

シナプス伝達に対する局所麻酔剤の阻害効果

染井 宏祐, 依田 淳一, 栃内 明啓, 染井 啓次, 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：1994年10月31日)

(受理：1994年11月29日)

Abstract : Compound action potentials (CAP) in response to orthodromic stimulation of the presynaptic nerve trunk were recorded extracellularly from the bullfrog sympathetic ganglion. Application of lidocaine, procaine, tetracaine, or dibucaine significantly depressed the amplitude of CAP. When evaluated from the dose-inhibition curves, those local anesthetics have the following order of blocking potency : dibucaine \geq tetracaine > procaine \geq lidocaine. In addition, these local anesthetics were depressed the action potentials being conducted through the sympathetic nerve trunk at a higher concentration than that which blocked the synaptic transmission. The acetylcholine-induced depolarizing response intracellularly recorded from a sympathetic ganglion cell was markedly depressed by lidocaine at a concentration that blocked the synaptic transmission. The modes of inhibition of the synaptic transmission by lidocaine and procaine were both noncompetitive, while that by d-tubocurarine was competitive. These results suggest that local anesthetics mainly block the allosteric site of a nicotinic ACh receptor at the postsynaptic membrane rather than inhibiting the release of transmitter at the presynaptic terminal, to effecting the blocking of synaptic transmission.

Key words : synaptic transmission, impulse conduction, local anesthetics, nicotinic ACh-receptor.

緒 言

局所麻酔剤が、神経線維上の活動電位の伝導を阻害することは広く知られており¹⁻³⁾、これを利用して臨床的に痛覚の遮断を行なう。しかしこのような作用に加えて、最近局所麻酔剤にはシナプス伝達を阻害する作用もあることが報告されている⁴⁻⁷⁾。例えば局所麻酔剤のプロカインはカエルの神経筋接合部で終板電位を抑制する⁸⁻¹¹⁾。また *Electrophorus Electricus* においても、局所麻酔剤は ACh- レセプターに作用して

その活性化を抑制する¹²⁾。一方、局所麻酔剤は中枢神経系のシナプス前末端に作用して伝達物質の放出を抑制するという報告もある¹³⁾。このように、局所麻酔剤がシナプスの前末端に作用するのか、シナプスの後部膜に作用するのか確立していない。

本研究においては、カエルの交感神経節を用いて、局所麻酔剤のリドカインがはたして神経筋接合部でのシナプス伝達を阻害したように、交感神経節のシナプス伝達も阻害するかどうか確認するとともに他の局所麻酔剤が同様の作用

Blocking effects of local anesthetics on the synaptic transmission of bullfrog sympathetic ganglion cells.

Kohsuke SOMEI, Junnichi YODA, Akihiro TOCHINAI, Hirotsugu SOMEI, and Takashi A SUZUKI
(Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 19 : 192 - 202, 1994

をもつかどうかを調べた。また、これら局所麻酔剤がシナプス伝達を阻害する場合の阻害様式を調べ、その作用部位についても推論した。

方 法

1. 実験標本

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) の 8 番目の腰部交感神経節とそれに連なる前交感神経幹、交通枝、脊髄神経を一塊として摘出した。実体顕微鏡下で、交感神経節を覆っている結合組織を丁寧に剝離して神経細胞を露出し、カエルの Ringer 液に直接接浸るようにして、細胞外記録装置に固定した。

2. 細胞外記録

直径 5 mm, 深さ 3 mm の穴をプラスチック円板にあけた。これをシャーレのなかに置き、流動パラフィンを満たした。プラスチック板の穴には Ringer 液や Ringer 液に溶かした薬液を満した (容積 300 μ l)。白金イリジウム電極 (ϕ 0.2 mm) に標本を固定した後、この下で上下できる台のうえに上記シャーレを取り付けた。標本が流動パラフィンに浸るようにして乾燥を防ぎ、神経節の部位が Ringer 液や試薬に浸るようにした。前交感神経幹を 0.1 Hz, 0.2 mmsec のパルスで閾上電気刺激をし、これに対する応答である複合活動電位 (compound action potential: CAP) を細胞外記録した。節前線維刺激により引き起こされた CAP は神経節上と脊髄神経の尾側に置いた 2 本の白金イリジウム電極から導出した。この CAP を増幅器で増幅した後オシロスコープ上に写しだし、それをポラロイドカメラにて記録した。CAP の振幅が一定になるまで約 60 分放置したあと、測定を行なった¹⁴⁾。

Ringer 液のイオン組成は: NaCl 112 mM, KCl 2.0 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 5.0 mM, NaOH 1.8 mM (pH 7.2) である。

3. 細胞内記録

摘出した交感神経節を灌流装置上に固定し Ringer 液及びそれに溶かした薬液を灌流しながら細胞内記録法を用いて神経節細胞より記録

を行なった。なお、灌流装置の容積は 80 μ l, 流速は 1~2 μ l/sec であった。

細胞内記録に用いたガラス微小電極は、先端の直径 0.5 μ 以下、電極抵抗は 30~60 M Ω , 電極のなかには 1 M K-citrate を充填した。

細胞内に電極を刺入し、静止電位を記録した後に、50 μ M neostigmine を 1 時間ごとに 5 分間投与して ACh-esterase を完全に阻害しながら ACh- レセプターの活動度を測定した。

4. 試薬とその投与方法

細胞外記録において試薬の効果を見るときには、同じ濃度の同一試薬を前述のプラスチック円板の 2 か所の穴に満し、神経節部分を第一の液に 5 分間、次いで第二の液には 25 分間以上浸して、その濃度での試薬の効果が一定値に達した後に測定を行なった。

使用した薬剤は以下のとおりである;

procaine, tetracaine, dibucaine, acetylcholine chloride, neostigmine bromide (Sigma chemical 製), 4-aminopyridine (東京化成製), D-tubocurarine chloride (和光純薬製), lidocaine-HCl (藤沢薬品より提供)。これらの試薬を細胞に投与する場合は、各実験ごとに上記 Ringer 液で必要な濃度に希釈して投与した。

結 果

1. シナプス伝達に対する種々の局所麻酔剤の阻害効果

摘出したウシガエル交感神経節の前交感神経幹を一回閾上に電気刺激をすると、一つの節後な応答 CAP が得られる (Fig.1)。この CAP の振幅を指標として、種々の局所麻酔剤の阻害効果を調べた。1 mM lidocaine, 0.3 mM procaine, 30 μ M tetracaine, 30 μ M dibucaine のシナプス伝達に対する抑制効果の測定例を Fig.1 に示す。これらの局所麻酔剤の抑制効果は、投与開始後 15 分以内にプラトーレベルに到達し、ノーマル Ringer に戻すと CAP の振幅は再びコントロールの値に戻った。また局所麻酔剤の濃度を増加するとその抑制作用も用量

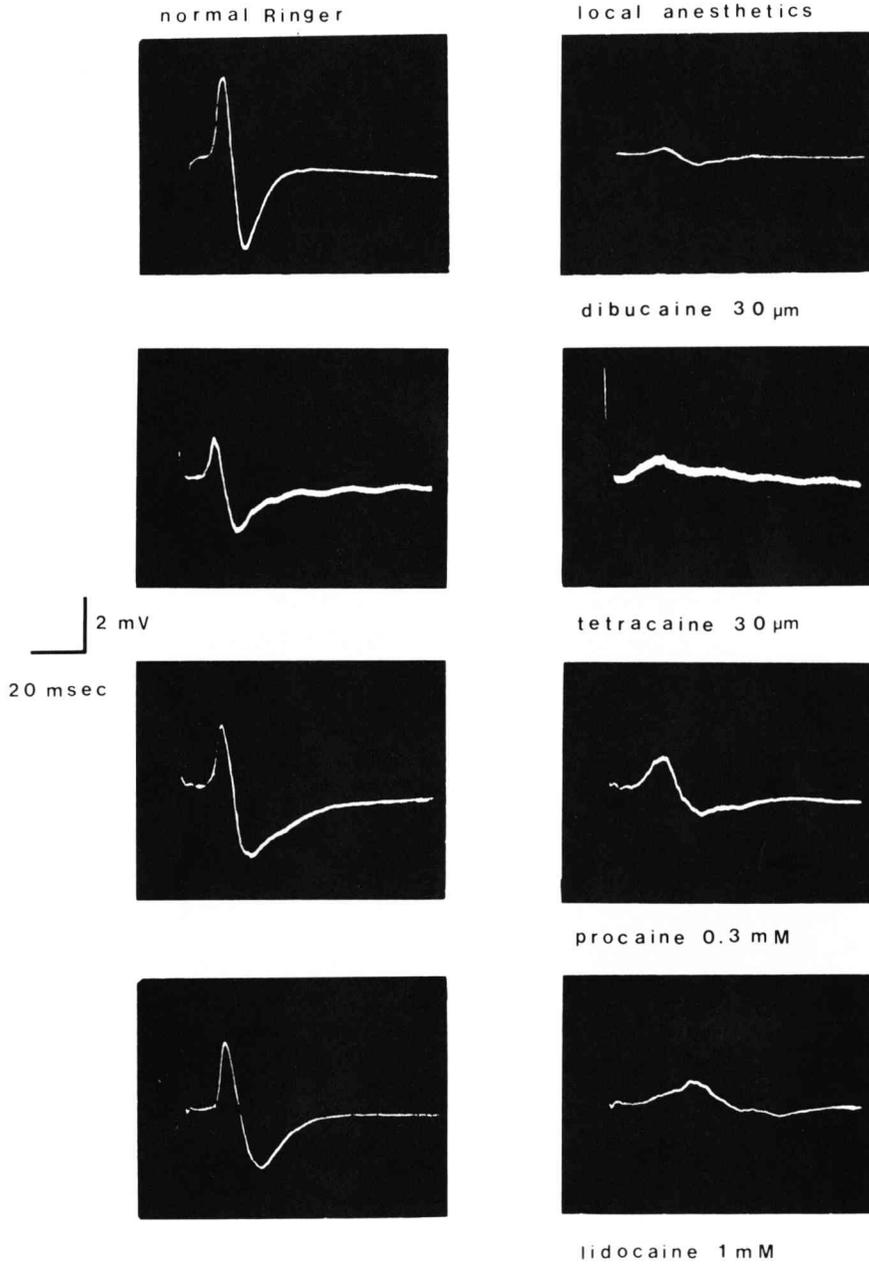


Fig. 1 Blocking effects of local anesthetics on the orthodromically evoked compound action potentials recorded from the bullfrog sympathetic ganglion. All traces on the left column indicate the control responses obtained from normal Ringer's solution, while those on the right column indicate the responses in the presence of dibucaine, tetracaine, procaine, and lidocaine, respectively.

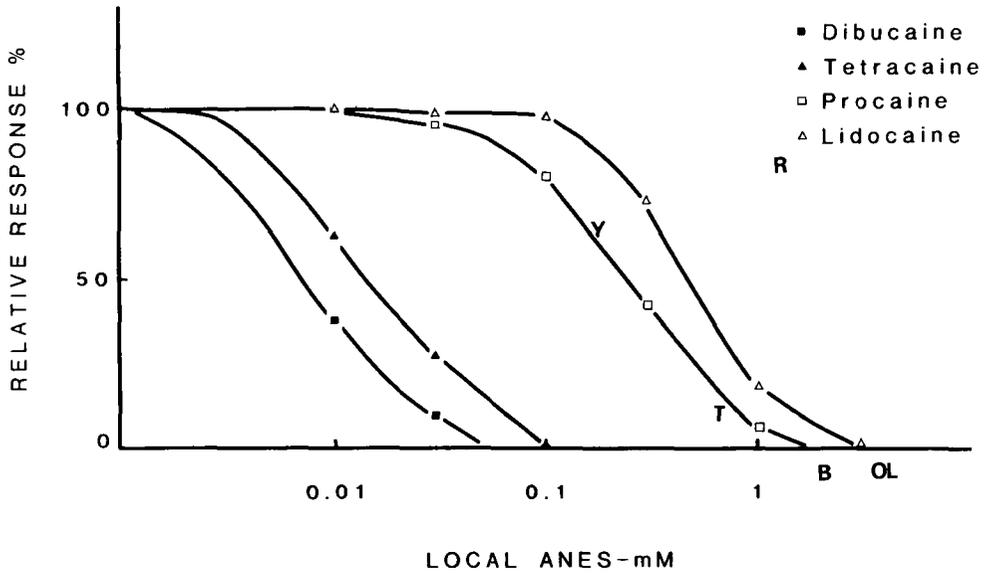


Fig. 2 Dose-inhibition curves for local anesthetics (dibucaine, tetracaine, procaine, lidocaine) obtained from CAP-amplitude. The CAP-amplitude recorded in normal Ringer's solution was taken as 100%, and relative values of the CAP-amplitude obtained in the varying concentrations of local anesthetics were expressed in % on the ordinate. Abscissa ; concentration of local anesthetics in logarithmic scale.

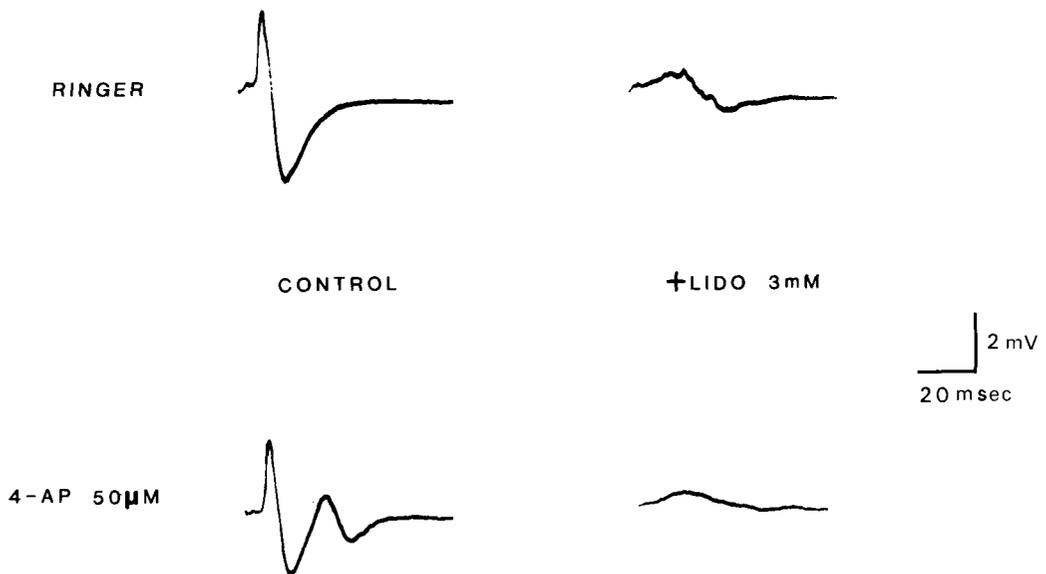


Fig. 3 Blocking effect of lidocaine on the CAP examined in the normal Ringer's solution (upper trace) and in 50 µM 4-AP solution (lower trace). Other nomenclatures are the same as in Fig. 1.

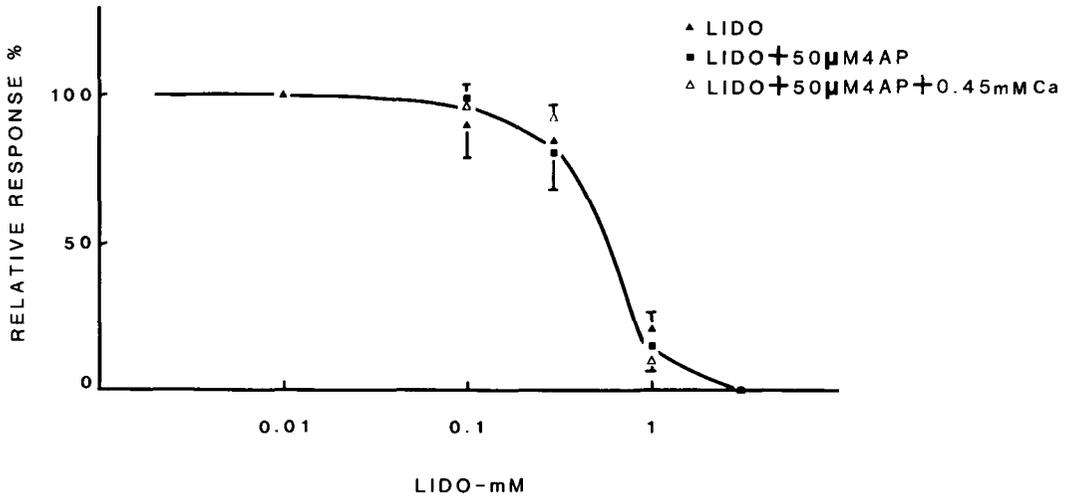


Fig. 4 Dose-inhibition curve for lidocaine obtained in the normal Ringer's solution (▲), in 50 μ M 4-AP solution (■), and in 50 μ M 4-AP + low Ca^{2+} (0.45mM) solution (△). Each point indicates mean value measured from 10 cells, with a vertical bar indicating S. D. Other nomenclatures are the same as in Fig. 2.

依存性に増大した。

2. 各局所麻酔剤の抑制効果の強さの比較

リドカイン、プロカイン、テトラカイン、ジブカインの抑制効果を定量的に比較するために縦軸にコントロールに対する局所麻酔剤存在下でのCAP振幅の相対値、横軸に各局所麻酔剤の濃度を対数目盛りでプロットした。我々はこれを用量-抑制曲線と呼んでいる¹⁴⁾。

その結果、Fig. 2 に示すごとく、4種類の局所麻酔剤の阻害の強さはジブカイン \geq テトラカイン $>$ プロカイン \geq リドカインの順序であった (ED_{50} : ジブカイン; 0.008 mM, テトラカイン; 0.02 mM, プロカイン; 0.5 mM, リドカイン; 0.7 mM)。これからジブカインとテトラカイン、プロカインとリドカインはそれぞれ同じ位の阻害強さを持つことがわかった。

3. 用量-抑制曲線による阻害様式の解析

これらの局所麻酔剤が主にどの部位に作用しているのかを解析する目的でシナプス前末端からの伝達物質の放出を low Ca^{2+} 溶液で減少させて受容体周辺の実効的な伝達物質濃度を低くした場合、また逆に 4-aminopyridine (4-AP) を用いて伝達物質の放出を増大させ受容体周辺

の伝達物質濃度を上げた場合について用量-抑制曲線を作成し、ノーマル Ringer でリドカインを作用させた場合と 4-AP で伝達物質の放出を増大させておいてリドカインを作用させた場合の測定例を Fig. 3 に示す。この図から明らかなように、4-AP の有無にかかわらずリドカインで抑制された CAP のコントロールに対する相対値はほぼ同じ程度であった。

この結果を用量-抑制曲線上で定量的に示すと Fig. 4 のようになった。すなわちノーマル Ringer 液中、および 50 μ M 4-AP 中で、一定濃度のリドカイン存在下での CAP の振幅をコントロール (リドカインがないときの応答) に対する相対値で表わした。各々の場合について 10 個の細胞で測定し、その平均値を求め用量-抑制曲線を作った。Fig. 4 から明らかなように 4-AP 存在下でも用量-抑制曲線は右方にも左方にも移動しなかった。ノーマル Ringer 液中の Ca^{2+} 濃度 (1.8 mM) を 1/4 の 0.45 mM Ca^{2+} にして、4-AP を投与して伝達物質の放出を元に戻した場合にも用量-抑制曲線のシフトは見られなかった。

同様の実験をプロカインについても行ない同

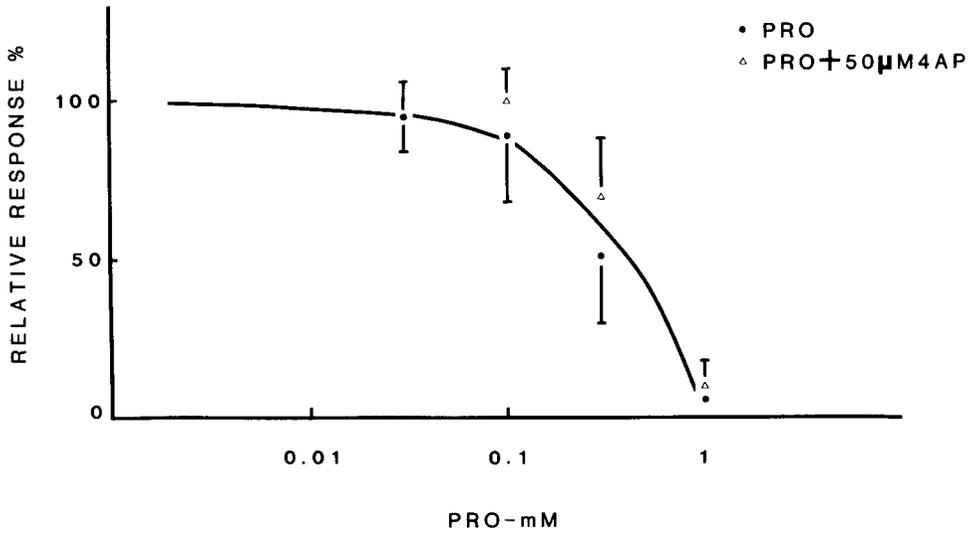


Fig.5 Dose-inhibition curves for procaine obtained in normal Ringer's solution (●), and in the 50 μM 4-AP solution (△). Other nomenclatures are the same as in Fig.2 and Fig.4.

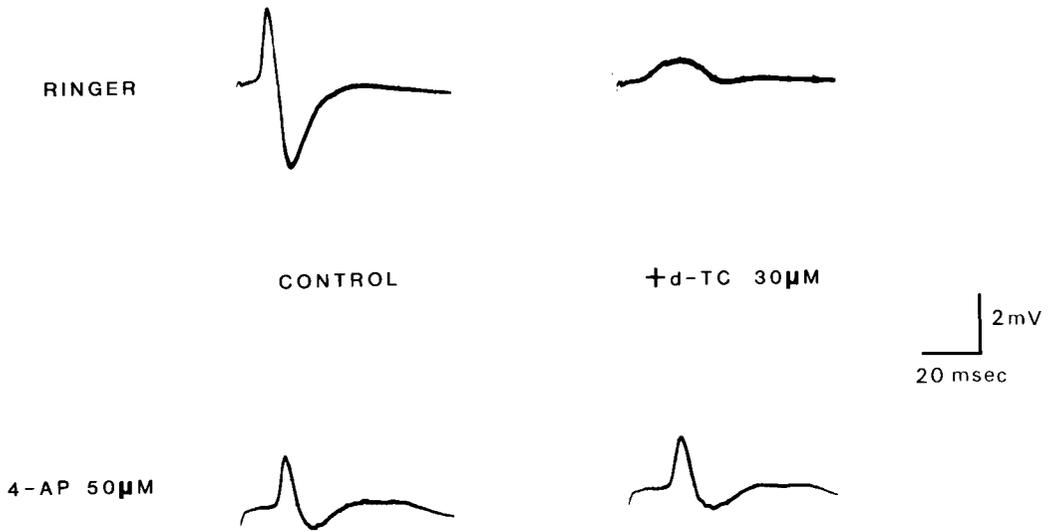


Fig.6 Blocking effects of 30 μM d-tubocurarine (d-TC) on the compound action potentials in the absence (upper trace) and presence (lower trace) of 50 μM 4-AP. Other nomenclatures are the same as in Fig.1.

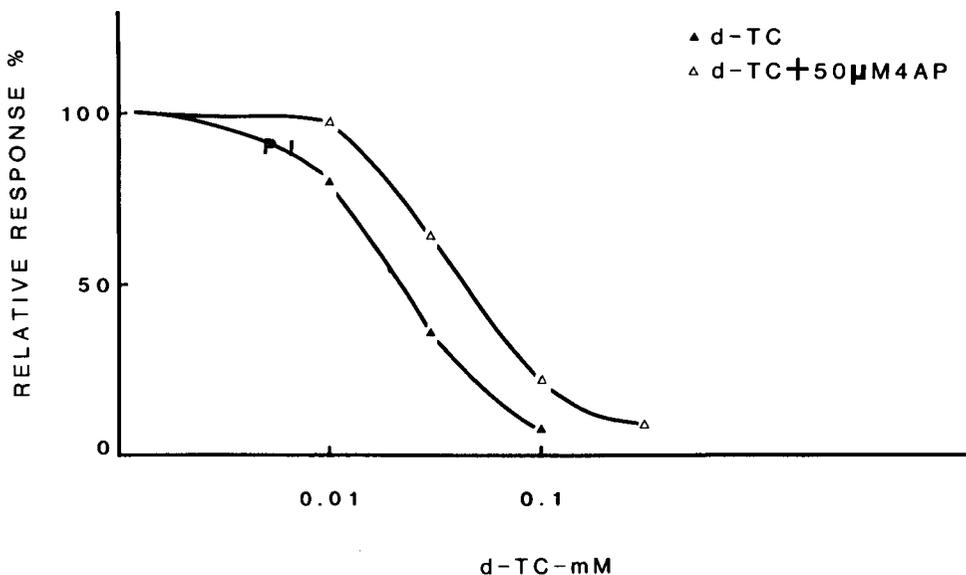


Fig. 7 Dose-inhibition curves for d-TC obtained from the CAP-amplitude. Other nomenclatures are the same as in Fig. 2.

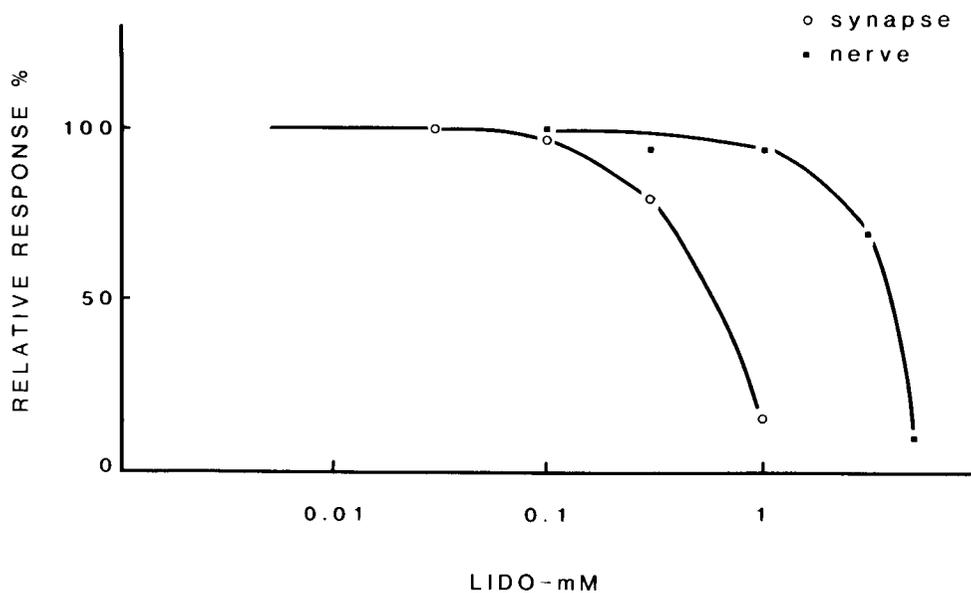


Fig. 8 Dose-inhibition curves for lidocaine obtained from blocking actions on synaptic transmission (○) and spike conduction (■). Other nomenclatures are the same as in Fig. 2.

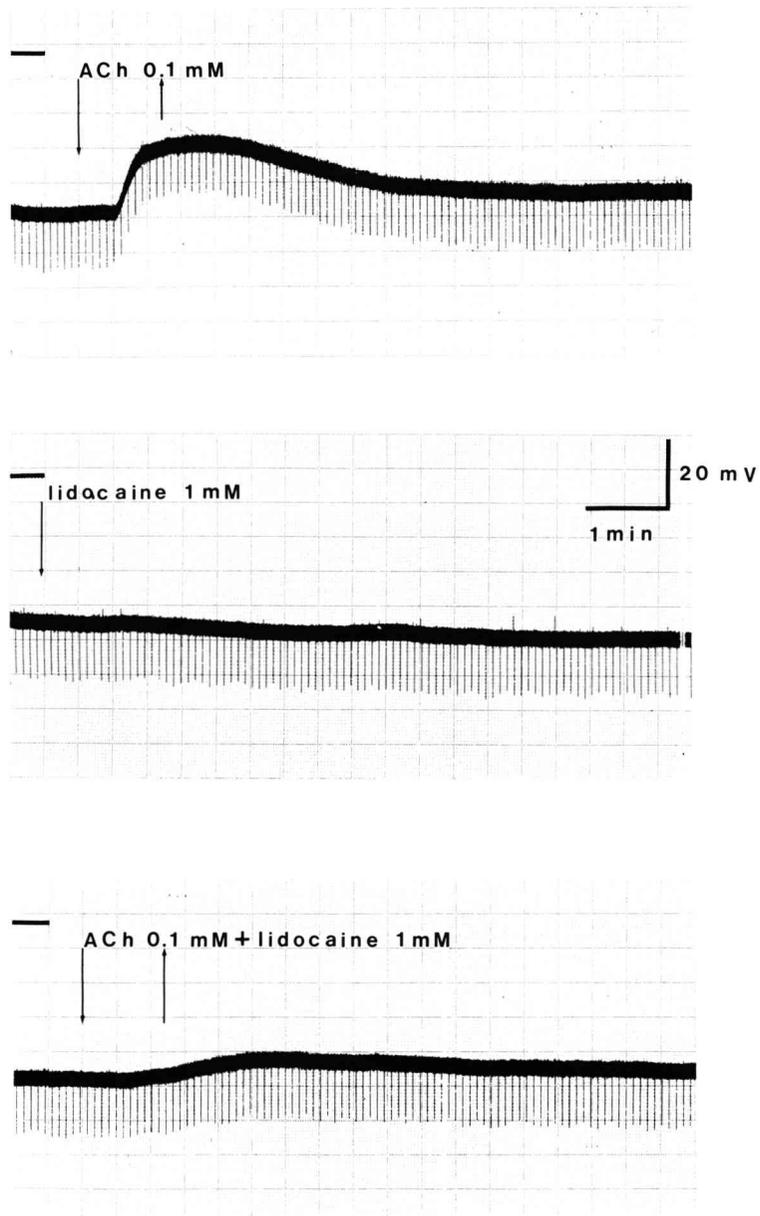


Fig.9 Blocking effects of lidocaine on acetylcholine (ACh)-induced depolarizing response intracellularly recorded from a sympathetic ganglion cell. The upper trace shows a response to 0.1mM ACh as a control. The middle trace shows the effect of 1mM lidocaine on the resting membrane. The lower trace shows the response to ACh in the presence of lidocaine. All records were obtained from a single sympathetic ganglion cell. Periodical downward deflections denote the electrotonic potentials of the membrane induced by constant current (5nA) pulses with a duration of 200ms and an interval of 5s. Short horizontal bars at the left shoulders denote zero level. The drug administration was started at the downward arrow and stopped at the upward arrow.

様な結果を得た (Fig.5)。

4. d-TC による CAP の抑制様式

クラール (d-TC) はニコチン型アセチルコリン (ACh) - レセプターに作用して ACh の結合を競合的に阻害することが知られている。交感神経節のシナプス後細胞にはニコチン ACh- レセプターがあり、これがシナプス前ニューロンを刺激した時の EPSP の発生に関与することは良く知られている。そこで 4-AP の存在下で d-TC による用量-抑制曲線がどのようにシフトするかについても調べた。Fig.6 に示したように、リドカインの場合とは異なり、CAP に対する d-TC の抑制作用は 4-AP 存在下では著しく弱くなった。この時、用量-抑制曲線はリドカインやプロカインで示された結果と異なり、4-AP 存在下では右方にシフトした (Fig.7)。

5. nerve trunk を伝導する活動電位に対する局所麻酔剤の効果

局所麻酔剤は本来軸索上を伝導する活動電位を阻害するために用いられる。そこで、今回用いた標本の前交感神経幹を伝導する活動電位に対するリドカインの抑制の強さについて調べ、CAP に対する抑制の強さと比較した。Fig.8 に示すように、前交感神経幹上で細胞外記録をした活動電位は用量依存性にリドカインで抑制された。リドカインの活動電位に対する抑制の強さと CAP に対する抑制の強さを、用量-抑制曲線で比較すると、その阻害の強さ (ED_{50}) は活動電位の伝導を抑制する強さよりも CAP に対する抑制の強さの方が約 5 倍強かった。

6. ニコチン型 ACh- レセプター応答に対するリドカインの阻害効果

単一交感神経節細胞からの細胞内記録下で 0.1 mM ACh を 1 分間投与すると膜電位は約 20 mV 脱分極し、この時膜抵抗の減少が見られた (Fig.9 上段)。

この細胞に 1 mM リドカインを単独で投与しても、静止時の膜電位や膜抵抗には何の影響も与えなかった (Fig.9 中段)。そこで 1 mM リドカインを 5 分間前投与した後、1 mM リド

カイン存在下で直ちに 0.1 mM ACh 溶液を 1 分間投与すると ACh の応答はほぼ完全に阻害された (Fig.9 下段)。

考 按

1. 局所麻酔剤の阻害の強さ

本研究の結果より、局所麻酔剤のジブカイン、テトラカイン、プロカイン、リドカインがカエル交感神経節でのシナプス伝達を阻害することが分った。これらの局所麻酔剤に共通した化学構造はアロマテック環とアミノグループの間が中間鎖により連結されていることである。中間鎖の構造は似ておりしかも長さもほぼ同じである。また、アロマテックな部分は脂溶性でアミノ基の部分は親水性である。それぞれの分子に特徴的なことはアロマテック環にはブチル基 (ジブカイン)、ブチルアミノ基 (テトラカイン)、アミノ基 (プロカイン)、2 個のメチル基 (リドカイン) が付いており、その長さはブチル基 ≧ ブチルアミノ基 > アミノ基 ≧ メチル基の順に短い。この部分の長さが長いほどアロマテック環の疎水性は高いと考えられるすなわち、実験で得られた阻害の強さの順序はこの長さの順、すなわち疎水性の大きな順序と一致していると考えられる。

2. 局所麻酔剤の作用部位

本研究ではリドカインがシナプス伝達の阻害作用に加えて交感神経幹を伝導する活動電位も阻害することを示した。しかしながら、リドカインの両者に対する阻害の強さを比較すると、シナプス伝達を阻害する場合の方が神経線維の興奮伝導を阻害に要する濃度の約 1/5 で抑制されることが分かった。この事から、交感神経節でのシナプス伝達の阻害作用は、神経終末からの伝達物質放出が抑制されることよりも、むしろシナプス後部膜での EPSP の発生を抑制するために発現すると考えられる。実際に神経節細胞に ACh を直接投与してニコチン型 ACh- レセプター刺激により発生させた脱分極応答も、CAP を完全に阻害する濃度のリドカインで著しく抑制された (Fig.7)。交感神経節

で発生する fast EPSP はニコチン型 ACh-レセプターの活性化で発生することはよく知られている。また、骨格筋の神経筋接合部では、プロカインが、活動電位を抑制するより低い濃度で終板電位や外から ACh を投与して発生させた脱分極性応答を抑制することが報告されている^{6,15-17)}。

本実験では用量-抑制曲線を用いてリドカインとプロカインのシナプス伝達に対する阻害の様式を解析した。その結果、両者とも非競合的にシナプス伝達を抑制していることが分った。一方 d-TC による阻害の様式は競合的であった。d-TC はシナプス後部膜にあるニコチン型レセプターの ACh 結合部位に作用して ACh の結合を阻害することはよく知られた事実である。もし局所麻酔剤が d-TC と同様、ACh の結合部位に働いているならばその阻害様式も d-TC 同様競合的阻害となるはずであるが、実験結果では非競合的阻害であった。従って、局所麻酔剤は同じニコチン型 ACh-レセプターに作用するのではあるが、その作用部位は若干異なっている。おそらくアロステリックな部位に作用してイオンチャネルの開き方を抑制していると考えられる。

以上のことから、ジブカイン、テトラカイン、プロカイン、リドカインは神経線維上を伝導する活動電位を抑制することに加えて、交感神経節のシナプス伝達も抑えることがわかった。またその作用部位はシナプス後部膜のニコチン型 ACh-レセプターであることが推察された。ただし実際のシナプス伝達の阻害作用の発現ではニコチン型レセプター活動度を抑えることに加え、シナプス終末部の活動電位を抑制する作用も弱いと同時に起き、両者の作用が相互に助長してシナプス伝達を抑制すると考えるべきであろう。今後、ニコチン型 ACh-レセプターと似た構造のレセプターをもつシナプスにおいても、交感神経節の場合と同様な効果があるか検討することが望まれる。

結 論

ウシガエル交感神経節シナプスを用いて、複合電位 (CAP) に対する種々局所麻酔剤の阻害効果を観察し、つぎの結論を得た。

1. 前交感神経幹刺激に应答する順行性 CAP の振幅は局所麻酔剤のジブカイン、テトラカイン、プロカイン、リドカインによって用量依存性に阻害された。

2. それらの阻害の強さは

ジブカイン \geq テトラカイン $>$ プロカイン \geq プロカインの順となったが、この違いは局所麻酔剤のアロマテック環側の疎水性に依存することが示唆された。

3. リドカインとプロカインのシナプス伝達に対する阻害様式は、いずれも非競合的であった。これに対して d-TC は競合的であった。

4. リドカインがインパルスの伝導を阻害するにはシナプス伝達を阻害する濃度の 5 倍の濃度が必要であることが示された。

5. シナプス後細胞に直接 ACh を投与して発生させた脱分極応答はシナプス伝達を完全に阻害するリドカインによって著しく抑制された。

6. 以上の結果より、局所麻酔剤はシナプス後部膜のニコチン型 ACh-レセプターのアロステリックな部位に作用してイオンチャネルが開くのを抑制する結果、シナプス伝達の阻害が起きるであろうと推論された。

文 献

- 1) Hill, B.: The common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves. *Nature*, 210: 1220-1222, 1966.
- 2) Narahashi, T., Frazier, D., and Yamada, M.: The site of action and active form of local anesthetics. I. Theory and pH experiments with tertiary compounds. *J. Pharmacol Exp Ther.*, 171: 32-44, 1970.
- 3) Strichartz, G.: Molecular mechanisms of nerve block by local anesthetics. *Anesthesiol.*, 45: 421-441, 1976.
- 4) Connor, E. A., and Parsons, R. L.: Procaine alters fast excitatory postsynaptic current decay in amphibian sympathetic ganglia. *Br. J.*

- Pharmacol.*, 78 : 293-299, 1983.
- 5) Katz, B., and Miledi, R. : The effects of procaine on the action of acetylcholine at the neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 249 : 269-284, 1975.
 - 6) Kordas, M. : The effect of procaine on neuromuscular transmission. *J. Physiol.*, 209 : 689-699, 1970.
 - 7) Ruff, R. L. : Local anesthetic alteration of miniature end-plate current fluctuations. *Biophys. J.*, 16 : 433-439, 1976.
 - 8) Adams, P. R. : Drug blockade of open end-plate channels. *J. Physiol.*, 260 : 531-532, 1976.
 - 9) Deguchi, T., and Narahashi, T. : Effect of procaine on ionic conductances of end-plate membrane. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 176 : 423-433, 1971.
 - 10) Furukawa, T. : Properties of the procaine end-plate potential. *Jpn. J. Physiol.*, 7 : 199-212, 1957.
 - 11) Katz, R. L., and Gissen, A. J. : Effects of inter-avenous and intraarterial procaine and lidocaine on neuromuscular transmission in man. *Acta. Anesthesiol Scand (Suppl)*, 36 : 103-113, 1969.
 - 12) Koblin, D. D., and Lester, H. A. : Voltage-dependent and voltage-independent blockade of acetylcholine receptors by local anesthetics in Electrophorus electroplaques. *Molec. Pharmac.*, 15 : 559-580, 1979.
 - 13) Matthews, E. K., and Quilliam, J. P. : Effect of central depressant drug upon acetylcholine release. *Br. J. Pharmac.*, 22 : 415-440, 1964.
 - 14) Riker, W. K. : Effects of tetraethylammonium chloride on electrical activities of frog sympathetic ganglion cells. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 145 : 317-325, 1964.
 - 15) Matsumoto, M., Sasaki, K., Somei, K., and Sato, M. : Dose-inhibition curve and its application to the analysis ACh-receptor activity. *Jpn. J. Physiol.*, 30 : 743-750, 1980.
 - 16) Hist, G. D. S., and Wood, Dr. : On the neuromuscular paralysis produced by procaine. *Br. J. Pharmac.*, 41 : 94-104, 1971.
 - 17) Maeno, T. : Analysis of sodium and potassium conductances in the procaine end-plate potential. *J. Physiol.*, 183 : 592-606, 1966.
 - 18) Maeno, T., Edwards, C., and Hashimura, S. : Difference in effects on end-plate potentials between procaine and lidocaine as revealed by voltage-clamp experiments. *J. Neurophysiol.*, 24 : 32-46, 1971.