

令和元年5月29日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10944

研究課題名(和文) 麻酔薬による、糖質コルチコイド誘導免疫細胞アポトーシスの増強作用機序の解析

研究課題名(英文) The analysis of the mechanisms by which anesthetics enhance the glucocorticoid-induced lymphocyte apoptosis.

研究代表者

黒澤 伸 (Kurosawa, Shin)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60272043

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)：糖質コルチコイドは治療に汎用されており、糖質コルチコイド使用患者に全身麻酔を施行する機会は増えている。しかし、糖質コルチコイドには免疫抑制作用があることから術後の易感染性や癌の再発転移が危惧される。この研究目的は1)糖質コルチコイドは免疫細胞にアポトーシスを誘導するか。2)全身麻酔薬は糖質コルチコイドによる免疫細胞アポトーシスを増強するか。3)麻酔薬の種類によりその免疫細胞アポトーシス誘導に差は生じるか。の3点である。研究の結果、糖質コルチコイドおよび全身麻酔薬ともに免疫細胞にアポトーシスを誘導し、さらに全身麻酔薬は糖質コルチコイドによる免疫細胞アポトーシスを増強することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔薬による免疫細胞へのアポトーシス誘導などのその直接的免疫抑制作用は周術期の全体的免疫能を負の方向にもたらし、手術後の癌再発・転移、術後感染症誘発など、長期予後に影響をあたえることが予想される。研究結果から、糖質コルチコイド使用患者の免疫能を維持、または低下させない麻酔法・麻酔薬の選択が可能になることが予想され、将来的にこれらの基礎研究結果を麻酔臨床に結びつけることにより麻酔を標準化することができる。また、個々の患者の全身状態を考慮したテーラーメイドの麻酔管理をすることは結果的に患者の長期予後改善に貢献する意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids are commonly used for their immunosuppressive and anti-inflammatory effects. The immunomodulatory effects of glucocorticoids on lymphoid cells include induction of apoptosis to thymocytes, peripheral lymphocyte, and leukemic cell lines. On the other hand, many studies have shown immunosuppressive effects of general anesthetics on various immune cells. In this point of view, there is a concern that general anesthetics augment glucocorticoid-induced immunosuppression in cancer patients undergoing steroids treatment before surgery, which may lead to the post-operative cancer recurrence and metastasis. The aim of this study is to investigate the effects of general anesthetics on the immunomodulation of glucocorticoids.

Results of this study indicate that general anesthetics such as volatile anesthetics and propofol promote the glucocorticoid-induced lymphocyte apoptosis. General anesthetics might have a potential to aggravate a glucocorticoid-immunosuppressive condition.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 リンパ球 アポトーシス 糖質コルチコイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖質コルチコイドはサイトカイン産生およびその機能抑制などの免疫抑制作用をもつことから自己免疫性疾患や感染症治療、気管支喘息や疼痛治療などに幅広く使用されている。また、周術期では虚血再灌流障害などの炎症反応を予防する目的でも使用され、糖質コルチコイド使用患者に全身麻酔を施行する機会は増えている。全身麻酔は手術侵襲から生体の恒常性を守るための必須の医療行為であるが、全身麻酔それ自体も生体にとって侵襲であることが知られている。生体への侵襲は免疫力低下をもたらす、手術後の患者の長期予後を左右する。全身麻酔管理による免疫能低下には循環管理、体温管理、輸血などの体液管理が関与するが、さらに麻酔薬そのものも患者の免疫能を低下させることが知られている (*Curr Opin Anaesthesiol*. 2006;19:423-428)。申請者はこの全身麻酔薬による免疫能低下の原因を解明するためにヒト末梢血リンパ球に揮発性吸入麻酔薬を曝露する実験を行い、揮発性吸入麻酔薬が直接的にリンパ球にアポトーシスを誘導することを発見し、報告した (*Anesthesiology*2001; 95:1467-1472)。その後、海外の研究者からも同様の研究結果が報告され (*Anesthesiology*2005;102:1147-1157)。全身麻酔薬による免疫能低下の原因のひとつが免疫細胞への直接的アポトーシス誘導であるという知見は認められつつある。さらに申請者は平成22年度から24年度科学研究費研究(課題番号 22591702)において揮発性吸入麻酔薬は時間依存性かつ濃度依存性に免疫細胞にアポトーシスを誘導すること、そしてそのアポトーシス誘導に先行して免疫細胞のミトコンドリア膜電位が低下することを解明し、揮発性吸入麻酔薬による免疫細胞アポトーシス誘導の原因はミトコンドリア膜電位低下であると結論した。続いて平成25年度から27年度科学研究費研究(課題番号 25462395)によって、揮発性吸入麻酔薬の種類(イソフルラン、セボフルラン)により免疫細胞へのアポトーシス誘導パターンとその強弱に違いがあり、その原因としてミトコンドリアよりもより上流にある情報伝達経路活性化の差異が関与していることを研究中である。そしてこれまでの一連の研究結果から、全身麻酔薬が免疫細胞にアポトーシスを誘導することは事実であるが、それぞれの麻酔薬の免疫抑制作用における特徴を生かして、個々の患者に最適な麻酔薬と麻酔管理の選択が可能であることを着想するに至った。糖質コルチコイドは関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性疾患の治療に必須の薬剤であり、これらの基礎疾患をもつ患者が癌などの治療目的で全身麻酔を施行される機会は少なくない。手術の目的は長期予後の改善であるが、背景に糖質コルチコイド使用による免疫抑制状態がある場合は、麻酔薬や麻酔法の選択によっては、より免疫抑制を増強して癌の再発・転移、感染症を誘発する可能性がある。そこで本研究の目的は、これまでの研究成果を踏まえ、糖質コルチコイドの免疫抑制作用機序に免疫細胞アポトーシスがあること、その糖質コルチコイドによる免疫細胞アポトーシスが全身麻酔薬(揮発性吸入麻酔薬、静脈麻酔薬)により増強すること、さらに糖質コルチコイドによる免疫細胞アポトーシスの程度が全身麻酔薬の種類によって異なることをそのメカニズムとともに解析し、周術期に管理するステロイド使用患者の、長期予後改善を目的とした適切な麻酔管理の選択を提唱することにある。

2. 研究の目的

糖質コルチコイドは自己免疫性疾患、感染症治療などに広く使用されており、糖質コルチコイド使用患者に全身麻酔を施行する機会は増えているが、術後の易感染性や癌の再発転移が危惧される。申請者は平成22年度から24年度科学研究費(課題番号 22591702)および平成25年度から27年度科学研究費(課題番号 25462395)によって揮発性吸入麻酔薬が免疫細胞にアポトーシスを誘導すること、吸入麻酔薬の種類によりアポトーシス誘導の強弱があり、その原因として細胞内シグナル伝達が関与していることを解析した。今回の研究目的は1)糖質コルチコイドは免疫細胞にアポトーシスを誘導するか。2)揮発性吸入麻酔薬および静脈麻酔薬は糖質コルチコイドによる免疫細胞アポトーシスを増強するか。3)麻酔薬の種類によりその免疫細胞アポトーシス誘導に差は生じるか。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ラン、イソフルランを、静脈麻酔薬はプロポフォールを用いた。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)を用いた。胸腺細胞への麻酔薬曝露は平成25年度から27年度の科学研究費(課題番号 22591702)と同様に密閉型アクリル樹脂製箱を使用した。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細胞膜構造の変化を染色するAnnexin-Vにより、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染色によるフローサイトメトリー法によりおこなった。

