



# Vasodilating Effects of Antispasmodic Agents and Their Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells—Potential Application in Microsurgery

上田, 美怜

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8893号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490118>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Vasodilating Effects of Antispasmodic Agents and Their Cytotoxicity  
in Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells—  
Potential Application in Microsurgery.

抗攣縮薬の血管拡張効果と血管平滑筋細胞および内皮細胞に対する細胞毒性  
—マイクロサージャリーへの応用の可能性—

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
形成外科学  
(指導教員：寺師 浩人教授)

上田 美怜

## 論文要旨

マイクロサージャリーの血管吻合術において、術中に血管攣縮が生じることがある。この予防のために、術中に抗攣縮薬の局所散布が行われているが、薬剤の種類やその至適濃度については未だ議論があり、血管の組織自体への影響についても明らかではない。本研究では、血管抗攣縮薬の血管拡張効果と細胞毒性を解明することを目的とした。術中の血管の攣縮の背景にあるメカニズムはとても複雑であり、様々な刺激に対する反応でおこりうる。この反応は血管の直接的な操作、代謝性ホメオスタシス、内在性の傾向といったものも含まれる。これらの反応には血管を構成する細胞が大きく関わっている。動脈壁は、解剖学的構造として内膜、中膜、外膜より構成される。血管内皮細胞は内皮の重要な構成要素であり、様々な働きを担っている。血管内皮細胞は、血管緊張を調節するために多数の生物活性物質を分泌している。血管の中膜は血管平滑筋細胞の複数の層で構成されており、血管平滑筋細胞は、血管の良好なパフォーマンスに不可欠である。血管平滑筋が収縮・弛緩することにより、血管管腔の直径が変化し、血管が適切な血圧を維持できるように働く。平滑筋細胞の働きもまたマイクロサージャリー術中の血管の状態に大きな影響を与える。これらの細胞に障害が生じた場合、血管組織自体の変性をきたし、血管緊張の調節障害や血栓形成をきたす可能性がある。そして最終的に皮弁の生存を困難にする可能性がある。マイクロサージャリーにおいて術中に抗攣縮薬の局所投与が行われているが、どのような薬剤が、どのような濃度で血管の攣縮を改善するかは未だ定かではない。また血管自体への影響も明らかでなく、生理的機能に与える影響と毒性についての研究や至適濃度に関する研究はない。各種抗攣縮薬が血管に与える影響とその濃度について、ラット腹部大動脈とワイヤーミオグラフィシステムを用いて検討した。ワイヤーミオグラフィは血管平滑筋の収縮力を測定するために用いられる実験装置であり、薬物の投与における血管収縮力の変化を測定する。同装置を用いて、抗攣縮薬の有効濃度や力価を検討した。その濃度をふまえ、各種抗攣縮薬の局所投与が血管に与える影響について、ラット平滑筋細胞 (Rat Smooth Muscle Cells : 以下 RSMC)、ヒト冠動脈内皮細胞 : Human Coronary Artery Endothelial Cells : 以下 HCAEC) に対する細胞毒性を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。リドカイン、パパベリン、ニトログリセリン、フェントラミン、オルプリノンにおいて検討を行った。ワイヤーミオグラフィシステムを用いて、投与 10 分後にラット腹部大動脈切片において最大血管拡張が起こった濃度から各薬剤の薬効を求め、その周辺濃度において評価した。RSMC、HCAEC における各種薬剤の IC<sub>50</sub> は GloMax® Navigator System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定した。各試薬の濃度は、前述のワイヤーミオグラフィシステムによりラット腹部大動脈における 10 分後の最大血管拡張効果を示す濃度から力価を算出し、その濃度から設定した。一薬剤につき、コントロールを含め計 12 種類の濃度を用意し、添加後の細胞毒性について検討した。投与後 10 分で最大血管拡張効果を達成する濃度は、リドカイン 35 mM、パパベリン 0.18 mM、ニトログリセリン 0.022 mM、フェントラミン 0.11 mM、オルプリノン 0.004 mM であった。その濃度、及びコントロールを含めた 12 種類の濃度において RSMC、

HCAEC それぞれにおいて細胞毒性を検討した。IC50 はリドカイン、パパベリン、ニトログリセリンで測定され細胞毒性を認めた。リドカインでは、投与後1分の時点でRSMC、HCAECともにIC50は測定され、その値はRSMCにおいて55.3mM、HCAECにおいて24.4mMであった。投与5分でのIC50はそれぞれ27.9mMと16.8mM、投与10分ではそれぞれ16.7mM、13.5mMであった。以降では時間経過につれてIC50は低値となった。パパベリンにおいては、投与後1分の時点でRSMC、HCAECともにIC50は測定され、その値はRSMCにおいて0.10mM、HCAECにおいて0.056mMであった。60分時点では、IC50は0.0015mMとかなり低値であった。ニトログリセリンにおいてはRSMCでは投与30分以降に、HCAECでは10分以降にIC50が測定された。その値は、RSMC(30分後)で0.13mM、HCAEC(10分後)で0.035mMであった。フェントラミンとオルプリノン、RSMC、HCAEC共に測定濃度内でIC50は測定されず、細胞毒性を示さなかった。

ラット腹部大動脈においては、報告されている投与濃度よりも低濃度でも血管拡張効果が得られた。一般にはマイクロサージャリーに用いられる血管では攣縮を生じる部位は吻合部のみならず、皮弁の血管茎のいずれかで生じる場合もある。吻合部は外膜を露出させているが皮弁側に行くに従って結合組織が血管を取り囲んでおり、薬剤の浸透を妨げていることから、中膜に浸透させるためには血管内腔から投与する方が効率が高いと推測される。しかしながら我々のデータが示した様にリドカインやパパベリンは100%の弛緩率が得られる濃度においては十分に細胞毒性を示す。結果的にはこれらの薬剤を使用する場合は、内腔を灌流する使用法は避け、低濃度の薬剤を噴霧後に速やかに洗い流すなど、ごく短時間の暴露を数回繰り返すことが良いと考えられる。リドカイン、パパベリン、ニトログリセリンは低濃度でも平滑筋細胞・内皮細胞に対する細胞毒性を認めており、これらの薬剤を使用する場合には血管内腔を洗浄することは避け、表面への散布にとどめるほうがよいと考えられる。フェントラミン、オルプリノンは、抗攣縮作用を有しながらも細胞毒性を認めず、血管吻合時の抗攣縮薬として有用な選択肢となる可能性がある。さらに費用対効果についても検討した。日本における販売価格およびラット腹部大動脈における10分後の最大血管拡張効果を示す濃度当たりの金額(希釈液として10mlあたり)は、リドカイン118円、パパベリン1.59円、ニトログリセリン4.99円、フェントラミン0.18円、オルプリノン201.32円であった。医療経済的な側面からは、細胞毒性が認められないにもかかわらず十分な血管拡張作用を示したフェントラミンが望ましい血管拡張薬である。しかし、フェントラミンは強力な $\alpha$ ブロッカーであり血管吻合時における術野へ散布を行なった場合の全身への影響は定かではなく、今後さらなる研究が望まれる。生理学的な血管拡張効果の検討と、細胞毒性試験との組み合わせを行うことで、より安全な濃度設定ができると考える。

| 論文審査の結果の要旨                       |   |     |       |
|----------------------------------|---|-----|-------|
| 受付番号                             | 甲 第 3388 号  | 氏 名 | 上田 美怜 |
| 論文題目<br>Title of<br>Dissertation | <p>Vasodilating Effects of Antispasmodic Agents and Their Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells—Potential Application in Microsurgery</p> <p>抗攣縮薬の血管拡張効果と血管平滑筋細胞および内皮細胞に対する細胞毒性<br/>—マイクロサージャリーへの応用の可能性—</p> |     |       |
| 審査委員<br>Examiner                 | <p>主 査 岡田 健次<br/>Chief Examiner</p> <p>副 査 古屋敷 智之<br/>Vice-examiner</p> <p>副 査 宇田 健一<br/>Vice-examiner</p>  |     |       |

(要旨は1,000字～2,000字程度)

(背景・目的) マイクロサージャリーの血管吻合術において、術中に血管攣縮が生じることがある。この予防のために、術中に抗攣縮薬の局所散布が行われているが、薬剤の種類やその至適濃度については未だ議論があり、血管の組織自体への影響についても明らかではない。マイクロサージャリーにおいて術中に抗攣縮薬の局所投与が行われているが、どのような薬剤が、どのような濃度で血管の攣縮を改善するかは未だ定かではない。また血管自体への影響も明らかでなく、生理的機能に与える影響と毒性についての研究や至適濃度に関する研究はない。本研究では、血管抗攣縮薬の血管拡張効果と細胞毒性を解明することを目的とした。

(方法ならびに結果) 各種抗攣縮薬が血管に与える影響とその濃度について、ラット腹部大動脈とワイヤーミオグラフィシステムを用いて検討した。ワイヤーミオグラフィは血管平滑筋の収縮力を測定するために用いられる実験装置であり、薬物の投与における血管収縮力の変化を測定する。同装置を用いて、抗攣縮薬の有効濃度や力価を検討した。その濃度をふまえ、各種抗攣縮薬の局所投与が血管に与える影響について、ラット平滑筋細胞 (Rat Smooth Muscle Cells : 以下 RSMC)、ヒト冠動脈内皮細胞 : Human Coronary Artery Endothelial Cells : 以下 HCAEC) に対する細胞毒性を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。リドカイン、パパベリン、ニトログリセリン、フェントラミン、オルプリノンにおいて検討を行った。ワイヤーミオグラフィシステムを用いて、投与 10 分後にラット腹部大動脈切片において最大血管拡張が起こった濃度から各薬剤の薬効を求め、その周辺濃度において評価した。RSMC、HCAEC における各種薬剤の IC<sub>50</sub> は GloMax® Navigator System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定した。各試薬の濃度は、前述のワイヤーミオグラフィシステムによりラット腹部大動脈における 10 分後の最大血管拡張効果を示す濃度から力価を算出し、その濃度から設定した。一薬剤につき、コントロールを含め計 12 種類の濃度を用意し、添加後の細胞毒性について検討した。投与後 10 分で最大血管拡張効果を達成する濃度は、リドカイン 35 mM、パパベリン 0.18 mM、ニトログリセリン 0.022 mM、フェントラミン 0.11 mM、オルプリノン 0.004 mM であった。その濃度、及びコントロールを含めた 12 種類の濃度において RSMC, HCAEC それぞれにおいて細胞毒性を検討した。IC<sub>50</sub> はリドカイン、パパベリン、ニトログリセリンで測定され細胞毒性を認めた。リドカインでは、投与後 1 分の時点で RSMC、HCAEC とともに IC<sub>50</sub> は測定され、その値は RSMC において 55.3mM、HCAEC において 24.4mM であった。投与 5 分での IC<sub>50</sub> はそれぞれ 27.9mM と 16.8mM、投与 10 分ではそれぞれ 16.7mM、13.5mM であった。以降では時間経過につれて IC<sub>50</sub> は低値となった。パパベリンにおいては、投与後 1 分の時点で RSMC、HCAEC とともに IC<sub>50</sub> は測定され、その値は RSMC において 0.10mM、HCAEC において 0.056mM であった。60 分時点では、IC<sub>50</sub> は 0.0015mM とかなり低値であった。ニトログリセリンにおいては RSMC では投与 30 分以降に、HCAEC では 10 分以降に IC<sub>50</sub> が測定された。その値は、RSMC(30 分後)で 0.13mM、HCAEC(10 分後)で 0.035mM であった。フェントラミンとオルプリノンは、RSMC、HCAEC 共に測定濃度内で IC<sub>50</sub> は測定されず、細胞毒性を示さなかった。さらに費用対効果についても検討した。日本における販売価格およびラット腹部大動脈における 10 分後の最大血管拡張効果を示す濃度当たりの金額 (希釈液として 10ml あたり) は、リドカイン 118 円、パパベリン 1.59 円、ニトログリセリン 4.99 円、フェントラミン 0.18 円、オルプリノン 201.32 円であった。

(総括) 本研究はマイクロサージャリー時の血管攣縮を毒性が少なく、より安価かつ効果的に予防する薬剤を同定しようとする臨床的に大変意義深い研究である。実験系の制約を認めるものの重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。