

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 4月15日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791328

研究課題名（和文） 酸化ビリルビンを指標とした開心術後心筋酸化ストレスの評価

研究課題名（英文） The examination of myocardial oxidative stress during cardiac surgery evaluated by oxidative bilirubin.

研究代表者

山本 正樹 (YAMAMOTO MASAKI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20437718

研究成果の概要（和文）：狭心症と心筋梗塞は心筋細胞の虚血を生じている。この虚血心筋に冠動脈バイパス術を行い、心筋血流を回復させることにより心筋を救助する。しかし、同時に心筋虚血再還流傷害という虚血心筋に血流が再開することにより心筋障害を生じる。これには酸化ストレスが一因となっている。生体内にある酸化ビリルビンを測定することで、その動態、原因、さらには組織障害機序を解明するための研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Reduced organ blood flow causes deficient oxygen and energy supply to the tissue, resulting in necrosis such as angina pectoris and myocardial infarction. Restoring blood flow and re-oxygenation improves metabolism in the ischemic myocardium, thus salvaging the heart. At the same time, reperfusion to the ischemic tissue can also cause ischemia/reperfusion injury. Tissue damage from reactive oxygen species (ROS) has been suggested as a mechanism of ischemia reperfusion injury. In this study, we used oxidative bilirubin with an antioxidant component, to investigate oxidative stress dynamics and mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：心臓大血管外科学、心筋虚血再還流障害、酸化ストレス、虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

これまでに心筋の一時的虚血の後に心筋に再灌流が生じると、再灌流による心筋障害を生じることが報告されており、心筋虚血再灌流障害と称されている。一時的心停止を必要とする心臓手術後や、一時的虚血を生

じる疾患である虚血性心疾患に対する冠動脈バイパス術などの心筋再灌流療法後の患者に術後肺水腫や一過性腎機能障害を来すことが経験される。

我々は動物モデルで、臓器虚血再灌流後の酸化ストレス産生が、臓器に与える影響について研究を行ってきた。再灌流後の心筋障害

を引き起こす原因の一つとして活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) の関与が報告されていた。しかし、ROS は不安定な物質故に、ROS 自体を経時的に測定できず、心筋虚血再灌流後の経時的な酸化ストレス変化は報告がなかった。我々は生体内ビリルビンの抗酸化作用を利用し、ROS 産生後に生じる酸化ビリルビン代謝物であるバイオピリンを測定することで生体内酸化ストレス動態を評価することを報告してきた(文献 1、2)。

バイオピリンは親水性代謝物であり、生体内で産生後に尿中に排泄される。共同研究者山口登喜夫(東京医科歯科大学)らの開発した抗 24G7 抗体(図 1)を用いた ELISA 法により測定でき(文献 3)、持続的採尿により経時的酸化ストレス評価を可能とした。

尿中バイオピリン測定法は簡便であり、心筋虚血再灌流後の酸化ストレス動態を経時的に測定できる可能性があり、さらに簡便故に、臨床応用の可能性が考えられる。

2. 研究の目的

心筋虚血再灌流を生じる心臓手術後に尿中バイオピリンを測定することで、全身性酸化ストレス動態を評価する。また、その結果、生体内での酸化ストレスの局在、機序を解明し、酸化ストレスに対する抗酸化治療の可能性について検討する。目的を以下のように分ける。

(1) 心筋虚血再灌流後の肺障害レベルを評価する。

心筋虚血再灌流を生じる心臓手術後に肺水腫が生じるが、動物実験で増加した尿中バイオピリンとの関連性は不明である。心筋虚血再灌流後の肺組織を多方面から評価することで肺における全身性酸化ストレスへの影響を検討する。

(2) 酸化ストレスを抑制する。

これまでの研究で、Bcl 2 発現促進が酸化ストレス抑制に関与することを報告している。また、組織学的検討から肺胞壁障害が酸化ストレス障害の本体である可能性を検討していた。以下の薬剤により以下の酸化ストレス抑制試験を行う。

