

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861365

研究課題名(和文) 静脈投与したリドカインの脊髄における鎮痛機序の解明

研究課題名(英文) Underlying mechanisms of intravenous administration of lidocaine in spinal dorsal horn

研究代表者

倉部 美起 (Kurabe, Miyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：30635579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リドカインは、静脈投与により神経障害性痛を軽減することが知られているが、その作用機序については明らかにされていない。我々はin vivoパッチクランプ法を用いてリドカインの脊髄での作用を明らかにすることを目的とした。リドカインの静脈投与により、濃度依存性に興奮性シナプス伝達が抑制された。また、後肢への侵害刺激によって誘発される興奮性電流も抑制された。一方、リドカインを脊髄へ直接投与したところ、興奮性シナプス伝達は変化しなかった。静脈投与したリドカインは、脊髄後角ニューロンにおける興奮性シナプス伝達をシナプス前性に抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Intravenous administration of lidocaine (IVL) is used for the management of postoperative and neuropathic pain. However, the analgesic mechanisms of IVL are yet to be elucidated. We hypothesized that IVL may affect excitatory synaptic transmission in spinal dorsal horn neurons. Herein, we used in vivo patch-clamp recording to examine the effects of IVL on synaptic transmission in the dorsal horn neurons of adult male Wistar rats. The experiments were performed in the voltage-clamp mode at a holding potential of -70 mV. IVL (3 and 10 mg/kg) decreased sEPSC frequencies, but did not affect the amplitudes. IVL (10 mg/kg) also decreased the area under the curve of EPSCs evoked by peripheral pinch stimuli to the receptive field. However IVL, superfusion of lidocaine (100 μ M) on the spinal surface did not affect sEPSC frequencies or amplitudes. Our results suggest that IVL inhibits excitatory synaptic transmission in spinal dorsal horn neurons, which may be one of the analgesic mechanisms.

研究分野：麻酔科学

キーワード：リドカイン in vivoパッチクランプ法 脊髄後角 興奮性シナプス伝達 痛み

1. 研究開始当初の背景

局所麻酔薬であるリドカインは、静脈投与により神経障害性疼痛や術後疼痛、タニケットによる虚血性疼痛を軽減することが知られている^{1,2}。これまでの研究でリドカインが中枢神経に作用して鎮痛作用を発揮する可能性が報告されているが³、その詳細な鎮痛機序は明らかになっていない。

静脈投与により鎮痛を得られるリドカインの血中濃度は 5 µg/ml (約 20 µM) 以下であるのに対し、脊髄後根の軸索伝導遮断に対するリドカインの 50% effective dose (ED₅₀) は 228 - 335 µM⁴、坐骨神経における軸索伝導遮断に対する half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) は C 線維、Aβ 線維、Aδ 線維でそれぞれ約 800 µM、410 µM、320 µM と報告されている⁵。また、脊髄後角ニューロンでの Na⁺チャネルに対するリドカインの IC₅₀ は約 100 µM である⁶。つまり、静脈投与によるリドカインの血中濃度は末梢神経や脊髄後角ニューロンで Na⁺チャネル阻害作用を発揮する濃度と比べ明らかに低いため、静脈投与リドカインの鎮痛作用には Na⁺チャネル以外の機序が存在する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

静脈投与したリドカインが脊髄後角ニューロンにおける興奮性シナプス伝達を修飾することによって鎮痛作用を発揮している可能性について、*in vivo* パッチクランプ法を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 脊髄標本の作製

5~8 週齢の Wistar 系雄性ラットをウレタン (1.2 ~ 1.5 g/kg、腹腔内投与) で麻酔後、尾静脈に静脈カテーテル (PE-10、Clay Adams、米国) を挿入した。その後、傍脊柱筋群を剥離し、脊椎を露出した。第 12 胸椎から第 2 腰椎まで椎弓切除を行った後、脊椎固定装置に固定した。95%酸素、5%二酸化炭素酸素の混合ガスで飽和し、約 36 に加温した人工脳脊髄液で脊髄表面を灌流した。人工脳脊髄液の組成は (単位は mM)、NaCl 117, KCl 3.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, glucose 11.5, NaHCO₃ 25 とした。実体顕微鏡下に硬膜を切除し、腰膨大部レベルで後根を分け、電極刺入スペースを確保した。呼吸による脊髄の振動が抑制されていることを確認し、一部のくも膜と軟膜を電極刺入用に剥離した。

