

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390364

研究課題名(和文)脳保護戦略におけるレミフェンタニルの効果およびそのメカニズム

研究課題名(英文)Effects and the mechanism of action by remifentanyl in the brain protection strategy

研究代表者

内田 寛治 (Uchida, Kanji)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60302709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：1年分の診療報酬データベースから、全身麻酔下脳動脈瘤クリッピング手術でレミフェンタニル+フェンタニル使用症例2,693例とフェンタニルのみ使用した症例1,809例を抽出したところ、レミフェンタニル使用群が有意に在院死亡が低く(odds比0.52, $p<0.001$)、予後を改善している可能性が考えられた。ラットの開頭侵襲モデルの検討から、レミフェンタニルは、手術侵襲に伴う白血球の動員に抑制的に働いていることが示唆された。白血球の活性に強い影響力を持つサイトカインGM-CSFの活性測定方法として、GM-CSF自己抗体の定量ELISA、臨床サンプルのGM-CSF生物活性測定法を標準化した。

研究成果の概要(英文)：Propensity-matched analysis of administrative claims database indicated that the use of remifentanyl associated with improved outcome of the patients undergoing surgical clipping of intracranial aneurysm. Use of remifentanyl associated with reduced postoperative death with odds ratio of 0.52 (95% CI 0.37-0.74 $p<0.001$). Animal craniotomy model using rats revealed that the use of intraoperative remifentanyl associated with suppressed recruitment of white blood cells to the peripheral blood. We have also standardized GM-CSF autoantibody ELISA and quantify reactivity of circulating neutrophils to exogenous GM-CSF to evaluate GM-CSF bioactivity that is important to the innate immunity against the invading pathogen, as well as repair of the wound.

研究分野：麻酔学、集中治療医学

キーワード：レミフェンタニル 脳保護 術後予後 開頭手術

1. 研究開始当初の背景

・開頭脳手術は開頭操作および脳実質に圧迫操作が加わることで、さらに術中の血管処理などで脳実質の虚血再灌流が起こる、侵襲の大きい手術である。術後の入院期間も一般的に長く、また術後合併症、在院死亡の割合も高い。術後の炎症反応も強く、合併症の原因と考えられている。

・モルヒネなどオピオイドが虚血再還流ストレスに対して臓器保護的に働く可能性が動物実験などで示唆されているが、超短時間作用性オピオイドのレミフェンタニルについて中枢神経保護作用に対する報告はこれまでにない。

・本邦の診療報酬請求システムである DPC データベースを用いた大規模疫学研究で、我々は脳外科手術において、レミフェンタニル導入前後で術後在院日数が有意に短いことを発表した(1)。さらに、脳腫瘍手術において、使用群が非使用群と比較して、術後死亡率、在院日数がともに有意に低いことを見出した。

・また、良性脳腫瘍 78 例の後ろ向き解析で、レミフェンタニルを使用した患者群の手術終了時および術後 1 日目の白血球数が有意に低く、全身炎症が抑制されている可能性が考えられた。

・炎症において、サイトカインの役割が重要であり、特に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) はマクロファージ、好中球など成熟免疫担当細胞の抗菌活性、貪食活性などを強く賦活する作用を持つことが知られている。その活性は厳密に調節されていることが想定され、そのメカニズムの一つとして抗サイトカイン抗体の可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

開頭手術におけるレミフェンタニル使用の予後に与える影響を、大規模データベース及び単施設の臨床データを用いた解析を行うことで明らかにするとともに、動物モデルによって同様の現象の再現を試みてその作用メカニズムを明らかにする。

また炎症状態を反映するバイオマーカーとして適切なものを検出し、予後との関連性を見出す。

また炎症制御に重要であると考えられる、GM-CSF の血液中での活性を測定する方法を標準化する。

3. 研究の方法

(1)大規模データベースを用いたレミフェンタニルの開頭手術予後に与える影響の検討

レミフェンタニルが本邦で保険収載された 2007 年の 1 月～12 月の 1 年間の脳外科開頭手術を DPC データベースより抽出した。そのうち、全身麻酔下で、脳動脈瘤開頭クリッピング手術を実施した患者を抽出した。抽出患者からさらに術中使用麻薬としてレミフェンタニル+フェンタニルを用いた患者群とフェンタニルのみを用いた患者群の 2 群を

抽出して、術後在院死亡、在院期間を検討した。術後予後に影響するとされる背景因子として年齢、性別、術前合併症(高血圧、糖尿病、慢性心疾患、慢性呼吸器疾患、肝硬変、慢性腎不全)を抽出した。患者の病変に関する予後規定因子として、破裂動脈瘤か未破裂動脈瘤か、術前意識状態(ジャパンコーマスケールに基づく評価)を抽出した。手術に関連した予後に影響する因子として、麻酔時間、使用麻酔薬、術中輸血量、クリップをかけた箇所、医療施設のタイプ(教育病院、非教育病院)および各施設の脳動脈瘤クリッピング手術件数を抽出した。それらを元にそれぞれの患者に性向スコア(propensity score)を算出、付与した。性向スコアがマッチした患者を各群から 1:1 で抽出し、2 群で、術後死亡率、在院期間を比較した。

(2)GM-CSF 生物活性測定法の確立と標準化

ヒト血液中の GM-CSF 活性を測定する方法として、中田らが開発した、血清中の GM-CSF 抗体をサンドイッチ ELISA 法で定量する方法を標準化し、時間空間的に離れた測定値でも比較できるようにする。また、血液中の好中球が低濃度の GM-CSF 刺激に対して細胞表面に接着因子であるインテグリン CD11b を高発現する性質を利用して、血液に GM-CSF を加えることでの好中球 CD11b 発現量の変化を見ることで GM-CSF 反応性から生物活性を推測するアッセイ系の確立を試みた。

(3)ラット開頭モデルを用いたレミフェンタニルの炎症反応に与える影響評価

8-9 週齢の Sprague-Dawley rat (270-330g) を用いた。イソフルレンによる全身麻酔を導入し、気管挿管、人工呼吸下、大腿動静脈にカテーテルを挿入して動脈圧を測定し、レミフェンタニルの持続投与を行った。レミフェンタニル+イソフルレン群と生食+イソフルレン群による術後 1 週間の炎症所見の推移を観察した。

4. 研究成果

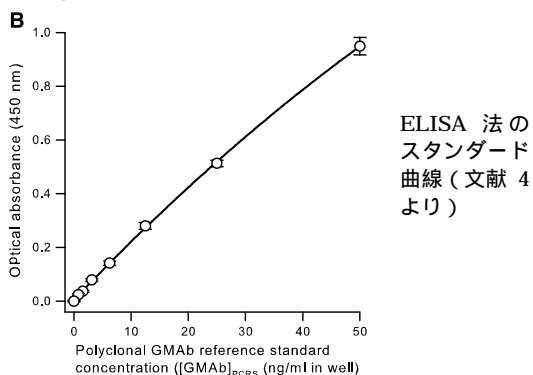
(1)大規模データベースを用いたレミフェンタニルの開頭手術予後に与える影響の検討

2007 年 DPC データベースの入院患者 2,990,000 人分のデータから、全身麻酔下脳動脈瘤クリッピング手術 6,186 例が抽出され、4,513 例がフェンタニル、あるいはレミフェンタニル+フェンタニルを用いた全身麻酔を受けていた。入院時に生命予後に影響する不可逆的な脳損傷を起こしており、バイタルサインが不安定である場合は、古典的麻酔方法(フェンタニルのみ使用)を選択する可能性が高いと考えられるため、入院後 3 日以内に死亡した患者 11 名は除外した。その結果フェンタニルのみ使用が 1,809 名、レミフェンタニル+フェンタニル使用が 2,693 名であった。性向スコアマッチングを行った結果、各群 1,380 名が抽出された。

患者の背景因子、また各群における施設の手術件数や麻酔時間、さらに麻薬以外の麻酔薬

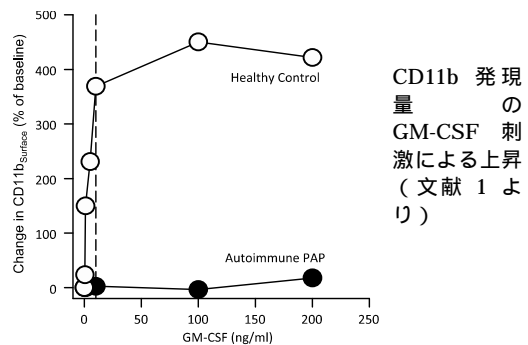
使用割合に2群間で有意差は認めなかった。結果、術後在院死亡は、フェンタニルのみ群が7.7%に対してレミフェンタニル+フェンタニル群は4.2% ($p < 0.001$)で有意に低かった。術後の在院期間はそれぞれ平均36.7日(95%信頼区間34.9-38.4)と37.7日(35.9-39.4) ($p = 0.433$)で有意差を認めなかった。ロジスティック回帰分析の結果、在院死亡と関連する独立因子は高齢、男性、術前高血圧が無いこと、術前意識状態が悪いこと、術中輸血、非教育病院であった。レミフェンタニル+フェンタニルは、オッズ比0.52(95%信頼区間0.37-0.74, $p < 0.001$)で有意に在院死亡を下げるとの解析結果となった(文献3)。本報告は、術前、レミフェンタニル投与前から脳実質に損傷が発生している脳動脈瘤破裂の患者でもレミフェンタニル使用の予後改善効果を示した報告という意味では画期的である。後ろ向き解析であり、前向き解析、ランダム化比較試験などでさらなる分析が望まれる。

(2)GM-CSF生物活性測定法の確立と標準化
96穴のマイクロタイタープレートにリコンビナントGM-CSFをコートして、ブロッキングののち、血清サンプルをアプライし、洗浄後にパーオキシダーゼラベルした抗ヒトIgG抗体を加え、結合した抗体を発色、定量する方法は、自己免疫性肺胞蛋白症患者の血清中抗GM-CSF抗体を測定する方法として、中田らが報告している。今回はコートするリコンビナントGM-CSFの種類、サンプルの希釈度による結果の違いなどのアッセイ構成成分の検討、スタンダードとして使用する抗体の精度及び安定度を検討し、またスタンダードを基にしたサンプル中の抗GM-CSF抗体濃度の算出方法を検討して、検出感度の高い、かつ再現性も高い測定方法へ標準化を行った。またベーリンガー社から提供を受けたモノクローナルGM-CSF抗体を用いた場合の濃度を、過去のポリクローナル抗体を用いた場合の濃度変換式を決定した。本成果はJournal of Immunological Methods誌へ報告した(文献4)が、この方法を用いることで、過去の



測定結果や異なる施設での測定結果を標準化して比較することが可能となったと考える。また、全血中の好中球にリコンビナントGM-CSFを加えることで、表面抗原である接着

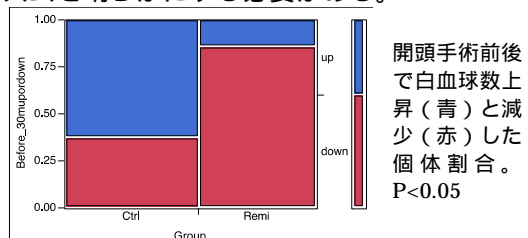
因子CD11bの発現量が急上昇する現象を捉え、10ng/mLのGM-CSF刺激によってCD11bの発現上昇率(% increase)をCD11b stimulation indexと定義し、その再現性を検討した。フローサイトメトリー法を用いた生細胞のバイオアッセイであるため、採血の取り方やサンプルの保存による結果の変動などを検討した結果、同一サンプルを測定したときのばらつきが、サンプル間の値のばらつきよりも小さく、違いを検討するに足るアッセイ法であると認定された(文献1)。この方法は、先



に述べた肺胞蛋白症患者の診断にも使用可能と考えらえる。また同様の手法は犬など他の動物種でも適応可能であることを確認した(文献2)。

(3)ラット開頭モデルを用いたレミフェンタニルの炎症反応に与える影響評価

ラットの再現性のある開頭手術侵襲モデルとして、全身麻酔下、人工呼吸下での開頭、硬膜開放手術モデルを開発した。本方法ではラットの生存が得られ、術後継続した観察、採血が可能となる。術中は体温を 37 ± 0.5 、平均血圧を80-100mmHgかつ動脈血液ガスでPaCO₂を36-44mmHg以内に維持するよう麻酔管理を行った。イソフルラン+生食群(NS群; n=8)とイソフルラン+レミフェンタニル群(Remi群:レミフェンタニル60μg/kg/hr持続投与; n=7)で比較したところ、術中の使用イソフルラン濃度は、NS群 3.1 ± 0.2 に対して有意に低かった(2.3 ± 0.3 , $p < 0.0001$)。また開頭手術前後で末梢血白血球数は、NS群で5/8が上昇したのに対し、Remi群は6/7で減少した($p < 0.05$)。しかし一方で血清中のTNFやIFNはRemi群で高い傾向が認められた。その後の経過では有意な差を認めず、ラットの生命予後はいずれも良好であった。侵襲初期の白血球動員に際してはレミフェンタニルが抑制的に働いている可能性が示唆された。高度侵襲にさらされている時に、白血球機能が抑制される可能性が示唆される報告があり、レミフェンタニルの使用はいずれにも効果を及ぼしている可能性が考えられるが、引き続きモデルを検討し、メカニズムを明らかにする必要がある。



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 10 件)

[欧文]

1. Kusakabe Y, Uchida K, Yamada Y, et al.(9 名中 2,8 番目) A standardized blood test for the routine clinical diagnosis of impaired GM-CSF signaling using flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2014 Nov;413:1-11. doi: 10.1016/j.jim.2014.07.009.
2. Nakagaki K, Nunomura Y, Uchida K, Nakata K, Tazawa R. Up-Regulation of Cluster of Differentiation (CD) 11b Expression on the Surface of Canine Granulocytes with Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014 Aug;76(8):1173-6.
3. Uchida K, Yasunaga H, Sumitani M, Horiguchi H, Fushimi K, Yamada Y. Effects of Remifentanil on In-hospital Mortality and Length of Stay Following Clipping of Intracranial Aneurysm: A Propensity Score Matched Analysis. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*. 2014 Oct;26(4):291-8.
4. Uchida K, Yamada Y, Trapnell BC, et al. (11 名中 1, 10 番目) Standardized Serum GM-CSF Autoantibody Testing for the Routine Clinical Diagnosis of Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Journal of Immunological Methods*. 2014 Jan;402(1-2):57-70
5. Sumitani M, Uchida K, Yamada Y, et al. (9 名中 3,9 番目). Perioperative factors affecting the occurrence of acute complex

regional pain syndrome following limb bone fracture surgery: Data from the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *Rheumatology*. 2014 Jul;53(7):1186-93

6. Muroya M, Chang K, Uchida K, Bougaki M, Yamada Y. Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549. *Bioscience Trends*. 2012 Apr;6(2):70-80.

7. Uchida K, Yasunaga H, Yamada Y. (7 名中 1,7 番目)

Impact of remifentanil use on early postoperative outcomes following brain tumor resection or rectal cancer surgery. *Journal of Anesthesia*. 2012 Oct;26(5):711-20

[邦文]

8. 内田寛治. 誤嚥性肺炎の病態と治療. *麻酔* 2016 Jan;65(1):13-22

9. 内田寛治. 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)シグナルと生体防御・臓器保護. *麻酔* 2013 Mar;62(3):265-74.

10. 内田寛治. 手術患者リスク評価と周術期管理に関連した周術期アウトカム. *麻酔* 2012 May;61(5):514-25

[学会発表](計 16 件)

1. 比留間 孝広, 内田 寛治, 日下部 良臣, 山村 睦朗, 矢作 直樹, 山田 芳嗣. 敗血症に引き続く緑膿菌肺炎のマウスモデルに対するインターフェロンの治療的効果とそのメカニズム. 日本麻酔科学会学術集会 2015 年 5 月 28 日(神戸市)

2. 内田寛治. シンポジウム: 肺傷害発症と重症化のメカニズム 臨床応用への可能性 肺血管透過性の関与とその制御. 日本麻酔科学会学術集会 2015 年 5 月 29 日(神戸市)

3. 阿部 真友子, 篠川 美希, 内田 寛治, 山田 芳嗣. 頭蓋内腫瘍合併症例の腹腔鏡補助下 S 状結腸切除術において、頭蓋内圧評価に視神経鞘径モニタリングを行った 1 例. 日本麻酔科学会東京・関東甲信越支部合同学術集会 2015 年 9 月 5 日(横浜市)

4. Hiruma T, Uchida K, Kusakabe Y, Yamamura Y, Nakamura K, Doi K, Suzuki Y, Totsu T,

Nakajima S, Yahagi N, Yamada Y. Interferon Beta Improved Survival Of Septic Pneumonia Induced By Intratracheal Instillation Of Pseudomonas Aeruginosa By Increasing Neutrophil Recruitment Into The Lung. American Thoracic Society Annual Meeting 2014.5.19 (San Diego, USA)

5.Kusakabe Y, Uchida K, Totsu T, Suzuki Y, Hiruma T, Doi K, Yamamura Y, Yamada Y. Protective Effect Of Interferon Beta To Murine Polymicrobial Sepsis May Not Be Explained By Simple Immunesuppression. American Thoracic Society Annual Meeting 2014.5.18 (San Diego, USA)

6.日下部 良臣, 内田 寛治, 比留間 孝広, 山村 睦朗, 山田 芳嗣. マウス敗血症モデルに対するインターフェロンの効果は単純な免疫抑制性効果によらない. 日本麻酔科学会学術集会 2014年5月16日(横浜市)

7.比留間 孝広, 内田 寛治, 日下部 良臣, 山村 睦朗, 中島 勸, 山田 芳嗣. 2次感染モデル(回盲部結紮穿孔後の肺炎)に対するインターフェロンの効果. 日本麻酔科学会学術集会 2014年5月16日(横浜市)

8.服部 貢士, 内田 寛治, 今井 洋介, 折井 亮, 山田 芳嗣. レミフェンタニルの術中低容量投与が肝切除術後白血球数に与える影響. 日本麻酔科学会学術集会 2014年5月16日(横浜市)

9.石川 慧介, 住谷 昌彦, 内田 寛治, 長江 祐吾, 山田 芳嗣. 術後に肺塞栓症を発症した患者の血液学的リスク因子に関する検討. 日本麻酔科学会学術集会 2014年5月17日(横浜市)

10.比留間 孝広, 内田 寛治, 日下部 良臣, 山村 睦朗, 土井 研人, 中村 謙介, 井口 竜太, 中島 勸, 山田 芳嗣, 矢作 直樹. 院内感染マウスモデルにおけるインターフェロンを用いた炎症制御. 日本救急医学会総会 2014年10月29日.(福岡市)

11.比留間 孝広, 内田 寛治, 日下部 良臣, 中村 謙介, 井口 竜太, 山村 睦朗, 松原 全宏, 中島 勸, 山田 芳嗣, 矢作 直樹. 回盲部結紮穿孔後の生体防御能低下に対するインターフェロンの効果. 日本集中治療医学会学術集会 2014年2月27日(京都市)

12.Kusakabe Y, Uchida K, Yamamura Y, Suzuki Y, Hiruma T, Yamada Y. Effect Of Interferon Beta On Survival For Murine Polymicrobial Sepsis. American Thoracic Society Annual Meeting 2013.5.19 (Philadelphia, USA)

13.日下部良臣, 内田寛治, 鈴木洋子, 山村睦朗, 比留間孝広, 山田芳嗣. マウス敗血症モデルでインターフェロンは生存率を改善する. 日本麻酔科学会学術集会 2013年5月23日(札幌市)

14.日下部 良臣, 内田 寛治, B.C. Trapnell, 山田 芳嗣. GM-CSF 刺激による好中球の CD11b の上昇率で術後患者や重症感染症患者

の免疫能を評価する. 日本麻酔科学会学術集会 2012年6月8日(神戸市)

15.Kusakabe Y, Uchida K, Trapnell BC, Yamada Y. Validation And Mechanism Of Flow-Based Whole Blood Assay To Evaluate Phagocyte Immune Function. American Thoracic Society Annual Meeting 2012.5.22 (San Francisco, USA)

16.Carey B, Chalk C, Uchida K, Suzuki T, Nakata K, Inoue Y, Trapnell B. Dried Blood Spot Card Testing For Diagnostic, Epidemiological And Longitudinal Evaluation Of Pulmonary Alveolar Proteinosis: The US National PAP Registry Study. American Thoracic Society Annual Meeting 2012.5.23 (San Francisco, USA)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 寛治 (UCHIDA, Kanji)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 60302709

(2) 研究分担者

山田 芳嗣 (YAMADA, Yoshitsugu)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 30166748

今井 英明 (IMAI, Hideaki)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70359587

(3) 連携研究者

()
研究者番号: