原 著

犬におけるハロタンあるいはペントバルビタール
麻酔のリンパ球幼若化能に及ぼす影響

中間實徳, 田中幹郎, 田中寿之

Effect of Halothane or Pentobarbital Anesthesia on Blastogenesis
of Peripheral Blood Lymphocytes in Dogs.

Sanenori NAKAMA, Mikio TANAKA, and Toshiyuki TANAKA.

SUMMARY

The purpose of this study was to clarify the effect of general anesthesia on blastogenesis of lymphocytes in dogs. Lymphocytes collected from the anesthetized dog were incubated with concanavalin A (Con A) or phytohemagglutinin (PHA) mitogen. Blastogenesis of lymphocytes stimulated by these mitogens were evaluated by the stimulation index (S.I.) from the incorporation of ^3H -thymidine. In halothane anesthesia (GOF) group, each dog was induced anesthesia by mask inhalation of 4% halothane and maintained by 1% halothane through a tracheal tube for 2 hrs (Group A). A significant decrease in S.I. value was indicated from 24 hrs to 4 weeks and the lowest value was recorded at 2 weeks after the anesthesia. In pentobarbital anesthesia group, receiving at a dose of 25 mg/kg intravenously (Group B), the lower values compared to those of pre-anesthesia were recognized at 24 hrs and 2 weeks after the anesthesia. The suppressive effect on blastogenesis of peripheral lymphocytes of halothane anesthesia was stronger than that of the pentobarbital anesthesia.

は じ め に

外傷や手術の侵襲によって生体の細胞性免疫能が一過性に抑制されるという報告はヒト^{2,3,13,19,21,26)}をはじめ獣医学領域においてもいくつか見られる^{9,12,14,16,17,25,26)}。従来、術後の細胞性免疫能の低下は、もっぱら外科的侵襲の大小に依り、麻酔薬そのものの抑制効果は僅かであるとの考え方が一般的であった^{3,7,11)}。しかし麻酔薬、特に

ハロタンそれ自身にもリンパ球の幼若化能を抑制することが *in vitro* で認められ^{1,4,5,6,20,22,23)}、ヒトでのハロタン麻酔による検討がなされてきた^{10,11,18)}。小動物臨床領域において、Medleau ら¹⁴⁾は犬で卵巣子宮全摘術時のリンパ球のフィトヘマグルチニン (PHA) への反応を調べている。彼らは麻酔をチアミラルで導入後、GOF で維持し、術後 24 時間まで観察した結果、リンパ球の幼若化能に一過性の低下を認めたことを報告している。また、Felsburg ら⁹⁾は、犬のメトキシフルラン麻酔でリンパ球の幼若化能が一時的に抑制されたことを報告している。

著者らは獣医臨床で広く用いられているハロタ

山口大学農学部家畜外科学教室 (山口市大字吉田 1677-1, 〒753)
Department of Veterinary Surgery, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida, Yamaguchi 753, Japan

ン (GOF) とペントバルビタールの全身麻酔が犬のリンパ球の幼若化能にどのように影響するかを³H-チミジン取り込み法で検討した。

材 料 と 方 法

1. 実験材料

(1) 実験犬

動物管理所より導入した推定年齢 1 ~ 3 歳の雑種犬で体重 6 ~ 16 kg の臨床的健康と思われる 18 頭を用いた。実験犬は導入後、ジステンパー、伝染性肝炎、レプトスピラおよびパルボウイルスの各ワクチンの接種を行ない、最低 2 週間の馴致期間をおいてから実験に供した。また、肝機能検査 (GOT, GPT) で正常範囲のものを使用した。

(2) 麻酔薬

全例に前処置として、硫酸アトロピン 0.05 mg/kg を皮下注射した。その 15 分後、ハロタン (GOF として O₂:N₂O=1:2 の混合ガスにハロタンを Fluotec Mark 2 で気化して使用) の吸入またはペントバルビタールナトリウム (ネンブタール) の静脈内注射で全身麻酔を施した。

2. 実験群

6 頭ずつ次の 3 群にわけて実験を行なった。

A 群 (GOF 麻酔群)

酸素と笑気ハロタン 4% の混合ガスでマスクにより導入後、気管チューブを挿入し、ハロタン 1% で 2 時間麻酔を維持した。

B 群 (ペントバルビタール麻酔群)

ネンブタール 25 mg/kg を静脈内注射した。

C 群 (無麻酔群)

