

Title	Involvement of GABAA-R/Cl ⁻ ion channel complex on local anesthetics-induced convulsion
Author(s)	大野, 勝己
Journal	歯科学報, 116(6): 512-513
URL	http://hdl.handle.net/10130/4163
Right	
Description	

氏名(本籍)	おおのかつみ 大野勝己 (茨城県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1926号(乙第750号)
学位授与の日付	平成23年4月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Involvement of GABA _A -R/Cl ⁻ ion channel complex on local anesthetics-induced convulsion
論文審査委員	(主査) 川口 充教授 (副査) 下野 正基教授 田崎 雅和教授 山根 源之教授 一戸 達也教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

GABA(A)-R/Cl⁻チャンネル複合体

局所麻酔薬の中毒性痙攣に対する抑制は、benzodiazepine類が最も強い効果を現すことから、GABA(A)受容体の関与が強く示唆された。そこで本研究では、GABA(A)-R/Cl⁻チャンネル複合体に着目し、細胞内Cl⁻の動態、GABA(A)受容体のGABA結合サイトおよびCl⁻チャンネルのリガンド結合サイトに対する影響を調べた。

2. 研究方法

1)細胞内Cl⁻動態の解析を行うために、大脳皮質のブロックスライスに、Cl⁻指示薬である dihydro-MEQ (6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide)を10分間ロードした後、HBSS-Hで洗浄し、37°Cで15分間インキュベート後、GABA(A)受容体のアゴニストの muscimol、局所麻酔薬の lidocaine と procaine を添加したときの細胞内Cl⁻濃度を ARGUS50(浜松ホトニクス)により測定した。

2)局所麻酔薬の結合部位を解析するために、通法によりラットの大脳皮質の膜標品を作成し、GABA(A)受容体に対して [³H]muscimol、Cl⁻チャンネルに対して [³⁵S]TBPS を標識リガンドとして用いて結合阻害実験を行った。これらの、膜標品との結合に対する局所麻酔薬の阻害効果を調べるために、GF/B フィルター(Whatman)に膜を吸着させて、フィルターに含まれる³H、³⁵S量を液体シンチレーションカウンターによって測定し、Kd、Bmax、IC₅₀を調べた。

3. 研究成績および結論

Muscimol 10⁻⁵M を添加すると急激なCl⁻の流入の増加が見られ、2秒以内にほぼピークに達した。これに対して、procaine、および lidocaine、prilocaine、tolocaine のいずれの局所麻酔薬で前処置した場合も、10⁻³M以上の濃度でCl⁻の流入を抑えた。しかし10⁻⁴M以下の低い濃度ではCl⁻流入に対する抑制反応は見られなかった。

[³⁵S]TBPSのCl⁻チャンネルタンパクとの結合に対して、picrotoxininは10⁻⁸Mから抑制が認められ、10⁻⁵Mで完全に抑制した。これに対して、各局所麻酔薬の [³⁵H]TBPSのタンパク結合に対する抑制は10⁻³Mから抑制が認められ、10⁻²Mで最大40%の抑制にとどまった。それらの抑制率はprocaineが最も強く、lidocaine、tolocaine、prilocaineの順であった。 [³H]muscimolのGABA(A)受容体タンパクとの結合に対してGABAは10⁻⁷Mから抑制が認められ、10⁻⁴Mで完全に抑制した。これに対して、各局所麻酔薬はいずれの濃度も [³H]

muscimol とタンパクとの結合阻害を起こさなかった。

以上の結果から局所麻酔薬誘発性痙攣は GABA(A)-R/Cl⁻チャンネル複合体の機能を抑制し、Cl⁻の流入を阻害するために生ずること、局所麻酔薬の分子標的は複合体の GABA 結合部位ではなく、Cl⁻チャンネルの picrotoxinin 結合部位であることが明らかになった。

論文審査の要旨

局所麻酔薬の過量投与による痙攣の発症機構について、GABA(A)-R/Cl⁻チャンネル複合体に着目し、細胞内 Cl⁻の動態、GABA(A)受容体の GABA 結合サイトおよび Cl⁻チャンネルタンパクのリガンド結合サイトに対する影響を調べたところ、局所麻酔薬誘発性痙攣は GABA(A)-R/Cl⁻チャンネル複合体の機能を抑制し、Cl⁻の流入を阻害するために生ずること、局所麻酔薬の分子標的は複合体の GABA 結合部位ではなく、Cl⁻チャンネルの picrotoxinin 結合部位であることを明らかにした。

本審査会では以上の発表について、1) Fluorescence 像の色の変化について、Ca と Cl の違い。2) in vivo で用いた局所麻酔薬 10^{-3} M の濃度の適切性および、³⁵S]TBS のリプレースに高濃度の局所麻酔薬を必要とすることの妥当性、3) 局所麻酔薬の選択の根拠、4) 局所麻酔薬の副作用の作用点が扁桃体にあるのに大脳皮質を用いた理由などの項目を中心に質疑が行われた。これに対して、1) Fra 2 と異なり、MQAE は、それ自体の蛍光発光があり、経時的に減弱していく中で、Cl⁻と結合すると急激に低下するのでそれを信号として捕らえる。ベースラインが下降していくのはこの蛍光法の弱点であり、相対比較しかできないことも欠点で、これらの点で、使用可能であればアイソトープの方が有利であること、2) 痙攣の onset に要する用量は、procaine : 170mg/kg, lidocaine : 150mg/kg であり、ラット体液中濃度に換算すると 10^{-2} M となり、この度の in vivo の結果と一致することから合理的な濃度と考えられること、3) 局所麻酔薬は、過去の実験の流れを考慮し、エステル型とアミド型で代表的あるいは使用頻度の多いものを選んだこと、4) GABA(A)-R/Cl⁻チャンネル複合体の特性を調べるのに、運動野を含む大脳皮質は良いモデルと考えたことへの回答がなされ、概ね妥当であるとの評価を得た。また、GABA 受容体と局所麻酔薬の効果について興味ある研究結果であると評価された。

本研究で得られた結果は、今後の歯学の研究の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。なお、英・独 2 カ国語につき試験を行った結果、合格と認定した。