



Halothane stimulates superoxide radical generation under anaerobic condition : studies using 2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazol [1,2-a] pyrazin-3-one (MCLA) to record continuous chemiluminescence in vivo from the rat liver.

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 黄, 建焜 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1005

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 152号	学位授与年月日	平成 5年 3月31日
氏 名	黄 建 焜		
論文題目	Halothane stimulates superoxide radical generation under anaerobic condition : studies using 2 -methyl - 6 - (<i>p</i> - methoxyphenyl) - 3, 7 - dihydroimidazol [1, 2 - a] pyrazin - 3 one (MCLA) to record continuous chemiluminescence in vivo from the rat liver (低酸素下ハロセンによるラット肝での活性酸素(スーパーオキシド)の産生に関する研究)		

医学博士 黄 建 焜

論文題目

Halothane stimulates superoxide radical generation under anaerobic condition: studies using 2-methyl-6-(*p*-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one (MCLA) to record continuous chemiluminescence in vivo from the rat liver.

(低酸素下ハロセンによるラット肝での活性酸素(スーパーオキシド)の産生に関する研究)

論文の内容の要旨

目的:

ハロセンは従来、臨床的に広く使用されてきた吸入麻酔薬である。しかし、1958年に Burnap、Vurture らによってハロセンが原因と思われる肝障害の症例報告があり、以来、術後肝障害の原因の一つとしてハロセンが注目され、その原因を代謝と免疫に求めて研究が進められてきた。肝障害の原因として、ハロセンの直接毒性によるものと、免疫的反応によるものとが考えられている。直接毒性としては嫌氣的代謝過程で産生されるハロセンラジカルの関与が挙げられている。このハロセンラジカルは細胞膜の不飽和脂肪酸と反応して脂質過酸化物を生成し、肝細胞に対し毒性を発揮するものとみなされている。1990年に Cohen らにより、好氣的条件下のハロセン麻酔で肝臓の表面からの脂質過酸化の化学発光を連続的に測定した報告がなされた。しかし、測定した化学発光がハロセンによる肝細胞の刺激、あるいは血球成分の刺激により生じたかどうかは明かではない。今回我々は、血液成分を取り除いたハロセンを含む灌流系を用い、発光剤として、ウミホタル・ルシフェリン誘導体である MCLA (2-methyl-6-(*p*-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one) を投与し、それと反応して肝臓表面よりの化学発光を起こす活性酸素の種類を検討した。

方法:

雄の Wistar 系ラット(体重250-300 g)に、予めフェノバルビタール50mg/kgを腹腔内に4日間投与し、肝酵素誘導を起こさせ、24時間絶食した後、ペントバルビタール100mg/kgを腹腔内に投与し、麻酔を導入した。そして、ヘパリン1500U/kgを経尾静脈投与し、開腹し、肝臓を露出した。肝動脈を結紮後、門脈にカニューレーションし、腹腔動静脈を切断、脱血した。同時に37°C Krebs-Hensleit (pH7.4) の灌流液を灌流し、高感度 photon-counter (EMJ19653) により連続的に肝臓表面からの化学発光を測定した。バックグランド (natural luminescence) の発光量が安定してから、肝臓表面からの MCLA 依存性化学発光を測定するために、生理食塩水に溶かした 1μM MCLA を輸液ポンプで側管より持続投与した。MCLA 依存性化学発光が安定してから、コントロール群として、95%窒素 + 5%二酸化炭素の混合ガスのみ20分間灌流液にバブリングした。ハロセン酸素群では、95%酸素 + 5%二酸化炭素の混合ガスに1.1%ハロセンを加えて20分間灌流液にバブリングした。ハロセン低酸素群では、95%酸素 + 5%二酸化炭素の混合ガスに1.1%ハロセンを加えて20分間灌流液にバブリングした。その後、それぞれの群に95%酸素 + 5%二酸化炭素の混合ガスをバブリングし、1μM SOD (superoxide dismutase) を投与し、スーパーオキシドにより惹起させる発光であるかどうかを測定した。

結果:

コントロール群では、95%窒素 + 5%二酸化炭素の混合ガスの負荷時、発光量は漸減したが、95%酸素 + 5%二酸化炭素の混合ガスに置換してから発光量は増加し、SOD を投与しても発光量の減少は認

められなかった。ハロセン酸素群はハロセンを中止しても発光量は一定量を持続し、SOD を投与しても発光量の減少は認められなかった。ハロセン低酸素群では95%窒素 + 5 %二酸化炭素の混合ガスに1.1%ハロセンを加えた時、発光量は漸減したが、95%酸素 + 5 %二酸化炭素の混合ガスに置換してから発光量は上昇し、SOD を投与すると発光量の減少が認められた。

考察：

MCLA 依存性化学発光は酸素による MCLA そのものの自動酸化およびスーパーオキシドとの反応時にみられる。コントロール群とハロセン酸素群では、SOD の投与で減少しなかった発光量は MCLA そのものの自動酸化によるものである。しかし、ハロセン低酸素群では、SOD を投与すると発光量の減少が認められた。この減少した発光量は、スーパーオキシドと MCLA による化学発光であることを示唆する。低酸素状態で投与したハロセンはラット肝臓でのスーパーオキシドの産生を増加させたものと考えられる。当研究センターの上原らのグループはラット肝灌流系において細胞刺激剤である PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) を投与すると肝 Kupffer 細胞により、スーパーオキシドを産生するという報告をしており、ラット肝を PMA 刺激下に NBT (nitroblue tetrazolium) を灌流後のラット肝臓の組織切片で、肝類洞にある肝 Kupffer 細胞内にホルマザン沈着が認められた。このホルマザン沈着は NBT がスーパーオキシドによる還元反応で形成されたものである。今回我々の実験結果により、このスーパーオキシドの産生場所については、低酸素状態においてハロセンの代謝産物が肝 Kupffer 細胞を刺激し、スーパーオキシドを産生したと考えているが、今後、さらに研究が必要である。

結論：

今回我々は photon-counter を用いてラット肝臓表面の MCLA 依存性化学発光を測定し、低酸素下で投与されたハロセンはスーパーオキシドの産生を刺激することを認めた。

論文審査の結果の要旨

申請者はハロセンによる肝障害について、その直接毒性にはハロセンラジカルによる生体膜の過酸化脂質形成が細胞毒性を引き起こすという説を新しい化学発光法により証明しようとした。ラジカルや活性酸素の発生を証明する方法としては、従来、ESR 法や過酸化脂質の測定などの生化学的方法がおこなわれて来たが、これらは組織の homogenate について行う、*in vitro* の系で行うものであった。この化学発光により検出する方法の特色は *in vivo* の系で行えるので経時的な変化を無侵襲で観察できることである。すでに同様の研究がなされているが、血流の状態で行ったもので、血液成分による影響を除外していなかった。著者は今回の研究を血液成分を取り除いた灌流系を用いたことが新しい着眼点である。

発光剤としてはウミホタル・ルシフェリン誘導体である MCLA を用い、肝臓表面からの MCLA 依存性化学発光を photon-counter により測定した。この実験系は最初に95%O₂ + 5 %CO₂で灌流液をバブリングして、その後20分間、3つの実験系で灌流した。

1) 95%N₂ + 5 %CO₂を灌流液に投与したコントロール群 2) 95%O₂ + 5 %CO₂ + 1.1%ハロセンを投与したハロセン酸素群 3) 95%N₂ + 5 %CO₂ + 1.1%ハロセン低酸素群。そしてすべての群に最後には95%O₂ + 5 %CO₂の投与を行い、更に SOD (superoxide dismutase) を添加してその影響を調べた。

MCLA 依存性化学発光は酸素による MCLA そのものの自動酸化およびスーパーオキシドとの反

応時にみられるが、コントロール群とハロセン酸素群において SOD の投与で減少しなかった発光量は MCLA そのものの自動酸化によると考えられた。ハロセン低酸素群では SOD を投与すると発光量の減少がみとめられた。この減少した発光量はスーパーオキシドと MCLA による化学発光であることを示すことが示唆された。低酸素状態でのハロセンによる肝臓障害にはスーパーオキシドの産生が関与していることが化学発光法により、*in uiuo* での研究で明らかにされた。

本論文の審査過程で次のような質疑が申請者になされた。

- 1) フェノバルビタールによる誘導がない場合では化学発光はどうなるか
- 2) ハロセンなしでも低酸素から高濃度酸素に変えると化学発光が増加している理由は
- 3) 化学発光の強さは統計処理した方がよいと思うが
- 4) ハロセン低酸素群での SOD 投与後の減少した化学発光の残量は何か
- 5) P-450が多い患者ではハロセンの肝臓障害は生じ易いか
- 6) この方法での灌流液の排出路は
- 7) この実験系の安定している時間は
- 8) PaO_2 の最小生存量は
- 9) 自動酸化の機序は、 O_2 が自動酸化を生じる際に中間産物が生じるか
- 10) *in uitro* の条件では酸素より化学発光が生じるか
- 11) 酸素投与による最初の化学発光の peak はどう説明するか
- 12) MCLA は肝細胞に入るか
- 13) ハロセンは低酸素時にはどう代謝されるか
- 14) スーパーオキシドの発生前には何が生じるか
- 15) 血液と灌流液による大きな違いは何か
- 16) 自動酸化による化学発光は弱いのではないか

以上の討論における申請者の応答は概ね適切であった。よって、本論文が博士（医学）の学位授与に値すると全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 中 島 光 好 副査 教授 藤 瀬 裕

副査 助教授 林 秀 晴 副査 助教授 風 間 富 栄