

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592285

研究課題名(和文) 心筋虚血再灌流時のプログラム細胞死モニタリングと麻酔薬による制御

研究課題名(英文) Can microdialysis monitor myocardial interstitial apoptotic markers evoked by ischemia-reperfusion?

研究代表者

山崎 登自 (YAMAZAKI, TOJI)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20116122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：虚血・再灌流時において細胞死には自然死とよばれるアポトーシスがあるが、in vivoにおける経時的モニタリングの手法は確立されていない。今回は本法によってアポトーシスがモニタリングできるかどうかをマイクロダイアリシス法により採取した心筋透析液中のシトクロムC(アポトーシスマーカー)濃度を測定することで検証した。その結果、冠動脈閉塞中の上昇は認められなかったが、開放時において有意な上昇が認められた。心筋透析液中のシトクロムC濃度応答を追跡することで虚血再灌流時のアポトーシス傷害が推測可能となり、心筋傷害の経時的細胞死モニタリングとして活用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study describes a measurement of the cell necrotic and apoptotic markers found in the myocardial interstitial space using cardiac microdialysis technique. The dialysate myoglobin (cardiac necrosis marker) levels elevated during coronary occlusion and reperfusion, however the dialysate cytochrome C (apoptosis marker) levels elevated during reperfusion. Therefore, cardiac ischemic injury evoked necrosis and reperfusion injury enhances both necrosis and apoptosis. This monitoring system might provide a new possibility for monitoring cardiac necrosis and apoptosis evoked by ischemia-reperfusion.

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：マイクロダイアリシス アポトーシス オンコース 心筋虚血再灌流傷害 シトクロムC ミオグロビン

1. 研究開始当初の背景

心筋虚血・再灌流時の心筋細胞傷害はオンコースとアポトーシスに大別される。前者は傷害した細胞から逸脱した蛋白質を検出することで生化学検査による補助診断に用いられ病態の予後の指針となっている。一方、アポトーシスは剖検所見から虚血・再灌流傷害に関与していることは明らかにされているがどの時点でどの程度生じているのかについてリアルタイムな情報は得られない。我々は心臓マイクロダイアリシス法を用いて血液レベルで検出するよりも早期でかつ鋭敏な虚血関連逸脱蛋白の検出法を編み出し、オンコースのモニタリングとして最適であることを発見し報告した (Kitagawa H, Yamazaki T, et al., Microdialysis separately monitors myocardial interstitial myoglobin during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug;289(2):H924-30.)。一方、虚血心筋傷害のもうひとつの標的であるアポトーシスを *in vivo* で経時的に測定する方法は見当たらない。

2. 研究の目的

本研究では虚血・再灌流によるアポトーシスの生化学マーカーがオンコースと同様にマイクロダイアリシス法により採取した心筋透析液中の濃度応答により検知できるかどうかを検討し、オンコース応答と比較する。さらに吸入麻酔薬などによる薬理学的心筋保護作用がアポトーシスに及ぼす影響について調べることを目的とした。

3. 研究の方法

心臓マイクロダイアリシス法

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シスファイバーを植え込み、一方よりリンゲル液で灌流し、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。

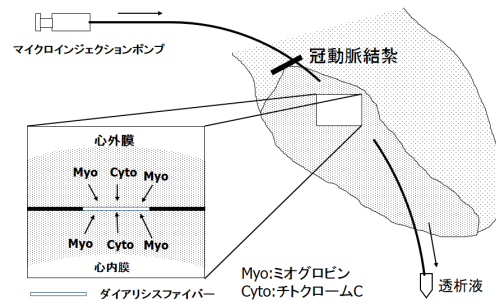


図1. 心臓マイクロダイアリシス法について

オンコースの指標としてミオグロビンを、アポトーシスの指標としてはチトクローム C、ヌクレオソームを選択し、測定した。

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。

ヌクレオソームの測定

定量的サンドイッチ酵素免疫測定法 (ロッシュ社製、Cell Death Detection) にて、血清および心筋透析液ヌクレオソーム濃度応答を測定した。

チトクローム C の測定

ELISA 法 (医学生物学研究所社製チトクローム C ELISA キット) を用い、心筋透析液チトクローム C 濃度応答を測定した。

(1) 冠動脈閉塞・開放による虚血再灌流傷害時の心筋透析液中のアポトーシス関連マーカー (チトクローム C、ヌクレオソーム) を測定し、問題点を探る。

(2) 心臓マイクロダイアリシス法の工夫改良により、心筋透析液中のアポトーシスマーカー (チトクローム C、ヌクレオソーム) の回収率を高め、さらに虚血時間を長くすることで虚血強度を変化させて、その濃度応答を検証する。

(3) 吸入麻酔薬による薬理学的プレコンディショニング・ポストコンディショニング等は虚血再灌流傷害によるアポトーシスにどのように影響するのか、またそのアポトーシスはオンコースとどのような関係にあるかについて検証する。

4. 研究成果

(1) 虚血再灌流時のオンコースス濃度応答 (ミオグロビン濃度応答) について

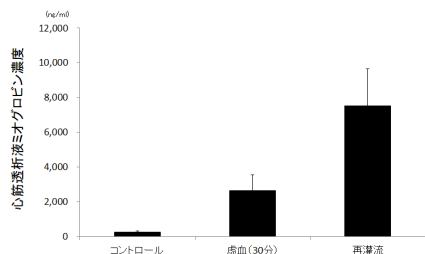


図2. 虚血 (30分)・再灌流時の心筋透析液ミオグロビン濃度応答

虚血 (30分) における心筋透析液中のミオグロビン濃度応答はコントロールに比し、虚血中に上昇し、再灌流ではさらに急峻に上昇した。

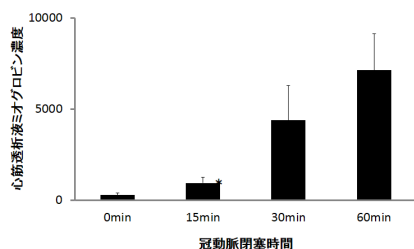


図3. 虚血時間による心筋透析液ミオグロビン濃度応答の変化

冠動脈閉塞 (虚血) 時間を変化させることで、オンコーススの指標であるミオグロビン濃度がどのように影響を受けるかについて調べた。その結果、虚血時間が長くなればなるほど心筋透析液ミオグロビン濃度の上昇が認められ、オンコーススがより進行することが観察された。

(2) 虚血再灌流時のアポトーシスマーカー応答 (チトクロムC) について

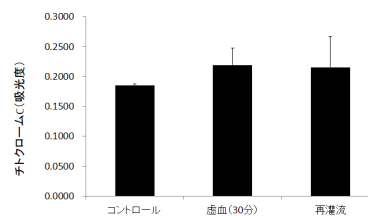


図4. 虚血 (30分)・再灌流時の心筋透析液チトクロムC吸光度の変化

オンコースス同様に30分間の虚血と再灌流時のチトクロムC吸光度応答を測定したが、コントロール、虚血時、再灌流時ともに有意な変化が認められなかった。

上記結果から、30分間虚血では虚血強度が足りないため心筋透析液チトクロムC濃度変化を検出できなかったと考えた。そこで冠動脈閉塞 (虚血) 時間を90分に延長して、その濃度応答が検出できるかどうか確かめた。また、同時に透析液の灌流速度を5分の1に減速し、標的物質の回収率を上昇させて再測定した。

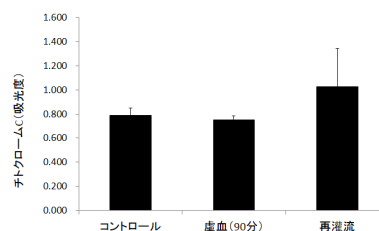


図5. 虚血 (90分) 時の心筋透析液チトクロムC吸光度の変化

心筋透析液チトクロムC吸光度変化は虚血時には認められず、再灌流時に上昇した。このことからアポトーシスは主に再灌流期に生じ、オンコーススとは異なるタイミング (様式) で上昇することが示唆された。

一方、アポトーシスの別指標としてヌクレオソームを測定したが、虚血再灌流時の変化を検知することはできなかった。また、吸入麻酔薬によるチトクロムC吸光度応答に及ぼす影響については明らかにできず、今後の課題とした。

以上の結果より、心臓マイクロダイアリシス法を用いた心筋透析液中のオンコースとアポトーシスマーカーの測定は虚血再灌流時の経時的生体モニタリングとして有用であることがわかった。

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 1 件)

澤田規、北川裕利、野坂修一、プロプラノロールの虚血再灌流時心筋透析液ミオグロビン濃度に及ぼす影響、麻酔、査読有、62巻、2013、1351 1359

〔学会発表〕(計 6 件)

小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一、セボフルランはマウス心室筋細胞における store-operated Ca^{2+} entry に対して抑制作用を持つ、日本麻酔科学会第60回学術集会、2013年、札幌市

小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一、セボフルランは酸化ストレスから心筋細胞を保護する、日本麻酔科学会第60回学術集会、2013年、札幌市

小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一、デスフルランの心臓ペースメーカー細胞に及ぼす影響、日本麻酔科学会第60回学術集会、2013年、札幌市

浅賀智子、澤田規、北川裕利、山崎登自、野坂修一、セボフルランは心筋虚血再灌流傷害を抑制し、バイアビリティを保持する、日本麻酔科学会第59回学術集会、2012年、神戸

小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一、セボフルランによる心房結節に対する陰性変時作用とその背景となるイオンチャネル電流の抑制作用、日本麻酔科学会第59回学術集会、2012年、神戸

小嶋亜希子、北川裕利、野坂修一、セボフルランの心臓ペースメーカー細胞におよぼす影響、日本心臓血管麻酔科学会第17回大会、2012年、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 登自 (YAMAZAKI TOJI)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：20116122

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：