

---

## 学位論文

---

### アフリカツメガエル卵母細胞に発現した セロトニントランスポーターに対する麻酔薬の作用

金子 美幸

キーワード：セロトニントランスポーター，麻酔薬，アフリカツメガエル卵母細胞，  
プロテインキナーゼC

### The Effects of Anesthetics on Serotonin Transporter Expressed in *Xenopus* Oocytes

Miyuki KANEKO

**Abstract:** Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) transporter (SERT) is the only functional membrane protein responsible for efficient synaptic clearance of extracellular 5-HT which has psychogenic properties. Anesthetics clinically contribute to psychosedation to relieve phobia or anxiety accompanied with dental treatment. Nevertheless, little is known about the effects of anesthetics on SERT. In this study, [<sup>3</sup>H]5-HT uptake assay and two-electrode voltage-clamp method were utilized to examine directly the effects of anesthetics on the human SERT expressed in *Xenopus* oocytes.

Ketamine (1-100 μM) significantly inhibited SERT function in concentration- and voltage dependent manners ( $IC_{50} = 4 \mu M$ ). Eadie-Hofstee analysis showed a significant increase in  $K_m$  (control;  $2.37 \pm 0.83 \mu M$ , 10 μM of ketamine;  $12.11 \pm 4.69 \mu M$ ) with no significant changes in the apparent  $V_{max}$  (control;  $12.60 \pm 1.14$  pmol/oocyte/hr, 10 μM of ketamine;  $14.67 \pm 2.66$  pmol/oocyte/hr), suggesting that ketamine competitively inhibited [<sup>3</sup>H]5-HT uptake. Propofol inhibited [<sup>3</sup>H]5-HT uptake and 5-HT-induced inward current only at high concentration (100 μM). Pentobarbital (5-500 μM) did not have significant effect on SERT function. Neither sevoflurane (50 μM-2 mM) nor isoflurane (50 μM-2 mM) had significant effect to SERT function.

Interestingly, lidocaine (10 nM-1 μM) inhibited [<sup>3</sup>H]5-HT uptake in a dose-dependent manner and [<sup>3</sup>H]5-HT uptake was completely inhibited by 1 μM of lidocaine. Eadie-Hofstee analysis showed a significant decrease in  $V_{max}$  (control;  $13.28 \pm 2.07 \mu M$ , 500 nM of lidocaine;  $9.33 \pm 1.14 \mu M$ ) with no significant changes in  $K_m$  (control;  $15.98 \pm 6.26$  pmol/oocyte/hr, 500 nM of Lidocaine;  $15.81 \pm 4.91$  pmol/oocyte/hr), suggesting that lidocaine non-competitively inhibited [<sup>3</sup>H]5-HT uptake. Intracellular QX314 (permanently charged lidocaine analogue) inhibited the [<sup>3</sup>H]5-HT uptake by SERT, but intracellular or extracellular benzocaine (permanently uncharged local anesthetics) was without effect. These results suggest that the action sites of lidocaine on SERT seem to be located intracellularly. The effect of lidocaine was partially abolished in the present of staurosporine, protein kinase C inhibitor. In conclusion, these results suggest that ketamine and lidocaine directly inhibit SERT function at clinical concentrations, and PKC may partially be responsible for lidocaine-induced inhibition of SERT function.

## 緒 言

セロトニン (serotonin, 5-hydroxytryptamine : 5-HT) は、情動の制御をはじめ、睡眠、摂食、運動、体温など様々な機能の調節に関与している神経伝達物質である<sup>1,2)</sup>。5-HT 神経は、発生学的に最も古い脳である脳幹の正中線核を起始核とし、脳内に広く投射されている<sup>3)</sup>。脳内の 5-HT は、松果体において必須アミノ酸であるトリプトファンから合成された後にシナプス小胞中に蓄えられ、神経刺激に応じて神経終末から放出される<sup>4)</sup>。放出された 5-HT は、標的神経の 5-HT 受容体に作用した後、情報伝達が終了するとすみやかに取り除かれる必要がある。このため、神経終末には 5-HT を再取り込みする何らかのタンパク質が存在していると考えられていた。1991年、5-HT の再取り込みを行なう膜タンパク質として、セロトニントランスポーター (serotonin transporter : SERT) がクローニングされた<sup>5,6)</sup>。SERT は抗うつ薬やコカイン、アンフェタミン等の作用点であり、うつ病などの精神神経疾患の形成に関与する分子であると考えられている<sup>7)</sup>。1999年には、SERT による 5-HT 再取り込みを選択的に阻害する SSRI (selective serotonin reuptake inhibitor) が、日本で臨床適用が認められ、うつ病などの精神神経疾患の治療に用いられている。一方、SSRI の過量投与により、錯乱や興奮など精神状態の変化を伴う重篤な副作用 (セロトニン症候群 : serotonin syndrome) を生じる<sup>8)</sup>。すなわち、SERT はシナプス間隙の 5-HT 量を適正に保ち、精神神経機能を制御するうえで非常に重要な役割を担っている。

麻酔薬は中枢神経系に作用し、様々な精神症状を生じさせる<sup>9,10)</sup>。しかし、麻酔薬による精神症状発症のメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究は、麻酔薬が精神症状の発症に深く関与する SERT に及ぼす影響を及ぼしているかを分子レベルで検討することを目的とした。様々な神経伝達物質のトランスポーターは、互いに相同性が高い<sup>5,6,11,12)</sup> ため基質や阻害薬などが一部共通しており<sup>13)</sup>、細胞内のシグナル伝達物質も共通している可能性がある。また15種類以上も同定されている 5-HT 受容体<sup>14,15)</sup> を介した情報伝達の制御と、SERT を介したそれとの鑑別も必要である。このため *in vivo* の実験系では麻酔薬の SERT に対する直接作用を検索することが困難である。本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞に SERT タンパクを強制発現させることにより、生体内で予想される他の影響を排除した環境下で、麻酔薬の SERT に対する直接作用を検討した。

## 材料ならびに方法

### 1. ヒト SERT mRNA の調製

ヒト SERT cDNA を含む発現ベクター pBluescript® SK(+/-) (Dr. S. G. Amara より委譲)<sup>16)</sup> を LB 培地 (Sigma Aldrich Chemical corporation, St. Louis, MO, USA) 中で培養し、精製 (Wizard® Plus SV Minipreps, Promega, Madison,

WI, USA) した。制限酵素 *NorI* (Promega) で線状化し、1% アガロースゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて電気泳動し、分子量を確認した後、5M 酢酸アンモニウム (和光純薬工業, 大阪) および100% エタノール (関東化学, 東京) を用いて沈澱させ、蒸留水 (GIBCO, Auckland, NZ) に溶解して濃縮した。T7 RNA ポリメラーゼ (EPICENTRE, Madison, WI, USA) を用いて *in vitro* 転写反応を行い mRNA を合成した。得られた mRNA を 260 nm の波長において分光測光法により定量し、蒸留水にて溶解し最終濃度 1 µg/ml に調製した。

### 2. アフリカツメガエル卵母細胞の採取および mRNA の注入

成熟雌アフリカツメガエル (浜松生物教材, 静岡) を 20°C 水槽中で飼育した。アフリカツメガエルを 5mM 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma Aldrich) を用いて麻酔した後、下腹部を切開して卵巣を摘出した。Dumont 分類で第 V ~ VI 相の卵母細胞を取り出し、ピンセットにて濾胞細胞膜を除去した。1 µg/ml ヒト SERT mRNA または蒸留水を注入用ガラス針に移し、卵母細胞の動物極と植物極の境界付近に、マイクロインジェクター (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) を用いて 50 ng 定量注入した。10 units/ml ペニシリン、10 µg/ml ストレプトマイシン、50 µg/ml ゲンタマイシン、220 µg/ml テオフィリン (以上、いずれも Sigma Aldrich) を添加した Barth 変法溶液 (以下、MBS 溶液と略す; 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.33 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.91 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.5, 関東化学または和光純薬工業) 中で、18°C の条件下、3 日間培養した。

なお、本研究における動物実験は、徳島大学動物実験委員会により承認された動物実験計画書に基づいて実施された。

### 3. 麻酔薬

静脈内麻酔薬 (ペントバルビタール, プロポフォール, ケタミン), 吸入麻酔薬 (セボフルレン, イソフルレン) および局所麻酔薬 (リドカイン) が SERT による 5-HT 取り込みに及ぼす影響を与えるか検討した。ケタミンの光学異性体に関する検討を、ラセミ体および S(+)-体を用いて行なった。局所麻酔薬の電荷に関する検討を、完全電荷型局所麻酔薬 QX314 および完全非電荷型のベンゾカインを用いて行なった。セボフルレンとイソフルレンは Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA) より購入した。その他の麻酔薬は Sigma Aldrich 社製のものをを使用した。

### 4. [<sup>3</sup>H]5-HT 取り込み測定

卵母細胞による 5-Hydroxy [<sup>3</sup>H]tryptamine creatinine sulfate ([<sup>3</sup>H]5-HT, Amersham Bio Sciences,

Buckinghamshire, UK) 取り込み測定を, Mayfield らの報告<sup>17)</sup> に準じて行なった。mRNA 注入 3 日後に, 卵母細胞を 1 グループ 5 - 8 個として, 各種濃度の麻酔薬を含有する MBS 溶液中に移した。室温下に 3 分間ブレインキュベーションした後に, [<sup>3</sup>H]5-HT を 28 KBq/ml となるように加え, さらに 10 分間培養を続けた。氷冷 MBS 溶液 1 ml で 3 回洗浄し, 細胞表面に残留する [<sup>3</sup>H]5-HT を完全に除去した。10% Sodium-Dodecyl Sulfate (和光純薬工業) 溶液にて細胞膜を破壊後, シンチレーション液 (AQUASOL-2, Packard BioScience, Groningen, Germany) に溶解し, 液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-5100, 東京) にて, 卵母細胞内に取り込まれた [<sup>3</sup>H]5-HT の放射活性を測定した。なお, 蒸留水を注入した卵母細胞による [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込み量を非特異的取り込みとし, 実測値から差し引いた値を特異的取り込みとした。また, 脂溶性の薬剤 (プロポフォール, ベンゾカイン) は, ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide : DMSO, Sigma Aldrich) に溶解してストック溶液を作成し, DMSO の最終濃度が 0.1% となるように調製し使用した。なお予備実験にて, 0.1% DMSO が SERT による [<sup>3</sup>H]5-HT 取り込みに影響を与えないことを確認した。

#### 5. Kinetics 分析

麻酔薬を含む MBS 溶液と含まない MBS 溶液中にて, 様々な基質濃度に対する基質取り込み速度を測定し基質飽和曲線を作成した。基質飽和曲線の結果を Eadie-Hofstee 解析し, 最大反応速度 (Vmax 値) とミカエリス定数 (Km 値) を求めた<sup>18)</sup>。

#### 6. 電気生理学的解析 (二電極式膜電位固定法)

二電極式膜電位固定法を用いた電気生理学的解析を, Mayfield らの報告<sup>17)</sup> に準じて行なった。SERT を発現した卵母細胞をチャンバー上に置き, MBS 溶液を灌流 (2 ml/min) させた。マイクロピペット製作器 (ナリシゲ, 東京) によってガラス管微小電極を作成し, 先端の電気抵抗値を 2 M $\Omega$  前後に調整し, ガラス管内を 3 M 塩化カリウム液で満たした。このガラス管微小電極をアフリカツメガエル卵母細胞内に 2 本刺入し, Oocyte Clamp Amplifier (model OC-725C, Warner Instruments, Hamden, CT, USA) を用いて -60 mV に電圧固定した。MBS 溶液に溶解した各麻酔薬を 3 分間ブレインキュベーションした後, 5-HT にて誘発された内向き電流を測定した。なお, 誘発に使用した 5-HT 濃度は, 5-HT 濃度を変化させ得られた電流量から基質飽和曲線を作成し, 最大応答の約 1/2 の電流量が生じる 5  $\mu$ M とした。

#### 7. プロテインキナーゼ C 関与についての検討

細胞内シグナル伝達物質プロテインキナーゼ C (PKC) が, リドカインによる SERT 機能の抑制に関与しているか否かを確認するため, PKC 活性化剤 phorbol-12-

myristate-13-acetate (PMA, Sigma Aldrich) とその不活性化型アナログ 4 $\alpha$ -phorbol 12-13-dicaprylate (4 $\alpha$ -PDD, Sigma Aldrich), および PKC 阻害剤スタウロスポリン (Sigma Aldrich) を用いて検討した。PMA (100 nM, 10 分間) 19), 4 $\alpha$ -PDD (100 nM, 10 分間) およびリドカイン (100  $\mu$ M, 3 分間) をそれぞれ単独でブレインキュベーションさせた後, [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込みを測定した。次に PMA またはスタウロスポリン (1  $\mu$ M, 60 分間)<sup>19)</sup> でブレインキュベーションした後, リドカインを最終濃度 100  $\mu$ M となるよう添加してさらに 3 分間培養し, [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込みを測定した。

#### 8. 統計学的分析

麻酔薬のブレインキュベーションを行わない卵母細胞による測定値を対照値とし, これに対する割合 (%) を平均値土標準偏差で示した。One-way analysis of variance (ANOVA) または unpaired-t test を用いて統計処理を行ない, 危険率 5% (p<0.05) にて有意とした。

## 結 果

#### 1. SERT による 5-HT 取り込みに対する静脈内麻酔薬の作用

ペントバルビタール (5-500  $\mu$ M) は, [<sup>3</sup>H]5-HT 取り込み測定および電気生理学的解析, いずれの方法においても SERT の機能に対して有意な変化を与えなかった (図 1 A, 1 B)。プロポフォール (0.1-100  $\mu$ M) は, [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込みおよび 5-HT 誘発電流を軽度抑制した。プロポフォール濃度が 100  $\mu$ M の時, [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込みは約 25% 抑制され (図 2 A), 5-HT 誘発電流は約 50% 抑制された (図 2 B)。ケタミン (1-1000  $\mu$ M) は, 低濃度で SERT を強く抑制した。[<sup>3</sup>H]5-HT の取り込みは 10  $\mu$ M ケタミンにより約 70%, 1000  $\mu$ M で 90% 以上抑制された (図 3 A)。ケタミンの SERT に対する IC<sub>50</sub> 値は 4  $\mu$ M であった。電気生理学的解析でも, ケタミンは 5-HT 誘発電流を 1  $\mu$ M の時に約 50%, 100  $\mu$ M では約 90% 抑制した (図 3 B)。ケタミンは, 光学異性体の S(+) 体と R(+) 体が 1 : 1 に配分されたラセミ体であることから, いずれのアイソマーが SERT 機能の抑制に関与しているのかを検討するため, ラセミ体と S(+) 体を用いて [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込みを測定した。ラセミ体と S(+) 体 (10, 50  $\mu$ M) は, いずれも SERT による [<sup>3</sup>H]5-HT の取り込みを抑制した。ラセミ体と S(+) 体による抑制の程度に有意差は認められなかった (図 4)。

#### 2. ケタミンによる SERT の 5-HT 取り込み抑制の作用機序の解析

ケタミン (5, 20  $\mu$ M) を含む MBS 溶液と含まない MBS 溶液にて, SERT を発現した卵母細胞を, 二電極式膜電位固定法により -90 mV から 40 mV の範囲で 10 mV おきに電位固定し, 5-HT 誘発電流を測定した。その結

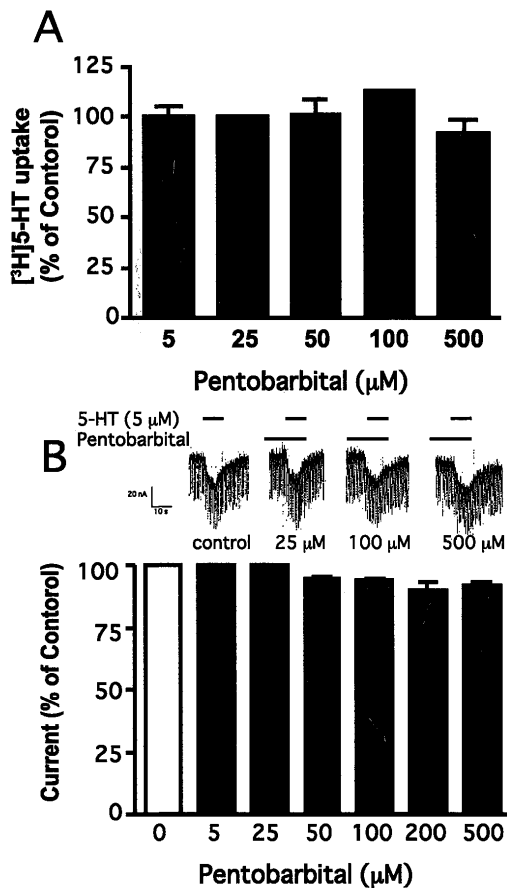


図1 SERTによる5-HT取り込みに対するペンタバルビタールの作用  
(A) ペントバルビタール (5, 25, 50, 100, 500 μM) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, SERTによる $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。ペンタバルビタールにより, SERTの $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みに変化は認められなかった。(n=3)  
(B) ペントバルビタール (5, 25, 50, 100, 200, 500 μM) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, 5-HT誘発電流を測定した。ペンタバルビタールにより, 5-HT誘発電流に変化は認められなかった。(n=2)

果, ケタミンのSERT抑制作用は, 濃度依存性かつ電位依存性であることが確認された(図5)。次に5-HT濃度を0.5, 3, 10, 30 μMと変化させ, 各種濃度にて $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込み速度を測定し, 基質飽和曲線を作成した(図6A)。基質飽和曲線の結果をEadie-Hofstee解析し,  $V_{\text{max}}$ 値および $K_{\text{m}}$ 値を求めた。ケタミン(10 μM)により, SERTに対する5-HTの $V_{\text{max}}$ 値(control;  $12.60 \pm 1.14 \text{ pmol/oocyte/hr}$ , ketamine (10 μM);  $14.67 \pm 2.66 \text{ pmol/oocyte/hr}$ )はほとんど変化しなかったが,  $K_{\text{m}}$ 値(control;  $2.37 \pm 0.83 \mu\text{l}$ , ketamine (10 μM);  $12.11 \pm 4.69 \mu\text{M}$ )は増加した(図6B)。

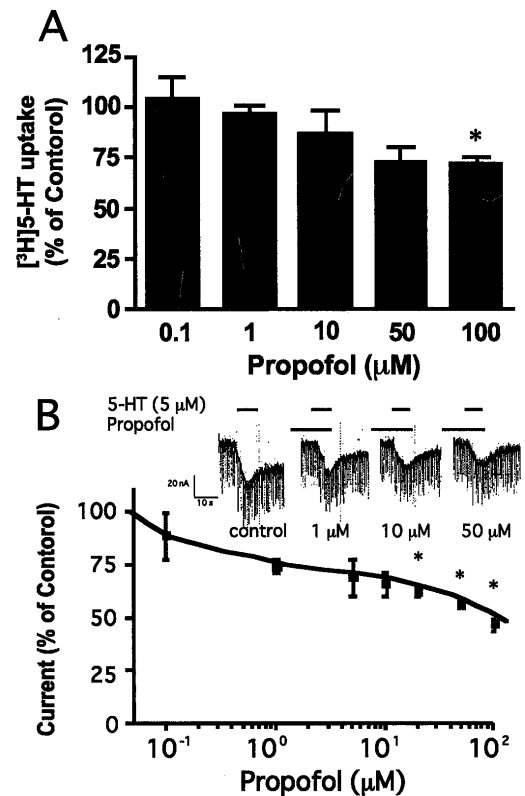


図2 SERTによる5-HT取り込みに対するプロポフォールの作用  
(A) プロポフォール (0.1, 1, 10, 50, 100 μM) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, SERTによる $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。100 μMのプロポフォールは,  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みを有意に抑制した。(n=3, \*p<0.05)  
(B) プロポフォール (0.1, 1, 5, 10, 20, 50, 100 μM) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, 5-HT誘発電流を測定した。プロポフォールは5-HT誘発電流を軽度抑制し, 100 μMの時に有意な抑制が認められた。(n=2, \*p<0.05)

### 3. SERTによる5-HT取り込みに対する吸入麻酔薬の作用

セボフルレン (50-2000 μM) は,  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込み測定, 電気生理学的解析いずれの方法においても, 5-HTの取り込みに有意な変化は認められなかった(図7A, 7B)。イソフルレン (50-2000 μM) も, セボフルレンと同様,  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込み, 電気生理学的解析ともに有意な変化は認められなかった(図8A, 8B)。

### 4. SERTによる5-HT取り込みに対する局所麻酔薬の作用

リドカイン (10-1000 nM) は, 低濃度でSERTによる

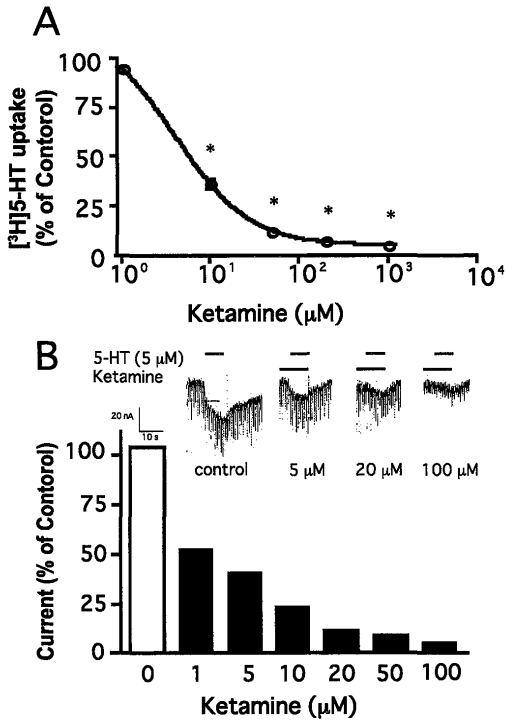


図3 SERTによる5-HT取り込みに対するケタミンの作用

(A) ケタミン (1, 10, 50, 200, 1000 μM) を含有するMBS溶液中で3分間プレインキュベーションした後、SERTによる<sup>3</sup>H]5-HTの取り込みを測定した。ケタミンは<sup>3</sup>H]5-HT取り込みを強く抑制した。IC<sub>50</sub>値は4 μMであった。(n=3, \*p<0.05)

(B) ケタミン (1, 5, 10, 20, 50, 100 μM) を含有するMBS溶液中で3分間プレインキュベーションした後、5-HT誘発電流を測定した。ケタミンは5-HT誘発電流を強く抑制した。(n=1)

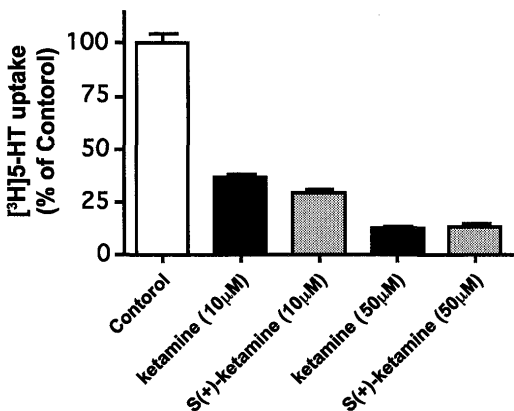


図4 ケタミンの光学異性体に関する検討  
ラセミ体およびS(+)体 (10, 50 μM) を含有するMBS溶液中で3分間プレインキュベーションした後、SERTによる<sup>3</sup>H]5-HTの取り込みを測定した。対照群と比較して、ラセミ体とS(+)体は同程度の抑制を示した。(n=3)

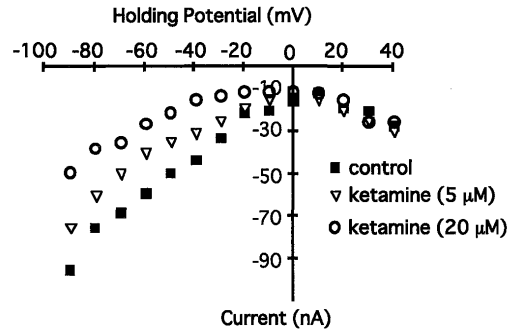


図5 ケタミン濃度と細胞膜固定電位の変化に伴う5-HT誘発電流の測定

二電極式膜電位固定法にて、卵母細胞膜の固定電位を-90 mVから40 mVまで10 mVおきに変化させ、ケタミン (5, 20 μM) を含有するMBS溶液中で5-HT誘発電流の変化を測定した。5-HT誘発電流は、ケタミンの濃度に依存して抑制された。また固定電位に依存して変化した。3回実験を行なった結果から代表的な1例を示す。

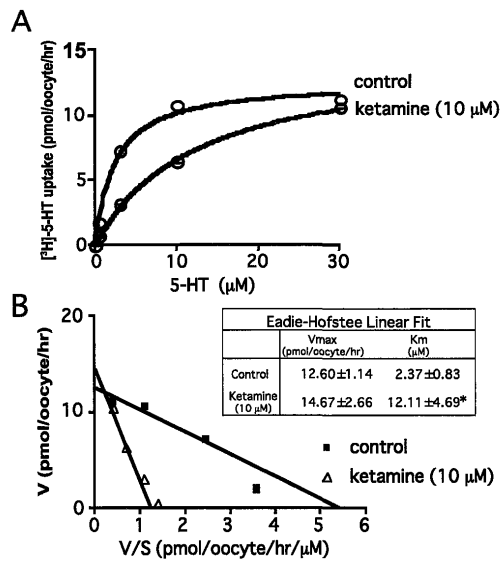


図6 ケタミンによるSERTの5-HT取り込み抑制機序の解析

(A) 5-HT濃度を0.5, 3, 10, 30 μMと変化させ、10 μMケタミンを含むMBS溶液または含まないMBS溶液中にて<sup>3</sup>H]5-HTの取り込みを測定し、基質飽和曲線を作成した。1回の実験で、1グループにつき5-8個の卵母細胞を測定し、3回実験を行なった結果から代表的な1例を示す。(B) 基質飽和曲線の結果をEadie-Hofstee解析した。対照群と比較して、ケタミン (10 μM) によりSERTの5-HTに対するKm値は有意に増加した>(\*p<0.05) (Vmax: 最大反応速度, Km値: ミカエリス定数)

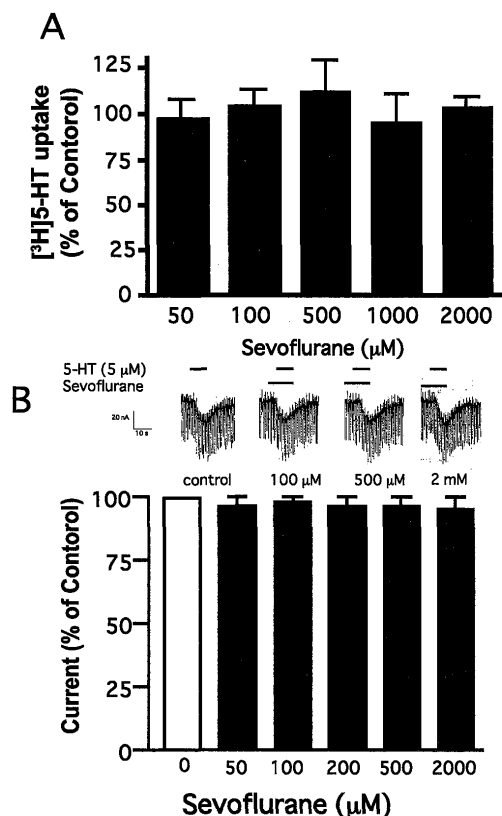


図7 SERTによる5-HT取り込みに対するセボフルレンの作用

(A) セボフルレン (50, 100, 500, 1000, 2000  $\mu\text{M}$ ) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, SERTによる $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。セボフルレンにより, SERTの $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みに変化は認められなかった。(n=3)

(B) セボフルレン (50, 100, 200, 500, 2000  $\mu\text{M}$ ) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, 5-HT誘発電流を測定した。セボフルレンにより, 5-HT誘発電流に変化は認められなかった。(n=2)

$[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みを強く抑制した。リドカインの濃度が200nMの時に約50%, 1  $\mu\text{M}$ では90%以上の抑制が認められた(図9A)。

#### 5. リドカイン作用後の5-HT誘発電流の経時的变化

SERTを発現した卵母細胞にリドカイン (10  $\mu\text{M}$ ) を作用させ, 5-HT誘発電流の経時的变化を測定した。5-HT誘発電流は, リドカイン作用後経時的 (1分, 3分, 6分) に抑制され, 8分後にほぼ完全に消失した(図9B)。

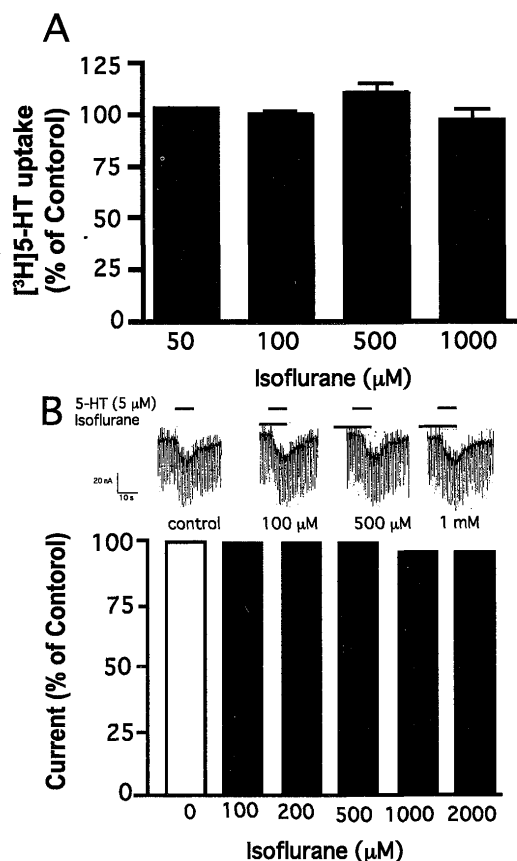


図8 SERTによる5-HT取り込みに対するイソフルレンの作用

(A) イソフルレン (50, 100, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, SERTによる $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みを測定した。イソフルレンにより, SERTの $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みに変化は認められなかった。(n=3)

(B) イソフルレン (100, 200, 500, 1000, 2000  $\mu\text{M}$ ) を含有する MBS 溶液中で3分間プレインキュベーションした後, 5-HT誘発電流を測定した。イソフルレンにより, 5-HT誘発電流に変化は認められなかった。(n=1)

#### 6. 局所麻酔薬の電荷型による膜透過性への影響に関する検討

卵母細胞膜上に発現したSERTに対し, リドカインが細胞膜の外側から作用をしているのか, 卵母細胞膜を通過した後に膜の内側から作用しているのかを検討するため, 完全電荷型の局所麻酔薬 QX314, または完全非電荷型のベンゾカインを含む MBS 溶液中で,  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。リドカイン, QX314 またはベンゾカインを含む培養液 (各 1  $\mu\text{M}$ ) 中で, SERTを発現した卵母細胞をこれまでと同様の手順でインキュベーションし,  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。その結果, リドカインのみが $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを抑制し, QX314とベンゾカインは取り込みに有意な変化を与えな

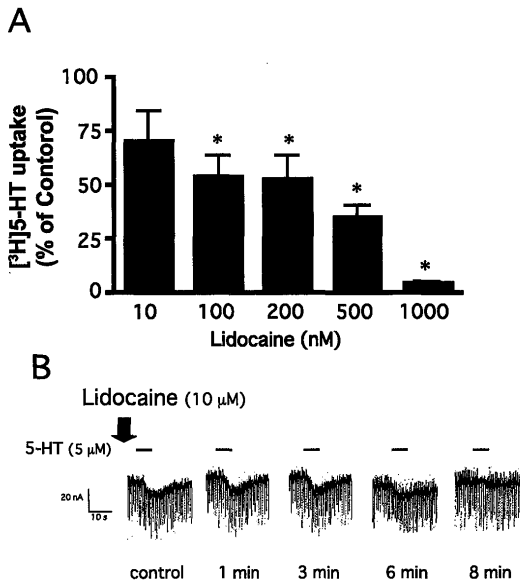


図9 SERTによる5-HT取り込みに対するリドカインの作用  
(A) リドカイン (10, 100, 200, 500, 1000 nM) を含有するMBS溶液中で3分間プレインキュベーションした後、SERTによる $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。リドカインは低濃度 (100 nM以上) で $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを有意に抑制した。(n=5, \* p<0.05)  
(B) リドカイン作用後の5-HT誘発電流の経時的变化  
SERTを発現した卵母細胞に対して、リドカイン (10 $\mu\text{M}$ ) を含有するMBS溶液を還流 (2 ml/分) させながら作用し、5-HT誘発電流の経時的变化を測定した。リドカインは経時的に5-HT誘発電流の抑制を増強し、作用開始8分後にほぼ完全な抑制が認められた。

かった (図10A)。次に各種の局所麻酔薬 (1  $\mu\text{M}$ ) を卵母細胞内に50nl直接注入し、注入5分後に $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。その結果、リドカインおよびQX314にて $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みが有意に抑制された (図10B)。

#### 7. リドカインによるSERTの5-HT取り込み抑制の作用機序の解析

リドカインによるSERTの阻害様式について検討するため、リドカイン (500 nM) を含むMBS溶液と含まないMBS溶液中の5-HT濃度を3, 10, 20, 50  $\mu\text{M}$ と変化させ、各種濃度にて $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定し、基質飽和曲線を作成した (図11A)。基質飽和曲線の結果をEadie-Hofstee解析し、 $V_{\text{max}}$ 値および $K_{\text{m}}$ 値を求めた。リドカイン (500 nM) により、SERTに対する5-HTの $V_{\text{max}}$ 値 (control;  $13.28 \pm 2.07$  pmol/oocyte/hr, lidocaine

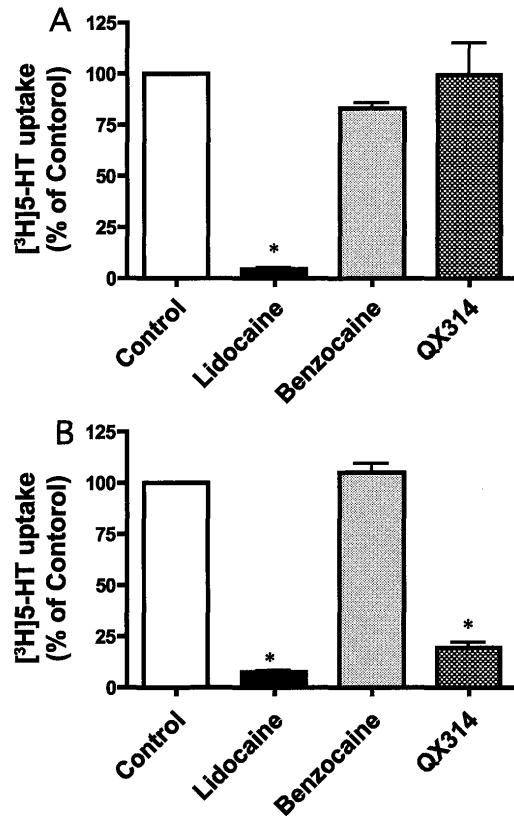


図10 局所麻酔薬の電荷型による膜透過性に対する影響  
(A) リドカイン、ベンゾカインまたはQX314を含有するMBS溶液 (各1  $\mu\text{M}$ ) 中で3分間プレインキュベーションした後、SERTによる $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。リドカインは $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを有意に抑制した。(n=5, \* p<0.05)  
(B) リドカイン、ベンゾカイン、QX314 (1  $\mu\text{M}$ , 50 nl) を卵母細胞内に定量注入し、注入5分後に $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みを測定した。リドカインとQX314は、 $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みを有意に抑制した。(n=3, \* p<0.05)

(500 nM);  $9.33 \pm 1.14$  pmol/oocyte/hr) は低下したが、 $K_{\text{m}}$ 値 (control;  $15.98 \pm 6.26$   $\mu\text{M}$ , lidocaine (500 nM);  $15.81 \pm 4.91$   $\mu\text{M}$ ) はほとんど変化しなかった (図11B)。

#### 8. SERTに対するリドカインの作用へのPKCの関与

PKC活性化剤PMAとその不活性型アナログ4 $\alpha$ -PDD, PKC阻害剤スタウロスポリンを用い、リドカインのSERT抑制作用におけるPKCの関与について検討した。その結果、4 $\alpha$ -PDDによりSERTの $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ の取り込みに変化は認められなかった。PMA (100 nM) 及びリドカイン (100  $\mu\text{M}$ ) は、それぞれ90%以上の取り込み抑制を示した。しかし、PMAにてプレインキュベーションした後にリドカインを作用させても、リドカインを単独で作用させた時と比較して、抑制程度に有意な増強は認められなかった。一方、スタウロスポリンにてプレインキュベーションした後にリドカインを作用させると、

抑制の程度が約20%減少した(図12)。

### 考 察

臨床で使用される鎮静薬や鎮痛薬には、脳内 5-HT 量の調節に影響するものがある。SSRI のほか、MAO (monoamine oxidase) 阻害薬などの抗うつ剤や、ペチジンやフェンタニルなどのオピオイド鎮痛薬などは、臨床使用濃度にてシナプス間隙の 5-HT 量を増加させることが明らかになっている<sup>8)</sup>。これら薬剤の過量投与や併用により過剰な 5-HT が蓄積すると、興奮、幻覚といった精神症状や、致死的な異常高熱を呈する重篤なセロトニン症候群を発症する。しかし、麻酔薬は精神神経機能の調節を行なうにも関わらず、SERT に対する作用についての報告はほとんど見当たらない。

ケタミンは、新皮質-視床系を抑制すると共に大脳辺縁系(海馬)を賦活化し、脳波上に解離がみられる特異な薬剤である<sup>20)</sup>。臨床的には、ケタミン麻酔の覚醒時に、患者は幻覚、せん妄、悪夢などの特徴的な精神症状を訴えることが知られている。動物実験でも、ケタミンを投与したラットは、統合失調症患者の精神症状とよく似た行動をとる<sup>21)</sup>。統合失調症には 5-HT 受容体が関与していることがすでに報告されており<sup>22, 23)</sup>、臨床症状が類似している点からも、ケタミンが脳内 5-HT に何らかの影響を与えると推測されていた。本研究において、ケタミンは SERT による  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$  取り込みを濃度依存性に強く抑制し、 $\text{IC}_{50}$  値は  $4\ \mu\text{M}$  であった(図 3 A)。電気生理学的にも 5-HT 誘発電流はほぼ同様に抑制された(図 3 B)。外科手術時に必要なケタミン有効血中濃度は  $4\text{-}15\ \mu\text{M}$ <sup>24-27)</sup> であり、精神症状を発現しやすい覚醒時の血中濃度は、これら濃度より低いと考えられる。ヒト胎児腎臓(human embryonic kidney: HEK)細胞に強制発現させた SERT では、ケタミンが取り込みを濃度依存性に抑制し、 $\text{IC}_{50}$  値は  $171\ \mu\text{M}$  であったとの報告がある<sup>28)</sup>。しかし、本研究にてケタミンが臨床濃度で SERT を抑制したことから、ケタミン麻酔の覚醒時に生じる精神症状に SERT が関与している可能性が示唆された。

ケタミンは、光学異性体 S(+ ) 体と R(- ) 体が 1 : 1 に配分されたラセミ体である。これらのアイソマーは、各種タンパクに対する親和性にも差があることが多く、ラットを用いた実験では S(+ ) 体は R(- ) 体に比べ精神症状の出現頻度が少ない<sup>29)</sup>。しかし本研究では、卵母細胞上に発現させた SERT に対して、ラセミ体と S(+ ) 体による抑制程度に有意差は認められなかった(図 4)。R(- ) 体の試薬は市販されておらず検討できなかったが、S(+ ) 体が SERT 抑制作用を持っていることが確認できた。

ケタミンが、臨床使用濃度で SERT を著明に抑制したことから、ケタミンの臨床的な作用発現に、トランスポーターを介した 5-HT の調節が何らかの役割を果たしている可能性があると考えられた。そこで  $0, 5, 20\ \mu\text{M}$  ケタミン存在下に  $-90\ \text{mV}$  から  $40\ \text{mV}$  まで  $10\ \text{mV}$  おきに電

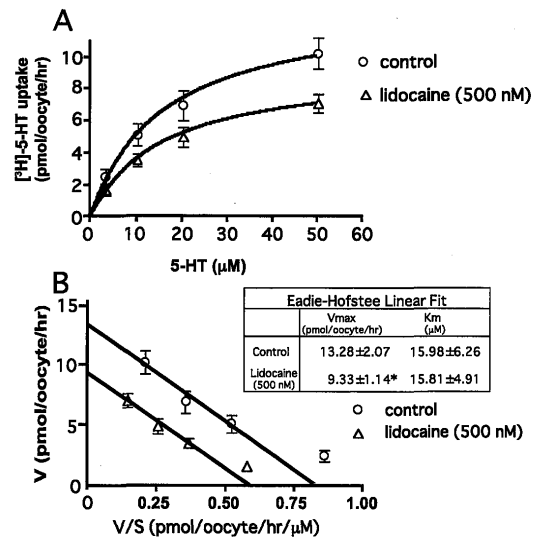


図11 リドカインによる SERT の 5-HT 取り込み抑制機序の解析

(A) 5-HT 濃度を  $3, 10, 20, 50\ \mu\text{M}$  と変化させ、 $500\ \text{nM}$  リドカインを含む MBS 溶液または含まない MBS 溶液中にて  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$  の取り込みを測定し、基質飽和曲線を作成した。1 回の実験で、1 グループにつき 5-8 個の卵母細胞を測定し、3 回実験を行なった結果から代表的な 1 例を示す。

(B) 基質飽和曲線の結果を Eadie-Hofstee 解析した。対照群と比較して、リドカイン ( $500\ \text{nM}$ ) により SERT の 5-HT に対する  $V_{\text{max}}$  値は有意に減少した。(\* $p < 0.05$ ) ( $V_{\text{max}}$ : 最大反応速度,  $K_m$  値: ミカエリス定数)

位固定し、5-HT 誘発電流を測定して電流電圧曲線を作成した。その結果、ケタミンによる 5-HT 誘発電流の抑制は濃度依存性かつ電位依存性であった(図 5)。さらに Kinetics 分析にて阻害様式を検討した結果、ケタミンは 5-HT と競合的に SERT を阻害することが示唆された(図 6)。HEK 細胞に発現させた SERT でも、ケタミンが 5-HT と競合して取り込みを抑制したとの報告<sup>13)</sup> がある。ケタミン ( $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ : 分子量 274.19) と 5-HT ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ : 分子量 176.22) の分子構造はまったく異なっており、結合部位の詳細は不明である。しかし、一次アミノ酸配列や構造などの点で SERT と相同性の高いドーパミントランスポーター (dopamine transporter: DAT) やノルアドレナリントランスポーター (norepinephrine transporter: NET) でも、ケタミンが競合的に基質取り込みを阻害したとの報告<sup>30)</sup> がある。

ペントバルビタールは、代表的な静脈内麻酔薬バルビツレート類に属し、全身麻酔の導入時に広く使用されている。ペントバルビタールは  $\gamma$ -アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid: GABA) 受容体と共役しているバルビツール酸受容体に結合し、抑制系を賦活化させ



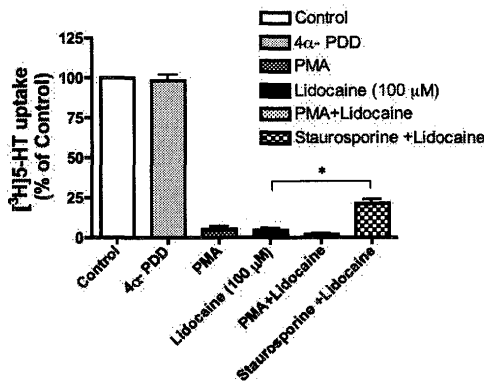


図12 SERT に対するリドカインの作用への PKC の関与

4α-PDD により, SERT の  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$  取り込みに変化は認められなかった。PMA (100 nM, 10分間) とリドカイン (100 μM, 3分間) は, SERT による  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$  の取り込みを著明に抑制した。PMA のプレインキュベーション後にリドカインを作用させると, リドカイン単独の作用と比較して抑制の有意な増強は認められなかった。しかしスタウロスポリン (1 μM, 60分間) のプレインキュベーション後にリドカインを作用させると, リドカイン単独の作用と比較して, 抑制の程度が一部拮抗された。(n=3-5, \* p<0.05)

ることで麻酔作用を発揮する<sup>31)</sup>。他の麻酔薬と同様, ペントバルビタールは様々な神経伝達物質に影響を与える可能性があるが, 本研究では高濃度でも SERT の機能に影響を与えなかった (図 1)。DAT, NET および GABA トランスポーター (GABA transporter : GAT) でもバルビツレート類は基質取り込みを抑制しない<sup>32, 33)</sup> と報告されており, 動物実験でもペントバルビタール麻酔を行なったラットの脳内 5-HT 濃度は変化しない<sup>34)</sup>。临床上でも, ペントバルビタール麻酔時に精神興奮症状は出現しないことから, 5-HT が臨床的な作用に関与している可能性は低いと考えられる。

プロポフォールは, 蓄積が少なく迅速な麻酔の導入, 覚醒が得られることから, 1986年にイギリスで臨床使用が承認されて以来, 急速に普及した静脈内麻酔薬である。プロポフォールもバルビツレート類と同様, GABA 受容体と共役した結合部位を介して麻酔作用を発現する<sup>31)</sup>。プロポフォールによる GABA 受容体の調節に伴い, 脳内の 5-HT 量の変動する<sup>35)</sup> ことから, 脳内の一部の領域では, 5-HT 神経が GABA 神経の調節を受けセロトニン量を変動させる可能性がある。しかし, プロポフォールの 5-HT 神経に対する直接作用は未だ不明な点が多い。临床上, プロポフォール麻酔に必要な有効血中濃度は 0.4 - 2 μM<sup>25, 26, 36, 37)</sup> である。本研究では, プロポフォールは臨床濃度で SERT 機能を抑制しなかった (図

2 A, 2 B)。臨床使用濃度のプロポフォールは, DAT, NET, GAT, グルタミン酸トランスポーターの機能にも有意な変化を生じない<sup>37, 38)</sup>。しかしながら, プロポフォール使用時には多幸感を生じることが多く<sup>9)</sup>, プロポフォールは複数のタンパクに非特異的に作用し, 中枢神経を興奮させているのではないかと考えられる。

吸入麻酔薬は, 静脈内麻酔薬と同様, シナプス後膜の GABA 受容体を介した抑制性伝達の増強に関与している<sup>36, 37)</sup>。しかし, その作用もまた GABA 特異的ではないことが明らかになってきた。イソフルレンは, グルタミン酸トランスポーターの機能を増強し<sup>38)</sup>, DAT を抑制する<sup>39)</sup>。しかし本研究では, セボフルレン, イソフルレンともに 2 mM と高濃度でも SERT による 5-HT 取り込み機能に変化を認めなかった (図 7 A, 7 B, 8 A, 8 B)。なおセボフルレン, イソフルレンは常温にて揮発するため,  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$  取り込み実験時にはインキュベーションを蓋付き 24穴プレート内で行ない, 可及的に濃度低下を防止した。ガスクロマトグラフィーを用いてイソフルレンの経時的濃度変化を測定すると, 10分後に約 65% の濃度低下がみられる<sup>33)</sup>。本研究の結果をこれに準じて換算しても, セボフルレン, イソフルレンは少なくとも临床上の有効血中濃度 (それぞれ 300 μM<sup>4)</sup>, 180-320 μM<sup>4, 21, 26-29)</sup> では, SERT 機能に影響を与えないと考えられる。臨床的にも, 吸入麻酔薬は精神異常などの作用を誘発することはなく, SERT に対する影響は少ないと思われる。

歯科では, 下顎孔伝達麻酔時に局所麻酔薬リドカインを使用する。この時, 血管内に誤注入してリドカイン中毒が生じると, 興奮, 痙攣などの中枢神経刺激症状が出現する。リドカインによる痙攣発症時, リドカイン血中濃度は 5 - 10 μg/ml<sup>40)</sup> (20-50 μM) である。その一方, 0.5 - 4 μg/ml (2-16 μM) の低濃度では抗痙攣作用や鎮静作用を有しており<sup>40)</sup>, リドカインは濃度により中枢神経系に対して抑制, 興奮の相反する両作用を持つ。本研究では, 临床上の抗痙攣濃度や鎮静濃度よりも低濃度 (1 μM 以下) のリドカインにより SERT 機能が抑制された (図 9 A, 9 B)。極めて低濃度のリドカインに対して SERT が鋭敏に反応し, 5-HT の取り込みを抑制した本研究の結果から, リドカインの中枢神経系に対する作用において, SERT が重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。

