

〔原 著〕

酸素ラジカル発生系に及ぼす歯科用麻酔薬の影響

神田 秀治

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)

Influence of local anesthetics upon oxygen radical generation

Hideharu KANDA

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

(Chief : Prof. Masayuki KANEKO)

Abstract

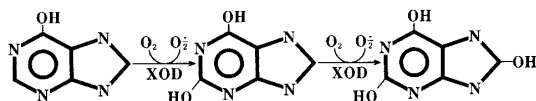
This study examined whether local anesthetics react with superoxide ($O_2^{\cdot -}$) radicals and generate other oxygen radicals. Lidocaine, mepibacaine, prilocaine, and dibucaine were used as amido type anesthetics; procaine, and tetracaine as ester type anesthetics; and epinephrine and ephedrine as epinephrine-like substances. A hypoxanthine-xanthine oxidase (HPX-XOD) reaction system was employed as the $O_2^{\cdot -}$ generator. Detection and measurements were carried out with the ESR spin trapping method. When amido type anesthetics were added with epinephrine, alkoxy ($RO\cdot$) and hydroxyl ($HO\cdot$) radical generation was confirmed, but there was no $RO\cdot$ and $HO\cdot$ generation with ephedrine. With ester type anesthetics with epinephrine, there was no $RO\cdot$ generation. The signal intensities of $RO\cdot$ and $HO\cdot$ were dependent on the concentration of anesthetics and epinephrine.

These results show that $RO\cdot$ and $HO\cdot$ generation by local anesthetics occur only where amido type anesthetics, cathecols, and ($O_2^{\cdot -}$) are present.

Key words : Local anesthetic, alkoxy radical, hydroxyl radical, epinephrine.

緒 言

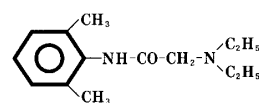
活性酸素は狭義にはスーパーオキシドラジカル (O_2^-), ヒドロキシラジカル ($HO\cdot$), 一重項酸素 (1O_2) および過酸化水素 (H_2O_2) の4種類を示すが, 有機過酸化物, 遷移金属イオンの酵素と錯体, アルコキシラジカル ($RO\cdot$) およびペルオキシラジカル ($ROO\cdot$) なども広義の活性酸素として分類されている¹⁻³⁾。生体内での活性酸素の発生はオキシダーゼ系反応^{4,5)}ならびに自動酸化⁶⁾などの内因的因子や, 放射線^{7,8)}, 紫外線⁹⁾, 有機化合物¹⁰⁾, 重金属¹¹⁾あるいは抗癌剤¹²⁾などの外因的因子によって惹起される。内因的因子の1つであるヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系反応は, 生体内に含有されるヒポキサンチンがキサンチンオキシダーゼによって尿酸に分解されるまでの過程で,



の反応を経て発生する¹³⁾。 O_2^- それ自身は強い反応性を示さないが, $HO\cdot$ に速やかに変換されるため, 発生した $HO\cdot$ が生体構成成分と拡散律速に近い速さで連鎖的に反応し, 全身的または局所的に種々の病的状態を引き起こすことになる^{14,15)}。口腔領域においても, 口腔癌や歯肉炎あるいは辺縁性歯周炎は活性酸素が一因となって生じると考えられている。

しかし, 一方では, 元来嫌気性であった生物が好気性生物へと進化する過程で, 活性酸素に対する種々の防護機構を作り上げてきた^{3,15)}。この防護機構の獲得は, 活性酸素を消去する酵素や抗酸化物を生体内で合成することが可能となった結果成されたものである。これらの酵素や抗酸化物の中で, O_2^- を消去するものとしてスーパーオキシドジスムターゼ(SOD), メタロチオネイン, グルタチオン, アスコルビン酸, α -トコフェロールあるいはエピネフリン等が

挙げられる。 O_2^- と特異的に反応するSODは不均化反応によって O_2^- を速やかに消去し, アスコルビン酸や α -トコフェロールならびにエピネフリン等は電子捕捉によって O_2^- を消去する。従って, O_2^- の発生量とこれらの消去能のバランスが崩れると種々の酸素障害を引き起こすことになる^{14,15)}。歯科用麻酔薬として最も多用されている塩酸リドカインは



の構造式を有すること, また, 通常血管収縮剤としてエピネフリンを添加して用いられていることなどの理由から, O_2^- 発生系と O_2^- 消去系のバランスを崩す原因の一つとなり得ると考えられる。 O_2^- 発生や $HO\cdot$ 発生を崩すものの一つに全身麻酔薬があり, それらによる O_2^- 発生や $HO\cdot$ 発生については比較的多くの報告¹⁷⁻³⁴⁾が認められる。しかし局所麻酔薬によるそれらの発生や消去についての報告は認められず, 発生する活性酸素種の種類, 発生量または発生する条件などの不明な点が多く残されている。

そこで, 著者は, 日常の歯科診療で最も多く使用されているエピネフリン含有塩酸リドカインが, 活性酸素種の発生系あるいは消去系にどのような影響を与えるかを検索することを目的として, 以下の実験を*in vitro*で行った。

材料と方法

実験 1

- 1) HPX-XOD系反応で発生するラジカルの同定
- 2) 塩酸リドカイン単独添加時の O_2^- 消去能の有無
- 3) エピネフリン単独添加時の O_2^- 消去能の有無
- 4) エピネフリン含有塩酸リドカイン添加時の

O_2^- 消去能の有無と新たなラジカル発生の検索

(1) O_2^- の発生

O_2^- 発生は通法に従ってヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ (HPX-XOD) 系反応を用いて化学的に行った。

(2) 手順

O_2^- の発生手順は、0.1mol PBS (pH: 7.4) でヒポキサンチン (Sigma) を 2 mmol に調整した溶液 50 μ l, キレート剤としての 5.5 mmol データパック (DETAPAK, 和光純薬) 35 μ l, 各種試薬 (藤沢薬品) 50 μ l, スピントラップ剤としての DMPO (Labotec) 15 μ l を混合し, この混合液に 0.4 U/ml のキサンチンオキシダーゼ (XOD, Boehringer Mannheim) 50 μ l を加え, 総量 300 μ l とした (表 1)。この混合液 300 μ l のうち 160 μ l をとり水晶製フラットセルに移して ESR による測定に供した。

加える各種試薬は, 90 mmol 塩酸リドカイン, 70 μ mol エピネフリン, エピネフリン (70 μ mol) 含有塩酸リドカイン (90 mmol) とした。

なお, 対照には PBS を用い, PBS はリン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4 , 関東薬品) とリン酸二水素ナトリウム (NaH_2PO_4 , 関東薬品) で調整した。

(3) 活性酸素種の検出

発生した O_2^- およびラジカルの検出は ESR 装置 (JES-FR80, 日本電子) を用い, ESR スピントラッピング法によって行った。ESR の測定条件は, 周波数: 9.04 GHz, 中心磁場: 334.5 mT,

出力: 8 mW, 掃引幅: ± 7.5 mT, 変調幅: 0.2×0.1 mT, 感度: 2×100 , 時定数: 0.1 秒, 掃引時間: 2 分, 測定温度: 室温とした (表 2)。

(4) 活性酸素種の同定

O_2^- およびラジカルの同定は得られた DMPO-アダクトのスペクトルから超微細結合定数 (hfcc) と g 値を求める方法で行った。

(5) 活性酸素種量の測定

O_2^- 発生量ならびにラジカル発生量の測定は, DMPO-アダクトの型で求め, 標準として用いた $MnO\cdot$ で得られたシグナルとの比, すなわち, 相対信号強度 (RSI) として求めた。測定はキサンチンオキシダーゼ添加後, 正確に 1 分後から開始し, 掃引時間を 2 分として, 反応開始から 3 分以内で終了した。

(6) 活性酸素種の鑑別

発生する活性酸素種の鑑別を行うために, O_2^- 発生系に 50 μ l の SOD を含む PBS 溶液 100 μ l, 50 μ l のメタノールを含む PBS 100 μ l, あるいは 50 μ l の SOD と 50 μ l のメタノールの混合液 100 μ l を加えた (表 1)。

実験 2

- 1) 塩酸リドカイン単独添加時の塩酸リドカイン濃度の相違による影響
- 2) エピネフリン単独添加時のエピネフリン濃度の相違による影響
- 3) エピネフリン含有塩酸リドカイン添加時の影響
 - (1) 塩酸リドカイン濃度の影響

表 1 材料と使用量

ヒポキサンチン	50 μ l
DETAPAC	35 μ l
試料/PBS	50 μ l
SOD/PBS	50 μ l
メタノール/PBS	50 μ l
DMPO	15 μ l
キサンチンオキシダーゼ	50 μ l
	300 μ l

表 2 ESR の測定条件

周波数	9.04 GHz
掃引幅	± 7.5 mT
出力	8.0 mW
中心磁場	334.5 mT
変調幅	0.2×0.1 mT
感度	2×100
掃引時間	2.0 min
温度	R.T.

(2) エピネフリン濃度の影響

添加する塩酸リドカインの濃度は、塩酸リドカイン単独添加時ならびにエピネフリン含有塩酸リドカイン添加時(エピネフリンは $70\mu\text{mol}$ で一定)はともに、 $10\sim 90\text{m mol}$ の 10m mol きざみとし、添加するエピネフリン濃度は、エピネフリン単独添加ならびにエピネフリン含有塩酸リドカイン添加時(塩酸リドカインは 90m mol で一定)は $10\sim 70\mu\text{mol}$ までの $10\mu\text{mol}$ きざみとした。

なお、これらの実験の対照には全てPBSを用いた。

実験 3

1) エピネフリン構造類似物質の相違による影響

2) アミド型麻酔薬とエステル型麻酔薬の相違による変化

O_2^- 発生および消去に影響を及ぼす機序を説明することを目的として、各種局所麻酔薬と各種エピネフリン構造類似物質を用いて比較した。

エピネフリン構造類似物質としては、エピネフリンとエフェドリンを塩酸リドカインにそれぞれ添加して比較する方法をとった。

局所麻酔薬としてはアミド型麻酔薬に分類される塩酸リドカイン、塩酸メピバカイン、塩酸プリロカインならびに塩酸ジブカインと、エステル型麻酔薬に分類される塩酸プロカインならびに塩酸テトラカインを用いて比較検討した。

なお、対照にはすべてPBSを使用した。

結 果

実験 1

1) HPX-XOD系反応で発生するラジカルの同定

HPX-XOD系反応で得られたESRスペクトルでは図1に示すごとく、12本線のピークを示すシグナルと4本線のピークを示すシグナルが重複して認められた。表3-aに示すごとく、12本線のピークを示すシグナルはhfccが $aN=1.41\text{mT}$, $aH\beta=1.14\text{mT}$, $aH\gamma=0.13\text{mT}$ が得られ、 $g=2.0059$ であることからDMPO- O_2^- であると同定された^{35,36)}。表3-bに示すごとく、4本線のピークを示すシグナルはhfccが $aN=1.49\text{mT}$, $aH\beta=1.48\text{mT}$ が得られ、 $g=2.0056$ であることからDMPO-OHであると同定された^{35,36)}。これらの結果から、HPX-XOD系反応で生じるラジカルは O_2^- と $\text{HO}\cdot$ であることが確認された。

なお、 O_2^- の存在しない条件下では何らの反応も生じなかった(図2)。

表3 ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系反応で発生するラジカルの超微細結合定数

(a)12本線のシグナル	(b)4本線のシグナル
$aN=1.41\text{mT}$	$aN=1.49\text{mT}$
$aH\beta=1.14\text{mT}$	$aH\beta=1.48\text{mT}$
$aH\gamma=0.13\text{mT}$	(-)
$g=2.0059$	$g=2.0056$
DMPO- O_2^-	DMPO-OH



図1 HPX-XOD系反応で発生する O_2^- ならびに $\text{HO}\cdot$ のESRスペクトル

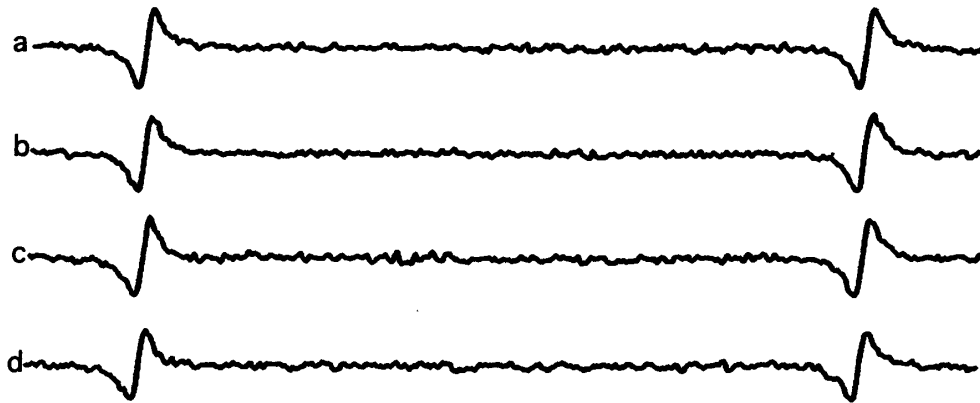


図2 O_2 の存在しない条件下で得られたESRスペクトル
 a: PBS添加(対照)群 b: 塩酸リドカイン単独添加群
 c: エピネフリン単独添加群 d: エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群

2) 対照 (PBS添加群)

塩酸リドカインならびにエピネフリンの両者ともに含まないPBS添加群では、12本線のピークを示すDMPO- $O_2^{\cdot-}$ のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルが重複して認められる(図3-a)。それぞれの相対信号強度は、RSI ($O_2^{\cdot-}$) = 2.483 ± 0.133 ならびにRSI ($HO\cdot$) = 0.583 ± 0.125 であった(表4-a)。

3) 塩酸リドカイン単独添加時の $O_2^{\cdot-}$ 消去能の有無(塩酸リドカイン単独添加群)

対照群と同様に12本線のピークを示すDMPO- $O_2^{\cdot-}$ のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルが重複して認められた(図3-b)。しかし、それぞれの相対信号強度は、RSI ($O_2^{\cdot-}$) = 1.474 ± 0.091 ならびにRSI ($HO\cdot$) = 0.365 ± 0.080 (表4-b)であり、対照群のそれら(表4-a)に比べて弱く、塩酸リドカイン単独添加群では $O_2^{\cdot-}$ の発生と $HO\cdot$ への変換を抑制していることが確認された。

4) エピネフリン単独添加時の $O_2^{\cdot-}$ 消去能の有



図3 HPX-XOD系反応による O_2 の存在下で得られたESRスペクトル
 a: PBS添加(対照)群 b: 塩酸リドカイン単独添加群
 c: エピネフリン単独添加群 d: エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群

無 (エピネフリン単独添加群)

対照群 (図3-a) ならびに塩酸リドカイン単独添加群 (図3-b) と同様に, 12本線のピークを示すDMPO-O₂のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルが重複して認められた (図3-c)。それぞれの相対信号強度はRSI(O₂)=1.654±0.196ならびにRSI(HO•)=0.467±0.070であり, 対照群のそれら (表4-a) よりは弱いものの, 塩酸リドカイン添加群のそれら (表4-b) よりは強く, 両者の中間程度であった (表4-c)。以上の結果はエピネフリン (70μmol) はO₂を還元して消去するものの, 塩酸リドカイン (90mmol) のO₂消去能よりも劣ることを示すものであった。

5) エピネフリン含有塩酸リドカイン添加時の

O₂消去能の有無 (エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群)

塩酸リドカインとエピネフリンの両者が混在するエピネフリン含有塩酸リドカインの添加では, 12本線のピークを示すDMPO-O₂のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルならびに6本線のピークを示す新たなシグナルが重複して認められた (図3-d)。この発生系にSODを加えると12本線のピークを示すDMPO-O₂のシグナルが消失し, 4本線のピークを示すシグナルと6本線のピークを示すシグナルのみが残り (図4-b), メタノールを添加すると4本線のピークを示すシグナルが消失し, 12本線のピークを示すシグナルと6本線のピークを示すシグナルのみが残った (図4-c)。

表4 塩酸リドカイン, エピネフリン, エピネフリン含有塩酸リドカイン添加による活性酸素発生量の相違

添 加	O ₂	HO•	HO• + RO•
(a)PBS (対照)	2.483±0.133	0.583±0.125	(-)
(b)塩酸リドカイン	1.474±0.091	0.365±0.080	(-)
(c)エピネフリン	1.654±0.196	0.467±0.070	(-)
(d)エピネフリン含有塩酸リドカイン	1.308±0.085	(-)	1.540±0.166

AV±SD(n=5)



図4 エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群にSOD, メタノール, SOD+メタノールを加えて得られたESRスペクトル

a: PBS添加 (対照) b: SOD添加 c: メタノール添加 d: SOD+メタノール添加

また、SODとメタノールを同時に添加すると12本線のピークを示すDMPO-O₂・のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルはともに消失し、6本線のピークを示す未同定のシグナルのみが認められた(図4-d)。6本線を示すシグナルはhfccがaN=1.44mT, aHβ=1.60mT, が得られ、g=2.0061を示す(表5-c)ことからDMPO-ORであると同定された。以上の結果からエピネフリン含有塩酸リドカインの添加によって新たに発生するラジカルはアルコキシラジカル(RO・)であることが確認された³⁵⁾。発生するDMPO-ORの相対信号強度はRSI(RO・)=0.770±0.092(表6)であり、ほぼHO・の発生量RSI(HO・)=0.738±0.067(表6)に匹敵する値であった。すなわち、エピネフリン含有塩酸リドカイン添加によってESRスペクトル上に現れるHO・とRO・が重複したシグナル(図4-a, b)の約半分がRO・であることが確認された(図4-c, d)。以上2)~5)のRSIから得られたO₂・, HO・, HO・+RO・ならびにRO・の発生量は図5および図6に示す如くであった。

表5 塩酸リドカイン単独添加, エピネフリン単独添加, エピネフリン含有塩酸リドカイン添加で発生するラジカルの同定

12本線のラジカル	4本線のラジカル	6本線のラジカル
aN=1.41mT	aN=1.49mT	aN=1.44mT
aHβ=1.14mT	aHβ=1.48mT	aHβ=1.60mT
aHγ=0.13mT	(-)	(-)
g=2.0059	g=2.0056	g=2.0061
DMPO-O ₂ ・	DMPO-OH	DMPO-OR

表6 エピネフリン含有塩酸リドカイン添加によって発生する活性酸素種に対するSOD, メタノール, SOD+メタノールの影響

添加	O ₂ ・	HO・	HO・+RO・	RO・
PBS(対照)	1.308±0.085	0.779±0.084	1.540±0.166	0.762±0.082
SOD	0.027±0.031	0.738±0.067	1.461±0.133	0.723±0.066
メタノール	0.822±0.072	(-)	(-)	0.961±0.188
SOD+メタノール	0.029±0.034	(-)	(-)	0.770±0.092

AV±SD(n=5)

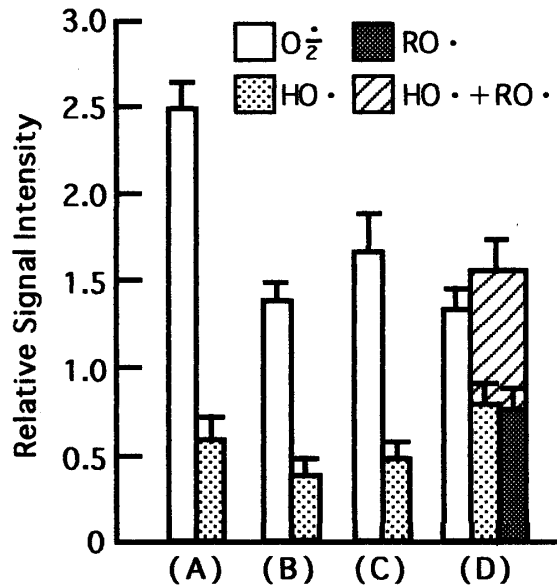


図5 HPX-XOD系反応に塩酸リドカイン, エピネフリン, エピネフリン含有塩酸リドカイン添加によって得られた活性酸素種の発生量 (A)PBS添加(対照) (B)塩酸リドカイン単独添加 (C)エピネフリン単独添加 (D)エピネフリン含有塩酸リドカイン添加

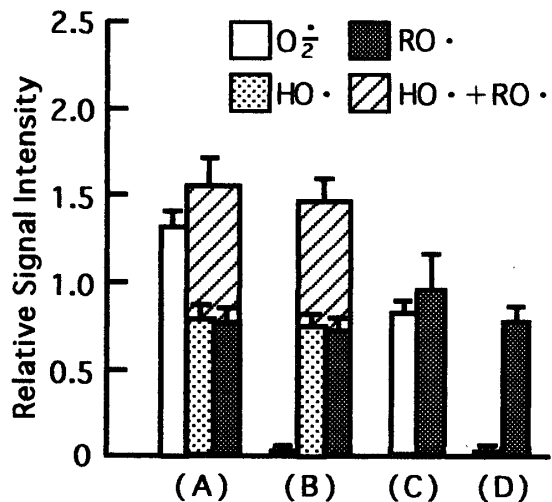


図6 HPX-XOD系反応のSOD, メタノール, SOD+メタノール添加によって得られる活性酸素種の発生量 (A)PBS添加(対照) (B)SOD添加 (C)メタノール添加 (D)SOD+メタノール添加

実験 2

1) 塩酸リドカイン単独添加時の塩酸リドカイン濃度の相違による影響

HPX-XOD系反応に10~90mmolまでの塩酸リドカイン添加を行って得られたESRスペクトルでは図7に示すごとく12本線のピークを示すDMPO-O₂のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルが重複して認められる。最上段のスペクトル(図7-a)はPBS添加のみの対照群で得られたものであり、2段目から10段目までのスペクトルは、それぞれ、10(図7-b)、20(図7-c)、30(図7-d)、40(図7-e)、50(図7-f)、60(図7-g)、70(図7-h)、80(図7-i)、90mmol(図7-j)の塩酸リドカイン添加群で得られたものである。対照群(図7-a)から90mmol添加までの範囲で、DMPO-O₂ならびにDMPO-OHの信号強度

は徐々に低下し、O₂発生量ならびにHO・発生量は塩酸リドカイン濃度の上昇に従って減少することが確認された。得られたESRスペクトルからDMPO-OO₂量ならびにDMPO-OHを相対信号強度として求めると表7のごとくであり、

表7 塩酸リドカイン単独添加群における塩酸リドカイン濃度と活性酸素種発生量

塩酸リドカイン濃度	O ₂	HO
PBS(対照)	1.875±0.161	0.394±0.038
10mmol	1.665±0.167	0.334±0.036
20	1.538±0.068	0.273±0.015
30	1.400±0.037	0.250±0.031
40	1.274±0.022	0.247±0.038
50	1.180±0.064	0.220±0.024
60	1.080±0.091	0.192±0.039
70	1.006±0.164	0.193±0.047
80	0.944±0.056	0.167±0.038
90	0.929±0.034	0.186±0.039

AV±SD(n=5)

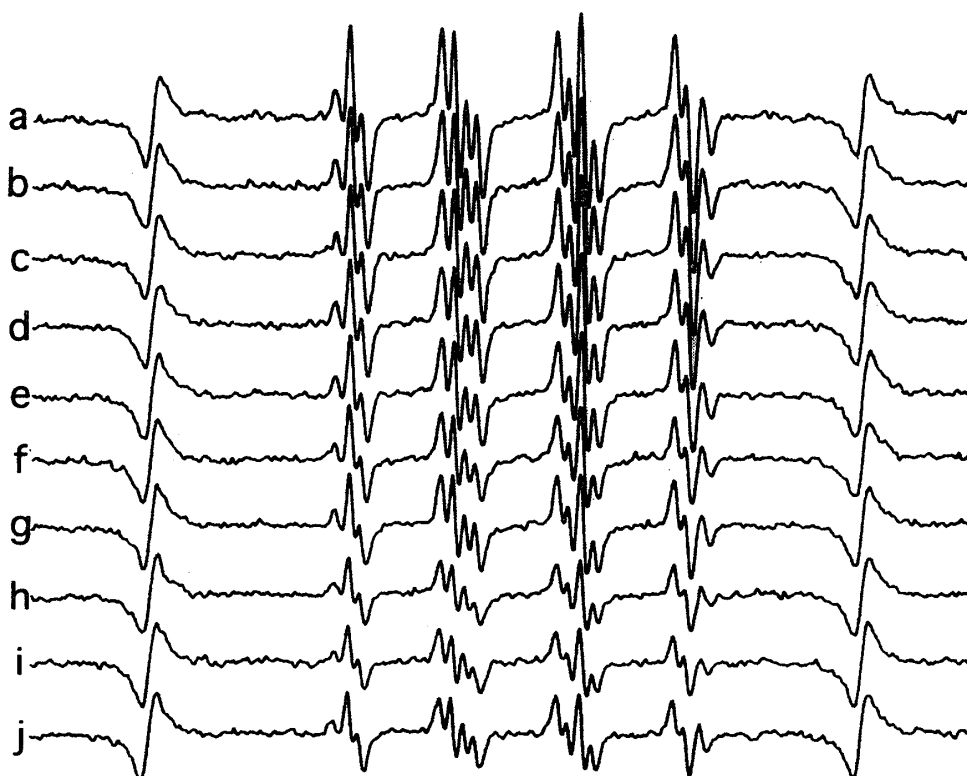


図7 塩酸リドカイン単独添加群における塩酸リドカイン濃度の相違によって得られたESRスペクトル
a: PBS b: 10mmol c: 20mmol d: 30mmol e: 40mmol f: 50mmol
g: 60mmol h: 70mmol i: 80mmol j: 90mmol

対照群のRSI ($O_2^{\cdot -}$) = 1.875 ± 0.161 , RSI (HO^{\cdot}) = 0.394 ± 0.038 から90m mol添加群のRSI ($O_2^{\cdot -}$) = 0.929 ± 0.034 , RSI (HO^{\cdot}) = 0.186 ± 0.039 へと濃度の上昇に従って減少した。表7をグラフで示すと図8のごとくであり、DMPO- $O_2^{\cdot -}$ 発生量ならびにDMPO-OH発生量ともに添加する塩酸リドカインの濃度の上昇に依存して減少することが確認された。

2) エピネフリン単独添加時のエピネフリン濃度の相違による影響

HPX-XOD系反応に10~70 μ molまでのエピネフリン添加を行って得られたESRスペクトルでは図9に示すごとく、12本線のピークを示すDMPO- $O_2^{\cdot -}$ のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルが重複して認められる。最上段のスペクトル(図9-a)はPBS添加のみの対照群で得られたものであり、2段目から8段目までのスペクトルは、それぞれ、10(図9-b)、20(図9-c)、30(図9-d)、40(図9-e)、50(図9-f)、60(図9-g)、70 μ mol(図9-h)のエピネフリン添加群で得られたものである。対照群(図9-a)から30 μ mol添

表8 エピネフリン単独添加群における添加濃度の相違による活性酸素種発生量の変化

エピネフリン濃度	$O_2^{\cdot -}$	HO
PBS(対照)	2.125 ± 0.213	0.509 ± 0.042
10 μ mol	2.200 ± 0.098	0.336 ± 0.034
20	2.386 ± 0.131	0.404 ± 0.055
30	2.490 ± 0.143	0.035 ± 0.045
40	2.297 ± 0.094	0.345 ± 0.038
50	2.245 ± 0.073	0.333 ± 0.018
60	2.103 ± 0.150	0.311 ± 0.030
70	2.065 ± 0.127	0.260 ± 0.048

AV \pm SD(n=5)

加群(図9-d)までの範囲では添加するエピネフリンの濃度の上昇につれて信号強度の上昇が認められるが、40 μ mol添加群(図9-e)から70 μ mol添加群(図9-h)の範囲で信号強度は徐々に低下することが確認された。得られたESRスペクトルからDMPO- $O_2^{\cdot -}$ 量ならびにDMPO-OH量を相対信号強度として求めると表8のごとくなり、対照群のRSI ($O_2^{\cdot -}$) = 2.125 ± 0.213 , RSI (HO^{\cdot}) = 0.509 ± 0.042 から30 μ mol添加群のRSI ($O_2^{\cdot -}$) = 2.490 ± 0.143 , RSI (HO^{\cdot}) = 0.035 ± 0.045 へと、それぞれ緩やかな増加を示すものの、40 μ mol添加群からRSI

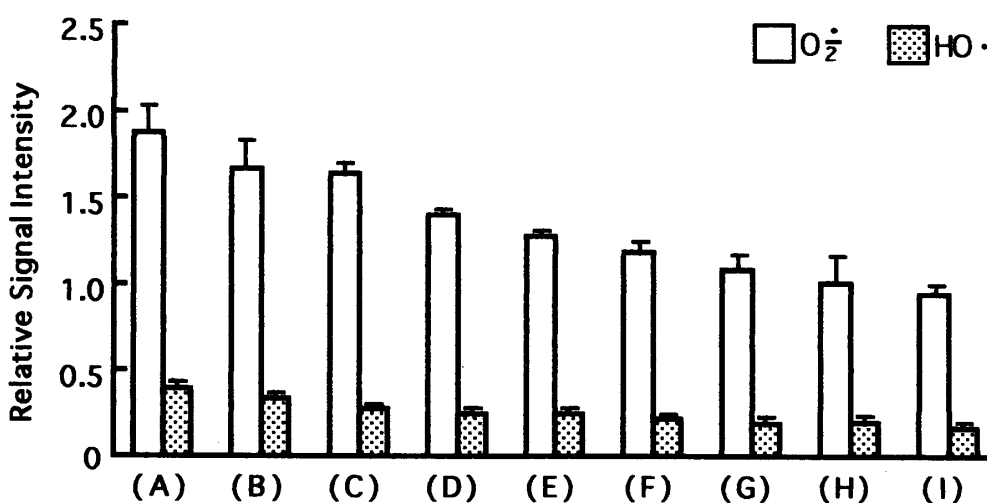


図8 塩酸リドカイン単独添加群の添加濃度の相違による活性酸素種発生量の変化 (A)PBS添加(対照) (B)10m mol添加 (C)20m mol添加 (D)30m mol添加 (E)40m mol添加 (F)50m mol添加 (G)60m mol添加 (H)70m mol添加 (I)80m mol添加 (J)90m mol添加

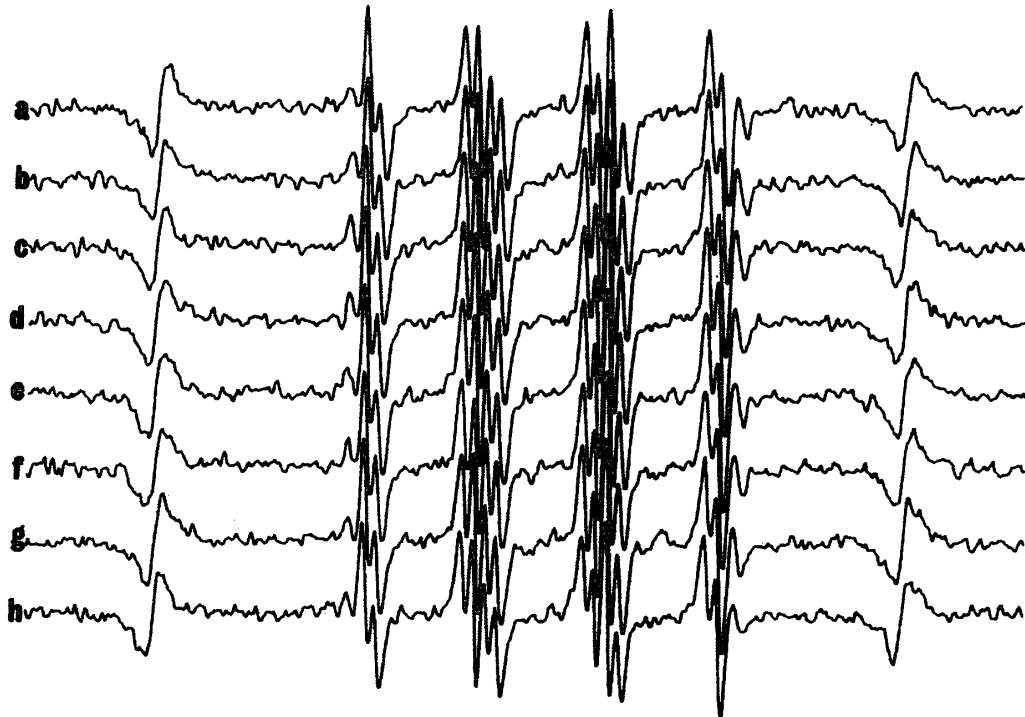


図9 エピネフリン単独添加群におけるエピネフリン濃度の相違によって得られたESRスペクトル
 a : PBS b : 10 μ mol c : 20 μ mol d : 30 μ mol e : 40 μ mol f : 50 μ mol
 g : 60 μ mol h : 70 μ mol

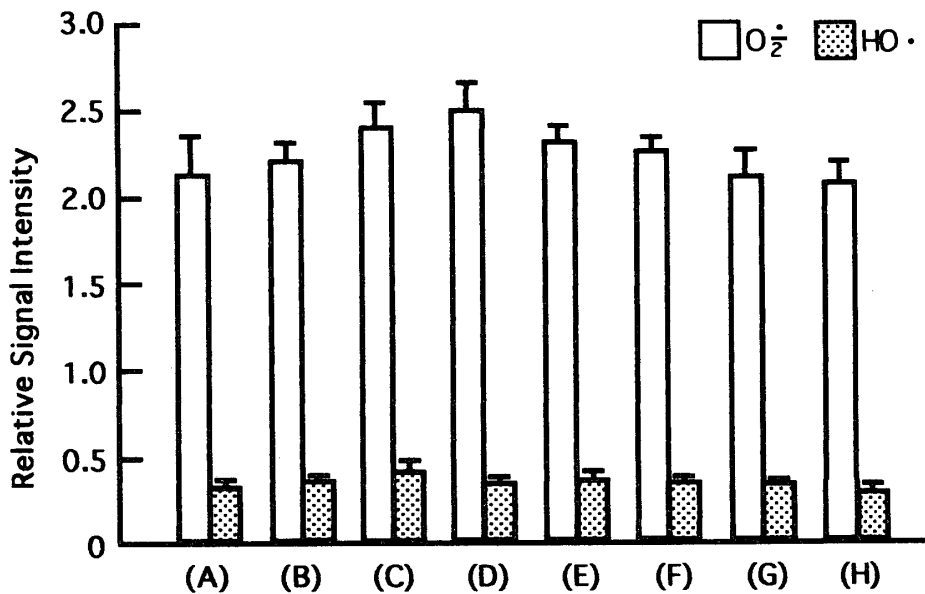


図10 エピネフリン単独添加群の添加濃度の相違による活性酸素種発生量の変化
 (A)PBS添加 (対照) (B)10 μ mol添加 (C)20 μ mol添加 (D)30 μ mol添加
 (E)40 μ mol添加 (F)50 μ mol添加 (G)60 μ mol添加 (H)70 μ mol添加

($O_2^{\cdot-}$) = 2.297 ± 0.094 , RSI ($HO\cdot$) = 0.345 ± 0.038 へとそれぞれ減少し, 70 μ mol添加群では RSI($O_2^{\cdot-}$) = 2.065 ± 0.127 , RSI($HO\cdot$) = $0.260 \pm$

0.048と対照群より小さい値となった。表8をグラフにすると図10のごとくであり, エピネフリンは $O_2^{\cdot-}$ 消去を行うものの, 70 μ molの程度では

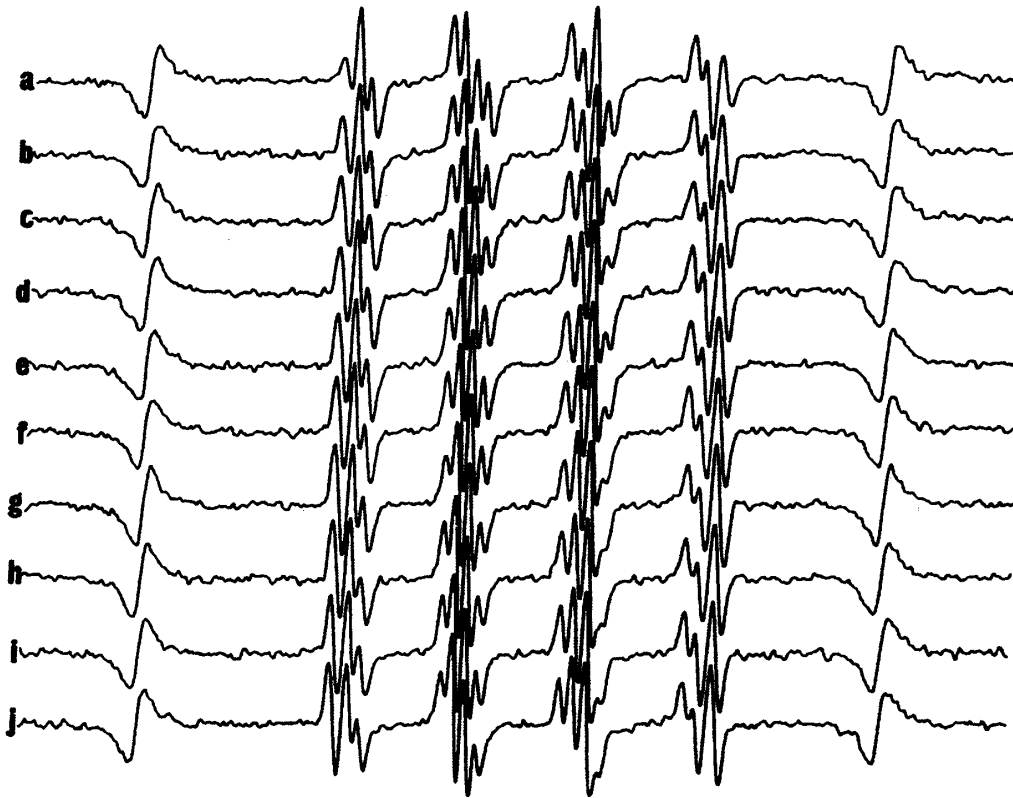


図11 エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群における塩酸リドカイン濃度の相違によって得られたESRスペクトル (エピネフリン濃度: $70\mu\text{mol}$ で一定)
 a : PBS b : 10m mol c : 20m mol d : 30m mol e : 40m mol f : 50m mol
 g : 60m mol h : 70m mol i : 80m mol j : 90m mol

その消去能は比較的小さいことが確認された。

3) エピネフリン含有塩酸リドカイン添加時の塩酸リドカイン濃度の相違による影響

エピネフリン含有塩酸リドカイン中の塩酸リドカイン濃度を臨床で用いる $70\mu\text{mol}$ で一定とし、塩酸リドカインの濃度のみを $10\sim 90\text{mol}$ まで変えて得られたスペクトルを図11に示す。最上段のスペクトル (図11-a) はPBS添加のみの対照群から得られたものであり、2段目から10段目までのスペクトルは、それぞれ、10 (図11-b)、20 (図11-c)、30 (図11-d)、40 (図11-e)、50 (図11-f)、60 (図11-g)、70 (図11-h)、80 (図11-i)、90m mol (図11-j) の塩酸リドカインを含有したエピネフリン含有塩酸リドカイン添加群から得られたものである。対照群 (図11-a) では12本線のピークを示すDMPO

- O_2^- のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルが重複して認められるのみであり、 $70\mu\text{mol}$ のエピネフリン単独添加群 (図3-c) と同様のスペクトルが得られ、ほぼ同等の信号強度を示した。しかるに、 $10\sim 90\text{mol}$ の塩酸リドカインがこの系に添加され、塩酸リドカインとエピネフリンが共存する状態では、DMPO- O_2^- とDMPO-OHのシグナルに、新たな6本線のピークを持つシグナルが重複して認められた (図11-b~j)。また、DMPO-OHの増大が、DMPO-ORと重複して認められた。エピネフリン濃度が $70\mu\text{mol}$ での一定条件で塩酸リドカイン濃度のみを変化させると、発生するDMPO- O_2^- の信号強度は30m mol添加群まで増大するものの、40m mol添加群から徐々に減弱し、90m mol添加群では対照群のそれよりも弱

表9 エピネフリン含有塩酸リドカイン濃度の相違による活性酸素種発生量の変化

塩酸リドカイン濃度	O ₂ ^{•-}	HO [•]	HO [•] + RO [•]	RO [•]
PBS(対照)	1.565±0.162	0.284±0.081	(-)	(-)
10mmol	1.557±0.190	0.425±0.096	0.941±0.172	0.417±0.094
20	1.600±0.159	0.543±0.069	1.084±0.132	0.532±0.068
30	1.614±0.204	0.638±0.120	0.263±0.203	0.626±0.118
40	1.544±0.133	0.672±0.040	1.330±0.078	0.658±0.040
50	1.483±0.148	0.735±0.067	1.433±0.138	0.721±0.066
60	1.498±0.134	0.726±0.035	1.445±0.093	0.718±0.042
70	1.418±0.174	0.770±0.051	1.525±0.150	0.755±0.050
80	1.358±0.078	0.776±0.055	1.511±0.119	0.774±0.061
90	1.353±0.132	0.798±0.031	1.594±0.067	0.782±0.030

AV±SD(n=5) エピネフリン濃度70μmol

くなった。一方、HO[•]とRO[•]の発生量は添加する塩酸リドカイン濃度の上昇につれて信号強度が増大することが確認された。得られたESRスペクトルからDMPO-O₂^{•-}とDMPO-OHならびにDMPO-ORの発生量を相対信号強度として求めると表9のごとくとなり、添加濃度の上昇に従ってHO[•]とRO[•]は増加することが確認された。表9をグラフにすると図12のごとくとなり、DMPO-O₂^{•-}発生量の変化はエピネフリン単独添加における濃度の変化と同様の傾向を示した。

4) エピネフリン含有塩酸リドカイン添加時のエピネフリン濃度の相違による影響

エピネフリン含有塩酸リドカイン中の塩酸リドカイン濃度を臨床で用いる90mmolで一定とし、エピネフリン濃度のみを10~70μmolまで変えて得られたESRスペクトルを図13に示す。最上段のスペクトル(図13-a)はPBS添加のみの対照群から得られたものであり、2段目から8段目までのスペクトルは、それぞれ、10(図13-b), 20(図13-c), 30(図13-d), 40(図13-e), 50(図13-f), 60(図13-g), 70μmol(図

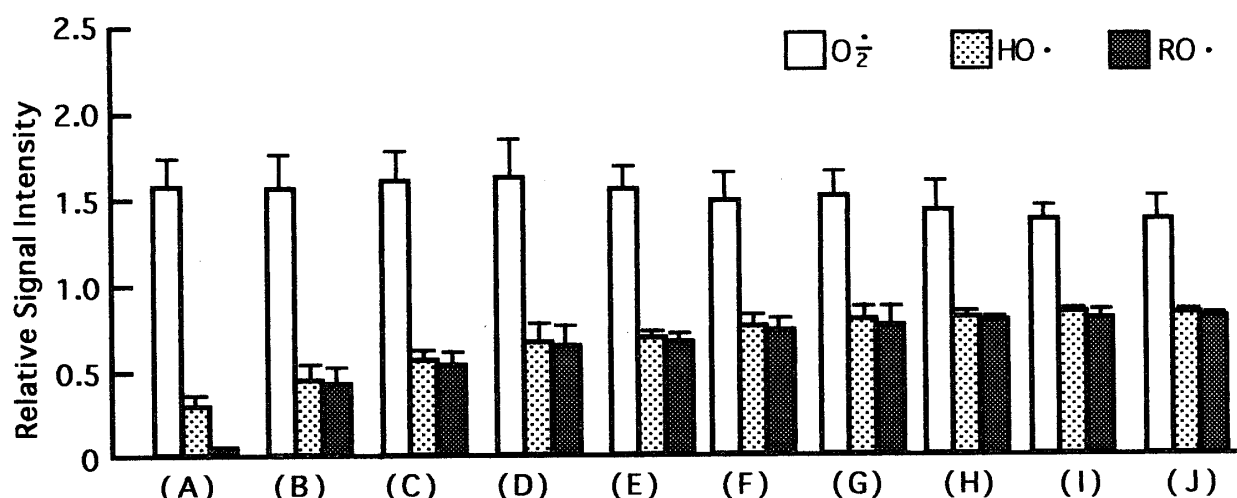


図12 エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群の塩酸リドカイン濃度の相違による活性酸素種発生量の変化 (エピネフリン: 70μmolで一定)
 (A)PBS添加(対照) (B)10mmol (C)20mmol (D)30mmol (E)40mmol (F)50mmol (G)60mmol
 (H)70mmol (I)80mmol (J)90mmol