硫酸アトロピンの皮下注射のみで他には何ら薬剤を用いなかった。

3. 実験方法

(1) 採血

各群とも麻酔導入前と導入後 24 時間目、1 週間目、2 週間目、3 週間目、4 週間目の計 6 回採血した。採血時間は 1 日のうちで最も外部のストレスの少ないと考えられる早朝に行なった。

(2) リンパ球幼若化反応の測定

これまで報告された方法^{5,24)} に準じて行なった。

(a) リンパ球分離法

4 ml の Ficoll-Conray 溶液上に、ヘパリン加血液 3 ml の PBS 溶液で 2 倍に希釈した 6 ml を静かに重層し、4°C, 1,550 rpm で 30 分間遠心し、リンパ球を採取した。RPMI-1640 培養液で洗浄後、リンパ球を 1×10⁶ 個/ml になるように調整し、10% 牛胎児血清 (FCS) 加 RPMI-1640 培養液を加え、リンパ球浮遊液とした。

(b) マイトジェンによるリンパ球幼若化反応

リンパ球浮遊液にマイトジェンの予備実験で濃度を決めた Phytohemagglutinine (PHA, Difco Lab.) 250 μg/ml あるいは Concanavalin A (Con A, Difco. Lab.) 100 μg/ml を添加し、³H-Thymidine [Methyl-³H]-Thymidine 2.0 Ci/mmol, Amersham, England) 0.5 μCi を、培養 48 時間後に添加して、リンパ球の ³H-Thymidine の取り込みを調べた。

(c) 培養

8×12 穴のマイクロプレートに 1×10⁶ 個/ml に調整したリンパ球浮遊液をおのおの 200 μl 分注した。これにマイトジェンを各 10 μl 宛分注し、盲検用にはマイトジェンの代わりに FCS 加 RPMI-1640 培養液 10 μl を加え、いずれも三重検定を行なった。マイクロプレートは 37°C, 5% CO₂, 95% 空気の加湿培養条件で 72 時間培養を行なった。培養終了後 18 時間前 (開始後 54 時間目) に ³H-Thymidine を予備実験で反応性が高かった 0.5 μCi/10 μl ずつ加えた。

(d) ³H-Thymidine の測定

培養終了後、直ちに 4°C に静置し、反応を停止させたうえ、セルハーベスター (Titertek Cel¹ Harvester 530/550, Flow Lab.) を用い、細胞をフィルターに集めた。各フィルターをシンチレーションバイアルに入れ乾燥後、シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka Scintillation Counter) で Radioactivity を測定し、CPM を求めた。リンパ球幼若化反応の程度は以下の式で Stimulation Index (S.I. 値) を算定した。

Fig. 1 SI values of lymphocytes by mitogen; Con A in group A with GOF anesthesia.

$$S.I. = \frac{\text{Mitogen刺激リンパ球の } ^3\text{H-Thymidine取り込み (CPM)}}{\text{Mitogen 非刺激リンパ球の } ^3\text{H-Thymidine 取り込み (CPM)}}$$

なお、検定には Student の t-検定を用いた。

成 績

A群(GOF 麻酔群)での Con A 刺激による S.I. 値の変動は、麻酔導入後 24 時間目ですべての個体において急激な低下を認め、その後も 1 週目、2 週目で低値を保ち、3, 4 週目で麻酔導入前値へ回復する傾向がみられた。また、麻酔導入前値と麻酔後 24 時間目、1 週目、2 週目、3 週目とではそれぞれ 0.5%, 麻酔導入前値と 4 週目、および麻酔後 1 週目、2 週目と 4 週目とではそれぞれ 2.5% 以下の危険率で有意差を認めた (Fig. 1)。

Con A を用いた幼若化能の GOF 麻酔による抑制の程度は麻酔導入前値を 100% とすると 24 時間目で $14.5 \pm 16.5\%$ ($\bar{x} \pm S.D.$), 1 週目で $11.4 \pm 9.0\%$ と低下し、2 週目では最低の $8.5 \pm 4.4\%$ まで低下した。3 週目では $37.7 \pm 21.9\%$ となり、4 週目では $67.4 \pm 21.6\%$ にまで回復がみられた。

Fig. 2 SI values of lymphocytes by mitogen; PHA in group A with GOF anesthesia.

Fig. 3 SI values of lymphocytes by mitogen; Con A in group B with pentobarbital anesthesia.

