

平成 21 年 3 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18390431
研究課題名（和文）慢性タバコ喫煙による気道過敏性亢進モデルを用いた麻酔薬の影響と機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms and actions of anesthetics on hyperreactive airway in chronic cigarette-smoking model

研究代表者

山蔭 道明 (Yamakage Michiaki)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：70285005

研究成果の概要：

本研究は、気道過敏性を伴った患者に対する吸入麻酔薬の影響とその機序について検討したものである。肺気腫モデルにおいてセボフルランは弛緩抵抗性を示した。機序として平滑筋組織の弛緩抵抗性が明らかにされ、さらに細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下が減弱し、カルシウムチャネル活性の抑制が減弱した。このチャネル活性の変化はセボフルランによる cyclic AMP レベル上昇作用の抑制が影響していると考えられた。本研究は、吸入麻酔薬の効果が弱い疾患における細胞レベルでの機序を解明したものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	9,500,000	2,850,000	12,350,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：タバコ、気道平滑筋、気道過敏性、静脈麻酔薬、吸入麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

臨床的に気道過敏性が亢進し、問題となる疾患として気管支喘息とは異なった分類とされる慢性閉塞性肺疾患

(COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease) がある。本疾患は、肺気腫と慢性気管支炎に代表され、そのほとんどが喫煙患者である。男性喫煙者が減少する一方、若年女性による喫煙率が上昇し、また本疾患は喫

煙歴数十年を経て発症するため、超高齢者社会を迎えた現在、COPDを合併し、手術を受けられる患者は急増している。簡便に測定できる肺機能検査では、その割合は500万人を超えるとされ、生活習慣病である糖尿病患者数に匹敵する割合である。本疾患に対する種々の麻酔薬の影響を観察し、その機序を解明し、さらにそのエビデンスに則った対応ならびに新薬の開発は、麻酔の安全性と信頼性を維持・向上させるために非常に重要な課題である。さらに、本邦においては、現在、新しい麻酔薬（麻薬性鎮痛薬レミフェンタニル、筋弛緩薬ロクロニウム、筋弛緩拮抗薬Org 25969など）の臨床治験が活発に行われ、ここ数年で臨床応用される予定である。これらすべての臨床治験に治験責任医師として参加し、その使用に熟知しているため、それら麻酔薬に関しても基礎研究を行い、その反応性ならびに機序について知見を得ることは、臨床上極めて重要であり、かつ急務な課題と考える。では、異種抗原を用いて過敏性を亢進させた気管支喘息を用いて本研究を遂行することは可能であろうか？予備実験で、気道の過敏性が慢性たばこ喫煙モデルと麻酔薬の反応性が異なることが明らかになった（Iwasaki S, Yamakage M, et al.: *Anesthesiology* 2004; 101: A1520, Yamakage M, et al.: *Anesthesiology* 2005; 102: A1411）。実験的肺気腫モデルとして、植物由来酵素による肺胞の破壊モデル、オゾンによる肺胞破壊モデル、肺気腫自然発生モデル、トランスジェニックモデルなどが報告されているが、もっとも臨床に近く病態を反映しているのは、煙草喫煙モデルであるとされる（Wright JL, et al: *Chest* 2002; 121: 188S-191S）。たばこには、4700にもわたる有害または作用のない物質が含まれているため、正確にCOPDの代表疾患である病態を反映するのは喫煙そのものがもっともよいモデルであると考えられる。

2. 研究の目的

現在、麻酔の臨床で広く用いられている麻酔薬、とくに吸入麻酔薬は気道過敏性に種々の影響を与えることが観察されている〔山蔭道明ほか. 麻酔（総説）1993; 42: 1578-86, Yamakage M, et al. *Curr Opin Anesthesiol* (Review) 1994; 7: 531-5〕。臨床の現場では、吸入麻酔薬以外にも静脈麻酔薬や他の作動薬を多

い、また気道確保のための気管挿管操作など機械的刺激によっても気道過敏性が変化するため、それらの影響について観察、機序を解明することは重要な課題であった。この点についても、多くの研究が積極的になされ、研究報告されている〔Yamakage M. *Br J Anaesth* (Review) 2002; 88: 624-7〕。機序としては、主にカルシウムチャンネルの抑制を介した種々のセカンドメッセンジャー伝達の抑制と解釈することができる〔Yamakage M, et al. *Can J Anesth* (Review) 2002; 49: 151-64, Yamakage M, et al.: *J Anesth* (Review) 2003; 17: 251-8〕。

本研究の主目的は、気道過敏性研究を行う際に最もヒトと近いとされるモルモットに定量投与可能となるたばこ曝露システム（ハンプルグII, パナファームラボラトリーズ）を用いて、肺気腫や慢性気管支炎の代表的組織像である炎症細胞の浸潤と肺胞拡大が得られるモデルを確立し、同様にすでに確立した閉塞性のスパイログラムを示す喘息モデルと比較検討することで、種々の麻酔薬の閉塞性疾患に対する気道過敏性変化に対する影響を観察し、さらにその機序を究明することである。

3. 研究の方法

研究動物として体重約250gの雌性Hartleyモルモットを使用した。無作為に2群に分け、急性オバラミン曝露群と（n=108）と長期タバコ曝露群（n=104）とした。急性オバラミン曝露群は、腹腔内にオバラミンを投与し、さらに15日後にオバラミンを吸入させた。対照群（n=52）として生理食塩水を同様に腹腔内・吸入投与した。長期タバコ曝露群は、1日に1時間、週に5日間、計150日（5ヶ月間）、主流煙を曝露した。タバコ曝露器としてMIPS社（大阪）のModel INH06-CIGR01を用いた。タバコはhi-liteTM（ニコチン1.4mg, タール17mg）を用いた。対照群（n=52）は同様に容器内に設置したが、タバコの代わりに空気を同期間吸入させた。

それぞれの群から無作為に4匹ずつ抽出した。腹腔内にウレタン（1.5g/kg）を投与し、麻酔下で瀉血死させた。気管と肺を一塊にして摘出し、10%ホルマリンを気管・肺内に一定の圧で注入した。48時間固定の後、パラフィンで3μmの厚さで切り出し、HE染色した。光学顕微鏡で末梢気道と肺胞の状態を観察した。

腹腔内にウレタンを投与して麻酔を行い、角膜反射と逃避反射が消失するように追加投与した。気管切開し、気管チューブを挿入した。モルモットは仰臥位に四肢を固定し、人工呼吸器で換気した。吸入器酸素濃度は30

〜35%とした。胸腔内圧を測定するために、内腔を水で満たしたカテーテルを食道内に挿入した。Transpulmonary pressure (肺圧差)は、胸腔内圧と気道内圧差で測定し、同時に気流を測定することによって R_L と $C_{D_{yn}}$ を測定した (PULMOS-II, MIPS)。気道過敏性を確認するために、アセチルコリン (1.0〜6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を静脈内投与した。これを1プロトコル終了した後に、セボフルラン 0.5 最小肺泡濃度 (MAC: minimum alveolar concentration, 0.5 MAC = 1.0% : モルモット) 曝露し、その上でアセチルコリンを再度投与した。本プロトコルをその後 1.0, 1.5, 2.0 MAC で同様に行った。

腹腔内にウレタンを投与し、瀉血死させた。気管と肺を一塊にして摘出し、気管周囲の結合組織を除去した後、気管をリング状に摘出し、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2/AM を室温下で5時間負荷した。その後、気管リング標本を 37°C の恒温槽内に設置した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は蛍光光度計 CAF-100 (日本分光, 東京) を用いた。340 nm と 380 nm 励起による 500 nm 蛍光強度の比 ($R_{340/380}$) を用いて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とした。予備実験で求めたカルバコールによる ED_{50} で収縮させた後、セボフルランを負荷した。

VGCC を通る内向き電流を nystatin を用いた perforated whole-cell パッチクランプ法で測定した。 Ca^{2+} によるチャネル抑制を防ぐために、charge carrier として 5 mM の Ba^{2+} を用いた。気管平滑筋組織を細かく刻み、コラゲナーゼを含む Tyrode 液に入れ、37°C で 120 分間インキュベートした。得られた細胞は KB 溶液に入れ、実験に使用した。ピペットを平滑筋細胞表面に接触させ、陰圧で高シールを得た後、陰圧を解除し、5〜15 分かけてパッチ膜を電氣的に導通させた。膜電流は CEZ-2400 パッチアンプ (日本光電, 東京) で測定した。細胞を ED_{50} 濃度のカルバコールで刺激した後、その状態でセボフルランを投与した。

上記の方法と同様、結合組織と軟骨を除去し、気管平滑筋組織を得た。それぞれのモデルにおける ED_{50} 濃度のカルバコールで刺激した後、セボフルランを負荷した。5 分間の負荷後、平滑筋組織を液化窒素で急速凍結した。平滑筋組織は Hanks 溶液中でホモジナイズして、一部はタンパク定量のために使用した。ホモジナイズした組織を 10 分間遠心分離し、Amplex マイクロカラムを用いて溶出した。気管平滑筋組織の cyclic AMP レベルは Biotrak cyclic AMP enzyme im-

munoassay system を用いて測定した。

4. 研究成果

対照群ならびに急性オバラミン曝露群は正常の肺構造を示した。好酸球やマクロファージのような炎症細胞の明らかな増加は認めなかった。長期タバコ曝露群においても炎症細胞の明らかな増加は認めなかったが、末梢細気管支ならびに肺泡の破壊と拡大が著明に認められた。

対照群において、アセチルコリンは濃度依存性に R_L を上昇させ、 $C_{D_{yn}}$ を低下させた。急性オバラミン曝露群では、アセチルコリンに対する感受性が亢進し、また吸入オバラミンによって一過性に R_L の上昇と $C_{D_{yn}}$ の低下を認めた。長期タバコ曝露群では、 R_L はアセチルコリンによる刺激前より高い値を示し、かつアセチルコリンに対しても感受性が高かった。 $C_{D_{yn}}$ はそれほど変化しなかった。吸入麻酔薬セボフルランを投与すると、対照群ならびに急性オバラミン曝露群では良好な R_L 低下作用を示したが、長期タバコ曝露群ではその作用が有意に小さかった。

摘出気管平滑筋標本を用いた本研究においても、急性オバラミン曝露群ならびに長期タバコ曝露群でカルバコールによる濃度-収縮曲線は対照群と比較して左方移動していた。カルバコール (ED_{50}) による気管平滑筋の収縮と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、セボフルランに対し対照群と急性オバラミン曝露群では濃度依存性かつ強力な抑制作用を示した。長期タバコ曝露群においても抑制効果は認められたが、他群と比較して極めて小さい作用であった。

Perforated whole-cell パッチクランプ法を用いて観察された Ba^{2+} 電流 (I_{Ba}) はカルバコールの投与によって有意に抑制された。対照群ならびに急性オバラミン曝露群においては、この条件下でセボフルランは有意にかつ濃度依存性にピーク I_{Ba} を抑制した。長期タバコ曝露群でもこの抑制効果は認められたが、その抑制程度は他の2群と比較して有意に小さかった。

ED_{50} 濃度のカルバコールによる刺激は、すべての群で cyclic AMP レベルを低下させ、群間に差は認めなかった。この条件下でセボフルランを負荷すると、濃度依存性にどの群においても cyclic AMP レベルは上昇したが、その程度は長期タバコ曝露群が他群と比較して小さかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Yamakage M, Iwasaki S, Jeong S-W, Satoh J-I, Namiki A: Beta-1 selective adrenergic antagonist landiolol and esmolol can be safely used in patients with airway hyperreactivity. *Heart Lung* 2009; 38(1): 48-55. (査読: 有)
- ② Yamakage M, Takahashi K, Takahashi M, Satoh J-I, Namiki A: Performance of four carbon dioxide absorbents in experimental and clinical settings. *Anaesthesia* 2009; 64(3): 287-92. (査読: 有)
- ③ 山蔭道明: 気道-喫煙の基礎医学. 治療学 2009; 43(2): 157-62. (査読: 無)
- ④ Yamakage M, Iwasaki S, Namiki A: Guideline-oriented perioperative management of patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Anesth* 2008; 22(4): 412-428. (査読: 有)
- ⑤ Yamakage M, Iwasaki S, Satoh J-I, Namiki A: Inhibitory effects of alpha-2 adrenergic agonists clonidine and dexmedetomidine on enhanced airway tone in ovalbumin-sensitized guinea pigs. *Eur J Anaesthesiol* 2008; 25(1): 67-71. (査読: 有)
- ⑥ Yamakage M, Namiki A: Anesthetic practice in Japan - past, present, and future-. *J Anesth* 2007; 21(3): 390-5. (査読: 有)
- ⑦ 山蔭道明: 麻酔科学の展望-麻酔科領域における最近の話題. *AMICUS: 札幌医科大学医学部同窓会誌* 2007; 18/19: 133-7. (査読: 無)
- ⑧ Uzuki M, Yamakage M, Fujimura N, Namiki A: Direct inotropic effect of the beta-2 receptor agonist terbutaline on impaired diaphragmatic contractility in septic rats. *Heart Lung* 2007; 36(2): 140-7. (査読: 有)

