

論 文 要 旨

氏 名

川崎 知佳

論文題目 (欧文の場合、和訳を付すこと)

Lidocaine Enhances Apoptosis and Suppresses Mitochondrial Functions of Human Neutrophils In Vitro

リドカインは In Vitro でヒト好中球のアポトーシスを増強しミトコンドリア機能を抑制する

論文要旨

(研究の目的)

好中球は、外傷や感染などの侵襲に対する生体防御に必要な自然免疫において重要な役割を果たす。また、ミトコンドリアは ATP の形でエネルギーを産生し、細胞や器官の機能・構造を維持するのに必要な器官である。手術侵襲、麻酔により好中球機能が低下することは知られているが、リドカイン・ロピバカイン・ブピバカインなどの局所麻酔薬による好中球機能変化を細胞内レベルで検討した研究は行われていない。今回の研究目的は、局所麻酔薬がヒト好中球機能に与える影響をミトコンドリア機能の変化、アポトーシス誘導の面から検討することである。

(方法)

健常成人ボランティアの静脈血から分離したヒト好中球に、リドカイン・ロピバカイン・ブピバカインを加えて培養した。局所麻酔薬が好中球機能に与える影響を評価するために、好中球の oxidative burst, 貪食能を flow cytometer で測定した。また、好中球ミトコンドリア機能における局所麻酔薬の影響を評価するために、細胞内 ATP 濃度 (bioluminescence assay で測定), ミトコンドリア膜電位 (JC-1 で蛍光染色後 flow cytometer で測定) および好中球のミトコンドリア形態 (Mito Tracker Green FM を用い histochemical staining を行い confocal laser-scanning microscopy で観察) を調べた。局所麻酔薬が好中球アポトーシスに与える影響は、annexin V と propidium iodide を使用して flow cytometer で測定した。ミトコンドリア機能と好中球機能との関係を明確にするために、ミトコンドリア ATPase インヒビターであるオリゴマイシンが好中球機能に与える影響 (好中球をオリゴマイシンと共に培養し、oxidative burst、貪食能、アポトーシス細胞の割合の変化を測定) を調べた。

(結果)

リドカイン (400 μ M) は好中球の oxidative burst および貪食能を約 20% 減少させた。ATP 濃度はコントロール好中球に比べてリドカイン処理した好中球の方が低かった。ミトコンドリア膜電位も、コントロールに比べリドカイン処理した好中球の方が低かった。また、リドカインはミトコンドリアの構造変化をおこし好中球のアポトーシスを誘導したが、ロピバカイン・ブピバカインはミトコンドリア機能を含む好中球機能に影響を与えなかった。

オリゴマイシンを加えて培養すると、好中球の貪食能、burst activity を抑制し、好中球アポトーシスを増加させた。このことから活性化したミトコンドリア機能が好中球機能維持に必要であることが明らかになった。

(考察)

ミトコンドリア膜電位はミトコンドリア機能を維持する一方、膜電位の虚脱により proapoptotic 蛋白を放出するといわれている。リドカインは ATP 合成やミトコンドリア膜電位を抑制し、ミトコンドリア形態を変化させ、好中球のアポトーシスを増加させた。このことから、ミトコンドリア膜電位の減少がリドカインによって引き起こされる好中球アポトーシスの原因であると示唆される。

一方、ロピバカインやブピバカインは好中球のミトコンドリア機能やアポトーシスに影響しなかった。これらの局所麻酔薬は好中球機能維持の観点からリドカインより有利であると考えられる。

今回の研究の問題点は、局所麻酔薬を in vivo、特に外傷モデルで投与できていない点である。また、この研究で見られた好中球機能の変化が臨床的にどの程度関連をもつかどうか不明であり、今後の研究課題であると思われる。

(結論)

ロピバカインとブピバカインは好中球やミトコンドリア機能に影響を与えなかったが、リドカインは好中球の機能や ATP 合成を抑制し、ミトコンドリア膜電位を減少させ、好中球アポトーシスを増加させた。

学位論文審査結果要旨

氏 名	川崎 知佳							
論文審査委員	主査	所属	生体適応	系	生体機構	部門	岩井 佳子	(印)
	副査	所属	障害機構	系	災害外科	部門	酒井 昭典	(印)
	副査	所属	生体情報	系	病態情報	部門	鈴木 秀明	(印)
				系		部門		(印)
				系		部門		(印)

論文題目

Lidocaine Enhances Apoptosis and Suppresses Mitochondrial Functions of Human Neutrophil In Vitro
(リドカインは *in vitro* でヒト好中球のアポトーシスを増強しミトコンドリア機能を抑制する)

学位論文審査結果要旨

<目的> 手術侵襲や、吸入および静脈麻酔により好中球機能が低下することは知られているが、局所麻酔薬による好中球への影響については知られていない。そこで本研究では局所麻酔薬であるリドカイン、ロピバカイン、ブピバカインの好中球機能に対する作用を調べた。

<方法> 健常者ボランティア末梢血から好中球を単離し、リドカイン、ロピバカイン、ブピバカインの存在下または非存在下で培養を行った。培養後、好中球を回収し、(1) PHAGOTEST (食食活性測定キット) を用いて食食能を、(2) BURSTTEST (活性酸素測定キット) を用いて殺菌能を、フローサイトメーターにより解析した。さらに(3) ATP determination kit を用いて ATP 産生量を、(4) JC-1 染色によりミトコンドリア膜電位を、(5) Annexin V+propidium iodide (PI) 二重染色によりアポトーシスおよびネクローシスを解析した。

<結果> リドカインは、好中球の食食能および殺菌能を抑制したが、ロピバカイン、ブピバカインでは抑制効果はみられなかった。またリドカインは好中球のミトコンドリア膜電位を低下させ、ATP 産生を抑制したが、ロピバカイン、ブピバカインでは変化がみられなかった。さらにリドカイン存在下では Annexin V 陽性 PI 陰性細胞の割合が増加したが、ロピバカイン、ブピバカイン存在下では変化がみられなかった。

<考察> 以上の結果から、ロピバカイン、ブピバカインは好中球機能に影響を与えないが、リドカインは好中球の食食能や殺菌能、エネルギー産生能を抑制して、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。アポトーシス誘導のメカニズムについては今後の研究が期待される。

本研究はこれまでに知られていなかったリドカインによる好中球機能の抑制作用をはじめて報告したもので、本学の学位論文として適格であると判断した。

平成 26 年 4 月 3 日