1)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における至適糖質コルチコイド濃度決定に関する実験: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 1×10^6 個/mlの割合で分配する。糖質コルチコイドとしてデキサメサゾンを用い、デキサメサゾン 10^{-7} モル濃度(以下、M)、 10^{-8} M、 10^{-9} Mを添加し、それぞれ4時間、8時間、12時間培養後、アポトーシス細胞の定量と定性を行い、糖質コルチコイドによる用量依存性および時間依存性アポトーシス誘導を確認し、その至適糖質コルチコイド濃度決定した。2)揮発性吸入麻酔薬による糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果に関する実験: 10^{-8} MのデキサメサゾンをBalb/cマウス由来胸腺細胞に添加後、揮発性吸入麻酔薬のイソフルランおよびセボフルランを曝露し、デキサメサゾンに

よる胸腺細胞アポトーシス誘導の変化を観察した。3)揮発性吸入麻酔薬による糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果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：同様に胸腺細胞を培養液に浮遊後デキサメサゾンを追加し、密閉型アクリル樹脂製箱内に静置して揮発性吸入麻酔薬に曝露、4時間、8時間、12時間培養し、揮発性吸入麻酔薬による糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗的アポトーシス増強における胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位の変化を測定、検討した。4)プロポフォルによる糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果に関する実験：胸腺細胞を培養液に浮遊後、デキサメサゾンを追加し、同時に30 μ Mプロポフォルまたは対照として10%脂肪乳剤を追加し8時間培養し、プロポフォルによる糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗的アポトーシス増強の用量依存性および時間依存性効果を検討した。5)プロポフォルによる糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果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：胸腺細胞を培養液に浮遊後、デキサメサゾンを追加し、同時に30 μ Mのプロポフォルまたは対照として10%脂肪乳剤を追加しCO₂インキュベーター内にて8時間培養し、プロポフォルによる糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗的アポトーシス増強における胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位の変化を測定、検討する。

4. 研究成果

1)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における至適糖質コルチコイド濃度決定に関する実験：10⁻⁹~10⁻⁵Mの糖質コルチコイド添加によってマウス由来胸腺細胞は用量依存性、時間依存性にアポトーシスが誘導されることを確認した。とくに10⁻⁶~10⁻⁵Mの糖質コルチコイドは4時間培養でも90%以上がアポトーシスをおこしていた。10⁻⁷Mの糖質コルチコイドから次第にアポトーシス誘導程度は減少し、10⁻⁹Mではアポトーシス誘導は5%未満となり、10⁻⁸Mでは10%前後の胸腺細胞がアポトーシスをおこしていた。これらの結果から、実験に使用する糖質コルチコイドは、これまでの報告に比べると低濃度である10⁻⁸Mを選択した。2)揮発性吸入麻酔薬による糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果に関する実験(図)：(1)4時間及び8時間の培養でイソフルラン(1MAC)は時間依存性に胸腺細胞にアポトーシスを誘導した。(2)10⁻⁸Mのデキサメサゾンは4時間及び8時間の培養で時間依存性に胸腺細胞にアポトーシスを誘導した。(3)1MACイソフルランおよび1MACセボフルランはともにデキサメサゾンによる胸腺細胞アポトーシス誘導を時間依存性に増強した。3)揮発性吸入麻酔薬による糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果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)イソフルラン(1MAC)は4時間および8時間の曝露で胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位低下を有意に誘導したが、その程度はデキサメサゾン(10⁻⁸モル濃度)による効果よりも小さかった。(2)イソフルラン(1MAC)およびセボフルラン(1MAC)はともにデキサメサゾンによるミトコンドリア内膜電位低下を増強した。4)プロポフォルによる糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果に関する実験：プロポフォル(30 μ M)単独では8時間培養で胸腺細胞にアポトーシスを誘導しなかったが、デキサメサゾンによる胸腺細胞アポトーシス誘導を増強した。5)プロポフォルによる糖質コルチコイド誘導性胸腺細胞アポトーシスの相加または相乗効果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：プロポフォル(30 μ M)は8時間培養で胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位を低下させ、またデキサメサゾンによるミトコンドリア内膜電位低下を増強した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Tsuyoshi Isosu, Tomohiko Sato, Rieko Ohishi, Tsuyoshi Imaizumi, Takahiro Hakozaiki, Shinju Obara, Yukihiko Ikegami, Shin Kurosawa, Masahiro Murakawa: Effects of indigo carmine intravenous injection on noninvasive and continuous total hemoglobin measurement. *Journal of Clinical Monitoring Computing*, 査読有, 30(3), 2016, 313-316, doi: 10.1007/s10877-015-9719-2

Ikegami Y, Yoshida K, Imaizumi T, Isosu T, Kurosawa S, Murakawa M: Life-threatening urethral hemorrhage after placement of a Foley catheter due to urinary retention induced by untreated benign prostatic hyperplasia. *Acute Medicine and Surgery*, 査読有, 3(4), 2016, 407-410, doi: 10.1002/ams2.209.

Tsuyoshi Isosu, Shinju Obara, Takahiro Hakozaiki, Tsuyoshi Imaizumi, Y Iseki, Midori Mogami, Midori, Satoru Ohashi, Yukihiko Ikegami, Shin Kurosawa, Masahiro Murakawa: Effects of indigo carmine intravenous injection on noninvasive and continuous total hemoglobin measurement with using

the Revision L sensor. Journal of Clinical Monitoring Computing, 査読有, 31(2), 2017, 485-486, doi: 10.1007/s10877-016-9850-8.

Tsuyoshi Isosu, Keisuke Yoshida, Rieko Oishi, Tsuyoshi Imaizumi, Yuzo Iseki, Norie Sanbe, Yukihiro Ikegami, Shinju Obara, Shin Kurosawa, Masahiro Murakawa: Effects of indigo carmine intravenous injection on oxygen reserve index (ORi™) measurement. Journal of Clinical Monitoring Computing, 査読有, 32(4), 2018, 693-697, doi: 10.1007/s10877-017-0064-5.

黒澤 伸, 血糖と免疫, 臨床麻酔, 査読なし, 40, 2016, 965-973

黒澤 伸, アナフィラキシー 発症メカニズム, LiSA, 査読なし, 23, 925-933

黒澤 伸, エキスパートに学ぶショック管理のすべて 4 - b) アナフィラキシーショック, 救急・集中治療, 査読なし, 30, 2018, 397-405

〔学会発表〕(計21件)

黒澤 伸, 手術室スタッフの放射線被曝 正しい知識で正しく怖がろう, 平成30年第2回日本手術医学会教育セミナー, 2018

黒澤 伸, 麻酔薬が免疫におよぼす影響について—おもに腫瘍免疫との関係を中心に—, 福島医学会470回学術集会, 2018

黒澤 伸, 麻酔管理が免疫系に及ぼす影響、および予後との関係, 2018 熊本神経ブロックセミナー, 2018

黒澤 伸, アナフィラキシーのメカニズム, 福岡麻酔科学セミナー2018, 2018

黒澤 伸, アナフィラキシーのメカニズム, 第1回周術期アナフィラキシー研究会, 2018

黒澤 伸, 麻酔管理と術後予後との関係, 第40回日本手術医学会総会, 2018

佐藤 優紀, 小川誠子, 本田 潤, 細野敦之, 小原伸樹, 黒澤 伸, カルシウム拮抗薬を含有する配合錠の中止による全身麻酔時の血圧に及ぼす影響, 日本麻酔科学会第65回学術集会, 2018

田中彩織, 細野敦之, 本田 潤, 中野裕子, 佐藤 薫, 五十洲 剛, 黒澤 伸, 村川雅洋, 連合弁膜症による心不全患者に対し末梢神経ブロックで管理した閉鎖孔ヘルニア修復術の一例, 日本臨床麻酔学会第38回大会, 2018

三部徳恵, 村川雅洋, 黒澤 伸, 五十洲 剛, 心サルコイドーシスが併存した鼻中隔彎曲症例に対する全身麻酔の経験, 日本臨床麻酔学会第38回大会, 2018

野地善恵, 高木麻美, 花山千恵, 井石雄三, 箱崎貴大, 五十洲 剛, 黒澤 伸, 村川雅洋, 小児の熱傷患者において経皮的トータルヘモグロビン測定が有用であった一例, 日本臨床麻酔学会第38回大会, 2018

城田さつき, 大石理江子, 長谷川貴之, 江花英朗, 小原伸樹, 五十洲 剛, 黒澤 伸, 村川雅洋, 産科患者の自己血貯血における白血球除去フィルターの導入について, 日本臨床麻酔学会第38回大会, 2018

長谷川貴之, 大石理江子, 城田さつき, 今泉 剛, 三部徳恵, 五十洲 剛, 黒澤 伸, 村川雅洋, 貯血式自己血輸血により重篤な副反応を起こした一例, 日本臨床麻酔学会第38回大会, 2018

大石理江子, 長谷川真貴子, 井石雄三, 今泉 剛, 箱崎貴大, 小原伸樹, 五十洲 剛, 黒澤 伸, 村川雅洋, NO 吸入が有効であった ARDS の一例, 第45回日本集中治療医学会学術集会, 2018

三部徳恵, 吉田圭佑, 細野敦之, 箱崎貴大, 小原伸樹, 最上 翠, 中野裕子, 五十洲 剛, 黒澤 伸, 村川雅洋, 感染性心内膜炎に対する僧帽弁置換術後再開胸止血術時のイダルシズマ

ブの投与経験、第45回日本集中治療医学会学術集会、2018

本田 潤、江花英朗、大橋 智、箱崎貴大、井石雄三、三部徳恵、五十洲 剛、黒澤 伸、村川雅洋、外傷による急性A型大動脈解離術後に人工心肺離脱困難に陥りLVADを装着し救命した1例、第45回日本集中治療医学会学術集会、2018

Jun Honda, Masahiro Murakawa, Makiko Hasegawa, Keisuke Yoshida, Kae Techigawara, Chie Hanayama, Yuko Nakano, Shinju Obara, Tsuyoshi Isosu, Shin Kurosawa, Detection of rapid onset respiratory deterioration in volunteers using recent developed continuous respiration rate monitor. American Society of Anesthesiologists, 2017

遠藤千麻、小原伸樹、小川誠子、今泉 剛、三部徳恵、黒澤 伸、脊髄くも膜下麻酔中の灌流指標（Perfusion Index）に対する鎮静の影響、日本麻酔科学会第64回学術集会、2017

長谷川真貴子、鉄地河原香恵、石堂瑛美、江花英朗、箱崎貴大、五十洲 剛、黒澤 伸、村川雅洋、繰り返しのECMO使用により血管確保困難となった肺胞蛋白症の麻酔経験、日本臨床麻酔学会第37回大会、2017

五十洲 剛、村川雅洋、今泉 剛、吉田圭佑、池上之浩、黒澤 伸、McGRATH MAC ビデオ喉頭鏡は、気管挿管に本当に有用なのか？、日本蘇生学会第35回大会、2016

吉田圭佑、五十洲 剛、今泉 剛、池上之浩、黒澤 伸、村川雅洋、術中に心電図異常は改善したが心エコーで壁運動異常がみられたたこつぼ型心筋症を合併したくも膜下出血の1例、日本蘇生学会第35回大会、2016

21 Tsuyoshi Imaizumi, Keisuke Yoshida, Midori Mogami, Shinju Obara, Shin Kurosawa, Masahiro Murakawa. Continuous and noninvasive hemoglobin monitoring may reduce excessive intraoperative RBC transfusion. 16th World Congress of Anaesthesiologists, Hong Kong, 2016

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。