

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20591659

研究課題名（和文） 未熟心筋に対する常温下心筋保護の研究：ミトコンドリア保護の重要性とその臨床応用

研究課題名（英文） Myocardial protection for normothermic ischemia and reperfusion in immature heart: effect of mitochondria permeability transition pore inhibitor.

研究代表者

井村 肇 (IMURA HAJIME)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40281422

研究成果の概要（和文）：虚血再灌流によるミトコンドリアの障害を抑制するプロポフォールの心筋保護効果を常温下にウサギ未熟心臓を用いて研究した。麻酔薬として広く使用されるプロポフォールは濃度及び投与方法依存的に心筋保護効果を示した。最も高い保護効果は $2\mu\text{g/ml}$ で認められ、過去に有用性を報告されたサイクロスポリン A と同等以上であった。しかしながら $4\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では濃度に比例した心筋抑制作用があり本薬剤の危険性も示された。

研究成果の概要（英文）：Propofol, which is widely used as an anesthetic agent, inhibits the mitochondria permeability transition pore (MPTP) during reperfusion after ischemia and may work for myocardial protection. In the present study, we investigated whether propofol would protect the immature heart during normothermic ischemia and reperfusion. The study was carried out by using immature rabbit hearts in the Langendorff model. Propofol showed protective effect at concentrations of $1-4\mu\text{g/ml}$, and the best protection was at $2\mu\text{g/ml}$. The protection at $2\mu\text{g/ml}$ was equal to that of cyclosporine (another MPTP inhibitor) in a viewpoint of functional recovery of the heart. However, we also observed significant negative inotropic effect at $4\mu\text{g/ml}$ or higher concentrations and this side effect was crucial at $10\mu\text{g/ml}$ or higher.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：未熟心筋、ミトコンドリア、心筋保護、MPTP 阻害剤、プロポフォール、小児開心術、ランゲンドルフ

1. 研究開始当初の背景

(1)小児開心術における虚血再灌流障害は成人開心術のそれより遙かに大きく、術後回復経過に直結する最も深刻な問題である。(2)動物実験では未熟心筋保護には低温が最も効果的とされるが、近年常温下心筋保護の有用性が大規模な臨床データから示された。我々も常温心筋保護の大きな可能性を示す基礎実験結果を報告した。このようにかつて成人開心術で起こった低温から常温への移行に近い将来小児でも起こる可能性が高まっている。(3)開心術において心臓を停止することは必須であるがそれに続いて起こる虚血再灌流障害ではミトコンドリアの障害度が重要である。MPTP(mitochondrial permeability transition pore)はミトコンドリアに存在する non-specific pore であり、虚血再灌流によって開放され、ミトコンドリアの swelling を来し心筋細胞を死に至らしめる。この MPTP 開放を抑制することが大きな心筋保護効果をもたらす事が証明されたが、未熟心筋でのデータは少ない。(4) MPTP 阻害剤として広く使用された cyclosporin-A は有効濃度の範囲の狭さや心筋細胞への副作用の問題がある。申請者が所属した研究室はそれに代わり、臨床応用しやすい propofol の MPTP 阻害剤としての有用性を報告したが、未熟心筋でのデータは存在しない。

2. 研究の目的

我々が目的とするのは成熟心筋で証明された MPTP 阻害剤である propofol の心筋保護効果が果たして常温の未熟心筋においても確認できるか検証することである。具体的には(1)ウサギ未熟心臓において propofol を様々な濃度で使用し、最も有効な濃度を研究する。(2)同様にウサギ未熟心臓で propofol を様々な投与方法で使用し、最も有効な投与方法を研究する。(3)ブタ未熟心臓において、臨床と同じ方法で人工心肺を使用し、上記(1)、(2)を踏まえた濃度と方法で propofol を使用してその有用性を研究する。

3. 研究の方法

(1) Langendorff ウサギ未熟心臓の実験

①濃度による propofol の心機能への影響
生後 7-14 日のウサギの心臓を Langendorff, 装置下に常温(39°C)、定常圧還流モデルに置く。左心房から左室内へ専用のバルーンカテーテルを挿入して左室圧をモニターする。心拍数及び左室圧が安定したところで 10 分間血行動態を記録し、続いての灌流液中に propofol を加えその濃度を 1, 2, 4, 10, 20 μ g/ml とする。各濃度群に対する比較対象とし

て control 群(propofol:0 μ g/ml)と Cyclosporin-A(2 μ g/ml)群を並行し行った。

②至適投与方法の研究

上記と同様の方法で実験を行う。実験開始後 10 分間の虚血前血行動態測定時間を取り、その後 30 分間の常温虚血、40 分間の再灌流とする。使用する propofol の濃度は成人で有効であった 4 μ g/ml とする。本実験では propofol の投与方法を、a) 虚血前 2 分のみ、b) 虚血前 2 分及び再灌流中、c) 虚血前 2 分及び再灌流最初の 20 分間のみ、とする。この 3 群間で心機能の回復を調査する。

