

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11087

研究課題名(和文) Dexmedetomidineの抗酸化能の検討：スピン共鳴解析を用いて

研究課題名(英文) Antioxidative effect of dexmedetomidine by spin resonance analysis

研究代表者

北野 敬明 (Kitano, Takaaki)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：20211196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： $\alpha_2$ 受容体アゴニストであるDexmedetomidine (DXM)は周術期の鎮静目的に使用され、周術期の酸化ストレスに対して脳保護作用を示すといわれている。本課題は、DXMの抗酸化作用の機序として、直接的なフリーラジカル消去作用の関与を、電子スピン共鳴法でフリーラジカルを直接測定することにより検討した。DXMは、ヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドアニオンを含む酸素中心ラジカルに対する直接的消去作用を示したが、一酸化窒素を含む窒素中心ラジカルに対しては消去作用を示さなかった。DXMの抗酸化作用の機序として、フリーラジカル、特に酸素中心ラジカルに対する直接的消去作用の関与が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、周術期管理に関して、術後認知機能障害が注目されている。術後認知機能障害は患者の予後に大きく影響する。その発症機序として、神経炎症の関与に加えて酸化ストレスの関与が示唆されている。周術期の鎮静目的に使用される $\alpha_2$ 受容体アゴニストDXMが酸化ストレスに対して脳保護作用を示すといわれている。DXMが術後認知機能障害を予防するとの報告もあり、我々はその作用機序としてDXMの抗酸化作用の寄与を推察している。DXMの抗酸化作用の機序の一つとして直接的なフリーラジカル消去作用の関与を明らかにした本課題の成果により、DXMが周術期の酸化ストレスを軽減し、術後認知機能障害の予防する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dexmedetomidine (DXM) is an  $\alpha_2$  agonist and used for perioperative sedation. It is reported that DXM is neuroprotective against perioperative oxidative stress. We evaluated the direct scavenging activity of DXM against multiple free radical species by electron spin resonance spectrometry using the spin trapping method. DXM scavenged multiple oxygen-centered radicals including hydroxyl radical and superoxide anion in dose dependent manners. However, DXM did not scavenge nitrogen-centered radicals including nitric oxide. The present study demonstrated the direct scavenging activity of DXM against free radicals, especially oxygen-centered radicals, to which its antioxidative activity might be attributed.

研究分野：麻酔科学

キーワード：Dexmedetomidine 抗酸化作用 フリーラジカル ラジカル消去能 虚血再灌流傷害 電子スピン共鳴

## 1. 研究開始当初の背景

$\alpha_2$  受容体アゴニストである Dexmedetomidine (DXM, 図 1) は、主に集中治療室にて人工呼吸管理されている周術期の鎮静目的に使用されている。近年、大変興味深いことに、基礎研究によって DXM が周術期の酸化ストレスに対して脳保護作用を示すことが報告されている (Rodríguez-González *et al.*, 2016; Sifringer *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2015)。また、DXM はその他にも心筋虚血 (Guler *et al.*, 2014)、肺障害 (Cui *et al.*, 2015)、腎虚血 (Yu *et al.*, 2016)、精索捻転 (Tuglu *et al.*, 2015)、電離放射線傷害 (Kutanis *et al.*, 2016) などの酸化ストレスに対して抗酸化作用を示すことが報告されている。しかし、その作用機序に関して  $\alpha_{2A}$  受容体 (Paris A *et al.*, 2006) や  $I_1$  受容体 (Dahmani *et al.*, 2010) が関与するとの報告があるが、詳細は未だ不明である。

周術期の最近のトピックスとして、術後認知機能障害が注目されている。術後認知機能障害が生じると患者の予後に大きく影響する。その発症機序として、以前より神経炎症の関与が指摘されているが、近年はこれに加えて酸化ストレスが大きく関与していることが確認されている。DXM が術後認知機能障害を予防する可能性を示唆する報告があるが (Wang *et al.*, 2015)、我々はその作用機序として、DXM の抗酸化作用が寄与している可能性があるかと推察している。

我々は、種々の薬剤の抗酸化作用のうち、薬剤による直接的なラジカル消去能の評価を電子スピン共鳴法 (ESR) を応用して行ってきた (Tokumaru, Kitano *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2010; 徳丸, 北野ら, 2013; Tokumaru, Kitano *et al.*, 2018; Umeda, Kitano, Tokumaru *et al.*, 2019)。

