

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19791073

研究課題名 (和文) 細胞内リドカイン濃度およびシナプス伝導に対する比重の影響

研究課題名 (英文) Effect of lidocaine on intra-cellular pH and synaptic transmission on identified recombinant synapse in *Lymnaea stagnalis*

研究代表者

細川 信子 (HOSOKAWA NOBUKO)

宮崎大学・医学科・助教

研究者番号： 10418840

研究成果の概要： 脊髄くも膜下麻酔に用いる高比重液と等比重液では、作用発現に違いがあることが報告されている。その比重の調節にはグルコースが用いられている。そこで水棲カタツムリの神経細胞を用いて、脊髄くも膜下麻酔に用いるグルコースの局所麻酔増強作用と細胞内 pH の関係を研究した。作用発現の違いの機序を明らかにするため、グルコースの添加が細胞内 pH と Na 電流に及ぼす影響を調べた。その結果、細胞内 pH はグルコース濃度依存性に低下し、2 分後の細胞内 Δ pH はリドカイン単独群に比べ 3%グルコース群が有意に低かった。また Na 電流もグルコース濃度依存性に抑制され、リドカイン単独群と他の群間で有意差がみられた。このことから、高比重液では、グルコースが細胞内 pH を低下させることで麻酔作用を増強していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,200,000	0	3,200,000
2008 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	60,000	3,460,000

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、細胞内 pH、電位依存性ナトリウム電流

1. 研究開始当初の背景

系尿道的内視鏡手術などの医療技術の発達により、高齢者に対して、低侵襲性の短時間手術が行われることが多くなった。その、麻酔法として脊椎麻酔が選択されることが多いが、最大麻酔域の発現が速く、循環動態の

変動が少ないことが安全性を高めると考える。脊椎麻酔に使用する局所麻酔薬に等比重液および高比重液があるが、その臨床における薬効は異なる。等比重液の方が高比重液と比較して持続時間が長く、広がり大きいという報告がある (Kokki ら, Br J Anaesth 81:

502-6, 1998) (Malinovsky ら, *Anesthesiology* 91: 1260-6, 1999)。われわれも、等量 (2ml) の 0.5% マーカインの等比重液および高比重液を用いて比較したところ、最大麻酔域が発現するまでの時間は等比重液の方が高比重液と比較して長く、収縮期血圧の最低値、心拍数の最低値は、等比重液の方が高比重液と比較して低く、およびそれらが発現するまでの時間は、等比重液の方が高比重液と比較して長かった (日本臨床麻酔学会、1-P13-9, 2006, 旭川市)。しかし、その機序は明確でない。Denson らは、パッチクランプを用いた実験で、比重の違いで Na^+ コンダクタンスが変化する。このことが脊椎麻酔に使用する局所麻酔薬の比重の違いによる薬効の違いを生じるとしている (Denson ら, *Biopharm Drug Dispos* 2:367-80, 1981)。これに対して、Ummenhofer らは、脊椎モデルを作製し、比重の異なる局麻薬に着色し、実際に臨床で使用する脊髄麻酔針で脊髄モデルに注射したところ、高比重液は脊髄モデルの底部、すなわち仙骨部の方に停滞したのに対して、高比重液は穿刺部から上下に拡散した。さらに、それぞれの密度を色素に対する吸光度法で測定したところ、高比重液の方が有意に高かった。そこで、この脊髄腔内における分配の違いが原因であるとしている。局所麻酔薬の薬効に影響する因子の 1 つに局所麻酔薬の細胞内濃度がある。当教室において、局所麻酔薬感受性微小電極を用いた実験で、局所麻酔薬の細胞内濃度と、活動電位の抑制は相関することが報告されている (矢野ら、*Anesth Analg* 102: 1734-8, 2006)。研究代表者らも、局所麻酔薬感受性微小電極を用いて、水棲カタツムリの単離神経細胞に比重の違う等濃度のリドカインを灌流したところ、等比重リドカイン (比重: 1.010) は、高比重リドカイン (比重: 1.040) と比較して、細胞内に移行するリドカインの濃度が高くなることが示唆された。

