

心筋虚血再灌流障害に対するセボフルランによる抑制効果 —投与方法による比較検討—

高田 一毅 今泉 うの 板倉 紹子
有坂 博史 吉田 和市

神奈川県川崎市立大学大学院麻酔科学講座

要旨

心筋虚血再灌流ウサギモデルにおいて、心筋壊死縮小効果をもたらすセボフルランの投与方法を検討した。ケタミン/ザイラジン (K/X) で麻酔したコントロール群、さらに 1.5% セボフルランを持続投与した群 (K/X+1.5S 群)、2.1% セボフルランの持続投与群 (2.1S 群)、1.5% セボフルランでプレコンディショニングを行った群 (Pre 群)、ポストコンディショニングを行った群 (Post 群) に分類し、虚血再灌流を行った。心筋梗塞域/虚血域のサイズからコントロール群に比べ他の 4 群では虚血再灌流後の心筋壊死縮小効果が有意に大きかった。また Pre 群と Post 群の虚血再灌流後の心筋壊死縮小効果は 2.1S 群に比べて有意に大きかった。プレコンディショニング、ポストコンディショニングは心筋保護効果がほぼ同等の強さであることが示唆された。

キーワード：セボフルラン、心筋保護、虚血再灌流障害

はじめに

心筋虚血再灌流障害とは虚血状態に置かれた心筋組織が急激な再酸素化に伴い、組織障害がさらに促進する現象である。臨床的には心筋梗塞や心停止後に血流が再開された場合などに起こる。その機序としては ATP 代謝の破綻¹⁾、Ca²⁺ の過負荷²⁾、活性酸素などの関与³⁾ が報告されている。心筋虚血再灌流障害に対する心筋保護に関しては、虚血やセボフルランなどの薬剤によるプレコンディショニング⁴⁻⁶⁾ およびポストコンディショニング⁷⁻⁸⁾ が報告されている。また、セボフルランなどの吸入麻酔薬そのものが心筋に保護的に作用することが明らかになっている⁹⁻¹¹⁾。しかしこれらの吸入麻酔薬の投

与方法に関しては研究者によりさまざまである。本研究では *in vivo* ウサギ心筋虚血再灌流モデルを用い、種々の投与方法による心筋保護効果を循環動態、虚血域、心筋梗塞域を指標として詳細に比較検討した。

対象と方法

本研究は神奈川県川崎市立大学動物実験倫理委員会の承認を得た上で動物実験指針に従い以下の手順で行った。

1. 外科処置

ウサギ (New Zealand White, 2.5-3.2Kg, 雄) 35 羽をケタミン (35 mg/kg)、ザイラジン (5 mg/kg) の混合液 (以下 K/X) の筋肉内投与による全身麻酔下において、気管切開し、気管内チューブ (SHERIDAN ID 3.5 mm) を挿入した。

麻酔の維持は K/X の静脈内持続投与 (ケタミン 35 mg/kg/h, ザイラジン 5 mg/kg/h) あるいは 2.1% セボフルランの持続投与にて行った。換気は動物用人工呼吸器 (PRO-45Va, アコマ, 東京) と動物用麻酔器 (ANS-5000A, アコマ, 東京) を用い空気で調節呼吸を行い、必要に応じて純酸素を加えた。換気数は 25 ~ 30 回/分に調節し、呼吸ガスモニター (Capnox, 日本コーリン, 愛知) を用い終末呼気炭酸ガス分圧が 35 ~ 45 mmHg になるように、また動脈血液ガス分析により PaO₂ > 100 mmHg, PaCO₂: 35 ~ 45 mmHg, pH: 7.35 ~ 7.45 になるように換気条件を設定した。体温は加温パッドシステム (T/PUMP TP-401, IMI, 埼玉) を用い直腸温を 37.5 ~ 38.5 °C で維持した。輸液は左頸静脈に留置したポリエチレンカテーテルから生理的食塩液を 15 ml/h で実験終了まで持続投与した。また再灌流時の血栓防止のために 500 unit/h のヘパリンを持続点滴静脈内投与した。

開胸は左第4肋間から行い、心嚢膜を切開し心臓を露出させた。針付絹糸(K-890H, Ethicon, Somerville, NJ)を房室溝と心尖の間線上の左冠状動脈前下行枝(以下LAD)の周りに一周させ、その絹糸の両端を内径2mm、長さ2.5cmのビニールチューブに通して結紮器を作成し、急性心筋梗塞モデルを作成した。虚血は結紮器の糸を牽引し止血鉗子でビニールチューブを固定することにより行い、閉塞は局所のチアノーゼ、および心電図上STの変化を指標として確認した。

2. 実験プロトコール

ウサギ35羽を無作為に5群に分類し、K/Xを用いたコントロール群(n=7)、K/Xに加え虚血5分前から再灌流終了まで1.5%セボフルランを投与した群(K/X+1.5S群:n=7)、2.1%セボフルランを単独で持続投与した群(2.1S群:n=7)、1.5%セボフルランによるプレコンディショニング群(以下Pre群:n=7)、1.5%セボフルランによるポストコンディショニング群(以下Post群:n=7)、とした。すべての実験群で循環動態を安定させるために外科手術後15分間放置し、実験操作に先行し循環動態のコントロール値を測定した。その後、30分の虚血に引き続き180分の再灌流を行った。また、Pre群では虚血前に、Post群では再灌流後にセボフルラン吸入を開始し、呼吸終末濃度が1.5%に達してから5分間曝露させた。Pre群ではセボフルラン中止後、呼吸終末濃度が0%になるまで待って虚血を開始した(図1)。

3. 循環動態の測定

循環動態の測定には生体情報モニター(BP-508, 日本コーリン, 愛知)を使用した。心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧は左頸動脈にポリエチレンカテー

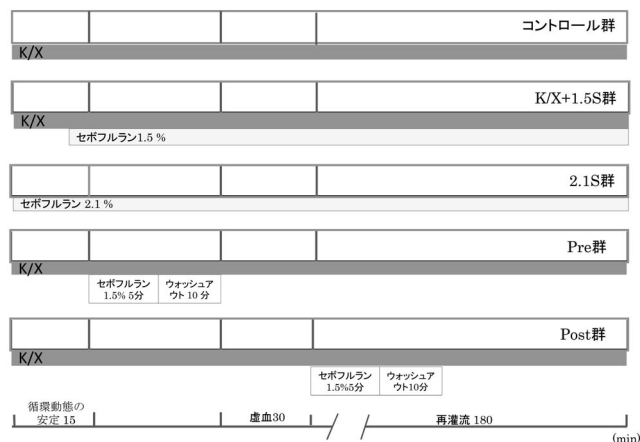


図1 実験のプロトコール
 K/X: ケタミン / ザイラジン
 S: セボフルラン
 Pre群: preconditioning 群
 Post群: postconditioning 群

テルを留置し血圧トランスデューサー(TP-400T, 日本光電, 東京)を介して測定した。心電図は第II誘導で持続的にモニタリングした。

測定ポイントは虚血直前をベースラインとし、虚血30分後、再灌流15分後、30分後とした。

4. 虚血域 / 左心室, 心筋梗塞サイズ / 虚血域の計測

虚血域はLADの結紮により虚血になった範囲である。その虚血域の中で心筋壊死に陥った部分を心筋梗塞域とした。虚血域を同定するために上記測定終了後、LADを再結紮し10%エバンスブルーを頸静脈より投与して虚血域と非虚血域に明らかな境界ができるのを視認し、結紮したまま直ちに心臓を摘出し、凍結させた。凍結した心臓は2mm厚にスライスし、その切片を37°C、pH7.4に調整した1%トリフェニルテトラゾリウムクロライド(以下TTC溶液)に浸漬、染色し、染色されなかった部位を心筋梗塞域と同定した。虚血域、非虚血域、心筋梗塞域の境界をスキャナーで取り込み、コンピューター処理(Adobe Photoshop7.0)により各々の面積の総和を計測し、虚血域が左心室に占める百分率および心筋梗塞サイズの虚血域に占める百分率を算出した。

