

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592977

研究課題名(和文) 新しい視点からの局所麻酔薬の薬理作用と有害作用の研究

研究課題名(英文) Study of pharmacological action and the adverse effect of the local anesthetic from a new viewpoint

研究代表者

福島 和昭 (FUKUSHIMA, KAZUAKI)

北海道大学・・・名誉教授

研究者番号：00002361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：局所麻酔薬は神経細胞のナトリウムチャネルを抑制することにより麻酔作用を生ずるとされているが、これのみで局所麻酔薬の作用や種々の有害作用をすべて説明することはできない。ラット脳には数種類のCa-及びMg-ATPaseが存在したが、本研究で、局所麻酔薬はアルカリ性で作用するCa-及びMg-ATPase活性を抑制した。また、作用の強い局所麻酔薬ほど強くNa,K-ATPase活性を抑制した。これらのATPaseは局所麻酔薬の作用に関連する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Local anesthetics are supposed to produce anesthetic action by inhibiting a neuronal sodium channel, but this inhibition cannot explain all the effects of the local anesthetic and various kinds of adverse effect. Several kinds of Ca- and Mg-ATPase were present in rat brain, but in this study, the local anesthetic inhibited Ca- Mg-ATPase activity that work in alkaline pH. Also, local anesthetic with strong anesthetic effects strongly inhibited Na,K-ATPase activity. These ATPases may be associated with effects of the local anesthetic.

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：局所麻酔薬 麻酔作用 有害作用 Ca-ATPase Mg-ATPase ラット脳 Na,K-ATPase

1. 研究開始当初の背景

局所麻酔薬の作用機構に関しては、ナトリウムチャンネル抑制説(Ragsdale, D.R. et al. Molecular determination of state-dependent block of Na channels by local anesthetics, Science, 265 : 1724-1728 (1994))で決定された感があり、最近では新たな研究はあまり見られない。しかし、局所麻酔薬の一般的な性質や種々の有害作用が、すべてナトリウムチャンネルに対する作用のみで説明できるわけではなく、新たな視点での研究が必要である。

2. 研究の目的

局所麻酔薬には、本来の麻酔作用以外にも有害な作用も含めて種々の作用があり、すべてをナトリウムチャンネルに対する作用だけで説明することは困難である。個々の作用に対するターゲットを明らかにすることができれば、より安全性の高い局所麻酔薬の開発に貢献できると考えられる。そこで、神経系の機能にかかわる酵素として、脳に存在する Na,K-ATPase, Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 活性に対する麻酔薬の作用を明らかにすること、生体膜のモデルとしてリポソームの物性に対する作用を検討し、新たな局所麻酔薬あるいは不整脈治療薬のデザインに応用可能なデータを得ることを目的に研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 脳の Ca-及び Mg-ATPase 活性に対する各種局所麻酔薬の作用

まず、ラット脳のミクロソーム及び形質膜分画から Ca-及び Mg-ATPase を部分精製し、各種阻害剤に対する応答性をもとに存在する ATPase 活性の性質を明らかにし、それらに対する麻酔薬の作用を検討する。

(2) Na,K-ATPase 活性に対する各種局所麻酔薬の作用

ラット及びウサギ脳から精製した Na,K-ATPase を用いて、Na,K-ATPase 活性及び部分反応であるパラニトロフェニルリン酸加水分解活性 (*p*-NPPase) に対する各種局所麻酔薬の作用の濃度依存性を測定し、各麻酔薬の構造と Na,K-ATPase および *p*-NPPase 活性抑制作用の強度の相関を明らかにする。

(3) リポソーム膜に対する各種局所麻酔薬の作用

スピンラベル剤である 5-DSA あるいは 16-DSA でラベルしたリポソームを作製する。

リポソーム中のスピンラベル剤の電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定し、スペクトルの線形の各計測値から、膜の中でのスピンラベル剤の配向や異方的回転を示すオーダーパラメータ (*S*) と回転運動の速さを示

す回転相関時間 () を計算する。スペクトルの線形と、これら *S* および の値から、膜の流動性等の物性を評価する。

各種局所麻酔薬存在下で、ESR の測定実験を行うことにより、生体膜のうち脂質部分に対する局所麻酔薬の作用を解析することができる。その結果をもとに、局所麻酔薬の細胞膜の安定性に対する作用と、麻酔薬の構造との関連について解析する。スピンラベル剤に加えて、Na,K-ATPase あるいはナトリウムチャンネルを組み込んだ、より生体膜に近いリポソームを作成して ESR スペクトルを測定する。局所麻酔薬の膜に対する作用が膜タンパク質の存在により変化するか否かを検討する。

リポソームをモデルに ESR スペクトルの測定により、各種麻酔薬の細胞内移行性を評価する。モデルリポソームは二重層膜なので、局所麻酔薬の作用が膜の外部側にとどまるか、内部にまで浸透しているかを判定することができる。

4. 研究成果

(1) ラット脳のコホモジェネートから調整した膜分画 (P) 及び、Pottorf の方法に従って調整した形質膜 (P) 及びミクロソーム (P) 分画の Ca で活性化される ATPase に対する propofol, pentobarbital と thiopental の作用を調べた。

P には Ca の濃度に依存して活性化される ATPase が存在し 1 mM 以上の Ca でほぼ飽和した (Ca-ATPase 活性)。P の Ca-ATPase 活性は propofol 濃度に依存して抑制され 50 % 阻害濃度 ($K_{i0.5}$) は 0.25 mM であった。Propofol 存在下で Ca-ATPase 活性の Ca 濃度依存性を調べると、存在する propofol 濃度に依存して最大活性と Ca に対する K_m は低下した。

P 及び P には、ウェスタンブロッティング及び酵素学的性質から Ca, Mg-ATPase である PMCA (plasma membrane Ca-ATPase) 及び SERCA (sarcoendoplasmic reticulum Ca-ATPase) の存在が明らかになった。P 及び P の Ca, Mg-ATPase 活性はいずれも類似した濃度依存性で propofol, pentobarbital と thiopental によって阻害され、その $K_{i0.5}$ はそれぞれ 0.35, 3 及び 1.5 mM であった。

本研究で調べた Ca-ATPase 及び Ca, Mg-ATPase 活性の propofol, pentobarbital と thiopental による活性阻害濃度は、同じ生体膜に存在する酵素である Na, K-ATPase 活性の阻害濃度と類似していた。以上の結果から、ラット脳に存在する Ca で活性化される ATPase 活性の静脈麻酔薬による阻害は特異的なものではなく、麻酔薬の生体膜に対する一般的な作用の結果として ATPase タンパク質が影響を受けた結果として抑制されたものと推測した。

P 及び P の中性 pH で検出される

Ca-ATPase 活性は procaine, lidocaine 及び tetracaine によって阻害されなかった。しかし、アルカリ性至適 pH で検出される P の Ca-ATPase 活性は procaine, lidocaine 及び tetracaine の濃度に依存して抑制され tetracaine による抑制が最も強かった。これらの理由については現在さらに検討中である。

(2) ラット全脳から, Pottorf の方法に従って, 形質膜(PII)とミクロソーム(PIII)分画を得た。Mg-ATPase 活性の至適 pH は PII が約 9.4, PIII は約 7.4 であった。

PII の Mg-ATPase 活性は F 型 ATPase の阻害剤である NaN_3 によって約 80%抑制され, PIII の Mg-ATPase 活性は P 型 ATPase 及び V 型 ATPase の阻害剤である Na_2VO_4 及び Bafilomycin A1 によってそれぞれ約 10%及び 30%抑制された。ウエスタンブロッティングの結果からも, F 型 ATPase は PII に, V 型 ATPase は PIII に最も多く検出された。上記阻害剤で抑制されない Mg-ATPase 活性を Basal Mg-ATPase とし, 各阻害剤の存在下で各 ATPase を分別して静脈麻酔薬の影響を調べた。

Propofol は V 型 ATPase 活性, PII 及び PIII Basal Mg-ATPase 活性を濃度依存的に抑制したが F 型 ATPase 活性は 80%程度活性化した。Pentobarbital はすべての ATPase 活性を濃度依存的に抑制した。Thiopental もすべての ATPase 活性を抑制したが, その程度は各 ATPase によって異なった。以上の結果から, 静脈麻酔薬はラット脳 Mg-ATPase 活性を基本的に抑制するが, Propofol はミトコンドリアに特異的な作用を及ぼすことが示唆された。

一方, P 及び P の中性 pH で検出される Mg-ATPase 活性は procaine, lidocaine 及び tetracaine によって阻害されなかった。しかし、アルカリ性至適 pH で検出される P の Mg-ATPase 活性は procaine, lidocaine 及び tetracaine の濃度に依存して抑制され tetracaine による抑制が最も強かった。これらの理由については現在さらに検討中である。

(3) 神経細胞膜の興奮性の維持をになう Na,K-ATPase に対する局所麻酔薬の作用について検討を行った。5 種類の局所麻酔薬は濃度に依存して Na,K-ATPase 活性を抑制した。活性阻害の濃度は各局所麻酔薬の臨床使用濃度に近く、活性の 50%阻害濃度と局所麻酔薬の力価あるいは毒性の間には相関が見られた。活性抑制の原因として Na 及び K イオンに対する親和性の低下が考えられた。

生体膜の構成脂質であるホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンは, Na,K-ATPase に対するプロカインの作用を低下させたが, リドカインなど他の局所麻酔薬による阻害を増強した。生体膜リン脂質が局所麻酔作用に影響することを示唆する。

(4) 歯科臨床において局所麻酔薬は歯槽骨周辺に浸潤麻酔として使用されることから、骨芽細胞由来の酵素に対する局所麻酔薬の作用を検討した。5 種類の局所麻酔薬は濃度に依存して Ca-及び Mg-ATPase 活性を抑制した。各麻酔薬の両 ATPase 活性阻害の順序は臨床的に推定されている各麻酔薬の作用あるいは毒性の強さの順序にほぼ一致していた。細胞の形質膜に対する局所麻酔薬の作用の結果としてこれらの酵素が抑制される可能性がある。リドカイン、プロカイン及びプリロカインはアルカリ性ホスファターゼ活性を抑制したが、ジブカインとテトラカインは抑制しなかったことから、局所麻酔薬に共通した作用ではなかった。

(5) 16-DSA を組み込んだ多重層リポソームのスペクトルは 5-DSA に比べて比較的鋭いシャープな 3 本のシグナルを示した。両者の ESR スペクトルから計算した S の値は大きく異なり、5-DSA のラジカルは膜の比較的表層、16-DSA では深部と二重膜の異なる部分に位置することを示した。

両者のスペクトル強度は、セボフルレンやイソフルレンでは麻酔薬の濃度に伴って増大し、ハロセン、エーテル、エタノールでは高濃度を加えたときに増大した。しかし、いずれの麻酔薬も膜流動性の指標となる S やにはほとんど影響しないことから、麻酔薬は脂質二重膜の表層にとどまっておらず、ラジカルの存在する脂質の内部には影響を及ぼさないことが示された。また、単層リポソームを用いた S と の測定結果は多重層リポソームの場合と同様であり、得られた実験結果はリポソーム膜の形態には影響されないことを示唆した。

