

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861401

研究課題名(和文)敗血症性脳症に対する新規脳保護法確立への試み

研究課題名(英文)The attempt to establish new cerebroprotection laws against septic encephalopathy

研究代表者

宮下 亮一 (Miyashita, Ryoichi)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：30649281

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)：プロポフォールは投与量によりミトコンドリア膜透過性亢進の誘発及び呼吸鎖に影響を認められた。ミトコンドリアの細胞死、呼吸鎖の停止を誘発する可能性が示唆された。それに比して、セボフルレン、ミダゾラム、デクスメドミジンは投与量に関わらず影響を認めなかった。また、プロポフォール、セボフルラン、ミダゾラムはミトコンドリアのCa取り込み能を抑制させる一方で、デクスメドミジンは、影響を認めなかった。敗血症性脳症の病態をミトコンドリアの観点からの解析を目指しているが、本研究結果は鎮静薬がせん妄などを呈する敗血症性脳症メカニズム解析の第一段階として、各種鎮静薬が脳ミトコンドリア機能に及ぼす関連結果を導いた。

研究成果の概要(英文)：We acknowledged that propofol affected the induced increase in the permeability of mitochondrial membrane and the respiration chain by its dosage. The possibility that might induce the cell death of mitochondria and the cessation of respiration chain was suggested. In comparison to it, we did not acknowledge that sevoflurane, midazolam and dexmedetomidine affected it in spite of their dosages. In addition, propofol, sevoflurane, and midazolam suppressed the ability which mitochondria took in calcium. On the other hand, we did not acknowledge that dexmedetomidine affected it. We aimed at analyzing the pathologic condition of septic encephalopathy from the viewpoint of mitochondria but the research findings led to the concerned conclusion that various tranquilizers affected the brain mitochondrial functions as the first stage of analysis in the mechanism of septic encephalopathy which tranquilizers developed delirium.

研究分野：麻酔・集中治療

キーワード：ミトコンドリア 鎮静薬 敗血症性脳症 プロポフォール デクスメドミジン 呼吸鎖

1. 研究開始当初の背景

クリティカル領域でのせん妄、敗血症性脳症 (septic encephalopathy: SE) などは多臓器障害の一分画としての中枢神経機能障害と捉えられてきている。SE の脳障害発症機序は特定されておらず、その標的分子も明らかではない。これまでの研究から、敗血症に伴う臓器障害の発現は、組織学的変化では説明できない臓器機能障害によるミトコンドリア機能が注目されている。本研究では、虚血性神経細胞死の解析で蓄積されたミトコンドリア機能不全に対する成果を SE のメカニズム解析に展開し、麻酔・集中治療医学領域において新しい解釈を加えることを目指した。

2. 研究の目的

SE の発症機序は、感染による全身性炎症反応の結果として生じたびまん性脳障害と考えられている。その病態には、血管内皮細胞の活性化と血液脳関門の崩壊、脳ミトコンドリア機能障害、神経伝達物質の異常、脳循環障害の関与が推定されている。脳ミトコンドリア機能障害においては、脳内 apoptosis の発現と脳内 Ca^{2+} 代謝の関連が報告されているが詳細は明らかではない。そこで日常的に頻用されている麻酔薬(主に鎮静薬)が中枢神経機能障害発生要因なのか、または予防として作用するのかを解明する事は神経集中治療領域において急務な課題である。そこで、本研究では、SE の解明のために脳組織のミトコンドリアを直接組織から抽出し、SE をミトコンドリアに焦点を置いた組織呼吸点から麻酔薬との関連を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Ca を用いたミトコンドリア膜透過性亢進の誘発(Swelling)の評価

正常ラット(各群 $N=3$)の脳を取り出し、脳ミトコンドリアを抽出後、各鎮静薬投与し Ca^{2+} overload を in vitro にて作り出し、ミトコンドリアの膨化 (swelling) を計測する。脳から Parcol 法でミトコンドリア分画を抽出し蛋白定量後、ミトコンドリアを KCl buffer に加え、さらに $CaCl_2$ を加えて light scattering を行い MPT に伴う脳ミトコンドリアの膨化率を測定する。各鎮静薬濃度は以下の通りである。

鎮静薬濃度: プロポフォール control, 16 μ M, 16 μ M, 1.6mM セボフルラン control, 0.36mM, 3.6mM, 36mM ミダゾラム control, 0.3 μ M, 30 μ M, 0.3mM デクスメトミジン control, 0.4nM, 0.04 μ M, 4 μ M

(2)ミトコンドリア Ca 取り込み能 calcium retention capacity (CRC)の評価

正常ラット(各群 $N=3$)の脳を取り出し、Isolation Buffer にて homogenize 後に濃度の異なる Parcol を重層した溶液に homogenize を重層して、超遠心後ミトコン

ドリアを分離する。蛋白定量後、ミトコンドリア蛋白を用いて解析を行う。ATP と ADP およびオリゴマイシンをミトコンドリア懸濁液に加える。ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み能 (Calcium Retention Capacity: CRC) は、各鎮静薬投与後、 $CaCl_2$ を持続投与し、蛍光色素の FuraFF を懸濁液に加え測定を行う。各鎮静薬濃度はセボフルランは評価せず、その他は上記(1)の実験と同様である。

(3)鎮静薬投与後の脳内ミトコンドリア呼吸能の変化

ミトコンドリアは内膜、外膜の二重膜構造からなる細胞内小器官であり、内膜上には呼吸鎖と呼ばれる一連のタンパク群(電子伝達系 + ATP 合成酵素。複合体 I~V)が存在する。電子は複合体 I および II を介して供給され、複合体 I~IV 間を受け渡されていく。電子を受け渡す際、内膜を挟んでプロトン勾配が形成され、このプロトン勾配は様々なミトコンドリア機能の駆動力となる。電子伝達系は複合体 IV で酸素消費を伴う反応 [$1/2 O_2 + 2 H^+ \rightarrow H_2O$] に電子を受け渡すことで集結される。従ってミトコンドリアの呼吸速度の変化を測定することでミトコンドリアの代謝あるいは呼吸機能の活性を知ることができる。そこで、正常ラット(各群 $N=3$)の脳を採取、ホモジネイトし遠心分離後にミトコンドリアを抽出。ミトコンドリアに各鎮静薬投与した後、ミトコンドリア呼吸鎖の Complex I に作用する試薬(促進剤および抑制剤)を順次添加し、高感度ミトコンドリア酸素呼吸測定装置(Oroboros Oxygraph-2k)により酸素消費量を測定した。各鎮静薬濃度はセボフルランは評価せず、その他は上記(1)の実験と同様である。

4. 研究成果

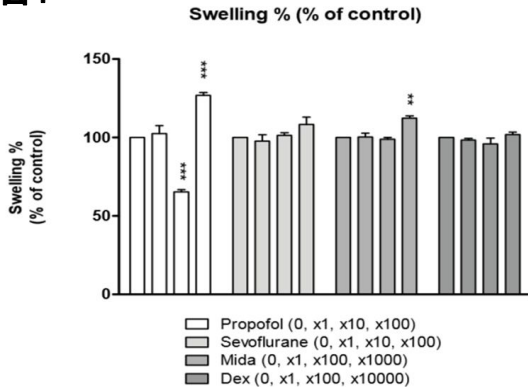
(1) Ca を用いたミトコンドリア膜透過性亢進の誘発(Swelling)の解析結果

細胞内シグナリングの変化と細胞死の軽減を介在しているのがミトコンドリアに存在するミトコンドリア膜透過性遷移孔

(mitochondrial permeability transition pore: mPTP) である。mPTP は、その構造に関しては諸説が混在しているが、内部(マトリックス)に存在する cyclophilin D などからなる構造物でマトリックスからのカルシウム流出系の一つになっている。mPTP は通常は閉じているが過剰な細胞内カルシウム負荷、酸化ストレス(大量の ROS)、低 ATP 状態などによって開口し、開口はミトコンドリアの機能停止、すなわち細胞死を意味する。本結果(図1)において、プロポフォールは投与量によりミトコンドリア膜透過性亢進の誘発(Swelling)に影響を及ぼし、ミトコンドリアの細胞死を誘発する可能性が示唆された。それに比して、セボフルラン、ミダゾラム、デクスメトミジンは大量投与に関わらず、ミ

トコンドリア膜透過性亢進の誘発 (Swelling) に影響を及ぼさない事を示唆した。

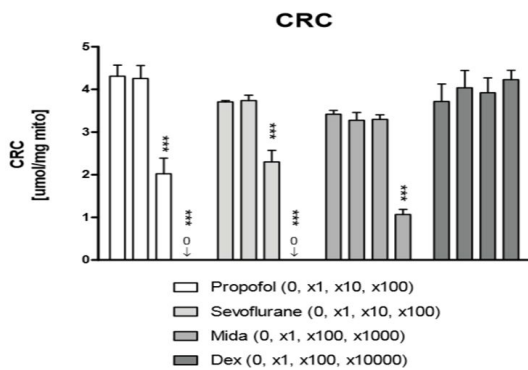
図 1



(2)ミトコンドリア Ca 取り込み能 calcium retention capacity (CRC)の解析結果

本結果 (図 2) よりプロポフォール、セボフルラン、ミダゾラムは用量依存性にミトコンドリアの Ca 取り込み能を抑制させる。一方でデクスメトミジンは、用量に関わらずミトコンドリア Ca 取り込み能に影響をおよぼさなかった。この結果は、(1) Ca 取り込み能を抑制しない、(2) ミトコンドリアに全く影響を及ぼさない作用機序であると推測される。(1) の場合であれば Ca 取り込み能に関連がある敗血症性脳症には、デクスメトミジンは症状増悪を抑制できる鎮静薬である可能性が示唆された。

図 2

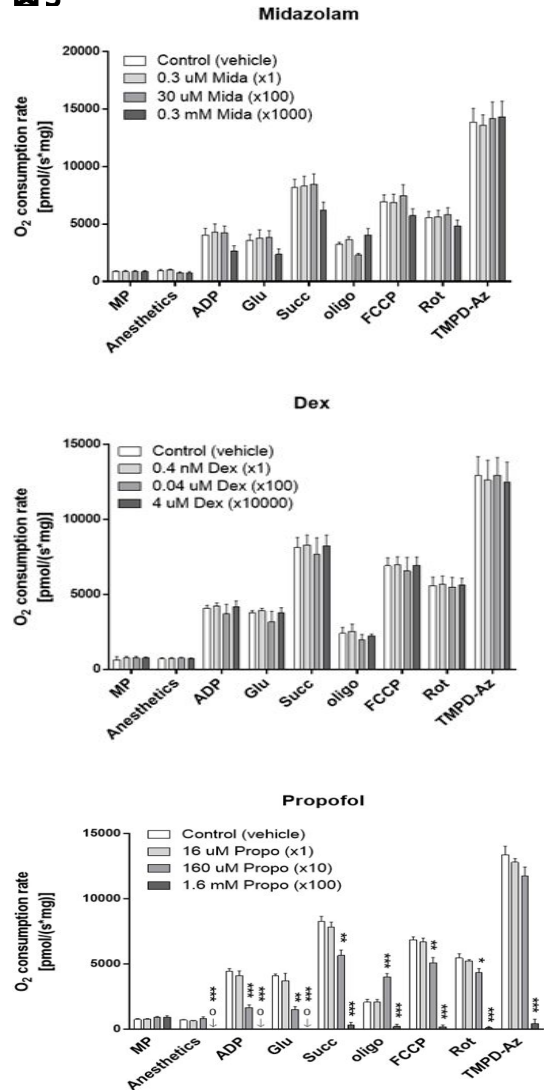


(3)鎮静薬投与後の脳内ミトコンドリア呼吸能の変化の解析結果

本研究結果 (図 3) よりミダゾラム・デクスメトミジンにおいては、高用量投与下でもミトコンドリア呼吸鎖に影響を及ぼさなかった。プロポフォールにおいては、高用量投与下にミトコンドリア呼吸鎖に影響を与えた。ミダゾラム・デクスメトミジン両鎮静薬とも、呼吸鎖での好氣的代謝経路の下流に位置する代謝経路の入力に悪影響を及ぼさ

ないことを示唆した。しかし、これは両鎮静薬の作用機序の観点から、呼吸鎖での主な反応である電子伝達と ATP 産生とは別の作用機序のために影響が出ないことの可能性もあるために更なる解析が必要である。プロポフォールにおいては、160 μ M 群で Oligomycin の値が有意に上昇、1.6mM 群では呼吸鎖の活性自体が抑えられていた。160 μ M で一旦 Oligo の値が跳ね上がっていることから、Propofol が膜の透過性を亢進させていることが考えられた。さらには 1.6mM では膜に対する作用もさらに増悪した可能性が考えられた。

図 3



(4)今後の展望

敗血症性脳症の病態をミトコンドリア機能の観点から解析することを目指して、せん妄などを呈する SE のメカニズム解析の第一段階として、今回の研究では各種鎮静薬が脳ミトコンドリア機能に及ぼす影響を解析した。今後の展望としては、今回は正常モデルのラットを対象に用いたが、SE モデルでの影響を評価し、濃度変化の詳細な設定により、ミトコンドリア呼吸鎖への影響を解析す

る必要があると考えられた。今回得られた鎮静薬と脳の関連を SE 解析に展開していきたい。

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)

[学会発表](計4件)

1 坂本美紀 宮下亮一 沖田綾乃 平林清子 今泉均 内野博之
高用量プロポフォールはミトコンドリア呼吸鎖を抑制する
第62回日本麻酔科学会
2015年5月28日 神戸

2 宮下亮一

フレッシュマンズコース(モーニングレクチャー)
敗血症の初期輸液療法
第42回日本集中治療学会
2015年2月10日 東京

3 宮下亮一 原直美 勇内山瑤子 金子恒樹 安藤千尋 松岡修平 宮田和人 荻原幸彦 畑山聖内 内野博之
鎮静薬が及ぼす脳内酸素代謝及びCa代謝への影響
第41回日本集中治療学会
2014年2月28日

4 宮下亮一 内野博之

シンポジウム
麻酔薬における脳保護機序解明への現状と展望
第60回日本麻酔科学会
2013年5月25日 札幌

[図書](計3件)

1 Ryoichi Miyashita
Springer Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection 2015 631-639

2 宮下亮一 内野博之

秀潤社 麻酔科学文献レビュー 2015-2016
104-119

3 今泉均 宮下亮一

へるす出版 救急医学 Sepsis 最新知見と治療戦略 2015 149-156

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮下亮一 (Miyashita, Ryoichi)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30649281