

機関番号：34408
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592382
 研究課題名（和文） 周術期の吸入麻酔薬とアルコールによる心筋保護相乗効果のメカニズムと臨床応用の解明
 研究課題名（英文） The mechanisms of enhanced cardioprotection by combination of volatile anesthetics and moderate alcohol consumption
 研究代表者
 宮前 雅見 (MIYAMAE MASAMI)
 大阪歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：20298821

研究成果の概要（和文）：吸入麻酔薬と慢性軽度～中等度アルコール摂取は虚血心筋に対し相乗保護効果を有する。その細胞内メカニズムを解明すべく、モルモット灌流心を用い実験を行った。5%エタノール慢性摂取とセボフルランの併用により **glycogen synthase kinase 3β** のリン酸化が増強し、再灌流後のミトコンドリア透過性ポアの開放抑制が増強されることが判明した。これは今後の心疾患を有する全身麻酔への応用として期待できると思われる。

研究成果の概要（英文）：Sevoflurane enhances cardiac preconditioning induced by moderate ethanol consumption. This effect is associated with glycogen synthase kinase 3β phosphorylation and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：①アルコール ②一酸化窒素合成酵素 ③心臓 ④虚血 ⑤モルモット
 ⑥セボフルラン

1. 研究開始当初の背景

周術期の広範囲心筋梗塞はその後のポンプ失調を来し致命的合併症となるため、これを如何に防ぐかが急務である。したがってこのような Risk を有する患者には基礎疾患に応じたより安全な全身麻酔、術中術後管理が要求される。近年 isoflurane, sevoflurane, などの揮発性吸入麻酔薬が心筋に対して Ischemic Preconditioning (IPC：長時間虚血前の反復する短時間虚血再灌流が、続発する長時間虚血による心筋梗塞巣を劇的に縮小する現象) 様の虚血心筋保護効果を有することが明らかとなった。

2. 研究の目的

近年の高齢化社会により高血圧、虚血性心疾患、不整脈などの循環器系疾患を有する患者の歯科全身麻酔の機会が急増している。これらの患者は術中、術後に基礎疾患により重篤な状態に陥り死に至ることもある。このような致命的合併症を如何に防ぐかが急務であり、このような患者には基礎疾患に応じたより安全な全身麻酔を行う必要がある。最近、揮発性吸入麻酔薬には IPC 様の虚血心筋保護効果があり、また慢性アルコール摂取による心筋保護効果を増強することが判明した。しかし、その詳しい細胞内シグナル伝達は不明

である。周術期にアルコールを完全に消失させた上で吸入麻酔薬との相乗効果を最大限に発揮できる方法を梗塞縮小効果、細胞内シグナル伝達物質、ミトコンドリア透過性ポアの開閉の観点から解明したい。

3. 研究の方法

1) 虚血再灌流実験

5%アルコールを8週間飲用させた後、虚血再灌流実験を行った。体重約600gのモルモットを用い腹腔内にpentobarbital (60mg/kg)を投与し十分麻酔後、心臓を摘出した。Langendorff灌流装置で定圧灌流を行った。Baselineの血行動態を測定後、30分間虚血120分間の再灌流を行った。左心室圧、左心室拡張終期圧、冠血流量を測定、TTC染色で心筋梗塞サイズを計測した。30分間虚血後120分間再灌流(I/R)を行った群を対照群(CTL)とした。I/R前に5%EtOHを8週間摂取させた群(E)、Sevo(1MAC:2%)を虚血前10分間投与後、10分間washoutした群(S)、EにSと同様のSevoを投与した群(E+S)の4群を作製した。各群で左心室圧(LVDP)、冠灌流量(CF)、梗塞サイズ(IS)を測定し比較検討した。また、再灌流10分後に左室心筋を採取し、Western blot法によりGSK3βのリン酸化を検討した。

2) Western blotによるシグナル伝達物質の発現の検討

Reperfusion injury salvage kinase (RISK) cascadeを構成する酵素であるAkt, GSK-3βの発現をコントロール群、アルコール群、コントロール+アルコール群で検討した。

3) Flow cytometryによるミトコンドリア内膜透過亢進ポア(mPTP)の検討

虚血再灌流実験とは別に、コントロール群、エタノール群より心臓を摘出し、ホモジネート後、心筋細胞ミトコンドリアを採取する。これにCalcein (1 μmol/L)を負荷する。その後、Ca²⁺ (100 μmol/L)を加え、mPTPを開放させることによるfluorescenceの低下を検討する。エタノール群でコントロール群に比べ、低下率が減少する(mPTPの開放抑制)か否かを検討した。

4. 研究成果

I/R後のLVDPはCTLと比較しE, S, E+Sで有意に高かった。ISはCTLと比較しE, Sで有意に小さく、E, Sに比べE+Sでさらに縮小した。CFは各群間で有意な差はなかった。Akt, GSK3βのリン酸化の発現はCTLと比較しE, Sで有意に高く、E, Sに比べE+Sでさらに増強された。単離ミトコンドリアの検討ではE, SでCalcein低下率が減少し、これはE+Sでさらに増強した。5%エタノール慢性摂取とセボ

フルランの併用によりglycogen synthase kinase 3βのリン酸化が増強し、再灌流後のミトコンドリア透過性ポアの開放抑制が増強されることが判明した。

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8件)

(1) INAMURA Y, MIYAMAE M, SUGIOKA S DOMAE N, KOTANI J. Sevoflurane postconditioning prevents activation of caspase 3 and 9 through antiapoptotic signaling after myocardial ischemia-reperfusion. J Anesth 2010 ; 24 : 215-224. 査読有

(2) MIYAMAE M, KANEDA K, DOMAE N, FIGUEREDO VM. Cardioprotection by regular ethanol consumption: Potential mechanisms and clinical application. Curr Drug Abuse Rev 2010 ; 3 : 39-48. 査読有

(3) OKUSA C, MIYAMAE M, SUGIOKA S, KANEDA K, KOTANI J. Activation of extracellular signal-regulated kinase after ischemia-reperfusion is required for cardioprotection of sevoflurane-induced preconditioning. J Osaka Dent Univ 2009 ; 43 : 1-10. 査読有

(4) OKUSA C, MIYAMAE M, SUGIOKA S, KANEDA K, INAMURA Y, ONISHI A, DOMAE N, KOTANI J, FIGUEREDO VM. Acute memory phase of sevoflurane preconditioning is associated with sustained translocation of protein kinase C-α and ε, but not δ, in isolated guinea pig hearts. Eur J Anaesthesiol 2009 ; 26 : 582-588. 査読有

(5) MIYAMAE M, OKUSA C, FIGUEREDO VM. Special Editorial; Memory phase of sevoflurane preconditioning. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins partnerships: Cardiology Month Website Hot Topics, 2009. 査読有

(6) INAMURA Y, MIYAMAE M, SUGIOKA S, KANEDA K, OKUSA C, ONISHI A, DOMAE N, KOTANI J, FIGUEREDO VM. Aprotinin abolishes sevoflurane postconditioning by inhibiting nitric oxide production and phosphorylation of protein kinase C-δ and glycogen synthase kinase 3β. Anesthesiology 2009 ; 111 : 1036-1043. 査読有

(7) KANEDA K, MIYAMAE M, SUGIOKA S, OKUSA C, INAMURA Y, DOMAE N, KOTANI J, FIGUEREDO VM. Sevoflurane enhances ethanol-induced cardiac preconditioning through modulation of protein kinase C, mitochondrial KATP channels, and nitric oxide synthase, in guinea pig hearts. *Anesth Analg* 2008 ; 106 : 9-15. 査読有

(8) MIYAMAE M, SUGIOKA S, FIGUEREDO VM. Additive cardioprotection by ethanol and sevoflurane: are sarcolemmal K_{ATP} channels also involved? (In response). *Anesth Analg* 2008 ; 106 : 1926-1927. 査読有

[学会発表] (計 31 件)

(1) KANEDA K, MIYAMAE M, SUGIOKA S, OKUSA C, INAMURA Y, ONISHI A, SHIOMI M, OKAMURA S, DOMAE N, FIGUEREDO VM, KOTANI J. Cardioprotection by regular ethanol consumption is mediated through the bradykinin B2 receptor through increased nitric oxide production. American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010.11.17, Chicago, USA

(2) OKUSA C, MIYAMAE M, DOMAE N, FIGUEREDO VM, KOTANI J. Combined pharmaceutical cardiac preconditioning with dipyridamole and sevoflurane or a NO donor. American Society of Anesthesiologist Annual Meeting 2010, 2010.10.18, San Diego, USA

(3) ARISHIRO K, MIYAMAE M, MOMOTA Y, OKUSA C, KOTANI J, DOMAE N, FIGUEREDO VM. Remote preconditioning by carotid artery occlusion limits myocardial infarct size: role of MAPK. American Society of Anesthesiologist Annual Meeting 2010, 2010.10.17, San Diego, USA

(4) 百田義弘, 宮前雅見, 有城久美子, 大草知佳, 金田一弘, 堂前尚親, 小谷順一郎. ウサギ in vivo 心筋虚血再灌流モデルを用いたリドカインの薬理的ポストコンディショニング効果. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2010.10.9, 横須賀芸術劇場 (神奈川県)

(5) 大草知佳, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 稲村吉高, 大西杏奈, 塩見真由美, 岡村 静, 堂前尚親, 小谷順一郎. ジピリダモール, セボフルラン, NO 供与薬による心筋プレコンディショニングの比較および相互作用. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2010.10.9, 横須賀芸術劇場 (神奈川県)

(6) 大西杏奈, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 大草知佳, 稲村吉高, 塩見真由美, 岡村 静, 堂前尚親, 小谷順一郎. セボフルランによるエタノールプレコンディショニング増強効果は PI3 kinase-AKT-glycogen synthase kinase 3 β pathway を解する. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2010.10.9, 横須賀芸術劇場 (神奈川県)

(7) 金田一弘, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 大草知佳, 稲村吉高, 大西杏奈, 塩見真由美, 岡村 静, 堂前尚親, 小谷順一郎. 慢性中等度エタノール摂取は nitric oxide 産生を増加させた心筋プレコンディショニング様作用を発現する. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2010.10.9, 横須賀芸術劇場 (神奈川県)

(8) 杉岡伸悟, 宮前雅見, 松田佳子, 讚岐拓郎, 金田一弘, 大草知佳, 稲村吉高, 大西杏奈, 塩見真由美, 岡村 静, 堂前尚親, 小谷順一郎. モルモット口腔内侵害刺激における pERK の発現. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2010.10.8, 横須賀芸術劇場 (神奈川県)

(9) 百田義弘, 松山知弘, 山林一公, 宮前雅見, 岸本直隆, 堂前尚親, 小谷順一郎. マウス一過性脳虚血再灌流モデルを用いた神経細胞死発現時間の検討. 第 38 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2010.10.8, 横須賀芸術劇場 (神奈川県)

(10) 金田一弘, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 大草知佳, 堂前尚親, 小谷順一郎. 慢性中等度エタノール摂取による心筋プレコンディショニング様作用への bradykinin 受容体の関与の検討. 日本麻酔科学会第 57 回学術集, 2010.6.4, 福岡国際会議場 (福岡県)

(11) 大草知佳, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 稲村吉高, 堂前尚親, 小谷順一郎. ジピリダモール, nitric oxide 供与薬による心筋プレコンディショニングの比較および相互作用. 日本麻酔科学会第 57 回学術集, 2010.6.4, 福岡国際会議場 (福岡県)

(12) 大西杏奈, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 堂前尚親, 小谷順一郎. セボフルランは慢性中等度エタノール摂取による心筋プレコンディショニング効果を glycogen synthase kinase 3 β のリン酸化を介して増強する. 日本麻酔科学会第 57 回学術集, 2010.6.4, 福岡国際会議場 (福岡県)

(13) 稲村吉高, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. セボフルランによるポストコンディショニングは虚血再灌流後のAkt, ERKの活性化を介してカスパーゼ 3, 9 を減弱させる. 日本麻酔科学会第 57 回学術集, 2010. 6. 4, 福岡国際会議場 (福岡県)

(14) ONISHI A, MIYAMAE M, SUGIOKA S, DOMAE N, FIGUEREDO VM, KOTANI J. Sevoflurane enhances moderate dose ethanol-induced preconditioning by augmenting phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β in isolated guinea pig hearts. IARS 2010 Annual Meeting, 2010. 3. 20, Honolulu, Hawaii

(15) MIYAMAE M, DOMAE N, FIGUEREDO VM. Protein kinase activation and cardioprotection by regular ethanol consumption and volatile anesthetics. BIT Life Sciences' 3rd Annual Protein and Peptide Conference, 2010. 3. 22, Beijing, China

(16) MIYAMAE M. Signal transduction in cardioprotection by regular ethanol consumption and volatile anesthetics: Potential mechanisms and clinical application. 大阪歯科大学中央歯学研究所講演会, 2009. 12. 10, 大阪歯科大学 (大阪府)

(17) 稲村吉高, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 堂前尚親, 小谷順一郎. セボフルランによるポストコンディショニングは虚血再灌流後の抗アポトーシスシグナル伝達経路を介してカスパーゼ 3, 9 の活性を防げる. 第 521 回大阪歯科大学会例会, 2009. 12. 12, 大阪歯科大学 (大阪府)

(18) 金田一弘, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 大草知佳, 稲村吉高, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. 慢性中等度エタノール摂取による心筋プレコンディショニング様作用には bradykinin 受容体が関与する. 第 37 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2009. 10. 9, 名古屋国際会議場 (愛知県)

(19) 大西杏奈, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 大草知佳, 稲村吉高, 堂前尚親, 小谷順一郎. セボフルランは慢性中等度エタノール摂取による心筋プレコンディショニング効果を glycogen synthase kinase 3 β のリン酸化を介して増強する. 第 37 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2009. 10. 9, 名古屋国際会議場 (愛知県)

(20) 大草知佳, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 稲村吉高, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. ジピリダモール摂取はセボフルランと同程度の心筋プレコンディショニング作用を有する. 第 37 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2009. 10. 9, 名古屋国際会議場 (愛知県)

(21) 稲村吉高, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 大草知佳, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. セボフルランによる心筋ポストコンディショニングは虚血再灌流後の nitric oxide 産生を上昇させる. 第 37 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 2009. 10. 9, 名古屋国際会議場 (愛知県)

(22) 大草知佳, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 小谷順一郎. セボフルランによるプレコンディショニングの心筋保護は、虚血再灌流後の Extracellular signal-regulated kinase の活性化が必要である. 第 516 回大阪歯科学会, 2008. 12. 13, 大阪歯科大学 (大阪府)

(23) KANEDA K, MIYAMAE M, SUGIOKA S, OKUSA C, INAMURA Y, ONISHI A, DOMAE N, FIGUEREDO V. Persistent cardioprotection by regular ethanol consumption after abstention depends on eNOS but not iNOS activity after reperfusion. American Heart Association Scientific Session 2008, 2008. 10. 28, New Orleans, USA

(24) OKUSA C, MIYAMAE M, SUGIOKA S, INAMURA Y, KOTANI J. Acute memory phase of sevoflurane preconditioning and translocation of PKC- α and ϵ , but not δ . 2008 Annual Meeting American Society of Anesthesiologists, 2008. 10. 18, Orland, USA

(25) INAMURA Y, MIYAMAE M, SUGIOKA S, OKUSA C, KOTANI J. Aprotinin abolishes sevoflurane postconditioning by inhibiting phosphorylation of PKC- δ and GSK 3 β . 2008 Annual Meeting American Society of Anesthesiologists, 2008. 10. 18, Orland, USA

(26) 稲村吉高, 宮前雅見, 杉岡伸悟, 金田一弘, 大草知佳, 大西杏奈, 堂前尚親, 小谷順一郎. アプロチニン は虚血再灌流後の PKC δ , GSK3 β のリン酸化を阻害し、セボフルランによる心筋ポストコンディショニングを消失させる. 第 36

回日本歯科麻酔学会総会・学術集会，
2008.10.8，大阪大学（大阪府）

(27) 金田一弘，宮前雅見，杉岡伸悟，
大草知佳，稲村吉高，大西杏奈，堂前尚親，
小谷順一郎．慢性エタノール摂取
による心筋プレコンディショニング効果
は再灌流後のnitric oxide synthase
阻害により消失する．第36回日本歯科
麻酔学会総会・学術集会，2008.10.8，大
阪大学（大阪府）

(28) 大草知佳，宮前雅見，杉岡伸悟，金
田一弘，稲村吉高，大西杏奈，堂前尚親，
小谷順一郎．1MACセボフルランによる
プレコンディショニングのmemoryに
は、PKC α ， ϵ の細胞膜へのtranslocation
を要するが、PKC δ は必要としない．第
36回日本歯科麻酔学会総会・学術集会，
2008.10.8，大阪大学（大阪府）

(29) 稲村吉高，宮前雅見，杉岡伸悟，
金田一弘，大草知佳，堂前尚親，小谷
順一郎．セボフルランによる心筋ポスト
コンディショニング効果はアプロチニン
により消失する．日本麻酔科学会第55
回学術集会，2008.6.12，パシフィコ横
浜（神奈川県）

(30) 大草知佳，宮前雅見，杉岡伸悟，
金田一弘，稲村吉高，堂前尚親，小谷
順一郎．1MACセボフルラン投与後の心筋
細胞内 ϵ PKCの細胞膜へのtranslocation
は30分以上持続し60分以内に停止する．
日本麻酔科学会第55回学術集会，2008.
6.12，パシフィコ横浜（神奈川県）

(31) 金田一弘，宮前雅見，杉岡伸悟，
大草知佳，稲村吉高，堂前尚親，小谷順一
郎．慢性エタノール摂取による心筋プレ
コンディショニング効果は再灌流後の
nitric oxide synthase阻害により消失
する．日本麻酔科学会第55回学術集会，
2008.6.12，パシフィコ横浜（神奈川県）

〔図書〕（計1件）

小谷順一郎，宮前雅見．モルモット摘出心
におけるセボフルランによる心筋プレコン
ディショニングの急性記憶の持続時間とプロ
テインキナーゼC α アイソザイムの細胞内局在
の関係．Anestha 21 Century（株）ソフト
ナイン 2009；11(3-35)：49-57.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮前 雅見 (MIYAMAE MASAMI)
大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20298821

(2) 研究分担者

堂前 尚親 (DOMAE NAOCHIKA)
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：60115889

杉岡 伸悟 (SUGIOKA SHINGO)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：90278573

小谷 順一郎 (KOTANI JUNICHIRO)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40109327

金田 一弘 (KANEDA KAZUHIRO)
大阪歯科大学・歯学部・研究員
研究者番号：90533886

(3) 連携研究者

なし