- ⑨ Yamakage M, Hirata N, Saijo H, Satoh J-I, Namiki A: Analysis of the compositions of original and generic sevoflurane in a routine use. *Br J Anaesth* 2007; 99(6): 819-23. (査読: 有)
- ⑩ Iwasaki S, Yamakage M, Satoh J-I, Namiki A: Different inhibitory effects of sevoflurane on airway smooth muscle contractility in ovalbumin-sensitized and chronic cigarette-smoking guinea pig models. *Anesthesiology* 2006; 105(4): 753-63. (査読: 有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 日本臨床麻酔学会第 28 回大会 (京都) 2008. 11. 20-22
高橋和伸, 山蔭道明, 高橋三佳, 並木昭義:
第 3 世代ソーダライムの特性評価
- ② The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. Orlando, USA. Oct. 18-22, 2008.
Takahashi K, Yamakage M, Takahashi M, Satoh J-I, Namiki A: Performance of four kinds of CO₂ absorbents in vitro experimental and in vivo clinical practices. *Anesthesiology* 108: A283, 2008.
- ③ The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. Orlando, USA. Oct. 18-22, 2008.
Satoh J-I, Yamakage M, Namiki A: Effects of rapid exposure of sevoflurane and isoflurane on the airway tone in ovalbumin-sensitized guinea pigs. *Anesthesiology* 108: A1192, 2008.
- ④ 日本麻酔科学会第 55 回大会 (横浜) 2008. 06. 12-14
山蔭道明: シンポジウム (5) たばこにまつわる問題. 「麻酔・手術前禁煙: その効果と outcome」
- ⑤ The 14th World Congress of Anaesthesiologists. Cape Town, South Africa. March 2-7, 2008.
Yamakage M, Hirata N, Satoh J-I, Namiki A: Analysis of the composition of original and generic sevoflurane in routine use.
- ⑥ 日本麻酔科学会第 54 回大会 (札幌)

2007.06.01-03

山蔭道明：ランチョン講演 (3) 「笑
気を考える」

- ⑦ 日本麻酔科学会第 54 回大会 (札幌)
2007.06.01-03
山蔭道明：ランチョン講演 (29) 「プ
ロボフォルムを考える」

[図書] (計 5 件)

- ① 山蔭道明：1. 揮発性吸入麻酔薬の物
理化学的性質，薬理作用および特徴。
A. 吸入麻酔薬の種類と薬理作用。II。
吸入麻酔薬の薬理。第 3 章。麻酔に
必要な基礎知識。麻酔実践テキスト。
武田純三，森田茂穂編。南江堂出版，
東京 2008，p. 56-9.
- ② 山蔭道明，佐藤順一：VI. 人工呼吸
管理で 사용되는記号，略語とその
解説。よくわかる人工呼吸管理テキ
スト (改訂第 4 版) 並木昭義，氏家
良人編。南江堂，東京，2007，p.
340-56.
- ③ 山蔭道明，佐藤久仁子：6) 呼気の炭
酸ガス濃度曲線からどんなことがわ
かるのですか？8) 呼気麻酔ガス濃
度モニターの見方，注意点について
教えてください。II：呼吸モニター。
ナーシングケア Q & A⑮「モニタリ
ング Q & A」。天羽敬祐，川村隆枝編。
総合医学社，東京。2007，p. 16-7，
20-1.
- ④ 山蔭道明：第 6 章。呼吸器系への薬
理作用。II。麻酔の基本原則。ミラ
ー麻酔科学 (第 6 版翻訳) 「Miller'
s Anesthesia, 6th edition. Ed. by
Miller RD」。メディカル・サイエン
ス・インターナショナル，東京。2007，
p. 125-51.
- ⑤ 山蔭道明：2. 気道過敏性を有する患
者の呼吸管理。臨床各論。周術期の
呼吸管理。西野 卓編。克誠堂出版，
東京。2007，p. 165-83.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：耳式体温測定装置における LED
点灯制御装置
発明者：山蔭 道明

権利者：バイオエコーネット
種類：特許願
番号 2008-110276
出願年月日：2008 年 4 月 21 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山蔭 道明 (Yamakage Michiaki)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：70285005

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし