

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591729

研究課題名（和文） 急性肺障害に対する生体内高エネルギーリン酸化物のホスホエノールピルビン酸の投与効果

研究課題名（英文） Protective effect of phosphoenolpyruvate on acute lung injury

研究代表者

大嶋 嘉明（OSHIMA YOSHIAKI）

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：90233105

研究成果の概要（和文）：Phosphoenolpyruvate（PEP）は内因性の ATP の前駆体であり、膜輸送蛋白を介して特定の細胞膜を透過できる。PEP の虚血再灌流障害肺に対する効果について検討した。兎摘出肺を換気・灌流を継続したコントロール群、虚血再灌流（IR）群、PEP 処置虚血再灌流（PEP-IR）群に分けた（各群 6 匹）。IR 群と PEP-IR 群では、30 分間の安定期の後、60 分間ほど換気・灌流を停止し、その後に換気・灌流を再開した。PEP-IR 群には安定期に灌流液に PEP（1mM）を前投与した。PEP 投与は再灌流後の肺濾過係数と肺湿乾重量比の上昇を抑制し、ピルビン酸濃度を上昇させた。

研究成果の概要（英文）：Phosphoenolpyruvate（PEP）is an endogenous substance that is one of the ATP precursors and can cross some cell membranes via anion exchanger. We investigated the effects of PEP on ischemia/reperfusion（IR）-induced lung injury. Isolated rabbit lungs were divided into the following groups: control（n=6）, perfused and ventilated without ischemia; IR（n=6）, ischemia for 60min, followed by reperfusion; PEP-IR（n=6）, 1mM PEP was administered for 30min before ischemia, followed by IR. The administration of PEP before ischemia significantly attenuated the increases in IR-induced coefficient of filtration and wet to dry ratio, and caused the increase in pyruvate in the perfusate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学
キーワード：周術期管理学

1. 研究開始当初の背景

急性肺障害 (ALI) の薬物療法は未だ確立されていない。選択的肺血管拡張作用を有する一酸化窒素吸入は ALI の予後の改善を期待されたが、肺酸素化能を改善するが、予後までは改善しないことが多施設共同研究で示された (Taylor RW, et al. Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury. JAMA 2004; 291: 1603-9.)。一方で、以前よりアルミトリンなどの低酸素性肺血管収縮 (HPV) を増強する薬剤を投与して、病的肺の酸素化能を改善する試みがなされていたが、副作用などにより臨床応用に至っていないのが現状である (Karzai W, et al. Hypoxemia during One-lung Ventilation: Prediction, Prevention, and Treatment. Anesthesiology 2009; 110: 1402-11)。理想的な HPV 増強剤とは ALI の予後を改善するものであろう。われわれは以前より HPV の機序について研究してきた。HPV の増強因子の一つに低酸素による赤血球変形能の低下がある。解糖系の中間代謝産物であるホスホエノールピルビン酸 (PEP) は、最終産物のピルビン酸に代謝される時に一分子の ATP を生じる。ATP などの高エネルギーリン酸化合物は細胞膜を透過しないが、投与した PEP は唯一、赤血球膜を透過して赤血球変形能を改善するという (Hamasaki N, et al. Regeneration of 2,3-bisphosphoglycerate and ATP in stored erythrocytes by phosphoenolpyruvate. Transfusion 1981; 21: 391-6)。われわれは、投与した PEP は HPV を減弱すると仮定して実験してみたが、逆に PEP は HPV を増強した (大嶋嘉明, 岡崎直人. ホスホエノールピルビン酸は低酸素性肺血管収縮を増強する. 麻酔 2005; 54; 1234-40)。

われわれは、生体内に存在する HPV 増強剤を偶然に見つけたわけである。最近、PEP はオレイン酸誘導による肺障害に対する保護効果があると報告された (Golbidi S, et al. Preventive effects of phosphoenolpyruvate on hypoxemia induced by oleic acid in guinea pigs. Biol Pharm Bull. 2003; 26: 336-40)。われわれは、PEP 投与は、肺酸素化能を改善し、かつ ALI を改善するのではと考えた。

2. 研究の目的

ALIの病態生理は肺泡領域を中心とした好中球主体の急性炎症と肺泡上皮細胞、血管内皮細胞の障害、および肺微小血管透過性の亢進である。今回、ALIの一つの動物モデルである摘出灌流肺の再灌流障害に対するPEPの保護効果について検討した。

3. 研究の方法

家兎をペントバルビタール25mg/kg耳静脈投与、ケタミン30mg/kg筋注で麻酔し、1000IU/kg静注でヘパリン化した。気管切開し、空気、一回換気量6ml/kg、40回/分、PEEP2 cmH₂O で換気した。胸骨正中切開し、肺動脈に送血用、左房に脱血用のカニューレを留置し、灌流肺標本を作製した。左房脱血管から血液成分を十分に廃棄した後に、physiological salt solution (PSS液: NaCl;119mM, KCl;4.7mM, MgSO₄;1.17mM, NaHCO₃;22.61mM, KH₂PO₄; 1.18mM, CaCl₂;3.2mM) を、リザーバーを介して30ml/kg/minの定流量で再灌流した。PSS液にはHES (5g/dl)、ブドウ糖 (100mg/dl)、インスリン (20mU/dl) を添加した。リザーバー内の灌流液のPCO₂が40mmHg前後になるように、灌流開始直後より換気ガスにCO₂を混入した。灌流肺標本を一括して縦

隔より摘出し、上皿電子秤（精度10mg）上のチャンバー内に納め、肺重量変化を持続的に測定できるようにした。チャンバー内は38°Cに加温、加湿した。少量のNaHCO₃を追加投与して、灌流液のpHを7.35~7.45に維持した。30分の安定期を設けた。

摘出灌流肺を虚血再灌流（IR）群、PEP処置虚血再灌流（PEP-IR）群、換気・灌流を中断なく継続したコントロール（Cont）群に分けた。PEP-IR群には安定期に灌流液にPEP（1mM）を前投与した。IR群とPEP-IR群では、30分間の安定期の後、60分間ほど換気・灌流を停止し、その後に換気・灌流を再開した。

肺濾過係数（kfc）、灌流液のブドウ糖・ピルビン酸・乳酸・LDH濃度を安定期終了前、再灌流30分後、再灌流60分後に測定した。また、実験終了時に、右肺に生食20mlを4分割して気管注入し、気管支肺胞洗浄液（BAL）を回収し、BALのmyeloperoxidase（MPO）活性を測定した。また、左肺を摘出し、直後の湿重量と乾燥後の乾重量から肺湿乾重量比を算出した。

Kfcの測定は下記のDrakeの方法に準じて行った。まず、換気・灌流を止めて、送血管と脱血管の間のシャントを開いて、LAPとPAPを肺毛細血管圧に収束させた。肺重量が少しも増加しない最大限の高さまでリザーバーを上げた。その位置から急にリザーバーを7mmHg分ほどさらに上げて、その高さを7分間維持し、肺重量変化を記録した。5秒毎の重量増加分の対数を時間軸（単位は分）に対して片対数グラフに取った。二本の直線が得られるが、緩徐な傾きの直線を外挿してy切片を求め、y切片の真数を算出した。y切片の真数を1mmHg負荷、100g肺当たり換算した値を求めるKfcとした。

統計はGraphPad Software社のPrism[®] ver. 5（San Diego, CA, USA）で行った。p<0.05を有意差ありとした。

4. 研究成果

（1）結果

再灌流障害によるKfcの上昇は、PEP処置により有意に抑制された（図1）。再灌流障害による肺湿乾重量比の上昇は、PEP処置により有意に抑制された（図2）。ブドウ糖濃度は3群ともに時間経過で低下したが、3群間に差はなかった。ピルビン酸濃度は3群ともに時間経過で上昇したが、全ての測定時期でPEP-IR群で高値であった（図3）。乳酸濃度は3群ともに時間経過で上昇したが、3群間に差はなかった。LDHは3群ともに時間経過で上昇したが、3群間に差はなかった。BAL中のMPO活性は3群間に差はなかった。

（2）考察

解糖系中間代謝産物であるPhosphoenolpyruvate（PEP）の虚血再灌流障害肺に対する保護効果について検討した。PEP 1 mMの前投与により、再灌流30分後と60分後の濾過係数の増加および肺の湿乾重量比の増加が抑制された。

Golbidiらは、guinea pigのin vivoにおいて、PEP 0.2mMの前投与はオレイン酸誘導の肺血管透過性の亢進とPaO₂の低下を予防したと報告した。彼らは、肺血管透過性をエバンスブルー色素を使った組織学的検査で評価している。Thelinらは、ブタにおいて、人工心肺中の心筋保護液にPEPとATPを混じると離脱後の心拍出量が保持されたと報告した（Thelin S, et al. Functional effects of phosphoenolpyruvate and ATP on pig hearts in cardioplegia and during reperfusion. Eur Surg Res. 1987; 19: 348-56）。北城らは、犬において、PEPを灌流保存液に添加すると、腎臓の単純冷却保存期間を延長させ、移植腎の生着率を増加させた報告した（北城守文, 他. 腎移植における灌流・冷却保存液へのホスホエノールピルビン酸の応用. 福大医紀. 1994; 21:

301-10)。

ATP などの高エネルギーリン化合物は細胞膜を透過しないのは、それらを細胞内に保持できる好都合な性質であるが、一旦、細胞のエネルギー状態が悪化した時に、外からATP そのものを供給しても細胞膜を透過しないので、細胞のエネルギー状態は改善されない。

PEP からピルビン酸への代謝経路でピルビン酸キナーゼ (PK) が必要とされるが、PK は98%が細胞内に存在するという。今回の実験では、PEP が障害された血管内皮細胞膜を透過して、ピルビン酸に代謝されたと考えられた。

虚血再灌流障害による微小血管障害を評価するのにいくつかの方法がある。肺の組織学的検査は、障害の部位や範囲を評価できるが、微小血管のバリアー機能について定量的な情報を十分には提供しない。気道への蛋白漏出や肺湿乾重量比は定量的な測定値ではあるが、毛細血管圧や微小血管圧に依存して変化する。一方、摘出灌流肺において、等重量の条件下に測定する Kfc は、反復して測定することのできる定量的な指標である。Kfc 測定は、再灌流障害やその他の肺障害による微小血管透過性の変化を評価する研究で行われている。高い Kfc は毛細血管透過性亢進を意味する。われわれの研究でも Kfc と肺湿乾重量比の結果は一致した。

PEP が肺血管の細胞膜を透過して作用を発現したことを証明するためには、肺組織のATP、ADP、AMP などの adenine nucleotides やピルビン酸濃度などを測定すべきであると考えられた。

臨床的には虚血再灌流障害肺は人工心肺や肺移植において問題となる。PEP をドナー肺の灌流保存液に添加すると、保存期間が延長したり、生着率を増加させる可能性がある

と考えられた。

生体内で唯一、赤血球膜や腎細胞膜を透過できる高エネルギーリン化合物である PEP 前投与の虚血再灌流障害肺に対する効果を調べた。PEP の前投与は肺虚血再灌流障害を軽減した。

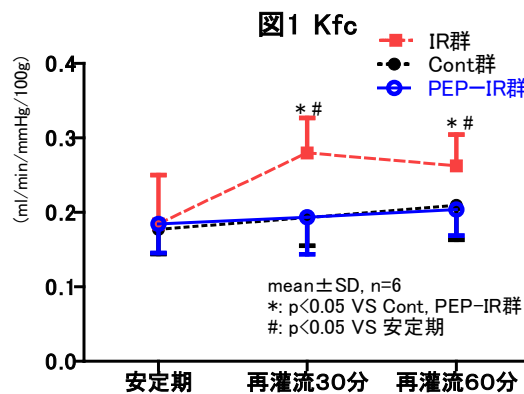


図2 肺湿乾重量比

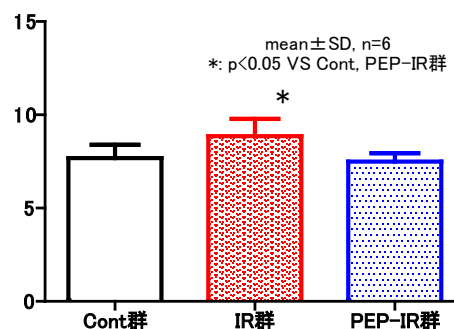
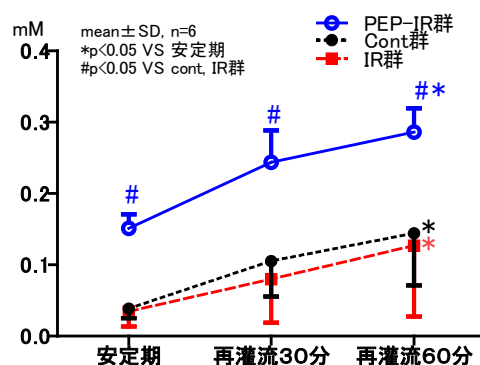


図3 ピルビン酸



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 2 件)

① ウサギ虚血再灌流障害肺に対するホ

スホエノールピルビン酸の保護効果

➤ 第59回日本麻酔科学会

➤ 大嶋 嘉明、稲垣 喜三、坂本成司、
船越多恵、持田晋輔、遠藤 涼

➤ 神戸ポートピアホテル(神戸)、2012
年06月07日～2012年06月09日

② Desfluraneの虚血前吸入はウサギ摘出
肺において肺虚血再灌流障害を増強す
る

➤ 第 60 回日本麻酔科学会

➤ 大嶋嘉明、倉敷達之、原田
知実、青木亜紀、仲宗根
正人、稲垣喜三

➤ ロイトン札幌(札幌)、2013年05月
24日～2013年05月26日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 嘉明 (OSHIMA YOSHIAKI)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：90233105