

<原著>局所麻酔薬"塩酸リドカイン"はキサンチン酸化酵素の存在下で酸素ラジカル種を発生する

著者名(日)	佐藤 尚武
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	2
ページ	247-259
発行年	2002-12-31
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008756/

〔原 著〕

局所麻酔薬“塩酸リドカイン”はキサンチン酸化酵素の
存在下で酸素ラジカル種を発生する

佐藤 尚武

北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

(主任：金子 昌幸教授)

Local anesthetic “lidocaine hydrochloride” generates oxygen
radicals under coexistence with xanthine oxidase

Hisataka SATOH

Department of Dental Radiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Masayuki KANEKO)

Abstract

This study investigated whether or not lidocaine, one of the most widely used local anesthetics in dentistry, reacts with xanthine oxidase and generates superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) and/or some other oxygen radicals. A lidocaine-xanthine oxidase (LHC-XOD) reaction system was employed to make this experiment. Detection and measurement of the radicals were carried out by ESR spin trapping techniques using DMPO and M_4PO . Identification of DMPO and M_4PO adduct signals was performed by obtaining the hyperfine coupling constants (hfcc). When lidocaine was added to the LHC-XOD reaction system, the formation of $O_2^{\cdot-}$ and two other radicals were observed. From their hfcc, these two other radicals were identified to be acyl and acyloxyl radical adducts. However, in the absence of XOD, there was no radical generation.

The results obtained show that the local anesthetic “Lidocaine” reacts with xanthine oxidase and generates superoxide, acyl and acyloxyl radicals.

Key words : local anesthetic, lidocaine, xanthine oxidase, oxygen radical, electron spin resonance, spin trapping technique.

受付：平成14年9月20日

I. 緒 言

生体内での活性酸素の発生はオキシダーゼ系反応^{1,2)}や自動酸化³⁾などの内因的因子や放射線^{4,5)}、紫外線⁶⁾、有機化合物⁷⁾、重金属⁸⁾、あるいは抗癌剤⁹⁾などの外因的因子によって惹起される。日常の歯科臨床で使用される塩酸リドカインも有機化合物の一種であることから、活性酸素の発生に関与する外因的因子の一つであることが推測される。生体内においては、塩酸リドカインは脱アルキル化や加水分解によってアルデヒド類を発生する¹⁰⁾。また、生体内にはキサンチン酸化酵素 (XOD) が少量ではあるが常に存在している¹¹⁾。XODはキサンチンやヒポキサンチンと反応してスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) を発生するが、このXODはアルデヒド類とも反応し、アルデヒド酸化酵素として働き、スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) を発生することも知られている。従って、塩酸リドカインから脱アルキル化や加水分解でアルデヒド類が発生するならば、XODと反応してスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の発生を引き起こすことが十分に考えられる。 $O_2^{\cdot-}$ そのものは強い反応性は示さないが $HO\cdot$ にすみやかに変換し、発生した $HO\cdot$ が全身的あるいは局所的に種々の病的状態を引き起こすこととなる^{12,13)}。これらの反応は歯科臨床においても、重要な意味を持つものと考えられる。しかるに、塩酸リドカインと活性酸素との関係は抗酸化剤あるいは消去剤としての働きを中心に研究されているものがほとんどであり^{14,15)}、スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の発生源としての研究はほとんど認められない。今回著者は局所麻酔薬“塩酸リドカイン”がキサンチン酸化酵素の存在下でスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) を発生するか否かを、また、その他のフリーラジカルの発生をきたすか否かを実験的に検索した。

II. 材料と方法

塩酸リドカインはSigma社、キサンチン酸化酵素はBoehringer Mannheim社、キレート剤としてのDETAPAC (Diethylenetriamine-N, N, N', N'', N''-Pentaaceticacid) は和光純薬社、スピントラップ剤としてのDMPO (5, 5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) と M_4PO (3,3,5,5-Tetramethylpyrroline-N-oxide) はLabotec社、リン酸ナトリウム緩衝液PBS (Phosphate Buffer Sodium) に用いるリン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4) とリン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) は関東薬品工業社の製品をそれぞれ用いた。

実験の手順は最初に0.1M PBS (PH=7.4) で調整した2.0Mの高濃度塩酸リドカイン溶液 $50\mu l$ を0.1MのPBS (PH=7.4) で調整した5.5 mMのDETAPAC $35\mu l$ の存在下で9.2M (原液) DMPO $15\mu l$ あるいは M_4PO $100\mu l$ と混和した後に、2.0U/mlのXOD $50\mu l$ を加える順で実施した。また発生する活性酸素種の同定を行う目的で、この系に1000U/mlスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を含むPBS $50\mu l$ を添加してスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の発生があるか否かを検索することとした。

スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の発生があるか否かの検索は電子スピン共鳴装置 (ESR装置JES-FR80日本電子社製) を用いてESRスピントラッピング法で行うこととした。ESRの測定条件は周波数9.04GHz、中心磁場334.8 mT、掃引幅 ± 7.5 mT、出力20mW、変調幅 ± 0.1 mT、感度500、時定数0.1秒、掃引時間2.0分とし、測定温度は室温とした。測定はXOD添加後、正確に1分後から開始し、反応開始から3分以内で終了することとした。

ラジカルの同定は得られたESRスペクトルから超微細結合定数 (hyperfine coupling constant, hfcc) を得る方法、ならびにSODを添加

することによりシグナルが消去するか否かを確認する方法で行った。ESRによる検索の項目は(1)塩酸リドカインそのもののみでラジカルの発生があるかないか、(2)もしもラジカルの発生があるとすればそれらの同定、(3)XODの存在下での発生があるかないかの検索、以上の3項目について行った。これら(1)~(3)はダブルトラップ法で9.2MD MPO15 μ l使用群と2.0M M₄PO100 μ l使用群の2群で行うこととした。高濃度塩酸リドカインによる検索終了後に、日常の歯科臨床で用いる75mMの低濃度塩酸リドカインについても同様の手順で検索を加えた。

III. 結 果

1. 高濃度 (2.0M) 塩酸リドカイン使用群

(1) DMPO使用群

① XOD無添加 (SOD無添加) 高濃度塩酸リドカイン群

塩酸リドカインのみのESRスペクトル (対照群) では図1に示すように6本線の弱いシグナルと12本線の弱いシグナルが重複して認められた。6本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), AN=1.41mT, AH β =1.77mTが得られたことからDMPOアシルラジカルアダクト (DMPO/ \cdot C(O)R) によるものであり、12本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), AN=1.24mT, AH β =1.00mT, AH γ =0.09mTが得られたことからDMPOアシロキシルラジカルアダクト (DMPO/ \cdot OC(O)R) に由来するものであると同定された。この結果は塩酸リドカイン溶液のみでもラジカルの発生があることを示すものである。しかしDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト (DMPO/ \cdot OOH) のシグナルは認められなかった。

DMPO : +
XOD : -
SOD : -



図1 XOD無添加, SOD無添加のDMPOによる高濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

② XOD添加 (SOD無添加) 高濃度塩酸リドカイン群

XOD添加時の塩酸リドカイン溶液から得られたESRスペクトルは図2に示すように12本線の強いシグナル, 12本線の弱いシグナル, 6本線の弱いシグナルならびに4本線の弱いシグナルの4種類が重複して認められた。12本線の強いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), AN=1.43mT, AH β =1.13mT, AH γ =0.13mTが得られたことからDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト (DMPO/ \cdot OOH) によるもの^{17,18)}, 12本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), AN=1.25mT, AH β =1.00mT, AH γ =0.09mTを得たことからDMPOアシロキシルラジカルアダクト (DMPO/ \cdot OC(O)R) によるもの¹⁶⁾, 6本線のシグナルは超微細結合定数 (hfcc), AN=1.40mT, AH β =1.77mTを得たことからDMPOアシルラジカルアダクト (DMPO/ \cdot C(O)R) によるもの¹⁶⁾, 4本線のシグナルは, 超微細結合定数 (hfcc), AN=1.49mT, AH β =1.49mTが得られたことから, DMPOヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/ \cdot OH) に由来する^{17,18)}ものと同定された。

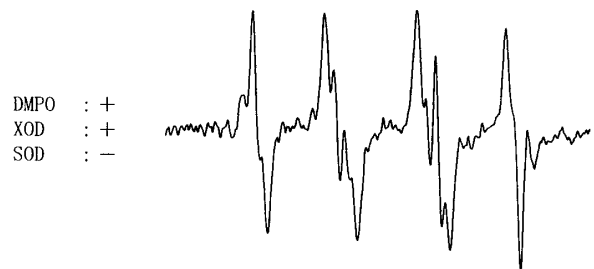


図2 XOD添加, SOD無添加のDMPOによる高濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

③ XOD添加 (SOD添加) 高濃度塩酸リドカイン群

SODの存在下でXODと塩酸リドカインを反応させて得られたESRスペクトルでは, 図3に示すようにDMPOヒドロペルオキシドラジカル (DMPO/ \cdot OOH) の12本線のシグナルは完全



図3 XOD添加, SOD添加のDMPOによる高濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

に消去され, 6本線の弱いシグナルと12本線の弱いシグナルのみが重複して認められた. 6本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.41\text{mT}$, $AH\beta=1.77\text{mT}$ を得たことから, DMPOアシルラジカルアダクト (DMPO/ $\cdot\text{C}(\text{O})\text{R}$)に由来するもの, 12本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.24\text{mT}$, $AH\beta=1.00\text{mT}$, $AH\gamma=0.09\text{mT}$ を得たことから, DMPOアシロキシラジカルアダクト (DMPO/ $\cdot\text{OC}(\text{O})\text{R}$)に由来するものと判定された¹⁶⁾. SODの存在下において, ②で見られた12本線の強いシグナルが消去されたことは, XODの存在下で塩酸リドカインが発生するラジカルはスーパーオキシドラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$)であることを示すものである.

(2) M_4PO 使用群

① XOD無添加 (SOD無添加) 塩酸リドカイン群
高濃度塩酸リドカインのXODの存在しない条件下で得られたESRスペクトルでは, 図4に示すように数種のシグナルが重複して認められるものの, ノイズ程度の強度であり超微細結合定数を得ることは不可能であった.



図4 XOD無添加, SOD無添加の M_4PO による高濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

② XOD添加 (SOD無添加) 塩酸リドカイン群
塩酸リドカインのみの対照群から得られたESRスペクトルでは, 図5に示すように6本線の強いシグナルとノイズ程度の6本線の弱いシグナルが重複して認められた. 6本線の強いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.39\text{mT}$, $AH\beta=0.64\text{mT}$ を得たことから M_4PO ヒドロペルオキシドラジカルアダクト ($\text{M}_4\text{PO}/$

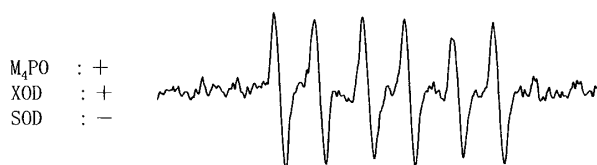


図5 XOD添加, SOD無添加の M_4PO による高濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

$\cdot\text{OOH}$)に由来するものと同定された^{19,20)}. また, 6本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.69\text{mT}$, $AH\beta=1.46\text{mT}$ を得たことから M_4PO ヒドロキシラジカルアダクト ($\text{M}_4\text{PO}/\cdot\text{OH}$)であると同定された.

③ XOD添加 (SOD添加) 塩酸リドカイン群

SODの存在下で塩酸リドカインとXODを反応させて得られたESRスペクトルでは, 図6に示すように6本線の強いシグナルが消失し, XOD無添加群と同様のノイズ程度のシグナルを認めるのみであった. このことはXOD添加で発生するラジカルがスーパーオキシドラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$)であることを証明するものであった²¹⁾.

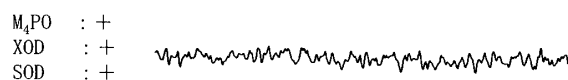


図6 XOD添加, SOD添加の M_4PO による高濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

2. 低濃度 (75mM) 塩酸リドカイン使用群

(1) DMPO使用群

① XOD無添加 (SOD無添加) 塩酸リドカイン群
臨床濃度 (75mM) の塩酸リドカインのみで得られたESRスペクトルでは図7に示す様に, 数種類のシグナルが重複して認められるものの, 強度がノイズ程度であり, 超微細結合定数による同定は不可能であった.

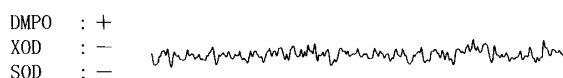


図7 XOD無添加, SOD無添加のDMPOによる低濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

② XOD添加 (SOD無添加) 塩酸リドカイン群

XODの存在下で得られたESRスペクトルでは、図8に示す様に、シグナル強度は小さいものの、12本線の強いシグナル、12本線の弱いシグナルならびに6本線の弱いシグナルが重複して認められた。12本線の強いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.43\text{mT}$, $AH\beta=1.13\text{mT}$, $AH\gamma=0.11\text{mT}$ を得たことからDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト (DMPO/ $\cdot\text{OOH}$)に由来するものと同定された^{17,18)}。12本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.26\text{mT}$, $AH\beta=1.03\text{mT}$, $AH\gamma=0.09\text{mT}$ を得たことからDMPOアシロキシルラジカルアダクト (DMPO/ $\cdot\text{OC(O)R}$)に、6本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.40\text{mT}$, $AH\beta=1.75\text{mT}$ を得たことからDMPOアシルラジカルアダクト (DMPO/ $\cdot\text{C(O)R}$)に由来することが確認された¹⁶⁾。



図8 XOD添加, SOD無添加のDMPOによる低濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

③ XOD添加 (SOD添加) 塩酸リドカイン群

SODの存在下で塩酸リドカインとXODを反応させて得られたESRスペクトルでは、図9に示すように12本線の強いシグナルの発生は認められず、ノイズ程度の2種類のシグナルが重複して認められるのみであった。2つのラジカルは12本線の弱いシグナルが超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.24\text{mT}$, $AH\beta=0.98\text{mT}$, $AH\gamma=0.09\text{mT}$ を得たことからDMPOアシロキシルラジカルアダクト (DMPO/ $\cdot\text{OC(O)R}$)に、6本線の弱いシグナルが超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.39\text{mT}$, $AH\beta=1.78\text{mT}$,

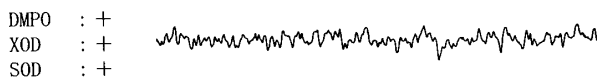


図9 XOD添加, SOD添加のDMPOによる低濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

$AH\gamma=0.09\text{mT}$ を得たことからDMPOアシルラジカルアダクト (DMPO/ $\cdot\text{C(O)R}$)にそれぞれ由来することが判明した¹⁶⁾。

(2) M_4PO 使用群

① XOD無添加 (SOD無添加) 塩酸リドカイン群
低濃度塩酸リドカインのみのXOD無添加 (SOD無添加) 群から得られたESRスペクトルでは、図10に示すようにDMPO使用群と同様にノイズ程度のシグナルを認めるのみであり、超微細結合定数を求めることは不可能であった。



図10 XOD無添加, SOD無添加の M_4PO による低濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

② XOD添加 (SOD無添加) 塩酸リドカイン群
低濃度塩酸リドカイン溶液にXODを添加して得られたESRスペクトルでは、図11に示すように、高濃度塩酸リドカイン群に比べればシグナル強度が極めて弱いものの、6本線の強いシグナルと6本線の弱いシグナルが重複して認められた。6本線の強いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.39\text{mT}$, $AH\beta=0.64\text{mT}$ を得たことから M_4PO ヒドロペルオキシドラジカルアダクト ($M_4PO/\cdot\text{OOH}$)に由来するものであると同定された¹⁹⁾。6本線の弱いシグナルは超微細結合定数 (hfcc), $AN=1.69\text{mT}$, $AH\beta=1.46\text{mT}$ を得たことから M_4PO ヒドロキシルラジカルアダクト ($M_4PO/\cdot\text{OH}$)に由来するものと同定された¹⁹⁾。



図11 XOD添加, SOD無添加の M_4PO による低濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

③ XOD添加 (SOD添加) 塩酸リドカイン群

SODの存在下で塩酸リドカインとXODを反応させて得られたESRスペクトルでは図12に示すように12本線の強いシグナルは消失し、ノイズ程度の弱いシグナルが認められるのみで

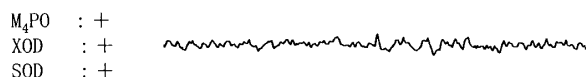


図12 XOD添加, SOD添加のM₄POによる低濃度塩酸リドカインのESRスペクトル

あった. このことからSOD無添加時XODと塩酸リドカインの反応で生じるラジカルがスーパーオキサイドラジカル(O₂^{•-})であることが確認された.

3. 塩酸リドカインとXODの反応によって生じるラジカルの経時的変化について

(1) DMPO使用群

塩酸リドカインとXODの混和後1分目から混和25分目までの経時的変化を検索して得たESRスペクトルを図13に示す. XOD添加後1分目から13分目までDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト (DMPO/•OOH) のシグナル強度は経時的に徐々に弱くなり, その後ほぼ一定の強度を呈した. これに反して, DMPOヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/•OH) の強度はXOD添加後1分目から13分目まで徐々に

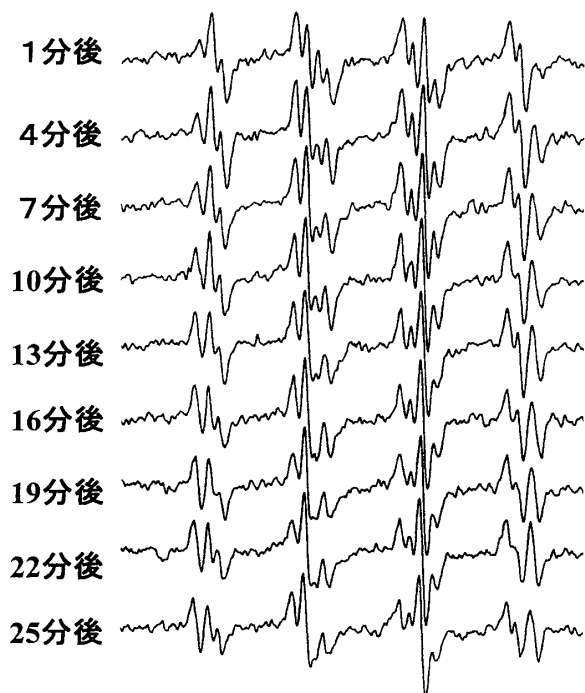


図13 XOD添加後のDMPOアダクトの経時的変化を示すESRスペクトル

強くなり, その後も強度の増大が認められた. ESRスペクトルから得られたXOD添加後1分目から13分目までのDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト (DMPO/•OOH) とDMPOヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/•OH) の標準試料 (Mn•) に対する相対信号強度 (relative signal intensity, RSI) の経時変化を表1に示す. 表1から得られたグラフは図14に示すようにDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト (DMPO/•OOH) の強度が時間の経過に伴い指数関数的に減弱し, ラジカル反応によって生じたDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト (DMPO/•OOH) であることが確認された. しかしDMPOヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/•OH) の信号強度は時間の経過に対して比例的に増強することから非ラジカル反応によるDMPOヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/•OH) であることが証明され

表1 XOD添加後のDMPOアダクトの経時的変化 (RSI)

経過時間	DMPO/•OOH	DMPO/•OH
1分後	0.29±0.02	0.08±0.02
4分後	0.15±0.01	0.14±0.01
7分後	0.12±0.02	0.20±0.01
10分後	0.09±0.04	0.24±0.01
13分後	0.08±0.02	0.28±0.01

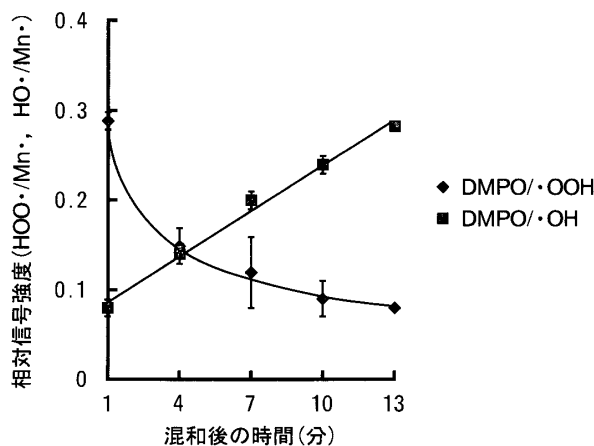


図14 DMPOアダクトの経時的変化

た²²⁾.

(2) M₄PO使用群

塩酸リドカインとXODの混和1分目から混和25分目までの経時的変化を検索して得たESRスペクトルを図15に示す。XOD添加後1分目から13分目までのM₄POヒドロペルオキシドラジカルアダクト (M₄PO/•OOH) のシグナル強度は経時的に減弱し、その後25分目まではノイズ程度のシグナル強度を示すのみであった。一方、M₄POヒドロキシルラジカルアダクト (M₄PO/•OH) のシグナルは、XOD添加後1分目から25分目までノイズ程度のシグナル強度を示すのみであった。ESRスペクトルから得られたM₄POの混和1分後から13分後までの相対信号強度 (RSI) の経時的変化を表2に示す。表2から得られたグラフは図16に示すように、M₄POヒドロペルオキシドラジカルアダクト (M₄PO/•OOH) の強度が時間の経過に対して指数関数的に減弱することからラジカル反応によって生じたものであることが確認され、M₄POヒドロキシルラジカルアダクト (M₄PO/•OH) の発生はラジカル反応でないことが確認された²²⁾。

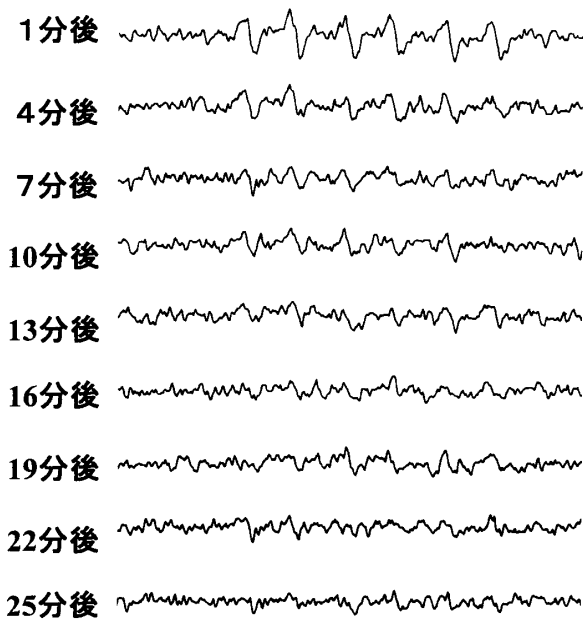


図15 XOD添加後のM₄POアダクトの経時的変化を示すESRスペクトル

表2 XOD添加後のM₄POアダクトの経時的変化 (RSI)

経過時間	M ₄ PO/•OOH	M ₄ PO/•OH
1分後	0.32±0.04	(-)
4分後	0.20±0.04	(-)
7分後	0.18±0.03	(-)
10分後	0.14±0.04	(-)
13分後	0.12±0.03	(-)

Av±SD (n=5)

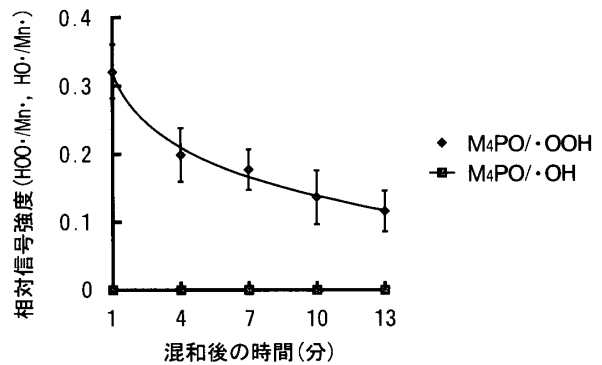


図16 M₄POアダクトの経時的変化

IV. 考 察

日常の歯科臨床で最も広く用いられている塩酸リドカインは、毒性が小さく、持続時間も比較的長いことから最も多用されている局所麻酔薬の1つである。リドカインそのものは構造式中に2つのメチル基と2つのエチル基を有するアミド型をなし、代謝の過程では脱アルキル化や加水分解を受けて、中間代謝物としてアルデヒド類を生成する¹⁰⁾。このことから生体中に存在するXODの存在下で塩酸リドカインが添加されれば、スーパーオキシドラジカル (O₂^{•-}) の発生を惹起することが十分に考えられる。今回の実験はin vitroで実施したものであるが、得られた結果について以下に考察を加える。

1. 塩酸リドカインによるスーパーオキシドラジカル (O₂^{•-}) の発生について

塩酸リドカインは構造式中に2つのメチル基と2つのエチル基を有するアミド型局所麻酔薬

である^{23,24}。生体内では主として肝で酸アミド部分が加水分解を受けてキシリジン (2,6-ジメチルアニリン) を経て、4-ヒドロキシ-2,6-ジメチルアニリンとジエチルアミノ酢酸を生成する¹⁰。主代謝物はこの4-ヒドロキシ-2,6-ジメチルアニリンである。また、別の代謝経路として脱アルキル反応によって脱エチル体を生成する¹⁰。いずれの経路でも中間代謝物としてアルデヒド類の発生を伴うことが確認されている。

一方、生体内には少量ながらも常にXODが存在していることから、プリン系の代謝で生じるヒポキサンチンやキサンチンとの反応によりスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) が常に発生していることも事実である。このXODはアルデヒド類に対してもヒポキサンチンやキサンチンに対する場合と同様の働きをして、スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) を発生することも確かめられている²⁵。これらの事実は、塩酸リドカインが生体中で脱アルキルや加水分解によってアルデヒド類を発生するとき、このアルデヒド類がXODと反応して2次的にスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) を発生する可能性を示すものである。

2. 塩酸リドカインのみ (対照群) におけるラジカル発生の有無について

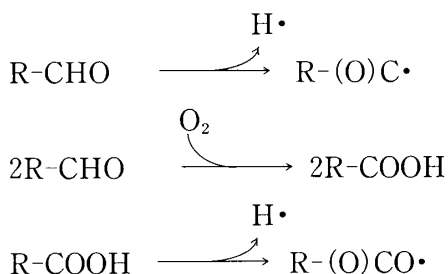
塩酸リドカイン溶液のみの状態、すなわちXODの存在しない状態ではDMPOあるいは M_4PO のどちらを用いてもDMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト ($DMPO/\cdot OOH$) あるいは M_4PO ヒドロペルオキシドラジカルアダクト ($M_4PO/\cdot OOH$) のスペクトルを得ることができなかった。これらの結果から塩酸リドカイン溶液のみではスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) の発生をきたさないと確認することができた。しかし、12本線と6本線の弱いシグナルが重複して認められたことは、塩酸リドカイン溶液そのものから数種のラジカルの発生があ

ることを示すものであった。

3. 塩酸リドカインのみ (対照群) におけるラジカル発生の機構について

塩酸リドカインのみの対照群においても2種類のラジカルが発生していることが確認された。1つはDMPOを用いたESRスペクトルにより $AN=1.25mT$, $AH\beta=1.00mT$, $AH\gamma=0.09mT$ を得たことからDMPOアシロキシラジカルアダクト ($DMPO/\cdot OC(O)R$) に、他の1つは $AN=1.40mT$, $AH\beta=1.77mT$ を得たことからDMPOアシルラジカルアダクト ($DMPO/\cdot C(O)R$) に由来していることが確認された¹⁶。これまでの文献ではチオペンタール水溶液から発生するヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) についての報告が認められる²⁶。しかし、奥富ら²⁶の使用したチオペンタールは全身麻酔薬として用いられるものであり、塩酸リドカイン等のアミド型局所麻酔薬とは異なった代謝分解経路を有するものである。また、彼らの報告で示されたESRスペクトルでは、一見DMPOヒドロキシラジカルアダクト ($DMPO/\cdot OH$) が生じているように見受けられるが、細い超微細構造が見られることから本当にDMPOヒドロキシラジカルアダクト ($DMPO/\cdot OH$) であるか否かの疑問が残ったままであった。今回のESR測定では条件を前述の如く設定した結果、塩酸リドカイン水溶液のみで得られるDMPOアダクトのシグナルは明らかにDMPOヒドロキシラジカル ($DMPO/\cdot OH$) とは異なるものであった。前述のように、これらのシグナルはDMPOアシロキシラジカルアダクト ($DMPO/\cdot OC(O)R$)、DMPOアシルラジカルアダクト ($DMPO/\cdot C(O)R$) の2つに由来していると確認したが、この発生経路として考えられることは以下のとおりである。すなわち、塩酸リドカインは酸性の条件下では安定であるとされているものの^{23,24}、光や紫外線、あるいは熱などに

よって自然に分解される可能性は否定しえない。水溶液中で常温の条件下において、脱アルキルや加水分解を受けてアルデヒド類を発生し、

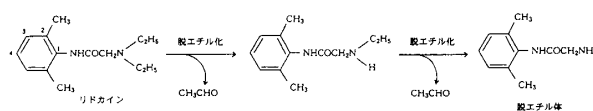


等の過程を経て、アシルラジカル (R-(O)C \cdot) とアシロキシルラジカル (R-(O)CO \cdot) とを発生したことが十分に考えられる¹⁰⁾。また、塩酸リドカイン水溶液中でシッフ反応を行ったとき、赤紫色を呈することから、R-CHOの生成が確認されたと考えられる。

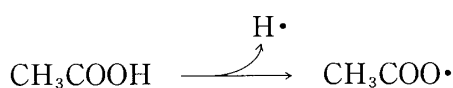
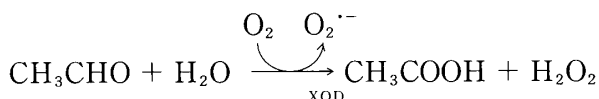
4. XOD存在下における塩酸リドカインのスーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$)の発生について

XODは分子量27500で2個のサブユニットから成り、1個のサブユニット中に1個のモリブデンイオン(Mo)と1個のFAD(flavin adenine dinucleotide)ならびに2個の非ヘム鉄硫黄タンパク質を有する酸化酵素である。この酵素はキサンチンあるいはヒポキサンチンを尿酸に酸化する過程で酸素(O $_2$)からスーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$)と過酸化水素(H $_2$ O $_2$)を生成する。XODから生成するスーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$)とH $_2$ O $_2$ の比率は条件により大きく変動することが知られている。例えば、(系に含まれる)酵素濃度が上昇するにしたがって、スーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$)の生成比率が増大し、H $_2$ O $_2$ の比率が減少する²⁵⁾。また、基質の濃度によっても変化するし、PHの変化によっても影響を受ける。キサンチンから尿酸に酸化されるまでの間に2電子が放出される。すなわちXODがキサンチンを酸化して尿酸に変

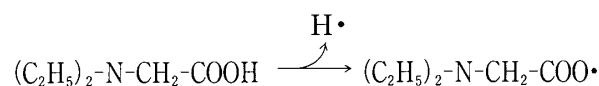
える間に、キサンチンは2電子酸化を受けて尿酸に変化する。この2電子がスーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$)生成に使われる比率が% univalent flexと呼ばれる指数であり、PH7.0の空気下では温度25°Cの条件で25~34%であるとされている。XODは基質がキサンチンやヒポキサンチンではなくアルデヒド類のときでも、この% univalent flexが30数%前後でキサンチンの場合とほぼ同等の値を示すことから、アルデヒド酸化酵素(AOD)としての作用も比較的大きいことがわかる。従って、もし塩酸リドカインが水溶液中で何らかの原因でアルデヒド類を発生すれば、XODの存在下でスーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$)の発生を惹起するのは当然のことと考えられる。すなわち、



の反応が生じ、ここで発生したアセトアルデヒド(CH $_3$ CHO)がXODの存在下で



の反応をきたしてスーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$)とCH $_3$ COO \cdot を発生する。主経路である4-ヒドロキシ-2,6-ジメチルアニリンの生成時に生じた(C $_2$ H $_5$) $_2$ -N-CH $_2$ -COOHも



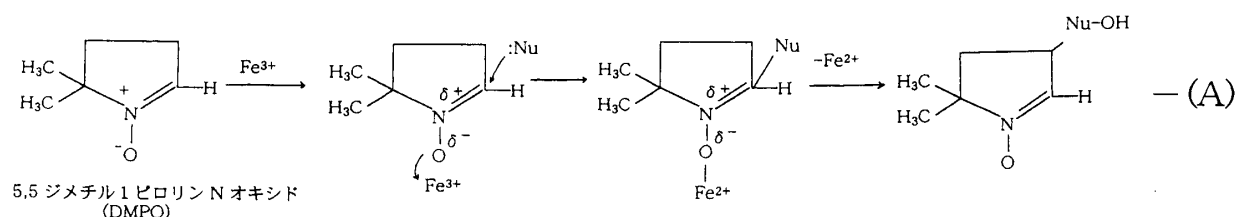
の反応を生じる可能性が大である。以上の反応で生じた2種類のアシルラジカル(R-(O)C \cdot)と2種類のアシロキシルラジカル(R-(O)CO \cdot)

が重複してESRスペクトル上に描記される。いずれにしても、塩酸リドカインが水溶液中でアルデヒド類を生成することがXODの存在下でスーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)の発生をきたす原因となるものと考えられる。しかし、本実験ではXODの濃度も塩酸リドカインの濃度も高いことからスーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)の発生が著しく見られたものの、臨床に用いる濃度や生体内でのXODの濃度が著しく低い(10^{-7} U/ml)点を考慮に入れると、日常の臨床でのスーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)の発生量は比較的少ないものと推察できる。

5. DMPOヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/•OH) のシグナルについて

塩酸リドカインとXODの反応では、一見DMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)のシグナルを認めたが、この系からヒドロキシルラジカル(•OH)が直接発生するかどうかは疑問である。もし、塩酸リドカインとXODの反応そのものからヒドロキシルラジカル(•OH)が発生するならば、ヒドロキシルラジカル(•OH)の消去剤であるDMSO(Dimethyl-sulfo-oxide)の存在下でDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)のシグナルは現れないはずである。もっとも考えられるDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)の発生理由としては、DMPOそのものと水分子との間で求核反応が生じている可能性が挙げられる。すなわち、(A)の反応によってDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)が生じたものと考えられる。

また、この系で発生したスーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)が経時的にヒドロキシルラジカル(•OH)に変換されてDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)の形で捕捉されたならば、DMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)のシグナル強度も経時的には指数関数的に増大するはずである。しかるに、図14に示すようにDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)のシグナル強度は比例的に増大していることからスーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)のヒドロキシルラジカル(•OH)への変化ではないことが推定される。このことは M_4PO を用いたときの M_4PO ヒドロキシルラジカルアダクト($M_4PO/•OH$)の経時の変化からも確認可能である。もしヒドロキシルラジカル(•OH)がこの系で発生するならば M_4PO ヒドロキシルラジカルアダクト($M_4PO/•OH$)のシグナルが認められるはずである。しかし、 M_4PO ヒドロキシルラジカルアダクト($M_4PO/•OH$)のシグナルが実際には認められないことは、この系からのヒドロキシルラジカル(•OH)の発生がないことを示すものである。また、スーパーオキシドラジカル($O_2^{\cdot-}$)が経時的にヒドロキシルラジカル(•OH)に変化するならば、 M_4PO ヒドロキシルラジカルアダクト($M_4PO/•OH$)のシグナル強度も経時的に増大するはずである。以上の結果は、この系からのヒドロキシルラジカル(•OH)の発生がないことを示すものであり、DMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/•OH)のシグナル強度の増大はDMPOの特異性による求核反応によるものと考えられた。



6. DMPOとM₄POのスーパーオキシドラジカル(O₂^{·-})の捕捉能について

DMPOはJanzenら²⁷⁾がスピントラップ剤としての有用性を報告して以来、生化学分野や医学分野におけるフリーラジカルの研究に広く用いられてきた²⁸⁻³⁴⁾。特にスーパーオキシドラジカル(O₂^{·-})やヒドロキシルラジカル(·OH)の多くの研究がDMPOを用いて行われた。しかし、DMPOヒドロペルオキシドラジカルアダクト(DMPO/·OOH)やDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/·OH)の半減期が短いこと、酵素中に含まれる金属元素のために反応が複雑化するなどの欠点が報告されてきた。これらの欠点を改良するために種々の研究がなされてきたが、Janzenら³⁵⁾によってDMPOよりも半減期が長いM₄POが開発された。M₄POはM₄POヒドロペルオキシラジカルアダクト(M₄PO/·OOH)のシグナルとM₄POヒドロキシルラジカルアダクト(M₄PO/·OH)のシグナルを明瞭に識別できることが最大の利点として挙げられる。一方、欠点としては、DMPOに比べてスーパーオキシドラジカル(O₂^{·-})やヒドロキシルラジカル(·OH)の捕捉能が低いため、より高濃度もしくはより大量の使用が要求されることである。今回M₄POを用いた理由は、DMPOでは複雑なESRスペクトルを示すスーパーオキシドラジカル(O₂^{·-})とヒドロキシルラジカル(·OH)の重複を避け、ヒドロキシルラジカル(·OH)がこの系から発生するか否かを確認するためであった。事実、塩酸リドカインとXODの反応時にM₄POを使用することでスーパーオキシドラジカルアダクト(O₂^{·-})とヒドロキシルラジカルアダクト(·OH)は明瞭に分離されヒドロキシルラジカル(·OH)の発生がないことが確認された。

一方、本実験でも確認されたが、DMPOはM₄POと比較して極めて鋭敏であることが最大の利点として挙げられる。しかし、前述のように、

水分子と反応して、すなわち求核反応を起こすことによってDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/·OH)のシグナルが現れること、それゆえヒドロキシルラジカル(·OH)の発生の有無がラジカル反応によってなされたものか否かが判定不可能なことなどが欠点として挙げられる。

以上のDMPOやM₄POの利点欠点を考慮しながら、これら両者を併用することで、より正確な同定が可能となるものと考えられる

V. 結 論

1. 塩酸リドカインは高濃度あるいは低濃度にかかわらず、キサンチン酸化酵素(XOD)の存在下でスーパーオキシドラジカル(O₂^{·-})を発生することが確認された。
2. スーパーオキシドラジカル(O₂^{·-})の発生は塩酸リドカインの脱アルキル化や加水分解で生じるアルデヒド類とキサンチン酸化酵素(XOD)が2次的に反応して惹起されると考えられた。
3. 塩酸リドカインとキサンチン酸化酵素(XOD)の反応で認められるDMPOヒドロキシルラジカルアダクト(DMPO/·OH)ならびにM₄POヒドロキシルラジカルアダクト(M₄PO/·OH)の発生はラジカル反応でないことが確認された。

以上の結果は、生体内では少量ながら常にキサンチン酸化酵素が存在することから、局所麻酔薬の使用時にはスーパーオキシドラジカル(O₂^{·-})の生成があるものと考えられ、日常の歯科臨床でも十分に注意を払う必要があるものと思われる。

謝 辞

本稿を終わるにあたり、終始、本研究遂行と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座金子昌幸教授に感謝の意を表し、

