

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592297

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎に対する麻酔薬の肝虚血保護法の検討：糖尿病薬との相互作用

研究課題名(英文)Effects of volatile anesthetics on ischemia-reperfusion injury in Non-alcoholic steatohepatitis rats: interaction with anti-diabetic drugs

研究代表者

趙 成三(CHO, Sungsam)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：90325655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常ラットでは、揮発性麻酔薬セボフルラン、チアゾリン薬ピオグリタゾン、インクレチン薬リラグルチドの虚血前投与によって肝細胞傷害の軽減とアポトーシスの抑制が認められ、生存率も高かった。非アルコール性脂肪性肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis; NASH)ラットでは肝虚血再灌流傷害が正常ラットよりも強く生存率も低下した。また、薬剤単独投与による保護効果も減弱することが明らかとなった。揮発性麻酔薬セボフルラン、チアゾリン薬ピオグリタゾンの併用群では、それぞれの単独投与と比較して、肝細胞傷害の軽減とアポトーシスの抑制が認められ、生存率も高かった。

研究成果の概要(英文)：Volatile anesthetic sevoflurane, thiazolidinedione pioglitazone, and glucagon-like peptide 1 liraglutide administered before ischemia would prevent ischemia-reperfusion-induced liver damage, apoptosis, or survival rate. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) rats resulted in more ischemia-reperfusion-induced liver damage and decreased a survival rate as compared with normal rats. And the protective effects of sevoflurane, pioglitazone, and liraglutide have been inhibited in NASH rats. The combination of sevoflurane and pioglitazone administered before ischemia would prevent ischemia-reperfusion-induced liver damage, apoptosis, or survival rate in NASH rats. This combination has better protection than sevoflurane, pioglitazone, and liraglutide alone in NASH rats.

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：非アルコール性脂肪肝炎 虚血再灌流傷害 肝臓 揮発性麻酔薬 チアゾリン薬 インクレチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) の病態と疫学: NASH は、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などの生活習慣病に合併する脂肪肝に、活性酸素や異常なサイトカインによる炎症が発生して起こる進行性の病変で、10年後に10~20%は肝硬変へ至ると報告されている。日本人の頻度は1%程度と言われており、およそ100万人のNASH患者がいると推定されている。NASHの成因については、肝臓に蓄積した脂肪細胞によるインスリン抵抗性と脂質代謝障害が関与している。

(2) NASHでは肝虚血傷害が正常肝より強くなる: 肝移植ドナーの脂肪肝およびNASHは、移植後の無機能肝リスクとして報告されており、脂肪肝を有する患者の肝切除術後死亡率も正常肝患者に比べて高率(14% vs 2%)である (Selzner M, *Semin Liver Dis* 21: 105-113; 2001)。この原因としてNASHは正常肝と比較して虚血再灌流障害が強くなること (Teoh NC, *Hepatology* 51: 996-1006; 2010) や肝再生能が障害されていることが挙げられている。

(3) 揮発性麻酔薬による肝虚血再灌流保護作用: イソフルランおよびセボフルランはラット肝虚血再灌流モデルで肝保護作用を有すること、このメカニズムとして様々な臓器において致死的ストレス後の細胞機能維持に働くストレス誘導蛋白の一つであるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の誘導が報告されている (Schmidt R, *Ann Surg* 245: 931-42; 2007)。近年、臨床においてもセボフルランの虚血前短時間投与が、肝切除患者の術後肝酵素の上昇抑制と術後合併症の低下させることが報告されている (Beck-Schimmer B, *Ann Surg* 248: 909-18; 2008)。しかし、正常肝と比較して虚血再灌流障害が強くなるNASHにおける検討はなされていない。

(4) チアゾリン薬、インクレチンによるNASHの進展予防と直接的な肝虚血保護作用: 糖尿病薬のチアゾリン薬は、peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR-) に作用し、インスリン抵抗性を改善するとともにNASHの進展を予防する。また、心臓や肝臓を含む様々な臓器の虚血再灌流障害に対して保護的に働く (Somi MH, *Transplant Proceed* 41: 4105-9; 2009)。消化管ホルモン(インクレチン)のglucagon like peptide-1 (GLP-1) は、膵細胞に作用しインスリン分泌を促すが、肝細胞の受容体にも作用し脂肪細胞の蓄積を阻害しNASHの進展を予防する。心虚血再灌流保護作用や血管内皮細胞の酸化ストレスに対してもHO-1の誘導により保護的に働くことが報告されている (Oeseburg H, *Arteroscler Thromb Vasc Biol* 30: 1407-14; 2010)。

2. 研究の目的

正常肝において揮発性麻酔薬およびチアゾリン薬が虚血再灌流保護作用を有することが報告されているが、NASHにおける検討はなされていない。2型糖尿病のインスリン抵抗性やインスリン分泌低下に対する治療薬であるチアゾリン薬ならびにGLP-1はNASHの進展予防の目的で、今後使用される頻度が増加することが予想される。これらの相互作用を検討することで、NASH患者の周術期における有効な肝保護法を確立できる可能性が考えられる。今回、正常肝ラットとNASHラットの肝虚血再灌流モデルを用い、揮発性麻酔薬と糖尿病治療薬の相互作用を検討し、より有効な肝虚血保護法を確立させること、ならびにこの保護メカニズムについても検討する。

現在臨床使用可能な薬剤の相互作用を検討し、有効な肝虚血保護法を開発することで、臨床への応用の可能性を検討し、またそのメカニズムについて検討を行うことで、より有効な保護法の開発へ寄与できると考える。生活習慣病の増加に伴い、本邦でもNASHは増加しており、効果的な肝保護法を開発することは、術中虚血再灌流が行われる肝切除術、肝移植術、人工心肺手術など多くの周術期管理においても有用であると考えられる。

3. 研究の方法

正常肝ラットとNASHラットの肝虚血再灌流モデルを用い、1) 虚血前に揮発性麻酔薬SEVOを投与する群、2) チアゾリン薬のPIOまたはGLP-1アナログのLIRAを虚血前3日間または4時間前1回投与する群、3) SEVOとPIOまたはLIRAの併用する群、4) それぞれの群にPI3K-Akt、eNOS、HO-1阻害薬を投与する。再灌流後6時間後に採血し(AST、ALT、 γ -GSTの測定)、HE染色、TUNEL染色、phospho-PI3K、phospho-eNOS、HO-1免疫染色用肝組織の採取を行い、閉腹し術後2週間の生存率を調べる。

(1) 実験方法 - 1

NASHラット作成法: 雄性ウイスターラット(190-200g)にmethionine choline deficient diet; MCDD (Oriental Yeast社、東京)を投与し、正常ラット群にはMF diet (Oriental Yeast社、東京)を投与し、2週間後に実験を開始する (Yoshikawa S, *Hepatol Res* 40: 823-31; 2010)。

肝虚血再灌流モデル: ペントバルビタール腹腔内投与にて基礎麻酔後、右総頸静脈に静脈ルート(輸液ならびに薬剤投与ルート)、右大腿動脈にA-lineを確保(採血用)、閉腹し90分の部分肝虚血(70%)を行う。

肝細胞障害の指標: 再灌流6時間後に採血によるAST、ALT、 γ -GSTの測定、組織標本作製し、HE染色による組織学的障害の程度、TUNEL染色によるアポトーシスの程度(TUNEL陽性細胞の割合)

生存率: 術後の生存率を2週間調べる。

(2)正常およびNASHラットでSEVO虚血前投与による保護効果

シャム群：麻酔法はペントバルビタール（PENT）で行い、外科的処置のみで肝虚血は行わない。コントロール群：麻酔法はPENTで行い、90分の部分肝虚血(70%)を行う。SEVO長時間群：麻酔法はPENT基礎麻酔、SEVO4%を虚血前15分前まで4時間投与後、PENT持続静脈内投与で行い、肝虚血を行う。(Schwer *CI, Int J Biochem Cell Biolo*; 2010) SEVO短時間群：麻酔法はPENT基礎麻酔後、持続静脈内投与し、SEVO4%を虚血前15分前まで15分間投与し、肝虚血を行う。(Beck-Schimmer *B, Ann Surg* 248: 909-18; 2008)

(3)正常およびNASHラットでPIOまたはLIRAの虚血前投与による保護効果

PIO 3日間投与群：術前3日間1日1回20 mg/kg 経口投与と術当日虚血4時間前に5 mg/kg 腹腔内投与を行い、肝虚血を行う。LIRA 3日間投与群：術前3日間1日2回と術当日虚血4時間前に100 µg/kg皮下投与を行い、肝虚血を行う。PIO または LIRA 1回投与群：術当日虚血4時間前にPIOを5 mg/kg腹腔内投与またはLIRAを100 µg/kg皮下投与を行い、肝虚血を行う。

(4)正常およびNASHラットでSEVOとPIOまたはLIRAの虚血前投与による相互作用
SEVOとPIOまたはLIRAの虚血前投与法を組み合わせる群で、肝細胞障害の指標、生存率を調べる。

(5) 分子機序の解明：PI3K-Akt、eNOS、HO-1の関与

上記の群で、再灌流6時間後の肝組織をphospho-PI3K、phospho-eNOS、HO-1の免疫染色を行う。阻害薬群：それぞれの群にPI3K-Akt、eNOS、HO-1阻害薬であるwortmanninを0.6 mg/kg、NG-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)を25 mg/kgの再灌流5分前に投与、tin protoporphyrin IX(SnPP)を50 µM/kg虚血5分前投与し、肝細胞障害の指標、生存率を比較する。

4. 研究成果

正常ラットでは、SEVO虚血前の短時間ならびに長時間投与またはPIO、LIRAの3日間投与ならびに1回投与によって肝細胞傷害の軽減とアポトーシスの抑制が認められ、生存率も高かった。NASHラットでは肝虚血再灌流傷害が正常ラットよりも強く生存率も低下した。また、SEVOやPIO、LIRAによる保護効果も減弱することが明らかとなった。実験3)正常およびNASHラットで揮発性麻酔薬SEVO虚血前投与とチアゾリン薬PIOまたはインクレチンのLIRAの虚血前投与による相互作用を調べた。実験内容)SEVO長時間群(SEVO 4%を虚血前15分前まで4時間投与し、肝虚血)、SEVO短時間群(SEVO4%を虚血前15分前まで15分間投与し、肝虚血)とPIO3日間投与群、LIRA 3日間投与群、PIOまた

はLIRA 1回投与群を組み合わせ、それぞれの群で肝細胞障害の指標、生存率を調べた。結果)それぞれの群で、正常およびNASHラットでの肝細胞障害の指標、生存率を検討したが、正常ラットにおいては、保護作用における相互作用を認めなかった。NASHラットでは、PIO 3日間投与群+SEVO短時間群が、単独群と比較して肝細胞障害の低下を認めた。

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 8件)

豊田智美、戸坂真也、戸坂玲子、前川拓治、趙成三、江口晋、中島正洋、澄川耕二、Milrinone-induced postconditioning reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: the roles of phosphatidylinositol 3-kinase and nitric oxide, *J Surg Res*, 査読有り、186、441-451、2014

DOI: 10.1016/j.jss.2013.09.007.

鶴長容子、戸坂真也、戸坂玲子、三好宏、前川拓治、趙成三、澄川耕二、Olprinone, a phosphodiesterase type III inhibitor, has pharmacological postconditioning properties against renal and heart ischemia-reperfusion injury, *Anesth Resus*, 査読有り、49、75-79、2013

柴田伊津子、趙成三、吉富修、嬉野浩行、前川拓治、原哲也、澄川耕二、Milrinone and levosimendan administered after reperfusion improve myocardial stunning in swine, *Scand Cardiovasc J*, 査読有り、47、50-57、2013

DOI: 10.3109/14017431.2012.732236.

前川拓治、趙成三、一ノ宮大雅、戸坂真也、松本周平、柴田伊津子、原哲也、澄川耕二、Fasudil administered during early reperfusion protects against myocardial infarction through activation of PI3K/Akt/NOS pathway in rats, *Circ Cont*, 査読有り、33、96-103、2012

吉富修、趙成三、原哲也、柴田伊津子、前川拓治、嬉野浩行、澄川耕二、Direct protective effects of dexmedetomidine against myocardial ischemia-reperfusion injury in anesthetized pigs, *Shock*, 査読有り、38、92-97、2012

DOI: 10.1097/SHK.0b013e318254d3fb.

一ノ宮大雅、趙成三、東島潮、松本周平、前川拓治、澄川耕二、High-dose fasudil preserves postconditioning against myocardial infarction under hyperglycemia in rats: role of mitochondrial KATP channels, *Cardiovasc Diabetol*, 査読有り、22、2012、

DOI: 10.1186/1475-2840-11-28

松本周平、趙成三、戸坂真也、東島潮、前川拓治、原哲也、澄川耕二、Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone- induced postconditioning in rat hearts、Cardiovasc Diabetol、査読有り、12、2012、

DOI: 10.1186/1475-2840-11-4

酒井一介、趙成三、柴田伊津子、吉富修、前川拓治、澄川耕二、Inhalation of hydrogen gas protects against myocardial stunning and infarction in swine、Scand Cardiovasc J、査読有り、46、2012、

DOI: 10.3109/14017431.2012.659676

〔学会発表〕(計 3件)

趙成三、前川拓治、吉富修、一ノ宮大雅、槇田徹次、代謝性アシドーシスがミルリノンとドブタミンの心行動態に与える影響、第41回日本集中治療医学会学術集会、2014年2月28日、国立京都国際会館(京都)

趙成三、Anesthesiological Features of Living Donor Liver Transplantation operations、Congress of Surgeons of Kazakhstan with International Participation、2013年4月8日、Almaty

趙成三、麻酔関連薬の肝・腎保護作用に関する現状、日本心臓血管麻酔学会第16回学術大会、2011年10月8日、旭川グランドホテル(北海道)

〔図書〕(計 3件)

趙成三、前川拓治、克誠堂出版、- For Professional Anesthesiologists - 吸入麻酔薬心血管作動薬 山陰道明、平田直之編 心血管作動薬の使用法、8. アルプロスタジールアルファデクス、2013、163-177

趙成三、克誠堂出版、- For Professional Anesthesiologists - 心血管作動薬 土田英昭編 . 心血管作動薬の使用法、9. ホスホジエステラーゼ 阻害薬、2013、204-219

趙成三、克誠堂出版、- For Professional Anesthesiologists - 心血管作動薬 土田英昭編 . 心血管作動薬の使用法、8. アルプロスタジールアルファデクス、2013、196-203

〔その他〕

ホームページ等

<http://research.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST>

<http://gyoseki.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST>

6. 研究組織

(1)研究代表者

趙成三(CHO Sungsam)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号: 90325655