(2) ニューロンからの電気生理学的記録

マイクロマニピレーターを用いて、電極を脊髄内に刺入し、脊髄背側表面から 50 µm - 150 µm の深さより、ブラインドホールセルパッチクランプ記録を行った。記録用電極には先端抵抗 8 - 12 MΩ のガラス微小電極を用いた。電極内液の組成は、(単位は mM) Cs-sulfate 110, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5,

HEPES 5, tetraethylammonium 5, ATP-Mg salt 5 とした。得られた電流は、パッチクランプ用増幅器 (Axopatch 200B, Molecular Devices、米国) を用いて記録したのち、Clampfit 10.3 (Molecular Devices、米国) または Mini Analysis 6.0 (Synaptosoft、米国) を用いて解析した。保持膜電位は -70 mV として記録を行った。リドカインは生理食塩水で溶解し、1、3、10 mg/kg に相当する量を総量 100 µl として、尾静脈から 3 分間かけて静脈投与した。

4. 研究成果

(1) 静脈投与したリドカインは自発性興奮性シナプス後電流の頻度を抑制する

自発性興奮性シナプス後電流 (EPSC) の頻度は投与前と比較して、3 mg/kg 群では 70.7 ± 17.3 % (p < 0.05) に、10 mg/kg 群では 33.9 ± 18.6 % (p < 0.01) に減少した。振幅に関しては、有意差は認めなかった (Fig. 1, 2)。リドカインは濃度依存性に自発性 EPSC の頻度を減少させた。リドカインによる抑制作用は可逆的で、投与後約 10~30 分で、投与前の水準まで回復した。

Figure 1

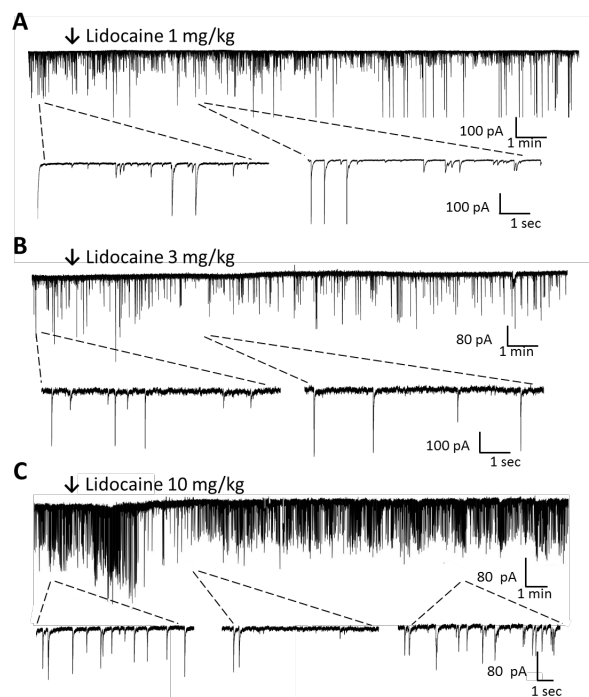
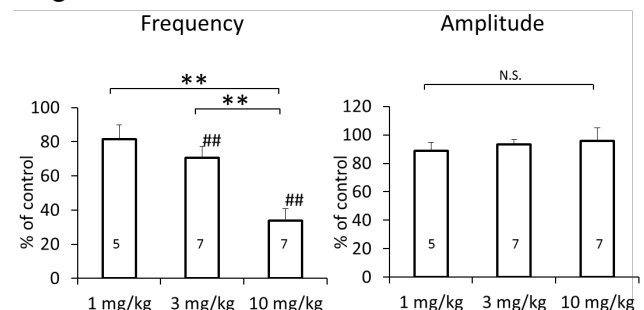


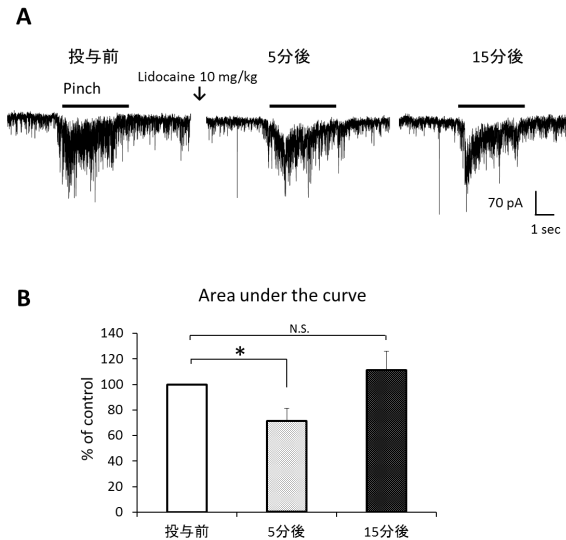
Figure 2



(2) 静脈投与したリドカインは誘発性 EPSC を抑制する

下肢受容野に有鉤鑷子で pinch 刺激を与えることにより、誘発性 EPSC が記録できる。基線と誘発性 EPSC によって囲まれた部分の面積の総和を AUC (area under the curve) として、リドカイン投与前後で比較した。リドカイン投与により、5 分後には AUC は投与前に対して $71.4 \pm 10.4\%$ ($n=7, p<0.05$) に減少し、15 分後には投与前の水準まで回復した (Fig.3)。

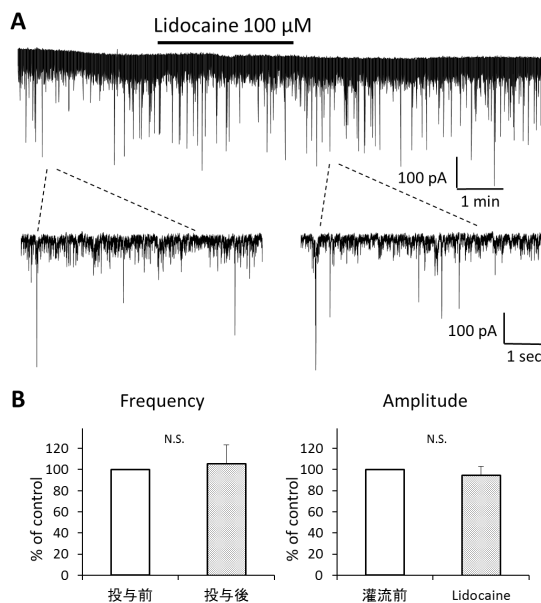
Figure 3



(3) 脊髄表面に灌流投与したリドカインは自発性 EPSC に影響しない

これまで観察された反応が、血中から脳脊髄液中へ移行したリドカインによる作用である可能性を考慮し、リドカイン $100 \mu\text{M}$ を脊髄表面に 2 分間灌流投与した。しかし、灌流投与によって自発性 EPSC の頻度、振幅いずれも変化しなかった (Fig.4)。

Figure 4



我々の研究により、静脈投与したリドカインは、脊髄後角ニューロンにおいて自発性 EPSC の頻度を濃度依存的、可逆的に抑制することが明らかとなった。さらに、静脈投与したリドカインは pinch 刺激による誘発性 EPSC も抑制した。これらの結果から、リドカインは、脊髄後角ニューロンにおいてシナプス前終末からのグルタミン酸の放出を抑制し、その結果として脳への痛覚伝達が抑制され、鎮痛作用を発揮している可能性が示唆される。

これまで、行動学的および電気生理学的解析によって、静脈投与したリドカインが神経障害性疼痛および炎症性疼痛に対して鎮痛作用を発揮することが報告されている。Devor らは静脈投与したリドカインが神経伝導を抑制しない濃度で、神経切断によって形成された neuroma 及び後根神経節からの異所性発火を抑制したと報告している⁷。また、Kawamata らは、*in vivo* パッチクランプ法を用いた解析により、リドカイン 2 mg/kg の静脈投与がラット後肢への小切開に起因する脊髄後角ニューロンの発火頻度を減少させたと報告している⁸。さらに、神経損傷によって Na^+ チャンネルの発現変化が起きることが知られており、その新たに発現した Na^+ チャンネルは、低濃度のリドカインでも阻害される可能性も示唆されている⁹。リドカインの末梢神経の障害部位に起因する異常発火を抑制する機序として、 Na^+ チャンネルの阻害作用が最も考えやすいと考察されている。本研究の結果から、静脈投与したリドカインは、脊髄後角において神経終末からの興奮性伝達物質の放出を減少させることがわかった。このリドカインの作用が静脈投与したリドカインが血中から脳脊髄液中に移行し、 Na^+ チャンネル阻害作用によって神経伝導を遮断した結果である可能性を考え、脊髄表面にリドカイン $100 \mu\text{M}$ (約 $30 \mu\text{g/ml}$) を灌流投与した。しかし、リドカインの灌流投与は自発性 EPSC に影響しなかった。脊髄後角ニューロンにおけるリドカインの Na^+ チャンネルに対する IC_{50} は約 $100 \mu\text{M}$ であることが知られている⁶。それに対し、リドカイン静脈投与時の血中濃度は数 $\mu\text{g/ml}$ であること、また脳脊髄液中の濃度はそれと同程度またはそれ以下であると考え、リドカイン静脈投与によって観察された脊髄での興奮性シナプス伝達の抑制は、血中から脳脊髄液へ移行したリドカインの Na^+ チャンネル阻害作用によって生じたものではないと考えられる。

近年、リドカインが Na^+ チャンネル阻害作用以外の作用を持つことが報告されている。例えば高濃度リドカインは、 Ca^{2+} チャンネル¹⁰ や *N*-methyl-D-aspartate 受容体¹¹ などを抑制すると報告されている。また、リドカイン静脈投与によって、髄腔内のアセチルコリン濃度が上昇したり¹²、グリシントランスポーターが阻害される¹³ ことが報告されている。今回観察された興奮性シナプス伝達の抑制には、 Na^+ チャンネル阻害作用というよりも他の受容

体や下行性抑制系¹⁴などが関与している可能性も考えられる。今後、これらの関与について検討する必要がある

引用文献

- 1) Challapalli V, Tremont-Lukats IW, McNicol ED et al: Systemic administration of local anesthetic agents to relieve neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003345, 2005
- 2) Frölich MA, McKeown JL, Worrell MJ et al: Intravenous Lidocaine Reduces Ischemic Pain in Healthy Volunteers. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 35: 249-254
210.1097/AAP.1090b1013e3181d23386, 2010
- 3) Zhao F, Williams M, Welsh DC et al: fMRI investigation of the effect of local and systemic lidocaine on noxious electrical stimulation-induced activation in spinal cord. *Pain* 145: 110-119, 2009
- 4) Jaffe RA, Rowe MA: Differential nerve block. Direct measurements on individual myelinated and unmyelinated dorsal root axons. *Anesthesiology* 84: 1455-1464, 1996
- 5) Huang JH, Thalhammer JG, Raymond SA et al: Susceptibility to lidocaine of impulses in different somatosensory afferent fibers of rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 802-811, 1997
- 6) Olschewski A, Schnobel-Eehalt R, Li Y et al: Mexiletine and lidocaine suppress the excitability of dorsal horn neurons. *Anesth Analg* 109: 258-264, 2009
- 7) Devor M, Wall PD, Catalan N: Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* 48: 261-268, 1992
- 8) Mikito Kawamata MD, Hidemasa Furue PD, Yuji Kozuka MD et al: Changes in properties of substantia gelatinosa neurons after surgical incision in the rat in vivo patch clamp analysis. *Anesthesiology* 104: 432-440, 2006
- 9) Mao J, Chen LL: Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. *Pain* 87: 7-17, 2000
- 10) Butterworth JFt: Models and mechanisms of local anesthetic cardiac toxicity: a review. *Reg Anesth Pain Med* 35: 167-176, 2010
- 11) Furutani K, Ikoma M, Ishii H et al: Bupivacaine inhibits glutamatergic transmission in spinal dorsal horn neurons. *Anesthesiology* 112: 138-143, 2010
- 12) Klas S.PAbelson AUH: Intravenously administered lidocaine in therapeutic doses increases the intraspinal release of acetylcholine in rats. *Neuroscience*

Letters 317: 93-96, 2002

13) Werdehausen R, Kremer D, Brandenburger T et al: Lidocaine metabolites inhibit glycine transporter 1: a novel mechanism for the analgesic action of systemic lidocaine? *Anesthesiology* 116: 147-158, 2012

14) Lauretti GR: Mechanisms of analgesia of intravenous lidocaine. *Rev Bras Anestesiologia* 58: 280-286, 2008

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)

倉部美起、大橋 宣子、山本 豪、古谷 健太、大橋 正幸、紙谷 義孝、馬場 洋、河野 達郎、
静脈投与したリドカインの脊髄後角におけるシナプス伝達に対する作用
脊髄機能診断学、査読有、35 巻、2014、46 - 51

[学会発表](計 4 件)

Miyuki Kurabe, Action mechanisms of intravenous administration of lidocaine on synaptic transmission in spinal dorsal horn neurons : An in vivo patch-clamp recording
15th World Congress of Pain, October 6 - October 11, 2014
La Rural Convention Center, Buenos Aires, Argentina

倉部美起

静脈投与したリドカインの脊髄後角におけるシナプス伝達に対する作用
第 35 回脊髄機能診断研究会
東京商工会議所(東京都、千代田区)
2014 年 2 月 1 日

倉部美起

静脈投与したリドカインは脊髄におけるシナプス伝達に影響するか? ~ in vivo パッチクランプ法による解析 ~
第 6 回日本運動器疼痛学会
2013 年 12 月 7~8 日
神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)

倉部美起

静脈投与したリドカインの脊髄における鎮痛機序
麻酔科学会第 60 回学術集会
2013 年 5 月 23 日~25 日
ロイトン札幌(北海道、札幌市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉部 美起 (KURABE Miyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：30636679

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：