## 2. 研究の目的

術後認知機能障害の発症に酸化ストレスが大きく関与していることが基礎および臨床研究にて確認されている。周術期の鎮静に使用される  $\alpha_2$  作動性鎮静剤 DXM (CAS 113775-47-6; C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>; MW 200.28) が術後認知機能障害を予防することが臨床研究にて報告されているが、興味深いことに DXM が抗酸化作用を有することを示す基礎研究もある。我々は DXM の抗酸化作用が術後認知機能障害の予防に関与する可能性があるかと推測しているが、その詳細は不明である。

そこで本研究は、DXM の抗酸化作用のうち、直接的なフリーラジカル消去能を ESR によって検証し、その作用機序を明らかにすることを目的として実施した。

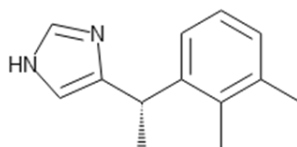


図1 Dexmedetomidine

## 3. 研究の方法

### (1) フリーラジカルの ESR による測定

試験管内で表1に示す8種類のフリーラジカルを発生させ、スピントラップ法により ESR で測定した。そこに DXM を濃度を変化させて添加し、観察されるフリーラジカルの ESR シグナルの強度の変化を定量した。

### (2) 50%阻害濃度の算出

Cheng-Prusoff の式を用いたノンパラメトリック回帰分析によって濃度-反応曲線を推定し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

$$y = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{a}\right)^b}$$

$x$ : DXM の濃度

$y$ : ラジカル信号の強度

$a, b$ : 定数 ( $a$  が IC<sub>50</sub> を示す)

### (3) 反応速度定数の推定

IC<sub>50</sub> 値は産生されたフリーラジカルの総量とスピントラップ剤の濃度に依存する。フリーラジカル間の比較を行うため、反応速度定数  $k_{\text{DXM}}$  を以下の式により算出した。スピントラップ剤の反応速度定数  $k_{\text{trap}}$  に対する相対値として求めた。

$$k_{\text{DEX}} = \frac{[\text{spin trap}]}{\text{IC}_{50}} k_{\text{trap}}$$

$k_{\text{DXM}}$ : DXM とフリーラジカルとの反応速度定数

$k_{\text{trap}}$ : スピントラップ剤とフリーラジカルとの反応速度定数

[trap]: スピントラップ剤の反応速度定数

表1 検討対象のフリーラジカルの発生法とスピントラップ剤

Free Radical species	Precursor / sensitizer	Spin trap
superoxide anion	hypoxanthine + XOD	DMPO
hydroxyl radical	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + UV 4s	CYPMPO
<i>tert</i> -butyl peroxy radical	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide + UV 5s	CYPMPO
<i>tert</i> -butyl oxy radical	AAPH + UV 1s	CYPMPO
singlet oxygen	rose bengal + UV 60s	4-OH-TEMP
ascorbyl free radical	sodium ascorbate + 99% DMSO	-
nitric oxide	NOC7	Carboxyl-PTIO
DPPH*	DPPH	-

## 4. 研究成果

(1) DXMは、*tert*-butyl peroxy radical以外の酸素中心ラジカルに対して、濃度依存的な直接的消去作用を示した(図2)。しかし、窒素中心ラジカルである一酸化窒素とDPPHに対しては、消去作用を示さなかった(図3)。

(2) 酸素中心ラジカルに対するDXMの反応速度定数をIC<sub>50</sub>から算出した(表2)。この結果、DXMは一重項酸素に対してはスピントラップ剤よりも大きな反応速度定数を持つものに対して、スーパーオキシドアニオンに対してはトラップ剤より2桁も小さな反応速度定数をもつことが示された。即ち、DXMは複数種の酸素中心ラジカルに対して直接的消去作用をもつが、その反応速度はラジカルの種類によって大きく異なることが示唆された。

(3) 周術期には、全身性炎症反応に伴う好中球の活性化や虚血/再灌流傷害に伴って酸化的連鎖反

応が生じる。この反応に対して、DXM は多種の酸素中心ラジカルを濃度依存性に消去することによって、抗酸化的作用を果たすことが考察された(図4)。この場合、虚血/再灌流障害の最上流に位置するスーパーオキシドアニオンに対して比較的弱いながらも消去活性を持つことや、生体内で最も組織傷害性が高いと言われるヒドロキシルラジカルを消去することは、全身性炎症反応や虚血/再灌流傷害に伴う酸化ストレスに対する DXM の抗酸化作用にとって有利な機序であると考えられる。またこのことより、術後認知機能障害の一因と考えられている活性酸素種の消去によって、DXM がその病態改善に寄与している可能性が示唆された(図5)。

(4) 一方、DXM は脂質ラジカルのモデルのうち *tert*-butyl oxyl radical は消去したが、もう一つのモデルである *tert*-butyl peroxy radical を消去しなかった。DXM の動脈硬化の予防効果は、あまり期待できないかもしれない(図4)。

(5) DXM は窒素中心ラジカルである一酸化窒素ラジカルに対して直接的消去能を示さなかった(図3)。一酸化窒素は、細胞内外で情報伝達物質としての働きを持っている。DXM はこの機能を障害することなく、ヒドロキシルラジカルなど有害なフリーラジカルを消去することが示唆された。

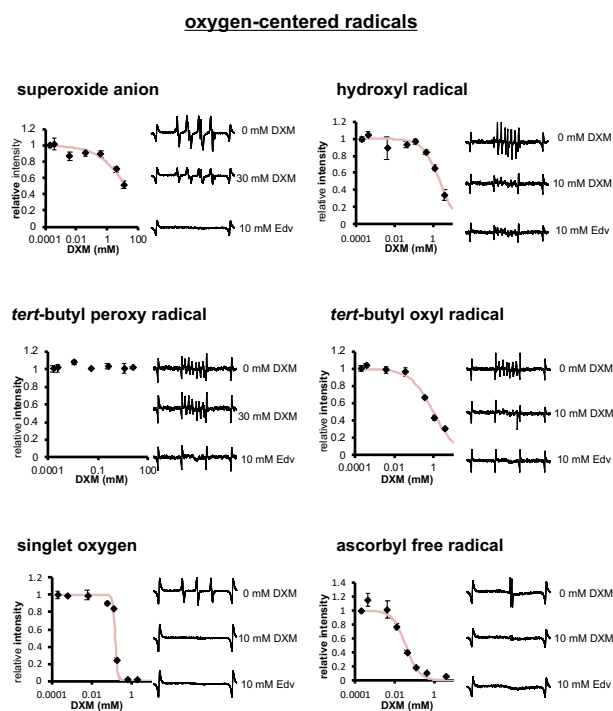


図2 DXM の酸素中心ラジカルに対する消去作用の濃度-反応曲線

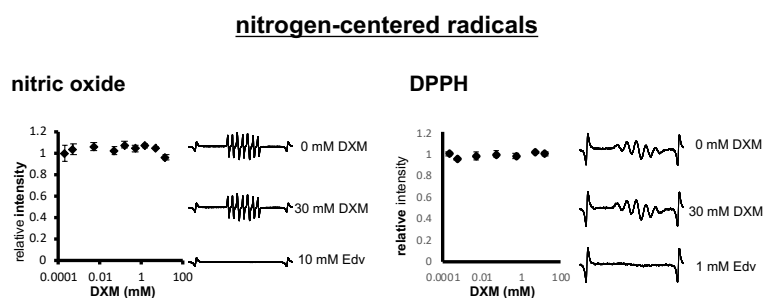


図3 DXM の窒素中心ラジカルに対する消去作用の濃度-反応曲線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tokumaru Osamu, Shuto Yachiko, Ogata Kazue, Kamibayashi Masato, Bacal Kira, Takei Hidehiro, Yokoi Isao, Kitano Takaaki	4. 巻 228
2. 論文標題 Dose-dependency of multiple free radical-scavenging activity of edaravone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 147 ~ 153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2018.03.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Umeda Ryohei, Takanari Hiroki, Ogata Kazue, Matsumoto Shigekiyo, Kitano Takaaki, Ono Katsushige, Tokumaru Osamu	4. 巻 64
2. 論文標題 Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 20 ~ 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.18-48	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西田太一, 徳丸治, 松本重清, 内野哲哉, 新宮千尋, 北野敬明
2. 発表標題 電子スピン共鳴法によるデクスメドミジンのフリーラジカル消去能の検討
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第66回学術集会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Kazue O, Yoshida K, Matsumoto S, Shingu C, Kitano T, Tokumaru O
2. 発表標題 Antioxidative activity of dexmedetomidine as a direct free radical scavenger
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Tokumaru O, Yoshida K, Ogata K, Takanari H, Kitano T
2. 発表標題 Dose-response relationship of free radical scavenging activity of dexmedetomidine
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新宮 千尋 (Shingu Chihiro) (30295191)	大分大学・医学部・准教授  (17501)	
研究分担者	徳丸 治 (Tokumaru Osamu) (40360151)	大分大学・福祉健康科学部・教授  (17501)	
研究分担者	松本 重清 (Matsumoto Shigekiyo) (90274761)	大分大学・医学部・准教授  (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------