

局所麻酔薬の免疫応答に対する影響

岡山大学歯学部口腔外科学第1講座（主任：西嶋克巳教授）

木庭茂治

（昭和59年8月31日受稿）

Key words：局所麻酔薬、
免疫反応
膜安定化

緒言

局所麻酔薬は臨床において、表面麻酔、浸潤麻酔といった適用部位のみに限局した麻酔の目的で用いられるばかりでなく、伝達麻酔あるいは脊髄麻酔として、深部組織に存在する知覚神経の支配下領域に広範囲な麻酔効果を生じさせる目的でも使用される。このような局所麻酔薬の作用機序は、神経線維に対する特異性の高い機序で作用するというよりは、むしろ、細胞膜に対する非特異的な機序で麻酔効果を発揮するという可能性が強く主張されている^{1,2)}。従って、局所麻酔薬の大量使用は、神経細胞以外の種々な体細胞に対しても複雑な影響を及ぼし得ることになる。局所麻酔薬の主作用は、神経線維の細胞膜に作用し、静止電位に変化を与えることなく Na^+ -channel を block し、膜の興奮性を低下させることにあるが、この作用強度は n-octanol-水間の油水分配係数と高度な相関を示すことが知られており、局所麻酔薬の主な作用点は細胞膜の疎水性部位、特に脂質二重層に存在すると理解されている^{1,2)}。この脂質二重層は全ての細胞膜に存在する基本的な膜構成要素の一つである。局所麻酔薬が脂質二重層に作用するという理解は、同時に局所麻酔薬の非特異的な作用発現の可能性を示唆している。このような考え方は、古くは Meyer-Overton の lipid theory^{3,4)} にはじまり、膜内における分子の体積を考慮した Mullins⁵⁾、Miller & Smith⁶⁾ や、更に膜蛋白への寄与も考慮した Seeman¹⁾ の membrane expansion theory、膜表面の Ca^{2+} と置換する

ことにより陰性に荷電したリン脂質の分布に影響するためという Ca^{2+} -displacement phase separation theory^{7,8)} へと発展している。また、膜蛋白における疎水性部位との相互作用から membrane expansion を説明する理論^{1,9)} も展開されている。その他、細胞膜の内側に隣接する周辺蛋白である microtubule や microfilament の再配列の阻害を作用機序の一つに挙げている報告もある¹⁰⁾。このように麻酔理論そのものは未確定の部分も多いが、その基本にあるものは細胞膜に対する非特異的な作用が大きく関与していることは疑いのないところである。既に、局所麻酔薬の主作用以外に種々な薬理作用が数多く報告されているが¹¹⁾、細胞膜に作用点をもつ作用としては、①赤血球低張溶血の阻止効果¹⁾、②ラット肝細胞からの血漿タンパク分泌抑制¹²⁾、③筋小胞体の Ca^{2+} uptake あるいは release の促進¹³⁾、④ human fibroblast からの collagen 分泌の抑制¹⁴⁾などが周知である。一方、最近の免疫学の進歩に伴い、局所麻酔薬が免疫担当細胞であるリンパ球に対しても、capping の阻害¹⁵⁾、核酸の取り込みや増殖の抑制^{16,17)}などの作用を持つことが報告されており、免疫系に対しても当然何らかの作用を発揮し得ることが予想される。このような観点から、免疫担当細胞に対する局所麻酔薬の効果を解明する事を目的として本実験を行った。免疫担当細胞として、脾臓リンパ球に対する作用の解析を in vivo 及び in vitro 実験系で行い、I型アレルギー反応に関与する肥満細胞に対する作用を in vitro 実験系で検討した。また、細胞膜リン脂質二重層に対す

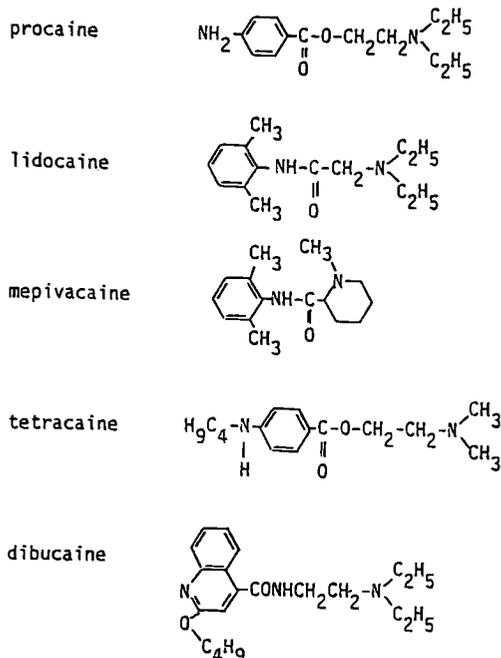


図1 局所麻酔薬の化学構造式

る影響を検討するために、モデル膜である liposome を用いた実験も併せて行った。

実験材料ならびに実験方法

1. 実験動物

脾臓リンパ球を用いる実験には、6—8週齢の Balb/c 系雄性マウス（チャールズリバー）のうち、体重18—20gの健康なものを選んで使用した。肥満細胞を用いる実験には、体重250—300gの Wistar 系雄性ラット（北山ラベス）を用いた。

2. 被検薬物

本研究に際し、用いた局所麻酔薬は以下のものであり、それらの構造式は図1に一括して示した。

lidocaine hydrochloride（藤沢薬品）、procaine hydrochloride（Sigma）、tetracaine hydrochloride（Sigma）、mepivacaine hydrochloride（吉富製薬）、dibucaine hydrochloride（帝國化学産業）。

いずれの薬物も使用直前に生理食塩液(saline)に溶解して使用した。

3. Rosette forming cells (RFC) に及ぼす局所麻酔薬の影響

RFCの検出は、Kawakamiら¹⁸⁾の変法により行った。Alserver液中に保存されたヒツジ赤血球（西日本シーブファーム、以下SRBC）をsalineで3回洗浄（2,000rpm, 5分, 4°C）した後、赤血球数が 10^9 SRBC/mlとなるように調整してsalineに懸濁した。この0.2ml（ 2×10^8 SRBC）をマウス腹腔内に1回注射して感作した。被検薬物は投与量を体重10g当り0.1mlに固定して用量を調整し、感作日より4日間、1日1回連続して皮下注射した。対照群にはsalineを同様に連続投与した。感作日より5日目のマウスをcervical dislocationにより致死させ、その後すみやかに脾臓を摘出し、氷冷したEDTA含有リン酸緩衝生理的塩溶液（137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na_2HPO_4 , 1.46mM KH_2PO_4 , 1mM EDTA, pH 7.6; PBS(-)-EDTA）を含有するシャーレに浸漬して脾臓をminceした。400 meshのstainless steel screenを通過した細胞を0.04M EDTA含有gelatin-veronal buffer（145mM NaCl, 0.15mM CaCl_2 , 0.5mM MgCl_2 , 0.1% gelatin, 3.12mM 5,5-diethylbarbituric acid, 1.82mM sodium 5,5-diethylbarbiturate, 40mM EDTA, pH 7.5; EDTA-GVB）で3回洗浄（800rpm, 5分, 4°C）した後、 3×10^8 脾細胞/mlの細胞浮遊液を作成した。あらかじめ秤量しておいた試験管にEDTA-GVB 2mlを注入し、これに脾細胞浮遊液0.1mlを加えて混和後、4°C, 700rpmで5分間遠心し、上清を捨て、氷冷下に試験管を5分間倒立させて水分を除き、細胞湿重量を秤量した（a mg）。これに0.2mlのEDTA-GVBを加えて均一な細胞浮遊液とした後、EDTA-GVBに浮遊させた0.5% SRBC浮遊液0.5mlを加えて混和し、37°Cで30分間CO₂ incubator中でincubationを行った。その後氷冷EDTA-GVB 2mlを加え、4°Cで500rpm, 5分間の遠心後上清を除去し、更に2mlの氷冷EDTA-GVBで洗浄し、pelletを0.5mlのEDTA-GVBに浮遊させ、これを秤量した（b mg）。この7μlをスライドグラスに載せ、18×18mmのカバーグラスで覆った後、倍率10×10倍で検鏡し、任意の

50視野における Rosette 数を計測した(c). 脾細胞表面に4個以上のSRBCが付着したものをRFCと判定し、次式により脾細胞 10^7 個当りのRFC数を計算した.

$$\text{RFC}/10^7 \text{ spleen cells} = 2 \times c \times b / 7 \times 3.3 / a$$

4. Hemolytic plaque forming cells(HPFC)に及ぼす局所麻酔薬の影響

局所麻酔薬のHPFCに対する影響は, in vivo及び2種類のin vitro実験系で検討した.