Kriebel らは、シナプスにおける miniature endplate potentials (微小終盤電位=MEPPs) すなわち、シナプス末端における神経伝達物質の自発的放出による微小 EPSP の頻度が、高比重液を灌流することで 100 倍以上増加すると報告している (Kriebel ら, *Neuroscience* 71:101-17, 1996)。これが、事実とすれば、高比重液の灌流によって、神経興奮性が高まり、局所麻酔薬が効きにくくなるのではないかと予想する。使用する水棲カタツムリの脳神経細胞は、脳自体が哺乳類と比較して非常に単純であるために、個々の神経細胞の性状がイオンチャネルを含め同定されており、これらの細胞を個々に摘出し培養することが可能である。また、個々に摘出した細胞を用いてアセチルコリンなど特定の伝達物質を介したシナプスを 2 個の細胞で構築し、再現

することが可能である。さらに、特定の 2 個の細胞で再構築したシナプスは微小終盤電位 (MEPPs) もよく観察できる。

本研究の学術的な特色は、局所麻酔薬の比重の違いが、細胞内に移行する局所麻酔薬濃度に影響するという報告は見あたらない。さらに、これがシナプス伝達においてシナプス前、シナプス後に影響する割合を測定した報告はない。独創的な点は、局所麻酔薬の比重の違いによる薬効の違いを、局所麻酔薬の細胞内濃度の違いという明確な指標で考察する点、および、2 個のシナプス前後細胞から成る最も単純なシナプスを構築して局所麻酔薬の比重の違いがシナプス前細胞とシナプス後細胞に作用する割合を測定する点である。予想される結果は、等比重液の方が細胞内の局麻薬濃度が高くなり、細胞内の局麻薬濃度と相関して、内向き Na^+ 電流も抑制される。この機序として、比重が高い方が、細胞膜透過性が低くなるあるいは、細胞内 pH が高くことが予想される。シナプスにおいては、灌流液の比重が低くなると、シナプス後電位 (EPSP) は抑制されるがシナプス後細胞に対しては、神経伝達物質による膜電位変化は灌流液の比重には影響されない。すなわち、灌流液の比重のちがいはシナプス前細胞の伝達物質放出に影響すると予想する。MEPPs も高比重液では、その発生頻度 (frequency) および電位は増加すると予想する。以上の結果、等比重の局所麻酔薬の方が、細胞内濃度が高くなり、シナプス伝導も高比重液と比較して抑制されるので、結果的には作用時間が長くなると予想する。しかし、標的細胞にこれらの噴射した場合は局所麻酔薬を噴射した場合、広がりの違いから、異なる結果が得られる可能性もある。これらの結果の臨床における意義は、局所麻酔薬の比重による麻酔作用効果を解明することで作用時間や血行動態の予測が可能となり、手術の程度、患者の状態に応じた使い分けが可能となる。

2. 研究の目的

細胞内の局所麻酔薬の濃度に関与する因子として細胞内 pH がある。そこで、細胞内 pH の変化を細胞内 pH 指示薬 BCECF/AM を用いて測定する。まず、灌流液の比重だけを変えて、細胞内 pH を測定し、つぎに、リドカインを添加して細胞内 pH の変化を測定する。また、脊髄は、前根と後根のシナプスを形成する場所でもある。これまでの実験は個々の細胞の活動電位や電流でのみ論じられてきたが、シナプスに対する比重の違いによる影響の報告例はない。その第一の理由は、細胞や軸索が複雑に入り組んでいる哺乳類の脊髄において、シナプスを形成しているシナプス前後を区別して同定することは困難なためであ

る。そこで、同定されている2個のシナプス前後細胞を用いてシナプスを再構築し、局所麻酔薬の比重の違いによるシナプス前後それぞれに対する影響を観察する。

3. 研究の方法

(1) 麻酔薬の比重の違いによる神経細胞への細胞内透過性を局所麻酔薬感受性微小電極法で測定する。

(2) 灌流液の比重の違いによる Na^+ コンダクタンスの変化をパッチクランプ法で測定する。灌流液の比重の違いによる細胞内 pH の変化を蛍光 pH 指示薬法で測定する。

(3) 局所麻酔薬の比重の違いによるシナプス伝達への影響を単離神経再構築シナプスにおいてシナプス後電位 (EPSP) 神経伝達物質にたいする膜電位および微小終盤電位 (MEPPs) を細胞内記録法で測定する。

方法の概要

水棲カタツムリより中枢神経節を摘出し、さらに、中枢神経細胞の visceral dorsal4 (VD4) 細胞を個々に摘出、培養し (1)、リドカイン感受性電極法を用いて、細胞内リドカイン濃度を測定する。細胞外にリドカイン (10mM) の低比重 (比重: 1.000)、等比重 (比重: 1.010)、高比重液 (比重: 1.040) を灌流し、細胞内リドカイン濃度を測定する。低比重液はリドカインを Lymnaea 用生理食塩水に溶解する。等比重液はリドカインを 6% グルコース含有 Lymnaea 用生理食塩水に溶解する。高比重液はリドカインを 10% グルコース含有 Lymnaea 用生理食塩水に溶解する。それぞれの溶液の比重、PH は (2)、ホールセル・パッチクランプ法を用いて、 Na^+ 電流を測定し、電流-電圧曲線、不応期曲線 (steady-state inactivation curve) を作製する。リドカインによる Na^+ 電流のコンダクタンスを測定する。(3)、BCECF/AM を用いて細胞内 pH を測定する。

方法の詳細

(1) リドカイン感受性電極法: リドカイン感受性電極は、98.2% ニトロフェノールオクチルエーテル (NPOE)、1.8% ポリ塩化ビニル、2mM タングステン酸、2mM リドカインを水酸化フランに溶解し、これを 10M Ω の微小電極先端に充填して作製する。電極内液には、4M KCl 溶液を充填する。それ

ぞれのリドカイン感受性電極は、細胞内液 (50mM KCl、5mM NaCl、5mM HEPES、pH7.2) 下でリドカイン (0.01~10mM) に対する校正曲線を作成する。リドカイン感受性電極で測定した電圧には、細胞内リドカイン濃度とともに、細胞膜電位も加算されているので、細胞膜電位分を除算する必要がある。このため、細胞膜電位測定用の 4M KCl 溶液を満たした微小電極を細胞内に挿入する必要がある (図5)。細胞内のリドカイン濃度測定は、リドカイン感受性電極電圧から膜電位を除算した電圧をリドカイン (0.01~10mM) に対する校正曲線に参照して細胞内リドカイン濃度を決定する。

(2) ホールセル・パッチクランプ法: ホールセル・パッチクランプ法を用いて、 Na^+ 電流を測定する (図6)。 Na^+ 電流測定用灌流液 (40 mM NaCl、10 mM TEA-Cl、4.0 mM MgCl₂、1.0 mM CaCl₂、1.0 mM 4-aminopyridine、1.0 mM CdCl₂、10 mM HEPES pH7.9) にグルコースを添加し、比重を一致する。 Na^+ 電流測定用セシウム溶液をピペット溶液とし (50 mM CsCl、5 mM EGTA、5 mM MgCl₂、10 mM HEPES、2 mM ATP-Mg、0.1 mM GTP-Tris、pH7.2)、-100mv に電圧固定し、-120mV~+40mV 間で、50mSec、10mV ステップパルスにて Na^+ 電流を取得する。電流-電圧曲線をプロットし、コントロールおよびリドカイン灌流後の Na^+ 電流のコンダクタンスを測定する。

(3) BCECF/AM を用いた細胞内 pH の蛍光イメージング: 細胞内の pH を BCECF/AM (Molecular probes 製) による蛍光イメージング法で測定する (図7)。BCECF/AM (200nM) を蛍光イメージング用培養デッシュに添加して 20°C で 1 時間培養する。励起波長は 490nm および 450nm とし、蛍光波長 535nm で画像を取得する。490nm および 450nm の蛍光比を算出し、検量線より細胞質の pH に換算する。

4. 研究成果

細胞内 pH はグルコース濃度依存性に低下し、2 分後の細胞内 Δ pH はリドカイン単独群に比べ 3% グルコース群が有意に低かった (リドカイン単独群; 1.14 ± 0.57 , 0.2%; 0.31 ± 0.42 , 1%; 0.24 ± 0.57 , 3%; -0.66 ± 0.56 , $P < 0.05$)。また Na^+ 電流もグルコース濃度依存性に抑制され、リドカイン単独群と他の群間で有意差がみられた (リドカイン単独群; $82.4 \pm 17.7\%$, 0.2%; $52.8 \pm 15.5\%$, 1%; $38.2 \pm 12.2\%$, 3%; $32.3 \pm 4.8\%$, $P < 0.05$)。

[考察] 高比重液では、グルコースが細胞内

pH を低下させることで麻酔作用を増強していると考えられた。

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0件)

[学会発表] (計1件)

三浦弘樹、細川信子、田村隆二、柏田政利、鬼塚信、谷口正彦、笠羽敏治
グルコースの局所麻酔増強作用と細胞内pHの関係. 日本麻酔科学会第55回学術集会. 2008年6月12日. 横浜市

[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

細川 信子 (HOSOKAWA NOBUKO)

宮崎大学・医学科・助教

研究者番号: 10418840

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: