

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591810

研究課題名（和文）超短時間作用性選択的 $\beta 1$ 遮断薬の虚血心筋保護作用機序研究課題名（英文）Cardioprotective effect and mechanism of action of ultra short-acting, highly selective $\beta 1$ -blocker on ischemic reperfused heart.

研究代表者

金谷 憲明 (KANAYA NORIAKI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10244344

研究成果の概要：

長短時間作用性選択的 $\beta 1$ 遮断薬（ランジオロール）の虚血心筋保護作用機序を単離モルモット心を用いて調べた。ランジオロールは虚血再灌流心に対し、心保護作用を有し、その心保護作用は心仕事量減少とは無関係であることが分かった。さらに、虚血による活性酸素産生を抑制し、フォスフォランバンのリン酸化を抑制する事が判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：(1) 心臓 (2) 虚血心 (3) β 遮断薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 周術期心イベントは、術後合併症の中で最も重篤なものであり、安全な周術期管理のためには周術期の心筋虚血による死亡を減らすことが最重要課題である。しかし、現在の医療ではある程度までの心イベントの発生を予想できても、周術期心イベントを減少させる決定的な方法は判明していない。今のところ、様々な術前薬物投与のうち β 遮断薬のみが術後の心筋梗塞のリスクを減らすことが知られているが、一般に用いられている静注用 β 遮断薬プロプラノロールは心抑制が遷延し、術中低血圧を

起こすため、その使用は制限されていた。近年、術中に使用可能な短時間作用性、選択的 $\beta 1$ 遮断薬が開発され、有用性が期待されるが、虚血心に対する作用についてはよく分かっていない。本研究の第 1 の目的は、選択的 $\beta 1$ 遮断薬が虚血／再灌流心に対しどのような影響を与えるか、摘出心臓灌流モデルを用いて調べ、至適使用量、時期について検討することである。

さらに、第 2 の目的は、新たに開発された選択的 $\beta 1$ 遮断薬であるランジオロール (Landiolol hydrochloride) の心保護作用機序について調べる事である。 β 遮断薬は一般に、心収縮力や心拍数を抑制することによ

り、心筋の酸素消費を抑え、その結果、虚血心に対して心保護作用を示すと思われる。その他の、心保護作用機序としては、抗酸化作用などがいわれている。最近では、ベータ遮断薬は筋小胞体の機能とそれに関与する遺伝子の発現を温存する事がいわれている。筋小胞体は細胞内カルシウム動員に重要な役割を果たしていることから、 β 遮断薬は筋小胞体機能を温存することを介して、虚血心筋に対して保護的に作用する可能性がある。

(2) 実験モデルの特色

われわれ臨床医が基礎研究を行う点で最も注意を要する点は、研究成果がどの程度日常の臨床に還元可能かということである。現在、多くの基礎研究は *in vitro* で行われている。そのため、一つ一つの細胞内で起こっている現象を見ることはできるが、生体内で起こっている現象の説明には直接結びつかない可能性がある。われわれが用いた実験モデルは、摘出灌流心であり *in vitro* の環境でありながら、自動能を有しており、心臓としての機能を観察しながら研究を行える点が、特長である。そのため、*in vivo* では除外できない循環、神経、内分泌系ホルモンの影響を受けずに心機能を評価できる。

(3) 研究の必要性

β 遮断薬の周術期心保護作用は、はっきりとエビデンスのある事柄であるのに、現時点では過小評価されている。その理由の一つは、 β 遮断薬があまりにもよく知られた薬剤であり、研究者自身が目新しさを感じないために、基礎研究があまり行われなことがある。さらに、今回、研究対象とした選択的 β_1 遮断薬は、いまのところ、術中不整脈に対してしか適応が認められていない。そのため、現実に臨床使用は麻酔科医に限られ、他診療科の医師が使用する機会は極めて限られている。したがって、本薬剤の研究は麻酔科以外では行われな可能性が大きい。

(4) 独創性

実験モデル、手技自体は広く行われ、確立している手法である。そのため、方法論で研究に苦慮する事はあまり考えていない。本研究は、基礎研究のためだけの研究ではなく、実際に臨床医が日常用いる治療薬についてその有効性、作用機序について調べられていない点、臨床では研究できない点を研究テーマとしている点が特長である。そのため、基礎研究と臨床との距離が非常に接近している。これは、通常的基础研究にはほとんど期待できない。

2. 研究の目的

(1) ランジオロールの心保護作用は、心仕事量減少による Energy-sparing effect によるのか?

虚血再灌流心において、ランジオロールは心仕事量の減少による二次的な効果で、心保護作用を示すのか、それとも、何らかの直接作用によって心保護作用を示すのであろうか。

(2) ランジオロールの心保護作用はプレコンディショニング機序によるものなのか?

虚血前に、短時間の虚血処理をすることにより、心筋は虚血に対する耐性を獲得する。現在、多くの薬物がこの、プレコンディショニング機序と同様の作用を有することが知られており、「薬理的プレコンディショニング」といわれている。麻酔薬もそのような作用を有することが知られているが、 β 遮断薬がそのような作用を有しているかは分かっていない。

(3) ランジオロールの心保護作用は、抗酸化作用によるものなのか?

心筋の虚血・再灌流は活性酸素産生を引き起こし、心筋障害の原因となる可能性がある。事実、free radical scavenger が虚血心に対し、保護的に作用するとする報告もされている。しかしながら、 β 遮断薬が抗酸化作用を介して、心筋保護作用を示すかどうかは分かっていない。

(4) ランジオロールは筋小胞体機能を温存することで心保護作用を示すのか?

筋小胞体は、細胞内カルシウム動員に重要な役割を果たしていることから、 β 遮断薬は筋小胞体機能温存により、虚血時の心筋保護作用を示す可能性がある。特に、細胞内のカルシウム取り込みは ATP-dependent Ca^{2+} pump ATPase (SERCA2a) を介して行われており、phospholamban (PLB) の機能を調べることによって、筋小胞体の機能を観察できる。

3. 研究の方法

(1) 虚血再灌流心における β 遮断薬の心保護作用の比較

モルモットを用い、ラングンドルフ法による摘出拍動心臓標本作製し、左心室圧、心拍数、冠血流量、心筋酸素消費量を測定する。虚血/再灌流心モデルとして、灌流停止による一過性の全虚血後、再灌流を行う。我々の行った予備実験では 45 分の虚血後に再灌流を行うと、1 時間後の左心室圧

は虚血前の 70%程度までしか回復しないことがわかっている。

1) 虚血/再灌流に対するβ遮断薬前投与の心保護作用:

虚血15分前に各種β遮断薬(プロプラノロール、エスマロール、ランジオロール)を投与し、虚血/再灌流による心収縮力低下が軽減するか、β遮断薬を前投与しない対照群と比較検討する(各群、n=7)。

(2) 心仕事量減少を介する心保護作用機序

β遮断薬の心保護作用が、その心仕事量減少を介する2次的なものなのかを調べる。摘出心は、β遮断薬を15分間前投与された群(n=7)と、β遮断薬による心仕事量減少を補う目的で、心室ペーシングにより心拍数を一定(300/分)にした群(n=7)とで心機能を比較する。

(3) 活性酸素減少を介する心保護作用機序

β遮断薬の心保護作用として、脂質過酸化の減少による直接作用の関与を調べる。摘出心臓は、45分の全虚血後に90分の再灌流を行う。β遮断薬としてランジオロールを用い、虚血前に15分間のβ遮断薬前投与を行う。脂質過酸化の指標として、再灌流90分後に組織内malondialdehyde(MDA)の測定を行う。MDAの測定には、心室標本を凍結保存しておき、後日、生化学的分析をおこなう。MDA濃度はN-methyl-2-phenylindoleとMDAとの反応により決定する。

(4) PLBのリン酸化を介する心保護作用機序

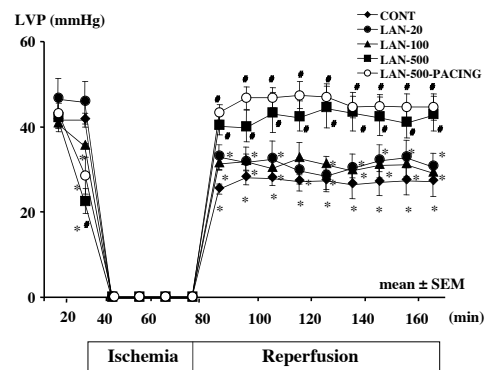
β遮断薬の直接心保護作用として、PLBのリン酸化を介する心保護作用機序の関与を調べる。摘出心臓は、45分の全虚血後に90分の再灌流を行う。β遮断薬としてランジオロールを用い、虚血前に15分間のβ遮断薬前投与を行う。心室標本を凍結保存しておき、後日、生化学的分析をおこなう。心室標本は、250mM sucrose, 1mM EDTA, 50mM Trisを含むbuffer中にhomogenateする。それを600gで10分間遠心し、さらに上清を8,000gで10分間遠心する。上清をさらに、15,000gで60分間遠心し、その上清をSDS-PAGE(polyacryl-amide gel electrophoresis)にかける。

蛋白標本(25 μg of total protein/ lane)は10-20% gradient slab gelsのSDS-PAGEで電気泳動法により分離される。蛋白はpolyvinylidene difluoride membranesに移行され、PLB peptide(residues 9-19)リン酸化部位によりSer16, Thr17の抗体によ

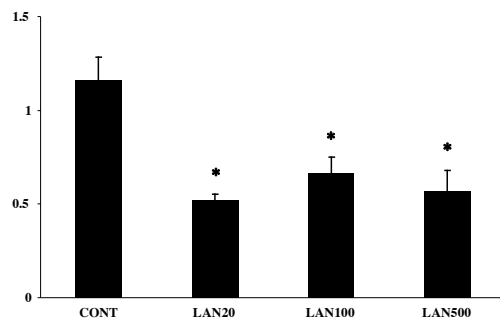
り検出する。

4. 研究成果

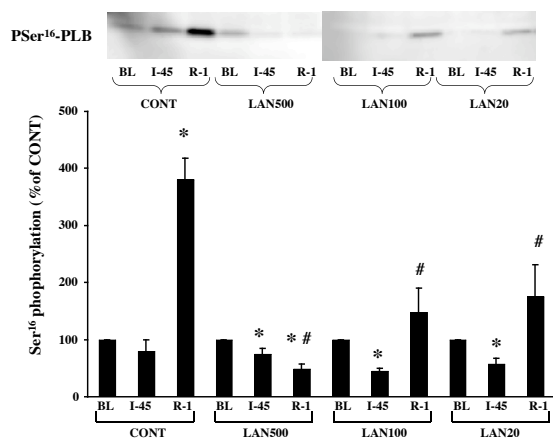
(1) ランジオロールの心保護作用



(2) ランジオロールの活性酸素減少を介する心保護作用機序



(3) ランジオロールのPLBのリン酸化を介する心保護作用機序



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 4件)

① Kamada N, Kanaya N, Hirata N, Kimura S, Namiki A. Cardioprotective

effects of propofol in isolated ischemia-reperfusion guinea pig hearts: role of KATP channels and GSK-3 β . Can J Anaesth;55:595-605, 2008、査読有

- ② Edanaga M, Nakayama M, Kanaya N, Tohse N, Namiki A.: Propofol increases pulmonary vascular resistance during alpha-adrenoreceptor activation in normal and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. Anesth Analg;104:112-118. 2007、査読有
- ③ Kimura-Kurosawa S, Kanaya N, Kamada N, Hirata N, Nakayama M, Namiki A.: Cardioprotective effect and mechanism of action of landiolol on the ischemic reperfused heart. J Anesth;21:480-489. 2007、査読有
- ④ 平田直之、金谷憲明、渡辺政徳、清水齋、並木昭義：抗生物質投与によるビタミン K 欠乏に起因すると思われる凝固抑制で硬膜外血腫を来した 1 症例。麻酔;56:181-185. 2007、査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 金谷憲明：ランチョン講演 進化するバルスオキシメータ「PVI の臨床使用の有用性」日本臨床麻酔学会第 28 回大会、2008 年 11 月 21 日、京都。
- ② Hirata N, Kanaya N, Namiki A. Propofol decreases ischemia induced arrhythmias and dephosphorylation of connexin43 in rats. A544 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists (Orlando), 10/18-22, 2008
- ③ 金谷憲明：特別講演「虚血心筋と麻酔」日本麻酔科学会北海道・東北支部、第 6 5 回東北地方会、2008 年 9 月 13 日、秋田。
- ④ 金谷憲明：パネルディスカッション 麻酔と循環 1：心筋虚血の予防と心血管作動薬の理論的な使用「選択的 β 1 遮断薬の虚血心筋保護作用機序」日本麻酔科学会第 55 回学術集会、2008 年 6 月 13 日、横浜。
- ⑤ 金谷憲明：パネルディスカッション 麻酔と循環 2：循環のモニタリング「酸素飽和度を用いた循環モニタリング」日本麻酔科学会第 55 回学術集会、2008 年 6 月 13 日、横浜。
- ⑥ Hirata N, Yamakage M, Kamada N, Kanaya N, Namiki A.: The hemodynamic effects of low-dose landiolol on endtracheal intubation in elderly patients. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, 2007, 10/13-17, San Francisco.
- ⑦ Kanaya N, Kamada N, Hirata N, Kimura S, Namiki A.: Cardioprotective effects of propofol in isolated ischemia-reperfusion guinea pig hearts. Annual Meeting of

American Society of Anesthesiologists, 2007, 10/13-17, San Francisco.

- ⑧ Saijo H, Sugino S, Kanaya N, Nakayama Y, Namiki A.: Clinical assessment of tracheal intubation using an Airwayscope™ video laryngoscope. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, 2007, 10/13-17, San Francisco.
- ⑨ Hirata N, Kanaya N, Kamada N, Nakayama M, Namiki A.: Sevoflurane mimics sympathetic nerve activity in rats early after myocardial infarction. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, 2007, 10/13-17, San Francisco.

[図書] (計 1 件)

- ① 金谷憲明：第 5 2 章. 血管手術の麻酔. ミラー麻酔科学 (第 6 版翻訳)「Miller's Anesthesia. 6th edition. Ed. by Miller RD」.メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2007, pp1607-1629.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

金谷 憲明 (KANAYA NORIAKI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10244344

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし