

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591702

研究課題名（和文）吸入麻酔薬と静脈麻酔薬による免疫細胞アポトーシス誘導機序の解明及びその相違の解析

研究課題名（英文）The analysis of the mechanisms by which volatile anesthetics and propofol induce apoptosis of immune cells.

研究代表者

黒澤 伸 (KUROSAWA SHIN)

東北大学・病院・准教授

研究者番号：60272043

研究成果の概要（和文）：揮発性吸入麻酔薬セボフルランおよびイソフルランは用量依存性かつ時間依存性にマウス胸腺細胞にアポトーシスを誘導した。この胸腺細胞アポトーシス誘導では胸腺細胞内カスパーゼ3が活性化され、アポトーシス誘導に先行してミトコンドリア膜電位の低下が観察された。したがって揮発性吸入麻酔薬による免疫細胞アポトーシス誘導機序にミトコンドリア膜電位の低下とそれによるカスパーゼ経路活性化が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, volatile anesthetics induced thymocyte apoptosis and reduced mitochondrial membrane potential in thymocytes dose- and time-dependently. In addition, the reduction of mitochondrial membrane potential preceded the induction of thymocyte apoptosis. Probably, reduction of mitochondrial membrane potential in thymocytes is one of the initial events.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：麻酔学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、周術期麻酔管理、たとえば術中の血糖値や体温管理、循環管理、同種血輸血管理などが術後の長期予後に影響をあたえる可能性が示唆されている。その原因としてはこれらの麻酔管理が直接的または間接的に免疫能を抑制することによると考えられている（*Curr*

*Opin Anaesthesiol.* 2006;19:423-428)。また、麻酔薬が免疫能に直接作用することも報告されており、われわれは麻酔薬の免疫抑制効果の程度を考慮した麻酔薬と麻酔法の選択が術後予後を視野に入れた麻酔管理を可能にすることを提言している（*J Anesth.* 2008;22:263-277)。すなわち最近の麻

酔管理と術後予後に関連した研究内容は予後における周術期麻酔管理の重要性、とくに術中から術後の免疫能維持に留意した麻酔管理の重要性を意味している。また、揮発性吸入麻酔薬に関して、全身麻酔薬が免疫細胞に直接抑制的に作用することも報告されており、この領域においてわれわれは揮発性吸入麻酔薬によるヒト末梢血リンパ球機能抑制の原因が揮発性吸入麻酔薬によるリンパ球の直接的アポトーシス誘導にあることを報告している (*Anesthesiology* 2001;95:1467-1472) が、全身麻酔薬が免疫細胞の機能を抑制する直接的原因を解明するには至らなかった。しかしこの全身麻酔薬の免疫細胞機能抑制の原因解明は個々の麻酔薬の免疫抑制の定量化を可能にし、さらにそれぞれの麻酔薬の免疫能に与える影響を考慮した、病態や手術内容に応じた麻酔薬と麻酔法の選択に発展し、長期予後を主眼とした麻酔法の標準化につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

全身麻酔薬は免疫機能を抑制することが数多く報告されている。さらに周術期の免疫機能低下が術後長期予後に影響を与える可能性が近年示唆されている。しかし、全身麻酔薬による免疫機能抑制の機序あるいは原因はいまだに解明されていない。また、個々の全身麻酔薬による免疫機能抑制の程度を定量化した上で比較した研究もない。この研究では最初に全身麻酔薬（揮発性吸入麻酔薬と静脈麻酔薬）によって免疫細胞にアポトーシスが誘導されることを、アポトーシスに特徴的な細胞膜の構造変化に着目して定量的かつ経時的に証明する。また、曝露する麻酔薬の種類によって免疫細胞のアポトーシス誘導の程度に差があるかを比較検討する。つぎに麻酔薬による免疫細胞のアポトーシス誘導の原因を究明解析する。まず、細胞のアポトーシス経路に

は外因性経路と内因性経路があることから、内因性経路によってアポトーシスが誘導される際に特徴的であるミトコンドリア内膜の膜電位の変化に着目して、麻酔薬へ曝露後の免疫細胞のミトコンドリア膜電位を測定する。この免疫細胞のミトコンドリア膜電位の変化と実際の麻酔薬によるアポトーシス誘導の経時的・量的変化を観察することにより、麻酔薬による免疫細胞のアポトーシス誘導が内因性アポトーシス経路によるもの、すなわちミトコンドリアの内膜電位の低下に原因があることを証明する。さらにミトコンドリアの内膜電位の低下あるいは変化が麻酔薬の違いによって差があるか、を検討することによって、それぞれの麻酔薬の免疫抑制度を定量化する。要約するとこの研究の目的は、

- (1) 揮発性吸入麻酔薬および静脈麻酔薬による免疫機能抑制の機序の解明
  - (2) 全身麻酔薬による免疫機能抑制の定量化
  - (3) 全身麻酔薬の免疫機能抑制の定量化を指標にした全身麻酔法の選択と麻酔法の標準化の確立
- 以上の3点である。

## 3. 研究の方法

麻酔薬は揮発性吸入麻酔薬としてセボフルレンとイソフルレンを、静脈麻酔薬はプロポフォールを用いる。使用する免疫細胞は一次リンパ組織として生後の生体の細胞性免疫形成の中心的役割を担っている胸腺細胞（生後4～8週齢の Balb/c マウス、メス）を用いる (*British Society of Immunology* 2006; 144: 371-375)。胸腺細胞のアポトーシス誘導の定量は *Anesthesiology* 2001;95:1467-1452 でわれわれが報告したアポトーシス細胞の細胞膜構造の変化を染色する Annexin-V により検討する。麻酔薬曝露後の胸腺細胞のミトコンドリア膜電位は JC-1 probe 染色により

測定し、細胞内 Caspase-3 活性はフローサイトメトリー法を用いる。

**(1) 揮発性吸入麻酔薬による胸腺細胞の用量依存性および時間依存性アポトーシス誘導実験;** 4~8 週齢の若い Balb/c マウスをエーテル深麻酔下に安楽死させた後、胸腺を摘出、10%FBS 入り RPMI 培養液中に胸腺細胞の浮遊細胞とし、24 穴培養プレートに1穴あたり  $1 \times 10^6$  個/ml の割合で分配し、密閉型アクリル樹脂製箱に乾燥しないように静置する。密閉型アクリル樹脂製箱内を摂氏 37 度、5%CO<sub>2</sub> の定常状態を確認後、空気をキャリアーガスとしてイソフルレンまたはセボフルレンがそれぞれ 0 MAC、1 MAC、3 MAC の定常状態となるように設定した後、アクリル樹脂製箱を密閉する。その状態で 12 時間、胸腺細胞を揮発性吸入麻酔薬に曝露し、フローサイトメトリー法によるアポトーシス細胞の Annexin-V および 7-AAD (医学生物学研究所) の 2 重染色によりアポトーシス細胞の定量を行い、揮発性吸入麻酔薬による用量依存性アポトーシス誘導を確認する。また、同様にイソフルレンまたはセボフルレンがそれぞれ 3 MAC になるように設定した後、4 時間、8 時間、12 時間培養し、揮発性吸入麻酔薬による時間依存性アポトーシス誘導を確認する。

**(2) プロポフォールによる胸腺細胞の用量依存性および時間依存性アポトーシス誘導実験;** (1) と同様に胸腺細胞を培養液に浮遊後、30  $\mu$ M または 60  $\mu$ M のプロポフォール (TOCRIC 社) を添加し CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて 4 時間、8 時間、12 時間培養し、プロポフォールによる用量依存性、時間依存性アポトーシス誘導を確認する。

**(3) 揮発性吸入麻酔薬による胸腺細胞のアポトーシス誘導時における胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位の測定実験;** アポトーシ

スの誘導シグナルには Fas に代表される死のレセプターを介するものと、ミトコンドリアを介するものに大別されるが、麻酔薬によるアポトーシス誘導はミトコンドリアを介する経路であることが予想される。また、細胞にアポトーシスがミトコンドリアを介する経路によって誘導される場合はミトコンドリア内膜電位の低下がアポトーシスに先行して起こることが知られている (*J.Immunology* 2003;170 : 2469-2478)。そこで (1) と同様に密閉型アクリル樹脂製箱に胸腺浮遊細胞を培養条件下に静置後、イソフルレンまたはセボフルレンを 3 MAC の定常状態となるように設定し、その状態で 4 時間、8 時間、12 時間、胸腺細胞を揮発性吸入麻酔薬に曝露し、それぞれの培養時間における、ミトコンドリア内膜電位が低下した胸腺細胞を JC-1 (Lipophilic cationic probe、Molecular Probes 社) を利用したフローサイトメトリー法により定量し、胸腺細胞のアポトーシス誘導とミトコンドリア内膜電位の経時的変化を比較、検討し、揮発性吸入麻酔薬による胸腺細胞のアポトーシス誘導に時間的に先行して胸腺細胞のミトコンドリア膜電位低下が発生するか否かを検討して、揮発性吸入麻酔薬による胸腺細胞のアポトーシス誘導経路がミトコンドリアを介するものであることを解明する。この実験により麻酔薬による免疫細胞のアポトーシス誘導と免疫細胞機能抑制の根本的原因が麻酔薬による免疫細胞のミトコンドリア膜電位の直接的低下作用であることを証明する。

**(4) プロポフォールによる胸腺細胞のアポトーシス誘導時における胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位の測定実験;** (1) と同様に胸腺細胞を培養液に浮遊後、30  $\mu$ M または 60  $\mu$ M のプロポフォール (TOCRIC 社) を添加し CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて 4

時間、8時間、12時間培養し、プロポフォールによるミトコンドリア膜電位の用量依存・時間依存的変化を(3)のごとく確認する。

(5) 揮発性吸入麻酔薬およびプロポフォールによる胸腺細胞のアポトーシス誘導時における胸腺細胞内Caspase-3 活性の測定実験；4~8週齢のBalb/cマウスをエーテル深麻酔下に安楽死させた後、胸腺を摘出、胸腺細胞の浮遊細胞とし、密閉型アクリル樹脂製箱に乾燥しないように静置する。密閉型アクリル樹脂製箱内をイソフルレンまたはセボフルレンがそれぞれ0MAC、1MAC, 3MACとなるように設定した後、アクリル樹脂製箱を密閉する。その状態で培養時間として8時間、胸腺細胞を揮発性吸入麻酔薬に曝露したのち、胸腺細胞内Caspase-3 活性をフローサイトメトリ法により測定する。また、上記と同様に胸腺細胞を浮遊細胞とし、30 $\mu$ Mまたは60 $\mu$ Mのプロポフォールを添加しCO<sub>2</sub>インキュベーター内にて8時間、培養することにより胸腺細胞をプロポフォールに曝露した後、胸腺細胞内Caspase-3 活性を測定する。

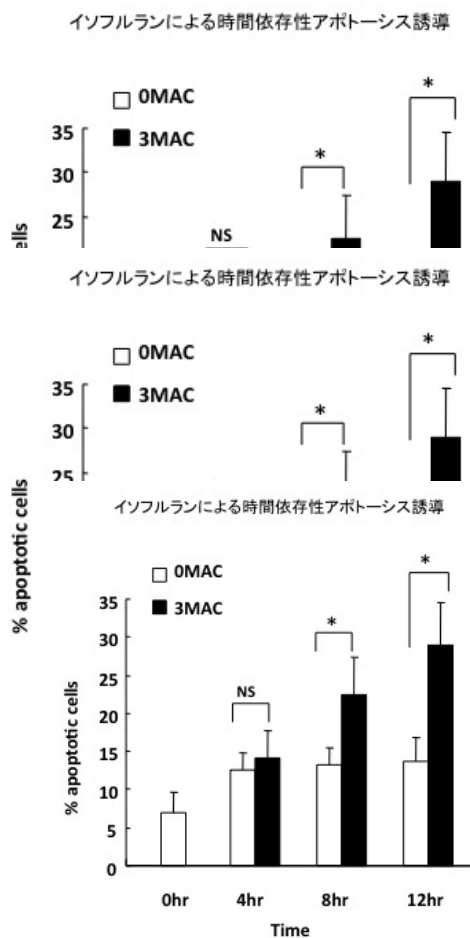
#### 4. 研究成果

(1) Balb/cマウスの胸腺を摘出、浮遊胸腺細胞とし、密閉型アクリル樹脂製箱に静置後、揮発性吸入麻酔薬セボフルレンまたはイソフルレンがそれぞれ0MAC、1MAC、3MACになるように設定し12時間、これら麻酔薬に曝露したのちにAnnexin Vと7-AADで染色し、Flow cytometry法にてアポトーシス細胞を観察した。また、同様にセボフルレンまたはイソフルレンがそれぞれ3MACになるように設定後、4、8、12時間、これら麻酔薬に曝露してアポトーシス細胞を観察したところ、セボフルレンまたはイソフルレンはin vitroにおいてマウス胸腺細胞に容量依存的、

時間依存的にアポトーシスを誘導した(図)。

(2) また、胸腺細胞はプロポフォールにより容量依存性、時間依存性ともにアポトーシスは誘導されなかった。(3) イソフルレンまたはセボフルレンをin vitroにおいて胸腺細胞に暴露すると、容量依存性及び時間依存性にミトコンドリア内膜電位が低下した胸腺細胞が非暴露群に比べ有意に増加した。揮発性吸入麻酔薬による胸腺細胞アポトーシス誘導実験の結果と比較すると、興味深いことに胸腺細胞のアポトーシス誘導に先行して胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位低下が観察された。(4) プロポフォール30 $\mu$ Mまたは60 $\mu$ M存在下に胸腺細胞を培養しても胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位はプロポフォール非暴露群と比較して有意な差は認められなかった。この結果はプロポフォールによる胸腺細胞のアポトーシス非誘導性という結果に一致し、免疫細胞アポトーシス誘導における揮発性吸入麻酔薬との差が認められた。

(5) セボフルレンを0MAC、1MAC, 3MACとなるように設定した後に8時間、胸腺細胞に暴露したところ、用量依存性に胸腺細胞内Caspase-3 活性は上昇し3MAC曝露群は0MACおよび1MAC曝露群に比し有意にCaspase-3 活性が高かった。イソフルレン曝露によっても胸腺細胞内Caspase-3 活性は用量依存性に上昇し、1MAC群および3MAC群とも、0MAC群に比しそれぞれ有意にCaspase-3 活性が上昇したが、1MAC群と3MAC群の群間に有意差は認められなかった。(6) 胸腺細胞をプロポフォールに8時間曝露した後、胸腺細胞内Caspase-3 活性を測定したところ30 $\mu$ Mおよび60 $\mu$ Mのプロポフォールともにプロポフォール非曝露群と比較し胸腺細胞内Caspase-3 活性は有意な変化を認めなかった。



## 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10件)

- ① Shin Kurosawa, Anesthesia in patients with cancer disorders. Current Opinion in Anesthesiology, 査読有、doi: 10.1097/ACO.0b013e328352b4a8, Vol. 25-No. 3、2012年、376-384
- ② Daizo Satoh, Shin Kurosawa, Wakaba Kirino, Toshihiro Wagatsuma, Yutaka Ejima, Akiko Yoshida, Hiroaki Toyama, Kei Nagaya, Impact of changes of positive end-expiratory pressure on functional residual capacity at low tidal volume ventilation during general anesthesia. J. Anesthesia, 査読有、doi: 10.1007/s00540-012-1411-9, Vol. 26-No. 5、2012年、664-669
- ③ Itsuro Kazama, Yoshio Maruyama, Yasuhiro Endo, Hiroaki Toyama, Yutaka Ejima, Mitsunobu Matsubara, Shin Kurosawa, Overexpression of Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Channels Promotes In situ Proliferation of

Leukocytes in Rat Kidneys with Advanced Chronic Renal Failure. International Journal of Nephrology, 査読有、Article ID 581581, doi:10.1155/2012/581581, 2012年、1-8

④ T. Takahashi, H. Kubo, N. Fujino, T. Suzuki, C. Ota, M. Yamada, M. Yamada, S. Suzuki, S. Kurosawa, Surgical stress increases circulating endothelial microparticles in elderly. Anaesthesia and Intensive Care, 査読有、Vol. 40-No. 5、2012年、899-902

⑤ Toru Takahashi, Seiichi Kobayashi, Naoya Fujino, Takaya Suzuki, Chiharu Ohta, Mei He, Mitsuhiro Yamada, Satoshi Suzuki, Masaru Yanai, Shin Kurosawa, Mutsuo Yamaya, Hiroshi Kubo, Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. Thorax, 査読有、doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201395, Vol. 67-No. 12、2012年、1067-1074

⑥ Etsuro Kazama, Yasuhiro Endo, Hiroaki Toyama, Yutaka Ejima, Shin Kurosawa, Yoshimichi Murata, Mitsunobu Matsubara, Yoshio Maruyama, Compensatory Thrombopoietin Production from the Liver and Bone Marrow Stimulates Thrombopoiesis of Living Rat Megakaryocytes in Chronic Renal Failure. Nephron Extra, doi: 10.1159/000333018, 査読有、Vol. 1、2012年、147-156

⑦ Hiroaki Toyama, Yasuhiro Endo, Yutaka Ejima, Mitsunobu Matsubara, Shin Kurosawa, Comparison of actual tidal volume in neonatal lung model volume control ventilation using three ventilators. Anaesthesia and Intensive Care, 査読有、Vol. 39-No. 4、2012年、599-606

⑧ Toru Takahashi, Satoshi Suzuki, Hiroshi Kubo, Mutsuo Yamaya, Shin Kurosawa, Masato Kato, Impaired endothelial progenitor cell mobilization and colony-forming capacity in chronic obstructive pulmonary disease. Respiriology, 査読有、doi: 10.1111/j.1440-1843.2011.01959.x, Vol. 16-No. 4、2012年、680-687

⑨ 西野 涼, 黒澤 伸, 揮発性吸入麻酔薬とリンパ球アポトーシス, Anesthesia 21 century, 査読なし、Vol. 14-No. 1、2012年、4-10

⑩ 黒澤 伸, 麻酔管理と長期予後 周術期管理と免疫機能, Anesthesia 21 Century, 査読なし、Vol. 12-No. 3、2012年、12-21

〔学会発表〕(計10件)

- ①Kengo Suzuki, Hiroki Daijo, Shinichi Kai, Tomonori Matsuyama, Shin Kurosawa, Kazuhiko Fukuda, Kiichi Hirota, The volatile anesthetics isoflurane and sevoflurane affect glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic beta cell line MIN6. American society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2012年10月15日, Washington, DC (米国)
- ②黒澤 伸、免疫能と麻酔管理、第31回日本臨床麻酔学会、2011年11月4日、那覇
- ③Toru Takahashi, Hiroshi Kubo, Satoshi Suzuki, Shin Kurosawa, Thoracic Surgery-induced Increase in Circulating Endothelial Microparticle Release in Elderly Patients. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2011年10月19日, Chicago (米国)
- ④Kengo Suzuki, Satoshi Takabuchi, Hiroki Daijo, Shinichi Kai, Tomonori Matsuyama, Shin Kurosawa, Differential Role of Prostaglandin E-type Receptors in Activation of Hypoxia-inducible Factor 1 by Prostaglandin E1 in Vascular-derived Cell under Non-hypoxic Conditions. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2011年10月19日, Chicago (米国)
- ⑤Noriko Toda, Shin Kurosawa, Kengo Suzuki, Wakaba Kirino, Yuko Saito, Propofol Promotes Glucocorticoids-induced Apoptosis of Murine Thymocytes in Vitro. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2011年10月18日, Chicago (米国)
- ⑥黒澤 伸、揮発性吸入麻酔薬による免疫細胞毒性の解析—揮発性吸入麻酔薬はマウス胸腺細胞のミトコンドリア膜電位を低下させ、アポトーシスを誘導する、日本麻酔科学会第58回学術集会、2011年5月20日、神戸
- ⑦戸田 法子、黒澤 伸、齋藤 浩二、吾妻 俊弘、亀山 良亘、小野寺 尚子、プロポフォルはマウス胸腺細胞のデキサメタゾン誘導性アポトーシスを増強する、日本麻酔科学会58回学術集会、2011年5月20日、神戸
- ⑧Toru Takahashi, Satoshi Suzuki, Shin Kurosawa, Masato Kato, Hiroshi Kubo, Endothelial Progenitor Cell Mobilization Was Impaired in Patients with Neoadjuvant Chemotherapy. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2010年10月19日, San Diego (米国)
- ⑨Noriko Toda, Shin Kurosawa, Toshihiro Wagatsuma, Hiroaki Toyama, Yutaka Ejima,

Volatile Anesthetics Promote Glucocorticoid-Induced Apoptosis of Murine Thymocytes In Vitro. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2010年10月17日, San Diego (米国)

⑩戸田法子、黒澤 伸、吾妻俊弘、齋藤浩二、吉田明子、長谷川淳一、揮発性吸入麻酔薬はデキサメタゾンによるマウス胸腺細胞のアポトーシスを増強する、第57回日本麻酔科学会学術集会総会2010年6月4日、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒澤 伸 (KUROSAWA SHIN)  
東北大学・病院・准教授  
研究者番号：60272043

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者