目で回復に向かう傾向がみられた (Fig. 2)。麻酔導入前値に対し、24 時間目 $21.2 \pm 10.9\%$, 1 週目 $20.7 \pm 14.5\%$, 2 週目 $19.5 \pm 13.8\%$ と低下したが、3 週目には $40.0 \pm 35.0\%$ に回復し、4 週目にはほぼ導入前値まで回復した。

B群(ペントバルビタール麻酔群)での Con A 刺激による S.I. 値の変動は A 群に比べばらつきが大きかったものの、やはり導入後 2 週目までは低下することが認められ、3 週目、4 週目で回復する傾向が認められた。麻酔導入前値と 24 時間目、および 2 週目ではそれぞれ危険率 0.5% および 5% 以下で有意差を認めた (Fig. 3)。S.I. 値の麻酔導入前値を 100% とすると、24 時間目で $23.0 \pm 19.3\%$, 1 週目で $30.0 \pm 31.3\%$, 2 週目で

Fig. 4 SI values of lymphocytes by mitogen; PHA in group B with pentobarbital anesthesia.

Fig. 6 SI values of lymphocytes by mitogen; PHA in group C (Control).

Fig. 5 SI values of lymphocytes by mitogen; Con A in group C (Control).

23.8±17.7% と低下し、3週目で 45.7±36.9% まで回復し、4週目ではほぼ導入前値までの回復が認められた。

PHA 刺激による S.I. 値の変動も幾分ばらつきはあるものの、Con A と同様の変動で導入後2週目まで抑制され、3週目、4週目で回復する傾向が認められた (Fig. 4)。幼若化能の抑制の程度は24時間目で導入前値の 21.5±19.1%，1週目で 39.0±29.5%，2週目で 20.7±14.7% であった。

C群（無処置対照群）では Con A および PHA 刺激で多少のばらつきはあるものの、ほぼ一定の

範囲内で変動し、一定の傾向は認められなかった (Figs. 5, 6)。

考 察

本研究によって、犬において手術侵襲を加えずにハロタンあるいはペントバルビタール麻酔のみで、血中リンパ球の幼若化能の抑制が起こることが明らかとなった。これまで、*in vitro* において、ハロタンはリンパ球の幼若化能を抑制することが明らかにされている。Bruce⁴⁾ は *in vitro* でヒトのリンパ球を PHA で刺激して調べているが、その培養器内のガスにハロタンを加えると、用量依存性に DNA 合成が阻害され、そのハロタン濃度は臨床的に用いる全身麻酔時の動脈血中の濃度にほぼ匹敵していたことを報告した。Cullen⁶⁾ も同様の方法でヒトのリンパ球に対するハロタンの影響を調べている。すなわち、*in vitro* でハロタン 0.5%，1%，2% の3種類を培養器内に用いたリンパ球の幼若化能の抑制率はおよそ 1%，16%，43% であった。また、2% のハロタン中で 24，48，72，96，120 時間培養した場合、その抑制は 48 時以内に現われ、時間とともに急速に増大したと述べている。坂東⁷⁾ もヒトのリンパ球を Cullen らと同じような方法で 2% ハロタンを含む培養条件下で実験を行ない、DNA 合成が著明に抑制されたことを報告した。

in vivo についての実験もいくつかある。Duncan ら⁸⁾はマウスを用いて、*Candida albicans* を一定量筋肉内注射した群と糞便の浮遊液を腹腔内に注射した群を設け、感染防御能に対するハロタン麻酔の影響を調べた。その結果、前者に対しては影響はみられなかったが、後者ではハロタン麻酔によって死亡率が有意に増加したことから、腹膜炎などのような重度の感染がある場合にはハロタン麻酔は致死率を高める可能性があるとして述べている。

大塚¹⁸⁾はヒトの手術例で、GOF 麻酔群と頸部硬膜外麻酔群をリンパ球 PHA 反応から比較し、GOF 麻酔群では術後 2, 3 週に及ぶ抑制を認めたが、頸部硬膜外麻酔群では抑制を認めなかった。このことから、細胞性免疫の抑制は手術侵襲の大小には関連せず、GOF 麻酔時間と大きく関わっていることを報告した。

Medleau ら¹⁴⁾は 12 頭の犬で、GOF 麻酔下での卵巣子宮摘出術によるリンパ球幼若化反応を術前 24 時間目と、術後 24 時間目とで比較している。この間 8 頭の 14 サンプルについては、途中の変化も調べているが、結論として、術後 4 頭でリンパ球の ³H-チミジンの取り込みに抑制がみられたが、これは一過性のものであったと述べている。しかし、彼等は、術後 1 日目以降の変化はみていないし、Stimulation ratios (SR) を 2.0 以下に抑制したものだけを挙げている。術前に SR が 87.9 を示した犬で 24 時間後に 3.4 と 96% も低下した例でも抑制があったとは計算していないなど、いくつかその評価法には問題がある。

今回の著者らの実験では麻酔処置後 4 週間目まで観察し、ハロタンでは麻酔後 2 週間目で S.I. 値が最低になった。これは、ヒトでの大塚のハロタン麻酔の報告にみられるように、手術後 2 週間目にリンパ球の PHA に対する反応は最低値を示したこともよく類似している。

中西ら^{16,17)}は、犬にハロタン麻酔下で実験的開胸手術を施し、手術侵襲に対する細胞性免疫能の動向と術中輸血の影響の 2 群について、PHA に対するリンパ球幼若化反応を指標として検討を行っている。それらによると、術後両群とも

PHA に対するリンパ球の反応性は著明に低下し、その回復には 4 週間を要したと述べている。また、このリンパ球の反応性の推移は手術直後一旦低下したものが 1~4 日間は回復し、術後 1~2 週間目にはまた低下を示し、3~4 週目で回復するという W-wave パターンを示したと述べている。我々の実験は手術の影響を避ける目的で、全身麻酔薬のみで検討したが、中西らの成績と類似した結果を得た。このことから、ハロタン麻酔によって、リンパ球幼若化反応は強く抑制されることが確認された。

一方、ペントバルビタール麻酔によるリンパ球幼若化能は、処置後ハロタン麻酔と同様 24 時間目で低下した。その後 1 週目で幾分回復し、2 週目で再び低下したあと 3 週目で回復に向かう W-wave パターンがみられたが、ハロタンよりもその作用は弱いようであった。

Thomas ら²⁵⁾は、アカゲザルで、ケタミン、メペリジン、あるいはペントバルビタールの 3 種類の注射麻酔薬を用いて 48 時間までの細胞性免疫への影響を調べ、メペリジン群とペンバルビタール群ではリンパ球の増殖機能が低下したが、ケタミン群では抑制されなかったと述べている。

菅野²⁸⁾はヒトの血液を用いて、チオペンタール、ジアゼパム、フルニトラゼパム、ケタミン、モルヒネ、ブプレノルフィンの静脈麻酔薬を添加した in vitro の実験で免疫抑制作用を ³H-チミジン取り込み率から検討している。その結果、PHA 刺激で T リンパ球に対する ³H-チミジン取り込みが有意に抑制されたのは、チオペンタール>ジアゼパム>フルニトラゼパムの順であり、モルヒネ、ブプレノルフィンにはほとんど抑制作用はみられなかったとし、また、ケタミンは ³H-チミジンの取り込み率を逆に促進する傾向を示したと述べている。

Felsburg ら⁹⁾は、犬で全身麻酔下での外科処置によるリンパ球の幼若化能を ³H-チミジン取り込み法で調べている。すなわち、チアミラールで麻酔を導入し、メトキシフルランで維持して処置を行なった後 7 日間経過を見ている。その結果、PHA と Con A に対する幼若化能は麻酔導入後

4 時間で著明な抑制が現われ 12 時間これが持続し、4 日では正常に戻ったと述べている。しかし、我々や中西らのように 4 週間位の観察をしていないので、2 週目位で再び低下するものかどうか不明である。

以上のことから、ハロタンをはじめ、いくつかの全身麻酔薬は、それ自体細胞性免疫能を抑制する作用があること、また、ハロタンによる長時間麻酔に手術侵襲が加わればさらに免疫力は低下することが考えられる。したがって全身麻酔を犬に行なう場合には、これらの事を十分考慮して行なう必要があろう。

文 献

- 1) 坂東隆文, 柳川史忠, 木谷泰治, 藤田達士 (1974) : フローセンの免疫抑制作用, 第 1 報. 免疫適格細胞の DNA 合成阻害について. 麻酔 23(8) : 706-714.
- 2) Bauer, A.R., McNeil, C., Trentelman, E., Swift, S.A. and Mason, J.D. (1978) : The depression of T lymphocytes after trauma. Am. J. Surg., 136 : 674-680.
- 3) Berenbaum, M.C., Fluck, P.A. and Hurst, N.P. (1973) : Depression of lymphocyte responses after surgical trauma. Br. J. exp. Path., 54 : 597-607.
- 4) Bruce, D.L. (1972) : Halothane inhibition of phytohemagglutinin-induced transformation of lymphocytes. Anesthesiology, 36(3) : 201-205.
- 5) Bruce, D.L. (1975) : Halothane inhibition of RNA and protein synthesis of phytohemagglutinin-treated human lymphocytes. Anesthesiology, 42(1) : 11-14.
- 6) Cullen, B.F., Sample, W.F. and Chretien, P.B. (1972) : The effect of halothane on phytohemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes in vitro. Anesthesiology, 36(3) : 206-212.
- 7) Cullen, B.F. and van Belle, G. (1975) : Lymphocyte transformation and changes in leukocyte count : Effects of anesthesia and operation. Anesthesiology, 43(5) : 563-569.
- 8) Duncan, P.G., Cullen, B.F. and Pearsall, N.N. (1976) : Anesthesia and the modification of response to infection in mice. Anesth. Analg., 55(6) : 776-781.
- 9) Felsburg, P.J., Keyes, L.L., Krawiec, D.R. and Rubin, S.I. (1986) : The effect of general anesthesia on canine lymphocyte function. Vet. Immun. & Immunopath, 13 : 63-70.
- 10) 藤田達士 (1978) : 麻酔と免疫. 麻酔, 27 (1) : 1-14.
- 11) Kanto, J., Vapaavuori, M. and Viljanen, M.K. (1974) : Mitogen-induced lymphocyte transformation after general anesthesia. Br. J. Anesth, 46 : 733-735.
- 12) Kelly, G.E. (1980) : The effect of surgery in dogs on the response to concomitant distemper vaccination. Aust. Vet. J., 56 : 556-557.
- 13) McLoughlin, G.A., Wu, A.V., Saporoschetz, I., Nimberg, R. and Mannick, J.A. (1979) : Correlation between anergy and a circulating immunosuppressive factor following major surgical trauma. Ann. Surg., 190 : 297-304.
- 14) Medleau, L., Crowe, D.T. and Dawe, D.L. (1983) : Effects of surgery on the in vitro response of canine peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. Am. J. Vet. Res. 44(5) : 856-860.
- 15) 向田直史, 笠原 忠, 河井 忠 (1984) : リンパ球培養と ^3H -thymidine 取り込み検査. 日本臨床, 42 : 1318-1322.
- 16) 中西章男, 有沢良隆, 伊藤美貴子, 小林正人, 高崎一哉, 増永 朗, 江島博康, 黒川和雄 (1986) : 手術侵襲および術中輸血のイ

- スリンパ球幼若化反応に及ぼす影響について. 日獣大研報. 35 : 77-81.
- 17) 中西章男, 江島博康, 増永 朗, 黒川和雄 (1986) : 免疫賦活剤投与によるイヌの術後細胞性免疫能低下の防止効果. 日獣会誌. 39 : 762-766.
- 18) 大塚節子 (1984) : ハロセン麻酔による細胞性免疫の抑制. 第1報リンパ球 PHA 反応を指標とした硬膜外麻酔との比較検討. 麻酔. 33(4) : 340-347.
- 19) Park, S.K., Brody, J.I., Wallace, H.A. and Blakemore, W.S. (1971) : Immunosuppressive effect of surgery. *Lancet*. 1 : 53-55.
- 20) Sharp, J.A., Nunn, J.F. and Dixon, M.K. (1969) : Effect of halothane on the activities of mammalian cells in culture. *Br. J. Anaesth.*, 41 : 193-194.
- 21) Slade, M.S., Simmons, R.L., Yunis, E. and Greenberg, L.J. (1975) : Immuno-depression after major surgery in normal patients. *Surgery*. 78(3) : 363-372.
- 22) Sturrock, J.E. and Nunn, J.F. (1975) : Mitosis in mammalian cells during exposure to anesthetics. *Anesthesiology*, 43(1) : 21-33.
- 23) 菅野倍志 (1983) : 静脈麻酔と麻薬の免疫に及ぼす作用. 麻酔. 32(9) : 1089-1094.
- 24) 螺良英郎, 中山拓郎 (1979) : T cell mitogens による幼若化反応. 日本臨床, 37 : 57-58.
- 25) Thomas, J., Carver, M., Haisch, C., Thomas, F., Welch, J. and Carchman, R. (1982) : Differential effects of intravenous anaesthetic agents on cell-mediated immunity in the Rhesus monkey. *Clin. exp. Immunol.* 47 : 457-466.
- 26) Vose, B.M. and Moudgil, G.C. (1976) : Postoperative depression of antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity following minor surgery and anesthesia. *Immunology*. 30 : 123-128.