の Contraction, Ca-transient を減少した (fig.10,11). このことから, 熱傷は処置 24 時間後において, 細胞内 Ca^{2+}濃度を減少することによって収縮を減弱することが示唆された. このように, ラットを用いた in vivo 実験において, 熱傷は時間単位で Burn lymph の影響と同様な二相性の作用を示した. また, これらの影響は, 腸間膜リンパ管結紮 (LDL) によって改善した. このことから, 腸間膜リンパ液には心臓に影響を及ぼす液性因子が含まれていることが示唆された. このことは, Burn lymph が心筋細胞に二相性の影響を及ぼしたことからも支持できる. 熱傷による 4, 24 時間後の反応は, 1% Burn lymph による二相性の反応と類似していることから, 1% Burn lymph によって影響のあった K^+チャネル, Ca^{2+}チャネルに対しての検討を行った. 熱傷は 4 時間後においては, I_{Ca}, I_{K1} には影響しなかったが I_{to} を有意に抑制し, この作用は LDL によって改善した (fig.12). このことから, 熱傷 4 時間後における細胞内 Ca^{2+}濃度を増加することによる心筋細胞の収縮増強は, 1% Burn lymph の初期における作用と同様に I_{to} の抑制を介した反応であり, 腸間膜リンパ液中の液性因子が関与していることが考えられる. 熱傷は 24 時間後においては 4 時間後から持続して I_{to} を抑制し (fig.12), また, I_{K1} には影響しなかったが I_{Ca} を有意に抑制した (fig.13). I_{to} に対する作用は LDL によって改善し, I_{Ca} に対しては LDL によって改善傾向が認められた. このことから, 熱傷 24 時間後における細胞内 Ca^{2+}濃度を低下することによる心筋細胞の収縮減弱は, 1% Burn lymph の後期における作用と同様に I_{Ca} の抑制を介した反応であり, 腸間膜リンパ液中の液性因子が関与していることが考えられる. また, 24 時間後において I_{to} が抑制されたにもかかわらず, 細胞内 Ca^{2+}濃度を低下することによる収縮の減弱が見られたのは, I_{to} の抑制に比べて I_{Ca} を抑制する作用の方が強かったからではないかと考えられる. そのことを支持するように, 24 時間後における I_{Ca} の抑制は, LDL によって完全に改善しなかった. これらのことから, 1% Burn lymph と同様に, 時間経過によって 4 時間後では心肥大様症状を, 24 時間後では心不全様症状を誘発したと考えられる.

今回の in vivo 実験において, 熱傷は 4 時間後においては心肥大様症状を誘発し, 24 時間後においては心不全様症状を誘発し, Burn lymph の結果と同様に 2 相性の反応を示した. また, 心肥大様症状には I_{to} の抑制, 心不全様症状には I_{Ca} の抑制が関与していることが示唆された. これらの影響は LDL によって改善することから, 腸間膜リンパ液

中に含まれる液性因子が，血液を介して心臓に達し，心肥大，心不全様症状を誘発することが考えられた.

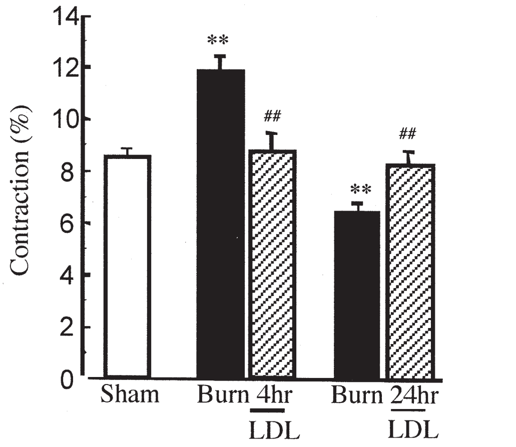


Fig. 10. Effects of sham and post burn on contraction in 4 and 24 h after burn.

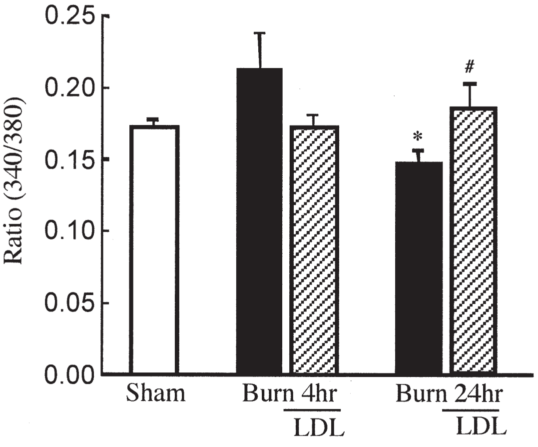


Fig. 11. Effects of sham and post burn on Ca-transient in 4 and 24 h after burn.

