

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	家 始 聡 介
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部教授 智原 栄一 (副 査) 朝日大学歯学部教授 柏俣 正典 (副 査) 朝日大学歯学部教授 近藤 信夫
論文題目	
fMLP で誘導されるラット好中球の機能発現におよぼす局所麻酔薬の影響	
論文内容の要旨	
<p>【目的】局所麻酔薬は神経細胞および心筋細胞に作用して、そのNaチャンネルを阻害して神経細胞の刺激伝達を阻害する局所麻酔作用および心筋細胞の収縮を抑制して抗不整脈作用を発現することが知られている。さらに、局所麻酔薬は臨床で用いられる濃度で、KチャンネルおよびCaチャンネルにも影響して、種々の細胞機能に影響することが報告されている。しかし、その詳細な機序については明らかにされていない。局所麻酔薬は、好中球の粘着、ケモタキシス、活性酸素の産生、LTB<sub>4</sub>およびIL-1の遊離などの機能発現を抑制することも知られているが機序については明らかにされていない。好中球にはNaチャンネルが存在しない。そこで、ラット好中球をモデルとして細菌由来の遊走因子fMLPで誘導される活性酸素産生能および遊走能発現に関与する細胞内情報伝達系(シグナル)に対する局所麻酔薬の影響について検討した。</p> <p>【実験方法】体重250~350gのWistar系雄ラットに6%カゼインを投与(i.p.)し、16~18時間後に腹腔液から好中球を回収した。好中球が産生するスーパーオキシドは、シトクロムC還元法で測定した。また遊走試験は96穴マイクロケモタキシスチャンバー(Neuro Probe, Cabin John, MD, USA)を用いたmembrane filter法およびEZ-TAXIScanを用い測定した。さらに分離したラット好中球からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析により、好中球のシグナルの活性化状態について検討した。</p> <p>【結果】fMLP刺激に伴う好中球の細胞内Caイオン濃度の上昇は、PI3K I a(<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\delta</math>)およびPI3K I b(<math>\gamma</math>)の活性化を介して生じると考えられている。fMLP刺激に伴うPI3K I a およびPI3K I bの活性化は、局所麻酔薬の影響を受けなかった。</p> <p>好中球の活性酸素産生においてカルモジュリンによって活性化されるCaMKKがPI3Kの下流にあるAktのリン酸化を介して、細胞質にあるp47<sup>phox</sup>を活性化させ膜に移動させ、活性酸素産生酵素NADPHoxidaseを活性化すると考えられている。今回用いた3種類の局所麻酔薬(lidocaine, bupivacaine および procaine)はAktのリン酸化を濃度依存的に抑制しp47<sup>phox</sup>の活性化の指標である膜への転移も抑制した。しかし、局所麻酔薬はp47<sup>phox</sup>の活性化因子の1つであるPKC<math>\alpha</math>の活性化(膜転移)も抑制した。この結果から、局所麻酔薬の活性酸素産生抑制作用には、Aktリン酸化阻害以外の作用も関与することが示唆された。</p> <p>局所麻酔薬がカルモジュリンを阻害することを確認するために、ラット脳由来のカルモジュリン依存性のphosphodiesteraseを用いて検討した結果、今回実験に用いた3種類の局所麻酔薬は濃</p>	

度依存的にカルモジュリンを阻害した。

EZ-TAXIScan のデータを解析した結果、局所麻酔薬は遊走速度を抑制したが、極性形成の指標である方向性及び直進性には影響しなかった。局所麻酔薬は PI3K の活性化には影響せず、カルモジュリン阻害作用を示した。これらの結果から、好中球の遊走能抑制作用は、カルモジュリン依存性の MLCK を阻害することによってミオシン II の活性化が抑制された結果であることが示唆された。

【考察および結論】局所麻酔薬は fMLP で刺激した好中球内に入り、カルモジュリンを抑制することにより MLCK およびミオシン II の活性化を阻害して遊走速度を抑え、カルモジュリン依存性 CaMKK のリン酸化が抑制され Akt のリン酸化も抑制された。また PKC の活性化も局所麻酔薬によって阻害された。その結果、p47<sup>phox</sup> のリン酸化が抑制されて膜への転移が阻害され、NADPHoxidase の作用を抑制する結果、活性酸素の産生が抑制されることが示唆された。これらの結果から、局所麻酔薬の抗炎症作用機序の一部が明らかになり歯科臨床で用いられている濃度で発現することが示唆された。