

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462460

研究課題名(和文) 手術部位感染の予防～擬似的高体温による免疫担当細胞の機能維持～

研究課題名(英文) Prevention of Surgical Site Infection - Maintenance of Immunocompetent Cell Functions by Use of Artificial Hyperthermia -

研究代表者

三島 康典 (Mishima, Yasuonori)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30258470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞に科学的熱刺激を加えることによる低体温時の免疫細胞の機能維持を目的とし、健康成人から採取した血液から好中球を用いて実験を行った。好中球の遊走能は低温になるに従い低下することが確認された。しかし、好中球のTRPV1を作動薬で刺激し、科学的熱刺激を加えても遊走能は改善を見なかった。麻酔薬暴露した好中球の遊走能は、ほぼ変化がないことが確認された。好中球エラスターゼの放出量も遊走能と同様にTRPV1による改善は見られなかった。TRPV1刺激では好中球の機能を改善させる熱刺激とはなりえないことが示唆された。しかし、他の温度感受性TRPチャンネルの関与を検討する余地がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to recover function degeneracy of immune cells under hypothermia by use of scientific thermal stimulation. The experiment was conducted by isolating neutrophils from a healthy adult subject. Chemotactic activity of the neutrophils was confirmed to lower as the temperature declined. However, scientific thermal stimulation through activation of neutrophil TRPV1 by an agonist did not improve the chemotactic activity. In addition, chemotactic activity of the neutrophils exposed to an anesthetic was confirmed to show nearly no change. Elastase-releasing capacity of the neutrophils also lowered with decline of the temperature similarly as chemotactic activity, but showed no improvement after TRPV1 stimulation. The above indicated that TRPV1 stimulation cannot be a thermal stimulus that improves functions of neutrophils. However, involvement of other temperature-sensitive TRP channels is left for future investigation.

研究分野：麻酔

キーワード：低体温 TRPV1 好中球

### 1. 研究開始当初の背景

SSI は周術期に発生する感染症であるが、全身麻酔患者における SSI 発症率は非全身麻酔患者に比べて格段に高くなっている。(厚生労働省 2005 年年報)全身麻酔そのものが SSI のリスクとなるかどうかは意見が分かるところだが、全身麻酔中の感染の危険因子として(1)低体温、(2)高血糖、(3)末梢循環不全、(4)手術時間などが挙げられ、全身麻酔患者の感染の契機となるには十分な環境が整っていると考えられる。更には全身麻酔薬の種類による易感染性の可能性も指摘されており、SSI から患者を守る事は医療者として当然必至かつ急務の課題である。さらに麻酔科医にとって SSI は身近な感染症であるにも拘らず、意外にも見過ごされがちな傾向にあるため、術中の全身管理を担う麻酔科医としては SSI に着目しその予防に努めなくてはならない。

感染の成立は主に細菌の生体への侵入に端を発するが、通常好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞が動員され殺菌される。しかしながら、低体温では免疫機能が有為に低下し易感染性となる。更には麻酔薬による好中球の遊走能の低下も報告されている。特に長時間に亘る開胸や開腹を伴う大手術においては、様々な処置を施してもある程度の低体温は必発であり、長時間麻酔薬にさらされた環境では SSI の発生リスクを高める要因である。

そこで、全身麻酔中の免疫担当細胞の機能を正常に保つ事が SSI 予防に繋がると考え、低体温及び全身麻酔薬による好中球の機能低下の原因の解明と機能保持により SSI の予防の足がかりを作る事を目的とする。われわれの pilot study においても 30 °C での好中球の遊走能は 37 °C に比べ有為に低下している事が証明されており全身麻酔下での好中球の機能保持が可能となれば SSI の予防に繋がる可能性がある。

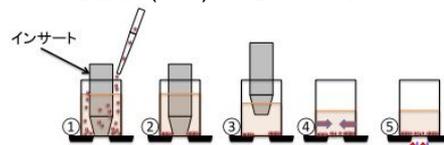
### 2. 研究の目的

手術部位感染(Surgical Site Infection: SSI)は手術患者の 2-5%に発症し、病院全体での感染では約 15%を占めると言われている。一旦 SSI を発症すると全身状態の悪化、再手術など患者本人への身体的・精神的負担のみならず、入院の長期化による医療費の増加など経済的、社会的負担も増加する。本研究は SSI の発生の大きな要因の一つと考えられている全身麻酔中の低体温による免疫能の低下に対して、熱受容体である TRP (Transient Receptor Potential) チャネル(中でも TRPV、TRPM、TRPA)を介する事で感染初期の初動細胞である好中球やマクロファージの機能を改善させ、感染を防ぐ事を目的としている。また、麻酔薬による好中球およびマクロファージの機能低下の原因を検索し、SSI 予防に寄与する研究を目的とする。

### 3. 研究の方法

健常ボランティアから採取した血液から好中球を取り出し全身麻酔と同様の環境(麻酔薬暴露、低温)における好中球の機能低下の原因を解明する。さらに機能低下の原因と TRPV1 の関連を見出し、擬似的熱/寒冷刺激にたいして好中球機能がどのように変化をして行くかを検証する。

- (1) 好中球の単離：3名の健常ボランティアから血液を採取する。その血液を血球分離溶液(Polymorphprep®)を用いて単核球、多核球、赤血球に分離し、多核白血球層を採取する。採取された多核白血球をフローサイトメトリー法を用いて好中球の確認を行い、多核白血球におけるその割合を導き出す。
- (2) 遊走能試験：分離された好中球は PBS で洗浄したのちに、RPMI-1640 培養液に懸濁し以下の薬剤で 1 時間の前処置を行い、40 °C、37 °C と 30 °C にそれぞれに分けて fMLP を走化因子として 6 時間かけて遊走能試験をおこなう。フィルターはポアサイズ 3µm の fibronectin でコーティングしたものをを用いる。6 時間後に遊走した細胞を Calcein AM で蛍光染色して蛍光強度(RFU)で比較した。



- ① インサートを挿入した状態の遊走能試験用のウェルに好中球を加える
- ② インサートの外周に細胞が接着するまで培養する
- ③ 細胞が接着したらインサートを取り外す
- ④ インサートでブロックされた部位に細胞を遊走させるために6時間培養する
- ⑤ 細胞を蛍光染色し遊走した細胞の蛍光強度を測定する

#### 前処置の条件

対照群：無血清 RPMI-1640 に懸濁した好中球を 40 °C、37 °C と 30 °C の条件下で遊走能試験を行う。

単離した好中球を 100 nM の OLDA (N-Oleoyldopamine: TRPV1 作動薬) で前処置を行う。

単離した好中球を 5µM のカブサゼピン (TRPV1 拮抗薬) で前処置を行う。

単離した好中球を 1µM、10µM、50µM のプロポフォル (静脈麻酔薬) で前処置を行う。

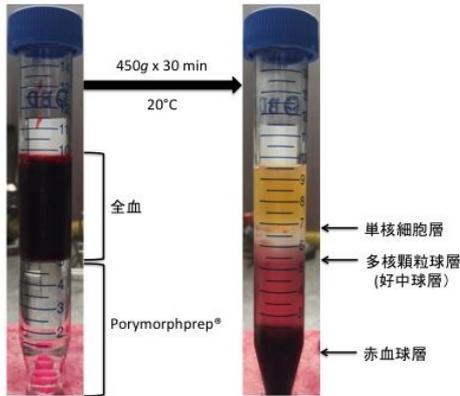
- (3) 殺菌能試験：遊走能試験と同様に健常ボランティアの血液から好中球を血球分離溶液(Polymorphprep®)を用いて分離し、PBS で洗浄し RPMI-1640 に懸濁する。その後 40 °C、37 °C と 30 °C の条件下で上記①～④の前処置を 60 分を行い、PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) で 3 時間刺激する。刺激された好中球から放出されたエラスターゼを蛍光染色し、定量化する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 好中球の単離

3名の健常ボランティアから2ヶ月の間に無作為に採血を行い(5検体/人),合計15検体を採取し多核白血球を採取した(図1)。

図1

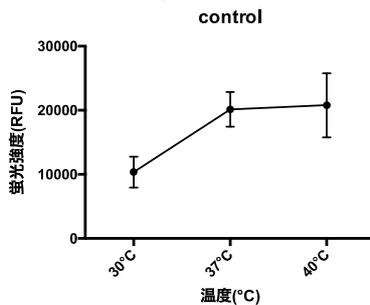


採取された多核白血球に占める好中球の割合は,  $90.2 \pm 1.2\%$ であった。

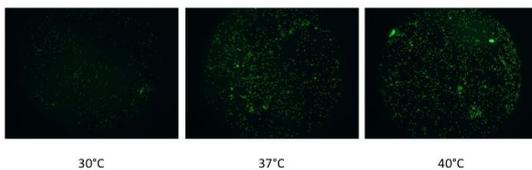
この結果から採取される多核白血球の90%が好中球であることが確認できたので,以降の実験は上記3名のボランティアから採取された多核白血球を好中球として使用した。

##### (2) 遊走能試験

前処置を施していない状態での遊走した好中球の蛍光強度は30°Cで最も低く  $10361 \pm 2413$  であった。37°C, 40°Cではそれぞれ  $20139 \pm 2701$ ,  $2274 \pm 3411$  であった。

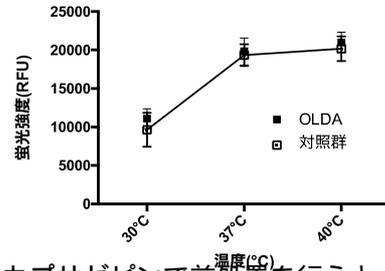


各温度における遊走好中球

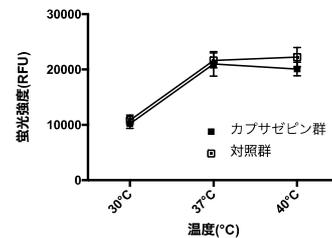


OLDAで前処置を行うと,遊走した好中球の蛍光強度は対照群と同様に30°Cで最も低く37°C, 40°Cで有意に上昇した。OLDAによる前処置によって30°Cにおいて遊走能の若干の亢進傾向は見られたが,各温度において有意な亢進は見られなかつ

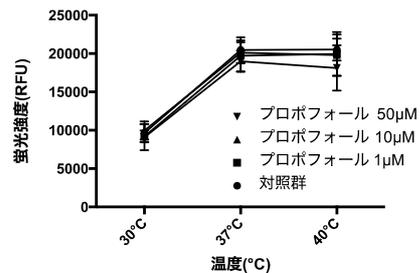
た。



カプサゼピンで前処置を行うと,遊走した好中球の蛍光濃度は対照群と同様に30°Cで最も低く37°C, 40°Cで有意に上昇した。しかしながら,各温度において対照群とカプサゼピン群間に遊走能の有意な差は見られなかつた。

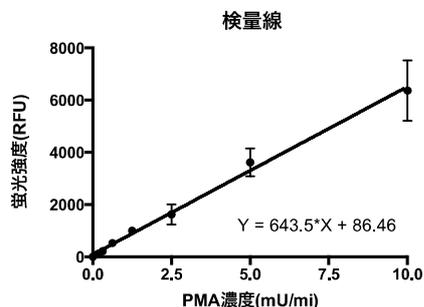


プロポフォルで前処置を行い,遊走した好中球の蛍光濃度は対照群と同様に30°Cで最も低く37°C, 40°Cで有意に上昇した。しかしながら,各温度において対照群とプロポフォルの各濃度における遊走能の有意な差は見られなかつた。



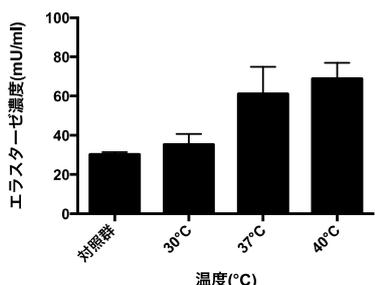
##### (3) 殺菌能試験

エラストーゼを用いて検量線を作成した。

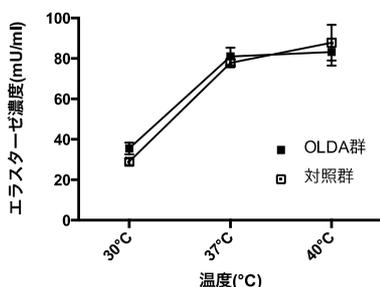


この検量線から得られた等式を用いて試料の蛍光強度から濃度を算出した。試料は10倍に希釈して測定した。

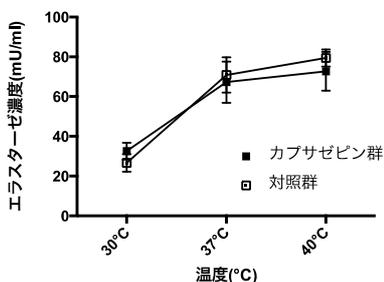
前処置を施していない状態での PMA 刺激による好中球からのエラスターゼ放出量は 40 °C で最も高く、30 °C で最も低かった。30 °C ではエラスターゼ放出量は対照群 (PMA 刺激なし) とほぼ同じであった。



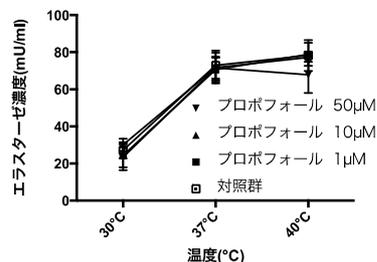
OLDA で前処置した好中球からのエラスターゼ放出量は、温度依存性に増加した。30 °C においては OLDA 群で対照群に比べてやや高い傾向であったが、各温度における対照群との間に有意な差はなかった。



カプサゼピンで前処置した好中球からのエラスターゼ放出量は対照群同様に温度依存性の反応を見せたが、各温度における対照群との間に有意な差はなかった。



プロポフォル(1μM, 10μM, 50μM) で前処置した好中球からのエラスターゼ放出量は温度依存性に増加した。37 °C, 40 °C においてはプロポフォルの濃度が高くなるにつれエラスターゼの放出量は減少する傾向が見られたが、いずれも有意な差は見られなかった。



今回の研究では好中球の接着能の検証は実験手技の再現性が得られなかったことから、結果を得ることはできなかった。これらの結果から、TRPV1 の刺激による擬似的高体温は低体温時の好中球機能の改善には繋がらないことがわかった。しかしながら、これまで報告がなされているように、好中球機能は明らかに温度依存であり、他の TRP チャンネルを介した刺激により機能が改善される可能性はあるものと考えられる。

## 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0件)

[学会発表](計2件)

三島康典 カンナビノイド受容体と麻酔  
日本麻酔科学会 第62回学術集会  
2015年5月28日~2015年5月30日  
神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場  
(神戸・日本)

三島康典 内因性カンナビノイドシステム：その役割と医療への応用の可能性  
日本麻酔科学会 第61回学術集会  
2014年5月15日~2014年5月17日  
パシフィコ横浜(横浜・日本)

[図書](計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三島 康典 (MISHIMA YASUNORI)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号：30258470

### (2) 研究分担者

横溝泰司 (YOKOMIZO TAISHI)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：30569520