

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2020年度 博士論文

*in vivo* 心筋虚血ウサギモデルにおいてアトルバスタチンが  
セボフルラン・ポストコンディショニングに及ぼす影響

2021年2月26日

香川 恵太

Keita Kagawa

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

全身管理医歯学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2020年度 博士論文

*in vivo* 心筋虚血ウサギモデルにおいてアトルバスタチンが  
セボフルラン・ポストコンディショニングに及ぼす影響

2021年2月26日

香川 恵太

Keita Kagawa

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

全身管理医歯学講座

讃岐拓郎教授 指導

## 論文内容要旨

心筋虚血再灌流障害とは、虚血された組織に急激に血流が再開(再灌流)することにより、組織障害が促進する現象である。再灌流開始時にセボフルランを投与することで心筋虚血再灌流障害が軽減する作用はセボフルラン・ポストコンディショニングと呼ばれる。また、アトルバスタチン(ATV)等のスタチン系薬剤の前投与も同様に心筋虚血再灌流障害を軽減させるといわれている。しかし、この二つの方法を併用した報告はまだない。我々は *in vivo* ウサギ心筋虚血モデルを用いセボフルラン・ポストコンディショニングと ATV 前投与の併用による心筋保護作用について循環動態、心筋梗塞域を指標に検討した。

ウサギは New Zealand 白色家兎、12 週齢、雄、体重 2.5~3.5kg を用いた。基礎麻酔としてケタミン、キシラジンの混合液(K/X)を使用し、虚血は左冠状動脈前下行枝(LAD)の結紮により行った。ウサギ 21 羽を無作為に以下の 3 群に分け(各  $n=7$ )、30 分間の虚血後に 180 分間の再灌流を行った。K/X 群 (K/X による基礎麻酔のみ)、POST 群(再灌流開始直後に 1.5%セボフルランを 5 分間曝露)、ATV+POST 群 (再灌流開始直後に 1.5%セボフルランを 5 分間曝露に加え ATV を実験開始前 3 日間に 5 mg/kg/日投与)。虚血域は LAD の結紮による虚血範囲、梗塞域は虚血域内で壊死した範囲とした。梗塞域、虚血域、非虚血域の境界をスキャナーに取り込み、コンピューターにより面積の総和を計測し、左心室における虚血域の割合(R/L)と虚血域における梗塞域の割合(I/R)を算出した。

R/L は K/X 群 :  $41.7\pm 6.8\%$ 、POST 群 :  $43.3\pm 4.9\%$ 、ATV+POST 群 :  $45.1\pm 12.7\%$ で 3 群間に有意差は認められなかった。I/R は K/X 群 :  $37.6\pm 2.2\%$ 、POST 群 :  $18.7\pm 5.5\%$ 、ATV+POST 群 :  $11.7\pm 3.5\%$ で、POST 群及び ATV+POST 群は K/X 群と比較して有意に減少した( $P<0.001$ ,  $P<0.001$ )。さらに ATV+POST 群は POST 群と比較して有意に減少していた( $P=0.011$ )。今回の結果より、セボフルラン・ポストコンディショニングと ATV 前投与との併用は梗塞域縮小効果を増強させた。循環動態に関しては、再灌流中の rate pressure product (RPP)が K/X 群と比較して ATV+POST 群で有意に上昇した。RPP は心筋酸素需要量の指標の一つであることから、梗塞域縮小効果と心筋酸素消費量の減少との直接的な関連性は低いことが示唆された。

本研究によりセボフルラン・ポストコンディショニングとアトルバスタチン前投与の併用は、セボフルラン・ポストコンディショニング単独よりも心筋保護作用を増強させ、虚血再灌流障害をさらに軽減させる可能性が示唆された。

## 論文審査要旨

学位論文である「*in vivo* 心筋虚血ウサギモデルにおいてアトルバスタチンがセボフルラン・ポストコンディショニングに及ぼす影響」は、*in vivo* ウサギ心筋虚血モデルを用い、セボフルラン・ポストコンディショニングとアトルバスタチン前投与の併用で心筋保護作用が増強するかを、循環動態及び心筋梗塞域を指標として検討した論文である。

虚血心筋への急激な血流の再開(再灌流)により生じる心筋の組織障害は虚血再灌流障害として知られている。セボフルラン・ポストコンディショニング (POST) とは、再灌流開始時のセボフルラン投与による心筋再灌流障害の軽減を指す。さらに、アトルバスタチン (ATV) 等のスタチン系薬剤の前投与もセボフルラン同様に心筋保護作用を示すことが報告されている。しかし、これら2つの方法を併用した心筋保護効果はいまだ解明されておらず、本論文において実証しようとする研究目的は高く評価できる。臨床において虚血再灌流障害は心臓のみならず他の臓器の移植、心臓や脳等の梗塞に対する手術や薬物療法時などに発生する病態で、虚血の範囲、時間により遠隔の臓器にまで波及し重篤な障害をもたらすことが示唆されている。このことから、心筋のみならず他の臓器組織の虚血と再灌流障害に関する基礎研究が進展することは、今後の歯科臨床に貢献することが明らかであり、意義ある研究目的である。

本研究は、動物実験倫理委員会への申請承認後、申請方法に則り *in vivo* 心筋虚血ウサギモデルを用い、POST と ATV 前投与の併用による心筋保護作用の増強を循環動態及び心筋梗塞域を指標に解析している。虚血は左冠状動脈前下行枝 (LAD) の結紮により行い、全てのウサギに30分間の虚血後に180分間の再灌流を行っている。また、ウサギ21羽を(1)ケタミン、キシラジン混合液の基礎麻酔のみ行ったK/X群、(2)再灌流開始直後に1.5%セボフルランを5分間曝露したPOST群、(3)POSTに加えATVを実験開始前3日間に5mg/kg/日を投与したATV+POST群の3群に分け研究に用いている。さらに梗塞域、虚血域、非虚血域の境界をスキャナーにて取り込みコンピューター処理により面積を計測、左心室における虚血域の割合 (R/L) と虚血域における梗塞域の割合 (I/R) を算出している。これらの方法は過去の文献や確立された既存の方法に基づいており妥当なものである。以上、研究目的に対する研究方法の組み立ては論理的であり、適切な解析手法により実験が行われている。

以上の解析の結果、R/Lは3群間に有意差は認められず、I/RはPOST群、ATV+POST群はK/X群と比較して有意に減少し、さらにATV+POST群はPOST群と比較して有意な減少を示した。これは、POST単独よりATV前投与との併用により梗塞域縮小効果が増強したことを示している。また循環動態で

は、再灌流中の Rate Pressure Product (RPP)が K/X 群と比較して ATV+POST 群で有意に増加した。RPP は心筋酸素需要量の指標の 1 つであることから、梗塞域縮小効果と心筋酸素消費量の減少との直接的な関連性は低いことが示唆される。以上の結果は、適切な方法、統計により導き出された明快な結果であると考えられる。

本研究より、セボフルラン・ポストコンディショニングとアトルバスタチン前投与を併用することで心筋保護作用が増強され、虚血再灌流障害がさらに軽減した可能性が示唆された。虚血と再灌流による組織障害は医科、歯科問わず臨床上しばしば経験しうる病態であり、本研究成果により臨床応用の可能性を新たに見出した点は高く評価できる。

本審査委員会は、全ての教育課程を修了し、論文内容および関連事項に関して、口頭試問を行ったところ十分な回答が得られたことを確認した。さらに本研究結果における新しい知見は、今後の医科歯科医療への貢献が期待できるとの結論に至った。そこで、本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。

2021 年 2 月 26 日

主 査：高橋 俊介

副 査：青木 一孝

副 査：有坂 博史

## 目 次

諸 言	1
実験材料（対象）および方法	3
結 果	7
考 察	8
結 論	12
謝 辞	12
利益相反	13
文 献	14
表および図	
表 1	21
図 1	22
図 2	24
図 3	25
図 4	26
図 5	27
図 6	28

## 1. 緒言

心筋虚血再灌流障害とは、虚血された組織に急激に血流が再開し、再酸素化されることにより、組織障害が促進する現象である。臨床では心筋梗塞や心停止後、血流が再開された場合などに起こる。そのメカニズムとして  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷<sup>1,2)</sup>、活性酸素の産生増加<sup>3)</sup>、ATP 代謝の破綻<sup>4)</sup>、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondria permeability transition pore : mPTP) の開口<sup>5)</sup>などがある。虚血性あるいは麻酔薬によるプレコンディショニング<sup>6,7)</sup>、ポストコンディショニング<sup>8,9)</sup>は心筋虚血再灌流障害に対し、保護的に作用する。

プレコンディショニングとは虚血前に短時間で頻回の虚血、あるいは麻酔薬の投与を行うことで虚血再灌流障害を軽減させる作用であり、それぞれ虚血性プレコンディショニング、麻酔薬プレコンディショニングという。一方、ポストコンディショニングとは再灌流初期に短時間で頻回の虚血、あるいは麻酔薬の投与を行うことで虚血再灌流障害を軽減させる作用である。この作用はそれぞれ虚血性ポストコンディショニング、麻酔薬ポストコンディショニング<sup>9)10)</sup>と呼ばれている。これらのメディエーターとしてプロテインキナーゼ C、ミトコンドリア ATP カリウムチャネル、サバイバルキナーゼ、mPTP<sup>11)</sup>、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase : COX)-2<sup>12)</sup>などがあげられる。さらに虚血前に様々な薬剤を投与する研究もされている<sup>13,14)</sup>。アトルバスタチンの前投与はリン酸

化内皮一酸化窒素合成酵素 ( endothelial nitric oxide synthase : eNOS ), 誘導性一酸化窒素合成酵素 ( inducible nitric oxide synthase : iNOS ), COX-2 の発現を増加させ, 心筋保護作用を強化させる<sup>13,15)</sup>。また, これらの方法を組み合わせた報告もある<sup>16,17)</sup>。Kelle ら<sup>18)</sup>はラット心臓において, 虚血性ポストコンディショニングにロスバスタチンの前投与を併用させることで, 心筋梗塞域がさらに縮小したと報告した。

我々は, セボフルラン・ポストコンディショニングにアトルバスタチンを組み合わせることで心筋保護作用が増強するという仮説を立てた。セボフルランは1990年に発売開始され, 臨床において現在まで広く使用されている吸入麻酔薬であり, アトルバスタチンは脂質異常症の治療や心血管疾患の予防に数多く処方されている。*in vivo* ウサギモデルにおけるセボフルラン・ポストコンディショニングに対するアトルバスタチンの効果はこれまで報告されていない。そこで, 今回我々は *in vivo* ウサギモデルを用い, アトルバスタチン前投与とセボフルラン・ポストコンディショニングの併用が心筋保護作用に与える影響を心筋梗塞域, 循環動態を指標として検討した。



## 2. 実験材料(対象)及び方法

アメリカ国立衛生研究所 「 The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 」 ( NIH Publication No.85-23, revised 1996 ) に準拠した。本研究は神奈川県歯科大学動物実験倫理委員会の承認を受けている ( 2019-004, 2019-016 )。

