



# Effects of phosphodiesterase-III inhibitors on sevoflurane-induced impairment of rat diaphragmatic function

上杉, 貴信

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-11-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2903

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002903>

※ 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。



【 1 7 2 】

氏 名・（本 籍） 上杉 貴信 （ 福井県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1989号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年11月 8日

【 学位論文題目 】

Effects of phosphodiesterase-Ⅲ inhibitors on sevoflurane-induced  
impairment of rat diaphragmatic function

（フォスフォジエステラーゼⅢ阻害薬がセボフルランによる  
ラット横隔膜機能不全に及ぼす効果）

審 査 委 員

主 査 教 授 横山 宏

教 授 黒田 嘉和

教 授 大北 裕

## Effects of phosphodiesterase-III inhibitors on sevoflurane-induced impairment of rat diaphragmatic function

フォスフォジエステラーゼⅢ阻害薬がセボフルランによる  
ラット横隔膜機能不全に及ぼす効果

### 【背景と目的】

横隔膜機能不全は急性呼吸不全に関連している。In vivo の動物実験では揮発性麻酔薬（ハロタン、エンフルラン、イソフルラン、セボフルラン）が横隔膜機能不全の原因となりうることを示されている。今回の研究においては横隔膜収縮力に対するハロタンとセボフルランの影響を比較することを最初の目的とした。この実験遂行のために MAC（minimum alveolar concentration）値が既知であるラットを用いて同一 MAC におけるセボフルランとハロタンの効果を比較した。一方、ドパミンやドブタミンなどの細胞内サイクリック AMP を上昇させる薬剤は横隔膜収縮能を増強することが知られている。ミルリノンやオルプリノンなどのフォスフォジエステラーゼⅢ（PDE-Ⅲ）阻害薬もサイクリック AMP 上昇効果を有しており横隔膜収縮力の増強が期待できる。そこで研究の第二の目的はセボフルランによる横隔膜収縮不全を PDE-Ⅲ阻害薬が軽減するかどうかを確かめることにある。もし

PDE-Ⅲ阻害薬が横隔膜機能の改善効果をもつならばサイクリック AMP レベルの上昇に関連しているか否かを調べるためにその含量を測定することとした。

### 【方 法】

この研究は健康な SD ラットから摘出した 5mm 幅の横隔膜切片（平均長：7mm、平均重量：24mg）を用い Part I と Part II に分けておこなった。Part I ではハロタンとセボフルランが横隔膜収縮能にどのような影響を及ぼすかについて検討した。70 匹のラットから横隔膜切片を摘出し 95%酸素と 5%二酸化炭素でバブリングした Krebs 液槽内に懸垂し電気刺激による等尺性収縮を記録した。神経刺激に対する間接的な収縮を排除するために予めパンクロニウムを Krebs 液に添加した。コントロール群としてまず twitch 刺激による収縮速度（dp/dtmax）と発生張力をもとめた。次に tetanus 刺激（10～100Hz）に対する発生張力を記録した。横隔膜に疲労負荷（20 Hz の刺激を 1 秒毎に 0.5 秒ずつ 5 分間）をかけた後に twitch 及び tetanus 刺激による収縮能を観察した。ハロタン（1.1% (= 1MAC), 2.2%, 3.3%）またはセボフルラン（2.2% (= 1MAC), 4.4%, 6.6%）で飽和した Krebs 液に交換し同様の方法にて疲労負荷前後の横隔膜切片の収縮能を記録した。なお液槽内は実験中各濃度のハロタンまたはセボフルランを通気して平衡を維持した。Part I の

## 【結 果】

実験においてセボフルラン 3MAC (6.6%) が疲労横隔膜の収縮力を顕著に低下させることが判明した (結果の項を参照)。この結果の解釈のため、さらに別のラットから横隔膜を摘出し (n=18)、ハロタン (3MAC) またはセボフルラン (3MAC) の曝露下、非曝露下で 5 分間の疲労試験を施行後、横隔膜を直ちに凍結保存した。後日これらの横隔膜に含まれるサイクリック AMP 量 (単位蛋白当り) を radioimmunoassay kit を用いて測定した。Part I の結果をうけて Part II ではセボフルランによって引き起こされた疲労負荷後の横隔膜収縮不全をミルリノンとオルプリノンが軽減するかどうかを検討した。摘出横隔膜 (n=30) を 3MAC (6.6%) のセボフルランで飽和した Krebs-Henseleit 液槽内に懸垂し 20microL の生理食塩水または同量のミルリノン (最終濃度 1.5 microg/mL) かオルプリノン (最終濃度 0.02 microg/mL) を添加し Part I の実験と同様に twitch 及び tetanus 刺激に対する収縮能の評価をおこなった。Part II 実験の結果解釈のために別のラットから横隔膜を摘出し (n=18)、生理食塩水、ミルリノン (最終濃度 1.5 microg/mL)、オルプリノン (最終濃度 0.02 microg/mL) のうちいずれかを含んだ Krebs 液槽内でセボフルラン (3MAC) の曝露下に 5 分間の疲労試験を施行後、横隔膜を直ちに凍結保存した。後日サイクリック AMP 量 (単位蛋白当り) を測定した。なお測定された発生張力は横隔膜切片の断面積で割り標準化した。統計処理は one-way ANOVA 及び repeated measures ANOVA を用い  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

Part I (ハロタンとセボフルランの横隔膜収縮能に及ぼす影響) : 疲労前の横隔膜ではハロタンやセボフルランは高濃度でも dp/dtmax や twitch、tetanus 刺激による発生張力に影響しなかった。コントロール (麻酔薬非曝露) 群において横隔膜疲労を起こすと収縮能は低下したが、ハロタン (1~3MAC) や 1~2MAC のセボフルランの曝露はさらに収縮能を低下させるということにはなかった。一方、3MAC のセボフルランは疲労した横隔膜における dp/dtmax、単収縮張力、tetanus 刺激による張力を著明に低下させた。ハロタン群と異なり 3MAC のセボフルラン群では疲労横隔膜の細胞内サイクリック AMP 含量に有意な低下が見られた。

Part II (ミルリノンとオルプリノンのセボフルランによる横隔膜収縮能不全に対する効果) : 疲労横隔膜において 3MAC のセボフルランで引き起こされた収縮能の著明な低下を臨床血中濃度レベルのオルプリノンが軽減した。ミルリノンでは効果がなかった。またオルプリノンはセボフルラン曝露下における疲労横隔膜のサイクリック AMP レベルの低下を回復した。ミルリノンにはこれに対する効果も見られなかった。

## 【考 察】

イヌを用いた *in vivo* 実験において 1~2MAC のハロタン曝露では疲労の有無を問わず横隔膜の収縮力は低下しないことが報告されている。これと同様に、今回の研究ではハロタン (1~3MAC) はラット横隔膜の収縮能に影響を与えなかった。ミオシンの架橋形成は筋肉において収縮力を作り出す原動力であるが、筋の収縮力は 1 個のミオシン架橋形成によって生じる力とミオシンの架橋形成数に依存する。ラット横隔膜の筋切片を用いた他の研究ではハロタンはミオシンの架橋形成に動力的変化を及ぼさないことが示されている。

Ide らは横隔神経刺激を用いたイヌの実験で 1~2MAC のセボフルランによって横隔膜の収縮力が低下すると報告している。彼らはセボフルランの収縮力抑制作用は横隔膜脚の収縮障害で神経筋伝達障害によるものであろうと推察している。今回の実験では 3MAC のセボフルランにより疲労横隔膜の収縮速度、単収縮力、テタヌス刺激時の張力が抑制され、1~2MAC では抑制は見られなかった。これは神経刺激による横隔膜収縮ではなく横隔膜切片に対する直接の電気刺激を用い興奮収縮連関部位へ効果を検討するという方法論の違いによるものであろう。

