

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592267

研究課題名(和文)血小板ミトコンドリアの呼吸機能とCa²⁺取り込み能に対する吸入・静脈麻酔薬の影響研究課題名(英文)Effects of inhalation and intravenous anesthetic drugs for Ca²⁺ uptake capacity and respiratory function in mitochondria of the platelets.

研究代表者

野口 将(NOGUCHI, MASASHI)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：70343522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：全血から血小板を分離し、血小板ミトコンドリアにセボフルラン(0.4, 1.6, 3.2, 8mM)、プロポフォール(5, 30, 60, 150 µg/ml)、ミダゾラム(0.1, 2.0, 10, 20 µg/ml)を暴露した。酸素消費量を測定し組織呼吸の変動からミトコンドリア呼吸鎖の各複合体(～)の機能を解析した。臨床濃度の麻酔薬暴露でミトコンドリア呼吸能は亢進した。ミトコンドリアの呼吸を抑制した濃度はセボフルランで臨床濃度の20倍、プロポフォールは30倍という高濃度で、複合体Iが複合体IIに比べて強かった。セボフルランの抑制作用は臨床濃度の4倍から認められた。ミダゾラムでは有為差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：In freshly isolated and permeabilized human platelets the commonly used anesthetic agents sevoflurane and propofol stimulate certain aspects of mitochondrial respiratory capacity at clinically relevant concentrations. At higher concentrations, these agents displayed a dose-dependent inhibition of complex I and II-supported respiration. The increased respiratory capacity induced by sevoflurane and propofol might be beneficial and the inhibition of respiration could be relevant to situations of prolonged or excessive exposure, especially in situations of tissue accumulation of these anesthetic agents.

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：ミトコンドリア 麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

近年、麻酔薬による臓器保護作用と細胞障害作用に注目が集まっており、麻酔薬の種類によって臓器保護や細胞障害の程度が異なる可能性も示唆されているが、詳細は明らかになっていない。

(1) 研究の学術的背景

現在、麻酔科学領域での懸案として麻酔薬の長期予後への影響が挙げられている。中でも、麻酔薬の神経毒性の問題や免疫機構への影響などが懸念されているが、その詳細はいまだ明らかではない。現状では、麻酔薬による臓器保護作用と細胞障害作用の2面性を有する可能性が想定されているが、麻酔薬の血球成分(白血球や血小板)の傷害機構についての解析は全く手付かずの状況である。麻酔薬の臓器障害として、脳障害を例に挙げるなら、そのメカニズムの1つとしてカルシウムの恒常性の異常が指摘されている。この細胞内カルシウム代謝異常はアポトーシスを誘発することが明らかとなっており、過剰な細胞質内カルシウム濃度の上昇が、小胞体(ER)膜上の Ca^{2+} -ATPase を活性化し Ca^{2+} の細胞内への流入を促進して、ER内の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、ERの Ca^{2+} 放出部位の近くに高濃度の Ca^{2+} が存在してミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みに関与することから、ERとミトコンドリアの連関はミトコンドリアに対する Ca^{2+} overload を引き起こし、膜電位の低下に伴うミトコンドリア内膜の透過性亢進 (Mitochondrial Permeability Transition, 以下 MPT) を招き、これによりミトコンドリア機能不全を引き起こし、アポトーシスを誘発すると考えられている。また、ミトコンドリアの Uniporter を介した Ca^{2+} の取り込みは、呼吸鎖における ATP 産生と競合していることもその原因となると考えられている。近年、脳だけではなく、様々な疾患で白血球や血小板のミトコンドリア機能を評価することで、その機能と病態の重症度が相関することが報告されている。本研究では、麻酔薬暴露によって機能低下が誘発される可能性のある臓器の中から血小板を選択し、そのミトコンドリア機能に焦点を置き、麻酔薬の臓器障害の詳細を血小板ミトコンドリアの呼吸機能から検討する。得られた結果を基に、ミトコンドリア機能と長期予後の関係ならびにミトコンドリア機能が麻酔薬暴露後の長期予後のバイオマーカーとなりえる可能性を検討する。この試みは、これまで不明であった血小板のミトコンドリアの組織酸素代謝に対する麻酔薬の及ぼす影響に新しい解釈を加え、新規の麻酔法構築のための糸口となり、麻酔科学領域での安全性と信頼性を高めることを目指す。

(2) 研究期間内に明らかにしようとする事柄

本研究では、健康成人ボランティアに対し、

吸入麻酔薬や静脈鎮静薬などの様々な薬剤の血小板のミトコンドリアの組織酸素代謝への影響をミトコンドリア呼吸鎖における組織呼吸の変動に焦点を当てて麻酔薬の投与濃度や投与時間を変えて解析する。血小板のミトコンドリア機能の役割を明確にする。血小板のミトコンドリア呼吸機能を基盤としたこの様な研究により、麻酔科学分野における安全性と信頼性の確立とより良い麻酔法を構築することを目的としている。

(3) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点と、予想される結果

本研究において学術的に独創的である点は、高感度のオキシグラフであるオロボロス™ (オーストリア製、当研究室に設置済み) を用いて、血小板のミトコンドリア機能を酸素消費の点から解析することである。オロボロスは数種類の試薬を用いる事で白血球や血小板のミトコンドリア呼吸鎖の複合体 (I~V) のうち、どの部位がどの程度の障害を受けているかを評価することが可能である。オロボロスの有用性は広く認められており、細胞生理学の分野ではすでに確立した測定法であるが、現在のところ、オロボロスを用いて麻酔薬が血小板のミトコンドリアを介した組織呼吸機能に及ぼす影響を検討した報告はない。予測される結果として、麻酔薬の種類によって、濃度依存性もしくは投与時間依存性に血小板のミトコンドリア機能障害を招く可能性が考えられる。さらに、血小板のミトコンドリア機能障害が麻酔薬暴露後長期の予後のバイオマーカーとなりえる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、麻酔薬暴露時の血小板ミトコンドリアの呼吸機能と Ca^{2+} 取り込み能を時間経過に従い測定し比較検討することで、麻酔薬の有する臓器保護作用もしくは細胞障害作用を解明し、より安全な周術期医療を確立する事を目的とする。また在院日数、最終的な転帰(治癒、死亡など)についても解析し、ミトコンドリア機能と予後の関係ならびにミトコンドリア機能が麻酔薬暴露後の長期予後のバイオマーカーとなりえる可能性を検討する。この試みは、麻酔薬の組織酸素代謝に及ぼす影響に新しい解釈を加え、新規の麻酔法構築のための糸口となり、麻酔科学領域での安全性と信頼性を高めることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、健康成人ボランティアと全身麻酔症例から全血を採取後に血小板を分離し、高感度オキシグラフ (オロボロス™) を用いて、組織呼吸の変動からミトコンドリア呼吸鎖の機能の関係を解析する。ミトコンドリア呼吸能は、数種類の試薬を用いる事でミトコンドリア呼吸鎖の複合体 (I~V) のうち、

どの複合体がどの程度の障害を受けているかを包括的に解明する。蛋白定量後、25 μ g/ml のミトコンドリアを KCL buffer に加え、さらに digitonine、malate、pyruvate を注入しミトコンドリアの膜透過性を上げる。その後、ミトコンドリアの呼吸鎖 complex I-V に作用する以下の薬物を添加し、クラーク酸素電極を用いて、電子伝達系の H^+ 濃度勾配を利用してミトコンドリア酸素消費量を測定し、白血球、血小板のミトコンドリア呼吸能を解析する。ミトコンドリア呼吸鎖に作用する薬剤としては、Glutamate 4 μ l of 2.5M (complex I を促進)、Succinate 16 μ l of 1.25M (complex III を促進)、Origomycin 2 μ l of 1mg/ml (complex V を抑制)、Rotenone 2 μ l of 2M (complex I を抑制)、antimycin 2 μ l of 1mg/ml (complex III を抑制)、FCCP titration 0.2~2 μ l of 2M \times n (脱共役剤、 H^+ を強制的にミトコンドリア内に透過させて酸素消費を増加させる) を用いる。

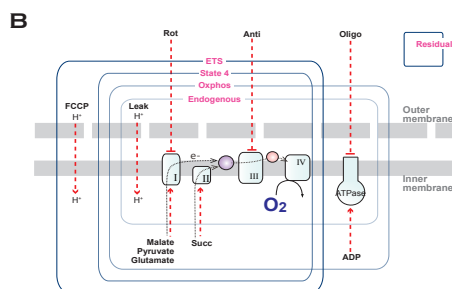
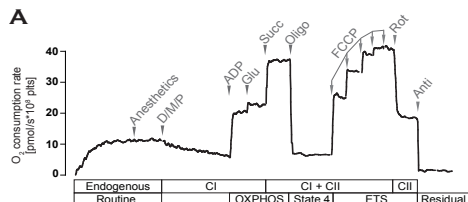
4. 研究成果

全血から血小板を分離し、血小板ミトコンドリアにセボフルラン (0.4, 1.6, 3.2, 8mM)、プロポフォール (5, 30, 60, 150 μ g/ml)、ミダゾラム (0.1, 2.0, 10, 20 μ g/ml) を暴露した。酸素消費量を測定し組織呼吸の変動からミトコンドリア呼吸鎖の各複合体 (I~V) の機能を解析した。

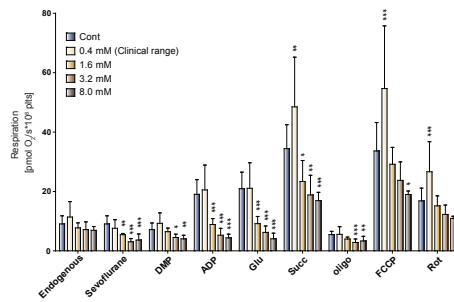
臨床濃度の麻酔薬暴露でミトコンドリア呼吸能は亢進した。ミトコンドリアの呼吸を抑制した濃度はセボフルランで臨床濃度の 20 倍、プロポフォールは 30 倍という高濃度で、複合体 I が複合体 II に比べて強かった。セボフルランの抑制作用は臨床濃度の 4 倍から認められた。ミダゾラムでは有為差を認めなかった。

A 高感度オキシグラフ (オロボロス™) を用いた組織呼吸の変動

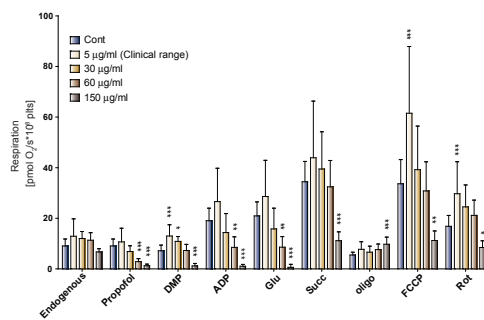
B ミトコンドリアの呼吸鎖 complex I-V と作用する薬物の関係



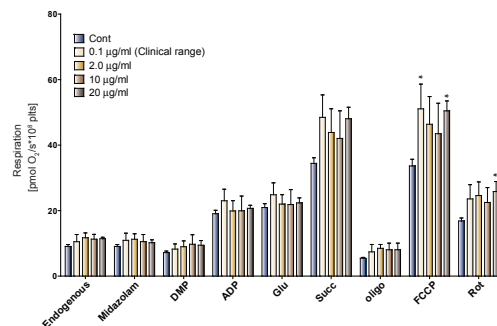
C セボフルラン暴露による酸素消費量



D プロポフォール暴露による酸素消費量



E ミダゾラム暴露による酸素消費量



C, D, E ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

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 1 件)

① 臼井大記、内野博之、The influence of anesthetic agents on mitochondrial function as determined by high-resolved respirometry of human blood cells. Euro

anesthesia 2012、
2012年6月9日～6月12日、パリ、フ
ランス。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 将 (NOGUCHI, Masashi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号： 70343522

(2) 研究分担者

岩瀬 直人 (IWASE, Naoto)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号： 40408141

安藤 千尋 (ANDO, Chihiro)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号： 50420980

富野 美紀子 (TOMINO, Mikiko)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号： 30459523

(3) 連携研究者

内野 博之 (UCHINO, Hiroyuki)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号： 60266476