

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 2 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591833

研究課題名 (和文) 再生医療における血管新生は麻酔薬及び周術期管理法に影響されるのか？

研究課題名 (英文) Is angiogenesis in regenerative medicine influenced by anesthetics and perioperative management methods?

## 研究代表者

川人 伸次 (KAWAHITO SHINJI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60284296

## 研究成果の概要 (和文)：

血管新生に及ぼす各種麻酔薬の影響を動物実験、臨床研究、培養細胞を用いた基礎実験において検討した。動物実験と臨床研究により、吸入麻酔薬の血管新生に及ぼす影響は少ないこと、培養細胞を用いた基礎実験により、静脈麻酔薬の一部は血管新生を促進する傾向があることがわかった。血管新生に及ぼす麻酔薬の影響が解明されることにより、周術期管理法の新たな指標となることが期待される。

## 研究成果の概要 (英文)：

We examined the influence of various anesthetics on angiogenesis in animal experiments, clinical studies, and basic experiments using cultured cells. Animal experiments and clinical studies revealed the effect on angiogenesis of the inhalation anesthetic should be less, and basic experiments using cultured cells indicated part of the intravenous anesthetic tended to promote angiogenesis. It is hoped that a new indicator of the perioperative administration is established by the influence of the anesthetic which gives it to angiogenesis being elucidated.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：再生医療、血管新生、麻酔薬、周術期管理法、薬剤反応性

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学や分子発生学などの生命科学の進歩により、組織の発生が解明されるようになり、障害された臓器の再生が実現可能になりつつある。とりわけ血管新生は、

再生医学の分野で大きな進歩を遂げ、臨床応用の段階に至った再生医療の一つである。

本邦では世界に先駆けて、閉塞性動脈硬化症やバージャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生の有効

性が発表され、この治療は再生医療としては初めて高度先進医療の保険適応を受けることになった。当院でも、2004年9月より単核球細胞移植を開始した。さらに最近では、虚血性心疾患に対する骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の有効性が動物モデルとともに臨床的にも報告されるようになり、重症狭心症や虚血性心筋症の治療に新たな展開が期待されるに至っている。このように、心血管系における再生医療は基礎的研究が飛躍的に臨床へと応用されつつある。一方、血管新生促進は両刃の剣であり、悪性腫瘍の成長も促進する可能性がある。糖尿病性網膜症や悪性腫瘍治療の分野では、異常血管新生を抑制し腫瘍の縮小を図る抗血管新生療法が進んでいる。血管新生制御は現在最も重要な研究課題である。血管新生促進・抑制に関連する様々な薬剤の開発が進む中、従来から用いられている薬剤の予想外の血管内皮増殖因子の促進作用や抑制作用が発見されている。

周術期に使用される各種麻酔薬は血管シグナリング分子や血管の反応性に影響を及ぼすため、血管新生にも影響を及ぼす可能性がある。多大な侵襲が加わる手術中や手術後長時間の鎮静を要する場合は使用される麻酔薬・鎮静/鎮痛薬の影響は大きいと推測される。血管新生には VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), angiopoietin-1 などの増殖因子・血管成熟促進因子が複雑に関与し、虚血組織において血管新生を誘導することが明らかになった。その中でも VEGF (血管内皮細胞増殖因子)は大動脈平滑筋細胞から分泌される血管新生促進因子であり、生理的血管新生において極めて重要な部分を担っている。

一方、麻酔科領域において再生医療に関与する研究はこれまでほとんどされていない。周術期に使用される麻酔薬・鎮静/鎮痛薬の血管新生に及ぼす効果はまだ確立されていないといえる。静脈麻酔薬のミダゾラムが VEGF 放出を刺激する可能性が示唆されているが (Tanabe K, Dohi S, Matsuno H, et al.: Midazolam stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells. *Anesthesiology* 98:1147-1154, 2003)、他の麻酔薬に関する研究はまだ進んでいない。申請者らの研究グループは周術期の心・血管系の反応、心筋保護作用等について研究を続け成果を上げてきた実績があり、また現在もミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャンネルの役

割、各種麻酔薬の血管収縮・拡張反応、ストレス蛋白質誘導、 $\beta$ 遮断薬による心筋保護作用等を研究中である。麻酔薬・鎮静/鎮痛薬の血管新生に及ぼす影響とその詳細な機序の解明は国際的に評価の高いものとなりうると考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 放出に及ぼす各種麻酔薬 (吸入麻酔薬と静脈麻酔薬) の影響を調べるため、ラット *in vivo* モデルを用いる基礎研究、長時間手術中の VEGF の変動を調べる臨床研究、培養ラット大動脈平滑筋細胞 (A10 細胞) を用いる *in vitro* 基礎研究の3種類の研究を企画した。本研究の最終目的は再生医療における血管新生に及ぼす各種麻酔薬及び周術期管理法の影響、さらにそのメカニズムを調べることである。

## 3. 研究の方法

本研究の特色は、各種麻酔薬の VEGF 放出に及ぼす影響を基礎研究と臨床研究を組み合わせ、様々な手法を用いて検討する点にある。まず、ラット *in vivo* モデルを用いて吸入麻酔薬を長時間投与し VEGF 放出を immunoassay で評価した。次に臨床研究でその結果を確認した。最後に静脈麻酔薬について培養ラット大動脈平滑筋細胞 (A10 細胞) を用いた *in vitro* 実験を実施した。

### <In vivo 動物実験>

吸入麻酔薬 (セボフルラン) を単独で長時間投与し、VEGF の変化を観察した。オスの Wister 系ラット (250-300 g) をセボフルラン吸入により麻酔導入し、約 2% で麻酔維持した。気管切開、人工呼吸管理下に大腿動静脈よりカニューレションし、輸液ルート、動脈圧測定・採血用とした。保温マットで体温を維持し、 $PaO_2$  が 40mmHg 前後になるように換気条件を一定に保ち、血行動態を記録しながらセボフルランを 12 時間連続投与した。麻酔導入直後、1 時間後、3 時間後、6 時間後、12 時間後に採血し、最終採血後、ラットを安楽死させた。VEGF enzyme-linked immunosorbent assay kit で VEGF を測定した。

### <臨床研究>

吸入麻酔薬 (セボフルラン) を用いた長時間手術中の VEGF の変動を調べ、*in vivo* 動物実験の結果を臨床研究で確認した。研究内容を説明し同意の得られた成人予定手術患者を対象とした。手術侵襲、手術時間がほぼ一定で呼吸・循環の変動が少ない下腹部手術 (手術時間 5-6 時間予定) を選択

した。セボフルラン (約 1.5%) を用いた吸入麻酔を中心にレミフェンタニルを併用し麻酔維持した。麻酔前投薬は投与せず、気管挿管・人工呼吸下に管理し、筋弛緩薬は通常量使用した。モニターは通常手術に準じ、静脈ライン、動脈ラインを確保した。麻酔導入前、1 時間後、3 時間後、6 時間後に採血し、VEGF enzyme-linked immunosorbent assay kit で VEGF を測定した。

#### <In vitro 基礎実験>

培養血管平滑筋細胞を用いて VEGF 放出に及ぼす静脈麻酔薬の影響を調べた。ラット培養血管平滑筋 (A10) 細胞をプロポフォル (1, 10, 100  $\mu$ M), ケタミン (1, 10, 100  $\mu$ M), ジアゼパム (1, 10, 50, 100  $\mu$ M), ミダゾラム (1, 10, 50, 100  $\mu$ M) に暴露させ、12 時間ごとに 72 時間まで培養液中の VEGF 濃度を VEGF enzyme-linked immunosorbent assay kit で測定した。

#### <統計>

結果は平均値±標準偏差で示し、分散分析及び post-hoc test (Student-Newman-Keuls) を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 4. 研究成果

#### <In vivo 動物実験>

体温、呼吸・循環動態に有意な変化はなかった。吸入麻酔薬 (セボフルラン) の長時間投与により VEGF の測定値にも有意な変化はなかった。セボフルランの長時間投与による血管新生に及ぼす影響は少なく、虚血患者・担癌患者共に安全に使用できる可能性が示唆された。

#### <臨床研究>

体温、呼吸・循環動態に有意な変化はなかった。吸入麻酔薬 (セボフルラン) 投与により VEGF の測定値にも有意な変化はなかった。セボフルランの安全性が臨床研究においても確認された。

#### <In vitro 基礎実験>

ジアゼパムにより 24 時間後の VEGF 濃度は有意に増加した (1, 10, 50, 100  $\mu$ M; 133.3 ± 5.8, 122.5 ± 3.5, 193.0 ± 2.6, 211.7 ± 18.9 pg/ml, control; 80.0 ± 0.0 pg/ml)。このうち 50  $\mu$ M では 36, 60, 72 時間後において、100  $\mu$ M では 36, 48, 60, 72 時間後においても VEGF 濃度は有意に増加した。ミダゾラム (50  $\mu$ M) は 24, 36, 48 時間後で VEGF 濃度は有意に増加した。

ケタミン (100  $\mu$ M) は 48 時間後で VEGF 濃度は有意に増加したが、他の濃度や時間では有意な差を認めなかった。プロポフォル

はいずれの濃度や時間でも VEGF 濃度に有意な影響を及ぼさなかった。

#### <まとめ>

動物実験と臨床研究により、吸入麻酔薬 (セボフルラン) の血管新生に及ぼす影響は少ないことがわかった。さらに長時間暴露において有意な変化が認められる可能性も否定はできないが、通常臨床の範囲内 (手術時間 5-6 時間程度) ではほとんど影響はないと考えられた。一方、培養細胞を用いた基礎実験により静脈麻酔薬の一部 (ミダゾラムとジアゼパム) は VEGF 産生を刺激する傾向が示された。周術期のベンゾジアゼピン系薬剤の長期投与により血管新生が促進される可能性が示唆された。

現在手術時の麻酔方法、集中治療領域における鎮静法等は患者の状態、手術術式等のみにより選択されており、血管新生に及ぼす麻酔薬の影響といった観点からは考慮されていない。極端に言えば、細胞移植、バイパス手術をはじめとする血管新生促進を目的とした手術・術後管理と血管新生抑制を図りたい糖尿病性網膜症や悪性腫瘍の手術・術後管理が同じ薬剤・同じ方法で行われている。血管新生に及ぼす麻酔薬・鎮静/鎮痛薬の影響が解明されることにより、周術期管理法の新たな指標となることが期待される。今後は更に、血管新生に影響を及ぼす可能性がある他の因子 (急性高血糖など) の作用も検討する予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Kawahito S, Kitahata H, Kitagawa T, Oshita S: Intensive insulin therapy during cardiovascular surgery. The Journal of Medical Investigation 57: 191-204, 2010 査読有
- (2) Kawahito S, Kitahata H, Oshita S: Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. World Journal of Gastroenterology 15: 4137-4142, 2009 査読有
- (3) Ikegami T, Shimada M, Imura S, Nakamura T, Kawahito S, Morine Y, Kanemura H, Hanaoka J: Argon gas embolism in the application of laparoscopic microwave coagulation therapy. Journal of Hepatobiliary Pancreatic Surgery 16:

- 394-398, 2009 査読有
- (4) Kitahata H, Nozaki J, Kawahito S, Tomino T, Oshita S: Low-dose sevoflurane inhalation enhances late cardioprotection from the anti-ulcer drug geranylgeranylacetone. *Anesthesia and Analgesia* 107: 755-761, 2008 査読有
- (5) Nitta K, Kawahito S, Kitahata H, Nozaki J, Katayama T, Oshita S: Two unusual complications associated with cardiopulmonary bypass for pediatric cardiac surgery detected by transesophageal echocardiography after decannulation. *Pediatric Anesthesia* 18: 325-329, 2008 査読有
- (6) Yamanaka A, Kitahata H, Tanaka K, Kawahito S, Oshita S: Implications of intraoperative transesophageal ventricular pacing in pediatric patients. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 22: 92-94, 2008 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Kawahito S, Kitahata H, Okada T, Hirose K, Oshita S: Continuous blood glucose monitoring and control for patients undergoing liver transplantation, The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, Oct. 18, 2010, San Diego, USA
- (2) Kawahito S, Kitahata H, Nakamura T, Okada T, Oshita S: Usefulness of continuous blood glucose monitoring during cardiovascular surgery, The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, Oct. 20, 2009, New Orleans, USA
- (3) Kitahata H, Nozaki J, Kawahito S, Tomiyama Y, Oshita S: Interaction of the  $\beta$ 1-blocker landiolol with early and late sevoflurane-induced preconditioning, The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, Oct. 18, 2009, New Orleans, USA
- (4) Kawahito S, Kitahata H: Insulin therapy during and after cardiopulmonary bypass, The 8th Meeting of the Asian Society of Cardiothoracic Anesthesia, Sep. 10, 2009, Tokyo, Japan

- (5) Wakamatsu N, Kawahito S, Kitahata H, Goh R, Kohyama A: Landiolol produces cardioprotection in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery, The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, Oct. 22, 2008, Orlando, USA
- (6) Kawahito S, Kitahata H, Nakamura T, Iseki A, Oshita S: Continuous intraoperative blood glucose monitoring and control using the STG-22 closed-loop system, The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, Oct. 20, 2008, Orlando, USA
- (7) Nakamura T, Kawahito S, Kitahata H, Tomiyama Y, Oshita S: Intensive insulin therapy in patients undergoing living-related liver transplantation, The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, Oct. 18, 2008, Orlando, USA

[図書] (計 4 件)

- (1) 北畑 洋, 川人伸次: 第 II 章 循環器 心筋梗塞の既往がある. pp56-57, 高崎真由弓, 河本昌志, 川真田樹人, 岡本浩嗣 (編) 麻酔科トラブルシューティング A to Z, 分光堂, 東京, 2010
- (2) 岡田 剛, 川人伸次: 第 III 部 生理学と病理学, 第 12 章 塞栓症, pp256-275, 新見能成 (編), 人工心肺 その原理と応用 (Cardiopulmonary Bypass: Principles and Practice), メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2010
- (3) 川人伸次: モルヒネ塩酸塩水和物, モルヒネ硫酸塩水和物. pp75-77, 社団法人日本麻酔科学会 (編), 厚生労働省医薬品等適正使用推進施行事業 — 麻酔薬および麻酔関連薬使用ガイドライン— (改訂第 3 版), 社団法人日本麻酔科学会出版, 東京, 2009
- (4) 川人伸次: 感染性心内膜炎の非心臓手術. pp297 - 303, 岡元和文 (編) 合併疾患別にみる周術期管理 Q&A—研修医からの質問 362—, 総合医学社, 東京, 2008

[その他]

ホームページ等

[http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/masui\\_totsu/ikyoku/](http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/masui_totsu/ikyoku/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川人 伸次 (KAWAHITO SHINJI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60284296

(2) 研究分担者

北畑 洋 (KITAHATA HIROSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授

研究者番号：60161486

大下 修造 (OSHITA SHUZO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授

研究者番号：60144945