

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11065

研究課題名(和文) 局所麻酔薬の神経細胞毒性においてT型カルシウムチャネルが果たす役割の解明

研究課題名(英文) The role of T-type calcium channel in the neurotoxicity of local anesthetics

研究代表者

藤原 祥裕 (FUJIWARA, YOSHIHIRO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70238640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を通じて以下のことが解明された。1. 局所麻酔薬ブピバカインは用量依存性、時間依存性にSH-SY5Y細胞の生存率を低下させる。2. 各種イオンチャネル阻害薬の中で、T型カルシウムチャネル阻害薬NNC55-0396のみがブピバカインの神経毒性を著明に増強する。3. ブピバカインによる神経毒性はカスパーゼ3活性の上昇、ミトコンドリア膜電位の脱分極、細胞内活性酸素の上昇を伴っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所麻酔薬の潜在的神経毒性は脊髄くも膜下麻酔後の馬尾症候群や神経ブロック後の神経障害の原因と考えられており、早急に解決されるべき問題である。本研究では神経細胞に対するブピバカインのアポトーシス誘導作用の機序についていくつかの新しい知見を得ることができた。これらの結果は今後局所麻酔薬の神経毒性作用を抑制する方策を探求するうえで極めて有用であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Bupivacaine produced cytotoxicity in SH-SY5Y cells in dose and time dependent manner. T-type calcium channel antagonist, NNC55-0396 markedly enhanced cytotoxic effect of bupivacaine. Apoptosis induced by bupivacaine was associated with induction of caspase-3, depolarization of mitochondrial membrane and increase in intracellular reactive oxygen species.

研究分野：麻酔

キーワード：ブピバカイン アポトーシス T型カルシウムチャネル 活性酸素 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

すべての局所麻酔薬には潜在的に神経毒性があるといわれている。この神経毒性は脊髄くも膜下麻酔後の馬尾症候群や神経ブロック後の神経障害の原因と考えられており、その発生頻度は高くはないものの麻酔後の患者の QOL を著しく低下させる可能性がある。したがって、局所麻酔薬の神経毒性の発生機序ならびにその予防法を見出すことは臨床麻酔上大きな意義がある。局所麻酔薬の神経毒性については過去にさまざまな研究が行われているが、その機序は完全に解明されていない。局所麻酔薬により神経細胞内カルシウム濃度が上昇することが神経毒性の発生に関与しているとする先行研究も存在するが、その後十分な追試はおこなわれていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SH-SY5Y ヒト神経芽腫細胞における局所麻酔薬プロピバカインの神経毒性作用機序を、とくに各種イオンチャネル阻害との関連、細胞内外カルシウム濃度環境の影響、細胞内 Caspase3 活性、活性酸素、ミトコンドリア膜電位に焦点を当てて解明することである。さらに、ミトコンドリア膜電位を維持する作用を有する ATP 感受性カリウムチャネル開口薬ジアゾキサイドの影響についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

SH-SY5Y ヒト神経芽腫細胞を、100 単位 /ml ペニシリン、100  $\mu$  g/ml ストレプトマイシンおよび 10 %胎仔ウシ血清を含む MEM と Hams F12 の混合培養液 ( MEM / F12; 1 : 1 ) を用いて、37 °C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて培養する。その後プロピバカイン 0.1 から 10 mM 濃度で培養液に投与し、1 - 12 時間放置する。細胞をトリプシン ( 0.25 EDTA 1mM ) で処理し、次いで  $5 \times 10^4$  細胞を 96 ウェルプレートに播き、一晚培養した後、MTT assay を用いて細胞生存率を測定する。同様の実験を、各種イオンチャネル阻害薬を添加して行い、プロピバカインの神経細胞毒性に対するこれらの薬剤の影響を調べる。同時に Ac-DEVD-AMC を用いて Caspase 3 活性、JC-1 色素を用いてミトコンドリア膜電位を測定する。さらに、ATP 感受性カリウムチャネル開口薬であるジアゾキサイドの添加がプロピバカインの神経毒性に与える影響も測定する。

## 4. 研究成果

本研究を通じて以下のことが解明された。1. 局所麻酔薬プロピバカインは用量依存性、時間依存性に SH-SY5Y 細胞の生存率を低下させる。2. 各種イオンチャネル阻害薬の中で、T 型カルシウムチャネル阻害薬 NNC55-0396 のみがプロピバカインの神経毒性を著明に増強する。3. 細胞内カルシウムキレート剤は神経毒性に影響を与えないが、細胞外カルシウムキレート剤は神経毒性を増強し、細胞外カルシウム濃度の上昇は神経毒性作用を抑制する。4. プロピバカインによる神経毒性はカスパーゼ 3 活性の上昇、ミトコンドリア膜電位の脱分極、細胞内活性酸素の上昇を伴っている。5. ミトコンドリア膜電位の脱分極を抑制する ATP 感受性カリウムチャネル開口薬ジアゾキサイドはプロピバカインの神経毒性作用に拮抗しない。

とくに T 型カルシウムチャネル阻害ならびに細胞外カルシウム濃度の局所麻酔薬神経毒性作用に及ぼす影響は新しい知見であった。カルシウムチャネルの中で T 型カルシウムチャネルのみが神経毒性作用に影響を及ぼすのは驚きであった。また、従来カルシウムは細胞毒性を増強すると考えられてきたが、本研究ではむしろ細胞保護的に作用することも予想外の結果であった。一方、プピバカインによる神経毒性作用はミトコンドリア膜電位の消失と関連していることが判明したが、ジアゾキサイドの添加はプピバカインの神経毒性作用に影響を与えることはなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1 . 発表者名 Fujiwara Y, Tanaka K, Tetsu S, Ishihara R, Aoyama H, Niwa H
2 . 発表標題 Bupivacaine induces apoptosis via blocking T-type Ca <sup>2+</sup> channels and resulting activation of mitochondrial apoptotic pathway in SH-SY5Y cells.
3 . 学会等名 Euroanaesthesia 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Ishihara R, Tanaka K, Fujiwara Y
2 . 発表標題 Diazoxide, ATP-sensitive potassium channel opener, does not affect the neurotoxicity of bupivacaine
3 . 学会等名 International Symposium of Ultrasound for Regional Anesthesia and Pain Medicine 2019 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yoshihiro Fujiwara
2 . 発表標題 Bupivacaine induces apoptosis via blocking T-type Ca <sup>2+</sup> channels and resulting activation of mitochondrial apoptotic pathway in SH-SY5Y cells
3 . 学会等名 Euroanaesthesia 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Tanaka K
2 . 発表標題 Bupivacaine induces apoptosis via inhibiting T-type Ca <sup>2+</sup> channels in SH-SY5Y cells.
3 . 学会等名 Annual Meeting of American Society Anesthesiologists 2017 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	馮 国剛  (FENG GUO-GANG)  (70351111)	愛知医科大学・医学部・講師    (33920)	