

## 局所麻酔薬によるウサギ脳 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

### 活性抑制と脂質による影響

#### 学位論文内容の要旨

##### 【目 的】

現在、局所麻酔薬の作用機構としてはナトリウムチャネル抑制説が有力であるが、ナトリウムチャネル以外にも局所麻酔薬の作用を受けるタンパク質が多数知られている。一方、局所麻酔薬は神経細胞膜を構成するリン脂質と強い親和性を示し、局所麻酔薬の麻酔強度と関連することも知られている。しかし未だに局所麻酔薬の細胞膜脂質に対する作用には不明な点が多い。そこで今回、局所麻酔薬がナトリウムチャネル以外のタンパク質や脂質にも非特異的に作用する可能性を考慮し、局所麻酔薬が $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性に与える作用ならびに生体膜構成脂質を $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseに添加した際に局所麻酔薬が与える作用に対する影響について調べたので報告する。

##### 【材 料 と 方 法】

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase：ウサギ脳から精製

局所麻酔薬：リドカイン、プロカイン、ブピバカイン、プリロカイン、ジブカイン

生体膜構成脂質：phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE)

ATPase活性測定：加水分解の結果生じたリンをChifflet法により定量して測定

実験は主に以下の4種類に関して行った。

##### (1) 局所麻酔薬の $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性に対する影響

前述の5種類の局所麻酔薬を用い、これら局所麻酔薬が $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性に与える影響について調べた。

##### (2) $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseの $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ およびATP親和性に対するリドカインの影響

局所麻酔薬が $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性を抑制する理由を調べる目的で、リドカイン存在下と非存在下で、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseの $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ およびATP親和性に対する変化について調べた。

##### (3) 局所麻酔薬による $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性抑制に対するPC, PEの影響

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseにPCとPEを添加した際、5種類の局所麻酔薬がNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性抑制に与える作用の変化について調べた。

(4) リドカイン存在下のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性のNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>およびATP親和性に対するPCの影響

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseにPCを添加した際にみられるリドカインのNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性抑制の増強作用の原因を調べる目的で、PC存在下と非存在下で、リドカイン存在下のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseのNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>およびATP親和性に対する変化について調べた。

#### 【結 果】

(1) 5種類全ての局所麻酔薬は臨床的に使用される濃度で濃度依存性にNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase活性を抑制した。各局所麻酔薬による50%活性抑制に要する濃度(IC<sub>50</sub>値)と、麻酔作用および毒性の強さの間には相関が認められた。活性抑制の濃度依存性のグラフはシグモイドカーブとなり、Hillプロットの結果、すべての局所麻酔薬のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseへの結合は正の協同性を示した。

(2) リドカインによる活性抑制の原因として、Na<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>に対する親和性の低下の可能性が示唆された。

(3) PCとPEはともに局所麻酔薬によるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性抑制に影響を与えた。IC<sub>50</sub>値はプロカインの場合のみPC、PEいずれにおいても増加したが、その他の局所麻酔薬では減少し、特にリドカインでは顕著に減少した。Hill係数については増加するものと減少するものがあり、顕著な傾向を示さなかった。

(4) PCはNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性の抑制に必要なリドカイン濃度を低下させたが、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>およびATPに対する親和性には顕著な影響を与えなかった。

#### 【考 察】

局所麻酔薬の主な作用機序はナトリウムチャネルを介したNa<sup>+</sup>の流入抑制であるにしても、臨床的使用濃度の局所麻酔薬によりNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性抑制が生じるという結果は、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性抑制が主作用あるいは副作用に関連する可能性があることを示唆するものである。さらに局所麻酔薬とNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseとの結合が正の協同性を示したことは、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseに対する局所麻酔薬の結合部位は複数存在することを意味する。しかし実際には精製したNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase周囲に残存するリン脂質に局所麻酔薬が多数結合して、その結果、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性を抑制している可能性も考えられ、局所麻酔薬の結合部位がNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseタンパク質なのか、脂質なのかという点に関しては、今回の実験結果からは不明である。

局所麻酔薬によるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase抑制の原因として、リドカイン存在下でNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseのNa<sup>+</sup>およびK<sup>+</sup>に対する親和性の低下が認められたことより、Na<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>に対する親和性の低下が関与している可能性が考えられた。

ナトリウムチャネルあるいはNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseなどの膜タンパク質は、脂質からな

る二重膜中に組み込まれており、当然脂質の状態の影響を受けると考えられる。本研究においても生体膜構成脂質であるPCあるいはPEを添加したところ、各局所麻酔薬の $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性阻害における $\text{IC}_{50}$ 値あるいはHill係数が変化した。その作用は脂質の種類、添加する局所麻酔薬の組み合わせによって異なった反応がみられたが、少なくとも局所麻酔薬の作用にはタンパク質だけではなく、脂質も関与する可能性を示唆する結果となった。

一方、 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseにPCを添加することにより、リドカインによる $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性抑制作用を増強させる直接の原因は今回の実験結果からは不明であるが、局所麻酔薬と結合した $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase周囲の脂質が $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseの分子構造あるいはサブユニット間の相互作用に与える影響について今後、検討する必要があるように思われる。

### 【結 論】

$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseに対する局所麻酔薬の作用と、脂質添加による影響を明らかにすることを目的として、ウサギ脳 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseに対する、5種類の局所麻酔薬および2種類の生体膜構成脂質の作用を調べて、以下の結論を得た。

1. 5種類全ての局所麻酔薬が臨床的に使用される濃度範囲で濃度依存性に $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性を抑制した。
2. 各局所麻酔薬による50%の活性抑制に要する濃度と、麻酔作用および毒性の強さの間には相関があった。
3. 活性抑制の濃度依存性のグラフはシグモイドカーブとなった。Hillプロットの結果、局所麻酔薬の $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseへの結合は正の協同性を示した。
4. リドカインによる活性抑制の原因として、 $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ に対する親和性の低下の可能性が示唆された。
5. PCとPEはともに局所麻酔薬による $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性抑制に影響を与えた。

最近局所麻酔薬の生体に対する作用を考えると、ナトリウムチャンネルに対する作用のみが重視される傾向があるが、本実験結果は、局所麻酔薬の作用全体を考える時、 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseを含む他のタンパク質及び生体膜脂質に対する作用についても考慮する必要があることを示唆するものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 島 和 昭

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 赤 池 忠

学 位 論 文 題 名

## 局所麻酔薬によるウサギ脳 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

### 活性抑制と脂質による影響

審査は、福島、鈴木および赤池の各審査担当者が学位申請者に対して提出論文の内容ならびにそれに関連する事項について、口頭試問により行われた。はじめに学位申請者に対し、本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

現在、局所麻酔薬の作用機構としてはナトリウムチャンネル抑制説が有力であるが、ナトリウムチャンネル以外にも局所麻酔薬の作用を受けるタンパク質が多数知られている。また局所麻酔薬は神経細胞膜を構成するリン脂質と強い親和性を示し、局所麻酔薬の麻酔強度と関連することも知られているが、局所麻酔薬の作用には未だに不明な点が多い。以上のような背景をもとに、局所麻酔薬が $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性に与える影響ならびに生体膜構成脂質を $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseに添加した際に局所麻酔薬の作用に与える影響について調べた。

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseはウサギ脳から精製したものをを用い、ATPase活性はChifflet法によりリンを定量して測定した。局所麻酔薬としてリドカイン、プロカイン、ブピバカイン、プリロカイン、ジブカインを用いて $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性に対する作用を調べ、さらに生体膜構成脂質である phosphatidylcholine(PC) と phosphatidylethanolamine(PE)添加による影響を調べた。

その結果、5種類全ての局所麻酔薬が臨床的に使用される濃度範囲で濃度依存性に $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase活性を抑制し、各局所麻酔薬による50%の活性抑制に要する濃度と、麻酔作用および毒性の強さの間には相関が認められた。活性抑制の濃度依存性のグラフはシグモイドカーブとなったため、Hillプロットで解析を行ったが、局所麻酔薬の $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseへの結合は正の協同性を示す結果となった。リドカイン存在

下では、 $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ に対する親和性の低下が認められた。PCとPEはともに局所麻酔薬による $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性抑制に影響を与えた。PCは $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性の抑制に必要なリドカイン濃度を低下させたが、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ およびATPに対する親和性には顕著な影響を与えなかった。

以上の結果より、臨床的使用濃度の局所麻酔薬においても $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性が抑制されることから、局所麻酔薬の作用機序としてはナトリウムチャネルを介した $\text{Na}^+$ の流入抑制以外にも、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性抑制が主作用あるいは副作用に関連する可能性が示唆された。局所麻酔薬による $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase抑制の原因としては、リドカイン存在下での実験結果から $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの $\text{Na}^+$ および $\text{K}^+$ に対する親和性の低下が関与している可能性が考えられた。また局所麻酔薬と $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseとの結合が正の協同性を示したことから、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseに対する局所麻酔薬の結合部位が複数存在することが考えられた。ナトリウムチャネルあるいは $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseなどの膜タンパク質は、脂質からなる二重膜中に組み込まれており、当然脂質の状態の影響を受けると考えられる。本研究においても生体膜構成脂質であるPCあるいはPEを添加したところ、各局所麻酔薬の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性阻害における $\text{IC}_{50}$ 値あるいはHill係数が変化した。これら作用には脂質の種類、添加する局所麻酔薬の組み合わせによって異なった反応がみられたが、少なくとも局所麻酔薬の作用にはタンパク質だけではなく、脂質も関与する可能性を示唆する結果となった。

現在、局所麻酔薬の生体に対する作用としてナトリウムチャネルのみが重視される傾向にあるが、本実験結果は、局所麻酔薬の作用全体を考える時、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseを含む他のタンパク質及び生体膜脂質に対する作用についても考慮する必要があることを示唆するものとする。

試問では、本論文の内容とその関連事項について質疑応答がなされたが、これらに対して申請者は本研究から得た知見と文献を引用して適切な回答を行った。

本研究は、種々の局所麻酔薬が臨床使用濃度域で $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性を抑制する作用を持つこと、さらには $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性抑制に対して脂質が重要な影響を与えていることについても見出しており、今後の局所麻酔薬の作用機序解明に対して、極めて有意義な研究であると判断された。

以上より、審査委員は全員、本研究が学位論文に十分値し、申請者が博士（歯学）の学位授与に相応しいと認定した。