

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21249081

研究課題名（和文） 手術侵襲と痛みに対する生体ストレス反応の評価とオピオイドの意義に関する研究

研究課題名（英文） Evaluation of the Stress Responses Evoked by Surgical Stimuli or Pain and the Roles of Opioids in Their Control

研究代表者

福田 和彦 (KAZUHIKO FUKUDA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90199224

研究成果の概要（和文）：

本研究では、麻酔科学および集中治療医学の重要なテーマである生体ストレス反応の機序とその制御について検討した。その結果、亜酸化窒素の作用には κ オピオイド受容体が重要な役割を果たしていること、オピオイドによる免疫抑制にはDNA損傷やオピオイド受容体以外の機序が関与すること、低酸素誘導因子を介する遺伝子発現に対して各種薬剤や低体温が影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to investigate the mechanism and control of the stress responses induced by various stimuli, which is an important theme of anesthesiology and critical care medicine. The results demonstrate that the κ -opioid receptor plays an important role in the action of nitrous oxide, that the DNA damage and the mechanism other than the opioid receptor are involved in the opioid-induced immunosuppression, and that hypoxia-inducible factor-mediated gene expression is affected by various drugs and hypothermia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2012年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
総計	36,400,000	10,920,000	47,320,000

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：

ストレス、麻酔薬、オピオイド、亜酸化窒素、低酸素、DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

麻酔科学の目標は、手術侵襲、各種の痛みを代表とする生体に対する侵襲に対して生じる過剰な生体ストレス反応の制御と、生体機能の保護である。この目標を達成するためには、生体ストレス反応の機序を理解し、それに対して全身麻酔薬を初めとする治療手段がどのように作用するかを明らかにする必要があるが、現在でも未解明の点が多い。我々は、揮発性麻酔薬が侵害刺激に対する交感神経反応を用量依存的に抑制せず、むしろ亢進させることを臨床研究で示してきた。これは、麻酔薬は必ずしも強い手術侵襲によって惹起される生体ストレス反応を抑制しているのではないことを示す重要な知見である。

手術における全身麻酔の役割は、古典的には①意識消失、②筋弛緩、③鎮痛、④異常反射抑制とされ、①と②については評価法がほぼ確立している。生体のストレス反応を制御することは主に③と④に相当するが、鎮痛と異常反射抑制の程度を手術中に適切に直接評価する方法、すなわち手術侵襲により惹起される様々なストレス反応を科学的根拠に基づいて総合的に評価する方法は確立されていない。評価法が確立していないので、真に理想的な麻酔法は何か、何を目標にストレス反応を制御すべきかが明確ではなく、さらに、ストレス反応制御の意義、すなわち手術侵襲に対するストレス反応を制御することが患者予後に影響するかどうかは必ずしも明らかではない。一方、手術侵襲によって惹起される炎症反応が生体ストレス反応の一つとして注目され、長期予後への影響が報告されているが、手術侵襲による炎症反応およびそれに対する各種麻酔法の影響に関する体系的な報告は少ない。また、最近では超短時間作用性オピオイド、レミフェンタニルの導入でオピオイド大量投与が可能となり、循環動態が安定しているので手術侵襲に対する過剰な生体反応は抑制されていると信じられているが、オピオイド大量投与が炎症反応を含む生体ストレス反応にどのように影響するのかは明らかではない。このように、手術侵襲により惹起される生体のストレス反応としての自律神経反応、内分泌学的反応、炎症反応を総合的に評価し、麻酔関連薬物の作用を明らかにするとともに、実際の麻酔管理に役立つ試みは報告がない。

2. 研究の目的

本研究の目標は、様々な侵襲に対する生体ストレス反応の制御に関して、①遺伝子発現変化と炎症反応に注目してストレス反応の機序を追究すること、②ストレス反応に対する麻酔関連薬物特にオピオイドの作用を明らかにすること、③外科手術におけるストレス反応制御の意義を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 亜酸化窒素の鎮痛機序

各種マウス（野生型マウス、ノックアウトマウス）における亜酸化窒素の鎮痛効果を酢酸ライジング試験、ホットプレート試験で評価し、脊髄下降抑制系活性化について c-Fos 陽性細胞の出現により比較検討した。

(2) オピオイドによる免疫抑制機構

ヒト末梢血由来 T 細胞を一定時間モルヒネ存在下で培養後に RNA を抽出して cDNA ライブラリーを作成した。モルヒネにより発現量が増加する cDNA を単離し塩基配列を決定して、モルヒネにより発現が誘導される遺伝子を同定した。

ヒト末梢血由来 T 細胞およびヒト T 細胞由来細胞株でモルヒネ投与後に細胞抽出液を調製して、ウェスタンブロット法により extracellular signal-regulated kinase 経路、nuclear factor κ B 経路などの細胞内情報伝達系の変化を検討した。

(3) 全身麻酔と低酸素誘導因子 (HIF) を介する遺伝子発現

神経芽細胞腫 SH-SY5Y、肝細胞癌 Hep3B、肺腺癌 A549 などの細胞株を用いて、HIF を介する遺伝子発現に対して静脈麻酔薬、オピオイド、硫化水素、低体温が及ぼす影響について、ウェスタンブロット法、レポーターアッセイ、RT-PCR などの分子生物学的手法により解析した。さらに、培養細胞で観察される現象がマウスでも観察されるかどうかを検討した。

マウス脳におけるエリスロポイエチン産生に対する各種麻酔薬の影響をウェスタンブロット法、ELISA、免疫組織化学などにより解析した。

(4) 人工心肺による免疫抑制の機序

人工心肺を使用する心臓手術を受けた患者から採血し、単核球を分離して、生化学的方法によって DNA 損傷とその機序について解析した。

4. 研究成果

(1) 亜酸化窒素の鎮痛機序

亜酸化窒素は鎮痛作用あるいは抗侵害作用を有することが知られているが、その機序には不明の点が多い。我々は、ノックアウトマウスあるいは阻害薬を用いた研究により、亜酸化窒素の鎮痛作用には、オピオイドの主な作用点である μ オピオイド受容体は関与しないが、オピオイド受容体ファミリーに属する κ オピオイド受容体およびノシセプチン受容体が関与する可能性を示した。

各オピオイド受容体選択的拮抗薬を用いた研究では、 κ オピオイド受容体およびノシセプチン受容体に対する拮抗薬は亜酸化窒素の鎮痛作用を抑制するが、 δ 受容体拮抗薬は影響を及ぼさなかった。

次に、 κ オピオイド受容体欠損マウスにおいて亜酸化窒素の作用を検討し、亜酸化窒素の鎮痛作用は κ オピオイド受容体欠損により消失するが、鎮静作用は変化しないことが示され、鎮痛作用は κ オピオイド受容体を介するが、鎮静作用はオピオイド受容体以外の機序を介することが明らかになった。今後は、亜酸化窒素により脳内で κ オピオイド受容体発現神経細胞あるいはダイノルフィン分泌神経細胞が活性化することを示す必要がある。

(2) オピオイドによる免疫抑制機構

オピオイドの代表であるモルヒネは、優れた鎮痛作用を有するが、大量投与により免疫抑制作用を示すことが知られている。我々は、この免疫抑制作用の分子機構を明らかにするために、モルヒネ投与によってT細胞に発現が誘導される遺伝子を網羅的に解析し、モルヒネがDNA損傷を惹起し、p53活性化を介して免疫抑制作用を示すことを示唆する結果を得た。

ヒト末梢血由来T細胞およびヒトT細胞由来細胞株でモルヒネ投与後にT細胞受容体を活性化すると、モルヒネ投与を行わない場合に比べて、extracellular signal-regulated kinaseの磷酸化は増強されるが、nuclear factor κ B経路の活性は減弱され、IL-2産生が低下することが明らかになった。これらの作用はナロキソンで抑制されないことから、オピオイドによる免疫抑制にはオピオイド受容体を介さない作用が関与することが示唆された。

(3) 全身麻酔と低酸素誘導因子 (HIF) を介する遺伝子発現

HIF-1は低酸素による遺伝子発現誘導に中心的な役割を果たす転写因子であり、様々な生理機能の調節に関与することが知られている。我々は、静脈麻酔薬バルビツレイトは神経由来培養細胞等においてHIF-1活性化を抑制すること、静脈麻酔薬プロポフォールはマクロファージにおいてリポポリサッカライドによるHIF-1活性化とブドウ糖代謝の変化を抑制することを明らかにした。神経細胞腫培養株におけるHIF-1活性とHIF-1依存性遺伝子発現に対してオピオイド鎮痛薬が及ぼす影響について検討し、オピオイド鎮痛薬投与後8-24時間で、 μ オピオイド受容体の活性化を介してHIF-1活性が上昇し、GLUT1、LDHA、VEGF遺伝子発現の増加することが明らかになった。さらに、持続する中等度の低体温状態はHIF-1活性化と低酸素による遺伝子発現誘導を抑制することを示した。これらの結果は、周術期に使用される薬剤や周術期に生体に加わるストレスが、低酸素による遺伝子発現の変化に影響を及ぼすことを示唆している。

硫化水素 (H_2S) は、臓器虚血耐性の獲得を促し臓器保護効果を有する。我々は、 H_2S が低酸素下HIF-1活性化に及ぼす影響について検討した。Hep3B細胞、SH-SY5Y細胞において、 H_2S は用量依存性に低酸素誘導性のHIF-1 α 細胞内蛋白質発現量を抑制し、HIF-1の標的遺伝子であるglucose transporter-1、vascular endothelial growth factorの発現誘導を抑制した。低酸素下における H_2S によるHIF-1活性抑制はHIF-1 α 分解促進によると考えられる。

エリスロポイエチン (EPO) は、脳において虚血や低酸素に反応して発現し、神経保護に重要な機能を有する可能性がある。本研究では、麻酔薬が低酸素に曝露したマウス脳におけるEPO発現に与える影響について検討し、検討したすべての麻酔薬 (イソフルラン、セボフルラン、ハロタン、バルビツレイト、プロポフォール、ケタミン) がEPO発現を抑制することを明らかにした。さらに、培養細胞を用いた検討から、アストロサイトにおいてEPO発現が麻酔薬によって抑制されることが明らかになった。近年、麻酔薬が神経発達に影響することが注目されているが、EPOが神経発達において重要な役割を果たすことが知られているので、本研究で示された麻酔薬によるEPO発現抑制が麻酔薬の神経発達への影響に関与している可能性がある。

(4) 人工心肺による免疫抑制の機序

CPB後の臓器機能不全や免疫抑制の機序として、ヒト単核球 (PBMC) のアポトーシスがある。我々は、CPB後のアポトーシスの機序としてヒトPBMCのDNA損傷を検討した。CPB後のPBMCにはDNA損傷が検出され、DNA損傷修復過程でみられるDDB2及びP53蛋白量の増加、P53のリン酸化が確認された。CPB導入前から好中球エラスターゼ阻害薬シベレスタットが投与された症例では、非投与例に比べてPBMCのCPB後DNA損傷は有意に軽度だった。

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 15 件)

- (1) 溝田敏幸、辻川洋、正田丈裕、福田和彦、Dual modulation of the T-cell receptor-activated signal transduction pathway by morphine in human T lymphocytes. *J Anesth* 27, 80-87, 2013 (査読有)
doi: 10.1007/s00540-012-1472-9
- (2) 深川博志、小山智弘、角山正博、福田和彦、Microglial activation involved in morphine tolerance is not mediated by toll-like receptor 4. *J Anesth* 27, 93-97, 2013 (査読有)
doi: 10.1007/s00540-012-1469-4
- (3) Elgendy HM, El Moghazy WM, Uemoto S, Fukuda K. Pre transplant serum magnesium level predicts outcome after pediatric living donor liver transplantation. *Ann Transplant* 17, 29-37, 2012 (査読有)
<http://www.annalsoftransplantation.com/fulltxt.php?ICID=883220>
- (3) 田中具治、甲斐慎一、小山智弘、大条紘樹、足立健彦、福田和彦、広田喜一、General anesthetics inhibit erythropoietin induction under hypoxic conditions in the mouse brain. *PLoS One* 6, e29378, 2011 (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0029378.
- (4) 甲斐慎一、田中具治、大条紘樹、原田浩、岸本俊、鈴木堅悟、高淵聡史、竹永敬三、福田和彦、広田喜一、Hydrogen sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau- and mitochondria-dependent manner. *Antioxid Redox Signal* 16, 203-216, 2011 (査読有)

doi: 10.1089/ars.2011.3882.

- (5) Nafady-Hego H, Elgendy H, Moghazy WE, 福田和彦、上本伸二、Pattern of bacterial and fungal infections in the first 3 months after pediatric living donor liver transplantation: an 11-year single-center experience. *Liver Transpl* 17, 976-984, 2011 (査読有)

doi: 10.1002/lt.22278.

- (6) 大条紘樹、甲斐慎一、田中具治、若松拓彦、岸本俊、鈴木堅悟、原田浩、高淵聡史、足立健彦、福田和彦、広田喜一、Fentanyl activates hypoxia-inducible factor 1 in neuronal SH-SY5Y cells and mice under non-hypoxic conditions in a μ -opioid receptor-dependent manner. *Eur J Pharmacol* 667, 144-152, 2011 (査読有)
doi: 10.1016/j.ejphar.2011.06.014.

- (7) Elgendy H, 興津輝、木村泰子、劉喜宝、Nafady-Hego H、倉田二郎、寺前洋生、Elbahrawy A、上本伸二、福田和彦、Augmented damage of islets by impaired exocrine acinar cells undergoing apoptosis that is possibly converted to necrosis during isolation. *Islets* 3, 102-110, 2011 (査読有)

doi: 10.4161/isl.3.3.15611

- (8) 佐藤雅美、白神豪太郎、田附 (西村) 三佐子、松浦壮吾、谷本圭司、福田和彦、Effect of single-dose dexmedetomidine on emergence agitation and recovery profiles after sevoflurane anesthesia in pediatric ambulatory surgery. *J Anesth* 24, 675-682, 2010 (査読有)

doi: 10.1007/s00540-010-0976-4.

- (9) 小山智弘、福田和彦、Involvement of the kappa-opioid receptor in nitrous oxide-induced analgesia in mice. *J Anesth* 24, 297-299, 2010 (査読有)

doi: 10.1007/s00540-010-0886-5.

- (10) 田中具治、若松拓彦、大条紘樹、小田聖子、甲斐慎一、足立健彦、木坂 (近藤) 科江、福田和彦、広田喜一、Persisting mild hypothermia suppresses hypoxia-inducible factor-1 α protein synthesis and hypoxia-inducible factor-1-mediated gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, R661-R671, 2010 (査読有)

doi: 10.1152/ajpregu.00732.2009.

(11) 田中具治、高淵聡史、西憲一郎、小田聖子、若松拓彦、大条紘樹、福田和彦、広田喜一、The intravenous anesthetic propofol inhibits lipopolysaccharide-induced hypoxia-inducible factor 1 activation and suppresses the glucose metabolism in macrophages. *J Anesth* 24, 54-60, 2010 (査読有)

doi: 10.1007/s00540-009-0829-1.

(12) 小山智弘、馬屋原拓、若松拓彦、曾良一郎、福田和彦、Deletion of mu-opioid receptor in mice does not affect the minimum alveolar concentration of volatile anaesthetics and nitrous oxide-induced analgesia. *Br J Anaesth* 103, 744-749, 2009 (査読有)

doi: 10.1093/bja/aep246.

(13) 若松拓彦、田中具治、小田聖子、西憲一郎、原田浩、大条紘樹、高淵聡史、甲斐慎一、福田和彦、広田喜一、The intravenous anesthetics barbiturates inhibit hypoxia-inducible factor 1 activation. *Eur J Pharmacol* 617, 17-22, 2009 (査読有)

doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.060.

(14) 小山智弘、福田和彦、Nociceptin receptor antagonist JTC-801 inhibits nitrous oxide-induced analgesia in mice. *J Anesth* 23, 301-303, 2009 (査読有) doi: 10.1007/s00540-009-0739-2.

(15) 辻川洋、正田丈裕、溝田敏幸、福田和彦、Morphine induces DNA damage and P53 activation in CD3+ T cells. *Biochim Biophys Acta* 1790, 793-799, 2009 (査読有) doi: 10.1016/j.bbagen.2009.04.011.

[学会発表] (計 19 件)

(1) 田中具治、広田喜一、甲斐慎一、松山智紀、福田和彦「麻酔薬は敗血症時の視床下部における炎症性サイトカイン誘導を抑制する」日本麻酔科学会第 60 回学術集会 2013.5.24 札幌市

(2) 松山智紀、佐々木美佳、天谷文昌、広田喜一、福田和彦「神経因性疼痛モデルラット脊髄における低酸素誘導性因子とその下流遺伝子の発現について」日本麻酔科学会第 60 回学術集会 2013.5.24 札幌市

(3) 鈴木堅悟、広田喜一、大条紘樹、甲斐慎一、松山智紀、福田和彦「膵 β 細胞 MIN6 の静脈麻酔薬のインスリン分泌に対する影響

の検討」日本麻酔科学会第 60 回学術集会 2013.5.24 札幌市

(4) 川本修司、平方秀男、杉田尚子、福田和彦「デクスメデトミジンは血小板 P-セレクチン(CD62P)発現量に対して 増加・減少両方の効果を併せ持つ」日本麻酔科学会第 60 回学術集会 2013.5.24 札幌市

(5) 正田丈裕、辻川洋、角山正博、瀬川一、福田和彦、岡村富夫「肝移植術における肝再灌流直後に得られる血漿の血管平滑筋弛緩効果」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.7 神戸市

(6) 川本修司、平方秀男、野口輝夫、杉田尚子、福田和彦「デクスメデトミジンは血小板凝集に対し増強・抑制両方の効果をあわせ持つ」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.7 神戸市

(7) 甲斐慎一、田中具治、松山智紀、大条紘樹、廣田喜一、福田和彦「イソフルランは、急性貧血により誘導される血中エリスロポエチンの上昇を抑制する」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.7 神戸市

(8) 鈴木堅悟、廣田喜一、大条紘樹、甲斐慎一、松山智紀、福田和彦「膵 β 細胞 MIN6 のグルコース刺激性インスリン分泌に対する揮発性麻酔薬の影響の検討」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.7 神戸市

(9) 松山智紀、廣田喜一、鈴木堅悟、甲斐慎一、大条紘樹、福田和彦「マイクログリアの活性化と酸素環境が低酸素誘導性遺伝子発現と神経因性疼痛関連遺伝子発現に与える影響」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.7 神戸市

(10) 田中具治、廣田喜一、甲斐慎一、松山智紀、福田和彦「グリア細胞における LPS 刺激による IL-1 β 遺伝子の発現は、全身麻酔薬により抑制される」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.8 神戸市

(11) 深川博志、小山智弘、福田和彦「亜酸化窒素の鎮痛作用機序における κ オピオイド受容体の役割」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.8 神戸市

(12) 辻川洋、福田和彦「モルヒネのヒト末梢血単核球細胞にもたらす DNA 損傷は、エンドトキシン反応性分泌型 IL-1 産生抑制の要因となる」日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012.6.8 神戸市

(13) 甲斐慎一、田中具治、鈴木堅悟、大条 紘樹、廣田喜一、福田和彦「イソフルランは低

酸素によるエリスロポエチンの上昇を抑制する」日本麻酔科学会第 58 回学術集会
2011. 5. 20 神戸市

(14) 深川博志、小山智弘、福田和彦「モルヒネ耐性成立におけるミクログリア活性化には toll-like receptor 4 は関与しない」日本麻酔科学会第 58 回学術集会 2011. 5. 19 神戸市

(15) 辻川洋、石井久成、福田和彦「ヒト単核球における人工心肺後 DNA 損傷に対するシベレスタットの効果」日本麻酔科学会第 58 回学術集会 2011. 5. 19 神戸市

(16) 鈴木堅悟、廣田喜一、大条紘樹、甲斐慎一、岸本俊、福田和彦「プロスタグランディン E1 は HIF-1 活性化、VEGF 発現を介して血管透過性を亢進させる」日本麻酔科学会第 58 回学術集会 2011. 5. 20 神戸市

(17) 甲斐慎一、大条紘樹、田中具治、廣田喜一、福田和彦「硫化水素が低酸素誘導性遺伝子応答に及ぼす影響」日本麻酔科学会第 57 回学術集会 2010. 6. 4 福岡市

(18) 田中具治、廣田喜一、大条紘樹、甲斐慎一、小山智弘、福田和彦「全身麻酔下では、低酸素による脳内エリスロポエチン発現誘導が抑制される」日本麻酔科学会第 57 回学術集会 2010. 6. 4 福岡市

(19) 石井久成、福田和彦「人工心肺を使用する心臓外科手術における好中球エラスターゼ阻害薬（シベレスタット）の有効性の検討」日本麻酔科学会第 57 回学術集会 2010. 6. 4 福岡市

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

福田 和彦 (KAZUHIKO FUKUDA)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90199224

(2) 研究分担者

辻川 洋 (TSUJIKAWA HIROSHI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20362501

瀬川 一 (SEGAWA HAJIME)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60263076

正田 丈裕 (TAKEHIRO SHODA)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20362501

(3) 連携研究者

()

研究者番号：