慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	硬膜外麻酔の癌再発抑制機序の解明
Sub Title	Elucidation of the cancer recurrence restraint mechanism of the epidural anesthesia
Author	山田, 高成(Yamada, Takashige) 五十嵐, 達(Igarashi, Toru)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	今回, 当研究室で既に確立済みのラット硬膜外力テーテル長期留置モデルを用いて, 「硬膜外麻酔が免疫担当細胞natural killer 細胞, T細胞の周術期機能を保持し, 癌増殖を抑える」との仮説の下に, 癌再発と周術期免疫機能の変化を探求する研究を行った。今回の研究においては硬膜外麻酔が免疫担当細胞Natural killer細胞, T細胞の周術期機能に与える影響を観察することが出来なかったが, 今後も更なる研究を続けていく予定である。 We performed a study to search the change of a cancer recurrence and the perioperative function of immunity, based on the hypothesis 'Epidural anesthesia maintains the function of natural killer cells and T cells, consequently suppress the cancer multiplication', using the rat long-term epidural anesthesia model which has been already established in our laboratory. We are not able to observe the influence that an epidural anesthesia gave Natural killer cell and T cell in this study. Further studies are warranted to clarify relationship between epidural anesthesia and cancer recurrence.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2013 ~ 2014 課題番号 : 25861400 研究分野 : 麻酔学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25861400seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2013～2014
課題番号：　２５８６１４００

研究課題名（和文）硬膜外麻酔の癌再発抑制機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the cancer recurrence restraint mechanism of the epidural anesthesia

研究代表者
山田　高成（Yamada, Takashige）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：２０３４８７６７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：今回、当研究室で既に確立済みのラット硬膜外カテーテル長期留置モデルを用いて、「硬膜外麻酔が免疫担当細胞natural killer 細胞、T 細胞の周術期機能を保持し、癌増殖を抑える」との仮説の下に、癌再発と周術期免疫機能の変化を探求する研究を行った。今回の研究においては硬膜外麻酔が免疫担当細胞Natural killer細胞、T細胞の周術期機能に与える影響を観察することが出来なかったが、今後も更なる研究を続けていく予定である。

研究成果の概要（英文）：We performed a study to search the change of a cancer recurrence and the perioperative function of immunity, based on the hypothesis ‘ Epidural anesthesia maintains the function of natural killer cells and T cells, consequently suppress the cancer multiplication', using the rat long-term epidural anesthesia model which has been already established in our laboratory. We are not able to observe the influence that an epidural anesthesia gave Natural killer cell and T cell in this study. Further studies are warranted to clarify relationship between epidural anesthesia and cancer recurrence.

研究分野：　麻酔学

キーワード：　硬膜外麻酔　がん抑制　Th1/Th2バランス　Th17　炎症性サイトカイン　NK活性

１．研究開始当初の背景

悪性新生物は日本人の死因第１位で、死亡者数は年間 35 万人を超えている（平成 22 年度厚生労働省人口動態統計）。医学薬学の発展に伴い癌治療に対する知見及び手術技術の向上は目覚ましいものの、未だ術後癌再発は癌治療領域の大きな課題となっている。周術期医学領域においては、硬膜外麻酔、脊髄くも膜下麻酔、傍脊椎ブロックなど区域麻酔併用麻酔が癌手術後の再発率を軽減し、長期予後を改善する可能性が示唆されている。2006 年、Exadaktylos らは乳癌手術に傍脊椎ブロックを併用すると、全身麻酔・麻薬併用と比べ無再発期間を有意に延長させる事を報告した（Anesthesiology 2006;105:660）。開腹前立腺全摘出術に硬膜外麻酔を術中から術後にかけて併用した場合、術後 2-12 年後の長期評価で硬膜外麻酔併用麻酔が全身麻酔単独に比べ、癌再発の指標である前立腺特異抗原の再上昇を 57％抑える報告もある（Anesthesiology 2008;109:180）。その一方、2012 年の大規模疫学調査では開腹大腸癌摘出術において全身麻酔・硬膜外麻酔併用群は全身麻酔群に比して術後 5 年生存率を改善したものの、癌再発率は有意な差が無かった(Anesthesiology 2012;116:797)。区域麻酔と癌再発率や予後に関する臨床研究は多数報告されているが、後方視的調査が多く、その結果は様々である。
基礎研究においては、Deegan らは、全身麻酔・麻薬併用と傍脊椎ブロック・全身麻酔併用患者の血清を培養液に添加、生体外で乳癌細胞への影響を検討し、傍脊椎ブロック・全身麻酔併用患者血清が癌細胞増殖を抑えると報告した（Br J Anaesth 2009;103:685）。他にも報告は存在するものの、区域麻酔の中でも硬膜外麻酔は術後持続鎮痛の有用性から臨床上多用されている一方、硬膜外麻酔が癌細胞や癌免疫機構に対する詳細な機序を解明する基礎研究はモデル維持の困難性から殆ど存在しない。硬膜外麻酔は優れた鎮痛効果の他にも抗炎症作用、微小循環の改善、組織酸素分圧の向上など生体への好ましい作用が報告されており、他にも様々な可能性を秘めている麻酔法であるが、近年注目されているのが癌免疫に与える影響である。

癌再発と転移に関連する免疫担当細胞には、natural killer 細胞（NK 細胞）や $CD8^+$細胞障害性 T 細胞（CTL）、$CD4^+$ヘルパーT 細胞（Th 細胞）等がある（Anat Embryol 1989;180:109）。Th 細胞は抗腫瘍効果を発揮する Th1 細胞、液性免疫に関与する Th2 細胞、血管新生を促し腫瘍増殖を助ける Th17 細胞等に分化する（Am J Reprod Immunol 2010;63:601）が、Th1 細胞と Th2 細胞は相互に抑制し合うため、Th1 細胞と Th2 細胞発現比（Th1/Th2 比）は腫瘍免疫の重要な指標であり Th1/Th2 比 が高いほど抗腫瘍活性が高い。Th1 細胞は、主に interleukin-12（IL-12）により分化誘導され、自ら interferon-γ(IFN-γ)などを放出する一方、Th2 細胞は主に IL-4 により分化誘導され、自ら IL-4 などを放出する。よって IL-12、IFN-γ、IL-4 の発現を比べる事で Th1/Th2 比を推定できる。Th17 細胞は最近発見された新たな Th サブセットで、IL-17 を放出し（Biophys Res Commun 2001;282:735）、血管新生を促す（J Immunol 2005;175: 6177）。また腫瘍に直接作用し抗アポトーシス作用を示し（Cancer Res 2008;68:3915）、抗腫瘍免疫の新たなパラダイムとして最近注目されている。
2007 年、Wada らは、動物実験で癌細胞に対する脊髄くも膜下麻酔の効果と機序を検討し、脊髄くも膜下麻酔併用が全身麻酔単独に比べ、Th1/Th2 バランスと NK 活性を保持し、転移性肝臓癌の増殖を有意に抑えると報告した（Anesthesiology 2007;106:499）。詳細な機序は解明されていないものの、術後炎症性サイトカイン上昇の抑制効果が抗腫瘍免疫の中心的役割を担うリンパ球機能の保持に関与している可能性が高い。しかし脊髄くも膜下麻酔は開胸あるいは上腹部癌手術への適用は困難で、効果の持続時間も半日程度と非常に短い。よって臨床上は 1 週間程度の術後持続鎮痛が可能な硬膜外麻酔が多用されている。硬膜外麻酔は術後のカテコラミン濃度上昇を抑制し（Best Pract Res Clin Anaesthesiol 2005;19:201）、求心性神経路の遮断により神経内分泌ストレスを抑え、術後免疫能低下の程度を減弱させる。よって硬膜外麻酔は他の区域麻酔と比べて周術期における悪性腫瘍の再発・転移の抑制効果が大きいと想定される。

更に、癌細胞は長期間に渡り生体免疫機構から逃れて生存してきた細胞群であり、生体免疫の攻撃から逃れる免疫寛容力を有している（Advances in Immunology: Academic Press; 2006:1）。特に癌細胞の産生する transforming growth factor-β(TGF-β)、IL-6、IL-10 等の免疫抑制分子は免疫抑制性細胞を誘導し、様々な癌で予後不良との相関が認められている。硬膜外麻酔による免疫抑制分子への影響については関連した研究が少なく、また結果も様々であるため本研究において探求する価値が高いと思われる。

２．研究の目的

以上の背景を踏まえて、今回、当研究室で既に確立済みのラット硬膜外カテーテル長期留置モデルを用いて、**「硬膜外麻酔が免疫担当細胞 natural killer 細胞、T 細胞の周術期機能を保持し、癌増殖を抑える」**との仮説の下に、癌再発と周術期免疫機能の変化を探求する研究計画を立てた。更に Th17 細胞や免疫抑制分子についても計測し、硬膜外麻酔の新たな可能性についても探求する。当研究

室では、これまで硬膜外麻酔の効果を検討し、硬膜外麻酔が低酸素あるいは敗血症侵襲下において腸管壁防御機構を維持し、抗炎症作用を有することを明らかにしてきた（Anesthesiology 2001;94:263, 2003;98:1407, Anesth Analg 2005;101;265)。

本研究計画の具体的な目的：ラット硬膜外カテーテル留置モデルを用い、手術侵襲後における

(1) 全身麻酔によるがん細胞の発育、NK 活性の変化、他免疫担当細胞の変化を検証する。
(2) 全身麻酔・硬膜外麻酔併用ががん細胞の発育抑制、NK 活性保持、その他 Th17 細胞を含む免疫担当細胞活性の低下を抑えていることを検証する。
(3) 全身麻酔と全身麻酔・硬膜外麻酔併用での免疫抑制分子の血清濃度の変化について検証する。

以上により、硬膜外麻酔が周術期リンパ球機能の保持を通じ、抗腫瘍免疫機能を保持し、癌再発の危険性を軽減していることを明らかにし、更に免疫抑制分子と硬膜外麻酔の関係を究明する。

申請者らの知る限り、硬膜外麻酔をラットに行って悪性腫瘍増殖の抑制を検証した報告はない。また、硬膜外麻酔と免疫抑制分子についての関連を検証した報告は希少である。本研究での最大の特色は**長期間の硬膜外カテーテルを留置したラットモデル**において観察研究を行った点であるが、3 日間の硬膜外カテーテル留置はヒトに対して頻繁に行われる手技であり、臨床に即していると思われる。
硬膜外麻酔による悪性腫瘍増殖の抑制が確認され、その機序が解明されれば、硬膜外麻酔の積極的な周術期の適用に関して新しい知見をもたらし、癌手術患者にとって大きな利益をもたらすと考える。

３．研究の方法

「実験１．硬膜外麻酔によるラット結腸がん細胞の肝臓内での増殖への影響の検討」

まず、癌細胞を肝臓に生着させるモデルを作成する。
Freise らの方法（Anesth Analg 2005;100:255）に従って、第 3/第 4 腰椎椎間より硬膜外カテーテルを挿入し、先端を下位胸椎に留置したラットを無作為に①生食投与群(25 匹)と②1%リドカイン投与群(25 匹)（マイクロシリンジポンプを使用し、両群共に 15μl/hr 持続投与：Anesth Analg 2005;100:255)の 2 群に分ける。具体的には、0 日目にセボフルラン投与による全身麻酔下に腹部切開を加え、ラット肝臓癌細胞 McA-RH7777 を 5×10^5cell(50μl)ラット肝臓の左側葉、左中葉、右中葉にマイクロシリンジにて注入する。また、背部より切開を加え、直視下に硬膜外カテーテルを挿入し、それぞれの薬液の硬膜外持続投与を開始する。その後、ラット専用ケージ内で覚醒、飼育する。硬膜外カテーテルは 3 日目に抜去する。これは臨床において術後麻硬膜外鎮痛の使用期間が 2～3 日程度となるためである。14 日目にセボフルラン全身麻酔下に腹部切開を加えラット肝における腫瘍の大きさと転移数を測定する。腫瘍の体積は(長径)×(短径)^2×π/6 で求める(Int J Cancer 2004;110:70)。本研究により、癌細胞の肝臓内増殖に対する硬膜外麻酔の関与を手術侵襲の影響を含め検証する。

「実験２．硬膜外麻酔による免疫担当細胞への影響の検討」

実験１と同様に、50 匹のラットを①生食投与群(25 匹)と②1%リドカイン投与群(25 匹)に分けて研究を行う。14 日目にセボフルラン投与による全身麻酔下にラット尾静脈より採血を行い、それぞれ動脈血液ガス、白血球数を測定する。また、血液を 3000rpm で 10 分間、5℃にて遠心分離し血清を得る。血清 IFN-γ、TGF-β、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17 濃度を ELISA 法により測定する。血清 IL-12 濃度、血清 IFN-γ濃度、血清 IL-4 濃度の変化を経時的に測定することで Th1/Th2 バランスを知ることが可能である。同時に血清 IL-17 濃度の変化を測定することで Th17 発現の程度を知ることが可能である。また、血清 TGF-β、IL-6、IL-10 濃度の変化を測定し、免疫抑制分子の趨向を観察する。
14 日目にラットを安楽死させ、無菌下に肝臓組織を採取する。肝臓の腫瘍組織と腫瘍から離れた組織から組織標本を作製し、ヘマトキシリン－エオジン染色を施し腫瘍細胞の健常部/壊死部を観察する。また、NK 活性を測定するため、肝臓は膜を通して培養液で濾過後、遠心分離機にて単核球を抽出する。NK 活性は MTT 法によって計測する(Leuk Lympoma 2003;44:1957) 。具体的には標的細胞を $Na_2(^{51}Cr)O_4$ にて標識し、抽出した単核球と混合培養し、上清中の ^{51}Cr の放射能活性をガンマカウンターにて計測する。
NK 細胞活性(% cytotoxicity)＝(検体解離$_{cpm}$-自然解離$_{cpm}$)÷(最大解離$_{cpm}$-自然解離$_{cpm}$)×100
で求められる。これらの研究により、硬膜外麻酔による免疫担当細胞への影響を生体内外実験系で検証する。

４．研究成果

担がんラットモデルを用いて 50 匹のラットを①生食投与群(25 匹)と②1%リドカイン投与群(25 匹)に分け、がん細胞注入の 14 日後にセボフルラン投与による全身麻酔下にラット尾静脈より採血を行い、それぞれ動脈血液ガスと白血球数を測定したところ両群間

に有意差を認めなかった。また、清 IFN-γ、TGF-β、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17 濃度を ELISA 法により測定したところ、全ての項目で両群間に有意差を認めなかった。
更にがん細胞注入 14 日後にラットから肝臓組織を採取し、腫瘍組織とそこから離れた肝組織から組織標本を作製し観察したが、やはり両群間に有意な違いを認めることはできなかった。また、肝臓から単核球を抽出し NK 活性を MTT 法にて測定したがこれも両群間に有意差を認めなかった。
今回の研究においては硬膜外麻酔が免疫担当細胞 Natural killer 細胞、T 細胞の周術期機能に与える影響を観察することが出来なかったが、これはがん細胞株の特性のため観察期間が 14 日しか取れなかった影響が大きいと考えられるため、今後も更なる研究を続けていく予定である。

そして、これらの実験により得られた知見の一部を活かして１編の論文を作成した。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　１件）

１．Igarashi Toru、 Suzuki Takeshi、Mori Katsuya、Inoue Kei、Seki Hiroyuki、Yamada Takashige、 Kosugi Shizuko、 Minamishima Shizuka、 Katori Nobuyuki、 Sano Fumiya、 Abe Takayuki、 Morisaki Hiroshi、The Effects of Epidural Anesthesia on Growth of Escherichia coli at Pseudosurgical Site: The Roles of the Lipocalin-2 Pathway. Anesthesia and analgesia、査読有、今後掲載予定、
doi: 10.1213/ANE.0000000000000694

〔学会発表〕（計　０件）

〔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〕

なし

６．研究組織

(1)研究代表者
山田　高成　（YAMADA, Takashige）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20348767

(2)研究協力者
五十嵐　達　（IGARASHI, Toru）