

## 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25年 6月 4日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591724

研究課題名（和文） TNF- $\alpha$ とスーパーオキシドからみた、ウリナスタチンによる心筋保護効果の解明

研究課題名（英文） Cardio-protective effects of ulinastatin in isolated rat hearts.

## 研究代表者

小口 健史（OGUCHI TAKESHI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：60201399

研究成果の概要（和文）：ラット摘出心臓標本において、臨床使用が既に可能な尿中トリプシン阻害薬であるウリナスタチンは、心筋虚血再灌流障害による心機能低下を改善し、再灌流不整脈の持続時間を抑制した。更に、人工心肺手術において使用されるプロタミンは心筋抑制作用を有するが、ウリナスタチンはプロタミンによる心筋抑制作用を減弱した。これらのウリナスタチンによる心筋保護作用は、ウリナスタチンによる抗 TNF- $\alpha$  作用によることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Pretreatment with ulinastatin, a clinically available protease inhibitor, offers protective effects against ischemia-reperfusion injury and protamine-induced cardiotoxicity by inhibiting TNF-alpha in the isolated rat heart.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学・ウリナスタチン・心筋虚血・TNF- $\alpha$ ・心筋保護・摘出心筋

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋虚血再灌流において心臓自体から TNF- $\alpha$  が放出するとされている (J Am Coll Cardiol 1997; 30: 1554-61)。一方、虚血再灌流により発生した TNF- $\alpha$  はスーパーオキシドを発生させて冠動脈血管内皮を障害を起こすとされる (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 475)。これに対して、抗 TNF- $\alpha$  抗体により、心筋虚血再灌流時の心機能回復が有意に改善したり (J Am Coll Cardiol 1997; 30: 1554-61)、心筋虚血再灌流によるスーパーオキシド産生が消失 (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; 296(6):

H2242-9) するとされる。

(2) 人工心肺手術において使用される抗凝固剤・ヘパリンの拮抗薬であるプロタミンは、血管拡張作用・直接心筋抑制作用・肺血管収縮作用を有するために、時に危機的循環不全を引き起こす。血管拡張作用は Nitric Oxide を介すること、肺血管収縮作用はアラキドン酸カスケードを介することが報告されている。一方、プロタミンを摘出心臓に投与すると、心筋から TNF- $\alpha$  が放出される (Anesthesiology 95: 1389-95, 2001) ことから、プロタミンによる直接心筋抑制作用に

は TNF- $\alpha$  の関与が指摘されている。

(3) ウリナスタチンは、臨床使用可能な尿中トリプシン阻害薬であり、好中球エラスターゼとカテプシン G を阻害して、ライソゾーム膜と細胞膜を安定化させる。更に、好中球からの酸素ラジカル放出を抑制する (Jpn Pharmacometrics 1986; 31: 663 / Jpn J Pharmacol 1992; 60: 239)。

これまでに、ウリナスタチンは、TNF- $\alpha$  を抑制することにより肝臓・肺における虚血再灌流障害を軽減 (Transplantation Proceedings 2006; 38: 2777-9 / 1998; 30: 3732-4) することが報告されている。ウリナスタチンは、ウサギの人工心肺モデルにおいて心機能回復を促進する (Ann Thrac Surg 2000: 69; 1121-6) とされているが、機序は不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 心臓における虚血一再灌流障害には TNF- $\alpha$  が関与しているとされる。一方、既に臨床使用可能な尿中トリプシン阻害薬であるウリナスタチンには TNF- $\alpha$  産生抑制作用があり、抗 TNF- $\alpha$  作用により肝臓・腎臓・肺における虚血一再灌流障害を軽減するとされている。そこで、本研究においては、ウリナスタチンの心筋における虚血一再灌流に及ぼす効果と機序を解明することを目的とした。ウリナスタチンの心筋に対する保護作用が解明されれば、心臓外科手術においてウリナスタチンを使用する新たな根拠が得られ、更に虚血性心疾患を合併した患者の麻酔管理においても新たな心筋保護薬になることが期待される。

(2) プロタミンには直接心筋抑制作用があり、その作用は TNF- $\alpha$  を介するとされている。そこで、ウリナスタチンは、TNF- $\alpha$  を抑制することにより、プロタミンの心筋抑制作用を軽減することが予想される。そこで、本研究においては、ウリナスタチンがプロタミンの心筋抑制作用を軽減するかどうかについて、TNF- $\alpha$  産生の面から解明することを第 2 の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 心筋虚血再灌流障害に対するウリナスタチンの保護効果の検討

### ① 摘出心臓標本の作成

心臓灌流用システムを用いて、ラットから摘出した心臓の大動脈にカニューレーションを行い、Langendorff 法により灌流する。肺静脈からバルーンカテーテルを左心室内へ挿入して左心室圧 (LVP) を測定する。LVP から左室 dP/dt max を求めて、心収縮能の指標と

する。肺動脈から流出する冠流液 (coronary effluent) を経時的に採取して心筋酸素消費量を算出する。

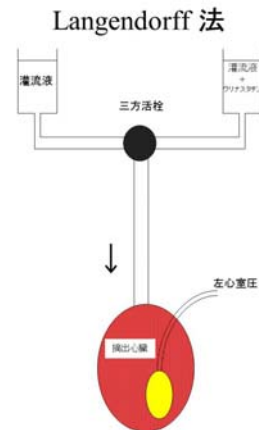


図 1

### ② スーパーオキシダの測定

虚血再灌流後に心臓を凍結乾燥して、細胞破碎装置 (MS-100R) を用いて心筋組織をホモジナイズ処理する。液体クロマトグラフィーを用いて心筋組織内の DHBA を測定する。スーパーオキシドがサリチル酸と反応して DHBA になることから、DHBA からスーパーオキシドの発生量を間接的に測定する。

### ③ TNF- $\alpha$ の測定

経時的に採取した肺動脈から流出する灌流液 (coronary effluent) の TNF- $\alpha$  濃度を Rat-ELISA Kit を用いて測定する。虚血再灌流後に心臓を凍結乾燥して、細胞破碎装置 (MS-100R) を用いて心筋組織をホモジナイズ処理して、心筋組織の TNF- $\alpha$  を測定する。

### ④ 実験プロトコール

上記のラット摘出心臓標本において、冠灌流停止による心筋虚血一再灌流実験 (虚血 15 分・ペーシング 222bpm → 再灌流 20 分) を行い、コントロール群とウリナスタチン群 (5 ~ 10 万単位/L) の間で、心機能の回復・サイトカイン産生量・スーパーオキシド発生量を比較して、ウリナスタチンの心筋保護効果について検討する。

#### 実験プロトコール

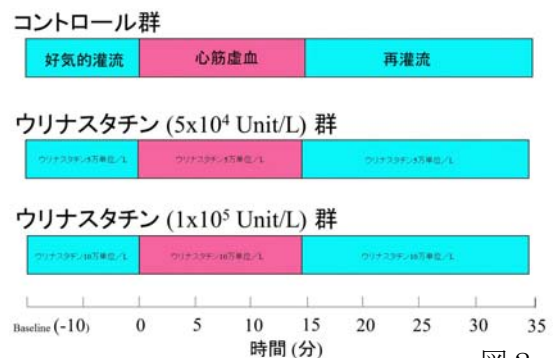


図 2

(2) プロタミンの心筋抑制作用に対するウリナスタチンの保護効果の検討

① 心筋虚血再灌流障害に対する実験と同様に、Langendorff 法によるラット摘出心臓標本を作成する。

② 冠灌流液中の TNF- $\alpha$  濃度を Rat-ELISA Kit を用いて測定する。心臓を凍結乾燥して、細胞破碎装置 (MS-100R) を用いて心筋組織のホモジナイズ処理を行い、心筋内 TNF- $\alpha$  量を測定する。

③ 上記の実験系において、コントロール群では通常の灌流液で 10 分間灌流後、プロタミン (20mg/L) を加えた灌流液で 10 分間灌流する。ウリナスタチン群では、ウリナスタチン 10 万 U/L を加えた灌流液で 10 分間灌流した後、ウリナスタチンおよびプロタミン (20mg/L) を加えた灌流液で 10 分間灌流する。

実験プロトコール

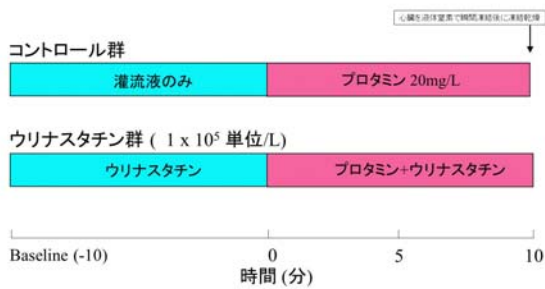


図 3

4. 研究成果

(1) 心筋虚血再灌流障害に対する保護効果

① 心機能に及ぼす影響

虚血前の好氣的灌流において、ウリナスタチンは心機能に有意な影響を及ぼさなかった。一方、虚血後の再灌流において、ウリナスタチン投与により心機能の回復が有意に改善した。

