

平成21年5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591807

研究課題名（和文）局所麻酔薬中毒による痙攣に関する研究

研究課題名（英文）The mechanism of local anesthetics induced convulsion

研究代表者

鬼塚 信（ONIZUKA SHIN）

宮崎大学・医学科・助教

研究者番号：20264393

研究成果の概要：局所麻酔薬はNaチャンネルだけでなくKチャンネル、Caチャンネルもブロックすることがわかった。さらに、それぞれのチャンネルをブロックする濃度は細胞により異なり、KチャンネルがNaチャンネルやCaチャンネルよりブロックされた場合、脱分極し興奮することがわかった。試験管内における抑制性シナプスを用いた実験では、シナプス伝達はシナプス前細胞の膜電位に依存することがわかった。シナプス前細胞が過分極している場合は、シナプス後電位は大きいですが、局所麻酔薬でシナプス前細胞が脱分極している場合は、シナプス後電位は小さくなり消失した。これは、神経伝達物質分泌に影響するカルシウムチャンネルの膜電位依存性の不活化によることがわかった。また、シナプス後細胞におけるアセチルコリン受容体電流は、局所麻酔薬によって有意に抑制された。

以上の結果から、局所麻酔薬中毒による痙攣は、個々の細胞の興奮性の増加し、シナプス伝達が遮断されることが原因であると結論した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：リドカイン、アセチルコリン、抑制性シナプス、パッチクランプ

## 1. 研究開始当初の背景

誤って血管内に局所麻酔薬を大量に投与すると、局所麻酔薬中毒による痙攣を引き起こす。局所麻酔薬は末梢神経のNaチャンネルをブロックして伝導を抑制する

ので、伝導抑制の考えから、局所麻酔薬による中枢の興奮作用は、抑制細胞の抑制が原因と報告された（Tanaka K, Yamasaki M. Nature 209: 207-8, 1966. Wagman IH et al. Anesthesiology 28:

155-72, 1967)。最新の教科書 (Strichartz GR, Berde CB: Local anesthetics p573-603 edited by Miller RD) でも、興奮系の関与や、伝達物質の関与についての記述が加えられているが、抑制系の抑制が痙攣を引き起こし、抑制系と興奮系の両方が抑制されることで、中枢神経全体の抑制がもたらされるとする考えは変わっていない。

日本では、手術にも局所麻酔薬の使用が多く、最近では、国外でも使用が増え、局所麻酔の有効性が認められている (Schulz-Stubner S et al. Crit Care Med 33: 1400-7, 2005.)。このため、作用の強さや時間に関する臨床使用の研究が多くなされている。安全性について、末梢神経毒性に対する研究も国内・国外を問わず多い (Drasner: Reg Anesth Pain Med 27: 576-80, 2002. Sekimoto et al. Anesth Analg 103: 608-14, 2006)。一方、中枢の興奮性に関しては、細胞体の興奮性や、シナプスを介した比較をした報告は少なく、安全な局所麻酔薬の開発のためにも、局所麻酔薬の中枢作用の研究が必要であると考えられる。

研究代表者らは、局所麻酔薬中毒による痙攣の興奮系の関与について (Kasaba T, et al. Reg Anesth Pain Med 23: 71-6, 1998)、また局所麻酔薬の神経毒性について報告してきた (Kasaba T et al. Anesth Analg 97:85-90, 2003. Onizuka S et al. Anesthesiology 102:353-63, 2005)。これらの実験の中で、局所麻酔薬のリドカインは、中枢神経培養細胞を濃度依存性に興奮させ、細胞内のCaイオンやNaイオンを増加させることを報告した (Onizuka S et al. Anesthesiology 101: 110-9, 2004)。さらに、抑制性の抑制が興奮をもたらすとのかを確かめるために、抑制性のシナプスを形成しているRPeD1とVD4の細胞を用いて、ディッシュ内に細胞体・細胞体の抑制性のシナプスを形成し、それに対するリドカインの作用を調べた (Onizuka S et al. Anesth Analg 100:175-82, 2005)。そこでも、リドカインは、濃度依存性に、シナプス前細胞もシナプス後細胞も、発射頻度を増加させることを報告した。これらのことから、局所麻酔薬中毒による痙攣には、抑制細胞の抑制だけでない別の機序の可能性が考えられた。局所麻酔薬が、神経細胞を濃度依存性に興奮させるなら、興奮作用の増大が痙攣に関係すると考えら

れる。痙攣は多数の神経細胞の同期した興奮であり、痙攣の機序を明らかにするためには、多数の細胞の興奮を同時記録する必要がある。そこで、ディッシュ上に多数の微小電極を張り巡らせ、その各点で多点記録ができるマルチ電極を用いて記録した。しかしながら、神経節の個々の神経細胞は、リドカインの濃度を増加させると、増加したり、減少したり、多彩な反応を示した。さらに、群発発射も記録され、痙攣と類似した活動も認められた。これらのことから、ネズミやネコでの脳波を測定するように、水棲かたつむりの中枢神経節で、細胞外電位を記録すると、多くの細胞から活動電位の頻度変化と痙攣に関係した脳波波形が記録できることがわかった。

局所麻酔薬は末梢神経の伝導をブロックすることから、局所麻酔薬による中枢の興奮作用は、抑制細胞の抑制が興奮をもたらすと報告されてきた。研究代表者らは、中枢神経培養細胞を用い、局所麻酔薬が直接細胞体を興奮することを報告した。マルチ電極を用い神経節にフィードバックして調べたところ、これまでの個々の細胞の反応が、神経節内の細胞にはそのままあてはまらないことが認められた。さらに、痙攣に類似した群発発射が認められ、痙攣の機序を明らかにできる実験系と考えられた。これまでの個々の細胞体の興奮とチャネルの抑制の結果をもとに、神経節内での群発発射が認められる時点での細胞の反応性を調べることは、局所麻酔薬の痙攣が、抑制系の抑制だけでなく、興奮系も含め、局所麻酔薬の持つ興奮と抑制という2つの相反する点から明らかにできると考える。また、痙攣を、アセチルコリン、GABAやグルタミン酸に対する興奮と抑制作用が明らかになると、局所麻酔薬中毒の治療薬や、中枢作用が少ない局所麻酔薬の開発の糸口になる。また、近年利用されている電気痙攣療法との違いや類似点を応用することで、中枢性疾患に対する薬物療法の可能性にもつながる。

## 2. 研究の目的

中枢神経節の発射活動を微小電極で記録しながら、リドカインの濃度を上昇させてRPeD1とVD4細胞の興奮性の変化を細胞内記録で比較する。特に、群発発射を示すときのNa, Ca, K電流に着目し、これまでのNa, Ca, Kチャネルの抑制と群発発射の興奮作用との

ギャップの関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

当教室の実験室で飼育している水棲かたつむりで体長が15-20 mmのものを用いる。水棲かたつむりの殻を除去し、背側から切開すると中枢神経節を露出できる。中枢神経節を水棲かたつむり用生理食塩液で満たしたディッシュに取り出す。生理食塩液の組成は、NaCl 51.3 mM; KCl 1.7mM; CaCl<sub>2</sub> 4.1 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.5mM; Hepes 10mM, pH 7.9である。局所麻酔薬のNaチャンネル、Kチャンネル、Caチャンネルへの影響をホールセル・パッチクランプ法を用いて測定し解析した。シナプス前細胞をVD4、シナプス後細胞をLPeD1という個々の同定された細胞を用いてアセチルコリンを神経伝達物質とする興奮性化学シナプスあるいはドーパミンを神経伝達物質とする抑制性化学シナプスを作製し、それぞれの細胞に電極を挿入し、ホールセルパッチクランプ法で解析した。すなわち、神経節内の神経細胞の電位を記録するため、パッチクランプシステム (axopatch 200B

axon 社製)を用いる。ポリ-L-ライシン (Sigma) でディッシュの表面をコーティングして用いる。個々の神経細胞を電極上に接触するように置き、シナプスを形成するように培養する。シナプス前およびシナプス後それぞれ神経細胞にパッチクランプ用微小電極を接合しギガオームシールを形成後、細胞膜を吸引し、ホールセルモードにした上で、後神経活動の記録部位を確認する。

シナプス接合部に微小圧噴射装置 (IM-300、ナリシゲ社製)を用いて、アセチルコリンなどの神経伝達物質を噴射し、その反応をホールセルパッチクランプ法で記録する。

さらに、シナプス前細胞 (VD4) に電流を注入し脱分極させることで、神経伝達物質を放出させこれに対するシナプス後細胞の興奮性膜電位変化 (EPSP) あるいは抑制性膜電位変化 (IPSP) をシナプス前細胞の膜電位と同時に記録する。

シナプス前後の細胞をそれぞれ電圧固定し、電位依存性 Na、K、Ca 電流を測定した。

### 4. 研究成果

パッチクランプ法による解析で、局所麻酔薬はNaチャンネルだけでなくKチャンネル、Caチャンネルもブロックすることがわかった。さらに、それぞれのチャンネルをブロックする濃度は細胞により異なり、KチャンネルがNaチャンネルやCaチャンネルよりブロックされた場合、脱分極し興奮することがわかった。

試験管内における抑制性シナプスを用いた実験では、シナプス伝達はシナプス前細胞の膜

電位に依存することがわかった。すなわち、シナプス前細胞が過分極している場合は、シナプス後電位は大きい、局所麻酔薬でシナプス前細胞が脱分極している場合は、シナプス後電位は小さくなり消失した。これは、神経伝達物質分泌に影響するカルシウムチャンネルの膜電位依存性の不活性化によることがわかった。

また、シナプス後細胞におけるアセチルコリン受容体電流あるいはドーパミン受容体電流は、局所麻酔薬によって有意に抑制された。以上の結果から、局所麻酔薬中毒による痙攣は、ある濃度では個々の細胞の興奮性が増加するとともに、シナプス伝達が遮断されることが原因であると結論した。

### 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2件)

① Onizuka S, Kasaba T, Takasaki M. The effect of lidocaine on cholinergic neurotransmission in an identified reconstructed synapse. *Anesth Analg.* 107:1236-42. 2008, 査読あり.

② Onizuka S, Kasaba T, Tamura R, Takasaki M. Lidocaine Increases the Intracellular Na<sup>+</sup> Concentration through Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase in an Lymnaea Neuron. *Anesth Analg.* 106:1465-72. 2008 査読あり.

[学会発表] (計2件)

① 鬼塚 信, 田村隆二, 三浦弘樹, 恒吉勇男: リドカインの腫瘍細胞増殖抑制および致死機序の解明-細胞周期からのアプローチ、日本麻酔科学会第55回学術集会、2008年6月12日、横浜市

② Shin Onizuka, Kouki Yamashita, Ryuji Tamura, Isao Tsuneyoshi: Lidocaine depolarizes the mitochondrial membrane potential by proton trapping in an lymnaea neuron. 2008 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. 2008年10月31日 Orland, USA.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鬼塚 信 (ONIZUKA SHIN)  
宮崎大学・医学科・助教  
研究者番号：20264393

### (2) 研究分担者

柏田 政利 (KASHIWADA MASATOSHI)  
宮崎大学・医学科・助教  
研究者番号：20336316

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書