

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592316

研究課題名(和文) 肝・腎臓における虚血再灌流障害に対する麻酔薬による保護効果の機序に関する研究

研究課題名(英文) The protective effects of anesthetics on ischemia reperfusion injury in kidney and liver

研究代表者

三尾 寧 (Mio, Yasushi)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00266686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：揮発性吸入麻酔薬は腎臓・肝臓において、虚血再灌流障害時のミトコンドリア呼吸機能を保護することが認められた。ミトコンドリア電子伝達系複合体Iの機能を麻酔薬が阻害することが、この両臓器における保護作用の作用機序の一つとして考えられた。両臓器を対象とした手術に際し、吸入麻酔薬の使用が、術後の機能維持という観点から有利となる可能性が示唆された。また造影剤による腎臓ミトコンドリア機能低下に対するニコランジル・麻酔薬の保護効果を検証したが、その作用は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The volatile anesthetics protected mitochondrial respiratory function against ischemia-reperfusion injury in rat liver and kidney. Further, the anesthetics inhibited complex I of the electron transport chain in mitochondria, which may in part underlie the mechanism for protective effects in both organs. These results may suggest the advantage of use of volatile anesthetics on kidney and liver surgery. The protective effects of nicorandil and anesthetics against contrast-induced renal mitochondrial injury were not observed.

研究分野：麻酔科学

キーワード：虚血再灌流障害 麻酔薬 ミトコンドリア 臓器保護 肝臓 腎臓

1. 研究開始当初の背景

1990年代に心臓における麻酔薬による虚血再灌流障害の軽減作用が報告された。これらの作用は麻酔薬プレコンディショニング、ポストコンディショニングとよばれ、以降基礎分野の観点からはメカニズムに関する様々な研究が、臨床分野では心臓手術などにおける実際の有効性に関する研究が広く行われていた。

このように麻酔薬による臓器保護の研究が心臓において進むにつれ、他臓器においてもこれらコンディショニング効果の適応が考えられるようになった。特に移植対象臓器でもある腎臓・肝臓に関しては、術後のクレアチニン値や肝逸脱酵素の推移から、揮発性吸入麻酔薬が虚血再灌流障害に対する保護作用を持つといった小規模な研究報告がされるようになった。しかしながら、その作用機序に踏み込んだ報告は少ない。

また、近年、血管内手術の増加に伴い、造影剤を用いる手術が増加している。造影剤の使用は造影剤腎症とよばれる腎障害の要因の一つとなり、その予防が重要になってくる。造影剤腎症は虚血再灌流障害とは異なるが、臓器保護という観点からみると、虚血再灌流障害軽減において中心的な役割を担っているミトコンドリアが関与している可能性がある。造影剤腎症を予防する目的で使用する薬剤に関しては、いくつか報告がされているが、機序や有効性に関しては明らかになっていない点が多い。

2. 研究の目的

(1) 心臓における麻酔薬による虚血再灌流障害においては、ミトコンドリアが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そこで、腎臓・肝臓における虚血再灌流障害に対する麻酔薬の保護作用の機序を、ミトコンドリアに焦点を当てることによって明らかにし、その臨床応用の有効性を推測する。

(2) 麻酔薬が造影剤腎症軽減作用を有するかどうかを、ミトコンドリア呼吸機能に焦点をあて明らかにする。さらに麻酔薬のみならず、造影剤腎症防止効果があるとされる周術期使用薬であるニコランジルを用い同様の研究を行い、その有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

ミトコンドリアの抽出と基本となる測定法: 腎臓ならびに肝臓よりミトコンドリアを過去の報告と同様な方法により分離する。緩衝液にて希釈したミトコンドリア溶液を酸素電極付のチャンバー内に注入する。次にピルビン酸とリンゴ酸をミトコンドリア溶液

