

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20383

研究課題名(和文)36 低体温法の心筋虚血再灌流障害保護作用：水素によるさらなるROSの制御

研究課題名(英文)protective effect of 36 degree hypothermia on myocardial ischemia reperfusion injury

研究代表者

川島 信吾 (kawashima, shingo)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：10467251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ランゲンドルフ装置を用いた孤立心筋モデルを作成した。37℃で95%酸素濃度の灌流液で20分間の安定化後に、30分間の完全虚血にする。その後、温度を変化させて、再灌流を90分行った。孤立心筋の灌流液の温度を37℃から36℃と34℃に低下させ低体温法の、虚血再灌流に及ぼす影響を検討した。心筋梗塞サイズの変化の結果はコントロールグループは45.2%±13.9%、34度の低体温群では、10.9%±5.3% (p<0.001)、36度低体温群では28.2%±9.5% (p<0.001)であった。これにより心筋梗塞のサイズは体温によって変化することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓のみで評価すると、虚血になった心臓(心臓が停止してしまった状態)では、温度を低くすることで、心筋梗塞の範囲が小さくできることがわかり、それにより、救急現場では体温を低く保つことで心臓機能を保護できる可能性がある。また、そこに水素を投与することで心臓の内皮細胞を保護して生存率が上がることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：An isolated myocardial model was created using the Langendorff apparatus. Stabilization for 20 minutes with perfusate with 95% oxygen concentration at 37°C. followed by 30 minutes of total ischemia. Then, the temperature was changed and reperfusion was performed for 90 minutes. The effect of hypothermia on ischemia reperfusion was examined by lowering the temperature of perfusate of isolated myocardium from 37°C to 36°C and 34°C. The change in myocardial infarct size was 45.2% ± 13.9% in the control group, 10.9% ± 5.3% (p<0.001) in the 34-degree hypothermia group, and 28.2% ± 9.5% (p in the 36-degree hypothermia group). It was <0.001). It was found that the size of myocardial infarction changes depending on the body temperature.

研究分野：心臓血管麻酔

キーワード：水素 心筋保護

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 心停止患者へ心肺蘇生法を行うと心筋虚血再灌流障害が引き起こされる

心停止患者は心肺蘇生法施行により自己心拍再開しても、多くの場合その後数時間で死亡してしまう。この現象の要因の多くは虚血再灌流障害で説明できる。そしてこの虚血再灌流障害には自己心拍再開後数分以内に引き起こされる酸化ストレスが関連していると報告されている。近年、自己心拍再開後の心臓ではミトコンドリア由来の酸化ストレスが再灌流後数分以内に起こることが示された。単離心筋細胞での虚血再灌流モデルでは、活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の上昇、収縮力低下、ミトコンドリアからのチトクローム C の放出、カスパーゼ活性化、ミトコンドリア膜透過性遷移孔開口が起き、最終的には細胞死となることが示された。

2) 低体温法は心停止患者の生存率改善に役立つ

今日のコールド療法国際コンセンサスでは、心停止患者の生存率改善に役立つ唯一の手段は低体温法であるとされている。さらに、自己心拍再開前に冷却を行うと心機能と予後の改善がもたらされると報告されている。しかし、多くの院外心停止例では病院搬送前もしくは搬送中、つまり自己心拍再開前に低体温法を始めることは困難である。また低体温法の心保護作用の機序についても不明な点が多い。

3) 心筋細胞の虚血再灌流障害時の特質

心筋細胞は虚血には良く耐えるが、再灌流時に細胞死を起こす。虚血再灌流障害に対して心筋保護効果が示された報告がある低体温帯は 30°C から 32°C であり、それ以下の 25°C では心筋保護効果が消失し、それ以上の温度帯は不明である。

過去の研究では、虚血再灌流障害に対する低体温法の心筋保護効果が示される温度帯は、32°C の低体温法が虚血再灌流障害に対する心筋保護作用が最も著しかった。(Shao, et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H2164-H2173, 2010) 私の所属する研究チームは近年、低体温法導入時期を再灌流時まで遅らせても心筋保護効果があること、低体温法目標温度を 34°C としても心筋保護作用があることをラット孤立心筋モデルにて見いだした。(Mochizuki, et al. *Resuscitation* 83:238-242, 2012)。再灌流時に導入した 34°C 低体温法は虚血再灌流障害に対し梗塞範囲を減少させる。(Mochizuki, et al. *Resuscitation* 83:238-242, 2012) NOS 阻害薬 NG-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) と phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 阻害薬 LY294002, Wortmannin は 34°C 低体温法の心筋保護作用を消去する。*P < 0.05 vs. control 群 (再灌流時 37°C), †P < 0.05 vs. reperfusion 群

4) 低体温法目標温度

心肺蘇生後症候群に対する脳保護の観点から、蘇生後の高体温は避けるべきである (Class I) とされている。また、低体温法目標温度として 32-36°C が推奨されているが、この温度を閾値としたことには明確な理由はない。近年、院外心停止患者に対し目標体温を 36°C とした低体温法を行ったところ、33°C 低体温法の神経学的予後が同等だったとする多施設前向きランダム化比較試験結果が公表された (Nielsen, et al. *NEJM* 369:2197-2206, 2013)。一般に低体温時には凝固能障害、不整脈、免疫能低下などの合併症が懸念される。また、目標温度を低くすればするほど実際の蘇生の現場で目標温度に達するのは不可能に近い。目標体温が 36°C の低体温法で、虚血再灌流障害に対する脳及び心筋を含めた臓器に十分な保護作用があるかどうか、大いに興味があるところであった。

5) 虚血再灌流障害を増悪させる高酸素濃度及び ROS

近年、院外心停止例で自己心拍再開後の吸入酸素濃度を動脈血酸素分圧 (PaO₂) 60-300 mmHg に維持すると PaO₂ > 300 mmHg に維持するよりも生存率が向上すると報告された。この機序には高濃度吸入酸素による ROS 産生が関係しているらしい。

6) 水素ガスによる ROS を介した細胞防御機能

水素は毒性がなく、527°C より高温でないと可燃しない安全なガスである。細胞中も ROS の中でもヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) のような酸化力の強い物質のみを消去してシグナル伝達機能を持っている ROS には影響を及ぼさない。このため、副作用が少なく、抗炎症、抗アレルギー、抗アポトーシス作用の併せ持つ臨床応用が待たれている新しいガスである。したがって、再灌流時に高酸素濃度へ、強酸化力のある ROS を抑制する水素ガスを混合することにより、低体温法による心筋保護作用に相加効果がもたらされることが期待される。

7) 低体温法、水素ガスの心保護作用機序としての nitric oxide (NO) synthase-NO 系

虚血再灌流障害に対する心筋保護作用には endothelial NO synthase (eNOS)-NO 系が関与する。我々是非特異的 NOS 阻害薬が 34°C 低体温法の心筋保護作用を消去することを見いだした (Mochizuki, et al. *Shock* 6:527-532, 2013)。eNOS を含めた NOS 系が低体温法、水素ガスの心筋保護作用に関与するかどうか、その詳細をアイソザイムのタンパク発現レベルで今回解析する

2. 研究の目的

AHA2015 年のガイドラインにおいて蘇生後の目標温度は旧ガイドラインの 32-34°C から「32-36°C」に変更された。神経学的予後による温度設定の変更であるが、心筋再灌流障害予防の効果においての適正温度は不明である。一方、蘇生の現場では高濃度酸素投与が行われているが、近年高濃度酸素による予後悪化の報告がある (Helmerhorst, et al. *Crit Care Med.* 2015;43:1508-19)。今回、ラット孤立心筋モデルを用い、目標体温①36°C 低体温法の心筋保

護効果、さらに、灌流液の中に水素ガスを投与し、②水素ガスが持つ ROS 抑制効果が、活性酸素から心筋を保護する効果があるか、さらに③心筋保護効果にいずれの NOS アイソザイムがタンパクレベルで関与しているか検討する。これにより臨床現場で施行可能な、よりよい蘇生時の条件を立証し、現場に提案することである。

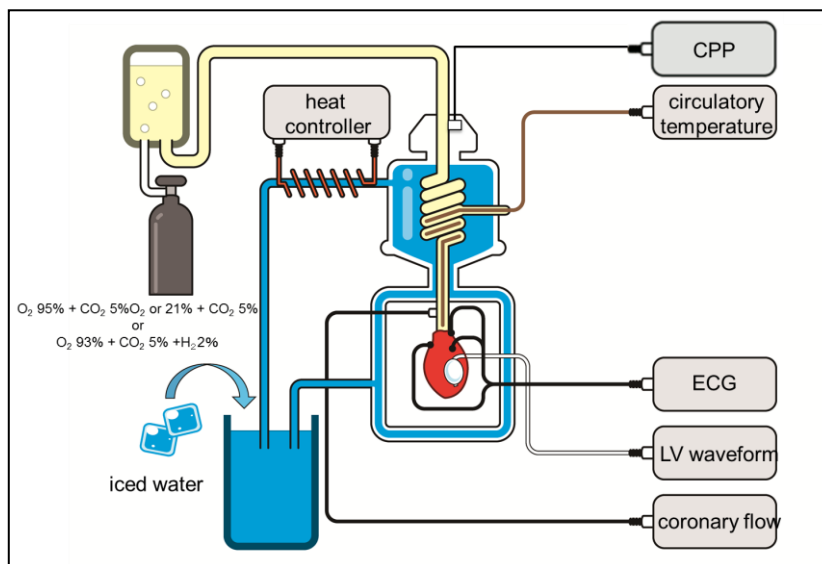
3. 研究の方法

Sprague-Dawley 雄性ラットを対象に、ランゲンドルフ装置を用いた孤立心筋モデルを作成する。これを用いて、灌流液温度を 37°C から 36°C に低下させる低体温法の、虚血再灌流に及ぼす影響を検討する。また同時に高濃度酸素に混合した 2% 水素ガスの影響も検討する。評価項目は、経時的に測定する左心室機能と酸素代謝の指標となるパラメータ、及び左心室の心筋梗塞範囲、三種類の NOS アイソザイム endothelial/neuronal/inducible NOS の蛋白質発現量及びリン酸化蛋白質質量とする。これにより、36°C 低体温、水素ガス添加の心筋保護作用を検討すると共に、NOS アイソザイムのいずれが心筋保護作用に関与するのか検討する。

1. 対象 Sprague-Dawley 雄性ラットを用いる。
2. 測定 1) ラットにエーテル吸入麻酔を行ったのち心臓と肺を一塊にして摘出し、ランゲンドルフ装置に装着する。装着後、後述する灌流液で灌流しながら肺組織などを切離し、孤立心筋モデルを作成する。2) ランゲンドルフ装置にて使用する灌流液は modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer とする。この灌流液は①酸素ガス 95% および二酸化炭素ガス 5% にて飽和させる。大気酸素濃度灌流を行う際には灌流液を②酸素ガス 21%、二酸化炭素ガス 5%、および窒素 74% で飽和させる。水素ガス投与群では①、②の期待に 2% の水素ガスを混合する (figure 3)。

Figure 3. 孤立心筋モデル

Heat controller: 熱交換器
 CPP (coronary perfusion pressure): 冠灌流圧、
 circulatory temperature: 灌流温度、ECG、心電図
 LV (left ventricular) waveform: 左室内圧波形、
 coronary flow: 冠灌流量



3) 孤立心筋モデルにより測定するパラメータ我々が従来測定しているパラメータを用いる。最適な水素濃度の決定

Sprague-Dawley ラット 83 頭を使用し、(a) ショック無し室内気群 (Room-NS) (b) ショック無し 1.2% 水素群 (H21.2%-NS)、(c) 出血性ショック室内気群 (Control-S)、(d) 出血性ショック 1.2% 水素群 (H21.2%-S)、(e) 出血性ショック 3% 水素群 (H23.0%-S) の 5 群を作成した。実験はイソフルランによる全身麻酔下に行った。出血性ショックは観血的動脈圧ラインから脱血し、平均動脈圧が 30-35 mmHg となる状態を 1 時間維持した。ショック後は脱血した血液の 4 倍量の生理食塩水を輸液して蘇生した。実験については、1) 輸液蘇生後 120 分の時点で採血し、血清シンデカン-1 (EGCX の損傷マーカー)、血清クレアチニンを測定した。また心筋毛細血管内における EGX を透過型電子顕微鏡で観察し、その厚さを測定した。2) 輸液蘇生後、収縮期血圧が 10 mmHg を下回るまでの時間を測定し、生存時間とした。3) 実験 1 と同様にして、ヘモグロビン値と Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 値を測定した。

4. 研究成果

Sprague-Dawley 雄性ラットを対象に、各群を 8 例ずつとした。37°C で 95% 酸素濃度の灌流液で 20 分間の安定化後に、30 分間の完全虚血にする。その後、温度を変化させて、再灌流を 90 分行った。孤立心筋の灌流液の温度 37°C から 36°C と 34°C に低下させ低体温法の、虚血再灌流に及ぼす影響を検討した。心筋梗塞サイズの変化の結果は コントロールグループ 45.2% \pm 13.9% 34 度の低体温群では、10.9% \pm 5.3% ($p < 0.001$)、36 度低体温群では 28.2% \pm 9.5% ($p < 0.001$) であった。他に記録したバイタルデータ (心電図波形、心拍数、左室内圧、冠灌流量、灌流液温度、PaO₂、PvO₂、lactate) については各群で優位な差は見られなかった。これにより心筋梗塞のサイズは体温によって変化することがわかった。臨床的意義として虚血によるダメージは体温の変化で抑制できることがわかる。ただ、その温度 2°C の差が臨床的に意味があるかは不明である。この原因についてはまだできていない。ここで、ランゲンドルフ装

置の不具合により当初予定していた実験が困難になり、水素の最適濃度の調査へと切り替えた。水素ガスの吸入が出血ショックによる心筋毛細血管へのダメージを観察した。1) シンデカン-1 値は Control-S 群 (27.9 ± 17.0 ng/ml) と比べて H₂1.2%-S 群 (8.3 ± 6.6 ng/ml; 95%信頼区間, 3.2-35.8; P=0.01) で有意に低かった。心筋 EGCX の厚みは Control-S 群 (0.06 ± 0.02 μ m) と比べて H₂1.2%-S 群 (0.15 ± 0.02 μ m; 95%信頼区間, 0.02-0.2; P=0.007) で有意に厚かった。

2) 生存時間は Control-S 群 (246 ± 69 min.) と比べて H₂1.2%-S 群 (327 ± 67 min. P=0.0160) で有意に長かった。3) ヘモグロビン値は Control-S 群 (11.1 ± 0.8 g/dl) と比べて H₂1.2%-S 群 (9.4 ± 0.5 g/dl; 95%信頼区間, 0.6-2.9; P=0.003) で有意に低かった。これらは H₂3.0%-S 群では Control-S 群と有意差が見られなかった。TNF- α は Control-S 群 (94.4 ± 152.2 pg/ml)、H₂1.2%-S 群 (144.7 ± 103.8 pg/ml; 95%信頼区間, -105-206.2; P=0.68)、H₂3.0%-S 群 (147.0 ± 77.5 pg/ml; 95%信頼区間, -103.4-208.5; P=0.66) で有意差が見られなかった。

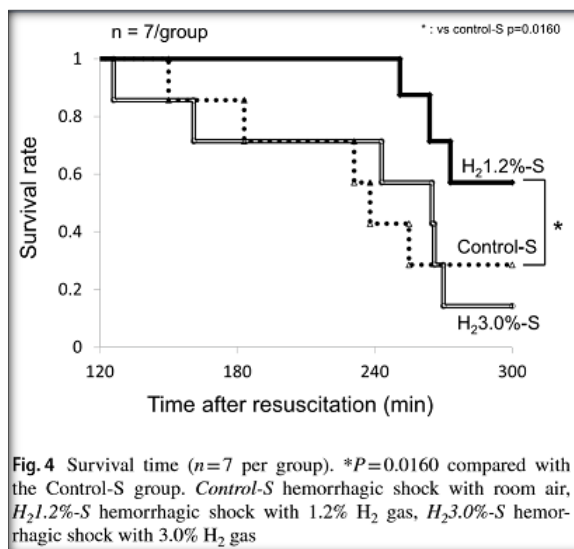


Fig. 4 Survival time ($n=7$ per group). * $P=0.0160$ compared with the Control-S group. Control-S hemorrhagic shock with room air, H₂1.2%-S hemorrhagic shock with 1.2% H₂ gas, H₂3.0%-S hemorrhagic shock with 3.0% H₂ gas

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Tsunehisa, Mimuro Soichiro, Katoh Takasumi, Kurita Tadayoshi, Truong Sang Kien, Kobayashi Kensuke, Makino Hiroshi, Doi Matsuyuki, Nakajima Yoshiki	4. 巻 34
2. 論文標題 1.2% Hydrogen gas inhalation protects the endothelial glycocalyx during hemorrhagic shock: a prospective laboratory study in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 268 ~ 275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02737-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Kensuke, Mimuro Soichiro, Sato Tsunehisa, Kobayashi Atsushi, Kawashima Shingo, Makino Hiroshi, Doi Matsuyuki, Katoh Takasumi, Nakajima Yoshiki	4. 巻 32
2. 論文標題 Dexmedetomidine preserves the endothelial glycocalyx and improves survival in a rat heatstroke model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 880 ~ 885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-018-2568-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima Shingo, Kurita Tadayoshi, Morita Koji, Nakajima Yoshiki	4. 巻 33
2. 論文標題 Effective Dose of Landiolol, an Ultra-Short-Acting β -Blocker, to Decrease Heart Rate During On-Pump, Beating Coronary Artery Bypass Grafting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia	6. 最初と最後の頁 2195 ~ 2200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2019.02.016	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima Shingo, Suzuki Yuji, Sato Tsunehisa, Kikura Mutsuhito, Katoh Takasumi, Sato Shigehito	4. 巻 22
2. 論文標題 Four-Group Classification Based on Fibrinogen Level and Fibrin Polymerization Associated With Postoperative Bleeding in Cardiac Surgery	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis	6. 最初と最後の頁 648 ~ 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1076029615597061	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurita Tadayoshi、Kawashima Shingo、Morita Koji、Nakajima Yoshiki	4. 巻 47
2. 論文標題 Use of a Short-Acting β 1 Blocker During Endotoxemia May Reduce Cerebral Tissue Oxygenation if Hemodynamics are Depressed by a Decrease in Heart Rate	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 SHOCK	6. 最初と最後の頁 765 ~ 771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000000795	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----