リドカインは, 生体内で電荷型分子と非電荷型分子が混在しており, 電荷型分子が知覚神経細胞膜の内側からナトリウムチャンネルに作用し, 興奮伝導を遮断することにより無痛状態が作り出される<sup>40)</sup>。そこでリドカインによる SERT の 5-HT 取り込み抑制作用においても, 電荷の違いによる影響があるのではないかと考えた。完全電荷型局所麻酔薬 QX314 と完全非電荷型のベンゾカインを卵母細胞の内外からそれぞれ作用させ, 混在型のリドカインと比較した。その結果, リドカインは細胞の内外

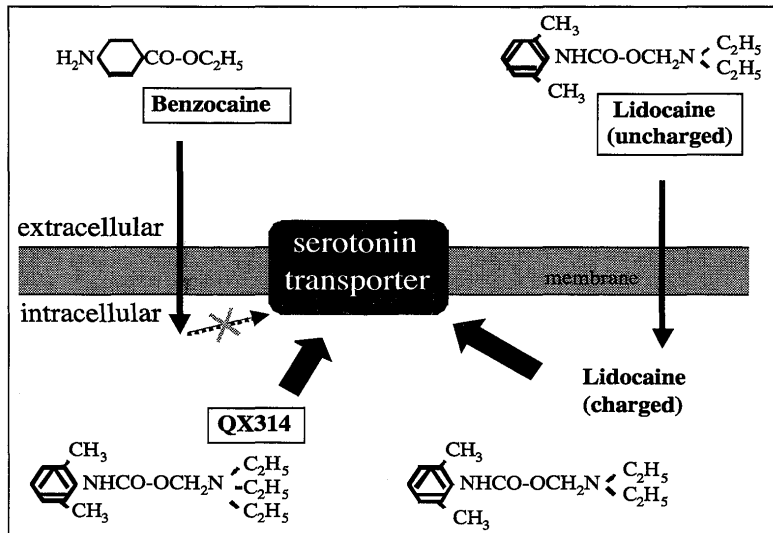


図13 局所麻酔薬の電荷の違いと SERT 抑制作用に関する推察

卵母細胞膜を透過したリドカインの非電荷型分子の内、細胞質内で電荷型となった分子が SERT に細胞膜の内側から作用し、5-HT の取り込みを抑制する。ベンゾカインは卵母細胞膜を透過するが、電荷型分子が存在しないために細胞膜の内側から作用することはできず、SERT による 5-HT の取り込みに影響しない。QX314 は非電荷型分子が存在しないため、細胞膜を透過できないが、細胞質内に直接注入されると SERT による 5-HT の取り込みを抑制すると推察される。

いずれから作用させても、 $[^3\text{H}]5\text{-HT}$  の取り込みを抑制したのに対し、QX314 は細胞内から作用させた時のみ取り込みを抑制し、細胞外からでは抑制しなかった。ベンゾカインは、細胞の内外いずれから作用させても抑制しなかった (図10)。これらの結果から、リドカインの作用点は細胞質内に存在していると考えられた。すなわち、リドカインは非電荷型分子が卵母細胞膜を透過後、電荷型となって SERT に内側から作用し 5-HT の取り込みを抑制する。ベンゾカインは、細胞膜を透過するが電荷型分子が存在しないため、膜内側から作用することができない。QX314 は、非電荷型分子が存在しないため細胞膜を透過できず、細胞外から作用させても 5-HT の取り込みを抑制しない。しかし、細胞質内に直接注入されると、5-HT の取り込みを抑制したと推察される (図13)。なお、本実験は緩衝液の pH を 7.5 に統一して行なった。しかし、緩衝液の pH によりリドカインの電荷型分子と非電荷型分子の割合が変化すると、SERT に対する抑制作用も影響を受けると考えられることから、pH による影響について今後さらに検討を加える必要がある。

SERT は 630 個のアミノ酸から成り、N 末端と C 末端を細胞質内に持ち、細胞膜を 12 回貫通した構造をしている<sup>2)</sup>。SERT の機能はリン酸化により修飾を受けるとされており、細胞内領域に PKC でリン酸化されうる部位 (セリン・スレオニン残基) が 5 ヶ所同定されている。SERT による 5-HT の取り込みが低下する場合、立体構造変化などによる SERT 自体の活性の低下や、細胞膜上に存在し機能的に働く SERT 数が減少するなどの機序が考えられる。HEK 細胞上に発現させた SERT は、PKC 活性化剤によりリン酸化が促進され、その促進作用は PKC 阻害剤で拮抗される<sup>41, 42)</sup>。また、PKC による調節を受けて SERT が細胞膜上から細胞質内へと移動 (trafficking) した結果、5-HT の取り込みが抑制された<sup>43)</sup>とも報告されている。DAT<sup>44)</sup>、GAT<sup>45)</sup>、NET<sup>46)</sup>で

も PKC を介した調節経路が報告されていることから、本研究にてアフリカツメガエル卵母細胞上に発現した SERT が抑制された機序にも、PKC によるリン酸化が関与している可能性があると考えられた。そこで、リドカインによる SERT 機能抑制のメカニズムを、PKC 活性化剤 PMA と PKC 阻害剤スタウロスポリンを用いて検討した。その結果、PMA とリドカインはそれぞれ SERT を強く抑制したが、PMA にてインキュベーションした後にリドカインを作用させても、抑制の有意な増強は認められなかった。一方、スタウロスポリンにてインキュベーションした後にリドカインを作用させると、リドカイン単独の作用時と比較して抑制は一部拮抗された (図12)。以上の結果から、リドカインによる SERT の 5-HT 取り込み抑制作用に、一部 PKC が関与している可能性があると考えられた。PMA は、細胞膜のアクチン骨格を破壊して膜安定性を失わせることにより、細胞膜上に存在する SERT の取り込み機能を抑制する<sup>47)</sup>との説もある。しかし、本研究の Kinetics 分析にてリドカインが非競合的に SERT を阻害すると示唆されたこと (図11A, 11B)、リドカインによる  $[^3\text{H}]5\text{-HT}$  取り込み抑制が PKC 阻害剤にて一部拮抗されたこと (図12)、電気生理学的解析においてリドカインが 5-HT 誘発電流を抑制するまでに時間を要したこと (図9B)、さらに SERT 以外のトランスポーターに対して、リドカインが PKC を介して基質取り込み抑制する<sup>49)</sup>との報告があることなどから、本研究にてリドカインが細胞膜内側から PKC を含むシグナル伝達系に作用し、SERT の機能を抑制した可能性があると考えられた。しかし PKC には 11 種類のアイソザイムが存在し、今回用いた PMA とスタウロスポリンが、どの PKC アイソザイムに作用するかなどの詳細は不明であり、今後の検討課題である。

## 結 論

アフリカツメガエル卵母細胞に発現した SERT に対する麻酔薬の作用について検討し、以下の結果を得た。

1. 静脈内麻酔薬の内、ペントバルビタール (5-500  $\mu\text{M}$ ) は、SERT 機能を有意に変化させなかった。プロポフォル (0.1-100  $\mu\text{M}$ ) は、SERT 機能を軽度抑制した。ケタミン (1-100  $\mu\text{M}$ ) は、低濃度で SERT 機能を競合的に抑制した。
2. 吸入麻酔薬のセボフルレン、イソフルレン (各 50-2000  $\mu\text{M}$ ) は、SERT 機能を有意に変化させなかった。
3. 局所麻酔薬のリドカイン (10-1000 nM) は、低濃度で SERT による 5-HT 取り込みを非競合的に強く抑制した。リドカインは、非電荷型分子が細胞膜を透過後に電荷型となり、膜の内側から SERT に作用したと考えられた。この抑制には一部 PKC が関与していることが示唆された。

