琉球大学学術リポジトリ

[原著] リドカイン代謝に及ぼすブピバカインの影響 : in vitro, in vivo での検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): biotransformation, pharmacokinetics, enzyme inhibition, lidocain, bupivacaine 作成者: 磯, 淳典, 平良, 豊, 垣花, 脩, 濱田, 哲, 奥田, 佳朗, Iso, Atunori, Taira, Yutaka, Kakinohana, Osamu, Hamada, Satosi, Okuda, Yoshiaki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015920

リドカイン代謝に及ぼすブピバカインの影響
―― in vitro, in vivoでの検討 ――

磯　淳典、平良　豊、垣花　脩、
濱田　哲、奥田佳朗

琉球大学医学部麻酔科

(1991年7月3日受付、1991年10月16日受理)

はじめに

局所麻酔薬(以下局麻薬)を使用する際、速やかな効果発現と長時間の効果を期待して、速効性短時間作用型のリドカインと遅効性長時間作用型のブピバカインを混合して用いることはしばしば行われており、その臨床的効果や安全性についての報告は多いが[1-4]、in vitroで局麻薬が互いの代謝に及ぼす影響について調べられたものはみあたらない。

代表的局麻薬のリドカインは主として肝のミクロゾームに存在するチトクロームP-450(以下P-450)によって代謝され、その主たる代謝産物は脱エチル化をうけたmonoethyl-glycinexylidide(MEGX)である[5, 6]。またブピバカインも肝で代謝されることが知られており[7, 8]、リドカインの代謝にブピバカインが影響をあたえる可能性がある。

そこでわれわれはリドカインの代謝に及ぼすブピバカインの影響について、ラット肝ミクロゾームを用いたin vitroの実験とイヌを用いたin vivoの実験を行い、酵素速度論的および薬動力学的に検討を加え若干の知見を得たので報告する。

実験方法

Ⅰ in vitroの実験

1) 肝ミクロゾーム浮遊液の作成

雄ウイスター系ラット(10週齢)を24時間絶食後、頚椎脱臼により犠殺し肝臓を摘出した。摘出した肝はただちに4℃に冷却した0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)で灌流し血球成分を除去した後、氷冷しながらホモジナイズした。ホモジネイト液は遠心分離(9000G15分4℃)を行い、その上清をさらに超遠心分離(101700G60分4℃)してミクロゾーム分画を得た。得られたミクロゾーム分画は、大村、佐藤らの方法[9]によりチトクロームP-450-CO複合体の分子吸光係数91mM^{-1}・cm^{-1}を用いてP-450含量を求め、P-450の最終濃度として1μMになるようリン酸カリウム緩衝液で希釈した。またタンパク含量はLowry法[10]によって測定した。

2) 酵素反応液の調整

基質としてのリドカイン濃度は、20,5,1.25,0.625mMの4種とした。一方阻害剤としてのブピバカインの終濃度は、4,2,1mMの3種類とした。また反応にはNADPH生成系を用い、組成はNADP; 0.65mM, Glucose-6-phoshate; 16mM, Glucose-6-phoshate dehydrogenase;0.8U・mℓ$^{-1}$とした。(濃度はいずれも反応液中終濃度)

3) 酵素反応

三角フラスコ内にミクロゾーム浮遊液1ml、NADPH生成系1.7mℓをいれ、37℃で5分間プレインキュベーションした後、各濃度のブピバカイン0.2mℓ、さらに20秒後に各濃度のリドカイン0.1mℓを加え計3mℓとして反応を開始した。37℃で振とうしながら10分間反応させたのち、メタノール3mℓを加え反応を停止させた。

4) MEGXの測定

反応の終了した液を遠心分離した後、上清中のMEGX濃度を高速液体クロマトグラフィー(島津LC-6A)で測定した。カラムは逆相カラム(CLC-ODS 6×150mm)を用い、測定の条件は移動相;0.1M NaH_2PO_4(pH 2.1)-CH_3CN (6:1)、流量;1.5mℓ·min^{-1}、カラム温度;50℃、UV;195nmとした。定量はクロマトグラムのピーク面積から検量線を用いて計算した。

5) 酵素速度論的解析

得られたMEGX濃度から基質濃度-反応速度曲線を求め、これをもとにLineweaver-Burk Plotを行い、阻害の有無や阻害の型をみた。また各々の阻害剤濃度と反応速度からDixon Plotを行い、阻害定数を求めた。

