

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08059

研究課題名(和文)ブタ急性心筋梗塞モデルを用いた再灌流障害抑制の研究

研究課題名(英文)Strategy to reduce reperfusion injury using pocine acute myocardial infarction model

研究代表者

田口 功 (Taguchi, Isao)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：80316570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心不全パンデミックに対する対策は重要課題である。心不全の原因疾患の一位は心筋梗塞であり、その梗塞範囲が予後を左右する。心筋梗塞再灌流療法後に生じる再灌流障害は、梗塞範囲を拡大し、その影響は梗塞範囲の50%に及ぶ。従って、再灌流障害の抑制は心不全増悪を含めた生命予後を著しく改善しうる。

我々は、ブタ心筋梗塞モデルを用いて再灌流障害抑制の実験を行った。ブタ20頭を、5頭ずつ以下の4群にわりつける。1群：再灌流なし、2群：再灌流のみ、3群：post conditioning、4群：緩徐再灌流である。その結果、我々の考案したpost conditioning群で再灌流障害を最も抑制しえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞後心不全の予後は梗塞範囲に規定される。心筋梗塞への再灌流療法により予後は改善されたが再灌流障害による梗塞範囲の拡大は改善すべき問題である。

本研究では、ブタ心筋梗塞モデルを用いてpost conditioningによる再灌流障害抑制の効果を確認できた。Post conditioningの手技は、現行の再灌流療法に簡便な操作を加えるのみで、薬剤も使用しないため、実臨床で実行可能である点も有意義である。本研究により心筋梗塞後心不全患者の予後を改善することが期待される。また、本研究で確立されたブタ心筋梗塞モデルの良好な完遂率、純粋な心筋静脈血の採取方法は、今後の実験に非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：In aging society, the strategy for heart failure pandemic is one of the most important issues. Myocardial infarction is the main cause of heart failure, and infarction area is closely related to the outcomes of heart failure. Reperfusion injury after emergent percutaneous coronary intervention for acute myocardaerial infarction can possibly increase infarction area by 50% at most, therefore, the reduction of reperfusion injury can be useful strategy to improve the outcomes of heart failure patients.

We have conducted the experiment using pocine acute myocardial infarction models that was assigned to 4 groups, including no reperfusion group, reperfusion group, post conditioning group, and staccart reperfusion group. In the results, the reperfuion injury was significantly reduced in the post conditioning group compared to the reperfusion group.

研究分野：冠動脈疾患

キーワード：再灌流障害 急性心筋梗

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞の救命率はカテーテル冠動脈再灌流療法によって改善された。しかし、その結果、わが国の高齢化も加わり心不全パンデミックが懸念されるに至った。急性心筋梗塞の再灌流療法時には、再灌流したにも関わらず再灌流障害により、壊死心筋が再灌流時より、さらに 20-50% 増加してしまうことがある。これを抑制することによる心機能の温存によって、心不全発症が予防され、健康寿命の延伸につながることを期待される。本研究の目的は、ブタ急性心筋梗塞モデルを用いて、再灌流時に乳酸加リンゲルを用いた post conditioning 効果によって再灌流障害が抑制され、その結果、壊死心筋の減少を確認することである。本研究のポイントは、本研究で実施する手技が、即刻、実臨床に導入することが可能であるため、近未来の急性心筋梗塞患者の予後改善への貢献が期待できる点である。

2. 研究の目的

ブタ急性心筋梗塞モデルにおいて、乳酸加リンゲルを用いた post conditioning 効果によって再灌流障害が抑制され、梗塞範囲の縮小を実証すること。

3. 研究の方法

ブタ(40-50kg)に対して冠動脈形成術用システムを用いて急性心筋梗塞を作成する。左冠動脈にガイディングカテーテルを挿入後、冠動脈用ガイドワイヤーを左前下行枝に進め、次に冠動脈用バルーンカテーテル(3.0mm×15mm)を左前下行枝中間部まで進める。バルーンを拡張することにより左前下行枝を90分間閉塞して心筋梗塞モデルを作成する。

ブタ20頭を、5頭ずつ以下の4群にわりつける。(1)再灌流なし群：左前下行枝90分間閉塞直後に再灌流をせず心臓を取り出し、再灌流障害のない梗塞エリアを計測する、(2)再灌流群：左前下行枝90分間閉塞後、バルーンを縮小し再灌流を6時間継続後、再灌流障害による梗塞エリアの拡大を計測する、(3)post conditioning 群：post conditioning 実施グループとして、冠動脈閉塞90分後の初回再灌流時に10秒間のみ血液を再灌流させ、その後、乳酸加リンゲルを冠動脈に急速注入充填後、バルーンを拡張することにより冠血流を遮断して、乳酸加リンゲルを冠動脈内に封入する。1分後、再び血液を再灌流させるが、次回は20秒間の血液再灌流後に乳酸加リンゲルを冠動脈注入し1分間冠血流を遮断する。次の血液再灌流は30秒間、というように、10秒ずつ血液再灌流時間を延長し、60秒間の血液再灌流後の乳酸加リンゲル冠動脈注入後、1分間の冠血流遮断が終了したのち血液還流を継続する。(4)緩徐再灌流群：緩徐再灌流による再灌流障害抑制効果をpost conditioning 効果と比較するため、再灌流は3群と同じ様式で行うが乳酸加リンゲルの冠動脈注入は行わない。

血液採取は毎回、動脈血と心筋静脈血を採取する。採血ポイントは、心筋梗塞作成前、再灌流直前、再灌流直後から1分間隔で6分後まで、以後、再灌流後1~6時間は1時間間隔で、計15ポイント採取し、生化学的項目、血ガス項目等を測定、検討する。

再灌流後 6 時間の血液採取後、脱血にて心臓を停止させる。その後、心筋梗塞作成の際にバルーンを拡張した左前下行枝の部位と同じ部位でバルーンを拡張し、心筋梗塞作成範囲の血流を遮断する。続いて、左右冠動脈内に Evans Blue dye (0.25%) を 240mL および 120mL 注入する。その結果、非虚血領域が Evans Blue dye によって染色される。次に、左心室を短軸方向に 10mm 間隔でスライスする。それらを、1% 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride 液で 20 分間インキュベーションする。それにより梗塞心筋は単黄色、生存心筋は赤色に染色される。全てのスライスをデジタルカメラで撮影し、それぞれの梗塞エリア/虚血エリアをトレースして各面積を測定し、各スライスを積分することによって全体の%AAR (梗塞エリア/虚血エリア×100%) を算出する。

4 . 研究成果

全身麻酔下、人工呼吸器管理により 52 頭のブタ心筋梗塞モデルを作成した。左右大腿動脈、右大腿静脈、右頸静脈に 7Fr シースイントロドゥーサーを挿入し、それぞれから、右冠動脈、左冠動脈、肺動脈、冠静脈洞にカテーテルを挿入した。

右冠動脈への 5FrJR3.5、左肺動脈へのスワンガンツカテーテル、冠静脈洞への 7Fr アンギオバーマンカテーテルは全例挿入可能であったが、左冠動脈は解剖学的な個体差から、JR3.5、IM1.0、AL0.75 から適切なものを選択し、全例挿入可能となった。

本研究では、4 点の成果を得た。(1)実験完遂率の改善、(2)純粋な心筋静脈血採取の確立、(3)再灌流障害抑制の確認、(4)ヘパリン起因性血小板減少症(heparin-induced thrombocytopenia、HIT)の確認、である。

(1)実験完遂率の改善

先行研究を参考に抗不整脈薬、ノルアドレナリンを投与するも、研究当初は、高率に心室細動で死亡し研究を完遂できなかったため、以下の改善を行った。

体温管理：個体によって体温変化は低体温、高体温を含めて多岐に及んだ。体温を 36.5 ~ 38.0 に維持するため、輸液、保温マット、保冷剤等を使用した。

血糖管理：頻度は低いが低血糖を生じる個体があり、50%ブドウ糖液投与により、血糖を 90 ~ 200mg/dL に管理した。

肺動脈圧・動脈圧管理：1号輸液およびノルアドレナリンの持続投与により、肺動脈収縮期圧を 30~40mmHg、動脈収縮期圧を 85~120mmHg に管理した。

抗不整脈薬：バルーンによる冠動脈閉塞直前に、硫酸マグネシウム 20mEq、リドカイン 200 mg を静注し、その後リドカインを 200 mg/hr. で持続静注した。また、心室性期外収縮が出現した際、臨時で硫酸マグネシウム 10mEq、リドカイン 100 mg を追加静注した。

冠動脈閉塞部位の変更：第一対角枝末梢でバルーンを閉塞すると、虚血範囲が広範となり、心室細動・ショックが高率に生じたため、閉塞部位を第二対角枝末梢に変更した。

以上の対応により、実験開始から 28 頭目までの実験完遂率は 50.0%(14/28 頭)であったが、前述

の対応が定着した 29 頭目から 52 頭目では 83.3%(20/24 頭)と著明に改善した。

(2)冠静脈洞への奇静脈の合流と環流異常

冠静脈血採取目的に、7Fr. アンギオバーマンカテを冠静脈洞に挿入するが、その前に、左前下行枝を造影して中心静脈開口部を確認した。多くの個体で奇静脈が冠静脈洞に合流しているため、純粋な心筋静脈血を採取するには、奇静脈の合流部を越えてカテーテルを進める必要があった。また、7.4%(2/27 頭)で、左前下行枝から続く中心静脈が冠静脈洞より上方の右房に直接開口していた。これらに対して以下の対応を行った。

中心静脈に選択的に 7Fr. アンギオバーマンカテを進めるために、0.35Fr. ラジフォーカスワイヤーをカテに挿入し、造影ガイドにカテを進めた。

中心静脈への選択的挿入が困難な場合は、7Fr. アンギオバーマンカテを冠静脈洞に残し、6Fr. ウェッジバーマンカテを奇静脈に挿入し、バルーン拡張により奇静脈の血流を遮断することにより、純粋な中心静脈の血液を採取した(Hirata Method)。

中心静脈が冠静脈洞より上方の右房に直接開口している場合は、5Fr. JR3.5 カテの先端に、20G 針で 6 つの側孔を作成し、0.35Fr. ラジフォーカスワイヤーをカテに挿入し、造影ガイドにカテを挿入した。

(3)再灌流障害抑制の確認

本研究の最重要課題は、% area at risk: %AAR (梗塞エリア/虚血エリア×100%)を縮小させることにより再灌流障害抑制を実証することである。以下に各グループの%AAR を示す。比較統計は、再灌流群をコントロールとして比較した。

再灌流なし群；梗塞エリアの同定不能

再灌流群；84.2±5.2%

post conditioning 群；72.3±8.5%, p=0.0073

緩徐再灌流群；75.9±5.2%, p=0.0984

以上より、post conditioning 群は、再灌流群に比して有意に%AAR が小さく、post conditioning による再灌流障害抑制効果が示された。

その機序を検討するため、冠静脈洞の pH の変化を評価した。通常、虚血領域の pH は低下し再灌流により回復するが、post conditioning 群と再灌流群でその回復時間を比較したところ、それぞれ 362±42 秒、195±33 秒、P<0.05 と再灌流群で優位に短かった。再灌流群では、急激な pH の回復により細胞内 Ca 過負荷が生じ、その結果、過収縮帯壊死が増幅され、再灌流障害進展の一因となったことが示唆された。

(4)ヘパリン起因性血小板減少症 (heparin-induced thrombocytopenia、HIT) の確認

ヘパリン投与後約 1 時間で、急激な肺動脈圧上昇に伴い心停止を起こした症例を 3 頭認めた。これらはすべて HIT 抗体陽性であった。病態としては、HIT による肺血栓塞栓症が疑われた。

総括として、本研究では、post conditioning による再灌流障害抑制の可能性を示せたことに加え、実験完遂率の向上、純粋な心筋静脈血の採取法の確立、HIT の可能性等を確認することができた。これらは、今後のブタ心筋梗塞モデルの実験において、非常に有用な情報となると思われる。

今後、post conditioning による再灌流障害抑制効果、および、ブタ心筋梗塞モデルの実験法、に関して、学会発表、論文作成を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	矢澤 卓也 (Yazawa Takuya) (50251054)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	川合 寛 (Kawai Satoru) (70275733)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	中原 志朗 (Nakahara Shiro) (70383081)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	小林 さゆき (Kobayashi Sayuki) (80226141)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	石川 哲也 (Ishikawa Tetsuya) (80408369)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------