以上より、静脈内麻酔薬ケタミンおよび局所麻酔薬リドカインは、SERT を介した 5-HT 再取り込みを抑制する可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った口腔侵襲制御学分野 中條信義教授、本研究の遂行に際し終始御指導、御教示を戴いた富岡重正助教授に心から謝意を表します。また、御校閲、御助言を戴いた口腔腫瘍制御学分野 佐藤光信教授、口腔組織学分野 羽地達次教授ならびに研究の円滑な進展のために特別の御配慮を戴いた口腔侵襲制御学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 酒井規雄：不安に関わる分子，セロトニントランスポーターの制御機構．日本精神神経薬理学雑誌24, 101-110 (2004)
- 2) 酒井規雄，白井康行，斎藤尚亮：セロトニントランスポーター．生化学72, 1215-1229 (2000)
- 3) Jacobs BL and Azmitia EC: Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72, 165-229 (1992)
- 4) Borowsky B and Hoffmann BJ: Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. *Int Rev Neurobiol* 38, 139-199 (1995)
- 5) Blakely RD, Berson HE, Freneau RT Jr, Caron MG, Peek MM, Prince HK and Bradley CC: Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 354,66-70 (1991)
- 6) Hoffman BJ, Mezey E and Brownstein MJ: Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 254, 579-80 (1991)
- 7) Rothman RB and Baumann MH: Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 479, 23-40 (2003)
- 8) Gillman PK: Monoamine oxidase inhibitors, opioid analgesics and serotonin toxicity. *Br J Anaesth* 95, 434-441 (2005)
- 9) Oxorn D, Orser B, Ferris L and Harrington E: Propofol and thiopental anesthesia: a comparison of the incidence of dreams and perioperative mood alterations. *Anesth Analg* 79, 553-557 (1994)
- 10) Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G and Grecksch G: Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 687-700 (2003)
- 11) Pacholczyk T, Blakely RD and Amara SG: Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350, 350-354 (1991)
- 12) Shimada S, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M and Uhl G: Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254, 576-578(1991)
- 13) Rothman RB and Baumann MH: Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 479, 23-40 (2003)
- 14) Gerhardt CC and van Heerikhuizen H: Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* 334, 1-23 (1997)
- 15) Hoyer D and Martin G: 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* 36, 419-428 (1997)
- 16) Glowniak JV, Kilty JE, Amara SG, Hoffman BJ and Turner FE: Evaluation of metaiodobenzylguanidine uptake by the norepinephrine, dopamine and serotonin transporters. *J Nucl Med* 34, 1140-1146 (1993)
- 17) Mayfield RD, Maiya R, Keller D and Zahniser NR: Ethanol potentiates the function of the human dopamine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 79, 1070-1079 (2001)
- 18) Elliot M. Ross: “薬力学：薬物作用の機序および薬物濃度と薬効との関係” 薬理書：薬物治療の基礎と臨床 [上巻]．Harden JG, Limbird LE, Molinoff PB, Rudden RW and Gillmann AG. 第8版，東京，廣川書店，1992，37-55.
- 19) Do SH, Fang HY, Ham BM and Zuo Z: The effects of lidocaine on the activity of glutamate transporter EAAT3: the role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Anesth Analg* 95, 1263-1268 (2003)
- 20) Domino EF, Chodoff P and Corssen G: Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man. *Clin Pharmacol Ther* 40, 279-291 (1965)
- 21) Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether

- G and Grecksch G: Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 687-700 (2003)
- 22) Matsumoto I, Inoue Y, Iwazaki T, Pavey G and Dean B: 5-HT<sub>2A</sub> and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neurosci Lett* 379, 164-168 (2005)
- 23) Alex KD, Yavarian GJ, McFarlane HG, Pluto CP and Pehek EA: Modulation of dopamine release by striatal 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Synapse* 55, 242-251 (2005)
- 24) Friederich P and Urban BW: Interaction of intravenous anesthetics with human neuronal potassium currents in relation to clinical concentrations. *Anesthesiology* 91, 1853-1860 (1999)
- 25) Furuya R, Oka K, Watanabe I, Kamiya Y, Itoh H and Andoh T: The effects of ketamine and propofol on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and P2x purinoceptors in PC12 cells. *Anesth Analg* 88, 174-180 (1999)
- 26) Friederich P, Dybek A and Urban BW: Stereospecific interaction of ketamine with nicotinic acetylcholine receptors in human sympathetic ganglion-like SH-SY5Y cells. *Anesthesiology* 93, 818-824 (2000)
- 27) Yamakura T and Harris RA: Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology* 93, 1095-1101 (2000)
- 28) Nishimura M, Sato K, Okada T, Yoshiya I, Schloss P, Shimada S and Tohyama M: Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Anesthesiology* 88, 768-774 (1998)
- 29) Liu J, Ji XQ and Zhu XZ: Comparison of psychic emergence reactions after (+/-)-ketamine and (+)-ketamine in mice. *Life Sci* 78, 1839-1844 (2006)
- 30) Nishimura M and Sato K: Ketamine stereoselectively inhibits rat dopamine transporter. *Neurosci Lett* 274, 131-134 (1999)
- 31) 佐久間泰司, 上田 裕: “麻酔薬の作用機序”. 歯科麻酔学. 古谷英毅, 松浦英夫, 雨宮義弘, 上田 裕, 金子 讓, 海野雅浩, 第5版. 東京, 医歯薬出版, 2000, 273-276.
- 32) Shahani SK, Lingamaneni R and Hemmings HC Jr: General anesthetic actions on norepinephrine, dopamine, and gamma-aminobutyric acid transporters in stably transfected cells. *Anesth Analg* 95, 893-899 (2002)
- 33) Sugimura M, Kitayama S, Morita K, Irifune M, Takarada T, Kawahara M and Dohi T: Effects of volatile and intravenous anesthetics on the uptake of GABA, glutamate and dopamine by their transporters heterologously expressed in COS cells and in rat brain synaptosomes. *Toxicol Lett* 123, 69-76 (2001)
- 34) Semba K, Adachi N and Arai T: Facilitation of serotonergic activity and amnesia in rats caused by intravenous anesthetics. *Anesthesiology* 102, 616-623 (2005)
- 35) Cechetto DF, Diab T, Gibson CJ and Gelb AW: The effects of propofol in the area postrema of rats. *Anesth Analg* 92, 934-942 (2001)
- 36) Banks MI and Pearce RA: Dual actions of volatile anesthetics on GABA(A) IPSCs: dissociation of blocking and prolonging effects. *Anesthesiology* 90, 120-134 (1999)
- 37) Jones MV and Harrison NL: Effects of volatile anesthetics on the kinetics of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 70, 1339-1349 (1993)
- 38) Huang Y and Zuo Z: Isoflurane induces a protein kinase C  $\alpha$ -dependent increase in cell-surface protein level and activity of glutamate transporter type 3. *Mol Pharmacol* 67, 1522-1533 (2005)
- 39) Votaw J, Byas-Smith M, Hua J, Voll R, Martarello L, Levey AI, Bowman FD and Goodman M: Interaction of isoflurane with the dopamine transporter. *Anesthesiology* 98, 404-411 (2003)
- 40) 雨宮義弘, 野口いずみ: “局所麻酔の作用機序, 局所麻酔薬”. 歯科麻酔学. 古谷英毅, 松浦英夫, 雨宮義弘, 上田 裕, 金子 讓, 海野雅浩, 第5版. 東京, 医歯薬出版, 2000, 159-234.
- 41) Ramamoorthy S, Giovanetti E, Qian Y and Blakely RD: Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. *J Biol Chem* 273, 2458-2466 (1998)
- 42) Ramamoorthy S and Blakely RD: Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science* 285, 763-766 (1999)
- 43) Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Risso S, DeFelice LJ and Blakely RD: Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. *J Neurosci* 17, 45-57 (1997)
- 44) Daniels GM and Amara SG: Regulated trafficking of the human dopamine transporter. Clathrin-mediated internalization and lysosomal degradation in response to phorbol esters. *J Biol Chem* 274, 35794-35801 (1999)
- 45) Corey JL, Davidson N, Lester HA, Brecha N and Quick MW: Protein kinase C modulates the activity of a cloned  $\gamma$ 2-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J Biol Chem* 269, 14759-147567 (1994)

- 46) Jayanthi LD, Samuvel DJ and Ramamoorthy S:  
Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization. *J Biol Chem* 279, 19315-19326 (2004)
- 47) Sakai N, Kodama N, Ohmori S, Sasaki K and Saito N:  
Involvement of the actin cytoskeleton in the regulation of serotonin transporter (SET) activity: possible mechanism underlying SET regulation by protein kinase C. *Neurochem Int* 36, 567-579 (2000)