① in vivoにおける局所麻酔薬の作用

動物の感作及び被検薬物の投与は, 前述のRFCの場合と同様の方法で行った. 感作日より5日目にマウスをcervical dislocationにより致死させ, 脾臓を摘出してJerneのplaque assay¹⁹⁾に従ってHPFCを測定した. 氷冷したEagle's minimum essential medium (Eagle MEM, 日水製薬) 中で脾臓をminceし, 400 meshのstainless steel screenを通過した細胞をEagle MEMで3回洗浄(1,500 rpm, 4°C, 5分)後, 2 mlのEagle MEMに浮遊させ, これを更にEagle MEMで100倍希釈してassayに供した. 0.01% DEAE-dextran (Sigma) を含む1.6% Noble agar (Difco) 1 ml, 2倍濃度のEagle MEM 1 mlを混合し, これにSRBCのsaline浮遊液(10^9 個/ml) 100 μ l, モルモット補体(極東製薬) 20 μ lを加えたプラスチックシャーレに上述の脾細胞浮遊液200 μ lを加えて急速に攪拌させて均一に分配させ, 37°Cで3時間CO₂ incubator内に放置し, その後溶血斑(plaque)を計数した. 脾細胞浮遊液中の生細胞数は, dye exclusion test (0.2% trypan blue)により計測し, 脾細胞 10^6 個当りのplaque生成数を求めた. また, 薬物のHPFC抑制率は次式により求めた.

$$\text{抑制率} = \frac{\text{対照動物における HPFC 数} - \text{薬物投与対照動物における HPFC 数}}{\text{対照動物における HPFC 数}} \times 100(\%)$$

② in vitro実験系における局所麻酔薬の直接作用

SRBCによる感作から5日目のマウスより摘出した脾臓で脾細胞浮遊液をin vivoの場合と同様の方法で作成し, 10^8 個/mlになるように

Eagle MEMに浮遊させた. この2 mlに最終濃度が0.1ないし0.02%となるように調整した被検薬物溶液0.5 mlを加え, CO₂ incubator 中で37°C, 30分間incubationを行った. その後, 1,500 rpm, 4°C, 5分間の遠心分離を行って上清を捨て, pelletを2 mlのEagle MEMに再浮遊させ, 以下, 前述の方法に従ってHPFC assayを行った. 対照群には, 生理食塩液を同じ用量だけ添加した.

③ in vitro HPFC産生能に及ぼす局所麻酔薬の影響

操作は, すべてクリーンベンチ内で無菌的にを行い, 培地, 試薬等は全てオートクレーブで滅菌したものを用いた.

マウス脾臓を無菌的に摘出し, Eagle MEMに浸した24 meshのstainless steel screen上で脾臓をスパーテルを用いてminceし, 細胞を分離した. 更に21 gaugeの注射針を通して細胞浮遊液を採取し, 400 meshのstainless steel screenを通して濾過した. その後Eagle MEMで1回細胞を洗浄し, 0.2% trypan blue液で非染色性の細胞を計数し, 10%牛胎児血清(FCS, Flow laboratories)及び1 mM 2-mercaptoethanolを含むRPMI-1640培地(5% CO₂でbubblingしてpH 7.4となるように調整したもの, 日水製薬)に, 脾細胞を 5×10^6 cells/mlとなるように浮遊させた. 組織培養用24穴マイクロプレート(Falcon)の各wellに種々な濃度の薬液50 μ l, SRBC浮遊液50 μ l(2×10^6 /wellになるよう調整したもの), 脾細胞浮遊液2 mlを加え, 5% CO₂ incubator 中で37°Cで4日間細胞を培養した. 4日後に各wellから細胞を集め, リン酸緩衝生理的塩溶液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM NaH₂PO₄, pH 7.6; PBS(-))で1回洗浄後, 2 mlのEagle MEMに浮遊させ, 生細胞数を計測した後, 前述の場合と同様の方法でJerneのHPFC assayを行った¹⁹⁾.

5. Hemagglutination (HA)による抗SRBC抗体価の測定

マウスの感作及び被検薬物の投与は, RFC測定の場合と同じ方法で行った.

感作5日目のマウスをエーテル麻酔下に頸動

脈より採血し、血液を2-4時間室温放置後2,500 rpm, 4°C, 10分間の遠心分離を行い、抗SRBCマウス血清を得た。

抗体価の測定は、TOMY精工製 microtiter plate を使用して木村の方法²⁰⁾に準じて行った。microtiter plate の各 well に dropper を用いて gelatin veronal buffered saline (145mM NaCl, 0.15mM CaCl₂, 0.5mM MgCl₂, 0.1% gelatin, 3.12mM 5,5-diethylbarbituric acid, 1.82mM sodium 5,5-diethylbarbiturate, pH 7.5; GVB⁺⁺) 25μl を入れ、25μl の diluter を使用して抗血清の2倍希釈系列を作った。更に別の dropper を用いて SRBC 浮遊液 (2×10⁸ 個/ml in GVB⁺⁺) を25μl ずつ各 well に加えた、microtiter plate を軽く振盪して5% CO₂ incubator 中で37°C, 1時間放置し、その後HAの陽性、陰性の判定を行った。

6. 蛍光偏光解消法によるリンパ球細胞膜流動性の測定

健康な非感作マウスの脾臓を摘出し、mince を行い PBS(-) で洗浄 (2,000 rpm, 4°C, 5分) 後、脾臓1個当たり2mlのPBS(-)に浮遊させた。これを、9% Ficoll と33.4% Conray 400 (vol/vol, 2.4:1) の混液2mlを入れた遠心管の上に重層し、1,550 rpm, 4°C, 30分間の密度勾配遠心分離を行い、リンパ球を分離採取した²¹⁾。このリンパ球をPBS(-)で2回洗浄した後、2×10⁷個/mlとなるようにPBS(-)に浮遊させ、リンパ球浮遊液とした。

リンパ球の蛍光ラベルは、Shinitzky & Inber²²⁾の方法に準じて行った。蛍光ラベル剤である1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) の10⁻³ M tetrahydrofurane 溶液を作成し、これを1000倍量のPBS(-)中に激しく攪拌しながら加え、室温で更に15分間マグネットスターラーを用いて攪拌を続け、10⁻⁶M DPH dispersion を作成した。このDPH 1mlにリンパ球浮遊液1mlを加え、25°Cで1時間放置してリンパ球のラベル化を行い、PBS(-)で1回洗浄した後蛍光測定に使用した。

蛍光偏光の測定には、Hitachi 650-10S 蛍光分光光度計及びPolacot社製偏光フィルターを使用した。励起波長は358nm, 蛍光波長は427

nm, で測定した。偏光励起光に対して平行方向に偏光した蛍光の強度(I//)と、垂直方向に偏光した蛍光の強度(I⊥)とを測定記録した。測定の際には、恒温水循環装置を用いて蛍光セルの温度を37°Cに保った。

上記の測定により求めたI//及びI⊥の値より、蛍光偏光度Pは次式により算出した。

$$P = \frac{I// - I\perp}{I// + I\perp} = \frac{I// / I\perp - 1}{I// / I\perp + 1} \dots\dots\dots(1)$$

また、偏光の異方性rは次式により求められる。

$$r = \frac{I// - I\perp}{I// + 2I\perp} = \frac{I// / I\perp - 1}{I// / I\perp + 2} = \frac{2P}{3 - P} \dots\dots\dots(2)$$

Jähnig²³⁾によれば、定常状態における蛍光の異方性rsは次のように表わし得る。

$$r_s = \frac{r_0 - r^\infty}{1 + \tau/\phi} + r^\infty \dots\dots\dots(3)$$

ここにr₀は回転緩和のない条件での異方性の値であり、r_∞はt_∞における異方性 (limiting anisotropy) である。また、τは蛍光の寿命であり、φはDPH分子の回転相関時間である。r₀, τ, φはDPH分子に固有の値で、脂質二重層の中ではr₀=0.39²⁴⁾, τ/φ=8²³⁾という値が報告されている。従って、これらの値を代入すると式(3)は

$$r_s = 9/8 r_s - 0.04875 \dots\dots\dots(4)$$

となる。一方、order parameterはラベル分子の回転軸に対してその主軸がどれだけ傾いているかを表わすパラメータで、回転軸と主軸のなす角度をQとすると、

$$S = 1/2 (3 \cos^2 Q - 1) \dots\dots\dots(5)$$

で表わされる。回転軸と主軸が一致した状態ではS=1となり、完全に等方的な状態では、 $\overline{\cos^2 Q} = 1/3$ であるからS=0となる。ところでこのSは、r_∞との間に次の関係が成立する²³⁾

$$r_s = r_0 \cdot S^2 \dots\dots\dots(6)$$

従って、式(6)と式(4)より、定常状態における蛍光偏光値を測定することにより、次式から流動性の逆数²⁵⁾であるorder parameterが求められる^{26,27)}。

$$S = \sqrt{1/0.39(9/8 r_s - 0.04875)} \dots\dots\dots(7)$$

7. liposome の膜流動性に及ぼす局所麻酔薬の効果

dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC,

Sigma) 1 mg に DPH 10^{-6} M dispersion 1 ml を加え, DPPC の相転移温度 (41.6°C) を越える温度 (45°C) で 20 分間, TOMY 精工製超音波発生装置 (UR-2000P) で超音波処理を行った後, 5,000×g, 20 分間の遠心分離により凝集塊を除き, DPH labeled sonicated liposome suspension を作成した. これに種々な濃度の局所麻酔薬 1 ml を加え, 更に 45°C で 10 分間超音波処理を行った. このようにして得た liposome の order parameter の温度による変動を恒温水循環装置を付けた蛍光分光光度計を用いて, 前述の場合と同様に蛍光偏光解消法により求めた. 蛍光セル中の liposome suspension の温度はサーミスタ温度計 (Takara Digimulti D611) を用いて記録した²⁷⁾.

8. ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離におよぼす局所麻酔薬の影響

ラットを断頭し, 出血致死させ, 腹腔内に HEPES 緩衝生理的塩溶液 (NaCl 154 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 0.9 mM, glucose 5.6 mM, HEPES 5 mM, pH 7.4; PS) 10 ml を注入し, 腹壁を 90 秒間おだやかにマッサージした. その後, 腹部正中線に小切開を加えて腹腔液を回収し, 4°C, 5 分間, 100×g の遠心分離を行った. pellet を氷冷した PS で 2 回洗浄 (100×g, 5 分間, 4°C) した後, 氷冷した PS 0.5 ml に細胞を再浮遊させた. その後, percoll 密度勾配遠心法²⁸⁾により肥満細胞を分離採取し, 分離肥満細胞を PS で 2 回洗浄した後実験に供した.

あらかじめ 37°C に保った PS に肥満細胞浮遊液 50 μl を加え, 5 分間の preincubation を行い, PS に溶解した種々な濃度の被検薬物 0.1 ml を加えて 37°C で 15 分間 incubation を行った. その後, 最終濃度が 0.5 μg/ml となるよう PS に溶解した compound 48/80 (48/80) を 0.1 ml 加え, 更に 37°C で 12 分間の incubation を行った. 試験管を氷冷して反応を停止させ, 400×g, 10 分間 4°C で遠心分離を行い, 上清と沈査に分離した. 上清 1 ml を分取し, 0.2 N HCl 1 ml を加えて検体とし, 残りの上清は decant した. 沈査に 0.1 N HCl 4 ml を加え, 沈査中に残存するヒスタミンを遊離させ, 700×g, 4°C で 10 分間遠心分離し, 上清 2 ml を分取して検体とした.

ヒスタミン遊離反応後の上清及び沈査に含まれるヒスタミン量は Shore ら²⁹⁾の変法によって蛍光定量した. 即ち, 検体 2 ml に n-butanol 2.5 ml, 5 N NaOH 0.25 ml と過飽和量の NaCl を加え, 10 分間振とうし, 2,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い, butanol 層 2 ml を採取し, NaCl で飽和した 0.1 N NaOH 2 ml を加え 10 分間振とう後, 2,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った. その後 butanol 層 1.5 ml を分取し, 0.1 N HCl を 2.5 ml 加え, 10 分間振とうし, 2,000 rpm で 10 分間遠心分離後, butanol 層を吸引除去し, HCl 層の 2 ml を検体とした. これに 2 N NaOH 0.2 ml 及び 1% O-phthalaldehyde の methanol 溶液 0.1 ml を加え, 室温で 4 分間反応させた後, 2 M citrate 0.2 ml を加え反応を停止させた. これを蛍光分光光度計 (Hitachi 650-10S) を用いて励起波長 360 nm, 蛍光波長 450 nm でヒスタミンの定量を行った.

ヒスタミン遊離率は次式に従って算出した.

$$\text{ヒスタミン遊離率} = \frac{\text{上清中ヒスタミン量}}{\text{上清中ヒスタミン量} + \text{沈査中ヒスタミン量}} \times 100$$

9. 肥満細胞の c-AMP 含量に及ぼす局所麻酔薬の影響

ラット腹腔より前述の方法に従って採取した腹腔細胞を PS に浮遊させた後, percoll 不連続密度勾配遠心法²⁸⁾により 95% 以上の純度で肥満細胞を分離した. 肥満細胞を toluidine blue で染色して細胞数を計測した. 37°C に保った 800 μl の PS に, 種々な濃度の被検薬液 100 μl を加えた後, 100 μl の肥満細胞浮遊液を加え, 37°C で 30 分間 incubation を行った. 氷冷した PS 1 ml の添加と tube の急速冷却により反応を停止させ, 4°C, 10 分間の遠心分離 (1,300 rpm) により肥満細胞を分離し, 上清を捨てた後, 5 mM HEPES buffer (pH 7.4) 2 ml を加え, 低張条件下で凍結融解を 3 回反復して細胞を崩壊させた後, 5% TCA 液 1 ml を加え除蛋白した. 添加した TCA は, 水飽和エーテルで 4 回抽出を繰返すことにより除去した. その後凍結乾燥したものを試料として用いた. 試料は 0.3 M imida-

表1 局所麻酔薬のRFCに及ぼす影響

drug	dose (mg/kg)	RFC/10 ⁷ spleen cells	% inhibition
control		762.5±46.8	
procaine	1	442.7±35.2**	7.36
	5	291.9±24.5**	38.9
lidocaine	1	732.6±50.9	3.9
	5	729.2±63.8	4.4
	20	589.3±18.4**	22.7
mepivacaine	1	679.3±89.1	10.9
	5	501.4±55.6**	34.2
tetracaine	1	623.3±47.4	18.3
	5	595.7±49.8*	21.9
dibucaine	1	763.2±50.5	-0.09
	5	645.5±53.3	15.3
	10	491.3±61.9**	35.6

各群 n=36, *: P<0.05, **: P<0.01

表2 in vivo HPFCに及ぼす局所麻酔薬の影響

drug	dose (mg/kg)	HPFC/10 ⁶ spleen cells	% inhibition
control		553.8±32.2	
procaine	1	364.5±22.6*	34.2
	5	240.4±10.1**	56.6
lidocaine	1	417.1±30.3*	24.7
	5	250.6±42.3**	54.7
mepivacaine	1	592.2±13.7	-6.9
	5	744.0±77.4*	-34.4
tetracaine	1	195.5±42.3**	64.7
	5	177.8±8.1**	67.9
dibucaine	1	273.2±56.7**	50.6
	5	135.7±12.7**	75.5

各群 n=36, *: P<0.05, **: P<0.01

zole buffer (pH 6.5) 0.1mlで完全に溶解させた後、Yamasa radioimmunoassay kitにより試料中のc-AMP量を測定した。

10. 局所麻酔薬の臨界ミセル濃度(CMC)の測定

PSに溶解した種々な濃度の局所麻酔薬1.95mlに200 μ Mの1-anillino-8-naphthalene sulfonate (ANS) 50 μ lを加えvortexによる攪拌の後、ANSの蛍光強度を励起波長375nm、蛍光波長485nmで測定した²⁷⁾。局所麻酔薬の濃度上昇

により、媒液中にミセルが形成されるとANSは、その疎水環境中で蛍光を発する様になる。ANS蛍光の立ち上る濃度をもって臨界ミセル濃度とした²⁷⁾。

実験結果

1. RFCに及ぼす局所麻酔薬の影響

SRBC感昨日より4日間連続して局所麻酔薬を1日1回皮下注射し、5日目に採取した脾細胞10⁷個当りのRFC数を表1に示した。saline

表3 in vitro 実験系における HPFC に及ぼす局所麻酔薬の直接作用

drug	concentration (%)	HPFC/10 ⁶ spleen cells	% inhibition
control		483.2±19.7	
procaine	0.02	403.5±16.4*	16.5
	0.1	384.2±23.6**	20.5
lidocaine	0.02	388.9±19.3**	19.5
	0.1	374.8±14.8**	22.4
mepivacaine	0.02	573.0±53.7	-18.6
	0.1	564.1±30.6	-16.7
tetracaine	0.02	275.0±55.7**	43.1
	0.1	66.1±11.3**	86.3
dibucaine	0.02	189.6±24.2**	60.8
	0.1	171.3±23.7**	64.6

各群 n=36, *: P<0.05, **: P<0.01

表4 in vitro HPFC 産生能に及ぼす局所麻酔薬の影響 (% change of HPFC/10⁶ spleen cells)

drug	Concentration (M)				
	0	5×10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
Procaine	100.0±4.9	98.2±7.5	133.2±8.3*	109.3±10.3	111.9±5.0
lidocaine	100.0±12.0	99.2±4.9	101.8±14.1	193.4±27.4*	56.0±11.9*
mepivacaine	100.0±8.5	139.2±6.2**	167.4±14.6**	112.7±14.2	114.5±15.0
tetracaine	100.0±7.2	205.0±25.3**	235.2±19.0**	116.5±24.1	3.2±1.4**
dibucaine	100.0±27.8	102.0±31.7	95.3±24.5	3.0±1.6**	5.0±5.0**

各群 n=6, *: P<0.05, **: P<0.01

を投与した対照群における RFC 数は762.5±46.8/10⁷ 脾細胞であった。procaine, lidocaine, mepivacaine, tetracaine 投与群では、用量依存性の RFC 数の減少がみられ、5 mg/kg の投与では procaine, mepivacaine, tetracaine はいずれも有意な抑制を示した。また、lidocaine の 10 mg/kg 投与群で、RFC は有意に抑制された。dibucaine のみが 1 mg/kg の投与により RFC の軽度な増強傾向を示したが、差は有意ではなく、5 mg/kg の投与量では逆に抑制傾向を示すようになり、10 mg/kg では有意な抑制が観察された。

2. HPFC に及ぼす局所麻酔薬の影響

① in vivo 実験

動物を SRBC で感作し、感作日より 1 日 1 回

皮下注射により局所麻酔薬を投与して、5 日目に採取した脾細胞 10⁶ 個当りの HPFC 数を表 2 に示した。saline 投与の対照群における HPFC 数は、脾細胞 10⁶ 個当り 553.8±32.2 であった。procaine, lidocaine, tetracaine, dibucaine はいずれも 1 mg/kg 及び 5 mg/kg の投与により用量依存性の有意な PFC 抑制を示した。1 mg/kg の用量における PFC の抑制率で比較すると、抑制効果は tetracaine>dibucaine>procaine>lidocaine の順であった。しかし、mepivacaine のみが HPFC に対して用量依存的な促進作用を示した。

② in vitro 実験系における局所麻酔薬の直接作用

SRBC 感作日より 5 日目に採取したマウス脾

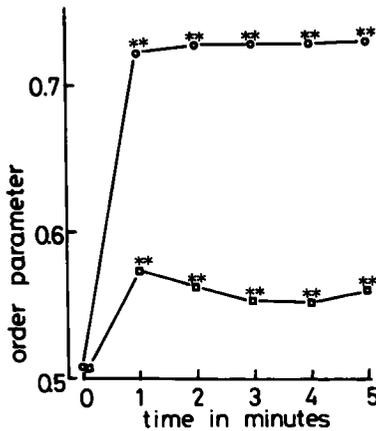


図2 tetracaine 添加後の order parameter の経時変化 (pH 7.4, 37°C). ○—○ tetracaine 含量比0.1%, □—□ tetracaine 含量比0.01%, **P<0.01

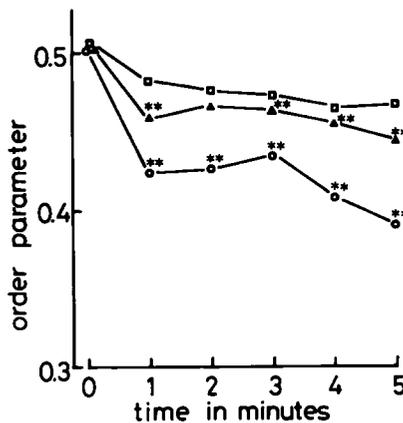


図3 mepivacaine 添加後の order parameter の経時変化 (pH 7.4, 37°C). ○—○ mepivacaine 含量比2%, ▲—▲ mepivacaine 含量比1%, □—□ mepivacaine 含量比0.5%, **P<0.01

細胞に種々な局所麻酔薬を37°C, 30分間作用させた際の脾細胞 10^6 個当りの HPFC 数を表3に示した。対照群の HPFC 数は, 483.2 ± 19.7 個/ 10^6 脾細胞であったが, procaine, lidocaine, tetracaine, dibucaine はいずれも用量依存的に PFC 数を有意に抑制した。その作用強度を0.02%の薬物濃度で比較すると, dibucaine>tetracaine>lidocaine>procaine の順であった。一方, mepivacaine は in vivo の実験と同様に

HPFC 数を増加させる傾向があった。

③ in vitro HPFC 産生能に及ぼす局所麻酔薬の影響

マウス脾細胞を局所麻酔薬の存在下で4日間 SRBC と共に培養し, 抗 SRBC 抗体の産生に対する局所麻酔薬の影響を HPFC assay を指標として検討した結果を表4に示した。局所麻酔薬を作用させない対照群の HPFC 数は, $428.8 \pm 54.3/10^6$ spleen cells であった。感作期間中培養液中に添加された局所麻酔薬は, いずれも比較的 low 濃度において HPFC 数を増加させた。最大増強濃度は procaine, tetracaine, mepivacaine で 10^{-5} M, lidocaine では 5×10^{-5} M であった。trypan blue 非染色性の生細胞数を測定して細胞の生存率についても検討した際, 対照群では実験終了時に培養開始時に添加した全細胞の64%が生存していた。procaine, lidocaine, mepivacaine 添加群では, 培養液中に添加して全ての濃度において対照群の生存率と全く差がなかった。しかし, tetracaine 添加群では, 10^{-5} M 以下の濃度では生存率は対照群と差がなかったが, 5×10^{-5} M 以上では生存率が減少した(50.2%)。また, dibucaine 添加群も, 同様に 10^{-5} M 以下の濃度では生存率に影響はみられなかったが, 5×10^{-5} M では対照群の約1/4に減少し, 10^{-4} M では4%しか生存していなかった。HPFC 抑制作用は高濃度においてのみ観察され, lidocaine では 10^{-4} M で56.0%, tetracaine では 10^{-4} M で3.2%, dibucaine では 5×10^{-5} M で control 群の3%まで減少した。

3. HA に及ぼす局所麻酔薬の影響

感作日より5日目に採血したマウスの抗 SRBC 血清は, HA assay において 2^5 倍希釈まで陽性を示した(n=36)。今回用いた procaine, lidocaine, mepivacaine, tetracaine, dibucaine はいずれも 1 mg/kg, 5 mg/kg の用量では抗 SRBC マウス血清の SRBC 凝集価に対して何ら影響を及ぼさなかった。

4. リンパ球膜流動性に及ぼす局所麻酔薬の影響

リンパ球細胞膜の流動性は, 流動性の逆数である order parameter で示した。対照群細胞の order parameter 値は, 0.500 ± 0.004 であった。order parameter は局所麻酔薬の添加後すみや

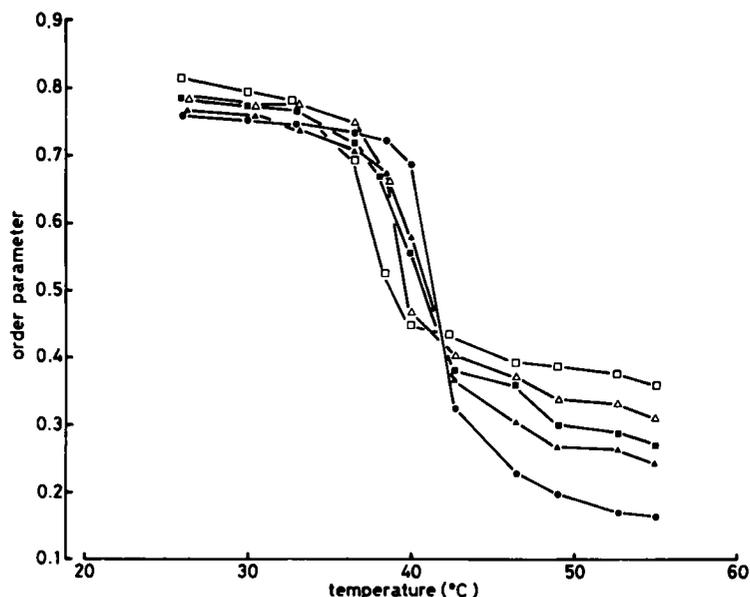


図4 dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) で作成した liposome の order parameter 温度依存性に及ぼす tetracaine の影響。tetracaine を種々な含量比で添加した場合、DPPC 液晶の order parameter は tetracaine 含量の増加に依存して増大した。liposome 中の tetracaine 含量比：●—● 0, ▲—▲ 0.01%, ■—■ 0.025%, △—△ 0.05%, □—□ 0.1%。

かに変化し、5分以内にはほぼ一定値を示した。tetracaine 及び mepivacaine 添加時の経時変化をそれぞれ図2、図3に示した。tetracaine の場合、0.01%の添加で order parameter は1分以内に0.575まで上昇し、その後ほぼ一定値を保った。order parameter 上昇効果は0.1%の添加時更に著明で、濃度依存的であった。同様の傾向は lidocaine, procaine の場合にもみられたが、同じ効果を得るのに lidocaine では約10倍の濃度を必要とした。また、procaine でも、軽度な order parameter の上昇がみられたが、差は有意ではなかった。一方、mepivacaine の場合には濃度依存的な order parameter の低下が観察され、0.5%で5分後には 0.470 ± 0.006 となった。なお、dibucaine はそれ自身が波長372 nm の励起により非常に強い蛍光(432 nm)を出すために order parameter は測定できなかった。

5. DPPC liposome の order parameter における温度依存性に及ぼす局所麻酔薬の影響
order parameter はリン脂質 (DPPC) の脂

脂酸側鎖の分子運動を表現する parameter でもあると考えられており、温度依存性が強く、リン脂質の gel 状態から液晶状態への相転移に伴い、その値が急激な変動を示すことが知られている²³⁾。図4、図5はそれぞれ tetracaine, mepivacaine を処理した DPPC liposome の order parameter の温度依存性を示している。DPPC 単独の場合(対照)、相転移温度以下の gel 状態では order parameter は非常に高く、0.7—0.8 の値を示したが、温度上昇とともに緩やかに低下した。相転移温度の付近(41°C)で order parameter は急激に低下し、43°C付近からは再び温度上昇に伴って徐々に低下した。一方、tetracaine 処理した liposome は、0.01% tetracaine の存在ですでに gel 状態での order parameter は対照に比較して低くなり、逆に液晶状態で order parameter は大きい値を示した。この効果は、tetracaine の濃度に明らかに依存した。また、gel 状態から液晶状態への相転移に伴い order parameter の変化も、より低温度から

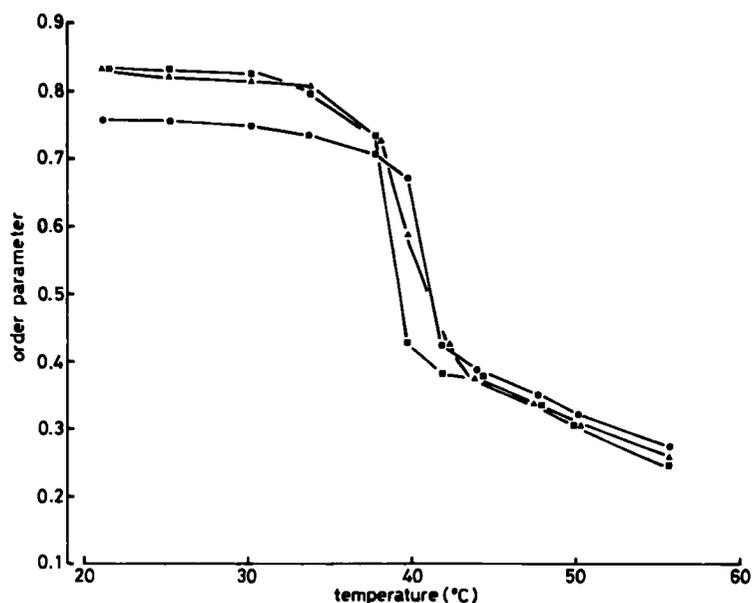


図5 dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) で作成した liposome の order parameter 温度依存性に及ぼす mepivacaine の影響. mepivacaine を種々な含量比で添加した場合, DPPC 液晶の order parameter は mepivacaine 含量の増加に依存して増大した. liposome 中の mepivacaine 含量比: ●—● 0, ▲—▲ 1%, ■—■ 2%.

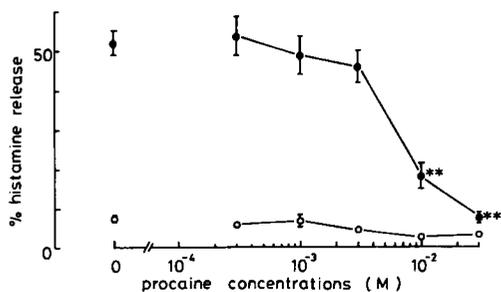


図6 compound 48/80 によるヒスタミン遊離に対する procaine の抑制効果について. ○—○ procaine 単独作用時のヒスタミン遊離率. ●—● procaine 前処置後 48/80 (0.5 μ g/ml) を添加した時のヒスタミン遊離率. **P < 0.01, n = 8

ゆるやかに減少した. lidocaine や procaine 処理した liposome でも同様の変化が観察されたが, 同じ order parameter 値の変動にはより高濃度を必要とした. mepivacaine は相転移温度を低下させる傾向を示したが, order parameter

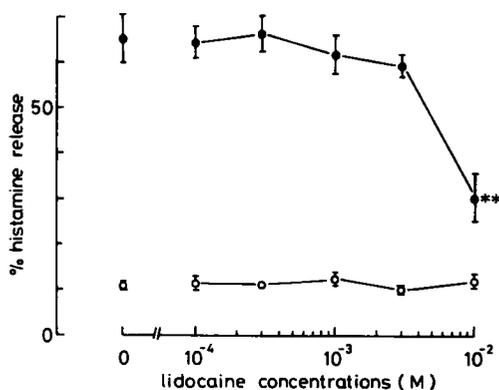


図7 compound 48/80 によるヒスタミン遊離に対する lidocaine の抑制効果について. ○—○ lidocaine 単独作用時のヒスタミン遊離率. ●—● lidocaine 前処置後 48/80 (0.5 μ g/ml) を添加した時のヒスタミン遊離率. **P < 0.01, n = 8

の変動に対しては tetracaine の場合と異なり, gel 状態での order parameter の上昇と液晶状態での低下という tetracaine とは正反対の効果

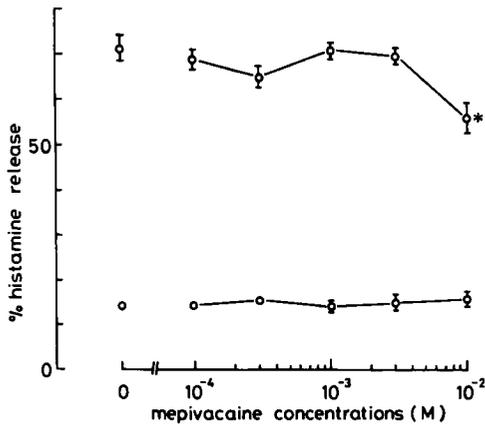


図8 compound 48/80 によるヒスタミン遊離に対する mepivacaine の抑制効果について。○—○ mepivacaine 単独作用時のヒスタミン遊離率。●—● mepivacaine 前処置後 48/80 (0.5 μg/ml) を添加した時のヒスタミン遊離率。
*p<0.05, n=8

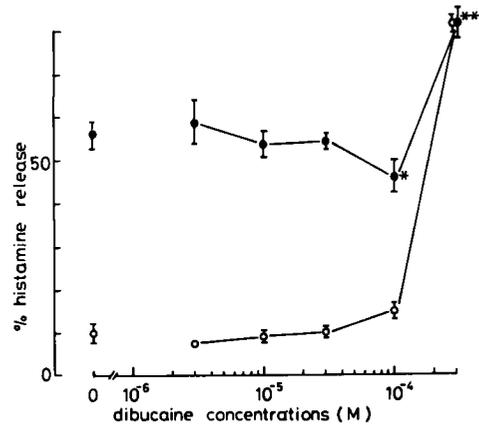


図10 compound 48/80 によるヒスタミン遊離に対する dibucaine の抑制効果について。○—○ dibucaine 単独作用時のヒスタミン遊離率。●—● dibucaine 前処置後 48/80 (0.5 μg/ml) を添加した時のヒスタミン遊離率。
**P<0.01, *P<0.05, n=8

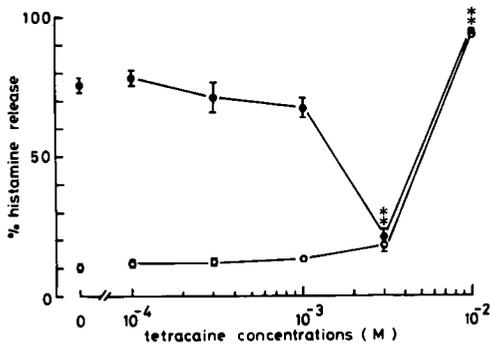


図9 compound 48/80 によるヒスタミン遊離に対する tetracaine の抑制効果について。○—○ tetracaine 単独作用時のヒスタミン遊離率。●—● tetracaine 前処置後 48/80 (0.5 μg/ml) を添加した時のヒスタミン遊離率。
**P<0.01, n=8

が観察された (図5)。

6. ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する局所麻酔薬の効果

I型アレルギー反応における重要な chemical mediator であるヒスタミンの遊離モデルとして、48/80によるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離実験がしばしば用いられている。本実験においても48/80によるラット単離肥満細胞から

のヒスタミン遊離に及ぼす局所麻酔薬の影響について検討した。

procaineは10⁻³M以上の濃度で抑制する傾向を示し、3×10⁻²Mではほぼ完全に48/80によるヒスタミン遊離を抑制した(図6)。lidocaineは10⁻³M以上の濃度でヒスタミン遊離を抑制する傾向があり、10⁻²Mでは有意にこれを抑制した(図7)。類いの効果はmepivacaineでも観察された(図8)。一方、tetracaineは3×10⁻⁴Mから10⁻³Mでは濃度依存的にヒスタミン遊離を抑制したが、3×10⁻³Mではtetracaine単独でヒスタミン遊離を惹起し、肥満細胞中に存在するヒスタミンの95%が遊離された(図9)。これと同様の傾向がdibucaineの場合にも観察され、10⁻⁴Mまではヒスタミン遊離を抑制する傾向を示したが、3×10⁻⁴M以上の濃度では単独でヒスタミン遊離を惹起した(図10)。

7. 肥満細胞内c-AMP量に及ぼす局所麻酔薬の影響

正常肥満細胞のc-AMP含量は0.68±0.07 pmole/10⁶ cellsであった。lidocaine, procaine, mepivacaineでは、10⁻²Mまで肥満細胞内c-AMP量に対して有意な変化を及ぼさなかった。tetracaineは10⁻³Mまではほとんどc-AMP量

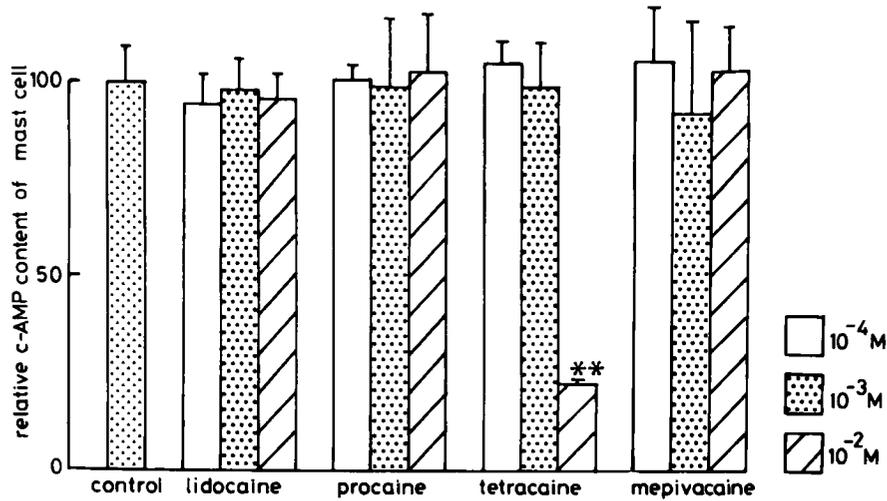


図11 ラット腹腔肥満細胞のc-AMP含量

に影響しなかったが、 10^{-2} Mの tetracaine は著明に細胞内 c-AMP 量を減少させた (図11)。

8. 局所麻酔薬の CMC の測定

ANS の蛍光測定より求めた局所麻酔薬の CMC は procaine, lidocaine, mepivacaine では 5×10^{-2} M 以上となったが, tetracaine では 2×10^{-3} M となった。なお, dibucaine はそれ自身が蛍光を持つため、この測定は不可能であった。

考 察

本研究において明らかにされた如く、検討された局所麻酔薬はすべてマウスにおける抗 SRBC 血清の凝集抗体の力価に対しては、何ら影響を及ぼさなかった。赤血球凝集反応は、抗血清中の IgM 抗体が主として関与する免疫反応であり、IgM は抗原感作の初期に出現するが、血中からの消失もまた速やかにおこることが知られている。HA の実験は、血清の倍数希釈系列を作ることにより行われるため、HA titer の変化は凝集力価が 2 倍以上変動しなければ認識しないことになる。従って、HA による抗体価の測定感度自身が高くて、抗体価の測定が不連続的に行われること、および結果の判定も all or none に行われるため、grade な変化は検出できない。このことが、RFC や HPFC で検出された薬物の抑制効果を明らかにし得なかった主な原因と考えられる。

局所麻酔薬は SRBC に感作されたマウス脾臓細胞の Rosette 形成に対して抑制的に作用した。Rosette test は、粒子状抗原が抗体産生細胞表面に附着して Rosette が形成される反応である。RFC の細胞膜表面には抗体ないし抗体様構造の抗原認識 receptor が存在し、その receptor を介して SRBC との cell binding が行われる。RFC は抗原特異的に反応するが、抗原認識を行う細胞は Rosette formation に関与すると考えられ、B cell, pre B cell, helper T cell が RFC として認められる。Rosette 形成には microfilament が関与することが cytochalasin B を用いた実験より明らかとなっている^{30,31)}。一方、局所麻酔薬は microfilament 及び microtubule 系に作用してこの rearrangement を抑制する事が知られている^{10,32)}。従って、局所麻酔薬による RFC の抑制効果には microfilament に対する抑制作用も関与していたものと理解する事ができる。また、本実験で局所麻酔薬がリンパ球の膜流動性を低下させることが明らかとなった。この事も Rosette 形成に対して抑制的に作用した機序の 1 つになりうるものと考えられる。

HPFC 反応は抗体産生細胞周辺に存在する抗原である SRBC が、抗体産生細胞より産生される液性抗体と培地中の補体により溶血され、その結果抗体産生細胞の周辺に hemolytic plaque が形成される現象である。本研究で用いた assay

系では、IgM 及び IgG の抗体産生を観察している。局所麻酔薬を動物に感作日より連続投与した 5 日目における HPFC 数は、対照群より有意な減少を示した。この所見は、局所麻酔薬による抗体産生能の低下を意味する。HA では検出されなかった程度の抗体産生の低下が HPFC では認められたと解釈できる。局所麻酔薬は *in vitro* 実験系で、リンパ球の blast transformation 抑制^{33,34)}、核酸取り込みや増殖抑制^{16,17)}などの作用を持つことが知られている。SRBC 感作後の局所麻酔薬の投与は、抗 SRBC 抗体産生細胞への細胞の分化と増殖に抑制的に作用したものと考える事ができる。前述の RFC の抑制にもこのような機構が原因の一つとして想定できる。しかし、このようなリンパ球の分化増殖抑制機構に対する抑制作用の他に、細胞膜脂質二重層の流動性低下も HPFC の減少に寄与しているものと考えられる。

in vitro の系で局所麻酔薬の HPFC に及ぼす直接作用を調べた実験でも、局所麻酔薬は抑制的に作用する事が明らかとなった。この場合、局所麻酔薬は当然、感作脾細胞の細胞膜の order parameter を上昇させ、膜流動性を低下させる効果、即ち膜安定化効果を発揮したものと考えられる。従って、抗体産生細胞からの抗体の放出に対しても抑制的に作用したものと解釈できる。

細胞培養系で感作と同時に局所麻酔薬を添加して脾細胞を培養した場合、HPFC は低濃度の局所麻酔薬により増加し、高濃度で減少する傾向を示した。低濃度の局所麻酔薬存在下では T cell の感受性が上昇し、capping は阻害されるものの、むしろ patching は促進されると報告されている³⁵⁾。従って、低濃度の局所麻酔薬はこの系においては T cell、特に helper T cell の感受性を上昇させて、B cell からの抗体産生に対して促進的に作用したと考えることができる。一方、高濃度の局所麻酔薬共存下では、HPFC は抑制されたが、これは *in vivo* でみられた場合と同様に、局所麻酔薬が細胞膜リン脂質二重層の流動性を低下させて、細胞の反応性を低下させたことによるものと考えられる。*in vivo* 実験系では低用量時の HPFC 促進効果は全く観察

されなかった。これは、低用量の局所麻酔薬は *in vivo* では速やかに代謝分解を受けてしまい、脾細胞に作用を及ぼすに至らなかったためであるものと推定される。

ただし、mepivacaine のみは HPFC assay 系では全て促進的な効果を示した。mepivacaine はリンパ球の膜流動性を上昇させており、この点で他の局所麻酔薬と膜作用を異にしている。T cell に対する感受性の上昇作用は mepivacaine もあるものと考えられるが、それを抑制してしまうだけの膜安定化効果がないために、むしろ促進的な作用が強調され、HPFC 上昇という結果を得たものと考えられる。

一般に局所麻酔薬は細胞膜脂質二重層に作用し、これを安定化すると言われている³¹⁾。その作用は膜拡大を惹起し、膜流動性を上昇させるものとされてきたが³⁶⁾、本研究で明らかとなったように、膜流動性の上昇は gel 状態の膜に起こり、細胞膜や相転移温度以上の温度における DPPC liposome のような液晶状態の膜に対しては、膜流動性を低下させた。これまで指摘されてきた膜流動性の上昇という現象は、DPPC のような直鎖飽和脂肪酸側鎖を持った単一の分子種から成る liposome の相転移温度を局所麻酔薬が低下させることや、gel 状態の流動性を低下させるものとして理解されてきた^{36,37)}。しかし、相転移温度の低下がただちに膜流動性の上昇であると理解できず、むしろ、液晶状態の膜の流動性を低下させると理解した方が自然である。同様の作用は肥満細胞からのヒスタミン遊離を膜安定化効果によって抑制する抗アレルギー薬について報告されている^{27,38)}。

このような観点から、肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する局所麻酔薬の作用についても検討を行ったが、図 11 に示した如く、細胞内 c-AMP 含量に何ら変化を与えなかったにもかかわらずヒスタミン遊離を抑制した。局所麻酔薬は、細胞膜表面の Ca^{2+} 結合部位に Ca^{2+} と置換して結合するという機構も知られており^{7,8)}、これが細胞内 Ca^{2+} 流入の抑制につながることも考えられる。しかし、この機構も結果的には膜の安定化を惹起するので、局所麻酔薬のヒスタミン遊離の抑制には、リン脂質二重層に対する安

定化機構が作働している事は間違いないものと考えられる。

なお、高濃度の tetracaine を作用させた際に、細胞内 c-AMP 量の減少と、tetracaine 自身によるヒスタミン遊離がみられたが、これらの作用を示す濃度は tetracaine の CMC を超えた部分である事が判明した。従って、高濃度の tetracaine は細胞膜内でミセルを形成し、その結果 detergent 効果が発現するものと思われる。

局所麻酔薬の免疫担当細胞に対する抑制作用は、局所麻酔薬を大量に用いるような処置を行う際には、患者の免疫機能に及ぼす影響についても考慮する必要がある事を示唆している。生体内での局所麻酔薬の代謝分解は比較的速やかではあるが³⁹⁾、類似した膜安定化効果を有する吸入麻酔薬においても、抗体産生能低下の報告があり^{40,41)}、局所麻酔薬においても同様な現象が発現する可能性についての配慮は必要であると思われる。

結 語

局所麻酔薬の免疫反応に対する作用を検討するために、in vivo 及び in vitro の系でマウス脾臓細胞に対する影響を観察した。

1) in vivo の系において局所麻酔薬は hemagglutination は抑制しなかったが、Rosette

forming cells (RFC) 及び hemolytic plaque forming cells (HPFC) に対し抑制的な効果を発揮した。

2) in vitro の系で局所麻酔薬を直接作用させた場合も、同様に HPFC を抑制した。

3) 局所麻酔薬存在下で SRBC 感作を行った脾細胞の培養実験では、低濃度の局所麻酔薬は HPFC を促進し、高濃度では抑制した。

4) これらの効果を解析する目的で、蛍光偏光解消法による膜流動性の測定を行ったところ、局所麻酔薬はリンパ球の細胞膜や、液晶状態のモデル膜の膜流動性を低下させ、膜安定化効果を示すことが判明した。

5) 類似の膜作用は、ラット腹腔より単離した肥満細胞の場合にも観察され、局所麻酔薬は compound 48/80 によるヒスタミン遊離に対しても抑制的に作用した。

謝 辞

本稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った岡山大学歯学部西嶋克己教授、ならびに薬学部田坂賢二教授に深謝致します。

本論文の要旨は、昭和56年5月10日第10回日本口腔外科学会中国、四国地方会(岡山)、昭和58年4月5日、日本薬学会第103年会(東京)、昭和58年9月30日第28回日本口腔外科学会総会(東京)、において発表した。

文 献

1. Seeman, P.: The membrane action of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* **24**, 583—655, 1972.
2. Seeman, P.: Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1753—1776, 1966.
3. Meyer, H.: Zur Theorie der Alkoholnarkose. Erste Mittheilung. Welche Eigenschaft der Anästhetica bedingt ihre narkotische Wirkung? *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **42**, 109—118, 1899.
4. Overton, E.: *Studien über Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie.* Verlag von Gustav Fischer. Jena, 1901.
5. Mullins, L.J.: Some physical mechanisms in narcosis. *Chem. Rev.* **54**, 289—323, 1954.
6. Miller, K.W., Paton, W.D.M., Smith, R.A. and Smith, E.B.: The pressure reversal of general anesthesia and the critical volume hypothesis. *Mol. Pharmacol.* **9**, 131—143, 1973.
7. Koblin, D.D., Pace, W.D. and Wang, H.H.: The penetration of local anesthetics into the red blood cell membrane as studied by fluorescence quenching. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 176—182, 1975.

8. Blaustein, M.P. and Goldman, D.E.: Action of anionic and cationic nerve-blocking agents: Experiment and interpretations. *Science* **153**, 429—432, 1966.
9. Eyring, H., Woodburry, J.W., D'Arrigo, J.S.: A molecular mechanism of general anesthesia. *Anesthesiology* **38**, 415—424, 1973.
10. Genna, J.-M., Coffe, G. and Pudles, J.: Effects of tertiary amine local anesthetics on the assembly and disassembly of brain microtubules in vitro. *Eur. J. Biochem.* **110**, 457—464, 1980.
11. Ritchie, J.M. and Greene, N.M.: Local anesthetics. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 6th ed., ed. A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman MacMillan Publishing, New York, pp.300—320, 1980.
12. Banerjee, D. and Redman, C.M.: Effect of local anesthetics on plasma protein secretion by rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **500**, 49—60, 1977.
13. Nash-Adler, P., Louis, C.F., Fudyma, G. and Katz, A.M.: The modification of unidirectional calcium fluxes by dibucaine in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit fast skeletal muscle. *Mol. Pharmacol.* **17**, 61—65, 1980.
14. Eichhorn, J.H. and Peterkofsky, B.: Local anesthetics-induced inhibition of collagen secretion in cultured cells under conditions where microtubules are not depolymerized by these agents. *J. Cell Biol.* **81**, 26—42, 1979.
15. Montecucco, C., Ballardini, S., Zaccolin, G.P. and Pozzan, T.: Effect of local anesthetics on lymphocyte capping and energy metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 2989—2992, 1981.
16. Yau, T. M., Kim, S.C. and Crissman, H.A.: Selection and characterization of a variant of murin L5178Y lymphoma resistant to local anesthetics. *J. Cell. Physiol.* **99**, 239—246, 1979.
17. Ramus, G.V., Cesano, L. and Barbalonga, A.: Different concentrations of local anesthetics have different modes of action on human lymphocytes. *Agents Actions* **13**, 333—341, 1983.
18. Kawakami, M., Kitamura, K., Mikami, H. and Mitsuhashi, S.: Transfer agent of immunity. II. Conversion of nonimmune spleen cells into antibody-forming cells by transfer agent in ribonucleic acid fraction of immunized mice. *J. Microbiol. Jpn.* **13**, 9—18, 1969.
19. Jerne, N.K. and Nordin, A.A.: Plaque formation in agar by single antibody-producing cell. *Science* **140**, 40, 1963.
20. 木村義民: Microtitration と hemagglutination 「免疫実験操作法 A」日本免疫学会編, 発行 pp.294—297, 1975.
21. 辻 公美: 比重遠沈法によるリンパ球の分離, Conray 400-Ficoll 法, 「免疫実験操作法 A」日本免疫学会編, 発行 pp.443—449, 1975.
22. Shinitzky, M. and Inber, M.: Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. *J. Mol. Biol.* **85**, 603—615, 1974.
23. Jähnig, F.: Structural order of lipids and proteins in membranes: Evaluation of fluorescence anisotropy data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6361—6365, 1979.
24. Lakowicz, J.R., Prendergast, F.G. and Hogen, D.: Differential polarized phase fluometric investigations of diphenylhexatriene in lipid bilayers. Quantitation of hindered depolarizing rotations. *Biochemistry* **18**, 508—519, 1979.
25. van Blitterswijk, W.J., van Hoeven, R.P. and van der Meer, B.W.: Structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim. Biophys. Acta* **644**, 323—332, 1981.

26. Mio, M., Akagi, M., Sakuma, Y. and Tasaka, K.: Antigen-antibody reaction on the black lipid membrane and histamine release from antigen-coated liposome in immune response. In *Advances in Histamine Research* ed. B. Uvnäs and K. Tasaka, Pergamon Press, Oxford, pp. 7—23, 1982.
27. Akagi, M., Mio, M. and Tasaka, K.: Histamine release inhibition and prevention of the decrease in membrane fluidity induced by certain anti-allergic drugs. *Agents Actions* **12**, 149—156, 1983.
28. Németh, A. and Rohlich, P.: Rapid separation of rat peritoneal mast cells with percoll. *Eur. J. Cell Biol.* **20**, 272—275, 1980.
29. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohen Jr., V.H.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182—186, 1959.
30. Cohnen, G., Fischer, K. and Brittinger, G.: Human T lymphocyte rosette formation. Inhibition by cytochalasin B. *Immunology* **29**, 337—341, 1975.
31. Green, W.C., Parker, C.M. and Parker, C.H.W.: Cytochalasin sensitive structures and lymphocyte activation. *Exp. Cell Res.* **103**, 109—117, 1976.
32. Woda, B.A., Yguerabide, J. and Feldman, J.D.: The effect of local anesthetics on the lateral mobility of lymphocyte membrane proteins. *Exp. Cell Res.* **126**, 327—331, 1980.
33. Dráberová, L., Dráber, P. and Benes, L.: The mechanisms of the inhibitory effect of local anaesthetics on lymphocyte blast transformation in vitro. *Folia Biol. (Praha)* **25**, 409—410, 1979.
34. Ferguson, R.M., Schmidtke, J.R. and Simmons, R.L.: Inhibition of mitogen-induced lymphocyte transformation by local anesthetics. *J. Immunol.* **116**, 627—634, 1976.
35. Poste, G., Papahadjopoulos, D., Jacobson, K. and Vail, W.J.: Effects of local anesthetics on membrane properties. II. Enhancement of the susceptibility of mammalian cells to agglutination by plant lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 520—539, 1975.
36. Ueda, I., Tashiro, C. and Arakawa, K.: Depression of phase-transition temperature in a model cell membrane by local anesthetics. *Anesthesiology* **46**, 327—332, 1977.
37. Yasuhara, H., Sakamoto, K. and Ueda, I.: Dissociation between local anesthetic and membrane-stabilizing actions in antiarrhythmic beta-adrenergic blockers and local anesthetics. *Anesth. Analg.* **60**, 897—900, 1981.
38. Akagi, M., Mio, M., Tasaka, K. and Kuniwa, S.: Mechanism of histamine release inhibition induced by azelastine. *Pharmacometrics* **26**, 191—198, 1983.
39. Covino, B.G. and Giddon, D.B.: Pharmacology of local anesthetic agents. *J. Dent. Res.* **60**, 1454—1459, 1981.
40. Vose, B.M. and Moudgil, G.C.: Post-operative depression of antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity following minor surgery and anaesthesia. *Immunology* **30**, 123—128, 1976.
41. Vose, B.M. and Kimber, I.: The effects of halothane anesthesia on antibody-dependent cellular cytotoxicity in rats. *Immunology* **32**, 609—615, 1977.

Influence of local anesthetics on immune responses

Shigeki KINIWA

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

Okayama University Dental School

(Director : Prof. K. Nishijima)

The influence of certain local anesthetics (LA) on immune responses was investigated in *in vivo* and *in vitro* systems. Since the stabilization of the cell membrane may play some role in the local anesthetic action of LA, the effect of LA on the cell membrane was also studied by measuring the fluidity of the membranes of lymphocytes and liposomes by steady-state fluorescence anisotropy.

Male babl/c mice were immunized with sheep red blood cells (SRBC), and LA was injected subcutaneously once a day for 5 consecutive days. Thereafter, mice were killed by cervical dislocation, and spleen cells were isolated. LA significantly inhibited rosette forming cells and hemolytic plaque forming cells (HPFC). When sensitized-mouse spleen cells were treated with LA *in vitro*, significant inhibition of HPFC was observed. In another experiment, non-sensitized spleen cells were isolated from the mouse spleen and immunized with SRBC in the presence or absence of LA in a tissue culture plate for 4 days. Higher concentrations of LA inhibited the production of HPFC, but lower concentrations of LA increased the number of HPFC. LA decreased the fluidity of the plasma membrane of purified mice lymphocytes and the liquid crystalline state of liposomes made with dipalmitoylphosphatidylcholine. LA suppressed the histamine release from isolated rat mast cells due to compound 48/80 without affecting the content of c-AMP in mast cells. Inhibitory effects of LA on the responses elicited in lymphocytes and mast cells were considered to be due to the membrane stabilizing effect.