

原 著

舌動脈血管平滑筋に対するデクスメドトミジン塩酸塩
の作用について筑田 真未¹⁾, 城 茂治²⁾, 佐藤 健一¹⁾¹⁾ 岩手医科大学歯学部口腔顎顔面再建学講座歯科麻酔学分野

(主任: 佐藤 健一 教授)

²⁾ 岩手医科大学歯学部補綴・インプラント学講座摂食嚥下・口腔リハビリテーション学分野

(主任: 城 茂治 教授)

(受付: 2017年12月26日)

(受理: 2018年1月10日)

抄 録

超高齢社会において、歯科医師は合併疾患を複数有する患者を診療していかなければならない。現在のアドレナリン含有局所麻酔薬の使用によって異常な血圧上昇をきたすことにより心疾患の増悪や脳血管障害などの偶発症を起こしかねない。それらの偶発症を未然に防ぐためにアドレナリンに代わる循環動態変化のより少ない局所麻酔薬添加薬が必要と考えられ、デクスメドトミジン塩酸塩 (Dex) が注目されている。今回われわれは、顎顔面領域の主要動脈の一つである舌動脈血管平滑筋に対する Dex の作用およびその作用機序について等尺性収縮張力と細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) 動態を同時測定し検討を行った。

屠殺ブタ (月齢 6 カ月) の舌から直径 1~2 mm の舌動脈を摘出し、長さ 2~3 mm に切断した後、血管内皮を剥離し反転して内膜側を外側にした舌動脈血管平滑筋の輪状標本を作製した。

Fura-2/AM を負荷した標本を細胞内カルシウムイオン測定装置 (AQUACOSMOSTM, HAMAMATSU) の恒温槽内 (1.0 ml) に設置し、静止張力 4 mN を負荷した。酸素 95 % と二酸化炭素 5 % 混合ガスのバブリング下で Hanks Component Solution 溶液 (HCS) を 30 分間灌流した後各種刺激薬 (KCl, アドレナリン, カフェイン, ヒスタミン) を投与し、その際に発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を同時測定した。

ブタ舌動脈血管平滑筋で、Dex は高 KCl の脱分極性刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ を添加濃度の増加に伴って増加させ、アドレナリンの受容体刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の増加を濃度依存性に抑

The effect of dexmedetomidine on swine isolated endothelium-denuded lingual arterial vascular smooth muscle

Mami CHIKUDA¹⁾, Shigeharu JOH²⁾, and Kenichi SATO¹⁾

¹⁾ Division of Dental Anesthesiology, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University,

(Chief: Prof. Kenichi SATO)

²⁾ Division of Oral and Dysphasia Rehabilitation, Department of Prosthodontics and Oral Implantology, School of Dentistry, Iwate Medical University,

(Chief: Prof. Shigeharu JOH)

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

制した. このことから収縮張力の増大には $[Ca^{2+}]_i$ が関与していることが示唆された. Dex は細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入機構である受容体活性化 Ca^{2+} チャネル (RACC) を抑制した. 細胞内貯蔵部位からの細胞内への Ca^{2+} 放出機構であるホスファチジルイノシトールリン脂質 (PI) 代謝回転で生じるイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP_3) 刺激による Ca^{2+} 放出 (ICR) を抑制したが, 細胞外からの Ca^{2+} の流入による細胞内 Ca^{2+} 誘導性 Ca^{2+} 放出 (CICR) は抑制しなかった. Dex の口腔内主要動脈の一つである舌動脈血管平滑筋に対する Dex の作用と作用機序を解明したことは Dex 添加局所麻酔薬の創薬に対する一助となりえる.

緒 言

超高齢社会において, 歯科医師は合併疾患を複数有する患者を診療していかなければならない. 現在のアドレナリン含有局所麻酔薬の使用によって異常な血圧上昇をきたすことにより心疾患の増悪や脳血管障害などの偶発症を起こしかねない. それらの偶発症を未然に防ぐためにアドレナリンに代わる循環動態変化のより少ない局所麻酔薬添加薬が必要と考えられ, デクスメデトミジン塩酸塩 (Dex) が注目されている^{1,6)}. 歯科麻酔領域では, モルモットに Dex 添加リドカイン塩酸塩を経皮的に投与した実験で濃度依存性に局所麻酔効果の増強がみられ¹⁾, 血圧や脈拍を変動させることなく濃度依存性に局所の血流を減少させ²⁾, 投与部位の炎症を抑制した³⁾との報告がある. 医科麻酔領域では Dex を局所麻酔薬に添加し, 硬膜外腔や末梢神経周囲に投与することにより局所麻酔薬の作用力価・作用持続時間を延長させることで単回投与のみで術後鎮痛をカバーする試みが積極的に行われている^{7,8,9)}. これらのことから Dex 添加局所麻酔薬を選択すれば麻酔作用時間の延長, 効果の増強が同時に得られる可能性があり, 循環器・脳血管疾患を有する患者の歯科治療時に有用な局所麻酔薬となりえると考えられる.

しかしながら, Dex は歯科用局所麻酔薬への新しい添加薬として注目され多くの臨床的研究が遂行されている^{4,6)}が, 顎顔面領域の動脈における Dex の作用およびその作用機序について検討されていない. そこで今回, 顎顔面領域の主要動脈の一つである舌動脈血管平滑筋に対す

る Dex の作用およびその作用機序を解明することを目的として収縮張力 (tension) と細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) 動態を同時測定し検討を行った. Dex の作用については脱分極性刺激と受容体刺激にどのような作用を及ぼすかを, 作用機序については血管平滑筋の収縮機構における $[Ca^{2+}]_i$ の増大に関するもっとも重要な因子である 2 つの経路, 細胞外 Ca^{2+} の細胞内への Ca^{2+} 流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの細胞内への Ca^{2+} 放出で, どの部位に Dex が影響を与えるのかについて検討した.

材料および方法

1. 実験材料

屠殺ブタ (月齢 6 カ月) の舌から直径 1~2 mm の舌動脈を摘出し, 長さ 2~3 mm に切断した後, 血管内皮を剥離し反転して内膜側を外側にした舌動脈血管平滑筋の輪状標本作製した.

2. 実験方法

1) 蛍光カルシウム指示薬 Fura-2/AM の負荷

Hanks Component Solution (HCS) に Ca^{2+} 感受性色素 Fura-2/AM (同仁化学) 30 μ M, 0.01% Pluronic F-127 (BASF) を溶解した液中に標本を浸し, 暗所, 37°C の恒温槽内で約 3 時間半振盪させた. HCS の組成は 0.34 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 0.44 mM KH_2PO_4 , 0.8 mM $MgSO_4$, 1.26 mM $CaCl_2$, 4.2 mM $NaHCO_3$, 5.55 mM Glucose, 5.36 mM KCL, 137 mM NaCl, pH7.37 とした.

2) 細胞内カルシウムイオン濃度および収縮張力の測定方法

Fura-2/AMを負荷した標本を細胞内カルシウムイオン測定装置 (AQUACOSMOS™, HAMAMATSU) の恒温槽内 (1.0 ml) に設置し、静止張力 4 mN を負荷した。酸素 95 % と二酸化炭素 5 % 混合ガスのバブリング下で HCS 溶液を 30 分間灌流した後各種刺激薬を投与し、その際に発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を同時測定した。収縮張力の測定については、標本を細胞内カルシウムイオン濃度測定装置の恒温槽内に、一端をマニピレータ (M-152, ナリシゲ) に固定し、他端はタングステンワイヤーを介して張力トランスデューサー (UL-2GR, ミネビア) に固定し、圧増幅ユニット (N4438, 日本電気三栄) を介して Power Lab® (ADInstruments) で記録した。 $[Ca^{2+}]_i$ については、倒立型蛍光顕微鏡 (DIAPHOT-300, Nikon) 下に測定部位を決定し、細胞内カルシウムイオン測定装置内のキセノンランプから発する励起光を、340 nm と 380 nm のバンドパスフィルター付き回転盤を通して標本に照射することにより二波長励起を行った。それにより標本組

織から発する蛍光を 500 nm のフィルターを介して光電子増幅管に導き、340 nm と 380 nm 励起蛍光強度を測定し、その蛍光強度比 (Ratio) をもって $[Ca^{2+}]_i$ 変化の指標とした。

3) 各標本の基準値の測定

実験の開始時にすべての標本に対して、60 mM KCl を 2 分間灌流し、それによって生じた収縮張力および蛍光強度比の最大変化値を測定し、各々の標本における基準値 (100 %) とした。なお、60 mM KCl 溶液は、HCS 溶液の NaCl と KCl を等モル置換して作製した。

4) 各種 α 受容体作動薬が舌動脈血管平滑筋に及ぼす影響について

(1) 各種濃度の Dex とイミダゾリンが舌動脈血管平滑筋に及ぼす直接作用について (図 1)

60 mM KCl 溶液を約 2 分間灌流し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定、記録しコントロールとした。次に 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10^{-5} M 濃度の順に Dex (Wako: 分子量 266.55) またはイミダゾリン (Wako: 分子量 236.74) を添加

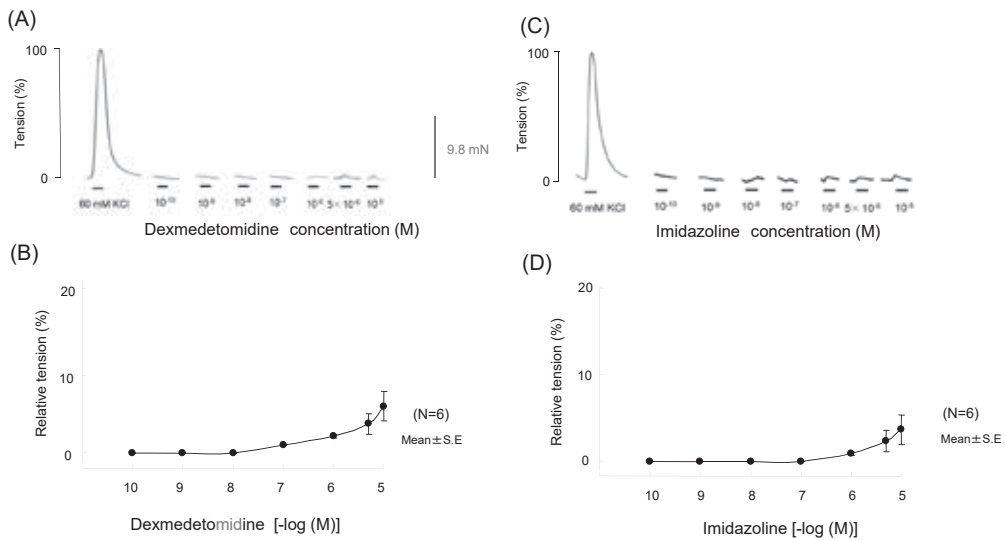


図 1: 舌動脈血管平滑筋に対する直接作用
(A), (C); 収縮張力のトレース
(B), (D); 各濃度での収縮張力の比較

した HCS 溶液をそれぞれ投与し, その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した. (N=6)

(2) 各種濃度の Dex とイミダゾリンが高 KCl による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響 (図 2)

60 mM KCl 溶液を約 2 分間灌流し, その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定, 記録しコントロールとした. 次に 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10^{-5} M 濃度の順に Dex またはイミダゾリンを添加した 60

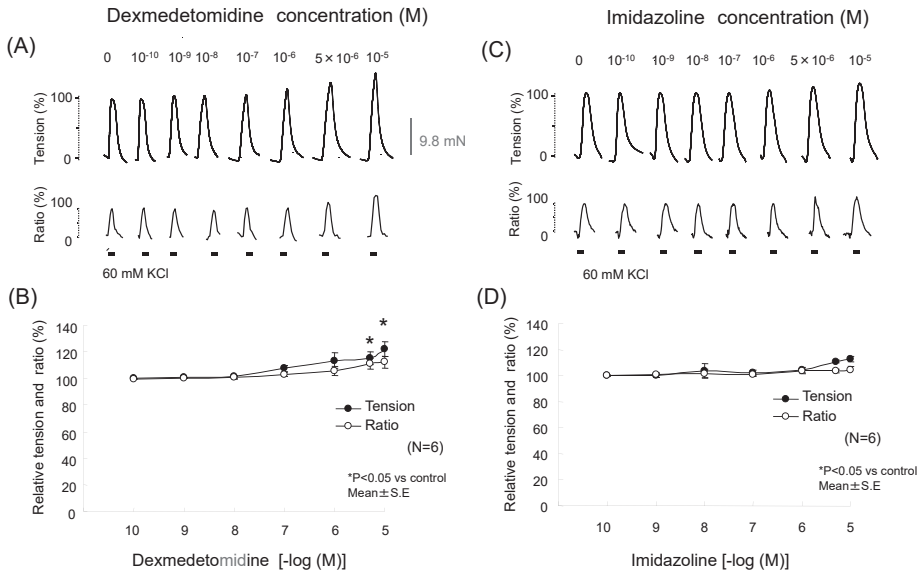


図 2: 高 KCl 刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用 (A), (C); 収縮張力と蛍光強度比のトレース (B), (D); 各濃度での収縮張力と蛍光強度比の比較

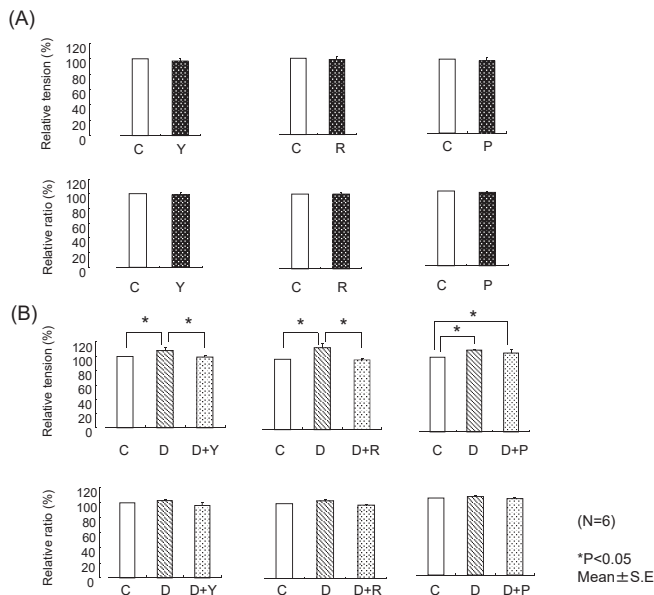


図 3: 高 KCl 刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ に対する各種 α 受容体拮抗薬の作用 (A); 高 KCl のみと高 KCl に各種拮抗薬を添加した場合との比較 (B); 高 KCl のみと高 KCl に Dex を添加と Dex 含有高 KCl に各種拮抗薬を添加した場合との比較 C, control; Y, yohimbine; R, rauwolscine; P, prazosin; D, dexmedetomidine

mM KCl 溶液をそれぞれ投与し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化を測定した. (N=6)

(3) ヨヒンビン, ラウオルシン, プラゾシンが高 KCl による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響 (図 3)

60 mM KCl 溶液を約 2 分間灌流し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定、記録しコントロールとした. 次に 5×10^{-6} M Dex を添加した 60 mM KCl 溶液を投与し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した. さらに 5×10^{-6} M ヨヒンビン, ラウオルシン, プラゾシンを添加した 5×10^{-6} M Dex 添加 60

mM KCl 溶液を投与し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した. (N=6)

(4) 各種濃度の Dex がアドレナリンによる収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響 (図 4)

5×10^{-6} M アドレナリン (Wako: 分子量 333.6) を添加した HCS 溶液を約 2 分間灌流し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定しコントロールとした. 次に 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10^{-5} M 濃度の順に Dex を添加した 5×10^{-6} M アドレナリン溶液をそれぞれ投与し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した. (N=6)

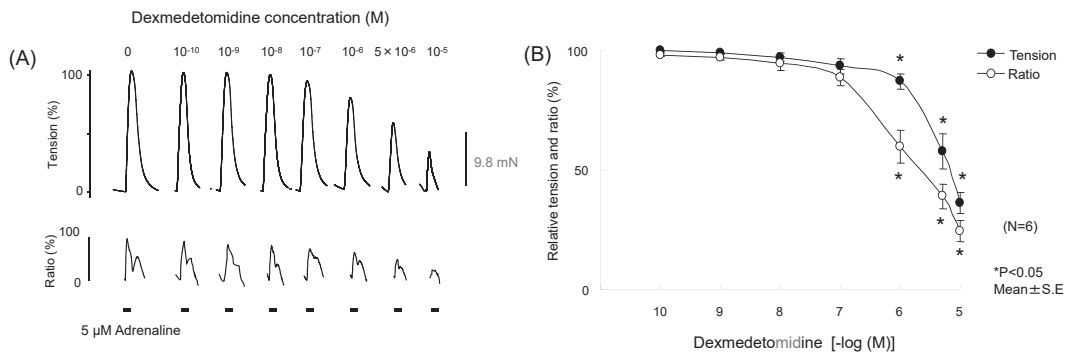


図 4: アドレナリン刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用

- (A): 収縮張力と蛍光強度比のトレース
(B): 各濃度での収縮張力と蛍光強度比の比較

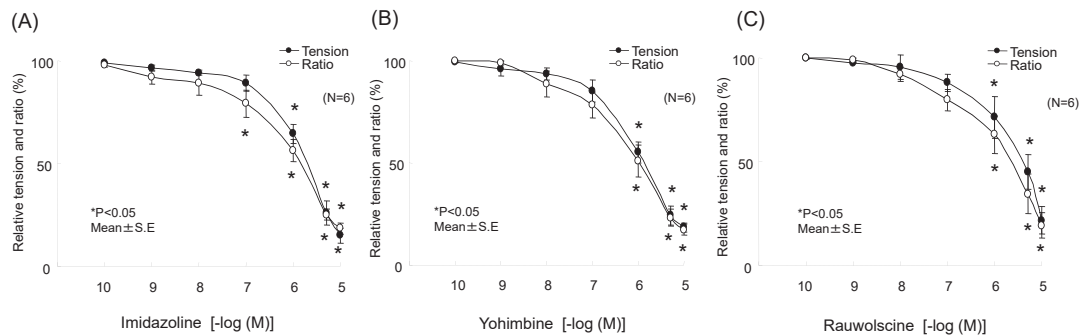


図 5: アドレナリン刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ に対する α 受容体作動薬と拮抗薬の作用

- (A): イミダゾリン
(B): ヨヒンビン
(C): ラウオルシン

(5) 各種濃度のイミダゾリン, ヨヒンビン, ラウオルシンがアドレナリンによる収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響 (図5)

5×10^{-6} M アドレナリンを添加した HCS 溶液を約 2 分間灌流し, その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定しコントロールとした. 次に 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 10^{-5} M 濃度の順にイミダゾリン, ヨヒンビン, ラウオルシンをそれぞれ添加した 5×10^{-6} M アドレナリン溶液を投与し, その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した. (N=6)

(6) 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位を枯渇した状態で, Dex がアドレナリンによる収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響 (図6)

60 mM KCl 溶液を約 2 分間灌流し, その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定しコン

トロールとした. 次に 1×10^{-3} M EDTA 含有 Ca^{2+} -free HCS 溶液を灌流した状態で, 2.5×10^{-2} M カフェイン (Wako: 分子量 212.21) を 2 分間投与, 続いて 3×10^{-5} M ライアノジン (Wako: 分子量 493.55) を 5 分間投与し, さらに 2.5×10^{-2} M カフェインを 2 回, 各 2 分間投与した. 5×10^{-6} M アドレナリンを添加した Ca^{2+} -in HCS 溶液または 5×10^{-6} M Dex を添加した 5×10^{-6} M アドレナリン Ca^{2+} -in HCS 溶液を約 20 分間投与し, その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した. (N=6)

(7) 細胞外 Ca^{2+} がない状態で, Dex がアドレナリン, カフェインおよびヒスタミンによる収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響 (図7)

60 mM KCl 溶液を約 2 分間灌流し, その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定しコン

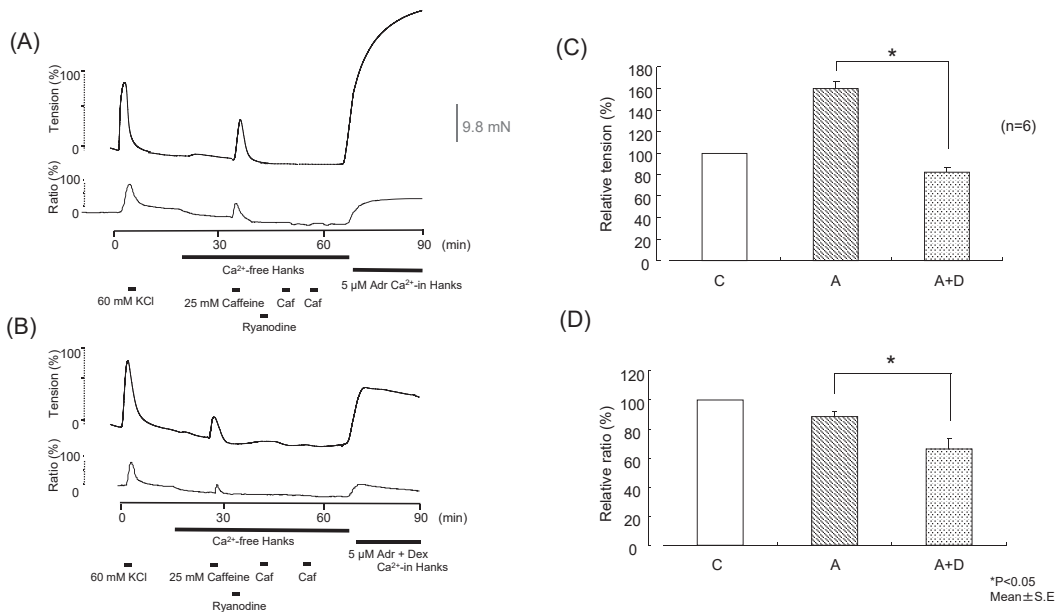


図6: 細胞内 Ca^{2+} を枯渇させた場合のアドレナリン刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用

- (A): アドレナリン単独を投与した場合の収縮張力と蛍光強度比のトレース
 (B): アドレナリンにDexを添加した場合の収縮張力と蛍光強度比のトレース
 (C): アドレナリン単独とDexを添加した場合の収縮張力の比較
 (D): アドレナリン単独とDexを添加した場合の蛍光強度比の比較
 C, control; A, adrenaline; D, dexmedetomidine; Caf, caffeine

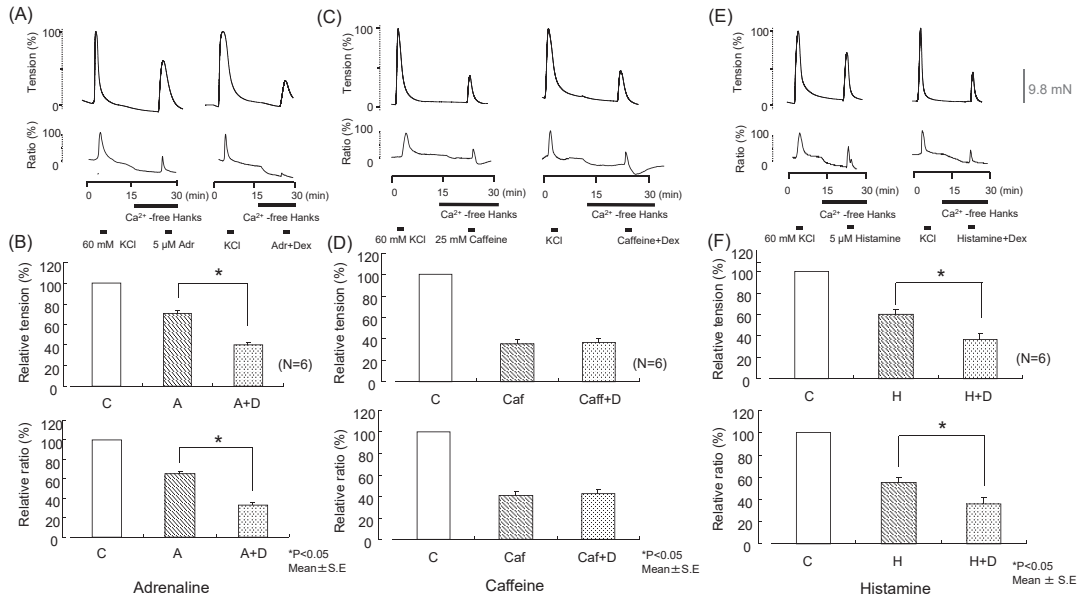


図7：細胞外 Ca^{2+} がない場合の各種刺激薬による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用

(A), (C), (E)：各種刺激薬単独と Dex を添加した場合の収縮

張力と蛍光強度比のトレース

(B), (D), (F)：各種刺激薬単独と Dex を添加した場合の収縮

張力と蛍光強度比の比較

C, control; A, adrenalin; D, dexmedetomidine; Caf, caffeine; H, histamine

コントロールとした。 1.0×10^3 M EDTA 含有 Ca^{2+} -free HCS 溶液を灌流し、さらに15分後に 5×10^6 M アドレナリンとヒスタミン (Wako：分子量 184.07), 2.5×10^2 M カフェイン (Wako：分子量 212.21) をそれぞれ投与し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した。次にコントロールと同様に基準値を測定後、 1×10^3 M EDTA 含有 Ca^{2+} -free HCS 溶液を灌流し、さらに15分後に 5×10^6 M Dex を添加した 5×10^6 M アドレナリンとヒスタミン、 2.5×10^2 M カフェインを投与し、その際発生する収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した。(N=6)

3. 統計学的解析

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。60 mM KCl とアドレナリンのみを投与した場合をコントロールとし、それぞれの α 刺激薬または拮抗薬を添加したときの収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の

コントロールに対する割合 (% 値) を算出した。2群間の比較では対応のない t 検定を行い、3群以上の群間の比較には一元配置分散分析を行った後、多重比較検定を行い、 $P < 0.05$ で有意差ありとした。

結 果

1. 各種濃度の Dex とイミダゾリンが舌動脈血管平滑筋に及ぼす直接作用について (図1)

Dex およびイミダゾリンでは添加濃度が上昇するのに伴わずかに収縮張力の増強傾向が観察されたが、収縮張力の有意な変化はみられなかった。

2. 各種濃度の Dex とイミダゾリンが高 KCl 刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響 (図2)

Dex は、添加濃度が上昇するのに伴い舌動脈

血管平滑筋の 60 mM KCl による収縮張力を増加させ、 5×10^6 M 以上の濃度で有意に増加させた。[Ca²⁺]_i は Dex の添加濃度の上昇に伴い増加傾向を示したが、有意差はみられなかった。イミダゾリンは、添加濃度の上昇に伴い、舌動脈血管平滑筋の 60 mM KCl による収縮張力を増加させたが有意ではなかった。[Ca²⁺]_i は、イミダゾリンの添加濃度の上昇に伴い増加傾向を示したが、有意差はみられなかった。

3. ヨヒンビン, ラウオルシン, プラゾシンが高 KCl による収縮張力と [Ca²⁺]_i 変化に及ぼす影響 (図 3)

ヨヒンビン, ラウオルシン, プラゾシン単独投与では、舌動脈血管平滑筋の 60 mM KCl 刺激による収縮張力および [Ca²⁺]_i の増加に有意差は認められなかった。Dex 添加 60 mM KCl 刺激による収縮張力の増加は α_2 受容体拮抗薬であるヨヒンビンとラウオルシンによって有意に抑制された。 α_1 受容体拮抗薬であるプラゾシンでは有意差は認められなかった。[Ca²⁺]_i は、Dex, ヨヒンビン, ラウオルシンおよびプラゾシンで有意な変化はみられなかった。

4. 各種濃度の Dex がアドレナリンによる収縮張力と [Ca²⁺]_i の変化に及ぼす影響 (図 4)

Dex は、舌動脈血管平滑筋のアドレナリンによる収縮張力と [Ca²⁺]_i の増加を濃度依存性に抑制した。(tension : EC₅₀ = 7.185 μ M)

5. イミダゾリン, ヨヒンビン, ラウオルシンがアドレナリンによる収縮張力と [Ca²⁺]_i 変化に及ぼす影響 (図 5)

イミダゾリン, ヨヒンビン, ラウオルシンはアドレナリンによる収縮張力と [Ca²⁺]_i の増加をいずれも濃度依存性に抑制した。(イミダゾリン tension : EC₅₀ = 1.006 μ M, ヨヒンビン tension : EC₅₀ = 1.203 μ M, ラウオルシン tension : EC₅₀ = 2.453 μ M)

6. 細胞内貯蔵部位を枯渇した状態で、Dex が

アドレナリンによる収縮張力と [Ca²⁺]_i 変化に及ぼす影響 (図 6)

Ca²⁺-free HCS 溶液灌流中に細胞内貯蔵部位から Ca²⁺ を放出するカフェインの 1 回目の投与により収縮張力および [Ca²⁺]_i の一過性の増加がみられた。さらにリアノジンで Ca²⁺ 誘導性 Ca²⁺ 放出系 (CICR) チャネルを開口固定した後、2, 3 回目のカフェイン投与では収縮張力および [Ca²⁺]_i の変化はみられなかった。この状態で Ca²⁺-in アドレナリンを投与すると収縮張力および [Ca²⁺]_i は緩徐に増加したのち一定値で持続相がみられた (コントロール)。次にコントロールと同じ条件下で Dex を添加したアドレナリン Ca²⁺-in 溶液を投与すると収縮張力および [Ca²⁺]_i はコントロールと同様の変化を示すものの、その最大値は有意に抑制された。

7. 細胞外 Ca²⁺ がいない状態で、Dex がアドレナリン, カフェイン, ヒスタミンによる収縮張力と [Ca²⁺]_i の変化に及ぼす影響 (図 7)

Ca²⁺ が細胞内貯蔵部位には存在するが、細胞外液に Ca²⁺ が存在しない状態ではアドレナリン, カフェイン, ヒスタミン投与により収縮張力および [Ca²⁺]_i は一過性に増加し、その後は速やかに減少した (コントロール)。次にコントロールと同一条件下で Dex 添加アドレナリンとヒスタミンを投与すると収縮張力および [Ca²⁺]_i はコントロールと同様の変化を示すものの、その最大値は有意に抑制された。コントロールと同一条件下で Dex 添加カフェインを投与するとコントロールと同様の変化がみられたが、収縮張力および [Ca²⁺]_i の変化に影響を及ぼさなかった。

考 察

今回われわれは、顎顔面領域の主要動脈の一つである舌動脈血管平滑筋に対する Dex の作用およびその作用機序について収縮張力と [Ca²⁺]_i 変化を同時測定し検討した。本実験では、Dex は高 KCl の脱分極性刺激による収縮張力と [Ca²⁺]_i を添加濃度の上昇にともなって増加

させ、アドレナリンの受容体刺激による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の増加を濃度依存性に抑制した。このことから収縮張力の増大には $[Ca^{2+}]_i$ が関与していることが示唆された。また、Dex は細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入機構である受容

体活性化 Ca^{2+} チャンネル (Receptor activated Ca^{2+} channel: RACC) を抑制し、細胞内貯蔵部位からの細胞内への Ca^{2+} 放出機構であるホスファチジルイノシトールリン脂質 (PI) 代謝回転で生じるイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP_3)

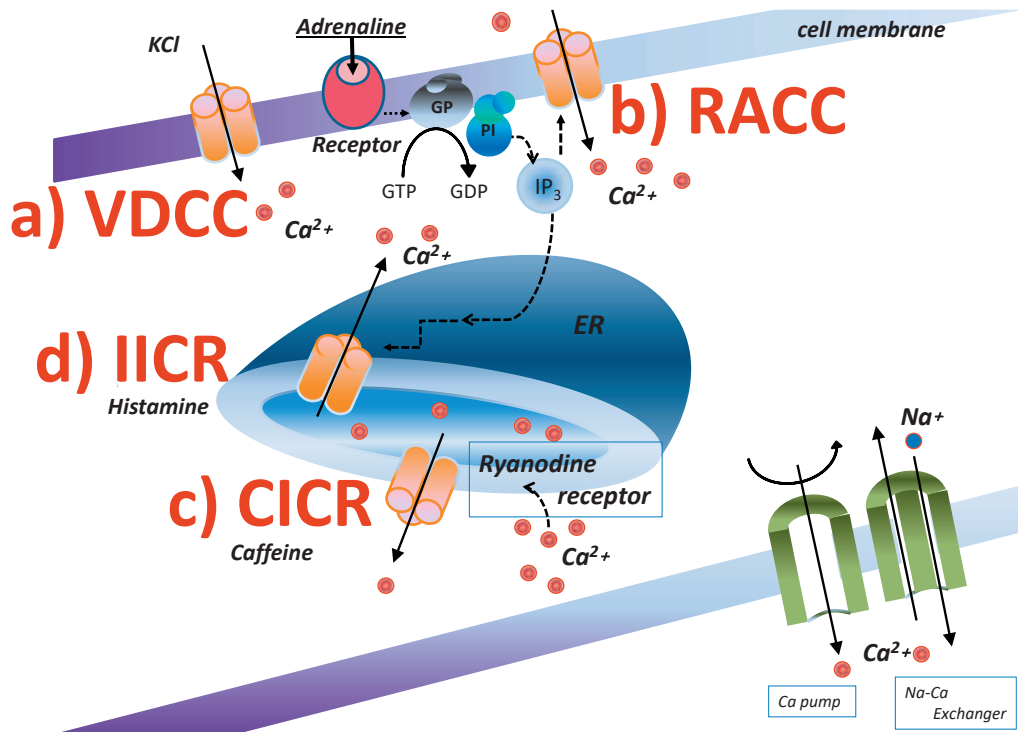


図 8 : 血管平滑筋における細胞内シグナルとデクスメトミジン塩酸塩 (Dex) の作用について

- (1) 細胞外からの Ca^{2+} の流入
 - a) 脱分極によって作動する電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (Voltage dependent Ca^{2+} channel: VDCC)
Dex により活性化された。
 - b) 受容体刺激に供益して受容体そのものがチャンネル機能をもって細胞外からの Ca^{2+} 流入を起こす受容体活性化 Ca^{2+} チャンネル (Receptor activated Ca^{2+} channel: RACC)
Dex により抑制された。
- (2) 細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出
 - c) 細胞外からのカルシウムイオン流入によるリアノジンレセプターを介する Ca^{2+} 放出機構 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism: CICR)
Dex により抑制されなかった。
 - d) ホスファチジルイノシトール (IP) 代謝回転で生じるイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP_3) 刺激による Ca^{2+} 放出機構 (IP_3 -induced Ca^{2+} release mechanism: IICR)
Dex により抑制された。

刺激による Ca^{2+} 放出 (IP_3 -induced Ca^{2+} release: IICR) を抑制するが, 細胞外からの Ca^{2+} の流入による細胞内 Ca^{2+} 誘導性 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release: CICR) は抑制しないことが示唆された.