横隔膜疲労に関して多数のメカニズムが提唱されている。ひとつは筋細胞の活動伝播速度の遅延であり、他に滑面小胞体からのカルシウムイオンの取り込みや放出の障害、細胞内エネルギーに関わる

活性酸素の増加などがある。セボフルランはスーパーオキシドを生成することが知られている。このセボフルランによる活性酸素産生がセボフルランによって引き起こされる疲労横隔膜の収縮障害に関与しているのかもしれない。サイクリック AMP の蓄積は疲労横隔膜に対して陽性変力作用を有していたが、これには滑面小胞体におけるカルシウムイオンポンプの活性化、カルシウムイオン流入の増加、細胞内カルシウムイオン交換の変化、ナトリウム-カリウムイオン輸送、ミオシンリン酸化を介した陽性変力作用が関与していると考えられる。セボフルランがイヌの心筋内のサイクリック AMP レベルを低下させることが報告されている。今回の実験でも横隔膜のサイクリック AMP 含量はセボフルラン曝露で低下しておりセボフルランはサイクリック AMP を介した経路を抑制することによって疲労横隔膜の収縮機能低下を増強させているのかもしれない。

イヌの *in vivo* 実験ではミルリノンとオルプリノンが疲労横隔膜の収縮能を改善すること及びオルプリノンはミルリノンよりもその効果が強いことが示されている。この報告と同じく我々もオルプリノンはセボフルラン使用下の疲労横隔膜に対して収縮改善効果を示したがミルリノンではそれが見られなかった。先の報告ではオルプリノンの収縮能増強効果のメカニズムはアミノフィリンと同様に細胞膜を介したカルシウムイオンの移動が強く関与していると思われるが、ミルリノンの効果はこの作用には無関係のようであると考察している。我々はオルプリノンがセボフルラン使用下の横隔膜細胞

## 【結 論】

今回の結果は高濃度のセボフルランがハロタンと異なり横隔膜疲労に伴う収縮力の低下を増強することを示唆している。また横隔膜疲労が起こりやすいと考えられる様々な状況においてセボフルラン吸入の不利な点をオルプリノンが克服できることを示唆している。

内サイクリック AMP 含量をコントロールレベルまで上昇させることを示した。しかしミルリノンにはこの作用が見られなかった。この2剤のサイクリック AMP 濃度に及ぼす効果の違いが何に基づくものかは判らないが、サイクリック AMP の上昇と収縮能の改善に相関関係が見られることは非常に興味深い。オルプリノンにおいてはサイクリック AMP を介した経路が何らかの形で疲労横隔膜の収縮力改善に寄与していると思われる。

呼吸筋疲労は临床上大きな問題となる人工呼吸器からの離脱困難に関係する。横隔膜疲労は敗血症や気道抵抗の増加、肺のコンプライアンスの低下や標準的でない手術体位など、あらゆる臨床上の場面で起こりうる。横隔膜疲労はおそらくセボフルランの使用により悪化する。ハロタンではなく高濃度のセボフルランを用いることは横隔膜疲労が起こりやすい状況では不利益となるだろう。セボフルランの横隔膜収縮能低下作用は重要と思われるが、麻酔臨床の場面で3 MAC もの高濃度のセボフルランを患者の自発呼吸下に使用する機会は頻度としては低い。我々は呼吸筋易疲労状態にある患者に対してセボフルランを使用せざるを得ない状況においてはオルプリノンの横隔膜収縮力に対する陽性変力作用が有利に働くことが考えられる。今回の研究の臨床意義はここにある。しかし、in vitro の実験データを単純に臨床に結び付けてはならない。

