

ハロセンによる肝腎グアニジノ化合物代謝の変動に関する実験的研究

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室（主任：小坂二度見教授）

北 浦 道 夫

（平成元年1月31日）

Key words：ハロセン，尿素回路，アルギニン，肝腎代謝

緒 言

ハロセンの1.0%の吸入によって、肝動脈、門脈、腎動脈の血流量はそれぞれ、54%、60%、88%に減少すると報告されている¹⁾²⁾³⁾。肝、腎における血流量減少は、肝腎代謝相関の上から、両臓器の代謝を変動させる可能性がある⁴⁾。なかでも、肝腎相関に関わる諸物質の中で、尿素サイクルが有名であるが、吸入麻酔薬による影響を調べた報告は少ない⁵⁾。

肝には特異的にアルギナーゼが存在して、アルギニン (Arginine：ARG) をただちに分解し尿素を排泄する。腎では ARG からグアニジノ酢酸 (Guanidinoacetic acid：GAA) を産生して GAA のかたちで尿中へ排泄する。この一連の代謝動態におけるハロセンの影響をしらべることは、代謝上重要である。そこで、ハロセン吸入濃度別及び、吸入後時間別に ARG、GAA、クレアチン (Creatine：CR)、グアニジノ酪酸 (Guanidinobutyric acid：GBA) などのグアニジノ化合物変動を肝と腎についてしらべ、興味ある事実をみつけたので報告する。

材 料 と 方 法

材料として平均体重200 gのWistar系雄性ラットを用いた。ラットを5群に分け、O₂のみを吸入させた群をコントロール群とし、他の4群にはハロセン1 MACを2時間および4時間それぞれ吸入させた。ハロセン吸入後の直後と24時間後とで区別し、直後の群（1および3群）と24時間の群（2および4群）に分けた。

ハロセン吸入に際しては、筋注用ケタミン (250 mg/kg) を使用し、ラットの呼吸状態を一定にするために気管切開下で、小動物用レスピレーターを使用して Pa_{CO₂} を一定に保った。また、ラットの股動脈に24ゲージアンギオ[®]カテーテルを留置し、持続的に動脈圧をモニターした。

各群ラットは、脱血によって犠牲せしめ、下大静脈より冷生食水を注入して臓器を灌流したのち、肝臓および腎臓を摘出した。取り出した肝臓と腎臓は湿重量の2倍量の蒸留水を加えて、ただちにホモジネートしたのち、10,000×gで30分の高速遠心分離を行なった。得られた試料は50%トリクロール酢酸 (TCA) にて除蛋白し、TCA濃度が最終的に10%になるように調整した。次に、0℃の水槽内に1時間置いたのち、3,000×gで10分間遠心分離を行なった。その上清を孔径0.45μmのマイクロフィルターにて濾過処理し、得られた濾液を分析に供した⁶⁾。なお、蛋白定量はBIURET法により行なった。

分析には、高速液体クロマトグラフ (HPLC) LC-3 A (Shimadzu) を用いた。LC-3 Aの測定条件は、溶離液としてクエン酸緩衝液を用いたステップグラディエント方式による溶出法で、55℃の定常温度下でニンヒドリン反応を用いた。分離カラムにはグアニジノ化合物分析用強酸性陽イオン交換カラム ISC-05/0504 (Shimadzu) を用いた。各GCの濃度計算は、クロマトバックC-RIAを用いて自動計算処理を行ない、数値は組織の1 mgあたりの nmol で表した。なお、肝機能障害の指標として血清 (Ornithine carbamoyltransferase) OCT 値を

OCT 測定用キット (和光) にて測定した。

自動計算処理によって得られた実測値は平均±標準偏差で表示した。統計学的には Student's t (unpaired) 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

分析した GC は尿素サイクルに関する CR, GAA, ARG, GBA であり、以上の 4 物質について検討をおこなった。

1. 血清 OCT 活性 (IU/L) は、コントロール群 4.65 ± 0.49 , 1 群 4.80 ± 1.73 , 2 群 4.15 ± 1.67 , 3 群 4.84 ± 3.05 , 4 群 4.64 ± 3.11 で、すべての群間で有意差がみられなかった (表 1)。

2. 肝臓では、吸入直後では CR 濃度が有意に

上昇し、GBA, GAA, ARG は変化がなかった。覚醒後 24 時間後では CR は対照群と有意差がなく、GBA, ARG も有意差がなかった (表 2)。

3. 腎臓では、CR, GBA は変化がなく、ARG, GAA は有意に減少した。麻酔吸入後 24 時間では CR, GBA は有意差がなく、GBA, ARG も有意差がなかった (表 3)。

4. 血液中の GC 濃度は、コントロール群と他の 4 群との比較では、CR, GAA, ARG は有意差はなかった。GBA はコントロール群では検出できなかったが、1~4 群では検出可能であった (表 4)。

考 察

ハロセンは、肝及び腎の血流量を一過性に減

表 1 血液中の OCT 活性 (IU/L)

control	1M×2h-0 (1 群)	1M×2h-24 (2 群)	1M×4h-0 (3 群)	1M×4h-24 (4 群)
4.65 ± 0.49	4.80 ± 1.73	4.15 ± 1.67	4.84 ± 3.05	4.64 ± 3.11
Mean±S.D. n = 6				

未処理のラットとハロセン吸入後のラットの血液中の OCT 活性の変化を表示した。

表 2 肝臓のグアニジノ化合物の濃度 (n mole/mg. protein)

	control	1M×2h-0 (1 群)	1M×2h-24 (2 群)	1M×4h-0 (3 群)	1M×4h-24 (4 群)
CR	1.23 ± 0.27	$1.87 \pm 0.36 *$	$1.58 \pm 0.16 *$	$2.23 \pm 0.54 *$	$0.88 \pm 0.19 *$
GAA	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
GBA	0.55 ± 0.20	0.65 ± 0.27	0.44 ± 0.08	0.70 ± 0.16	$0.34 \pm 0.09 *$
ARG	0.48 ± 0.13	0.38 ± 0.09	0.32 ± 0.08	0.39 ± 0.07	0.37 ± 0.07

Mean±S.D. n = 6 * $p < 0.01$

未処理のラットとハロセン吸入後ラットの肝臓内の CR, GAA, GBA, ARG の変化を表示した。

表 3 腎臓のグアニジノ化合物の濃度 (n mole/mg. protein)

	control	1M×2h-0 (1 群)	1M×2h-24 (2 群)	1M×4h-0 (3 群)	1M×4h-24 (4 群)
CR	8.61 ± 1.47	8.25 ± 1.63	$5.95 \pm 0.93 *$	12.03 ± 5.25	6.86 ± 2.19
GAA	15.55 ± 2.92	$6.27 \pm 1.37 *$	$2.44 \pm 0.14 *$	$3.36 \pm 0.99 *$	$8.03 \pm 2.13 *$
GBA	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.04	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.04
ARG	32.52 ± 4.00	$17.83 \pm 2.88 *$	$10.42 \pm 0.77 *$	$5.66 \pm 3.39 *$	$21.44 \pm 4.38 *$

Mean±S.D. n = 6 * $p < 0.01$

未処理のラットとハロセン吸入後ラットの腎臓内の CR, GAA, GBA, GBA, ARG の変化を表示した。

表4 血液中のグアニジノ化合物の濃度 (n mole/mg. protein)

	control	1M×2h-0 (1群)	1M×2h-24 (2群)	1M×4h-0 (3群)	1M×4h-24 (4群)
CR	2.83±0.44	2.78±1.08	2.96±0.88	3.04±0.46	2.46±0.90
GAA	0.089±0.024	0.082±0.018	0.080±0.021	0.076±0.026	0.073±0.018
GBA	Not Detected	0.12±0.01	0.13±0.06	0.18±0.04	0.17±0.03
ARG	2.05±0.11	2.21±0.089	2.35±0.10	2.02±0.12	1.96±0.22

Mean±S.D. n = 6

未処理のラットとハロセン吸入後ラットの血液中のCR, GAA, GBA, ARG の変化を表示した。

少させる³⁾。肝腎両臓器の血流減少は、代謝動態に影響を及ぼすと考えられる⁴⁾。特に、肝と腎を結ぶ結物質の代謝動態のうちでは、尿素サイクルによる臓器相関が有名である⁵⁾⁶⁾。

尿素サイクルとは、肝で産生されるアンモニア態窒素を尿素として腎から排泄させる方法である。すなわち、肝臓ではアルギナーゼが特異的に高活性を有しているため、アルギニン(ARG)が尿素とオルニチン(ORN)とに分解されてしまう。そこで産生されたORNをシトルリン(CIT)、アルギノコハク酸さらにARGとなり尿素サイクルを構成している。以前は、尿素サイクルの途中産生されたCITが腎で取り込まれると考えられていたが、最近では腸管よりCITが血液中に排泄され、腎に取り込まれる⁷⁾。腎に取り込まれたCITはARGからGAAという反応過程で、GAAを産生し尿中に排泄させると考えられている(図1)⁸⁾⁹⁾。

吸入麻酔薬によって、こうした一連の反応経路とそこで産生される物質がいかなる影響を受けるかということについては報告が少ない。本研究では、臨床上一番使用例数の多いハロセンの肝腎グアニジノ化合物代謝に及ぼす影響について調べた。

まず、第1に、OCT活性については、表1に示すように、ハロセンによる影響は各群で認められなかった。肝ミトコンドリアに局在するOCTは、ORNをCITに転化する酵素で、劇症肝炎や広汎な肝の細胞壊死のときに、血中に増加する¹⁰⁾。ハロセンには従来より、肝ミトコンドリアの破壊作用はないので、血中OCT濃度に変動が認められなかったことは、当然の結果であるといえる。しかし、OCT活性に及ぼすハロセンの

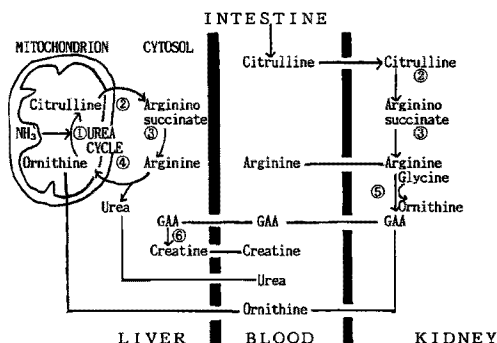


図1 尿素サイクルと肝腎のアミノ酸の動態

- ① Ornithine transcarbamoylase
- ② Argininosuccinate synthetase
- ③ Argininosuccinate lyase
- ④ Arginase
- ⑤ Glycine amidinotransferase
- ⑥ GAA methyltransferase

作用については、肝ミトコンドリア内のOCT活性を調べるか、ORNとCITの産生比を調べる以外に方法はなく、間接的には血中のORNとCITの濃度により推測するしかない。肝ミトコンドリア内のOCTに対するハロセンの影響について、本研究の結果からは確かなことは言えない。尿素サイクルに関係する腎の諸酵素には、腎に取り込まれたCITをアルギノコハク酸に転換するアルギノコハク酸合成酵素、アルギノコハク酸からARG、ARGからGAAという2つの反応を触媒するアルギノコハク酸分解酵素、Glycine amidinotransferase (GAT) などがある⁸⁾。

本研究では、腎臓内ARG及びGAA濃度は減少していた。通常、腎へのCITの取込がない状態では、腎GAT活性が亢進すると、腎内ARG低下及び腎内GAA増加という結果がもたらされ

るはずである。ハロセンを吸入した各群とも、吸入直後及び吸入24時間後いずれも腎内 ARG と、GAA の濃度が低下していたが、この結果は、ハロセンによる腎代謝の抑制に他ならない。腎の GAA 濃度の低下は、腎から GAA が大量に流出したか、腎での GAA 産生が抑制されたかのどちらかである。ハロセンによる代謝抑制が持続すると、腎への CIT の取り込み自体が低下して、腎全体での ARG から GAA への転化が遮断される。ARG から GAA への転化の抑制は、血中への ARG の放出をうながすので、血清 ARG は増加する。本研究では、ハロセン 1 MAC を 2 時間吸入させた直後のラット（1 群）において、腎内 ARG の有意な減少と、血清 ARG の上昇傾向がみられており、この考えを裏づけるといえる。

ここで、吸入麻酔薬による腎代謝への影響をみる場合、今まで腎代謝、ことに腎 GAA に関する報告が少ないので、腎代謝の抑制された状態、すなわち、急性腎不全（ARF）もしくは慢性腎不全（CRF）の代謝状態を参考にせざるをえない。ラットの ARF において、腎内 GAA は低下し、腎内 GAT 活性の低下が報告されている¹¹⁾。臨床例においては、ARF で血清 GAA は減少する¹²⁾。この低下は、腎内 GAA の低下によって GAA の血清中への遊離が減少したためだと説明されている。したがって、腎内 GAA の減少および血清 GAA の減少は、腎代謝が抑制されていることを意味すると考えられる。ハロセンによって一時的な腎代謝機能の抑制が生じることが、グアニジノ化合物の変動より確かめられた。

腎で産生される GAA は腎代謝機能を表現する物質のひとつである⁴⁾⁵⁾。重症患者の腎生理機能の低下に相関して、尿中 GAA 排泄量は有意に低下する。すなわち、尿中 GAA 排泄量は自由水クリアランスと有意の負相関を、クレアチニンクリアランスと有意の正相関を示しており¹³⁾、腎生理機能と腎代謝機能が密接に関連していることを裏づけている¹³⁾。吸入麻酔薬によって、腎血流量、腎糸球体濾過量などは一過性に抑制され、吸入中止後はただちに元の値に復する。腎内 GAA の変動からみると、ハロセン吸入後24時間後の2群、4群でも腎内 GAA は低濃度であり、腎代

謝機能は吸入直後から24時間目までは抑制されていることがわかる。腎代謝機能が吸入後何時間で腎生理機能のように元の値に復するかということの検討は今後の課題である。

次に、肝におけるクレアチン（CR）の変動について考察する。肝内 CR は、1、2、3 群の各群とも、4 時間吸入後24時間後の群（4 群）を除いて著明に増加していた。肝における CR の合成は、筋のエネルギー代謝に必須であり、通常は血清 GAA を肝に取り込んでアデノシルメチオニンの存在下、GAA メチルトランスフェラーゼによって合成される。血清中の CR、GAA、ARG は有意に変動しなかったのに対し、肝内 CR のみが増加した理由として、① GAA メチルトランスフェラーゼの活性亢進、② 筋肉中に取り込まれる CR 量が減少して肝での一時的な CR の貯留が増大した、かのどちらかが考えられる。前者は肝代謝の亢進を、後者は肝代謝の抑制を意味する。本研究では、酵素誘導を引き起こす薬物を前処置として用いていないため、肝代謝の亢進が生じているとは考えにくい。したがって、肝内 CR の増加は、筋肉代謝の抑制で CR の需要が低下し、そのフィードバックによって CR が肝に一時的に貯留したか、肝からの CR 遊離が減少したために、起こったものである。

4 群の24時間後群では、肝内 CR が逆に低下しており、肝内 CR の産生が24時間後においても抑制された状態にあるため、筋への CR の再供給に対応できないものと推測される。つまり、肝内 CR の増加と減少は、筋肉代謝の影響を間接的に反映した結果である¹⁴⁾。肝代謝のみ抑制された状態では肝内 CR は減少するはずであるが、同時に筋肉代謝が抑制されると、肝内 CR の貯留をもたらす、ついで、筋肉代謝が回復すると肝内 CR が減少するという二相性の変化を呈する。

エンフルレンを吸入させた実験⁵⁾で肝内 CR の変化をみると、ハロセンにおける場合とほぼ同様である。エンフルレンの吸入で肝内 CR は増加しており、ハロセンにおける場合と同じ機序のことがいえる。

一般的に、ハロセンによる肝障害はないといわれているが、本研究でも肝障害の鋭敏な指標である血清 OCT は変化しなかった。むしろ、注

目すべきことは、肝毒性の指標として血中にグアニジノ酪酸 (GBA) が1~4群でみられたことである。西谷は¹⁰⁾、ラットを用いた劇症肝炎モデルで、血清OCTの上昇と血中GBAの増加を報告している。血清OCTが肝細胞の崩壊によって急上昇し、数十時間以内に低値になるのに対し、血中GBAは吸入直後の1, 3群で軽度上昇するが、血中に遊離することは少なく、血中GBAの上昇をみた場合は、肝障害の可能性を考えるべきである。今後、肝でのGBAに関する動態の解明がまたれる。

結 論

1. ハロセンによる肝・腎のグアニジノ化合物(GC)に与える影響をみるために、1 MAC×2時間と1 MAC×4時間を吸入させた動物実験を行ない、吸入直後と吸入24時間後のGCの変化を調べた。

2. ハロセンの吸入によって、血清オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (OCT) 活性は変化しなかった。腎内GCの変動では、アルギニン (ARG)、グアニジノ酪酸 (GAA) が減少した。

3. 肝ではクレアチン (CR) が著明に増加し、肝代謝による影響のみならず、筋肉代謝の抑制を加味した結果であった。すなわち、肝内CRの増加がみられたのは、吸入濃度が低く時間が短い群で、肝内CRの減少が見られたのは、吸入濃度が高く時間が長い群でしかも吸入後24時間経過した群であった。

