

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791619

研究課題名(和文) 局所麻酔薬の心毒性に対するリピッドレスキューの機序解明

研究課題名(英文) Mechanisms of lipid infusion on local anesthetic-induced cardiac toxicity

研究代表者

松浦 正 (Matsuura, Tadashi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90619793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：局所麻酔薬中毒に対して、脂肪乳剤の投与が有効であることが以前から報告されていた。本研究は脂肪乳剤の有効性の機序を解明することを目的として行った。局所麻酔薬として心毒性の強いブピバカインを用いた。細胞を使った実験で脂肪乳剤は細胞外のブピバカインを取り込み、細胞外濃度を低下させ、結果的に細胞内のブピバカイン濃度を低下させることが示唆された(リピッドシンク)。モルモットの摘出心臓を用いた実験からは、脂肪乳剤がブピバカインによって抑制された心機能を著しく回復させて、その機序もリピッドシンクが強く関与していることが明らかであった。in vivoモデルを用いた実験においても同様の結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Lipid emulsion has been reported to be quite effective against local anesthetic-induced systemic toxicity. This study aimed to investigate the mechanisms of lipid infusion therapy. Proton channels recordings by patch-clamp method revealed that extracellular lipid emulsion trapped bupivacaine to decrease the concentration of extracellular bupivacaine and consequently the intracellular concentration of bupivacaine was decreased. This result supports the importance of "lipid sink" of lipid infusion therapy. Both results of lagendorff experiments and in vivo experiments could also suggest that "lipid sink" is the main mechanism of lipid infusion therapy.

研究分野：麻酔科学

キーワード：局所麻酔薬中毒 脂肪乳剤 パッチクランプ ランゲンドルフ

1. 研究開始当初の背景

長時間作用型局所麻酔薬による難治性の心毒性に対して脂肪乳剤の有効性が示され、リピッドレスキューとして注目されていた。局所麻酔薬の脂肪乳剤への取り込み(以下、lipid sink)が主要機序とされているが、細胞レベルでは明らかではなく、細胞内局所麻酔薬濃度の変化、効果発現濃度、効果発現時間、pHの影響など検討すべき点も多い。また局所麻酔薬の主作用チャンネルである Na⁺チャンネルへの影響を調べた研究はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、電気生理学的手法を用いて、プロトンチャンネル記録により局所麻酔薬の細胞膜内外での動態、特に脂肪乳剤を細胞外から投与した場合の動態を解明する。また局所麻酔薬のターゲットである Na⁺チャンネルに対する脂肪乳剤の影響を調べる。この研究により lipid sink の効果を詳細に検討し、リピッドレスキューの機序を細胞レベルで解明することを目的とした。また摘出心臓を用いたランゲンドルフ灌流実験によって局所麻酔薬の心毒性に対する脂肪乳剤の心臓への直接効果を調べる。局所麻酔薬としては心毒性の強いブピバカインを使用し、比較対象として一部実験でリドカインも使用した。またすべて実験において脂肪乳剤として「20%イントラリピッド」を用いた。

3. 研究の方法

(1) 電位依存性プロトンチャンネルによる検討
局所麻酔薬の細胞内外の分布に対する脂肪乳剤の効果について、パッチクランプ法による電位依存性プロトンチャンネル記録で検討する。

(2) 単離心筋細胞 Na⁺チャンネル記録による検討
ブピバカインを含めた局所麻酔薬の主作用部位は Na⁺チャンネルである。そこでモルモットの単離心室筋細胞を用いて、ブピバカインによる Na⁺チャンネル抑制に対する脂肪乳剤の効果をパッチクランプ法で検討する。

(3) モルモット摘出心臓を用いたランゲンドルフ灌流実験による検討
ブピバカインの心毒性に対する脂肪乳剤の効果について、モルモット摘出心臓を用いたランゲンドルフ灌流実験で検討する。摘出心臓では、局所麻酔薬の心臓への直接作用を抽出して調べることができる。

(4) in vivo モデルによる検討
最後に in vivo モデルでの検討を行う。セボフルラン全身麻酔下のモルモットを気管切開し人工呼吸を行う。頸動静脈にカテーテルを挿入し、静注薬として「3 mg/kg ブピバカインを生食に溶解(7 ml/kg)」「同用量のブピバカインを脂肪乳剤に溶解(7 ml/kg)」「を遠心して脂肪層を除去した遠心液(7 ml/kg)」の3群に分けて血行動態と心電図変

化を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 電位依存性プロトンチャンネル記録による検討

局所麻酔薬(リドカイン、ブピバカイン)は、濃度依存性にプロトンチャンネル電流を抑制した。脂肪乳剤を細胞外液に加えると(4% lipid)ブピバカインにおいては著明に抑制が軽減され、リドカインについては効果が少なかった(図1)。次に局所麻酔薬を含む脂肪乳剤と標準外液の混和液を遠心することにより脂肪層を取り除いた遠心液(Centrifuged aqueous extract)を作成し、脂肪乳剤混合液との効果を比較した。遠心液と脂肪乳剤混合液では電流抑制を回復させる効果に差はなかった(図2)。

パッチクランプの溶液槽を1mMブピバカインで満たした後に、U-tubeを用いて標的細胞周囲の外液を急速に置換する実験を行った。標準外液と脂肪乳剤を含む外液では電流回復効果に差はなかった。一方、溶液槽を一定速度でwash outする実験では脂肪乳剤を含む外液で有意に電流回復が速かった。これらの結果から脂溶性の高い局所麻酔薬において脂肪乳剤は局所麻酔薬を細胞外で取り込み遊離型濃度を減少させ、結果的に細胞内外の濃度勾配を増加させることにより細胞内の局所麻酔薬濃度を減少させることが示された。ブピバカインにおいては脂肪乳剤によるプロトンチャンネル電流回復効果が著しいことから、リピッドレスキューの機序として脂肪乳剤が血液中のブピバカインを取り込み遊離型濃度が減少するという「lipid sink」が非常に大きな役割をしていることが示唆された。以上の結果をまとめ、英文医学学術誌に投稿し受理された(参考文献)。

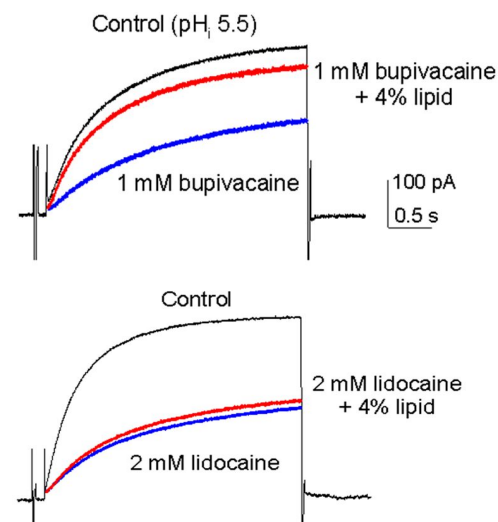


図1 リドカイン、ブピバカインによるプロトンチャンネル抑制に対する脂肪乳剤の効果

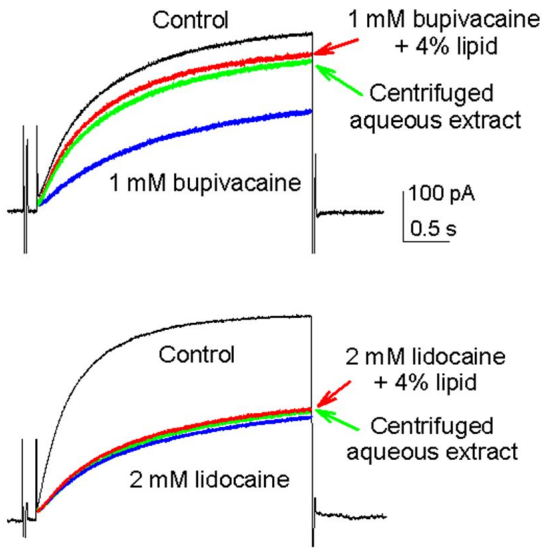


図2 脂肪乳剤混合液と遠心液（脂肪層除去）の効果比較

(2) 単離心筋細胞 Na チャネル記録による検討
 50 μ M プピバカインで Na 電流は約 50%に抑制され、同濃度のプピバカインを含む標準液に脂肪乳剤を 10%加えた溶液 (2% lipid) を灌流させると電流は有意に回復した (図3)。脂肪乳剤がプピバカインによる心抑制を改善することに関与していることが示唆された。しかしこのパッチクランプの実験を実施している最中にドイツの施設から同じ研究テーマでより詳細に検討した研究論文が医学学術誌に掲載された (参考文献)。結果もほぼ同じ傾向であったためパッチクランプでの実験は継続する意義がないと判断し中断した。

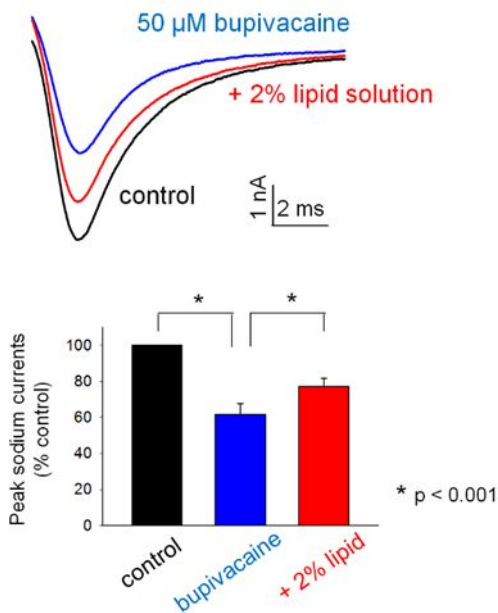


図3 プピバカインによる心室筋細胞 Na チャネル抑制と脂肪乳剤の効果

3, モルモット摘出心臓を用いたランゲンド

ルフ灌流実験による検討

標準液 (Krebs Henseleit buffer: KHB) を灌流した状態の左室駆出圧 (LVDP) と心拍数 (HR) を各々 100% とした。50 μ M プピバカインは LVDP と HR を著明に抑制し、心電図での QRS 幅を延長させた。標準液 (KHB) に脂肪乳剤を 10% 加えた溶液 (2% lipid) を灌流させると血行動態は元の値の 80% 以上に回復し、QRS 延長も改善した。次に脂肪乳剤がプピバカインを取り込み遊離型プピバカインの濃度が低下するという「lipid sink」の効果を検討するために、標準液にプピバカインと脂肪乳剤を加えた灌流液を超遠心し、脂肪層を除去した「遠心液 (Centrifuged aqueous extract: CAE)」を作成した。この「遠心液 (CAE)」と元の脂肪乳剤混合液の効果と比較した。「遠心液」と「脂肪乳剤混合液 (2% lipid)」の効果はほぼ同等で、心電図の QRS 変化も同程度であった。この結果から脂肪乳剤を用いた「リピッドレスキュー」の機序として「lipid sink」が大きく関わっていることが示唆された (図4)。

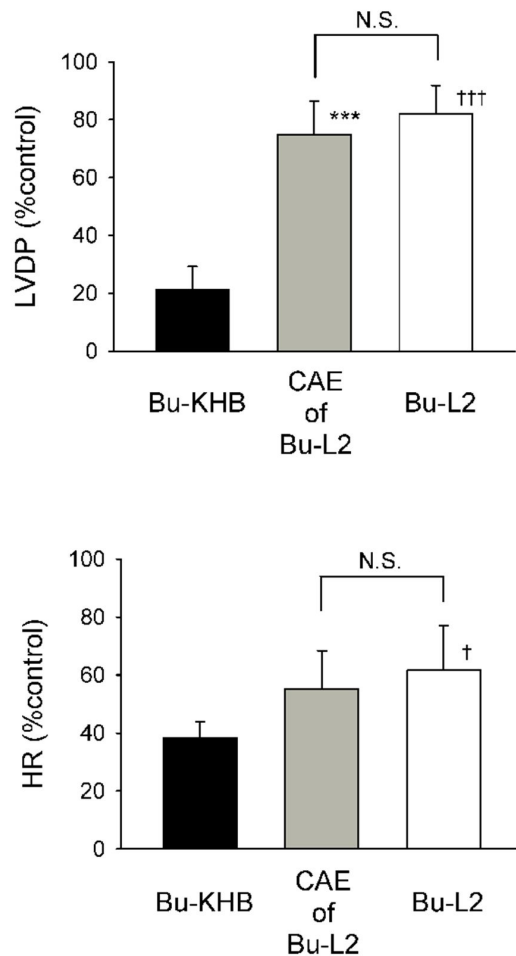


図4 50 μ M プピバカインによる心機能抑制と脂肪乳剤および遠心液の効果比較

(4) in vivo モデルによる検討

セボフルラン麻酔下で静注薬投与前の平均血圧 (mBP) と心拍数 (HR) を control (100%) とし

た。mBP, HR ともに脂肪乳剤群と遠心液群で生食群よりも有意に高く (n = 3-5, mBP; p < 0.001)、生食群と遠心液群とでは有意な差を認めなかった (図5)。この *in vivo* での実験からも「脂肪乳剤による蘇生」に「lipid sink」が大きな役割を担っていることが示唆された。(3)ランゲンドルフによる灌流実験と(4)*in vivo* モデルでの実験では同じ傾向の結果が得られた。この2つ実験の結果をまとめて英文医学学術誌に投稿中である。

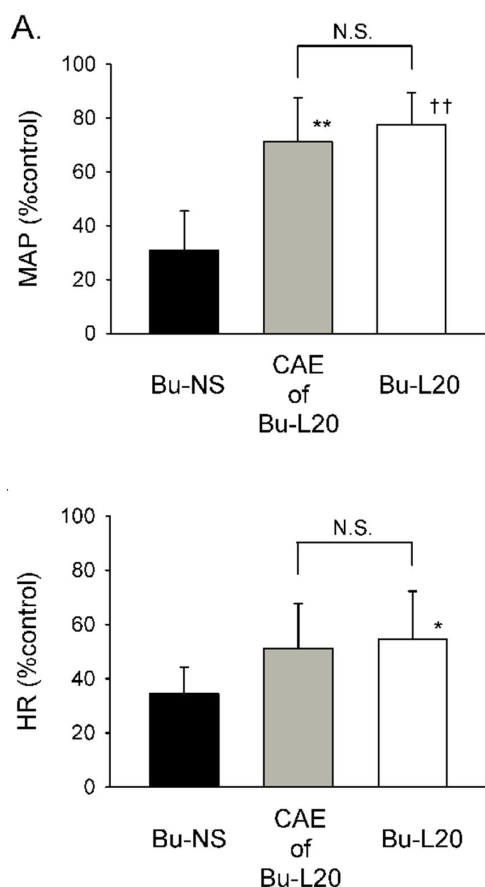


図5 プピバカインによる血行動態の抑制に対する脂肪乳剤と遠心液の効果比較

<引用文献>

Hori K, Matsuura T, Mori T, Kuno M, Sawada M, Nishikawa K: The Effect of Lipid Emulsion on Intracellular Bupivacaine as a Mechanism of Lipid Resuscitation. *Anesth Analg* 2013;117:1293-301

Wagner M, Zausig YA, Ruf S, Rudakova E, Gruber M, Graf BM, Volk T: Lipid Rescue Reverses the Bupivacaine-induced Block of the Fast Na⁺ Current (I_{Na}) in Cardiomyocytes of the Rat Left Ventricle. *Anesthesiology* 2014;120:724-36

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1件)

Hori K, Matsuura T, Mori T, Kuno M, Sawada M, Nishikawa K: The Effect of Lipid Emulsion on Intracellular Bupivacaine as a Mechanism of Lipid Resuscitation. *Anesth Analg* 2013;117:1293-301
doi: 10.1213/ANE.0000000000000011.
査読有り

[学会発表](計6件)

Kotaro Hori, Tadashi Matsuura, Shogo Tsujikawa, Takashi Mori, Miyuki Kuno, Kiyonobu Nishikawa: The electrophysiological effects of lipid emulsion on bupivacaine-induced cardiotoxicity in guinea pigs.: 2014 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists, New Orleans, Louisiana, USA, 10/13/2014

堀耕太郎, 松浦 正, 辻川翔吾, 森 隆, 久野みゆき, 西川精宣: リピッドレスキューによる血行動態回復における lipid sink effect の重要性: 日本麻酔科学会第61回学術集会, 神奈川県横浜市, 2014年5月15日

Kotaro Hori, Tadashi Matsuura, Megumi Hasaka, Takashi Mori, Miyuki Kuno, Kiyonobu Nishikawa: The recovery speed of lipid emulsion therapy largely depends on "lipid sink": An electrophysiological study using voltage-gated proton channels.: *Euroanaesthesia* 2013, Barcelona, Spain, 6/4/2013

堀耕太郎, 松浦 正, 羽阪めぐみ, 森隆, 久野みゆき, 西川精宣: lipid rescueにおける"lipid sink"の効果発現時間について ~電位依存性プロトンチャネルによる検討~: 日本麻酔科学会第60回学術集会, 北海道札幌市, 2013年5月23日

Kotaro Hori, Tadashi Matsuura, Megumi Hasaka, Takashi Mori, Miyuki Kuno, Kiyonobu Nishikawa: "Lipid sink" mechanism of lipid rescue evidenced by voltage-gated proton channels: 41st Critical Care Congress, Society of Critical Care Medicine, Houston, USA, 2/5/2012

堀耕太郎, 松浦 正, 羽阪めぐみ, 森隆, 久野みゆき, 西川精宣: 電位依存性

プロトンチャネルによる lipid rescue メカニズムの検討：日本麻酔科学会第 59 回学術集会，兵庫県神戸市，2012 年 6 月 8 日

ホームページ等

<http://ocu-anesth.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

松浦 正 (MATSUURA, Tadashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90619793