

平成21年6月1日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791090
 研究課題名 マイクロサンプリングプローブによる肺上皮被覆液の解析-亜酸化窒素と中心として-
 研究課題名 Analysis of the Epithelial Lining Fluid by the bronchoscopic microsampling method - The influence of the nitrous oxide -
 研究代表者
 熊倉 誠一郎 (KUMAKURA SEIICHIRO)
 順天堂大学・医学部 ・助教
 研究者番号：00306953

研究成果の概要：

挿管し陽圧呼吸で管理する全身麻酔施行前後に、気道上皮被覆液中(以下 ELF)のインターロイキン-8 (以下 IL-8) 濃度の測定を行った。揮発性吸入麻酔薬であるセボフルランに亜酸化窒素を併用投与すると、併用しない場合と比較し、術後 ELF 中の IL-8 の濃度が有意に上昇した。しかし静脈麻酔薬であるプロポフォールに亜酸化窒素を併用投与した場合には、IL-8 濃度の上昇は有意には高まらなかった。以上から今回の研究によりセボフルランと亜酸化窒素を併用投与することで肺局所に炎症を惹起する可能性が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：亜酸化窒素、肺上皮被覆液(Epithelial Lining Fluid)、インターロイキン-8、セボフルラン、マイクロサンプリングプローブ、プロポフォール

1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素は、1997年12月に決議された京都議定書に基づき、削減目標を達成することが定められたガスのひとつである。しかし未だに日本では全身麻酔を施行時に、多くの施設で亜酸化窒素が、全身麻酔施行時に併用投与されている。

本研究開始前の我々の予備実験によれば、亜酸化窒素を吸入麻酔と併用することにより全身麻酔後の ELF 中の IL-8 濃度が上昇す

る可能性が認められた。つまり全身麻酔施行後に肺合併症を増加させる可能性がある。もし亜酸化窒素を吸入麻酔薬や静脈麻酔薬と併用投与することにより、肺局所における炎症反応が増強するような作用が確認されたならば、日本だけに限らず世界的に亜酸化窒素の使用量が次第に減少していく可能性がある。これは全身麻酔を受けられる患者の利益だけにとどまらず、地球温暖化問題にまで影響を与えるテーマだと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 吸入麻酔薬であるセボフルランに亜酸化窒素を併用投与した群を S+G 群、空気を併用投与した群を S+A 群とし、2 群に分け、全身麻酔導入後と手術終了後にマイクロサンプリングプローブ™(BC-402C, オリンパス社, 東京) を用いて、肺上皮被覆液 (Epithelial Lining Fluid, 以下 ELF) 採取し、ELF 中のインターロイキン (以下 IL)-6, IL-8 を測定することによって検討する。

(2) 静脈麻酔薬であるプロポフォールに亜酸化窒素を併用投与した群を P+G 群、空気を併用投与した群を P+A 群とし、2 群に分け全身麻酔導入後と手術終了後に前回同様にマイクロサンプリングプローブ™を用いて ELF を採取し、ELF 中のインターロイキン IL-8 を測定することによって検討する。

(3) 得られた検体を用いて、さらに詳細に分析するため IL-8 に代表されるケモカイン (Chemokine) のうち、IP-10、RANTES、MCP-1、MIG について測定を行い検討する。

(4) 上記 4 群を比較する際、検体を採取した手術の術式、全身麻酔施行時の酸素分圧やオピオイドの使用条件がまちまちであった為、これらの条件を同じにすべくプロトコールを作成し、すべて同じ術式の手術 20 症例を、再度 S+G 群、S+A 群の 2 群に分け、マイクロサンプリングプローブ™を用いて ELF を採取し、ELF 中のインターロイキン IL-8 を測定し検討した。

3. 研究の方法

本研究は、順天堂大学医学部附属練馬病院の倫理委員会の承認を取得後に開始された。

(1) 対象

当院で全身麻酔を用いて外科手術が予定された全身状態が良好な患者を対象とした。

① 対象のうち 20 症例を抽出し、セボフルランと亜酸化窒素の併用群を S+G 群 (10 症例)、セボフルランと空気の併用群を S+A 群 (10 症例) として無作為的に 2 群に分けた。

② 対象のうち乳腺外科手術症例を 20 例抽出し、プロポフォールと亜酸化窒素の併用群を P+A 群 (10 症例)、プロポフォールと空気の併用群を P+A 群 (10 症例) として無作為的に 2 群に分けた。

(2) 麻酔管理

① セボフルラン麻酔の場合

全症例において麻酔前投薬はなし。

モニター：ECG, NIBP, SpO₂, ETCO₂

【導入】

プロポフォール 1.5-2.5mg·kg⁻¹

ベクロニウム 0.1mg·kg⁻¹

全例気管挿管を施行

【麻酔維持】

S+G 群：Sevoflurane + O₂ + N₂O

S+A 群：Sevoflurane + O₂ + Air

・G 群：セボフルラン 1~3%

酸素 2l/min⁻¹

亜酸化窒素 2~3l/min⁻¹

・A 群：セボフルラン 1~3%

酸素 1~1.5l/min⁻¹

空気 3l/min⁻¹

両群とも術中の酸素濃度は 33~50% となるよう調節し、吸入セボフルラン濃度は 1~3% の範囲で調節した。

1 回換気量は 7~10ml·kg⁻¹ 程度とし、呼吸回数は呼気終末二酸化炭素分圧が 35~40mmHg となるように機械的調節呼吸を行った。

最高気道内圧が 20cmH₂O 以下となるよう換気量を調節した。

セボフルラン濃度およびベクロニウムの追加投与、オピオイドの使用に関しては担当麻酔科医の任意とした。

② プロポフォール麻酔の場合

全症例において麻酔前投薬はなし。

モニター：ECG, NIBP, SpO₂, ETCO₂, BIS

【導入】

・プロポフォール TCI 4μg/ml

・レミフェンタニル 0.15-0.3μg·kg⁻¹·min

・ベクロニウム 0.1mg·kg⁻¹

【麻酔維持】

P+G 群：Propofol + O₂ + N₂O

P+A 群：Propofol + O₂ + Air

Propofol TCI は BIS 値が 40~60 となるよう調節

F_IO₂ : 0.4 (固定), 1 回換気量: 7~10ml·kg⁻¹

最高気道内圧は 20cmH₂O 以下となるよう調整

呼吸回数は ETCO₂ が 35~40mmHg となるように調節

③ 新規に行ったセボフルラン麻酔

全症例において麻酔前投薬はなし。

モニター：ECG, NIBP, SpO₂, ETCO₂

【導入】

・プロポフォール 1.5-2.0mg·kg⁻¹

・レミフェンタニル 0.15-0.3μg·kg⁻¹·min

・ベクロニウム 0.1mg·kg⁻¹

【麻酔維持】

P+G 群：Sevoflurane + O₂ + N₂O

P+A 群：Sevoflurane + O₂ + Air

F_IO₂ : 0.4(固定), 1 回換気量: 7~10ml・kg⁻¹
最高気道内圧は 20cmH₂O 以下となるよう調整
呼吸回数は ETCO₂ が 35~40mmHg となるように調節

(3) 検体採取方法

肺上皮被覆液 (ELF) 採取にマイクロサンプ
リングプローブ™ (BC-402C, オリンパス社,
東京) を用いた。気管挿管直後および手術終
了時に、気管支ファイバースコープ下にマイ
クロサンプリングプローブ™ を用いて主気管
支から右気管支にかけての部位で ELF を採取
した。採取した検体は採取後直ちに -80℃ で
冷凍保存し、後日測定を行った。

(4) 実験方法と評価項目

マイクロサンプリングプローブ™ の取り扱い
は石坂らの報告に従い処理した¹⁾。

① IL-6 は eBioscience 社製 (San Diego, CA,
USA)

IL-8 は R&D system 社製 (Minneapolis, MS,
USA) のキットを使用し、酵素免疫測定法
(ELISA) を用いて測定した。キットの最小検
出濃度は、IL-6 は 2pg・ml⁻¹、IL-8 は 3.5pg・ml⁻¹
であった。

② IP-10、RANTES、MCP-1、MIG は、BD (Becton,
Dickinson and Company; Franklin Lakes, NJ
USA) 社製の Human BD CBA キットを用いて CBA
法を用いて測定した。

(5) 統計処理

得られたデータは、平均値 ± 標準偏差で表
した。2 群間の背景因子並びに術中因子の比
較は Mann-Whitney U 検定 (両側検定) を用
いた。また各群の術前後値の比較には対応の
ある t 検定によって検定した。P < 0.05 を有
意とした。

4. 研究成果

(1) セボフルラン麻酔

① 患者背景と術中因子

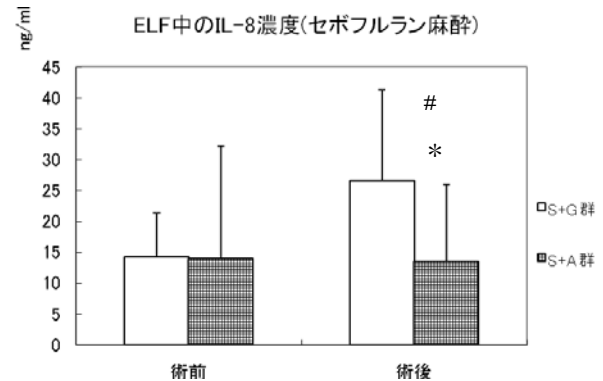
S+G 群と S+A 群では、身長、体重、年齢に有
意差を認めなかった。手術時間や、麻酔時間、
術中輸液量、術中出血量、術中尿量に関し
ても両群で有意差を認めなかった。また自動麻
酔記録システム (ORSYS, Philips 社製) によ
って計算された術中投与されたセボフルラ
ンの総量も、有意差を認めなかった。

② IL-6 および IL-8 濃度変化

2 群の術前後の ELF 中 IL-8 濃度変化・濃度
を図 1 に示す。IL-8 は、S+A 群では手術前後

で有意差を認めなかったが、S+G 群では、ELF
中 IL-8 濃度は術前に比較し術後に有意に高
かった (P < 0.05)。また両群の術後値のみを
比較した場合にも、A 群に比較し S+G 群で有
意に高かった (P < 0.05)。

IL-6 は両群すべての症例で検出限界以下で
あった。



(図 1) (* : P<0.05 手術前と比較して)
(# : P<0.05 S+A 群の術後と比較して)

③ IL-8 は、好中球の遊走因子であり、単球、
マクロファージ、好中球、血管内皮細胞、上
皮細胞などから産生・遊離される²⁾。肺局所
においても肺胞上皮細胞や気道上皮細胞が
IL-8 を発現することが知られており³⁾、気道
炎症の程度と IL-8 との関与が示唆されてい
る。McCrea らは BALF 中の IL-8 濃度が気道炎
症のバイオマーカーとなりうることを報告
している⁴⁾。

④ すべての症例において、主気管支から右気
管支の部位で、マイクロサンプリングプロ
ブ™ を用いて ELF を採取した。マイクロサ
ンプリングプローブ™ は、気管支肺泡洗浄法に
比較して特定部位での ELF 採取が可能であり、
ELF の希釈倍率が算出でき各症例で採取部
位による違いは無かった。また ELF の希釈倍率
の算出が可能であった。

⑤ 全身麻酔施行時に起こる気道の炎症には、
手術侵襲、陽圧呼吸、セボフルランなどの揮
発性麻酔薬が関係していると報告^{5)~11)}され
ている。一般的に外科的侵襲により血漿サイ
トカイン濃度は上昇するが、今回研究対象と
したマイナー手術では、術後の ELF 中のサイ
トカイン IL-6 および IL-8 の濃度変化は手術
侵襲による血中 IL-6 および IL-8 濃度変化に
よる影響はほとんどないと考える。

④ 気管挿管下の陽圧換気で呼吸管理するこ
とが炎症反応のトリガーとなることが報告
されている⁸⁾。すべての症例で挿管し、術中

陽圧換気を行ったが、その時間は両群とも2時間程度であり、両群間で有意差はなかった。陽圧換気による影響は存在していると考えられるが、その程度は今回の2群間でほぼ同程度と考えられた。

⑥揮発性麻酔薬の肺の炎症反応に対する影響には議論がある。揮発性麻酔薬は肺胞内マクロファージ、サーファクタント、気管や肺胞上皮細胞、さらに肺毛細血管内皮細胞に対して、直接あるいは間接に作用し、肺の抗炎症作用などの免疫機能に影響を与えることが報告されている⁵⁾。この報告によるとヒトの肺胞マクロファージにおける炎症性サイトカインの遺伝子発現は、手術時間が遷延するに従い増強し、その反応はプロポフォール麻酔とイソフルラン麻酔を比較するとイソフルラン麻酔の方がより大きかった。一方これとは反対に、ハロタンとイソフルランは肺の実験的炎症を抑制するとの報告もある¹⁰⁾。この抗炎症作用は肺胞II型細胞からのサイトカイン分泌抑制によるものと説明されている。ラットにおいてはLPS (lipopolysaccharide) 刺激による肺の急性炎症時に1%ハロタン麻酔を行うことで、BALF中や肺組織中のIL-6濃度が減少すること¹¹⁾、さらにセボフルラン麻酔とチオペンタール麻酔を比較したブタによる研究においても、対象群と比較してセボフルラン麻酔群で肺組織中のIL-6の遺伝子発現が少なかったことが報告されている⁶⁾。以上から揮発性麻酔薬は肺局所において炎症性サイトカインの遺伝子発現を増強させる可能性、または抗炎症作用がある可能性、両方が示唆されている。

⑥麻酔中に使用されたセボフルランの投与総量を正確に把握する方法は無く、本研究においても、各症例において使用されたセボフルランの投与濃度は、各担当麻酔医の任意としており、投与されたセボフルランの総量および濃度を正確に比較する方法はない。しかし自動麻酔チャート記録システム (ORSYS, フィリップス社製) によって計算された、術中セボフルランの使用量は、両群間で有意差は認めなかった。今回のELF中のIL-8濃度変化にセボフルランの使用総量だけ見る限り両群に同様に影響しており有意差はないと考えられた。

⑦また今回の研究で、S+A群で、術後ELF中のIL-8濃度に減少傾向が見られたのはセボフルランがIL-8の生合成を抑制した可能性も考えられた。すべての症例においてELF中のIL-6は測定限界以下であった。IL-6は、サルコイドーシスや気管支喘息¹²⁾などの炎症性肺疾患においてBALF中に増加を認めて

おり、IL-6は肺局所における炎症性疾患のマーカーの一つと考えられている。しかし今回IL-6が測定限界以下であったのは、手術侵襲や陽圧呼吸の影響が少なかったほかに、セボフルランがIL-6の生合成を抑制しその濃度上昇を抑制した可能性も考えられた。

⑧セボフルラン麻酔に亜酸化窒素を併用することで術後のELF中IL-8濃度が上昇する機序については今回の研究では特定できなかったが、肺局所に炎症を惹起する要因が亜酸化窒素の有無以外2群で同等であったと仮定できるならば、亜酸化窒素が直接原因物質となりIL-8濃度が上昇したと推測される。エアロゾル化したLPS (lipopolysaccharide) やオゾンの吸入後に、ELF中の炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加することから、吸入された薬物により肺に炎症反応が惹起され、ELF中のIL-8濃度が上昇する。つまり何らかの刺激により気道上皮細胞から遊離されたIL-8は気道炎症を惹起し、さらにこのIL-8により気道局所に浸潤してきた好中球も刺激を受けるとIL-8を遊離して、より多くの好中球を肺局所に集簇させ、炎症の進展・持続に大きく寄与していると考えられる。

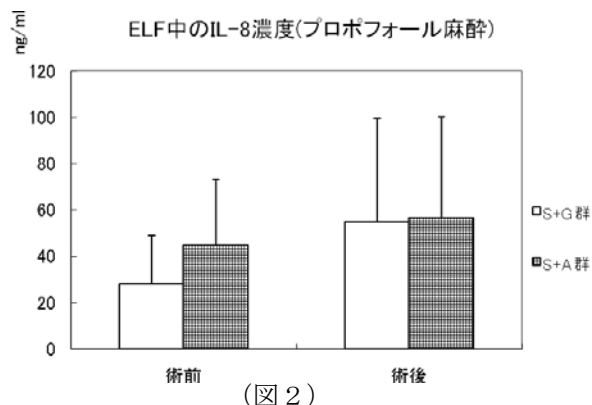
(2) プロポフォール麻酔

①患者背景と術中因子

P+G群とP+A群では、年齢・体重に有意差を認めなかったが、身長はP+G群で有意に高かった。そのためBMIを両群で比較したが有意差はなかった。また手術時間・麻酔時間、術中輸液量、術中出血量、術中尿量に関しても両群で有意差を認めなかった。投与されたプロポフォールの総量を比較したが優位さはなかった。

②IL-8濃度変化

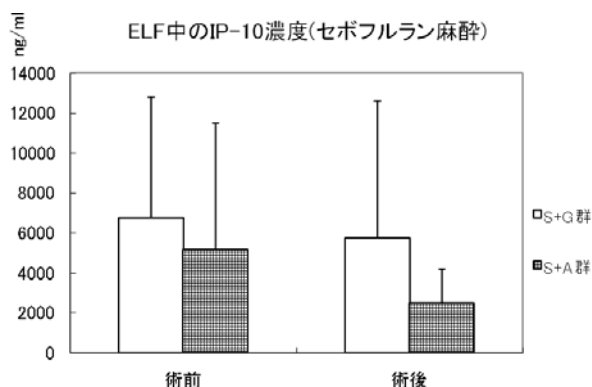
P+G群とP+A群の術前後のELF中IL-8濃度変化を図2に示す。P+G群はP+A群に比較し手術前後でややELF中のIL-8濃度が増大する傾向を認めたが、有意差は認めなかった。



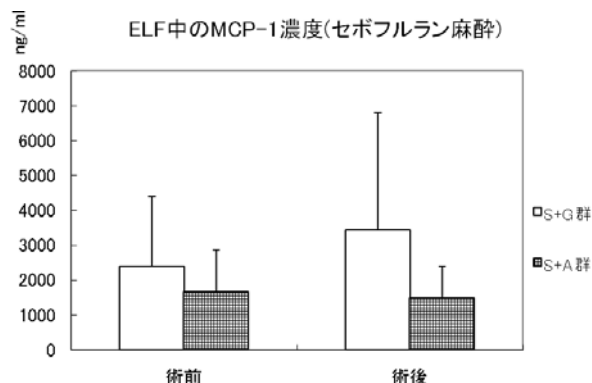
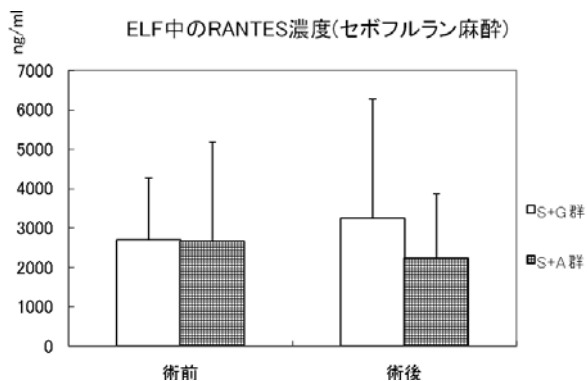
③検体採取部位、手術侵襲、陽圧換気、投与された経静脈麻酔薬の総量、術式など肺局所に炎症を惹起させる可能性のある条件を一致させた。結果は、2群とも ELF 中の IL-8 濃度はやや上昇が認められるものの術前後で有意な濃度変化は認められなかった。

つまり亜酸化窒素の投与だけでは術後に有意な IL-8 の濃度上昇は認めなかった。

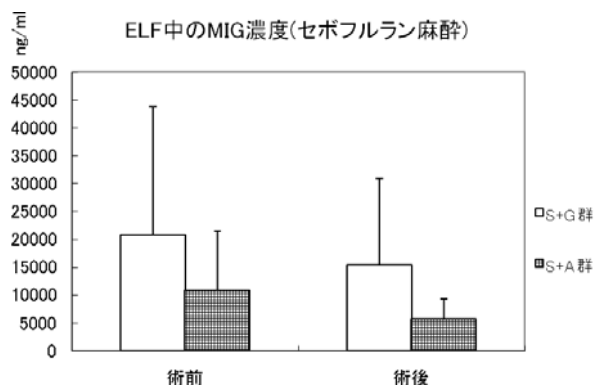
(3) IP-10、RANTES、MCP-1、MIG 測定結果手術前後で有意差のみられたセボフルラン麻酔の2群、40 検体について測定を施行したが、術前後に有意な変化はみられなかった。(図3)(図4)(図5)(図6)



↑ (図3) ↓ (図4)



(図5)



(図6)

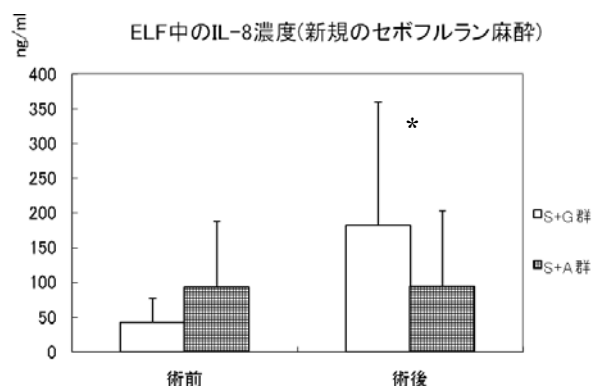
(4)新規に術式・麻酔条件を統一して行ったセボフルラン麻酔

①患者背景と術中因子

S+G 群と S+A 群では、身長、体重、年齢に有意差を認めなかった。手術時間や、麻酔時間、術中輸液量、術中出血量、術中尿量に関しても両群で有意差を認めなかった。また自動麻酔記録システム (ORSYS, Philips 社製) によって計算された術中投与されたセボフルランの総量も、有意差を認めなかった。

②IL-8 濃度変化

2群の術前後の ELF 中 IL-8 濃度変化・濃度を図7に示す。IL-8 は、A 群では手術前後で有意差を認めなかったが、G 群では、ELF 中 IL-8 濃度は術前に比較し術後に有意に高かった ($P < 0.05$)。



(図7) (* : $P < 0.05$ 手術前と比較して)

③検体採取部位、手術侵襲、陽圧換気、投与された吸入麻酔薬の総量、術式など肺局所に炎症を惹起させる可能性のある条件を一致させた。結果として、S+G 群で術後 ELF 中の IL-8 濃度が有意に上昇を認めた。

つまりプロポフォール麻酔に亜酸化窒素

を併用投与しただけでは術後に有意な IL-8 の濃度上昇は認めないが、プロポフォルをセボフルランに変えた場合のみ術後 ELF 中の IL-8 濃度が有意に上昇し、肺局所に炎症反応を惹起させる可能性が改めて認められた。

(5) 考察

亜酸化窒素は in vitro でヒト好中球の走化性や酸化能に影響を与えるとの報告¹³⁾はあるが、現在までのところ in vivo において亜酸化窒素が直接サイトカインの発現に影響するという報告はない。

本邦では揮発性麻酔薬が使用され全身麻酔が施行された麻酔症例はおよそ 150 万件と推定されており、現在でも亜酸化窒素が併用されることもあったと考えられる。周術期管理が発達した今日でも、術後呼吸器合併症の発生は大きな問題である。全身麻酔施行時にセボフルラン麻酔に亜酸化窒素を併用投与することにより、気道の ELF 中 IL-8 濃度が有意に増加することが臨床的に術後呼吸器合併症とどのように関係するかは今後のさらなる検討課題であると考えられるが、少なくとも手術前より呼吸器合併症を併発している患者ではセボフルラン麻酔に亜酸化窒素の併用投与は避けた方が術後の呼吸器合併症への影響を軽減できる可能性が見いだされた。

今後さらに、詳細な ELF 中のサイトカインの分析や、なぜセボフルラン麻酔に亜酸化窒素の併用投与で炎症が惹起されるのか、そのメカニズムを解き明かしていきたいと思う。

(6) 参考文献

- 1) 石坂 彰敏. 経気管支鏡マイクロサンプリングプローブ法: 気管支学. 2005; 27 :457-60.
- 2) Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP 3rd, Toews GB, et al : Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. J Clin Invest. 1990 ;86 :1945-53.
- 3) Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. Am J Physiol. 1993 ;264 :L413-8.
- 4) McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. Am J Respir Crit Care Med. 1994 ;150 :696-703.
- 5) Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI, Yasuda T, Ebina T, Muraoka M, et al. Expression of genes for proinflammatory cytokines in alveolar macrophages during propofol and isoflurane anesthesia. Anesth Analg. 1999 ;89 :1250-6.
- 6) Takala RS, Soukka H, Salo MS, Kirvela O, Kaapa P, Aantaa R. Gene expression of pulmonary cytokines after sevoflurane or thiopentone anaesthesia in pigs.

- Acta Anaesthesiol Scand. 2006 ;50 :163-7.
- 7) Cruickshank AM, Fraser WD, Burns HJ, Van Damme J, Shenkin A. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. Clin Sci(Lond) 1990 ;79 :161-165
 - 8) Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. JAMA. 1999 ;282 :54-61.
 - 9) Kotani N, Takahashi S, Sessler DI, Hashiba E, Kubota T, Hashimoto H, et al. Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. Anesthesiology. 1999;91 :187-97.
 - 10) Giraud O, Mollieux S, Rolland C, Lecon-Malas V, Desmots JM, Aubier M, et al. Halogenated anesthetics reduce interleukin-1beta-induced cytokine secretion by rat alveolar type II cells in primary culture. Anesthesiology. 2003 ;98 :74-81.
 - 11) Giraud O, Seince PF, Rolland C, Lecon-Malas V, Desmots JM, Aubier M, et al. Halothane reduces the early lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mechanically ventilated rats. Am J Respir Crit Care Med. 2000 ;162 :2278-86.
 - 12) Ishizaka A, Watanabe M, Yamashita T, Ogawa Y, Koh H, Hasegawa N, et al. New bronchoscopic microsample probe to measure the biochemical constituents in epithelial lining fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med. 2001 ;29 :896-8
 - 13) Nunn JF, O'Morain C. Nitrous Oxide decreases motility of human neutrophils in vitro. Anesthesiology. 1982; 56 :45-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

熊倉誠一郎, 菊地利浩, 山口敬介, 釘宮豊城, 稲田英一, 亜酸化窒素による肺局所炎症反応悪化の可能性について、麻酔 57、(10)、1200-1206、2008、査読有

〔学会発表〕(計1件)

熊倉 誠一郎, 亜酸化窒素による肺局所炎症反応悪化の可能性について—セボフルラン麻酔と TIVA を比較して—、第 56 回日本麻酔科学会学術集会総会、2009-08-17 (予定) 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊倉 誠一郎 (KUMAKURA SEIICHIRO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 : 00306953