

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2006～2008  
課題番号：18591977  
研究課題名（和文）鎮静薬投与患者末梢血単核球のNF- $\kappa$ B転写活性、サイトカイン産生能の検討  
研究課題名（英文）Evaluation of expression of NF- $\kappa$ B DNA and cytokine production in white blood cells derived from sedative patients  
研究代表者  
國元 文生（KUNIMOTO FUMIO）  
群馬大学・医学部・准教授  
研究者番号：70125847

研究成果の概要：呼吸不全患者及び食道癌術後患者から採取した単核球（peripheral を利用してのNF- $\kappa$ Bの転写活性、サイトカイン産生を健常人と比較検討を実施した。TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の産生量は呼吸不全患者で著明に増加しており、Western Blot 法を用いて測定した細胞質内 I- $\kappa$ BとNF- $\kappa$ Bの発現量も同時に増加していた。以上のことから、細胞内シグナルトランスダクションシステムの障害によりサイトカイン産生が惹起されることが判明した。重症患者は鎮静薬の投与によりさらに免疫能が低下することを解明することが出来た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	480,000	3,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、救急医学

キーワード：鎮静薬、重症患者、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

集中治療患者の適切な鎮静は、重症病態から

の回復に影響する極めて重要な治療手技であるが、免疫能の低下、循環動態の不安定さなどから、多くの問題も残されている。現在、鎮静薬として半減期が短く調節性に富むプロポフォール (PFL)、ミダゾラム (MDZ) が多用され、ときに長期投与も行われているが、免疫能の低下している患者が多い集中治療患者では、その細胞性免疫抑制作用が問題となっていた。

## 2. 研究の目的

PFL、MDZ が細胞性免疫能に与える影響を検索することによって集中治療の安全管理に有用な情報を得ると同時に、適切・安全な薬剤の選択に役立てることを目的とした。

## 3. 研究の方法

<PBMCの細胞質 I- $\kappa$  B および核内 NF- $\kappa$  B の測定>

密度勾配遠心で分離したPBMC層をRPMI1640で培養し  $1 \times 10^6$  個/ml とする。ついで 10mM HEPES入りの低張液で細胞を融解したのち高速遠心(Beckman遠心器:100,000 x g)した。

### (1) タンパク質の精製

密度勾配遠心で分離した患者 PBMC 層に 10 倍量の 0.32M sucrose 加えた後、Polytron PT-10 型ホモジナイザー及びPotter型ホモジナイザーを利用して、ホモジネート。ホモジネートした組織はBeckman 遠心器を利用して 100,000g x 60 分で P2 分画に精製分離し、Bradford 法でタンパク定量。

### (2) I- $\kappa$ B と NF- $\kappa$ B の DNA の発現量

精製したP2 分画に  $32^p$ -ATPでラベルしたコンセンサスモチーフを有するプローベ (Promega社製Kit) を結合させた後 5%アクリルアミドゲル上で 30mA、1 時間電気泳動 (EMSA) を行い、Whatman 3M紙に転写して autoradiography (アロカ社製) で定量。

### (3) I- $\kappa$ B と NF- $\kappa$ B の定量

Western Blot 法で測定する。精製した P2 分画を利用して SDS-PAGE と Immunoblotting 法 (Western Blot 法) を用いての細胞質内 I- $\kappa$  B の定量と NF- $\kappa$  B の定量を行った。Bradford 法で定量し  $20 \mu\text{g}$  に分割した P2 分画を電気泳動(Boi-Rad 社製 Immune Blot Kit) に流して細胞質内 I- $\kappa$  B と NF- $\kappa$  B を分離し、それを Nitrocellulose 膜に転写。1 次抗体である抗 NF- $\kappa$  B 抗体 (100 倍希釈 : Sigma 社製品), 抗 I- $\kappa$  B 抗体 (500 倍希釈 : Sigma 社製品) で、Avidin-Biotin Complex (ABC kit: アマシャム社製) を投与し発色させる (2 時間固定)。発色した部位を Densitometry で解析した。

### <PBMC の TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 産生能>

LPS 刺激前後で上清中の TNF  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$  を測定し上昇率を求め産生能を測定した。LPS は E. coli LPS (055:B5, Sigma) を  $1 \mu\text{g}/10^6$  個/ml 液とし、60 分間インキュベートした後、上清  $50 \mu\text{l}$  を採取しルミネックスアッセイキット (BioSource 社製) で測定した。100mgLPS 粉末は生理食塩水 100ml で溶解した後、生化学工業試薬およびウェルリーダーを用いてエンドスピー値が  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう調整した。

#### <Apoptosis発現の観察>

健康人と敗血症患者から採取したPBMCの細胞濃度を  $2.5 \sim 5 \times 10^5$  個/mlになるように調節し、細胞混濁液をマイクロプレートに乗せプロポフォルやミダゾラムと共に一晚培養。Apoptosis誘導剤(カナマイシン)  $50 \mu\text{L}$ を加えさらにCO<sub>2</sub>インキュベーターで16~20時間培養。 $10 \sim 100 \mu\text{L}$ の0.4%トリパンブルーを加える。顕微鏡の倍率を100倍に合わせて、 $1 \text{ mm}^2$ の区画全体の視野から、トリパンブルーに染まらない生細胞と青く染まる細胞の数をカウントした。

#### 4. 研究成果

TNF  $\alpha$ 、IL-1  $\beta$  の産生量は呼吸不全患者で著明に増加しており、Western Blot 法を用いて測定した細胞質内 I- $\kappa$  B と NF- $\kappa$  B の発現量も同時に増加していた。以上のことから、細胞内シグナルトランスダクションシステムの障害によりサイトカイン産生が惹起されることが判明した。重症患者は鎮静薬の投与によりさらに免疫能が低下することを解明することが出来た。

#### 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3件)

①Kawauchi C, Kadoi Y, Hinohara H, Kunimoto F, Saito S  
Evaluation of cerebrovascular carbon

dioxide reactivity in patients with diabetes mellitus under sedative doses of propofol. J Anesthesia 22:429-434, 2008. 査読有

②Kadoi Y, Hinohara H, Kunimoto F, Saito S  
Effects of the cannabinoid antagonist AM281 on systemic hemodynamics and mortality rate in streptozotocin-induced diabetic rats with endotoxic shock - Comparison between non-diabetic and diabetic rats. Acta Anaesthesiol. Scand. 52:664-672, 2008. 査読有

③Kadoi Y, Saito S, Kawauchi C, Hinohara H, Kunimoto F  
Comparative effects of propofol versus dexmedetomidine on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with septic shock. Br. J Anesth. 100:224-229, 2008. 査読有

[学会発表] (計1件)

①日野原宏、河内力、金丸良範、林淑朗、大嶋清宏、門井雄司、桑野博行、國元文生  
集中治療患者のヘモグロビン濃度 第35回  
日本集中治療医学会、2008.3.1、東京

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

國元 文生 (KUNIMOTO FUMIO)  
群馬大学・医学部・准教授  
研究者番号：70125847

(2) 研究分担者

門井 雄司 (KADOI YUJI)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：10292591