## 論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第 1992 号	氏 名	上杉 貴信
論文題目 Title of Dissertation	Effects of phosphodiesterase-III inhibitors on sevoflurane-induced impairment of rat diaphragmatic function  フォスフォジエステラーゼⅢ阻害薬がセボフルランによるラット横隔膜機能不全に及ぼす効果		
審査委員 Examiner	主 査 横山 光宏 Chief Examiner 副 査 黒田 嘉和 Vice-examiner 副 査 大塚 孝 Vice-examiner		
審査修了日	平成 18 年 10 月 18 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

横隔膜機能不全は急性呼吸不全に関連している。In vivo の動物実験では揮発性麻酔薬（ハロタン、エンフルラン、イソフルラン、セボフルラン）が横隔膜機能不全の原因となりうることを示されている。今回の研究においては横隔膜収縮力に対するハロタンとセボフルランの影響を比較するために MAC (minimum alveolar concentration) 値が既知であるラットを用いて同一 MAC におけるセボフルランとハロタンの効果を比較した。一方、ドパミンやドブタミンなどの細胞内サイクリック AMP を上昇させる薬剤は横隔膜収縮能を増強することが知られている。そこで研究の第二の目的はセボフルランによる横隔膜収縮不全をミルリノンやオルプリノンなどの PDE-Ⅲ阻害薬が軽減するかどうかを確かめ、その機序にサイクリック AMP レベルの上昇が関与しているか否かを調べた。

## (方法)

本研究は健康な SD ラットから摘出した 5mm 幅の横隔膜切片を用いておこなった。Part I ではハロタンとセボフルランが横隔膜収縮能にどのような影響を及ぼすかについて検討した。ラット横隔膜切片を摘出し、酸素化した Krebs 液槽内に懸垂し電気刺激による等尺性収縮を記録した。あらかじめバンクロニウムを Krebs 液に添加した。コントロール群としてまず twitch 刺激による収縮速度 (dp/dtmax) と発生張力をもとめた。次に tetanus 刺激 (10～100Hz) に対する発生張力を記録した。横隔膜に疲労負荷 (20 Hz の刺激を 1 秒毎に 0.5 秒ずつ 5 分間) をかけた後に twitch 及び tetanus 刺激による収縮能を観察した。ハロタン (1.1% (=1MAC), 2.2%, 3.3%) またはセボフルラン (2.2% (=1MAC), 4.4%, 6.6%) で飽和した Krebs 液に交換し、同様の方法にて疲労負荷前後の横隔膜切片の収縮能を記録した。さらに別のラットから横隔膜を摘出し、ハロタン (3MAC) またはセボフルラン (3MAC) の曝露下、非曝露下で 5 分間の疲労試験を施行後、横隔膜を直ちに凍結保存した。後日横隔膜サイクリック AMP 量 (単位蛋白当り) を radioimmunoassay kit を用いて測定した。Part II ではセボフルランによって引き起こされた疲労負荷後の横隔膜収縮不全をミルリノンとオルプリノンが軽減するかどうかを検討した。摘出横隔膜を 3MAC

172  
(6.6%) のセボフルランで飽和した Krebs-Henseleit 液槽内に懸垂し、20microL の生理食塩水または同量のミルリノン（最終濃度 1.5 microg/mL）かオルプリノン（最終濃度 0.02 microg/mL）を添加し、twitch 及び tetanus 刺激に対する収縮能の評価をおこなった。さらに別のラットから横隔膜を摘出し、生理食塩水、ミルリノン（最終濃度 1.5 microg/mL）、オルプリノン（最終濃度 0.02 microg/mL）のうちいずれかを含んだ Krebs 液槽内でセボフルラン（3MAC）の曝露下に 5 分間の疲労試験を施行後、横隔膜を直ちに凍結保存した。後日サイクリック AMP 量（単位蛋白当り）を測定した。なお測定された発生張力は横隔膜切片の断面積で割り標準化した。統計処理は one-way ANOVA 及び repeated measures ANOVA を用い  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### (結果)

Part I（ハロタンとセボフルランの横隔膜収縮能に及ぼす影響）：疲労前の横隔膜ではハロタンとセボフルランは高濃度でも  $dp/dt_{max}$  や twitch、tetanus 刺激による発生張力に影響しなかった。コントロール（麻酔薬非曝露）群において横隔膜疲労を起こすと収縮能は低下したが、ハロタン（1~3MAC）や 1~2MAC のセボフルランの曝露はさらに収縮能を低下させるということとはなかった。一方、3MAC のセボフルランは疲労した横隔膜における  $dp/dt_{max}$ 、単収縮張力、tetanus 刺激による張力を著明に低下させた。ハロタン群と異なり 3MAC のセボフルラン群では疲労横隔膜の細胞内サイクリック AMP 含量に有意な低下が見られた。

Part II（ミルリノンとオルプリノンのセボフルランによる横隔膜収縮能不全に対する効果）：疲労横隔膜において 3MAC のセボフルランで引き起こされた収縮能の著明な低下を臨床血中濃度レベルのオルプリノンが軽減した。ミルリノンでは効果がなかった。またオルプリノンはセボフルラン曝露下における疲労横隔膜のサイクリック AMP レベルの低下を回復した。ミルリノンにはこれに対する効果も見られなかった。

#### (考察)

今回の研究ではハロタン（1~3MAC）はラット横隔膜の収縮能に影響を与えなかった。ラット横隔膜の筋切片を用いた他の研究でのハロタンはミオシンの架橋形成に動力学的変化を及ぼさないという成績と一致する所見である。

一方、今回の実験では 3MAC のセボフルランにより疲労横隔膜の収縮速度、単収縮力、テタヌ刺激時の張力が抑制され、1~2MAC では抑制は見られなかった。

横隔膜疲労に関して多数のメカニズムが提唱されている。ひとつは筋細胞の活動伝播速度の遅延であり、他に滑面小胞体からのカルシウムイオンの取り込みや放出の障害、細胞内エネルギーに関わる活性酸素の増加などがある。セボフルランはスーパーオキシドを生成することが知られている。このセボフルランによる活性酸素産生がセボフルランによる疲労横隔膜の収縮障害に関与しているのかもしれない。今回の実験でも横隔膜のサイクリック AMP 含量はセボフルラン曝露で低下しておりセボフルランはサイクリック AMP を介した経路を抑制することによって疲労横隔膜の収縮機能低下を増強させているのかもしれない。

我々の研究でオルプリノンはセボフルラン使用下の疲労横隔膜に対して収縮改善効果を示しセボフルラン使用下の横隔膜細胞内サイクリック AMP 含量をコントロールレベルまで上昇させることを示した。しかしミルリノンにはこのような作用は見られなかった。オルプリノンにおいてはサイクリック AMP を介した経路が何らかの形で疲労横隔膜の収縮力改善に寄与していると思われる。

呼吸筋疲労は臨床上大きな問題となる人工呼吸器からの離脱困難に関係する。横隔膜疲労は敗血症や気道抵抗の増加、肺のコンプライアンスの低下や標準的でない手術体位など、あらゆる臨床上の場面で起こりうる。横隔膜疲労はおそらくセボフルランの使用により悪化する。麻酔臨床の場面で 3MAC もの高濃度のセボフルランを患者の自発呼吸下を使用する機会は頻度としては低いが、我々は呼吸筋易疲労状態にある患者に対してセボフルランを使用せざるを得ない状況においてはオルプリノンの横隔膜収縮力に対する陽性変力作用が有利に働くことが考えられる。しかし、in vitro の実験データを単純に臨床に結び付けてはならない。



本研究は横隔膜疲労に伴う収縮力の低下に及ぼすセボフルランとハロタンの影響を比較し、その増悪をPDEⅢ阻害薬が軽減できるかを研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかった横隔膜疲労に伴う収縮力低下が高濃度のセボフルランによって増強し、オルプリノンによって軽減することを示し、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。