

氏名・(本籍)	工藤 勝 (神奈川県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第8号
学位授与の日付	平成4年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	<b>塩酸リドカインの脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP 受容体複合体に対する影響</b>
論文審査委員	主査 教授 新家 昇 副査 教授 市田 篤 郎 副査 教授 松本 仁 人

## 論文内容の要旨

### 緒 言

局所麻酔薬は歯科診療において使用頻度が非常に高く、この使用頻度に比例して起こる合併症の多くは急性中毒であり、その主な症状に中枢神経系症状としての痙攣がある。この痙攣は局所麻酔薬がGABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸) 作動性ニューロン末端からのGABA遊離抑制による脱抑制機構により発現するものと考えられている。一方、抗不安薬であるベンゾジアゼピン (BZP) 誘導体は局所麻酔薬中毒による痙攣の予防と治療に有効であることが知られている。しかし、これらの作用機序は現在注目されている脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体レベルで明らかにされていない。そこで著者は局所麻酔薬による中枢神経作用は脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に影響し、中枢神経症状を発現するのではないかと仮説をたて本研究を行なった。すなわち、ラット全脳より調整したシナプス膜可溶化画分を用いたin vitroでの実験を行い、塩酸リドカイン添加と非添加時においてBZP誘導体である[<sup>3</sup>H]フルニトラゼパムの脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に対する結合能を比較検討した。

## 実験材料および実験方法

### 1. ラット脳シナプス膜可溶化画分の調整

ウイスター系雄性ラット（体重180～220 g）を断頭屠殺後、全脳を速やかに摘出し実験に供した。シナプス膜画分はZukinらの方法に従い調整し、得られた沈渣を-80℃で24時間以上凍結保存した。凍結沈渣を融解後、1%（w/v）ノニデットP-40を用いたTaguchiらの方法により可溶化し、得られた上清を可溶化画分とした。そして、この画分は0.1%（w/v）ノニデットP-40含有50mMトリスクエン酸緩衝液（pH7.1）1Lにて16時間透析した。なお上記の全ての操作は2℃もしくは氷浴中にて行なった。

### 2. ラット脳シナプス膜可溶化画分に対する $[^3\text{H}]$ フルニトラゼパム特異的結合量の測定

脳シナプス膜可溶化画分と $[^3\text{H}]$ フルニトラゼパム結合の測定はTaguchiらの方法に従い、さらに同一条件下で塩酸リドカインを添加した。すなわち可溶化画分の0.1mlに塩酸リドカイン含有50mMトリスクエン酸緩衝液（pH7.1）を加えて全量を0.7mlとし $[^3\text{H}]$ フルニトラゼパムの最終濃度は1nMに設定して、2℃で60分間インキュベーションした。反応終了後にポリエチレングルコール添加による沈澱法とワットマンGF/Bフィルターを用いた吸引濾過法を組合せ、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターにて16時間後に測定した。スキッチャードプロット作製のため、同一量の $[^3\text{H}]$ フルニトラゼパムにBZP誘導体の非標識クロナゼパムを1nM～50nM加えて同様に実施した。非特異的結合量は非ラベル10nMクロナゼパム存在下の値とし、特異的結合量は全結合量から非特異的結合量を引いた値とした。

### 3. 蛋白定量

ラット脳シナプス膜可溶化画分の蛋白定量はBradford法により行なった。

### 4. 各実験値の統計学的検定

各実験成績は平均値あるいは平均値±標準誤差で示した。統計学的検定はWilliams-Wilcoxonの多重比較検定を行なって危険率0.05以下をもって有意差とした。

## 実験成績

### 1. 実験に使用するラット脳シナプス膜可溶化画分蛋白量の決定

$[^3\text{H}]$ フルニトラゼパムのラット脳シナプス膜可溶化画分への結合量は蛋白量に依存して増大し、蛋白量0.02mg～0.3mg/mlの範囲で結合量との間に直線性が認められた。すなわ

ち、結合実験は直線を示す部分の中間値となる蛋白量0.1mg～0.2mg/mlの範囲で実施した。

## 2. ラット脳シナプス膜可溶化画分への [<sup>3</sup>H] フルニトラゼパム結合

[<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合のスキッチャードプロット解析では、高親和性部位 ( $K_d = 0.38 \text{ nM}$ ,  $B_{\text{max}} = 0.47 \text{ pmol/mg protein}$ ) と低親和性部 ( $K_d = 2.56 \text{ nM}$ ,  $B_{\text{max}} = 0.95 \text{ pmol/mg protein}$ ) の二相性の存在を示した。

## 3. ラット脳シナプス膜可溶化画分への [<sup>3</sup>H] フルニトラゼパム結合に対する塩酸リドカインの影響

1 nM, 10 nM, 100 nM塩酸リドカインの添加は [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合を濃度依存性に減少させた。100 nM塩酸リドカイン添加は [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合を79.5%まで有意に減少させた。