③至適 propofol 濃度の研究

上記②と同様の方法で実験を行う。実験②において最も有効であった C)の方法で propofol を投与するが、propofol 濃度をゼロから 10 μ g/ml まで変化(0, 1, 2, 4, 10, 20 μ g/ml)させ、各群での心機能(developed pressure, coronary flow)、虚血心筋障害(再灌流液中への乳酸の流出量)、心筋細胞の病理組織変化(光学顕微鏡、電子顕微鏡)を評価する。同時にこれまで広く基礎実験にて使用されてきた MPTP 阻害剤 Cyclosporin-A(2 μ g/ml)群を並行して行った。

(2) 人工心肺モデルブタ未熟心臓の実験

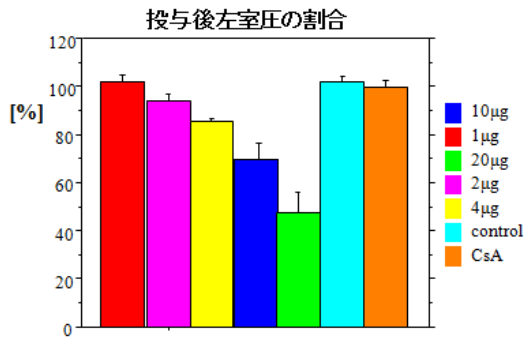
生後 2 週のブタを全身麻酔下に臨床と同じ方法で人工心肺を装着する。人工心肺開始 30 分後に上行大動脈を遮断して心停止液を注入、心臓を常温下 60 分の虚血とする。その後遮断を解除して再灌流を開始し、40 分後に人工心肺を離脱、さらにその後の 90 分間を観察期間とする。ブタを propofol 投与群と非投与群に分けるが、この投与方法はウサギ実験結果に従って 2 μ g/ml、虚血前 2 分及び再灌流 20 分間とする。評価項目は血行動態(血圧、心拍数、中心静脈圧、左房圧、心拍出量)、心筋障害(継時的な血中 Troponin-I の測定)、心筋の病理組織学的変化とする。

4. 研究成果

(1) Langendorff ウサギ未熟心臓の実験

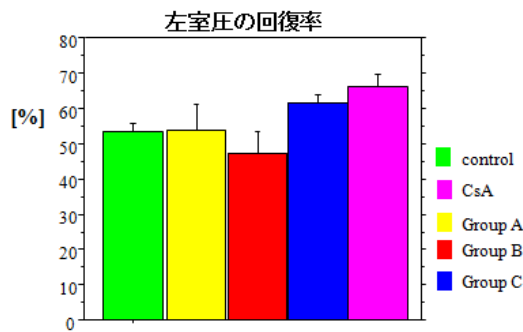
①濃度による propofol の心機能への影響

左室圧は propofol の投与によって低下した。結果は下図の如くであるが、濃度に比例して心機能抑制(左室圧の低下)の程度は増大した。一方、control 群及び Cyclosporin-A 群ではその投与によって左室圧に有意な変化は認めなかった。各濃度別に見ていくと、propofol 濃度が 1, 2 μ g/ml では左室圧の低下は control 群に比して有意ではなく、4 μ g/ml 以上において有意(p<0.05)となった。この結果は propofol による有意な濃度依存性心機能抑制効果を示すものであり、高濃度使用の危険性を示唆している。



②至適投与方法の研究

投与方法によって以下の通り 3 群に分けた。A 群:虚血直前 2 分のみ propofol を投与、B 群:虚血前 2 分+全再還流期間投与、C 群:虚血前 2 分+再還流後最初の 20 分のみ投与。各群の心機能を比較検討した。Propofol 使用群と比較する為、対象として control 群 (propofol:0 µ g/ml) と Cyclosporin-A(2 µ g/ml)群を並行して行った。結果は下図の如くであった。左室圧の虚血・再還流後の回復率をみると、Control 群に比して有意に心筋保護効果を示したのは C 群と Cyclosporin-A 群のみであった(p<0.05)。一方 A 群と B 群では control 群と有意な差はなく、心筋保護効果は証明されなかった。このことは propofol の臨床応用を想定した場合、再還流中に使用することと、人工心肺離脱前に十分な propofol washout period をとることの重要性を示唆している。