4. ハロセンによる肝障害をみる場合、血清OCT活性よりも早期に、かつ長く血中に認められるGBAが指標として有用である可能性があるかと推測した。

本稿の要旨は、第34回日本麻酔学会総会 (東京, 1987) および第2回国際グアニジノ化合物シンポジウム (富士裾野, 1987) で発表した。

稿を終えるにあたり、終始御懇切丁寧なる指導と校正を賜った岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室小坂二度見教授ならびに岡山大学生化学教室矢尾謙三郎講師に深甚なる謝意をささげます。さらに岡山大学麻酔・蘇生学教室の本研究に御協力くださった諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Thulin L, Andreen M and Irestede L: Effects of controlled halothane anesthesia on splanchnic blood flow and cardiac output in the dog. *Acta Anaesthesiol Scand* (1975) **19**, 146.
- 2) 長谷川浩平, 飯島一彦, 岡 龍弘, 米沢利英: 肝動脈・門脈・肝組織血流への吸入麻酔薬の影響. *麻酔* (1980) **34**, 619-625.
- 3) 小坂二度見: 腎の解剖と生理 (IV) - 第2項 腎の生理 -. *麻酔* (1974) **23**, 131-141.
- 4) Funahashi M, Kato H, Shiosaka S and Nakagawa H: Formation of arginine and guanidinoacetic acid in the kidney in vivo. Their relations with the liver and their regulation. *J Biochem* (Tokyo) (1981) **89**, 1347-1356.
- 5) 落合陽治, 松田力或, 雁木千恵子, 西谷恭子, 香曾我部義則, 板野義太郎, 小坂二度見: エンフルレンによる Urea cycle への影響と肝腎相関について. *麻酔と蘇生* (1984) **20** (別冊), 75-82.
- 6) Kitaura M, Ochiai Y, Sugimoto S, Kabutan K, Kosogabe Y, Matsuda R, Tsuji C and Kosaka F: The alteration of guanidino compounds in the liver, kidney and blood following halothane inhalation in rats. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Guanidino Compounds*. (edit. by Mori A, Cohen BD and Lowenthal A) Plenum Press, New York. in press.
- 7) Windmueller, Hewbert G and Spaeth AE: Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol* (1981) **241**, 473-480.
- 8) 中川八郎: 動物組織におけるアルギニン, プロリン代謝. 代謝マップ-経路と調節 (日本生化学会編) 東京

化学同人, 東京 (1980) pp. 48—49.

- 9) 葛野公明, 入江章子, 久城英人, 児玉順三, 佐谷 誠, 林 長蔵, 宮井 潔: グアニジノ酢酸分析による腎機能の解析. 医のあゆみ (1982) 121, 419—421.
- 10) 西谷恭子: 急性肝不全における腎臓の役割, 岡山医誌 (1986) 98, 135—143.
- 11) 東福要平, 黒田満彦, 村本弘昭, 竹田亮祐: 腎不全時のグアニジン代謝. 日腎誌 (1984) 26, 171—181.
- 12) Kosogabe Y, Ochiai Y, Matsuda R, Nishitani K, Abe S, Itano Y, Yamada T and Kosaka F: Guanidino compounds in patients with acute renal failure. In Guanidines, ed. Mori A, Cohen BD and Lowenthal A, Plenum Publishing Corporation, New York (1985) pp. 287—294.
- 13) 落合陽治, 株丹浩二, 北浦道夫, 杉本清治, 小坂二度見: 腎代謝機能の指標としての尿中グアニジノ化合物の意義. ICU と CCU, 投稿中.
- 14) 落合陽治, 雁木千恵子, 松田力哉, 西谷恭子, 香曾我部義則, 板野義太郎, 小坂二度見: 急性腎不全におけるエンドトキシンのグアニジノ化合物に及ぼす影響. 医のあゆみ (1984) 130, 815—817.

**Metabolic changes of hepatic and renal guanidino compounds
by inhalation of halothane in rats**

Michio KITAURA

Department of Anesthesiology and Resuscitology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. F. Kosaka)

A metabolic relationship between the liver and kidney exists in combination with the urea cycle. In patients with acute renal or hepatic insufficiency, certain variations among several guanidino compounds are relevant to the condition of the liver or kidney. An experimental model of rats exposed to inhaled halothane was evaluated for metabolic changes in the liver and kidney by measuring guanidino compound levels using high performance liquid chromatography. As a result, no significant difference in serum ornithine carbamoyltransferase (OCT) activities were observed among all groups. In the liver, concentrations of creatine (CR) and guanidinobutyric acid (GBA) were significantly elevated immediately after inhalation of halothane without any accompanying changes in guanidinoacetic acid (GAA) and arginine (ARG). In the kidney, ARG and GAA were significantly decreased without any accompanying changes in CR and GBA. No significant difference in serum GC levels was observed among the groups.

The inhalation of halothane appears to change the concentrations of GAA, ARG and CR in the liver and kidney. It also appears that inhalation of halothane caused GBA to appear in the blood, indicating a possible association of halothane with hepatotoxicity.