5. 統計処理

各々の実験結果は平均値±標準誤差で示した。虚血域 / 左心室, 心筋梗塞サイズ / 虚血域の統計処理はKruskal-Wallis検定を用い、 $p < 0.05$ で有意差が認められた場合にはDunn's procedureの多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。心拍数、平均血圧、Rate Pressure Product(RPP)の各測定ポイントにおける群間の比較は一元配置分散分析を用い、 $p < 0.05$ にて有意差が認められた場合には、Fisher's PLSDの多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

結果

循環動態は心拍数、平均血圧、RPPを指標とした。心拍数、平均血圧は一部でコントロール群に対し有意差がみられたが、RPPはすべての群間において有意差はみられなかった(表1)。

虚血域 / 左心室はコントロール群 $46.7 \pm 0.7\%$ と比較して他のすべての群間で有意差はなかった(図2)。心筋梗塞域 / 虚血域はコントロール群 $59.9 \pm 1.9\%$ と比較してK/X+1.5S群 $42.6 \pm 5.4\%$ 、2.1S群 $47.2 \pm 1.0\%$ 、Pre群 $35.6 \pm 1.2\%$ 、Post群 $32.5 \pm 6.0\%$ で、方法を問わずセボフルランを投与した群では有意に減少した。また、2.1S群に比較してPre群、およびPost群では有意な心筋壊死縮小効果が認められた(図3)。

考 察

心筋虚血再灌流後の心筋梗塞サイズは、セボフルランなどの吸入麻酔薬により縮小することが報告されている(9-11)。

また、臨床研究において冠動脈バイパス手術における術後1年の死亡率が全静脈麻酔群と比較して、セボフルラン群で有意に低値を示し、セボフルランによる心筋保護効果が示唆されている(12-13)。

過去の研究でセボフルランの心筋壊死縮小効果が、ATP感受性Kチャンネルの拮抗薬であるグリベンクラミドや5-ハイドロキシ-デカノエート(14-15)によって消失したことから、ATP感受性Kチャンネルの開口が関与している可能性が高い。本研究ではATP感受性Kチャンネルを抑制する(16)ケタミンを基礎麻酔に用いているため、1.5%セボフルランによる心筋保護効果は減弱されている可能性がある。

我々は同様の *in vivo* ウサギ実験系でK/Xを基礎麻

表1 循環動態；*コントロール群に比較して有意差あり(P<0.05), RPPは全群間で有意差はみられなかった(平均値±標準誤差)。

実験群	虚血前	虚血30分後	再灌流15分後	再灌流30分後
HR (beats/min)				
コントロール	173±12	174±10	165±8	167±7
K/X+1.5S	194±11	195±7	187±9	180±11
2.1S	203±8	198±8	199±8*	208±12*
Pre	159±12	165±10	165±9	161±9
Post	208±16	225±11*	181±17	211±14*
MAP (mmHg)				
コントロール	68±4	68±3	68±3	69±3
K/X+1.5S	58±2	56±3	56±3	56±3
2.1S	55±4*	51±3	54±3	54±3
Pre	55±6*	54±5	54±5	54±5
Post	71±3	53±11	49±11*	53±11
RPP (mmHg・min)				
コントロール	13619±1255	13445±908	12906±1038	13248±1006
K/X+1.5S	13569±641	13212±497	12910±581	12299±696
2.1S	14675±837	13248±739	13941±703	14459±1046
Pre	11437±1071	11161±959	11321±931	11075±1054
Post	14412±2527	13534±2553	11975±2632	13524±1902

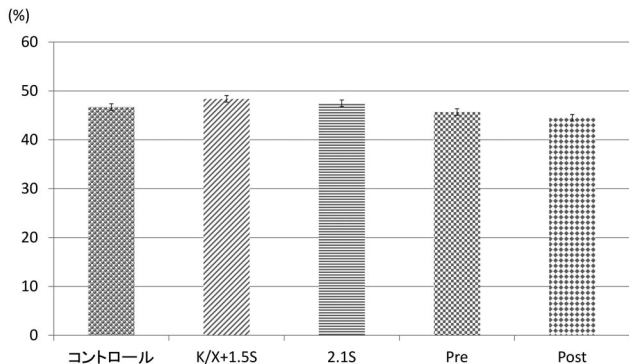


図2 虚血域 / 左心室；全群間で有意差はみられなかった(平均値±標準誤差)。

K/X：ケタミン / ザイラジン
S：セボフルラン
Pre群：preconditioning 群
Post群：postconditioning 群

酔とした場合、1.5%セボフルランが最も心筋保護効果をもたらす可能性が高いことを見出し(データ未発表)、本研究ではセボフルランの濃度を1.5%とした。また、基礎麻酔なしでセボフルランを全身麻酔薬として投与した群では、予備実験(15)により、他の投与方法による循環動態と有意差がない濃度を考慮し2.1%とした。

ウサギのMACは3.70 ± 0.17%で、ヒトのその約2.2倍に相当する(17)。したがって今回投与したセボフルランの濃度はヒトではおよそ0.4MAC (1.5%) および0.6MAC (2.1%) に相当する。

臨床的研究(18)からも1MACのセボフルランでは心臓バイパス手術を受けた患者で心筋保護効果がなかったことが報告されており、これはヒトでも1MAC以下の比較的低濃度のセボフルランでないと心筋保護が得られないことを示唆するものである。また、セボフルランによる心臓手術後にICUで低濃度のセボフルランで鎮静することで再灌流後の障害を軽減させるという試みもすでになされている(19)。Piriouら(20)はウサギの1MACに相当する3.7%のセボフルラン曝露によるプレコンディショニングでは心筋壊死縮小効果が認められないことを報告しており、循環抑制を引き起こす程度の高濃度では心筋壊死縮小効果が得られない可能性を示唆する。

心筋梗塞域を評価するためには側副血行路の存在を正確に検討することが必要である。ウサギにおける側副血行路はほぼゼロでこれはヒトと類似する(21)。すなわち側副血行路による虚血心筋への影響は少ないと考えられる。

本研究では虚血再灌流後の心筋梗塞サイズはTTCの

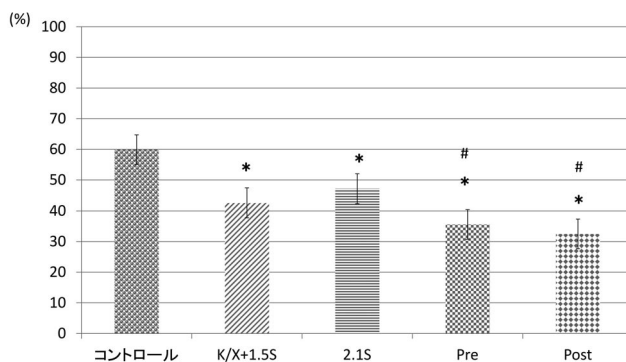


図3 心筋梗塞域 / 虚血域；*コントロール群に比較して有意差あり(P<0.05) #2.1S群に比較して有意差あり(P<0.05), (平均値±標準誤差)。

K/X：ケタミン / ザイラジン
S：セボフルラン
Pre群：preconditioning 群
Post群：postconditioning 群

染色法により計測した。この方法は心筋梗塞サイズを正確に計測する方法として広く用いられており、TTCで染色される部分は心筋内において脱水素酵素の活性が認められる心筋であるが、壊死した心筋細胞では染色されない²²⁾。この方法の妥当性に関しては再灌流2～3時間後にTTC染色法で得られた心筋梗塞サイズを組織学的に測定した結果と差がないことが確認されている²³⁾。以上を考慮して再灌流時間は180分に設定し、その後心筋梗塞サイズを決定した。

各群でRPPの有意な差は認められなかったが、心筋壊死縮小効果はすべてのセボフルラン投与群で認められた。これは心筋保護効果が心筋酸素需要量の低下によるものではないことを示唆するものである。

プレコンディショニングやポストコンディショニングによる心筋保護メカニズムは本研究では検討していないが、文献的にはATP感受性Kチャネルの開口や、mPTP（ミトコンドリア膜透過性遷移孔）の抑制がエンドエフェクターとして有力視されている^{15-21, 24)}。

セボフルランによるプレコンディショニングは心筋梗塞を引き起こす前に操作しなければならず、心筋梗塞が予測できない以上、実際には困難である。しかし、セボフルランによるポストコンディショニング操作は臨床応用が可能である。また、本研究からセボフルランの持続投与の必要性は低いと考えられる。今後、虚血再灌流後の心筋保護の目的でセボフルランを臨床応用するには、心筋梗塞サイズの計測が実際には不可能なので、他の指標をもって検討する必要がある。

結 語

セボフルランによるプレコンディショニング、ポストコンディショニングは心筋保護効果がほぼ同等の強さであることが示唆された。臨床的にはセボフルランによるポストコンディショニング操作は虚血が解除された再灌流時に行うため、有用性は高いと考えられる。

文 献

- 1) Tu L, Pan CS, Wei XH, et al : Astragaloside IV protects heart from ischemia and reperfusion injury via energy regulation mechanism. *Microcirculation* 20(8) : 736-747, 2013
- 2) Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, et al : Sevoflurane protects ventricular myocytes against oxidative stress-induced cellular Ca²⁺ overload and hypercontracture. *Anesthesiology* 119(3) : 606-620, 2013
- 3) Han Y, Zhao H, Tang H, et al : 20-hydroxyeicosatetraenoic Acid mediates isolated heart ischemia/reperfusion injury by increasing NADPH oxidase-derived reactive oxygen species production. *Circ J* 77(7) : 1807-1816, 2013
- 4) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5) : 1124-1136, 1986
- 5) Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, et al : Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes : comparison with cyclosporine A. *Eur J Pharmacol* 675(1-3) : 40-46, 2012
- 6) Yoshida K, Maaieh MM, Shipley JB, et al : Monophosphoryl lipid A induces pharmacologic 'preconditioning' in rabbit hearts without concomitant expression of 70-kDa heat shock protein. *Mol Cell Biochem* 159(1) : 73-80, 1996
- 7) Wagner C, Ebner B, Tillack D, et al : Cardioprotection by ischemic postconditioning is abrogated in hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 61(1) : 35-41, 2013
- 8) Chen D, Cheng B, Zhou HY, et al : The effect of sevoflurane postconditioning on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Mol Biol Rep* 39(5) : 6049-6057, 2012
- 9) Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, et al : Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 86(3) : 699-709, 1997
- 10) Lamberts RR, Onderwater G, Hamdani N, et al : Reactive oxygen species-induced stimulation of 5'AMP-activated protein kinase mediates sevoflurane-induced cardioprotection. *Circulation* 120(11) : S10-15, 2009
- 11) 丸山久雄, 吉田和, 神田元彦, ほか : 揮発性吸入麻酔薬が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響 - *in vivo* ウサギモデルにおける検討 - . *循環制御* 20(3) : 288-293, 1999
- 12) De Hert S, Vlasselaers D, Barbé R, et al : A comparison of volatile and non volatile agents for cardioprotection during on-pump coronary surgery.

