

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592309

研究課題名(和文)手術患者の酸化ストレス病態の解明と抗酸化治療による手術侵襲治療戦略の確立

研究課題名(英文)Elucidation of surgical stress from the standpoint of oxidative stress and development of treatment strategy for it

研究代表者

土屋 正彦(Tschiya, Masahiko)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80253350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：手術侵襲には酸化ストレスが大きな役割を果たしているが、その評価方法は十分に確立されていない。我々は、酸化ストレスにより産生される酸化的代謝物の過酸化脂質に注目し、特殊な呈色反応を用いて過酸化脂質を定量する測定法を確立した。この方法により解析した結果、心臓手術患者では、術前の過酸化脂質値が高い症例ほど術後の重症度が高いことが判明した。抗酸化治療確立に向けた研究では、大腸癌手術患者で、抗酸化作用を有する局所麻酔薬を用いて神経ブロックを行うと、全身麻酔のみの場合と比較して術中の循環動態が安定することを明らかにした。さらにアポトーシスや白血球の免疫反応への酸化ストレスの関与についても研究を進めた。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is involved with surgical stress. However, evaluation method for oxidative stress in perioperative period is not well established. We established new simple and reliable method which measured lipid peroxides by colour reaction. By investigating cardiac surgery patients with this method, the patients who had high level of preoperative plasma lipid peroxides presented very severe postoperative course. On the other hand, in abdominal surgery patients, combination of regional nerve block using antioxidant local anesthetics with general anesthesia promoted intraoperative hemodynamic stability, which indicates the clinical potential of intraoperative antioxidant therapy. Furthermore, effects of oxidative stress on apoptosis or immune reaction of white blood cells were intensively studied.

研究分野：麻酔科学

キーワード：酸化ストレス 手術侵襲 麻酔管理 活性酸素 過酸化脂質 アポトーシス 8-ヒドロキシ-デオキシグ
アノシン 神経ブロック

1. 研究開始当初の背景

(1)健康な生体内では活性酸素の毒性は抗酸化システムにより巧妙に制御され、酸化ストレスは低いレベルに維持されている。しかし、活性酸素の過剰産生や抗酸化機能の低下など様々な要因で両者のバランスがくずれると、臓器や組織に障害が発生する。我々は、虚血性心疾患、動脈硬化、脳血管障害、悪性腫瘍、糖尿病、敗血症や他の炎症性疾患などあらゆる疾患の成立や増悪の過程で、活性酸素がその中心的役割を果たしていることを明らかにしてきた^[1]。

(2)手術侵襲と活性酸素に関しても研究を進め、同じ臓器の手術であっても、低侵襲な腹腔鏡手術は酸化ストレスが少なく^[2]、また、周術期治療に使用されるいくつかの薬剤は酸化ストレスを強力に軽減することを明らかにしてきた^[3]。特に局所麻酔薬や一部の全身麻酔薬には強力な抗酸化作用が認められる。

2. 研究の目的

(1)以上の研究成果に基づき、手術侵襲を決定し術後経過を左右する因子として、酸化ストレスが重要なキーワードであると考えられた。しかし、周術期患者の酸化ストレスの評価方法は確立されていない。そこで、本研究では、酸化ストレス病態の評価法の確立と病態メカニズムの解析を行うことを目的とする。

(2)手術侵襲に酸化ストレスを介したアポトーシスが関与している可能性があり、麻酔薬とアポトーシスの関係を明らかにする。

(3)局所麻酔薬は強力な抗酸化作用を持つため、その効果的使用により、酸化ストレスによる手術侵襲を軽減し周術期治療の安全性を向上させると期待される。そこで、本研究では局所麻酔薬を用いた神経ブロックによる麻酔管理法を確立し、その有用性を検討する。

(4)ヒトの酸化ストレス病態は、それぞれが密接に相関している。そのため、手術侵襲における酸化ストレスの重要性を解明するためにも、他の酸化ストレス病態についても十分に解析し、相互比較することが必要である。特に手術侵襲と関連の深いと思われるいくつかの活性酸素病態において、その病原メカニズムについて研究を進める。

3. 研究の方法

(1)手術侵襲と酸化ストレスの関係を明らかにするために、臨床条件での酸化ストレスの測定法を確立する。

(2)確立した方法により、手術患者の酸化ストレス病態を解析し、術後経過との関係を検討する。

(3)同様に集中治療中の重傷患者の酸化ストレス病態を解析・研究する

(4)先行して進めていた麻酔薬とアポトーシス研究の仕上げを行う。

(5)局所麻酔薬による神経ブロック法を活用した安全な全身麻酔法を確立する。

(6)白血球系細胞の免疫応答と酸化ストレスの関連を解析する。

4. 研究成果

(1)酸化ストレスを誘発する活性酸素は非常に短時間で体内から除去される。そのため、臨床患者でその消長を測定することは簡単ではない。これが、臨床条件で酸化ストレス研究がなかなか成果を上げられない原因の一つである。そこで、我々は、酸化ストレスにより生成される中間代謝産物に注目した。その変化を解析することにより、その患者の酸化ストレス病態を明らかに出来ると考えた。そこで、比較的献体を得やすい血液を対象として、過酸化脂質ラジカルと反応して呈色するN,Nジエチルパラフェニレンジアミン (DEPPD) の反応を利用して、過酸化脂質由来のヒドロペルオキシドの量を定量化する方法を研究した。手術患者を対象とした測定結果は非常に安定しており、この方法を用いることにより、患者血液内の過酸化脂質量を高い精度で定性解析できることが明らかとなった。

(2)同様に、血漿のイオン還元力は、血液中の抗酸化力の総量の指標となる。そこで、鉄イオンによる呈色反応を利用した血漿イオン還元力を測定する方法を研究し、その有用性を実際の手術患者検体で検討した。その結果、常に安定した値が測定でき、しかも、手術侵襲に応じて変動することが確認できた。

(3)活性酸素の一種である一酸化窒素(NO)についても、研究室レベルではなく臨床検体で安定して測定できる測定法を研究した。NOは不安定であるため、臨床検体で直接測定することは不可能であった。そこで、その安定代謝産物である硝酸塩

および亜硝酸塩を測定し、間接的にNOの体内動態を解析することを目指した。しかし、硝酸塩および亜硝酸塩は、日内変動や経口摂取内容によっても大きく変動するため、その影響の排除が課題であった。多くの検体を用いた比較研究を進めた結果、測定条件の工夫により、一定の測定精度を得ることが出来た。

(4)新たに確立した上記の酸化ストレスの測定方法を用いて、心臓外科手術を受ける患者95名を対象に、手術前の血液中過酸化脂質量を測定し、術後の経過との相関を解析した。その結果、術前の過酸化脂質量が高い症例と正常な症例を比べると、術後の人工呼吸期間、カテコールアミンの使用量、集中治療室入室日数、全入院日数、いずれもが有意に高いことが明らかとなった。さらに、気管切開の有無、再手術の有無も高過酸化脂質量症例の方が高い頻度であった。この過酸化脂質量の術前値の、術後重症度への予測精度に関して、ROC曲線(受信者動作特性曲線)を描き解析すると、すでに広く用いられている指標であるEuroSCOREと比べても、十分高い精度で術後経過を予測できることが分かった(図1)。

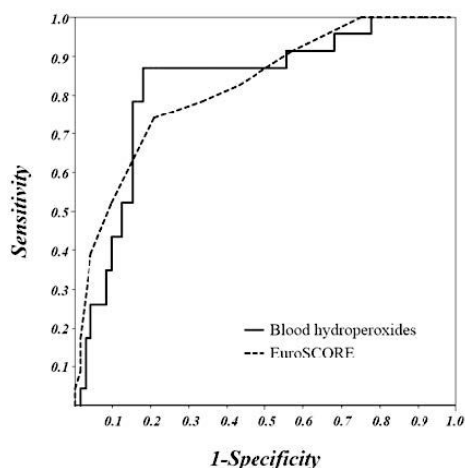


図1 ROC曲線による血液中過酸化脂質量とEuroSCOREの心臓手術術後患者の重症度予測の信頼度および精度の比較
血液中過酸化脂質量の術前値は、心臓手術後の重症度病態の予測においてEuroSCOREと、ほぼ同程度の信頼性があることが分かる。

(5)最も侵襲の強い消化管手術の一つである食道癌手術患者を対象にした研究では、心臓外科手術の場合と同様に、術前の過酸化脂質量が術後経過の予測因子になることを示唆する結果が得られている。さらに、手術中の麻酔薬による抗酸化療法により、術後経過が好転する可能性も認められている。今後さらに研究を続け、その全体像を明らかにしたい。

(6)肝移植手術を受け術後長期間集中治療を続けた患者群での解析では、過酸化脂質量はかえって減少し、血漿の還元力は逆に増加する傾向が認められた。さらにチオール基濃度などの抗酸化力の指標も大きく変動したが、患者間で一定の傾向が認められなかった。長期間の集中治療室での治療では、患者の酸化ストレス病態は、手術患者とはまた違った状態になるのではないかと推測された。しかし、まだその病態を十分に解明するところまでは研究が進んでいない。さらに症例を集め解析を進めたい。

(7)ヒト培養細胞を用いて、麻酔薬であるプロポフォールはアポトーシスを惹起することを明らかにした。さらに、メカニズムが、プロポフォールによるカスパーゼの活性化作用であることを明らかにし、その活性化には、デスレセプターを介する場合と、ミトコンドリアを介する場合の二つのルートがあることを示した。特にプロポフォールのミトコンドリアへの作用は、アポトーシスだけではなく、そのエネルギー代謝を傷害する作用もあり、麻酔薬の合併症を考える上で、重要なメカニズムと考えられた。以上のアポトーシスに関する研究は、本研究期間で、いくつかの追加実験を行い、さらに詳細に解析を進めた。以前の研究成果と合わせて、その成果は総説として発表した。

(8)心血管系に重度の病変を持つ大腸癌切除手術患者を対象に、全身麻酔に局所麻酔薬を用いた神経ブロック(腹横筋膜面ブロック)を併用した場合と、全身麻酔のみで麻酔管理を行った場合を比較して、神経ブロックを併用した群の方が、手術中の循環動態が安定し、麻酔からの覚醒も早いことを明らかにした(図2)。この結果には、神経ブロックによる鎮痛効果ばかりでなく、使用した局所麻酔薬の抗酸化作用による酸化ストレス軽減作用が影響していると考えている。今後、さらに解析を進め、神経ブロックと抗酸化作用との関係を明

らかにする計画である。さらに、その結果を基にして、手術侵襲による酸化ストレス軽減に有効な神経ブロック法を確立する計画である。

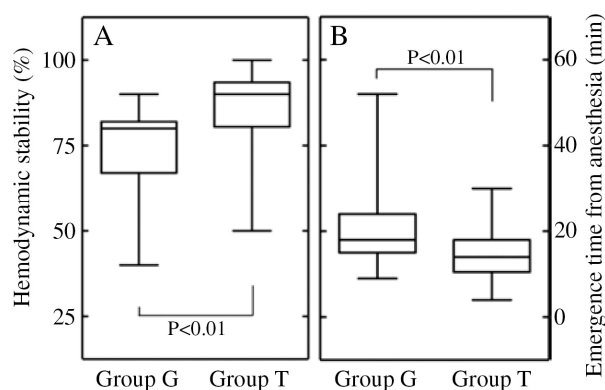


図2 GroupG: 全身麻酔のみの群
GroupT: 全身麻酔 + 腹横筋膜面ブロック群
A: 手術中の循環動態の安定度 (%)
B: 全身麻酔からの覚醒時間(分)

(9)動物実験において、白血球の免疫応答に一酸化窒素(NO)および紫外線が強い影響を与えることを明らかにした。同様の反応は、ヒトでも生ずると考えられ、手術中の白血球の応答反応も同様のメカニズムが機能している可能性が高い。今後、ヒトで同様の反応が生ずるのか研究を進める計画である。

(10)核酸の酸化代謝物である 8OH-dG の測定法について研究を行った。尿を検体したので、集中治療中の患者でも、あるいは手術中の患者でも、無尿でない限りは、安定して検体を集めることが出来ると考えている。この測定法は簡便かつ短期間で行うことが可能で、再現性も高い。今後は、この方法により、実際の手術患者等で、その酸化ストレスを正確に評価できるかについて検討する計画である。

<引用文献>

[1] 土屋正彦、浅田章、井上正康：生体にとっての活性酸素の意義。ICUとCCU 27: 649-660, 2003.

[2] Tsuchiya M, Sato EF, Inoue M and Asada A: Open abdominal surgery increases intraoperative oxidative stress: can it be prevented? *Anesthesia & Analgesia* 107: 1946-52 2008.

[3] Kang MY, Tsuchiya M, Packer L and Manabe M: In vitro study on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 42: 4-12 1998.

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14件)

(1) Yamate Y, Hiramoto K, Kasahara E, Sato EF: UVA irradiation of the eye modulates the contact hypersensitivity of the skin and intestines by affecting mast cells in mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015 May;31(3):129-40. 【査読あり】

(2) Hashimoto M, Sato EF, Hiramoto K, Kasahara E, Inoue M, Kitagawa S: Role of adrenocorticotrophic hormone in the modulation of pollinosis induced by pollen antigens. *Neuroimmunomodulation*. 2015;22(4):256-62. 【査読あり】

(3) Mizutani K, Suwa K, Tsuchiya M: Illustration of O2 and CO2 recirculation to interpret respiratory and circulatory physiology. *J Clin Anesth*. 2015 Mar 22. pii: S0952-8180(15)00070-7. doi: 10.1016/j.jclinane.2015.03.014. 【査読あり】

(4) Suehiro K, Tanaka K, Matsuura T, Funao T, Yamada T, Mori T, Tsuchiya M, Nishikawa K: Preoperative hydroperoxide concentrations are associated with a risk of postoperative complications after cardiac surgery. *Anaesthesia and Intensive Care*. 42:487-94 2014. 【査読あり】

(5) Hiramoto K, Yamate Y, Kobayashi H, Ishii M, Sato EF, Inoue M: Ultraviolet B irradiation of the mouse eye induces pigmentation of the skin more strongly than does stress loading, by increasing the levels of prohormone convertase 2 and -melanocyte-stimulating hormone. Clin Exp Dermatol. 2013 Jan;38(1):71-6. 【査読あり】

(6) Hiramoto K, Kobayashi H, Orita K, Sato EF, Ishii M: Inducible nitric oxide synthase plays important roles in allergic reactions of pollinosis in mice sensitized with pollen allergy. J Clin Biochem Nutr. 2013 Jan;52(1):17-21. 【査読あり】

(7) Tsuchiya M, Kyoh Y, Mizutani K, Yamashita J and Hamada T: Ultrasound-guided single shot caudal block anesthesia reduces postoperative urinary catheter-induced discomfort. Minerva Anestesiologica 79: 1381-8 2013. 【査読あり】

(8) Hiramoto K, Sato EF: Ultraviolet B radiation to the eye induces pigmentation in the epidermis via the activation of the subunit gp91 phox of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. Clin Exp Dermatol. 2012 Jan;37(1):65-7. 【査読あり】

(9) Hiramoto K, Yamate Y, Kobayashi H, Ishii M, Miura T, Sato EF, Inoue M: Effect of the smell of Seirogan, a wood creosote, on dermal and intestinal mucosal immunity and allergic inflammation. J Clin Biochem Nutr. 2012 Sep;51(2):91-5. 【査読あり】

(10) Hong JY, Kim GH, Kim JW, Kwon SS, Sato EF, Cho KH, Shim EB. Computational modeling of apoptotic signaling pathways induced by cisplatin. BMC Syst Biol. 2012 Sep 11;6:122. 【査読あり】

(11) Hiramoto K, Kobayashi H, Yamate Y, Ishii M, Sato EF: Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced

inflammation. Exp Dermatol. 2012 Dec;21(12):911-4. 【査読あり】

(12) Tsuchiya M, Takahashi R, Furukawa A, Suehiro K, Mizutani K and Nishikawa K: Transversus abdominis plane block in combination with general anesthesia provides better intraoperative hemodynamic control and quicker recovery than general anesthesia alone in high-risk abdominal surgery patients. Minerva Anestesiologica 78: 1241-1247 2012. 【査読あり】

(13) 土屋正彦: 静脈麻酔薬、特にプロポフォールの抗酸化保護作用とアポトーシス作用. Anesthesia 21 Century 14(1): 11-21, 2012 【査読なし】

(14) Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Hara K, Takahashi N, Konishi M, Sato EF, Matsumoto S, Okamura H, Inoue M: Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. FEBS Lett. 2011 Jul 21;585(14):2263-8. 【査読あり】

〔学会発表〕（計3件）

(1) 山田徳洪、堀耕太郎、舟井優介、土屋正彦、西川精宣：脈圧は胸腔鏡下食道癌手術中の心房細動発症の関連リスクとなり得るか。第41回日本集中治療医学会学術集会。2014年2月27-31日。国立京都国際会館（京都府・京都市）。

(2) 末廣浩一、田中克明、松浦正、山田徳洪、森隆、土屋正彦、西川精宣：心臓血管外科手術において術前ヒドロペルオキシド値は術後合併症予測因子である。日本心臓血管麻酔学会第18回学術大会。2013年9月27-29日。北九州国際会議場（福岡県・北九州市）。

(3) 古川敦子、土屋正彦、森隆、西川精宣：3DCTを用いた左主気管支長計測で分離肺換気中の低酸素症の発生を術前予測できるか。日本臨床麻酔学会第31回大会。2011年11月3-5日。沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

土屋正彦 (TSUCHIYA Masahiko)
大阪市立大学医学研究科・准教授
研究者番号：80253350

(2)研究分担者

佐藤英介 (SATO Eisuke)
鈴鹿医療科学大学薬学部・教授
研究者番号：60211942