

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08968

研究課題名(和文) 虚血再灌流傷害時の心筋間質サイトカイン濃度上昇に麻酔薬が及ぼす影響

研究課題名(英文) effect of anesthetics on myocardial interstitial cytokine levels induced by ischemia

研究代表者

北川 裕利 (Kitagawa, Hirotohi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50252391

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)：In vivo麻酔下ラットに心臓マイクロダイアリシス法を用いて、冠動脈閉塞解放による心筋虚血再灌流時の透析液中のサイトカイン(IL-6、TNF- α)濃度応答について検証した。従来のマイクロダイアリシス法でのサイトカイン濃度の測定は報告がなく、ファイバーの最適化にてIL-6の濃度を測定することに成功した。その結果、冠動脈閉塞時には心筋間質IL-6濃度は上昇し、解放により低下することが観察された。また、その上昇は吸入麻酔薬を投与することで冠動脈閉塞時と解放時の両者ともにvehicle群に比し抑制された。吸入麻酔薬セボフルランは心筋における虚血再灌流障害に対する免疫応答を修飾することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋の単離乳頭筋張力の発生やin vivo心筋の収縮・拡張性がサイトカインによって低下するとの報告をもとに以下の研究を行った、心臓マイクロダイアリシス法を改良することでin vivo心筋における心筋間質サイトカイン濃度を測定することができるようになり、虚血時のサイトカイン濃度を測定した。その濃度は虚血時に上昇し、吸入麻酔薬投与で抑制された。本結果は手術時の血中サイトカイン濃度の上昇を吸入麻酔薬が抑制し、心筋傷害の抑制や心機能維持に寄与できることを示唆する。今後さらなる検証を行うことで吸入麻酔による全身麻酔時の臓器保護効果として、安全な手術治療に貢献ができると思われる。

研究成果の概要(英文)：Using cardiac microdialysis in in vivo anesthetized rats, we examined the response of cytokines (IL-6, TNF- α) in the dialysate during myocardial ischemia-reperfusion due to coronary artery occlusion and release. There have been no reports on measuring cytokine concentrations using conventional microdialysis methods, so we independently established the optimization of fiber type, length, and perfusion rate, and finally succeeded in measuring dialysate IL-6 concentration. As a result, it was observed that myocardial interstitial IL-6 concentration increased in coronary occlusion, and decreased in release. In addition, the increase was suppressed by administering an inhaled anesthetic both during coronary artery occlusion and release compared to the vehicle group. Inhalation anesthetics have been shown to modify the immune response to ischemia-reperfusion injury in the myocardium.

研究分野：麻酔学

キーワード：心臓マイクロダイアリシス サイトカイン 心筋間質 吸入麻酔薬 セボフルラン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は心臓マイクロダイアリス法をもちいた心筋間質レベルにおける虚血関連タンパクを経時的に測定することで、血中濃度測定法より高感度で心筋障害の変化を検知し、その解析を行ってきた。特に、冠動脈閉塞開放時の心筋ネクロシスのマーカーであるミオグロビンを用いた解析で、虚血プレコンディショニング効果と同様の心筋保護効果が吸入麻酔薬でも生じることを示した。そのメカニズムとしては細胞内シグナリングが主に関連すると報告されてきたが、加えて Ca^{2+} イオン動態に関わる複数のイオンチャンネルにも関与があることを見だし、成果を発表してきた。今回は虚血心筋における各種サイトカインの関与に着目し、in vivo 心筋マイクロダイアリス法でのサイトカイン濃度測定法を確立することを目的とした。特に IL-6 や TNF- 等のサイトカインは心筋細胞に影響を与え、筋張力の低下や心筋細胞ネクロシスを誘導し、左室機能を低下させること、そのサイトカインが吸入麻酔薬により減少するという論文が in vitro 実験において報告されていることを考慮すると、心筋間質レベルでのサイトカイン濃度低下が証明できれば、吸入麻酔薬による心保護効果のメカニズムの要因として新たな治療のターゲットになる。

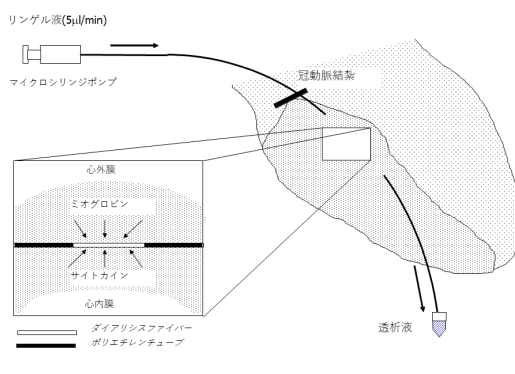
2. 研究の目的

研究代表者らは心筋虚血モデルにおいて、心筋マイクロダイアリス法を用いた虚血逸脱タンパク濃度応答を測定することで、血中濃度上昇を待たずに、より早期に組織における濃度応答が測定できることを証明してきた。今回、本法により心筋虚血時の心筋間質サイトカイン濃度応答を測定できれば、従来の血中濃度に比してより鋭敏な臓器別サイトカイン動態を検知することができるよう基盤を作る。

3. 研究の方法

心臓マイクロダイアリス法を用いて検討した。(下図)

ネブタール麻酔下ラットの左室心筋にマイクロダイアリスファイバーを植え込み、一方よりリング液で灌流し、他方より透析液を回収して各種マーカー濃度を測定し、心筋間質濃度応答の指標とする。



ミオグロビンの測定

モノクローナル抗体による抗原抗体反応(サンドイッチ法)と毛細管現象を利用した免疫クロマトグラフィー法を併用使用したロッシュ社製ミオグロビン測定キット(カルディアックリーダー®、ロッシュ・ダイアグノスティック社製、スイス)にて測定。

IL-6、TNF- の測定

サイトカインに対する捕捉用抗体と、検出用 HRP (horseradish peroxidase) 標識抗体(高感度 HS キットは Biotin 標識抗体)を用いるサンドイッチ ELISA 法を用いて測定。

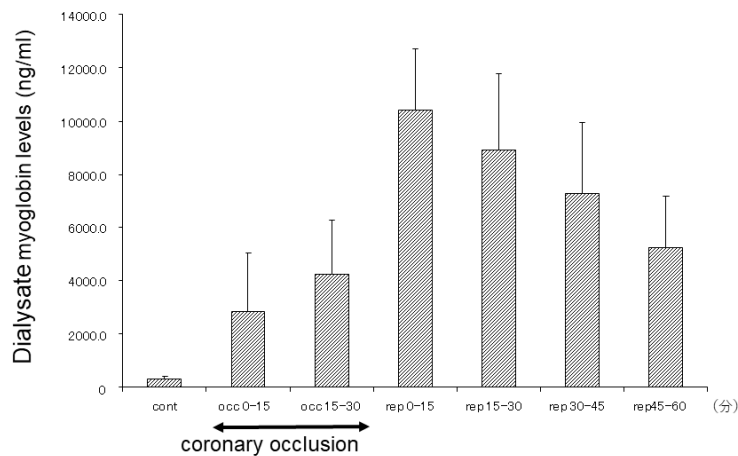
プロトコール

心臓ダイアリシス法により、心筋間質でのサイトカイン（特に IL-6、TNF-a）の測定を可能にすることを目標とし、その経時的な濃度応答についても確認する。さらに、吸入麻酔薬が心筋間質のサイトカイン濃度応答を抑制するかどうかを確認する。

4. 研究成果

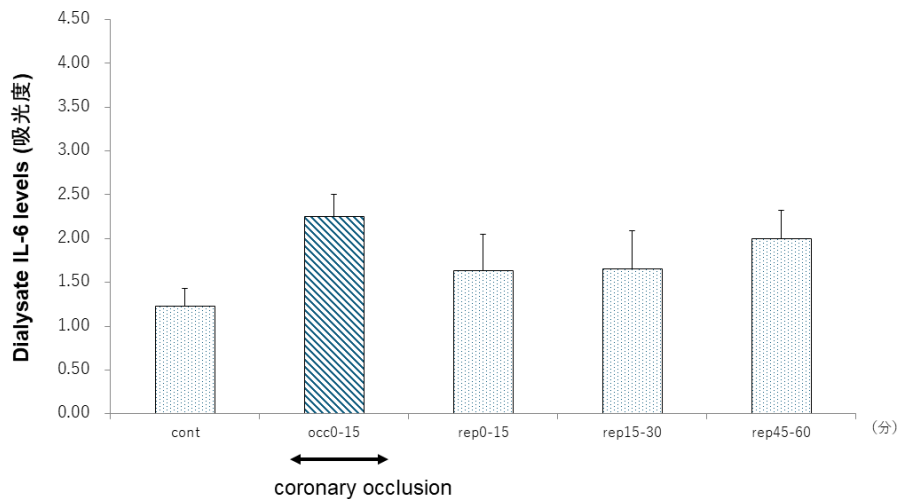
1) 冠動脈閉塞解放時の心筋間質ミオグロビン濃度応答を示す。30 分間虚血により心筋透析液ミオグロビン濃度は上昇した。また、再灌流によりさらに急峻に上昇した後緩徐に低下した。(下図)

冠動脈閉塞解放時の心筋間質ミオグロビン濃度応答



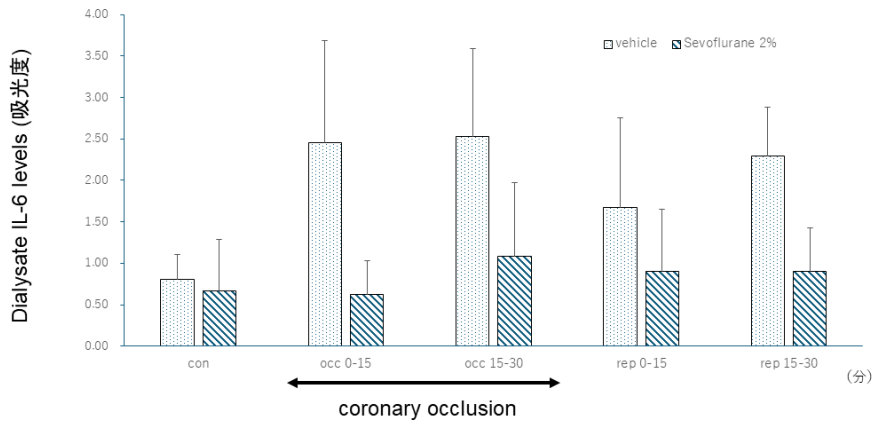
2) 冠動脈閉塞解放時の心筋間質 IL-6 濃度応答を示す。15 分間虚血により心筋透析液 IL-6 濃度は上昇し、再灌流により低下した。(下図)

冠動脈閉塞解放時の心筋間質IL-6濃度応答

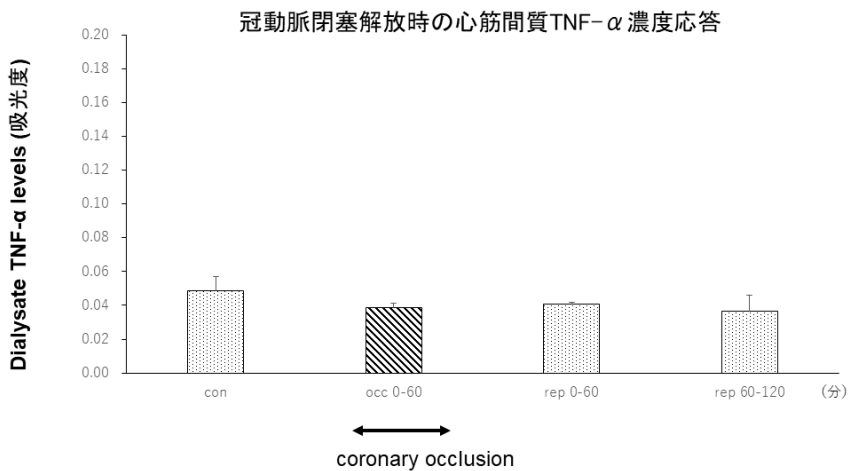


3) 吸入麻酔薬 (sevoflurane) 投与による 60 分間の冠動脈閉塞解放時の透析液 IL-6 濃度応答を示す。虚血 0-15 分において IL-6 は急峻に上昇し、60 分後まで高値を維持した。その後の再灌流により透析液 IL-6 濃度は低下した。また、2%セボフルランを冠動脈閉塞 30 分前より投与することで、vehicle 群に比して、その上昇は虚血・再灌流期ともに抑制された。(下図)

セボフルラン投与による冠動脈閉塞解放時の心筋間質IL-6濃度応答



4) 冠動脈閉塞解放時の心筋間質 TNF- α 濃度応答を示す。TNF- α は 60 分間虚血と再灌流 120 分間において、濃度応答に変化は認められず、測定感度不足と判断した。(下図)



まとめ

心臓マイクロダイアリシス法を用いたミオグロビン、IL-6、TNF- α 濃度の経時的濃度応答データであり、その実験ノウハウは我々の独自に開発したものである。残念ながら TNF- α については十分な検討ができなかったが、本法は in vivo 心筋での心筋間質の IL-6 濃度の測定を可能とし、経時的かつ臓器特異的に免疫応答をモニターできることを示した。その手法を用いることで虚血再灌流時の心筋間質内 IL-6 濃度が上昇すること、その上昇は吸入麻酔薬セボフルラン暴露により抑制されることが示された。それにより心筋内免疫応答を in vivo レベルへと引き上げることで、麻酔薬等の抗サイトカインを持つ薬剤のダイナミックな変化を詳細に検討できる基盤ができたと考える。今後は心筋傷害と免疫応答との相互関連について検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ishihara Mariko, Kojima Akiko, Ding Wei-Guang, Kitagawa Hirotooshi, Matsuura Hiroshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Dexmedetomidine Exerts a Negative Chronotropic Action on Sinoatrial Node Cells Through the Activation of Imidazoline Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 826 ~ 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FJC.0000000000001133	査読の有無 有
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 Yuasa Mayumi, Kojima Akiko, Mi Xinya, Ding Wei-Guang, Omatsu-Kanbe Mariko, Kitagawa Hirotooshi, Matsuura Hiroshi	4. 巻 473
2. 論文標題 Characterization and functional role of rapid- and slow-activating delayed rectifier K+ currents in atrioventricular node cells of guinea pigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1885 ~ 1898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-021-02617-z	査読の有無 有
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 Shimizu Morihiko, Mi Xinya, Toyoda Futoshi, Kojima Akiko, Ding Wei-Guang, Fukushima Yutaka, Omatsu-Kanbe Mariko, Kitagawa Hirotooshi, Matsuura Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Propofol, an Anesthetic Agent, Inhibits HCN Channels through the Allosteric Modulation of the cAMP-Dependent Gating Mechanism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 570 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12040570	査読の有無 有
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
研究分担者	澤田 規 (Sawada Tadashi) (20340515)	宝塚医療大学・保健医療学部・教授 (34536)	

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
---------	---------