- ① 炎症細胞遊走の抑制
- ② 窒素酸化物(NO)産生の抑制

(3) 冠動脈バイパス術後の酸化ストレス動態を測定する。

これまでの動物実験による結果、測定法を

元に、冠動脈バイパス術における尿中バイオピリンを経時的測定することで酸化ストレス動態を評価する。

(4) 心臓手術後の酸化ストレスと冠動脈灌流との関連性を検討する。

Indocyanine green (ICG) を用いた冠動脈造影検査を用い、冠動脈バイパス手術時にバイパスグラフトの造影検査を行った。バイパスグラフト血流障害と酸化ストレス産生との関連を評価する。(本研究期間にグラフト血流障害を認めた症例がなく、予備実験までとする。)

3. 研究の方法

本研究では、基礎研究と臨床研究により遂行した。

(1) 基礎研究(動物実験)

① 実験モデル作成

Wister 系雄性ラット(体重 250~300g)を用い、フォーレンを用いた全身麻酔下に左側胸部切開により心嚢を露出する。虚血再灌流群(MIR 群)は、心膜切開を行い、心嚢を露出し、左前下行枝近位部を 7-0 絹糸にて一時結紮を行い、灌流域の一時的心筋を行う。30 分の心筋虚血の後、結紮糸を解放し、心筋再灌流とする。左胸腔を縫合、全身麻酔を中止した後、飼育室で常温(25 度)下に置く。

比較対照群(Sham 群)は心膜切開までを同様の手技で行い、30 分後に閉胸し、以後同様にする。

薬剤投与モデルは全身麻酔施行直後、以後 MIR 群と同様に心筋虚血再灌流を行い、その後、1 2 時間毎に薬剤の経腹腔内投与を行った。

(使用薬剤)

- i. Methylpredonisolone (MP 群): 炎症細胞遊走の抑制
- ii. NG-monomethyl-L-arginine (LNM 群): NO 産生の抑制

② サンプル採取

i. 尿サンプル

心筋再灌流の後、2 時間毎の新尿採尿を行い、4 8 時間まで継続する。同様に採尿する。採尿後、-20 度で冷凍保存する。

ii. 組織サンプル

心筋虚血再灌流後各群のラットに対し、8 時間、24 時間で薬物的擬死を行った後、臓器を採取する。採取臓器は、心臓、肺、脾臓、肝臓および腎臓とし、採取直後に液体窒素による急速凍結の後、-80 度で凍結保存する。

採取した尿サンプルと、採取組織から作成

した組織ホモジネート(RIPA バッファーで溶解)からバイオピリン測定を行った。バイオピリン測定は共同研究者 山口らの作成したプロトコールにより、ELISA 法で測定した。

③組織学的検討

採取臓器からパラフィン切片を作成し、組織学的、免疫組織学的検討を行う。

(染色項目)

- i. HE 染色
- ii. 24G7 抗体(抗バイオピリン抗体)
- iii. Hememoxygenase-1 (HO-1)
- iv. 誘導型 Nitric Oxide 合成酵素 (iNOS)
- v. TNF- α

(本研究では HO-1、iNOS の染色結果は結論に関係がなくなったため、結果は省略する。)

④心筋梗塞領域測定

各群のラット虚血再灌流モデルに対し、再灌流後 48 時間で全身麻酔下に心臓を採取し、Triphenyltetrazolium chloride(TTC)染色を行い、Image J1.34 software を用い、心筋梗塞域を計測した。

⑤循環動態検査

各群のラット虚血再灌流モデルに対し、再灌流後 8 時間、24 時間において全身麻酔下に左室内圧測定を行う。測定パラメーターは左室内圧、心拍数、拡張末期圧、dP/dt とした。

(2) 臨床研究

① 尿サンプル採取

高知大学医学部附属病院、心臓血管外科における冠動脈バイパス術施行患者の尿サンプルを採取し、バイオピリン濃度を測定する。測定タイミングは、執刀直前、冠動脈吻合直前、冠動脈吻合開始後 1 時間、冠動脈吻合後 1、2 時間、以後 4 時間毎 4 8 時間までとした。対象患者は、全身麻酔下に、胸骨正中切開による心拍動下冠動脈バイパス術症例とした。

対照群は同時期に全身麻酔下に胸骨正中切開から拡大胸腺摘出術を施行した症例とした。本手術群は冠動脈吻合以外の手技は同様に施行されている。

② 冠動脈バイパスグラフト評価

研究(2)①で尿サンプル採取を行った症例に対し、術中に ICG 血管造影法によるバイパスグラフト造影検査を行い、吻合部狭窄などグラフト不全評価を行った。(施行症例に術中グラフト不全を認める症例がなく、術後 1 年での冠動脈造影検査結果にてグラフト不全を判定するため、研究期間中に結果は出ていない。)

ICG 血管造影法は、研究協力者：高知大学

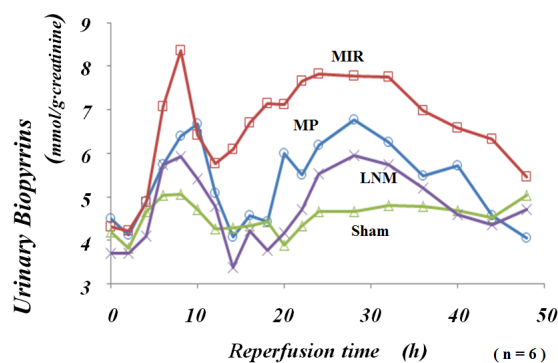
医学部生理学講座 佐藤により開発した HyperEye Medical System を用いて撮影し、画像は AVI フォーマットで保存している。

4. 研究成果

(1) 心筋虚血再灌流後の尿バイオピリン

ラット心筋虚血再灌流モデルにおける尿中バイオピリン濃度を測定し、濃度補正のため尿クレアチニン補正を行った。(文献 山本)測定結果は、MIR 群では虚血再灌流後 8、24 時間に上昇する 2 相性変動を示し、48 時間で術前値に復した。統計学的には Sham 群と有意差を認めた(repeated measures ANOVA) (図 1)。また、MP 群、LNM 群の尿中バイオピリン濃度は MIR 群から有意に減少した(図 1)

これまでに、心筋虚血再灌流直後に生じる活性酸素種由来の心筋障害は報告されている(文献 5)。その後、一旦減少した酸化ストレスが 2 相性に再上昇することは本研究で初めて報告され、さらに、MP、LNM により抑制されることも初回報告となる。



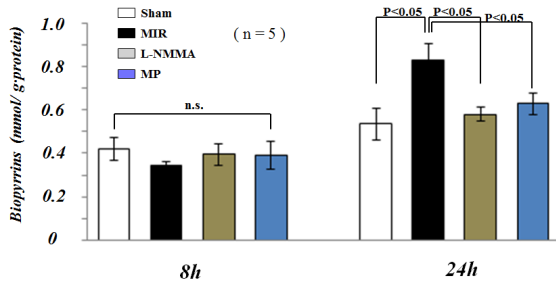
(図 1) 尿中バイオピリン

(2) バイオピリンの局在

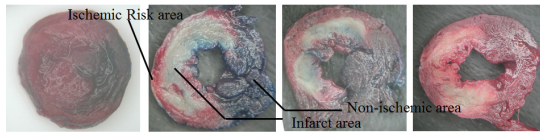
ラット心筋虚血再灌流モデルにおいて採取した組織切片から 24G7 染色(バイオピリン染色)を行い。虚血心筋、肺、脾臓、腎臓に発現を認めた(data not shown)。虚血心筋組織のバイオピリン濃度は、再灌流後 8 時間では上昇なく、24 時間での上昇を認めた(図 2)。MP 群、LNM 群では有意に抑制され(図 2)、(図 1)に示す再灌流後 24 時間に上昇する尿中バイオピリン上昇の原因に虚血心筋で生じる白血球浸潤、Nitric Oxide 産生が寄与する可能性が示された。

(3) 酸化ストレスと心筋梗塞域

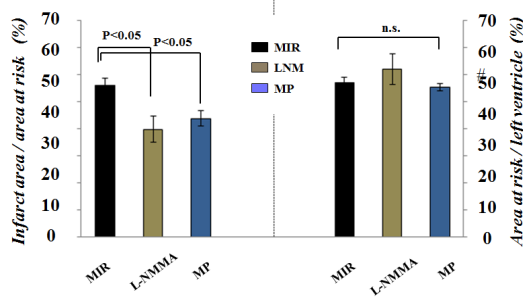
ラット心筋虚血再灌流モデル、各群の心筋梗塞域では LNM 群、MP 群で有意な縮小を認め、虚血再灌流後の酸化ストレスが梗塞域に寄与する可能性を示した(図 3)。



(図2) 心筋バイオピリン



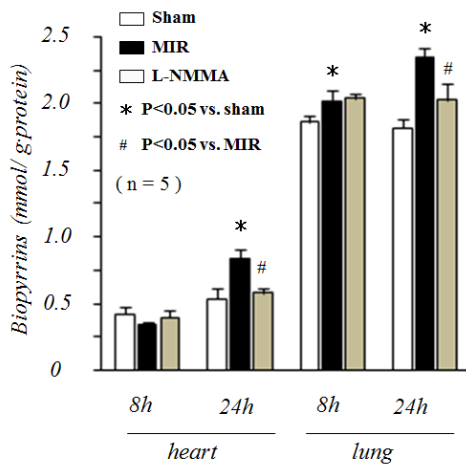
(図3-1) 心筋梗塞域(TTC染色)



(図3-2) 心筋梗塞域(TTC染色)

(4) 心筋虚血再灌流後の肺障害

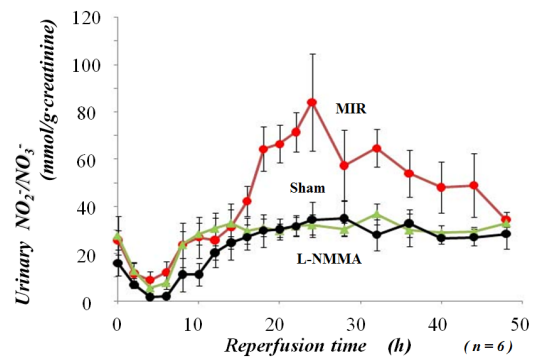
これまでに心筋虚血再灌流後の肺組織のバイオピリン上昇を認めることを報告してきた(文献1)。MIR群では肺バイオピリン濃度は有意な上昇を認め(図4)、肺胞壁に浸潤するmonocyteにバイオピリン発現を認めた。これはED-1陽性細胞(data not shown)であり、組織バイオピリン測定ではLNM群で有意な抑制を認めた(図4)。



(図4) 心臓、肺バイオピリン

(5) 酸化窒素の影響

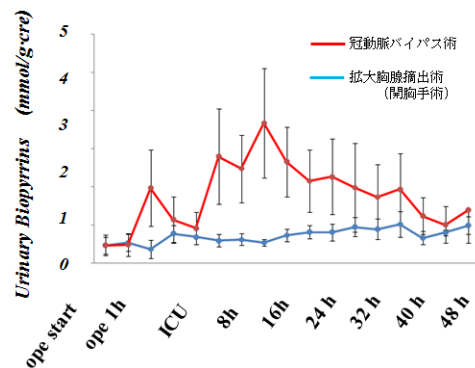
心臓と肺における組織バイオピリン、尿中バイオピリンはLNM群で有意に抑制された。さらに各群の心内圧測定ではMIR群に比較し、LNM群は、LVBP、dP/dt、edpおよびHRにおいて有意に良好である。また、各群における肺障害を肺水腫としてマクロ評価した。測定にはwet-weight to dry-weight ratioを用い比較し、有意にLNM群で低値であることを報告している(文献1)。その結果から、MIR亜急性期のNitric Oxideの影響が重要であると考えられる。各群の虚血再灌流後の尿中NO₂/NO₃を測定した結果、LNM群で有意な抑制効果が見られ(図5)、MIR亜急性期病態におけるNOラジカルの影響が示唆され、現在追加研究を行っている。



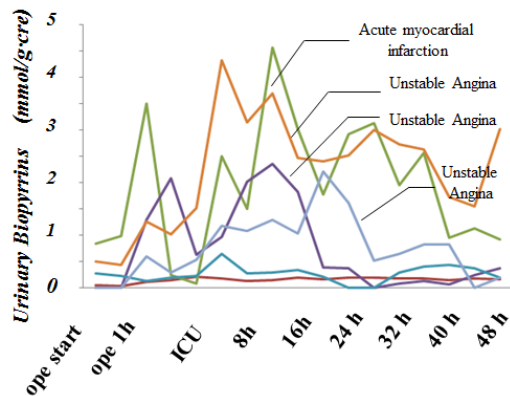
(図5) 尿中NO₂/NO₃

(6) 冠動脈バイパス術後尿中バイオピリン変動

冠動脈バイパス術後の尿中バイオピリンを測定した結果、冠動脈吻合直後に上昇後、一旦減少し、術後12時間をピークに再上昇を認めた(図6-1)。拡大胸腺摘出術症例との比較から、心筋虚血の影響を反映している可能性が示唆される。また、冠動脈バイパス術を施行した症例ごとの検討では、労作性狭心症症例に比して、急性心筋梗塞、不安定狭心症例で高度の尿中バイオピリン上昇を認め、虚血重症度の差が原因と考えられた(図6-2)。



(図6-1) 冠動脈バイパス後バイオピリン



(図6-2)冠動脈バイパス後バイオピリン

(7) 冠動脈バイパス術におけるグラフト不全と酸化ストレスの関係

冠動脈バイパス術におけるグラフト不全、特に術中の技術的吻合部トラブルが生じた場合、十分な冠血流が得られない。その場合に生じる心筋障害は虚血遷延による障害と再灌流による障害が考えられる。そのため、術中グラフト血流評価による不全グラフトと、尿中バイオピリンの関連性を評価する予定であるが、不全グラフト症例がなく、現在、結果を判定できない。そのため、術後、X線冠動脈造影結果と、尿中バイオピリン濃度を比較する予定であり、術後X線冠動脈造影結果の集積を待っている。なお、X線冠動脈造影結果から、術中施行したICG冠動脈検査結果を判定し、その結果から尿中バイオピリンとの関連性を判定できるため、ICG冠動脈検査結果はAVIフォーマットにて保存している。現時点で本研究結果に影響を与えないため、結果は省略する。

(参考文献)

1. Yamamoto M, Circ J 2008;72: 1520-1527
2. Yamamoto M, Am J Transplant 2007;7:1897-1906
3. Yamaguchi T, Biochem Biophys Res Commun 1996;223:129-135
4. Yamamoto M, Surgery Today 2011;41:1467-1474
5. Park JL, Ann Thorac Surg 1999;68:1905-1912

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)

[学会発表] (計8件)

- ① Masaki Yamamoto, THE EFFICACY OF ANTIOXIDANT THERAPY FOR MYOCARDIAL ISCHEMIA REPERFUSION. 20th Annual meeting The Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery. 2012. 3. 7-3. 11, Bali Indonesia

- ② 山本正樹, 酸化ビリルビンにより評価された冠動脈バイパス術周術期の酸化ストレス動態. 第111回日本外科学会定期学術集会, 2011. 5. 26-28, 紙上開催(東京)
- ③ 山本正樹, 心筋虚血再灌流後の酸化ストレス評価と抗酸化治療の導入. 第98回中国四国合同地方会, 2011. 5. 13-5. 14 徳島
- ④ 山本正樹, 酸化ビリルビンによる冠動脈バイパス術後の酸化ストレス評価と抗酸化治療の導入. 第9回KMS Research Meeting, 2011. 2. 3 -2. 4, 高知
- ⑤ 山本正樹, 心臓手術周術期における抗酸化治療の開発. 第63回日本胸部外科学会定期学術集会. 2010. 10. 24-27, 大阪
- ⑥ Masaki Yamamoto, Bilirubin Oxidation Reflects the Influence of Nitric Oxide after Myocardial Ischemia Reperfusion. American college of surgeon the 96th clinical congress. October 3- 7, 2010, Washington DC
- ⑦ Masaki Yamamoto, Bilirubin oxidation reflect generation of systemic oxidative stress after Myocardial Ischemia Reperfusion. The 5th China-Japan Cardiovascular Forum. 2009. 10. 12, Beijing.
- ⑧ 山本正樹, 心筋虚血再灌流は心筋以外にも影響を与えるのか。第109回日本外科学会定期学術集会, 2009. 4. 2-4, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 正樹 (YAMAMOTO MASAKI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：20437718

(2) 研究協力者

山口登喜夫 (YAMAGUCHI TOKIO)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
佐藤隆幸 (SATO TAKAYUKI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授