

ウサギ心筋における isoflurane-induced preconditioning の検討 — Ischemic preconditioning との比較 —

丸山久雄*, 古屋宗孝*, 西田尚史*
大館満*, 岩田修*, 吉田和市*

要 旨

本研究は, in vivo ウサギ心筋虚血再灌流モデルを用い, ischemic preconditioning およびイソフルランによる preconditioning が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響を循環動態, 虚血域 (以下 area at risk) および心筋壊死域 (以下 infarct size) を指標とし検討した。

ウサギ (n=23) をケタミン/ザイラジンによる全身麻酔下に開胸し, 左冠状動脈前下行枝を結紮し30分間の虚血を行った後, 180分間の再灌流を行った。実験中は血圧, 心拍数, 心電図を持続的にモニタリングした。

実験群はコントロール群 (C群: n=8), ischemic preconditioning 群 (IP群: n=8), イソフルランによる preconditioning 群 (I群: n=7) とした。Infarct size は1% 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (以下, TTC 溶液) による染色で評価した。infarct size はC群が $52.2 \pm 1.6\%$ に対し, IP群 $36.3 \pm 2.6\%$, I群 $39.8 \pm 1.9\%$ (mean \pm SEM) であり, IP群とI群において心筋壊死域は有意に減少した。

以上よりウサギ心筋虚血再灌流モデルにおいて心筋虚血前に一時的に投与したイソフルランはischemic preconditioning と同様に心筋に対して保護的に作用し, そのメモリー現象は少なくとも30分は持続する可能性が示唆された。

緒 言

近年, 虚血性心疾患を有する全身麻酔症例の増加に伴い, 麻酔領域においても心筋虚血再灌流障害が注目されている。

1986年にMurryら¹⁾はイヌモデルにおいて長時間の心筋虚血前に頻回の短時間虚血再灌流操作を加えると, その後に起こる虚血再灌流後の infarct size が減少することを報告し, これを ischemic preconditioning と名付けた。その後, 多くの研究がなされウサギ^{2,3)}, ラット⁴⁾ヒト⁵⁾などに ischemic preconditioning が認められることが明らかにされた。

一方, イソフルランが preconditioning 作用を有し, 心筋に保護的に作用することが報告されている^{6~8)}。しかしこれらの研究はペントバルビタールやプロポフォル麻酔下でのものであり, ケタミン/ザイラジン麻酔下での報告はない。

そこで本研究ではケタミン/ザイラジンをベースに用いた in vivo ウサギ心筋虚血再灌流モデルにおいて, ischemic preconditioning およびイソフルランによる preconditioning が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響を循環動態, area at risk および infarct size を指標とし検討した。

対象と方法

外科処置

ウサギ (New Zealand White, 2.5-3.2 kg, 雄) 23羽を対象とし, 無作為にコントロール群 (C群: n=8), ischemic preconditioning 群 (IP群: n=8),

*神奈川歯科大学麻酔学教室

イソフルランによる preconditioning 群 (I 群 : n=7) の 3 群に分類した。

麻酔導入はケタミン (35 mg/kg) / ギライジン (5 mg/kg) 混合液の筋肉内投与にて行い、全身麻酔下に気管切開をし、気管内チューブを挿入した。

麻酔の維持は3群ともにケタミン (35 mg/kg/hr) / ギライジン (5 mg/kg/hr) 混合液の静脈内持続投与で行った。

換気は動物用人工呼吸器と動物用麻酔器を用いルームエアーで調節呼吸を行い、必要に応じて純酸素を加えた。換気数は25~30回/minに調節し、呼吸ガスモニタを用い、連続的に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。さらに動脈血液ガス分析により PaO₂ > 100 mmHg, PaCO₂ : 35 mmHg~45 mmHg, pH : 7.35~7.45, Base Excess : -3 ~ +3 であることを確認した。体温は加温パッドシステムを用い直腸温を 37.5~38.5℃に維持した。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。針付絹糸を房室溝と心尖の中

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 2 mm, 長さ 2.5 cm の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。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、心電図上 ST の変化を指標として確認した。

実験プロトコール

Fig.1 に示すように全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分間の虚血に引き続き180分間の再灌流 (以下、虚血再灌流) を行った。IP 群についてはコントロール値の測定後5分間の虚血と10分間の再灌流を行った後、虚血再灌流を行った。I 群についてはコントロール値の測定後、イソフルラン吸入を開始し終末呼気濃度が1.5%に達してから15分間維持し、その後イソフルランが0%になるまで洗浄した後、虚血再灌流を行った。

虚血域を同定するために LAD を再結紮し 10% Evans blue を頸静脈より投与して虚血部位と非虚血部位に明らかな境界ができるのを視認し、再結紮したまま、直ちに心臓を摘出し、凍結させた。

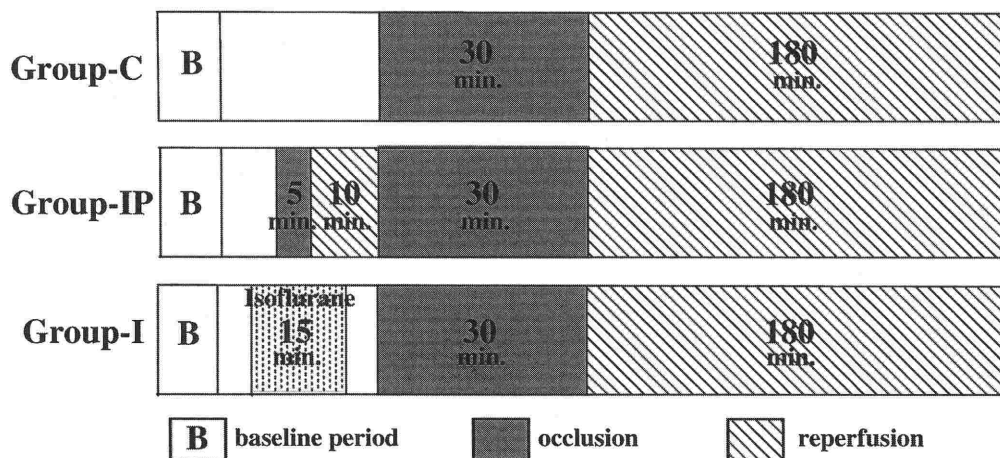


Fig. 1 Schematic diagram of the protocol. All rabbits were subjected to 30 min of LAD occlusion and followed by 180 min of reperfusion. Group-C received no intervention before LAD occlusion and reperfusion. Group-IP underwent 5min LAD occlusion with 10min of reperfusion before 30 min LAD occlusion. Group-I received 15min of isoflurane (1.5% end tidal) followed by wash-out period before 30 min of LAD occlusion.

循環動態の測定

循環動態, 心電図, 直腸温の測定および記録は心電図モニタを使用し, 心拍数, 収縮期血圧, 拡張期血圧, 平均血圧を測定した. 血圧は左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. また心筋酸素消費量の指標として rate pressure product (以下 RPP) を算出した.

測定ポイントは外科手術15分後をベースラインとし, 虚血15分後, 再灌流60分後, 再灌流180分後とした.

Area at risk/LV (左心室), Infarct size/area at risk の計測

Fig. 2 に示すように凍結した摘出心臓は 2 mm厚にスライスし, その切片を 37°C, pH 7.4 に調整した TTC 溶液に浸漬, 染色した. 染色した切片の area at risk, infarct size, 非虚血域の境界は透明アクリルシートに書き写し, スキャナで取り込み, コンピュータ処理により各々の面積を計測し, area at risk の LV に占める百分率および infarct size の area at risk に占める百分率を算出した.

統計処理

各々の実験結果は平均値 (mean) ± 標準誤差 (SEM) で示した.

Area at risk/LV, Infarct size/ area at risk の統計処理は Kruskal-Wallis test を用い, $p < 0.05$ で有意差が認められた場合には Dunn procedure の多重比較検定を行い $p < 0.05$ で有意差ありとした. 平均血

圧, 心拍数, 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, Fishers 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

1 循環動態

循環動態は平均血圧, 心拍数, RPP を指標とした. Table 1 はベースライン, 虚血15分, 再灌流60分, 再灌流180分後の平均血圧, 心拍数, RPP を示す. 平均血圧, 心拍数, RPP はいずれも各測定ポイントにおいて3群間に有意差はなかった.

2 Area at risk/LV および infarct size/area at risk

Table 2 は area at risk/LV を示す. Area at risk/LV は3群間において統計的に有意差は認められなかった. Table 2, Fig.3 は infarct size/area at risk を示す. Infarct size/area at risk は C 群で $52.2 \pm 1.6\%$, IP 群 $36.3 \pm 2.6\%$, I 群 $39.8 \pm 1.9\%$ であった. IP 群, I 群はともに C 群と比較して infarct size は有意に小さかった. しかし IP 群と I 群には有意差は認められなかった.

考 察

本研究はウサギ心筋においてケタミン/ザイラジン麻酔下, 虚血前に 1.5% のイソフルランを15分間吸入させる操作を加えると, 30分の虚血と180分の再灌流による infarct size が有意に縮小し, ischemic preconditioning によって得られる心筋壊死縮小効果と同程度の効果がある可能性を示唆している.

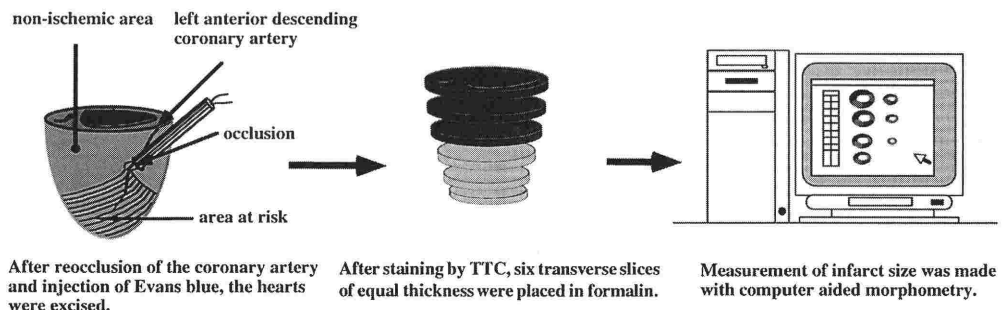


Fig. 2 Measurement of infarct size

Table 1. Hemodynamics during ischemia and reperfusion

	Group-C (n=8)	Group-IP (n=8)	Group-I (n=7)
Mean arterial pressure (mmHg)			
Baseline	66.1±2.8	66.1±2.6	54.6±8.1
15min after occlusion	59.1±3.7	64.0±2.7	61.3±2.7
60min reperfusion	63.3±3.1	66.4±2.9	65.7±2.2
180min reperfusion	61.9±3.6	62.8±2.6	61.9±3.3
Heart rate (bpm)			
Baseline	166.4±4.1	167.1±10.1	175.1±20.2
15min after occlusion	165.5±6.7	172.9±11.3	167.6±7.9
60min reperfusion	157.6±4.7	169.4±10.1	162.9±12.3
180min reperfusion	154.4±5.3	157.1±7.2	166.7±7.6
Rate pressure product			
Baseline	13317.6±238.0	13759.3±1031.9	12528.9±573.7
15min after occlusion	11728.6±671.1	12882.9±1049.3	12032.0±671.0
60min reperfusion	11976.6±386.4	13350.3±968.4	12574.7±862.1
180min reperfusion	11788.0±504.8	11697.3±810.3	11900.3±597.4

Data are expressed as mean ± SEM.

Table 2. Area at risk/LV and Infarct size/area at risk

	Area risk/LV (%)	Infarct size/area at risk (%)
Group-C (n=8)	67.9±8.1	52.2±1.6
Group-IP (n=8)	66.0±5.9	36.3±2.6*
Group-I (n=7)	67.4±5.9	39.8±1.9*

Data are expressed as mean ± SEM.

* Significantly different (p<0.05) from Group-C

Ischemic preconditioning は長時間の虚血に先行する短時間の虚血により得られる心筋の虚血耐性獲得現象として知られ、そのメカニズムにはアデノシンレセプタ²⁾, KATP チャンネルの開口³⁾, フリーラジカル⁹⁾などの多くの因子が複合的に関与している¹⁰⁾。一方、イソフルランが preconditioning 効果を有することがウサギ⁶⁾, イヌ⁷⁾で観察され、イソフルランの心筋保護効果に KATP チャンネル⁷⁾やアデノシンレセプタ⁸⁾が関与していることも明らかにされており、ischemic preconditioning と共通のメカニズムが示唆されている。

最近、Kehl らはイヌにおいてイソフルランによる心筋壊死縮小効果が濃度依存性であることを明らかにし、0.25MAC の低濃度でも preconditioning 効果が発現することを見出した¹¹⁾。ウサギの

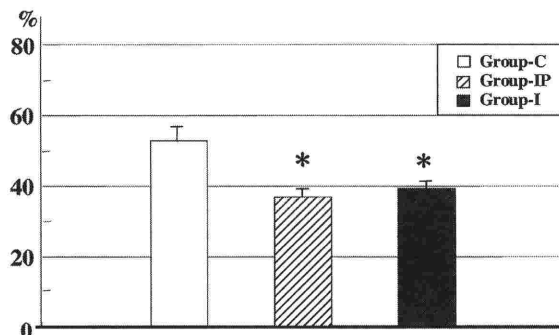


Fig. 3 The figure shown infarct size expressed as percentage of anatomic area at risk. Data are expressed as mean ± SEM.

* Significantly (p<0.05) different from Group C

場合、イソフルランの 1MAC が 2.1% である¹²⁾ことから、本研究では約 0.7MAC のイソフルランを吸入させた。予備実験の結果、1MAC イソフルランをケタミン/ザイラジン麻酔下で吸入させると循環抑制が強く生じ、麻酔の維持が困難であり、本研究では有意な循環抑制を起こさない程度の濃度のイソフルランを用いた。

本実験において、ischemic preconditioning 群およびイソフルランによる preconditioning 群の循環動態および RPP はコントロール群に比較して有

意な差が認められないことから、少なくともイソフルランによる preconditioning 効果に心筋酸素消費量は関与していないと考えられる。また、イソフルランの心筋保護効果のメカニズムの1つとして、冠動脈拡張作用による側副血流の増加が考えられるが、本研究で用いたウサギは側副血行が極めて少ないことが証明されており¹³⁾、その可能性は低い。

Cason ら⁶⁾はウサギでプロポフォール麻酔下、1.1%のイソフルランが preconditioning 効果を発現させることをすでに報告しているが、米国においてウサギモデルで最も一般的に用いられているケタミン/ザイラジン麻酔下での報告は著者らの検索した限りではない。ケタミン単独では麻酔の維持が困難であり、ケタミン (35 mg/kg) とザイラジン (5 mg/kg) の混合液を静注すると開胸術にも有効である。ケタミンは興奮性伝達物質受容体である NMDA レセプタを非競合的に遮断し、再灌流不整脈を抑制する¹⁴⁾。しかし in vivo では血圧上昇、心拍数増加、心拍出量増加が生じ、心仕事量を増加させるため心筋虚血を増悪させる。しかし、逆にザイラジンは、脳幹部および血管平滑筋の前シナプスにおいて $\alpha 2$ レセプタのアゴニストとして作用し、血圧を下降させ心筋酸素消費量を減少させるためケタミンの作用は相殺される可能性がある。また、ケタミンは KATP チャネルにおける glibenclamide の拮抗作用を増強し¹⁵⁾、ischemic preconditioning による心筋壊死縮小効果を阻害すること¹⁶⁾が報告されている。本研究においても虚血およびイソフルランによる preconditioning での infarct size はそれぞれ36.3%、39.8%であるのに対し、プロポフォールを用いた Cason らの報告ではそれぞれ8.7%、23.4%と小さかった。これはプロポフォールがラジカルスカベンジャとして働き心筋に保護的に作用する¹⁷⁾のに対し、ケタミンは上記の理由から preconditioning を抑制している可能性を示唆するものである。このようにベースに用いる麻酔薬により preconditioning 効果は影響されると考えられる。

以前、著者らは今回と同様な実験系においてケタミン/ザイラジンによる全身麻酔下とイソフルラン1.2%による全身麻酔下で30分の心筋虚血と180分の再灌流を行い infarct size を検討した結果、イソフルランの持続投与には心筋壊死縮小効果が

認められないことを報告した¹⁸⁾。このようにイソフルランの心筋虚血再灌流障害に与える影響の相違は投与濃度の違いも否定できないが、投与方法が大きく関与する可能性が考えられる。ischemic preconditioning はメモリー現象を有すると言われているが、イソフルランもこれと同様な性質を有する⁷⁾。つまり虚血前にイソフルランを投与し、それを洗浄した後もイソフルランの心筋保護効果が続く現象である。本研究においてもイソフルランのメモリー現象が認められ、少なくとも30分持続することが示唆された。イソフルランにより心筋保護効果を得るには持続投与ではなく虚血前に一時的に投与しメモリー現象を引き出すことが必要条件であると考えられた。しかしイソフルランの心筋保護効果を最大限に発揮させる投与時期、投与時間、イソフルラン濃度および心筋保護のメカニズムについては今後の研究課題である。

結 論

イソフルランはウサギ心筋虚血再灌流モデルにおいて ischemic preconditioning と同様に心筋梗塞に対して保護的に作用することが確認された。しかし、この心筋保護効果は、イソフルランによる全身麻酔つまりイソフルランの持続投与では認められなかったことより、虚血前の一時的投与により得られる可能性が示唆された。

[本研究の一部は平成12~13年度文部科学省研究費補助金(奨励研究A, 課題番号12771249)で行われた.]

文 献

- 1) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124-1136, 1986
- 2) Liu GS, Thornton J, Winkle DM, et al : Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84 : 350-356, 1991
- 3) Sawada H, Yoshida K, Kukreja RC : Blockade of ischemic preconditioning by glibenclamide in rabbits anesthetized with sevoflurane. *The bulletin of Kanagawa Dental College* 25 : 65-71, 1997
- 4) Liu Y, Downey JM : Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 263 : H1107-1112, 1992
- 5) Yellon DM, Alkhalafi AM, Pugsley WB : Preconditioning

- the human myocardium. *Lancet* 342 : 276-277, 1993
- 6) Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, et al : Anesthetic-induced preconditioning. *Anesthesiology* 87 : 1182-1190, 1997
 - 7) Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, et al : Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K_{ATP} channels. *Anesthesiology* 87 : 361-370, 1997
 - 8) Ismaeil MS, Tkachenko I, Gamperl AK : Mechanisms of isoflurane-induced myocardial preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 90 : 812-821, 1999
 - 9) Giuseppe A, Isabella T, Massimo C : The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 27 : 1035-1039, 1995
 - 10) 吉田和市 : 麻酔薬が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響. *日本歯科麻酔学会雑誌* 27 : 276-280, 1999
 - 11) Kehl F, Krolkowski JG, Mraovic B, et al : Is isoflurane-induced preconditioning dose related?. *Anesthesiology* 96 : 675-680, 2002
 - 12) Drummond JC : MAC for halothane, enflurane, and isoflurane in the New Zealand white rabbit : And a test for the validity of MAC determinations. *Anesthesiology* 62 : 336-338, 1985
 - 13) 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 : 737-746, 1987
 - 14) D'Amico M, Di Filippoo C, Rossi F, et al : Arrhythmias induced by myocardial ischaemia-reperfusion are sensitive to inotropic excitatory amino acid receptor antagonists. *Eu J Pharmacol* 366 : 167-174, 1999
 - 15) Mullenheim J, Frassdorf J, Preckel B, et al : Ketamine, but not S(+)-ketamine, blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo. *Anesthesiology* 94 : 630-636, 2001
 - 16) Morita Y, Murakami T, Iwase T, et al : K_{ATP} channels contribute to the cardioprotection of preconditioning independent of anaesthetics in rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 29 : 1267-1276, 1997
 - 17) Kokita N, Hara A, Abiko Y, et al : Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg* 86 : 252-258, 1998
 - 18) 丸山久雄, 吉田和市, 神田元彦ら : 揮発性吸入麻酔薬が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響. *循環制御* 20 : 288-293, 1999

Comparative study of ischemic preconditioning and isoflurane-induced preconditioning in rabbit hearts

Hisao Maruyama*, Munetaka Furuya*, Naofumi Nishida*,
Mitsuru Ohdachi*, Osamu Iwata*, Kazu-ichi Yoshida*

*Department of Anesthesiology, Kanagawa Dental College, Kanagawa, Japan.

We evaluated the effects of ischemic preconditioning and Isoflurane induced preconditioning on myocardial infarction within a quantified area at risk in rabbit hearts subjected to a regional ischemia/reperfusion injury. In-vivo rabbit hearts(n=23) were received regional ischemia by 30min of the left anterior descending artery occlusion and followed by 180min of reperfusion under ketamine/xylazine anesthesia. Rabbits were randomly divided into three groups : Group-C (Control,n=8) were given no pretreatment, Group IP(Ischemic preconditioning,n=8) were pretreated with 5min of coronary occlusion followed by 10min of reperfusion, Group-IP (Isoflurane induced

preconditioning,n=7) were pretreated with 15min of isoflurane(1.5% end-tidal) inhalation and washout.

The infarct size determined by tetrazolium staining was: $52.2 \pm 1.6\%$ in Group-C, $36.3 \pm 2.6\%$ in Group IP, $39.8 \pm 1.9\%$ in Group-I. The infarct size was smaller in the Group IP and Group I than in the Group-C ($p < 0.05$, respectively).

The administration of 1.5% isoflurane before LAD occlusion resulted in a reduction in myocardial infarct size similar to that observed with ischemic preconditioning in an in vivo rabbit model, suggesting the presence of preconditioning effect in isoflurane.

Key words : Ischemia-reperfusion injury, Myocardial protection, Isoflurane ,
Ischemic preconditioning,

(Circ Cont 23 : 410~415, 2002)