

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462395

研究課題名(和文)異なる全身麻酔薬による免疫細胞アポトーシス誘導の強弱はなぜ生じるのか

研究課題名(英文) The mechanism by which the different kinds of general anesthetics differently induce the intensity of lymphocyte apoptosis.

研究代表者

黒澤 伸 (Kurosawa, Shin)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：60272043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は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初めて報告した。この研究過程で、異なる全身麻酔薬によって誘導されるリンパ球アポトーシスの強さに差があることが判明した。本研究ではこの全身麻酔薬によるアポトーシス誘導の強弱の原因に細胞内情報伝達に関与していることを示すために、リンパ球のATP産生量と分裂促進因子タンパク質キナーゼ(MAPK)誘導に着目して研究を行った。その結果、イソフルランはリンパ球のATP産生とMAPKを抑制したが、セボフルランはATP産生とMAPKを刺激したことから、MAPK誘導の差がリンパ球アポトーシス誘導の強弱差に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I have previously reported that two different volatile anesthetics, isoflurane and sevoflurane induce lymphocyte apoptosis and reduce the Mitochondrial membrane potentials in vitro. In the study, additional results have suggested that these two different volatile anesthetics induce different intensity of lymphocyte apoptosis. The aim of the study is to investigate the mechanisms by which the different kinds of general anesthetics induce the different intensity of lymphocyte apoptosis. In this study, I investigated the effects of isoflurane or sevoflurane on ATP production and activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in lymphocytes in vitro. The results indicated that isoflurane reduces ATP production and inhibits MAPK, however, sevoflurane increases ATP production and stimulates MAPK in lymphocytes. Therefore, the differences in MAPK activities induced by two different anesthetics may result in the different intensity between anesthetics-induced lymphocyte apoptosis.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔科学 吸入麻酔薬 免疫学 アポトーシス 細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

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し、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 前出)。その後、海外の研究者からも同様の研究結果が報告され (Anesthesiology2005;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。しかし、この段階でのわれわれの研究は長時間かつ高濃度の吸入麻酔薬をリンパ球に曝露したものであり、より生理的、臨床的な麻酔薬の曝露時間と濃度でも同様のアポトーシス誘導がおこるか、という問題が残った。そこで平成 22 年度から 24 年度の科学研究費 (課題番号 22591702) によりおこなった研究では全身麻酔薬の免疫細胞への曝露時間を 12 時間以内に設定し、曝露濃度も臨床使用濃度 (1MAC~3MAC) としたところ、時間依存性かつ濃度依存性に揮発性吸入麻酔薬は免疫細胞にアポトーシスを誘導することが確認された。そしてさらに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が判明し、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。しかし、この研究ではさらに興味深い事実、つまり揮発性吸入麻酔薬が一様に免疫細胞にアポトーシスを誘導するのではなく、麻酔薬によってアポトーシスの誘導パターンが異なるという事実も判明した。具体的にはイソフルラン、セボフルランのどちらもリンパ球にアポトーシスを誘導するが、イソフルランとセボフルランを比較すると、イソフルランは曝露早期にリンパ球にアポトーシスを誘導し、その誘導程度も強く、セボフルランは曝露後にイソフルランよりも遅れてアポトーシスが誘導され、その程度も弱いという結果が得られた。これら、個々の麻酔薬によるアポトーシス誘導パターンの相違は、細胞内情報伝達経路にそれぞれの麻酔薬が異なった影響をあたえていることを示唆していると考えられる。そこで本研究ではこれまでの研究結果を踏まえ、麻酔薬の種類によって、細胞内の情報伝達上、

ミトコンドリアよりもより上流にある情報伝達経路がどのように変容し、それが結果としての麻酔薬によるアポトーシス誘導にどのように影響するかを観察する。

2. 研究の目的

申請者は全身麻酔薬が免疫力を低下させる原因を解析し、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初めて報告した (Anesthesiology2001;95:1467-1472)。さらに平成 22 年度から 24 年度の科学研究費 (課題番号 22591702) により行った研究では全身麻酔薬による免疫細胞アポトーシス誘導にミトコンドリア膜電位が大きく関与していることを解明したが、この研究により麻酔薬の種類によってアポトーシス誘導の程度に差があることも明らかになった。今回の研究目的は 1) 全身麻酔薬による免疫細胞アポトーシス誘導に細胞内情報伝達が関与しているか。2) 麻酔薬の違いはそれらの細胞内情報伝達の変容に影響を与えるか。3) 麻酔薬の違いによる細胞内情報伝達変容の差異がアポトーシス誘導の強弱に影響を与えるか。の 3 点である。

3. 研究の方法

(1) 揮発性吸入麻酔薬の細胞培養液への溶存確認実験；揮発性吸入麻酔薬が培養液に溶存していることをガスクロマトグラフィーにより確認した。2.4 穴培養プレートに細胞培養液 RPMI 1640 を分配し、密閉型アクリル樹脂製箱に乾燥しないように静置し、密閉型アクリル樹脂製箱内を摂氏 37 度、5%CO₂ の定常状態を確認後、空気をキャリアガスとしてイソフルランまたはセボフルランがそれぞれ 0 MAC、1 MAC、3 MAC の定常状態となるように設定した後、アクリル樹脂製箱を密閉する。その状態で 12 時間、ガスクロマトグラフィー法により溶存した麻酔薬濃度を測定した。(2) 揮発性吸入麻酔薬曝露によって変化する胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位の測定実験；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、2.4 穴培養プレートに 1 穴あたり百万個/ml の割合で分配し、密閉型アクリル樹脂製箱に乾燥しないように静置し、密閉型アクリル樹脂製箱内を摂氏 37 度、5%CO₂ の定常状態を確認後、空気をキャリアガスとしてイソフルランまたはセボフルランが呼気ガスモニターを用いてそれぞれ 0 MAC、1 MAC、3 MAC の定常状態となるように設定した後、アクリル樹脂製箱を密閉する。その状態で 5 分間、0.5 時間、4 時間、胸腺細胞を揮発性吸入麻酔薬に曝露し、それぞれの培養時間における、ミトコンドリア内膜電位が低下した胸腺細胞を JC-1 を利用したフローサイトメトリー法により

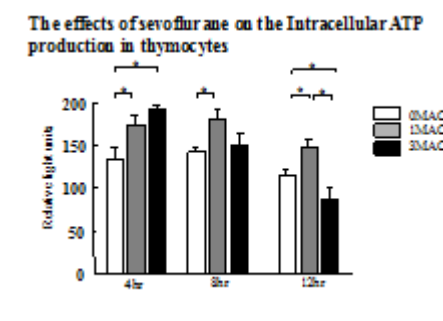
定量し、胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位の経時的变化を比較、検討した。(3) 密閉型アクリル容器内に未熟型T細胞であるマウス胸腺細胞を静置し、イソフルランまたはセボフルランを曝露後、胸腺細胞内ATPを測定する実験を行った。細胞内ATP産生量の測定方法は細胞内ATPのルシフェラーゼ蛍光作用を利用したATPアッセイキットを使用し、定量はMicroplate Luminometerを使用した。(4) セボフルランまたはイソフルラン曝露による胸腺細胞内ERK1/2活性変化測定実験：比較的若い生後4週齢のBalb/cマウスの胸腺細胞をセボフルラン0MAC, 1MAC, 3MACにそれぞれ20分間、1時間、3時間曝露し、胸腺細胞内のERK1/2活性変化をBD Phosflow Technologyを用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 揮発性吸入麻酔薬が培養液に溶存していることをガスクロマトグラフィーにより確認した。密閉型アクリル樹脂製箱内の揮発性吸入麻酔薬濃度測定は呼気ガスモニター(VAMOS Plus、ドレーゲル社)を用いておこなった。実験はイソフルランまたはセボフルランそれぞれ独立して3回おこなった。結果は揮発性吸入麻酔薬非曝露群：0mM、イソフルラン(1MAC、12時間曝露)：0.24mM、0.23mM、0.23mM、イソフルラン(3MAC、12時間曝露)：0.65mM、0.60mM、0.64mM、セボフルラン(1MAC、12時間曝露)：0.18mM、0.19mM、0.19mM、セボフルラン(3MAC、12時間曝露)：0.60mM、0.52mM、0.58mMであった。(2) 揮発性吸入麻酔薬が胸腺細胞のミトコンドリア内膜電位に影響を与えるかを観察した。結果はミトコンドリア内膜電位低下細胞の割合(%)で表すと揮発性吸入麻酔薬非曝露群：5.1±0.7(%)、イソフルラン(1MAC、5分間曝露)：5.2±2.0(%)、イソフルラン(1MAC、0.5時間曝露)：7.3±2.3(%)、イソフルラン(1MAC、4時間曝露)：27.2±2.3(%)、イソフルラン(3MAC、5分間曝露)：6.2±2.0(%)、イソフルラン(3MAC、0.5時間曝露)：8.5±2.

3(%)、イソフルラン(3MAC、4時間曝露)：37.9±3.1(%)、セボフルラン(1MAC、5分間曝露)：5.8±1.8(%)、セボフルラン(1MAC、0.5時間曝露)：6.1±2.1(%)、セボフルラン(1MAC、4時間曝露)：19.3±1.1(%)、セボフルラン(3MAC、5分間曝露)：6.0±2.4(%)、セボフルラン(3MAC、0.5時間曝露)：7.1±1.9(%)、セボフルラン(3MAC、4時間曝露)：34.8±4.2(%)であった。(3) イソフルランまたはセボフルランを曝露後、胸腺細胞内ATPを測定する実験を行った。その結果イソフルラン1MACまたは3MACに曝露された胸腺細胞内ATPは容量依存性に減少した。しかし、セボフルラン1MACまたは3MACに曝露された胸腺細胞内ATPは容量依存性に増加した。

意義または重要性：イソフルランは強いアポトーシス誘導作用によって細胞内ATP産生量を減少させるがセボフルランはアポトーシス誘導前に細胞を刺激しATP産生量を増加させている可能性がある。



(4) この2種類の揮発性吸入麻酔薬が免疫細胞のATP産生量に与える影響の違いが細胞内ATP産生にかかわる細胞内シグナル伝達と、細胞のアポトーシスにかかわる細胞内シグナル伝達の違いにある可能性を解明するためにMAPKのうち、細胞増殖または抗アポトーシスに重要な役割を担っているERK1/2について、イソフルランまたはセボフルランを曝露によるその活性変化を観察した。セボフルラン1MAC曝露群では0MAC曝露群に比較し、曝露時間20分間および1時間においてERK1/2活性に差は認められなかったが、曝露時間3時間において1MAC曝露群のERK1/2活性は

0 MAC 曝露群に比較し増大した。セボフルラン 3MAC 曝露群では0 MAC 曝露群に比較し、曝露時間 20 分間で ERK1/2 活性は増大したが、曝露時間 1 時間および 3 時間では差は認められなかった。イソフルラン 1MAC 曝露群の ERK1/2 活性は0 MAC 曝露群に比較し曝露時間 20 分間において増大したが、曝露時間 1 時間では差がなくなり、曝露時間 3 時間では低下した。イソフルラン 3MAC 曝露群でも ERK1/2 活性は0 MAC 曝露群に比較し曝露時間 20 分間において増大したが、曝露時間 1 時間では差がなくなり、曝露時間 3 時間では低下した。まとめると、セボフルランはマウス胸腺細胞の ERK1/2 活性を維持・増大させるが、イソフルランは曝露後の短時間(20 分間)で一過性に ERK1/2 活性を増大させた後、その活性を低下させることが判明した。

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 9 件)

岡田吉史、吾妻俊弘、吉田明子、山本庸子、齊藤和智、黒澤 伸、分離肺換気を用いた全身麻酔下食道がん一期根治術において麻酔方法の違いが周術期の患者予後に与えた影響の検討、麻酔、査読有、doi:なし、vol.64、2015年、368-372

五十洲 剛、大石理江子、今泉 剛、箱崎貴大、小原伸樹、池上之浩、黒澤 伸、村川雅洋、マンニトールの使用が原因で高カリウム血症をきたした場合、その治療はすぐに必要か？ 蘇生、査読有、doi:なし、vol.34、2015年、98-102

Toyama H, Saitoh K, Takei Y, Ejima Y, Kurosawa S, Yamauchi M, Two cases of bilateral lung transplantation combined with intracardiac repair and pulmonary artery replacement: perioperative managements of based on the left ventricular function. J Anesthesia, 査読有、doi: 10.1007/s00540-015-2043-7, vol.29, 2015 年、957-967

Saito K, Toyama H, Ejima Y, Kurotaki K, Yamauchi Y, Kurosawa S, Anticoagulant managements of left ventricular assist device implantation in two patients with heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Anesthesia and Clinical Research, 査読有、doi: 10.4172/2155- 6148.1000525, vol.6, 2015 年、525-529

Isosu T, Sato T, Ohishi R, Imaizumi T, Hakozaiki T, Obara S, Ikegami Y, Kurosawa S, Murakawa M, Effects of indigo carmine intravenous injection on noninvasive and continuous total hemoglobin measurement. J Clinical Monitoring Computing, 査読有、doi:

10.1007/s10877- 015- 9719- 2vol.1, 2015, 1-5

Hidaka H, Suzuki T, Toyama H, Kurosawa S, Nomura K, Katori Y, Dislocated dental bridge covering the larynx: usefulness of tracheal tube guides under video-assisted laryngoscopy for induction of general anesthesia, thus avoiding tracheostomy. Head & Face Medicine, 査読有、doi: 10.1186/1746-160X- 10- 23. Vol.10, 2014 年、23-26

Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, Yamada M, Yanai M, Yamaya M, Kurosawa S, Yamauchi M, Kubo H, Annual FEV1 changes and numbers of circulating endothelial microparticles in patients with COPD: a prospective study. BMJ Open, 査読有、doi: 10.1136, vol. 4, 2014 年、1-8

Hatano R, Mukouchi H, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Kazama I, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Kurosawa S, Kanai Y, Matsubara M, Asano S, Glucocorticoid mediates the transcription of OAT- PG, a kidney-specific prostaglandin transporter. European J Physiology, 査読有、doi: なし、vol. 466, 2014年、925-935

Suzuki K, Nishi K, Takabuchi S, Kai S, Matsuyama T, Kurosawa S, Adachi T, Maruyaka T, Fukuda K, Hirota K, Differential roles of prostaglandin E-type receptors in activation hypoxia-inducible factor 1 by prostaglandin E1 in vascular derived cells under non-hypoxic condition. Peer J、査読有、doi: 10.7717/peerj.220, vol.1, 2013 年、1-20

[学会発表](計 6 件)

Obara S, Imaizumi T, Hakozaiki T, Ikegami Y, Isosu T, Kurosawa S, Murakawa M, Dexmedetomidine in patients under spinal anesthesia: A comparison of clinical outcomes between target controlled infusion and the recommended regimen, validation of published pharmacokinetic models, and construction of a new pharmacokinetic model. American society of Anesthesiologists Annual Meeting、2015 年10月24日、San Diego(米国)

黒澤 伸、学術講演：区域麻酔と免疫および術後予後との関係、日本区域麻酔学会第2回学術集会(招待講演)、2015 年 4 月 26 日、高崎市、群馬パース大学

Oishi R, Morimoto I, Mogami M, Imaizumi T, Hosono A, Hakozaiki T, Obara S, Isosu T, Kurosawa S, Murakawa M, Fluid Balance During Pancreaticoduodenectomy and

Postoperative Renal Dysfunction.
American society of Anesthesiologists
Annual Meeting、2014年10月13日、New
Orleans (米国)

安達厚子、黒澤 伸、亀山恵理、山本庸子、
山内正憲、心内修復術後成人ファロー四徴
症における再開心手術6症例の麻酔管理、日
本麻酔科学会第61回学術集会、2014年5
月14日、横浜市、パシフィコ横浜

Abe N, Satoh D, Anzai H, Kanaya H,
Kurosawa S, Yamauchi M, Functional
residual capacity changed during robot-
assisted laparoscopic radical
prostatectomy. American society of
Anesthesiologists Annual Meeting、2013
年10月14日、San Francisco (米国)

Toda N, Kurosawa S, Ejima Y, Yamauchi
M, Volatile anesthetics promotes
glucocorticoid-induced apoptosis of murine
thymocytes in vitro. International
Symposium Anatomical Science for
advance in health and clinical therapy
2013, 2013年8月27日、仙台市、民陵会館

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒澤 伸 (KUROSAWA SHIN)

東北大学・医学(系)研究科・非常勤講師

研究者番号：60272043

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：