

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16491

研究課題名(和文)心肥大に伴う局所麻酔薬の心筋への作用の変化に関する検討

研究課題名(英文)Cardiac hypertrophy associated changes in the effects of local anesthetics on myocardium

研究代表者

松浦 正(Matsuura, Tadashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90619793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：局所麻酔薬は心臓のナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)チャンネルを阻害して心機能を抑制する。これまで肥大心でその心毒性が増悪するかは分かっていなかった。心肥大においてブピバカインによる心抑制が増強するかを調べた。心肥大モデルラットを作成し、in vivo実験とパッチクランプ法でのNa<sup>+</sup>チャンネル記録などで検証した。実験結果から、心肥大ラットではブピバカインの心毒性が増強していることが示された。その機序として、心肥大において心筋細胞膜上に過剰発現しているTRPC3を介して本来細胞膜を通過しない陽イオン型の局所麻酔薬が通過することを明らかにし、それに伴って細胞内のブピバカイン濃度が上昇したためと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究で左室肥大による局所麻酔薬の心抑制の増悪する機序としてTRPC3チャンネルの発現が増加しており、そのTRPC3チャンネルのポアをイオン型局所麻酔薬が通過することが示された。近年の高齢化社会により高齢者が手術を受ける機会が増えている。それに伴い左室肥大を合併した手術患者が増加していると考えられる。そういった高齢者で全身麻酔を避けて末梢神経ブロックや局所浸潤麻酔を選択する機会が増えている。後負荷増大に伴う左室肥大が局所麻酔薬による心抑制作用を増悪させるかはわかっていなかったが、本研究ではそのような患者の局所麻酔薬による心毒性の危険性を示し注意喚起している。

研究成果の概要(英文)：Local anesthetics, particularly potent long acting ones, such as bupivacaine, can cause cardiotoxicity by inhibiting sodium (Na<sup>+</sup>) channels; however, the impact of left ventricular hypertrophy on the cardiotoxicity and the underlying mechanisms remain undetermined. We hypothesized that bupivacaine-induced cardiotoxicity is more severe in left ventricular hypertrophy due to upregulated TRPC channels. We used a modified transverse aortic constriction model as a left ventricular hypertrophy. Cardiotoxicity caused by bupivacaine was compared between sham and aortic constriction male rats, and the underlying mechanisms were investigated by recording Na<sup>+</sup> channel currents and immunocytochemistry of TRPC protein in cardiomyocytes. Left ventricular hypertrophy exacerbated bupivacaine-induced cardiotoxicity, which could be a consequence of the "pore phenomenon" of TRPC3 channels upregulated in left ventricular hypertrophy.

研究分野：麻酔科学

キーワード：局所麻酔薬 パッチクランプ 心肥大

## 1. 研究開始当初の背景

(1) リドカインやブピバカインなどの局所麻酔薬は処置・手術での浸潤麻酔や区域麻酔を行うために必須の薬剤である。局所麻酔薬は細胞膜Na<sup>+</sup>チャンネル遮断により効果を発現し、心筋Na<sup>+</sup>チャンネルにも抑制作用を示す。ブピバカインなど長時間作用型局所麻酔薬は心毒性が強く過量投与や血管内誤注入により蘇生困難な致死性不整脈を起こしうる。

(2) 近年、高齢化や維持透析患者の増加に伴い、心肥大を合併した患者の手術が増加している。肥大大心筋では電気生理学的変化が生じて、活動電位が延長することや(引用文献 )、イオンチャンネルの電流が変化することが報告されている(引用文献 )。局所麻酔薬はNa<sup>+</sup>チャンネルに作用するため、肥大大心筋では局所麻酔薬への感受性が変化している可能性がある。ラット心肥大モデルの左室筋切片を用いた研究ではリドカインによる活動電位延長作用は正常心筋に比して小さく、収縮力抑制作用は強くなったと報告されている(引用文献 )。この結果は、心肥大患者ではリドカインの効果が増強していることを示唆している。長時間作用型局所麻酔薬の血中濃度が上昇した場合に生じる心毒性も心肥大患者では変化している可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、局所麻酔薬のなかでも心毒性の強いブピバカインを用いて、肥大大心筋におけるブピバカインの作用がどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、in vivo での心電図・血行動態記録と心筋細胞パッチクランプ法による電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネル電流記録で検討した。