### 2-1. 外科処置

ウサギ ( New Zealand 白色家兎, 雄, 体重 2.5~3.5 kg, 21 羽 ) にケタミン ( 35 mg/kg ) とキシラジン ( 5 mg/kg ) の混合液 ( ketamine/xylazine : K/X ) を筋肉内注射し, その後実験を通して K/X を静脈内に持続投与 ( ケタミン 35 mg/kg/時, キシラジン 5mg/kg/時 ) した。筋弛緩薬は使用しなかったが, 動物の逃避行動は見られなかった。呼吸管理は気管チューブ ( ID 3.5 コヴィディエン, 東京 ) を挿管後, 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 ) を用いて空気と酸素の混合ガスで調節呼吸を行った。換気回数は 25 ~30 回/分 程度に調節し, 呼吸ガスモニター ( カプノックス, コーリン, 東京 ) を用い終末呼気炭酸ガス分圧が 35 ~ 45 mmHg になるように, 換気条件を設定した。循環動態は頸動脈にポリエチレンカテー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。輸液は頸静脈に留置したポリエチレンカテーテルから生理食

塩液を 0.15 ml/時 で実験終了まで持続投与した。体温は直腸音を加温パッドシステム (T/PUMPTP-401, IMI, 埼玉) にて測定し, 37.5 ~ 38.5 °C となるようにした。開胸は左第 4 肋間から行い, 心臓を露出させた。針付絹糸を房室溝と心尖の中間の左冠状動脈前下行枝 (left anterior descending coronary artery : LAD) の周りを通し, その絹糸の両端を小さなビニールチューブに通して結紮器を作成し, 結紮による急性心筋梗塞モデルを作成した。結紮による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, LAD の閉塞は局所のチアノーゼと心電図上 ST の変化を指標として確認した。

## 2-2. 実験プロトコール

ウサギ 21 羽を無作為に以下の 3 群に分類し (各 n=7), K/X 群 (K/X による基礎麻酔のみ), POST 群 (再灌流開始直後に 1.5% セボフルランを 5 分間曝露), ATV+POST 群 (再灌流開始直後に 1.5% セボフルランを 5 分間曝露に加えアトルバスタチンを実験開始日前 3 日間に 5 mg/kg/日 投与) とした。すべてのウサギに対し LAD の結紮による 30 分間の虚血とその後の 180 分間の再灌流を行った (図 1)。アトルバスタチンは 200 ml の水に混ぜ, 給水瓶を用いて飲ませた。全量摂取は水を全て飲んでいることで確認した。

### 2-3. 虚血域，梗塞域の計測

虚血域は LAD 結紮により虚血された範囲である。虚血域内で壊死した範囲を梗塞域とした。虚血域は LAD を再結紮し，頸静脈より 10 % エバンスブルーを目が青くなるまで注入し，可視化した。虚血域はエバンスブルーで染まらないため，虚血域と非虚血域の間に明確な境界が形成された。5 % セボフルランによる深麻酔下で心臓を摘出し，凍結した。凍結した摘出心臓は 2 mm 厚にスライスした。切り方は心尖部と虚血部位を結んだ線に対し，ほぼ垂直に心尖部から虚血部位までスライスした。その切片を 37 °C，pH 7.4 に調整した 1 % 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (triphenyl tetrazolium chloride : TTC) に 15 分間浸漬し染色した。その後，10 % ホルマリンに 15 分間浸漬した ( 図 2 )。梗塞域は虚血域の範囲内で心筋壊死となり，TTC 溶液で染色されない部分とした。切片の梗塞域，虚血域，非虚血域の境界をスキャナーで取り込み ( 図 3 )，コンピューター処理 ( Adobe Photoshop7.0 ) によりそれぞれの面積の総和を計測し ( 図 4 )，虚血域の左心室に占める百分率 ( area at risk/left ventricle : R/L ) と梗塞域の虚血域に対する百分率 ( infarct size/area at risk : I/R ) を算出した。外科処置と虚血域，梗塞域の測定は同一人物が行った。

#### 2-4. 循環動態の測定

循環動態は収縮期血圧, 拡張期血圧, 平均血圧 (mean blood pressure : MAP) , 心拍数 (heart rate : HR) , 心筋酸素需要量 (rate pressure product : RPP) を指標とし, その記録は血圧トランスデューサー (TP-400T, 日本光電, 東京) , 生体情報モニター (ライフスコープ 11, 日本光電, 東京) を使用した。血圧は虚血前をコントロールとし, 虚血 29 分後, 再灌流 30 分後, 60 分後に記録した。MAP は収縮期血圧と拡張期血圧の差を 3 で割った値と拡張期血圧の和にて求めた。RPP は心拍数と収縮期血圧の積にて求めた。心電図は第II誘導で持続的に観察した。

#### 2-5. 統計解析

R/L および I/R について, Kolmogorov-Smirnov 検定を用いて正規性の検定を行った。正規性が確認できたため, Welch's ANOVA を用いて 3 群間を検定し, 有意差が認められたものに対して Bonferroni 法による多重比較を行った。循環動態は Kolmogorov-Smirnov 検定にて正規性が確認できなかったため, Kruskal-Wallis 検定を用いて 3 群間を検定し, Bonferroni 補正を用いた Mann-Whitney U 検定による多重比較を行った。

有意水準は 5% ( Bonferroni 補正による有意水準調整により 1.6% ) とし

た。なお、統計解析には IBM SPSS Statistics 23.0 ( IBM, Armonk, NY, USA) を使用した。

### 3. 結果

R/L は K/X 群が  $41.7 \pm 6.8\%$ , POST 群が  $43.3 \pm 4.9\%$ , ATV+POST 群が  $45.1 \pm 12.7\%$  で、3 群間に有意差は認められなかった ( $P=0.806$ ) ( 図 5)。I/R は K/X 群が  $37.6 \pm 2.2\%$ , POST 群が  $18.7 \pm 5.5\%$ , ATV+POST 群が  $11.7 \pm 3.5\%$  であり、Welch's ANOVA ( $P<0.001$ ) 後の多重比較の結果、POST 群および ATV+POST 群が K/X 群と比較して有意に減少していた ( $P<0.001$ )。さらに ATV+POST 群が POST 群と比較して有意に減少していた ( $P=0.011$ ) ( 図 6)。

虚血および再灌流中の循環動態を表 1 に示す。心拍数は、虚血 29 分において ATV+POST 群が K/X 群と比較して有意に上昇していた ( $P=0.011$ )。平均血圧は、再灌流 30 分および 60 分において ATV+POST 群が K/X 群と比較して有意に上昇していた ( $P=0.011, P=0.001$ )。また心筋酸素需要量は、虚血前において POST 群と ATV+POST 群が K/X 群と比較して有意に上昇していた ( $P=0.004, P=0.001$ )。再灌流 30 分および 60 分においては ATV+POST 群が K/X 群と比較して有意に上昇していた ( $P=0.007, P=0.004$ )。

#### 4. 考 察

本研究はセボフルラン・ポストコンディショニングとアトルバスタチン前投与の併用がセボフルラン・ポストコンディショニングの梗塞域縮小効果を増強するかを検討した。今回の結果より、セボフルラン・ポストコンディショニング単独よりアトルバスタチン前投与の併用は梗塞域縮小効果が増強した。本研究と我々の先行研究<sup>19)</sup>においてセボフルラン・ポストコンディショニングは、K/X対照群と比較し、心筋梗塞域を縮小させた。セボフルラン・ポストコンディショニングは、COX-2を含む様々なメディエーター<sup>12,20)</sup>が関与している<sup>12,21)</sup>。本研究ではK/X麻酔下での心筋虚血再灌流障害に対するアトルバスタチンの直接的な影響を検討していない。しかし、ケタミン麻酔下でのスタチン系薬剤の前投与の検討で、ウサギやブタにおける心筋梗塞域の縮小が報告されている<sup>22)23)</sup>。スタチン系薬剤の一種であるアトルバスタチンはヒドロキシメチルグルタニル-CoA還元酵素阻害薬であり、血中コレステロール低下作用を有する。さらにスタチン系薬剤による脂質低下療法は原発性および二次性脳卒中、心筋梗塞、脳血管障害のリスクを減少させるといわれている。スタチン系薬剤による治療はNOのバイオアベイラビリティを増加させ、血管内皮機能障害を改善する。さらにスタチン系薬剤は組織因子の発現や血小板による血栓形成を低下させ、線溶系を改善することで血栓形成に重要な役割を果たしている<sup>24)</sup>。その上、スタチ

ン系薬剤は心筋梗塞域縮小作用があるとの報告が多数ある。アトルバスタチンは iNOS や COX-2 を活性化させることで、心筋梗塞域を縮小させ、さらに COX-2 は iNOS の下流に存在するため、その発現には iNOS の活性化が必要であると報告されている<sup>25)</sup>。アトルバスタチンは COX-2 をアップレギュレーションし、血管内皮機能障害を改善することで心筋梗塞域を縮小させると考えられる。その他に冠血流量の増加<sup>26)</sup>や no reflow 現象<sup>27)</sup>の防止などの報告がある。no reflow 現象とは心筋虚血に伴い、微小血管が破壊されることで再灌流を行っても心筋血流が得られない領域が出現することである。

セボフルラン・ポストコンディショニングとアトルバスタチンの心筋保護作用の共通点は COX-2 のアップレギュレーションによって媒介される点である。セボフルラン・ポストコンディショニングは様々なメディエーター<sup>11,12)</sup>が組み合わさって作用するが、COX-2 はこれらのメディエーターの一つである可能性がある。一方、COX-2 はアトルバスタチンによる心筋梗塞域縮小効果において重要な役割を果たしている可能性がある。また、セボフルラン・ポストコンディショニングとアトルバスタチン前投与の併用による心筋保護効果は投与量、投与経路、動物種、側副血行路の違いに依存する<sup>28,29)</sup>。そのため、心筋梗塞域の大きさを評価するには側副血行路を考慮すべきであるが、ラットの側副血行路が 6.1 %<sup>28)29)</sup>であるのに対し、ウサギの側副血行路は 2 % 以下と無視できる程度

であり、ヒトと同様である。本研究におけるアトルバスタチンの投与量と投与期間は過去の報告<sup>30,31,32)</sup>より決定した。シンバスタチンを使用した報告ではラットで 10mg/kg/日<sup>30)</sup>、ウサギで 5mg/kg/日<sup>32)</sup>であった。アトルバスタチンを使用した報告ではラットで 10mg/kg/日<sup>31)</sup>であり、すべて 3 日間投与であった。以上より、動物種を考慮し、アトルバスタチン 5mg/kg/日 を 3 日間投与した。本研究では心筋梗塞域の測定には、心筋梗塞域を正確に測定するために広く用いられている TTC による染色法を用いた。TTC によって染色される部位はデヒドロゲナーゼ酵素の活性が認められている心筋であり、梗塞した心筋は染色されない<sup>33)</sup>。この染色法の有効性は再灌流 2 ～ 3 時間後に TTC 染色で得られる心筋梗塞域が組織学的解析と変わらないことが報告されている<sup>34)</sup>。

循環動態に関して、RPP は再灌流中、ATV+POST 群で K/X 群と比較して有意に上昇した。RPP は心筋酸素需要量の指標の一つである<sup>35,36)</sup>ことから、梗塞域縮小効果は心筋酸素消費量の減少とは直接関係がないことが示唆された。RPP は収縮期血圧と HR によって算出される。本研究では、再灌流中の HR において 3 群間に有意な差はなく、RPP の上昇は収縮期血圧の上昇に起因すると考えられる。MAP は収縮期血圧と拡張期血圧によって算出される。本研究では、再灌流中の MAP において、ATV+POST 群は K/X 群と比較し、有意に上昇していた。RPP の上昇は MAP の上昇によるものと考えられる。高血圧症患者への



スタチンの長期投与は血圧を低下させなかったとの報告があり<sup>37)</sup>、降圧治療を受けている患者はスタチン投与によって血圧が低下しなかったとの報告もある<sup>38)</sup>。通常、セボフルランは用量依存的に血圧を低下させる<sup>39)</sup>。本研究ではアトルバスタチンによる血圧上昇が原因で RPP が上昇した。RPP が上昇している一方、梗塞域が縮小しており、RPP の上昇がなければさらに梗塞域が縮小される可能性がある。アトルバスタチンは心筋酸素需要量を増加させ、心臓に負荷をかける一方で、血管に対し保護的に働くことで梗塞域縮小効果を呈することを示唆しており、冠血流量の増加と no reflow 現象の阻害がそのメカニズムである可能性がある。

本研究にはいくつかの限界が考えられる。第一に COX-2 活性を含めた心筋虚血再灌流障害に対するアトルバスタチンの直接的な影響を検討していないため、アトルバスタチンの心筋虚血再灌流障害に対する直接的な影響とその詳細なメカニズムについてさらなる検討が必要である。第二に、セボフルラン・ポストコンディショニングにおける NO 産生や COX-2 発現について検討していない。セボフルラン・ポストコンディショニングに関与する eNOS のメカニズムについては特異的な eNOS や iNOS の阻害剤を用いたさらなる検討が必要である。第三にセボフルラン・ポストコンディショニングが no reflow 現象に及ぼす影響について検討していない。今後、セボフルランが微小血管に対し、保護的

に作用するか検討する予定である。全身麻酔を行う患者においても、常用薬としてスタチン系薬剤を内服している患者は多い。また、セボフルラン・ポストコンディショニングは虚血が解除された再灌流時に行う方法であり、両者の併用は臨床での有用性も高いと考えられる。

## 5, 結 論

セボフルラン・ポストコンディショニングとアトルバスタチン前投与の併用は、セボフルラン・ポストコンディショニング単独よりも心筋保護作用を増強させ、虚血再灌流障害をさらに軽減させる可能性が示唆された。

## 6, 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導をいただいた神奈川歯科大学大学院歯学研究科全身管理医歯学講座 森本佳成教授、讃岐拓郎教授ならびに今泉の講師に深く感謝申し上げます。また、本論文を作成するにあたり、様々なご助言をいただいた神奈川歯科大学大学院歯学研究科災害医療・社会歯科学講座 澁田慎也講師に深く感謝の意を示します。最後に、本研究をご支援いただいた神奈川歯科大学大学院歯学研究科全身管理医歯学講座教室員各位に心より感謝申し上げます。

## 7, 利益相反

本研究に関連して、開示すべき利益相反はない。

## 文 献

1. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, et al.: Sevoflurane protects ventricular myocytes against oxidative stress-induced cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload and hypercontracture. *Anesthesiology*. 119(3): 606-620, 2013
2. Li Y, Li Q, Zhang O, et al. : miR-202-5p protects rat against myocardial ischemia reperfusion injury by downregulating the expression of Trpv2 to attenuate the  $\text{Ca}^{2+}$  overload in cardiomyocytes. *J Cell Biochem*. 120(8):13680-13693, 2019
3. Braunersreuther V, Jaquet V : Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol*. 13(1): 97-114, 2012
4. Tu L, Pan CS, Wei XH, et al.: Astragal side IV protects heart from ischemia and reperfusion injury via energy regulation mechanism. *Microcirculation*. 20(8): 736-747, 2013
5. Li X, Jia P, Huang Z, et al. : Lycopene protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Drug Des Devel Ther*. 13(11):2331-2342, 2019
6. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 74(5):1124-1136, 1986

7. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, et al. : Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology*. 86(3): 699-709, 1997
8. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. : Postconditioning attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*. 62(1): 74-85, 2004
9. Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, et al . : Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*. 234(10): 1186-1191, 2009
10. Kinoshita M, Tsutsumi YM, Fukuta K, et al. : Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels. *J Med Invest*. 63(1-2): 80-84, 2016
11. Lemoine S, Zhu L, Beauchef G, et al. : Role of 70-kDa ribosomal protein S6 kinase, nitric oxide synthase, glycogen synthase kinase-3 beta, and mitochondrial permeability transition pore in desflurane-induced postconditioning in isolated human right atria. *Anesthesiology*. 112(6):1355-1363, 2010
12. Stumpner J, Tischer-Zeitz T, Frank A, et al. : The role of cyclooxygenase-1 and -2 in sevoflurane-induced postconditioning against myocardial infarction. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 18(3):272-80, 2014

13. Ye Y, Martinez JD, Perez-Polo RJ, et al. : The Role of eNOS, iNOS, and NF- $\kappa$ B in upregulation and activation of cyclooxygenase-2 and infarct size reduction by atorvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(1): H343-351, 2008
14. Xu H, Cheng J, Wang X, et al. : Resveratrol pretreatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting STIM1-mediated intracellular calcium accumulation. *J Physiol Biochem.* 75(4): 607-618, 2019
15. Zuo Y, Wang Y, Hu H, et al. : Atorvastatin protects myocardium against ischemia-reperfusion injury through inhibiting miR-199a-5p. *Cell Physiol Biochem.* 39(3):1021-30, 2016
16. Zhang J, Zhang J, Yu P, et al. : Remote ischaemic preconditioning and sevoflurane postconditioning synergistically protect rats from myocardial injury induced by ischemia and reperfusion partly via inhibition TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Physiol Biochem.* 41(1): 22-32, 2017
17. Pirzeh L, Babapour V, Badalzadeh R, et al. : Pretreatment with vildagliptin boosts ischemic-postconditioning effects on cardioprotection and expression profile of genes regulating autophagy and mitochondrial fission/fusion in diabetic heart with reperfusion injury. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 392(11):1371-1382, 2019

18. Kelle I, Akkoç H, Uyar E. et al.: The combined effect of rosuvastatin and ischemic pre- or post-conditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 19(13): 2468-2476, 2015
19. Itakura S, Imaizumi U, Yui H, et al.: Pre- and Post-conditioning effects of sevoflurane on myocardial ischemia/ reperfusion injury. *J.Jpn.Dent.Soc.Anesthesiol.* 42(2), 196-203, 2014 (in Japanese)
20. Qiao SG, Sun Y, Sun B, et al. : Sevoflurane postconditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by restoring autophagic flux via an NO-dependent mechanism. *Acta Pharmacologica Sinica.* 40(1): 35-45, 2019
21. Tosaka S, Tosaka R, Matsumoto S, et al.: Roles of cyclooxygenase 2 in sevoflurane- and olprinone-induced early phase of preconditioning and postconditioning against myocardial infarction in rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 16(1): 72-78, 2011
22. Lazer HL, Bao Y, Zang Y, et al.: Pretreatment with statins enhances myocardial protection during coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 125(5): 1037-1042, 2003
23. Wang L, Lin R, Guo L, et al.: Rosuvastatin relieves myocardial ischemia/reperfusion by upregulating DPAR- $\gamma$  and UCP2. *Mol Med Rep.* 18(1): 789-798, 2018

24. Castilla Guerra L, del Carmen Fernández Moreno M, López Chozas JM, et al. :  
Statins in stroke prevention: What an internist should know. *Eur J Intern Med.*  
19(1):8-14, 2008
25. Atar S, Ye Y, Lin Y, et al.: Atorvastatin-induced cardioprotection is mediated by  
increasing inducible nitric oxide synthase and consequent S-nitrosylation of  
cyclooxygenase-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(5): H1960-H1968, 2006
26. Lardizabal JA, Deedwania PC : The anti-ischemic and anti-anginal properties of  
statins. *Curr Atheroscler Rep.* 13(1): 43-50, 2011
27. Xhao XJ, Liu XL, He GX, et al.: Effects of single-dose atorvastatin on interleukin-6,  
interferon gamma, and myocardial no-reflow in a rabbit model of acute myocardial  
infarction and reperfusion. *Braz J Med Biol Res.* 47(3): 245-251, 2014
28. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM : Species variation in the coronary collateral  
circulation during regional myocardial ischemia: a critical determinant of the rate of  
evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 21(10): 737-746,  
1987
29. Hearse DJ : Species variation in the coronary collateral circulation during regional  
myocardial ischemia: a critical determinant of the extent of myocardial infarction.  
*Cardiovasc Res.* 45(1): 213-219, 2000



30. Ye Y, Long B, Qian J, et al.: Dipyridamole with low-dose aspirin augments the infarct size-limiting effects of simvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 24(5-6): 391-399, 2010
31. Ding C, Fu XH, He ZS, et al.: Cardioprotective effects of simvastatin on reversing electrical remodeling induced by myocardial ischemia-reperfusion in normocholesterolemic rabbits. *Chin Med J.* 121(6): 551-556, 2008
32. Birnbaum Y, Lin Y, Ye Y, et al.: Aspirin before reperfusion blunts the infarct size limiting effect of atorvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(6): H28891-2897, 2007
33. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, et al.: The mechanism of the Tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchow Arch.* 393(3): 287-297, 1981
34. Goto M, Miura T, Iliodoromitis EK, et al.: Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in a collateral deficient species. *Cardiovasc Res.* 25(11): 943-949, 1991
35. Ansari M, Javadi H, Pourbehi M, et al.: The association of rate pressure product (RPP) and myocardial perfusion imaging (MPI) findings: a preliminary study. *Perfusion.* 27(3), 207-213, 2012

36. Zarger JA, Naqash IA, Gurcoo SA, et al.: Comparative evaluation of the effect of metoprolol and esmolol on rate pressure product and ECG changes during laryngoscopy and endotracheal intubation in controlled hypertensive patients. *Indian J Anaesth.* 46(5): 363-368, 2002
37. Ichihara A, Hayashi M, Koura Y, et al.: Long-term effects of statins on arterial pressure and stiffness of hypertensives. *J Hum Hypertens.* 19(2): 103-109, 2005
38. Mancia G, Parati G, Revera M, et al.: Statins, antihypertensive treatment, and blood pressure control in clinic and over 24 hours: evidence from PHYLLIS randomised double blind trial. *BMJ.* 340: c1197, 2010
39. Ebert TJ : Cardiovascular and autonomic effects of sevoflurane. Cardiovascular and autonomic effects of sevoflurane. *Acta Anaesthesiol Belg.* 47(1): 15-21, 1996

		Pre-ischemia	29 min after ischemia	30 min after reperfusion	60 min after reperfusion
HR (beats/min)	K/X	160 ( 148, 181 )	162 ( 156, 186 )	173 ( 148, 179 )	163 ( 154, 279 )
	POST	202 ( 168, 224 )	227 ( 167, 261 )	224 ( 155, 257 )	160 ( 123, 250 )
	ATV+POST	199 ( 176, 275 )	195 ( 189, 261 )*	187 ( 147, 231 )	184 ( 150, 244 )
MAP (mmHg)	K/X	58 ( 42, 79 )	55 ( 44, 66 )	57 ( 38, 72 )	56 ( 40, 60 )
	POST	73 ( 68, 85 )	65 ( 12, 68 )	51 ( 17, 74 )	51 ( 20, 70 )
	ATV+POST	79 ( 71, 90 )	55 ( 51, 70 )	75 ( 69, 80 )*	72 ( 69, 79 )*
RPP (mmHg/min)	K/X	11584 ( 10354, 13984 )	11956 ( 10416, 12320 )	11396 ( 8662, 14110 )	10920 ( 9177, 12851 )
	POST	18204 ( 14112, 22176 )*	13694 ( 4851, 19068 )	13528 ( 7168, 17174 )	12800 ( 3567, 16800 )
	ATV+POST	19250 ( 17776, 26640 )*	15624 ( 13419, 22968 )	16168 ( 13671, 21021 )*	15910 ( 14100, 19380 )*

表 1：虚血再灌流中の循環動態

データは中央値（第 1 四分位数－第 3 四分位数）で表した。

虚血 29 分後の HR において ATV+POST 群は K/X 群と比較して有

意差あり。虚血前の RPP において ATV+POST 群と POST 群は K/X

群と比較して有意差あり。再灌流中の MAP と RPP において

ATV+POST 群は K/X 群と比較して有意差あり。

\*：K/X 群と比較して有意差あり

## Protocol

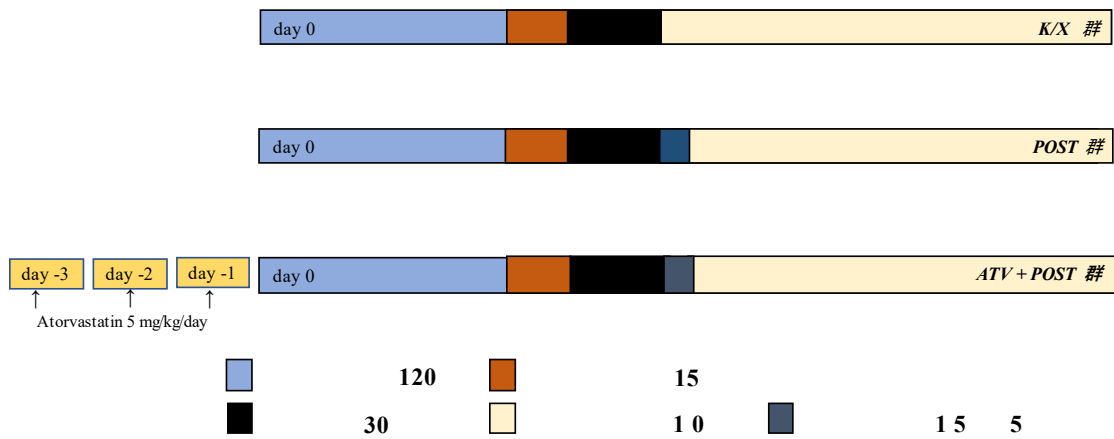


図 1 : 実験プロトコール概略図

K/X 群 : 基礎麻酔のみのコントロール群。外科処置 120 分, 循環動態の安定化 15 分, 虚血 30 分, 再灌流 180 分を行った。

POST 群 : 再灌流開始直後から 5 分間 1.5 %セボフルランを投与する群。外科処置 120 分, 循環動態の安定化 15 分, 虚血 30 分, 再灌流 180 分を行った。再灌流開始直後に 1.5 %セボフルランを 5 分間投与した。

ATV+POST 群 : 再灌流開始直後から 5 分間の 1.5 % セボフルラン投与に加え, アトルバスタチンを実験日の前から 3

日間投与する群。実験 3 日前よりアトルバスタチン  
を毎日 5 mg/kg 投与した。実験当日は、外科処置  
120 分、循環動態の安定化 15 分、虚血 30 分、再  
灌流 180 分を行った。再灌流開始直後に 5 分間  
1.5 % セボフルランを投与した。



図 2 : 実際の切片の例

心尖部と虚血部位を結んだ線に対し、ほぼ垂直にスライスし、右心室、乳頭筋、弁をトリミングした。TTC にて 15 分間浸漬後、10% ホルマリンにて 15 分間浸漬した。非虚血域は青く、虚血域は赤く、梗塞域は白くなっていることがわかる。

