

局所麻酔薬痙攣発現機序に関する研究

—脳内セロトニンとの関係について—

遠 藤 邦 彦

Studies on the Mechanisms of Local Anesthetics-induced Convulsions

—Causal Relationship with Brain Serotonin—

Kunihiko Endo

(平成5年2月3日受付)

序 言

局所麻酔薬は神経の Na^+ conductance を減少させることにより、神経の活動電位の発生を抑制し、伝導を遮断する。その作用は本来の標的である知覚神経のみならず、一般に興奮性細胞の Na^+ チャンネルを同様に遮断する。したがってその急性中毒は、基本的には中枢神経系の抑制、末梢循環系の抑制に基づく種々の症状となって現れる。しかし局所麻酔薬の中枢神経系への作用は一様ではなく、時には中枢神経系の興奮をもたらし、重篤な場合は痙攣を誘発する。この現象は最も危険な急性中毒の一つをなす一方で薬理学的に矛盾する現象でもあり、その発現機序は解明されなければならない重要な課題として残されている。

局所麻酔薬の中枢神経系への作用は、その電気現象の変化としていくつか報告されている。Lidocaine をネコ静脈内に注入したときに、中枢では初期抑制、続いて促進、抑制そして最終的に促進され reticular neuronal firing に至る4層の変化が観察されている¹⁾。局所麻酔薬による中枢興奮作用は大脳辺縁系、特に扁桃核で著明な discharge や²⁻⁵⁾、海馬での代謝促進としても認められている⁶⁾。

局所麻酔薬痙攣の発現機序については、抑制性ニューロンが抑制されることによる興奮性ニューロンの活性化に基づくとの考えが提唱されている。Lido-

caine がウサギ大脳皮質およびネコ脊髄において、抑制性シナプスを興奮性シナプスより強く抑制することや、lidocaine が脊髄単反射を促進するなどの結果^{7,8)}は、この考えを支持するものである。

γ -アミノ酪酸 (GABA) は中枢神経系での最も主要な抑制性神経伝達物質とされる。池田ら^{9,10)}はラット脳シナプトゾームからの GABA 遊離を局所麻酔薬が抑制すること、GABA の脳室内投与は局所麻酔薬痙攣の発現を抑制すること等を示し、GABA 作働性ニューロンの活性低下が、局所麻酔薬痙攣発現の要因となることを示唆している。

一方脳内モノアミンと痙攣発現との関係については、脳内モノアミン、特にカテコールアミン作働性ニューロンの活性を変化させる処置により、電気刺激誘発痙攣や薬物痙攣閾値が影響されることが報告されており、脳内カテコールアミンがこれらの痙攣の調節因子として関与する可能性が示唆されている¹¹⁻¹⁴⁾。芳村ら¹⁵⁾は lidocaine 痙攣の発現機構に、中枢の nor-adrenaline 作働性ニューロンが促進性調節因子として含まれることを示唆した。一方 serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) と痙攣発現との関係については、やはり 5-HT の前駆体や合成阻害剤により脳内 5-HT 含量を変化させることにより痙攣発現が影響されること¹⁶⁾から、脳内 5-HT が痙攣発現に関与しているようであるが、実験モデルによって異なった結果が得られており、必ずしもその役割は明確ではない。また局所麻酔薬痙攣と 5-HT との関係について、その報告は極めて少ない。de Oliveira ら^{17,18)}は、マウスにおいて脳内 5-HT 含量を増加させる処置により lidocaine 痙攣発現の閾値が低下し、減少させる処置により閾値

広島大学歯学部口腔外科学第一講座 (主任: 高田和彰教授) 本論文の要旨は平成2年9月の第64回広島大学歯学会例会において発表した。本研究は一部文部省科学研究費 (奨励研究 A No. 01771746) によった。

が上昇することを報告している。しかし薬物投与による脳内 5-HT 含量の変化と痙攣発現が必ずしも相関しないなど、局所麻酔薬痙攣と 5-HT との関係は十分明らかではない。

本研究では局所麻酔薬痙攣発現における 5-HT の役割を明らかにする目的で、5-HT 関連物質の局所麻酔薬痙攣に対する影響について検討した。Pentylenetetrazol (PTZ) はその痙攣発現機序に、局所麻酔薬痙攣同様 GABA 作働性神経に対する作用を含んでいる。したがって対照として PTZ 痙攣を用い、5-HT の役割について比較した。さらに脳における 5-HT 動態に対する局所麻酔薬の影響について検討した。

実験材料ならびに実験方法

I. 実験動物

体重 20~30 g の ddy 系雄性マウスを恒温 (22±2°C) の動物飼育舎に 3 日以上飼育し、実験開始前 3 時間以上絶食させた。痙攣発現実験では一群 20~30 匹を用い、脳内 5-HT の日内変動¹⁹⁾を考慮して実験開

始はすべて午後 2 時から 5 時までとした。

II. 薬物投与方法

薬物はすべて腹腔内投与した。投与量は体重 10 g あたり 0.2 ml とし、*p*-chlorophenylalanine (PCPA)、reserpine は 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) に懸濁し、それ以外の薬物はすべて生理的食塩水に溶解して投与した。対照動物には同量の 0.1% CMC 液もしくは生理的食塩水を投与した。

III. 脳内 5-HT, 5-HIAA 量の測定

脳内 5-HT およびその代謝物である 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) の抽出および定量は Curzon and Green の方法²⁰⁾によって測定した (図 1)。

1. 5-HT, 5-HIAA の抽出

マウスの全脳を摘出し、外套 (大脳皮質と髄質)、脳幹、小脳に分け 6 ml の酸性 butyl alcohol を加え、ホモジェナイズした。5000 回転で 5 分遠沈後、上清液 5 ml を 40 ml の共栓付ガラス遠沈管にとり、*n*-heptane

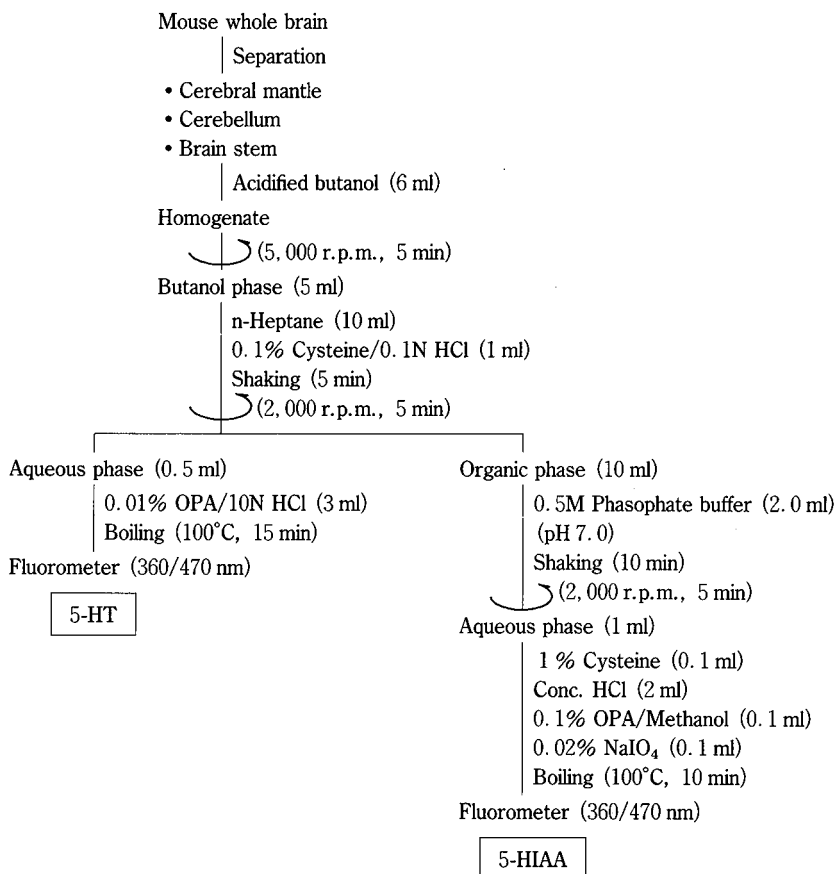


図 1 脳内 serotonin (5-HT) および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) の抽出、定量法。

10 ml, 0.1% cysteine/0.1 N 塩酸溶液 1 ml を加え, 5 分間振盪器で振盪した後2000回転で5分間遠沈し, 水層と有機層を分離した。水層は 5-HT, 有機層は 5-HIAA の定量に用いた。抽出操作はすべて 4°C 以下で行った。

2. 5-HT の測定

分離した水層 0.5 ml を試験管にとり, 0.01% o-phthalaldehyde (OPA)/10 N 塩酸溶液を 3 ml 加え, 攪拌後煮沸水浴中で15分反応させた。水冷後日立 650-10M 蛍光光度計を使用し, 励起波長 360 nm, 蛍光波長 470 nm にて蛍光強度を測定した。

3. 5-HIAA の測定

分離した有機層 10 ml を共栓付ガラス遠沈管にとり, 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml を加え, 振盪器で10分振盪を行った。2000回転, 5分間遠沈後下層の水層 1 ml を試験管に取り, 1% cysteine 溶液 0.1 ml, 濃塩酸 2 ml, 0.1% OPA/methyl alcohol 溶液 0.1 ml, 0.02% 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 0.1 ml を加えた後, 煮沸水浴中で10分間反応させた。水冷後 5-HT と同条件にて蛍光測定した。

IV. 脳切片からの 5-HT 遊離実験

1. 脳切片の作成

マウスを断頭瀉血後ただちに氷温下で全脳を摘出し, McIlwain tissue chopper を用いて外套と脳幹を厚さ 0.3×3.0 mm に薄切した脳切片を作成した。

2. 脳切片の表面灌流

脳切片の表面灌流は Farnebo らの方法²¹⁾ に準拠して行った。すなわち脳切片約20個を O₂ の飽和灌流液に浮遊させ, [³H]5-HT (比活性=939.8 GBq/mmol) を添加 (最終濃度 10⁻⁷ M) した。灌流液は NaCl 143 mM, KCl 6 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 1.3 mM, EDTA 0.03 mM, ascorbate 0.06 mM, glucose 10 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, pargyline 5 nM からなり, pH 7.3 とした。O₂ を通気しながら 37°C, 60分間インキュベートして [³H]5-HT を取り込ませた後, 灌流装置に切片をおき 50 cm H₂O で定圧灌流した。流速は 0.5 ml/min に調整した。プラスチック製チャンパーは内径 4 mm, 長径 15 mm の円筒形で 37°C に保温されている。チャンパー内には直径 0.5 mm の白金線を環状にした電極が, 10 mm の間隔をおいて設置された 2 枚の薄いナイロン製ネットにより保持されている。これによりいわゆる field stimulation が可能となっている。上記の灌流速度で60分間予備灌流し, 以後 2 分毎に最長270分まで連続的に試料を採取した。

[³H]5-HT の自然遊離を調べるため 2 分毎の資料を連続的に 3 回採取した後, 2 分間のうち最初の 1 分間

電気刺激 (矩形波, 2 msec, 20 mA, 5 Hz) を行った。電気刺激は30分間隔に行い, 薬物は刺激の20分前から適用した。2 分間の採取試料を放射活性測定用バイアルに採取し, ジオキサン系シンチレーター (Bray 液)²²⁾ を加え, 液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-3100) で放射活性を測定した。試料採取後切片は Insta-gel に溶解し放射活性を測定した。2 分間に灌流液中へ遊離した [³H]5-HT の割合は試料採取開始時の切片中の全放射活性に対する百分率で現した。すなわち, 5-HT 遊離率を R とし, 各分画の放射活性を A, 灌流終了後の切片中放射活性を B, 各分画の放射活性の合計を C とすれば, R (%) = 100 × A / (B + C) で現した。

V. 脳 P₂ 画分への 5-HT 取り込み実験

1. P₂ 画分の調整

シナプトゾームを含む P₂ 画分は Gray and Whittaker の方法²³⁾ により調整した。マウス全脳をガラスステフロンホモジェナイザーを用いて 0.32 M 蔗糖液の10%ホモジェネートとし, 1,000×g, 10分間遠沈して P₁ 画分を除き, 上清液を 10,000×g, 15分間遠沈して P₂ 画分の沈渣を得た。操作はすべて 4°C 以下で行った。

2. P₂ 画分への 5-HT 取り込み

[³H]5-HT (最終濃度 10⁻⁷ M) と試験薬物を添加した灌流液 0.9 ml に, P₂ 画分を浮遊させた灌流液を 0.1 ml 加え, 37°C, 10分間インキュベートした。水冷灌流液を 4 ml 加えて取り込みを停止させた後, 灌流液をガラスマイクロファイバーフィルターで濾過し, フィルターを洗浄後その放射活性を測定した。

VI. 使用薬物

実験に使用した主な薬物は以下のものである。

Lidocaine hydrochloride (藤沢薬品), pentylenetetrazol (東京化成), *p*-chlorophenylalanine (半井化学), reserpine (半井化学), methiothepin (Hoffman-La Roche), methysergide (サンド薬品), 5-hydroxytryptophan (Sigma), imipramine hydrochloride (日本チバガイギー), fenfluramine hydrochloride (藤沢薬品), o-phthalaldehyde (半井化学), [³H] serotonin creatinine sulfate (NEN)。

VII. 統計処理法

有意差検定は痙攣発現実験では最小 2 乗法による χ^2 検定, その他は t 検定により行った。

実験結果

I. 痙攣発現の状態

Lidocaine 60~90 mg/kg を投与すると、2~3分後に歩行失調、正向反射の消失などの中枢抑制症状が現れ、次いで5~8分後に間代性痙攣が観察された。対照の痙攣薬として pentylenetetrazol (PTZ) を用いた。PTZ 50~70 mg/kg を投与すると、約2分後より自発運動の亢進、歩行失調、単発性の筋攣縮などがみられ、しばらくして間代性痙攣が出現した。

II. 痙攣発現に対する 5-HT 作働性ニューロン活性化低下の影響

局所麻酔薬による痙攣発現における脳内 5-HT の役割について検討するため、まず脳内 5-HT 作働性ニューロンの活性を低下させる種々の薬物を投与し、lidocaine および PTZ による痙攣発現に対する影響を観察した。

1. ρ -Chlorophenylalanine の影響

5-HT 合成律速段階酵素である tryptophan-5-hydroxylase を阻害する PCPA の痙攣発現に対する影響を観察した。PCPA は lidocaine および PTZ 投与48時間前に、腹腔内に投与した。Lidocaine による痙攣発現率は対照群の32%から PCPA 150 mg/kg 投与群では60%、300 mg/kg 投与群では72%と有意に増加した。また PTZ による痙攣発現率も上昇傾向を示した(図2)。PCPA (300 mg/kg) 投与により脳内の 5-HT、5-HIAA 含量は外套および小脳では有意差はなく、脳幹では 5-HT、5-HIAA とも有意に減少していた(表1)。

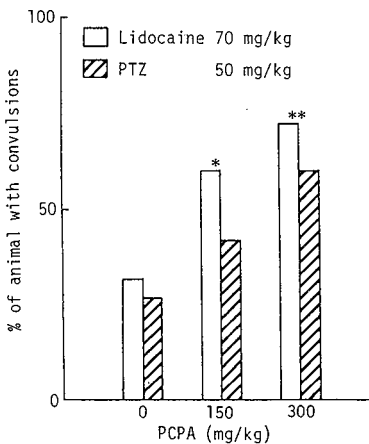


図2 Lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 誘発痙攣発現率におよぼす ρ -chlorophenylalanine (PCPA) の影響。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表1 マウス脳内 serotonin (5-HT) および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量におよぼす ρ -chlorophenylalanine (PCPA) の影響

	Concentration (μ g/g tissue)	
	5-HT	5-HIAA
Cerebral mantle		
Control	0.43 \pm 0.07	0.13 \pm 0.02
PCPA	0.41 \pm 0.03	0.11 \pm 0.02
Cerebellum		
Control	0.50 \pm 0.11	0.16 \pm 0.08
PCPA	0.49 \pm 0.08	0.15 \pm 0.03
Brain stem		
Control	0.79 \pm 0.03	0.46 \pm 0.07
PCPA	0.64 \pm 0.03**	0.32 \pm 0.04*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. Reserpine の影響

神経軸索末端における 5-HT 貯蔵機構を障害し 5-HT の枯渇をひきおこす reserpine の痙攣発現に対する影響を観察した。Reserpine は lidocaine および PTZ 投与20時間前に腹腔内に投与した。Lidocaine による痙攣発現率は対照群の23%から reserpine 10 mg/kg 投与群では27%、20 mg/kg 投与群では38%とそれぞれ上昇傾向を示した。PTZ による痙攣発現率は対照群の54%から 10 mg/kg 投与群では71%、20 mg/kg 投与群では93%へと増加した(図3)。Reserpine 投与により脳内の 5-HT 含量は、外套、小脳、脳幹においてそれぞれ対照群の59%、45%および60%へと有意に減少していた。5-HIAA 含量は、いずれの部位でも有意な変化はなかった(図4)。

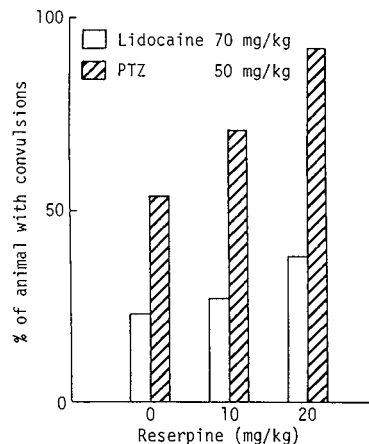


図3 Lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 誘発痙攣発現率におよぼす reserpine の影響。

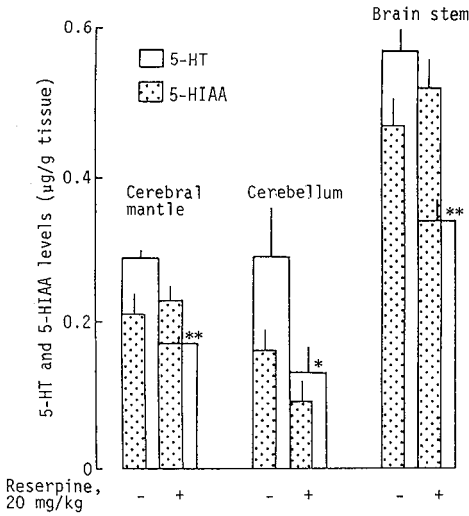


図4 マウス脳内 serotonin (5-HT) および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量におよぼす reserpine の影響。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3. Methiothepin の影響

シナプス後膜に存在する 5-HT 受容体のサブタイプのうち、主に 5-HT₁ 受容体で 5-HT の作用に拮抗する methiothepin の痙攣発現に対する影響を観察した。Methiothepin は lidocaine および PTZ 投与30分前に投与した。Lidocaine による痙攣発現率は、対照群の 20% から、methiothepin 0.2 mg/kg 投与群では 60% と有意に上昇した。PTZ による痙攣発現率には有意な変化を認めなかった (図 5)。

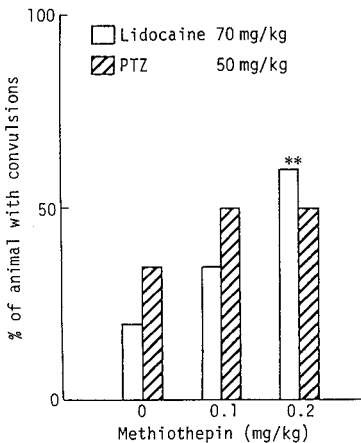


図5 Lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 誘発痙攣発現率におよぼす methiothepin の影響。
** $P < 0.01$.

4. Methysergide の影響

シナプス後膜に存在する 5-HT 受容体のサブタイプのうち、主に 5-HT₂ 受容体で 5-HT の作用に拮抗する methysergide を 30 分前に投与し、痙攣発現に対する影響を観察した。methysergide の 30 分前投与では、lidocaine, PTZ による痙攣発現率はやや上昇する傾向が認められた (図 6)。

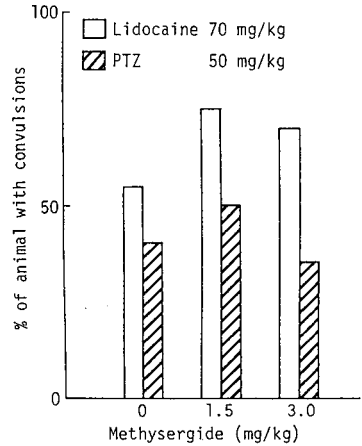


図6 Lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 誘発痙攣発現率におよぼす methysergide の影響。

Ⅲ. 痙攣発現に対する 5-HT 作働性ニューロン活性化上昇の影響

上記のように、5-HT 作働性ニューロンの活性低下を引き起こす処置により、PTZ による痙攣同様に lidocaine による痙攣も促進される結果が得られた。そこで次に、5-HT ニューロンの活性を高める処置の影響について観察した。

1. 5-Hydroxytryptophan の影響

5-HT の前駆物質である 5-hydroxytryptophan (5-HTP) を 20 分前に投与し、痙攣発現に対する影響を観察した。Lidocaine による痙攣発現率は、対照群の 92% から 5-HTP 80 mg/kg 投与群では 31% にまで有意に低下した。PTZ による痙攣発現率も低下傾向を示した (図 7)。5-HTP 投与により脳内の 5-HT, 5-HIAA 含量はいずれの部位においても著しく増加していた (図 8)。

2. Imipramine の影響

(1) 痙攣発現に対する影響

神経軸索末端よりシナプス間隙に遊離された 5-HT は神経伝達物質としての作用発現後、大部分は神経終末に再取り込みされる。この取り込みが抑制されると、5-HT 作働性ニューロンの活性が上昇すると考え

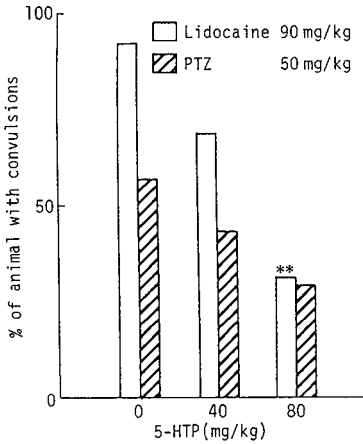


図7 Lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 誘発痙攣発現率におよぼす 5-hydroxytryptophan (5-HTP) の影響.
** P<0.01.

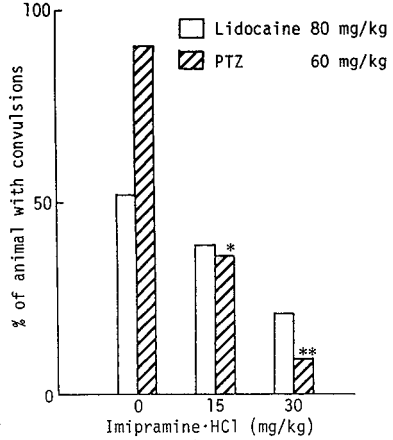


図9 Lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 誘発痙攣発現率におよぼす imipramine の影響.
* P<0.05, ** P<0.01.

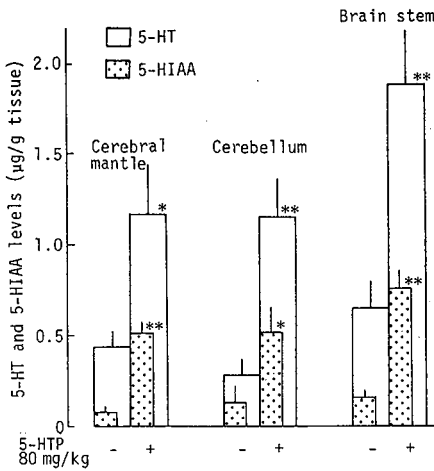


図8 マウス脳内 serotonin (5-HT) および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量におよぼす 5-hydroxytryptophan (5-HTP) の影響.
* P<0.05, ** P<0.01.

表2 マウス脳内 serotonin (5-HT) および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量におよぼす imipramine の影響

	Concentration (µg/g tissue)	
	5-HT	5-HIAA
Cerebral mantle		
Control	0.38 ± 0.03	0.27 ± 0.02
Imipramine	0.39 ± 0.02	0.24 ± 0.02
Cerebellum		
Control	0.25 ± 0.02	0.07 ± 0.07
Imipramine	0.29 ± 0.09	0.07 ± 0.04
Brain stem		
Control	0.72 ± 0.12	0.50 ± 0.08
Imipramine	0.77 ± 0.07	0.51 ± 0.03

られる。その可能性を検討するため、神経終末から放出された 5-HT の再取り込みを阻害する imipramine を30分前に投与し、痙攣発現に対する影響を観察した。Lidocaine による痙攣発現率は、対照群の52%から imipramine 15 mg/kg 投与群では39%、30 mg/kg 投与群では21%と低下傾向を示した。PTZ による痙攣発現率は有意に低下した(図9)。Imipramine 投与により脳内の 5-HT、5-HIAA 含量は、いずれの部位でも有意な変化はなかった(表2)。

(2) 脳切片からの 5-HT 遊離に対する影響

脳切片からの 5-HT 遊離に対する imipramine の効果について調べた。³H]5-HT で標識した脳切片を表面灌流すると、その自然遊離は一定時間後に安定した状態に至る。本実験では90分間予備灌流を行ったのち試料採取を開始した。電気刺激は予備灌流終了6分後より30分間隔に行ったが、刺激時の ³H]5-HT 遊離は約50%から100%増加し、またその反応は長時間の灌流中常に一定していた(図10)。

Imipramine は ³H]5-HT の自然遊離にはほとんど影響しなかったが、10⁻⁷ M の濃度にて電気刺激時の ³H]5-HT 遊離を増加させ、10⁻⁶ M の濃度では増加はさらに大きかった(図11)。

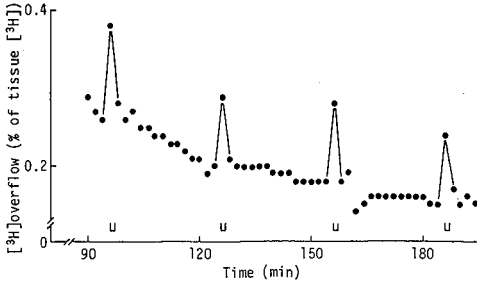


図10 電気刺激によるマウス大脳切片からの $[^3\text{H}]$ serotonin (5-HT) 遊離。
(U: 20 mA, 2 msec, 5 Hz)

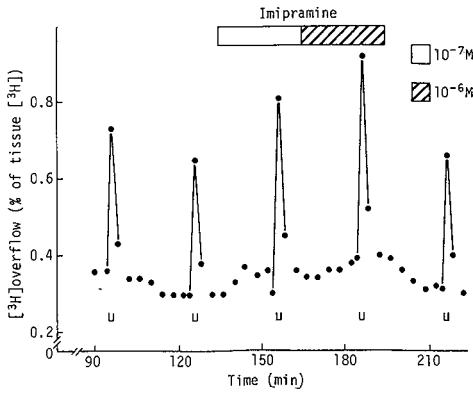


図11 マウス大脳切片からの $[^3\text{H}]$ serotonin (5-HT) 遊離におよぼす imipramine の影響。
(U: 20 mA, 2 msec, 5 Hz)

(3) 脳 P₂ 画分への 5-HT 取り込みに対する影響

脳 P₂ 画分への 5-HT 取り込みに対する imipramine の影響について検討した。P₂ 画分浮遊液に $[^3\text{H}]$ 5-HT を 10^{-7} M 存在させたとき 37°C における P₂ 画分への $[^3\text{H}]$ 5-HT の取り込みは10分までほぼ直線的に増加した。この $[^3\text{H}]$ 5-HT 取り込みに対し $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M の imipramine は約 30~40% の抑制効果を示した (図12)。

3. Fenfluramine の影響

(1) 痙攣発現に対する影響

神経終末からの 5-HT の放出を増加させる fenfluramine を30分前に投与し、痙攣発現に対する影響を観察した。Lidocaine による痙攣発現率は fenfluramine (5 mg/kg, 10 mg/kg) 投与によりわずかに低下傾向を示した。PTZ による痙攣発現率には明らかな変化は認められなかった (図13)。

(2) 脳切片からの 5-HT 遊離に対する影響

Fenfluramine は 3×10^{-7} M $\sim 10^{-5}$ M の範囲で濃度依存的に $[^3\text{H}]$ 5-HT の自然遊離を増加させた。電気刺

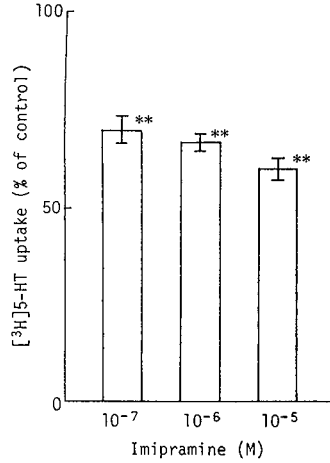


図12 マウス脳 P₂ 画分への $[^3\text{H}]$ serotonin (5-HT) 取り込みにおよぼす imipramine の影響。
** P < 0.005.

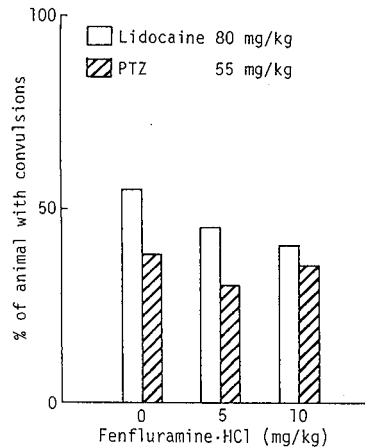


図13 Lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 誘発痙攣発現率におよぼす fenfluramine の影響。

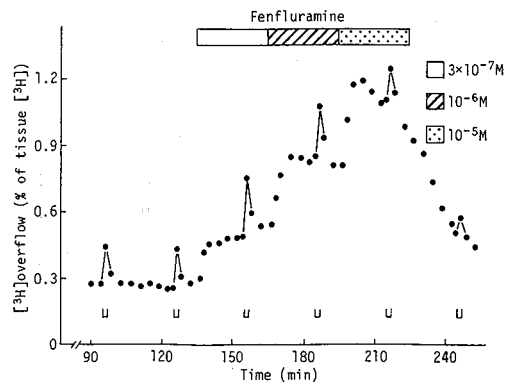


図14 マウス大脳切片からの $[^3\text{H}]$ serotonin (5-HT) 遊離におよぼす fenfluramine の影響。
(U: 20 mA, 2 msec, 5 Hz)

激時の遊離は低濃度で若干増加したが、高濃度では逆に減少した(図14)。

IV. Lidocaine の 5-HT 作働性ニューロン活性に対する影響

以上のごとく lidocaine による痙攣発現に対して 5-HT 作働性ニューロン活性の変化が影響を与えることが示されたので、lidocaine の 5-HT 遊離、取り込みに対する影響について検討を加えた。

1. 脳切片からの 5-HT 遊離に対する影響

Lidocaine は 10^{-5} M より濃度依存的に電気刺激時の $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 遊離を抑制し、 10^{-4} M で著明に抑制した。Lidocaine を wash out することによりこの抑制から回復した。 10^{-3} M ではほぼ完全に遊離を抑制し、 $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 自然遊離を増加させた(図15)。

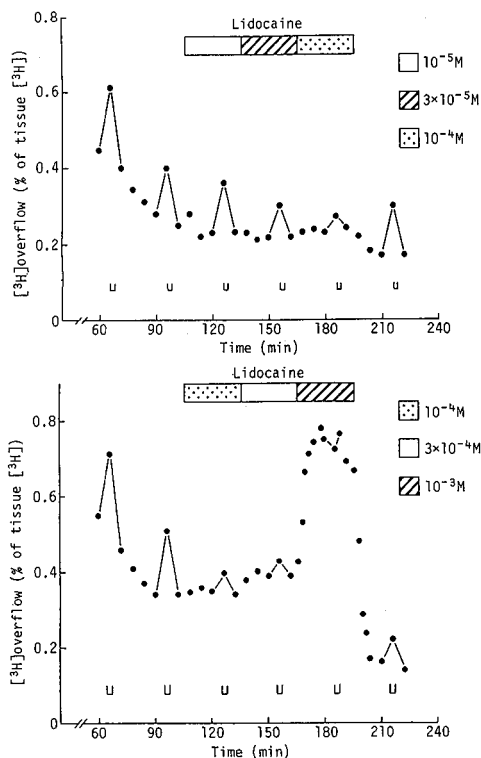


図15 マウス大脳切片からの $[^3\text{H}]$ serotonin (5-HT) 遊離におよぼす lidocaine の影響。
(U: 20 mA, 2 msec, 5 Hz)

2. 脳 P_2 画分への 5-HT 取り込みに対する影響

脳 P_2 画分への $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ 取り込みに対し、 10^{-5} M および 10^{-4} M では lidocaine による抑制効果は明らかではなかったが、 10^{-3} M では有意に抑制した(図16)。

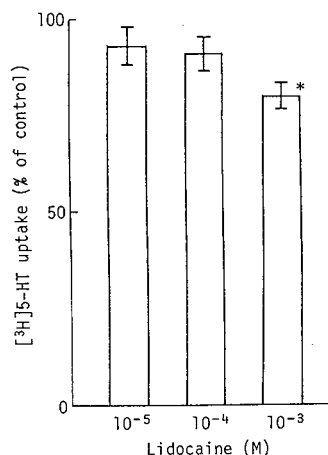


図16 マウス脳 P_2 画分への $[^3\text{H}]$ serotonin (5-HT) 取り込みにおよぼす lidocaine の影響。

* $P < 0.05$.

考 察

脳内モノアミン自身は、痙攣発現因子として重要な役割を果たしているわけではないが、脳内モノアミン含量を変化させたときに、電気刺激や薬物による痙攣発現が影響を受けることはよく知られている。たとえば reserpine 処置マウスでは、電気ショック痙攣閾値が低下する¹¹⁾。Reserpine は脳内カテコールアミンのみでなく、5-HT 含量も減少させる。そこで reserpine 処置後に各モノアミン前駆体を投与して脳内モノアミン含量を増加させることにより、どのアミンが痙攣に関係するのかが調べられた結果、noradrenaline が電気ショック痙攣に参与していることが示唆された^{24,25)}。PTZ 痙攣でも noradrenaline 作働性ニューロンの活性上昇をもたらす処置により、痙攣発現は抑制され、活性低下をもたらす処置により促進されたこと²⁶⁻²⁸⁾ から、noradrenaline はこうした痙攣に抑制性神経伝達物質として働いていることが示唆されている。Dopamine の関与については明確ではないようである。

一方脳内 5-HT が痙攣発現に係わりを有することを示唆するいくつかの報告がある。すなわち脳内 5-HT 含量を変動させたときに痙攣閾値が影響を受けるというものである。しかしこれらの成績は、実験モデルによって必ずしも一致していない。たとえば脳内 5-HT 含量を増加させるような処置は、電気ショック痙攣や PTZ 痙攣の閾値を上昇させたとの報告^{29,30)}がある反面、hexafluorodiethylether の痙攣閾値を低下させたとの報告³¹⁾がある。脳内ニコチンおよびムスカリン受容体の同時刺激による、特異的な持続性振戦と痙攣の発現には、5-HT は促進的に参与しているようであ

る³²⁾。このように 5-HT は痙攣に対し抑制的、あるいは促進的にと、実験モデルによって異なった関係を示している。

局所麻酔薬痙攣とモノアミンとの関係については報告が少なく、関連性も明確ではない。Ciarlone ら^{33,34)} は lidocaine がマウス中脳の dopamine 含量を減少させることを報告している。さらにカテコールアミン合成律速酵素である tyrosine hydroxylase を α -methyl-p-tyrosine (α -MPT) で阻害し、カテコールアミン含量を減少させた場合に局所麻酔薬痙攣は影響を受けないのに対し、 α -MPT と dihydroxyphenylserine により、noradrenaline を回復させ dopamine だけを選択的に減少させると、lidocaine および procaine 痙攣の閾値は低下することを示し、dopamine の関与を示唆している。しかし芳村ら¹⁵⁾ はマウスにおいて、脳内カテコールアミン、特に dopamine よりも noradrenaline 作働性ニューロンの活性を上昇させることにより lidocaine 痙攣発現が促進され、活性低下により抑制されることを見だしている。しかし同時に対照として行った PTZ 痙攣では、noradrenaline 作働性ニューロンの活性上昇により痙攣は抑制され、活性低下により促進されるというこれまでの報告と一致した結果を認めており、したがって noradrenaline 作働性ニューロンは、局所麻酔薬痙攣と PTZ 痙攣に対し全く逆の係わりを有することになる。このことは局所麻酔薬と PTZ 痙攣の発現機序の相違を示唆するものとして興味深い。

局所麻酔薬痙攣と 5-HT の関係についての報告は乏しい。de Oliveira ら^{17,18)} がネコ、マウスにおいて 5-HT 前駆物質等が lidocaine 痙攣閾値を低下させ、痙攣持続時間を延長し、5-HT 合成阻害剤が閾値を上昇させることを報告しているくらいである。したがって 5-HT の局所麻酔薬痙攣への係わりは明確ではない。本研究は 5-HT の局所麻酔薬痙攣への関与を明確にするため、5-HT ニューロンの活性の変動による局所麻酔薬痙攣の発現率への影響を検討したものである。こうした実験においては、前述のように実験モデルによって異なった結果が得られることがあるので、本実験では対照として PTZ を同じ実験系に用いた。

Tryptophan hydroxylase は l-tryptophan を水酸化して 5-HTP に変換する酵素であり、5-HT 生合成の律速酵素である。この酵素の基質特異性は高く、tryptophan 水酸化反応は酵素、基質、補酵素 tetrahydrobiopterine 量によって調節されており、反応生成物である 5-HTP や 5-HT によって調節されることはない。この点、tyrosine hydroxylase が noradrenaline によってネガティブフィードバック調節を受けるのとは異

なっている。したがって血中 tryptophan や 5-HTP を増加させると脳内 5-HT 含量が増加する。PCPA は tryptophan と競合し不可逆的に酵素と結合して酵素活性を阻害し、脳内 5-HT 含量を低下させる³⁵⁾。このようにして脳内 5-HT 含量を増減することによって 5-HT ニューロンの活性を変化させることができる。

本研究では PCPA により脳幹部 5-HT 含量を有意に減少させたとき、あるいは reserpine により脳内 5-HT 含量を著しく減少させたとき、lidocaine 痙攣発現率は増加した。PTZ についても同様の結果であった。5-HT 受容体拮抗薬に関しては、5-HT₂ 受容体拮抗薬である methysergide³⁶⁾ では作用は認められなかったが、5-HT₁ 受容体拮抗作用のある methiothepin³⁶⁾ では、lidocaine 痙攣発現率が有意に増加した。これらの結果は脳内 5-HT ニューロンの活性低下が局所麻酔薬痙攣発現を増加させる、すなわち 5-HT ニューロンは局所麻酔薬痙攣に抑制的に関与していることをうかがわせるものである。

次に 5-HT ニューロンの活性を高めた場合の局所麻酔薬痙攣発現への影響について検討した。5-HTP 投与は脳内 5-HT 含量を著しく増加させた。5-HTP 処置マウスでは lidocaine 痙攣発現率は有意に減少した。Imipramine はアミン、特に 5-HT の神経終末への取り込み阻害作用を有する三環系抗うつ薬である。本研究においても imipramine 10^{-7} ~ 10^{-6} M は脳切片からの 5-HT 自然遊離には影響しなかったが、電気刺激による遊離を促進させた。これは imipramine により 5-HT の神経終末への取り込みが抑制され、灌流液中の 5-HT が増加したものと考えられる。実際本実験でも imipramine は同濃度範囲で、P₂ 画分への 5-HT の取り込みを阻害した。このような imipramine を前処置したマウスでは、lidocaine、PTZ 痙攣ともにその発現率は減少した。したがって imipramine は in vivo においても 5-HT の取り込みを阻害し、シナプス間隙の 5-HT 濃度を高め、5-HT ニューロンの活性を高めることにより、痙攣発現を抑制したものと考えられる。これらの成績は、5-HT ニューロンの活性促進は局所麻酔薬痙攣発現を抑制することを示唆しており、5-HT ニューロンは局所麻酔薬痙攣において抑制的に作働しているとの仮説を支持するものである。しかしながら de Oliveira ら¹⁸⁾ は、5-HTP や monoamine oxidase 阻害剤 iproniazid は局所麻酔薬痙攣閾値を低下させ、PCPA は痙攣閾値を上昇させると報告している。これらの結果は 5-HT ニューロンの活性化が局所麻酔薬痙攣に対し促進的な関係を示唆するもので、本研究結果とは全く逆の関係を示している。しかし対照として用いた PTZ 痙攣と 5-HT との関係についての本研

究結果は、これまで報告されている脳内 5-HT ニューロンの活性を促進あるいは抑制させる処置が、それぞれ PTZ 痙攣閾値を上昇あるいは低下させるとの成績と一致している。芳村ら¹⁵⁾は脳内カテコールアミンと局所麻酔薬痙攣との関係において、脳内 noradrenaline 作働性ニューロンの活性促進は局所麻酔薬痙攣発現率を増加させることを示し、局所麻酔薬痙攣に対し noradrenaline 作働性神経は抑制的に関与するというこれまでの説と矛盾することを報告している。局所麻酔薬痙攣においてなぜこのような違いが生じるのか、その理由は現在のところ不明である。本研究では実験系や実験条件の違いによる成績の差異を考慮し、対照として PTZ 痙攣について同時に実験を行っており、PTZ 痙攣に対してはこれまでの報告と一致する成績を得ている。したがって単に実験モデルの違いによるものと言いきれないが、最近内因性 imipramine 様物質の存在が示唆されており、このような内在性物質により 5-HT ニューロンの活性が実験モデルによって異なった調節を受けている等の可能性は否定できない。また最近脳内 5-HT₂ 受容体の存在と機能が明らかにされてきており、海馬や線条体において inward current を抑制、あるいは促進すること³⁷⁾や、noradrenaline や acetylcholine の遊離促進^{38,39)}あるいは GABA や dopamine の遊離抑制^{40,41)}と関連していることが示されていることから、こうした 5-HT 受容体のサブタイプの異なった関与が含まれているのかもしれない。最近抗うつ薬で 5-HT 取り込み阻害作用のある fluoxetine が、genetically epilepsy-prone rats において抗痙攣作用を示すこと、microdialysis による脳 5-HT 動態の解析から、この薬物による 5-HT ニューロンの活性化が、抗痙攣作用と密接に関係していることが報告されている⁴²⁾。ヒトにおいても熱性痙攣発現率と神経伝達系の異常との関連性が注目されており、脳脊髄液 (CSF) 中の 5-HT と dopamine それぞれの代謝産物である 5-HIAA と homovanillic acid (HVA) 濃度との関係が示唆されている⁴³⁾。Giroud ら⁴³⁾は CSF 中の 5-HIAA 濃度の減少と熱性痙攣との相関性を認めており、CSF 中 5-HIAA 濃度の低下が痙攣閾値の生物学的指標となり得ることを示唆している。これらの知見は 5-HT ニューロンの活性低下が痙攣閾値を下げる、すなわち 5-HT ニューロンはこれら痙攣発現においても抑制的に機能していることを示唆しており、本研究結果における 5-HT ニューロンの役割に関する仮説を支持するものである。

したがって次に脳組織における 5-HT 取り込みおよび遊離に対する lidocaine の影響を検討した。lidocaine $10^{-5} \sim 10^{-4}$ M は、大脳皮質切片からの [³H]5-HT

の自然遊離には影響することなく、電気刺激による [³H]5-HT 遊離を濃度依存的に抑制した。局所麻酔薬痙攣において 5-HT ニューロンは抑制性神経系として作働しているとのこれまでの仮説を勘案してみれば、局所麻酔薬が 5-HT の遊離を抑制することにより脱抑制をもたらす、結果として痙攣誘発を助長しているものと考えて矛盾はない。さらに電気刺激による 5-HT 遊離を完全に抑制するような高濃度 (10^{-3} M) の lidocaine 存在下では、自然遊離が増加してきた。これは lidocaine による 5-HT の神経終末への取り込み阻害に基づくものと考えられる。実際 lidocaine 10^{-3} M は P₂ 画分への [³H]5-HT の取り込みを阻害した。このような自然遊離の増加は、5-HT 遊離促進作用、取り込み阻害作用のある fenfluramine⁴⁴⁾によっても観察された。しかし fenfluramine は電気刺激による 5-HT 遊離を低濃度で若干増加させるものの、高濃度ではむしろ抑制することから、局所麻酔薬のように遊離抑制作用も持ち合わせているのかもしれない。このことが imipramine と異なり局所麻酔薬および PTZ 痙攣発現率に対し抑制効果を示し得なかったことの原因と考えられる。

GABA 合成阻害剤やその受容体拮抗薬、あるいは Cl⁻ チャンネル遮断薬がそれ自身で痙攣を誘発するのと異なり、PCPA や 5-HT 受容体拮抗薬で痙攣が誘発されることはない。したがって局所麻酔薬痙攣発現の機序に GABA ニューロンに対する抑制作用が大きく関与していることが考えられるのに対しアミン作働性ニューロンは調節的修飾をしているものと考えられる。すなわち 5-HT 作働性ニューロンは抑制的に、noradrenaline 作働性ニューロンは促進的に関与していることが、本実験および芳村らの報告より明らかになった。また対照として用いた PTZ 痙攣に対し、5-HT ニューロンの関与は同傾向であったがその程度は総じて lidocaine 痙攣におけるよりも小さかった。PTZ はその痙攣誘発機序としてやはり GABA 作働性ニューロンの抑制が考えられているが、それ以外に神経系への直接の興奮作用を有しており、この点局所麻酔薬痙攣とは違ったアミン作働性神経の影響を受けることは、その機序の相違をさらに示唆するものである。

以上本研究は、lidocaine 痙攣発現機構に、脳内 5-HT 作働性ニューロンが抑制性ニューロンとして、密接に関与していることを示唆するものである。

総 括

局所麻酔薬痙攣における脳内 serotonin (5-HT) の関与を明らかにする目的で、マウスを用い、脳内 5-

HT 作働性ニューロンの活性変動をもたらすことによる, lidocaine および pentylenetetrazol (PTZ) 痙攣発現への影響を検討した。加えて, マウス大脳皮質切片からの 5-HT 遊離および P_2 画分への 5-HT 取り込みに対する lidocaine の影響について検討を加え, 以下の結果を得た。

1. ρ -Chlorophenylalanine (PCPA, 300 mg/kg) 投与により脳内 5-HT および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量は脳幹においてそれぞれ対照の81%および70%に減少した。この時 lidocaine による痙攣発現率は2倍以上に増加した。PTZ 痙攣発現率も増強される傾向にあった。

2. Reserpine (20 mg/kg) 投与により脳内 5-HT 含量は外套, 小脳, 脳幹いずれの部位でも有意に減少した。一方 5-HIAA 含量はいずれの部位でも変化がなかった。この時 lidocaine 痙攣発現率は65%増強された。PTZ 痙攣発現率も増強される傾向にあった。

3. Methiothepine (0.2 mg/kg) 投与により lidocaine 痙攣発現率は3倍に増強された。PTZ 痙攣発現率は軽度増強された。Methysergide (1.5, 3.0 mg/kg) は lidocaine および PTZ 痙攣発現率に影響を与えなかった。

4. 5-Hydroxytryptophan (5-HTP, 80 mg/kg) 投与により lidocaine 痙攣発現率は対照の1/3にまで抑制された。PTZ 痙攣発現率も抑制される傾向にあった。この時脳内 5-HT および 5-HIAA 含量はいずれの部位でも2倍以上に増加していた。

5. Imipramine (30 mg/kg) により lidocaine 痙攣発現率は減少傾向を示した。PTZ 痙攣発現率は有意に減少した。Imipramine は脳内 5-HT および 5-HIAA 含量に影響を与えなかった。Imipramine は 10^{-7} ~ 10^{-5} M の範囲で電気刺激による脳切片からの $[^3\text{H}]$ 5-HT 遊離を濃度依存的に増加させた。またその濃度で脳 P_2 画分への $[^3\text{H}]$ 5-HT 取り込みを有意に抑制した。

6. Fenfluramine (5, 10 mg/kg) 投与により lidocaine 痙攣発現率は減少する傾向にあった。PTZ 痙攣発現率には明らかな影響は認められなかった。Fenfluramine は 3×10^{-7} M より濃度依存的に脳切片からの非刺激時の $[^3\text{H}]$ 5-HT 遊離を増加させたが, 電気刺激時の遊離は低濃度でわずかに促進したが高濃度では減少させた。

7. 10^{-5} ~ 10^{-4} M の lidocaine は電気刺激時の脳切片からの $[^3\text{H}]$ 5-HT 遊離を濃度依存的に抑制した。 10^{-3} M においては非刺激時の $[^3\text{H}]$ 5-HT 遊離を増加させ, 脳 P_2 画分への $[^3\text{H}]$ 5-HT 取り込みを抑制した。

以上, lidocaine により発現する痙攣は PTZ により

発現する痙攣と同様に, 脳内 5-HT 作働性ニューロンの活性低下をきたす処置により促進され, 活性上昇をきたす処置により抑制されること, また lidocaine は脳標本での 5-HT 動態に影響することが示された。これらの結果は局所麻酔薬痙攣発現機構において中枢の 5-HT 作働性ニューロンが抑制的調節因子として重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

謝 辞

本研究に際し, 御懇切なる御指導と御校閲を賜りました本学, 口腔外科学第一講座高田和彰教授, 辻本明名誉教授, ならびに歯科薬理学講座土肥敏博教授に心より謝意を表します。また, 御校閲を賜った歯科麻酔学講座河原道夫教授に深謝致します。さらに本研究を進めるに際し, 多くの御教示, 御協力をいただいた歯科薬理学講座森田克也講師に感謝するとともに, 御協力いただいた口腔外科学第一講座ならびに歯科薬理学講座の教職員各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Seo, N., Oshima, E., Stevens, J. and Mori, K.: The tetraphasic action of lidocaine on CNS electrical activity and behavior in cats. *Anesthesiology* 57, 451-457, 1982.
- 2) Eidelberg, E., Lesse, H. and Gault, F.P.: An experimental model of temporal lobe epilepsy. In *Studies of the Convulsant Properties of Cocaine, EEG and Behavior*, (Glaser, G.H. ed.). Basic Books, New York, 272-283, 1963.
- 3) Wagman, I.H., de Jong, R.H. and Prince, D.A.: Effects of lidocaine on the central nervous system. *Anesthesiology* 28, 155-172, 1967.
- 4) Wagman, I.H., de Jong, R.H. and Prince, D.A.: Effects of lidocaine on spontaneous cortical and subcortical electrical activity. Production of seizure discharges. *Arch. Neurol.* 18, 277-290, 1968.
- 5) Stripling, J.S.: Origin of cocaine-induced and lidocaine-induced spindle activity within the olfactory forebrain of the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 53, 208-219, 1982.
- 6) Ingvar, M. and Shapiro, H.M.: Selective metabolic activation of the hippocampus during lidocaine-induced pre-seizure activity. *Anesthesiology* 54, 33-37, 1981.
- 7) Tanaka, K. and Yamasaki, M.: Blocking of cortical inhibitory synapses by intravenous lidocaine. *Nature* 209, 207-208, 1966.
- 8) de Jong, R.H., Robles, R. and Corbin, R.W.: Central actions of lidocaine-synaptic transmission. *Anesthesiology* 30, 19-23, 1969.
- 9) Ikeda, T., Dohi, T. and Tsujimoto, A.: Protec-

- tion from local anesthetic-induced convulsions by γ -aminobutyric acid. *Anesthesiology* **56**, 365-368, 1982.
- 10) Ikeda, T., Dohi, T. and Tsujimoto, A.: Inhibition of γ -aminobutyric acid release from synaptosomes by local anesthetics. *Anesthesiology* **58**, 495-499, 1983.
 - 11) Chen, G., Ensor, C.R. and Bohner, B.: A facilitation action of reserpine on the central nervous system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **86**, 507-510, 1954.
 - 12) Kilian, M. and Frey, H.H.: Central monoamines and convulsive thresholds in mice and rats. *Neuropharmacology* **12**, 681-692, 1973.
 - 13) London, E.D. and Buterbaugh, G.G.: Modification of electroconvulsive responses and thresholds in neonatal rats after brain monoamine reduction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **206**, 81-90, 1978.
 - 14) Mason, S.T. and Corcoran, M.E.: Catecholamine and convulsions. *Brain Res.* **179**, 497-507, 1979.
 - 15) Yosimura, Y., Dohi, T., Tanaka, S., Takada, K. and Tsujimoto, A.: Changes in convulsion susceptibility of lidocaine by alteration of brain catecholaminergic functions. *Japan. J. Pharmacol.* **56**, 85-91, 1991.
 - 16) Azzaro, A.J., Wenger, G.R., Craig, C.R. and Stitzel, R.E.: Reserpine induced alterations in brain amines and their relationship to changes in the incidence of minimal electroshock seizures in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **180**, 558-568, 1972.
 - 17) de Oliveira, L.F., Heavner, J.E. and de Jong, R. H.: 5-Hydroxytryptophan intensifies local anesthetic-induced convulsions. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **207**, 333-339, 1974.
 - 18) de Oliveira, L.F. and Bretas, A.D.: Effect of 5-hydroxytryptophan, iproniazid and ρ -chlorophenylalanine on lidocaine seizure threshold of mice. *Eur. J. Pharmacol.* **29**, 5-9, 1974.
 - 19) Quay, W.B.: Circadian rhythm in pineal serotonin and its modification by the estrous cycle and photoperiods. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 473-479, 1963.
 - 20) Curzon, G. and Green, A.R.: Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in small regions of rat brain. *Br. J. Pharmacol.* **39**, 653-655, 1970.
 - 21) Farnebo, L.O. and Hamberger, B.: Drug-induced changes in the release of [3 H]-monoamines from field stimulated rat brain slices. *Acta. Physiol. Scand.* **371**, 35-44, 1971.
 - 22) Bray, G.A.: A simple effective liquid scintillator for counting aqueous solution in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.* **1**, 270-285, 1960.
 - 23) Gray, E.G. and Whittaker, V.P.: The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* **96**, 79-88, 1962.
 - 24) Mason, S.T. and Corcoran, M.E.: Seizure susceptibility after depletion of spinal or cerebellar noradrenaline with 6-OHDA. *Brain Res.* **166**, 418-421, 1978.
 - 25) Crunelli, V., Cervo, L. and Samanin, R.: Evidence for a preferential role of central noradrenergic neurons in electrically induced convulsions and activity of various anti-convulsants in the rat. *Neurotransmitters, Seizures, and Epilepsy.* 195-202, 1981.
 - 26) Pfeifer, A.K. and Galambos, E.: The effect of reserpine, α -methyl-p-tyrosine, prenylamine, and guanethidine on metrazol-convulsions and the brain monoamine level in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **165**, 201-211, 1967.
 - 27) Bhattacharya, S.K., Ghosh, P. and Bose, R.: Pentylentetrazol induced clonic convulsions in rat. Role of brain monoamines. *Mater. Med. Pol.* **3**, 184-187, 1978.
 - 28) Mason, S.T. and Corcoran, M.E.: Forebrain noradrenaline and metrazol-induced seizures. *Life Sci.* **23**, 167-172, 1978.
 - 29) Schleginger, K., Stavnes, K.L. and Boggan, W. O.: Modification of audiogenic and pentylentetrazol seizures with γ -aminobutyric acid, norepinephrine and serotonin. *Psychopharmacologia* **15**, 226-231, 1969.
 - 30) De La Torre, J.C. and Mullan, S.: A possible role for 5-hydroxytryptamine in drug-induced seizures. *J. Pharm. Pharmacol.* **22**, 858-859, 1970.
 - 31) Gallagher, B.B.: Aminoacids and cerebral excitability. *J. Neurochem.* **16**, 701-706, 1969.
 - 32) Dohi, T. and Tsujimoto, A.: Possible mechanisms of sustained tremor induction by nicotine in pilocarpine treated animals. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **235**, 62-72, 1978.
 - 33) Ciarlone, A.E. and Smudski, J.W.: Lidocaine's influence on brain amines in mice. *J. Dent. Res.* **55**, 465-469, 1976.
 - 34) Ciarlone, A.E.: Alteration of lidocaine- or procaine-induced convulsions by manipulation of brain amines. *J. Dent. Res.* **60**, 182-186, 1981.
 - 35) Takaori, S. and Tanaka, C.: Effect of ρ -chlorophenylalanine, a serotonin depletor, on Sidman avoidance response in rats. *Japan. J. Pharmacol.* **20**, 607-609, 1970.
 - 36) Leff, P., Martin, G.R. and Morse, J.M.: Differential classification of vascular smooth muscle and endothelial cell 5-HT receptors by use of tryptamine analogues. *Br. J. Pharmacol.* **91**, 321-331, 1987.

- 37) Yakel, J.L., Trussel, L.O. and Jackson, M.B.: Three serotonin responses in cultured mouse hippocampal and striatal neurons. *J. Neurosci.* 8, 1273-1285, 1988.
- 38) Blandina, P., Goldfarb, J. and Green, J.P.: Molecular Biology, Receptors and Functional Effects; in Serotonin (Fozard, J.R. and Saxena, P.R., eds.). Birkhauser, 322-329, 1991.
- 39) Barnes, J.M., Barnes, N.M., Costall, B., Naylor, R.J. and Tyers, M.B.: 5-HT₃ receptors mediate inhibition of acetylcholine release in cortical tissue. *Nature* 338, 762-763, 1989.
- 40) Ropert, N. and Guy, N.: Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 441, 121-136, 1991.
- 41) Blandina, P., Goldfarb, J. and Green, J.P.: Activation of a 5-HT₃ receptor releases dopamine from rat striatal slice. *Eur. J. Pharmacol.* 155, 349-350, 1988.
- 42) Dailey, J.W., Yan, Q.S., Mishra, P.K., Burger, R.L. and Jobe, P.C.: Effect of fluoxetine on convulsions and on brain serotonin as detected by microdialysis in genetically epilepsy-prone rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 533-540, 1992.
- 43) Giroud, M., Dumas, R., Dauvergne, M., D'Athis, P., Rochette, L., Beley, A. and Bralet, J.: 5-Hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid in cerebrospinal fluid of children with febrile convulsions. *Epilepsia* 31, 178-181, 1990.
- 44) Mennini, T., Garattini, S. and Caccia, S.: Anorectic effect of fenfluramine isomers and metabolites: Relationship between brain levels and in vitro potencies on serotonergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berline)* 85, 111-114, 1985.