

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592012

研究課題名（和文）血管内軽度低体温法による虚血再灌流後の心筋保護効果：ラット孤立心筋モデルでの研究

研究課題名（英文）Cardioprotective effect of intravascular mild hypothermia against ischemia/reperfusion injury in rat isolated heart model

研究代表者

望月 利昭（MOCHIZUKI TOSHIAKI）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40293641

研究成果の概要（和文）：

34℃低体温は虚血中、もしくは再灌流直後に導入しても梗塞範囲を減少させることがわかった。つぎに再灌流時に10分間15 mmHg低灌流を付け加えると、34℃低体温導入しても心筋保護効果を認めなかったが、40 mmHg低灌流では、34℃低体温の心筋保護効果を認めた。機序としてphosphoinositide 3'kinase (PI3K)/nitric oxide (NO)系とextracellular signal-regulated kinase (ERK)系が機序に関与していることもわかった。

研究成果の概要（英文）：

A cardioprotective effect was present when hypothermia at 34°C was induced during ischemia, and this effect still occurred when induction of hypothermia was early after reperfusion. Furthermore, the cardioprotective effect of hypothermia was not observed when 10 min of 15 mmHg low-reperfusion immediately after ischemia was added to reperfusion period, but did occur when 10 min of 40 mmHg low-reperfusion immediately after ischemia was added. The phosphoinositide 3'kinase (PI3K)/nitric oxide (NO) pathway, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway were involved in the mechanism underlying the effect of hypothermia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 救急医学

キーワード：救急蘇生学

1. 研究開始当初の背景

心停止を起こした患者では自己心拍再開後に Post Cardiac Arrest Syndrome (PCAS) と

総称される一連の臓器機能障害が引き起こされる。

この PCAS の構成要素の一つに心機能障害

がある。心臓手術や心臓カテーテルなど、管理された環境であるならば、事前に準備された薬物を虚血前に投与することにより心停止後の自己心拍再開という虚血再灌流障害から心筋を保護することができる(薬理的プレコンディショニング)。しかし、一般的に心停止は病院内、外を問わず、突然起こることが多い。この突然の心停止に対して、事前に準備された薬理的プレコンディショニングによって心筋保護を計ることは、不可能である。その解決策の一つとして以前に申請者らは、自己心拍再開後の心臓に一酸化窒素ドナーを投与することで心機能改善効果が得られることを明らかにした。(Hui et al, J Anesth 2008)

体温を 30°C程度まで下降させる重度の低体温を心停止前に導入すると心筋保護効果がある。(Ning et al, Am J Physiol 2003, Ning et al, Am J Physiol 2007) 一方、心停止中に軽度の低体温法(正常体温から 2.5 °C-3.0°Cの低下)を開始するだけで心筋保護効果があることが Kanemoto らのウサギを用いた研究でわかった。(Kanemoto et al, Ann Thorac Surg 2009) その機序としては心筋微小循環の保持、heat shock protein 72 の関与、アポトーシスの減少、補体活性低下、好中球脱顆粒の減少が推測されている。

しかし、上記のウサギによる研究(Kanemoto et al, Ann Thorac Surg 2009)では、表面冷却法を用いて低体温法を導入しているため、目標体温に達するまでに約 60 分もの時間を要した。このため、低体温法の開始が自己心拍再開後にまで遅延してしまうと心筋保護効果は期待できないという問題点がある。一方、血管内冷却法など、目標体温に到達するまでに短時間で済む方法を用いれば、自己心拍再開後に低体温法を導入せざるを得ない場合でも心筋保護効果が得られるかも知れない。また、ウサギの正常体温は 39°C とヒトに比べて高い。そのため、Kanemoto らの研究結果は直接ヒトに外挿できないという問題点も残ったままであった。

2. 研究の目的

研究代表者らは以前よりラット孤立心筋モデルを用い、様々な状況での心機能評価を行ってきた。(Hui et al, J Anesth 2008, Mochizuki et al, Can J Anesth 2008, Okada et al, Resuscitation 2007) 今回、ラット孤立心筋モデルを用いて、ラットの正常体温(37°C)による全虚血後再灌流を行い、その 10 分後に 34°Cの灌流液による灌流に切り替えることで軽度低体温法(34°C、正常体温より 3°Cの低下)を開始する。(血管内冷却軽度低体温法)血管内冷却法では開始から 5 分程度で目標体温である体温 34°Cに到達できる。この血管内軽度低体温法の効果を、心筋収縮力、酸

素消費量、冠灌流量や心筋梗塞範囲の定量を行い、対照群と比較することにより明らかにする。あわせて、Phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K), nitric oxide (NO) endothelial NO synthase (eNOS), Extracellular signal-regulated kinase (ERK)が血管内軽度低体温法の心筋保護効果に関わっているかどうか明らかにする。

3. 研究の方法

2010~2011 年度

ラット孤立心筋モデルに 37°C30分の全虚血とその後 180分の再灌流を行い、control群、ischemia-hypothermia群(虚血・再灌流時 34°C 低体温)、hypothermia after reperfusion群(再灌流時 34°C 低体温) reperfusion/L-NAME群(再灌流時 34°C 低体温と nitric oxide synthase 阻害薬 L-NAME 負荷)、reperfusion/LY294002 群、reperfusion/wortmannin群(再灌流時 34°C 低体温に PI3K 阻害薬 LY294002 もしくは wortmannin 負荷)に群わけした。灌流終了後左心室梗塞範囲(%LV infarct size)を triphenyltetrazolium chloride 染色で評価した。

2012 年度

前年度までに、研究代表者らは心筋虚血再灌流障害に対し 34°C 低体温療法を 75mmHg の再灌流直後に導入すると心筋保護効果があることを見いだした。しかし、再灌流時に心肺蘇生をシミュレートした 15/40 mmHg 再灌流した場合の低体温に心筋保護効果があるかどうかについては検討されていなかった。

本年度はラット孤立心筋モデルを以下の 6 群に群わけした。すなわち、15 mmHg コントロール群(30分全虚血後 10分間 15 mmHg 再灌流し、その後 90分間灌流圧 75mmHg で再灌流、全期間 37°C)、15 mmHg 低体温群(15 mmHg 再灌流開始直後に 34°C 低体温導入)、40 mmHg コントロール群(全虚血後 10分間 40 mmHg 再灌流、全期間 37°C)、40 mmHg 低体温群(40 mmHg 再灌流開始直後に 34°C 低体温導入)、U0126 群(40 mmHg 再灌流開始直後に 34°C 低体温導入、同時に ERK 阻害薬 U0126 60 μM 投与)、L-NIO 群(40 mmHg 再灌流開始直後に 34°C 低体温導入、全虚血 5 分前より eNOS 阻害薬 L-NIO 2 μM 投与)である。再灌流終了後左心室梗塞範囲(%LV infarct size)を triphenyltetrazolium chloride 染色で評価した。

4. 研究成果

2010~2011 年度

34°C 低体温療法は虚血中、もしくは再灌流直後に導入しても梗塞範囲を減少させることが明確となった。加えて L-NAME、LY294002 および wortmannin を投与すると 34°C 低体温療法の心筋保護作用は消去されることがわかった。

低体温療法は再灌流時に導入しても心筋保護作用があることが孤立心筋モデルという whole organ レベルで判明した。自己心拍再開時まで低体温療法導入が遅延しても、できるだけ早期に低体温療法を行うと心筋保護作用が期待できるだろう。さらに、低体温療法の機序として NO/Akt 系とその上流である PI3K 系が関与していることも示された。(Resuscitation 83:238-242,2012)

2012 年度

15 mmHg 再灌流では、34°C 低体温導入しても心筋保護効果を認めなかったが、40 mmHg 再灌流では、34°C 低体温導入すると心筋保護効果を認めた。さらに、U0126 は 34°C 低体温の心筋保護効果を消去したが、L-NIO の効果は判定保留となった。

心肺蘇生中に冠灌流圧を 40mmHg に保つことができれば、34°C 低体温導入タイミングが心肺蘇生開始時になったとしても心筋保護効果を期待することができる。心肺蘇生中なるべく高く冠灌流圧を保つことができれば、自己心拍再開後に行われる低体温療法の心筋保護効果を最大に発揮させることができるだろう。さらに、34°C 低体温療法の心筋保護効果を示す機序として ERK も関与していることが明確となった。(Shock, in press, 2013 DOI: 10.1097/SHK.0b013e318294e259)

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 2 件)

1. Toshiaki Mochizuki, Qiliang Jiang, Takasumi Katoh, Katsunori Aoki, Shigehito Sato Quality of cardiopulmonary resuscitation affects cardioprotection by induced hypothermia at 34°C against ischemia/reperfusion injury in a rat isolated heart model. Shock, in press, 2013 DOI: 10.1097/SHK.0b013e318294e259 (IF 2.85)

2. Toshiaki Mochizuki, Shuchun Yu, Takasumi Katoh, Katsunori Aoki, Shigehito Sato Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia at 34°C against ischaemia/reperfusion injury mediated by PI3K and nitric oxide in a rat isolated heart model. Resuscitation 83:238-242,2012 (IF 3.60)

〔学会発表〕(計 9 件)

国際学会・学会賞コンペティション

1. Mochizuki T., Yu S., Katoh T., Aoki K., Sato S. Mild hypothermia induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury mediated by nitric oxide in rat isolated heart. Best abstract prize competition 1-5 Euroanaesthesia 2011 (Oral presentation) Amsterdam, the Netherlands, 2011

国際学会一般演題

2. Mochizuki T. Cardioprotection by therapeutic hypothermia to out-of-hospital cardiac arrest patients. 4th World Anesthesia Convention 2013 (Poster presentation) Bangkok, Thailand, 2013

3. Mochizuki T., Jiang Q., Katoh T., Aoki K., Sato S. Quality of cardiopulmonary resuscitation affects extracellular signal-regulated kinase-mediated cardioprotection by therapeutic hypothermia at 34°C during simulated cardiopulmonary resuscitation reperfusion in a rat isolated heart model. AP184 Resuscitation 2012 (Poster presentation) Vienna, Austria, 2012

国内学会シンポジウム

4. 望月利昭 低体温療法における心筋保護：基礎研究から臨床応用へ 日本麻酔科学会第 60 回学術集会 シンポジウム「神経集中治療（低体温療法：心拍再開後を中心に）」札幌市, 2013

5. 望月利昭 脳低温療法と心筋保護 日本蘇生学会第 31 回大会 シンポジウム「脳低温療法とその周辺」大津市, 2012

国内学会・学会賞コンペティション

6. 望月利昭, 余樹春、吉野篤人、青木克憲、佐藤重仁 低体温療法による虚血再灌流障害に対する心筋保護作用と NO/PI3K 系の関与 ラット孤立心筋モデルによる評価 第 26 回日本 Shock 学会総会 (口演) 浜松市, 2011

国内学会一般演題

7. 望月利昭, 高橋善明、齊藤岳児、大場健司、吉野篤人、佐藤重仁、青木克憲 心筋虚血再灌流障害に対する 34°C 低体温導入時期 第 40 回日本救急医学会総会・学術集会 (口演) 京都市, 2012

8. 望月利昭, 川島信吾、成瀬智、吉野篤人、土井松幸、佐藤重仁 Extracellular Signal-regulated kinase は心肺蘇生をシミュレートした虚血再灌流モデルに対する 34°C 低体温療法の心筋保護作用を介する 日本蘇生学会第 31 回大会 (ポスター) 大津市, 2012

9. 望月利昭, 白木克典、鈴木綾乃、吉野篤人、青木克憲 虚血再灌流障害に対する軽度低体温の心筋保護効果は Wortmannin で拮抗される 第 39 回日本救急医学会総会・学術集会 (口演) 東京都, 2011

〔図書〕(計 4 件)

1. 望月利昭 §39. 心肺蘇生と脳保護 麻酔科学レビュー 2013

2. 望月利昭 §39. 心肺蘇生と脳保護 麻酔科学レビュー2012

3. 望月利昭 §39. 心肺蘇生と脳保護 麻酔科学レビュー2011

4. 望月利昭 §40. 心肺蘇生と脳保護 麻酔科学レビュー2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://researchmap.jp/toshiaki_mochizuki/

6. 研究組織

(1)研究代表者

望月 利昭 (MOCHIZUKI TOSHIAKI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40293641

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

余 樹春 (YU SHUCHUN)
浜松医科大学・医学部・R A
研究者番号：00464115

浦岡 雅博 (URAOKA MASAHIRO)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30402332