(2) 左室肥大において非選択的陽イオンチャンネルである transient receptor potential canonical (TRPC1,3,6)が心筋細胞で過剰発現し心臓の肥大化と関連しているという報告がある(引用文献 )。最近では、TRPCとは異なるTRPチャンネルが陽イオン状態で存在する薬剤を通過させることが報告され“pore phenomenon”として認識された(引用文献 )。局所麻酔薬は細胞膜を塩基型が通過して、細胞内でその一部が陽イオン型となり細胞質側からNa<sup>+</sup>イオンチャンネルを阻害する。TRPチャンネルを介した“pore phenomenon”が生じると、陽イオン型局所麻酔薬の細胞内への移行が促進されることが推測される。それらの現象から、左室肥大ではTRPCチャンネルが関与して局所麻酔薬感受性が亢進しているのではないかと考えられたため検証を行なった。

## 3. 研究の方法

3週齢の雄性SDラットに対してセボフルラン麻酔下、左側開胸で大動脈弓部の左鎖骨下動脈分岐遠位部に22ゲージ針の太さで絹糸により狭窄を作成し、その後4週間飼育することで大動脈狭窄による左室肥大モデルラット(modified transverse aortic constriction; mTAC)を作成した。Sham群には開胸のみを行なった。

(1) in vivo でのブピバカイン持続静注による血行動態変化の比較

Sham群(n=12)とmTAC群(n=12)に対してウレタン(1.2-1.5g/kg)腹腔内投与により麻酔し、気管切開・人工呼吸(室内気)下で右総頸動脈から動脈圧測定、尾静脈に薬剤投与ルートを確認した。観血的動脈圧、体表心電図を記録し血行動態が安定しているのを確認後に0.5%ブピバカインを3mg/kg/minで持続静注を開始した。QRS幅がベースラインの2倍になるまでの時間と心電図で心停止を1分間確認するまでの時間を測定した。また、心停止確認1分後のブピバカインの血中濃度も測定した。

(2) 単離左室心筋細胞でのパッチクランプ法によるNa<sup>+</sup>電流の比較

7から8週齢のShamならびmTACラットからペントバルビタール(120mg/kg)とヘパリン(200U)を投与した後に心臓を摘出した。摘出心臓にコラゲナーゼ含有Tyrode液を灌流することで左室心筋細胞を単離した。まず単離左室心筋細胞のNa<sup>+</sup>電流をホールセル・パッチクランプ法で測定し、ブピバカインを灌流させることによるNa<sup>+</sup>電流抑制を各モデルラットで検証した。続けてTRPC3活性化剤である1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol(OAG)を灌流させ再度Na<sup>+</sup>電流を測定した。さらに体内でほぼイオン型として存在するリドカイン誘導体QX-314を灌流させNa<sup>+</sup>電流を測定し、その後OAGを灌流させて再度Na<sup>+</sup>電流を測定した。

(3) トランスフェクションHEK-293T細胞でのパッチクランプ法によるNa<sup>+</sup>電流測定

左室肥大モデルでは左室肥大や心不全によるTRPC3チャンネル過剰発現以外の病的変化がブピバカインのNa<sup>+</sup>チャンネル抑制に影響している可能性があるため、HEK-293T細胞に心筋Na<sup>+</sup>チャンネル(Nav1.5)、TRPC3チャンネルを発現させパッチクランプ法と用いてブピバカインによるNa<sup>+</sup>電流抑制に対するTRPC3チャンネルの影響を検証した。

(4) 単離心筋細胞膜上のTRPC3発現の比較

免疫染色法を用いてShamならびmTACラットのTRPC3チャンネルの発現量を比較した。

## 4. 研究成果

左室肥大モデルとしてmTACラットはShamラットよりも心臓は肥大し、心臓重量/体重比は有意に高かった(Sham 0.53 ± 0.07 vs. mTAC 0.78 ± 0.02; P < 0.001)。

(1) mTACモデルは有意にブピバカインによる心抑制が増強した

mTACラットはブピバカイン持続投与によってQRS幅がベースラインの2倍になるまでの時

間は有意に短く (Sham  $197 \pm 55$  vs. mTAC  $147 \pm 35$  s,  $P = 0.017$ )、心停止までの時間も有意に短かった (Sham  $1302 \pm 324$  vs. mTAC  $1034 \pm 211$  s,  $P = 0.030$ 、図 1 A)。血圧に関して mTAC ラットは Sham ラットよりもベースラインの血圧は高かったがブピバカイン投与開始とともに低下した (図 1 B)。また、心停止時のブピバカイン血漿濃度は mTAC ラットの方が低かった (Sham  $58.1 \pm 23.3$  vs. mTAC  $41.4 \pm 12.8$   $\mu\text{g/ml}$ 、 $P = 0.048$ )。

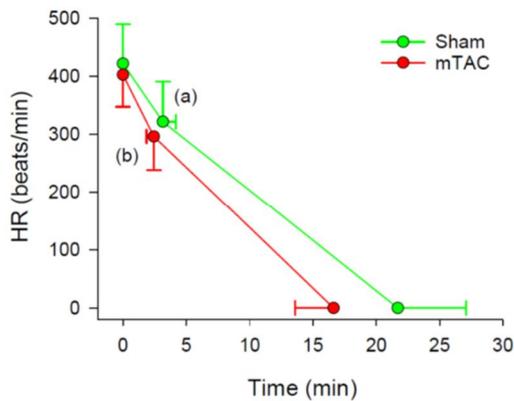


図 1 A

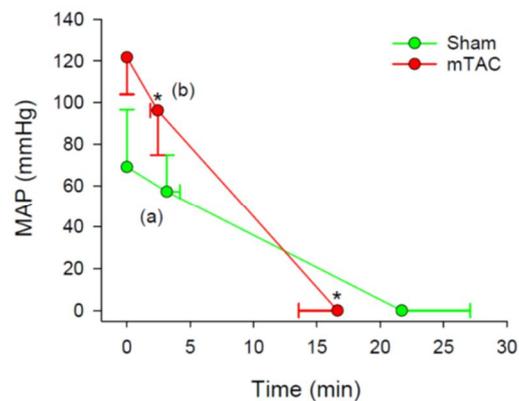


図 1 B

(2) mTAC では TRPC3 を活性化することでブピバカインによる  $\text{Na}^+$ 電流抑制が増強した Sham ラットの単離心筋細胞の  $\text{Na}^+$ 電流はブピバカイン  $3 \mu\text{M}$  灌流により減少し、さらに OAG を追加灌流させ TRPC3 を活性化することでさらなる  $\text{Na}^+$ 電流減少を認めた。mTAC ラットの単離心筋細胞でも同様の結果となったが TRPC3 チャネルを活性化することによる  $\text{Na}^+$ 電流の減少は大きくなった (図 2)。灌流ブピバカイン  $1$ 、 $3$ 、 $10$ 、 $30 \mu\text{M}$  での結果から用量反応曲線を作成し、 $\text{Na}^+$ 電流をベースラインの  $50\%$ にする濃度 ( $\text{IC}_{50}$ )を計算したところ、Sham ならび mTAC ラットのブピバカインの  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ  $4.5 \mu\text{M}$ 、 $4.3 \mu\text{M}$ であった (図 3 実線)。TRPC3 チャネルを OAG で活性化した場合はそれぞれ  $3.9 \mu\text{M}$ 、 $2.6 \mu\text{M}$ まで減少し、mTAC ラットの方がより減少した (図 3 破線)。QX-314 はイオン型リドカイン誘導體であり細胞膜を通過しにくいいため  $\text{Na}^+$ 電流抑制はほとんど見られないが OAG で TRPC3 チャネルを活性化することで両モデルラットとも  $\text{Na}^+$ 電流の抑制を認めた (Sham  $102 \pm 13\%$   $79 \pm 10\%$  [ $P = 0.004$ ], mTAC  $91 \pm 25\%$   $47 \pm 27\%$  [ $P = 0.020$ ])。また、その抑制効果は mTAC ラットで大きくなった ( $P = 0.040$ 、図 4 A)。一方で TRPC3 をより特異的に阻害する Pyr3 をあらかじめ灌流させることでこれらの効果は消失した (図 4 B)。

