

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591709

研究課題名（和文） 局所麻酔薬の神経毒性に関する作用機序の解明

研究課題名（英文） Mechanism of Nerve Toxicity due to Local Anesthetic Agents

研究代表者

十時 忠秀 (TOTOKI TADAHIDE)

佐賀大学・名誉教授

研究者番号：20038722

研究成果の概要：

（アミトリプチリンの神経毒性メカニズムの解明）アミトリプチリンによる不可逆的神経障害の原因をそのデタージェント作用による膜破壊であるという仮説を検証するため、アミトリプチリンの分子会合濃度の定量、モデル膜を破壊するアミトリプチリン濃度の滴定、赤血球を破壊するアミトリプチリン濃度の滴定、及びラットくも膜下腔への投与によって不可逆的神経障害をもたらすアミトリプチリン濃度の定量を行った。

アミトリプチリンの分子会合濃度、モデル膜破壊濃度および赤血球破壊濃度はそれぞれ 0.46%、0.35%、0.3%であった。またラットの神経障害はアミトリプチリン 0.3%以上の濃度で認められた。

アミトリプチリンの分子会合濃度、膜破壊濃度および不可逆的な神経障害をきたす濃度がほぼ一致することからアミトリプチリンによる神経障害の機序はそのデタージェントとしての物性に深く関連していると思われた。

（ケタミンの神経毒性メカニズムの解明）ケタミンによる不可逆的神経障害の原因にデタージェント作用による膜破壊が関連しているかどうかを検証するため、水溶液中でのケタミンの分子会合濃度の定量、赤血球を破壊するケタミン濃度の滴定を行った。

ケタミンは 0.1～2.5%の濃度範囲においては分子会合体を形成しなかった。また、2.5%までの投与では溶血は認められなかった。このことから、ケタミンによる不可逆的神経毒性の発生機序は、可溶化によるものではないと推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

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：局所麻酔薬，神経障害，分子会合，可溶化，溶血，ニューロメーター，ラット

1. 研究開始当初の背景

局所麻酔法は神経伝達遮断により確実な鎮痛効果が期待できることから手術麻酔やペインクリニックで頻りに利用されている。

脊椎麻酔後の永続的な神経障害など、局所麻酔薬による神経障害は臨床上大きな問題となっている。現在のところ細胞内グルタミン酸上昇、細胞内カルシウム濃度上昇、デタージェント作用あるいはアポトーシス誘導作用などが提唱されているもののその機序は明らかではない。

抗うつ薬であるアミトリプチリンは局所麻酔薬としても臨床使用ができるのではないかと期待されているが、その一方でアミトリプチリンは不可逆的神経障害を引き起こすことも最近知られるようになった。我々はアミトリプチリンによる神経障害はそのデタージェント作用によって説明できるのではないかと考えている。

ケタミンは代表的な NMDA 拮抗薬であり、昨今その神経毒性に対して注目されているが、その機序は明らかではない。我々の手法を用いてケタミンと局所麻酔薬の毒性の関連の有無を調べることは両者の毒性機序を考える上で有益であると考えている。

我々は、局所麻酔薬の有する界面活性特性による神経細胞破壊がその機序のひとつであるという仮説を立て、臨床で使用されている局所麻酔薬について界面活性特性（分子会合、リン脂質モデル膜可溶化）発現濃度を調べ、それらが神経障害発現濃度と一致することを報告している。

2. 研究の目的

本研究は、可溶化によってモデル膜及び赤血球が破壊される濃度が、脊椎麻酔モデルラットで実際に神経障害が生じる濃度と一致するかどうかを調べることと、リン脂質モデル膜及び赤血球膜が局所麻酔薬で破壊される場合、これらを構成するリン脂質と局所麻酔薬からなる会合体が形成されていることを、生物物理学的手法を用いて証明することである。

3. 研究の方法

局所麻酔薬（アミトリプチリン）の分子会合濃度、リン脂質モデル膜や赤血球を破壊する局麻薬濃度およびラットのくも膜下腔投与で神経障害をきたす局麻薬濃度を求め比較した。

分子会合体形成の有無はイオン電極法で調べた。また、膜破壊は赤血球の溶血の有無で調べた。ヒト洗浄赤血球をあらかじめ各濃

度に調整したアミトリプチリン水溶液中に分散させ 10 分間間歇的に振盪した。その後遠心分離して得られた上澄み液の吸光度（波長 549nm）を測定から遊離ヘモグロビン量を求め溶血の程度を評価した。

ケージに固定した脊椎麻酔モデルラットにカテーテルからマイクロシリンジを用いて各濃度の薬剤を注入し 4 日間飼育した。ラットの神経障害は、ニューロメーターで求められる皮膚電流知覚閾値として定量される知覚障害の有無と、ビデオカメラで撮影したラットの歩行状態記録映像より行動異常の有無とを総合的に評価した。

代表的な NMDA 拮抗薬ケタミンについても同様の手法を用いて実験を行った。

また、合成オピオイドであるメペリジンは局所麻酔作用を有しており、この薬剤について同様の実験を行うことは我々の仮説を一般化する上で有用と思われる。本実験を行うに先立って、メペリジンの薬剤特性を臨床症例から考えた研究を行った。

さらに、いまだ明らかとなっていない局所麻酔薬ロピバカインについても、Yaksh モデルラットを用い知覚検査と歩行観察を行い、神経障害の有無およびその程度について調べた。

4. 研究成果

アミトリプチリンの分子会合濃度、モデル膜破壊濃度および赤血球破壊濃度はそれぞれ 0.46%、0.35%、0.3%であった。またラットの神経障害はアミトリプチリン 0.3%以上の濃度で認められた。

アミトリプチリンの分子会合濃度、膜破壊濃度および不可逆的な神経障害をきたす濃度がほぼ一致することからアミトリプチリンによる神経障害の機序はそのデタージェントとしての物性に深く関連していると思われる。

局所麻酔薬の分子会合濃度、リン脂質モデル膜や赤血球を破壊する局麻薬濃度およびラットのくも膜下腔投与で神経障害をきたす局麻薬濃度は一致し、可溶化作用は局麻薬による神経障害の機序のひとつであることが強く示唆された。

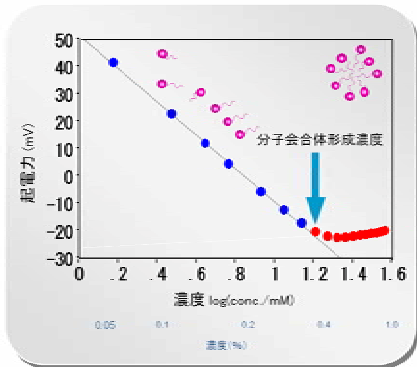
本研究の遂行にあたり、その基礎研究としてラットの神経障害をニューロメーターで測定される皮膚刺激電流閾値によって定量化する方法を確立した。

ケタミンは毒性が発現すると報告されている濃度に至っても分子会合の所見は認められなかった。

生理食塩水投与群、0.75%、1.5%ロピバカ

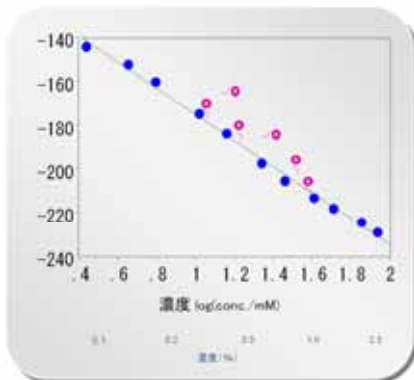
イン投与群では薬剤投与前と4日後で神経学的所見に変化は見られなかった。2%以上のロピバカイン投与群では薬剤投与4日後の評価で、無痛域が存在し、濃度依存性の電流刺激閾値の上昇および歩行状態の異常を認めた。5%リドカイン投与群では明らかな神経学的異常が認められ、その程度は2%ロピバカインに比べ重篤だった。

(図表)



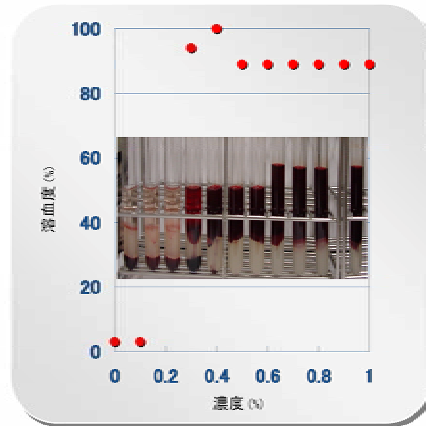
アミトリプチリンではネルンスト応答直線からのズレが0.4%で認められ、分子会合体が生じていることがわかる。

(図1) アミトリプチリンの溶液物性 (起電力 vs. 濃度; イオン電極法による) の測定例



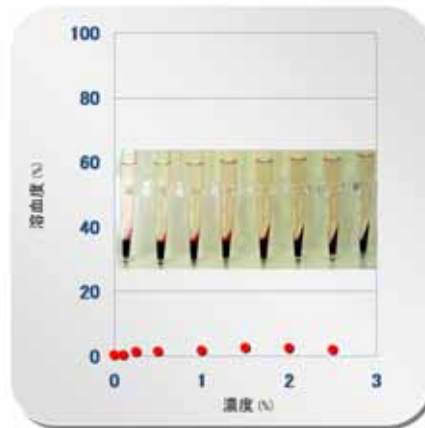
ケタミンでは2.5%までネルンスト応答直線からのズレはなく、分子会合体は生じていない。

(図2) ケタミンの溶液物性 (起電力 vs. 濃度; イオン電極法による)



アミトリプチリンは0.3%以上で溶血し、濃度依存性に増強する。

(図3) 赤血球膜に対する各種濃度のアミトリプチリン投与効果について (吸光度法)



ケタミンは2.5%まで明らかな溶血は認めない。

(図4) 赤血球膜に対する各種濃度のケタミン投与効果について (吸光度法)

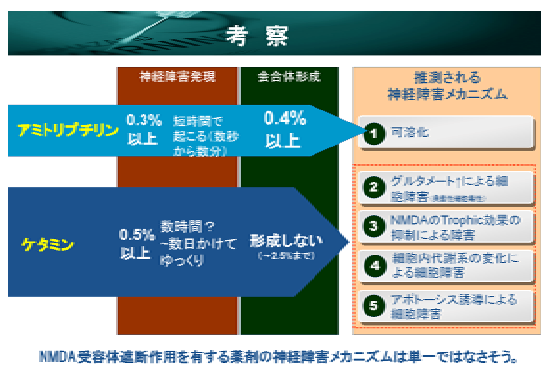
(表1) 結果のまとめ

結果のまとめ			
	症例報告・動物実験で神経障害が発生する濃度	分子会合体形成濃度	溶血を引き起こす濃度
局所麻酔薬	ケタミン	0.5%以上	~2.5%では形成しない ~2.5%では溶血しない
	アミトリプチリン	0.3%以上	0.4%以上 0.3%以上
局所麻酔薬	リドカイン	5.0%以上	5.0%以上 4.0%以上
	ジブカイン	0.5%以上	0.5%以上 0.3%以上

(Kitagawa et al. Anesthesiology 2004;100:962-967)

アミトリプチリンでは分子会合体形成濃度と溶血を引き起こす濃度が動物実験や症例報告で神経障害をきたした濃度と一致した。これは局所麻酔薬と同様の結果である。一方、ケタミンは2.5%まで濃くても分子会合体は形成せず、明らかな溶血も起こさなかった。

(図5) アミトリプチリンとケタミンによる
神経障害メカニズムの比較



(まとめ)

アミトリプチリンでは神経障害を起こす濃度(0.3%)が、分子会合体形成濃度と溶血を起こす濃度にほぼ等しいことから可溶化作用が神経障害のメカニズムのひとつと推測される。これは我々が推測する高濃度局所麻酔薬の神経毒性のメカニズムと同様である。

ケタミンは0.5%で神経障害を起こすと報告されているが、2.5%まで濃くしても分子会合体を形成せず、溶血も起こさないことからケタミンによる神経障害は可溶化作用で引き起こされているのではないと思われる。

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) Norihito Kitagawa, Mayuko Oda, I. Nobutaka, Hidetoshi Satoh, Tadahide Totoki, and Masatoshi Morimoto, A proposed mechanism for amitriptyline neurotoxicity based on its detergent nature., *Toxicology and Applied Pharmacology*(査読あり)217:100-106, 2006.
- 2) Norihito Kitagawa, Mayuko Oda, Tadahide Totoki, Meperidine-Induced Muscular Rigidity During Spinal Anesthesia? *Anesth. Analg.* (査読あり), 103:100-106, 2006.

[学会発表](計 2 件)

- 1) 北川範仁, 小田万友子, 北嶋修司, 高崎光浩, 土時忠秀: ケタミンによる神経障害のメカニズムは可溶化作用ではない, 日本麻酔科学会第 55 回学術集会, 2008 年 6 月 12 日, 横浜市.

- 2) 北川範仁, 小田万友子, 森本正敏, 土時忠秀: ロピバカインのラットくも膜下腔投与における神経障害発現最少濃度の同定, 日本麻酔科学会第 53 回学術集会, 2006 年 6 月 1 日, 神戸市.

[図書](計 0 件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

[その他]

研究成果等を公開する web サイト等は設置していない。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土時 忠秀 (TOTOKI TADAHIDE)

佐賀大学・名誉教授

研究者番号: 20038722

(2) 研究分担者

垣内 好信 (KAKIUCHI YOSHINOBU)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号: 70363447

(2006 年度, 2007 年度)

森本 正敏 (MORIMOTO MASATOSHI)

佐賀大学・総合分析実験センター・助教授

研究者番号: 90136482

(2006 年度)

高崎 光浩 (TAKASAKI MITSUHIRO)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号: 70236206

(2006 年度, 2007 年度)

(3) 連携研究者

高崎 光浩 (TAKASAKI MITSUHIRO)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号: 70236206

(2008 年度)

垣内 好信 (KAKIUCHI YOSHINOBU)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号: 70363447

(2008 年度)

研究協力者

(2006 ~ 2008 年度)

北川 範仁 (KITAGAWA NORIHITO)

小田 万友子 (ODA MAYUKO)