中に加えることにより電子伝達系を賦活化させる。電子伝達系が賦活化されると、ミトコンドリアは溶液中の酸素を消費するため、酸素電極を用いてこのミトコンドリア溶液中の酸素濃度の変化を測定する。ピルビン酸とリンゴ酸を最初に投与した直後においては、酸素濃度は徐々に低下し、この期間を第2相呼吸という。次にADPを投与するとそれらがATPに変換され、その際には酸素を急速に消費するため酸素濃度は急激に低下する(第3相)。引き続いて投与したADPが全てATPに変換されるとミトコンドリア溶液中の酸素濃度の低下は再び緩徐となる(第4相)。この第3相と第4相の酸素濃度低下速度の比をrespiratory control ratio(RCR)という。一般にRCR値が大きいほどミトコンドリアの機能が保持されており、今回の研究ではこのRCRをミトコンドリア機能の指標として用いた。

(1) 麻酔薬による虚血再灌流障害に対する腎臓・肝臓ミトコンドリア保護効果に関する研究: 前述した方法でミトコンドリアの電子伝達系を賦活しATPを産生させた後、第4相呼吸のまま放置することによりチャンバー内のミトコンドリア溶液酸素濃度を0とし、そのままチャンバーを密封しミトコンドリアを低酸素状態に暴露する。一定時間ミトコンドリアを低酸素に暴露した後、チャンバーを大気に開放しミトコンドリア溶液中の酸素濃度を上昇させる。この低酸素-再酸素化刺激を虚血再灌流として捉え、様々な影響を評価した。

まず、摘出し裁断した腎臓・肝臓を2つに分け、一方にのみ吸入麻酔薬を適応した。コントロールとして、麻酔薬非投与のミトコンドリアRCR値を低酸素-再酸素化刺激前後で測定した後、揮発性吸入麻酔薬を適応した後に抽出したミトコンドリアを用いて同様に低酸素-再酸素化刺激を加え、RCR値が刺激前後でどのように変化するかを検討した。更に、抽出したミトコンドリアを希釈し、窒素ガスを用いて低酸素-再酸素化刺激を加えた再酸素化早期に吸入麻酔薬を適応し、低酸素暴露後の麻酔薬の使用がミトコンドリア機能障害を軽減するか検討した。

(2) 麻酔薬による虚血再灌流障害に対するミトコンドリア保護効果の機序に関する研究: 前述した方法で、ミトコンドリアの酸素消費を観察した場合、最初の基質としてピルビン酸・リンゴ酸を用いると、電子伝達系は複合体Iから賦活化される。一方、最初の基質としてコハク酸を複合体I阻害剤であるロテノンと共に用いると、複合体IIから電子伝達系は賦活化される。この複合体Iから電子伝達系を賦活化した場合と、複合体IIから不活化した場合のミトコンドリアの酸素消費が、吸入麻酔薬の存在下でどのように変化するかを各々について観察した。

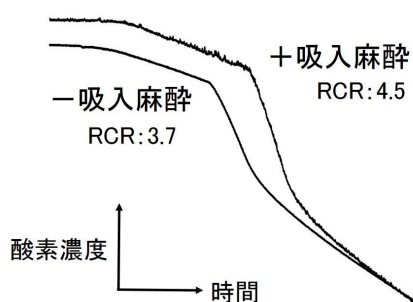
(3) 造影剤腎症に関する研究：腎臓からミトコンドリアを抽出し、コントロールの RCR を測定した。その後造影剤を投与し再度 RCR を測定した。造影剤投与前にいくつかの研究で造影剤腎症軽減作用を有すると報告され周術期においても使用頻度の比較的高いニコランジルを使用することにより、造影剤使用後のミトコンドリア呼吸能の障害が軽減されるか検討した。さらに上記(2)と同様に摘出裁断した腎臓を2つに分け、一方に麻酔薬を適応した。各々についてミトコンドリアを抽出し造影剤投与前後の RCR を測定することにより、造影剤によるミトコンドリア呼吸能に対する障害作用が麻酔薬の適応の有無で変化が生じるか観察した。

4. 研究成果

(1) 麻酔薬による虚血再灌流障害に対する腎臓・肝臓ミトコンドリア保護効果に関する研究：

腎臓に関する研究
吸入麻酔薬を適応したグループにおいて、非適応グループに比べ、低酸素 - 再酸素化刺激後の RCR 値は保持されていた。さらに、低酸素 - 再酸素化刺激における、再酸素化早期に吸入麻酔薬を投与した場合も、非適応グループと比べミトコンドリア RCR 値は保持されていた。吸入麻酔薬は低酸素 - 再酸素化刺激以前の投与により、刺激後のミトコンドリア機能を保護すること、ならびに低酸素 - 再酸素化刺激の再酸素化早期の麻酔薬投与により、刺激後のミトコンドリア機能を保護することが、各々判明した。

低酸素 - 再酸素化後の腎臓ミトコンドリア RCR



この種の研究が広く行われてきた心臓においては、最終的なアウトカムとして、心筋梗塞範囲の減少や血行動態の安定といった項目が評価され、それによりプレコンディショニング効果、ポストコンディショニング効果を有すると報告されてきた。腎臓の場合、病態としての虚血は一般的でなく、心臓のような方法で評価を行うことが困難であるため、吸入麻酔薬は腎臓においてプレ・ポストコンディショニング効果を有するとは断言できないと考えられる。しかしながら、エネルギー

代謝の主役であるミトコンドリアを低酸素 - 再酸素化刺激から防御することは観察されたため、腎臓が虚血に陥るような手術操作の際には、揮発性吸入麻酔薬使用の有用性がある可能性があると考えられた。

肝臓に関する研究

吸入麻酔薬を適応したグループにおいて、非適応グループと比して、低酸素 - 再酸素化刺激後のミトコンドリア RCR 値は保持されており、麻酔薬は低酸素 - 再酸素化刺激による障害から肝臓ミトコンドリア機能を保護していることが観察された。

肝臓においては、そのミトコンドリア抽出法の確立に時間を要したため、低酸素 - 再酸素化刺激における再酸素化早期の吸入麻酔薬の投与(いわゆるポストコンディショニングに相当)の実験は行うことができなかった。

(2) 麻酔薬による虚血再灌流障害に対するミトコンドリア保護効果の機序に関する研究：

抽出したミトコンドリアに吸入麻酔薬を適応した後、基質としてピルビン酸・リンゴ酸を用い電子伝達系複合体 I から活性化させると RCR 値は低下した。一方、複合体 I 阻害剤であるロテノンと共に基質としてコハク酸を用い電子伝達系 II から活性化させると、RCR 値は保持された。これにより、吸入麻酔薬には腎臓・肝臓ミトコンドリア複合体 I を阻害すると言える。心臓における虚血再灌流時のミトコンドリア機能の保持には、少量の電子のリークが関与されていると言われている。肝臓・腎臓においても、吸入麻酔薬はミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害することにより電子のリークを生じさせ、保護効果を発現することが推測できた。

(3) 造影剤腎症に関する研究：造影剤腎症に対する予防的効果が一部で提唱されているニコランジルの投与によって、造影剤による全腎ミトコンドリア RCR 値の低下は軽減されなかった。ニコランジルは腎髄質に作用するとされるため、腎皮質を除去した腎臓から抽出したミトコンドリアを用い同様の実験を行ったが、造影剤投与による RCR 低下に対する保護効果は認められなかった。ニコランジルに代え、吸入麻酔薬を用いて上記と同様の実験を行った。しかしながら、同様に造影剤によるミトコンドリア RCR 低下に対する保護効果は観察できなかった。

本研究期間中に血管内手術が広く施行されるようになり、腎臓においては虚血再灌流と同様か、あるいはそれ以上に造影剤腎症に対する予防的方策が重要になると考えた。臓器保護という観点からは類似した問題であり、基本的実験方法も同一であるため、造影剤によるミトコンドリア機能低下を軽減させる可能性のある薬物を用いた実験を重点的に

行った。しかしながら仮説と合致する結果を得ることができなかった。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三尾 寧 (MIO YASUSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00266686

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし