

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17836

研究課題名（和文）小児がんに対する麻酔薬の選択が予後および免疫機能へ与える影響

研究課題名（英文）The Effect of Anesthetic Choice on Prognosis and Immune Function in Pediatric Cancer

研究代表者

大井 まゆ（Ooi, Mayu）

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10716567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：白血病細胞株HL60細胞、BALM-9細胞を用い全身麻酔薬の選択が白血病細胞における生存率やミトコンドリア機能、免疫機能へ与える影響をin vitroで解析した。HL60細胞、BALM-9細胞は吸入麻酔薬セボフルラン、静脈麻酔薬プロポフォールによる細胞毒性を示さなかった。セボフルランは分化HL60細胞のミトコンドリア呼吸・ATP産生を活性化し、活性酸素産生を増加させた。プロポフォールはミトコンドリア呼吸・ATP産生を活性化するが、活性酸素産生に影響しなかった。以上からプロポフォールはミトコンドリア呼吸を活性化させた際に活性酸素を産生させにくい可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔薬の選択が小児血液腫瘍患者における予後や免疫機能へ影響する可能性がある。小児では腫瘍の切除術のみならず軽微な処置に対して全身麻酔を行うことが多く、成人よりも全身麻酔薬に暴露する機会が多い。また、麻酔薬と癌の長期転機についての研究は成人を対象としており小児のエビデンスは少ない。そのため小児癌患者に対し麻酔薬の選択が与える影響について調べることは急務である。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effects of general anesthetics on leukemia cell viability, mitochondrial function, and immune function in vitro using the leukemia cell lines HL60 and BALM-9 cells. HL60 and BALM-9 cells showed no cytotoxicity induced by sevoflurane or propofol. Sevoflurane activated mitochondrial respiration and ATP production and increased ROS production in differentiated HL60 cells. Propofol activated mitochondrial respiration and ATP production but did not affect ROS production. These results suggest that propofol may be less likely to produce ROS when mitochondrial respiration is activated.

研究分野：麻酔科学

キーワード：全身麻酔薬 小児 悪性腫瘍 免疫機能 長期予後

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

麻酔薬の癌細胞への影響

近年、癌の手術において周術期のいくつかの要因(麻酔、鎮痛、輸血、体温)が手術結果と相互作用し、影響を与える可能性が示されている。その中で、麻酔の主な変更可能な要因の1つは、全身麻酔を維持するための鎮静薬としての揮発性麻酔薬または静脈麻酔薬の選択である。プロポフォールによる完全静脈麻酔(TIVA: total intravenous anesthesia)は、術中覚醒および術中低血圧のリスクがわずかに高い一方で、より迅速な効果発現、術後の悪心および嘔吐のリスク低減も可能にする。さらに、より最近の研究は、プロポフォールがいくつかの抗腫瘍特性を持っているかもしれないことを示唆している¹⁾。対照的に、イソフルランやセボフルランなどの揮発性麻酔薬は、in vitro でさまざまな癌細胞株の増殖と移動を促進し、in vivo で腫瘍細胞の移動距離を増加させることが報告されている²⁾。しかし、いまだ、悪性腫瘍における長期予後改善における、至適な全身麻酔薬の選択に関して明確なエビデンスは存在しない。

麻酔薬と免疫機能との関連

また麻酔薬の別の重要な側面は、免疫機能への影響がある。免疫機能は癌患者の転帰に影響を与える可能性がある。揮発性麻酔薬は、Tリンパ球のアポトーシスを誘導し、ナチュラルキラー(NK)細胞の活性を減衰させ、Th1/Th2比を低下させ、発癌性サイトカインおよびマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)のレベルを高めることにより、免疫機能を全身的に損なうことが示されている³⁾。対照的に、プロポフォールは細胞傷害性Tリンパ球活性を増加させ、NK細胞機能を維持すること⁴⁾や、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)およびプロスタグランジンE2(PGE2)機能を阻害することにより、抗炎症および抗酸化特性があることも示した⁵⁾。

成人患者における麻酔薬の癌の長期予後への影響

臨床研究では、いくつかの研究が吸入麻酔とTIVAで手術された癌患者の長期転帰を比較し、TIVAでさまざまな程度の成功を報告した⁶⁾。TIVAで手術を受けた群では死亡率が低い、もしくは再発率が低いとの結果を示した。

本研究の着想

これらの結果から小児の癌の手術、および癌患者の処置、検査などに行う全身麻酔においても麻酔薬の選択が影響を与える可能性はないのか、という疑問を抱いた。小児では腫瘍の切除術のみならず軽微な処置に対して全身麻酔を行うことを考えると、小児癌患者に対し麻酔薬の選択が与える影響について調べることは急務であると考えた。

2. 研究の目的

血液悪性腫瘍と診断され全身麻酔を要する小児患者において、使用する全身麻酔薬として吸入麻酔薬と静脈麻酔薬を比較し、化学療法効果率、再発率、骨髄幹細胞生存率(Cell viability)、末梢血中の好中球・単球・リンパ球数および白血球における割合、血中INF- γ 濃度、TGF- β 濃度、IL-4濃度の推移を検討することで、麻酔薬の選択が小児悪性血液腫瘍患者における予後および免疫機能へ与える影響を明らかにする。また、in vitro で白血病細胞株HL60、BALM-9を用いて麻酔薬の選択が細胞の生存率、ミトコンドリア機能、免疫機能に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

対象患者の抽出と後方視的検討

過去の手術および麻酔件数から情報を収集し対象患者の抽出を行った。

細胞培養と細胞分化

前骨髄球系細胞株HL60細胞と急性リンパ性白血病細胞株BALM-9は、JCRB細胞バンクから入手した。10%ウシ胎児血清、100 units/ml Penicillin-Streptomycin Solutionを含むRPMI-1640培地で培養し37℃、5%CO₂インキュベーターで維持した。分化HL60細胞は、1 μ M all-trans-Retinoic Acid(ATRA)を添加したRPMI-1640培地で分化誘導した。

全身麻酔介入

全身麻酔薬は静脈麻酔薬のプロポフォール、吸入麻酔薬のセボフルランを使用した。培養細胞を、4 μ g/mLプロポフォールを含む培地存在下で1、5時間培養した。あるいは、細胞を3%気化セボフルラン存在下のインキュベーター中で1、5時間培養した。

細胞生存率解析

1時間の麻酔薬暴露後、細胞生存率を細胞数で評価した。

ミトコンドリア膜電位解析

1時間の麻酔薬曝露後、JC-1を用いて、プロトコールに従って細胞のミトコンドリア膜電位を測定した。蛍光画像は、All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X700を用いて測定した。蛍光強度はEnSpire multimode plate readerを用いて測定した。ミトコンドリア膜電位は赤/緑蛍光強度比で表した。

ミトコンドリア機能解析

Seahorse XFe96 細胞外フラックスアナライザーを用いて、ミトコンドリアの酸素消費率とATP産生量を測定した。全身麻酔処理後 Cell Tak コーティングした Seahorse XFe96 ウェルプレートに細胞を播種し、プレートを遠心して細胞を接着させた。次にミトコンドリア機能分析を製造元のプロトコールに従って行った。

活性酸素産生量解析

免疫機能として活性酸素産生を測定した。Cell Tak コーティングした 96 ウェルプレートに細胞を播種し、プレートを遠心して細胞を接着させた。プロトコールに従って 5 μM Cell IRox deep red®で染色し、HBSS(Hanks' Balance Salt Solution)で洗浄した後、蛍光顕微鏡で分析した。蛍光画像は、All-in-One Fluorescence Microscope BZ-X700を用いて測定した。測定値はすべて、各実験における未処理のコントロールに対する相対値で表した。

4. 研究成果

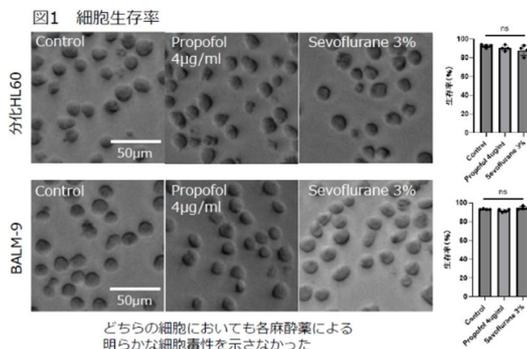
研究対象の抽出と後方視的検討

過去の手術および麻酔件数から研究対象患者の人数、術後の血球数など通常の診療の範囲内で測定される数値の推移につき情報を収集した。また過去の研究報告などから統計学的に必要なとされる症例数を割り出した。

小児血液悪性腫瘍の疾患の多様性が幅広いことが判明し、統計学的に当該施設での手術件数から研究に必要な症例数を満たすには、研究機関が長くなることが予測された。そのため血液腫瘍特に白血病において麻酔薬が免疫機能へ与える影響を調べるために対象をヒトに限らず、in vitroでのHL60細胞、BALM-9細胞での実験を検討した。

麻酔薬による細胞生存率への影響

プロポフォール、セボフルランは1時間の麻酔ではそれぞれの細胞生存率に影響を示さなかった(図1)。



麻酔薬によるミトコンドリア膜電位の変化

分化 HL60 細胞においてセボフルランはミトコンドリア膜電位を低下させたがプロポフォールは膜電位を変化させなかった(図2)。BALM-9ではミトコンドリア膜電位の変化は認められたものの有意ではなく、ミトコンドリア機能を測定する以下の実験では分化 HL60 細胞のみ用いることとした。

図2 ミトコンドリア膜電位

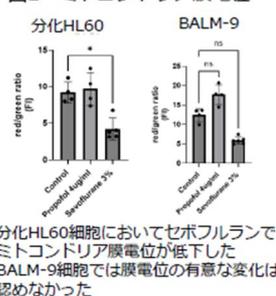
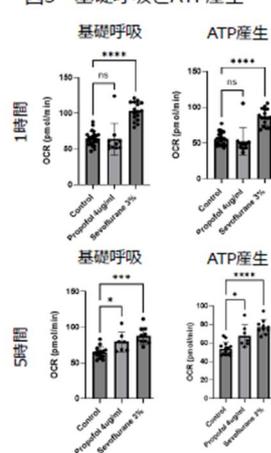


図3 基礎呼吸とATP産生

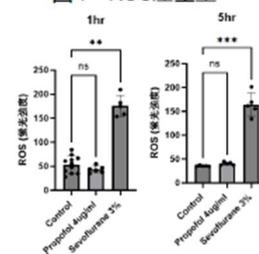


1時間ではセボフルランで基礎呼吸、ATP産生ともに増加した
5時間ではセボフルラン、プロポフォールで基礎呼吸、ATP産生量が増加した

麻酔薬によるミトコンドリア代謝と活性酸素産生量への影響

セボフルランは麻酔1時間および5時間においてミトコンドリア呼吸・ATP産生を活性化し、活性酸素産生を増加させた。プロポフォールは、麻酔1時間においてミトコンドリア呼吸・ATP産生と活性酸素産生を変化させなかった。プロポフォールは麻酔5時間ではミトコンドリア呼吸とATP産生を増加させたが、活性酸素産生は変化させなかった(図3、4)。

図4 ROS産生量



セボフルランは1時間、5時間麻酔でROS産生量を増加させた

BALM-9、HL60細胞はセボフルラン、プロポフォールによる細胞毒性を示さなかった。またプロポフォールはセボフルランと比べてミトコンドリアを活性化した際に活性酸素産生を増加させにくく、細胞保護的に作用する可能性がある。小児癌患者に対し麻酔薬の選択が与える影響について調べることは急務であり、引き続き研究を行っていく予定である。

参考文献

- 1) BMC Anesthesiol 2018; 18: 77.
- 2) Br J Anaesth 2016; 116: 870-877.
- 3) Reg Anesth Pain Med 2010; 35: 490-495.
- 4) Immunopharmacol Immunotoxicol 2007; 29: 477-486.
- 5) J Anesth 2014; 28: 911-918.
- 6) Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2019 Jun 25;11(3):83-94.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------