ラット中脳-辺縁系ドーパミン神経活動への リドカインの影響に関する研究

大 井 清

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科麻酔学専攻 (指導: 西 正勝教授)

平成4年12月22日受理

Effects of Lidocaine on Dopamine Release in Mesolimbic Neuron in Rat Brain

Kiyoshi Ohi

Department of Dental Anesthesiology (Director: Prof. Masakatsu Nishi)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan.

Using the technique of *in vivo* microdialysis, extracellular concentrations of dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were determined in the nucleus accumbens and ventral tegmental area, while Sprague-Dawley rats underwent lidocaine perfusion and intravenation. The microdialysis probe had semipermeable cellulose tubes (molecular weight cutoff 50,000 : O. D. 0.22 mm). Perfusion was started 12 hours after implantation of the microdialysis probe under a freely-moving condition. Measurement of the extracellular concentrations of dopamine, DOPAC and HVA was made at 20 minute intervals, which was started 120 minutes after the onset of the perfusion. Dopamine, DOPAC and HVA were quantified by a high-performance liquid chromatography coupled with an electrochemical detector.

The results were as follows :

1. Extracellular dopamine levels decreased in perfusion of 10^{-3} M lidocaine for 100 minutes in nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat brain, but they did not change in perfusion of $10^{-4} \sim 10^{-6}$ M lidocaine.
2. Extracellular dopamine levels did not change in intravenation of 0.74 mg/min lidocaine for 20 minutes in nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat brain.
3. It is assumed that the high concentration lidocaine inhibited mesolimbic dopamine neuron activity, but the lidocaine did not inhibit mesolimbic dopamine neuron activity when it's concentration was less than convulsion threshold.

Key words : Lidocaine / Nucleus accumbens / Ventral tegmental area / Dopamine / Microdialysis

緒 言

歯科診療においてリドカインは局所麻酔薬として広く使用されている。この局所麻酔薬の大量投与、あるいは血管内誤注入により、不安、興奮、多弁、悪心、意識消失、全身痙攣、さらには呼吸停止、心停止に至る局所麻酔薬中毒が発現することは良く知られている。局所麻酔薬は、血液脳関門 (blood brain barrier) を容易に通過し¹⁾、局所麻酔薬中毒を誘発する。全身痙攣に至るまでの局所麻酔薬の中樞神経系作用に関しては、Tanaka ら (1966)²⁾、de Jong ら (1969)³⁾ が電気生理学的に、ウサギおよびネコの中樞神経系の抑制系シナプスの方が興奮系シナプスよりも強く抑制されることを示し、抑制系神経の脱抑制が起こるとされている。

近年、リドカインの中樞神経系への影響を明確にするため、多くの研究が行われている⁴⁻¹⁶⁾。しかし抑制性伝達物質の一つとされるドーパミン神経に対するリドカインの影響は未だ明確ではない。

脳内神経伝達物質の一つであるドーパミンは、他のモノアミン (serotonin, noradrenaline) が脳全体にびまん的に分布しているのに対して、比較的局在性をもって分布する。脳内ドーパミン神経は、おもに (A 8) ~ (A 10) の細胞体群を起始部とし、中脳-辺縁・前頭皮質系、中脳-線条体系、間脳-脊髓系、脳室周囲系、不確帯視床下部系、隆起-下垂体系、嗅球系球体周囲系、網膜系などの経路が知られている¹⁷⁾。

本研究では、ドーパミン神経活動へのリドカインの影響を明確にするために、神経化学的研究手法の一つである *in vivo* マイクロダイアリシスと高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器 (HPLC-ECD) を用い、リドカインの灌流実験および静脈内投与によりドーパミン

およびその代謝産物 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) 細胞外量の変動より検索した。

また検索部位は不安などの情動や、摂食、摂水などの動物行動に関与していると考えられている中脳-辺縁系ドーパミン神経路の、細胞体が存在する (A 10) 腹側被蓋野と、その神経終末が存在する側坐核とした。

Roth ら (1988)¹⁹⁾ は拘束ストレスにより、ラット側坐核のドーパミン細胞外量が増加したと報告している。また Hernandez ら (1988)¹⁵⁾、Yoshida ら (1992)²⁰⁾ は摂食や摂水により、ラット側坐核におけるドーパミン神経活動の亢進が認められたとしている。

研究方法

I. 実験動物

実験には Sprague-Dawley ラット (日本チャールズリバー) 雄性、7 ~ 12 週齢、体重 230 ~ 350 g、42 匹を用いて行った。ラットは購入後、九州歯科大学附属動物実験施設にて、12 時間の明暗周期下 (明時間 8 : 00 ~ 20 : 00, 暗時間 20 : 00 ~ 8 : 00) 室温 24 ± 1 °C で 7 ~ 14 日間、水と飼料 (MF, オリエンタル酵母) を自由に与えて飼育し、実験に用いた。

II. 実験群設定

マイクロダイアリシスによるラット中脳-辺縁系ドーパミン神経活動へのリドカインの影響を検索する部位には、右側腹側被蓋野、左側側坐核を設定した。リドカイン投与群は人工脳脊髄液内に添加灌流する灌流実験群、および静脈内投与する静脈内投与群を設定した。灌流実験群ではリドカイン濃度を 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M、灌流時間を 100 分間とし、静脈内投与群では投与量を 0.74 mg/min、20 分間とした。また各検索部位毎に、リ

表1 マイクロダイアリシス測定部位と実験群別個体数

	側 坐 核	腹側被蓋野
Perfusion control	6	6
Perfusion of lidocaine 10^{-3} M	6	6
Perfusion of lidocaine 10^{-4} M	6	6
Perfusion of lidocaine 10^{-5} M	6	6
Perfusion of lidocaine 10^{-6} M	6	6
Intravenous control	6	6
Intravenous of lidocaine	6	6

ドカインを非添加灌流する灌流対照群, 生理食塩液を静脈内投与する静脈内投与対照群を設定した (表 1)。

Ⅲ. マイクロダイアリス

ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, 腹腔内投与) に, ラットの bregma-lambda 間を脳定位固定装置 (SR-6, Narishige) に対して水平に固定し, マイクロダイアリスプローブの植え込みを行った。マイクロダイアリスプローブは, 先端に透析膜 (分子量カット 50,000, 外径 220 μ m) を持つ直管型プローブを用いた。各脳部位でのマイクロダイアリスプローブ透析膜の位置は, Paxinos & Watson (1986)¹⁸⁾ のラット脳アトラスに準じ, 腹側被蓋野では, bregma より後方 5.3 mm, 外側 0.9 mm, 深さ脳硬膜より 8.1 mm (透析膜長 1 mm) に, 側坐核では, bregma より前方 2 mm, 外側 1.5 mm, 深さ脳硬膜より 7.6 mm (透析膜長 2 mm) に位置するように挿入, 固定した。このマイクロダイアリスプローブ挿入固定後 12 時間を経ってから, 各実験群および対照群のドーパミン, および DOPAC, HVA の定量を行った。すなわち, アクリルボックス (縦 30 $\times$ 横 30 $\times$ 高さ 35 cm) 内で無麻酔, 無拘束下に, 腹側被蓋野および側坐核に対して, 同時に人工脳脊髄液 (NaCl 140 mM, KCl 3.35 mM, CaCl₂ 1.26 mM, MgCl₂ 1.15 mM, NaH₂PO₄ 1.20 mM, Na₂HPO₄ 0.3 mM, pH 6.8) のマイクロダイアリスプローブへの灌流を開始した。人工脳脊髄液は, マイクロシリンジポンプ (EP-60, Eicom) を用いて 2.0 μ l/min の速度で灌流した。灌流開始 120 分後に灌流液の回収を開始し, オートサンプルインジェクター (AS-10, Eicom) を用いて 20 分毎に灌流液を回収し, その全量を HPLC-ECD に注入した。

リドカイン灌流群, 灌流対照群, リドカイン静脈内投与群, および静脈内投与対照群のいずれに対してもリドカイン灌流およびリドカイン静脈内投与, 生理食塩液の静脈内投与開始に対応する時点をも 0 分として, その 40 分前の時点から 20 分毎に 3 検体 (− 40 min, − 20 min, および 0 min) を無麻酔, 無拘束下で回収し, この 3 検体中のドーパミンおよび DOPAC, HVA 量を基礎放出量とした。リドカイン灌流群では, 上記 3 検体を回収後 100 分間のリドカイン灌流を無麻酔, 無拘束下で行い, 灌流対照群では, 無麻酔, 無拘束下で灌流液の回収を行った。また, リドカイン静脈内投与群では, 同じく 3 検体を回収直後より 20 分間, リドカイン静脈内投与を無麻酔, 無拘束下で行い, 静脈内投与対照群ではリドカイン溶液に代えて生理食塩液を同様に静脈内投与した。灌流液の回収は, 静脈内投与終了後 100 分間 (投与

開始後 120 分間), 無麻酔, 無拘束下で行った。

また, マイクロダイアリス終了後, ラットをペントバルビタール深麻酔 (100 mg/kg, 腹腔内投与) により心停止させ, 開頭後, 摘出脳よりマイクロダイアリスプローブの位置を肉眼的に確認した。

Ⅳ. ドーパミンおよび DOPAC, HVA の定量

ドーパミンおよび DOPAC, HVA の定量は, HPLC-ECD を用いて行った。側坐核での定量に用いた HPLC-ECD は, ポンプシステム (EP-10, Eicom), グラファイト電極を装着した ECD (ECD-10, Eicom) 印加電圧 + 550 mV, 逆相系カラム (MA-5 ODS 4.6 $\times$ 150 mm, Eicompak), リン酸緩衝系移動相 (0.1 M KH₂PO₄, 250 μ M sodium 1-octanesulfonate, 30 μ M EDTA, pH 4.0, 15% methanol) で構成した。カラム温度 30°C, ポンプ流量は 0.8 ml/min とした。腹側被蓋野での定量に用いた HPLC-ECD は, ポンプシステム (LC-10 AD, SHIMADZU), グラシーカーボン電極を装着した ECD (ICA-3060, TOA) 印加電圧 + 500 mV, 逆相系カラム (MA-5 ODS 4.6 $\times$ 150 mm, Eicompak), リン酸緩衝系移動相 (0.1 M KH₂PO₄, 55 μ M sodium 1-octanesulfonate, 30 μ M EDTA, pH 4.0, 12% methanol) で構成した。カラム温度 30°C, ポンプ流量は 1.0 ml/min とした。このように検索部位により異なった HPLC-ECD システムを用いたのは, 腹側被蓋野におけるドーパミン基礎放出量が少なく, 高感度のシステムを必要としたためである。以上より得られたクロマトグラムからドーパミンおよび DOPAC, HVA 量を, インテグレータ (CC-12, SIC) 2 台を用い, 側坐核, 腹側被蓋野, それぞれのピーク面積から 2 点検量線法により定量した。検量線作成のために, マイクロダイアリス灌流液である人工脳脊髄液に 3-hydroxytyramine (SIGMA), 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (SIGMA), homovanillic acid (和光純薬) を溶解, 調製した。

Ⅴ. リドカイン灌流と静脈内投与

リドカイン灌流群には側坐核, 腹側被蓋野ともに 100 分間のリドカイン灌流を行った。すなわち, マイクロダイアリス灌流液である人工脳脊髄液に, 塩酸リドカイン (フナコシ) を添加し, 濃度を $10^{-3} \sim 10^{-6}$ M に調整し, マイクロシリンジポンプのシリンジをそれぞれ切り替えることにより灌流を行った。一方, 静脈内投与群では, マイクロダイアリスプローブ植え込みに先立ち, 外頸静脈にカニューレーションを行い, マイクロダイアリスプローブ同様に頭部に固定した。そのカニューレよ

図1 クロマトグラム (テトロドトキシン添加による変化)
A: 人工脳脊髄液灌流時のクロマトグラム
B: テトロドトキシン 10^{-6} M 添加人工脳脊髄液灌流開始 80 分後のクロマトグラム

リドカイン静脈内投与を 20 分間行った。リドカイン静脈内投与には、生理食塩液（大塚製薬）に塩酸リドカイン（フナコシ）を溶解し、マイクロシリンジポンプ（EP-60, Eicom）を用い 0.74 mg/min で行った。また静脈内投与対照群においても同様にカニューレーションを行い、生理食塩液の静脈内投与 $10 \mu\text{l/min}$ を行った。

VI. 定量したドーパミンが神経伝達に参与していることの証明

人工脳脊髄液中に Na チャンネル阻害剤であるテトロドトキシンを 10^{-6} M の濃度で添加した。その結果、ドーパミン細胞外量の著明な減少が観察された（図1）。これは、テトロドトキシンにより Na チャンネルが阻害され細胞内外の脱分極が不可能となり、ドーパミンのシナプス間隙への放出が抑制された²¹⁾ものと考えられる。よって本研究で定量しているドーパミンおよび、DOPAC, HVA の大部分は、神経伝達に参与していることが明らかとなった。

VII. 統計学的処理

図2 側坐核でのリドカイン 10^{-3} M 灌流によるドーパミン、DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

** : $p < 0.01$

* : $p < 0.05$

(基礎値に対する検定で有意差がみられたもの)

** : $p < 0.01$

(対照群に対する検定で有意差がみられたもの)

統計学的処理は、灌流群の群内ならび、群間に関して有意差の検定を行った。群内の検定は基礎放出量に対応する 3 検体の平均値を基礎放出量値とし、従来のマイクロダイアリスによる報告に準じてこの値に対して百分率変換を行い、リドカイン灌流開始後に対応する (20 min から 100 min) の値と分散分析を行い、有意差の認められた群について、Newman-Keuls の多重比較検定を行った。群間の検定では、同一群について分散分析を行い有意差の認められた群について、Newman-Keuls の多重比較検定を行った。リドカイン静脈内投与群と静脈内投与対照群でも同様に、群内ならびに群間に関して有意差の検定を行った。群内の検定は、リドカイン静脈内投与後に対応する (20 min から 120 min) の値と分散分析を行い、有意差の認められた群について、Newman-Keuls の多重比較検定を行った。群間の検定

図3 側坐核でのリドカイン 10^{-4} M 灌流によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

* : $p < 0.05$

(基礎値に対する検定で有意差がみられたもの)

図4 側坐核でのリドカイン 10^{-5} M 灌流によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

** : $p < 0.01$

* : $p < 0.05$

(基礎値に対する検定で有意差がみられたもの)

では, 同一群について t 検定を行った.

結 果

I. 側坐核 (Nucleus Accumbens)

各実験群の側坐核における基礎値の平均 (mean $\pm$ SD) は, ドーパミン 64.0 ± 32.2 fmol で, DOPAC 1.8 ± 0.7 pmol, HVA 1.0 ± 0.5 pmol であった.

1) 灌流実験対照群

ドーパミン細胞外量も, DOPAC, HVA 細胞外量のいずれも, 基礎値に対して有意の経時的変動は認められなかった (図2-5).

2) リドカイン 10^{-3} M 灌流群

A. ドーパミン細胞外量の変動

灌流開始後 40 分までは急激に減少した. さらにその後も徐々に減少を示し, 100 分値で基礎値に対して最大 63.3% の減少が認められ, 20, 40, 60, 80, 100 分値においても基礎値に対して有意の減少が認められた. ま

た, 対照群に対しても 20, 40, 60, 80, 100 分値において有意の減少が認められた (図2).

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は灌流開始後徐々に減少し, 60 分値以降 100 分値まで基礎値に対して有意の減少が認められた. しかし, 対照群に対する有意差は認められなかった. HVA は対照群よりわずかに低い値となったが, 基礎値に対する有意差を認めるには至らなかった (図2).

3) リドカイン 10^{-4} M 灌流群

A. ドーパミン細胞外量の変動

灌流開始後より軽度減少傾向を示したが, 基礎値に対する有意差を認めるには至らなかった (図3).

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は灌流開始後, 対照群よりわずかに低い値となり, 100 分値で基礎値に対して有意の減少が認められた. しかし対照群に対する有意差は認められなかった. HVA はリドカイン灌流による経時的変動は少なく, 基

図5 側坐核でのリドカイン 10^{-6} M 灌流によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

* : $p < 0.05$

(基礎値に対する検定で有意差がみられたもの)

礎値に対する有意差はいずれの時点においても認められなかった (図3).

4) リドカイン 10^{-5} M 灌流群

A. ドーパミン細胞外量の変動

リドカイン灌流による経時的変動は比較的少なく, 基礎値に対する有意差はいずれの時点においても認められなかった (図4).

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は灌流開始後対照群よりわずかに低い値を示し, 80 分値, 100 分値で基礎値に対して有意の減少が認められた. しかし対照群に対する有意差は認められなかった.

HVA はリドカイン灌流による経時的変動は比較的少なかったが, 100 分値で基礎値に対して有意の減少が認められた. しかし対照群に対する有意差を認めるには至らなかった (図4).

5) リドカイン 10^{-6} M 灌流群

図6 側坐核でのリドカイン静脈内投与によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

* : $p < 0.05$

(基礎値に対する検定で有意差がみられたもの)

* : $p < 0.05$

(対照群に対する t 検定で有意差がみられたもの)

A. ドーパミン細胞外量の変動

リドカイン灌流による経時的変動はほとんど認められず, いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった (図5).

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は灌流開始後対照群よりわずかに低い値を示し, 60 分値以降 100 分値まで基礎値に対して有意の減少が認められた. しかし対照群に対する有意差を認めるには至らなかった. HVA はリドカイン灌流による経時的変動はほとんど認められず, いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった (図5).

6) 静脈内投与対照群

ドーパミン細胞外量も, DOPAC, HVA 細胞外量のいずれも, 基礎値に対して有意の経時的変動は認められなかった (図6).

図7 腹側被蓋野でのリドカイン 10^{-3} M 灌流によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$
 (基礎値に対する検定で有意差がみられたもの)
 ** : $p < 0.01$
 (対照群に対する検定で有意差がみられたもの)

7) リドカイン静脈内投与群

A. ドーパミン細胞外量の変動

リドカイン静脈内投与後軽度には減少したが, 基礎値に対して有意差を認めるには至らなかった (図6).

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は静脈内投与後 60 分値まで軽度の増加傾向を示し, その後対照群より低い値を示した. しかし基礎値に対する有意差を認めるには至らなかった. HVA は投与後軽度には増加し, 40 分値で有意の増加を認めた. しかし対照群に対しては有意差を認めるには至らなかった. また 80 分値では対照群に対して有意の増加が認められた (図6).

II. 腹側被蓋野 (Ventral tegmental area)

各実験群の腹側被蓋野における基礎値の平均 (mean

図8 腹側被蓋野でのリドカイン 10^{-4} M 灌流によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

* : $p < 0.05$
 (基礎値に対する検定で有意差がみられたもの)

$\pm$ SD) は, ドーパミン 17.5 ± 7.5 fmol で, DOPAC 0.3 ± 0.1 pmol, HVA 0.2 ± 0.1 pmol であった.

1) 灌流実験対照群

ドーパミン細胞外量も, DOPAC, HVA 細胞外量のいずれも, 基礎値に対して有意の経時的変動は認められなかった (図7-10).

2) リドカイン 10^{-3} M 灌流群

A. ドーパミン細胞外量の変動

灌流開始直後より減少し 100 分値で基礎値に対して最大 19.6% の減少が認められ, 80, 100 分値において基礎値に対して有意の減少が認められた. また, 対照群に対して 20, 40, 60, 80, 100 分値において有意の減少が認められた (図7).

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は灌流開始後徐々に減少し, 40 分値以降 100 分値まで基礎値に対して有意の減少が認められた. しか

図9 腹側被蓋野でのリドカイン 10^{-5} M 灌流によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

し対照群に対する有意差は認められなかった。HVA は対照群よりわずかに低い値となったが、基礎値に対する有意差を認めるには至らなかった (図7)。

3) リドカイン 10^{-4} M 灌流群

A. ドーパミン細胞外量の変動

灌流開始後より増加傾向を示し、100分値で基礎値に対して18.3%の増加が認められた。しかし対照群に対して有意差を認めるには至らなかった (図8)。

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC, HVA 共にリドカイン灌流による経時的変動はほとんど認められず、いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった (図8)。

4) リドカイン 10^{-5} M 灌流群

A. ドーパミン細胞外量の変動

リドカイン灌流による経時的変動はわずかで、いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった (図9)。

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

図10 腹側被蓋野でのリドカイン 10^{-6} M 灌流によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean $\pm$ SD)

DOPAC はリドカイン灌流による経時的変動はほとんど認められず、いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった。HVA は対照群よりわずかに低い値を示したが、基礎値に対する有意差を認めるには至らなかった (図9)。

5) リドカイン 10^{-6} M 灌流群

A. ドーパミン細胞外量の変動

リドカイン灌流による経時的変動はわずかで、いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった (図10)。

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は対照群よりわずかに低い値を示したが、基礎値に対して有意差を認めるには至らなかった。HVA はリドカイン灌流による経時的変動はほとんど認められず、いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった (図10)。

6) 静脈内投与対照群

ドーパミン細胞外量も、DOPAC, HVA 細胞外量の

図11 腹側被蓋野でのリドカイン静脈内投与によるドーパミン, DOPAC, HVA 細胞外量の経時的変動 (mean±SD)

いずれも, 基礎値に対して有意の経時的変動は認められなかった (図 11)。

7) リドカイン静脈内投与群

A. ドーパミン細胞外量の変動

リドカイン静脈内投与後 40 分値まで軽度の増加を認めその後 80 分値まで減少傾向を示した。しかし基礎値に対する有意差を認めるには至らなかった (図 11)。

B. DOPAC, HVA 細胞外量の変動

DOPAC は投与後 40 分値まで対照群よりわずかに高い値を示し, その後減少傾向を示した。しかし基礎値に対する有意差を認めるには至らなかった。HVA はリドカイン静脈内投与による経時的変動はほとんど認められず, いずれの時点でも基礎値に対して有意差は認められなかった (図 11)。

考 察

I. マイクロダイアリシスと脳内ドーパミン系

マイクロダイアリシスは, Ungerstedt ら (1982)²²⁾

によって開発された。その特徴として, 従来よりの摘出脳を用いた細胞内外からの神経活動検索に比べ, 半透析膜を有するマイクロダイアリシスプローブに人工脳脊髄液を灌流させることにより, 細胞外すなわちシナプス間隙に存在し実際に生理活性をもつ神経伝達物質や, その代謝産物の連続的採取を可能にした。また, 本研究でも行ったように, 人工脳脊髄液に添加した薬剤を, 半透膜を介して脳内に連続的に投与し, 神経活動への影響を経時的に観察可能にした。また, 実験動物を無麻酔, 無拘束下で用いることができ, より生理的な状態での研究を可能にした。これらの特徴を活かし, 現在 *in vivo* での神経化学的研究手法として広く用いられている^{15, 16, 20-26)}。

本研究は, ラット中脳-辺縁系ドーパミン神経活動へのリドカインの影響を, 細胞外液 (シナプス間隙) に存在するドーパミンおよび DOPAC, HVA の経時的変動より明かにすることを目的として行った。マイクロダイアリシスを用いることで, ラットを無麻酔, 無拘束状態とすることができ, より生理的な状態での研究が可能であった。

本研究で観察した中脳-辺縁系ドーパミン神経は, 細胞体を腹側被蓋野とし, 神経終末部である側坐核に神経を投射している^{17, 19, 20, 23, 29, 32)}。

神経終末部におけるドーパミン放出の調整は, ドーパミン神経の直接的な興奮や抑制の他に, 細胞体や神経終末部で, 複雑に絡み合う他の神経細胞からの刺激も関与している³⁰⁾。またこの他に, 神経終末部での autoreceptor が調節に関与している。この autoreceptor は, ドーパミンサブタイプレセプターとして知られている D_1 , D_2 の中で, D_2 タイプに属すると考えられている。この autoreceptor の薬理学的特徴は, D_1 agonist, antagonist には反応せず, D_2 agonist 投与によりドーパミン放出量は減少し, D_2 antagonist 投与によりドーパミン放出量は増加する。これらのことより, この autoreceptor は D_2 タイプに属すると考えられ, ドーパミン放出の調整に関与している²⁵⁾。またこれと同じ働きをするレセプターが細胞体樹状突起にも存在すると考えられている³³⁾。

ところで, この autoreceptor は, ドーパミン放出の調整だけではなくドーパミン合成にも関与していると考えられている。Bannon ら (1981)²⁸⁾ によれば, ドーパミン神経のインパルス伝導により放出される, いわゆるドーパミンのインパルスフローを, γ -butyrolactone (GBL) 投与または軸索切断という方法で, 減少あるいは遮断すると, ドーパミンのシナプス間隙への放出が

減少した。その結果 autoreceptor に結合するドーパミンが減少し、ドーパミン合成における tyrosine hydroxylase 活性が増加し、ドーパミンの合成が促進されたことを線条体にて報告している。しかし、この作用は前頭皮質では認められなかったと報告されている。

本研究でドーパミンと同時に観察した DOPAC, HVA は神経終末より放出されたドーパミンが後シナプスのレセプターに作用後、大部分は神経終末内に再取り込みされ、おもにミトコンドリアで、monoamine oxidase により DOPAC となり、catechol-O-methyltransferase により HVA へと代謝され不活性化される²⁷⁾。その一方で神経終末外に残ったドーパミンは、catechol-O-methyltransferase により 3-methoxytyramine, (3-MT) となり、さらに、monoamine oxidase により、これも HVA へと代謝され不活性化される²⁴⁾。

本研究ではマイクロダイアリシスを用いて、ドーパミン神経活動へのリドカインの影響を細胞外ドーパミン量から検討した。すなわち従来の摘出脳組織を用いての細胞内外ドーパミン総量からドーパミン神経活動を検索した神経科学的な研究手法に比べ、ドーパミン神経活動のより正確な把握が可能であると考えられる。

II. リドカイン灌流および静脈内投与

本研究では、ラット中脳-辺縁系ドーパミン神経系活動へのリドカインの影響をより確実にするため、ダイアリシスプローブの半透析膜を介して灌流投与する方法と、静脈内に投与する方法を用いた。ダイアリシスプローブの半透析膜を介して薬物の灌流投与ができることは、前述のようにマイクロダイアリシスの特徴の1つである。これらの方法では、薬剤の投与が簡便なこと、実験者による実験操作上の誤差が少ないことなどの特徴がある。

Hernandez ら (1991)¹⁶⁾ は、マイクロダイアリシスを用い、プロカイン、テトラカイン、およびリドカインのドーパミン神経系への影響を側坐核にて検討した。その結果、リドカイン 7.3×10^{-3} M, 20 分間脳内灌流で、ドーパミン細胞外量に変化はなかったと報告している。そこで本研究では灌流時間を 100 分と延長し、リドカイン濃度を 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M の濃度と設定した。一方、静脈内投与は、リドカインによる局所麻酔薬中毒の実験モデルとして、より臨床に近い状態を再現するために行った。しかし、マイクロダイアリシスを用いた研究でリドカイン静脈内投与によるドーパミン神経活動への影響に関する報告は、著者が渉猟した限りでは報告されていない。

リドカイン静脈内投与においてラットを用い痙攣波発現までの脳波を観察し、各時点での脳内への影響を検討した報告によると⁹⁾, 0.74 mg/min, 静脈内投与で、約 17 分前後で痙攣波が観察されている。また血中濃度の薬動力学的解析を行った研究によれば³¹⁾, 動脈血中のリドカイン濃度は、急速静注では投与後一過性に減少するが、緩徐静注では投与後一過性上昇し、その後緩やかに減少すると報告されている。これらのことより、本研究で用いたマイクロダイアリシスおよび、HPLC-ECD システムで、ラット中脳-辺縁系ドーパミン神経活動への影響を検索するのに十分なリドカイン静脈内投与量は 0.74 mg/min, 20 分間であると判断し設定した。

III. ラット脳内ドーパミン系へのリドカインの影響

本研究で行ったリドカイン灌流実験において、リドカイン 10^{-3} M で観察された腹側被蓋野および側坐核でのドーパミン細胞外量の減少は、リドカインによるドーパミン神経活動への直接的な抑制を反映しているであろうと考えられた。すなわち、リドカインは細胞膜の Na チャネルを主に阻害し、膜電位変化の閾値を上昇させる作用を持つことが知られており³⁴⁾, この作用によりドーパミンの細胞外への放出が抑制されたと考えられる。

Badberry ら (1989)²³⁾ は、マイクロダイアリシスを用い、ラット脳内、腹側被蓋野および側坐核で、コカインの影響を検索した。それによると両検索部位でドーパミン細胞外量の増加を認めたが、腹側被蓋野より側坐核での放出量が多かった。これは側坐核から腹側被蓋野へのロングループのフィードバック機構の関与や、autoreceptor の影響であろうと推測している。このロングループのフィードバック機構について German ら (1980)²⁹⁾ は、ラット脳内側坐核に電気的刺激を与えることにより、腹側被蓋野へ、主に γ -aminobutyric acid (以下、GABA) 神経などの長い経路を介して影響をあたえると報告している。すなわち、本研究で観察した 10^{-3} M 灌流実験における両検索部位での減少量の差も、このロングループのフィードバック機構の影響や autoreceptor の影響が関与していると推測できる。

ドーパミン神経活動へのリドカインの影響をマイクロダイアリシスを用いて検索した報告は少ないが、それによると、ラット脳内側坐核でコカイン、プロカイン、およびリドカインの影響を灌流実験により観察した結果、 7.3×10^{-3} M, 20 分間灌流によりコカイン、プロカインはドーパミン細胞外量を著明に増加させたが、リドカインは、ドーパミン神経活動に影響は与えなかったと報告

している。そのことよりコカイン、プロカインでは中枢神経系への興奮作用を認めたが、リドカインでは認められなかったと報告している¹⁶⁾。このようにリドカイン灌流濃度は、本研究より高濃度であるにも関わらず、ドーパミン細胞外量に変化がなかったことについては、灌流実験に用いた灌流液組成の違い¹⁵⁾が関与していると考えられている²⁶⁾。また pH の違いも関与している可能性が高いと考えられる。一方、本研究で行った灌流実験の中で、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} M の濃度で、腹側被蓋野および側坐核でのドーパミン細胞外量に有意な変動は認められず、これらの濃度のリドカインはドーパミン神経活動には直接的な影響は少ないと考えられた。

リドカインの中脳神経への作用を研究した報告の多くは、GABA に関する報告が多い。この背景には、リドカインが抑制系ニューロンの中で、主に GABA 作動性抑制性ニューロンを抑制しその脱抑制機構の結果として、局所麻酔薬中毒における痙攣が発現すると考えられているからである。GABA に関して Ikeda ら (1983)^{11, 12)} は、GABA 合成酵素である glutamate decarboxylase 活性に対する局所麻酔薬の影響を検討した結果、影響はなかったと報告し、局所麻酔薬は GABA の生合成を阻害せずシナプス前膜からの遊離を抑制したと推論した。また、GABA 腹腔内投与により、局所麻酔薬による痙攣を抑制する傾向にあったと報告している¹³⁾。また、工藤ら (1992)¹⁰⁾ は、ラット摘出脳より調製したシナプス膜可溶分画を用いた研究で、リドカインが GABA_A 受容体/BZP 受容体/Cl⁻チャンネル複合体への内因性リガンドの結合に対する阻害、すなわち GABA 作用を抑制することによる脱抑制機構により痙攣を誘発すると推察している。これらの事より、本研究で観察した中脳-辺縁系ドーパミン神経路に関する、GABA 神経や他の神経との関係も考慮する必要があると考えらる。

Kalivas ら (1991)³⁵⁾ は、ドーパミン放出には GABA, Enkephalin, neurotensin, substance P, glutamate, などが関与すると報告し、GABA_A, Enkephalin は間接的に影響を与え、GABA_B は直接的に影響を与えるとしている。このように中脳-辺縁系ドーパミン神経活動には多くの神経が関与しており、本研究にもこれらの神経活動の影響があったのではないかと考えられる。

つぎに、ドーパミン神経活動へのリドカイン全身投与による影響に関する報告で、芳村 (1984)⁴⁾ は、ドーパミンの前駆物質である l-dihydroxyphenylalanine (以後 l-DOPA) を腹腔内投与し、脳内ドーパミン含量を

上昇させ、l-DOPA を投与しなかったマウスとの間でリドカインによる痙攣発現に対する影響を比較した。その結果リドカインによる痙攣発現は l-DOPA を投与しなかった対照群に対して有意の差は認めず、ドーパミン含量上昇によるドーパミン作動性ニューロン活性化の状態は、リドカインによる痙攣とは無関係であったと報告している。しかし彼は、カテコールアミン合成の律速段階酵素である tyrosine hydroxylase の阻害薬 α -methyl-p-tyrosine を腹腔内投与し、脳内ドーパミン含量を減少させることにより、リドカインによる痙攣発現は有意に減少したとも報告している。また、Gage ら (1977)⁵⁾ は、リドカインを腹腔内投与し痙攣発現後摘出した脳よりドーパミン含量を測定した。それによると、リドカインを投与しなかった対照群に対してドーパミン含量は増加傾向にあるが有意差はなく、リドカインによる痙攣発現とドーパミン神経活動は無関係であったと報告している。Ciarloni ら (1976, 1977)^{6, 7)} は、マウスおよびラットを用いた研究で、リドカインによる痙攣発現後ドーパミン含量を測定した結果、ドーパミンは減少していた。また選択的にドーパミンを減少させるとリドカインによる痙攣閾値は低下したと報告している⁸⁾。これらの報告からでは、統一した見解は得られておらず、また痙攣によりドーパミン神経活動へ影響を与えたのか、痙攣発現以前に影響を与えたか判断は難しい。

本研究では、上記のような研究方法と異なりラット中脳-辺縁系ドーパミン神経活動へのリドカインの影響を、マイクロダイアリシスを用いて灌流、あるいは静脈内投与の方法により検索した。リドカインによるドーパミン神経活動への影響を正確に把握するには、神経終末から放出されたドーパミンの動態を詳細に検討することが必要であり、本研究で用いたマイクロダイアリシスは、ドーパミン神経活動を検索する方法としては、有用であると考えられた。

Sakabe ら (1974)¹⁴⁾ は、局所麻酔薬の中脳作用を考えるには、脳内の局所麻酔薬濃度が血液中濃度より重要であると考え、イヌを用いリドカイン定速持続静注を行い、動脈血、脳静脈血、および脳脊髄液中のリドカイン濃度を経時的に測定した。その結果最高濃度に達する時間の差は、動脈-脳静脈、脳静脈-脳脊髄液で、それぞれ 2 分、4 分であり、脳内への移行は約 6 分以内におけると考え、局所麻酔薬は比較的容易に脳内に入りそのレベルがある閾値をこえると痙攣を主とする中枢神経中毒症状を来すのではないかと推論している。これより、本研究で静脈内投与したリドカインも比較的容易に脳内に移

行していると考えられた。

本研究で用いた、リドカイン 0.74 mg/min, 静脈内投与により、ラット脳波上にて痙攣波出現時におけるリドカイン動脈血中濃度は、約 9.4 μ g/ml と報告されている⁹⁾。本研究では投与時間を 20 分間としたため、この報告よりさらに動脈血中濃度は濃いと考えられた。今回は脳波の観察は行っておらず、この投与量から脳内の状態は判断し難いが、ラットの行動を十分に観察したところ、多動、鎮静などの、局所麻酔薬中毒症状と考えられる行動異常が明かに認められ、リドカインの脳内への影響が推察された。

本研究ではリドカイン静脈内投与による腹側被蓋野、および側坐核でのドーパミン細胞外量に有意な変動は認められなかった。すなわち、局所麻酔薬中毒における、痙攣閾値以下での、中脳-辺縁系ドーパミン神経活動へのリドカインの影響は認められなかった。また先に述べた、Sakabe らの報告¹⁰⁾で、脳脊髄液中のリドカイン濃度は、動脈血中のリドカイン濃度の約 20% で、これを本研究の灌流実験の濃度として考えれば 10^{-4} M 程度に相当し、ドーパミン神経活動への影響は少ないと推測できる。以上より本研究を総括すると、ラット中脳-辺縁系ドーパミン神経活動へのリドカインの影響は、灌流実験より、 10^{-3} M では直接的な抑制作用が考えられ、それ以下の灌流濃度ではドーパミン神経活動への直接的な影響は少ないと考えられた。また静脈内投与実験からドーパミン神経活動への直接的なリドカインの影響は、少ないと考えられた。すなわち、抑制系神経の脱抑制により発現するとされる局所麻酔薬中毒で、抑制系神経である中脳-辺縁系ドーパミン神経路は痙攣閾値以下のリドカイン濃度では抑制を受けないことが推察された。今後は痙攣時での影響や、中脳-辺縁系ドーパミン神経活動に関与する他の神経の影響を検索する必要がある。

結 語

マイクロダイアリシスと HPLC-ECD を用いて、ラット中脳-辺縁系ドーパミン神経活動へのリドカインの影響を、灌流実験、および静脈内投与の方法にて、腹側被蓋野、および側坐核で検討した。その結果、 10^{-3} M, 100 分間灌流で腹側被蓋野、および側坐核でのドーパミン細胞外量の減少が観察された。しかし、 10^{-4} M 以下の灌流濃度では、ドーパミン細胞外量に変動は観察されなかった。また、リドカイン静脈内投与実験では、ドーパミン細胞外量に変動は観察されなかった。すなわち、比較的高濃度のリドカインは、ラット中脳-辺縁系ドー

パミン神経活動に抑制を与えるが、局所麻酔薬中毒における痙攣閾値以下では、中脳-辺縁系ドーパミン神経活動に抑制を与えないことが推察された。

稿を終わるにあたり、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜った恩師西 正勝教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に御協力いただいた歯科麻酔学講座の各位に感謝いたします。

なお、本研究の一部は、第 20 回日本歯科麻酔学会総会 (1992, 東京) において報告した。

引用文献

- 1) Stanley, F. M.: Handbook of local anesthesia 2nd ed., The C. V. Mosby Company, London, 1986, 253.
- 2) Tanaka, K. and Yamasaki, M.: Blocking of cortical inhibitory synapses by intravenous lidocaine. *Nature* 209: 207-208, 1966.
- 3) de Jong, R. H., Robles, R. and Corbin, R. W.: Central actions of lidocaine-synaptic transmission. *Anesthesiology* 30: 19-23, 1969.
- 4) 芳村喜道: 局所麻酔薬痙攣発現機序に関する研究, 脳内カテコールアミンとの関係について. 広大歯誌 16: 260-275, 1984.
- 5) Gage, T. W. and Dorris, R. L.: Annotation local anesthetics and mouse brain dopamine. *J. Dent. Res.* 56: 1492, 1977.
- 6) Ciarlon, A. E. and Smudski, J. W.: Lidocaine's influence on brain mice. *J. Dent. Res.* 55: 465-469, 1976.
- 7) Ciarlon, A. E. and Smudski, J. W.: Lidocaine's influence on the accumulation and depletion rates of mouse brain amines. *J. Dent. Res.* 56: 1391-1394, 1977.
- 8) Ciarlon, A. E. and Juras, M. S.: Lidocaine and procaine alter rat brain amines. *J. Dent. Res.* 60: 1886-1890, 1981.
- 9) Yamada, K., Maekawa, T., Okuda, Y. and Takeshita, H.: Cyclic nucleotides in rat brain during lidocaine infusion. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 28: 91-94, 1984.
- 10) 工藤 勝, 市田篤郎, 新野 昇: 塩酸リドカインの脳内 GABA_A 受容体・BZP 受容体複合体に対する影響. 日歯麻誌 20: 472-484, 1992.
- 11) 池田正弘: 局所麻酔薬痙攣の発現機序に関する研究, 一とくに γ -アミノ酪酸 (GABA) との関係について. 広大歯誌 8: 120-132, 1976.
- 12) Ikeda, M., Dohi, T. and Tujimoto, A.: Protection from local anesthetic-induced convulsions by γ -aminobutyric acid. *Anesthesiology* 56: 365-368, 1982.
- 13) Ikeda, M., Dohi, T. and Tujimoto, A.: Inhibition of γ -aminobutyric acid release from synaptosomes by local anesthetics. *Anesthesiology* 58: 495-499, 1983.

- 14) Sakabe, T., Maekawa, T., Ishikawa, T. and Takeshita, H. : The effects of lidocaine on canine cerebral metabolism and circulation related to the electroencephalogram. *Anesthesiology* 40 : 433–441, 1974.
- 15) Hernandez, L. and Hoebel, B. G. : Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. *Life Sci.* 42 : 1705–1712, 1988.
- 16) Hernandez, L., Guzman, N. A. and Hoebel, B. G. : Bidirectional microdialysis *in vivo* shows differential dopaminergic potency of cocaine, procaine and lidocaine in the nucleus accumbens using capillary electrophoresis for calibration of drug outward diffusion. *Psychopharmacology* 105 : 246–268, 1991.
- 17) 融 道男 : 中脳-辺縁-前頭皮質 dopamine 系. *脳神経* 43 : 319–329, 1991.
- 18) Paxinos, G. and Watson, C. : The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1986.
- 19) Roth, R. H., Tam, S., Ida, Y., Yang, J. and Deutch, A. Y. : Stress and the mesocorticolimbic dopamine system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 537 : 138–147, 1988.
- 20) Yoshida, M., Yokoo, H., Mizoguchi, K., Kawahara, H., Tsuda, A., Nishikawa, T. and Tanaka, M. : Eating and drinking cause increased dopamine release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in the rat : measurement by *in vivo* microdialysis. *Neurosci. Lett.* 139 : 73–76, 1992.
- 21) Westerink, B. H. C., Tuntler, J., Damsma, G., Rollema, H. and de Vries, J. B. : The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 336 : 502–507, 1987.
- 22) Ungerstedt, U., Forster, Ch., Herrera-Marschitz, M., Hoffman, I., Jungnelius, U., Tossman, U. and Zetterström, T. : Brain dialysis—A new *in vivo* technique for studying neurotransmitter release and metabolism. *Neurosci. Lett.*, suppl. 10 : S 493, 1982.
- 23) Bradberry, C. W. and Roth, R. H. : Cocaine increases extracellular dopamine in rat nucleus accumbens and ventral tegmental area as shown by *in vivo* microdialysis. *Neurosci. Lett.* 103 : 97–102, 1989.
- 24) Brown, E. E., Damsma, G., Cumming, P. and Fibiger, H. C. : Interstitial 3-methoxytyramine reflects striatal dopamine release : An *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.* 57 : 701–707, 1991.
- 25) Tanaka, T., Vincent, S. R., Nomikos, G. G. and Fibiger, H. C. : Effect of quinine on autoreceptor-regulated dopamine release in the rat striatum. *J. Neurochem.* 59 : 1640–1645, 1992.
- 26) de Boer, P., Damsma, G., Fibiger, H. C., Timmerman, W., de Vries, J. B. and Westerink, B. H. C. : Dopaminergic-cholinergic interactions in the striatum : The critical significance of calcium concentrations in brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342 : 528–534, 1990.
- 27) Cooper, J. R., Bloom, F. E. and Roth, R. H. : The biochemical basis of neuropharmacology 6th ed., Oxford university press, New York, Oxford, 294, 1991.
- 28) Bannon, M. J., Michaud, R. L. and Roth, R. H. : Mesocortical dopamine neurons lack of autoreceptors modulating dopamine synthesis. *Mol. Pharmacol.* 19 : 270–275, 1981.
- 29) German, D. C., Dalsass, M. and Kiser, R. S. : Electrophysiological examination of the ventral tegmental (A10) area in the rat. *Brain Res.* 181 : 191–197, 1980.
- 30) 笹 征史 : ドーパミン受容体研究の発展と向精神薬. *神経精神薬理* 11 : 667–676, 1989.
- 31) 石川敏三, 奥田佳朗 : Lidocaine 静注時血中濃度曲線の薬動力学的解析. *麻酔* 25 : 35–39, 1976.
- 32) Yim, C. Y., and Mogenson, G. J. : Response of ventral pallidal neurons to amygdala stimulation and its modulation by dopamine projections to nucleus accumbens. *J. Neurophysiol.* 50 : 148–161, 1983.
- 33) Starke, K., Göthert, M. and Kilbinger, H. : Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptor. *Physiol. Rev.* 69 : 864–889, 1989.
- 34) Courtney, K. R. : Structure-activity relations for frequency-dependent sodium channel block in nerve by local anesthetics. *J. Pharmacol. Exp Ther.* 213 : 114–119, 1980.
- 35) Kalivas, P. W., and Stewart, J. : Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.* 16 : 223–244, 1991.