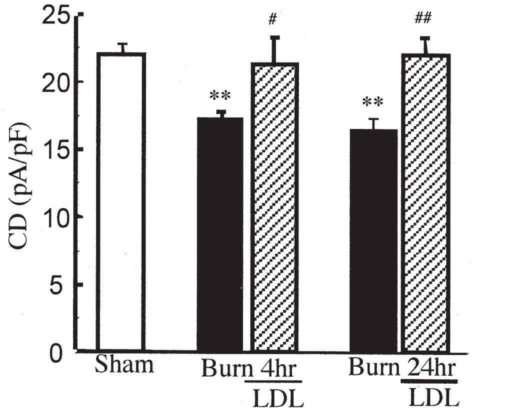


Fig. 12. Effects of sham and post burn on I_{to} density in 4 and 24 h after burn.

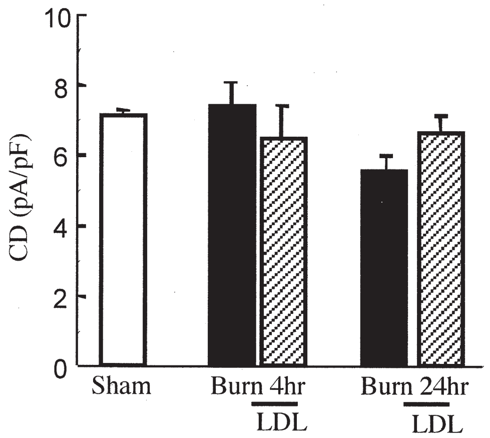
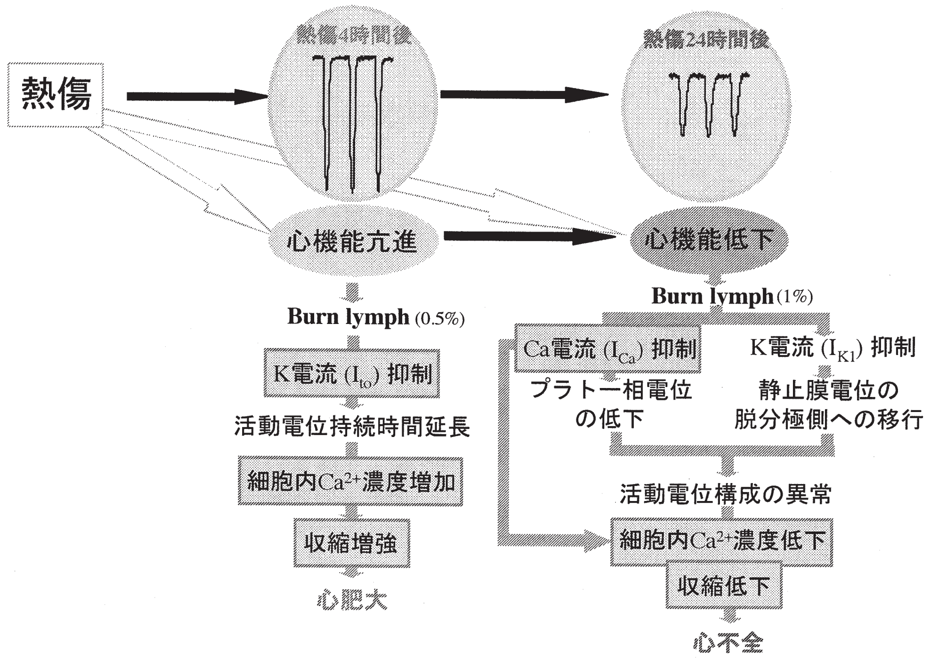


Fig. 13. Effects of sham and post burn on I_{Ca} density in 4 and 24 h after burn.

総括

本研究では，熱傷 24 時間後において心不全の症状と同様に細胞内 Ca^{2+}濃度の低下を伴う心筋細胞の収縮の低下が観察された．また，熱傷を処置したラットから収集した腸間膜リンパ液 (Burn lymph) も同様に心筋細胞の収縮を低下したことから，臨床で見られるような熱傷後の心不全に腸間膜リンパ液が大きな役割を果たしている知見を得ることができた．その熱傷 24 時間後における心筋細胞内 Ca^{2+}濃度の低下は，Ca^{2+}電流 (I_{Ca}) の抑制，内向き整流型 K^+電流 (I_{K1}) の抑制によるものであると示唆された．また，熱傷 4 時間後において，細胞内 Ca^{2+}濃度の増加を伴う一過性の心筋細胞収縮の増強が観察された．その熱傷 4 時間後に観察された心筋細胞内 Ca^{2+}濃度の増加は，一過性外向き K^+電流 (I_{to}) の抑制によって起こるによるものだと考えられ，臨床における熱傷後の心肥大の発現の危険性についても示唆された．



参考文献

1. Kawai K, Kawai T, Sambol JT, Xu DZ, Yuan Z, Caputo FJ, Badami CD, Deitch EA, Yatani A. Cellular mechanisms of burn-related changes in contractility and its prevention by mesenteric lymph ligation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 292: 2475-84.
2. Blalock A. The importance of the local loss of fluid in the production of the low blood pressure after burns. Experimental shock. 1931; 22: 610-617.
3. Adams HR, Baxter CR, Parker JL. Contractile function of heart muscle from burned guinea pigs Circ Shock. 1982; 9: 63-73.
4. Adams HR, Baxter CR, Izenberg SD. Decreased contractility and compliance of the left ventricle as complications of thermal trauma. Am Heart J. 1984;108:1477-87.
5. Adams HR, Baxter CR, Parker JL, Senning R. Development of acute burn shock in unresuscitated guinea pigs. Circ Shock. 1981; 8: 613-25.
6. Murphy JT, Horton JW, Purdue GF, Hunt JL. Cardiovascular effect of 7.5% sodium chloride-dextran infusion after thermal injury.Arch Surg. 1999;134:1091-7.
7. Carlson DL, Maass DL, White J, Sikes P, Horton JW. Caspase inhibition reduces cardiac myocyte dyshomeostasis and improves cardiac contractile function after major burn injury. J Appl Physiol. 2007;103: 323-30.
8. Ballard-Croft C, Carlson D, Maass DL, Horton JW. Burn trauma alters calcium transporter protein expression in the heart.J Appl Physiol. 2004; 97:1470-6.
9. Koshy US, Burton KP, Le TH, Horton JW. Altered ionic calcium and cell motion in ventricular myocytes after cutaneous thermal injury. J Surg Res. 1997; 68:133-8.
10. Murphy JT, Giroir B, Horton JW. Thermal injury alters myocardial sarcoplasmic reticulum calcium channel function.J Surg Res. 1999; 82: 244-52.
11. White DJ, Maass DL, Sanders B, Horton JW. Cardiomyocyte intracellular calcium and cardiac dysfunction after burn trauma. Crit Care Med. 2002; 30:14-22.
12. Vasan RS, Levy D. The role of hypertension in the pathogenesis of heart failure. A clinical mechanistic overview. Arch Intern Med. 1996; 156:1789-96.
13. Houser SR, Piacentino V 3rd, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. J Mol Cell Cardiol. 2000; 32:1595-607.
14. Ferrara JJ, Franklin EW, Kukuy EL, Flynn DM, Gilman DA, Keller VA, Choe EU, Flint LM, Lefer DJ. Lymph isolated from a regional scald injury produces a negative inotropic effect in dogs. J Burn Care Rehabil. 1998; 19: 296-304.

15. Sambol JT, White J, Horton JW, Deitch EA. Burn-induced impairment of cardiac contractile function is due to gut-derived factors transported in mesenteric lymph. Shock. 2002; 18: 272-6.

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究に終始御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の藤原道弘教授, 福岡大学薬学部臨床薬物治療学教室の中島学教授, 本研究室の岩崎克典教授，三島健一准教授，ニュージャージー医科歯科大学の八谷アツ子教授に深く感謝致します．また，本研究の遂行にあたり，数々の有益なる御助言と御協力を頂いた入江圭一氏，江頭伸昭准教授，高崎浩太郎助教，桂林秀太郎助教に深く感謝致します．公私共に多大な御助言と御協力を頂いた早川和秀氏，渡辺拓也氏，緒方歩女史，山元猛氏，榎木麻希子女史，石橋直哉氏，合志英美女史をはじめ福岡大学臨床疾患薬理学教室の皆様に深く感謝致します．また学生生活を通じ，終始精神的，経済的支援を賜りました家族をはじめ多くの方々に深く感謝致します．最後に，本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝致します．