

論文要旨

Effects of olprinone on hepatosplanchnic circulation and mitochondrial oxidation in a porcine model of endotoxemia

〔ブタエンドトキシン血症モデルにおけるオルプリノンの肝循環とミトコンドリア酸化に与える影響〕

國吉 保

【序論および目的】エンドトキシンは、血行動態を破綻させ多臓器不全を引き起こす原因物質の一つである。その中でも、エンドトキシン血症による肝不全は集中治療領域では大きな問題となっている。近年、動物実験において、強心作用と血管拡張作用を持つオルプリノン (phosphodiesterase III阻害薬) が、エンドトキシンにより低下した肝血流量と肝酸素供給量を有意に改善させることが報告されている。しかし、敗血症時には、十分な心拍出量や酸素供給量にもかかわらず高乳酸血症を呈することから、シャントのような血流再分配による組織の低酸素領域が生じている可能性が論じられ、さらに近年では、酸素供給量とエネルギー産生量がカップリングしない cytopathic hypoxia (細胞内酸素代謝異常) の概念が提唱され注目を浴びている。これらの病態が敗血症時に存在すれば、薬物でいくら臓器血流量を増やしても、適切な細胞内酸素化や細胞内エネルギー状態を保障することはできなくなる。そこで今回我々は、エンドトキシン血症時の肝酸素運搬量、肝酸素消費量の変化、肝組織内ミトコンドリアの酸化-還元状態の変化を測定し、オルプリノンが肝循環だけでなく肝ミトコンドリアの酸化状態にどのような効果を示すのかをブタエンドトキシン血症モデルを使用し検討したので報告する。

【材料および方法】SPF (specific pathogen -free) のブタ 14 頭 (体重 23.0~30.0kg) を生理食塩水群 (CONT group, n=7) とオルプリノン群 (OLP group, n=7) に無作為に分けて実験を行った。ケタミン 25mg/kg、硫酸アトロピン 0.5mg を筋注し静脈ルートを確保後、気管挿管を行い、ペントバルビタール 20mg/kg の静注により麻酔導入を行い、吸入酸素濃度 50% の条件下に動脈血中炭酸ガス濃度 35~40mmHg となるように調節呼吸を開始した。麻酔はイソフルラン 1% で維持し、筋弛緩を得るために臭化パンクロニウム 0.1mg/kg を持続投与した。

右大腿動脈からカテーテルを留置し観血的動脈圧を連続的にモニタリングし、左大腿静脈から中心静脈カテーテルを挿入し採血およびオルプリノン投与を行った。スワン・ガンツカテーテルを右大腿静脈から肺動脈に留置し、熱希釈法を用いて心拍出量 (CO) を測定した。開腹後、右外頸静脈から採血用カテーテルを肝静脈 (HV) に留置した。肝動脈血流量 (HAF)、門脈血流量 (PVF) を測定するため超音波血流計用プローブを固有肝動脈 (HA)、門脈 (PV) へそれぞれ装着した。エンドトキシン注入・採血を目的としたダブルルーメンカテーテルを上腸間膜静脈の分枝から門脈に留置した。肝組織内酸素化状態をモニタリングするために近赤外線分光装置の送受光用プローブを肝表面に装着後閉腹した。

以上の手技が終了した後 1 時間の回復期間において、すべてのブタで門脈からエンドトキシンの持続投与 (1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) を開始し 240 分まで継続した ($t=0\sim 240$)。エンドトキシン投与開始後 150 分の時点 ($t=150$) で CONT 群では生理食塩水の持続投与 (0.09ml/kg/h) を、OLP 群ではオルプリノンの持続投与 (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) を開始し 90 分間継続した ($t=150\sim 240$)。エンドトキシン投与開始時 ($t=0$) をベースラインとして、 $t=0$ 、150、180、210、240 の各時点で血液ガス分析・乳酸値測定 (動脈血、混合静脈血、肝静脈血、門脈血) と Hb 濃度測定を行い、同時に心係数 (CI) の測定、酸素供給量 (DO_2)、肝酸素供給量 (DO_2H)、酸素消費量

(VO₂)、肝酸素消費量 (VO₂H) を算出した。肝ミトコンドリア酸化状態 (redox state of cytochrome aa3) と酸素化型ヘモグロビン (hemoglobin oxygenation) の変化は肝表面に装着された近赤外線分光装置の送受光用プローブにより連続的に測定した。実験中の輸液量は両群ともに酢酸加リンゲル液 20ml/hg/h とした。結果は平均値±標準偏差で表記し、統計学的分析は ANOVA 検定で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】OLP 群、CONT 群ともにエンドトキシン投与によって CI と DO₂H が有意に低下したが VO₂ と VO₂H は維持された (t=0~150)。OLP 群では、オルプリノン投与後 (t=150~240)、CI と VO₂ は変化しなかったが DO₂H と VO₂H は増加した。対照的に CONT 群では t=150~240 において CI、DO₂、DO₂H が減少し、t=240 では OLP 群よりも有意に低かった。エンドトキシン投与 (t=0~150) により肝酸素化ヘモグロビンとミトコンドリア酸化状態は低下し、CONT 群では t=150~240 でさらに悪化した。一方、OLP 群ではオルプリノンの投与開始後 (t=150~240) 肝酸素化ヘモグロビンは上昇し、肝ミトコンドリア酸化状態は t=180 以降大きく増加に転じ、t=240 における肝ミトコンドリア酸化状態は CONT 群と比較して OLP 群のほうが有意に高かった。乳酸値に関して、両群ともにエンドトキシンのみが持続投与されている t=0~150 までは有意な増加を示したが、OLP 群ではオルプリノン投与後 (t=150~240) の乳酸値の増加は認めなかった。一方、CONT 群では t=150~240 でも乳酸値は更に増加し、t=240 で OLP 群よりも有意な高値を示した。

【結論及び考察】敗血症は高心拍出量状態においても高乳酸血症、代謝性アシドーシスを呈するが、それは臓器微小循環レベルでの血流シャントあるいはミトコンドリアの機能不全が原因と考えられている。その為にエンドトキシン血症や敗血症時には心拍出量、肝血流量や肝酸素供給量を増加させることが必ずしも臓器の細胞内酸素化と細胞エネルギー状態の改善を保障するものではないと言われている。本研究の結果では、オルプリノンはエンドトキシン血症においてミトコンドリア酸化状態の改善と乳酸値の抑制を示したがこれは、オルプリノンが細胞内低酸素症の改善をもたらすことを示唆するものである。今回の研究では、オルプリノンは全身酸素供給量や全身酸素消費量を有意に変化させなかったが、肝酸素供給量や肝酸素消費量を有意に増加させている。これはエンドトキシン血症時のオルプリノンの効果が全身の中でも肝臓に対して高い選択性を示した結果だと思われる。興味深いことに、オルプリノン投与開始初期には (t=150~180)、肝酸素供給量と酸素化ヘモグロビンは増えているが、ミトコンドリア酸化は減少したままである。これは細胞外酸素化 (血管内酸素化) は改善していても細胞内酸素化 (ミトコンドリア内酸化状態) は必ずしも改善しないことを示している。この病態は、オルプリノンが投与開始初期にまず大血管や non-nutrient 血管のような比較的大きな血管を拡張させ、投与開始 30 分以降 (t=180~240) では、肝細胞に直接酸素や栄養を供給する nutrient 血管を拡張させ、酸素化ヘモグロビンの増加のみならず肝ミトコンドリア酸化を改善させるようになるという仮説で説明可能である。今回の研究でオルプリノンはエンドトキシン血症において肝循環だけではなく肝の酸素代謝そして肝細胞内酸素化を改善した。しかし、オルプリノンの効果が容量依存性であるかどうかは検討されておらず、今後更なる研究が必要と思われる。

今回の結論として、オルプリノンは敗血症時にみられる全身循環や肝循環の悪化を改善するだけでなく、肝ミトコンドリアの酸化状態をも改善することができる有益な薬物である可能性が示唆された。

(Journal of Anesthesia 2005; 19: 295-301 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 645 号	氏名	國吉 保
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	宮田 篤郎	山田 勝士

Effects of olprinone on hepatosplanchnic circulation and mitochondrial oxidation in a porcine model of endotoxemia ブタエンドトキシン血症モデルにおけるオルプリノンの肝循環とミトコンドリア酸化に与える影響

エンドトキシンは、血行動態を破綻させ同時に肝血流量を低下させる原因物質の一つである。近年、動物実験において、強心作用と血管拡張作用を持つオルプリノン (phosphodiesterase III 阻害薬) が、エンドトキシンにより低下した肝血流量と肝酸素供給量を有意に改善させることが注目されている。しかし、敗血症時には、十分な心拍出量や酸素供給量にもかかわらずシャントのような血流再分配による組織の低酸素領域が生じている可能性が論じられており、オルプリノン使用時の肝細胞レベルでの酸素化を評価した研究報告はない。本研究の目的はエンドトキシン血症時のオルプリノン投与が肝循環と肝ミトコンドリア酸化状態に与える影響を評価することである。

本研究は、体重 23.0~30.0kg の SPF(specific pathogen -free)ブタ 14 頭を生理食塩水群 (CONT group, n=7) とオルプリノン群 (OLP group, n=7) に無作為に分け、全身麻酔下にエンドトキシンを持続注入した。エンドトキシン投与開始 150 分後、OLP group ではオルプリノン 0.3 μ g/kg/min の持続投与を開始し、CONT group では同量の生理食塩水を投与した。以後 30 分毎に肝動脈血流量、門脈血流量、肝酸素供給量、肝酸素消費量を測定し、肝チトクロームオキシダーゼ酸化・還元状態は近赤外線分光法 (NIRS) により連続的に記録した。結果に対して repeated measure ANOVA を用いて検定を行い、群間に有意差を認めた場合は unpaired t-test で検定を行った。危険率 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

本研究で得られた知見は以下の通りである。

- 1) オルプリノンが心係数を増加させることなく腹部臓器血流を増加させたことから、オルプリノンの臓器特異性、PDEIII の分布局在性が示唆された。
- 2) オルプリノン投与により肝酸素消費量が増加し、乳酸の産生が抑制されたことから、エンドトキシンにより肝酸素供給量は critical level 以下に減少していたことが考えられた。
- 3) エンドトキシンにより悪化した肝血液流量、肝酸素供給量は、オルプリノン投与により有意に回復し、肝ミトコンドリアレベルでも酸素化の改善を認めた。

本研究は、PDEIII 阻害薬であるオルプリノンがエンドトキシンによって減少した腹部臓器血流量を増加させ、肝細胞レベルでも酸素化を改善することを証明し、敗血症の薬物治療におけるオルプリノンの有効性に新たな視点を提供したものである。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 645 号	氏名	國吉 保
審査委員	主 査	丸山 征郎	
	副 査	宮田 篤郎	山田 勝士
<p>主査および副査の3名は、平成19年1月26日、学位請求者 國吉保君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下の様な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき解答を得ることができた。</p> <p>質問1) 本研究に使用したオルプリノンの投与量は臨床上の投与量と同程度か？ (回答) オルプリノンの臨床での使用量は0.1~0.3$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$であり、本研究で使用した0.3$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$とほぼ同程度である。</p> <p>質問2) 肝臓・腹部臓器血流の増加を認めているがPDEⅢの体内分布は？ (回答) PDEⅢは人の生体内では主に心筋、血管平滑筋、血小板に局在している。また、ヒト摘出血管(胃大網動脈、内胸動脈、橈骨動脈)を用いたPDEⅢ inhibitorの反応性に関する検討において血管部位によるPDEⅢ分布濃度の違いが指摘された。本研究の結果と合わせて考えるとPDEⅢは腹部臓器の栄養動脈に多く分布している可能性がある。</p> <p>質問3) PDEⅢ inhibitorのなかでオルプリノンを選択したのは何故か？ (回答) 当教室で行った開心術後の患者にオルプリノン、ミルリノン、アムリノンを用いて、使用前後の心拍出量変化率と腹部臓器血流量変化率について比較検討した研究で、オルプリノンが最も選択的に腹部臓器血流を増加させたため選択した。</p> <p>質問4) エンドトキシンを投与することで種々のケミカルメディエーターが放出され、最終的に視床下部にてProstaglandin E₂の作用により体温の上昇を認めると考えられるがどうか？ (回答) 実験データとして体温を測定していなかったため不明であるが、本研究では全身麻酔を施行し筋弛緩薬で無動化を得ているため骨格筋のふるえ熱産生は抑制される。循環動態としてはhypodynamic stateであるため生体は交感神経系を最大限に緊張させて対応する。その為、交感神経を介した非ふるえ熱産生、末梢血管収縮による放熱反応の抑制が機能し発熱反応はあったと考えられる。</p> <p>質問5) オルプリノンの脳血流に与える影響はどのようなものであるか？ (回答) オルプリノンと脳血流についての研究は少ないが、ヒト(術後)においてはオルプリノン0.3$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$の持続注入により心拍出量の増加と脳細動脈の拡張のため脳血流量が増加したとの報告がある。本研究ではコントロール群、オルプリノン群の平均動脈圧は脳血流 Auto-regulation 機能が作動する範囲内であるが、心拍出量は両群ともに低下している。また、脳血管にはエンドトキシンによる血管内皮障害が起きている可能性もあり、Auto-regulation 機能が破綻している事も十分想定される。脳血流を増加させる因子と減少させる因子が複雑に関与しており、本研究においては判断が難しい。</p> <p>質問6) 临床上、これからも積極的にオルプリノンを使用していくのか？ (回答) オルプリノンが腹部臓器血流を改善する有望な薬剤であることが判明したが、臨床的</p>			

には低血圧を誘発することも多い。従って用量、対象患者の状態（脱水の有無、心疾患等）、その使用による有益性を十分考慮したうえで使用する必要がある。

質問7) エンドトキシン注入時の肝血流の変化で、総肝血流量と門脈血流量が減少しているのに肝動脈血流量が増加しているのは何故か？

(回答) エンドトキシンを注入した場合、初期反応において門脈血流量が減少し総肝血流量も減少するが、肝動脈が一過性・代償性に拡張し総肝血流量を維持しようとする。しかしこの反応は一過性であり、やがて肝動脈血流量も減少していく。

質問8) PDEⅢ inhibitor の使用でミトコンドリア酸化が改善するのは何故か？

(回答) 大きな要因として総肝血流量の増加が挙げられる。付加的な要因としてはオルプリノンの肝微小循環の改善による機序も考えられる。

質問9) PDEⅢ inhibitor は腸内細菌バリア破綻や bacterial translocation の防止効果を持つか？

(回答) ラット出血性ショックモデルにおいて腹腔内リンパ液を正常ラット体循環に注入した場合 ALI/ARDS が生じ、培養細胞に注入すればアポトーシスにいたるという研究報告が為され、腹部臓器血流減少と消化管と炎症の関係が注目されている。したがって腹部臓器血流量を増加させる PDEⅢ inhibitor は腸内細菌バリアの破綻や bacterial translocation の防止効果に有用と考える。

質問 10) オルプリノンによる肝血流量の増加は腹部臓器血流（門脈血流）と肝動脈血流のどちらが主体なのか？また今回使用した近赤外線モニターを直接消化管に適用して消化管のミトコンドリア酸素化状態を観察できるのか？

(回答) 今回我々の得たデータでは肝血流量増加の主体は門脈血流量の増加に拠るところが大きいですが、酸素飽和度の高い肝動脈血流が維持されている事は肝酸素供給量に与える影響は大きく重要である。我々の使用している近赤外線モニターは送光用・受光用の2本のプローベを肝表面に装着しデータを解析するが、重要なことはプローベ間の距離を一定に保つことである。肝臓のような実質臓器であれば可能であるが管腔臓器ではプローベ間隔が変動することで吸光度が変化しデータの信頼性を欠くものとなる。

質問 11) オルプリノンの添付文書ではドブタミンとは併用注意と記載されているが臨床的に併用する可能性は？

(回答) ともに血管拡張作用を有しており、併用により過度の低血圧、不整脈を招く可能性が高いため臨床的には併用する可能性は極めて低いと考える。

質問 12) 実験で大動物（ブタ）を対象としているのは何故か？すぐ死ぬことはないか？他の動物に変更も可能か？ブタの値段は？ビーグル犬の値段は？

(回答) ブタを対象としている理由の1つとしては小動物におけるモニタリングの難しさがある。本研究では多くのカテーテルを挿入・留置するが、特に肺動脈カテーテルの小動物での留置は不可能である。対象となるブタのエンドトキシンやオルプリノンに対する反応もさまざまであり、実験の完了を待たずに死に至る場合も多い。また、ブタはかなりストレスに弱く、厩舎での管理が影響を与えている可能性もある。研究当時のブタの値段は 32,000 円でビーグル犬は 145,000 円である。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と見識を十分に具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格をもつものと認めた。