6) チトクロームC還元酵素活性の測定

ブピバカインによるチトクロームC還元酵素への影響をみるため、Phillipsらの方法[11]にならい、分光光度計の石英セル内に最終濃度としてミクロゾーム浮遊液(P-450;0.33mM)、KCN;1mM、チトクロームC;0.06mM、NADPH;0.04mMとなるように、0.5mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.6)で調整し、これにブピバカイン0.13mM(終濃度)または対照として蒸留水を0.2mℓ添加して、総量3mℓの反応液として550nmで2分間タイムスキャンした。吸光度の増加から分子吸光係数21mM^{-1}·cm^{-1}を用いて各々のチトクロームC還元酵素活性を計算し比較した。添加したブピバカインの濃度は、3)の実験で用いた最も濃いブピバカイン濃度のP-450に対する反応比と同じである。

Ⅱ in vivoの実験

雑種成犬(雄 8～10kg)6頭を用い、それぞれに10日以上の間隔をおいてエンフルラン麻酔下に対照投与(リドカイン2mg/kg静注)とブピバカイン投与(リドカイン2mg/kg＋ブピバカイン0.5mg/kg静注)を行い、リドカインの血漿中濃度を測定した。

1) 麻酔

ケタミン40～50mg筋注後、ペントバルビタール100～125mg静注で導入し、挿管後調節呼吸とした。エンフルラン濃度は0.8～1.2%とし、血液ガス分析でpHが7.35～7.45内におさまるよう調節してから実験を開始した。筋弛緩薬は用いなかった。

2) 測定

リドカイン単独またはリドカインとブピバカインの混合物いずれも投与量は5mlとして、5秒以内に急速静注した。採血は大腿動脈より3,5,10,20,30,45,60,80,120,150,180分に3mlずつ行い、血漿中のリドカイン濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。測定の条件はin vitroの実験の場合と同じである。得られたイヌごとのリドカイン血漿濃度値をそれぞれ2コンパートメントモデルを用いて指数関数、$C=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}$ (C；薬物濃度、t；時間) にあてはめた。この式から薬動力学パラメーターを求め、対照投与とブピバカイン投与との比較を行った。検定にはstudentのt検定を用いた。

Ⅲ 試薬

リドカイン、ブピバカインは藤沢薬品提供の原末結晶を用いた。またNADP、NADPH、Glucose-6-phosphate、Glucose-6-phosphate dehydrogenase、チトクロームCはベーリンガーマンハイム社の特級試薬、その他の試薬は市販の特級試薬を使用した。

結　　果

Ⅰ in vitroの実験

基質濃度-反応速度曲線でブピバカインは濃度依存性にMEGXの生成を抑制した(Fig 1)。

これをもとにしたLineweaver-Burk Plotの結果、それぞれの直線は第二象限で相互に交点をもち、混合型阻害であることを示した(Fig 2)。

さらにDixon Plotを行い直線相互の交点の横軸座標からブピバカインの阻害定数Kiを求めたところ1.38mMであった(Fig 3)。

またブピバカインを添加した際のチトクロームC還元酵素活性値は、対照が0.233μmol·mg protein^{-1}·min^{-1}、ブピバカイン添加時が0.227μmol·mg protein^{-1}·min^{-1}とブピバカインの添加によって酵素活性値に差はみられなかった。

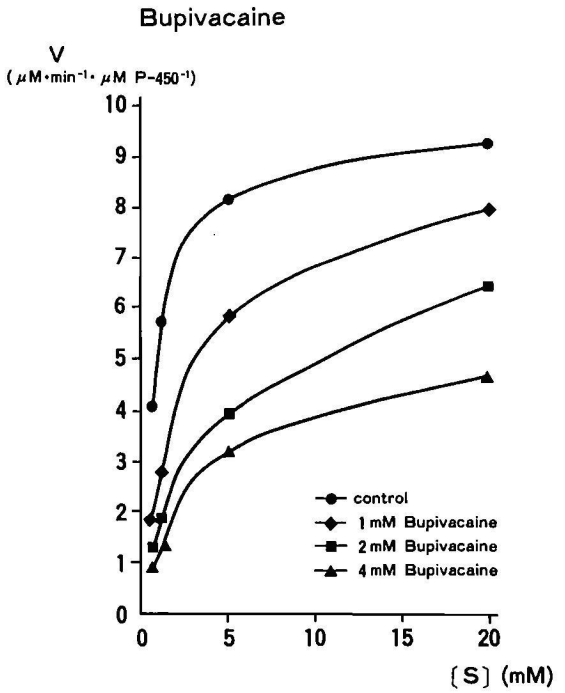

Fig 1 Velocity versus substrate concentration curves
V ; intial velocity of MEGX product
[S]; lidocaine concentration

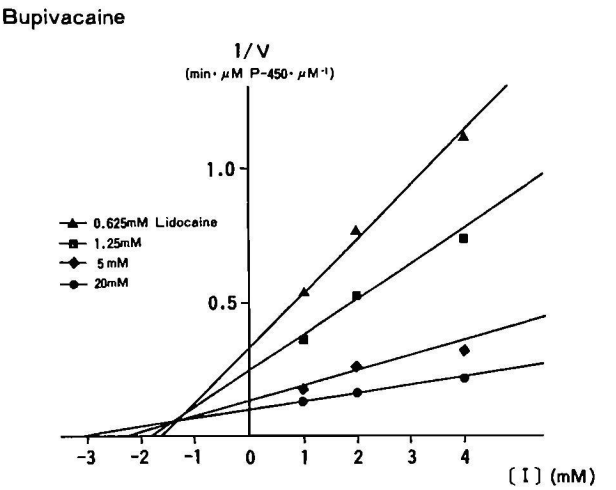

Fig 3 Dixon plots for the interaction of bupivacaine with the in vitro metabolism of lidocaine

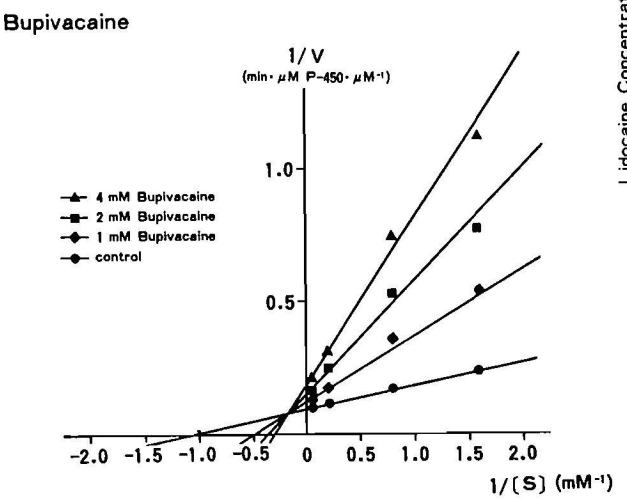

Fig 2 Lineweaver-Burk plots for the interaction of bupivacaine with the in vitro metabolism of lidocaine

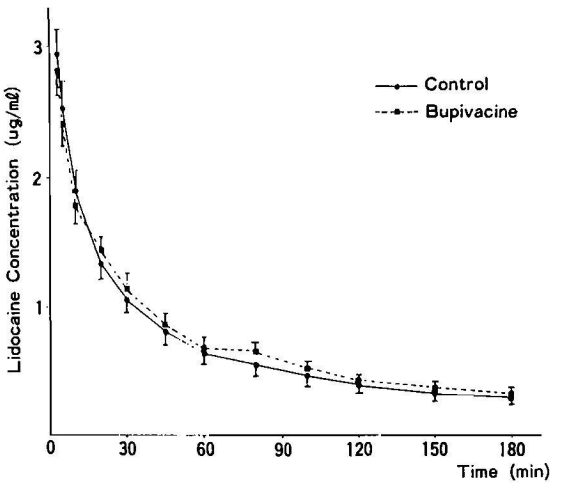

Fig 4 Time versus plasma lidocaine concentration curves after lidocaine 2mg/kg IV (--●--) and mixture of lidocaine 2mg/kg and bupivacaine 0.5mg/kg IV (--■--)(n = 6)

Ⅱ in vivoの実験

対照投与とブピバカイン投与時の血漿リドカイン濃度と薬動力学的パラメーターを両群で比較したが、分布容量(Vc)、中央コンパートメントと末梢コンパートメント間の薬物の移行を示す速度定数(K_{12}, K_{21})、中央コンパートメントからの消失速度定数(Ke)、排泄クリアランス(Cl)、area under the curve(AUC)、半減期(t1/2)のいずれの間にも統計学的に有意な差は認められなかった(Fig 4, Table 1)。

Table 1 Pharmacokinetics parameter of lidocaine

	Control	Bupivacaine
Vc (ml/kg)	685.8±163.5	676.1±49.5
K_{12} (1/min)	0.0277±0.0097	0.0312±0.0166
K_{21} (1/min)	0.0176±0.0092	0.0257±0.0123
Ke (1/min)	0.0169±0.0058	0.0257±0.0036
Cl (ml/min kg)	11.27±3.65	10.39±2.67
AUC (min μg/ml)	0.191±0.053	0.203±0.052
t 1/2 (min)	13.21±3.57	11.29±3.44

Control; lidocaine(2mg/kg) alone injection.
Bupivacaine; lidocaine(2mg/kg) mixed with bupivacaine(0.5mg/kg) injection.

考　察

リドカインは主として肝のミクロゾームで代謝されるが、その代謝経路は複雑である。主な代謝経路として、脱エチル化によってMEGXに代謝されていく系のほか、ベンゼン環の第3位の水酸化による3-OHリドカインへ代謝される系なども知られている。この代謝過程には種差がありヒトでは脱エチル化の系が主とされているが[12、13]、Keenaghanら[14]の尿中分解物の分析によるとヒトに比してラットでは3-OHリドカインや3-OH-MEGXのしめる割合が多くラットではベンゼン環水酸化の系も重要な代謝経路である可能性があるとしている。しかしラットでもin vitroで高濃度のリドカインが存在する条件ではやはりその主たる代謝産物はMEGXであることが示されており[15、16]、われわれの実験においてもリドカインの代謝をMEGXの産生で評価することに問題はないと考える。

チトクロームP-450は主として一原子酸素添加反応にかかわるミクロゾーム酵素群で、反応に必要な電子供給系をその中に有することが特徴である。その電子供給系は複雑であるが、主なものはNADPHからチトクロームC還元酵素を介する系である[17]。ブピバカインがこれらの系を抑制したとしてもリドカインの代謝は影響をうけると考えられるが、ブピバカインはチトクロームC還元酵素に影響を与えなかったことから本実験におけるブピバカインによるリドカインの代謝抑制は主としてP-450上のものと考えられる。

一般に酵素反応は温度、pHの影響を大きくうける。本実験の反応は37℃に設定した恒温槽を用い、充分プレインキュベーションした後、振とうさせながら行っており、温度の条件はほぼ一定と考えられる。また予備実験で反応液中のpHを測定した結果では局麻薬の添加時に最大で0.05程度のpHの低下がみられ、反応液のpHは7.25±0.05の範囲であった。若干のpHの低下は局麻薬に含まれる塩酸の影響と考えられたが、このpHの範囲ではMEGX生成に差のないことは予備実験で確認ずみである。われわれの仮説はリドカインの代謝を、同じアミド型局麻薬のブピバカインがP-450上において競合的に阻害するのではないかというものであっ

た。しかしLineweaver-Burk Plotの結果、ブピバカインはリドカイン代謝を混合型に阻害した。

リドカインの代謝経路は先に述べたように複雑で、多くの代謝産物が確認されている。ブピバカインも、肝で脱ブチル化をうけ2.6-pipecoloxylidide(PPX)などに代謝される[18、19]したがって本実験の反応液中にはP-450の基質となりうる物質が複数存在し、互いにP-450との結合に影響を及ぼしている可能性がある。またSuzukiら[20]はラットの実験でリドカイン自身がその代謝産物であるMEGXとOH-リドカインの生成を逆に阻害すると報告しており代謝産物どうしの相互作用がおこっている可能性もある。

P-450に分子種が存在することはよく知られており、Funaeら[21]は無処理の雄ラットから6種のP-450の精製に成功している。リドカインの代謝だけをみてもKawaiら[16]はラットの実験でリドカインの脱エチル化に2種以上のP-450が関与していることを示唆しており、また中平は[22]P-450の分子種によってリドカイン代謝活性に差があることも報告しており、P-450の分子種の多様性もまた本実験の結果を複雑にしていると考えられる。

次にin vivoの実験では対照投与とブピバカイン投与のそれぞれの薬動力学的パラメーター間に有意な差を見いだせなかった。Seowら[4]はヒトにリドカインとブピバカインを種々の比で硬膜外投与し薬動力学的解析を行った結果、リドカインのTmaxとCmaxに差はなかったと報告している。

リドカインは肝の1回の通過でその70%がとりこまれるためリドカインの血中からの排泄は主に肝血流に依存するとされている[23]。肝血流量は心拍出量の低下、加齢、麻酔薬やその他の薬物などさまざまな因子で低下する。本実験におけるエンフルラン、ケタミン、ペントバルビタールといった麻酔薬やイヌの個体差による肝血流の変動因子を考慮するとブピバカインによるリドカインに対する薬動力学的変化は存在したとしてもマスクされた可能性がある。さらにin vivoではブピバカイン濃度を臨床使用量を考慮してリドカインの4分の1としたため影響が小さかったことも一因と考えられる。またブピバカインがリドカインの血漿タンパクとの結合に影響を及ぼすことが報告されている[24]。ブピバカインはタンパク結合能が高く、血漿タンパクと結合しているリドカインと置換することも報告されており[25]、これによって非結合型のリドカインは増加すると考えられる。一般に肝での排泄率の低い薬物の場合、タンパクとの結合率が低下するとその薬物のクリアランスは増加すると言われている。しかしリドカインのような肝排泄率の高い薬物ではタンパク結合率の変化によるクリアランスへの影響は少ないとされ[26]、このことはわれわれの実験結果と矛盾しない。

教室の濱田ら[27]は吸入麻酔薬によるリドカインの代謝抑制がin vitroでも存在し、エンフルランの阻害定数は0.586mMであったと報告している。この値とブピバカインの阻害定数1.38mMを比較するとブピバカインの阻害度はエンフルランより弱いことになり、少なくともin vivoでブピバカインがリドカイン代謝に与える影響は少ないものと考えられる。逆に臨床的立場からみるとリドカインとブピバカインを混合して用いても薬動力学的には問題はないといえる。

まとめ

リドカイン代謝におよぼすブピバカインの影響についてin vitroとin vivoで検討した。

1)in vitroでリドカインの代謝をブピバカインは阻害した。

2)その阻害様式は混合型で阻害定数は1.38mMであった。

3)in vivoでは対照投与とブピバカイン投与の薬動力学的パラメーターの間に有意な差を認めなかった。

4)臨床使用量のブピバカインはリドカインの血中濃度に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

文　献

1) Bromage, P.R., Gertel, M.: Improved blachial plexus with bupivacaine hydrochloride and carbonated lidocaine.Anesthe siology 36:479-487,1972.

2) Magee, D.A., Sweet, P.T.,Holland,A.J.C.: Epidural anaesthesia with mixtures of bupivacaine and lidocaine.Can Anaesth Soc J 30:174-178,1983.

3) Prithvi,P., Rosenblatt,R., Miller,J., Katz,R.L.: Dynamics of local anesthetic compounds in regional anesthesia. Anesth Analg 56:110-117,1977.

4) Seow, L.T., Lips, F.J., Cousins, M. J., Mather, L. E. : Lidocaine and bupivacaine mixtures for epidural blockade.Anesthesiology 56:177-183,1982.

5) Hollunger, G.:On the metabolism of lidocaine Ⅱ. The biotransformation of lidocaine. Acta pharmacol et toxicol 17:365-373,1960.

6) Difazio, C.A., Brown, B.E.: Lidocaine matabolism in normal and phenobarbital-pretreated dogs.Anesthesiology 36:238-243, 1972.

7) 浅田 章,西 信一:麻酔におけるPharmacokineticsおよびPharmacodynamics 3 局所麻酔薬,臨床麻酔 11:1123-1130,1987

8) 藤森 貢:局所麻酔薬の分布と代謝,麻酔と蘇生 16 別冊 麻酔薬代謝と肝障害:69-73,1980

9) Omura,T., Sato,R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J Biol Chem 239:2370-2385,1964.

10) Lowry, O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent.J Biol Chem 193:265-275,1951.

11) Phillips,A.H., Langdon,R.G.: Hepatic Triphosphopyridine nucleotide-cytochromec reductase: isolation,characterizati on, and kinetic studies. J Biol Chem 237 : 2652-2661,1962.

12) Hermansson, J., Glaumann,H., Karlen,B., Christer,B.: Metabolism of lidocaine in human liver in vitro.Acta pharmacol et toxicol 47:49-52,1980.

13) 榎本 小弓,小田 裕,浅田 章,藤森 貢,今岡 進,舟江 良彦:局所麻酔薬リドカインのヒト肝ミクロゾームのチトクロームP-450による代謝ついて,麻酔と蘇生 25 別冊 麻酔薬代謝と肝障害x:1-4,1989.

14) Keenaghan,J.B., Boyes,R.N.: The tissue distribution,metabolism and excretion of lidocaine in rats,guinea pigs,dogs and man.J Phamacl Exp Ther 180:454-463,1972.

15) Bahr, C., Hedlund, I., Karlen, B., Backstrom, D. and Grasalen, H. : Evidence for two catalytically different binding sites of liver microsomal cytochrome P-450 : Importance for species and sex differences in oxidation pattern of lidocaine. Acta pharmacol et toxicol 41 : 39- 48, 1977.

16) Kawai, R., Fijita, S., Suzuki, T. : Simultaneous quantitation of lidocaine and its four metabolites by high-performance liquid chromatography : Application to studies on in vitro and in vibo metabolism of lidocaine in rats. J Pharm Sci 74 : 1219-1224, 1985.

17) 吉田 雄三:小胞体の電子伝達系:薬物代謝の酵素系,佐藤 了,大村恒雄編,p65-88, 講談社サイエンティフィク,東京,1989.

18) Boyes,R.N.: A review of the metabolisme of amide local anaesthetic agents. Br J Anaesth 47:225-230,1975.

19) Reynolds, F.: Metabolism and excretion of bupivacaine in man : Acomparison with mepivacaine. Br J Anaesth 43:33-37,1971.

20) Suzuki,T., Fujita,S., Kawai,R.:Precursormetabolite interaction in the metabolism of lidocaine.J Pharm Sci 73:136-138,1984.

21) Funae,Y., Imaoka,S.: Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated male rats.Biochim

Biophys Acta 926:349-358, 1987.

22) 中平 雄三:リドカインのチトクロームP-450による代謝について,麻酔 37:296-365,1989.

23) Stenson, R. E., Constantino, R. T., Harison, D.C. : Interrelationships of hepatic blood flow, cardiac output, and blood levels of lidocaine in man. Circulation 43 : 205-211, 1971.

24) Tucker,G.T., Boyes,R.N., Bridenbaugh, P. O., Moore, D. C. : Binding of anilide type local anesthetics in human plasma. Anesthesiology 33 : 287-314, 1970

25) Mcnamara, P. J., Slaughter, R. L., Pieper, J. A. : Factors influencing serum protein binding of lidocaine in humans. Anesth Analg 60 : 395-400, 1981

26) Gibalid, M., Perrier, D. : Pharmacokinetics, 2nd edn. vol15, Marcel Dekker, inc, NewYork, 1982.

27) 濱田 哲,平良 豊,垣花 脩,磯 淳典,徳嶺 譲芳,奥田 佳朗：リドカイン代謝に及ぼす各種揮発性麻酔薬の酵素阻害,第38回日本麻酔学会総会抄録：234,1991

Effects of Bupivacaine on in vitro and in vivo Lidocaine metabolism

Atunori Iso, Yutaka Taira, Osamu Kakinohana,
Satosi Hamada and Yoshiaki Okuda

Department of Anesthesiology, Faculty of Medine, University of the Ryukyus

Key words : biotransformation, pharmacokinetics, enzyme inhibition, lidocain, bupivacaine.

Abstract

To evaluate the effects of bupivacaine on lidocaine metabolism mediated by chtochrome P-450, we analyzed enzyme kinetics in an in vitro study using rat liver microsomes and pharmacokinetics in an in vivo study using anesthetized dogs.

In vitro study,bupivacaine showed mixed type inhibition of lidocaine metabolism with inhibition constants being 1.38mM. Since bupivacaine did not affect cytochrome C reductase activity,this inhibition of lidocaine metabolism may have been caused by the action on cytochrome P-450.

In vivo study,there was no difference between pharmacokinetic parameter after lidocaine alone injection and lidocaine mixed with bupivacaine injection.