

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591829

研究課題名(和文) 虚血に伴う心臓自律神経過剰興奮機序とその心筋傷害に及ぼす影響

研究課題名(英文) Mechanisms of ischemia-induced excessive excitement of cardiac autonomic nerves and the influence of this excitement to myocardial injury

研究代表者

秋山 剛 (AKIYAMA TSUYOSHI)

国立循環器病センター・心臓生理部・室長

研究者番号:70202554

研究成果の概要：

本研究では、心臓マイクロダイアリス法を用い、虚血・再灌流時における交感・副交感神経傷害の発生機序、自律神経傷害の心筋細胞傷害に及ぼす影響、ならびpre-conditioningが自律神経傷害ならびに心筋細胞傷害を軽減するかを検討した。虚血・再灌流時の虚血部心臓交感・副交感神経傷害に関して、心虚血時に虚血部交感神経終末から非開口分泌によりnorepinephrine(NE)が大量に放出されるが、その一部は、心臓内PNMTによりepinephrine(Epi)に変換された。また、心虚血時の虚血部交感・副交感神経終末からのNEおよびACh放出は、神経活動とは関係なく放出されるが、その機序として、虚血時に起こるNa⁺-K⁺ATPaseのブロックが関わっていた。さらに、心虚血時の虚血部交感・副交感神経終末からのNEおよびAChの放出の程度は、虚血の程度に深く関わっていた。虚血・再灌流時の虚血部心筋細胞傷害に関して、心虚血時に虚血部交感神経終末からの非開口分泌によってNEが放出されるが、それを抑制しても、虚血・再灌流時の心筋細胞傷害に影響はなかった。また、迷走神経電気刺激により心虚血・再灌流時の心筋細胞傷害は減弱したが、これは心拍数低下にともなう心筋酸素消費量の低下によるところが大きかった。さらに、虚血前の吸入麻酔薬sevoflurane投与は、心臓に直接作用して虚血・再灌流時の心筋細胞傷害を軽減した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経科学、循環器・高血圧、自律神経、心筋虚血

1. 研究開始当初の背景

心臓の虚血・再灌流による傷害は、心筋細胞のみならず周囲に分布する自律神経すなわ

ち心臓交感・副交感神経にまで及び、こうした自律神経傷害が致命的な不整脈の発生や心不全の増悪因子となり、生命維持にとってきわめて重大な影響を及ぼす。したがって、急性心筋虚血、ならびに心筋梗塞の予後や治療計画を立てる上で、虚血領域の心筋細胞傷害だけでなく、虚血部心臓交感・副交感神経の傷害の程度を知ることが重要となってくる。しかし、従来までは組織化学検査による retrospective な研究のみで、虚血領域からリアル・タイムな情報を得ることはほとんど不可能であった。

2. 研究の目的

本研究では、心臓マイクロダイアリス法を用い、虚血・再灌流時において虚血部の交感・副交感神経の傷害、ならびに心筋細胞傷害をモニターし、交感・副交感神経傷害の発生機序、自律神経傷害の心筋細胞傷害に及ぼす影響、ならび pre-conditioning が自律神経傷害ならびに心筋細胞傷害を軽減するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

虚血・再灌流時の虚血部心臓交感・副交感神経傷害

我々は、これまでに心臓マイクロダイアリス法を用いて、麻酔下ネコあるいはウサギにおいて、心虚血時に虚血部心臓交感・迷走神経終末から NE ならびに ACh の分泌が引き起こされることを報告してきた。虚血部における大量のNE分泌は、神経活動とは関係のない uptake₁ carrier を介した非開口分泌を介して放出され、N-type Ca²⁺ channel inhibitor である ω-conotoxin GVIA では抑制されず、uptake₁ carrier の inhibitor である desipramine によって抑制される。また、虚血部における ACh の分泌も、神経活動とは関係のない分泌機序で、迷走神経切除や ω-conotoxin GVIA では抑制されず、intracellular Ca²⁺ antagonist である TMB-8 によって抑制される。今回、これらの結果に基づいて、虚血・再灌流時の虚血部心臓交感・副交感神経傷害に関して、心臓マイクロダイアリス法を麻酔下ネコまたはウサギに用いて、以下の実験を計画、実行した。

1) 虚血部心筋間質 NE 濃度上昇にともなう epinephrine (Epi) 生成:

NE から Epi を合成する enzyme である phenylethanolamin-N-methyltransferase (PNMT) は、副腎髄質だけでなく心臓にも存在する。心虚血時に虚血部交感神経終末か

らは uptake₁ carrier を介して、大量の NE が非開口分泌にて放出されるが、虚血部に大量に放出される NE が、PNMT によって Epi に変換されるかを検討した。

2) Na⁺-K⁺ ATPase ブロックによる心臓交感・迷走神経終末からの NE・ACh 分泌への関与:

虚血部では ATP が枯渇し、神経終末の Na⁺-K⁺ ATPase がブロックされる。この Na⁺-K⁺ ATPase のブロックは虚血時の心臓交感・迷走神経終末からの ACh・NE 分泌に大きく関与していることが考えられているが、薬理的に ouabain にて Na⁺-K⁺ ATPase だけをブロックした際の、ACh・NE 分泌機序を検討した。

3) 心虚血時における心臓交感・迷走神経終末からの NE・ACh 分泌の心臓局所による違い:

心臓局所の違いで、心虚血時における心臓交感・迷走神経終末からの NE・ACh 分泌の違いがあるかどうかを、左室前壁、左室後壁、右室で検討した。

虚血・再灌流時の虚血部心筋細胞傷害

我々は、心臓マイクロダイアリス法を用いてより高分子の生体内物質をモニターするために、マイクロダイアリスプローブの改良し、麻酔下ウサギにおいて、虚血部における心筋細胞傷害の指標であるミオグロビン放出をモニターする方法を確立したが、今回、麻酔下ウサギに同法を用いて、虚血・再灌流時の心筋細胞傷害に関して、以下の実験を計画、実行した。

1) 虚血部交感神経終末からの NE 放出が心筋細胞傷害に与える影響:

虚血時に虚血部心臓交感神経から非開口分泌によって大量に放出される NE は、不整脈の発生、凝固系の亢進、心筋細胞傷害の助長など、病態に悪影響を及ぼすと考えられてきた。そこで、desipramine の局所投与により、虚血部交感神経からの非開口分泌による NE 放出を抑制したとき、虚血・再灌流時の心筋細胞傷害を軽減するかどうかを検討した。

2) 迷走神経刺激による虚血部心筋細胞傷害軽減:

動物実験において、迷走神経刺激が急性心筋梗塞の予後を改善することが報告されている。今回、麻酔下ウサギにおいて、迷

走神経刺激により、心筋虚血・再灌流によるミオグロビン放出を指標とした虚血・再灌流時の心筋細胞傷害を軽減できるかどうか検討した。

3) 吸入麻酔薬 sevoflurane による虚血部心筋細胞傷害軽減:

短時間虚血と同じように、吸入麻酔薬には虚血に対して preconditioning 効果のあることが報告されているが、今回、麻酔下ウサギにおいて、吸入麻酔薬 sevoflurane により、心筋虚血・再灌流によるミオグロビン放出を指標とした虚血・再灌流時の心筋細胞傷害を軽減できるかどうか検討した。

4. 研究成果

虚血・再灌流時の虚血部心臓交感・副交感神経傷害

1) 虚血部心筋間質 NE 濃度上昇にともなう epinephrine (Epi) 生成:

外因性のNE局所投与により心筋間質Epiは上昇し、PNMT inhibitorによりその上昇は抑制された。また、虚血により虚血部心筋間質Epiは著明に上昇し、PNMT inhibitorによりその上昇は抑制された。uptake₁ carrier 阻害薬である desipramine 投与によってもEpi上昇は抑制され、この抑制の程度はPNMT inhibitorが存在しても同じであった。以上より、心臓内にはPNMTが存在し、虚血時大量に放出されるNEの一部は、PNMTによってEpiに変換されると考えられた。この虚血部におけるEpi濃度の著明な上昇は、β-receptor刺激が亢進され不整脈誘発に結びつくと考えられた。

2) Na⁺-K⁺ ATPase ブロックの心臓交感・迷走神経終末からのNE・ACh分泌への関与:

ouabain局所投与により心筋間質内に大量のNEおよびAChが放出された。ouabainによるNE放出は、開口分泌と非開口分泌の両方の機構で放出され、ACh放出は開口分泌により放出された。虚血時の心臓交感・迷走神経終末からのNEおよびACh放出にATP枯渇によるNa⁺-K⁺ ATPaseのブロックが関与していると考えられた。

3) 心虚血時における心臓交感・迷走神経終末からのNE・ACh分泌の心臓局所による違い:

NEならびにAChの両方の放出に関して、左室前壁と左室後壁では差がなかったが、右

室ではどちらも有意に低かった。一方、ouabain局所投与で誘発したNEならびにAChの放出は、左室前壁、左室後壁、右室で差がなかった。したがって、心虚血時におけるNEならびにAChの放出の心臓局所による違いは、交感・迷走神経分布の違いではなく、虚血の程度の違いによると考えられた。

虚血・再灌流時の虚血部心筋細胞傷害

1) 虚血部交感神経終末からのNE放出が心筋細胞傷害に与える影響:

予想に反して、desipramine局所投与により虚血部交感神経終末からのノルエピネフリンの非開口分泌を抑制しても、心筋虚血・再灌流によるミオグロビン放出を指標とした虚血・再灌流時の心筋細胞傷害は軽減できなかった。今後、desipramineの局所投与ではなく、全身投与によって軽減できるか、またヒスタミンレセプターを介したノルエピネフリンの非開口分泌の抑制により軽減できるかを検討する予定である。

2) 迷走神経刺激による虚血部心筋細胞傷害軽減:

冠動脈閉塞直後から迷走神経刺激をおこなうことにより、心筋虚血・再灌流によるミオグロビン放出を指標とした虚血・再灌流時の心筋細胞傷害を軽減できた。しかし、この軽減作用は、アセチルコリンの心筋細胞に対する直接作用より、心拍数低下による心筋酸素消費減少が主たる要因と考えられた。

3) 吸入麻酔薬 sevoflurane による虚血部心筋細胞傷害軽減:

冠動脈閉塞前に sevoflurane の吸入 (1 MAC for 30 min, twice) により、心筋虚血時および再灌流時のミオグロビン放出を抑制した。また、cyanide の心臓への局所投与によっても、心筋細胞傷害が起きてミオグロビンが放出されるが、sevoflurane の吸入はこの放出も抑制した。sevoflurane の吸入は、直接心筋細胞に働くことによって、心筋虚血・再灌流時の心筋細胞傷害を軽減すると考えられた。

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 7 件)

1. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Shishido T, Yamazaki T, Kamiya A,

- Mizuno M, Sano S, Sugimachi M. In vivo direct monitoring of vagal acetylcholine release to the sinoatrial node. *Auton Neurosci* 148: 44-49, 2009. 査読有り
2. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, Shimizu S, Mizuno M, Li M, Sugimachi M. Vagal stimulation suppresses ischemia-induced myocardial interstitial myoglobin release. *Life Sci* 83: 490-495, 2008. 査読有り
 3. Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, Nosaka S, Mori H. Isoflurane attenuates myoglobin release during ischemic and/or reperfusion periods. *Acta Anaesthesiol Scand* 52: 650-657, 2008. 査読有り
 4. Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, Komaki F, Mori H, Kawada T, Sunagawa K, Sugimachi M. Characterization of ouabain-induced noradrenaline and acetylcholine release from in situ cardiac autonomic nerve endings. *Acta Physiol* 191: 275-284, 2007. 査読有り
 5. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Shishido T, Shimizu S, Mizuno M, Mori H, Sugimachi M. Regional difference in ischaemia-induced myocardial interstitial noradrenaline and acetylcholine releases. *Auton Neurosci*. 137: 44-50, 2007. 査読有り
 6. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Li M, Zheng C, Shishido T, Mori H, Sugimachi M. Angiotensin II attenuates myocardial interstitial acetylcholine release in response to vagal stimulation. *Am J Physiol* 293: H2516-H2522, 2007. 査読有り
 7. Kuroko Y, Yamazaki T, Tokunaga N, Akiyama T, Kitagawa H, Ishino K, Sano S, Mori H Cardiac epinephrine synthesis and ischemia-induced myocardial epinephrine release. *Cardiovasc Res* 74: 438-444, 2007 査読有り

[学会発表] (計 2件)

1. Komaki F, Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T. Remifentanyl preconditioning attenuates myoglobin release evoked by myocardial ischemia and reperfusion. IARS 2008年3月30日 サンフランシスコ
2. Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, Komaki F. Timing and duration of

exposure to sevoflurane effective in protecting cardiac ischemia-reperfusion injury in rabbits. IARS 2008年3月30日 サンフランシスコ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 剛 (AKIYAMA TSUYOSHI)
国立循環器病センター・心臓生理部・室長
研究者番号：70202554

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

北川裕利 (KITAGAWA HIROTOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：50252391