また貴重な御助言ならびに御校閲を賜った歯科麻酔学講座新家昇教授および歯科薬理学講座東城庸介教授に深謝いたします。そして本研究に対して御協力くださいました歯科放射線学講座の教室員の皆様に心から感謝いたします。

参考文献

1. 末松 誠, 土屋雅春: 微小循環障害における活性酸素の関与. 医学のあゆみ **142**: 729-732, 1987.
2. 田中寅彦, 石村 巽: オキシダーゼ-食細胞のNADPHオキシダーゼ系-1. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 2756-2762, 1988.
3. 浅田浩二, 中野 稔: 自動酸化による活性酸素生成. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 2776-2780, 1988.
4. 湯川修身, 中沢 透: 放射線障害. 日本臨床 **46**: 2262-2268, 1988.
5. 小沢俊彦: 放射線. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 2811-2817, 1988.
6. 伊藤 敦, 伊藤 隆: 可視光・紫外線 一光増感過程による活性酸素の生成-1. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 2795-2802, 1988.
7. 祖父尼俊雄, 石館 基: 変異原性と活性酸素. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 2830-2837, 1988.
8. 川西正祐, 井上純子: 重金属と過酸化水素によるヒドロキシルラジカル生成およびDNA損傷. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 2838-2843, 1988.
9. 児玉昌彦: 発癌, 抗癌剤の効果. 日本臨床 **46**: 2257-2261, 1988.
10. 山元郁男: 薬物代謝学辞典, リドカインの代謝, 469-470, 広川書店, 東京, 平成8年.
11. 志田正二編集: 化学事典, 第1版, 森北出版, 東京, 1981, 299頁.
12. Fridvich I: Superoxide Dismutases. *Advances in Enzymology*, **41**: 35-97, 1974.
13. 浅田浩二: 酸素毒性. 生化学 **48**: 226-257, 1976.
14. Peck SL, Johnston RB Jr, Horwitz LD. Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusions of lidocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, **235**: 418-422, 1985.
15. Hattori M, Dohi S, Nagaki M, Niwa M, Shimanaka H. The inhibitory effects of local anesthetics on superoxide generation of neutrophils correlate with their partition coefficients. *Anesth Analg*, **84**: 405-412, 1997.
16. Pryor WA, Gouindar CK, Church DF. Mechanism of ozonolysis of acetylenes: Evidence for a free-radical pathway for the decomposition of intermediates. *J Am Chem Soc*, **104**: 7563-7566, 1982.
17. Kohno M, Yamada M, Mitsuta K, Mizuta Y, Yoshikawa T: Spin-trapping studies on the reaction of iron complexes with peroxides and the effect of water-soluble antioxidants. *Bull Chem Soc Jpn*, **64**: 1447-1453, 1991.
18. Rosen, G M, Rauckman E J: Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical. In methods in enzymology, vol **105**: Packer L ed., *Academic Press*, Orland, 1984.
19. Buettner GR, Britigan BE. The spin trapping of superoxide with M_4PO (3,3,5,5-tetramethylpyrrolin-N-oxide). *Free Radical Biol Med*, **8**: 57-60, 1990.
20. 森 浩子, 荒井俊之, 森健次郎, 筒井宏明, 牧野圭祐. ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系におけるスピン捕捉剤 M_4PO の応用. 第15回磁気共鳴医学会講演集, 49-52, 1993 (抄).
21. McCord J.M. and Fridvich I.: Superoxide dismutase. *J Biol Chem*, **244**: 6049-6055, 1969.
22. Makino K, Hagiwara T, Hagi A, Nishi M, Murakami A. Cautionary note for DMPO spin trapping in the presence of iron ion. *Biochem Biophys Res Commun*, **172**: 1073-1080, 1990.
23. 高北義彦, 上田 裕, 新家 昇: 歯科麻酔学入門. 第2版, 第3刷, 学研書院, 東京, 1996, 92-107頁.
24. 堤 璋二 編集: 歯学薬理学. 第2版, 第1刷, 学研書院, 東京, 1981, 169-170頁.
25. 菊川清見, 桜井 弘 編集: フリーラジカルとくすり. 広川書店, 初版, 東京, 1991, 5-37.
26. 奥富俊之, 野元けい子, 中村国衛, 後藤文夫: チオペンタール水溶液から発生するヒドロキシルラジカルと生体に対する影響. 第15回磁気共鳴医学会口演集, 89-92, 1993 (抄).
27. Janzen EG, Nutter DE Jr, Davis ER, Blackburn BJ: On spin trapping hydroxyl and hydroperoxyl radicals. *Can J Chem*, **56**: 2237-2242, 1978.
28. Janzen EG: Free radicals in biology. Vol.IV, ed. by Pryor, W.A. *Academic Press*, New York, 1980, 115-154.
29. 毛老省三: 活性酸素のESRによる測定法. 蛋白質 核酸 酵素 **33**: 2693-2698, 1988.

30. 毛老省三, 池上雄作, 中野 稔: 医学および生物学者のための活性酸素ラジカルのスピントラップ法. 炎症 **5**: 3-13, 1985.
31. Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J: Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol*, **16**: 676-685, 1979.
32. Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J: Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radical with nitrones. *J Am Chem Soc*, **102**: 4994-4999, 1980.
33. Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J: Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical. Practical aspects. *Arch Biochem Biophys*, **200**: 1-16, 1980.
34. Harbour J R, Chow V, Bolton J R: An electron spin resonance study of the spin adducts of OH and HO₂ radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solution. *Can J Chem*, **53**: 3549-3553, 1974.
35. Janzen EG, Liu JIP. Radical addition reactions of 5,5-dimethyl-1-oxide. ESR spin trapping with a cyclic nitron. *J Mag Reson*, **9**: 510-512, 1973.