

原 著 リドカインによる LPS 誘導性好中球性気道炎症 抑制効果についてのマウスモデルを用いた検討

昭和大学医学部内科学教室 (呼吸器・アレルギー内科学部門)

宮本 正秀 田中 明彦 横江 琢也
田崎 俊之 山本 義孝 渡部 良雄
山本 真弓 大田 進 足立 満

国立病院機構相模原病院呼吸器科

美濃口健治

要約：局所麻酔薬や抗心室性不整脈薬として広く実地臨床において使用されるリドカインは抗炎症効果を有することが知られている。われわれは、LPSの経気道的投与によって誘導される肺傷害マウスモデルを用いて好中球性炎症に対するリドカインの抗炎症効果について検討を行った。6～8週齢の雄性C57BL/6マウスに対して経気道的にLPS (lipopolysaccharide)を投与することによって好中球性炎症を誘導し肺傷害モデルを作成した。同モデルに対してリドカインを腹腔内に投与し(3, 30 mg/kg), LPS刺激24時間後に気管支肺胞洗浄液(BALf: Bronchoalveolar Lavage fluid)を採取した。なお、リドカインの投与にあたっては全身投与の経路から経静脈投与も検討したが、個体が小さく静脈確保が困難であったため、腹腔内投与を選択した。検体採取後、BALf中の総細胞数はヘモサイトメーターを用いて算出し、スライドグラス固定後に白血球分画を検討した。またBALf中のInterleukin (IL)-6濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて測定した。リドカイン(3, 30 mg/kg)を単独で腹腔内に投与し、右心房から得られた血液とBALf中の白血球分画を解析したところ、リドカイン単独群はリドカイン非投与のコントロール群と比較し差を認めなかった。一方、リドカインを前投与し、LPSを経気道的に投与した24時間後に採取したBALf中の白血球分画では、LPSによって上昇した好中球数がリドカインによって有意に減少した。また、リドカインによる肺胞内の好中球浸潤の抑制と合致して、BALf中のIL-6の濃度が有意に低下した。以上より、マウスの肺傷害モデルにおいて、リドカインの全身投与は好中球性炎症を抑制する可能性が示唆された。

キーワード：リドカイン, IL-6, 好中球性気道炎症

急性肺傷害 (acute lung injury: ALI) および急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome: ARDS) は過剰な炎症・凝固系の破綻などによって引き起こされ、好中球を中心とした炎症細胞の肺胞内浸潤と肺水腫および間質の浮腫などによって特徴付けられる症候群である¹⁾。病理学的にはびまん性肺泡領域傷害 (diffuse alveolar damage: DAD) を共通の所見とし、硝子膜形成を特徴とする滲出期、線維芽細胞の増生を特徴とする増殖期、膠原繊維の沈着による肺胞構築の改変を特徴とする線維化期に分類される。その原因は感染症、悪性腫瘍、常位胎盤早期剥離などを代表とする婦人科疾

患、外傷、虚血/再灌流 (肺移植、肺血栓除去後) と多岐にわたって存在する。その中でも、感染症特に敗血症に伴うALI/ARDS (以降肺傷害とする) は日常臨床においてもしばしば遭遇し、時に致命的な問題となる。肺傷害は敗血症によって誘導される多臓器不全 (multiple organ dysfunction syndrome: MODS) の一臓器障害と考えられている。肺傷害に対する治療はその原因に対する直接的な治療が原則である。過去に、原疾患以外の治療つまり補助的な治療が海外を中心に数多く試みられてきたが、その多くは明らかな有効性を認められていない²⁻⁵⁾。

リドカインは1930年代にアミド型局所麻酔薬と

して初めて合成され、1947年に始めて臨床応用された。その後、1948年から市販され現在に至っている。実地臨床においては局所麻酔薬としての役割とIb群抗不整脈薬としての役割を持つ。作用機序は局所麻酔薬としての共通の機序であるNaチャネルの阻害である。すなわち、活動電位の発生と伝導を担っている電位依存性Na⁺チャネルの開口をブロックし、活動電位の伝導を遮断して、局所麻酔作用を発揮する。また、リドカインは抗炎症効果を有する報告が散見される。われわれは過去に、アレルギー性気管支喘息患者から採取した末梢血単核球を、ダニ抗原で刺激する際に、リドカインを添加すると細胞増殖反応およびサイトカイン産生(Interleukin (IL)-4, IL-5)が制御されることを報告し、リドカインの抗アレルギー性炎症効果を証明した⁶⁾。その後、動物モデルにおいてもリドカインがアレルギー性炎症を制御することが証明された⁷⁾。リドカインは虚血による脳神経細胞障害の抑制や外傷-出血マウスモデルにおける免疫抑制効果なども報告されている^{8,9)}。また、腹膜炎/敗血症モデルにおいても、リドカインは腎保護作用および肝保護作用と共に致死率を低下させることも知られている¹⁰⁾。しかし、これまでリドカインの肺傷害動物モデルに対する検討はなされていない。

そこで、今回われわれはLPS誘導性肺傷害モデルを用いて、リドカインの好中球性炎症に与える影響に関して検討を行った。

研究方法

本研究は6~8週齢の雄性C57BL/6マウス(18~23g)を使用した。マウスは埼玉動物供給所より購入し、実験開始1週間より前から昭和大学動物舎の飼育環境下にて飼育した。また、実験は「昭和大学動物実験実施指針」に基づき倫理的に行った。

1. LPS誘導性肺傷害マウスモデルとリドカイン投与 (Fig. 1)

エーテルでの吸入麻酔下にリドカイン(3, 30 mg/kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を24G針の注射器を用いて腹腔内投与した。また、リドカインの対象としてPhosphate buffered saline (PBS)を使用した。リドカインもしくはPBSを腹腔内(ip)に投与した30分後に、再度エーテル麻酔下にてlipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis,

(protocol)

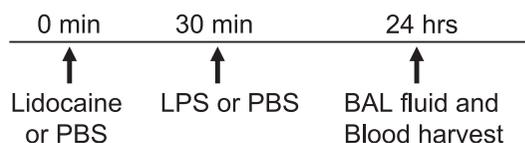


Fig. 1 Time course of the study

MO) (LPS: 10 μg/ 50 μl, PBSに溶解) を経鼻的に投与した(in). LPSの対象として、PBSを使用した。最終的に用いた群を下記に示す。

- I. PBS ip_PBS in 群
- II. リドカイン ip_PBS in 群
- III. PBS ip_LPS in 群
- IV. リドカイン ip_LPS in 群 (各群 n = 6~8匹)

LPS (もしくは対象としてのPBS) を経鼻的に投与して24時間後に解剖を行った。まず、ネブタールとセラクタールの併用麻酔下にて右心房より血液採取を行った。その後、頸部切開を行い、22Gの静脈用カテーテルを気管に穿刺し留置した。留置したカテーテルを使用し350 μlの生理食塩水にて3回肺洗浄を行い気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALf)採取した。採取したBALfは遠心(2000 g, 5分)された後、上清はサイトカイン測定用に凍結され、沈渣に存在するBALf中の細胞は赤血球溶解液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で3回洗浄後にヘモサイトメーターを用いて総細胞数が算出された。また、赤血球溶解液にて処理されたBALf中の細胞は、サイトスピンにてスライドグラスに固定されDiff-Quick (Dade Behring Inc., Newark, DE)で染色後、細胞分画が算出された。

2. サイトカイン測定

BALf中のIL-6はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて測定した(R&D Systems, Minneapolis, MN)。IL-6の検出限界濃度は3 pg/mlである。

3. 統計解析

データは平均値 ± 標準偏差(SEM)で示されており、統計学的有意差はp値<0.05を持って統計学的有意差ありと判定した。多群間における統計学的有意差解析はBonferroni/Dunn解析を用いて行った。

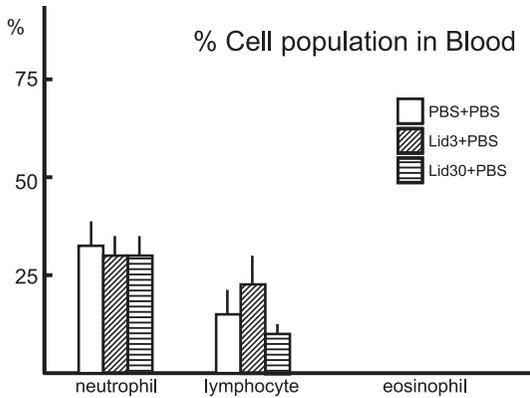


Fig. 2 Differential cell population in blood. Whole blood was harvested 24hr after the administration of LPS intratracheally. After the lysis of red blood cell using lysis buffer, white blood cells were harvested and counted using hemocytometer. Differential cell counts of up to 500 were performed on cytospin cell preparations, followed by staining with Diff-Quick and counting using standard morphological criteria.

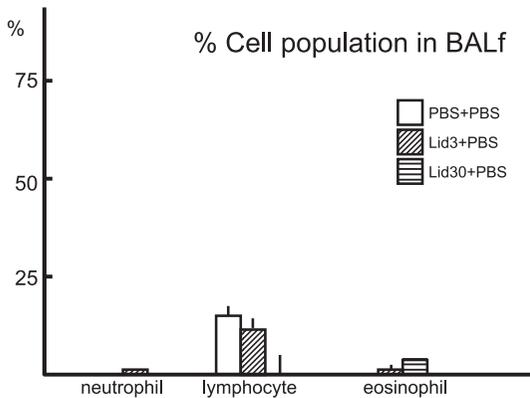


Fig. 3 Differential cell population in BALf. BALf was harvested 24hr after the administration of LPS intratracheally. After the centrifuge at 2000 xg for 5 min, the residual BALf cells were treated three times with red cell lysis buffer counted using hemocytometer. Differential cell counts of up to 500 were performed on cytospin cell preparations, followed by staining with Diff-Quick and counting using standard morphological criteria.

結 果

今回の実験において、肺傷害における好中球性炎症に対するリドカインの影響を検討するため、われわれは肺傷害モデルの中でも最も使用頻度の高い

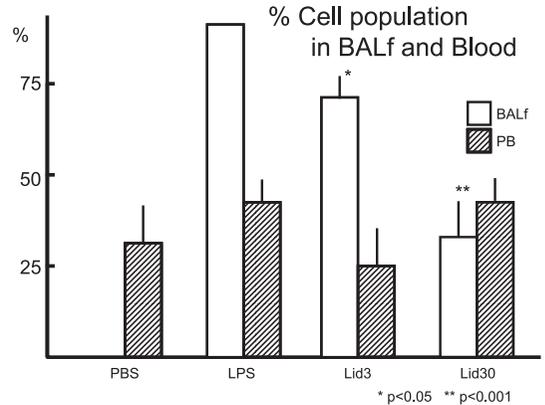


Fig. 4 Differential cell population in BALf and blood. BALf and whole blood were harvested 24hr after the administration of LPS intratracheally. BALf cells and white blood cells were counted and differentiated. * p<0.05 ** p<0.001

LPS 誘導性肺傷害マウスモデルを用いた。

はじめに、リドカインの濃度の設定と安全性の確認のため、リドカインを単独で腹腔内に投与した。リドカインの濃度は 3, 30 mg/kg で投与したが、単独投与による 24 時間以内のマウスの死亡および明らかな中枢神経障害は認められなかった。また、リドカインの単独投与による白血球に与える影響を確認する目的で、リドカイン投与 24 時間後に血液と BALf を採取しヘモサイトメーターを用いて総細胞数を算出した。また、それらの細胞をサイトスピンでスライドグラスに固定し、Diff-Quick 染色を行い顕微鏡下で観察した。その結果、血液中および BALf 中の総細胞数はリドカインを投与しても非投与群と比較し有意な差を認めなかった (Fig. 2, 3)。また、その分画も総細胞数同様に差を認めなかった (Fig. 2, 3)。

経鼻的に LPS を投与したところ、50 μ l で即時的に窒息死を起こしたマウスはいなかった。LPS の投与にて BALf 中の総細胞数が 24 時間以内に著増した (Fig. 4)。BALf 中の細胞をサイトスピンでスライドグラスに固定し、Diff-Quick 染色を行い顕微鏡下で観察した結果、BALf 中の細胞の中で分核を特徴とする好中球が特異的に増加していることが証明された (Fig. 4)。リドカインの腹腔内投与は、LPS による BALf 中の総細胞数および好中球の上昇を抑制した (Fig. 4)。すなわちリドカインは LPS に

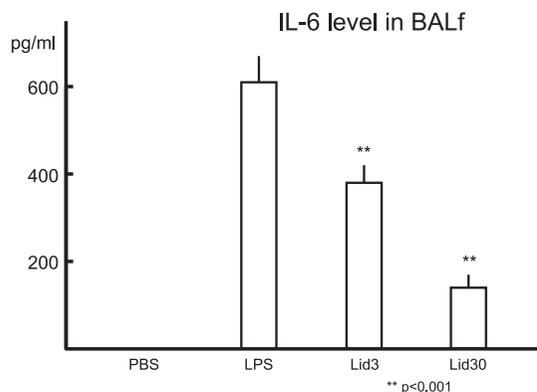


Fig. 5 The level of IL-6 in BALf. BALf was harvested 24hr after the administration of LPS intratracheally. The collected BALf was centrifuged at 2000 xg for 5 min, and the supernatant was harvested. IL-6 levels in the supernatant were determined by ELISA

よって誘導される好中球の血管から肺胞への浸潤を抑制した。

リドカインはLPSによって誘導される好中球性炎症を抑制することがわかったため、次に、好中球性炎症に関与するサイトカインであるIL-6について検討を行った。その結果、LPSによってBALf中のIL-6は増加し、その増加は全身性のリドカイン投与によって有意に抑制された (Fig. 5)。

考 察

一般臨床においてリドカインを抗不整脈薬として使用する際には50 mgを静脈内に投与することが多く、これは50 kgのヒトだと1 mg/kgとなる。今回われわれが使用したリドカインの量に関しては、低用量の3 mg/kgは日常臨床で使用される濃度よりやや高いことが推測される。一方、高用量の30 mg/kgに関しては日常使用するリドカインの濃度では到達することは困難であると考えられる。

今回われわれは、リドカインの腹腔内投与がLPSによって誘導される好中球性炎症を制御することを報告した。過去に、リドカインは好酸球にアポトーシスを誘導し、喘息における好酸球性炎症を抑制することが証明されており、われわれも気管支喘息におけるリドカイン吸入療法の作用機序の一つとして、リドカインがTリンパ球にアポトーシスを誘導することを報告した¹¹⁾。しかし、今回の実験に

おいては、リドカインの単独投与が血液中の白血球およびBALf中の細胞分画に影響を与えないことから、リドカインの腹腔内投与によって白血球がアポトーシスに誘導された可能性は低い。つまり、リドカインによる好中球性炎症制御の作用機序として、白血球のアポトーシス誘導は考え難い。われわれは、炎症性サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) に分類され、LPSによってBALf中で上昇するIL-6が、リドカイン投与によって制御されることを証明した。IL-6は元来B細胞に作用し免疫グロブリンの産生能を誘導する液性因子として発見され、1986年に遺伝子構造が決定されたサイトカインであるが¹²⁾、好中球性炎症を惹起する重要なサイトカインでもある。したがって、IL-6の抑制はリドカインによる好中球の活性化および肺胞内浸潤の抑制に関与していると考えられる。IL-6はB細胞やT細胞からも産生されることが証明されているが、その多くは単球から産生される¹³⁾。ゆえに、リドカインは単球に作用し、単球からのIL-6の産生を抑制した可能性が高い。以上の結果より、リドカインがLPS誘導性の好中球性炎症を抑制した機序の一つとして、単球からのIL-6の抑制を介して間接的に好中球の活性化を抑制することが想定される。また、過去にMaedaらはリドカインが好中球上のCD11bの発現を抑制することを報告した¹⁴⁾。これは、リドカインの全身投与が好中球の肺胞内浸潤を抑制したもう一つの間接的機序として考えられる。

過去にわれわれは、リドカインがTリンパ球にアポトーシスを誘導することを証明した⁶⁾。また、アポトーシスを誘導する濃度と比較し、低濃度のリドカインがダニ抗原特異的刺戟やPMA (phorbol 12 myristate 13-acetate) やCa²⁺ionophoreによるTリンパ球の活性化を抑制することも報告している¹¹⁾。これらは、リドカインが低濃度においては細胞の活性化を抑制する作用を有し、高濃度では細胞死を誘導する可能性を示唆している。したがって、今回の実験におけるリドカインの作用機序として、好中球やリンパ球、単球などの免疫細胞にアポトーシスを誘導しないレベルの濃度において、LPSによって誘導される好中球の活性化を直接的に抑制した可能性が考えられる。

過去に動物モデルにおいて有効性が実証されながら、臨床治験においては効果が認められなかった薬

剤が多く存在する。動物の疾患モデルは比較的有病態が単一 (homogeneous) であるため、薬剤の効果が得られやすい傾向がある。一方、実地臨床における疾患は病態が多様 (heterogeneous) であるために、薬剤が病態形成の一部に有効性を示しても、結果としては現れないことが数多く認められる。したがって、動物モデルで証明された有効性が即臨床応用可能となるのではなく、さらにリドカインの効果発現機序等についての検討が必要である。

文 献

- 1) Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, *et al*: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* **2**: 319-323, 1967.
- 2) Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, *et al*: High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **317**: 1565-1570, 1987.
- 3) Bone RC, Slotman G, Maunder R, *et al*: Randomized double-blind, multicenter study of prostaglandin E1 in patients with the adult respiratory distress syndrome. Prostaglandin E1 study group. *Chest* **96**: 114-119, 1989.
- 4) Yu M and Tomasa G: A double-blind, prospective, randomized trial of ketoconazole, a thromboxane synthetase inhibitor, in the prophylaxis of the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **21**: 1635-1642, 1993.
- 5) Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. The ARDS Network. *JAMA* **283**: 1995-2002, 2000.
- 6) Tanaka A, Minoguchi K, Oda N, *et al*: Inhibitory effect of lidocaine on T cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **109**: 485-490, 2002.
- 7) da Costa JC, Olsen PC, de Azeredo Siqueira R, *et al*: JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol* **119**: 219-225, 2007.
- 8) Seyfried FJ, Adachi N and Arai T: Suppression of energy requirement by lidocaine in the ischemic mouse brain. *J Neurosurg Anesthesiol* **17**: 75-81, 2005.
- 9) Kawasaki T, Choudhry MA, Schwacha MG, *et al*: Lidocaine depresses splenocyte immune functions following trauma-hemorrhage in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**: C1049-C1055, 2006.
- 10) Gallos G, Jones DR, Nasr SH, *et al*: Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology* **101**: 902-911, 2004.
- 11) Matsuo H, Minoguchi K, Tanaka A, *et al*: Lidocaine induces apoptosis in peripheral CD4+ T-cells of patients with bronchial asthma. *Showa Univ J Med Sci* **17**: 15-23, 2005.
- 12) Hirano T, Yasukawa K, Harada H, *et al*: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**: 73-76, 1986.
- 13) Matsuzaki N, Saji F, Kameda T, *et al*: In vitro and in vivo production of interleukin-6 by fetal mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* **55**: 305-314, 1990.
- 14) Maeda K, Sakonju I, Kumakura A, *et al*: Effects of lidocaine hydrochloride on canine granulocytes, granulocyte CD11b expression and reactive oxygen species production. *J Vet Med Sci* **72**: 141-147, 2010.

THE INHIBITORY EFFECT OF LIDOCAINE ON LPS-INDUCED NEUTROPHILIC AIRWAY INFLAMMATION IN A MOUSE MODEL

Masahide MIYAMOTO, Akihiko TANAKA, Takuya YOKOE,
Toshiyuki TAZAKI, Yoshitaka YAMAMOTO, Yoshio WATANABE,
Mayumi YAMAMOTO, Shin OHTA and Mitsuru ADACHI

Department of Internal Medicine, Division of Respirology and Allergology,
Showa University School of Medicine

Kenji MINOGUCHI

National Hospital Organization Sagamihara National Hospital

Abstract — Lidocaine, widely used as a local analgesic or an anti-ventricular arrhythmia agent, is known to have an anti-inflammatory effect. We investigated the effect of lidocaine on pulmonary inflammation induced by the exposure of lipopolysaccharide (LPS) in mice. LPS-induced lung injury model was established by the intratracheal exposure of LPS to male C57BL/6 mice at 8–10 weeks of age. Lidocaine at 3 or 30 mg/kg was injected intraperitoneally 30 minutes before exposure of LPS. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood were collected 24 hours after the administration of LPS. Total cells and differential cell counts in BALF were measured. Interleukin-6 (IL-6) in BALF was measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Injection of lidocaine alone by the intraperitoneal route did not alter any cell population in BALF and peripheral blood compared to vehicle control. Treatment with lidocaine significantly reduced the alveolar recruitment of neutrophils in BALF. In concordance with the downregulation of neutrophils, lidocaine reduced the concentration of IL-6, highly associated with neutrophilic inflammation, in BALF. These results suggest that systemic treatment of lidocaine can suppress LPS-induced neutrophilic inflammation in a murine model.

Key words: lidocaine, inflammation, interleukin-6 (IL-6)

[受付：11月10日，受理：12月7日，2011]