

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
研究期間： 2006 年 ~ 2008 年  
課題番号： 18791100  
研究課題名 (和文) 血管収縮に及ぼす局所麻酔薬の構造特異性とタンパクリン酸化酵素の発現

研究課題名 (英文) Effect of structural specificity of local anesthetics on vasoconstriction and protein phosphorylation

研究代表者 栗山 俊之 ( KURIYAMA TOSHIYUKI )  
公立大学法人 和歌山県立医科大学 医学部 助教

研究者番号： 10405467

### 研究成果の概要：

局所麻酔薬の構造特異性に着目して、局所麻酔薬が血管平滑筋に及ぼす張力変化・細胞内カルシウム濃度・タンパクリン酸化酵素のリン酸化について検討した。本研究で、S-enantiomer であるロピバカインに注目して検討をおこなった。その結果、光学異性体をもたないリドカインは血管平滑筋に対して張力変化や細胞内カルシウム濃度変化を引き起こさないが、ロピバカインには強い血管収縮作用と細胞内カルシウム濃度上昇・タンパクリン酸化酵素の活性化がみとめられた。

### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,000,000	0	1,000,000
平成 19 年度	900,000	0	900,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード： 血管平滑筋 局所麻酔薬 タンパクリン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年開発され臨床使用可能になった ropivacaine は、以前より使用されてきた bupivacaine と同じく、長時間作用性のアミド型局所麻酔薬である。局所麻酔薬の作用時間は、麻酔薬の神経細胞のイオンチャンネル部に対するタンパク結合性と血管収縮性が大きく関与している。当教室の Hatano らは、ラット摘出血管を用い、局所麻酔薬の血管作用について研究を行い、ropivacaine は、強い血管収縮作用を有するが、lidocaine は血管収縮作用を示さず、むしろ血管拡張作用を有していることが明らかにした。

(2) 血管平滑筋の収縮は主として細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) により調節されている。しかし最近、Protein Kinase-C (PKC)、Rho kinase、Tyrosine kinase、p44/42 mitogen-activated protein kinase (p42/44 MAPK) などのタンパクリン酸化酵素は収縮タンパクの  $Ca^{2+}$  感受性を亢進させ、 $[Ca^{2+}]_i$  とは別の平滑筋収縮機構として働いていることが明らかになってきた。以前、我々はカルシウム蛍光色素である Fura2/AM を indicator として、ropivacaine 投与時の静止張力と  $[Ca^{2+}]_i$  変化の同時測定を行い検討した。その結果、ropivacaine による平滑筋収縮時には  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を認めたが、PKC 阻害薬である Bisindolylmandelamide I (BIS I) の存在下では、ropivacaine によって  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は全く抑制されなかったが、収縮反応は完全に抑制されたということを経験した (Anesthesiology 2004; 101: A651)。このことは、ropivacaine の血管収縮には  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇とともに、収縮タンパクの  $Ca^{2+}$  感受性亢進も関与している可能性を強く示唆するものである。

(3) 局所麻酔薬の中で ropivacaine には、血管収縮作用があると報告されている。このことは臨床において、lidocaine はエピネフリン添加により作用時間が延長するのに対し、ropivacaine はエピネフリン添加による作用の延長は見られず、ropivacaine の作用時間の延長には ropivacaine 自身の血管収縮性が寄与していることを示すもの

である。しかし現在のところ、血管収縮作用のメカニズムまで言及した報告はない。また、R(+)-体の局所麻酔薬は S(-)体に比べ心筋・神経毒性が強いことはよく知られているが、血管平滑筋の収縮性の違いに関するメカニズムは不明である。

(4) 局所麻酔薬の本来の作用は  $Na^+$  チャンネル阻害作用であるが、血管平滑筋収縮に関して特定の受容体に作用する薬剤ではない。Agonist 収縮薬でない局所麻酔薬の血管収縮作用を、局所麻酔薬の光学異性体を用いて、麻酔薬の物理化学的特性という観点から明らかにしようとする事に本研究の獨創性がある。

(5) 本研究は、血管平滑筋収縮作用を  $[Ca^{2+}]_i$  の変化のみならず、細胞内収縮機構の最終過程である  $Ca^{2+}$  感受性調節タンパクであるタンパクリン酸化酵素の発現に帰するところに特色がある。また、Western blot 法を用い、その PKC、Tyrosine kinase、Rho kinase、p42/44 MAPK とそのアイソザイム発現を直接測定し同定することにより明らかにしていく。予備実験の結果から、局所麻酔薬の血管収縮作用に  $Ca^{2+}$  感受性調節タンパクであるタンパクリン酸化酵素が関与しているということが、本研究により明らかになることは疑う余地はない。しかし、すべての局所麻酔薬が全く同様の作用を有するとは考えにくく、Western blot 法により種々のタンパクリン酸化酵素の subtype の発現を定量的に測定することによって麻酔薬の物理化学的特性による差異を解明できる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット摘出血管を用い、

(1) 局所麻酔薬の血管平滑筋収縮作用を比較し、その血管収縮性には S(-)の光学異性体に特有なものであるということと、

(2) 局所麻酔薬の血管収縮のメカニズムが、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇だけでなく収縮タンパクの感

受性亢進によるものであるという仮説を、細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 測定および、Western blot を用いた PKC、Tyrosine kinase、Rho kinase、p42/44 MAPK のタンパクリン酸化酵素の発現を定量的に検討することによって解明することである。

### 3. 研究の方法

(1) ハロセン麻酔下に、Wistar rat の胸部大動脈を摘出し、柵状標本を作成した。これをカルシウム蛍光色素である Fura2/AM ( $10^{-6}M$ ) 溶液に室温で 5 時間暴露した。リンゲル液で残存した Fura2/AM を洗い出し、2 波長蛍光光度計 (CAF100) に内蔵されている organ bath (95% $O_2$ 、5% $CO_2$  で飽和した 37°C に維持されたリンゲル液で充填) 内に至適張力を負荷して懸垂した。血管標本の片方を固定し、他方は圧トランスデューサーに連結し、等尺性張力を測定した。

血管張力測定と同時に血管標本の 340 および 380nm の波長励起による 510nm の蛍光強度 (F<sub>340</sub> および F<sub>380</sub>) を記録し、F<sub>340</sub> と F<sub>380</sub> の比 (F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) を細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の指標とした。

局所麻酔薬 (ropivacaine, bupivacaine および lidocaine) を累積的に投与し、血管張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を同時測定した。なお、bupivacaine においては、ラセミ体を使用した。

(2) タンパクリン酸化酵素 (PKC、Tyrosine kinase、Rho kinase および p44/42 MAPK) の阻害薬 (BIS I、genistein、Y-27632 および PD098059) 存在下で局所麻酔薬を累積的に投与し、血管張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を同時測定した。タンパクリン酸化酵素阻害薬の存在下で、局所麻酔薬による張力変化と  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を検討し、局所麻酔薬の血管平滑筋収縮作用におけるタンパクリン酸化酵素の役割を検討した。

(3) ropivacaine に暴露したラット胸部大動脈をホモジナイズし、タンパク成分を分離、抽出した。細胞質成分と膜成分のそれぞれのタンパク質をゲル泳動により分離し、それをメンブレンに移し、メンブレン上で PKC、Tyrosine kinase、Rho kinase および p42/44 MAPK に対する抗体と反応させ、免疫抗体法にてそれぞれの発現を検討した (Western blot 法)。

### 4. 研究成果

(1) ropivacaine  $10^{-5}M$  から  $10^{-3}M$  までの用量作用曲線を求めた。ロピバカインは  $10^{-4}M$  まで濃度依存性に、血管収縮と  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を引き起こした。  $10^{-4}M$  より高い濃度では血管収縮反応および  $[Ca^{2+}]_i$  変化は減弱していく傾向にあった。

ラセミ体の bupivacaine は ropivacaine と同様の反応を示したが、ropivacaine に比べ収縮反応・ $[Ca^{2+}]_i$  変化も小さかった。 lidocaine は、収縮反応・ $[Ca^{2+}]_i$  変化とも認められなかった。

(2) タンパクリン酸化酵素 (PKC) の阻害薬 (BIS I と GO6976) 存在下でロピバカインを累積的に投与し、血管張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を同時測定した。タンパクリン酸化酵素 (BIS I と GO6976) の存在下では、ropivacaine による血管平滑筋収縮反応が著明に抑制された。しかしながら、BIS I (GO6976 では検討できなかった) 非存在下ではロピバカインによる  $[Ca^{2+}]_i$  上昇はあまり影響を受けなかった。

(3) ropivacaine は  $3 \times 10^{-4}M$  をピークに濃度依存性に PKC、Tyrosine kinase、Rho kinase および p42/44 MAPK をリン酸化させた。

局所麻酔薬がノルエピネフリンなどの血管収縮物質の作用を減弱させること、およびカリウムチャンネルを介する血管弛緩を抑制すること報告はあった。しかし、局所麻酔薬の血管平滑筋収縮メカニズムについてほとんど知られていなかった。さらに、局所麻酔薬の血管平滑筋収縮機序を、タンパクリン酸化酵素を介して収縮タンパクの  $Ca^{2+}$  感受性の変化に求める研究は他に類をみないものであった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Tokenaga Y, Ogawa K, Yu J, Kuriyama T, Minonishi T, Hatano Y. Mechanism of the ropivacaine-induced increase in

intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in rat  
aortic smooth muscle. Acta Anaesthesiol  
Scand 2007; 51: 1155-60

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗山 俊之 (KURIYAMA TOSHIYUKI)  
公立大学法人 和歌山県立医科大学  
医学部 助教  
研究者番号 : 10405467