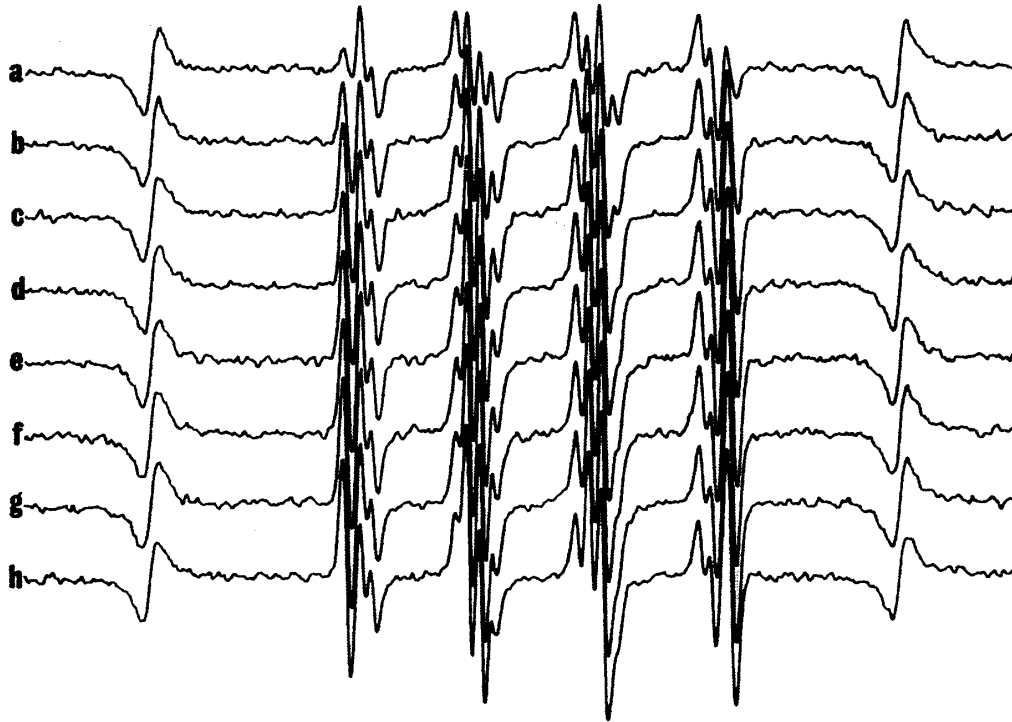


図13 エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群におけるエピネフリン濃度に相違によって得られたESRスペクトル (塩酸リドカイン: 90 μmol で一定)
 a : PBS添加 b : 1 μmol c : 20 μmol d : 30 μmol e : 40 μmol f : 50 μmol g : 60 μmol
 h : 70 μmol

13-h) のエピネフリンを含んだエピネフリン含有塩酸リドカイン添加群から得られたものである。対照群 (図13-a) では12本線のピークを示すDMPO-O₂·のシグナルと4本線のピークを示すDMPO-OHのシグナルが重複して認められるのみであり、90 μmol の塩酸リドカイン単独添加群 (図3-b) と同様のスペクトルが得られ、ほぼ同等の信号強度を示した。しかし、10 μmol から70 μmol のエピネフリンがこの系に添加されると、エピネフリン含有塩酸リドカイン中の塩酸リドカイン濃度のみの相違時と同様に、これら二者の信号と重複して、6本線のピークを示す新たなシグナルがDMPO-OHと重なって認められた (図13-b~h)。6本線の新たなシグナルは超微細結合定数からDMPO-ORであると同定された。DMPO-O₂·の信号強度はエピネフリン濃度40 μmol までは徐々に増強されるものの、50 μmol 添加群から再び減弱傾向を

示した。これに対してDMPO-ORとDMPO-OHの重複したシグナルは、エピネフリン濃度の上昇に従って増強されることが確認された。得られたESRスペクトルからDMPO-O₂·, DMPO-OHならびにDMPO-ORの発生量を相対信号強度として求めると表10のごとくなり、O₂·発生量とHO·発生量およびRO·発生量は添加するエピネフリン濃度に大きく依存することが判明した。表10をグラフで表すと図14のごとくなり、エピネフリン含有塩酸リドカイン添加時の、それぞれの濃度変化では、同様の傾向を示すことが確認された。

5) エピネフリン含有塩酸リドカイン添加によって生じる新たなラジカルの鑑別

エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群から得られたESRスペクトルは図4-aに示すごとく、12本線のピークを示すシグナルと4本線のピークを示すシグナルならびに6本線のピーク

表10 エピネフリン含有塩酸リドカインのエピネフリン濃度の相違による活性酸素種発生量の変化

エピネフリン濃度	O ₂ ^{•-}	HO [•]	HO [•] + RO [•]	RO [•]
PBS(対照)	1.348±0.100	0.470±0.118	(-)	(-)
10mmol	1.423±0.117	0.808±0.140	1.539±0.206	0.792±0.102
20	1.532±0.110	1.054±0.130	2.086±0.203	1.033±0.101
30	1.521±0.120	1.115±0.122	2.208±0.241	1.093±0.119
40	1.531±0.123	1.258±0.146	2.491±0.289	1.233±0.143
50	1.485±0.051	1.332±0.158	2.619±0.311	1.296±0.154
60	1.429±0.100	1.423±0.147	2.818±0.291	1.395±0.144
70	1.413±0.126	1.438±0.140	2.848±0.276	1.410±0.137

AV±SD(n=5) 塩酸リドカイン濃度90mmol

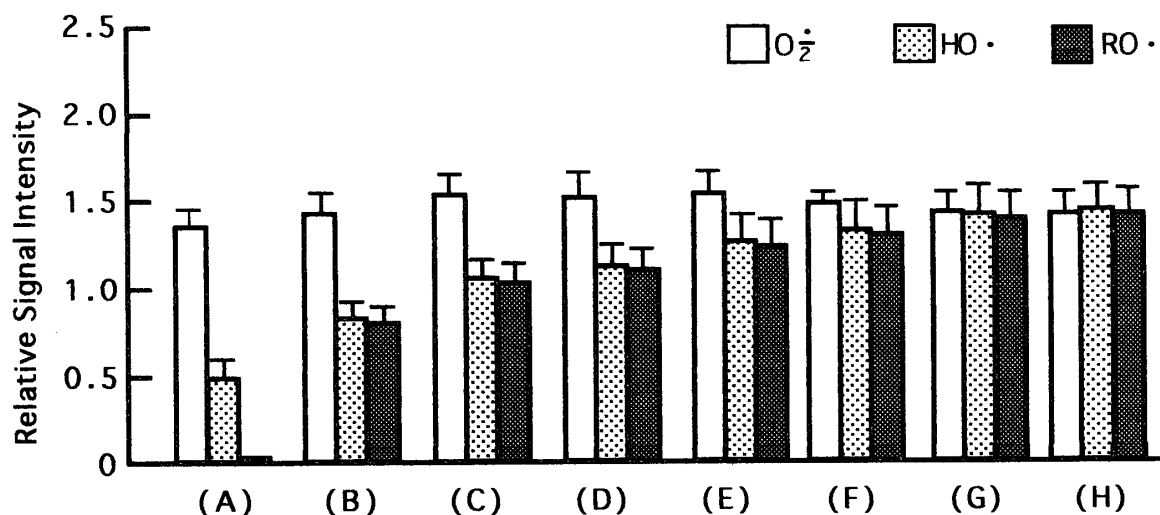


図14 エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群におけるエピネフリン濃度の相違によって得られたESRスペクトル (塩酸リドカイン: 90mmolで一定)
 (A)PBS添加 (対照) (B)10μmol添加 (C)20μmol添加 (D)30μmol添加 (E)40μmol添加
 (F)50μmol添加 (G)60μmol添加 (H)70μmol添加

を示すシグナルが重複して認められた。この発生系にSODを加えると12本線のピークを示すシグナルが消去され、4本線のピークを示すシグナルと6本線のピークを示すシグナルのみが認められた(図4-b)。また、メタノールの添加を行うことによって4本線のピークを示すシグナルは消去され、12本線と6本線のピークを示すシグナルのみが残った(図4-c)。さらに、SODとメタノールの混合液を添加すると12本線のピークを示すシグナルと4本線のピークを示すシグナルはともに消去され、6本線のピークを示すシグナルのみが残った(図4-d)。

残った6本線のピークを示すシグナルはhfccが $aN=1.44\text{mT}$, $aH\beta=1.60\text{mT}$ が得られ、 $g=2.0061$ を示すことからDMPO-ORであると同一定された(表5-c)。以上の結果から、エピネフリン含有塩酸リドカイン添加によって生じる新たなラジカルはアルコキシラジカル(RO[•])であることが確認された。

実験3

- 1) エピネフリン構造類似物質の相違によるラジカル発生の有無
 エピネフリン含有塩酸リドカイン添加ならば

にエピネフリン様構造を示すエフェドリンを含むエフェドリン含有塩酸リドカイン添加によって得られたESRスペクトルを図15に示す。PBS添加のみの対照群(図15-a)では12本線のピークを示すDMPO-O₂のシグナルと4本線のピークを示す極めて弱いDMPO-OHのシグナルが認められるのみであるが、エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群(図15-b)ではこれらの他に6本線ピークを示すDMPO-ORのシグナルが重複して認められ、DMPO-OHのシグナル強度の増大も顕著であった。しかし、エフェドリン含有塩酸リドカイン添加群(図15-c)では、対照群(図15-a)と同様のスペクトルを示し、DMPO-ORのシグナルは認められなかった。エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群のESRスペクトルから得られたDMPO-O₂とDMPO-OHならびにDMPO-ORの相対信号強度は表11-bに示すごとく、RSI(O₂)=1.754±0.210,

RSI(HO·)=1.312±0.147, RSI(RO·)=2.595±0.291が求められた。また、エフェドリン含有塩酸リドカイン添加群のESRスペクトルからは、表11-cに示すごとく、RSI(O₂)=1.697±0.141, RSI(HO·)=0.438±0.169のみが求められ、対照群のESRスペクトルから得られたそれらとほぼ同様の傾向を示した。表11をグラフで表すと図16のごとくなり、対照群(図16-A)に比べてエフェドリン含有塩酸リドカイン添加群(図16-C)ではO₂発生量は低下が認められるものの、RO·の発生は認められなかった。これに対してエピネフリン含有塩酸リドカイン添加群(図16-B)ではRO·の発生とHO·の増加が認められ、それら両者はほぼ等しい発生量であった。

2) アミド型麻酔薬添加とエステル型麻酔薬添加によるRO·発生量の変化
エピネフリン含有アミド型麻酔薬添加群なら

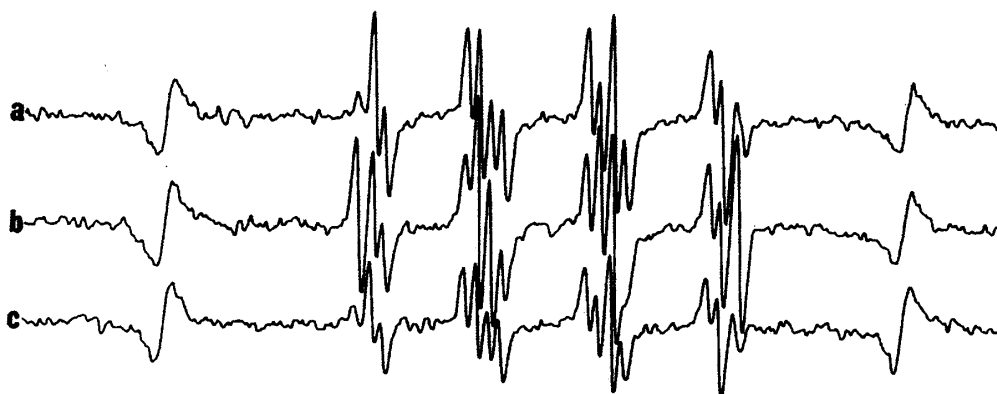


図15 エピネフリン構造類似物質の添加で得られる活性酸素種発生量の相違

a : PBS添加 (対照)
b : エピネフリン含有塩酸リドカイン
c : エフェドリン含有塩酸リドカイン

表11 エピネフリン含有塩酸リドカイン, エフェドリン含有塩酸リドカイン添加による活性酸素種発生量の相違

添 加	O ₂	HO·	HO·+RO·	RO·
(a)PBS(対照)	2.424±0.170	0.571±0.151	(-)	(-)
(b)エピネフリン含有塩酸リドカイン	1.754±0.210	1.312±0.147	1.283±0.144	2.595±0.291
(c)エフェドリン含有塩酸リドカイン	1.697±0.141	0.438±0.169	(-)	(-)

AV±SD(n=5)

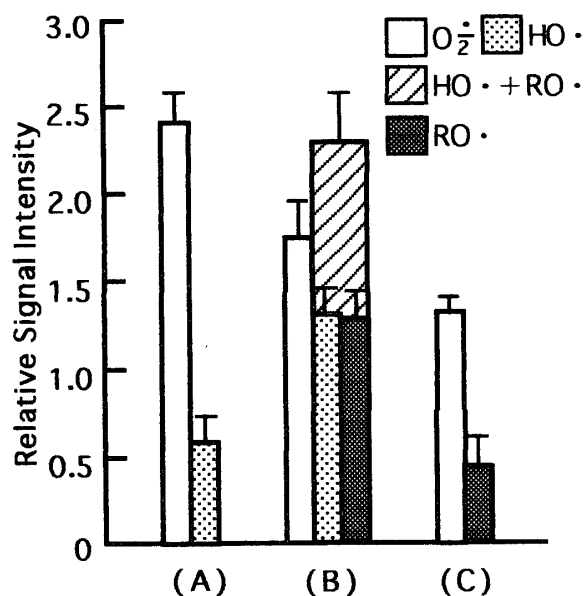


図16 エピネフリン構造類似物質の添加で得られる活性酸素種発生量の相違

- (A) PBS添加 (対照)
 (B) エピネフリン (70 μ mol) 含有塩酸リドカイン (90m mol) 添加
 (C) エフェドリン (70 μ mol) 含有塩酸リドカイン (90m mol) 添加

びにエピネフリン含有エステル型麻酔薬添加群から得られたESRスペクトルを図17に示す。エピネフリン含有塩酸リドカイン添加群 (図17-a), エピネフリン含有塩酸メピバカイン添加群 (図17-b), エピネフリン含有プリロカイン添加群 (図17-c) から得られたESRスペクトルでは, 4本線のピークを示すDMPO-OHの信号強度の増強と6本線のピークを示すDMPO-ORの発生を認める。これらはいずれもアミド型麻酔薬の添加によるものであるが, アミド型麻酔薬として分類されるエピネフリン含有塩酸ジブカイン添加群 (図17-d) では, DMPO-OHの信号強度の増強とDMPO-ORの発生はともに認められなかった。エピネフリン含有塩酸プロカイン添加群 (図17-e) ならびにエピネフリン含有塩酸テトラカイン添加群 (図17-f) のエステル型麻酔薬添加群から得られたスペクトルでは, 両者ともに, DMPO-OHの信号強度の増強あるいはDMPO-ORの発生を示さず, エピネフ

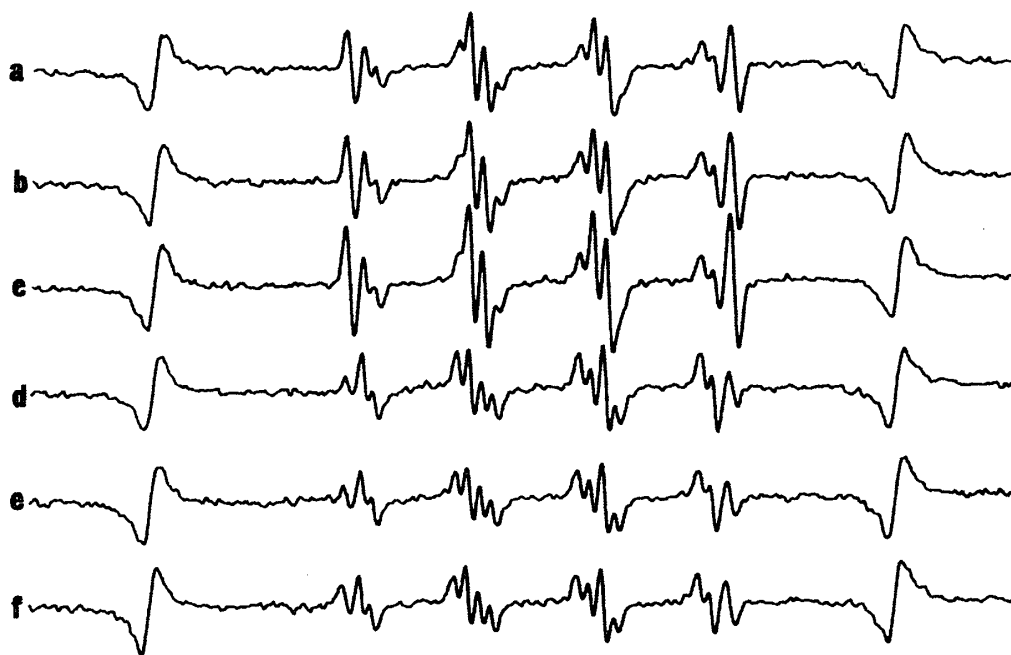


図17 HPX-XOD系反応にアミド型麻酔薬とエステル型麻酔薬を添加し得られたESRスペクトル
 a : 塩酸リドカイン (アミド型) b : 塩酸メピバカイン (アミド型)
 c : 塩酸プリロカイン (アミド型) d : 塩酸ジブカイン (アミド型)
 e : 塩酸プロカイン (エステル型) f : 塩酸テトラカイン (エステル型)

表12 アミド型麻酔薬とエステル型麻酔薬の相違による活性酸素種発生量の変化

添加麻酔薬	O ₂ ⁻	HO [•]	HO [•] + RO [•]	RO [•]
塩酸リドカイン	0.635±0.082	0.547±0.055	1.043±0.165	0.536±0.054
塩酸メピバカイン	0.674±0.025	0.560±0.051	1.109±0.101	0.549±0.050
塩酸プリロカイン	0.643±0.026	0.740±0.084	1.465±0.167	0.703±0.058
塩酸ジブカイン	0.934±0.093	0.353±0.120	(-)	(-)
塩酸プロカイン	0.734±0.055	0.393±0.063	(-)	(-)
塩酸テトラカイン	0.681±0.034	0.444±0.109	(-)	0.770±0.092

AV±SD(n=5)

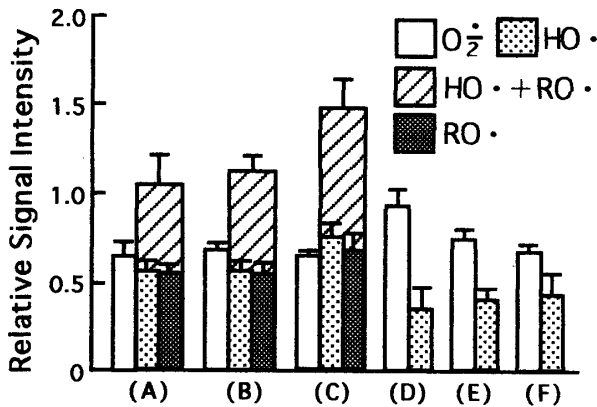


図18 アミド型麻酔薬添加群とエステル型麻酔薬添加群における活性酸素種発生量の相違
 (A)塩酸リドカイン添加 (B)塩酸メピバカイン添加
 (C)塩酸プリロカイン添加 (D)塩酸ジブカイン添加
 (E)塩酸プロカイン添加 (F)塩酸テトラカイン添加

リン含有塩酸ジブカイン添加群 (図17-d) と同様にDMPO-O₂⁻と弱いDMPO-OHのシグナルを認めるのみであった。以上の結果から、アミド型麻酔薬の中でもベンゼン核と窒素(N)が直接結合するときのみRO[•]の発生とHO[•]の増大を来すことが確認された。ESRスペクトルから得られたアミド型麻酔薬添加群ならびにエステル型麻酔薬添加群で発生するラジカルの相対信号強度は表12に示すごとくであり、RO[•]発生量はエピネフリン含有塩酸プリロカイン添加群で最も大きかった。表12をグラフで表すと図18のごとくなり、アミド型麻酔薬添加のHO[•]発生量とRO[•]発生量はほぼ等しいことが確認された。

考 察

1. 生体における活性酸素種の発生と消去について

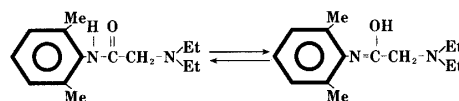
ヒト生体内ではプリン代謝の過程で常にヒポキサンチンとキサンチンが生成され、血清中ではそれぞれ0.1mg/100ml, 0.1~0.2mg/100mlの割合で含まれている¹³⁾。また、これら2つを加水分解して、最終的に尿酸の生成を行うキサンチンオキシダーゼが0.0005U/mlの割合で存在することから、生体では常にスーパーオキシドラジカル(O₂⁻)が生成されている。O₂⁻それ自身は強い反応性を示さないものの、速やかにヒドロキシラジカル(HO[•])に変換され、生体構成成分と拡散律速に近い速度で連鎖的に反応し、全身のあるいは局所的に種々の病的状態を惹起すると考えられている^{14,15)}。このようにして生じる種々の病的状態を防止するために、生体は色々な防護機構を作り上げてきた^{3,15)}。この防護機構の作用とO₂⁻発生量のバランスを保つことによって生体に対する酸素障害が防止されてきた。従って、これら両者間のバランスが崩れるとO₂⁻あるいはHO[•]による種々の病的状態が発現することになる^{14,15)}。歯科用麻酔薬として用いられる塩酸リドカインはベンゼン核に2つのメチル基を有し、鎖状構造中にアミド基とアミノ基ならびに2つのエチル基を有すること、通常、血管収縮剤としてのエピネフリンを含有して用いられていること、などから、O₂⁻発生系やO₂⁻消去系のバランスを崩す原因の1つとなり

得ると考えられる¹⁶⁾。

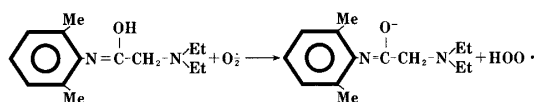
事実、著者の行った実験で、塩酸リドカイン単独添加とエピネフリン単独添加によって O_2^- の消去が確認され、これら両者が共存するエピネフリン含有塩酸リドカイン添加では O_2^- の消去と $HO\cdot$ の増加が認められるとともに $RO\cdot$ の発生が認められた。以上の結果は、生体においても、塩酸リドカインやエピネフリン投与が外因的因子となって O_2^- 消去系および発生系のバランスを崩す一因となるものと推測される。

2. 塩酸リドカイン単独添加による O_2^- 消去について

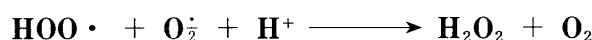
塩酸リドカイン単独添加によって O_2^- 消去が行われること、 O_2^- 消去能は添加する塩酸リドカイン濃度に依存して増大することが確認された。塩酸リドカインそのものは構造式中に2つのメチル基と2つのエチル基を有することから、これらが溶液中で遊離し、 O_2^- と反応することによって O_2^- を消去する可能性も考えられる¹⁶⁾。しかし、もしもメチル基あるいはエチル基が溶液中で遊離するならば、 O_2^- の存在しない条件下でもアルキルラジカル($R\cdot$)が認められるはずである。また、もしもこれらのアルキル基が溶液中に遊離し、 O_2^- と反応すればメトキシラジカル($CH_3O\cdot$)やエトキシラジカル($C_2H_5O\cdot$)等の何らかのシグナルが得られるはずである。しかるに、今研究では、 O_2^- の存在の有無に関わらずそれらのラジカル発生を示すシグナルは何ら認められなかった。以上の結果は、塩酸リドカインの構造式に含まれるアルキル基は O_2^- との反応に関与しないものと推測された。従って、塩酸リドカイン単独添加による O_2^- 消去は構造式中の他の基によるものと考えられた。考えられる反応としては、 O_2^- はアニオンとしての性格を有することから、塩酸リドカイン単独添加時には、



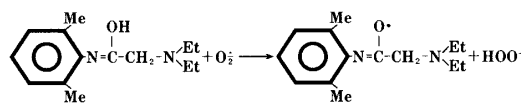
の平衡関係で生じたエノールタイプの塩酸リドカインがアニオンとしての O_2^- と反応し、



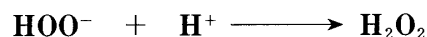
の反応を行い、ここで生じた $HOO\cdot$ が



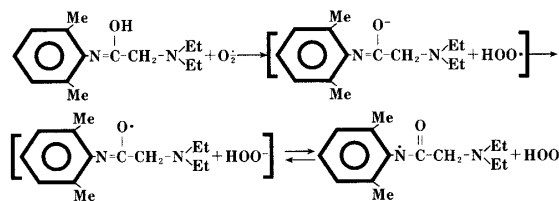
等の不均化反応を経て消去される。この反応は生理的pHの外で、反応速度定数 $8.5 \times 10^4 M^{-1} S^{-1} \sim 8.5 \times 10^5 M^{-1} S^{-1}$ 内外で行われることから予測されるものである。一方、塩酸リドカインがラジカルとしての O_2^- と反応すれば水素引き抜き反応で



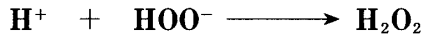
の反応を行い、ここで生じた HOO^- と O_2^- が



の反応を経て O_2^- が消去される可能性も考えられる。しかし、 O_2^- そのものの反応性は有機化合物から水素を引き抜くほど大きくないこと、また、もしも水素引き抜きが行われるならば、塩酸リドカイン添加のみでも $RO\cdot$ の発生が見られるはずであること、などの理由から上述の反応は否定的にならざるを得ない。また、 O_2^- がラジカルとしての一電子酸化を考えると



の反応を経てアミディルラジカルと HOO^- を生成し、ここで発生する HOO^- が



の反応を経ることによって、 O_2^- が消去されると考えられる。ここで発生するアミディルラジカルはDMPOに捕捉されることがないのでESRスペクトル上に認められることがなく、 O_2^- の消去のみが認められることとなり、この反応によって O_2^- が消去されたものと考えられる。

以上述べたごとく、塩酸リドカインによる O_2^- 消去は O_2^- がアニオンとして働く求核置換反応と O_2^- がラジカルとして働く一電子酸化反応の両者によって成されるものと考えられる。

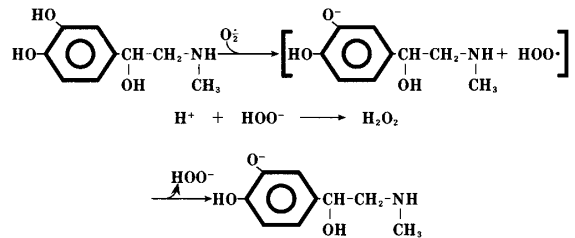
3. エピネフリン単独添加による O_2^- 消去について

エピネフリン単独添加による O_2^- 消去については、成書等にも広く記載されている³⁷⁻³⁹。著者の実験においても、 O_2^- 発生系にエピネフリンを添加することで O_2^- 発生量の減少を認めた。エピネフリンは構造式のベンゼン核に2つの水酸基を有するカテコールアミンであり、容易に酸化を受けてアドレノクロームを生成する^{38,39}。

しかし、生理的pH付近での O_2^- の反応性は、二次反応速度定数が $4 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ と低いことから、 O_2^- 消去到比較的高濃度を必要とする。実際に、著者が検索したエピネフリン単独添加時の O_2^- 消去能においても、塩酸リドカイン単独添加時と同一の発生系を用いたが、 $10 \sim 30 \mu\text{mol}$ 添加の範囲では対照群よりも O_2^- 発生量の増大が見られ、 O_2^- 消去は認められなかった。しかし、 $40 \mu\text{mol}$ を超えると O_2^- 発生量の増大は停止し、エピネフリン濃度の上昇にしたがって O_2^- 発生量が逆に低下することが確認された。以上の結果は、エピネフリン濃度が低いときにはHPX-XOD系反応の O_2^- 発生能がエピネフリンの O_2^- 消去能を上回るために O_2^- 量増大として認められたと考えられた。また、エピネフリン濃度が $70 \mu\text{mol}$ を超えると対照群よりも O_2^- 発生量が減

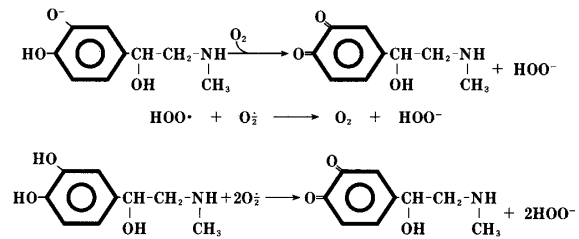
少することから、エピネフリンが O_2^- 消去を行い得ることは明白である。

エピネフリンの O_2^- 消去機序は、まず最初に



の反応が行われる。

溶媒の不在下で生じた $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_3^{\ominus}(\text{O}^-)-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{CH}_3)$ と $\text{HOO} \cdot$ がそれぞれ

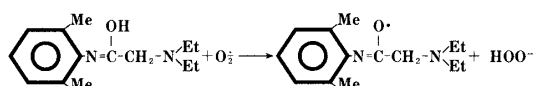


等の反応を行い、最終的にはアドレノクロームと過酸化水素を生じることになる³⁷⁻³⁹。以上述べたごとくの過程を経て O_2^- 消去が成されるが、その O_2^- 消去能は日常の臨床で含有されている条件、つまり $70 \mu\text{mol}$ エピネフリン添加の条件下では塩酸リドカインの含有量すなわち 90m mol 添加の条件下のそれより低く、対照群との中間程度である。塩酸リドカインの濃度の1/1000程度であることを考慮に入れると、エピネフリンの O_2^- 消去能も比較的大きいものと考えられた。

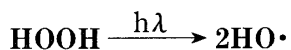
4. エピネフリン含有塩酸リドカイン添加による O_2^- 消去と $\text{HO} \cdot$ 増加ならびに $\text{RO} \cdot$ 発生について

塩酸リドカイン単独添加群ならびにエピネフリン単独添加群では O_2^- 消去のみが認められ $\text{HO} \cdot$ 増加や $\text{RO} \cdot$ 発生は認められなかった。しかし、これら両者が共存するエピネフリン含有塩酸リドカインの添加では O_2^- の消去を行うと

ともにRO・発生とHO・増加が認められた。前述のごとく、O₂・の存在しない系では塩酸リドカイン単独添加ならびにエピネフリン含有塩酸リドカイン添加時と同様に何らのラジカル発生が認められないことから、エピネフリン含有塩酸リドカインの構造式中にメチル基やエチル基が遊離してRO・発生の原因となったとは考えられない。また、HO・の増加についても、その構造式から考えて否定的と言わざるを得ない。すなわち、RO・発生とHO・増加はエピネフリンと塩酸リドカインならびにO₂・の三者が共存して初めて認められ、かつ、添加する麻酔薬がアミド型の時のみ認められることから、RO・発生とHO・増加は、これらの条件がすべて満たされた時のみに生じると言える。エピネフリン含有塩酸リドカインのO₂・発生系への添加はこれらの条件がすべて満たされていることから、O₂・の存在がRO・発生とHO・増加の開始反応を引き起こすものと考えられた。塩酸リドカイン単独添加時にはRO・の発生が認められないことから、O₂・そのものが、

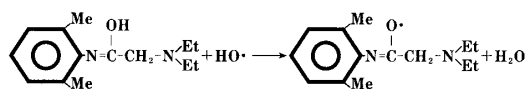


の水素引き抜き反応を生じるとは考えられない。また、塩酸リドカインとエピネフリンの両者が反応してRO・を発生することは、O₂・の存在しない系では両者が共存してもRO・の発生を認めないことから否定的である。しかし、塩酸リドカイン単独添加でもエピネフリン単独添加でもO₂・の消去に伴ってH₂O₂が発生する。ここで発生するH₂O₂は熱的に安定であるものの、光に対して極めて不安定であるとともに、ラジカルや塩基による誘発分解を容易に生じ、



等の反応を経てHO・となり得ると考えられる。

ここで生じるHO・が拡散律速に近い速度で塩酸リドカインと反応して水素引き抜きを行い



の反応を経てRO・を発生するものと考えられる。また、HO・発生量の増加は、H₂O₂の分解によるものであり、その発生量の約半分がRO・発生に寄与していると考えられた。

5. エピネフリン含有塩酸リドカイン添加によって生じるラジカル種の鑑別について

DMPOはO₂・, HO・, HOO・ならびにRO・など種々の活性酸素種を捕捉し、特異的なESRスペクトルを示す^{35,41~54})。各々の活性酸素種が単独に存在するときは、それぞれDMPO-O₂・, DMPO-OH, DMPO-OR等のDMPO-アダクトを生成するので、得られたESRスペクトルの超微細結合定数(hfcc)ならびにg値を得ることで比較的容易に同定できる。しかし、今研究のように種々の活性酸素種が共存すると、DMPO-O₂・, DMPO-OHおよびDMPO-ORが重複して現れ、極めて複雑なスペクトルを示すこととなる。従って、これら重複したESRスペクトルを鑑別することが、発生するラジカル種の同定時に重要となる。O₂・はSODによる不均化反応で



を経て消去される。また、メタノールはHO・と特異的に反応し、



を経てHO・を消去する⁵⁵)。従って、これら両者をO₂・, HO・ならびにRO・の発生系に添加するとRO・のみが残ることとなり、DMPO添加で得られるESRスペクトルのhfccとg値を求めることでRO・の同定が可能となる²⁹)。今研究ではこの鑑別方法を利用し、エピネフリン含有塩酸

リドカイン添加時に、同時に発生する O_2^- 、 $HO\cdot$ および $RO\cdot$ の鑑別と同定を行った。

SODとメタノールを同時に添加して得られたESRスペクトルは、12本線のピークを示すシグナルと4本線のピークを示すシグナルが共に消失し、6本線のピークを示すシグナルのみが残り、 $hfcc$ が $aN=1.44mT$ 、 $aH\beta=1.60mT$ 、 $g=2.0061$ が得られたことからDMPO-ORと同定した。また、エピネフリン含有塩酸リドカイン添加によって増大する $HO\cdot$ 量は、SODのみの添加で残る $HO\cdot+RO\cdot$ 量から、 $RO\cdot$ 量を減じて求めた。以上の結果は、重複するラジカルの鑑別と同定のみならず、それぞれの発生量を求めることにも極めて有用であると考えられる。

6. エピネフリンとエピネフリン構造類似物質の相違について

エピネフリン含有塩酸リドカインの添加では、 $RO\cdot$ 発生と $HO\cdot$ 増大を認めたと、エフェドリン含有塩酸リドカインでは O_2^- 消去のみを認め $RO\cdot$ 発生と $HO\cdot$ 増大は見られなかった。これは、ベンゼン核に含まれる2つの HO 基が $RO\cdot$ 発生と $HO\cdot$ 増大に重要であることを示唆するものであった。

7. アミド型麻酔薬とエステル型麻酔薬の相違について

アミド型麻酔薬に属する塩酸リドカイン、塩酸メピバカイン、塩酸プリロカインをエピネフリンとともに添加すると、 $RO\cdot$ 発生と $HO\cdot$ 増大が顕著に認められた。しかし、同じアミド型麻酔薬に分類される塩酸ジブカインとエピネフリンを加えた場合には $RO\cdot$ 発生や $HO\cdot$ 増大は見られなかった。また、エステル型麻酔薬である塩酸プロカイン、塩酸テトラカインにエピネフリンを添加して用いた場合でも、エピネフリン含有塩酸ジブカイン添加時と同様に $RO\cdot$ の発

生および $HO\cdot$ 増加は認められなかった。

塩酸リドカイン、塩酸メピバカインならびに塩酸プリロカインのアミド基は、いずれも窒素(N)がベンゼン核に直接結合する $\begin{matrix} H & O \\ | & || \\ (ph)-N & -C- \end{matrix}$ の構造をもつ¹⁶⁾。しかし、塩酸ジブカインのアミド基はベンゼン核と炭素(C)が結合する $\begin{matrix} O & H \\ || & | \\ (ph)-C & -N- \end{matrix}$ の構造を示し、エステル型の $\begin{matrix} O \\ || \\ (ph)-C-O- \end{matrix}$ の共鳴構造に類似していることから、 $RO\cdot$ 発生や $HO\cdot$ 増加を来さなかったものと思われる。すなわち、局所麻酔薬の添加による $RO\cdot$ 発生ならびに $HO\cdot$ 増加はベンゼン核に窒素(N)が直接結合するアミド型麻酔薬添加時のみに生じるものと考えられた。

結 論

HPX-XOD系反応で発生する O_2^- に対する、塩酸リドカイン、エピネフリンならびにエピネフリン含有塩酸リドカイン添加の影響をESRスピントラッピング法で検索し以下の結論を得た。

1. 塩酸リドカイン単独添加ならびにエピネフリン単独添加では、 O_2^- 消去と $HO\cdot$ への変換の抑制を認めた。 O_2^- 消去量と $HO\cdot$ 抑制量は、塩酸リドカインまたはエピネフリンの添加濃度に依存することが確認された。
2. エピネフリン含有塩酸リドカイン添加では、 O_2^- 消去のほかに、 $HO\cdot$ 発生量の増加と $RO\cdot$ 発生が認められた。 O_2^- 消去量、 $HO\cdot$ 増加量、 $RO\cdot$ 発生量は、添加する塩酸リドカインあるいはエピネフリンの濃度に依存することが分かった。
3. $RO\cdot$ 発生と $HO\cdot$ 増加は、 O_2^- 存在のもとでアミド型麻酔薬とカテコール類が共存するときのみ認められた。 $RO\cdot$ 発生と $HO\cdot$ 増加は、二次的に生じるヒドロキシラジカル($HO\cdot$)の水素引き抜き作用によるものと考えられた。

以上から, O_2^- 発生系にエピネフリン含有塩酸リドカインが添加されると, $RO\cdot$ 発生と $HO\cdot$ 増加をきたすことが確認された。 $RO\cdot$ と $HO\cdot$ はともに拡散律速に近い速度で生体成分と反応し, 酸素障害を起こす原因となり得ることを考慮し, 日常の臨床においても, 局所麻酔薬使用の量, 頻度, 方法などに留意する必要があるものと考えられた。

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薬理学講座松本仁人教授および歯科麻酔学講座新家昇教授に深謝致します。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. 中野 稔: フリーラジカルをめぐる用語の概念と定義. 日本臨床 46: 2117-2124, 1988.
2. 浅田浩二: 活性酸素の生物に対する作用. 代謝 15: 1277-1285, 1978.
3. 浅田浩二: 活性酸素の生成・消去・作用. 蛋白質核酸 酵素 3: 2659-2664, 1988.
4. 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.
5. 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—. 蛋白質 核酸 酵素 33: 2756-2762, 1988.
6. 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.
7. 湯川修身, 中沢 透: 放射線障害. 日本臨床 46: 2262-2268, 1988.
8. 小沢俊彦: 放射線. 蛋白質 核酸 酵素 33: 2811-2817, 1988.
9. 伊藤 敦, 伊藤 隆: 可視光・紫外線—光増感過程による活性酸素の生成—. 蛋白質 核酸 酵素 33: 2795-2802, 1988.
10. 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.
11. 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.
12. 児玉昌彦: 発癌, 抗癌剤の効果. 日本臨床 46: 2257-2261, 1988.
13. 志田正二編集: 化学事典, 第1版, 森北出版, 東京, 1981, 1013頁.
14. Fridvich I: Superoxide Dismutases. Advan Enzymol 41: 35-97, 1974.
15. 浅田浩二: 酸素毒性. 生化学 48: 226-257, 1976.
16. 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.
17. Hall E J: Radiology for the radiologist, 2nd Ed., Harper & Row, Publishers, Hagerstown, Maryland, New York, Evanston, San Francisco, and London, 1978.
18. Hall E D, Yonkers, P A, Taylor, B M, Sun FF: Lack of effect of postinjury treatment with methylprednisolone or tirilazad mesylate on the increase in eicosanoid levels in the acutely injured cat spinal cord. J Neurotrauma 12: 245-256, 1995.
19. Shen J G, Zhou D Y: Efficiency of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in antioxidant protection against myocardial ischemia and reperfusion injury. Biochem Mol Biol Int 35: 125-134, 1995.
20. Green T R, Bannett S R, Nelson V M: Specificity and properties of propofol as an antioxidant free radical scavenger. Toxicol Appl Pharmacol 129: 163-169, 1994.
21. Toivonen H J, Ahotupa M: Free radical reaction products and antioxidant capacity in arterial plasma during coronary artery bypass grafting. J Thorac Cardiovasc Surg 108: 140-147, 1994.
22. da-Luz P L, Chagas A C, Laurindo F R, Pileggi F: Antagonizing the hydroxyl ion free radical ($HO\cdot$) dose not abolish reperfusion ventricular fibrillation in anesthetized dogs. Braz J Med Biol Res 26: 477-489, 1993.
23. LI X Y, McCay P B, Zughuib M, Jeroudi M O, Triana J F, Bolli R: Demonstration of free radical generation in the "stunned" myocardium in the conscious dog and identification of major differences between conscious and open-chest

- dogs. *J Chin Invest* **92** : 1025-1041, 1993.
24. Vollmar B, Conzen P F, Habazettl H, Yekebas E, Peter K : Heparin-protamine reaction in pigs. : vrole of oxygen-derived free pigs.:vrole of oxygen-derived free radicals. radicals. *J Appl pigs.:vrole of oxygen-derived free radicals. Physiol* **74**: pigs.:vrole of oxygen-derived free radicals. 2412-2420, 1993.
 25. Takahashi T, Miura M, Katsumata U, Ichinose M, Kimura K, Inoue H, Takishima T, Shirato K : Involvement of superoxide in ozone-induced airway hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis* **148** : 103-106, 1993.
 26. Lundgren J, Smith M L, Siesjo B K : Effects of dimethylthiourea on ischemic brain damage in hyperglycemic rats. *J Neurol Sci* **113** : 187-197, 1992.
 27. Usui A, Kato K, Murase M, Maeda M, Kayama T, Tanaka M, Takeuchi E, Abe T : Manganese-containing superoxide dismutase in blood and urine during open-heart surgery. *Jpn Circ J* **56** : 1206-1213, 1992.
 28. Kazui M, Andreoni K A, Norris E J, Klein A S, Burdick J F, Beattie C, Sehnert S S, Bell W R, Bulkley G B, Risby T H : Breath ethan : a specific indication of free-radical-mediated lipid peroxidation following reperfusion of the ischemic liver. *Free Radic Biol Med* **13** : 509-515, 1992.
 29. Rosolia D L, Mckenna P J, Gee M H, Alvertine K H : Infusion of zymosan-activated plasma affects neutrophils in peripheral blood and bone marrow in sheep. *J Leukoc Biol* **52** : 501-515, 1992.
 30. Nihro Y, Sogawa S, Izumi A, Sasamori A, Sudo T, Miki T, Matsumoto H, Sath T : 3-0-alkylascorbic acids as free radical quenchers.3. protective effect on coronary occlusion-reperfusion induced arrhythmias in anesthetized rats. *J of Med Chem* **35** : 1618-1623, 1992.
 31. Wilson W C, Swetland J F, Bnumof J L, Laborde P, Taylor R : General anesthesia and exhaled breath hydrogen peroxide. *Anesthesiology* **76** : 703-710, 1992.
 32. Prasado K, Kalra J, Bharadwaj B, Chaudhary A K : Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortcoronary bypass surgery. *Am Heart J* **123** : 37-45, 1992.
 33. Ooiwa H, Stanley A, Felaneous-Bylund A C, Wilborn W, Downey J M : Superoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol fails to limit myocardial infarct size after 30 min ischemia followed by 2h of reperfusion in the rabbit. *J Mol Cell Cardiol* **237** : 119-125, 1991.
 34. Koerner J E, Anderson B A, Dage R C : Protection against postischemic myocardial dysfunction in anesthetized rabbit with scavengers of oxygen-derived free radicals : superoxide dismutase plus catalase, N-2-mercaptopropionyl glycine and captopril. *J Cardiovasc Pharmacol* **17** : 185-191, 1991.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 齊藤 烈, 松郷誠一 : 活性酸素の化学. 蛋白質 核酸 酵素 **33** : 2665-2677, 1988.
 38. 中野 稔 : 活性酸素の測定—化学および生化学的方法—. 蛋白質 核酸 酵素 **33** : 2684-2692, 1988.
 39. 八木国夫, 中野 稔 観衆 : 活性酸素. 第1版, 第2刷, 医歯薬出版, 東京, 90-91頁, 1987.
 40. Loschen GL, Azzi A, Richter C, Flohe L : Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydroxide. *FEBS Lett* **42** : 68-72, 1974.
 41. 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.
 42. 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.
 43. Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J : Spin trapping of superoxide. *Mol Pharmacol* **16** : 676-685, 1979.
 44. 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.
 45. Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J : Spin

- trapping of superoxide and hydroxyl radical. Practical aspects. *Arch Biochem Biophys* **200** : 1-16, 1980.
46. 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.
47. Janzen EG, Nutter DE Jr, Davis ER, Blackburn BJ: On spin trapping hydroxyl and hydroperoxyl radicals. *Can J Chem* **56** : 2237-2242, 1978.
48. Janzen EG: Free radicals in biology. Vol.IV, ed. by Pryor, W.A. Academic Press, New York, 1980, pp. 115-154.
49. McGay PB, Noguchi T, Fong KL, Lai EK, Poyer JL: Free radicals in biology, Vol.IV, ed. by Pryor, W.A. Academic Press, New York, 1980, pp. 154-186.
50. Akaike T, Sato K, Ijiri S, Miyamoto Y, Kohno M, Ando M, Maeda H: Bactericidal activity of alkyl peroxy radicals generated by heme-iron-catalyzed decomposition of organic peroxides. *Arch Biochem Biophys* **294** : 55-63, 1992.
51. 谷川 徹, 吉川敏一, 宮川春雄, 上田茂信, 竹村俊樹, 田中憲三, 森田 豊, 伊谷憲正, 杉野 茂, 近藤元次: ESRを用いたヒト抹消多形核白血球の superoxide生産能の測定とその臨床応用, *炎症* **8** : 443-477, 1988.
52. Klyanaraman B, Mottley C, Mason RP: A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *J Biol Chem* **258** : 3855-3858, 1983.
53. Ueno I, Kohono M, Mitsuta M, Mizuta Y, Kanegasaki S: Reevaluation of the spin-trapping adduct formed from 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide during the respiratory burst in neutrophils. *J Biochem* **105** : 905-910, 1989.
54. 石津一彦 編集: 実用ESR入門. 講談社, 東京, 1981, 91-137頁.
55. McCord J.M. and Fridovich I.: Superoxide dismutase. *J Biol Chem* **244** : 6049-6055, 1969.
56. 河野泰久: 生体内フリーラジカル, 活性酸素の消去系: 分布と作用機序. *日本臨床* **46** : 2130-2137, 1988.
57. 河野泰久: 活性酸素の生体内消去機構と役割. *医学のあゆみ* **142** : 720-722, 1987.