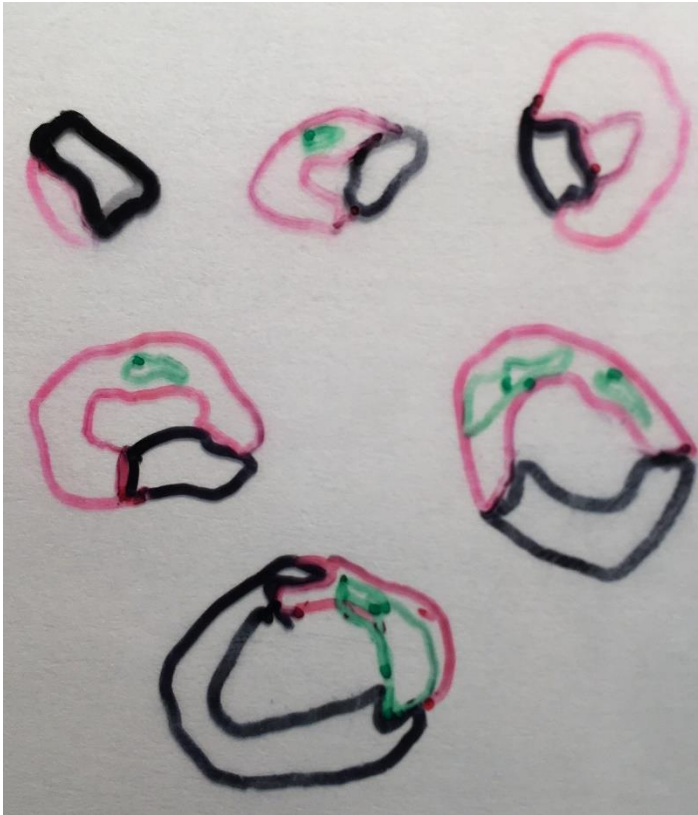


図 3 : 切片の境界線を描画した例

図 1 の切片の境界線を透明なアクリルシート上で描画したもの。非虚血域は黒、虚血域は赤、梗塞域は緑にて境界線をひいた。

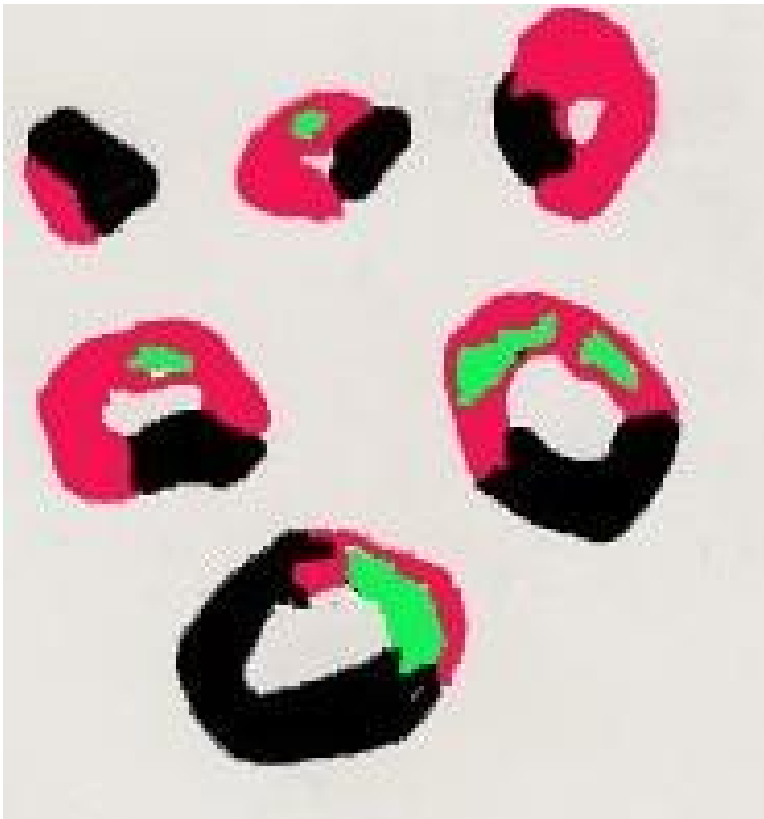


図 4 : 切片をコンピューター処理した例

図 2 をパソコンに取り込み，コンピューター処理した。非虚血域は黒く，虚血域は赤く，梗塞域は緑となっている。これを用いて非虚血域，虚血域，梗塞域の面積を計測した。



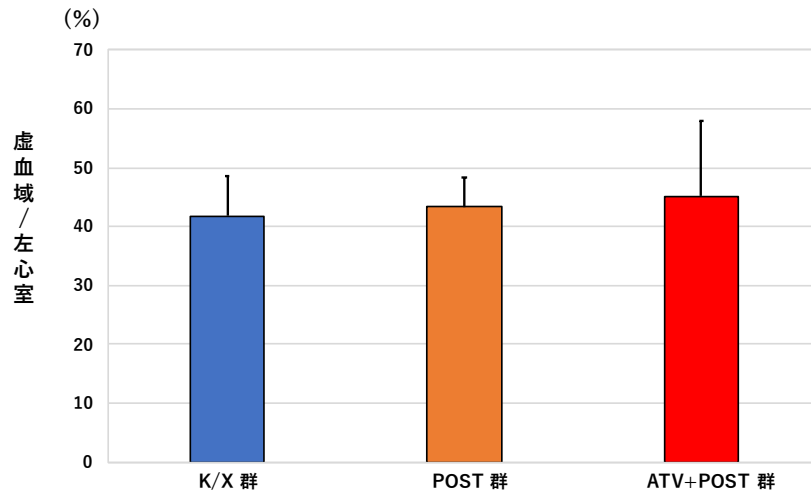


図 5 : 虚血域の左心室に占める百分率 ( area at risk/left ventricle : R/L )

データは平均値±標準偏差で表した。

3 群間に有意差は認められなかった( P=0.806 )。

左心室における虚血された範囲の割合は同様であった。

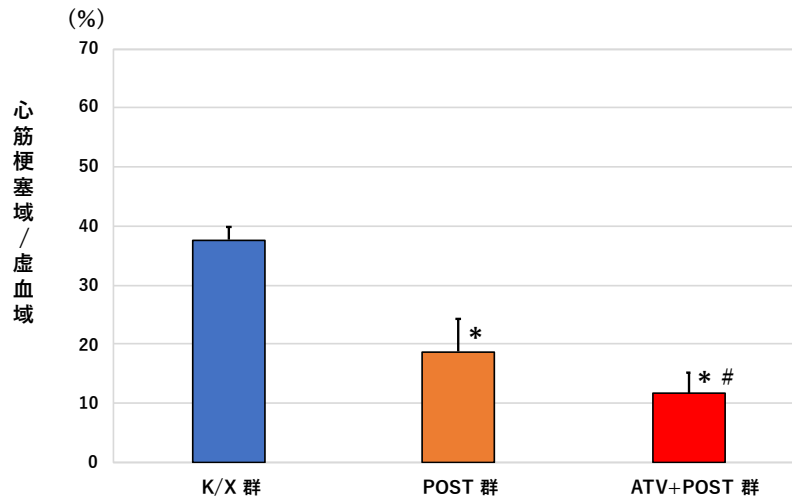


図 6 : 梗塞域の虚血域に対する百分率 ( infarct size/area at risk :I/R )

データは平均値±標準偏差で表した。

ATV+POST 群と POST 群は K/X 群と比較して有意に減少していた。

ATV+POST 群は POST 群と比較して有意に減少していた。

セボフルランを投与された 2 つの群は投与されていない群と比較し、梗

塞域が縮小した。さらにセボフルランが投与された中でも、アトルバスタ

チンが投与された群は、投与されていない群と比較し、梗塞域が縮小した。

\* : K/X 群との間に有意差あり (  $P < 0.001$ , Bonferroni 法による多重比較 )

# : POST 群との間に有意差あり (  $P = 0.011$ , Bonferroni 法による多重比較 )