

機関番号： 33703
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20592381
 研究課題名（和文） 麻酔薬の機序的膜作用の再検証：生体膜ラフトならびに特異的膜脂質との相互作用
 研究課題名（英文） Reverification of the mechanistic membrane effects of anesthetics: Interactions with biomembrane rafts and specific membrane lipids
 研究代表者
 土屋 博紀 (TSUCHIYA HIRONORI)
 朝日大学・歯学部・教授
 研究者番号： 30131113

研究成果の概要（和文）： 麻酔薬の有用・有害作用に関し、受容体やチャネルと特異的に結合するという従来の機序から離れて最新の生体膜理論に立脚した新しい視点から、生体膜との機序的相互作用を再検証した。少なくともラフトモデル膜を用いた解析では、麻酔薬が選択的に作用する場として脂質ラフトが関与する可能性は低かった。しかし、麻酔薬は特異な脂質：コレステロールやアニオン性リン脂質から構成される生体膜と構造依存的に相互作用し、その作用強度は立体異性体間ですら識別し得た。これらの結果は、麻酔薬の機序としての生体膜相互作用を支持する。

研究成果の概要（英文）： Apart from the conventional mechanism in which anesthetics specifically bind to receptors and channels, we reverified the mechanistic hypothesis that anesthetics may interact with biomembranes to exert clinically useful and adverse effects based on the latest structural and functional theory about biomembranes. The relevance of membrane lipid rafts to anesthetics was questionable at least in their effects on raft-like model membranes. However, anesthetics structure-dependently interacted with biomimetic membranes consisting of specific lipids (cholesterol and anionic phospholipids) and their interacting potencies were discriminated even between stereoisomers. These results support the membrane interaction of anesthetics as the mode of action.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・外科系歯学

キーワード： 麻酔薬、作用機序、生体膜、相互作用、ラフト、膜脂質、膜流動性、心毒性

1. 研究開始当初の背景

(1) その発見から1世紀以上が経過し現在

最も臨床応用されている薬物の一つにもかかわらず、麻酔薬の詳細な作用機序は未だ解

明されていない。近年、作用点とされる受容体あるいはイオンチャネルに対して薬物が特異的に結合し、薬理作用を示すとする機序が主流となっている。しかし、機能性タンパクとの相互作用だけでは麻酔効果や有害効果を必ずしも説明できず、多くの矛盾や疑問も残っていた。一方、Meyer-Overton 理論から発展した膜脂質との相互作用説も、麻酔薬立体異性体の構造選択的作用や臨床濃度での膜作用に課題が生じ、その支持を失いつつあった。

(2) 麻酔薬の作用点とも想定される生体膜の構造や機能に関し、1990年代後半から大変革が起こった。すなわち、生体膜にはマイクロドメインが存在し、コレステロールやスフィンゴ脂質といった特異な脂質が濃縮されて脂質ラフトを形成する。そして、この生体膜ラフトに受容体やイオンチャネルが局在し、これら機能性タンパクの活性がラフトの性状によっても制御されることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

(1) 生体膜に関する最新の考え方『特異な脂質が濃縮・局在してマイクロドメインを形成し、この脂質ラフトが薬物の作用に影響し得る。』に基づき、麻酔薬と生体膜脂質の機序的相互作用を再検証する。そして、有用な麻酔効果や、心毒性といった有害作用発現の科学的背景を理解する手掛かりを得ることを目的とする。

(2) 研究目的を達成するため、ラフトモデル膜、神経細胞・心筋細胞モデル膜を用いた、麻酔薬の膜相互作用を解析できる実験系を確立する。そして、機序的膜作用理論を検証するとともに、実験的方法論を応用・発展させて、これまで説明できなかった麻酔薬の作用変化、新規の潜在的有用作用、麻酔関連薬物の作用機序の解明も目指す。

3. 研究の方法

(1) 種々のリン脂質やコレステロールの脂質標品を用い、モデル膜リポソーム試料を調製した。ラフト組成、神経細胞膜組成、心筋細胞膜組成に準じて各脂質のモル比を調節した。

(2) 各モデル膜ならびに特異的脂質組成のリポソーム膜に、臨床濃度や麻酔下組織中濃

度で種々の局所麻酔薬、全身麻酔薬、その他関連薬物を 37°C で処理した。一定時間の反応後に蛍光偏光を測定し、膜流動性変化を指標にして麻酔薬と生体膜の相互作用を定量的に解析した。

(3) 反応 pH、反応時間、反応温度等の条件を変えて膜相互作用を解析し、麻酔薬の作用機序を考察した。

(4) 膜相互作用解析法を広く応用し、麻酔薬が潜在的に有する有用活性：抗酸化作用、麻酔薬と薬物相互作用を起こし得る物質： β -カルボリンの薬理学的特性、周術期薬物： β -遮断薬の作用機序についても合わせて検討した。

4. 研究成果

(1) 生体膜ラフトとの相互作用

① コレステロールとスフィンゴ脂質の組成を調整することにより、マイクロドメインを想定した数種のラフトモデル膜の調製に成功した。

② これらのラフトモデル膜ならびにカルジオリピンを含む心筋細胞モデル膜に、リドカイン、ブピバカイン、ロピバカイン、プリロカインを作用させた。局所麻酔薬が惹起する膜流動性変化を測定した結果、麻酔薬が脂質ラフトと選択的に相互作用する可能性は低いことが示唆された。生体膜ラフトと麻酔薬の関係に、新知見を加えるものである。

③ 研究成果公表

• Journal of Anesthesia, Vol. 24, pp. 639-642, 2010.

(2) 麻酔作用機序と特異的膜脂質の関与

① リドカインの四級アンモニウム誘導体 QX-314 はイオン型として存在するにもかかわらず、リドカインと同様に、生理的 pH 条件下でホスファチジルセリンやカルジオリピンを含むリポソーム膜に作用して膜流動性を高めた。従来の膜作用機序の課題であるイオン化薬物分子の膜不活性説に対し、イオン型局所麻酔薬もアニオン性リン脂質を組成とする生体膜と相互作用し得ることが明らかになった。

② ブピバカイン立体異性体 ($R(+)$ -、 rac -、 $S(-)$ -体) ならびにロピバカイン立体異性体 ($R(+)$ -、 $S(-)$ -体) は、コレステロールを含むモデル膜と立体構造選択的に相互作用して膜流動化を惹起した。また、この膜作用強度は、相対的な麻酔効果と一致した。しかし、

コレステロールが存在しないと、モデル膜との相互作用は立体選択性を示さなかった。立体異性体間における麻酔活性の相違は、生体膜コレステロールとの相互作用に基づく構造選択的な膜流動性修飾と、機序的に関係する可能性を示すものである。

③ 研究成果公表

- Local and Regional Anesthesia, Vol. 1, pp. 1–9, 2008.
- Regional Anesthesia and Pain Medicine, Vol. 33, pp. 304–311, 2008.
- Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, Vol. 128 (Suppl. 2), pp. 33–34, 2008.
- 薬物の相互作用シンポジウム, 2008年8月7日, 札幌.

(3) 病態と麻酔効果の変化

① 炎症組織では局所麻酔薬が一般に効きにくいのが、この現象の薬理的・病理学的背景に関し、生体膜相互作用の視点から検証した。pH 6.4 のような酸性条件下でも、リドカイン、プリロカイン、ブピバカインはアニオン性リン脂質を含む神経細胞モデル膜に作用して膜流動性を高めた。麻酔効果減弱に関する従来の組織 acidosis 説を実験的に初めて解析してそれを否定するとともに、代替機序の存在を示唆した。

② 炎症組織に相当すると考えられる濃度の peroxynitrite を、リドカイン、プリロカイン、ブピバカインに、あるいは神経細胞モデル膜に前もって作用させた結果、局所麻酔薬の膜相互作用が著しく抑制された。炎症に伴う麻酔効果減弱に関する従来の組織 acidosis 説に代わり、新規機序仮説として炎症性 peroxynitrite との相互作用を提唱するものである。

③ 研究成果公表

- Journal of Inflammation Research, Vol. 1, pp. 41–48, 2008.
- Journal of Anesthesia, Vol. 22, pp. 96–99, 2008.
- Journal of Anesthesia, Vol. 22, pp. 475–478, 2008.
- 12th International Dental Congress on Modern Pain Control, 2009年10月17日, Gold Coast.

(4) 心毒性と特定膜脂質との相互作用

① 局所麻酔薬の構造に依存した心毒性の薬理的機序に関し、生体膜相互作用の視点から検討した。種々のリン脂質の組成を変えた心筋細胞モデル膜に、ブピバカイン、ロピバカイン、リドカイン、プリロカインを作

用させた。各麻酔薬が惹起する膜流動性変化を比較した結果、膜作用強度はブピバカイン > ロピバカイン > リドカイン > プリロカインであった。

② 膜相互作用の相違は、心筋細胞モデル膜中のアニオン性リン脂質、特にカルジオリピンの組成比を高めるとより著しくなった。また、膜作用強度は、局所麻酔薬の心毒性強度と相関した。カルジオリピンは特に心筋細胞ミトコンドリア膜に局在することから、局所麻酔薬の心毒性発現とその強度の決定に、カルジオリピンに依存した膜相互作用が機序的に関与する可能性が考えられる。

③ 研究成果公表

- Chemico-Biological Interactions, Vol. 183, pp. 19–24, 2010.
- Hong Kong Academy of Medicine 15th Anniversary Congress, 2008年11月15日, Hong Kong.
- 42nd IUPAC Congress, 2009年8月4日, Glasgow.
- 日本麻酔科学会第56回学術集会, 2009年8月16日, 神戸.

(5) 薬物立体構造に依存した膜相互作用

① 立体構造に選択的な局所麻酔薬の心毒性の薬理的機序に関し、生体膜相互作用の視点から検討した。臨床濃度の *S*(-)-、*R*(+)-、*rac*-ブピバカインならびに *S*(-)-、*R*(+)-ロピバカインを心筋細胞モデル膜に作用させ、膜流動性変化に基づいて立体異性体間の膜相互作用を比較した。

② カルジオリピンをはじめ全ての膜リン脂質は、立体異性体を識別できなかった。しかし、キラリティーの高いコレステロールを心筋細胞相当の組成比で含む膜では、局所麻酔薬が立体構造に選択的に膜流動化を惹起した。このような膜作用は、心毒性発現濃度 (~5 μM) でも確認された。また、膜作用強度は、局所麻酔薬エナンチオマー間で異なる心毒性強度と相関した。麻酔薬の立体選択的心毒性に、コレステロールが関与する生体膜相互作用という新規薬理的機序を提唱するものである。

③ 研究成果公表

- Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011 (*in press*, doi: 10.1016/j.bmc.2011.04.030).
- 42nd IUPAC Congress, 2009年8月4日, Glasgow.
- NYSORA World Anesthesia Congress, 2010年3月7日, Dubai.
- 日本麻酔科学会第57回学術集会, 2010年6月3日, 福岡.

- 21st International Symposium on Medicinal Chemistry, 2010年9月6日, Brussels.

(6) 膜相互作用が関与する全身・局所麻酔薬の抗酸化作用

① 開発した膜相互作用解析法の応用として、全身・局所麻酔薬の膜活性と抗酸化活性を定量的に比較するとともに、構造-活性相関を解析した。その結果、膜流動化作用と関連して抗酸化作用が認められ、構造-活性相関に基づき、最も強い抗酸化活性を示す麻酔薬としてプロポフォールを同定した。既知の作用に加えて、膜相互作用に由来する有用作用を麻酔薬が潜在的に有することを示唆するものである。

- ② 研究成果公表
- Analytical Sciences, Vol. 24, pp. 1557–1562, 2008.
 - European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 39, pp. 97–102, 2010.
 - 3rd World Congress of Total Intravenous Anaesthesia & Target Controlled Infusion, 2011年4月2日, Singapore.

(7) 膜作用性β-カルボリン

① 基礎的研究で確立した実験方法を、神経活性アルカロイドに応用した。その結果、麻酔薬と薬物相互作用を起こす可能性をもつβ-カルボリンに、膜作用とそれに基づく抗血小板作用（血小板凝集抑制効果）を見出した。

- ② 研究成果公表
- Pharmacological Reports, Vol. 62, pp. 689–695, 2010.

(8) β-遮断薬

① 膜相互作用解析法を、周術期に用いるβ₁遮断薬に応用した。その結果、膜作用強度の相違に基づいて選択的/非選択的β₁遮断薬を識別する、新規分類法が確立できる可能性を得た。

- ② 研究成果公表
- European Journal of Anaesthesiology, Vol. 27, pp. 829–834, 2010.
 - 日本麻酔科学会東海・北陸支部第8回 学術集会, 2010年9月4日, 福井.

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 13 件)

- ① Hironori Tsuchiya, Takahiro Ueno, Maki Mizogami, “Stereostructure-based differences in the interactions of cardiotoxic local anesthetics with cholesterol-containing biomimetic membranes”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, 2011 (in press, doi: 10.1016/j.bmc.2011.04.030).
- ② Hironori Tsuchiya, Shuichi Ohmoto, “Comparative effects of β-carbolines on platelet aggregation and lipid membranes”, *Pharmacological Reports*, 査読有, Vol. 62, pp. 689–695, 2010.
- ③ Hironori Tsuchiya・Takahiro Ueno・Maki Mizogami・Ko Takakura, “Do local anesthetics interact preferentially with membrane lipid rafts? Comparative interactivities with raft-like membranes”, *Journal of Anesthesia*, 査読有, Vol. 24, pp. 639–642, 2010.
- ④ Maki Mizogami, Ko Takakura and Hironori Tsuchiya, “The interactivities with lipid membranes differentially characterize selective and nonselective β₁-blockers”, *European Journal of Anaesthesiology*, 査読有, Vol. 27, pp. 829–834, 2010.
- ⑤ Hironori Tsuchiya, Takahiro Ueno, Toshiyuki Tanaka, Nobuyasu Matsuura, Maki Mizogami, “Comparative study on determination of antioxidant and membrane activities of propofol and its related compounds”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, Vol. 39, pp. 97–102, 2010.
- ⑥ Hironori Tsuchiya, Takahiro Ueno, Maki Mizogami, Ko Takakura, “Local anesthetics structure-dependently interact with anionic phospholipid membranes to modify the fluidity”, *Chemico-Biological Interactions*, 査読有, Vol. 183, pp. 19–24, 2010.
- ⑦ Takahiro Ueno, Maki Mizogami, Ko Takakura and Hironori Tsuchiya, “Anesthetic and Cardiotoxic Effects in the Light of the Interactions of Local Anesthetics and Membrane Lipids”, *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 査読有, Vol. 128 (Suppl. 2), pp. 33–34, 2008.
- ⑧ Hironori TSUCHIYA, Takahiro UENO, Maki MIZOGAMI, and Ko TAKAKURA, “Antioxidant Activity Analysis by Liposomal Membrane System and Application to Anesthetics”, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 24, pp. 1557–1562, 2008.
- ⑨ TAKAHIRO UENO, MAKI MIZOGAMI,

KO TAKAKURA, and HIRONORI TSUCHIYA, “Peroxynitrite affects lidocaine by acting on membrane-constituting lipids”, *Journal of Anesthesia*, 査読有, Vol. 22, pp. 475–478, 2008.

- ⑩ TAKAHIRO UENO, MAKI MIZOGAMI, KO TAKAKURA, and HIRONORI TSUCHIYA, “Membrane effect of lidocaine is inhibited by interaction with peroxynitrite”, *Journal of Anesthesia*, 査読有, Vol. 22, pp. 96–99, 2008.
- ⑪ Takahiro Ueno, Hironori Tsuchiya, Maki Mizogami, Ko Takakura, “Local anesthetic failure associated with inflammation: verification of the acidosis mechanism and the hypothetic participation of inflammatory peroxynitrite”, *Journal of Inflammation Research*, 査読有, Vol. 1, pp. 41–48, 2008.
- ⑫ Maki Mizogami, Hironori Tsuchiya, Takahiro Ueno, Masanori Kashimata, and Ko Takakura, “Stereospecific Interaction of Bupivacaine Enantiomers with Lipid Membranes”, *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 査読有, Vol. 33, pp. 304–311, 2008.
- ⑬ Hironori Tsuchiya, Maki Mizogami, “Membrane interactivity of charged local anesthetic derivative and stereoselectivity in membrane interaction of local anesthetic enantiomers”, *Local and Regional Anesthesia*, 査読有, Vol. 1, pp. 1–9, 2008.

[学会発表] (計 10 件)

- ① H. Tsuchiya, T. Ueno, M. Mizogami, “POTENTIAL ANTIOXIDANT UTILITY OF PROPOFOL BEYOND ANESTHESIA ASSOCIATED WITH MEMBRANE INTERACTION: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP”, *3rd World Congress of Total Intravenous Anaesthesia & Target Controlled Infusion*, 2011年4月2日, Singapore.
- ② Hironori Tsuchiya, Takahiro Ueno, Maki Mizogami, Ko Takakura, “STEREO-STRUCTURE-MEMBRANE INTERACTIVITY RELATIONSHIP OF LOCAL ANAESTHETICS ASSOCIATED WITH THEIR STEREOSELECTIVE CARDIOTOXICITY”, *21st International Symposium on Medicinal Chemistry*, 2010年9月6日, Brussels.
- ③ 溝上真樹, 東康加, 家始聡介, 高倉康, 土屋博紀, “膜脂質との相互作用に基づく選択的/非選択的β₁遮断薬の識別”, *日本麻酔科学会東海・北陸支部第8回学術*

集会, 2010年9月4日, 福井.

- ④ 溝上真樹, 上野高広, 藤原茂樹, 高倉康, 土屋博紀, “局所麻酔薬の立体構造に選択的な心毒性の仮説的機序: プピバカインならびにロピバカインの立体異性体間で異なるコレステロール生体膜との相互作用”, *日本麻酔科学会第57回学術集会*, 2010年6月3日, 福岡.
- ⑤ Hironori Tsuchiya, Takahiro Ueno, “STRUCTURE-DEPENDENT MEMBRANE INTERACTION OF LOCAL ANESTHETICS: A MECHANISTIC CLUE FOR THEIR STRUCTURE-SELECTIVE CARDIOTOXICITY”, *NYSORA World Anesthesia Congress*, 2010年3月7日, Dubai.
- ⑥ Maki Mizogami, Takahiro Ueno, Ko Takakura, Hironori Tsuchiya, “Local anaesthesia affected by inflammation: the conventional mechanism based on tissue acidosis and the novel mechanism focused on inflammatory peroxynitrite”, *12th International Dental Congress on Modern Pain Control*, 2009年10月17日, Gold Coast.
- ⑦ 上野高広, 溝上真樹, 藤原茂樹, 高倉康, 土屋博紀, “局所麻酔薬の構造依存的心毒性に関するカルジオリピンに着目した機序的膜脂質相互作用”, *日本麻酔科学会第56回学術集会*, 2009年8月16日, 神戸.
- ⑧ Hironori Tsuchiya and Takahiro Ueno, “Membrane lipids as one of drug targets: Stereostructure-dependent membrane interactions of local anesthetics relevant to their cardiotoxicity”, *42nd IUPAC Congress*, 2009年8月4日, Glasgow.
- ⑨ Hironori Tsuchiya, “MECHANISTIC MEMBRANE-INTERACTION OF LOCAL ANAESTHETICS FOR THEIR STRUCTURE-DEPENDENT CARDIOTOXIC EFFECTS”, *Hong Kong Academy of Medicine 15th Anniversary Congress*, 2008年11月15日, Hong Kong.
- ⑩ 上野高広, 溝上真樹, 高倉康, 土屋博紀, “局所麻酔薬と膜脂質の相互作用からみた麻酔効果と心毒性”, *第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム*, 2008年8月7日, 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 博紀 (TSUCHIYA HIRONORI)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号: 30131113

(2) 研究分担者

溝上 真樹 (MIZOGAMI MAKI)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：10231614

(H20)