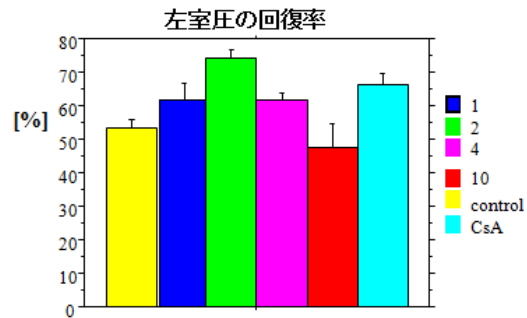
③至適 propofol 濃度の研究

上記結果を受けて C 群の方法にて本実験を行った。投与する propofol 濃度は 1, 2, 4, 10 µ g/ml とし、さらに propofol を使用しない control 群と Cyclosporin-A(2 µ g/ml)群を加えて心機能の変化、心筋障害の程度、病理組織学的評価の比較検討を行った。

(心機能の比較)

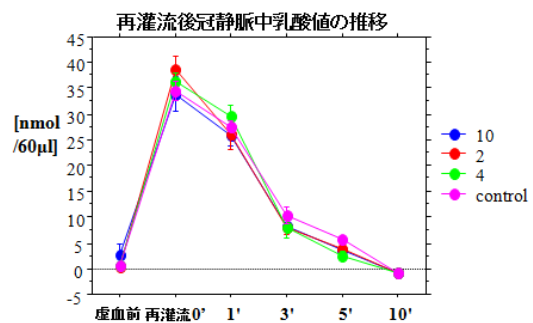
左室圧の回復率を図に示した。下図の如く 2 µ g/ml が最も良い回復率を示し、これをピークに濃度を上げてても下げてても、濃度依存性に回復率は悪化した。統計学的に検討すると propofol:2 µ g/ml は Cyclosporin-A 以外の全

ての群に対して有意に高い回復率、即ち心筋保護効果を示した。さらに propofol:2 µ g/ml と Cyclosporin-A 群では、前者で良い傾向が見られ p=0.94 であった。この 2 者以外で control 群より有意に高い回復率を示したのは 4 µ g/ml 群のみであった。実験終了時の左室拡張期圧の比較では各群間に有意差は認めなかったが、1 及び 2 µ g/ml 群のみ control 群よりも低い傾向があった (p=0.51 及び p=0.54)。冠還流量を見ると実験終了時では各群有意差はなかったが control 群に比べ 2 µ g/ml でのみ高い傾向があった (p=0.61)。



(虚血心筋障害の比較)

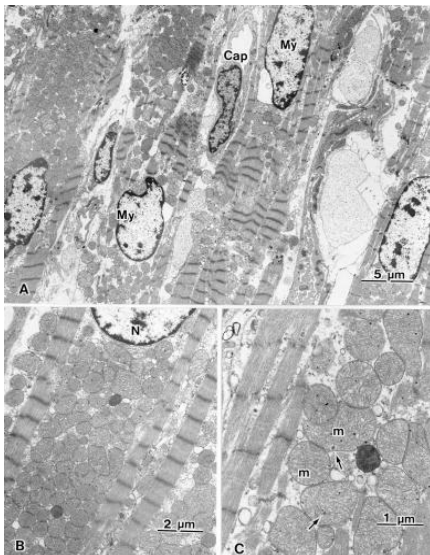
再還流時の冠還流量液中への乳酸の流出量を各群で比較した。結果は下図の如くであるが、各群の間で乳酸の流出には有意差はなかった。乳酸値は再還流開始時、最早期において(0 分値)、何れの propofol 濃度でもピーク値を示した。乳酸流出は、ピーク後は速やかに低下し再還流 10 分後にはほぼ虚血前の値に戻っている。この急峻なカーブからは虚血中に蓄積された乳酸の排出が示唆され、この値には再還流による心筋障害が反映されていないことが予想される。本結果は各 propofol 濃度において虚血期間中の心筋障害に差はないことを示すと考えられ、propofol による心筋保護効果は再還流障害の軽減にあることが間接的に示唆された。実験②において propofol の虚血前のみでの投与では心筋保護効果を示さなかったことは、このことを支持するものと考えられた。



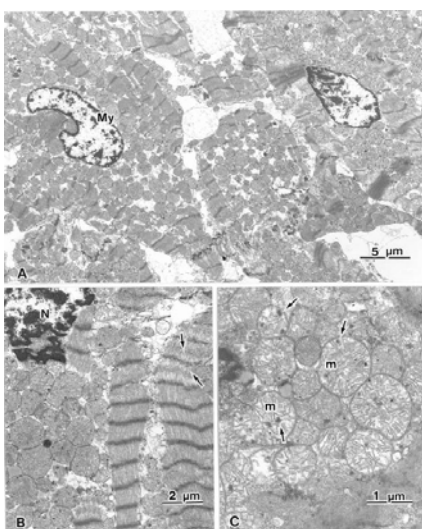
(病理組織学的検討)

実験終了後直ちにグルタルアルデヒドで固定した心臓から、各群の心筋障害の程度を光学顕微鏡・電子顕微鏡で評価し各濃度群で比較検討した。この評価は実験内容を知らされない第三者であり、同時に経験豊かである病理医によって行われた。光学顕微鏡・電子顕微鏡検査ともに様々な心筋の虚血再灌流障害所見が観察されたが、比較する項目として、光学顕微鏡下には核クロマチンの凝集と細胞浮腫、電子顕微鏡検査では筋原線維のI帯の出現、無構造物質の出現が同病理医によって挙げられた。さらにミトコンドリアの障害として膨化が認められこれも比較検討された。これらの変化を各群で比較すると、半定量的評価ではあるが $2\mu\text{g/ml}$ 群が $10\mu\text{g/ml}$ 群に比して明らかに正常に近く保たれており、有意な心筋保護効果、ミトコンドリア保護効果が観察された。

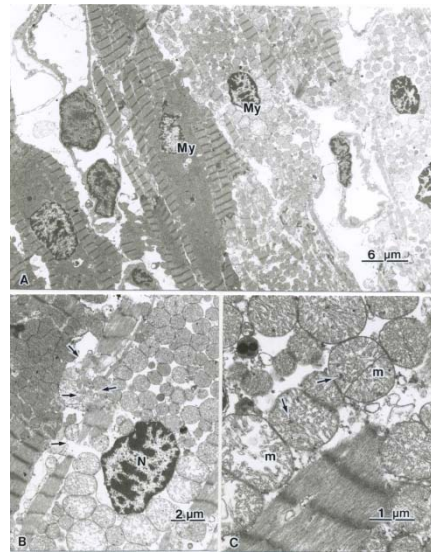
<propofol: $2\mu\text{g/ml}$ 電顕像>



<propofol: $10\mu\text{g/ml}$ 電顕像>



<Control 群の電顕像>



Cap:毛細血管, My:心筋細胞, N:心筋細胞内核
クロマチン, m:ミトコンドリア,

<propofol: $2\mu\text{g/ml}$ 電顕像>

右下図矢印はミトコンドリア内の高電子密度無構造物質を示す。

<propofol: $10\mu\text{g/ml}$ 電顕像>

左下図矢印は筋原線維内のI帯の出現を示す。
右下図矢印はミトコンドリア内の高電子密度無構造物質を示す

<Control 群の電顕像>

左下図矢印は筋原線維内の断裂を示す。

④本研究の学術的成果とインパクト

本研究では初めて propofol が未熟心筋に対して MPTP 阻害剤として心筋保護効果があることを証明した。その心筋保護効果は成熟心筋では $4\mu\text{g/ml}$ でみられたのに対して未熟心筋では $2\mu\text{g/ml}$ と低濃度であった。Propofol は麻酔薬として临床上広く普及している薬剤であり、即戦力の心筋保護薬剤として期待が持てる。しかしその一方で、propofol の使用には負の面の危険性があることを表面化させた。即ち心筋抑制効果の出現である。この効果は $4\mu\text{g/ml}$ 以上で有意にみられ濃度依存性に増大した。そして $10\mu\text{g/ml}$ では心機能の低下のみならず病理組織検査において組織学的な不可逆性のダメージが確認され、薬剤効果による一過性の心機能低下ではないと考えられた。今回の我々の実験結果は propofol の有効域の狭さを証明し、不可逆性の心筋障害をもたらす危険性を明らかにしたとも言える。

(2) 人工心肺モデルブタ未熟心臓の実験

生後 1-2 週、体重 3Kg の piglet の人工心肺

実験はこれまで殆ど行われていない実験モデルであり困難を伴った。麻酔及び手術を臨床と全く同じ方法で行ったがなかなか安定した人工心肺を確立できず、信頼できる実験結果を得られなかった。人工心肺回路の変更や前実験残血の再利用、高濃度アルブミンの使用など試行錯誤を繰り返した。最終的には同種新鮮血液によって人工心肺を初期充填するなどの工夫から漸く実験は安定して行えるようになってきた。しかしながらこうした経緯と十分な新鮮血液の確保には時間と経費を想定以上に要し、さらに大震災以降は様々な理由によって同種新鮮血液の入手が難しくなった。このように本実験は期間中に信頼するに十分なデータが得られなかったが、実験方法は漸く確立され、今後これを継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井村 肇 (IMURA HAJIME)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 40281422

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :