

令和 5 年 5 月 2 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18277

研究課題名（和文）アクアポリンに着目した周術期における新たな輸液管理戦略の開発

研究課題名（英文）Development of a new infusion control strategy in perioperative period focusing on aquaporin

研究代表者

濱田 耕介（Hamada, Kosuke）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20806799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：吸入麻酔薬であるセボフルランはアストロサイト培養細胞の膨化を抑制し、脳浮腫への関与が示唆された。そのことは、アクアポリン（AQP）4の発現量ではなく機能に関係している可能性が示唆された。五苓散もまたアストロサイト培養細胞の膨化を抑制した。このこともAQP4の機能に関係していると考えられた。さらに外傷性脳浮腫モデルラットにおいて脳浮腫の抑制に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

吸入麻酔薬とアクアポリン（AQP）の関係は明らかにはなっていない。また、外傷性の脳浮腫に対して五苓散が有効であるという報告は未だない。五苓散の機序、有効成分、AQPとの関係性も明らかにはなっていない。今研究により周術期の体液管理において、AQPという観点からこれをコントロールしていくという道が開かれる可能性がある。さらに、外傷性脳損傷における脳浮腫に対して新たな治療法が確立する可能性があり、浮腫に対しての新薬開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Sevoflurane, an inhaled anesthetic, inhibited the swelling of astrocyte cultured cells, suggesting its involvement in cerebral edema. It was suggested that this may be related to the function of aquaporin (AQP) 4 rather than its expression level. Goreisan also inhibited the swelling of astrocyte cultured cells. This was also considered to be related to the function of AQP4. Furthermore, it was suggested that it may be effective in suppressing cerebral edema in traumatic cerebral edema model rats.

研究分野：麻酔科学

キーワード：アクアポリン AQP4 周術期 輸液管理 五苓散 吸入麻酔薬 脳浮腫

1. 研究開始当初の背景

(1) 周術期における輸液管理と浮腫

周術期に発生する浮腫は、うっ血性心不全、呼吸器合併症、急性腎不全、感染症、創傷治癒遅延と関連している。このことは術前全身状態の悪い患者や高齢者では、予後にかかわる重要な因子となりうる。浮腫を予防・治療するために厳格な輸液管理を行うことは一つの方法である。近年は周術期の体液管理に関して、ERAS (Enhanced recovery after surgery) に基づいた目標指向型輸液 (GDT) の概念が提唱されている。しかし、個々の症例すべてにおいて最適な輸液量を評価し、投与することはいまだ困難である。

(2) アクアポリンと脳浮腫

アクアポリン (AQP) は 1992 年 Agre P. らにより報告された水チャネル蛋白質で、細胞膜上に存在して主に水分子を受動的に輸送する。現在、哺乳類には AQP0 から AQP12 までの 13 種類の AQP のサブタイプが知られている。その中で AQP4 は脳の血液脳関門、アストロサイト細胞に発現しており、脳実質の浮腫形成と関連していることが明らかになってきている。慢性硬膜下血腫に対する脳浮腫予防目的に、臨床的に使用されている漢方薬「五苓散」は、AQP4 の機能を阻害するといわれている。

(3) 周術期における新たな輸液・臓器保護戦略確立

AQP は受動輸送を行うチャネルであるため、AQP を介した水の移動を人為的に調節するには濃度勾配、あるいは AQP 自体の発現量を調節、AQP の機能を促進または阻害するという介入が必要である。

AQP4 の阻害薬として、五苓散が AQP4 の機能をどのように阻害するかという詳細な機序は明らかではない。さらに、吸入麻酔薬は細胞膜の電解質チャネルを抑制し、電解質の細胞膜内外への輸送を阻害する作用があるが、吸入麻酔薬の AQP4 への影響はいまだ不明である。

これまで行われてきた周術期輸液量の適正化を目指すというアプローチではなく、AQP の発現量の調節、AQP 機能の阻害薬・促進薬を用いることにより AQP を介した水の移動を制御し、浮腫の形成をコントロールするという試みはいまだない。わたしは、AQP の発現量を周術期での受動輸送を考慮し適切な時期に発現するように制御することによって、新たな周術期輸液・臓器保護戦略が可能となるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