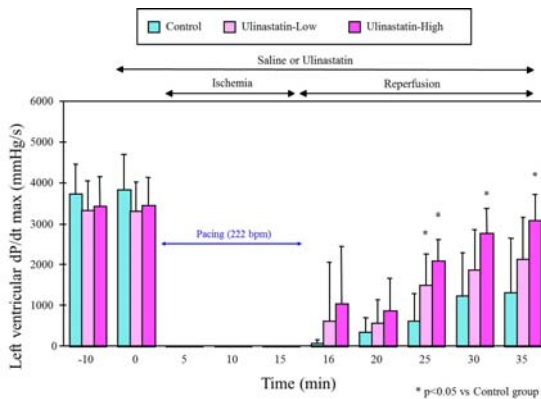


図 4

② 虚血再灌流不整脈に及ぼす影響

心筋虚血—再灌流によって発生した心室細動・心室性頻拍の持続時間は、コントロール群に比較してウリナスタチン群で有意に短縮された。

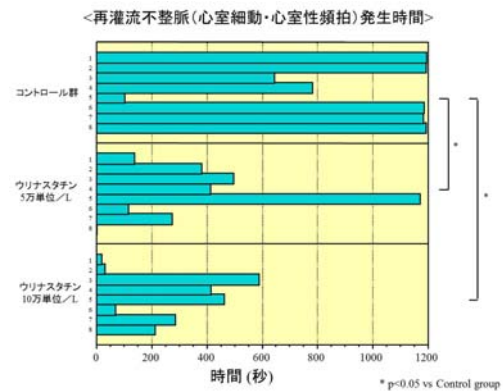


図 5

③ TNF- $\alpha$  に及ぼす影響

心筋虚血—再灌流時の冠流液中の TNF- $\alpha$  濃度は、コントロール群に比較してウリナスタチン群において有意差を認めなかった。

TNF- $\alpha$  そのものによる心機能低下作用は、ウリナスタチン投与により有意に抑制された。

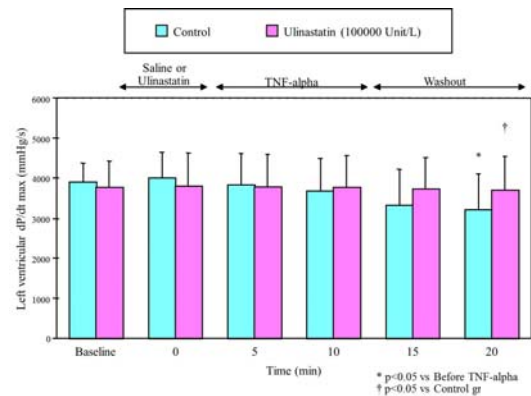


図 6

④ 成果の意義

ウリナスタチンは、摘出心臓において、虚血—再灌流時の心機能の低下を改善した。更に、ウリナスタチンは再灌流によって誘発される致死的不整脈の発生を抑制することも示された。冠流液中の TNF- $\alpha$  の濃度に有意な変化を認めなかったが、TNF- $\alpha$  そのものによる心抑制作用をウリナスタチンは抑えた。これらの結果は、ウリナスタチンの心筋虚血に対する保護効果は、TNF- $\alpha$  の産生量を減らすことによるのではなく、TNF- $\alpha$  の作用を減弱することによると示唆された。

本研究により、ウリナスタチンの心筋保護効果を動物実験において証明できたことにより、今後は臨床においても心筋虚血に対する有用性を検証する価値がある。ウリナスタ

チンの心筋に対する保護作用を臨床においても証明できれば、心臓外科手術においてウリナスタチンを使用する新たな根拠が得られ、更に虚血性心疾患を合併した患者の麻酔管理においても新たな心筋保護薬になることが期待される。

