白血球による血管弛緩に及ぼす静脈麻酔薬ケタミン及びサイオペンタールの影響

新潟大学医学部麻酔学教室（主任：下地恒毅）
木 下 秀 則

The Effects of Ketamine and Thiopental on Vasorelaxation Induced by Polymorphonuclear Leukocytes

Hidenori KINOSHITA

Department of Anesthesiology, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Koki SHIMOJI)

The effects of the commonly-used intravenous anesthetics, ketamine and thiopental (10^{-5}, 3×10^{-5}, and 10^{-4} M), on vasorelaxation induced by polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) were investigated using the porcine coronary artery. Ketamine, 10^{-4} M, enhanced the PMNLs-induced vasorelaxation, whereas thiopental had no effect. Ketamine in concentrations over 10^{-4} M increased the appearance of a cell adhesion molecule, L-selectin (CD62L) on PMNLs measured by flow cytometer. Concanavalin A (Con－A) and lens culinaris agglutinin (LCA), which are kinds of lectin, caused endothelium-dependent vasorelaxation. The PMNLs-induced vasorelaxation was abolished in KCl (25 mM)－contracted and ouabain (10^{-5} M)－treated preparations, and was attenuated by 10^{-2} M tetraethylammonium (TEA), 10^{-2} M tetrabutylammonium (TBA), and 10^{-7} M charybdotoxin (ChTx), but not by 10^{-3} M 4-aminopyridine and 10^{-6} M glibenclamide. The relaxation by Con－A and LCA was also attenuated by TEA and TBA. The findings suggest that PMNLs-induced vasorelaxation is at least in part produced through the calcium dependent potassium channel. However, the facilitation of Na^+ pump cannot be excluded in the mechanism of vasodilation by PMNLs. Oxygen free radical scavengers, superoxide dismutase (150 U/ml), catalase (1200 U/ml), and mannitol (80 mM) had no influence on the PMNLs-induced vasorelaxation. These findings suggest that lectins induce vasorelaxation partly through calcium dependent potassium channel, and also that ketamine-induced enhancement of the relaxation by PMNLs is produced by increased appearance of L－selectin.

Key words: polymorphonuclear leukocyte (PMNL), endothelium, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), L－selectin
多核白血球，血管内皮，内皮由来過分極因子，L－セレクチン

Reprint requests to: Hidenori KINOSHITA,
Department of Anesthesiology
Niigata University School of Medicine
Niigata city, 951-8510 JAPAN.

別刷請求先： 〒951-8510 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部麻酔学教室 木下秀則

緒　　言

従来，臓器循環の調節は交感神経などの神経性因子，pHや二酸化炭素などの代謝性因子，血中カテコラミンなどの液性因子，血管内皮細胞から放出される収縮または拡張因子等[1]によって制御されていると考えられてきた．しかし，近年さらに血液細胞と血管内皮細胞との相互作用が血管トーヌスに影響することが明らかになってきた．血液細胞の中でも多核白血球はそれ自体プロスタグランジン，一酸化窒素，エンドセリン－1などを産生し，血管平滑筋のトーヌスに影響を与え，また，多核白血球は接着分子を介して血管内皮に接着することが知られており[2)3)4)]，多核白血球が内皮細胞に作用することによって血管張力に影響することも報告されている[5)]．われわれは，以前，白血球が血管内皮に作用し，内皮由来過分極因子を介して血管を弛緩させることを示唆したがその機序については解明されていない[6)]．

一方麻酔薬はこれまで白血球走化性や活性酸素産生に対し抑制的に作用するといわれているが[7) 8)]，白血球の内皮依存性血管弛緩作用に対しどのように影響するかの報告はない．そこで白血球による血管弛緩機序における接着分子，K^+チャネル，活性酸素の関与を検索し，内皮依存性弛緩作用において静脈麻酔薬がどのように影響するかを検討した．

方　　法

多核白血球の分離

ヒト末梢静脈血を採取し，ヘパリン（10単位/ml）及び1％デキストラン（4分の3容）を加えた．60分間静置後，上清7 ml を Ficol－Conray 溶液に重層し，30分間 300 g で遠心した．沈査を蒸留水に20秒間浮遊し溶血させた後，同量の1.8% NaCl を加え等張に戻した．その後多核白血球はリン酸緩衝液中に浮遊させ10^8/ml となるように濃度調節し，投与直前まで4℃で保存した．白血球はトリパンブルー排除試験にて生存率95％以上を確認した．

輪状血管標本の作製

ブタ心臓から冠状動脈左前下行枝分枝を摘出し，輪状血管標本（直径1.0－1.3mm）を作製した．クレブス液で満たしたマグヌス管において血管内腔に2本の鋼線を通し一端を固定，他端をトランジューサー（日本光電社製　TB －612T 型）に接続して張力を測定した．クレブス液は95％酸素＋5％二酸化炭素で飽和し，pH 7.4，温度37℃，静止時張力を1.5 g に保った．静止時張力が安定した後，KCl 50mM を投与し張力を測定した．その後 KCl 25 mM 下でブラジキニン10^{-7}M を投与し，弛緩反応の有無により機能的な内皮細胞の存在を確認した．数回洗浄し静止時張力が安定した後，エンドセリン－1を10^{-9}M 投与し，KCl 50mM 収縮の約50％の収縮を得た．張力が安定するまで2時間静置し，多核白血球を10^6/ml になるように浮遊させ弛緩効果の時間経過をみた．

実験 1.　多核白血球による冠血管弛緩と静脈麻酔薬の影響

静脈麻酔薬サイオペンタール（10^{-5}，3×10^{-5}，10^{-4}M），ケタミン（10^{-5}，3×10^{-5}，10^{-4}M）を，エンドセリン－1投与30分前に添加した．多核白血球による弛緩度はエンドセリン－1による収縮を100％とし，これに対する相対値で示した．

実験 2.　白血球接着分子CD62L発現に及ぼす静脈麻酔薬の影響

フローサイトメーター（ベクトン・ディッキンソン社 FACS Calibur）を用いて静脈麻酔薬がL－セレクチン（CD 62L）の発現に与える影響を検討した．ヒト静脈血を採取しヘパリン（10単位/ml）を添加した．最初に未処置血液中の白血球 CD 62L の発現が時間経過（採血直後，30分，60分）でどのように変化するかを検討した．次にケタミン，サイオペンタールの白血球 CD 62L の発現に及ぼす影響をみた．実験群は，未処置群，ケタミン（10^{-5}，10^{-4}，10^{-3}M）群またはチオペンタール（10^{-5}，10^{-4}，10^{-3}M）群に分け，37℃，5.6％二酸化炭素＋空気で満たした培養器中に60分間静置後，L－セレクチンの蛍光標識モノクローナル抗体（Fluorescein isothiocyanate : FITC）で30分間反応させた後，FACS lysing solution 及び PBS で溶血・洗浄し，フローサイトメーターでL－セレクチンの発現を測定した．L－セレクチンの発現は FITC の平均発光強度を波長530 nm測定した．

実験 3.　レクチン様物質（タチナタマメレクチン，レンズマメレクチン）の影響

実験1のように内皮の存在を確認した後エンドセリン－1で収縮させ，内皮依存性弛緩作用を有するとされるレクチン様物質であるレンズマメレクチン，タチナタマメレクチンを累積的（10^{-8}～10^{-5}M）に投与し，これらによる弛緩反応をみた．またこれらの反応がテトラエチルアンモニウム10^{-2}M（カルシウム依存性 K^+チャネル阻害薬），テトラブチルアンモニウム10^{-2}M（カルシウム依存性 K^+チャネル阻害薬）によりどの様に影響

されるかも検討した．

実験4．K^+チャネル及びNa^+-K^+ポンプの関与

実験1と同様にエンドセリン－1を10^{-9}M投与し，KCl 50mM 収縮の約50%の収縮を得た後，多核白血球を10^6/ml になるように浮遊させ弛緩効果の時間経過をみた．

4－アミノピリジン10^{-3}M（電位依存性K^+チャネル阻害薬），グリベンクラミド10^{-6}M（ATP 感受性K^+チャネル阻害薬），シャリブドトキシン10^{-7}M（カルシウム依存性 K^+チャネル阻害薬），テトラエチルアンモニウム10^{-2}M，テトラブチルアンモニウム10^{-2}M，ウアバイン10^{-5}M（Na^+-K^+ ATPase 阻害薬）をそれぞれエンドセリン－1投与30分前に加え，上記阻害薬の多核白血球による弛緩反応に及ぼす影響を検討した．またエンドセリン－1収縮の代わりに KCl 25 mM で収縮を得，白血球10^6/ml の影響をみた．多核白血球による弛緩度はエンドセリン－1もしくは KCl 25 mM による収縮を100 %とし，これに対する相対値で示した．

実験5．活性酸素の関与

フリーラジカルスカベンジャーであるスーパーオキサイドジスムターゼ（150単位/ml），カタラーゼ（1200単位/ml），マンニトール（80 mM）をそれぞれエンドセリン－1投与30分前に加え，多核白血球による弛緩反応に及ぼす影響を検討した．

統　　計

結果は平均±標準誤差で表した．実験1，3，4，5において群間の比較は二元配置分散分析により行った．二元配置分散分析にて群間に有意差がみられた時，各時間における群間の弛緩度の比較及び実験2における群間の比較は一元配置分散分析により行い，多重比較は最小有意差検定法によった．また危険率5％未満をもって有意とした．

結　　果

1）内皮依存性弛緩作用における静脈麻酔薬の影響

いずれの静脈麻酔薬も静止時張力に影響しなかった．チオペンタールはいずれの濃度においても白血球による血管弛緩度に影響しなかった．ケタミンは10^{-4}Mの濃度で有意に弛緩度を増強した（図 1）．

2）多核白血球表面の接着分子発現における静脈麻酔薬の影響

平均発光強度でみた白血球L-セレクチンの発現は採血直後，30分，60分で有意な変化はみられなかった（図2A）．チオペンタールはL-セレクチンの発現に影響しな

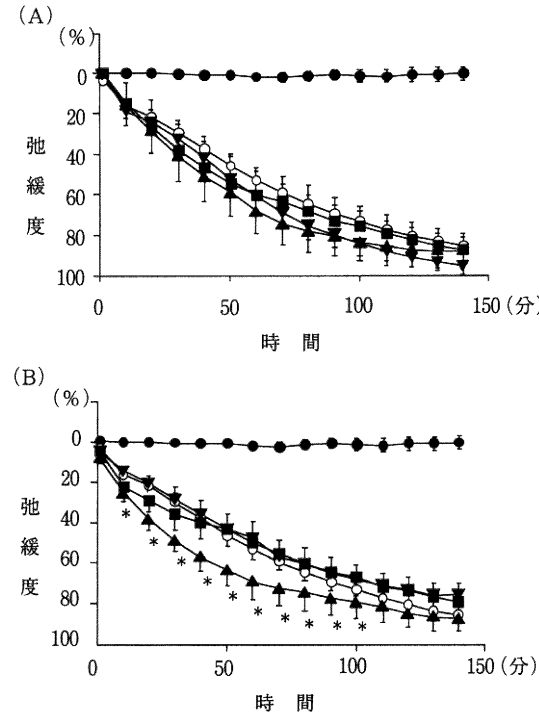

図1　内皮依存性弛緩作用における静脈麻酔薬の影響

(A)　チオペンタール群
- ●　エンドセリン－1のみ（n＝8）
- ○　多核白血球10^6/ml（n=24）
- ▼　チオペンタール10^{-5}mol/L ＋多核白血球10^6/ml（n＝6）
- ■　チオペンタール3×10^{-5}mol/L ＋多核白血球10^6/ml（n＝6）
- ▲　チオペンタール10^{-4}mol/L ＋多核白血球10^6/ml（n＝6）

