

骨芽細胞由来酵素に対する局所麻酔薬の作用

学位論文内容の要旨

【目的】 歯科臨床において、局所麻酔薬は歯槽骨周囲に浸潤麻酔として頻用されている。その作用する部位には、骨芽細胞、破骨細胞などの骨のリモデリングに関与する細胞が存在するので、これらの細胞に対する局所麻酔薬の作用を考慮する必要があると考えられる。しかし、実際に骨およびそこに存在する細胞に対しどのような影響を与えているかの詳細は明らかではない。そこで、骨芽細胞が有する酵素活性を指標として各種局所麻酔薬の作用を検討した。骨芽細胞において骨形成に関与する可能性のある酵素として、Ca-ATPase、Mg-ATPase およびアルカリ性ホスファターゼ活性に対する、各種局所麻酔薬の作用を調べた。

【方法】 骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を培養した後にミクロソーム分画を調整し、存在する Ca および Mg 依存性の ATPase (Ca-および Mg-ATPase) 活性に対する作用を調べた。また、ヒト骨由来のアルカリ性ホスファターゼ(ALP)活性に対する効果も調べ、その比較のためにヒト小腸由来の ALP に対する作用も調べた。麻酔薬はリドカイン、プリロカイン、ジブカイン、プロカイン、テトラカインを用いた。

【結果と考察】

1. Ca-ATPase 活性に対する局所麻酔薬の作用

各麻酔薬はいずれも臨床に使用される濃度の範囲で、その濃度に依存して Ca-ATPase 活性を抑制した。活性を 50%抑制する濃度 (IC₅₀) は、リドカインでは 8 mM、プリロカイン 12 mM、プロカイン 15 mM 程度であった。また、テトラカインでは約 1.6 mM、ジブカインでは 0.1 mM と低い濃度で抑制された。

局所麻酔薬が Ca-ATPase 活性を抑制する理由を調べることを目的として、Ca-ATPase の Ca に対する親和性が局所麻酔薬存在下では変化するか否かを調べた。局所麻酔薬はリドカイン、プロカインを用いたが、麻酔薬存在下でも ATPase 活性は Ca 濃度の増加とともに増加し、麻酔薬の存在による Ca に対する親和性の変化は見られなかった。

次に、Ca-ATPase の ATP に対する親和性が局所麻酔薬によって変化するか否かを調べることを目的として、ATP 濃度を変化させて活性を測定した。活性を 50%発現するのに必要な ATP 濃度は、局所麻酔薬非存在下では約 0.1 mM であったが、プロカイン存在下では 0.5 mM、リドカイン存在下では 0.8 mM となり、局所麻酔薬存在下では ATP に対する親和性が低下することが示された。

2. Mg-ATPase 活性に対する局所麻酔薬の作用

Mg-ATPase 活性も、臨床で使用されている濃度範囲で、局所麻酔薬の濃度に依存して抑制された。IC₅₀ 値は、プロカインとプリロカインでは 12 mM、リドカインでは 8 mM 程度で、また、テトラカインでは 1 mM、ジブカインでは 0.1 mM 程度であった。各麻酔薬の Ca-および Mg-ATPase 活性抑制の強さの順序は、臨床的に推定されている各麻酔薬の作用あるいは毒性の強さの順序にほぼ一致していた。以前に報告された Na,K-ATPase の場合も同様の傾向を示すことから、細胞の形質膜に対する局所麻酔薬の作用の結果として、これらの酵素が抑制される可能性がある。

次に、Mg-ATPase 活性の Mg 濃度依存性に対するリドカインとプロカインの影響を調べた。局所麻酔薬が存在しない場合の Mg による 50% 活性化濃度は 0.02 mM 程度であったが、リドカインおよびプロカイン存在下では 0.1 mM と増加した。麻酔薬は Mg-ATPase の Mg に対する親和性を低下させており、活性抑制の一因となっている可能性が示された。さらに、Mg-ATPase 活性の ATP 濃度依存性に対するリドカインとプロカインの作用を調べた。リドカイン存在下での ATP による 50% 活性化濃度は局所麻酔薬非存在下と同程度であったが、プロカイン存在下では 50% 活性化濃度は低下した。つまり ATP に対する親和性がわずかに増加する結果となり、局所麻酔薬による Mg-ATPase 活性抑制に、ATP に対する親和性の変化は関与していないものと考えられた。

3. 骨型アルカリ性ホスファターゼ活性に対する局所麻酔薬の作用

骨型 ALP 活性に対する局所麻酔薬の作用を調べた。リドカインとプロカインでは濃度に依存して活性が低下した。リドカインによる IC₅₀ 値は 16 mM 程度であったが、プロカインでは 48 mM でも 50% 程度しか減少しなかった。プリロカインでは、低濃度で 10% 程度活性が増大した後に、高濃度では濃度に依存した活性の抑制が見られた。ジブカインおよびテトラカインでは活性の抑制は見られなかった。骨アルカリ性ホスファターゼ活性の抑制は、局所麻酔薬に共通した作用ではなかった。リドカイン、プロカイン、プリロカインの抑制作用の理由については、今回の結果からは不明であるが、これらの局所麻酔薬投与により骨芽細胞のアルカリ性ホスファターゼの抑制が起こるということについては、注意が必要であり、今後検討していかなければならないと考えられる。

4. 小腸型アルカリ性ホスファターゼ活性に対する局所麻酔薬の作用

骨型 ALP のアイソザイムである小腸型 ALP を用いて同様の実験を行った。プロカインとプリロカイン存在下の小腸型 ALP 活性は、骨型と同様の濃度依存性で活性が変化した。しかし、リドカインにおいては骨型と異なり、プリロカインと同様に低濃度で活性がやや増大したのち、より高濃度では低下した。ジブカインあるいはテトラカインでは、骨型と同様に、活性は抑制されなかった。

5. 小腸型アルカリ性ホスファターゼ活性のリドカイン依存性に対する SDS の作用

骨型と小腸型 ALP 活性のリドカインによる抑制の濃度依存性に違いが認められたが、両 ALP 活性の ALP 阻害剤に対する反応性についても同様の報告があり、SDS 存在下では小腸型の反応性が骨型に変化したと報告されている。そこで、小腸型の活性測定の際に SDS を添加することにより、リドカインによる抑制の濃度依存性が骨型

に変化するか否かを検討するため、0.5 および 10 % SDS 存在下で、小腸型 ALP 活性のリドカインの濃度依存性を調べた。その結果、SDS 存在下でも、小腸型 ALP 活性抑制のリドカイン濃度依存性は SDS 非存在下と変わらず、骨型 ALP の場合とは異なっていた。

【結語】

1. 局所麻酔薬は臨床使用濃度の範囲で、骨芽細胞の Ca-および Mg-ATPase 活性を抑制した。またリドカイン、プロカインとプリロカインはアルカリ性ホスファターゼ活性も抑制したことから、骨代謝に対する安全性の検討をさらに進める必要が示唆された。
2. アルカリ性ホスファターゼの阻害は各局所麻酔薬に共通したものではなく、また、リドカイン以外では骨型と小腸型による作用の違いも見られなかった。
3. Na,K-ATPase に対する作用との比較から、Ca-および Mg-ATPase に対する局所麻酔薬の作用は、基本的には形質膜に対する作用であると推定された。
4. その結果として、Mg-ATPase 活性の Mg に対する親和性が減少し、Ca-および Mg-ATPase 活性の ATP に対する親和性を前者で低下、後者で増加させた。

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

骨芽細胞由来酵素に対する局所麻酔薬の作用

審査は、審査員全員の出席の下に行った。まず、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求め、さらに、研究内容とそれに関連した知識について口頭試問を行った。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

骨芽細胞が有する酵素活性に対する各種局所麻酔薬の作用を調べることを研究目的とした。対象は、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞のミクロソーム分画に存在する Ca (Ca-ATPase) および Mg (Mg-ATPase) 依存性の ATPase 活性と、ヒト骨由来のアルカリ性ホスファターゼ (骨型 ALP) 活性とした。骨型 ALP との比較のために、ヒト小腸由来 (小腸型 ALP) の ALP 活性に対する作用も調べた。麻酔薬はリドカイン、プリロカイン、ジブカイン、プロカイン、テトラカインを用いた。

各麻酔薬は臨床使用濃度の範囲で、その濃度に依存して Ca-および Mg-ATPase 活性を抑制した。各麻酔薬の両 ATPase 活性抑制の強さの順序は、臨床的に推定されている各麻酔薬の作用あるいは毒性の強さの順序にほぼ一致していた。以前に報告された Na,K-ATPase の場合も同様の傾向を示すことから、細胞の形質膜に対する局所麻酔薬の作用の結果として、これらの酵素が抑制される可能性がある。局所麻酔薬は、Mg-ATPase 活性の Mg に対する親和性を減少させ、Ca-および Mg-ATPase 活性の ATP に対する親和性を前者で低下、後者で増加させた。

リドカイン、プロカインおよびプリロカインは骨型 ALP 活性を抑制したが、ジブカインとテトラカインは抑制せず、骨型 ALP 活性の抑制は、局所麻酔薬に共通した作用ではなかった。また、リドカイン以外の局所麻酔薬の作用は、小腸型 ALP の場合も骨型と同様であった。

以上の結果のように、局所麻酔薬は骨芽細胞の Ca および Mg 依存性の ATPase 活性を抑制し、リドカイン、プロカインおよびプリロカインは骨型 ALP 活性も抑制することから、骨代謝に対する安全性の検討をさらに進める必要がある。

申請者に対する口頭試問および討論の内容は以下の通りである。

(1) 本研究結果を直接臨床と結びつけて考えることが出来るのか、について

本研究結果をそのまま臨床における局所麻酔薬の危険性に結びつけることは意図していない。しかし、骨代謝に対する局所麻酔薬の有害作用などが見られた際には、本研究結果は重要な情報になると考えられる。結果をより有用なものにするためには、Ca-および Mg-ATPase 活性抑制の可逆性や経時的変化、および、より臨床に近い実験系での検討が必要であると考えている。

(2) 本研究結果を踏まえた上での、臨床上での局所麻酔薬使用の注意点について

各種局所麻酔薬が、臨床濃度で骨芽細胞に存在する Ca-あるいは Mg-ATPase 活性を抑制することは事実であり、軽視できない可能性もある。骨代謝が盛んな小児に対する局所麻酔薬の使用においては、念頭に置いて注意する必要があると考える。

(3) 局所麻酔薬による低濃度での ALP 活性の増大について

その原因については不明であるが、ビスフォスフォネートの ALP 活性に対する作用においても同様の現象が見られる。局所麻酔薬の細胞膜に対する作用に関係する可能性もある。

(4) ALP の一般的な性質について

ALP は骨芽細胞のマーカー酵素とされ、骨芽細胞の分化、あるいは硬組織形成の指標として測定されることが多い。ヒトの ALP には、骨型を含む臓器非特異型、小腸型、胎盤型、類胎盤型のアイソザイムが知られている。ALP は発見から約 100 年の歴史があるものの、いまだに不明な点が多い酵素であることなどが述べられた。

(5) 今後の研究の展開と将来の展望について

今後の展開としては局所麻酔薬を臨床で使用した状態により近づけた研究、すなわち経時的な変化や吸収といった視点からの実験を進めていきたい。また、本研究に使用した骨芽細胞に存在する Ca-あるいは Mg-ATPase は、最近酵素活性の測定が可能になった酵素であることから、プロポフォール等、全身麻酔薬の作用も検討したいと展望が述べられた。

これらの質問に対して、申請者は適切かつ明快な回答を行い、研究の立案と実行、結果の収集とその評価について十分な能力があることが理解された。また関連分野に関しても広範な知識を有し、今後ますます研究を発展させていく可能性が高いと判断された。以上のことから申請者の学識は博士（歯学）に値するものと判断し、主査並びに副査は合格と判断した。