## 4. ラット脳シナプス膜可溶化画分への [<sup>3</sup>H] フルニトラゼパム結合に対する塩酸リドカインの結合阻害形式

100 nM塩酸リドカイン添加時の [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合をスキッチャードプロット解析すると、高親和性部位の変化はごく僅かであった。一方、低親和性部位の $K_d$ は2.57 nMから3.02 nMへ増大し、 $B_{\text{max}}$ は0.95 (pmol/mg protein) から0.88 (pmol/mg protein) へ減少した。

## 5. GABA<sub>A</sub>受容体作動薬、Cl<sup>-</sup>による [<sup>3</sup>H] フルニトラゼパム結合増強効果に対する塩酸リドカインの影響

10 μMムシモール添加は134%と有意に増加し、100 nM塩酸リドカイン添加で104%へと有意に減少した。120 mM NaCl添加は126%と有意に増加し、その効果は100 nM塩酸リドカイン添加で107%へと有意に減少した。ムシモールとNaClの両添加は151%と有意に増加し、その効果は100 nM塩酸リドカイン添加で124%へと有意に減少した。

## 考 察

本研究で調整したラット脳シナプス可溶化画分はGABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体の機能的共軛機構を保持した状態で調整された事を確認できた。よって、本研究は評価に値するものと考えられる。

ラット脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に対する塩酸リドカインの作用を検討した結果、100 nM塩酸リドカインはBZP誘導体の受容体への結合を有意に

減少させた。この濃度は動物実験において塩酸リドカインによる痙攣誘発時の動脈血濃度よりはるかに低い濃度であった。また、スキッチャードプロット解析の実験成績からでは塩酸リドカインのBZP受容体結合におよぼす結合阻害形式を確定することはできないと考えられた。塩酸リドカインはGABA<sub>A</sub>受容体作動薬やCl<sup>-</sup>によるBZP誘導体の受容体への結合増強効果を有意に抑制した。BZP誘導体はGABA作動性ニューロンのシナプス後膜に存在するGABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体のBZP受容体に結合し、GABA作用を特異的に増強すると考えられている。この作用を塩酸リドカインが抑制したことから、塩酸リドカインとBZP誘導体は、GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体において相反する作用を示すと考えられた。また、局所麻酔薬の急性中毒により誘発される痙攣発生機序の一要因としてGABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に対する塩酸リドカインの抑制的な影響が関与している可能性が示唆された。

## 結 語

ラット脳シナプス膜可溶化画分を用いた実験を行い [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパムの脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に対する結合能を塩酸リドカイン添加と非添加において比較検討した。

1. 100nM塩酸リドカイン添加は [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合を79.5%まで有意に減少させた。スキッチャードプロット解析による高親和性部位の変化はごく僅かであった。一方、低親和性部位のK<sub>d</sub>は増大し、B<sub>max</sub>は減少した。

2. GABA<sub>A</sub>受容体作動薬、Cl<sup>-</sup>による [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合増加に対し、100nM塩酸リドカイン添加はその結合量を有意に減少した。

以上の事から、塩酸リドカインの作用は中枢神経系のGABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に対し抑制的に影響していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

局所麻酔注射は痛みを伴う歯科治療では必ず使用される。その使用頻度に比例して多く発生する合併症が局所麻酔薬中毒である。この局所麻酔薬中毒発生時最初に現われるのが中枢神経系症状の痙攣である。一方、その予防薬及び治療薬として多用されているのが抗不安薬であるベンゾジアゼピン誘導体である。局所麻酔薬の中毒症状である痙攣は局所麻酔薬がGABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸) 作動性ニューロン末端からのGABA遊離抑制による脱抑制機構により発現するものと考えられている。そこで、局所麻酔薬による中枢神経作用は、脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に影響し中枢神経症状を発現するのではないかと仮説を立て次のような研究を行なった。即ち、ラット全脳より調整したシナプス膜可溶化画分を用いたin vitroでの実験を行い、塩酸リドカイン添加と非添加時においてBZP系薬物である [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパムの脳内GABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に対する結合能を比較検討した。

その結果、100nM塩酸リドカイン添加は [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合を79.5%まで有意に減少させた。高親和性部位の変化はごく僅かであった。一方、低親和性部位のK<sub>d</sub>は増大し、B<sub>max</sub>は減少した。また、GABA<sub>A</sub>受容体作動薬、Cl<sup>-</sup>による [<sup>3</sup>H]フルニトラゼパム結合増加に対し、100nM塩酸リドカイン添加はその結合量を有意に減少した。以上のことから、塩酸リドカインの作用は中枢神経系のGABA<sub>A</sub>受容体・BZP受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に対し抑制的に影響していることが示唆された。この実験結果は局所麻酔中毒の予防及び治療薬としてのベンゾジアゼピン誘導体の作用機序を解明するために一つの重要な示唆を与える報告である。また局所麻酔薬の中枢神経系に対する作用機序を解明するために、一つの極めて重要な示唆を与える報告である。

上記の内容より、本論文は博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認める。