

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592343

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬による脳梗塞予後改善と機序の解明。免疫抑制は関与するか？

研究課題名(英文) Effect of inhaled anesthetics on recovery after brain infarction.

研究代表者

秋吉 浩三郎 (AKIYOSHI, KOZABURO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70322287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、全身麻酔薬の免疫抑制作用と脳保護作用への影響を明らかにするものであった。このために、1)吸入麻酔薬であるイソフルラン、セボフルラン等の全身麻酔薬の脳保護作用と炎症反応抑制の関連性に関する培養細胞による検討 2)マウス脳梗塞モデルを用いた脳梗塞サイズや機能的予後に与える影響の検討 3)脳内で主に免疫防御を担っているミクログリア機能に対する麻酔薬の影響の検討を行う予定とした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the effects of the immunosuppressive effects and brain protective effects of general anesthetics. To this, we planned, 1) experiment on the cultured cell for the relevance of the inhalation anesthetics, isoflurane and sevoflurane, for the brain protective effect and the inflammatory response suppression. 2) experiment of the impact of inhalation anesthetics on the brain infarct size and functional prognosis using a mouse brain infarction model. 3) experiment of the effects of anesthetic on the microglia function, which is responsible for mainly immune defense in the brain.

研究分野：麻酔・周術期管理

キーワード：脳梗塞 脳保護 免疫 全身麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

周術期の脳虚血や脳梗塞は、診断が困難なことから重篤な後遺症を残す危険があり、全身麻酔を受ける患者にとって、致命的な周術期合併症の一つである。米国では脳梗塞の有病率が高く、毎年約79,500人が、新たな、もしくは脳卒中中の再発を経験している。治療技術の進歩などにより、脳梗塞による年間死亡率は1995年から2005年の10年間で約30%減少したものの、脳梗塞患者の15%~30%は症状の改善を全く認めず、その他20%の患者も発症後3ヶ月の施設ケアを必要とすると報告されている（AHA研究会報告、2009）。動脈硬化は脳虚血や脳梗塞の重要なリスクファクターであるが、わが国でも高齢人口の増加と、食生活を含めた生活様式の欧米化などにより動脈硬化のリスクファクターである糖尿病や高脂血症、高血圧などの生活習慣病が急増している。従って今後、周術期脳虚血や脳梗塞の発症率は上昇していくものと考えられ、周術期管理上、その予防と対策は今後更に重要なものになる。

現在の脳梗塞治療の柱は可及的早期の血流回復と考えられている。この目的で認められている唯一の脳梗塞治療薬は、現在、血栓溶解組換え組織プラスミノゲン（tPA）のみである。t-PAは、1995年にその有効性が初めて報告されて以来、広く臨床使用されてはいるが、その効力を発する為には脳梗塞発症後早期（4.5時間以内）に投与する必要があるとあり、全患者のわずか3~5%のみしか適応とならない。従って、脳梗塞の治療成績を向上させるためには、より広い治療域を持った脳梗塞治療薬の開発が急務であろう。これまで、グルタミン酸受容体拮抗薬をはじめ、神経細胞を主な標的とした治療薬が開発され、基礎実験では有効であったものの、臨床試験ではその有用性が証明されなかった。近年、脳梗塞を契機として引き起こされる全身免疫反応が、脳梗塞の予後に大きな影響を与えることが明らかとなってきた。脳梗塞で障害を受けた脳組織には、発症後数時間~数日の間に種々の炎症細胞が浸潤する（Yilmaz et al. *Neuromolecular Med* 2010）。更に炎症反応は全身へ波及し（Offner et al. *Neuroscience* 2009）、生体にとって過剰な免疫反応を引き起こす。この過剰な免疫反応に引き続いて起こる免疫抑制は、脳梗塞予後に関連する重大な合併症である肺炎などの感染症の誘因となっていると考えられている。これら免疫反応を抑制すると脳梗塞サイズが縮小（Hurn et al. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007）、さらに脳機能的予後も改善することを申請者は示した（Akiyoshi et al. *Transl Stroke Res* 2011）。脳梗塞後炎症反応の抑制は、脳機能維持と脳梗塞後合併症軽減の観点から、今後の脳梗塞治療の重要な目標の一つである（Hall et al. *Transl Stroke Res* 2009）。

一方、周術期に使用する麻酔薬、なかでも、吸入麻酔薬であるイソフルラン、セボフルランの脳保護作用は広く認められている（Steiger et al. *Acta Neurochir (Wien)* 2007）が、そのメカニズムに関しては未だ明らかでない。しかし、吸入麻酔薬には免疫抑制作用があるとの報告があり、吸入麻酔薬の免疫抑制作用が脳梗塞後の全身炎症反応に対していかに作用するか興味を持たれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①全身麻酔薬の脳保護作用に関して、炎症反応抑制の関与を明らかにし、②周術期に脳梗塞の発症や悪化の可能性がある患者に対してより安全で効果的な周術期管理法を検討し、更に、③一般的な脳梗塞治療への適応を探ることであった。

これまでの研究成果をもとに、研究期間内に以下のことを明らかにする計画とした。

- 吸入麻酔薬であるイソフルラン、セボフルラン等の全身麻酔薬の脳保護作用と炎症反応抑制の関連性に関して、培養細胞にて検討する。
- 更にマウス脳梗塞モデルを用いて脳梗塞の大きさや機能的予後に与える影響について検討する。
- 近年、脳梗塞後炎症反応のコントロールの鍵として、白血球の代わりに脳内で免疫防御を担っているミクログリアの関連が報告されており、麻酔薬とミクログリア機能の関連について明らかにする。

3. 研究の方法

吸入麻酔薬であるイソフルランおよびセボフルランが脳梗塞後免疫反応に与える影響に関して、オスのマウスを用いて以下の検討を予定した。

- 梗塞領域を比較するためマウスMCAOモデルを作成し、再灌流48または96時間後に脳を摘出、梗塞領域の大きさを2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)染色にて評価する。麻酔薬の種類、Preconditioningの有無、または虚血後投与の有無が梗塞領域に与える影響を検討する。

- ② ①と同様に作成したマウスMCAOモデルにて、再灌流4、24、48、96時間の時点で脳を摘出し、脳を梗塞側と非梗塞側に分けてフローサイトメトリーを用い、脳内に浸潤した炎症細胞、特にミクログリアに関して検討する。
- ③ Preconditioningの有無が脳梗塞後の脳内炎症細胞浸潤に対する影響が確認された場合、吸入麻酔薬であるイソフルラン、セボフルランの脳保護作用メカニズムの一つと考えられているミトコンドリアKATPチャンネルの選択的阻害薬を用いて、その影響が可逆的であるかどうかを検討する。

プロトコールの詳細

一連の実験において、イソフルランとセボフルラン、及びPreconditioningの有無、虚血後投与の有無を組み合わせ、脳梗塞サイズ及び炎症細胞浸潤に関して検討する。

- (1) 吸入麻酔薬Preconditioning (0.5MAC、4時間) または対照群として空気吸入後、1時間のMCAOを行い、再灌流48または96時間後の時点で脳を摘出、2mm 間隔で5切片にスライス後、TTC染色にて各動物群における梗塞サイズの評価を行う。
- (2) 1時間のMCAO後、吸入麻酔薬を虚血後投与 (0.5MAC、4時間) または対照群として空気吸入後、再灌流48または96時間後の時点で脳を摘出、2mm 間隔で5切片にスライス後、TTC染色にて梗塞サイズの評価を行う。
- (3) ①及び②と同様に作成したマウスMCAOモデルにて、再灌流4、24、48、96時間の時点で脳を摘出し、脳を梗塞側と非梗塞側に分けてフローサイトメトリーを用い、脳内に浸潤した炎症細胞、特にミクログリアに関して検討する。

本研究は、九州大学医学部動物実験委員会倫理規則に則り、動物実験倫理委員会の承認を得た上で施行する予定であったが、保有している実験室の管理及び設備の問題から、動物実験の承認を得ることができなかった。そこで、ラット脊髄標本を用いて、脊髄虚血に対する麻酔薬の影響を以下のとおり検討した。

- (4) インビボパッチクランプ標本を用いた麻酔薬による痛み刺激応答に対する反応の観察
脊髄後角からのインビボパッチクランプ標本を作成し、各種麻酔薬を脊髄灌流投与した際に痛み刺激応答に対する反応が変化するかを、脊髄スライス標本を用いた解析を行うこととした。

4. 研究成果

吸入麻酔薬であるイソフルランおよびセボフルランが脳梗塞後免反応に与える影響に関する検討を行ったが、動物モデルの生存率が極めて低く、期間内に十分な検討を行うことができなかった。引き続き、当施設での動物モデルを確立し、検討を進めていく予定である。

- (4) インビボパッチクランプ標本を用いた麻酔薬による痛み刺激応答に対する反応の観察
インビボ標本からのホールセルパッチクランプ記録の開始後、麻酔薬として、アルチバ®50 μ Mを灌流投与すると、電位固定法で-70mVに電位を固定して観察している場合、外向き電流を観察した。電流固定法で静止電位を観察している場合、アルチバ®50 μ Mの灌流投与によって膜電位は過分極した。足趾への痛み刺激応答はアルチバ®50 μ Mの灌流投与によって減弱した。レミフェンタニル製剤であるアルチバ®は脊髄においてはこれまでの痛覚過敏の報告から、痛覚を増強するものと予想していたが、本研究により脊髄において鎮痛効果を有することが明らかとなった。引き続き吸入麻酔薬を用いた検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 (計1件)

①秋吉 浩三郎

発表表題：周術期循環管理の過去、現在、未来：これからの麻酔科医に求められるもの、

学会名：九州麻酔科学会第51回大会

発表年月日：平成25年9月7日

発表場所：熊本市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋吉 浩三郎 (Kozaburo Akiyoshi)

九州大学・病院麻酔科蘇生科・講師

研究者番号：70322287