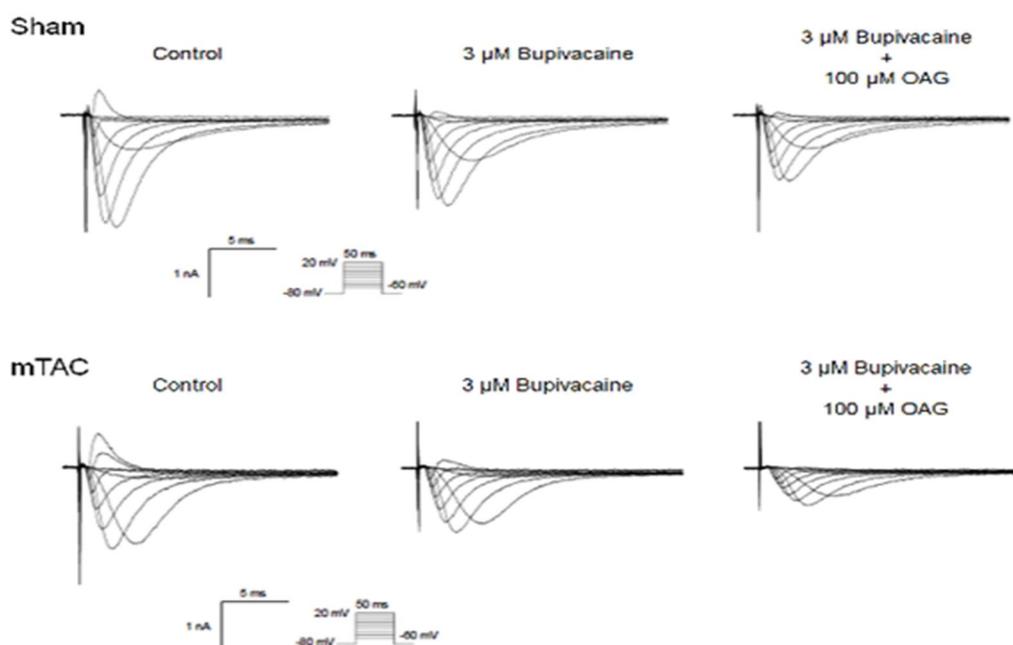


図 2

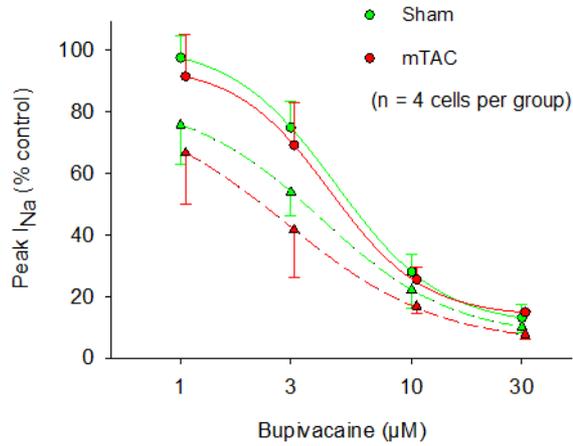


図 3

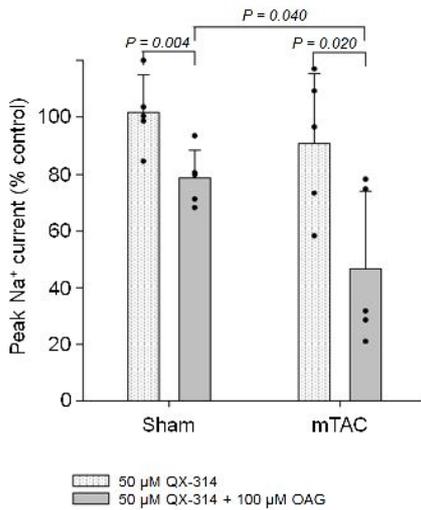


図 4 A

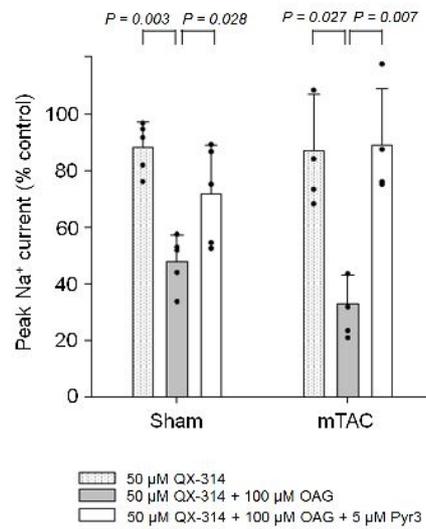


図 4 B

(3) Nav1.5 発現 HEK-293T 細胞でも TRPC3 が共発現することで Na<sup>+</sup>電流抑制が増強した HEK-293T 細胞に Nav1.5 のみを発現させた場合、当然ブピバカインによって Na<sup>+</sup>電流は抑制されるが、OAG を追加灌流させても TRPC3 は存在しないため Na<sup>+</sup>電流のさらなる減少は認められない。(90 ± 3% 89 ± 5%, P = 0.617、図 5)。一方で Nav1.5 と TRPC3 を共発現させた HEK-293T 細胞ではブピバカイン単独による Na<sup>+</sup>電流抑制は同等であったが、OAG を追加灌流することで Na<sup>+</sup>電流のさらなる抑制を認める結果となった(86 ± 7% 72 ± 7%, P = 0.048、図 5)

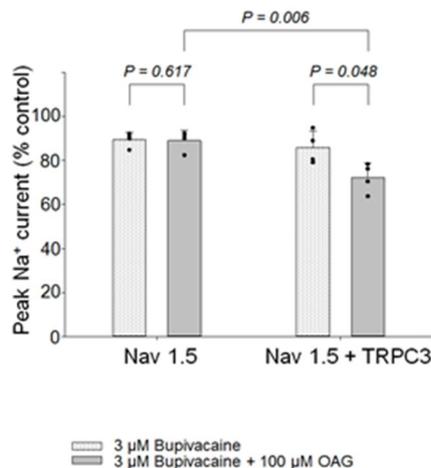


図 5

(4) mTAC ラットでは左室心筋細胞の細胞膜上への TRPC3 タンパク発現が増加している。各モデルの単離左室心筋細胞の TRPC3 タンパクを免疫染色したところ、Sham ラットと比較して mTAC ラットは細胞膜上の蛍光強度が強かった(図 6 A)。これを定量化するために細胞の任意横断面上での細胞膜と細胞質の比(S/C 比)を計算し比較した。その結果、mTAC ラットで TRPC3 タンパクの細胞膜上への局在化が起きているのが確認できた(3.0 [2.6 - 3.8] vs. 4.9 [4.1 - 6.6]、 $P = 0.002$  図 6 B)。

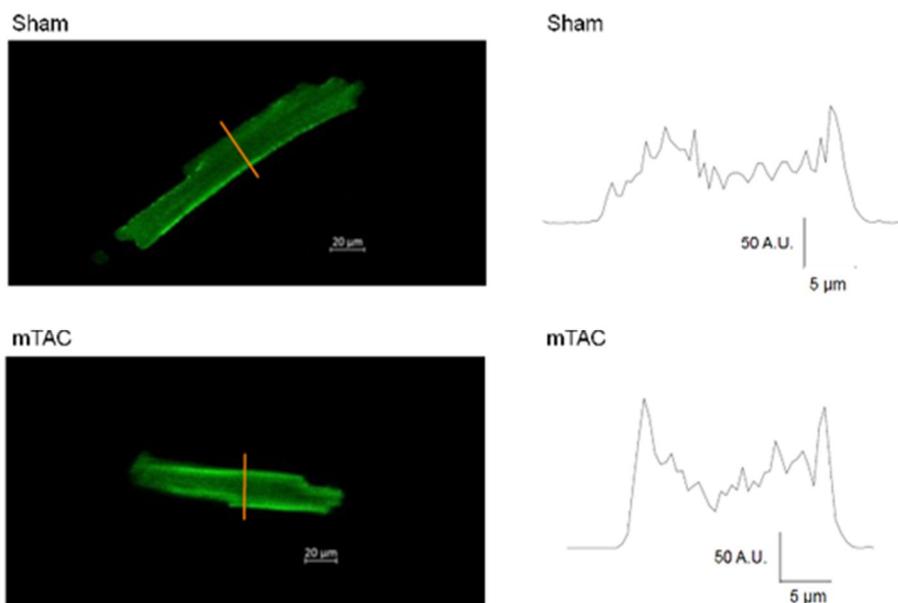


図 6 A

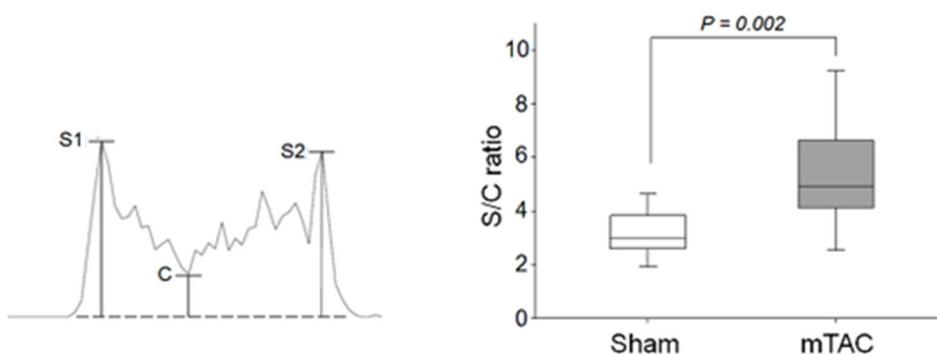


図 6 B

今回の一連の実験により左室肥大ラットではプピバカインによる心抑制が増強され、そのメカニズムには左室肥大の心筋細胞膜に発現増加している TRPC3 活性が関連していることが分かった。

< 引用文献 >

Tomaselli GF, Marban E. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 270-83  
 Ahmed GU, Dong PH, et al. *Circ Res* 2000; 86: 558-70  
 Doggrell SA, Nand V, et al. *Gen Pharmacol* 1999; 32: 429-37  
 Wu X, Eder P, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7000-5  
 Ferreira LG, Faria RX. *J Bioenerg Biomembr* 2016; 48: 1-12

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hino Hideki, Matsuura Tadashi, Kuno Miyuki, Hori Kotaro, Tsujikawa Shogo, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu	4. 巻 133
2. 論文標題 Left Ventricular Hypertrophy Increases Susceptibility to Bupivacaine-induced Cardiotoxicity through Overexpression of Transient Receptor Potential Canonical Channels in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 1077 ~ 1092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/ALN.0000000000003554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 日野秀樹、松浦 正、堀耕太郎、辻川翔吾、森隆、西川精宣	4. 巻 70
2. 論文標題 心肥大モデルラットではTRPCチャネルの過剰発現が関与してピバカインによる心毒性が増強する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 麻酔	6. 最初と最後の頁 210 ~ 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 日野秀樹、松浦正、堀耕太郎、辻川翔吾、森隆、西川精宣
2. 発表標題 心肥大モデルラットにおける局所麻酔薬中毒による心抑制の増加とTRPCチャネルの影響
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideki Hino, Tadashi Matsuura, kotaro Hori, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa
2. 発表標題 Increase in cardiotoxicity caused by bupivacaine in the rats with left ventricular hypertrophy and potential impact of TRPC channels
3. 学会等名 European Society of Anaesthesia 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日野秀樹、松浦 正、堀耕太郎、辻川翔吾、森 隆、西川精宣
2. 発表標題 心肥大モデルラットではTRPCチャネルの過剰発現によってプピバカインによる心毒性が増強する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関