

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591796

研究課題名（和文）

吸入麻酔薬が心リズムとイオンチャネルに及ぼす影響に関する基礎的研究

研究課題名（英文）

Effects of volatile anesthetic(Sevoflurane) on cardiac rhythm and ion channels

研究代表者

鈴木 昭広 (SUZUKI AKIHIRO)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：30292121

研究成果の概要（和文）：

本邦でよく用いられる吸入麻酔薬セボフルランが心筋リズムを構成するイオンチャネルである一過性外向きKチャネル電流、slow型遅延整流Kチャネル電流に及ぼす影響を調査した。パッチを用いた研究の結果、セボフルランは一過性外向きKチャネル電流を peak 電流（ITOpeak）と sustained 電流(ITOSus)に二分して影響を調べたところ、セボフルランは両者を濃度依存性に抑制し、活動電位を延長させる方向に作用することが明らかとなった。また、slow型遅延整流Kチャネルに関しては、チャネル構成タンパクであるKCNQ1,およびKCNE1のcDNAをマウス由来のHEK細胞に発現させて影響を調査した。セボフルランは濃度依存性にチャネル電流を抑制し、その抑制は一過性外向きK電流よりも大きかった。これらのことから、セボフルランがKチャネルを抑制することにより活動電位を延長させ、III群抗不整脈薬のような作用をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We electro-physiologically studied the effect of sevoflurane, a volatile anesthetic widely used in Japan, on transient outward K (Ito) channel and slow delayed rectifier K (IKs) channel using the patch clamp technique. Sevoflurane suppressed the Ito in a concentration dependent manner. Sevoflurane also suppressed the IKs transfected on HEK cell. Our result indicated that the sevoflurane prolongs action potential by suppressing these potassium channel and may have a similar effect as class III anti-arrhythmia drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総 計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：蘇生学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

本邦で開発され小児から老人まで幅広く使用されている吸入麻酔薬セボフルランは臨床上不整脈の発生頻度が少ないとされている。近年セボフルランが、虚血再還流の心臓において心室細動の発生頻度を減少させるという報告もあり、何らかの抗不整脈作用がある可能性が示唆されるが、そのメカニズムや、セボフルランの心筋リズムへの影響については未だ明らかになっていない部分が多い。

我々は、科学研究費 16790864 (H16-17) において、セボフルランが心筋活動電位を濃度に応じて低濃度で延長、高濃度で短縮という 2 相性の変化を生じさせることを明らかにし、その原因は主として L 型カルシウム電流、及び遅延整流 K チャンネル電流の抑制度の違いによって生じていることを明らかにした。セボフルランは、臨床上心電図の QT 時間を延長する作用があるとされるが、同じく薬物で QT を延長をさせるものには III 群抗不整脈薬があり、ある種の不整脈を予防する反面、副作用として致死性不整脈を起こす QT 延長症候群も知られている。従って遅延整流 K チャンネルは、セボフルランの心筋リズムへの影響に関して非常に重要な意味をもつと考えられる。さらに、遅延整流 K チャンネル電流の特徴は、活性化の後、電流は完全に基準値に収束しないことであり、これはチャンネルの活性後速やかに不活化して一定の休止期間後でないと再びチャンネルが活動できないナトリウムやカルシウムと明確に異なっている。従って、このチャンネルは繰り返す心拍の様態で常に一定の開閉活動が続いている特性があり、心リズムの生成に与える影響が非常に大きい。通常の実験手法（細胞に 1 回の矩形波パルスを与える手法）ではその特性を観察することは困難であることか

ら、本チャンネルへの影響は相応の実験手法（train pulse つまり連続した繰り返しの矩形波パルス刺激）を用いてこそ明らかとなると考えた。

また、モルモットには存在しないがヒト心筋には発現している一過性外向き K チャンネル電流に関してはこれまで詳細な検討は加えられておらず、心筋リズムに関して何らかの関与が推察されており、これを調査することとした。

2. 研究の目的

まず、セボフルランの心筋リズムに及ぼす影響をチャンネル電流レベルで検討する。1 年目は、セボフルランが心筋活動電位、及び一過性外向き K 電流に及ぼす影響を調査する。我々がこれまでに得た preliminary data からは、セボフルランは一過性外向き電流を抑制し、活動電位を延長させる可能性がある事が明らかとなっており、QT 延長の原因の一つとして重要な役割を担っている可能性がある。

モルモット心筋には一過性外向き K 電流は発現していない。そこでラットを用い、一過性外向き K 電流をさらに peak と sustained の 2 つに分けて、電流とチャンネルキネティクスへの影響を調査する。2 年目は、これまで明らかになっているセボフルランの遅延整流 K チャンネル電流への影響を、他のチャンネルの混入のない状態で検討する。ネイティブなモルモット心筋細胞に発現している rapid 型、slow 型の各遅延整流 K 電流は、単回の電流測定では特異的ブロッカーを用いて抑制できるが、連続する心拍を再現するような train-pulse 刺激状態下では 100% の混入を防ぎ得ないことが我々の preliminary data で明らかになってきた。そこで、slow 型チャンネルの構成タンパクである KCNQ1, および KCNE1 の cDNA を

マウス由来のHL-1細胞に発現させ、他のチャネルの混入を防いだ状態でセボフルランによる影響を活動電位プロトコール、train-pulse プロトコールを用いて検討する。

3. 研究の方法

1) ラット単離心筋の遊離

十分な麻酔下にラットを開胸し心臓を摘出し、大動脈遠位端をランゲンドルフ回路（手製、現有）に接続、Collagenase、Protease (Sigma 社) を含む灌流液を用いて逆行性灌流を行った。組織の十分な融解後に心筋部のみ切除裁断し、恒温槽を用いてさらに数分間酵素溶液とともに攪拌、遠心分離器（現有）を用いて酵素溶液を洗浄置換し、細胞浮遊液を常温保存して実験に用いた。

2) パッチクランプ実験

<ガラス電極の作成>

パッチクランプ用ガラス電極は現有の水平牽引型の電極作成器（Sutter 社製 P-97）を用いて作成した。

<活動電位の計測>

活動電位、及び各イオンチャネルの開閉動態は温度の影響を受けて変化する可能性があるため、本実験はすべて 37 度の生理的温度下で行う。現有の温度調整器(TC-344B および SF-28、PH-1 いずれも Warner Instrument 社製)を用いる。チャネル電流、活動電位の記録にはアンプの Axopatch200B、A-D コンバータ Digidata1321A、波形観察・記録ソフトウェア pclamp8(すべて Axon instrument 社製、現有)を用いる。倒立顕微鏡 (Nikon 社製 Diaphot) のチャンバーに細胞浮遊液を滴下し、ガラス電極にて通常の whole-cell mode でギガオームシールを得てパッチ膜を破った後、current clamp モードに切り替え、400 μ sec の電流を細胞に注入して活動電位を発生させ、セボフルランが心筋活動電位に与える影響を調べる。得られた活動電位波形はデ

ジタル化し解析ソフトウェア clampfit8.0 (Axon instrument 社製) を用いて voltage protocol に変換し、活動電位プロトコールとしても用いた。

<セボフルランが一過性外向き K チャネルに与える影響の調査>

各イオンチャネル電流の測定は、Voltage clamp モードで先に得られた活動電位プロトコールを用いて測定した。測定するイオンチャネルは一過性外向き電流を 2 つに分け、peak current と sustained current に分けて検討を行った。

平成 20 年；セボフルランがラット心筋活動電位及び一過性外向きカリウム電流に与える影響を調査した。

・Current clamp モードでセボフルランが心筋活動電位に与える影響について、臨床使用濃度に基づき 3 つの異なる濃度で調査を行う。Tyrode 溶液下での測定を Control とし、セボフルラン投与、Washout 時の変化を観察する。活動電位時間は APD50、APD90 の 2 点を測定し比較検討した。

・Voltage clamp モードで活動電位プロトコールを用い、セボフルランが一過性外向き K 電流に与える影響を調べる。それぞれ電流の分離のため選択的ブロッカーを用いるか、イオンを他薬剤で置換して他のチャネル電流の混入を防止する（例 Na は NMDG、K は Cs で置換）

チャネル電流 (peak, sustained それぞれ) に与えるセボフルランの影響、および activation, inactivation などチャネル開閉キネティクスを解析した。

1) 培養細胞へのチャネルタンパク発現

HEK 細胞は、AT-1 マウスの心房細胞由来の心筋細胞ラインであり、この細胞に slow 型の遅延整流 K チャネル電流を構成するヒト KCNQ1 および KCNE1 の cDNA (10ng) を注入

した。

使用する cDNA は蛍光色素 (green fluorescent) でマーキングされており、チャンネルタンパクが発現した場合には、蛍光顕微鏡下に判別が可能となるため、蛍光顕微鏡下で発光した細胞がターゲットとなる。

<セボフルランがKVLQT1 電流に与える影響の調査>

蛍光顕微鏡下にチャンネルタンパクが発現したことを示す発光が認められた培養細胞のみを実験に使用した。各イオンチャンネル電流の測定は、Voltage clamp モードで先に得られた活動電位プロトコルを用いて測定した。

Voltage clamp モードで活動電位プロトコルを用い、セボフルランが HL1 細胞に発現した IKs チャンネル電流に与える影響を調べた。異なるセボフルラン濃度のチャンネル電流に与える影響、および activation, deactivation などチャンネル開閉キネティクスを解析した。

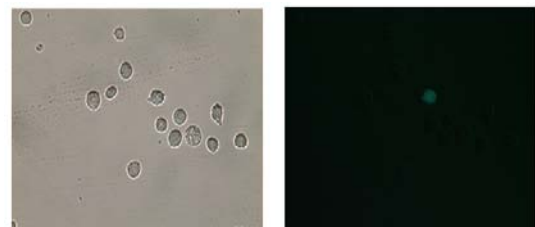
同じく、Voltage clamp モードで train-pulse プロトコルを用い、セボフルランが連続測定された IKs に与える影響を調べた。異なるセボフルラン濃度のチャンネル電流に与える影響、および activation, deactivation などチャンネル開閉キネティクスを解析した。

4. 研究成果

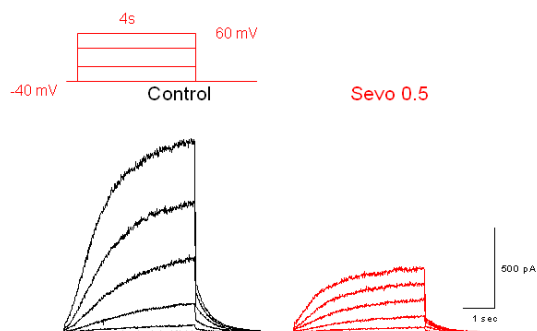
1 年目は一過性外向き K 電流は peak 電流 (ITOpeak) と sustained 電流 (ITOsus) に二分しておのこの吸入麻酔薬への感受性を調べた。その結果、0.5mM のセボフルランは、ITOpeak を 0mV 時に $16.7 \pm 5.8\%$ 、60mV 時に $17.0 \pm 4.7\%$ 抑制した。一方、ITOsus に対しては 0mV 時に $14.6 \pm 7.8\%$ 、60mV 時に $4.2 \pm 2.9\%$ の抑制効果を示した。ITO は心筋活動電位において、第

1 相の成り立ちに関与している。ITO の抑制はすなわち第 1 相のノッチ部分を減弱させ、活動電位を延長するように作用することを意味する。さらに、第 1 相が抑制され、活動電位が延長する方向に作用した結果、プラトー相 (第 2 相) のはじまりがはやくなり、持続時間も延長する結果、次の IK 電流の活動時間が延長することとなり、全体として心筋活動電位が延長されやすくなる。今回のセボフルランによる ITO への抑制結果は大きなものとはいえないが、活動電位全体に与える影響は大きくなる可能性が示された。セボフルランは ITO の構成 2 成分をいずれも抑制し、活動電位延長の原因の一環をになっていることが確認され、臨床上 QT を延長しうることが明らかとなった。

2 年目は遅延整流 K チャンネルについての検討を行った。本チャンネルに関しては slow 型遅延整流 K チャンネルの構成タンパクである KCNQ1, および KCNE1 の cDNA をマウス由来の HEK 細胞に発現させた。



目的の細胞を選んでチャンネル電流を測定し、吸入麻酔薬による変化を観察したところ、セボフルラン (0.5mM) は、ベースライン電流に対して 0mV において $58 \pm 5\%$ 、20mV 時に $67 \pm 5\%$ 、40mV 時に $69 \pm 5\%$ 、60mV 時に $69 \pm 5\%$ の電流抑制効果をもたらした。本研究では 2 種ある IKs 電流のうち rapid 型の影響を除き、slow 型のみの電流への影響を観察することができた。



その結果、セボフルランが **slow 型 IKs** 電流を抑制することが明らかとなり、3 群抗不整脈薬のように活動電位を延長させて抗不整脈作用を持つ可能性が示唆された。

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木昭広、丹保亜希仁、相沢圭、菊地千歌、岩崎寛。吸入麻酔薬が遅延整流Kチャネルに及ぼす影響の調査～タンパク発現マウスHEK細胞を用いて～ 日本臨床麻酔学会、2010、徳島

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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◇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

鈴木 昭広 (SUZUKI AKIHIRO)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：30292121

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：