(2) プロタミンに対する心筋保護効果

① 心機能に及ぼす影響

コントロール群ではプロタミン投与により左室圧 dP/dtmax が 50%減少したのに対し、ウリナスタチン群では 9%の減少に留まり有意に心機能低下を軽減した。

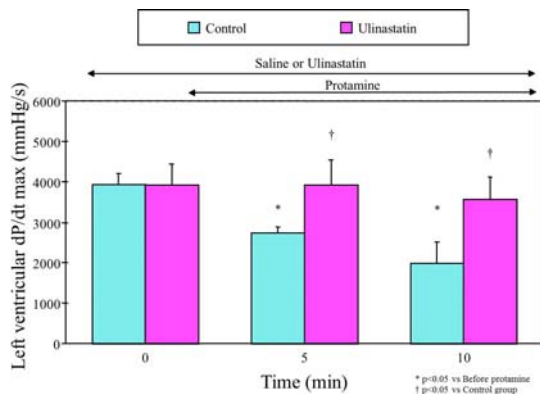


図 7

② TNF-α 産生に及ぼす影響

冠流液中の TNF-α 濃度は、プロタミン投与前はコントロール群とウリナスタチン群で同等であった。これに対して、プロタミン投与 5 分後の冠流液中の TNF-α 濃度はコントロール群に比較して、ウリナスタチン群では有意に抑制された。

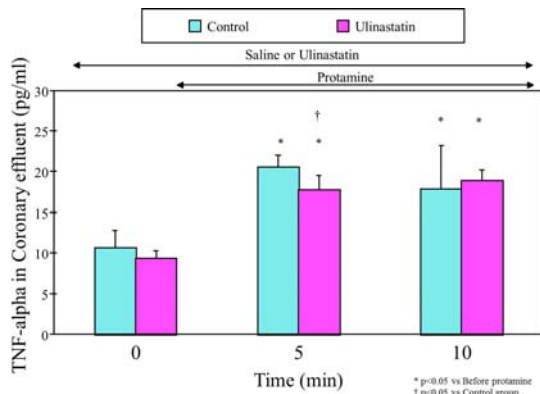


図 8

プロタミン投与後に心臓を凍結乾燥して、心筋内 TNF-α を Rat-ELISA Kit を用いて測定した結果、心筋内 TNF-α は、コントロール群に比較して、ウリナスタチン群において有意に抑制された。

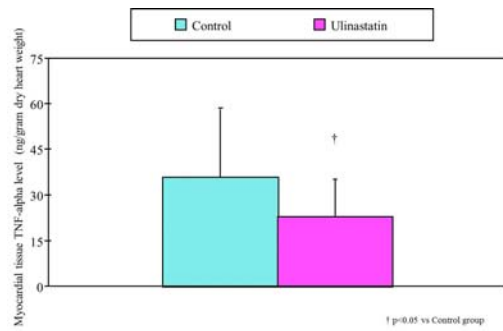


図 9

③ 成果の意義

プロタミン投与により心筋からの TNF-α 産生量は増加して、心筋収縮力が低下した。これに対して、ウリナスタチンの前投与により心筋からの TNF-α 産生は抑制され、プロタミンの持つ心筋抑制作用は軽減した。

本研究により、ウリナスタチンの心筋保護効果を動物実験において証明できたことから、プロタミンの心抑制作用に対するウリナスタチンの有用性を臨床においても検証する価値があると考えられる。プロタミンは心臓外科手術において循環不全を引き起こす原因の一つであり、ウリナスタチンの有用性を臨床においても証明できれば、より安全な心臓外科手術の麻酔管理に寄与できるものと期待される。

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)  
現在投稿準備中

〔学会発表〕 (計 2 件)

① Hisashi Fukushima, Takeshi Oguchi, Hiroaki Sato, Tamaki Sato, Takashi Matsukawa. Ulinastatin, a protease inhibitor, attenuates protamine-induced cardiotoxicity in rats by inhibiting tumor necrosis factor alpha. 2011 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, 2011 年 10 月 16 日, McCormick Place (アメリカ合衆国 シカゴ)

② Hisashi Fukushima, Takeshi Oguchi, Tadahiko Ishiyama, Hiroaki Sato, Takashi Matsukawa. Ulinastatin attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. 2011 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, 2010 年 10 月 17 日(アメリカ合衆国 サンディエゴ)

[その他]  
ホームページ等  
<http://y-anesth.jp/research/shinkin/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小口 健史 (OGUCHI TAKESHI)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・准教授  
研究者番号：60201399

### (2) 研究分担者

石山 忠彦 (ISHIYAMA TADAHIKO)  
山梨大学・医学部付属病院・准教授  
研究者番号：90293448

松川 隆 (MATSUKAWA TAKASHI)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：80209519

### (3) 連携研究者

なし