(B)　ケタミン群
- ●　エンドセリン-1のみ（n＝8）
- ○　多核白血球10^6/ml（n=24）
- ▼　ケタミン10^{-5}mol/L ＋多核白血球10^6/ml（n=12）
- ■　ケタミン3×10^{-5}mol/L ＋多核白血球10^6/ml（n=12）
- ▲　ケタミン10^{-4}mol/L ＋多核白血球10^6/ml（n=12）

＊$P<0.05$　多核白血球群に対して，ケタミン10^{-4}mol/L群は多核白血球のみの群に対して有意に弛緩度が大きかった．

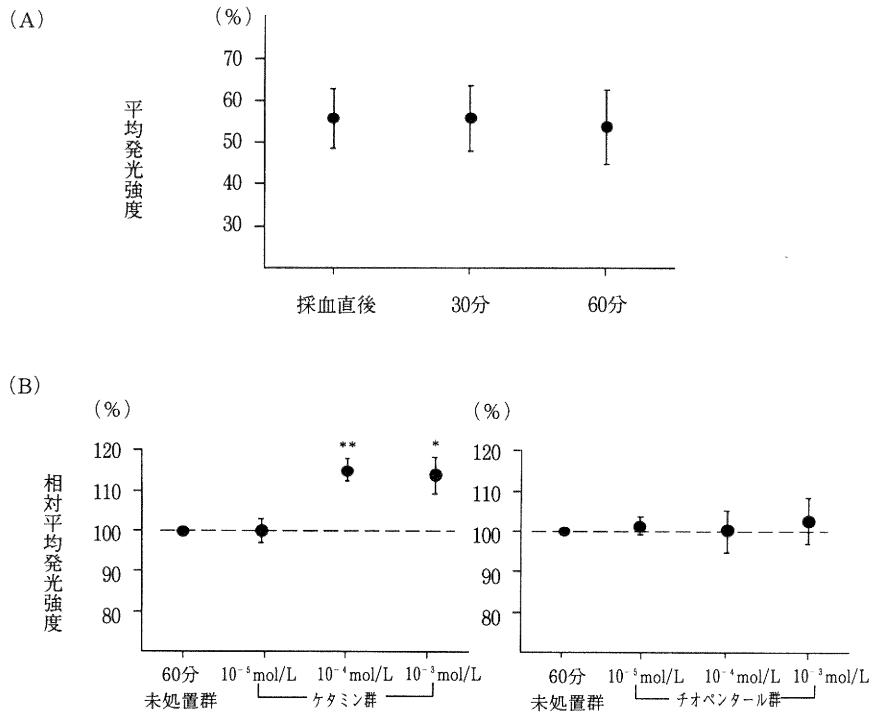

図2　L－セレクチン（CD62L）発現に及ぼす静脈麻酔薬の影響
（A）白血球L-セレクチンの発現は，採血直後，30分，60分で有意な変化はみられなかった．
（B）未処置白血球を5.6%炭酸ガス＋空気飽和培養器中に60分間静置後のL-セレクチンの発現を100%とし，ケタミン，チオペンタール60分間処置の影響を相対値で表した．

かった．ケタミン10^{-4}及び10^{-3}MはL-セレクチンの発現を有意に増強した（図 **2B**）．

3）レンズマメレクチン，タチナタマメレクチンの血管弛緩作用

レンズマメレクチン，タチナタマメレクチンは内皮依存性に血管を弛緩した（図 3）．またタチナタマメレクチンによる弛緩作用はテトラエチルアンモニウム，テトラブチルアンモニウム前処置により有意に抑制された．

4）内皮依存性弛緩作用における K^+チャネル及びNa^+－K^+ポンプの関与

エンドセリン－1による収縮は，140分間の観察中一定に保持された．白血球10^6/ml 投与により血管は漸次弛緩した．電位依存性 K^+チャネル阻害薬の4－アミノピリジン，及び ATP 感受性 K^+チャネル阻害薬であるグリベンクラミドは多核白血球による弛緩作用を抑制しなかった．カルシウム依存性 K^+チャネルの阻害薬であるシャリブドトキシン，テトラエチルアンモニウム，テトラブチルアンモニウムはいずれも多核白血球による弛緩作用を有意に（$P<0.05$）抑制した（図 4）．また KCl で収縮させた時及びウアバインで前処置した場合，多核白血球による弛緩作用は全くみられなかった．

