

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09329

研究課題名(和文) Remifentanilの抗酸化作用：フリーラジカルの直接的消去活性はあるか？

研究課題名(英文) Antioxidative activity of remifentanil: Does remifentanil directly scavenge free radicals?

研究代表者

徳丸 治 (Tokumaru, Osamu)

大分大学・福祉健康科学部・教授

研究者番号：40360151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、レミフェンタニルが脳を含む器官・組織への酸化ストレスに対する抗酸化作用を示すことが報告されている。本課題は抗酸化作用の機序のうち、直接的なフリーラジカル消去活性の評価を目的として実施した。試験管内で9種類のフリーラジカルを発生させ、レミフェンタニルの添加によるその消去を、電子スピン共鳴法により定量した。レミフェンタニルは、ヒドロキシルラジカルを含む複数種のフリーラジカルを濃度依存的に消去した。レミフェンタニルの抗酸化作用の機序の一つとして、濃度依存的な直接的フリーラジカル消去活性の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた日本では、術後認知機能障害(POCD)のリスクを抱えた高齢者の手術症例の増加が予想される。POCDは酸化ストレスが原因とされているが、近年の研究でその予防にレミフェンタニルが有効である可能性が示唆されている。本課題はレミフェンタニルの抗酸化作用の機序の一つが、レミフェンタニルがフリーラジカルを直接消去する作用であることを明らかにした。高齢者の全身麻酔でのレミフェンタニルの使用が、POCDの予防に対して有効であることを裏付ける知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Remifentanil is an ultra-short acting opioid used for general anesthesia. Recently, it is reported that remifentanil has anti-oxidative activity, and is preventive against oxidative stress including ischemia/reperfusion injury and inflammation. However, the mechanism of antioxidative activity is not fully understood. The aim of the present study was to investigate direct free radical scavenging activity of remifentanil as an antioxidant. Scavenging activity against nine kinds of free radicals were investigated. Free radicals were observed using electron spin resonance spectrometry. Remifentanil significantly scavenged five kinds of free radicals out of nine in dose-dependent manners, including hydroxyl radical that is one of the most harmful radicals in living body. These results indicate that the mechanisms of antioxidative activity of remifentanil include direct dose-dependent free radical scavenging activity with selectivity.

研究分野：生理学，スピン共鳴解析学

キーワード：レミフェンタニル 抗酸化作用 フリーラジカル ラジカル消去作用 電子スピン共鳴法

1. 研究開始当初の背景

我が国は高齢化率が 27.3%に達し(2016年)、超高齢社会を迎えた。このような中で全身麻酔時に低酸素血症に対する耐性が低いとされる高齢者の手術症例の増加が予想され、術中・術後における低酸素血症や脳虚血、術後認知機能障害(POCD)に対する予防法や治療法の開発が健康寿命を伸ばす観点から極めて重要である。虚血再灌流負荷による脳障害においては、酸素の供給停止に伴うエネルギー基質の枯渇とそれに伴う脳機能の停止に加えて、フリーラジカルの発生とその下流で誘導される炎症反応による組織の破壊が、病態に多大な影響を与えるといわれている。

近年の基礎研究によって、Remifentanil が脳を含むさまざまな器官・組織への酸化ストレスに対する抗酸化作用を示すことが報告され、注目を集めている。特に、周期期の低酸素血症による POCD は神経炎症と酸化ストレスにより発症するとされることから、その予防に Remifentanil が有効である可能性が強く示唆される。しかし、Remifentanil の抗酸化作用の機序の詳細は、未だ不明である。オートファジーを介するとの報告があるが、フリーラジカルをその連鎖反応の上流で直接的に消去するのか、それとも下流において抗炎症作用を有するのか、未だ詳細は解明されていない。我々は Remifentanil の抗酸化作用について検討するに当たり、最も上流にあたるフリーラジカルの直接的消去活性から明らかにしていく必要があると考えている。

2. 研究の目的

本課題は、Remifentanil の抗酸化作用の機序への直接的フリーラジカル消去活性の寄与を明らかにすることを目的に実施した。

3. 研究の方法

9種類のフリーラジカルをディスプレイセル内で一定量発生させた。フリーラジカルを直接測定できる唯一の手法である電子スピン共鳴法(ESR)によりフリーラジカルを同定・定量した(スピントラップ法)。Remifentanil の濃度を変えてフリーラジカルを測定し、濃度-反応曲線を作成した。この曲線より導き出した 50%阻害濃度(IC₅₀)とスピントラップ剤の濃度から、Remifentanil と各フリーラジカルとの反応速度定数を推定し、これをそのフリーラジカルに対する消去活性の指標とした。

評価したフリーラジカルは以下の9種類である; hydroxyl radical, superoxide anion, *tert*-butyl peroxy radical (*t*-BOO), *tert*-butoxy radical (*t*-BO), ascorbyl free radical (AFR), singlet oxygen, nitric oxide (NO), DPPH, tyrosyl radical。また、脂質に対する抗酸化活性を TBARS アッセイにより評価した。

4. 研究成果

各フリーラジカルのスペクトルと Remifentanil 添加時の ESR スペクトルの相対強度を図 1 に、各フリーラジカルに対する IC₅₀ と反応速度定数を表に示す。Remifentanil は、濃度依存的に hydroxyl radical, *t*-BO, AFR, singlet oxygen, NO の 5 種類のフリーラジカルを消去した。(図 1 A, D, E, F, G)。しかし、superoxide anion, *t*-BOO, DPPH, tyrosyl radical の 4 種類のフリーラジカルに対しては、直接的な消去活性を示さなかった(図 1 B, C, H, I)。また、ホモジネートしたマウス脳組織に過酸化水素を添加して起始した脂質の過酸化に対して、Remifentanil は有意な抑制作用を示した(図 2)。

本課題の結果は、Remifentanil が複数種類のフリーラジカルに対して選択的に直接的消去活性を有することを示した。また、TBARS アッセイの結果より、ラット脳組織の脂質過酸化に対して抗酸化作用を有することが示された。酸化ストレスのカスケード反応において、Remifentanil は細胞傷害性の高い hydroxyl radical を直接消去する作用を示した。この消去作用により、これより下流で生じるフリーラジカルの産生やそれによる生ずる細胞や組織への傷害の抑制に寄与していることが示唆される。しかし、虚血-再灌流傷害において最も上流で発生するとされる superoxide anion に対する消去作用は確認できなかった。

また、Remifentanil は脂質アルコキシルラジカルのモデルである *t*-BO は直接消去したが、脂質ペルオキシルラジカルのモデルである *t*-BOO は消去しなかった。TBARS アッセイで示された脂質の過酸化を抑制する機序として、連鎖的脂質過酸化反応のうち脂質ペルオキシルラジカルの産生は抑制しないものの、脂質アルコキシルラジカルの産生を抑制することにより抗酸化作用を示すことが示唆された。

超高齢社会を迎えて増加する高齢者の手術症例において、Remifentanil は酸化ストレスが原因といわれている POCD に対する予防効果があると期待されている。Remifentanil の抗酸化作用

の詳細が未だ十分に解明されていない中で、本課題がその直接的フリーラジカル消去活性を明らかにしたことは、Remifentanil による POCD 予防の機序の一端の理解に寄与するものである。

<引用文献>

1. Yoon JY, Kim DW, Kim EJ, et al. Protective effects of remifentanil against H₂O₂-induced oxidative stress in human osteoblasts. *J Dent Anesth Pain Med.* 2016;16(4):263-271.
2. Kwon JY, Park BS, Kim YH, et al. Remifentanil protects human keratinocytes against hypoxia-reoxygenation injury through activation of autophagy. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116982.
3. Tokumaru O, Shuto Y, Ogata K, Kamibayashi M, Bacal K, Takei H, Yokoi I, Kitano T. Dose-dependency of multiple free radical-scavenging activity of edaravone. *J Surg Res.* 2018;228:147-153.
4. Umeda R, Takanari H, Ogata K, Matsumoto S, Kitano T, Ono K, Tokumaru O. Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors. *J Clin Biochem Nutr.* 2019;64(1):20-26.
5. Matsumoto S, Tokumaru O, Ogata K, Kuribayashi Y, Oyama Y, Shingu C, Yokoi I, Kitano T. Dose-dependent scavenging activity of the ultra-short-acting β 1-blocker landiolol against specific free radicals. *J Clin Biochem Nutr.* 2022;71(3):185-190.
6. Sato Y, Matsumoto S, Ogata K, Bacal K, Nakatake M, Kitano T, Tokumaru O. The dose-response relationships of the direct scavenging activity of amide-based local anesthetics against multiple free radicals. *J Clin Biochem Nutr.* (in press) <https://doi.org/10.3164/jcfn.22-131>.

表 Remifentanil のフリーラジカルに対する IC₅₀ と反応速度定数

free radicals	IC ₅₀ (mM)	Reaction rate constant (M ⁻¹ s ⁻¹)
hydroxyl radical	8.9×10^{-2}	1.9×10^{11}
superoxide anion	—	—
<i>tert</i> -butyl peroxy radical	—	—
<i>tert</i> -butoxyl radical	3.1	$1.2 k_{\text{CYPMPO}}$
ascorbyl free radical	3.6×10^{-1}	$4.7 \times 10^{-1} k_{\text{EDV}}$
singlet oxygen	1.3×10^{-1}	$1.3 \times 10 k_{\text{OH-TEMP}}$
nitric oxide	1.4×10	1.0×10
DPPH	—	—
tyrosyl radical	—	—

k_{CYPMPO} : reaction rate constant of CYPMPO with *tert*-butoxyl radical

k_{EDV} : reaction rate constant of edaravone with ascorbyl free radical

$k_{\text{OH-TEMP}}$: reaction rate constant of OH-TEMP with singlet oxygen

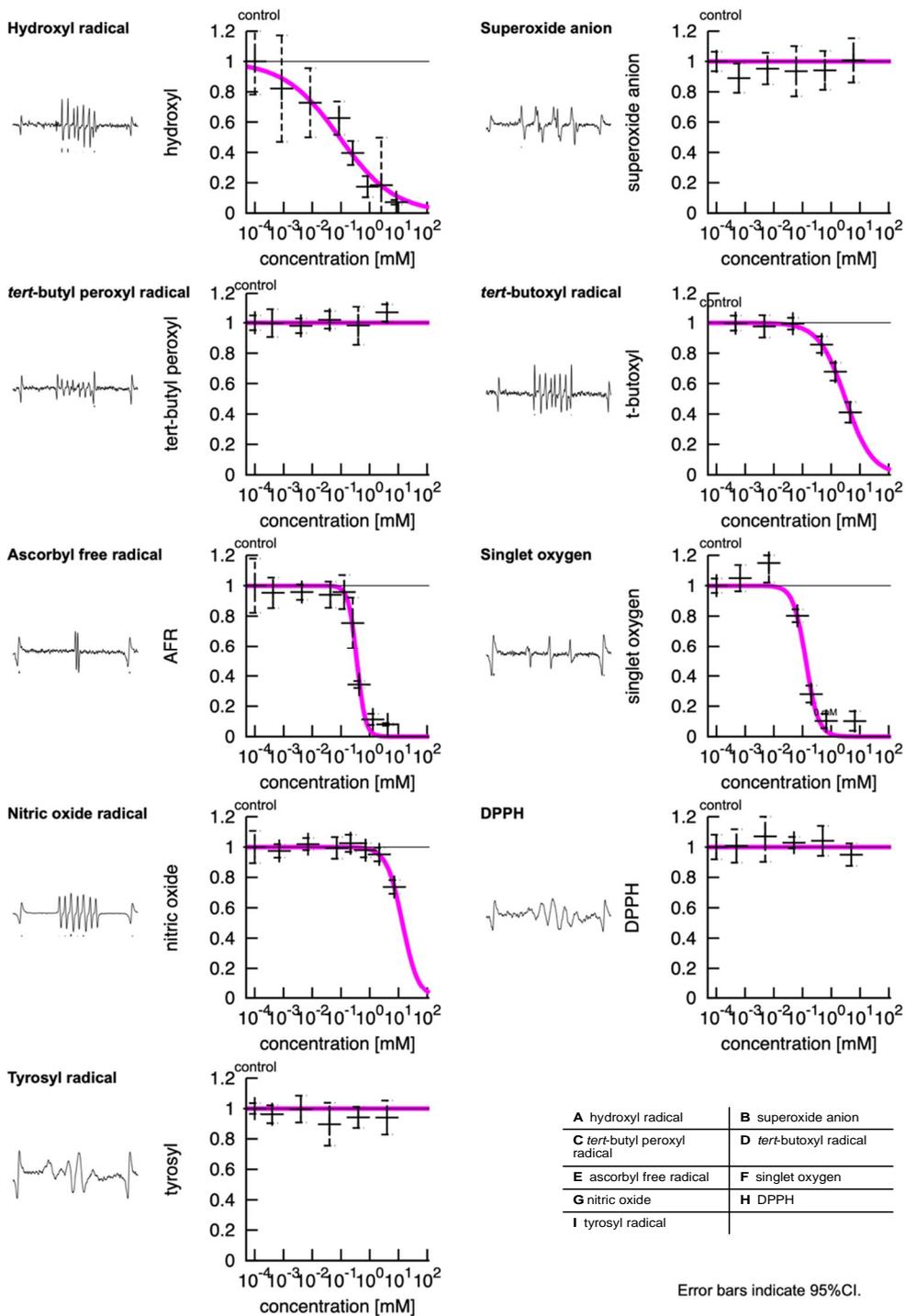


図1 9種類のフリーラジカルのESRスペクトルとRemifentanilの濃度-反応曲線

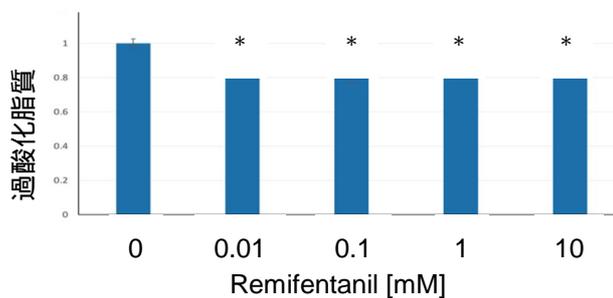


図2 Remifentanilによる脂質過酸化の抑制 (* $p < 0.05$)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Shigekiyo, Tokumaru Osamu, Ogata Kazue, Kuribayashi Yoshihide, Oyama Yoshimasa, Shingu Chihiro, Yokoi Isao, Kitano Takaaki	4. 巻 71
2. 論文標題 Dose-dependent scavenging activity of the ultra-short-acting 1-blocker landiolol against specific free radicals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 185 ~ 190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcfn.21-157	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tokumaru O, Yamasaki L, Ogata K, Matsumoto S, Kitano T.
2. 発表標題 Antioxidative activity of remifentanil as a direct free radical scavenger
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tokumaru O, Ozaki Y, Kawano T, Ogata K, Eshima N, Matsumoto S, Kitano T
2. 発表標題 Antioxidative activity of ketamine as a direct radical scavenger
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ogata K, Ono K, Tokumaru O.
2. 発表標題 Antioxidative activity of fructose 1,6-bisphosphate as a direct free radical scavenger
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogata K, 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

〔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	北野 敬明 (Kitano Takaaki) (20211196)	大分大学・医学部・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)	
研究分担者	江島 伸興 (Eshima Nobuoki) (20203630)	京都大学・高大接続・入試センター・特定教授 (14301)	

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
---------	---------