臓器虚血対策—プレコンディショニングによる戦略—

Mechanism of Anesthetic Preconditioning : A Role for Reactive Oxygen Species

田中克哉^{*1} David C. Warltier^{*2}

〔要旨〕われわれの研究室はイソフルラン吸入が心筋虚血再灌流障害に対するイヌの心筋梗塞サイズを減少することを1997年に初めて報告した。この現象は後にAnesthetic preconditioning (APC)と呼ばれ、近年、吸入麻酔薬が虚血障害に対して心筋を保護することを証明する多くの論文が報告されている。また、われわれは最近イソフルラン吸入によってウサギの心筋で活性酸素が発生し、その活性酸素がイソフルランによる心筋保護の作用機序に重要な役割を果たしていることを報告した。ここでは行った実験の結果を紹介しながら、APCの作用機序、とくに活性酸素の役割について述べる。

キーワード：Anesthetic preconditioning, 心筋保護効果, 吸入麻酔薬

(日臨麻会誌 Vol.25 No.2, 206～212, 2005)

はじめに

近年、吸入麻酔薬は虚血再灌流障害に対して心筋を保護することが数多く報告されている。ATP感受性カリウム(K_{ATP})チャネルやプロテインキナーゼC(PKC)などを含む内因性の情報伝達経路の活性化によって、吸入麻酔薬による心筋保護作用が発揮されることが徐々に解明されている。また、reactive oxygen species (ROS)もこの心筋保護作用のメカニズムに関与していることが報告されている。本稿では吸入麻酔薬によるプレコンディショニング(Anesthetic preconditioning: APC)の概念、APCの作用機序、APCにおけるROSの役割について考察する。

I Anesthetic preconditioning の概念

1986年Murryらは、短時間の冠動脈の虚血再灌流が長時間の虚血再灌流に先行して存在すると、心筋の虚血再灌流障害が有意に減少することを報告した¹⁾。これは、Ischemic preconditioning (IPC)と呼ばれ、そのメカニズムは数多くの研究によって明らかになりつつあるが、いまだ完全に解明されていない。1997年、イソフルランを心筋虚血再灌流前に投与しておく心筋梗塞のサイズが有意に減少し、IPC様の作用があることが動物実験によって明らかになった²⁾。図1にわれわれの研究室で行われている典型的なウサギの実験プロトコルを示す。イソフルラン群では30分間1.0MACのイソフルランを吸入させ、イソフルラン吸入中止15分後に30分間の

^{*1} 徳島大学病院麻酔科

^{*2} ウィスコンシン医科大学麻酔科

著者連絡先 田中克哉
〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15
徳島大学病院麻酔科

図1 Experimental Protocol

ウサギの *in vivo* 心筋虚血再灌流モデルによる実験プロトコール。基礎麻酔はペントバルビタールで行う。イソフルラン群ではイソフルランを投与後15分間のメモリー期間(MEM)をおいた後に虚血再灌流を行う。

冠動脈閉塞と3時間の再灌流を施行する。イソフルラン吸入中止から冠動脈閉塞までの15分間をメモリー期間と呼ぶ。イソフルラン吸入によって血圧は対照群と比較して有意に低下するが、メモリー期間終了後、すなわち冠動脈閉塞直前の血行動態は対照群とイソフルラン群に有意差はなくなる。その後の心筋虚血再灌流中の血行動態も2群間でほぼ似たような経過をたどる。しかし、心筋梗塞サイズはイソフルラン群で有意に減少する。これは、イソフルランによる心筋保護作用は血行動態とは無関係で、イソフルラン自体に直接心筋を保護する作用があることを示唆している。このように吸入麻酔薬の先行投与が心筋虚血再灌流障害をIPC様に軽減することをAnesthetic preconditioning(APC)という。

II APCの作用機序

1992年Grossらは、IPCによる心筋梗塞サイズの減少が非選択的な K_{ATP} チャネル阻害薬であるグリベンクラミドの前投与で棄却されることを報告した³⁾。これは、IPCの作用機序に K_{ATP} チャネルの開口が関与していることを示唆している。さらに、1998年Liuらはミトコンドリアの K_{ATP} チャネルの開口がIPCに重要であることを示した⁴⁾。IPCはG蛋白結合受容体、すなわちアデノシン、ブラディキニ

ン、オピオイド等の受容体の活性によってトリガーされる。これらの受容体の活性化はPKCの活性化を引き起こし、細胞内伝達を開始すると考えられている。

APCにおける細胞内伝達経路はIPCのそれときわめて類似していることが示されている。現在、アデノシン A_1 受容体、PKC、Gi蛋白質、ROS^{5)~7)}、ミトコンドリアおよび細胞膜 K_{ATP} チャネル^{2), 8)}がAPCの細胞内伝達に関与していることが明らかとなっている(図2)。イソフルランとセボフルランは心筋細胞の虚血モデルで細胞の生存率を上昇したが、この細胞保護効果はミトコンドリア K_{ATP} チャネルの選択的なブロッカーである5-hydroxydecanoate(5-HD)で減弱した⁹⁾。しかし、細胞膜 K_{ATP} チャネルの選択的なブロッカーであるHMR-1098では影響はみられなかった。イソフルランによる心筋梗塞サイズの減少²⁾やイソフルランによるATP節約効果は、グリベンクラミドにより抑制された¹⁰⁾。5-HDはイソフルランによるプレコンディショニング効果を抑制する¹¹⁾。これらの結果は、APCにおいて K_{ATP} チャネルが大きな役割を果たしていることを示している。

イヌにおいて5-HDもHMR-1098もデスフルランによる心筋虚血再灌流障害に対する心筋保護効果

図2 現在考えられているAPCのメカニズム

を抑制した¹²⁾。これは、吸入麻酔薬による心筋保護効果にミトコンドリアと細胞膜の K_{ATP} チャネルが必要であることを示唆している。対照的に、別の研究ではヒト右心房筋でデスフルランによるプレコンディショニングがHMR-1098によって何ら影響を受けなかったと報告している¹³⁾。これはAPCに細胞膜 K_{ATP} チャネルは無関係であることを示唆する。細胞膜 K_{ATP} チャネルの役割についてはいまだ論争中である。しかし、近年細胞膜 K_{ATP} チャネルの重要性を再び指摘する研究成果が報告されている。

Ⅲ APCにおけるROSの役割

大量のROSが虚血心筋の再灌流時に放出され、細胞内恒常性を維持する蛋白質の障害、心収縮力の抑制、膜の障害を誘発する¹⁴⁾。ハロタン、イソフルラン、エンフルランは単離心においてROSによる左室内圧低下を減弱することが示されている¹⁵⁾。イソフルランはラットの虚血心においてヒドロキシラジカルの産生を減少する¹⁶⁾。セボフルランの保護的作用はROSと活性窒素物質の間接的な指標であるジチロシンの形成の減少と関連している⁷⁾。これらの結果は吸入麻酔薬が冠動脈の虚血再灌流に伴って

放出される大量のROSの産生を減弱するということを示唆している。

このような大量のROSの病的な役割を意味する結果と対照的に、さまざまなプレコンディショニング刺激(例えば短時間の虚血、ミトコンドリア K_{ATP} チャネル開口薬、オピオイドまたは吸入麻酔薬の暴露)は少量のROSを産生し、そのROSが下流にある伝達経路を刺激し、その後の虚血障害から保護作用を作り出すことが強く示唆されている¹⁷⁾。例えば、短時間の虚血の間にミトコンドリアから発生したROSがプレコンディショニングを引き起こし、短時間虚血前またはその最中にROSスカベンジャーを投与すると心筋梗塞サイズに対するプレコンディショニング刺激の効果が著しく減弱する¹⁸⁾。これらはIPCがプレコンディショニング刺激によって放出される少量のROSを必要とし、結果的に再灌流時のROSの放出を減弱することを示している(図3)。セボフルランの虚血障害に対する好ましい反応はスーパーオキシドのスカベンジャーとNO合成酵素の抑制によって消失する⁷⁾。これらの結果は、スーパーオキシドはAPCのトリガーとして働き、NOは再灌流時に障害を減弱するためにスーパーオキシ

図3 ROS in Ischemic preconditioning

心筋虚血再灌流実験におけるROS産生の経時的変化の模式図。対照群では再灌流時にROSが大量に放出されるが、IPC群ではプレコンディショニング刺激で少量のROSが発生し、再灌流時の大量のROS産生を減弱する。

ドを除去している可能性を示唆している。ROSスカベンジャーはイソフルランによる心筋梗塞サイズ縮小効果を減弱し^{5), 6)}、ミトコンドリアの K_{ATP} チャネル開口による好ましい効果も抑制する。私たちの研究室は最近、スーパーオキシドに特異的な蛍光物質 dihydroethidium とレーザー共焦点顕微鏡を用いた実験で、イソフルランが虚血のエピソードとは無関係にスーパーオキシドの産生を増加させることを直接的に証明した⁶⁾。これらの結果⁶⁾は吸入麻酔薬が少量のROSを産生することができ、そのROSが虚血再灌流後の心筋梗塞サイズの減少に関連していることを初めて示したものである。興味深いことに低濃度のROSを前処置しておくことIPC様の好ましい効果を発揮し、PKCを介するメカニズムで虚血障害を減少する¹⁹⁾。これらは少量のROSがAPCにおいて重要な役割を果たすことを指示するものである。

ROSは酸化ストレスから細胞を保護するための数多くの伝達経路でその調節を行うメディエーターとして働いている²⁰⁾。ROS誘発性PKC¹⁹⁾およびmitogen-activated protein kinase(MAPK)²¹⁾活性化

はIPCおよび薬物誘発性PCの両者に関与している。過酸化水素はラットの心筋細胞で3つすべてのMAPKのサブタイプを活性化するが、p38 MAPKファミリーの刺激とその後引き続くHeat shock protein 25/27のリン酸化が心筋保護中にきわめて重要であった²¹⁾。これらの知見は吸入麻酔薬によって産生されるROSは結果的にAPCに関与するシグナル伝達経路となる蛋白合成酵素活性化にリンクしている可能性を間接的に支持している。

吸入麻酔薬によって誘発されるミトコンドリア K_{ATP} チャネルの開口がROS産生の前後どちらに位置するのか不明である。われわれは5-HDまたはROSスカベンジャーであるN-acetylcysteine(NAC)またはN-2-mercaptopropionyl glycine(2-MPG)をイソフルラン投与前に前処置しておくこと、ウサギの*in vivo*モデルでROS産生を棄却することを報告した²²⁾。対照的に5-HDをイソフルラン吸入後心筋虚血前に投与した場合ROS産生を部分的に減弱するだけであった(図4, 5)²²⁾。これらの結果は、ミトコンドリア K_{ATP} チャネルの開口がROSを産生し、APCにおいてトリガーとして働いていることを示

*Significantly ($p < 0.05$) different from isoflurane.

図4 Administration of 5-HD before isoflurane inhibits myocardial protection

ミトコンドリア K_{ATP} チャンネルの選択的ブロッカーである5-HDをイソフルラン投与前後に投与し、虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを比較した。イソフルランは有意に心筋梗塞サイズを減少したが、5-HDをイソフルラン投与前に処置するとその有益な効果は消失した。しかし、5-HDをイソフルラン投与後に処置すると、心筋梗塞サイズ減少効果は維持された。これらはミトコンドリア K_{ATP} チャンネル開口がイソフルラン暴露中に必要であり、APCのトリガーとして働いていることを示唆する。〔文献22〕より引用〕

*Significantly ($p < 0.05$) different from isoflurane.

#Significantly ($p < 0.05$) different from control.

図5 Mitochondrial K_{ATP} channels trigger release of reactive oxygen species

5-HDをイソフルラン投与前後に投与し、ROSの産生を比較した。すべての群で心筋は冠動脈虚血再灌流を行う前に摘出された。イソフルランはROS産生を有意に増加させた。この効果は5-HDをイソフルラン投与前に処置すると消失したが、イソフルラン投与後に処置すると部分的にROS産生を抑制した。これはイソフルランによるROS産生はミトコンドリア K_{ATP} チャンネル開口後に起こることを示唆している。〔文献22〕より引用〕

唆している。反対に、モルモット心筋を使った研究ではセボフルランで誘発されるROS産生は心筋虚血前の5-HDによって抑制されなかったと報告している²³⁾。このように動物実験の結果はミトコンドリア

ア K_{ATP} チャンネルの開口がAPCのトリガーの役割を果たすという仮説を支持しつつも、微妙な論争点も存在している。最近、ミトコンドリア K_{ATP} チャンネルの開口とROS産生は互いにポジティブフィードバ

ックしていることが考えられている。

まとめ

吸入麻酔薬自身に、直接心筋に対して保護効果があることがわかってきた。この現象は Anesthetic preconditioning と呼ばれ、麻酔科領域で多くの研究がなされている。われわれの実験の結果、吸入麻酔薬はミトコンドリア K_{ATP} チャネルを開き、少量の ROS が産生され、APC のシグナル伝達経路を活性化することが示唆された。この分野の研究は近年急速に進歩し、動物実験を用いたメカニズムの解明に加え、臨床実験でもその有用性が評価されてきている。

参考文献

- 1) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124 ~ 1136, 1986
- 2) Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, et al. : Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of $K(ATP)$ channels : reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 87 : 361 ~ 370, 1997
- 3) Gross GJ, Auchampach JA : Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 70 : 223 ~ 233, 1992
- 4) Liu Y, Sato T, O'Rourke B, et al. : Mitochondrial ATP-dependent potassium channels : novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 97 : 2463 ~ 2469, 1998
- 5) Mullenheim J, Ebel D, Frassdorf J, et al. : Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. *Anesthesiology* 96 : 934 ~ 940, 2002
- 6) Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, et al. : Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits : a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* 97 : 1485 ~ 1490, 2002
- 7) Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, et al. : Anesthetic preconditioning : triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 : H44 ~ H52, 2002
- 8) Toller WG, Gross ER, Kersten JR, et al. : Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels : mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 92 : 1731 ~ 1739, 2000
- 9) Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, et al. : Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial $K(ATP)$ channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 97 : 4 ~ 14, 2002
- 10) Nakayama M, Fujita S, Kanaya N, et al. : Blockade of ATP-sensitive K^+ channel abolishes the anti-ischemic effects of isoflurane in dog hearts. *Acta Anaesthesiol Scand* 41 : 531 ~ 535, 1997
- 11) Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, et al. : Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane : role of mitochondrial $K(ATP)$ channels and opioid receptors. *Anesthesiology* 98 : 705 ~ 711, 2003
- 12) Toller WG, Gross ER, Kersten JR, et al. : Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels : mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 92 : 1731 ~ 1739, 2000
- 13) Hanouz JL, Yvon A, Massetti M, et al. : Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 97 : 33 ~ 41, 2002
- 14) Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML : Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 : 1404 ~ 1407, 1987
- 15) Tanguay M, Blaise G, Dumont L, et al. : Beneficial effects of volatile anesthetics on decrease in coronary flow and myocardial contractility induced by oxygen-derived free radicals in isolated rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 18 : 863 ~ 870, 1991
- 16) Nakamura T, Kashimoto S, Oguchi T, et al. : Hydroxyl radical formation during inhalation anesthesia in the reperfused working rat heart. *Can J Anaesth* 46 : 470 ~ 475, 1999
- 17) Ambrosio G, Tritto I, Chiariello M : The role of oxygen free radicals in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 27 : 1035 ~ 1039, 1995
- 18) Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, et al. : Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273 : 18092 ~ 18098, 1998
- 19) Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, et al. : Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 80 : 743 ~ 748, 1997
- 20) Droge W : Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82 : 47 ~ 95, 2002
- 21) Clerk A, Michael A, Sugden PH : Stimulation of multi-

- ple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes. *Biochem J* 333(Pt 3) : 581 ~ 589, 1998
- 22) Tanaka K, Weihrauch D, Ludwig LM, et al. : Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology* 98 : 935 ~ 943, 2003
- 23) Kevin LG, Novalija E, Riess ML, et al. : Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth Analg* 96 : 949 ~ 955, 2003

Mechanism of Anesthetic Preconditioning : A Role for Reactive Oxygen Species

Katsuya TANAKA *¹, David C. WARLTIER *²

*¹ Department of Anesthesiology, Tokushima University Hospital

*² Department of Anesthesiology, Medical College of Wisconsin

A rapidly growing body of evidence indicates that volatile anesthetics protect the myocardium against reversible and irreversible ischemic injury. In 1997, our laboratory demonstrated that isoflurane reduced myocardial infarct size in dogs, and this protective effect persisted despite discontinuation of the agent before coronary occlusion. This phenomenon was termed "anesthetic-induced preconditioning" (APC), and was characterized by a short-term memory phase similar to that observed during ischemic preconditioning (IPC). The precise mechanisms responsible for volatile anesthetic-induced protection against ischemic injury remain unclear despite extensive study.

Our laboratory recently demonstrated that isoflurane directly increases superoxide anion formation *in vivo* using the fluorescent probe dihydroethidium and laser confocal microscopy independent of an ischemic episode. These data indicated for the first time that volatile anesthetics were capable of producing small amounts of reactive oxygen species (ROS) that were directly correlated with a reduction in myocardial infarct size after prolonged ischemia.

In this report, we will show our results obtained from the experiments of myocardial infarct size study and *in vivo* measurements of ROS in rabbits. We also discuss the role of ROS in the mechanisms in APC.

Key Words : Anesthetic preconditioning, Cardio protection, Volatile anesthetics