

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19374

研究課題名(和文)心房細動のリズム不整が血栓形成に及ぼす影響に関する検討

研究課題名(英文)The association between pulse irregularity in atrial fibrillation and thrombogenesis

研究代表者

田中 仁啓 (TANAKA, YOSHIHIRO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40707543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動は高齢化に伴い、本邦でも増加している不整脈疾患であり、心不全、脳梗塞の原因となることが知られている。心房細動には頻脈と脈不整という二つの側面があり、頻脈による影響は過去に多く検討されているが、脈不整の立場からの検討は過去に行われていない。そこで、脈不整の程度を適宜調整可能なペースング装置を用いて、脈不整がブタの心臓において血栓形成に寄与しているかどうかを検討することとした。

全身麻酔下で、外科的にブタの左心房を2時間ペースングした。ペースング前後にそれぞれ採血を実施し、凝固能や炎症マーカーを評価した。不整ペースング4匹、整ペースング5匹の実験を終了し、現在各種マーカーの解析中である。

研究成果の概要(英文)：Atrial fibrillation (Afib) is an increasing arrhythmic disorder in the graying society like Japan, and it is known as a cause of heart failure and embolic stroke. Afib has two aspects, tachycardia and pulse irregularity, and the effect of tachycardia on heart failure or stroke has been well-investigated, while no reports regarding the effect of pulse irregularity have not been found. Therefore, we ought to investigate whether pulse irregularity played an vital role in thrombogenesis using porcine hearts.

Under general anesthesia, porcine hearts were surgically paced for two hours. Blood samples were taken before and after pacing, and coagulation and inflammation markers were evaluated. We performed four cases of irregular pacing and five cases of regular pacing, and now several markers are being analyzed.

研究分野：循環器内科

キーワード：心房細動 脈不整 血栓形成

1. 研究開始当初の背景

頻脈性心房細動は1)頻脈 2)リズム不整を特徴とする不整脈であり、実臨床において最も頻度の多い不整脈である。我が国では、60歳以上の一般成人の有病率は約4.3-6.3%と報告されており、その有病率は加齢とともに増加している。したがって、超高齢化社会を迎えている我が国では、心房細動診療の機会は増加の一途を辿ることが容易に予想される。

心房細動の重要な合併症として、頻脈による動悸、心不全、脳梗塞が挙げられる。その中でも心原性脳梗塞は一旦発症すると、広範囲に及ぶ不可逆性の障害から死亡する例が多く、一命を取り留めたとしても、重度の機能障害のため日常・社会生活を送ることが困難となる。また、家族への心理的・物理的負担、医療経済への影響も甚大である。したがって、心原性脳梗塞を予防することが実臨床における最重要課題とされる。

この心房細動関連の脳梗塞は左房内血栓形成による血栓塞栓症が原因と考えられているが、この血栓形成機序には、1)心房細動による有効な心房収縮の消失・左房内血流速度の低下が起こり、2)左房内皮におけるトロンボモジュリンやプラスミノゲン活性化因子インヒビターなどの遺伝子発現が修飾され、易血栓性が惹起されることが知られている

これらの病態群の背景には、心房細動による頻脈やリズム不整が関与していることが推測される。心房細動の特徴の一つである頻脈が血栓形成に大きく関与していることは多くの動物実験・臨床研究で実証されているが、他の頻脈性不整脈に比し、絶対性不整脈である心房細動に圧倒的に血栓塞栓症合併の頻度が高いことから、リズム不整自体が血栓形成に大きく寄与している可能性が予想される。しかしながら、この疾患モデル群における、リズム不整の客観的評価方法は確立されておらず、またリズム不整自体が血栓形成に与える影響は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、心拍数・リズム不整ともに任意に調整が可能である不整ペースング刺激装置を用い、今まで評価困難であったリズム不整の影響の客観的評価法を確立し、心房細動における血栓形成の新規メカニズムを同定することで新たな治療戦略とその臨床応用を目指すものである。

3. 研究の方法

心臓の大きさ、心拍数、電気生理学的特性がヒトと類似するため、30kgのブタを使用して実験を行う方針とした。全身麻酔下で気管挿管を行い、左側開胸で肋骨を切除し、心臓を漏出され、左心耳心外膜側にペースングリードを固定した。

耳静脈からペースング前の採血を実施し、刺激装置としてはMyopacer EPという機種を使用した。心拍数 160 回/分で規則正しくペースングを行う Regular pacing 群と、基本心拍数 160 回/分でペースングし、その40%(64 回/分)の範囲内で無作為に変動するように設定した Irregular pacing 群を比較検討した。

ペースング時間に関しては、実験開始時は3時間で予定し、3時間のペースング後に左心耳から採決を実施し、ペースング前のもとの比較を行う方針とした。

上記ブタを用いて、心房ペースング前後で凝固能、炎症、内皮機能を左房内採血を用いて評価を行う。また、摘出心を用いて、血栓の病理学的評価及び Micro-arrayを用いた、RNAの発現差異を評価する。評価項目としては、血小板活性化の指標として可溶性 P-selectin、内皮障害の指標として von Willbrand factor (vWF)と Asymmetric dimethylarginine (ADMA)、凝固能の評価として Fibrinogen・D-dimer・Thrombin-Antithrombin complex (TAT)、トロンボモジュリンやプラスミノゲン活性化因子インヒビター、炎症の指標として TNF- α ・CRP の測定を行う。さらに左心房筋から RNA を抽出し、Micro-Arrayを用いて、Regular pacing群と Irregular pacing群のRNAの発現の差異を網羅的に評価する方針とした。

4. 研究成果

(1) 鎮静・全身麻酔

ミニブタ(約30kg)に対して、開胸後にペースングを3時間実施する必要があるため、まず、安定した麻酔管理・呼吸管理状況の初期調整を行った。ケタラール500mgを事前に筋肉内注射して、軽度鎮静がかかった状態で手術台に固定し、セボフルランを用いた吸入麻酔で鎮静・鎮痛を実施した。睫毛反射消失を確認後にスパイラル挿管チューブで気管挿管を行い、人工呼吸器管理とした。

上記方法で実験を開始したが、セボフルランによる麻酔が弱かった影響か、ペースング中に突然心室細動を発生して、突然死を起してしまうケースが頻回に認められた。したがって、以後はセボフルランの投与量を2倍にして実験を行った結果、心室細動発生に伴う突然死はほとんど認めなくなった。

本方法を用いることで、少なくとも4-5時間の長時間の麻酔が可能であることを事前に確認した。

(2) 開胸及び左心耳ペースング

上記方法で全身麻酔を行い、鎮静・鎮痛を十分に行った状態で、右側臥位に体位を変更し、左肩甲骨を目印に皮膚に15cm前後の切開線を入れ、電気メスで止血をしながら肋骨を露出させた。肋骨を2本切断し、肺の下の心臓を露出した。心外膜を1cmほど切開し、

体外式ペースングリードを左心耳にナイロン糸で結紮・固定を行った。

この時点で耳静脈から採血を 10cc 行い、EDTA 及びクエン酸採血管に 5cc ずつ分注を行った。EDTA 及びクエン酸採血管は遠心分離(4 度、3000rpm、15 分間)を行い、血漿成分のみ 400 μ l ずつ分注し、マイナス 30 度の冷蔵庫で保存した。

(3) ペースング時間の調整

ペースングは Myopacer EP を用いて、出力 5V、基本心拍数 160bpm で規則的にペースングする群と 160 \pm 64bpm の範囲内で不規則にペースングする群に分けて実施した。

四肢誘導心電図をブタに装着し、自己心拍およびペースングが行われているかどうかをモニタリングする方針とした。

研究計画では 3 時間のペースングを実施する予定であったが、3 時間のペースング後に心房細動が誘発されてしまい、ペースングにならなくなる症例が 2 例続いてしまったため、不整ペースングによる脈不整が血栓形成に及ぼす影響を予定通り評価できないと考えられた。したがって、それ以降はペースング時間を 2 時間に短縮して実験を行う方針とした。

(4) ペースング終了後

ペースングを 2 時間継続し、心電図モニターを用いてペースングが行われているかどうかを評価した。

ペースング終了後に、左心耳に 18G 針を穿刺し、左心耳内から EDTA 及びクエン酸採血管に 5cc ずつ採血を実施した。EDTA 及びクエン酸採血管を遠心分離し(4 度、3000rpm、15 分間)、血漿成分のみ 400 μ l ずつ分注し、マイナス 30 度の冷蔵庫で保存した。

最終的に規則的ペースングを 5 匹、不規則ペースングを 4 匹、期間内に実験可能であった。

(5) ペースング可能であったブタの特徴に関して

【規則的ペースング群:5 匹】

- ・ 開胸～初回採血までの時間の中央値：
30 分(最小 20 min、最大 40 分)
- ・ 体重中央値 40 kg
(最小 35 kg、最大 45 kg)
- ・ 心拍数中央値 88bpm
(最小 80 bpm、最大 110 bpm)

【不規則ペースング群:4 匹】

- ・ 開胸～初回採血までの時間の中央値：
30 分(最小 30 min、最大 45 分)
- ・ 体重中央値 33kg
(最小 30 kg、最大 45 kg)

- ・ 心拍数中央値 105 bpm
(最小 60 bpm、最大 120 bpm)

2 群間で体重及び自己心拍数に差は認められるものの、統計学的な有意差は認めなかった。

(6) 今後の展望

不整ペースング群に関して 1 匹実験を追加し、下記検査の結果で有意差を認めれば、心拍数をさらに早く設定して実験を再試行予定である。

現在、EDTA 及びクエン酸採血管で採取した検体を用いて、ELISA 法を用いて各種炎症マーカー、凝固能等測定を実施中である。また、心停止後に切除した左耳心から RNA を抽出して、Micro-array を用いて、今後網羅的に RNA の発現を評価予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 仁啓 (TANAKA Yoshihiro)
金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40707543

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者

林 研至 (HAYASHI, Kenshi)

山岸 正和 (YAMAGISHI, Masakazu)