

Ca²⁺-activated G_K⁺ に対する局所麻酔剤の効果

染井宏祐 加藤一郎 William K. Riker*
依田淳一 村田広紀 奈良一彦 鈴木 隆

岩手医科大学歯学部口腔生理学講座

(主任：鈴木 隆教授)

(受付：1995年1月25日)

(受理：1995年3月17日)

Abstract : Excised bullfrog sympathetic ganglia were pinned in a microperfusion chamber and single cells were impaled with 1M K⁺-citrate filled microelectrodes (20–60MΩ). Superfusion with caffeine (2–3mM) Ringer caused abrupt membrane hyperpolarization which quickly returned to control resting potential. Repetitive rhythmic membrane hyperpolarization (RMH) began approximately 1–2 min later and continued at the same frequency during caffeine superfusion. RMH ceased immediately on changeover to caffeine-free Ringer. Caffeine induces an oscillatory Ca²⁺-activated G_K⁺ in frog ganglion cells, and is evidently as RMH. We examined the mechanism of intracellular Ca²⁺ oscillation and the effects of ryanodine and local anesthetics. The 10 μM ryanodine, which selectively affected the Ca²⁺-release mechanism, irreversibly blocked the caffeine-induced RMH. Caffeine-induced RMH was reversibly blocked by 3mM procaine, 3mM cocaine, or 3.6mM lidocaine. Since adenosine triphosphate (ATP) reverses the procaine conduction block in frog nerve (Kuperman et al, 1964), we tested its effect on the procaine block of Ca²⁺-activated G_K⁺ in 24 of 42 cells. One mM ATP restored RMH amplitudes to 125 ± 5% of control, but did not restore RMH frequency. The results suggest that sympathetic ganglion cells have a Ca²⁺-induced Ca²⁺-release system and procaine > cocaine > lidocaine depress the rise in intracellular Ca²⁺ concentration that triggers G_K⁺, particularly since it is mediated though the P₂-receptor in the presence of extracellular ATP, which can increase cellular Ca²⁺, and reverse the procaine block.

Key words : sympathetic ganglion cells, caffeine-induced RMH, local anesthetics, ryanodine, ATP

緒 言

細胞内 Ca²⁺ が種々の細胞において、その細胞機能を調節していることは明らかである。細胞内 Ca²⁺ 濃度は静止時に低く保たれ、その濃度は外液に比べ 10000 分の 1 以下である。しか

し、何らかの要因が細胞に加わると細胞外より細胞内への Ca²⁺ の流入や、細胞内 Ca²⁺ ストアーからの Ca²⁺ の放出が起り、細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇する。その結果、筋肉の収縮¹⁾、伝達物質や唾液の放出^{2,3)}、ホルモンの分泌⁴⁾卵割の開始⁵⁾、膜の過分極^{6,7)}など種々の細胞機能が発現

Effects of local anesthetic on Ca²⁺-activated G_K⁺ in sympathetic ganglion cells.

Kohsuke SOMEI, Ichiro KATO, William K. Riker,* Junichi YODA, Hironori MURATA, Kazuhiko NARA, and Takashi A. SUZUKI

(Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27 Chuoh-dori, Morioka, Iwate 020 Japan)

(*Department of Pharmacology, school of Medicine, Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon, 97201 U. S. A.)

する。

最近、種々の細胞において細胞内 Ca^{2+} の振動により筋線維のリズミカルな収縮や、細胞膜の電位の振動 (rhythmic membrane hyperpolarization; RMH) などの機能が明らかになってきた。しかし、いずれの細胞においても、細胞内 Ca^{2+} の振動について完全に明らかになったわけではない。久場や著者らは、ウシガエル交感神経節細胞を用いて、カフェイン (caffeine) によって細胞内 Ca^{2+} の上昇をきたし、 Ca^{2+} -activated K^+ チャネルが活性化して RMH が発現する機序について報告してきた⁸⁻¹²⁾。そこで本実験においては、ウシガエル交感神経節細胞にカフェインを投与し、細胞内記録法にて caffeine-induced RMH を観察し、RMH が種々の局所麻酔剤でどのように阻害されるかを比較検討した。さらに、その阻害効果が ATP によって回復することが認められたので、その機序についても検討した。

方 法

ウシガエル交感神経節の 8 番および 9 番の腰部神経節を実体顕微鏡下で摘出し、結合組織を丁寧に剝離し、実効容積 80 μ l の灌流装置上にインセクトピンで固定し、カエル Ringer 液および薬液を灌流 (1-2 μ l/sec) しながら 1 個の細胞より細胞内記録法にて測定を行なった。細胞内記録に使用したガラス微小電極内には 1 MK⁺-citrate を充填し、電極抵抗は一般的には 20-60 M Ω のものを使用した。電極は preamplifier (Dagan, Model-8100) に接続し、その出力をストレージオシロスコープ (日本光電, Model VC-11) とチャートレコーダー (日本光電, Model-RTA-1200) に接続して記録を行なった。

カエル Ringer 液の組成: 112mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8mM $CaCl_2$, 5mM HEPES, 1.8 mM NaOH で pH 7.2 であった。

使用した薬剤は以下の通りである。

caffeine, adenosine, c-AMP, ATP, c-GMP, procaine, cocaine, lidocaine は Sigma

Chemical 製, ryanodine, 9-21 ryanodine, K^+ -citrate は和光純薬製である。

これらの試薬を細胞に投与するときには、各実験のつど、上記 Ringer 液で必要な濃度に希釈して投与した。全ての実験は室温 (22-25°C) で行なった。

結 果

神経節細胞に 1MK⁺-citrate 電極を刺入し、2-3mM のカフェインを灌流すると数分後に膜電位は急速に過分極 ($X = 15$ mV) を起こす。そして、さらに遅れること数分後に RMH が開始する。この応答は caffeine を投与している間のみ観察されカフェインを含まない Ringer 液に戻すと消失する。この応答の交感神経節細胞での出現率は 84%, 出現頻度は 1.3 ± 0.4 / min, 振幅は 17 ± 0.7 mV であった。なお、著者らは RMH のパターン解析を行ない、4 つのパターンがあることをすでに報告している¹³⁾、そのパターン解析によって一番出現率が高かった regular beating type の RMH を今回の実験に使用し以下の実験を行なった。

1. RMH に対するライアノジンの効果

3mM カフェインで引き起こされる RMH は、細胞内の Ca^{2+} ストアでの Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) の機構に特異的に作用し、 Ca^{2+} イオンチャネルを開口固定する 10 μ M ライアノジン¹⁴⁾の投与により、3mM カフェイン存在下でも投与後 2 分以内に caffeine-induced RMH は完全に阻害された (Fig.1)。その後直ちに、3mM カフェインの溶液に戻し約 1 時間洗滌したが、カフェインによる RMH は出現しなかった。次に、ライアノジン誘導体の 9-21 ライアノジン 10 μ M を 3 mM カフェイン存在下で投与しても、RMH はライアノジンの適用時よりは阻害効果発現までに時間を要し、その効果は不可逆性であった (Fig.2)。

2. RMH に対する種々局所麻酔剤の効果

2-3mM カフェインで引き起こされる RMH は、 Ca^{2+} によって引き起こされる Ca^{2+} の放出

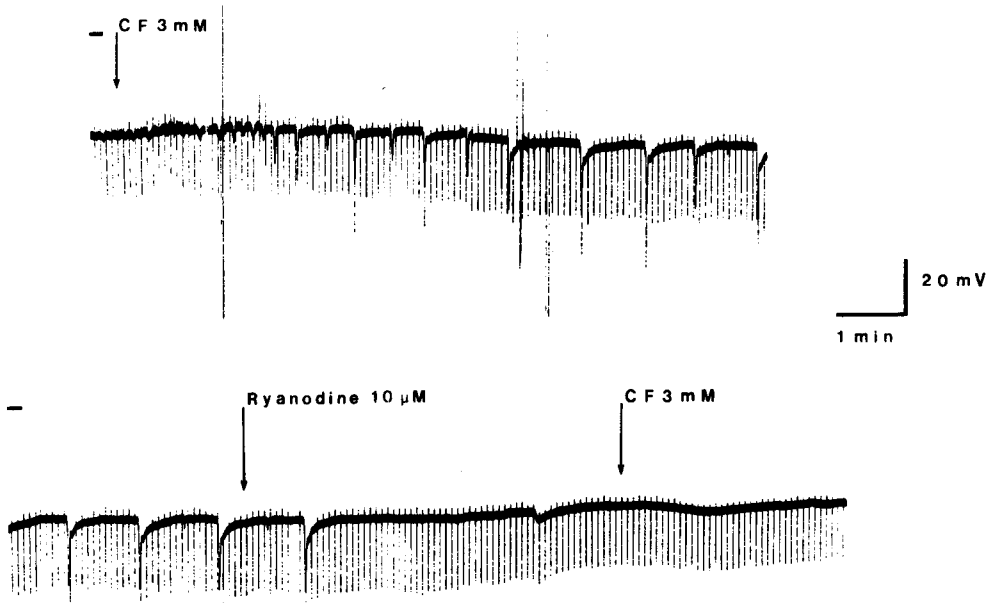


Fig.1 Intracellular recordings of caffeine-induced rhythmic membrane hyperpolarization (RMH) in bullfrog sympathetic neurons. The upper trace shows a response to 3mM caffeine as a control. Shortly after the start (downward arrow) of 3mM caffeine superfusion, regular RMH develops. The lower trace shows a response to caffeine in the presence of ryanodine. Periodical downward deflection denote the electrotonic potentials of the membrane induced by constant current (5nA) pulses with a duration of 200ms and an interval of 5s. Horizontal bars in the left shoulders denote zero level. Intracellular recording from a ganglion cell during continuous superfusion with 3mM caffeine.

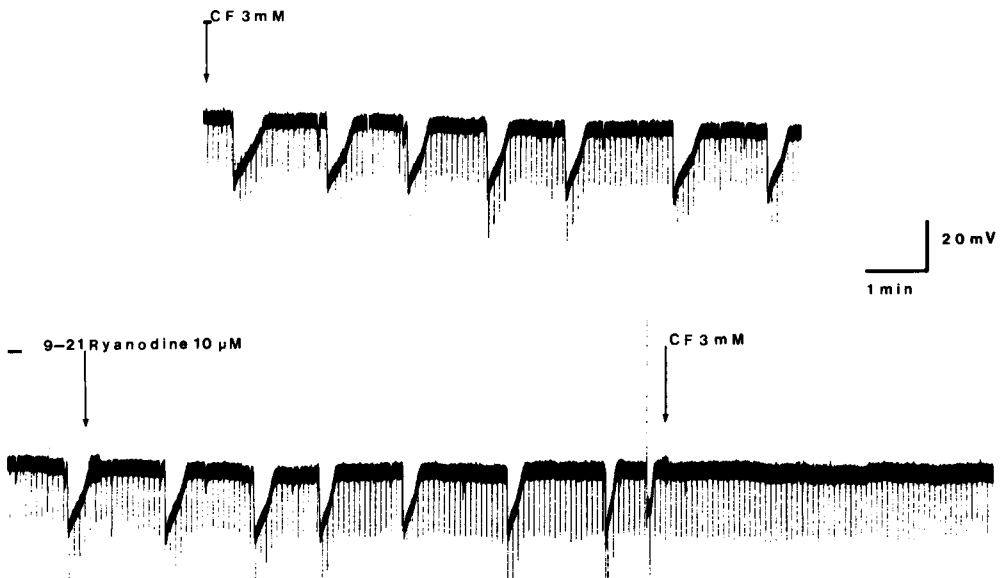


Fig.2 Effect of 9-21 ryanodine . Other nomenclature is the same as in Figure 1.

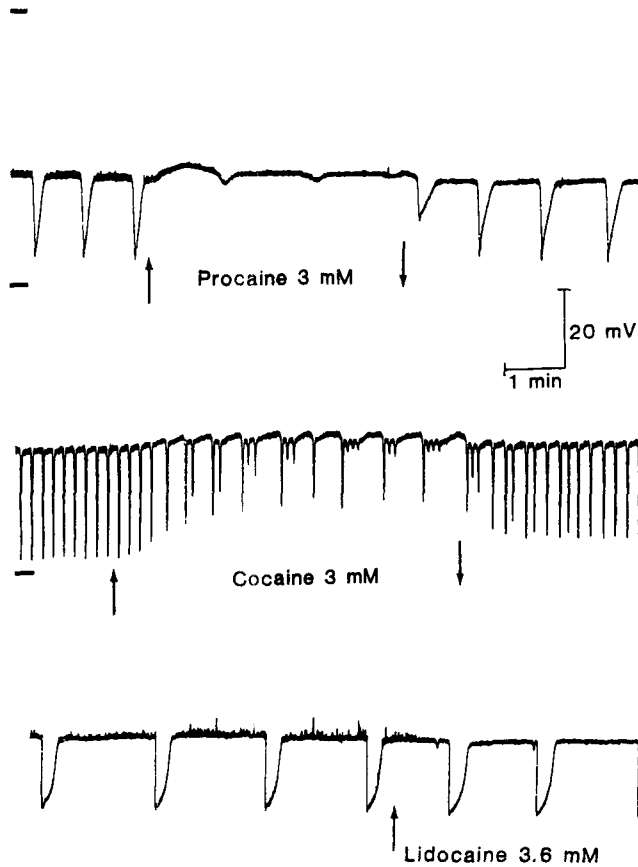


Fig.3 Reduction of rhythmic membrane hyperpolarization amplitudes and frequencies by local anesthetics. Intracellular recordings from the ganglion cells. The upper trace shows a response to caffeine in the presence of procaine. Superfusion with 3mM procaine was started and then discontinued at the arrows ($\uparrow\downarrow$). The middle trace shows a response to caffeine in the presence of cocaine. The lower trace shows a response to caffeine in the presence of lidocaine. Intracellular recording from a ganglion cell during continuous superfusion with 3mM caffeine.

Table 1 Blocking effects of local anesthetics on caffeine-induced RMH.

[Drug]	Number of cells	Abolition of RMH	Percentage reduction from control RMH		Number of cells
			Amplitude	Frequency	
Procaine 3mM	60	18/60	66 \pm 3*	62 \pm 5	42
Cocain 3mM	21	1/21	46 \pm 4	59 \pm 2	20
Lidocaine 3.6mM	43	0/43	14 \pm 4	39 \pm 6	43

* X \pm S. E. x

を抑制するといわれている 3mM プロカイン¹⁵⁾の投与で著しく阻害された (Fig.3)。RMH の出現頻度, 振幅はコントロール (カフェイン単

独) の応答に比べて両者共に約 70% の抑制が見られた (Table 1)。また, 3mM プロカインで完全に阻害された RMH は 60 個中 18 個の細胞

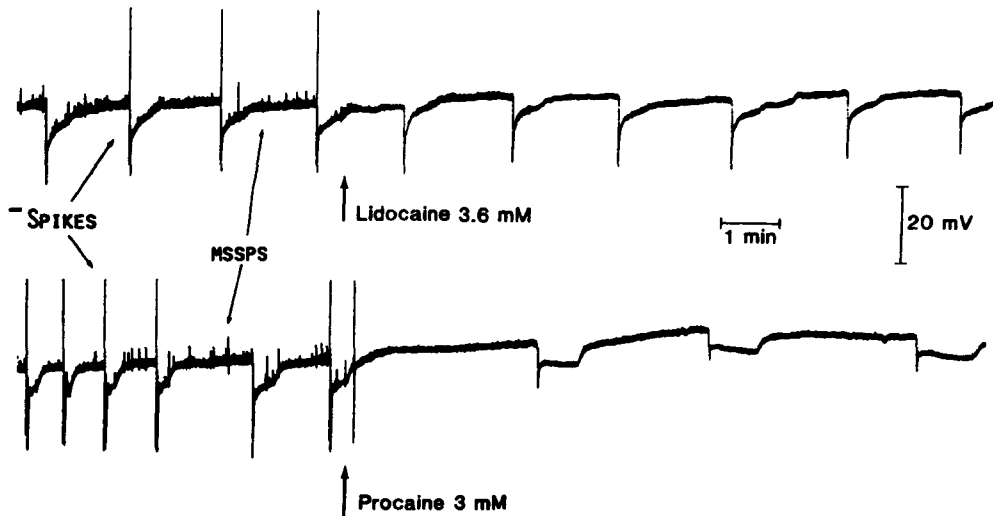


Fig.4 Equipotency of local anesthetics (3.6mM lidocaine, 3mM procaine) for blocking of spikes and miniature spontaneous synaptic potentials, but unequal potencies for blocking of RMH. Intracellular recording from a ganglion cell during continuous superfusion with 3mM caffeine.

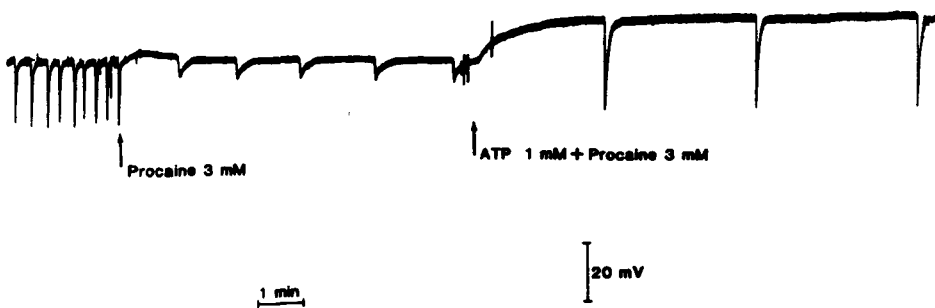


Fig.5 Effect on procaine blocking of RMH. The 1mM ATP restored RMH amplitudes but did not restore RMH frequency. Intracellular recording from a ganglion cell during continuous superfusion with 3mM caffeine.

で観察された。

次に、プロカインと同じくエステル型局所麻酔剤のコカイン 3mM を投与してみた。caffeine-induced RMH はプロカイン投与のと

きよりその効果は弱く、コントロールに比べてその出現頻度は 59%、振幅は 46% であった (Fig.3 and Table 1)。また、3mM コカインで完全に阻害された RMH は 21 個中 1 個の細胞

で見られた。

さらに、アミド型局所麻酔剤のリドカイン 3.6mM の投与では、caffeine-induced RMH はほとんど抑制されなかった (Fig.3)。その出現頻度で 40%、振幅ではわずか 15% の抑制しか見られなかった (Table 1)。また、3.6mM リドカインでは RMH の完全な阻害は 1 個の細胞にも観察されなかった。

しかし、これらの局所麻酔剤によるスパイクや miniature spontaneous synaptic potential に対する効果を調べてみると、caffeine-induced RMH の RMH に対する阻害効果はプロカイン > コカイン > リドカインであったにもかかわらず、このような電気現象にたいしては 3 種の局所麻酔剤は全て完全に阻害した (Fig.4)。

3. プロカインの RMH に対する阻害効果を restore する ATP

Kuperman ら¹⁶⁾はカエルの座骨神経の興奮伝導をプロカインで完全に阻害させた後に ATP を投与すると、プロカインによって阻害された座骨神経の興奮伝導が再び発現することを報告している。このようなことを著者らの実験において検討した。すなわち、3mM プロカインで阻害をされた caffeine-induced RMH に対して 1mM ATP を投与すると、膜電位は 10mV 程度脱分極し、3mM プロカインによって阻害されていた RMH が再び発現し (Fig.5)。その出現頻度は restore をしなかったが、RMH の振幅は完全に restore した。図には示さなかったが、この restore 効果はアデノシン誘導体の ADP では見られたが、他のアデノシン誘導体 (c-AMP, c-GMP, adenosine) では見られなかった。

考 按

ウシガエル交感神経節細胞で観察される caffeine-induced RMH の発現機序や性質は、Kuba と彼の共同研究者そして著者らによって細胞内 Ca^{2+} -activated G_k^+ 増大によって引き起こされることが報告されている^{13,17-19)}。しか

し、この RMH がカフェインの投与により細胞内で Ca^{2+} の上昇がみられることまでは解明されていたが、その機序については未だ明らかでなかった。多くの研究者はこれまで細胞内の Ca^{2+} ストアーの存在について考えてきた。著者らもこの点に注目し本実験を行ってきた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節機構としては、 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR)²⁰⁾ と inositol triphosphate-induced Ca^{2+} -release (IICR)²¹⁾ とが考えられている。骨格筋や平滑筋に CICR の機構が存在することは既に知られている^{21,22)}。最近、CICR 機構が神経細胞にも存在することが明らかになった²³⁾。しかし、交感神経節細胞ではその存在は明らかでない。そこで著者らは CICR の存在を確かめるために、CICR 機構に特異的に作用し Ca^{2+} を放出する Ca^{2+} イオンチャンネルを開口固定するといわれているライアノジンや 9-21 ライアノジンを投与し、非可逆性に caffeine-induced RMH を阻害することを観察した。さらに、筋細胞の CICR 機構に対して阻害作用をもつと言われているプロカインによっても caffeine-induced RMH は阻害されることを確かめた。それらの結果より、交感神経節細胞にも筋細胞でみられたと同じような CICR 機構が存在するのではないかと示唆され、caffeine-induced RMH はこの機構を介して発現するものと推定される。

本実験ではプロカインのほか同じエステル型のコカインとアミド型のリドカインについても調べてみた。これらの局所麻酔剤は caffeine-induced RMH に対してプロカイン、コカインのようなエステル型局所麻酔剤は強い抑制作用を示したが、アミド型に属するリドカインは弱い抑制作用しか見られなかった。このことより、交感神経節細胞の CICR の機構にたいしてはエステル型局所麻酔剤は阻害作用をもつが、アミド型局所麻酔剤はあまり阻害効果を持たないことが示された。次に、スパイクや miniature spontaneous synaptic potential のような電気的な応答に対しては、上記の 3 種類の局所麻酔剤は同じ阻害効果を示した。

また、局所麻酔剤のプロカインによって阻害された caffeine-induced RMH が ATP の投与で、RMH の振幅のみがコントロールのレベルまで restore した。Benham & Tsien²⁴⁾ が平滑筋に ATP を投与すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると報告しているが、本実験でもプロカインによる RMH に対する阻害効果が ATP 投与で restore する機序は、ATP が交感神経節細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こしたのと考えられる。

この発現機序として、ATP 投与によって膜の脱分極を引き起こすため、voltage-dependent な Ca^{2+} チャネルを通して細胞外 Ca^{2+} の流入が考えられるが、細胞の膜電位を人工的に脱分極させても caffeine-induced RMH の振幅は変化しなかった(図省略)。このことから ATP 投与による restore 効果は voltage-dependent な Ca^{2+} チャネルを介して起るものではないと考えられる。

さらに、交感神経節細胞には purinergic-receptor の存在があると考えられている²⁵⁾。しかし、purinergic-receptor には 3 種類あることが知られている。交感神経節細胞での purinergic-receptor の型を調べてみると、本実験で使用しているカフェインのようなキサンチン誘導体の存在下でも ATP の脱分極性応答が出現する。そのほか ATP および ADP の投与によってのみプロカインで阻害された RMH の振幅がコントロールのレベルまで restore し、他のアデノシン誘導体(アデノシン, c-AMP, c-GMP) では restore しないものがあった。このことから、この restore 効果は P_1 -receptor を介して起るものでなく、 P_2 -receptor を介してこの効果が発現するものと考えられる。

今後、caffeine-induced RMH に対して種々の局所麻酔剤の作用を調べ、さらに、局所麻酔剤による阻害効果を restore する ATP, ADP の投与により細胞内 Ca^{2+} イオン濃度が増大する機序として phospholipase C (PLC) の活性化が起り、それに引き続いてイノシトール 1, 4, 5-3 リン酸 (IP_3) の産生が考えられるの

でこの点についても詳細に検討することが必要であろう。

結 論

ウシガエル交感神経節細胞にカフェインを投与すると rhythmic membrane hyperpolarization (RMH; Ca^{2+} activated G_x^+) が発現する。この応答がどのような機序によって起るのかを細胞内 Ca^{2+} -ストアーからの Ca^{2+} の放出をする Ca^{2+} イオンチャネルを阻害するライアノジンやその誘導体、及び局所麻酔剤を使用し、細胞内記録法で検討した。

1. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR) の機構に特異的に作用し、 Ca^{2+} チャネルを開口固定するといわれているライアノジンおよびライアノジン誘導体によって caffeine-induced RMH は非可逆性に阻害された。
2. 同じく、CICR の機構を阻害するといわれているプロカインの投与によって caffeine-induced RMH は可逆性に阻害された。
3. 他の局所麻酔剤コカイン及びリドカインを投与すると caffeine-induced RMH はコカインでは阻害されたが、リドカインではほとんど阻害されなかった。このことより caffeine-induced RMH はエステル型局所麻酔剤(プロカイン, コカイン)では阻害され易いが、リドカインのようなアミド型局所麻酔剤では阻害され難いことが示唆された。これら 3 種類の局所麻酔剤の RMH に対する阻害の強さはプロカイン > コカイン > リドカインの順であった。
4. スパイクや miniature spontaneous synaptic potential などの電氣的応答にたいしては 3 種類の局所麻酔剤とも同様な阻害効果を示した。
5. プロカインで阻害された caffeine-induced RMH は、アデノシン誘導体の ATP, ADP の投与でのみ RMH の振幅はコントロールのレベルまで restore した。しかし、他のアデノシン誘導体(アデノシン, c-AMP, c-GMP) ではプロカインによる阻害効果に対して何の効果も示さなかった。

以上の結果より、交感神経節細胞にも筋細胞に在る CICR 機構が存在することが示唆された。また、局所麻酔剤によって阻害された caffeine-induced RMH が ATP や ADP の投与で restore する機序については、交感神経節細胞の P_2 -receptor を介して起るのではないかという事が考えられる。

文 献

- 1) Endo, M., Tanaka, M., and Ogawa, Y. : Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. *Nature.*, 228 : 34 - 36, 1970.
- 2) Blaustein, M. P., Ratzalaff, R. W., and Schweitzer, E. S. : Calcium buffering in presynaptic nerve terminals : II Kinetic properties of the nonmitochondrial Ca sequestration mechanism. *J. Gen. Physiol.*, 72 : 43 - 66, 1978.
- 3) Gromada, J., Jorgensen, T. D., Tritsarlis, K., Nauntofte, B., and Dissing, S. : Ca^{2+} signalling in exocrine acinar cells : the diffusional properties of cellular inositol 1, 4, 5-trisphosphates and its role in the release of Ca^{2+} . *Cell Calcium.*, 14 : 711 - 723, 1993.
- 4) Chay, T. R., and Keizer, J. : Minimal model for membrane oscillations in the pancreatic β -cell. *Biophysic. J.*, 42 : 181 - 190, 1983.
- 5) Miyazaki, S., and Igusa, Y. : Fertilization potential golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarization. *Nature.*, 290 : 706 - 707, 1981.
- 6) Skov, V. I., Storch, N. N., and Nishi, S. : The effect of caffeine on the neurons of a mammalian sympathetic ganglion. *Neuroscience.*, 3 : 697 - 708, 1978.
- 7) Suzuki, T., and Kusano, K. : Rhythmic membrane changes in hamster parasympathetic neurons. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 8 : 213 - 236, 1983.
- 8) Kuba, K. : Release of calcium ions linked to the activation of potassium conductance in a caffeine-treated sympathetic neurone. *J. Physiol.*, 288 : 251 - 269, 1981.
- 9) Kuba, K., Morita, K., and Nohmi, M. : Origin of calcium ions involved in the generation of a slow afterhyperpolarization in bullfrog sympathetic neurones. *Pflügers Archiv.*, 399 : 194 - 202, 1983.
- 10) Kuba, K., and Nishi, S. : Rhythmic hyperpolarizations and depolarization of sympathetic ganglion cells induced by caffeine. *J. Neurophysiol.*, 39 : 547 - 563, 1976.
- 11) Riker, W. K., and Somei, K. : Difference between Ca^{2+} - and Sr^{2+} - activated gK^+ in bullfrog sympathetic neurons. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 31 : 1 - 3, 1988.
- 12) Somei, K., Riker, W. K., and Mela-Riker, L. : Caffeine-induced rhythmic hyperpolarization in sympathetic ganglion cells. *Fed. Proc.*, 45 : 513, 1991.
- 13) Somei, K., and Riker, W. K. : Some new observation on caffeine-induced rhythmic hyperpolarization in sympathetic ganglion cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, 57 : 25 - 35, 1991.
- 14) Sutko, J. L., Ito, K., and Kenyon, J. L. : Ryanodine : A modifier of sarcoplasmic reticulum in striated muscle. *Fed. Proc.*, 44 : 2984 - 2988, 1985.
- 15) Bianchi, C. P., and Bolton, T. C. : Action of local anesthetics on coupling systems in muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 157 : 388 - 405, 1967.
- 16) Kuperman, A. S., Okamoto, M., Beyer, A. M., and Volpert, W. A. : Procaine action : Antagonism by adenosine triphosphate and other nucleotides. *Science.*, 144 : 1222 - 1223, 1964.
- 17) Morita, K., Koketsu, K., and Kuba, K. : Oscillation of $[Ca^{2+}]$ -linked K^+ conductance in bullfrog sympathetic ganglion cells is sensitive to intracellular anions. *Nature.*, 283 : 204 - 205, 1980.
- 18) Riker, W. K., Somei, K., and Mela-Riker, L. : Local anesthetic effects on Ca^{2+} -activated G_K^+ in bullfrog sympathetic ganglion cells. *Fed. Proc.*, 46 : 360, 1987.
- 19) Tokimasa, T. : Calcium-dependent hyperpolarizations in bullfrog sympathetic neurons. *Neuroscience.*, 12 : 927 - 937, 1984.
- 20) Fabiato, A. : Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cells. *J. Gen. Physiol.*, 85 : 247 - 289, 1985.
- 21) Iino, M. : Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.*, 94 : 363 - 383, 1989.
- 22) Sakai, T., Kurihara, S., and Yoshioka, T. : Action of manganese ions of excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibers. *Jpn. J. Physiol.*, 24 : 513 - 530, 1974.
- 23) Neering, I. R., and McBurney, R. N. : Role for microsomal Ca storage in mammalian neurones? *Nature.*, 309 : 158 - 160, 1984.
- 24) Benham, C. D., and Tsien, R. W. : A novel receptor-operated Ca^{2+} - permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature.*, 328 : 275 - 278, 1987.
- 25) Akasu, T., Hirai, K., and Koketsu, K. : Modulatory actions of ATP on membrane potentials of bullfrog sympathetic ganglion cells. *Brain Res.*, 258 : 313 - 317, 1983.