

原 著

fMLP で誘導されるラット好中球の機能発現に及ぼす局所麻酔薬の影響

家 始 聡 介¹⁾ 東 幸 雄²⁾ 智 原 栄 一¹⁾ 柏 俣 正 典²⁾

Effects of local anesthetics on superoxide production and chemotaxis in fMLP-stimulated rat neutrophils

KASHI SOSUKE¹⁾, AZUMA YUKIO²⁾, CHIHARA EIICHI¹⁾, KASHIMATA MASANORI²⁾

局所麻酔薬は神経細胞や心筋細胞の Na⁺ チャネルを阻害して、神経細胞刺激伝導の抑制による局所麻酔作用や心筋細胞興奮の抑制による抗不整脈作用を発現する。また、局所麻酔薬は Na⁺ チャネル以外の標的分子に作用することが知られているがそれらの詳細な機序については不明な点が多い。本研究で、我々は fMLP で惹起された好中球の活性酸素産生と遊走能に対する局所麻酔薬の効果について検討を行った。全ての局所麻酔薬（リドカイン、ブピバカインおよびプロカイン）は fMLP で惹起された好中球の活性酸素産生と遊走能を濃度依存的に抑制した。また、局所麻酔薬は fMLP による p47^{phox} と PKC α の膜転移の膜転移、Akt とミオシン軽鎖のリン酸化を抑制した。カルシウム-カリモジュリン経路は p47^{phox}、PKC、Akt およびミオシン軽鎖のリン酸化に深く関与することが知られているが、本研究において局所麻酔薬はカルモジュリン依存性の phosphodiesterase を抑制することがわかった。以上の結果から、局所麻酔薬は少なくともその一部がカルシウム-カリモジュリンのシグナル伝達を介して好中球の機能を抑制することが明らかになった。

キーワード：好中球、シグナル伝達、局所麻酔薬

Local anesthetics are known to block the function of Na⁺ channels in nerve and cardiac cells, and also to affect the other functions of many cells. However, the precise mechanisms of these functions are still unknown. In this experiment, we investigated the effects of local anesthetics on superoxide production and chemotaxis in fMLP-stimulated neutrophils. All three local anesthetics (lidocaine, bupivacaine, and procaine) suppressed superoxide production and chemotaxis in fMLP-stimulated neutrophils, in a concentration-dependent manner. These anesthetics also suppressed the fMLP-stimulated membrane translocations of p47^{phox} and PKC α , phosphorylation of Akt and myosin light chain of myosin II. It is well known that a calcium-calmodulin cascade mediates the phosphorylations of the above signaling molecules, and local anesthetics suppressed the calmodulin dependent activation of phosphodiesterase in vitro. These results suggest that local anesthetics at least partially suppress the activation of neutrophil functions through the calcium-calmodulin signal transduction system.

Key words : neutrophils, signal transduction, local anesthetics

緒 言

局所麻酔薬は神経細胞および心筋細胞に作用して、その Na チャネルを阻害して神経細胞の刺激伝導を阻

害する局所麻酔作用および心筋細胞の興奮を抑制して抗不整脈作用を発現することが知られている¹⁾。さらに、局所麻酔薬は臨床で用いられる濃度で、K チャネルおよび Ca チャネルにも阻害することが知られ、種々

¹⁾ 朝日大学歯学部総合医科学講座麻酔学分野

²⁾ 朝日大学歯学部口腔感染医療学講座歯科薬理学分野
〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851番地1

¹⁾ Department of Anesthesiology, Division of General Medicine

²⁾ Department of Dental Pharmacology, Division of Oral Infection and Health Sciences, Asahi University School of Dentistry
1851-1 Hozumi, Mizuho-City, Gifu 501-0296, Japan
(平成30年3月9日受理)

の細胞機能に影響することが報告されている²⁻⁴⁾。しかし、その詳細な機序については明らかにされていない。

局所麻酔薬は、好中球の粘着^{5,6)}、遊走⁷⁾、活性酸素の産生⁸⁻¹⁰⁾、leukotriene B₄(LTB₄) および interleukin-1 (IL-1) の遊離¹¹⁾などを抑制することも知られているが機序については明らかにされていない。好中球には Na チャネルが存在しない¹²⁾ことから、これらの作用は Na チャネル阻害以外の作用に基づくものと考えられる。

そこで、ラット好中球をモデルとして細菌由来の遊走因子 formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine (fMLP) で誘導される活性酸素産生能および遊走能発現に関与する細胞内情報伝達系 (シグナル) に対する局所麻酔薬の影響に着目した。

シグナルに対する局所麻酔薬の作用は、好中球の Ca シグナルに影響を与えて、好中球の機能発現を抑制すると考えられている¹³⁾。特に、真核生物に広く分布する Ca 結合タンパク質カルモジュリンは、不活性の状態では細胞質に存在し、Ca²⁺ イオン濃度の上昇に伴ってその 4ヶ所の結合部位に Ca が結合して活性化される。活性化したカルモジュリンはカルモジュリン依存性のタンパク質リン酸化酵素に結合してその酵素を活性化させる。その結果、様々な生体機能に影響することが知られている^{14,15)}。また、局所麻酔薬がカルモジュリンを阻害することも報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。本研究では、Ca-カルモジュリンシグナル系と遊走能および p47^{phox} と活性酸素産生能に焦点をあて、局所麻酔薬の好中球機能発現に対する作用の解析を試みた。

材料および方法

1 試薬

RPMI1640培地, Hank's balanced salt solution (HBSS) および Gey's balanced salt solution (Gey's BSS) は Gibco Life Technologies (Grand Island, NY, USA) のものを使用した。fMLP, カルモジュリン, bupivacaine hydrochloride, lidocaine hydrochloride, procaine hydrochloride およびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) のものを使用した。N-ethylidocaine bromide (QX-314) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) のものを使用した。カルモジュリン拮抗薬: W-7は Calbiochem (San Diego, CA, USA) のものを使用した。抗 phospho-Akt (Ser 473) 抗体, 抗 Akt 抗体, 抗 PKC α 抗体, 抗 phospho-myosin light chain 2 (Ser 19) 抗体および抗 myosin light chain 2 抗体は Cell Signaling Biotechnology (Beverly, MA, USA) のものを使用した。抗 p47^{phox} 抗体は BD Biosciences

(Franklin Lakes, NJ, USA) のものを使用した。これらの一次抗体はすべてラット抗原を認識するものを用いた。二次抗体の抗マウス IgG 抗体と抗ウサギ IgG 抗体は Vector 社 (Burlingame, CA, USA) のものを用いた。

2 ラット好中球の調整

実験には体重250~300gのWistar系雄性ラットを用いた。ラット腹腔内に6%カゼイン水溶液を体重100gあたり10ml投与して18時間放置した。クロロホルム麻酔下で腹腔液を採取し、腹腔液に混入した赤血球を取り除くため氷冷低張緩衝液 (0.15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃および1mM EDTA) に懸濁させて10秒間処理した後、遠心分離 (800×g, 10分) し、沈渣をさらに phosphate buffered saline (PBS) で2回洗浄した。試料中の好中球を確認するため、浮遊液に含まれる細胞をメイ・ギムザ染色法とトリパンブルー染色法にて染色し、その95%以上が好中球であること、また95%以上が生細胞であることをそれぞれ確認した。すべての動物実験は朝日大学動物倫理委員会の承認 (承認番号10-006) を得て行った。

3 活性酸素産生の測定

好中球が産生するスーパーオキシドは、シトクロム C 還元法²⁰⁾で測定した。好中球浮遊液 (5×10⁶ cells/ml, 10mM HEPES および4mM NaHCO₃含有 HBSS に懸濁) にシトクロム C (最終濃度1.2mg/ml) と fMLP (最終濃度1 μ M) を加えて37°Cで5分間、インキュベーションを行った。反応を遠心分離 (250×g, 20秒) により停止し、上清に含まれる還元シトクロム C の濃度を540nm および550nmの吸光度を測定することで求めた。スーパーオキシドによって生成された還元シトクロム C 量を正確に求めるため、反応液に45unitsのSODを添加して同様に測定した陰性対照値を差し引いた値をシトクロム C 産生量とした。活性酸素産生量の変動は対照群に対する % で表示した。

4 遊走能の測定

好中球の遊走能は、96穴マイクロケモタキシスチャンパー (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA) を用いて、Boyden 法²¹⁾の変法により測定した。チャンパー下室には fMLP と各種局所麻酔薬または各種阻害薬を含有した Gey's BSS を、ポリカーボネイト膜 (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA) で仕切られた上室には 0.1%BSA と各種局所麻酔薬または各種阻害薬含有の Gey's BSS に浮遊した好中球 (2×10⁶ cells/ml) を満たして37°Cで60分間インキュベーションを行った。反

応後、膜を取り外し、膜表面の細胞を剥がして取り除いた後、膜裏面まで遊走した細胞を Diff-Quic (国際試薬、神戸) で固定染色した。遊走した細胞数は染色された膜の吸光度 (655nm) をマイクロプレートリーダーで測定することにより求めた。好中球遊走能は、チャンバー下室に fMLP のみを加えた陽性対照からチャンバー下室に緩衝液のみを加えた陰性対照を差し引いた値を100 (最大遊走量) とし、この値に対する % で表示した。

さらに詳細に好中球の遊走能を解析する目的で、EZ-TAXIScan (GE Healthcare Japan, Tokyo) を用いて検討した。水平のガラス板上にチップと呼ぶシリコン製のプレートを押着し、スリット様の構造を形成した。スリット幅は4 μ m のものを使用した。EZ-TAXIScan は6つのチャンネルから構成され、それぞれのチャンネルの片側から2 \times 10⁶ cells/ml に調整した好中球浮遊液を1 μ l 分注した。もう一方の側から至適濃度10nM fMLP 溶液1 μ l 分注した。スリット上に fMLP の濃度勾配が形成され、少なくとも120分以上は安定なことが確かめられている。fMLP の濃度勾配に引張られて好中球はスリット上を遊走する。これをガラス板下の CCD カメラで撮影して観察を行った。また、1つのチャンネルには fMLP を注入せず陰性対照とした。撮影条件は25 $^{\circ}$ C、1時間とし、1分おきに1枚の撮影を行った。遊走反応の解析は、Motic Image Plus (Shimadzu, Kyoto) を用いて行った。遊走速度は、実際に移動した距離を移動時間で割って求めた (μ m/min)。極性形成は2つのパラメーター直進性および方向性を指標として求めた。直進性は実際に移動した距離で2点間の直線距離を割ったもので、細胞がまっすぐに進めば1に近づく。方向性は各測定時点での細胞の移動角度の平均値から求めた。平均移動角度が45 $^{\circ}$ 以下をケモタキシス、45 $^{\circ}$ 以上をランダム遊走とした。

5 カルモジュリン活性の測定

カルモジュリンを除去した Ca 依存性 bovine heart phosphodiesterase を LaPorte ら²²⁾ の方法に従って調整した。Phosphodiesterase の活性は30nM カルモジュリンの存在下および非存在下で、各種の局所麻酔薬または阻害薬を添加して400nM cyclicGMP を基質として測定した¹⁶⁾。

6 好中球の活性化と細胞成分分析法

好中球浮遊液 (5 \times 10⁷ cells/ml, RPMI1640に懸濁) に、各種局所麻酔薬または各種阻害薬を加えて、37 $^{\circ}$ C で30分間プレインキュベーションした後、fMLP (1 μ M ま

たは10nM) を加えて、さらに反応を行った。一定時間の後、好中球浮遊液を氷冷して反応を停止し、遠心分離 (800 \times g, 10分) によって細胞を集めた。好中球に100 μ l の10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0), 0.34M ショ糖, 1mM PMSF, 1mM EGTA, 10mM benzamidine, 10 μ g/ml leupeptin および10 μ g/ml antipain 含有を加えてトリポロンホモジナイザーによりホモジネートを作成した。ホモジネートを12,000 \times g, 10分間遠心分離し、上清をさらに105,000 \times g, 60分間遠心分離した。得られた上清を細胞質画分として実験に使用した。また、沈殿に50 μ l の50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5), 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 25mM β -glycero-phosphate, 0.2mM sodium orthovanadate, 10 μ g/ml leupeptin および10 μ g/ml aprotinin 含有を加えて溶解し、さらに12,000 \times g, 30分の遠心分離を行って上清を細胞膜画分とした。それぞれの画分のタンパク質量はプロテインアッセイキット (BioRad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

7 ウエスタンブロット法

一定量のタンパク質 (50 μ g) を含む細胞質画分と細胞膜画分に等量の2 \times SDS-sample buffer (1.0M Tris-HCl pH6.8, 4% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 20% glycerol および0.05% bromophenol blue) を加え、100 $^{\circ}$ C で5分間処理した。処理後、各試料を10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。泳動されたタンパク質はポリビニルピロリデンジフルオライド (PVDF) 膜に転写後、特異抗体を用いたペルオキシダーゼ/NBT/H₂O₂を用いて発色した。

8 統計処理

統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。p 値が0.05以下を有意差ありとした。実験結果は平均 \pm 標準誤差で表示した。

結 果

我々はラット好中球の遊走および活性酸素産生の濃度依存性を確認した。ラット好中球の遊走は0.1 nM 以上の fMLP の濃度で見られ、10 nM で最大となることが分かった。また、10 nM fMLP 以上濃度ではむしろ遊走能は低下した。一方、fMLP で刺激したラット好中球の活性酸素産生は、100 nM 以上の fMLP で有意な活性酸素産生の増加が認められ、1 μ M まで用量に依存して増加した。したがって、以下の実験では遊走活性の至適濃度である10nM fMLP で刺激した場合と活性酸素産生の増加が認められる1 μ M fMLP で刺激した場合のシグナルについて検討した。

今回用いた3種類の局所麻酔薬 (lidocaine, bupivacaine および procaine) は, fMLP で誘導されるラット好中球のケモタキシスおよび活性酸素産生を濃度依存的 (lidocaine および bupivacaine は0.5mM ~ 2mM, procaine は1mM ~ 5mM) に抑制した(図1 A, B,

C). しかし, lidocaine の誘導体で常にイオン化していて細胞膜を通過できない QX-314 は lidocaine と同じ濃度で, 抑制効果は認められなかった (図1 D). この結果は3種類の局所麻酔薬の好中球機能発現抑制作用の作用点が細胞内にあることを示している.

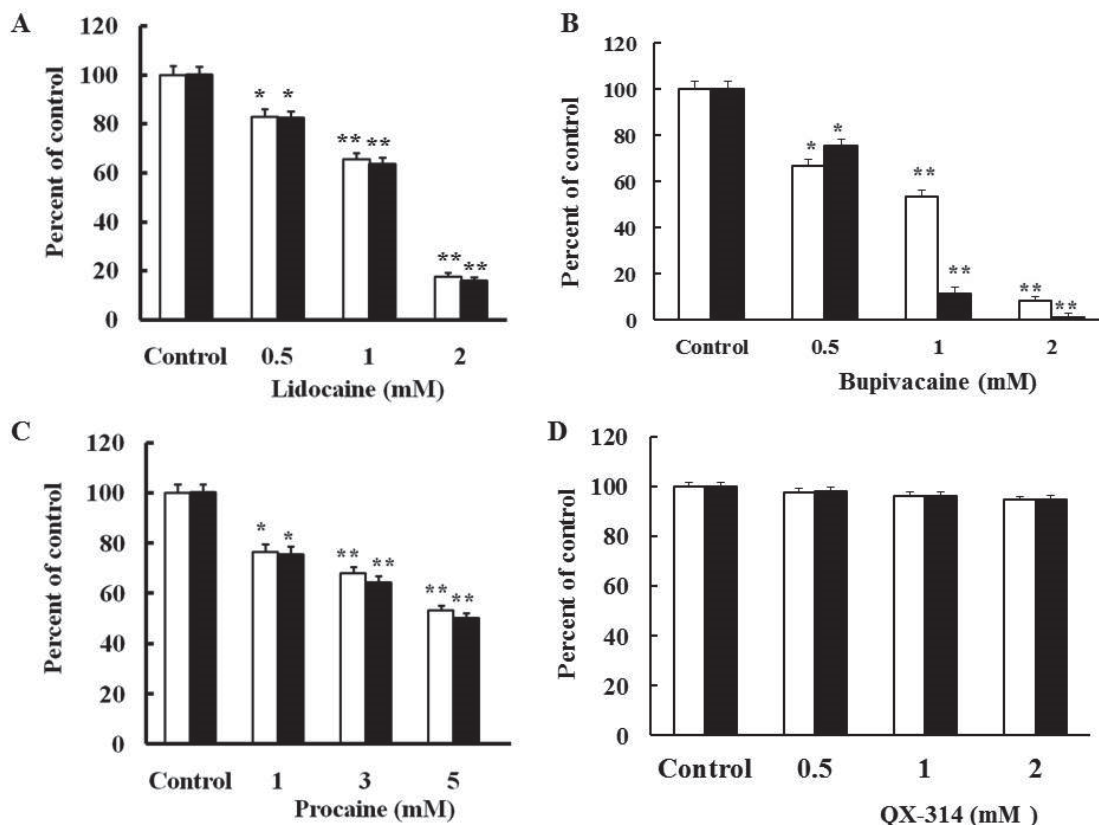


図1. fMLP 刺激によるラット好中球の遊走および活性酸素産生におよぼす局所麻酔薬の影響

10nM fMLP 刺激による遊走 (open column) および1 μ M fMLP 刺激による活性酸素産生 (closed column) におよぼす Lidocaine(A), Bupivacaine(B), Procaine(C) および QX-314(D) の影響, 平均 \pm 標準誤差 (n=6)

* $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ はそれぞれの対照群 (control) に対する危険率を示す.

fMLP によって誘導される NADPHoxidase の細胞質コンポーネント p47^{phox} の膜への転移に対する局所麻酔薬の作用を検討した.

0.5~2mM lidocaine, 0.5~2mM bupivacaine および 1~5mM procaine で p47^{phox} の膜転移は濃度依存的に抑制された (図2). fMLP 刺激好中球において p47^{phox} の活性化は, Akt, PKC, p38MAPK および ERK などによって生じる²³⁻²⁶⁾.

fMLP 刺激による Akt のリン酸化は局所麻酔薬によって濃度依存的に抑制された (図3). また, fMLP 刺激による PKC α の膜への転移も Akt のリン酸化を

抑制するのと同じ濃度の局所麻酔薬によって濃度依存的に抑制された (図4).

局所麻酔薬が Ca シグナルの中心的な役割を果たしている Ca 結合タンパク質カルモジュリンを抑制することが報告されている^{13,14)} ので, カルモジュリンに対する局所麻酔薬の作用をカルモジュリン依存性 phosphodiesterase を用いて検討した. カルモジュリンで活性化した phosphodiesterase の増強部分は, カルモジュリン阻害薬 W-7 および3種類の局所麻酔薬で阻害された (図5 A, B, C, D).

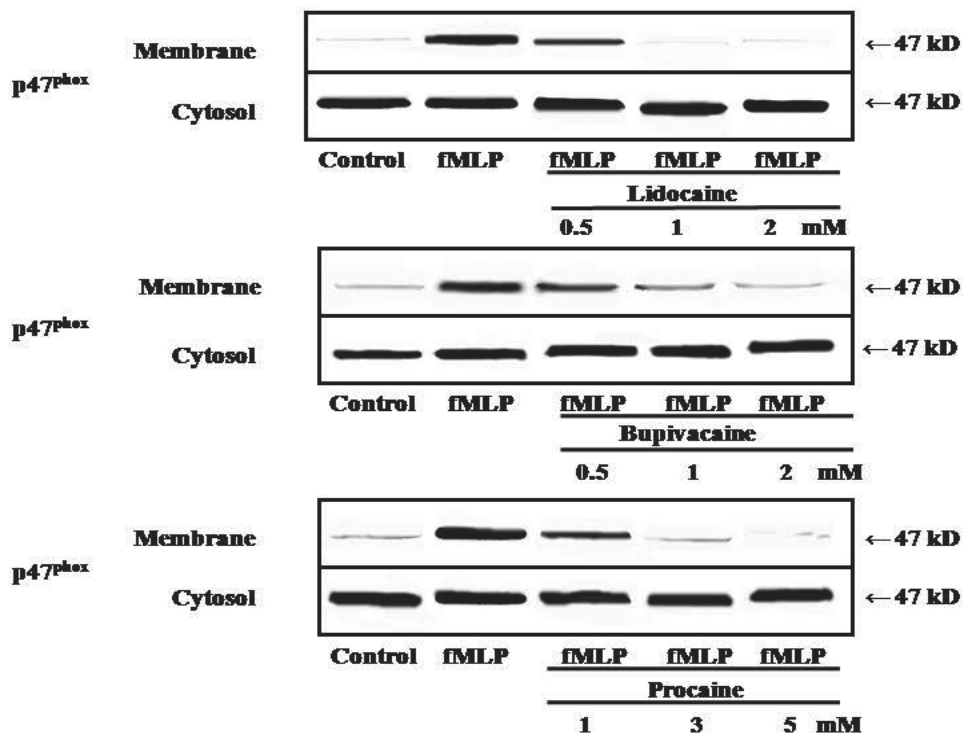


図2. fMLP 刺激による p47^{phox} の膜転移に対する局所麻酔薬の影響
好中球の膜分画と細胞質分画の p47^{phox} を特異抗体を用いたウエスタンブロット法によって検出した。fMLP(1 μ M)。

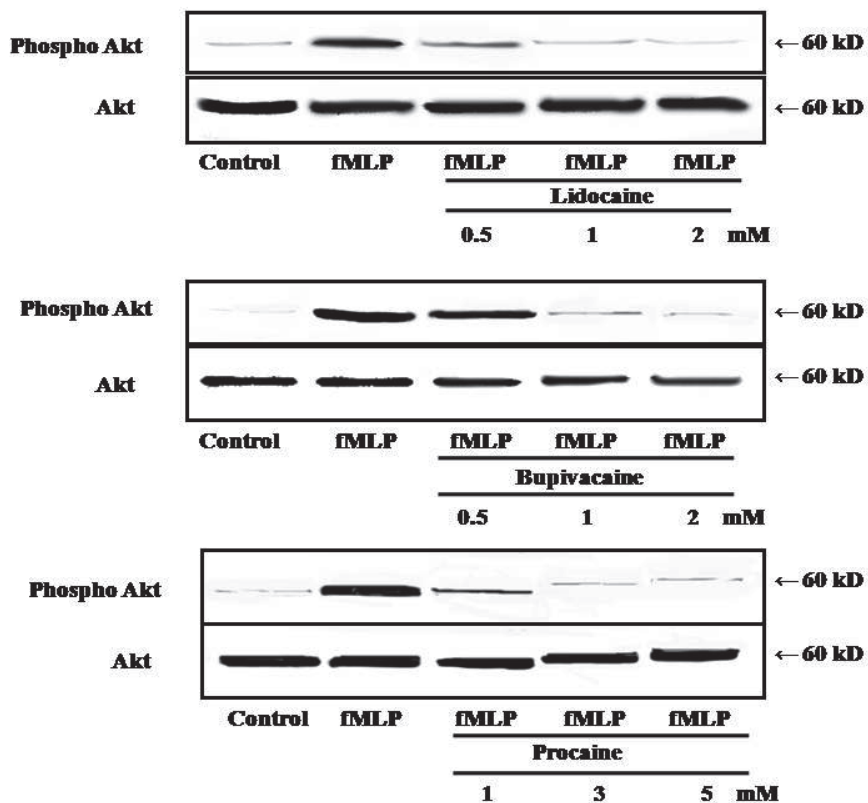


図3. fMLP 刺激による Akt のリン酸化に対する局所麻酔薬の影響
好中球の Akt およびリン酸化 Akt を特異抗体を用いたウエスタンブロット法で検出した。fMLP(1 μ M)。

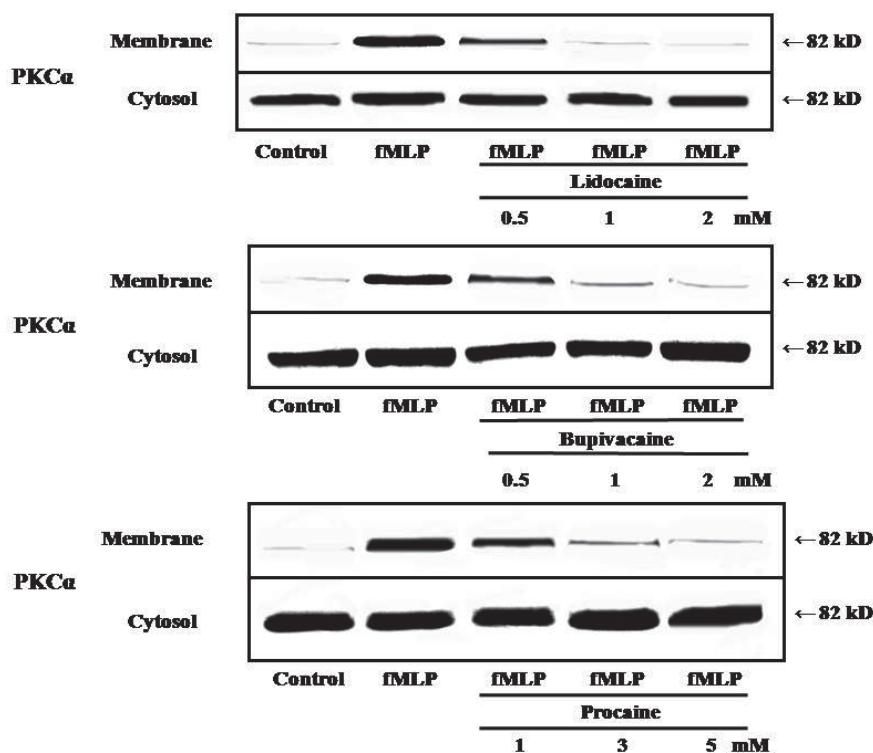


図4. fMLP刺激によるPKC α の膜転移に対する局所麻酔薬の影響
好中球の膜分画と細胞質分画のPKC α を特異抗体を用いたウエスタンブロット法によって検出した。fMLP(1 μ M)。

しかし、カルモジュリン非存在下の phosphodiesterase 活性は、W-7および局所麻酔薬では影響を受けなかった(図5E, F, G, H)。好中球に発現している非筋性ミオシンIIは、好中球の遊走における推進力の生成に重要な働きをすることが知られている²⁶⁾。ミオシンIIの活性化に対する局所麻酔薬の影響を検討した。fMLPによりミオシン軽鎖のリン酸化が生じ、ミオシンが活性化される²⁷⁾。Ca-calmodulin 依存性 myosin lightchain kinase (MLCK) 阻害薬 ML-7は、fMLPによるミオシンのリン酸化を濃度依存的に抑制した(図6A)。3種類の局所麻酔薬もミオシンのリン酸化を濃度依存的に阻害した(図6B, C, D)。

ラット好中球の遊走反応および遊走能に対する局所麻酔薬の影響をEZ-TAXIScanを用いて検討した。fMLP刺激により遊走する好中球は、方向性を持って遊走するchemotactic cells, ランダムに遊走するrandom migration cellsおよび全く移動しないno response cellsの3つのグループに分かれた。無処置の対照群では、chemotactic cellsが65.8%, random migration cellsが17.5%およびno response cellsが16.7%であった。対照群と局所麻酔薬処置群およびQX-314処置群との間に有意差は認められなかった(未発表データ)。移動している細胞の平均速度は、3種類の局所麻酔薬で、有意に抑制された(図7)。

しかし、常にイオン化しているlidocaineの誘導体QX-314では抑制されなかった(図7)。遊走好中球の極性形成の指標となる2つのパラメーター、直進性および方向性については、3種類の局所麻酔薬およびQX-314で処置した細胞と対照群の細胞との間に有意差は認められなかった(未発表データ)。

考 察

局所麻酔薬はNaチャンネルを阻害して、局所麻酔作用や抗不整脈作用を発現するだけでなく、KチャンネルおよびCaチャンネルも阻害することが知られている²⁻⁴⁾。さらに、様々な細胞の機能に影響し、抗炎症作用^{28,29)}、抗菌作用^{30,31)}のあることも報告されている。一方、これらの作用を発現する局所麻酔薬の濃度が通常局所麻酔薬および抗不整脈薬として臨床応用される濃度より高い濃度を必要とするため、新たな臨床応用については否定的な意見も少なくない²⁸⁻³¹⁾。

本実験では、カゼインで誘導したラット腹腔好中球を用いて、fMLPで誘導される活性酸素産生と遊走に対する局所麻酔薬の影響について、機能発現に関与するシグナルに着目して検討を行った。fMLPが好中球膜に存在する膜7回貫通Gタンパク質共役型受容体に結合すると、様々なシグナルを活性化し、生物活性を発現することが知られている³²⁻³⁶⁾。受容体が活性化す

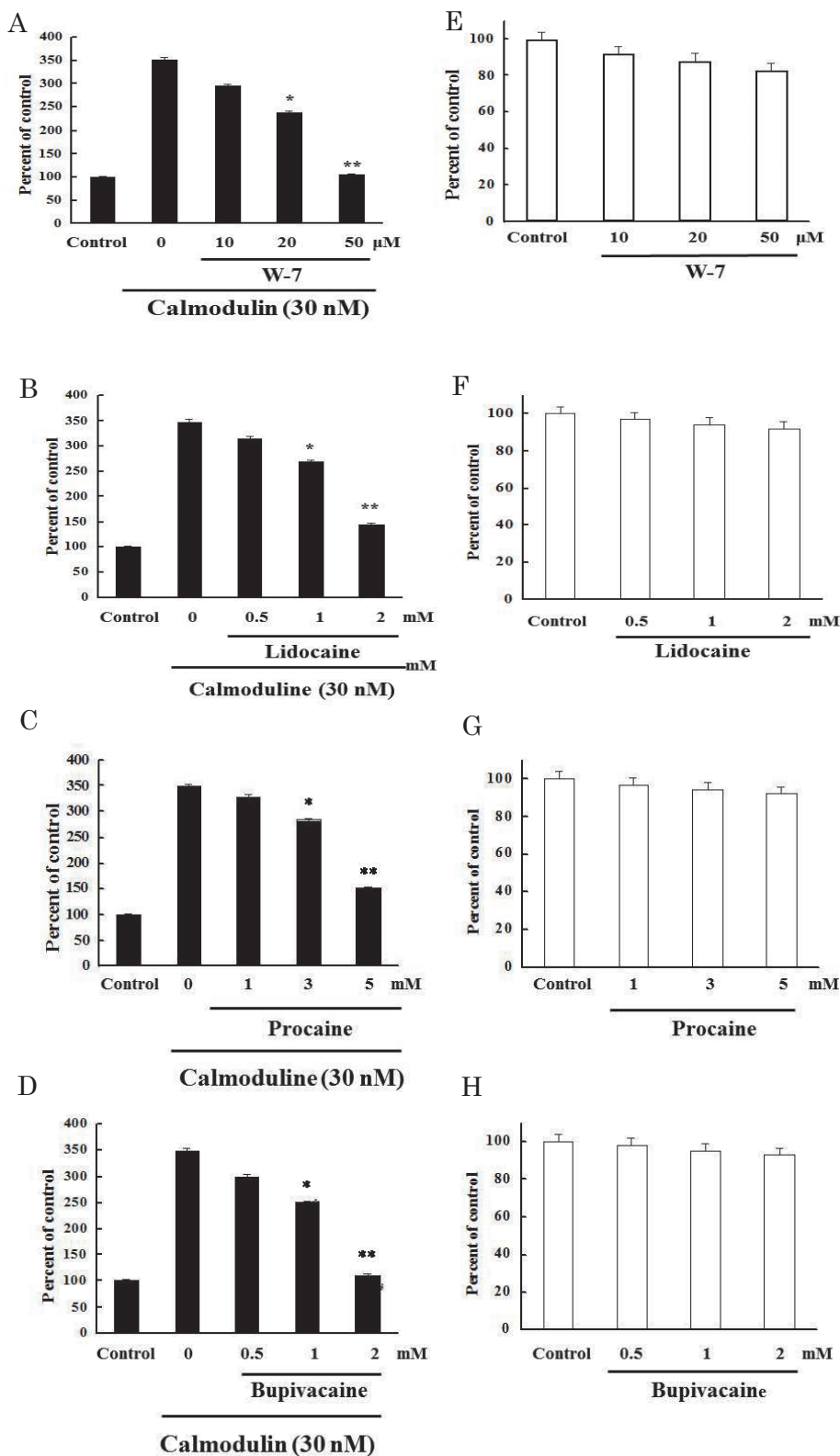


図5. カルモジュリン依存性 Phosphodiesterase の活性化におよぼす局所麻酔薬の影響
 30nM カルモジュリンで活性化した phosphodi-esterase の活性増強に対する Lidocaine (B), Procaine (C), Bupivacaine (D) および W-7 (A) の影響 (closed column). カルモジュリン非存在下の phosphodiesterase 活性に対する Lidocaine (F), Procaine (G), Bupivacaine (H) および W-7 (E) の影響 (open column), 平均±標準誤差 (n=6)
 * $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ はそれぞれの対照群 (control) に対する危険率を示す.

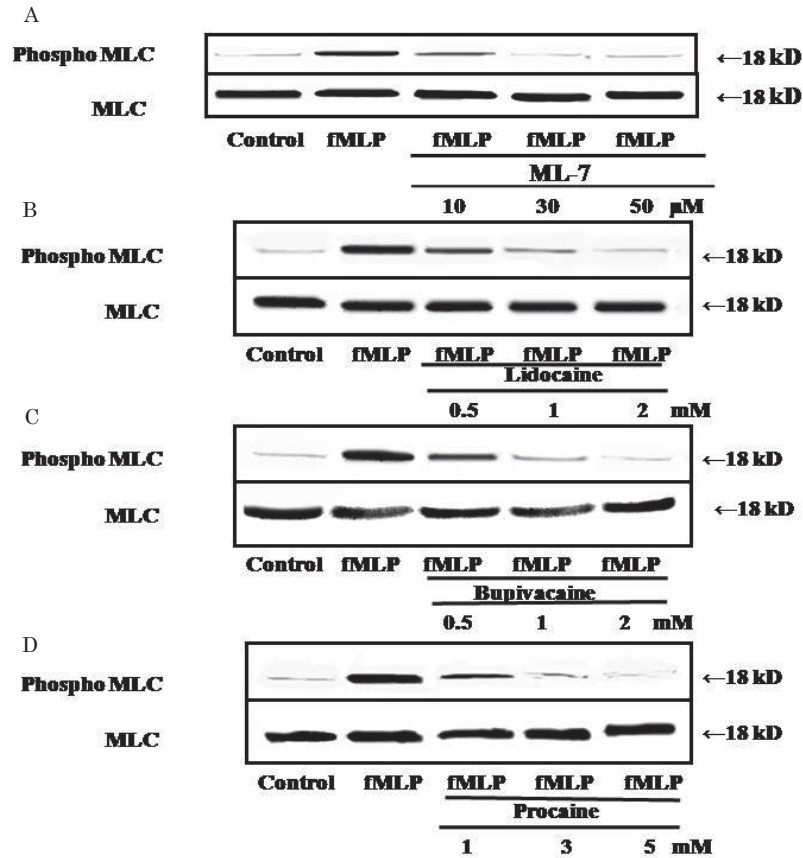


図6. ミオシン軽鎖リン酸化に対する局所麻酔薬の影響
fMLP(10nM) 刺激によるミオシン軽鎖 (MLC) リン酸化に対する ML-7(A), Lidocaine(B), Bupivacaine(C) および Procaine(D) の影響をウエスタンブロット法と MLC およびリン酸化 MLC に対する特異抗体を用いて検討した。

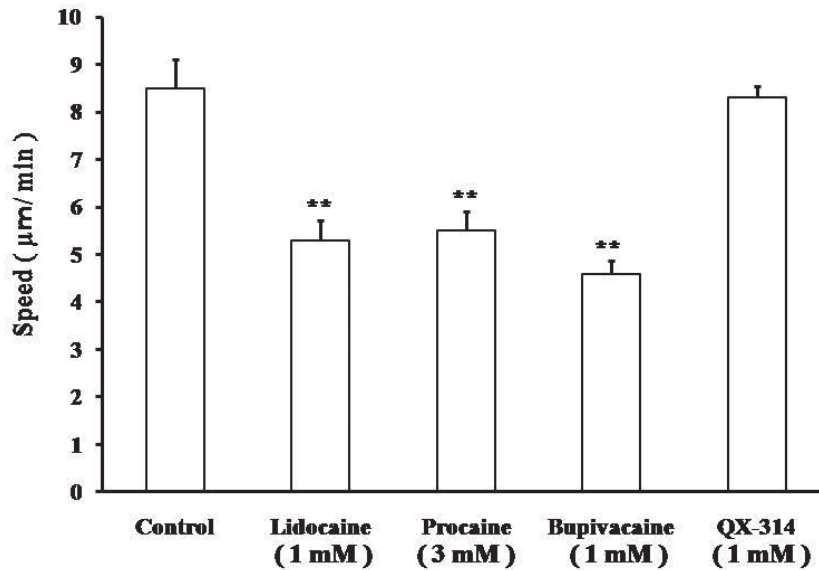


図7. 好中球の遊走速度におよぼす局所麻酔薬の影響
EZ-TAXIScan で測定した fMLP(10nM) で誘導される好中球の遊走速度に対する各種局所麻酔薬の作用を検討した。平均±標準誤差 (n=6)

** $p < 0.01$ は対照群 (control) に対する危険率を示す。

ると、Gタンパク質から遊離した $G_{\beta\gamma}$ サブユニットと結合してPLC β が活性化し³²⁾、同様に、 $G_{\beta\gamma}$ サブユニットとの結合を介してPI3K γ が活性化することが知られている^{33,34)}。活性化したPLC β とPI3K γ はともにIP₃の生成を亢進させ、その結果、細胞内貯蔵部位からCaの遊離を促し細胞内遊離Caイオン濃度を上昇させる^{35,36)}。受容体活性化に伴い細胞膜のCaチャネルを介して細胞外のCaの流入による細胞内Caイオン濃度の持続的な上昇が生じることが知られている^{35,36)}。細胞内Caイオン濃度の上昇を抑制するとfMLPによって誘導される好中球の活性酸素産生や遊走などの好中球の機能が阻害される。したがって、Caは好中球機能発現のセカンドメッセンジャーの一つと考えられている^{35,36)}。

また、局所麻酔薬が、CaチャネルおよびCa結合タンパク質カルモジュリンを阻害することが報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾ので、Caシグナル系に対する局所麻酔薬の影響と好中球機能発現との関係について検討を行った。今回実験に用いたlidocaine, bupivacaine およびprocaineは1 μ MのfMLPによって誘導される活性酸素産生を濃度依存的に抑制し、常にイオン化しているlidocaineの誘導體QX-314では抑制されなかった(図1)。

また、好中球にはNaチャネルが存在しないという報告もある¹²⁾ことから、局所麻酔薬が細胞内のNaチャネル阻害以外の作用に基づいて活性酸素の産生を阻害することが示唆された。さらに、局所麻酔薬は無細胞系で、活性酸素産生酵素NADPHoxidaseを阻害せず、生成したスーパーオキシドアニオンに対するスカベンジ作用もないことが報告されている^{24,25)}。fMLP刺激により活性化したPI3Kにより産生が亢進するPIP₃はAktの膜転移を誘導し³⁵⁾、好中球に多量に発現しているカルモジュリン依存性のCaMKKがAktをリン酸化する^{37,38)}。リン酸化Aktは、活性酸素産生酵素NADPHoxidaseの細胞質サブユニットであるp47^{phox}をリン酸化し、NADPHoxidaseの活性化を介して活性酸素の産生を促進することが報告されている^{39,40)}。

ウエスタンブロット解析により、ラット好中球のAktリン酸化はfMLP刺激によって促進するが(図3)、リン酸化反応はカルモジュリン拮抗薬W-7および局所麻酔薬によって抑制された。したがって、Aktが活性酸素産生系のシグナル分子として機能していることが示唆された。

しかし、好中球の活性酸素産生におけるシグナル伝達系では、PI3K-Aktの関与する割合は少なく、PI3K-PKCが主要な役割を果たしているという報告もある⁴¹⁾。さらに詳細な検討が必要であると考えられるが、局所

麻酔薬はAktだけでなくPKCの膜転移も抑制した。活性化したAktおよびPKCでリン酸化(活性化)されたp47^{phox}は膜に転移してNADPHoxidaseを構成して活性酸素を産生する。これらの経路で局所麻酔薬はp47^{phox}の膜転移も阻害した(図2)。これらの結果から、局所麻酔薬はカルモジュリンを阻害してAktのリン酸化を抑制し、PKCの活性化も阻害することによって、両者によるp47^{phox}のリン酸化が起こさず、p47^{phox}の膜転移およびNADPHoxidaseの活性化阻害により活性酸素産生を抑制することが示唆された。

好中球の遊走能の解析はこれまでBoyden法²¹⁾が主流であった。定量性に優れ比較的簡便に測定することができることから、現在も多くの研究者により用いられている。本実験においても、局所麻酔薬に好中球の遊走反応を抑制する作用のあることをBoyden法の変法であるmembrane filter法^{42,43)}を用いて確認した。また、QX-314に遊走反応抑制作用のないことも確認した(図1, open column)。

しかし、Boyden法では最終的にmembraneの裏側まで遊走した細胞数しか分からず、遊走している細胞の割合、遊走細胞の速度、遊走細胞の極性形成といった遊走反応を解析するために必要なパラメーターを測定することができない。

そこで、このようなパラメーターを測定することが可能なEZ-TAXIScan^{44,45)}を用いて検討した。EZ-TAXIScanはreal timeで視覚的に観察可能なchemotaxis chamberで、2つの水平のコンパートメントとそれを挟むmicrochannelで構成されている。一方のコンパートメントに細胞を他方のコンパートメントに細胞遊走因子を適用すると、microchannelに再現性が高く安定な遊走因子の濃度勾配が形成され、少なくとも2時間以上維持される。細胞遊走は経時的にCCDカメラで記録し、形態観察を行うとともに遊走速度、方向性および直進性を測定した。

fMLP刺激により生じるchemotactic cells, random migration cellsおよびno response cellsの比率は、無処置の対照群と局所麻酔薬処置群およびQX-314処置群との間に有意差は認められなかった。

遊走している細胞の平均速度は、3種類の局所麻酔薬で、有意に抑制された。しかし、常にイオン化しているlidocaineの誘導體QX-314では抑制されなかった。Chemotactic cell(遊走好中球)の極性形成の指標となる2つのパラメーター、直進性および方向性については、3種類の局所麻酔薬およびQX-314で処置した細胞と対照群との間に有意差は認められなかった。これらの結果から、局所麻酔薬は、fMLPで誘導されるラット好中球の遊走反応の遊走速度を抑制する

ことにより阻害することが明らかとなった。また、遊走細胞の分布および極性形成には影響を与えなかった。このことは、fMLP 刺激により活性化される好中球のシグナルの中で、極性形成および遊走細胞の分布に関与すると考えられている p38MAPK⁴⁶⁾ および PI3K⁴⁷⁾ が局所麻酔薬の影響を受けず、好中球の推進力の形成に関与すると考えられている Ca-calmodulin-MLCK-myosin II 系⁴⁸⁾ が局所麻酔薬で抑制されることとよく一致している。

局所麻酔薬の好中球活性酸素産生抑制作用および好中球遊走反応抑制作用が数ミリモルの濃度で認められたが、抗不整脈治療に用いられる局所麻酔薬の血中濃度は数マイクロモルであり、本実験で用いた濃度の1000分の1であるが、歯科臨床で用いられる浸潤麻酔では2% lidocaine が使用されている。この濃度は lidocaine 40mM に相当し、本実験で用いた0.5~2.0mM lidocaine の濃度は注射部位局所では十分ありえる濃度と考える。

以上のことから局所麻酔薬は fMLP で刺激した好中球内に入り、カルモジュリンの機能を抑制することにより MLCK およびミオシン II の活性化を阻害して遊走速度を抑制して Akt のリン酸化を抑制した。また PKC の活性化も局所麻酔薬によって阻害された。その結果、p47^{phox} のリン酸化が抑制されて膜への転移が阻害され、活性酸素産生酵素 NADPHoxidase の作用を抑制する結果、活性酸素の産生が抑制されることが示唆された。これらの結果から、局所麻酔薬の抗炎症作用機序の一部が明らかになり歯科臨床で用いられている濃度で発現することが示唆された。

結 論

ラット好中球をモデルとして細菌由来の遊走因子 fMLP で誘導される活性酸素産生能および遊走能発現に関与する細胞内情報伝達系（シグナル）に対する局所麻酔薬の影響について検討した。

局所麻酔薬は fMLP で刺激した好中球内で、カルモジュリンの機能を抑制することにより MLCK およびミオシン II の活性化を阻害して遊走速度を抑制した。

また PKC の活性化も局所麻酔薬によって阻害された。その結果、p47^{phox} のリン酸化が抑制されて膜への転移が阻害され、NADPHoxidase の作用を抑制する結果、活性酸素の産生が抑制されることが示唆された。

これらの結果から、局所麻酔薬の抗炎症作用機序の一部が明らかになり歯科臨床で用いられている濃度で発現することが示唆された。

文 献

- 1) Becker DE and Reed KL. Local Anesthetics: Review of Pharmacological Considerations. *Anesth Prog.* 2012; 59: 90-102.
- 2) Scholz A. Mechanism of (local) anesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *Br J Anaesth.* 2002; 89: 52-61.
- 3) Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA and Catterall WA. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 387-395.
- 4) Yanagidate F and Strichartz GR. Local Anesthetics. *Handb Exp Pharmacol.* 2007; 177: 95-127.
- 5) Ravinovitch M and DeStefano MJ. Cell shape changes induced by cationic anesthetics. *J Exp Med.* 1976; 143: 290-304.
- 6) Ohsaka A, Saionji K, Sato N and Igari J. Local anesthetic lidocaine inhibits the effect of granulocyte colony-stimulating factor on human neutrophil function. *Exp Hematol.* 1994; 22: 460-466.
- 7) Hammer R, Dahlgren C and Stendahl O. Inhibition of human leukocyte metabolism and random mobility by local anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1985; 29: 520-523.
- 8) Eriksson AS, Sinclair R, Cassuto J and Thomsen P. Influence of lidocaine on leukocyte function in the surgical wound. *Anesthesiology.* 1992; 77: 74-78.
- 9) Cederholm I, Briheim G, Rutberg H and Dahlgren C. Effects of five amino-amide local anesthetic agents on human polymorphonuclear leukocytes measured by chemiluminescence. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1994; 38: 704-710.
- 10) Hattori M, Dohi S, Nozaki M, Niwa M and Shimonaka H. The inhibitory effects of local anesthetics on superoxide generation of neutrophils correlate with their partition coefficients. *Anesth Analg.* 1997; 84: 405-412.
- 11) Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J and Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB₄ release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1993; 37: 159-165.
- 12) Krause KH, Demareux N, Jaconi M and Lew DP. Ion channels and receptor-mediated Ca²⁺ influx in neutrophil granulocytes. *Blood Cells.* 1993; 19: 165-173.
- 13) Hollmann MW, DiFazio CA and Durieux ME. Ca-Signaling G-protein-Coupled Receptors: A New Site of Local Anesthetic Action? *Regional Anesthe Pain Med.* 2001; 26: 565-571.

- 14) Soderling TR. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci*, 1999; 24: 232-236.
- 15) Corcoran EE and Means AR. Defining Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 2001; 276: 2975-2978.
- 16) Tanaka T and Hidaka H. Interaction of local anesthetics with calmodulin. *Biochem Biophys Res Comm*. 1981; 101: 447-453.
- 17) Muto Y, Kudo Y and Nozawa Y. Effects of local anesthetics on calmodulin-dependent guanylate cyclase in the plasma membrane of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem Pharmacol*. 1983; 32: 3559-3563.
- 18) Volpi M, Sha'afi RI, Epstein PM, Andrenyak DM and Feinstein MB. Local anesthetics, mepacrine, and propranolol are antagonists of calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 795-799.
- 19) Corps AN, Hesketh TR and Metcalfe JC. Limitation on the use of phenothiazines and local anesthetics as indicators of calmodulin function in intact cells. *FEBS Lett*. 1982; 138: 280-284.
- 20) McCord JM and Fridovich I. Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*. 1969; 244: 6049-6055.
- 21) Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 1962; 115: 453-466.
- 22) LaPorte DC, Toscano Jr WA and Storm DR. Cross-linking of iodine-125-labeled, calcium dependent regulatory protein to the Ca²⁺-sensitive phosphodiesterase purified from bovine heart. *Biochemistry*. 1979; 18: 2820-2825.
- 23) Azuma Y, Kosaka K and Kashimata M. Phospholipase D-dependent and -independent p38MAPK activation pathways are required for superoxide production and chemotactic induction, respectively, in rat neutrophils stimulated by fMLP. *Eur J Pharmacol*. 2007; 568: 260-268.
- 24) Kumada CD and Hara PM. Lidocaine: a hydroxyl radical and singlet oxygen quencher. *Mol Cell Biochem*. 1992; 115: 179-185.
- 25) Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H and Niwa Y. Inhibitory effect of local anesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997; 41: 524-528.
- 26) Wong K, Pertz O, Hahn K and Bourne H. Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103: 3639-3644.
- 27) Guo M, Yuan SY, Sun C, Frederich BJ, Shen Q, McLean DL and Wu MH. Role of non-muscle myosin light chain kinase in neutrophil-mediated intestinal barrier dysfunction during thermal injury. *Shock*. 2012; 38, 436-443.
- 28) Cassuto J, Sinclair R and Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006; 50: 265-282.
- 29) Caracas HCPM, Maciel JVB, Martins PMRS, de Souza MMG and Maia LC. The use of lidocaine as an anti-inflammatory substance: A systematic review. *J Dentist*. 2009; 37: 93-97.
- 30) Fazyl Bazaz BS and Salt WG. Local anesthetics as antimicrobial agents: structure action considerations. *Microbios*. 1983; 37: 45-64.
- 31) Johnson SM, Saint John BE and Dine AP. Local anesthetics as antimicrobial agents: a review. *Surg Infect*. 2008; 9: 205-213.
- 32) Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV and Wu D. Roles of PLC- β 2 and β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*. 2000; 287: 1046-1049.
- 33) Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Sielengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F and Wymann M. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in Inflammation. *Science*. 2000; 287: 1049-1053.
- 34) Bae YS, Cantley LG, Chen C-S, Kim S-R, Kwon K-S and Rhee SG. Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 1998; 273: 4465-4469.
- 35) Korchak HM, Rutherford LE and Weissmann G. Stimulus response coupling in the human neutrophil. I kinetic analysis of changes in calcium permeability. *J Biol Chem*. 1984; 259: 4070-4075.
- 36) Korchak HM, Vienne K, Rutherford LE, Wilkenfeld C, Finkelstein MC and Weissmann G. Stimulus response coupling in the human neutrophil. II temporal analysis of changes in cytosolic calcium and calcium efflux. *J Biol Chem*. 1984; 259: 4076-4082.
- 37) James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJA, Holmes AB and Alessi DR. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J*. 1996; 315: 709-713.
- 38) Yano S, Tokumitsu H and Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein kinase-B pathway. *Nature*. 1998; 396: 584-587.
- 39) Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klirin JB and McLeish KR. Akt phosphorylates p47^{phox} and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol*. 2003; 170: 5302-5308.

- 40) Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin J-H, Tschlis PN and Babior BM. Modulation of p47^{phox} activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 5130–5135.
 - 41) Yamamori T, Inanami O, Nagahata H and Kuwabara M. Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47^{phox} by controlling cPKC/PKC δ but not Akt. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 316: 720–730.
 - 42) Falk W, Goodwin Jr RH and Leonard EJ. A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods*. 1980; 33: 239–247.
 - 43) Harvath L, Falk W and Leonard EJ. Rapid quantitation of neutrophil multiwell assembly. *J Immunol Methods*. 1980; 37: 39–45.
 - 44) Kanegasaki S, Nomura Y, Nitta N, Akiyama S, Tamatani T, Goshoh Y, Yoshida T, Sato T and Kikuchi Y. A novel optical assay system for the quantitative measurement of chemotaxis. *J Immunol Methods*. 2003; 282: 1–11.
 - 45) Nitta N, Tsuchiya T, Yamauchi A, Tamatani T and Kanegasaki S. Quantitative analysis of eosinophil chemotaxis tacked using a novel optical device – TAXIScan. *J Immunol Methods*. 2007; 320: 155–163.
 - 46) Yi L, Chandrasekaran P and Venkatesan S. TLR signaling paralyzes monocyte chemotaxis through synergized effects of p38MAPK and global Rap-1 activation. *PLoS One*. 2012; 7: e30404.
 - 47) Gambrdella L and Vermeren S. Molecular players in neutrophil chemotaxis – focus on PI3K and small GTPases. *J Leukoc Biol*. 2013; 94: 603–612.
 - 48) Janeczek AH, Van Alten PJ, Reyes HM and Walter RJ. Modulation of the cytoskeleton and intracellular calcium in leukocytes exhibiting a cancer-associated chemotaxis defect. *J Leukoc Biol*. 1993; 54: 351–359.
-