

令和元年6月25日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20100

研究課題名(和文) 局所麻酔薬が細胞内カルシウム濃度に与える影響についての研究

研究課題名(英文) Do local anesthetics increase intracellular calcium concentration?

研究代表者

大月 幸子(Otsuki, Sachiko)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：90774018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性高熱症(malignant hyperthermia; MH)は、骨格筋における細胞内カルシウム濃度(Ca²⁺)の異常上昇により引き起こされる遺伝性の筋疾患である。これまで、局所麻酔薬による筋毒性の報告がされてきたが、その主な原因として細胞内Ca²⁺濃度の上昇が考えられている。今回、MH素因者の骨格筋に局所麻酔薬を負荷した際の細胞内Ca²⁺動態について研究した。MH素因者の骨格筋にリドカイン、レボプビバカイン、ロピバカインを負荷した際の細胞内Ca²⁺動態は、健常者と比較して有意差はなかった。このことから、MH素因者にも局所麻酔薬の使用を控える必要はないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に局所麻酔薬はMH素因者にも安全に使用できると言われているが、これまで筋毒性についての報告はされてこなかった。今回の研究で、MH素因者にも健常者と同様に局所麻酔薬を使用できると考えられた。使用できる麻酔薬の種類が限定されるMH素因者において、局所麻酔薬を使用できるということは、MH素因者だけでなく医療者においても非常に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Malignant hyperthermia (MH) is an inherited muscle disorder caused by abnormal elevations of intracellular calcium (Ca²⁺) in skeletal muscle. There are several reports of myotoxicity caused by local anesthetics, and the increased intracellular Ca²⁺ is considered to be an important cause. However, there is insufficient evidence regarding myotoxicity in MH-susceptible individuals when large doses of local anesthetics are administered. This study investigated the effect of MH predisposition on myotoxicity using human skeletal muscles. We calculated the 50% effective concentration (EC₅₀) values of three local anesthetics, namely lidocaine, levobupivacaine, and ropivacaine using the ratiometric dye Fura-2 AM.

These EC₅₀ values were similar in individuals with and without MH predisposition. Therefore, we consider that extra caution is not warranted when using local anesthetics in MH-susceptible individuals.

研究分野：麻酔

キーワード：悪性高熱症 局所麻酔薬 筋毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症(malignant hyperthermia; MH)は、常染色体優性遺伝の潜在的な筋疾患で、発症率は約 10 万例に 1 例と稀ではあるが、死亡率が 15%もある致死的な疾患である。揮発性吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬により誘発され、その発症機序は薬剤への暴露により骨格筋細胞質内の Ca^{2+} が上昇することである。これには、筋小胞体の Ca 放出チャネルである 1 型リアノジン受容体 (RYR1)の関与が考えられている。アミド型局所麻酔薬の使用は、局所麻酔や硬膜外麻酔、脊髄くも膜下麻酔では MH 素因者にも安全であるとされているが、アミド型局所麻酔薬による骨格筋細胞毒性は 1970 年代から報告され、その原因として骨格筋細胞内の Ca^{2+} 上昇が関与していることが判明してきた。またこの骨格筋毒性は、MH の特効薬であるダントロレンにより抑制され、RYR1 のアゴニストであるカフェインにより抑制されることから、RYR1 の関与が考えられている。最近では、末梢神経ブロックが全身麻酔での併用や術後疼痛管理の手段として、その有用性が再認識され、長時間・多量の局所麻酔薬が使用されるようになってきた。潜在的に骨格筋細胞内 Ca^{2+} の調節障害がある MH 素因者では、リドカインやレボブピバカイン、ロピバカインといった局所麻酔薬を使用した際、正常者の骨格筋に比べより低濃度で骨格筋細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇すると予想される。MH 素因者が末梢神経ブロックを安全に受けるために、局所麻酔薬は MH 素因骨格筋でも使用可能かどうか、および使用できる適正な局所麻酔薬の濃度について検討する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

MH 素因があるヒト培養骨格筋細胞を用い、 Ca^{2+} 調節機能に対するアミド型局所麻酔薬の効果を分析し、MH 素因者への安全な投与方法と有用な併用薬剤の検討を行う。

3. 研究の方法

当院で MH の素因診断(Ca-induced Ca release ; CICR 速度検査)を行った 22 名を対象とし、亢進していた 14 名を MH 素因のある亢進群、非亢進であった 8 名を MH 素因のない非亢進群として 2 群に分けた。大腿四頭筋や上腕三頭筋から生検を行い、素因診断後の余剰筋を研究に使用した。Dulbecco 's modified Eagle 's medium (DMEM)で 37 度 5%CO₂ 下で 2-3 週間培養し、2-10% の FBS を加えた DMEM でさらに 2 週間培養し、筋管細胞(myotubes)への分化を誘導した。myotube の同定は形態学的に行った。myotube にカルシウム蛍光指示薬である Fura2/AM を 5 μ M 負荷後、340、380nm の 2 波長で励起し、測定は 510nm で行った。試薬を負荷した際の 340/380nm の蛍光強度比を測定して細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を検討した。測定は現有の装置(蛍光倒立顕微鏡とカルシウム画像解析装置(アクアコスモス))を使用した。37 度の HBSS で灌流し、Ratio 340/380 を算出する。Ratio340/380 から Ca^{2+} 濃度への換算は、 Ca^{2+} キャリアレーションキット (Invitrogen™) より得られた検量線から行った。まず、筋管細胞の性質を確認するために、純粋な RYR1 activator である Caffeine と 4-chloro-m-cresol (4-CmC)を負荷した。次に、10mM のカフェインで細胞内 Ca^{2+} が上昇した細胞を RYR1 が発現した細胞と判断し、局所麻酔薬の負荷に使用した。局所麻酔薬はリドカイン、レボブピバカイン、ロピバカインを使用した。局所麻酔薬を負荷した際の用量反応曲線からそれぞれの 50%効果濃度(EC₅₀)を求めた。値は平均値 \pm 標準偏差で表し、統計学的検討は t 検定で行い、P 値<0.05 を有意とした。



図 1) myotubes

4. 研究成果

今回研究に使用した myotube は、負荷したカフェインとクレゾールの濃度が上昇するにつれ、すべての細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。亢進群と非亢進群の EC₅₀ は、それぞれカフェインが 3.11 ± 0.54 mM, 4.85 ± 0.64 mM (P<0.0001), クレゾールが 144.8 ± 30.7 μ M, 249.8 ± 34.3 μ M (P<0.0001)であった。この結果から、今回使用した CICR 亢進群の myotube は MH 素因があると考えられた。また、局所麻酔薬の EC₅₀ は、リドカインが亢進群 1.52 ± 0.72 mM, 非亢進群 1.75 ± 0.37 mM (p=0.42), レボブピバカインが亢進群 0.72 ± 0.36 mM, 非亢進群 0.79 ± 0.46 mM (p=0.68), ロピバカインが亢進群 1.21 ± 0.35 mM, 非亢進群 1.62 ± 0.57 mM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

($p = 0.06$)で、いずれの局所麻酔薬でも有意差はなかった。

MH 素因者では健常者と比較し、細胞内 Ca^{2+} 濃度がより上昇すると考えられたが、実験では有意差はなく、MH 素因者でも局所麻酔薬の使用を控える必要はないと考えられた。

骨格筋の小胞体において、RYR1 の周辺には様々な蛋白が存在している。中でも L 型電位依存性 Ca チャネルである DHPR と RYR1 は密接に関与しており、小胞体からの Ca の放出を調節している。今回の実験では、カフェインとクレゾールの EC_{50} では亢進群と非亢進群で有意差が出たのにも関わらず、局所麻酔薬では有意差がでなかった。局所麻酔薬が RYR1 のみに作用するのであれば、カフェインとクレゾールと同様に局所麻酔薬の EC_{50} にも有意差が出たと考えられることから、局所麻酔薬が細胞内 Ca 濃度を上昇させる機序には、RYR1 のみならずその他のさまざまな Ca 調節機構が関与していることが考えられた。

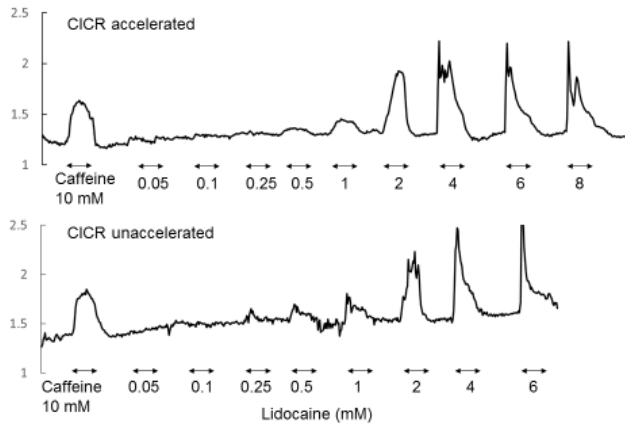


図 2) リドカインを負荷した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度

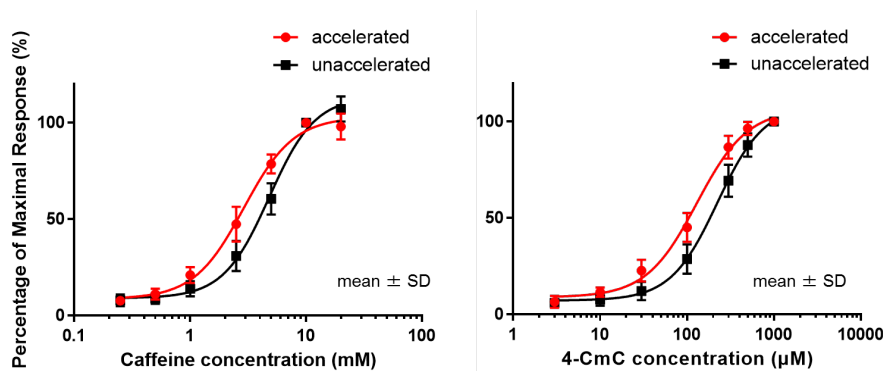


図 3) カフェインと 4-CmC の用量反応曲線

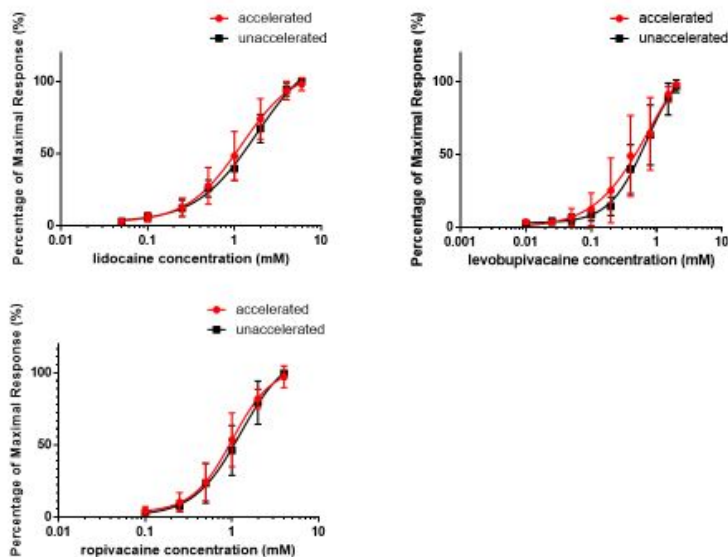


図 4) 各局所麻酔薬の用量反応曲線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

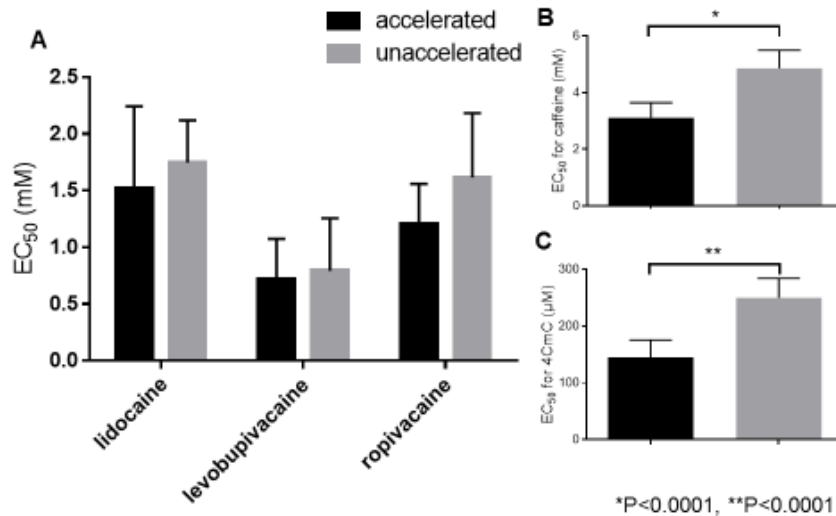


図5) 各局所麻酔薬のEC50

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Otsuki S, Yasuda T, Mukaida K, et al. Myotoxicity of local anesthetics is equivalent in individuals with and without predisposition to malignant hyperthermia
Journal of Anesthesia, 32(4): 616-623, 2018.

DOI 10.1007/s00540-018-2526-4

査読有

[学会発表](計 1 件)

発表者 大月幸子

発表標題 悪性高熱症素因骨格筋のカルシウム代謝に及ぼすアミド型局所麻酔薬の影響

学会名 日本麻酔科学会 第63回学術集会

発表年 2016年

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 安田 季道

ローマ字氏名: Toshimichi Yasuda

研究協力者氏名: 向田 圭子

ローマ字氏名: Keiko Mukaida

研究協力者氏名: 野田 祐子

ローマ字氏名: Yuko Noda

研究協力者氏名: 神崎 理英子

ローマ字氏名: Rieko Kanzaki

研究協力者氏名: 三好 寛二

ローマ字氏名: Hirotsugu Miyoshi

研究協力者氏名: 近藤 隆志

ローマ字氏名: Takashi Kondo

研究協力者氏名: 濱田 宏

ローマ字氏名: Hiroshi Hamada

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

研究協力者氏名：河本 昌志

ローマ字氏名：Masashi Kawamoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。