5）内皮依存性弛緩作用における活性酸素の関与

スーパーオキサイドジスムターゼ，カタラーゼ及びマンニトールはいずれも白血球による弛緩に影響しなかった．

考　　察

本研究から多核白血球による内皮依存性の血管弛緩作用は，一部カルシウム依存性 K^+チャネルを介することが示唆された．またこの弛緩作用はケタミンによって増強されることがわかった．

前研究から白血球による血管弛緩作用は内皮除去血管

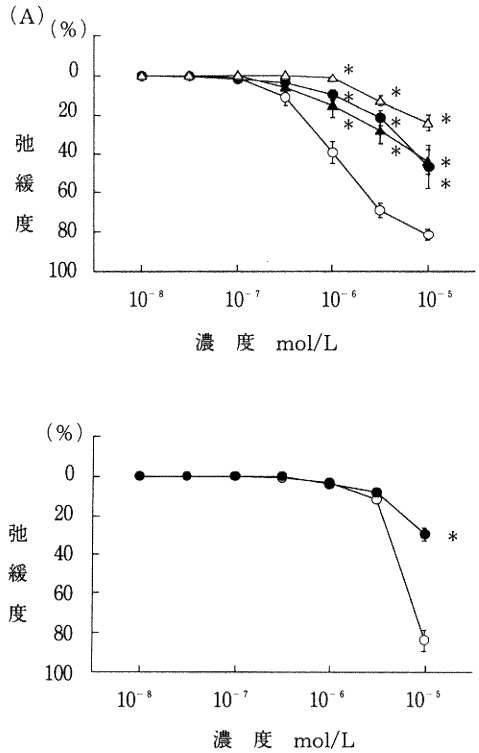

図3　タチナタマメレクチン，レンズマメレクチンの内皮依存性弛緩作用

(A)　タチナタマメレクチン群

—●—　内皮（＋）（n＝8）

—○—　内皮（－）（n＝4）

—▲—　テトラエチルアンモニウム10^{-2}mol/L前処置（n＝4）

—△—　テトラブチルアンモニウム10^{-2}mol/L前処置（n＝4）

＊P<0.05　内皮（＋）群に対して．テトラエチルアンモニウム，テトラエブチルアンモニウムで前処置した群及び内皮を除去した群はいずれも内皮を温存した群に対して有意に弛緩度が小さかった．

(B)　レンズマメレクチン群

—●—　内皮（＋）（n＝4）

—○—　内皮（－）（n＝4）

＊P<0.05　内皮（＋）群に対して．内皮を除去した群は内皮を温存した群に対して有意に弛緩度が小さかった．

では弛緩度が小さいことならびに一部の血管では白血球による弛緩が完全に抑制されたことから内皮依存性と考えられる[6]．またN$^{\omega}$－ニトロ－L－アルギニン及びインドメタシンによって白血球による弛緩が全く影響され

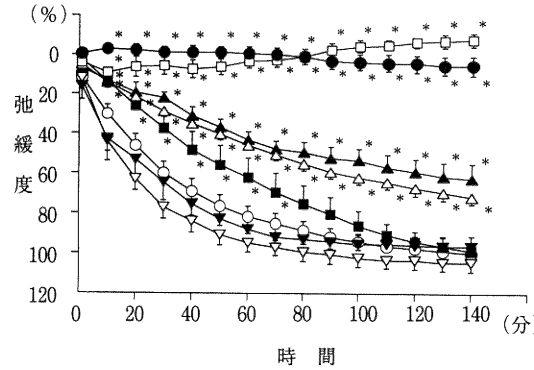

図4　白血球内皮依存性弛緩作用における種々のカリウムチャネルブロッカーの影響

—○—　多核白血球10^6/ml（n＝23）

—▲—　テトラエチルアンモニウム10^{-2}mol/L＋多核白血球10^6/ml（n＝7）

—△—　テトラブチルアンモニウム10^{-2}mol/L＋多核白血球10^6/ml（n＝8）

—■—　シャリブドトキシン10^{-7}mol/L＋多核白血球10^6/ml（n＝11）

—▼—　グリベンクラミド10^{-6}mol/L＋多核白血球10^6/ml（n＝6）

—▽—　4－アミノピリジン10^{-3}mol/L＋多核白血球10^6/ml（n＝6）

—●—　ウアバイン10^{-5}mol/L＋多核白血球10^6/ml（n＝6）

—□—　KCl収縮に対して（n＝4）

＊P<0.05　多核白血球10^6/ml群に対して有意に拮抗

なかったことから弛緩物質は一酸化窒素やプロスタノイドではないと考えられる．また本研究でも KCl やウアバインによりその弛緩反応が抑制されたことから内皮依存性過分極因子（EDHF）の関与が示唆された．もし白血球による弛緩が EDHF を介するものならばいずれかの K^+チャネルを介して平滑筋細胞膜を過分極させる可能性がある[9]．現在血管では種々の K^+チャネルが報告されている[10]．しかしそれぞれの阻害薬は必ずしも特異的ではない．Urakami－Harasawaら[11]のヒト胃大網動脈を用いた実験によると，ブラジキニンによる内皮依存性弛緩はテトラブチルアンモニウムにより完全に拮抗され，一部小血管においてはテトラブチルアンモニウムとシャリブドトキシンによって拮抗された．本研究においても白血球による弛緩はテトラブチルアンモニウム，テトラエチルアンモニウム及びシャリブドトキシンによって減弱された．このことは Urakami－Harasawa らの報告と一致する．ところで本研究にお

いてテトラブチルアンモニウム，テトラエチルアンモニウム及びシャリブドトキシンによる拮抗作用は完全ではなかった．このことは K^+チャネル活性化以外の弛緩機構が関与していることが示唆される．ウアバインは細胞膜における Na^+ポンプの特異的拮抗薬として知られている[12]．KCl収縮時と同様にウアバイン処置は血管平滑筋の膜を脱分極させるため，膜を過分極する物質の作用を減弱する．本研究においてウアバインは白血球による弛緩を完全に抑制した．以上の結果から白血球による弛緩は内膜を介した K^+チャネルの活性化の他に Na^+ポンプ活性化の作用も否定できない．

白血球が活性化されると種々のフリーラジカルが生ずる．Rubanyi ら[13]はイヌ冠動脈を用いた実験でキサンチンーキサンチンオキシゲナーゼで発生させたフリーラジカルが内皮依存性に冠動脈を弛緩し，その弛緩はカタラーゼ（過酸化水素スカベンジャー）により抑制されると報告している．一方Weiら[14]はネコ脳動脈を用い，過酸化水素及びスーパーオキサイドがそれぞれATP感受性 K^+チャネル，カルシウム依存性 K^+チャネルを介して血管を拡張させると報告している．しかし，本研究においては，いずれのフリーラジカルスカベンジャーも白血球による弛緩に影響を及ぼさなかった．したがって活性化白血球により産生されるフリーラジカルはこの血管弛緩に関与しないと思われる．

近年，多核白血球は接着分子を介して血管内皮に接着することがいわれている[2)3)4)]．白血球－内皮間の接着の第一段階はローリング現象であり，白血球表面のL－セレクチンが主要な役割を果たしていると考えられている[15]．本研究においてL－セレクチンのレクチン様ドメインと相同性を示すタチナタマメレクチン，レンズマメレクチンは内皮依存性の弛緩作用を示した．また白血球による弛緩作用を減弱したテトラブチルアンモニウム，テトラエチルアンモニウムはこの作用を減弱した．このことからこれらレクチン様ドメインを有するタチナタマメレクチン，レンズマメレクチンは白血球による弛緩と同様に K^+チャネルを介して血管を弛緩することが示唆された．

静脈麻酔薬の L－セレクチンの発現に対する影響を検討した結果，ケタミンは L－セレクチンの発現を増強することが明らかになった．L－セレクチンの発現に対する静脈麻酔薬の影響については報告がなく，その機序については今後の課題である．

ケタミンは，臨床投与量で麻酔導入一分後ではおよそ 10^{-4}M にまで達すると報告されている[16]．大脳皮質・視床を抑制するが大脳辺縁系を賦活することから解離性麻酔薬と呼ばれ，他の麻酔薬と性質が大きく異なる．そのため一般にショック時の麻酔導入に用いられることが多いが，敗血性ショックなど白血球が末梢循環に大きな影響を与えると考えられるとき，従来報告されているような心血管系刺激作用[17]のみならず，本研究で示されたように白血球による血管弛緩を増強させる作用を持ち合わせることから，微小循環を改善させる可能性があると思われる．

以上より多核白血球によるブタ冠状動脈の内皮依存性弛緩作用はケタミンによって増強され，その機序として白血球 L－セレクチンの発現をケタミンが増強することが示唆された．

稿を終えるにあたり，御指導・御校閲を賜りました新潟大学麻酔学教室下地恒毅教授，福田　悟助教授，冨士原秀善助手に深謝いたします．

参　考　文　献

1) **Rimere, T.J., Stum, R.J., Adams, L.M., Henry, D.E., Heaslip, R. J., Weichiman, R.J. and Grimes, D.**: Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of neutrophil-derived relaxing factor. J. Phamcol. Exp. Ther, **245**: 102～111, 1988.

2) **Zimmermann, G.A., Prescott, S.M. and McIntyre, T.M.**: Leukocytes-endothel interactions. Immunology Today. **13**: 93～100, 1992.

3) **Springer, T.A.**: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. Cell, **76**: 301～314, 1994.

4) **Adams., D.H. and Show, S.**: Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. Lancet, **343**: 831～836, 1994.

5) **Kleha, J.F., Devesly, P. and Johns, A.**: Endothelium derived relaxing factor release from canine coronary artery by leukocytes. Can. J. of Physiol. Pharmacol, **73**: 404～408, 1995.

6) **佐久間一弘**：ブタ冠状動脈の多核白血球による内皮依存性弛緩作用．新潟医学会雑誌，**110**：177-183.

7) **Davidson, J.A.H., Boom, S.J., Pearsall, F.J., Zhang, P. and Ramsay, G.**: Comparison of the effects of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. Br. J. Anaesth, **74**: 315～318, 1995.

8) **Moudgil, G.C., Allan, R.B., Russel, R.J. and Wilkinson, P.C.**: Inhibition, by anesthetic agents, of human leukocyte locomotion towards chemical attractants. Br. J. Anaesth., **49**: 97～104, 1977.

9) **Mombouli, J.V. and Vanhoutte, P.M.**: Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. Trends in Pharmacological Sciences, **18**: 252～256, 1977.

10) **Himmel, H.M., Whorton, A.R. and Strauss, H.C.**: Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. Hypertension, **21**: 112～127, 1993.

11) **Urakami-Harasawa, L., Shimokawa, H., Nakashima, M., Egashira, K. and Takeshita, A.**: Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. J. Clin. Invest., **100**: 2793～2799. 1997.

12) **Woolfson, R.G. and Poston, L.**: Effect of ouabain on endothelium-dependent relaxation of human resistance arteries. Hypertension. **17**: 619～625. 1991.

13) **Rubanyi, G.M. and Vanhoutte, P.M.**: Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. American Journal of Physiology, **250**: 815～821, 1986.

14) **Wei, E.P., Kontos, H.A. and Beckman, J.S.**: Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. American Journal of Physiology, **271**: 1262～1266, 1996.

15) **Ley, K., Bullard, D.C. and Arbones, M.L.**: Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. J. Exp. Med., **181**: 669～675, 1995.

16) **Domino, E.F., Zsigmond, E.K., Domino, L.E., Domino, K.E. Kothary, S.P. and Domino, S.E.**: Plasma levels of ketamine and two of its metabolites in surgical patients using a gas chromatographic mass fragmentographic assay. anesthesia and analgesia, **61**: 87～92, 1982.

17) **White P.F., Way W.L. and Trevor A.J.**: Ketamine-its pharmacology and therapeutic uses. Anesthesiology, **56**: 119～136, 1982.