- Anaesthesia 64(9) : 953-960, 2009
- 13) De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S : Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 101(1) : 9-20, 2004
 - 14) Kawano T, Oshita S, Takahashi A, et al : Molecular mechanisms underlying ketamine-mediated inhibition of sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology* 102(1) : 93-101, 2005
 - 15) Sawada H, Yoshida K, Kukreja RC : Blockade of ischemic preconditioning by glibenclamide in rabbits anesthetized with sevoflurane. *Bulletin of Kanagawa Dental College* 25(2) : 65-71, 1997
 - 16) Miura T, Imaizumi U, Furuya M, et al : Effects of Ischemic and Sevoflurane-induced Preconditioning on Myocardial Infarction and Arrhythmias in Rabbits *In Vivo*. *J Anesth Clin Res* 4 : 10, 2013
 - 17) Scheller MS, Saidman LJ, Partridge BL : MAC of sevoflurane in humans and the New Zealand white rabbit. *Can J Anaesth* 35(2) : 153-156, 1988
 - 18) Piriou V, Mantz J, Goldfarb G, et al : Sevoflurane preconditioning at 1 MAC only provides limited protection in patients undergoing coronary artery bypass surgery : a randomized bi-centre trial. *Br J Anaesth* 99(5) : 624-631, 2007
 - 19) Orriach JL, Aliaga MR, Ortega MG, et al : Sevoflurane in intraoperative and postoperative cardiac surgery patients. Our experience in intensive care unit with sevoflurane sedation. *Curr Pharm Des* 19(22) : 3996-4002, 2013
 - 20) Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, et al : Pharmacological preconditioning : comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* 89(3) : 486-491, 2002
 - 21) Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM : Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia : a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 21(10) : 737-746, 1987
 - 22) Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W : The mechanism of the Tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchow Arch* 393 : 287-297, 1981
 - 23) Goto M, Miura T, Iliodoromitis EK, O'Leary EL, Ishimoto R, Yellon DM, Iimura O : Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in a collateral deficient species. *Cardiovasc Res* 25(11) : 943-949, 1991
 - 24) Jin C, Wu J, Watanabe M, et al : Mitochondrial K⁺ channels are involved in ischemic postconditioning in rat hearts. *J Physiol Sci* 62(4) : 325-32, 2012

ABSTRACT

Inhibitory effects of sevoflurane on myocardial ischemia/reperfusion injury.

— A comparative study with various sevoflurane administrations —

Kazuki Takada, Uno Imaizumi, Shoko Itakura, Hirofumi Arisaka, Kazu-ichi Yoshida

Department of Anesthesiology, Kanagawa Dental University

82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, Japan

This study was designed to investigate the cardioprotective effects of different ways of sevoflurane administration on myocardial ischemia/reperfusion injury in *in vivo* rabbit hearts. Rabbits underwent regional ischemia by 30 min of the left anterior descending artery (LAD) occlusion followed by 180 min of reperfusion. Control group, Ketamine/Xylazine (K/X)+1.5S group and 2.1% sevoflurane group (2.1S), received K/X anesthesia, continuous 1.5% sevoflurane under K/X, and continuous 2.1% sevoflurane only, respectively. The Pre group animals received sevoflurane (1.5 %) for 5 min prior to ischemia under K/X. Post group animals received sevoflurane (1.5 %) for 5 min after reperfusion under K/X. Infarct size/risk area was 59.9 ± 1.9 % in the Control group ; the size was decreased significantly to 42.6 ± 5.4 % in the K/X+1.5S group, 47.3 ± 1.0 % in the 2.1S group, and 35.6 ± 1.2 % in the Pre group and 32.5 ± 6.1 % in the Post group. Mean infarct size of the risk area was significantly less in the Pre group and the Post group than the 2.1S group. These results suggest that 1.5%sevoflurane preconditioning and postconditioning cause the almost same potent infarct size limiting effect in the myocardium in the rabbits. It was suggested sevoflurane postconditioning may be clinically applicable in situations where the potential for ischemia/reperfusion injury is of concern.

Key words : sevoflurane, cardioprotection, ischemia/reperfusion injury