

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892018

研究課題名(和文) 腸管粘膜バリア機能に着目した硬膜外鎮痛と周術期免疫応答に関する研究

研究課題名(英文) Study of the perioperative epidural analgesia influence to the immunoresponse concern to the intestinal mucosal barrier in dogs.

研究代表者

井芹 俊恵 (ISERI, toshie)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：00453142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：周術期における硬膜外鎮痛が免疫応答に与える影響について、腸管粘膜バリア機能に着目して研究を行った。Perfusion CTにより、硬膜外鎮痛は腹腔動脈は有意に拡大させ、十二指腸、膵臓の血流速度を有意に低下させた。また、術中の十二指腸および結腸組織におけるサイトカイン(IL-6、IL-12p35、IL-12p40)のmRNA発現量は、硬膜外鎮痛の有無による有意な違いは見られなかった。今回の研究から、周術期の腸管粘膜におけるサイトカインのmRNA発現は明らかな影響はみられなかったが、硬膜外鎮痛は腹腔動脈を拡張し、臓器血流速へ影響を与えたため、今後さらに長期間の影響を検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study evaluates that influence of perioperative epidural analgesia to the immunoresponse concern to the intestinal mucosal barrier function in dogs. Perfusion CT revealed that epidural analgesia decreased the parenchymal blood flow of the duodenum and pancreas, and vasodilated the celiac artery, significantly. However, the expression of mRNA cytokine (IL-6, IL-12p35 and IL-12p40) of the duodenum and colon were not difference significantly with/without epidural analgesia during operation. These results suggest that further study is necessary to evaluate long-term influence about epidural analgesia.

研究分野：獣医麻酔学

キーワード：硬膜外鎮痛 周術期麻酔 犬 獣医

1. 研究開始当初の背景

周術期の侵襲ストレスは、手術による組織損傷そのものだけでなく、侵襲ストレスに対するストレスホルモン応答が各種のサイトカイン放出を導くことで一過性の免疫活性化状態を招き[Joris J, et al. Br J Anaesth 69:341-5.1992]、それに伴い産生される抗炎症性サイトカインによって術後の免疫抑制状態を引き起こす[Kato M, et al. J clin Anesth 10:184-8.1998]。侵襲ストレスの一つである痛みをコントロールするために、さまざまな疼痛管理方法が利用されており、侵害神経を脊髄レベルでブロックする硬膜外鎮痛はそのうちの一つである。術後の早期回復を目的とした各種管理方法を集学的に実施するプロトコルである ERAS(enhanced recovery after surgery)では、硬膜外鎮痛を中心とした周術期疼痛管理が推奨されており[Lassen K, et al. Arch Surg 144:961-9.2009]、またそれとは別に、硬膜外鎮痛を用いることで癌の再発を低下させることが報告されるなど[Lin L, et al. Br J Anaesth 106:814-22.2011]、最近、硬膜外鎮痛の臨床的な利点について注目されている。これまで、硬膜外鎮痛は「優れた鎮痛効果」によりストレス応答を抑制すると考えられてきたが、同様に鎮痛効果を持つオピオイドの静脈内投与に比べ、硬膜外鎮痛は「鎮痛効果」による一般的なホルモン応答とは異なり、むしろ周術期における炎症性サイトカインの増加を抑制し、また術後の一過性免疫抑制を軽減する臨床研究が報告されたことから[Moselli NM, et al. Ann Surg Oncol 18:2722-31.2001]、硬膜外鎮痛では「鎮痛効果」とは異なる免疫応答への影響が示唆される。

ところで、消化管粘膜では生体が大きな侵襲を受けると血流低下によって容易に低酸素状態となり、腸管内の細菌や毒素などが粘膜壁を超えて他の臓器に侵入する Bacterial translocation を起こすことで術後の全身性炎症反応症候群(SIRS)あるいは、敗血症などの原因となる可能性が最近示唆されている[Marik P. Chest 104:225-9.1993]。

硬膜外鎮痛は侵害刺激だけでなく交感神経もブロックする。胸部硬膜外鎮痛を行った場合、支配領域の血管拡張を招くため全身の血圧を低下させるが、その反面、硬膜外鎮痛では臓器血流量を増加させる可能性がある[Sielenkaper AW, et al. Anesthesiology 93:844-51.2000]。これらの背景から、硬膜外鎮痛、とくに胸部硬膜外鎮痛による前腸管膜動静脈を含めた支配領域の交感神経ブロックは、消化管血流を保持し、腸管粘膜のバリア機能を維持することで、Bacterial translocation を予防して炎症性サイトカイン上昇を抑制し、さらにそれに続く抗炎症性サイトカインの産生を防ぐという仮説(図1参照)が考えられるが、詳細については調べられていない。

2. 研究の目的

(1) 非侵襲的な評価が可能な perfusion CT を用いた腹部臓器血流量への硬膜外鎮痛の影響について検討する。

(2) 硬膜外鎮痛による Bacterial translocation への影響を調べるために、消化管粘膜におけるサイトカインの mRNA 発現への硬膜外鎮痛の影響について検討する

3. 研究の方法

(1) Perfusion CT を用いた腹部臓器血流量への硬膜外鎮痛の影響についての検討

実験前後で CBC、血液生化学検査およびレントゲン検査により健康状態を確認したビーグル犬 3 頭(メス、平均 2 歳齢、体重 9.39 ± 0.35 kg)を 2 週間以上の間隔をおいたクロスオーバーで用い、硬膜外鎮痛(Epi)群およびコントロール(Con)群とした。プロポフォルで導入し、気管挿管後に非観血的な平均動脈血圧(MAP)が 60 mmHg 以上となるように濃度を調節したイソフルラン吸入により麻酔を維持した。L2-3 間から硬膜外針(19 G、八光)を穿刺し、生理的食塩水(生食)を用いた抵抗消失法により硬膜外腔を確認したのちに、硬膜外カテーテルは先端が T13 に位置するように硬膜外腔に留置した。Epi 群では 2%リドカイン 0.2 ml/kg 単回投与の後に 0.2 ml/kg/hr の持続投与を行い、Con 群では同量の生食を投与した。硬膜外投与開始から 20 分後に Dynamic CT 撮影を行った。造影剤はイオジキサノール(ビジパーク、第一三共)を 300 mgI/kg で用いた。得られた画像から、まず大動脈(AO)、腹腔動脈(CA)、膵臓(Pan; 左葉 PanL、右葉 PanR)、十二指腸(DUO; 粘膜層 DUOmucosa、筋層 DUOmucle)の時間濃度曲線を作成し、Time to peak (TTP: s)、AUC (EU · s) を求めた。次いで maximum slope 法による Perfusion 解析を行い、Pan、DUO、膵臓(Spl)について blood flow (maxBF: ml/100 g/min) を求めた。また、造影後の CT 画像を用いて画像解析ソフト(Virtual Place Fujin、Aze)による CA および前腸管膜動脈の直径を測定した。群間の統計学的解析には対応のある t 検定を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

(2) 消化管粘膜におけるサイトカインの mRNA 発現への硬膜外鎮痛の影響についての検討

実験前に CBC、血液生化学検査およびレントゲン検査により健康状態を確認したビーグル犬 5 頭(メス、平均 1.6 歳齢、 8.55 ± 0.37 kg)を 2 週間以上の間隔をおいたクロスオーバーで用い、硬膜外鎮痛(Epi)群およびコントロール(Con)群とした。プロポフォルで導入し、気管挿管後に 1.4%(1MAC)程度のイソフルラン吸入により麻酔を維持し、観血的 MAP は 60mmHg 以上となるようにした。実験(1)と同様の手順で硬膜外カテーテルの先端が T13 に位置するように硬膜外腔に留置した。0.5%プリピバカイン 0.2ml/kg による

腹部正中切開部の局所麻酔により開腹を行い、十二指腸(Duo)、結腸(Col)を6mmパンチによる全層バイオプシーを行った(pre)。採材後に腸壁は縫合し、腹壁は仮縫合を行った。続いてEpi群では2%リドカイン0.2 ml/kg単回投与の後に0.2 ml/kg/hrの持続投与を行い、Con群では同量の生食を投与した。硬膜外投与開始から1時間後に再びDuoおよびColの採材を行った(post epi)。同様に腸壁の縫合、腹壁の仮縫合を行い、イソフルラン濃度を2.8%(2MAC)程度に上昇させ、MAPが50mmHg程度の低血圧状態を30分間維持した後に再びDuoおよびColの採材を行った(hypo)。採材した組織からRNAを抽出してcDNAを作成し、リアルタイムPCRによりサイトカインmRNA発現を相対定量した。内部標準としてGAPDHを用い、解析にはそれぞれの組織におけるpreを1とした相対値として評価し、統計学的解析には重複測定分散分析法を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) TTPおよびAUCは2群で有意差はみられなかったが、Con群にくらべEpi群で増大した。maxBFはE群のPanLおよびDuoMsで有意に低下し、PanRで低下傾向がみられた($p=0.06$)(図1)。また、CAの直径はEpi群でCon群に比べて有意に拡大した(図2)。

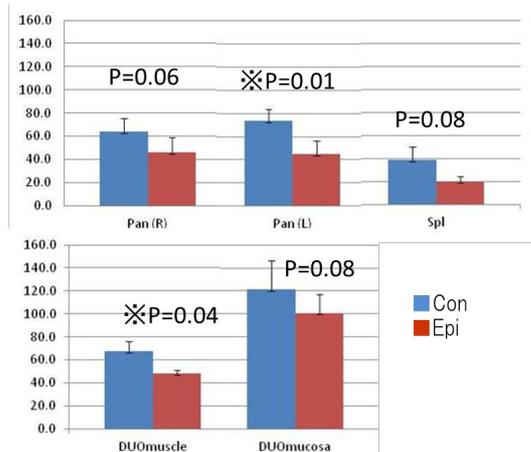


図1 膵臓(PanR、PanL)、脾臓(Spl)、十二指腸(DUOmuscle、DUOmusosa)のblood flow (maxBF: ml/100 g/min) $p < 0.05$ Con. VS Epi.

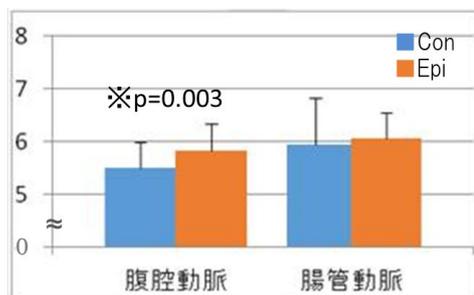


図2 腹動脈(CA)および腸管動脈の直径(mm) $p < 0.05$ Con. VS Epi.

本実験では硬膜外カテーテルをT13に留置したため、前腸間膜動脈よりも腹腔動脈で血管拡張がみられ、この分枝である胃十二指腸動脈および前膵十二指腸動脈を介し、膵臓や十二指腸での血流速度の低下となった可能性が考えられた。今回の結果から、T13にカテーテル先端を留置した硬膜外鎮痛は腹部血管を拡張させ、膵臓および十二指腸の血流側へ影響を及ぼすことが明らかとなった。その一方で、これまで報告されている膵炎に対する硬膜外鎮痛の臓器血流量を増加させる影響は、主に疼痛コントロールによるものであることが推察された。

(2)

測定が可能であったIL-6、IL-12p35およびIL-12p40の、DuoとColにおける発現量に群間および群内で有意差は見られなかった(図3)。なお、IL-6、IL-12p35はTaqManプロンプ法、IL-12p40はSYBR Green法を用い、使用したプライマーは以下の通りである。

IL-6

Forward : CAGGACCCCAGCTATGAACT

Reverse : GGGAAAGCAGCCATCAC

IL-12 p35

Forward: GGAAAGGCCTCTTTTATGACG

Reverse: CCATCTGGTACATCTTCAAGTCC

IL-12 p40

Forward: GCGTCTTCCTCATGACC

Reverse: GGGTGCCAGTCCAACCTCTAC

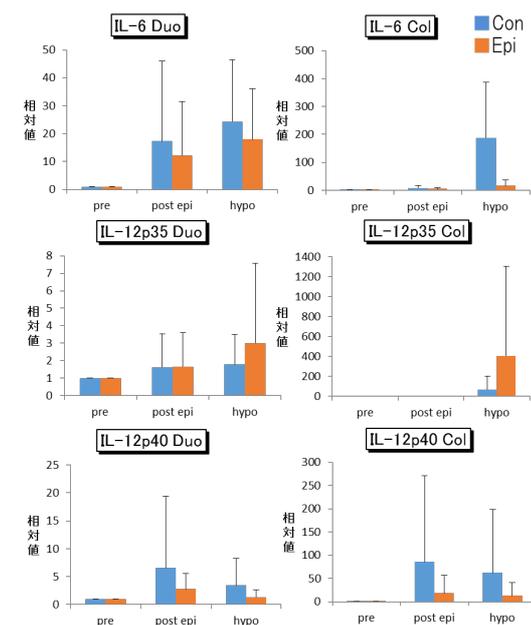


図3 DuoおよびColにおけるIL-6、IL-12p35およびIL-12p40の発現量。グラフは各群のpreの値を1として、硬膜外鎮痛開始1時間後(post epi)、低血圧状態に30分間維持した場合(hypo)の相対値を示す。

本実験では、硬膜外鎮痛を開始してから1時間後、また低血圧状態としてから30分後に採材を行った。実験1の結果からすでに十二指腸粘膜への血流量は変化したと考えら

れ、さらに、実験1と異なり、開腹術による侵害刺激が加わった状態であったが、サイトカインの発現量について有意差は見られなかった。腸管におけるサイトカインの発現には長期にわたり複雑な生体反応が加わっていると考えられるため、今後も引き続きサイトカインの解析や、経時的な採材方法を含めて検討を続ける必要があると考えられる。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Perfusion CT撮影法を用いた腹部臓器血流量への硬膜外鎮痛の影響についての検討
井芹俊恵、岸本海織、伊藤博、中市統三
第92回獣医麻酔外科学会(埼玉県おおみや市、大宮ソニックシティ)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

井芹 俊恵 (ISERI, Toshie)

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号: 00453142

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

研究協力者:

藤本 由香(FUIJIMOTO, yuka)

岸本 海織(KISHIMOTO, miori)

三重 慧一郎(MIE, keiichiro)

大橋 文人(OHASHI, fumihito)

秋吉 秀保(AKIYOSHI, hideo)

伊藤 博(ITO, hiroshi)

中市 統三(NAKAICHI, munekazu)