

セボフルランは酸化ストレスによる血管内皮依存性弛緩反応 およびグリコカリックスの障害を回復させる

数馬 聡, 時永泰行, 君塚基修, 東口 隆, 濱田耕介, 山蔭道明

札幌医科大学医学部麻酔科学講座

キーワード：グリコカリックス, セボフルラン, 酸化ストレス

連絡先：数馬 聡

〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目291

Tel : 011-611-2111

E-mail : sea_hawk_3104@yahoo.co.jp

要 旨

【背景】 血管内皮依存性弛緩反応は臓器血流の調節を担う。血管内皮細胞表面の糖鎖の層は内皮グリコカリックスと呼ばれ、血管透過性の調節のほか、内皮依存性弛緩反応にも関与する。虚血再灌流障害に伴う酸化ストレスはグリコカリックスを障害し、病態を悪化させる。したがって、グリコカリックスの直接的な保護もしくは回復は病態の改善につながる可能性がある。今回、酸化ストレスによる内皮グリコカリックスの障害に対してセボフルランが保護的に働くことを仮説として検討した。

【方法】 ラット胸部大動脈リング状標本を調製した。フェニレフリンとアセチルコリンの投与による血管内皮依存性弛緩反応の等尺性張力変化を、0.5 mM 過酸化水素の暴露/非暴露で測定した。また、過酸化水素の暴露前後で、2.4%もしくは4.8%セボフルランを30分間投与し、張力変化を測定した。さらに、等尺性張力変化に使用したサンプルから20 μ m厚の凍結切片を作製し、糖鎖に特異的に結合し標識するWGA-FITCレクチンを用いて免疫組織化学染色を行った。それぞれのサンプルの血管内皮層内におけるWGA-FITC層の平均蛍光強度を測定した。統計解析として、One-way ANOVAを行った後、調整p値を用いたTukey法による多重分析を行った。p < 0.05を有意とした。

【結果】 過酸化水素の暴露によって弛緩反応は減弱し、セボフルランはこの減弱を有意に回復させた。セボフルランの前投与では、弛緩反応は減弱したままであった。過酸化水素の暴露はグリコカリックスの平均蛍光強度を減少させた。過酸化水素暴露後のセボフルランの投与は平均蛍光強度を有意に増加させた。

【結語】 セボフルランは過酸化水素暴露による血管内皮依存性弛緩反応の減弱を回復させた。この機序として、セボフルランが内皮グリコカリックスの障害を回復させることが示唆された。

【背景】

血管内皮細胞表面の糖鎖の層は内皮グリコカリックス (Glycocalyx: GCX) とよばれ、プロテオグリカンを中心にグリコサミノグリカンが枝の

ように結合している。GCXは、血管透過性の調節や血流のセンサー機能のほか¹⁾、血管内皮依存性弛緩反応にも関与している²⁾。虚血再灌流障害 (Ischemia Reperfusion Injury: IRI) に伴う酸化

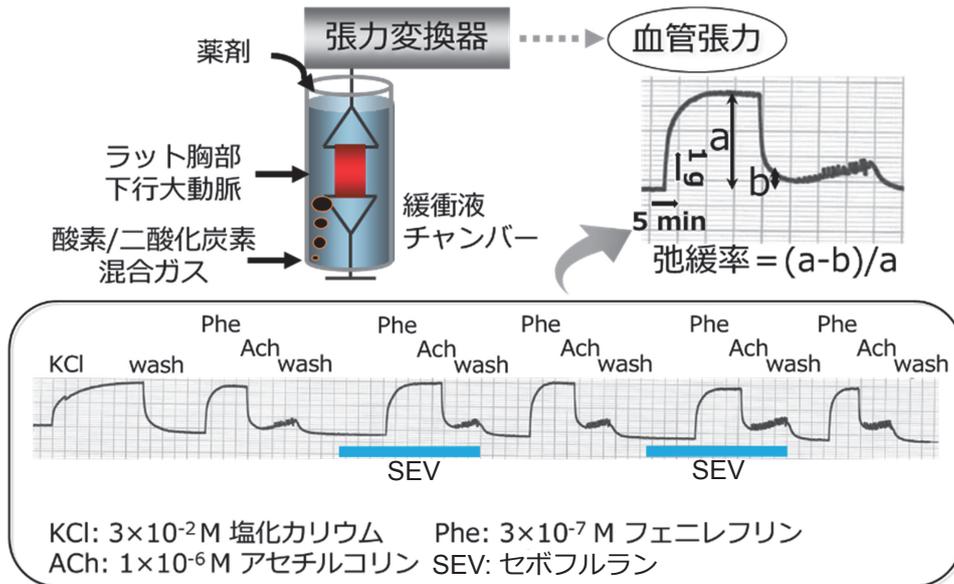


Figure 1. 典型的な等尺性張力変化測定.

大動脈リングは 3×10^{-2} M KCl の投与で平滑筋の損傷がないことを確認し、 3×10^{-7} M フェニレフリン投与による血管収縮の後、 10^{-6} M アセチルコリンの投与で血管内皮依存性弛緩反応を惹起させ、その弛緩率を算出した。

ストレスにおいて、過酸化水素種 (Hydrogen Peroxide: H_2O_2) は主要な活性酸素種であり、血管内皮障害に関与する³⁾。最近の研究では、GCX は IRI の環境下で高度に障害されること明らかとなっている⁴⁾。したがって、GCX の直接的な保護もしくは回復は病態の改善につながる可能性がある。現在まで、虚血プレコンディショニングや、虚血前のヒドロコルチゾンやアンチトロンビンの投与などが、IRI における GCX を保護することが報告されている⁵⁾。吸入麻酔薬であるセボフルランに関しても GCX に対する保護効果が報告されているが、これらの報告の多くは、GCX の構成成分の逸脱産物の測定による間接的評価が中心であり、GCX に対する生理機能学的評価を行なった報告は稀である。今回、酸化ストレスによる内皮 GCX および血管内皮依存性弛緩反応の障害をセボフルランが回復させることを仮説として検討した。

[方法]

等尺性張力変化測定

札幌医科大学医学部動物実験倫理委員会の承認のもと (承認番号: 17-107)、雄性 Wistar ラット

(200-300 g) より麻酔下に胸部下行大動脈を摘出し、長さ 5.0 mm x 幅 3.5 mm のリング状標本作製した。この切片はクレブス・リンゲル液で満たした組織管の中に懸垂し、95% 酸素と 5% 二酸化炭素の混合ガスを持続的に送気した。切片の張力変化を測定するために、切片の一方を等尺性張力変換器に接続し、事前検討で最大上張力を発生するために最適とされた 3.0 g に安静時張力を設定した。切片は 60 分間の平衡させた後、 3×10^{-2} M KCl を投与して血管の収縮を惹起させ、1.0 g の張力に満たないものは、サンプル操作によって平滑筋が損傷したものとして張力変化の検討は行わずに棄却した。また、 3×10^{-7} M フェニレフリンの投与による血管収縮の後に 10^{-6} M アセチルコリンで血管内皮依存性弛緩反応を惹起させ、その弛緩の割合が最大収縮の 60% に満たないものは、血管内皮が損傷しているものとして棄却した。一般的な血管張力測定の経過を Figure 1. に示す。実験グループを Figure 2. に示した。切片の 0.5 mM H_2O_2 の暴露は 37°C、8 分間行ない、暴露後はクレブス・リンゲル液で 5 回洗浄した。また、セボフルランの暴露は、ラットの 1 MAC (Minimum Alveolar Concentration: 肺胞内最小

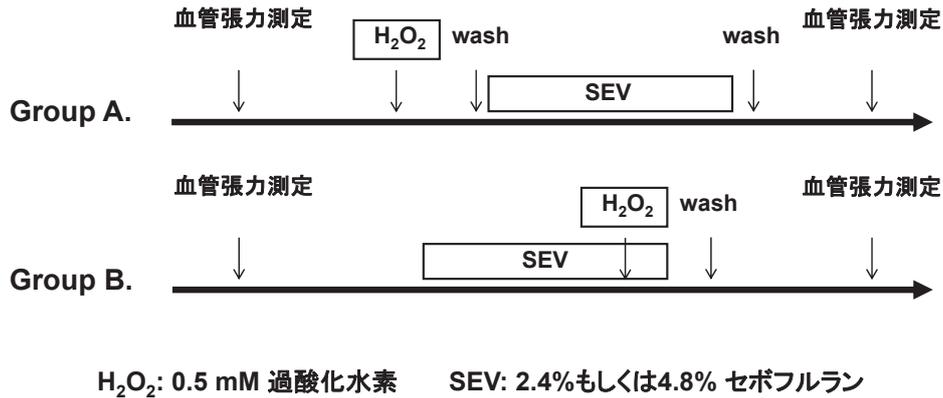


Figure 2. 実験プロトコル.

Group A: 大動脈リングを 0.5mM 過酸化水素を 8 分間、37°C で処理した後、2.4% もしくは 4.8% セボフルランを 30 分間投与した。処理の前後で等尺性張力変化測定を施行し弛緩率の変化を算出した。
 Group B: 大動脈リングを 4.8% セボフルランを 30 分間投与し、投与終了 8 分前から 0.5 mM 過酸化水素を 8 分間、37°C で処理した。処理の前後で等尺性張力変化測定を施行し弛緩率の変化を算出した。
 Group A, B 各々のグループにはコントロール群、過酸化水素単独群、セボフルラン単独群を含み、各グループに 4 群が存在する。

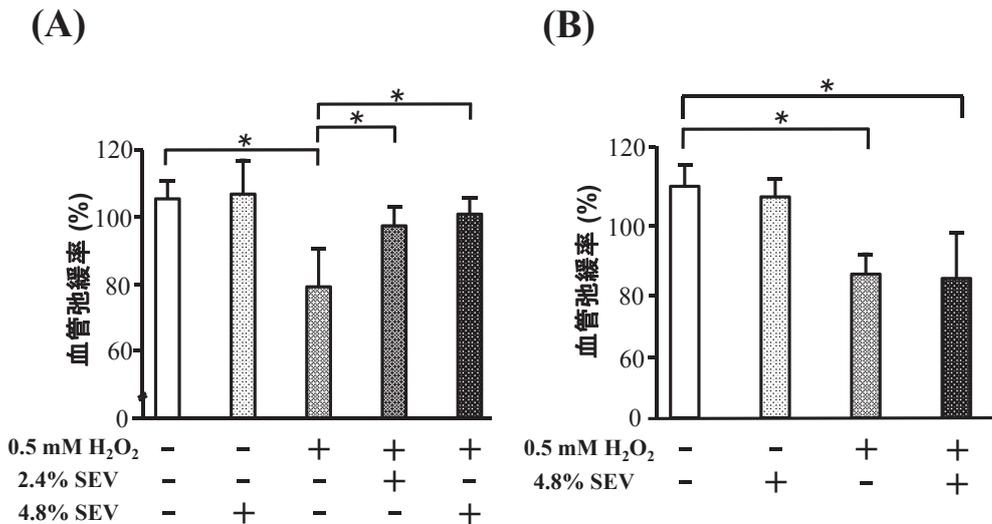


Figure 3.

(A) ラット大動脈の血管内皮依存性弛緩反応における過酸化水素処理後セボフルラン投与の効果 (Group A) (n = 8)
 H₂O₂: 過酸化水素; SEV: セボフルラン. *p < 0.001
 (B) ラット大動脈の血管内皮依存性弛緩反応におけるセボフルラン前投与の効果 (Group B) (n = 8)
 H₂O₂: 過酸化水素; SEV: セボフルラン. *p < 0.001

濃度), 2 MAC に相当する, それぞれ 2.4%, 4.8% の投与を 30 分間行なった (Figure 3).

レクチン染色による内皮グリコカリックスのイメージング

等尺性張力変化に使用した切片に対して, クリオスタットによって 20μm 厚の凍結切片を作製し

た. この切片をクレブス・バッファーにて洗浄後, 糖鎖に特異的に結合する FITC で蛍光ラベルされたレクチンである 20μg/ml WGA (Wheat Germ Agglutinin) を 37°C, 20 分間暴露し, その後クレブス・リンゲル液で 3 回の洗浄を行った. レクチン染色した切片は, 蛍光顕微鏡を用いて観察を行い, 切片の円周 2/3 以上が含まれるように

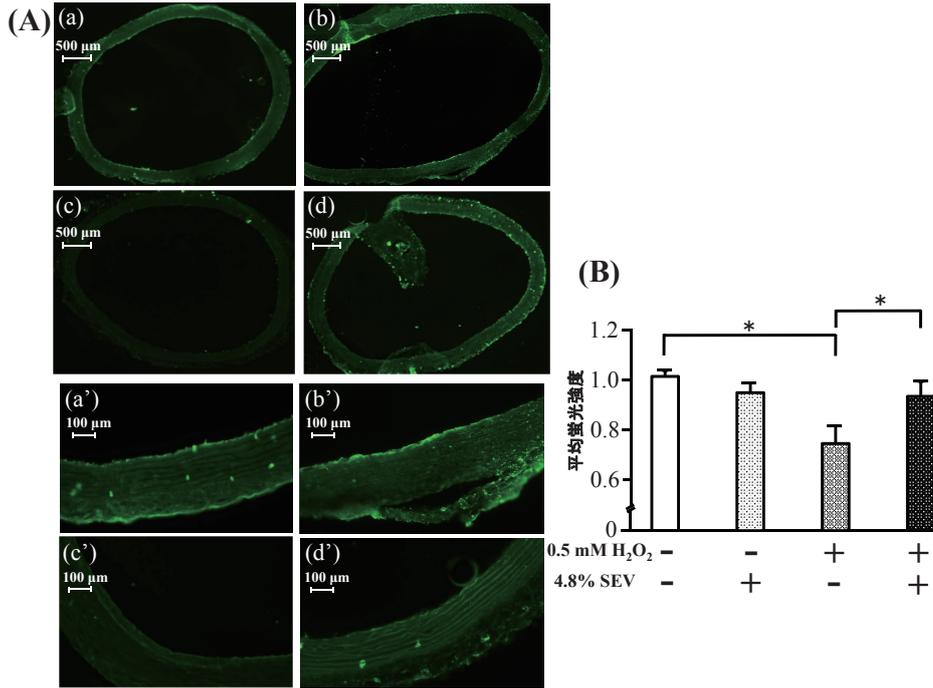


Figure 4.

- (A) ラット大動脈の内皮グリコリクスのレクチン染色における過酸化水素処理後セボフルラン投与の効果 (Group A) (n = 5)
 (a) コントロール群; (b) 4.8% セボフルラン単独群; (c) 過酸化水素単独群; (d) 過酸化水素 + 4.8% セボフルラングループ (a') - (d') 拡大像.
- (B) ラット大動脈のレクチン染色における平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity: MFI)
 H₂O₂: 過酸化水素; SEV: セボフルラン. *p < 0.001

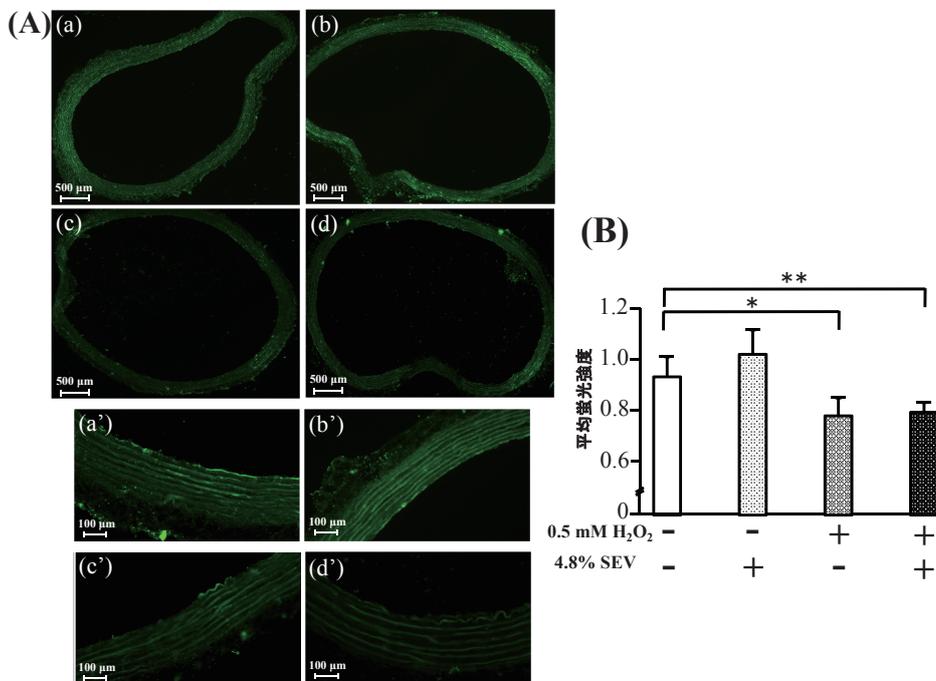


Figure 5.

- (A) ラット大動脈の内皮グリコリクスのレクチン染色におけるセボフルラン前投与の効果 (Group B) (n = 5)
 (a) コントロール群; (b) 4.8% セボフルラン単独群; (c) 過酸化水素単独群; (d) 過酸化水素 + 4.8% セボフルラングループ (a') - (d') 拡大像.
- (B) ラット大動脈のレクチン染色における平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity: MFI)
 H₂O₂: 過酸化水素; SEV: セボフルラン. *p = 0.02, **p = 0.03

200倍、4視野ごとに血管の最内層の平均蛍光強度 (Mean Fluorescence Intensity: MFI) を算出した (Figure 4, Figure 5).

統計手法

統計解析には、GraphPad Prism (Version 7.00., GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。一元配置分散分析 (One-way ANOVA) を行った後、調整p値を用いたTukey法による多重分析を行った。データは平均 ± 標準偏差、もしくは平均差 (Mean Difference: MD) とともに平均差の95%信頼区間 (Confidence Interval: CI) で表した。p < 0.05を有意とした。

【結果】

過酸化水素暴露後のセボフルランの投与は血管内皮依存性弛緩反応を回復させる

フェニレフリン投与後のアセチルコリン投与による内皮依存性弛緩反応は最大で110%であり、平均105 ± 5.3%であった。H₂O₂の暴露はコントロールに対して弛緩反応を著しく低下させた (MD 26.3, 95% CI 16.1 - 36.6, p < 0.001)。Group Aにおいて、H₂O₂暴露後にセボフルランを30分間投与した場合、内皮依存性弛緩反応は有意に改善した (2.4% セボフルラン; MD -18.3, 95% CI -28.4 - -8.0, p < 0.001, 4.8% セボフルラン; MD -21.8, 95% CI -32.6 - -10.9, p < 0.001)。セボフルラン単独の投与は内皮依存性弛緩反応に影響を与えなかった。

過酸化水素暴露前にセボフルランを投与しても血管内皮依存性弛緩反応の障害は保護できない

Group Bにおいて、H₂O₂暴露前にセボフルランを投与しても、血管内皮依存性弛緩反応は保護できなかった (MD -13.3, 95% CI -10.7 - 13.3, p = 0.99)。

過酸化水素暴露による内皮グリコカリックスの障害はセボフルラン投与により回復する

Group Aにおいて、H₂O₂暴露によって、レクチン染色における内皮グリコカリックスのMFI

は有意に減少した (MD 0.28, 95% CI 0.18 - 0.38, p < 0.001)。H₂O₂暴露後にセボフルランを投与するとMFIは有意に回復した (MD -0.2, 95% CI -0.3 - -0.1 p < 0.001)。一方でGroup Bのうち、H₂O₂暴露前にセボフルランを投与した群では、MFIの減少は抑制できなかった。

【考察】

本研究の新たな知見を以下に述べる。1) H₂O₂の暴露後のセボフルランの投与は血管内皮依存性弛緩反応を回復させる、2) この作用はセボフルランの前投与ではみられない、3) GCXの観察でも、セボフルランの作用は血管内皮依存性弛緩反応と同様の傾向がみられ、H₂O₂暴露後のセボフルラン投与のみGCXの回復作用がみられた。

セボフルランの内皮GCXに対する回復作用を示した報告は現在までほとんどない。本研究では、内皮依存性弛緩反応とGCXは同様な回復を示した。これらの知見は内皮GCXの障害が動脈硬化を引き起こすことや^{2,6)}、GCXの存在が内皮依存性弛緩反応に機能的に重要な役割を担うことを示唆していると考えられる。

いくつかの報告では、障害を受けたGCXが回復することが示されている。GCXの構成成分であるグリコサミノグリカンと類似したSulodexideはGCXを再構築し、内皮機能を保護することが報告されている⁷⁾。他にもヘパラン硫酸は市販されているGCXの構成成分であり、損傷したヘパラン硫酸を置換することが示されている⁸⁾。ヘパラン硫酸を含めて、GCXの回復を促進する試みがなされており、その機序として構成成分の置換、構造的な安定性、競合的結合、合成などが考えられているが、これらの成分の投与のみによって回復するのかは明らかになっていない⁹⁾。GCXの構成は持続的な脱落と合成の繰り返す中で、血管内皮細胞によって活発に調整されている^{10,11)}。絶え間ない合成のためには、新しいプロテオグリカン王小体/ゴルジ装置から細胞膜へ輸送することと同時に、損傷したプロテオグリカンをマトリックスメタロプロテアーゼファミリーやほかのヘパラーゼによって切り離す必要がある。セボフ

ルランがこれらのGCXの合成または脱落の機序に作用するのか、また作用するのであればどの部分のポイントに作用するのかは今後の検討する必要がある。われわれは、GCXの構成成分であり、酸化ストレスに関与するとされるポリシアル酸を分解する酵素のシアリダーゼを用いて、この酵素にセボフルランが作用することを見出している(データ未公表)。

今回の検討では、ラット大動脈に対して、 H_2O_2 処理後のセボフルラン投与はGCXや血管内皮依存性弛緩反応を回復させた。一方で、セボフルランの前投与はこれらの効果がみられなかった。セボフルランの虚血ポストコンディショニング効果は以前から報告があり、ラット脳組織の虚血再灌流障害に対してセボフルランが酸化ストレスを抑制することが報告されており¹²⁾、今回の検討結果と合致する。セボフルランの虚血プレコンディショニングは今回みられなかった原因としては、本研究のセボフルラン投与が持続的に30分間投与し、臨床的側面により近いものにしたことに対して、他の報告では頻回の短時間投与とされていることが考えられる^{13, 14)}。今後、虚血プレ/ポストコンディショニング効果に対するセボフルランの影響に関しても分子レベルの解明が待たれる。

[結 語]

セボフルランは過酸化水素の暴露による血管内皮依存性弛緩反応の減弱を回復させた。この機序として、セボフルランが内皮グリコカリックスの障害を回復させることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 828-39.
- 2) Mitra R, O'Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in atherosclerosis-relevant endothelium function and as a therapeutic target. *Curr Atheroscler Rep* 2017; 19: 63.
- 3) Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydro-

- gen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000; 486: 10-3.
- 4) Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H2247-56.
- 5) Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 2007; 107: 776-84.
- 6) VanTeeffelen JW, Brands J, Jansen C, Spaan JA, Vink H. Heparin impairs glycocalyx barrier properties and attenuates shear dependent vasodilation in mice. *Hypertension* 2007; 50: 261-7.
- 7) Li T, Liu X, Zhao Z, Ni L, Liu C. Sulodexide recovers endothelial function through reconstructing glycocalyx in the balloon-injury rat carotid artery model. *Oncotarget* 2017; 8: 91350-61.
- 8) Cheng MJ, Kumar R, Sridhar S, Webster TJ, Ebong EE. Endothelial glycocalyx conditions influence nanoparticle uptake for passive targeting. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 3305-15.
- 9) Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med* 2016; 280: 97-113. Review.
- 10) Koo A., Dewey C. F. Jr., and Garcia-Cardena G. Hemodynamic shear stress characteristic of atherosclerosis-resistant regions promotes glycocalyx formation in cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: C137-46.
- 11) Wang Z., Gotte M., Bernfield M., and Reizes O. Constitutive and accelerated shedding of murine syndecan-1 is mediated by cleavage of its core protein at a specific juxtamem-

- brane site. *Biochemistry* 2005; 44: 12355-61.
- 12) Zhang Y, Zhang FG, Meng C, Tian SY, Wang YX, Zhao W, Chen J, Zhang XS, Liang Y, Zhang SD, Xing YJ. Inhibition of sevoflurane postconditioning against cerebral ischemia reperfusion-induced oxidative injury in rats. *Molecules* 2011; 17: 341-54.
- 13) Chen Y, Nie H, Tian L, Tong L, Deng J, Zhang Y, Dong H, Xiong L. Sevoflurane preconditioning-induced neuroprotection is associated with Akt activation via carboxy-terminal modulator protein inhibition. *Br J Anaesth* 2015; 114: 327-35.
- 14) Casanova J, Garutti I, Simon C, Giraldez A, Martin B, Gonzalez G, Azcarate L, Garcia C, Vara E. The effects of anesthetic preconditioning with sevoflurane in an experimental lung autotransplant model in pigs. *Anesth Analg* 2011; 113: 742-8.