血管平滑筋の収縮機序は細胞内 Ca^{2+} の増加により細胞内の Ca^{2+} 受容体蛋白であるカルモジュリンが活性化され, さらにミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) も活性化されることによる MLCK リン酸化の増加で収縮が起こる¹⁰⁾. 細胞内 Ca^{2+} の増加の経路として細胞外からの Ca^{2+} の流入と細胞内貯蔵部位 (筋小胞体など) からの細胞質内への Ca^{2+} 放出の二つの経路がある (図8). 細胞外からの Ca^{2+} の流入経路として, 1. 細胞膜の電位依存性 Ca^{2+} チャネル (Voltage-dependent Ca^{2+} channel: VDCC) の活性化による Ca^{2+} の流入, 2. 受容体活性化 Ca^{2+} チャネル (Receptor activated Ca^{2+} channel: RACC) の活性化による Ca^{2+} の流入, 3. 膜内外の濃度勾配による Ca^{2+} の流入 (非刺激時の Ca^{2+} leak) に分類される^{11, 12)}. 細胞内貯蔵部位 (筋小胞体など) からの Ca^{2+} の放出は細胞内貯蔵部位表面膜の脱分極の効果 (Depolarization-induced Ca^{2+} release), 2. 細胞外からの Ca^{2+} の流入による細胞内 Ca^{2+} 誘導性 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release: CICR), 3. ホスファチジルイノシトールリン脂質 (PI) 代謝回転で生じるイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP_3) 刺激による Ca^{2+} 放出 (IP_3 -induced Ca^{2+} release: IICR) に分類される^{11, 12, 13)} (図8).

本実験では, Dex は高 KCl の脱分極刺激による収縮張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を添加濃度の上昇に伴って増加させ, アドレナリンの受容体刺激による収縮張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を濃度依存性に抑制した. このことから収縮張力の増大には $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が関与していることが示唆された. Dex は静止状態 (resting tone) では有意な収縮はみられなかったが (図1), 高 KCl 刺激による収縮を添加濃度の上昇に伴い増強させた (図2). Dex による高 KCl 刺激の収縮の増強は a_2 受容体拮抗薬であるヨヒンビンやラウオルシンによって

抑制され, a_1 受容体拮抗薬であるプラブシンでは拮抗されなかった (図3). このことから Dex による高 KCl の脱分極性血管平滑筋収縮の増強は a_2 受容体のメカニズムによって引き起こされることが示唆された. ブタ舌動脈を用いた本研究の結果は内皮細胞を除去したヒトの胃大網動脈でも同様の結果が得られている¹⁴⁾. したがって, 末梢動脈系の平滑筋細胞の a_2 受容体の役割は KCl 脱分極刺激に対して増強効果を示すことが考えられる. 一般的に高 KCl による血管平滑筋の収縮は, VDCC が活性化することで, Ca^{2+} の細胞内への流入と収縮機構の活性化により起こる¹⁴⁾. ヒトの抵抗血管において, a_2 アドレナリン受容体によって引き起こされる収縮は部分的に VDCC からの Ca^{2+} 流入に依存し¹⁵⁾, さらにプロテインキナーゼ C の活性化に起因する G 蛋白質により VDCC を促進させるとの報告がある¹⁶⁾. ラット伏在静脈で, a_2 アドレナリン受容体刺激は間接的に VDCC を活性化させ細胞膜の脱分極を引き起こすとの報告¹⁷⁾ や Ca^{2+} 感受性を増大させるとの報告もある¹⁸⁾. また高 KCl 刺激により VDCC を介して細胞外から Ca^{2+} が流入することで, 筋小胞体上に存在するリアノジン受容体が活性化され, CICR が開くことで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する¹⁹⁾. Dex の高 KCl 刺激による収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加 (図2) は, VDCC を介する細胞外 Ca^{2+} の流入および CICR の促進, あるいは VDCC または CICR のどちらか一方を促進する可能性が考えられる. カフェインによる刺激は筋小胞体上に存在するリアノジン受容体を活性化し CICR を促進して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる. 本実験で Dex は Ca^{2+} -free HCS 溶液中でカフェイン刺激による収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加に影響を与えなかった (図7). これらのことから Dex により高 KCl 刺激すなわち脱分極性刺激による舌動脈血管平滑筋の収縮を増強させる機序は, CICR の促進ではなく, VDCC の活性化による細胞外 Ca^{2+} 流入の促進であることが示唆された. Dex は a_2 受容体に加えイミダゾール基を有しているので a_2 受容体だけではなく, イミダゾリン受容体にも

作用することが報告され、さらに血管系にはイミダゾリン受容体が存在することが確認されている²⁰⁾。そこでイミダゾリンを投与し検討したところ、イミダゾリンは高KClによる収縮を濃度依存的に増強させる傾向を示した。このことからイミダゾリンは高KClの脱分極性刺激による収縮を増強させる可能性が示唆された(図2)。

α_2 受容体刺激薬であるDex、イミダゾリン受容体刺激薬であるイミダゾリン、 α_2 受容体拮抗薬であるヨヒンビンとラウオルシンは、 α_1/α_2 受容体刺激薬であるアドレナリンによる舌動脈血管平滑筋の収縮と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加を濃度依存的に抑制した(図4, 5)。Dexとイミダゾリンはアドレナリンの収縮を抑制したことから、イミダゾール基を有する受容体刺激薬は、 α_1/α_2 の両方を持つ受容体刺激薬に対して抑制作用を有することが示唆された。Dexおよびクロニジンのアドレナリン刺激に対する抑制効果は α_1 受容体の阻害作用で説明可能である。Dexやクロニジンは α_1 受容体にも結合し、強い親和性を示すが、 α_1 受容体刺激作用はさきわめて弱く、むしろ阻害作用を示すことが報告されている^{14, 20-24)}。またヨヒンビンや、ラウオルシンのアドレナリン刺激に対する抑制効果は α_1 選択的の刺激薬(フェニレフリン)よりも α_1 、 α_2 受容体刺激薬(ノルアドレナリン)で強く抑制されたことにより α_1 、 α_2 両受容体の阻害によると考えられる¹⁴⁾。

Dexは細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入機構であるRACCを抑制し、細胞内貯蔵部位からの細胞内への Ca^{2+} 放出機構であるIICRを抑制したが、CICRは抑制しなかった。RACCは受容体刺激に共益して受容体そのもののチャネル機能によって細胞外からの Ca^{2+} 流入を引き起こし $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる。受容体刺激薬によりPLCを活性化することでPIから IP_3 が産生される。 IP_3 が産生されることによってIICRが活性化し、細胞内貯蔵部位から Ca^{2+} が放出されることで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する²⁵⁾。細胞外から流入する Ca^{2+} と IP_3 により筋小胞体上に存在するリアノジン受容体が活性化することでCICR

からの Ca^{2+} 放出がさらに促進し $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する。 IP_3 受容体、リアノジン受容体はともに筋小胞体上に存在し、リアノジン受容体の活性化による細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出が細胞外からの Ca^{2+} 流入をさらに増強させ、また IP_3 受容体の活性化による細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出がリアノジン受容体からの Ca^{2+} 放出を促進させるなど、細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出機構に重要な役割を相互に担っている^{26, 27)}。受容体刺激によりPLCが活性化することによる収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性の変化によって平滑筋の収縮を調節している²⁸⁾。本研究では、Dexは受容体刺激薬であるアドレナリンによる収縮張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制したことからRACCを介する細胞外 Ca^{2+} の流入、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの細胞質内への Ca^{2+} 放出機構であるCICRまたはIICRを抑制することが示唆された(図4)。細胞内 Ca^{2+} を枯渇した状態で、Dexはアドレナリンによる収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制したことからRACCを介する細胞外 Ca^{2+} の流入を抑制することが示唆された(図6)。細胞外 Ca^{2+} がない状態でDexはアドレナリンによる収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制したことからCICR、IICRの両者もしくはどちらか一方を抑制することが示唆された(図7)。そこで細胞外 Ca^{2+} がない状態で、CICRに作用するカフェインとIICRに作用するヒスタミンを投与し、Dex添加時との比較を行った。その結果、細胞外 Ca^{2+} がない状態でDexはカフェインによる収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制しなかったが、ヒスタミンによる収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制した(図7)。カフェインによる刺激はリアノジン受容体を活性化し、CICRを促進して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させ、収縮を発現する¹⁹⁾。このことからDexはCICRを抑制しないことが示唆された。ヒスタミンはセカンドメッセンジャーとして IP_3 を介してカルシウムイオンを動員し、さらにジアシルグリセロールを介したプロテインキナーゼCの活性化により収縮を起こす²⁹⁾。このことからヒスタミンはIICRに特

異的に作用するとされている³⁰⁾. 今回の実験で, 細胞外 Ca^{2+} がいない状態でヒスタミンによる収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制したことから Dex は IICR を抑制することが示唆された.

Dex は高容量では血管平滑筋に分布する α_{2B} 受容体を活性化させて, 血管平滑筋収縮による血圧上昇を引き起こす. 低用量では血管拡張による血圧低下と副交感神経優位による徐脈を引き起こす³¹⁾. いくつかの実験的研究では有効濃度はまちまちで^{1-3, 8, 9, 32-34)}, 局所麻酔薬に添加する至適濃度の決定には更なる in vitro, in vivo での検討が必要である.

ブタ舌動脈血管平滑筋で, Dex は高 KCl の脱分極刺激による収縮張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を添加濃度の増加に伴って増加させ, アドレナリンの受容体刺激による収縮張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を濃度依存性に抑制した. このことから収縮張力の増大には $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が関与していることが示唆された. Dex は細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入機構である RACC を抑制した. 細胞内貯蔵部位からの細胞内への Ca^{2+} 放出機構である IICR を抑制したが, CICR は抑制しなかった. 今回 Dex の舌動脈血管平滑筋に対する作用および作用機序について収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化から検討し, Dex の作用と作用機序の一端を示すことができたと考える. 本研究ではイミダゾリン受容体の役割および β 受容体, 血管内皮細胞の役割に対しての課題が残された. Dex の口腔内主要動脈の一つである舌動脈血管平滑筋に対する Dex の作用と作用機序を解明したことは, Dex 添加局所麻酔薬の創薬に対する一助となりえると考えられる.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 多くのご支援とご協力をいただきました歯科麻酔学分野の諸先生方に心より御礼申し上げます.

利 益 相 反

本研究において開示すべき利益相反はない.

参 考 文 献

- 1) . Yoshitomi, T., Kohjitani, A., Maeda, S., Higuchi, H., Shimada, M., and Miyawaki, T.: Dexmedetomidine enhances the local anesthetic action of lidocaine via an α -2A adrenoceptor. *Anesth. Analg.*, 107: 96-101, 2008.
- 2) . Yabuki, A., Higuchi, H., Yoshitomi, T., Tomoyasu, Y., Ishii-Maruhama, M., Maeda, S., and Miyawaki, T.: Locally injected dexmedetomidine induces vasoconstriction via peripheral α -2A adrenoceptor subtype in guinea pigs. *Reg. Anesth. Pain. Med.*, 39: 133-136, 2014.
- 3) . Sukegawa, S., Higuchi, H., Inoue, M., Nagatsuka, H., Maeda, S., Miyawaki, T.: Locally injected dexmedetomidine inhibits carrageenin-induced inflammatory responses in the injected region. *Anesth. Analg.*, 118: 473-480, 2014.
- 4) . 山根彩加: デクスメデトミジン添加はリドカインによる口腔内局所麻酔効果を増強する ボランティアを対象とした二重盲検クロスオーバー比較試験. *岡山歯誌*, 33: 1-7, 2014.
- 5) . 野上堅太郎, 真鍋庸三, 谷口省吾: メピバカインに添加したデクスメデトミジンが組織血流量に及ぼす影響. *福岡歯大誌*, 36: 1-8, 2010.
- 6) . 野上堅太郎, 真鍋庸三, 岩本 繁, 加藤喜久, 谷口省吾: 生理食塩液またはリドカインに添加したデクスメデトミジンが局所血流量に与える影響. *日本歯麻誌*, 37: 145-150, 2009.
- 7) . Klimscha, W., Chiari, A., Krafft, P., Plattner, O., Taslimi, R., Mayer, N., Weinstabl, C., Schneider, B., and Zimpfer, M.: Hemodynamic and analgesic effects of clonidine added repetitively to continuous epidural and spinal blocks. *Anesth. Analg.*, 80: 322-327, 1995.
- 8) . Memiş, D., Turan, A., Karamanlioğlu, B., Pamukçu, Z., Kurt, I.: Adding dexmedetomidine to lidocaine for intravenous regional anesthesia. *Anesth. Analg.*, 98: 835-840, 2004.
- 9) . Calasans-Maia, J.A., Zapata-Sudo, G., Sudo, R.T.: Dexmedetomidine prolongs spinal anaesthesia induced by levobupivacaine 0.5% in guinea-pigs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 57: 1415-1420, 2005.
- 10) . Itoh, T., Kubota, Y., Kuriyama, H.: Effects of phorbol ester on acetylcholine-induced Ca^{2+} mobilization and contraction in the porcine coronary artery. *J. Physiology.*, 397: 401-419, 1988.
- 11) . Karaki, H., Weiss, G. B.: Calcium release in smooth muscle. *Life sciences*, 42: 111-122, 1988.
- 12) . Sato, K., Ozaki, H., Karaki, H.: Multiple effects of caffeine on contraction and cytosolic free Ca^{2+} levels in vascular smooth muscle of rat aorta. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 338: 509-513, 1988.
- 13) . Ozaki, H., Ohyama, T., Sato, K., Karaki, H.:

- Ca²⁺-dependent and independent mechanisms of sustained contraction in vascular smooth muscle of rat aorta. *Japan. J. Pharmacol.*, 52: 509-513, 1990.
- 14) . Hamasaki, J., Tsuneyoshi, I., Katai, R., Hidaka, T., Boyle, W. A., Kanmura, Y.: Dual alpha (2)-adrenergic agonist and alpha (1)-adrenergic antagonist actions of dexmedetomidine on human isolated endothelium-denuded gastroepiploic arteries. *Anesth. Analg.*, 94: 1434-1440, 2002.
- 15) . Nielsen, H., Mortensen, F. V., Pilegaard, H. K., Hasenkam, J. M., Mulvany, M. J.: Calcium utilization coupled to stimulation of postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in isolated human resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260: 637-643, 1992.
- 16) . Lepretre, N., Mironneau, J., Morel, J. L.: Both [alpha] 1A- and [alpha] 2A-adrenoceptor subtypes stimulate voltage-operated L-type calcium channels in rat portal vein myocytes. *J. Biol. Chem.*, 269: 2946-2952, 1994.
- 17) . Cheung, D. W.: An electrophysiological study of [alpha]-adrenoceptor mediated excitation-coupling in smooth muscle cells of the rat saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.*, 84: 265-271, 1985.
- 18) . Parkinson, N. A., Hughes, A. D.: The mechanism of action of [alpha] 2-adrenoceptors in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 115: 1463-1468, 1995.
- 19) . Iino, M.: Calcium release mechanisms in smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.*, 54: 345-54, 1990.
- 20) . Haefeli, W. E., Srivastava, N., Kongpatanakul, S., Blaschke, T. F., Hoffman, B. B.: Lack of role of endothelium-derived relaxing factor in effects of [alpha]-adrenergic agonists in cutaneous veins in humans. *Am. J. Physiol.*, 264: H364-369, 1993
- 21) . Skrbic, R., Chiba, S.: Dominant antagonistic action of [alpha]2-adrenoceptor agonists on [alpha]1-agonist-induced vasoconstriction. *Eur. J. Pharmacol.*, 230: 131-137, 1993.
- 22) . Schumann, H. J., Endoh, M.: [alpha]-adrenoceptors in the ventricular myocardium: clonidine, naphazoline and methoxamine as partial agonists exerting a competitive dualism in action to phenylephrine. *Eur. J. Pharmacol.*, 36: 413-421, 1976.
- 23) . Ruffolo, R. R., Rosing, E. L., Waddell, J. E.: Receptor interactions of imidazolines. II. Affinities and efficacy for alpha adrenergic receptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 209: 429-436, 1979.
- 24) . Daniel, E. E., Shi, A. G., Wang, Z. L., Guan, Y. Y., Hoo, K., Cragoe, E. J., Kwan, C.Y.: Alpha-adrenoceptors in vascular smooth muscle: all is not well. *Blood. Vessels.*, 28: 104-114, 1991.
- 25) . Janiak, R., Wilson, S. M., Montague, S., Hume, J. R.: Heterogeneity of calcium stores and elementary release events in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 280: C22-33, 2001.
- 26) . Van Breeman, C., Saida, K.: Cellular mechanisms regulating [Ca²⁺]_i smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.*, 51: 315-329, 1989.
- 27) . Kawaguchi, T., Satoh, K., Kuji, A., Joh, S.: Features of distinct contractions induced with a high and a low concentration of KCl, noradrenaline, and histamine in swine lingual artery. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 381: 107-120, 2010.
- 28) . Andrea, J. E., Walsh, M. P.: Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension.*, 20: 585-595, 1992.
- 29) . Jeong, J. H., Yun, M. C., Shin, C. Y., Lee, T. S., Song, H. J., Sohn, U. D.: Signaling via histamine receptors in cat duodenal smooth muscle cells. *Mol. Cells.*, 16: 180-186, 2003.
- 30) . Mauban, J. R., Wilkinson, K., Schach, C., Yuan, J. X.: Histamine-mediated increases in cytosolic [Ca²⁺] involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 290: C325-336, 2006.
- 31) . Ebert, T. J., Hall, J. E., Barney, J. A., Uhrich, T. D., Colino, M. D.: The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology.*, 93: 382-394, 2000.
- 32) . Jalonen, J., Hynynen, M., Kuitunen, A., Heikkilä, H., Perttilä, J., Salmenperä, M., Valtonen, M., Aantaa, R., Kallio, A.: Dexmedetomidine as an anesthetic adjunct in coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology.*, 86: 331-345, 1997.
- 33) . Talke, P., Chen, R., Thomas, B., Aggarwal, A., Gottlieb, A., Thorborg, P., Heard, S., Cheung, A., Son, S. L., Kallio, A.: The hemodynamic and adrenergic effects of perioperative dexmedetomidine infusion after vascular surgery. *Anesth. Analg.*, 90: 834-939, 2000.
- 34) . Talke, P.O., Caldwell, J. E., Richardson, C. A., Kirkegaard-Nielsen, H., Stafford, M.: The effects of dexmedetomidine on neuromuscular blockade in human volunteers. *Anesth. Analg.*, 88: 633-639, 1999.

The effect of dexmedetomidine on swine isolated endothelium-denuded lingual arterial vascular smooth muscle

Mami CHIKUDA¹⁾, Shigeharu JOH²⁾, and Kenichi SATO¹⁾

¹⁾ Division of Dental Anesthesiology, Department of Reconstructive Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University,
(Chief: Prof. Kenichi SATO)

²⁾ Division of Oral and Dysphasia Rehabilitation, Department of Prosthodontics and Oral Implantology, School of Dentistry, Iwate Medical University,
(Chief: Prof. Shigeharu JOH)

[Received : December 26 2017 : Accepted : January 10 2018]

Abstract : When added to local anesthetics, dexmedetomidine has been shown to increase the local anesthetic effect, decrease local blood flow, and suppress inflammation. However, the effects and mechanism of action of dexmedetomidine on lingual arteries have not been determined. The aim of this study was to investigate the effect of dexmedetomidine on lingual arterial vascular smooth muscle, evaluating changes in contraction tension and intracellular calcium ion concentration $[Ca^{2+}]_i$.

Endothelium-denuded lingual arteries were sliced into 2- to 3-mm rings. Specimens were loaded with a fluorescent calcium indicator. Changes in isometric contraction tension and $[Ca^{2+}]_i$ were measured with the addition of various substances at various concentrations, under different conditions of baseline stimulation (with KCl, adrenaline, caffeine, or histamine) ,and under conditions of intra or extracellular calcium store depletion.

Dexmedetomidine increased the contraction tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by high-KCl depolarization. Dexmedetomidine inhibited receptor-activated Ca^{2+} channels and phosphatidylinositol-1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release, but not Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release.

The findings of the present study elucidate the effects and mechanism of action of dexmedetomidine on vascular smooth muscle. This information will be useful in the development of dexmedetomidine-containing local anesthetics that are safe for use in patients with cardiovascular compromise.

Key words : endothelium-denuded lingual artery, dexmedetomidine, adrenaline, intracellular calcium ion concentration, isometric tension