周術期の浮腫を予防するために、手術中・術直後の体液増加期は AQP の発現量を減少させ、AQP の機能を抑制させることによって間質への水の移動を抑制する。また、術後のリフィリング時期には AQP の発現量を増加させ、AQP の機能を促進させることで体液の排出をスムーズに行えるように制御する。そのために適切な麻酔薬を選択し、必要な薬剤を適切な時期に投与することで、AQP を体液コントロールのための一つのツールとすることが本研究の目的である。

これまで脳浮腫と AQP4 において関連性が指摘されている。AQP4 の機能を阻害する五苓散を脳出血、脳虚血、脳腫瘍の患者に投与することによって、脳浮腫が予防される。しかし、周術期の浮腫を改善するために、AQP に着目して行った研究の報告はない。周術期における体液増加・浮腫に対して、従来の輸液による制御ではなく、AQP の発現量と機能を調整することで制御しようとする試みが学術的独自性である。また、本研究により AQP に着目して体液のシフトを制御するという新たな治療概念を築き上げることとなる。

3. 研究の方法

(1) 五苓散による AQP4 阻害作用の機序を明らかにするために、ラットのアストロサイト培養細胞株に五苓散を投与し、五苓散投与群と非投与群での AQP4 タンパク質の発現量を定量比較する。さらに、低浸透圧暴露条件下の細胞の形態変化を五苓散投与群と非投与群で比較する。これらの結果から、阻害作用の機序が発現量の変化によるものではなく、機能の阻害であることを明らかにする。

(2) 吸入麻酔薬の AQP4 への影響を明らかにするために、アストロサイト培養細胞株に吸入麻酔薬を投与し、投与群、非投与群での AQP4 タンパク質の発現量を定量比較する。さらに、低浸透圧暴露条件下の細胞の形態変化を吸入麻酔薬投与群と非投与群で比較する。

(3) これらの in vitro での研究をふまえ、in vivo での研究としてラット過剰輸液モデルを作成し、脳浮腫の形成を体重当たりの脳重量及び MRI で評価する。DEX 投与、五苓散投与、吸入麻酔薬の投与に伴う AQP4 タンパク質の発現量、脳浮腫の形成をそれぞれ比較する。

4. 研究成果

吸入麻酔薬であるセボフルランを投与することで、アストロサイト培養細胞の膨化は抑制された(図1)。このことからセボフルランは脳浮腫への関与することが示唆された。またセボフルランの投与下でウェスタンブロッティングにより AQP4 の発現量を測定したが、有意差は認めなかった(図2)。このことからセボフルランは AQP4 の発現量ではなく機能に関係している可能性が示唆された。

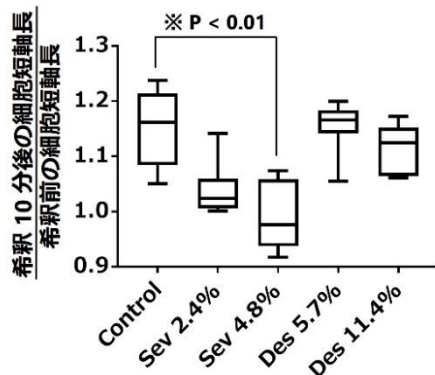


図1：吸入麻酔薬暴露による細胞膨化の割合 (n = 6)

- Sev 4.8%暴露群ではControl 群と比較して細胞膨化の割合が有意に低かった (P = 0.0084)

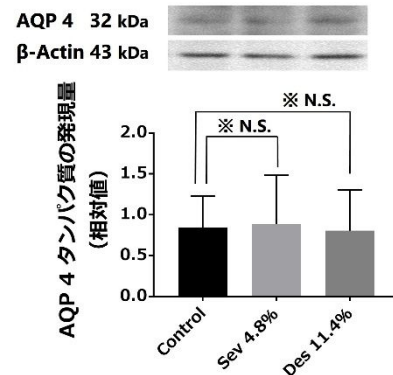


図2：吸入麻酔薬暴露によるAQP4 タンパク質の発現量の変化 (n = 8)

- Sev 4.8%暴露群、およびDes 11.4%暴露群のAQP4 タンパク質量は、Control 群と比較して差がなかった
- N.S.: 非有意

さらに同様に、五苓散投与によりアストロサイト培養細胞の膨化は抑制された(図3)。五苓散の投与でも AQP4 の発現量に変化は認めなかったため、五苓散も AQP4 の機能に関係していると考えられた(図4)。

in vivo での研究として当初予定していた輸液過剰モデルではなくラット外傷性脳浮腫モデルを使用したが、五苓散の投与により外傷性脳浮腫は抑制され(図5) in vivo でも五苓散の脳浮腫への関与を確認できた。

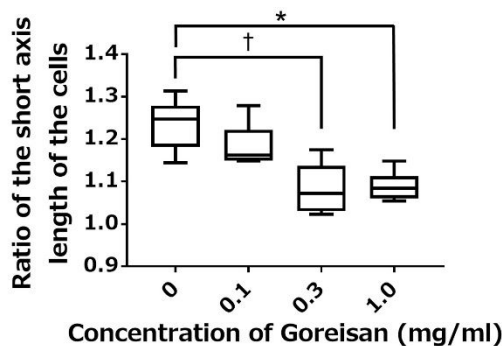


図3：五苓散投与によるアストロサイトの膨化 (n = 6)
培養アストロサイトに0.3および1.0mg/mlの五苓散を投与すると、未投与と比較して細胞の膨化が有意に抑制された *P = 0.013、† P = 0.018
短軸長の比：希釈10分後の細胞の短軸長/希釈前の細胞の短軸長

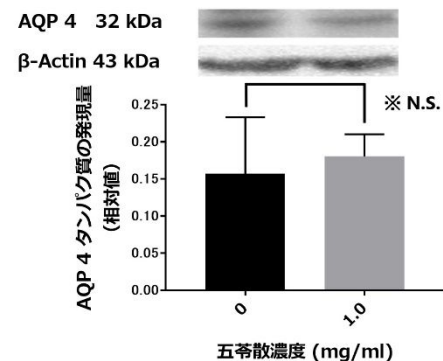


図4：ウェスタンブロッティング法による五苓散の有無におけるAQP4タンパク質の発現 (n = 8)
五苓散の有無によりAQP4タンパク質の発現に有意差はなかった AQP4：アクアポリン4、※N.S.: P > 0.05

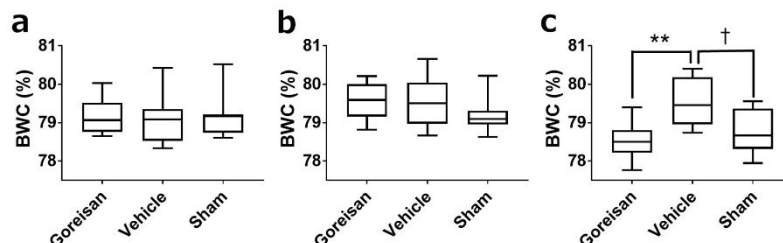


図5：外傷性脳損傷後1 (a), 3 (b), および7 (c) 日後の脳水分量 (n = 8 または 11)

外傷性脳損傷の7日後、脳水分量(BWC)は生理食塩水群よりも五苓散群で有意に低かった ** P = 0.0035、† P = 0.0147

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosuke Hamada	4. 巻 92
2. 論文標題 Evaluation of the Effects of the Japanese Herbal Medicine “Goreisan” on Traumatic Cerebral Edema in Rats and Identification of Active Ingredients in Cultured Astrocytes.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Sapporo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱田耕介，時永泰行，佐藤智恵，君塚基修，山蔭道明
2. 発表標題 セボフルランはデスフルランと異なり、アストロサイト培養細胞の膨化を抑制する
3. 学会等名 日本麻酔科学会 北海道・東北支部第9回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hamada K, Tokinaga Y, Sato T, Azumaguchi R, Kimizuka M, Kazuma S, Yamakage M
2. 発表標題 Herbal Kampo Medicine, Prevents Water Movement by Inhibiting the function of Aquaporin 4 in Astrocytes.
3. 学会等名 The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. Orland, USA. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. Orland, USA.	開催年 2019年～2019年
---	--------------------

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------