

論文の内容の要旨

論文題目 静脈麻酔薬によるマスト細胞機能抑制

指導教官 花岡一雄教授

東京大学大学院医学系研究科

平成十二年四月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 藤本 幸弘

「緒言」

麻酔、手術侵襲、輸血、その他周術期に関与する種々の要因は免疫系に多大な影響を及ぼす。静脈麻酔薬が好中球の遊走能、殺菌能を抑制する論文は散見される。マスト細胞はアレルギーや細菌感染の宿主防衛において重要な役割を担っているが、静脈麻酔薬がマスト細胞機能を抑制すると仮定したら、有害アレルギー反応が抑制される一方で、細菌感染が悪化する可能性があり、生体にとって不利に働くこととなる。しかしながら、静脈麻酔薬のマスト細胞機能への影響を調べた報告は無い。本研究ではイヌの皮膚マスト細胞腫から樹立した canine mastocytoma derived cell (CMMC) をマスト細胞系として使用して以下の実験を行った。

第一に、ニューロペプチドのサブスタンス P が CMMC に対する遊走刺激因子になるか否かを検討した。次に IgG 抗体を介する免疫学的刺激とサブスタンス P による非免疫学的刺激が CMMC に対してヒスタミン遊離を誘導する濃度を特定し、マスト細胞の遊走能およびヒスタミン遊離能における実験系を確立した。そして、この実験系を使用して、現在臨床使用される 4 種の静脈麻酔薬、チオペンタール、ケタミン、ミダゾラム、プロポフォールが、マスト細胞のヒスタミン遊離能と遊走能に与える影響を検討した。

「結果」

CMMC に対する遊走刺激因子を検討するため、細胞基質構成物質のラミニン、フィブロネクチンおよび、マスト細胞のヒスタミン遊離因子であるサブスタンス P、カルシウムイオノフォア A23187、コンパウンド 48/80 を被験試料としてボイデンチャンバー法にて遊走実験を行った。一方向性の遊走を示す可能性のある物質はサブスタンス P のみであった。

サブスタンス P についてはさらに詳細な遊走実験を行った。CMMC のサブスタンス P への遊走が一方向性なのか多方向性なのかを判断するため、チェックボード解析を行った。サブスタンス P に対する CMMC の運動は、一方向性および多方向性の遊走であることを示した。サブスタンス P に対して遊走した CMMC の数はサブスタンス P の濃度依存性に上昇し、最大遊走濃度は 300 μ M であり、それより高い濃度では遊走細胞数は低下した。この遊走は細胞外カルシウム依存であることを示した。CMMC の最適な遊走時間は約 2 時間であることを示した。CMMC のサブスタンス P への遊走が G 蛋白を介するか否かを検討するため、百日咳毒素 (PTx) 処理をした細胞を使用し、遊走実験を行った。その結果、百日咳毒素 (10, 30 ng/ml) で CMMC を反応させると部分的な遊走抑制が認められ (各々 60% 抑制、82% 抑制)、100 ng/ml で反応させると 100% の遊走抑制が認められた。サブスタンス P による遊走は G 蛋白が介することを示した。

サブスタンス P の刺激により誘導される CMMC 細胞内カルシウム動態を、Fura-2-AM を使用して蛍光法で測定した。サブスタンス P の刺激による細胞内カルシウム上昇の強さは濃度依存性であることを示した。この反応は細胞外カルシウム依存であることを示した。

イヌ IgG 抗体感作後、羊-抗イヌ IgG 抗体 (10 μ g/ml) を加えた IgG 抗体を介する免疫学的刺激およびサブスタンス P による非免疫学的刺激によるマスト細胞のヒスタミン遊離実験を行った。イヌ IgG 抗体の濃度 0.1-10 μ g/ml で、

CMMC のヒスタミン遊離率は濃度依存性に上昇した。イヌ IgG 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) 感作時のヒスタミン遊離率は最大値 $27.2 \pm 4.2\%$ であり、それより高い濃度では低下した。このため、イヌ IgG 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) の感作および、羊-抗イヌ IgG 抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) の刺激を静脈麻酔薬の抑制実験に使用することを決定した。サブスタンス P の濃度 10-100 μM で、CMMC のヒスタミン遊離率は濃度依存性に上昇した。サブスタンス P (100 μM) によるヒスタミン遊離率は最大値 $28.1 \pm 2.6\%$ であり、それより高い濃度では低下した。このため、サブスタンス P (100 μM) を静脈麻酔薬の抑制実験に使用することを決定した。

最後に静脈麻酔薬がマスト細胞のヒスタミン遊離能と遊走能に与える影響を検討した。CMMC を 4 種の静脈麻酔薬 (チオペンタール、ケタミン、ミダゾラム、プロポフォール) の中で 120 分間、37 $^{\circ}\text{C}$ にて反応させ、洗浄後、ヒスタミン遊離実験および遊走実験に使用した。

ケタミン、ミダゾラム、プロポフォールは、臨床使用濃度の 0.1 倍、1 倍、10 倍の濃度で濃度依存性に CMMC のヒスタミン遊離を抑制した。臨床使用濃度 (1 倍) によるヒスタミン遊離率はそれぞれ対照実験の 82 %、80%、50% であることを示した。チオペンタールは臨床使用濃度の 0.1 倍、1 倍、10 倍の濃度 (3, 30, 300 $\mu\text{g/ml}$ = 11.4, 114, 1140 μM) では、対照実験と比較して CMMC のヒスタミン遊離を抑制しなかった。

チオペンタール、ミダゾラム、プロポフォールは、臨床使用濃度の 0.1 倍、1 倍、10 倍の濃度で濃度依存性に CMMC の遊走を抑制した。臨床使用濃度 (1 倍) による遊走はそれぞれ対照実験の 60 %、55%、82% であることを示した。ケタミンは臨床使用濃度の 0.1 倍、1 倍、10 倍の濃度 (3, 30, 300 $\mu\text{g/ml}$ = 10.9, 109, 1090 μM) では、対照実験と比較して CMMC のヒスタミン遊離を抑制しなかった。

臨床的に長期間にわたりチオペンタールやプロポフォールを使用した患者が重篤な感染症を引き起こした報告がある。組織炎症期および創傷治癒期にお

いて、静脈麻酔薬がマスト細胞のヒスタミン遊離を抑制し、局所に向かう遊走能を抑制すると、患者のアレルギー反応は軽減する一方で、創傷治癒が遅れ、感染に対する防御力が低下する可能性が示唆された。

「結論」

本研究において第一に、ニューロペプチドのサブスタンスPがマスト細胞の遊走因子になることを新たに明らかにした。

第二に、現在最も臨床使用されている4種の静脈麻酔薬のうち、マスト細胞のヒスタミン遊離能に関してはミダゾラム、ケタミンおよびプロポフォールに、マスト細胞の遊走能に関してはチオペンタール、ミダゾラムおよびプロポフォールに濃度依存性の機能抑制効果があることを新たに明らかにした。