

マウスにおけるフェノール誘発振せんに及ぼす脳内アセチルコリンの役割(補遺) - マウスの脳内モノアミン神経系およびアミノ酸神経系伝達物質の含量に及ぼすフェノールの影響 -

伊藤 真紀

岩手医科大学歯学部歯科薬理学講座

(主任：伊藤 忠信 教授)

(受付：1995年6月14日)

(受理：1995年7月28日)

Abstract : The effects of phenol on the contents of monoaminergic and amino acidergic substances were examined in the striatum, hypothalamus, cerebral cortex and hippocampus of the mice. The former substances were norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT), 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), and the latter were aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), glutamine (Gln), glycine (Gly), taurine (Tau), and γ -aminobutyric acid (GABA). The contents of the substances were measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). The time course of the change in the content of the target substances in the striatum after injection of phenol (200 mg/kg, s. c.) was examined. The contents of DOPAC, HVA and 5-HIAA showed a time-dependent biphasic pattern, and the similar time pattern was found in the Asp level. These findings were different from the previous ones, which had shown a monophasic pattern in acetylcholine level and tremor score. The target substance contents in each brain area were also examined 40 min after the injection of phenol (200 mg/kg, s. c.). Almost all monoaminergic substances increased in the striatum, hypothalamus and hippocampus. The contents of DA and DOPAC, however, decreased in the cerebral cortex. Almost all amino acidergic substances increased in each brain area. These findings suggest that phenol affects the monoaminergic and amino acidergic systems of mouse brain, but that it may be not directly related to phenol-induced tremor.

Key words : phenol, monoaminergic, amino acidergic, mouse brain

緒 言

フェノールは殺菌作用や抗炎症作用を有し、深達性もあることから、歯科臨床においては消毒薬、歯髄鎮静剤として使用されていた¹⁾。現在は、フェノール単独での消毒作用はあまり強く

なく、また有機物、脂質の共存によりその作用が著しく減弱し、組織に対する刺激作用も強いため¹⁾、フェノール単独で使用することは少なくなってきた。しかし、パラクロロフェノール、ユージノール、グアヤコールなど基本骨格にフェノール誘導体を含む薬剤や、フェ

The role of brain acetylcholine in phenol-induced tremor in mice (Supplement) - Effects of phenol on the contents of monoaminergic and amino acidergic substances in mouse brain -

Maki Itoh

(Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

ノールカンフル、ホルムクレゾールなどのフェノール合剤あるいはフェノール誘導体合剤はフェノールを含んでおり¹⁾、フェノールの単独使用こそ少なくなったが、フェノールは現在でも歯髄鎮静剤、根管消毒剤などの歯科用薬物の基本骨格となっている。フェノールおよびフェノールと構造が類似するカテコール、リゾルシン、クレゾール、ハイドロキノロン、ピロガロールなどの化合物は、動物に振せんやけいれんを誘発することが知られている²⁾。とくにフェノールの場合、全身が小刻みに震える特徴的な状態からフェノール振せんとして広く知られており、その誘発機序の解明が行われてきた²⁻⁸⁾。

著者⁹⁾は先に、マウスにおけるフェノール誘発振せんの機序を解明するため、脳内アセチルコリン (ACh) 含量に及ぼすフェノールの影響について検討し、中枢神経系の ACh はフェノール誘発振せんに対して抑制的に働いていることを明らかにした。

従来、薬物誘発けいれんに関しては、ACh 神経系のほか、モノアミン神経系¹⁰⁾、アミノ酸神経系¹¹⁾などの中枢神経系の関与が指摘されており、フェノール誘発振せんに関しても、脳内モノアミン神経系とくにドパミン (DA) 神経系の関与^{5,6,8)}が指摘されている。本研究においては、マウスにフェノールを投与して脳内モノアミン神経系およびアミノ酸神経系伝達物質の含量を測定し、中枢モノアミン神経系およびアミノ酸神経系に対するフェノールの影響について検討した。

材料と方法

動物

実験には、ddY 系雄性マウス (28 g から 35 g, 日本 SLC, 浜松) を 1 群 8 匹から 9 匹として使用した。マウスは昼夜 12 時間間隔 (午前 7 時点灯, 午後 7 時消灯) で照明し、室温 22 ± 1°C, 湿度 55 ± 5% の一定環境下で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。

フェノールの投与条件

著者は前報⁹⁾において、マウスに対するフェ

ノール誘発振せんがフェノール 200 mg/kg の皮下投与で観察が容易であったことから、今回の実験においてもフェノールの投与量は 200 mg/kg とした。なお、フェノールは生理食塩水 (大塚生食注, 大塚製薬) に溶解し、対照群には生理食塩水を等量 (0.1 ml/10 g) 皮下投与した。

1) 脳内モノアミンおよびアミノ酸の含量の経時的変化

マウスにフェノールを投与し、脳内モノアミンおよびアミノ酸の含量の経時的変化を調べるために、フェノール投与 10 分, 20 分, 40 分および 60 分後にマウスを屠殺して検討した。この実験における物質含量の測定は、前報⁹⁾において ACh 含量の変化が著しかった線条体について行った。

2) 各脳部位における脳内モノアミンおよびアミノ酸の含量の測定

マウスの各脳部位における脳内モノアミンおよびアミノ酸の含量の測定は、線条体において物質含量の変化が最も大きかった時間に合わせてマウスを屠殺し、線条体、視床下部、大脳皮質、海馬を摘出して行った。

試料の作製

マウスをマイクロ波照射 (照射時間 6 sec, 2450 MHz/1 kw; Model RE-3000, シャープ) により屠殺して全脳を摘出した。脳の分割は Glowinski と Iversen¹²⁾ の方法の変法により、線条体、視床下部、大脳皮質、海馬を摘出し、ドライアイスで凍結後、重量を測定して -80°C に凍結保存した。線条体は 400 μl, その他の部位は 300 μl の 0.1 M 過塩素酸溶液中で超音波破碎して遠心分離 (12,000 g × 20 min, 4°C) 後、0.45 μm フィルター (Type HV, 日本ミリポア) で濾過した上清を -80°C に凍結して測定時まで保存した。

伝達物質の測定法

1) 脳内モノアミン神経系伝達物質および関連物質 (脳内モノアミン)

Norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT), 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid

(DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量の測定は、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いる Saito ら¹³⁾の方法により行った。

2) 脳内アミノ酸神経系伝達物質 (脳内アミノ酸)

Aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), glutamine (Gln), glycine (Gly), taurine (Tau), γ -aminobutyric acid (GABA) 含量の測定は、HPLC-ECD を用いる Murai ら¹⁴⁾の方法を一部改変し、分析用カラムに日立製 WH-C 18, 4.6 mm ID \times 50mm, 5 μ m を用いて行った。

統計学的処理

測定結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。結果の統計学的有意性は、脳内モノアミンおよびアミノ酸の含量の経時的变化に対しては Dunnett の多重比較検定を用い、マウス脳の部位別の含量の値に対しては Student の t 検定を用いて判定した。

結 果

1. 線条体モノアミンおよびアミノ酸の含量の経時的变化に及ぼすフェノールの影響

1) モノアミンの含量 (Table 1)

NE 含量と 5-HT 含量はマウスにフェノールを投与し、60 分後までの各測定時間においては対照群 (cont.) に対して有意な変化を示さなかった [NE: cont. 165 \pm 7, 10min 143 \pm 7, 20 min 153 \pm 7, 40min 170 \pm 6, 60min 153 \pm 7; 5-HT: cont. 394 \pm 16, 10min 374 \pm 22, 20 min 403 \pm 16, 40min 425 \pm 16, 60min 372 \pm 13]。一方、DA 含量はフェノールを投与して40分および60分後には対照群に対して有意な増加を示した [cont. 11067 \pm 481, 40min 13979 \pm 381 (+26.3%), 60 min 13243 \pm 462 (+19.7%)]. DA と 5-HT の主要代謝物である DOPAC, HVA, 5-HIAA の各含量はフェノールを投与して 10 分後に対照群に対して有意に減少し、さらに 40 分後と 60 分後では有意な増

Table 1. Effects of phenol on the contents of monoaminergic substances in the striatum of mice.

Substance	Control	Time after injection phenol			
		10min	20min	40min	60min
NE	165 \pm 7	143 \pm 7	153 \pm 7	170 \pm 6	153 \pm 7
MHPG	35 \pm 1	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
DA	11067 \pm 481	11091 \pm 274	12036 \pm 273	13979 \pm 381** (+26.3%)	13243 \pm 462** (+19.7%)
DOPAC	666 \pm 37	524 \pm 20* (-21.3%)	581 \pm 33	845 \pm 27** (+26.9%)	984 \pm 43** (+47.7%)
HVA	1055 \pm 30	838 \pm 28** (-20.6%)	1006 \pm 26	1340 \pm 47** (+27.0%)	1594 \pm 66** (+51.1%)
5-HT	394 \pm 16	374 \pm 22	403 \pm 16	425 \pm 16	372 \pm 13
5-HIAA	305 \pm 9	228 \pm 8* (-25.2%)	260 \pm 14	367 \pm 15** (+20.3%)	434 \pm 12** (+42.3%)

Mice were sacrificed by microwave irradiation 10, 20, 40 or 60 min after subcutaneous injection of phenol 200 mg/kg and saline solution 0.1ml/10 g body weight (control).

Values represent the mean \pm SEM (n=8~9) and the contents of substances are expressed in ng/g tissue weight.

The numbers in parentheses represent mean percent changes from control.

NE, norepinephrine; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol; DA, dopamine; DOPAC, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid; 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid.

N. D.: not determined.

* p<0.05, ** p<0.01 vs. controls (Dunnett's multiple range test, 2 sided).

加を示した [DOPAC: cont. 666±37, 10min 524±20 (-21.3%), 40min 845±27 (+26.9%), 60min 984±43 (+47.7%); HVA: cont. 1055±30, 10min 838±28 (-20.6%), 40min 1340±47 (+27.0%), 60min 1594±66 (+51.1%); 5-HIAA: cont. 305±9, 10min 228±8, (-25.2%), 40min 367±15 (+20.3%), 60min 434±12 (+42.3%)]. なおフェノール投与群は, 今回の実験方法では測定したいずれの時間においても, また, 線条体, 視床下部, 大脳皮質, 海馬いずれのマウス脳部位においても MHPG のピークと脳内に移行したフェノールによるピークとが重なり, MHPG の測定は不可能であった。

2) アミノ酸の含量 (Table 2)

測定した6種類, 全てのアミノ酸の含量は対照群に対して有意な変化を示した。Asp 含量はマウスにフェノールを投与して10分後に有意に減少し, 40分後では逆に増加を示した [cont. 3.68±0.08, 10min 3.33±0.08 (-9.5%), 40min 4.07±0.09 (+10.6%)]. Glu

含量はフェノールを投与して40分後と60分後には有意な増加を示した [cont. 12.54±0.20, 40min 13.96±0.24 (+11.3%), 60min 13.29±0.27 (+6.0%)]. Gln 含量はフェノールを投与して40分後に有意な増加を示した [cont. 6.66±0.17, 40min 7.51±0.15 (+12.8%)]. Gly 含量はフェノールを投与して10分後, 20分後そして40分後に有意な増加を示した [cont. 0.74±0.01, 10min 1.39±0.05 (+87.8%), 20min 1.22±0.03 (+64.9%), 40min 0.95±0.02 (+28.4%)]. Tau 含量はフェノールを投与して20分後と40分後に有意な増加を示した [cont. 13.98±0.26, 20min 14.89±0.28 (+6.5%), 40min 15.83±0.16 (+13.2%)]. GABA 含量はフェノールを投与して40分後に有意な増加を示した [cont. 1.93±0.04, 40min 2.11±0.05 (+9.3%)].

2. フェノールのマウス各脳部位への影響

上記の実験結果よりマウスの線条体モノアミンおよびアミノ酸の含量の変化が, フェノールを投与して40分後に著明であったことから,

Table 2. Effects of phenol on the contents of amino acidergic substances in the striatum of mice.

Substance	Time after injection phenol				
	Control	10min	20min	40min	60min
Asp	3.68±0.08	3.33±0.08* (-9.5%)	3.64±0.05	4.07±0.09** (+10.6%)	3.67±0.08
Glu	12.54±0.20	12.55±0.21	13.02±0.14	13.96±0.24** (+11.3%)	13.29±0.27* (+0.6%)
Gln	6.66±0.17	6.82±0.17	6.87±0.16	7.51±0.15** (+12.8%)	7.01±0.10
Gly	0.74±0.01	1.39±0.05** (+87.8%)	1.22±0.03** (+64.9%)	0.95±0.02** (+28.4%)	0.81±0.01
Tau	13.98±0.26	14.48±0.25	14.89±0.28* (+6.5%)	15.83±0.16** (+13.2%)	14.61±0.23
GABA	1.93±0.04	1.86±0.05	1.99±0.03	2.11±0.05* (+9.3%)	1.85±0.03

Mice were sacrificed by microwave irradiation 10, 20, 40 or 60 min after subcutaneous injection of phenol 200 mg/kg and saline solution 0.1ml/10 g body weight (control).

Values represent the mean ± SEM (n=8~9) and the contents of substances are expressed in μmol/g tissue weight.

The numbers in parentheses represent mean percent changes from control.

Asp, aspartic acid; Glu, glutamic acid; Gln, glutamine; Gly, glycine; Tau, taurine;

GABA, γ-aminobutyric acid.

* p<0.05, ** p<0.01 vs. controls (Dunnett's multiple range test, 2 sided).

線条体 (STR), 視床下部 (HYP), 大脳皮質 (CER), 海馬 (HIP) における脳内モノアミンおよびアミノ酸の含量の測定は, フェノールを投与して 40 分後にマウスを屠殺して行った。

1) モノアミンの含量 (Table 3)

NE 含量は, マウスの線条体, 視床下部, 海馬では対照群に対して有意な変化を示さなかった [STR: cont. 219 ± 22 , phenol 221 ± 9 ; HYP: cont. 1946 ± 53 , phenol 1448 ± 49 ; HIP: cont. 411 ± 10 , phenol 390 ± 15] が, 大脳皮質では有意な減少を示した [CER: cont. 358 ± 18 , phenol 270 ± 14 (-24.6%)]. DA 含量は線条体, 視床下部で対照群に対して有意な増加を示した [STR: cont. 11907 ± 435 , phenol 14617 ± 414 (+22.8%); HYP: cont. 668 ± 16 , phenol 778 ± 29 (+16.5%)] が, 大脳皮質では有意な減少を示した [CER: cont. 511 ± 16 , phenol 372 ± 12 (-27.2%)]. DOPAC 含量は線条体, 海馬で対照群に対して有意な増加

を示し [STR: cont. 743 ± 44 , phenol 927 ± 22 (+24.8%); HIP: cont. 27 ± 1 , phenol 69 ± 6 (+155.6%)], 大脳皮質で有意な減少を示した [CER: cont. 90 ± 5 , phenol 59 ± 3 (-34.4%)]. HVA 含量は, 測定した全ての脳部位で対照群に対して有意な増加を示した [STR: cont. 923 ± 32 , phenol 1129 ± 42 (+22.3%); HYP: cont. 208 ± 5 , phenol 589 ± 23 (+183.2%); CER: cont. 140 ± 11 , phenol 202 ± 4 (+44.3%); HIP: cont. 47 ± 3 , phenol 85 ± 3 (+80.9%)]. 5-HT 含量は線条体と大脳皮質では対照群に対して有意な変化を示さなかった [STR: cont. 985 ± 18 , phenol 1098 ± 38 ; CER: cont. 567 ± 21 , phenol 548 ± 27] が, 視床下部と海馬では有意な増加を示した [HYP: cont. 1558 ± 23 , phenol 1706 ± 37 (+9.5%); HIP: cont. 623 ± 10 , phenol 710 ± 20 (+14.0%)]. 5-HIAA 含量は HVA 含量と同様に, 全ての脳部位で対照群に対して有意な増

Table 3. Effects of phenol on the contents of monoaminergic substances in the striatum, hypothalamus, cerebral cortex and hippocampus of mice.

Region	Substance (ng/g tissue weight)						
	NE	MHPG	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
Striatum control	219 ± 22	29 ± 2	11907 ± 435	743 ± 44	923 ± 32	985 ± 18	312 ± 8
phenol	221 ± 9	N. D.	$14617 \pm 414^{**}$ (+22.8%)	$927 \pm 22^{**}$ (+24.8%)	$1129 \pm 42^{**}$ (+22.3%)	1098 ± 38	$375 \pm 15^{**}$ (+20.2%)
Hypothalamus control	1946 ± 53	96 ± 4	668 ± 16	231 ± 13	208 ± 5	1558 ± 23	462 ± 17
phenol	1448 ± 49	N. D.	$778 \pm 29^{**}$ (+16.5%)	274 ± 13	$589 \pm 23^{**}$ (+183.2%)	$1706 \pm 37^{**}$ (+9.5%)	$567 \pm 15^{**}$ (+22.7%)
Cerebral cortex control	358 ± 18	16 ± 1	511 ± 16	90 ± 5	140 ± 11	567 ± 21	110 ± 5
phenol	$270 \pm 14^{**}$ (-24.6%)	N. D.	$372 \pm 12^{**}$ (-27.2%)	$59 \pm 3^{**}$ (-34.4%)	$202 \pm 4^{**}$ (+44.3%)	548 ± 27	$136 \pm 5^{**}$ (+23.6%)
Hippocampus control	411 ± 10	11 ± 1	80 ± 7	27 ± 1	47 ± 3	623 ± 10	304 ± 6
phenol	390 ± 15	N. D.	87 ± 7	$69 \pm 6^{**}$ (155.6%)	$85 \pm 3^{**}$ (+80.9%)	$710 \pm 20^{**}$ (+14.0%)	$361 \pm 13^{**}$ (+18.8%)

Mice were sacrificed by microwave irradiation 40 min after subcutaneous injection of phenol 200 mg/kg and saline solution 0.1ml/10 g body weight (control).

Values represent the mean \pm SEM (n=8) and the contents of substances are expressed in ng/g tissue weight.

The numbers in parentheses represent mean percent changes from control.

NE, norepinephrine; MHPG, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol; DA, dopamine;

DOPAC, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid; 5-HT, serotonin;

5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid.

N. D.: not determined.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. controls (Student's t test).

加を示した [STR: cont. 312±8, phenol 375 ±15 (+20.2%) ; HYP : cont. 462±17, phenol 567±15 (+22.7%) ; CER: cont. 110 ±5, phenol 136±5 (+23.6%) ; HIP : cont. 304±6, phenol 361±13 (+18.8%)].

2) アミノ酸の含量 (Table 4)

Asp 含量は測定した全てのマウス脳部位で対照群に対して有意な増加を示した [STR : cont. 3.35±0.07, phenol 3.75±0.08 (+11.9%) ; HYP : cont. 3.67±0.07, phenol 4.03±0.07 (+9.8%) ; CER: cont. 3.87±0.15, phenol 4.62±0.17 (+19.4%) ; HIP : cont. 3.03±0.08, phenol 3.32±0.10 (+9.6%)]. Glu 含量は線条体でのみ対照群に対して有意な増加を示した [STR : cont. 13.04±0.16, phenol 14.58±0.19 (+11.8%)]. Gln 含量は線条体, 視床下部, 海馬で対照群に対して有意な増加を示した [STR : cont. 5.81±0.17, phenol 6.60±0.08 (+11.3%) ; HYP : cont. 6.52±0.10, phenol 7.05±0.06 (+8.1%) ;

HIP : cont. 5.33±0.20, phenol 5.96±0.09 (+11.8%)] が, 大脳皮質では有意な変化を示さなかった [CER : cont. 5.03±0.99, phenol 5.33±0.17]. Gly 含量は線条体, 視床下部, 大脳皮質で対照群に対して有意な増加を示した [STR: cont. 0.82±0.03, phenol 1.02±0.03 (+24.4%) ; HYP : cont. 1.43±0.02, phenol 1.51±0.02 (+5.6%) ; CER : cont. 0.68±0.02, phenol 0.73±0.02 (+7.4%)] が, 海馬では有意な変化を示さなかった [HIP : cont. 0.90±0.03, phenol 0.96±0.03]. Tau 含量および GABA 含量は Glu 含量と同様に, 線条体でのみ対照群に対して有意な増加を示した [Tau : cont. 17.22±0.16, phenol 19.33±0.26 (+12.3%) ; GABA : cont. 2.40±0.06, phenol 2.63±0.05 (+9.6%)].

考 察

フェノール合剤は, 歯科臨床において根管消毒剤や歯髄鎮静剤として使用されている¹⁾.

Table 4. Effects of phenol on the contents of amino acidergic substances in the striatum, hypothalamus, cerebral cortex and hippocampus of mice.

Region	Substance (μmol/g tissue weight)					
	Asp	Glu	Gln	Gly	Tau	GABA
Striatum control	3.35±0.07	13.04±0.16	5.81±0.17	0.82±0.03	17.22±0.16	2.40±0.06
phenol	3.75±0.08** (+11.9%)	14.58±0.19** (+11.8%)	6.60±0.08** (+11.3%)	1.02±0.03** (+24.4%)	19.33±0.26** (+12.3%)	2.63±0.05* (+9.6%)
Hypothalamus control	3.67±0.07	10.47±0.17	6.52±0.10	1.43±0.02	8.83±0.23	4.49±0.88
phenol	4.03±0.07** (+9.8%)	10.84±0.20	7.05±0.06** (+8.1%)	1.51±0.02** (+5.6%)	8.73±0.09	4.55±0.05
Cerebral cortex control	3.87±0.15	15.20±0.32	5.03±0.99	0.68±0.02	14.44±0.16	1.35±0.02
phenol	4.62±0.17** (+19.4%)	15.85±0.46	5.33±0.17	0.73±0.02* (+7.4%)	13.92±0.22	1.36±0.02
Hippocampus control	3.03±0.08	14.41±0.28	5.33±0.20	0.90±0.03	14.24±0.19	1.92±0.06
phenol	3.32±0.10* (+9.6%)	15.08±0.14	5.96±0.09* (+11.8%)	0.96±0.03	14.52±0.16	1.87±0.04

Mice were sacrificed by microwave irradiation 40 min after subcutaneous injection of phenol 200 mg/kg and saline solution 0.1ml/10 g body weight (control).

Values represent the mean±SEM (n=8) and the contents of substances are expressed in μmol/g tissue weight.

The numbers in parentheses represent mean percent changes from control.

Asp, aspartic acid ; Glu, glutamic acid ; Gln, glutamine ; Gly, glycine ; Tau, taurine ;

GABA, γ-aminobutyric acid.

* p<0.05, ** p<0.01 vs. controls (Student's t test).

フェノール合剤は歯髄に対する局所作用を有しており、高濃度では細菌に対して原形質毒として作用し、細胞壁の機能を破壊したり、細胞内のタンパク質を変性、凝固、沈殿させ、低濃度では酵素系を不活性化することにより細胞を死に導いて殺菌作用を示す¹⁾。現在までにフェノール合剤の毒性^{15, 16)}、拡散性¹⁷⁾、表面張力¹⁸⁾などについての報告があり、歯周組織への影響についてもいくつかの報告がある^{19, 20)}。また、近年フェノール合剤の局所作用のひとつに抗炎症作用^{1, 21-24)}が考えられており、その作用機序として、プロスタグランジンの合成阻害^{21, 22)}、リポキシゲナーゼの合成阻害²³⁾、活性酸素に対するスカベンジャー効果²⁴⁾などが報告されている。歯科臨床で用いられるフェノール合剤の用量は極めて少量であるけれども、組織に大量に吸収された場合には中毒症状などの全身作用が発現する。実際にガン性疼痛に対する神経ブロックにフェノールを用い、けいれんが誘発された報告もある^{25, 26)}。このようにフェノール合剤には局所作用だけでなく全身作用もあることが考えられる。そこで、フェノール合剤の基本骨格であるフェノールの全身作用のなかで、フェノール振せんについて研究を行った。

従来、薬物振せんやけいれんに関して、種々の中枢神経系の関与が指摘されている。Angelら²⁷⁾はカテコール振せんが、抗コリン薬で抑制され、コリンエステラーゼ阻害薬で増強されるという結果から、カテコール振せんの発現に脳内ACh神経系の賦活化が重要であると報告している。CoxとPotkonjak^{28, 29)}はトレモリンやその代謝物であるオキソトレモリンは脳内ACh量を増加させ、振せんを誘発することを報告している。Georgeら³⁰⁾もネコの中脳にオキソトレモリンを微量注入すると振せんが惹起され、これがアトロピンで抑制されることを報告している。これらの報告から、振せんの誘発にACh神経系が関与していることが示唆される。マウスにおけるフェノール振せんについても、鈴木ら⁷⁾が、コリンエステラーゼ阻害薬であり血液脳関門を通過しないネオスチグミンの末

梢投与で振せんが増強され、血液脳関門を通過するフィズスチグミンでは著しい影響を受けなかったことから、末梢の組織ACh量の増加は振せんの増強をもたらす、中枢のACh量の増加は末梢運動神経系の興奮に対しネガティブフィードバック制御を行っている可能性を示唆している。著者⁹⁾は、フェノール振せんとうACh神経系との関係を神経化学的に検討し、フェノール振せんに直接関与するのは末梢の神経・筋接合部におけるフェノールによる節前線維からのAChの放出増大であり、フェノール振せんがフィズスチグミンの脳室内投与によって抑制されることから、中枢におけるフェノールによるAChの放出の増大はニコチン性ACh神経系を介してフェノール振せんを抑制している可能性を報告した。

一方、マウスにおけるフェノール振せんの誘発には、ACh神経系以外の中枢神経系も関与している可能性が行動薬理学的研究より示されている^{5, 6, 8)}。また他の薬物誘発振せんについては、RogersとSlater¹⁰⁾はトレモリンやフィズスチグミンの脳内モノアミン系に対する影響について；KellyとNaylor³¹⁾はハルミン誘発振せんに対するDA神経系の関与について、そしてGoldsteinら³²⁾はハルミン誘発振せんに対しDA作動性神経の主経路とされている黒質-線条体路が重要な役割を演じていることを報告した。本研究においては、前報⁹⁾に加えて、中枢モノアミン神経系とアミノ酸神経系に関与する神経伝達物質の含量に及ぼすフェノールの影響について検討した。

マウスの線条体モノアミン神経系伝達物質に対して、フェノールはDAおよび5-HTの主要代謝物であるDOPAC, HVAおよび5-HIAAの含量に、経時的に強い影響を及ぼすことを認めた。この影響の特徴は、マウスにフェノールを投与して10分後にDAと5-HTの代謝物が減少し、その後、時間の経過とともに増加を示す、いわゆる時間依存的な二相性の変化であった。これらの所見は、マウスにフェノールを投与して10分後ではDAと5-HTの代謝回転の抑

制, 40分以後は代謝回転の亢進が起きている可能性を示唆している。この時間依存的な二相性の変化は, 今回測定したマウスの線条体アミノ酸神経系伝達物質, すなわち Asp 含量においても認められた。

マウス線条体における他のアミノ酸含量は, マウスにフェノールを投与して10分から40分後にかけて増加し, とくに40分後で著明であった。また, マウス各脳部位のアミノ酸含量も, 線条体では6種類全てが, 視床下部では Asp, Gln, Gly 含量が, 大脳皮質では Asp, Gly 含量が, 海馬では Asp, Gln 含量が増加を示した。これらの所見から, フェノールはアミノ酸神経系にも影響を及ぼすことが示された。

次に, マウスにフェノールを投与して40分後における各脳部位のモノアミン系伝達物質の含量は, 線条体, 視床下部, 海馬では, ほとんど全てのモノアミン含量が増加を示したにも関わらず, 大脳皮質では DA と DOPAC の含量が著しく減少し, HVA 含量は増加した。これらの所見は, フェノールが線条体, 視床下部, 海馬において DA 神経系と 5-HT 神経系における神経伝達物質の代謝回転を促進させ, また, 大脳皮質においても, 神経伝達物質の代謝過程に影響を及ぼしたことを示唆している。

鈴木ら^{5,6,8)}は, マウスにおけるフェノール振せんの研究から, (1)DA の生体内前駆物質である L-dopa の末梢への投与⁵⁾, DA の脳室内への投与⁶⁾, そして DA レセプターに作用するアゴニストのアポモルフィンの末梢投与により振せんは増強される⁶⁾。(2)DA アゴニストにより増強された振せんは, DA レセプターアンタゴニストであるハロペリドールにより拮抗される⁶⁾。(3)レセルピンによる中枢モノアミン含量の低下は, 振せんの増強をもたらす⁸⁾。ことを報告している。鈴木ら^{5,6,8)}のこの知見は脳内 DA 神経系が関与する可能性を示唆するものである。本実験の結果は, フェノールが脳内 DA 神経系活性に影響を及ぼすという点では, 鈴木ら^{5,6,8)}の見解と一致する。

著者の前報⁹⁾では, マウス線条体および大脳

皮質の ACh 含量と振せんスコアの経時的変化は, いずれもフェノールを投与して10分後をピークとする用量依存的な一相性の変化であった。しかし, 本実験では, モノアミン神経系およびアミノ酸神経系伝達物質に対するフェノールの影響は, 時間依存的な二相性の変化であった。この時間依存的な二相性の変化は, 振せんスコアと平行した経時的変化ではなかった。また, フェノール振せんは, マウスにフェノールを投与して60分後にはほとんど消失したが, モノアミン神経系およびアミノ酸神経系伝達物質の含量はなお増加した状態を維持していた。このようなモノアミン神経系およびアミノ酸神経系の伝達物質は, フェノール振せんの誘発には直接的には関係していないように思われる。また, 著者の前報⁹⁾でフェノールのマウス脳室内投与では振せんが誘発されなかったことより, フェノールによる脳内 ACh 含量の変化がフェノール振せんの誘発に直接的には関与せず, 末梢におけるフェノールによる ACh の放出の増大が直接的な要因である可能性を報告した。従って, 本実験の結果からも, マウスにおけるモノアミン神経系およびアミノ酸神経系の伝達物質が, フェノール振せんの誘発には直接的には関与せず, 末梢におけるフェノールによる ACh の放出の増大が, フェノール振せんの誘発の直接的な要因である可能性がさらに強くなったと考えられる。一方ではマウスにフェノールを投与して10分後にはフェノール振せんがピークに達するが, マウス線条体の DOPAC, HVA, および 5-HIAA 含量は減少している。この理由については, 本研究では不明であった。また, モノアミン神経系, アミノ酸神経系と ACh 神経系との間に, 相互作用や干渉作用のある可能性も考えられるが, 本研究においては詳細については不明である。今後の検討課題としたい。

本研究において, フェノールがモノアミン神経系およびアミノ酸神経系に対して時間依存的な二相性の変化を示したことは, 薬理学的に興味ある知見と考える。

結 論

マウス脳内モノアミン神経系およびアミノ酸神経系伝達物質の含量に及ぼすフェノールの影響について検討し以下の結論を得た。

- 1) マウス線条体において, DA, 5-HTの主要代謝物であるDOPAC, HVA, 5-HIAA含量は, 時間依存的な二相性の変化を示した。このような変化は, Asp含量でも認めた。
- 2) マウス各脳部位のモノアミン神経系伝達物質の含量は線条体, 視床下部, 海馬では増加したが, 大脳皮質ではDAとDOPAC含量が著しく減少しHVA含量は増加した。これらの結果よりフェノールが線条体, 視床下部, 海馬においてDA神経系と5-HT神経系の神経伝達物質の代謝回転の促進と大脳皮質における伝達物質の代謝過程に対し著しい影響を及ぼす可能性が示唆された。
- 3) マウス各脳部位のアミノ酸神経系伝達物質の含量は, フェノールの投与によって影響を受けた。
- 4) 先の著者の報告におけるACh含量およびフェノール振せんのスコアの経時的変化は用量依存的な一相性の変化であったのに対し, 本実験におけるモノアミン神経系およびアミノ酸神経系伝達物質含量の経時的変化は時間依存的な二相性の変化を示した。このことからモノアミン神経系およびアミノ酸神経系の伝達物質が, フェノール振せんの誘発に直接的には関係していないことが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始懇切なるご指導, ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科薬理学講座 伊藤忠信教授, 村井繁夫助教授ならびに齊藤弘子助手に心より謝意を表します。また, 同歯科薬理学講座の方々から心から感謝申し上げます。本論文に対し懇切丁寧なるご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部口腔生化学講座 太田 稔教授, ならびに岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座 名和橙黄雄教授に心から深

謝いたします。

文 献

- 1) 小椋秀亮, 小倉保己: 現代歯科薬理学, 第2版, 医歯薬出版, 東京, 151 - 158 ページ, 527 - 537 ページ, 556 - 563 ページ, 1989.
- 2) Matsumoto, J., Kiyono, S., Nishi, H., Koike, J. and Ichihashi, T.: The convulsive mechanism of phenol derivatives. *Med. J. Osaka Univ.* 13 : 313-323, 1963.
- 3) Otsuka, M. and Nonomura, Y : The action of phenolic substances on motor nerve endings. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 140 : 41-45, 1963.
- 4) Banna, N. R. and Jabbur, S. J. : Increased transmitter release induced by convulsant phenols. *Brain Res.* 20 : 471-473, 1970.
- 5) 鈴木崇彦, 木皿憲佐, 小野寺憲治, 高野桂悦, 小椋保己: Phenolの毒性に関する行動薬理学的研究(Ⅱ), 歯基礎誌, 23 : 409 - 413, 1981.
- 6) 鈴木崇彦, 木皿憲佐, 小野寺憲治, 高野桂悦, 小椋保己: Phenolの毒性に関する行動薬理学的研究(Ⅲ), 歯基礎誌, 23 : 414 - 418, 1981.
- 7) 鈴木崇彦, 木皿憲佐, 小野寺憲治, 小椋保己: Phenol振戦に関する薬理学的研究(第7報), 日薬理誌, 81 : 127 - 134, 1983.
- 8) Suzuki, T. and Kisara, K. : Enhancement of phenol-induced tremor caused by central monoamine depletion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22 : 153-155, 1985.
- 9) Itoh, M. : The role of brain acetylcholine in phenol-induced tremor in mice. *Archs. Oral Biol.* 40 : 365-372, 1995.
- 10) Rogers, K. J. and Slater, P. : Effects of tremorine, physostigmine and tremor blocking drugs of brain monoamines. *Archs. Int. Pharmacodyn.* 193 : 68-72, 1971.
- 11) Sato, K., Morimoto, K., Hiramatsu, M., Mori, A. and Otsuki, S. : Effect of a noncompetitive antagonist (MK-801) of NMDA receptor on convulsions and brain amino acid level in E1 mice. *Neurochem. Res.* 14 : 741-744, 1989.
- 12) Glowinski, J. and Iversen, L. L. : Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochem.* 13 : 655-669, 1966.
- 13) Saito, H., Murai, S., Abe, E., Masuda, Y. and Itoh, T. : Rapid and simultaneous assay of monoamine neurotransmitters and their metabolites in discrete brain areas of mice by HPLC with coulometric detection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42 : 351-356, 1992.
- 14) Murai, S., Saito, H., Abe, E., Masuda, Y. and Itoh, T. : A rapid assay for neurotransmitter amino acids, aspartate, glutamate, glycine, taurine and γ -aminobutyric acid in the brain by high-performance liquid chromatography with

- electrochemical detection. *J. Neural Transm.* 87 : 145-153, 1992.
- 15) Kasugai, S., Hasegawa, N. and Ogura, H. : Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established dental pulp cell. *J. Dent. Res.* 70 : 127-130, 1991.
- 16) Ketley, C. E. and Goodman, J. R. : Formocresol toxicity : is there a suitable alternative for pulpotomy of primary molars? *Int. J. Paediatr. Dent.* 1 : 67-72, 1991.
- 17) Gutierrez, J. H., Donoso, E., Villena, F. and Jofre, A. : Diffusion of medicaments within root canal dentin. A scanning electron microscopic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 72 : 351-358, 1991.
- 18) Pecora, J. D., Guimaraes, L. F. and Savioli, R. N. : Surface tension of several drugs used in endodontics. *Braz. Dent. J.* 2 : 123-127, 1992.
- 19) Abrams, H., Cunningham, C. J. and Lee, S. B. : Periodontal changes following coronal/root perforation and formocresol pulpotomy. *J. Endod.* 18 : 399-402, 1992.
- 20) 山崎雅弘 : 抜髄後のラットの根尖部歯周組織におよぼすホルマリン・クレオソートの影響, 愛院大歯誌, 28 : 435-459, 1990.
- 21) Anamura, S., Dohi, T., Shirakawa, M., Okamoto, H. and Tsujimoto, A. : Effects of phenolic dental medicaments on prostagrandin synthesis by microsomes of bovine tooth pulp and rabbit kidney medulla. *Archs. Oral Biol.* 33 : 555-560, 1988.
- 22) Dohi, T., Terada, H., Anamura, S., Okamoto, H. and Tsujimoto, A. : The anti-inflammatory effects of phenolic dental medicaments as determined by mouse ear edema assay. *Japan. J. Pharmacol.* 49 : 535-539, 1989.
- 23) Dohi, T., Anamura, S., Shirakawa, M., Okamoto, H. and Tsujimoto, A. : Inhibition of lipoxigenase by phenolic compounds. *Japan. J. Pharmacol.* 55 : 547-550, 1991.
- 24) Tsujimoto, Y., Hashizume, H. and Yamazaki, M. : Superoxide radical scavenging activity of phenolic compounds. *Int. J. Biochem.* 25 : 491-494, 1993.
- 25) Smith, M. C. : Histological finding following intrathecal injection of phenol solutions for relief of pain. *Br. J. Anaesth.* 36 : 387-406, 1984.
- 26) Benzon, H. T. : Convulsions secondary to intravascular phenol : a hazard of celiac plexus block. *Anesth. Analg.* 58 : 150-151, 1979.
- 27) Angel, A., Clarke, K. A. and Dewhurst, D. G. : A pharmacological study of the spontaneous convulsive activity induced by 1, 2-dihydroxybenzene (catechol) in the anaesthetized mouse. *Br. J. Pharmacol.* 61 : 433-439, 1977.
- 28) Cox, B. and Potkonjak, D. : The relationship between tremor and change in brain acetylcholine concentration produced by injection of tremorine or oxotremorine in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 35 : 295-303, 1969.
- 29) Cox, B. and Potkonjak, D. : The effects of atropine and dyflos on tremor and increase in whole brain acetylcholine produced by injection of oxotremorine in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 35 : 521-529, 1969.
- 30) George, R., Haslett, W. L. and Jenden, D. J. : The production of tremor by cholinergic drugs : central sites of action. *Int. J. Neuropharmacol.* 5 : 27-34, 1966.
- 31) Kelly, D. M. and Naylor, R. J. : Mechanisms of tremor injection by harmine. *Eur. J. Pharmacol.* 27 : 14-24, 1974.
- 32) Goldstein, M., Battista, A. F., Fuxe, K., Ohmoto, T. and Anagnoste, B. : The effect of 1-(2"-pyrimidyl)-4-piperonyl-piperazine (ET 495) on tremor and involuntary movements in monkeys with nigral lesions. *Psychopharmacology* 26 : Suppl. 23, 1972.