より生体に近いモデル膜で解析を行うために Na,K-ATPase あるいは microsome 分画中に含まれる膜タンパク質を組み込んだリポソームを作成した。Na,K-ATPase の場合は脂質とタンパク質の重量比を 10:1 に、microsome の場合は重量比を 10:3 とした。Na,K-ATPase 及び microsome タンパク質再構成リポソームの ESR スペクトルの S の値も 5-DSA と 16-DSA で大きく異なり、膜中でのラジカルの存在部位が異なることを示した。麻酔薬添加による両タンパク質を再構成したリポソームの ESR スペクトルの線形変化はリポソーム単独の場合と同様であり、セボフルレンやイソフルレンでは麻酔薬の濃度に伴って強度が増大し、ハロセン、エーテル、エタノールでは高濃度を加えたときに増大した。高濃度のイソフルレン、エタノールの添加で S の値が低下したが、その他の麻酔薬ではほとんど変化しなかった。の変化もリポソーム単独のときと同様、麻酔薬の添加によりほとんど変化しなかった。以上の結果は、今回用いた重量比の Na,K-ATPase あるいは microsome 膜タンパク質をリポソームに再構成しても、膜中でのスピンラベル剤の周囲環

境およびそれに対する麻酔薬の作用に影響を及ぼさないことを示した。

電子スピン共鳴 (ESR)、¹⁹F の核磁気共鳴 (NMR) を用いた実験から、全身麻酔薬のイソフルレンはリポソーム膜の表層に結合し化学交換を行っていること、その膜に対する影響は膜の表層に強く作用し、深部ではその作用が低下することを示した。

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 19 件)

1. 宮本健志、出山義昭、吉村善隆、鈴木邦明、藤澤俊明：ラット脳各種 ATPase 活性に対する静脈麻酔薬の作用、in press, (2014) (査読有)

2. 岩本理恵、北条敬之、渋谷真希子、木村幸文、亀倉更人、藤澤俊明：局所麻酔薬アレルギーが疑われ北海道大学病院歯科麻酔科外来を受診した症例の検討、北海道歯誌, 34:114-119. (2014) (査読有)

3. 田仲宏光、出山義昭、吉村善隆、鈴木邦明、福島和昭：ラット脳カルシウム ATPase 活性の静脈麻酔薬による抑制、北海道歯誌, 32:222-229, (2012) (査読有)

4. Y. Hase, Y. Deyama, Y. Yoshimura, K. Suzuki, K. Fukushima : Mechanism for propofol inhibition of Na,K-ATPase activity in rat brain (英語論文). 北海道歯誌.32:147-155, (2012) (査読有)

5. M. Shibuya, T. Hiraoki, K. Kimura, K. Suzuki, K. Fukushima : The effects of general anesthetics on ESR spectra of spin labels in phosphatidylcholine vesicles containing purified Na,K-ATPase or microsomal protein. Applied Surface Science, 262: 102-106 (2012) (査読有)

[学会発表](計 20 件)

1. M. Shibuya, K. Suzuki, K. Kimura, T. Hiraoki, K. Fukushima : The effects of general anesthetics on ESR spectra of spin labels in liposome containing with membrane proteins, 13th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation, and Pain Control (IFDAS 2012), 2 Mar, 2012, (Kohala Coast, Big Island of Hawaii, USA)

2. Y. Hase, K. Suzuki, T. Fujisawa, K. Fukushima : Mechanism for propofol inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat

brain, The 4th Annual Meeting of the Federation of Asian Dental Anesthesiology Society, Oct. 8, 2011, Kobe International Conference Center (Kobe)

3. M. Shibuya, T. Hiraoki, K. Kimura, K. Fukushima, K. Suzuki : The effects of general anesthetics on ESR spectra of spin labels in phosphatidylcholine vesicles, 3rd International Symposium on Surface and Interface of Biomedicine, Jul. 11, 2011, Hokkaido University (Sapporo)

4. 田仲宏光、出山義昭、吉村善隆、福島和昭、鈴木邦明 : 静脈麻酔薬によるラット脳 Mg-及び Ca,Mg-ATPase 活性の抑制、第 62 回日本薬理学会北部会、2011 年 9 月 30 日、東北大学 (仙台)

5. 長谷由理、出山義昭、吉村善隆、福島和昭、鈴木邦明 : 静脈麻酔薬プロポフォールによるラット脳 Na,K-ATPase 活性阻害、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日、国立京都国際会館 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者:

福島 和昭 (FUKUSHIMA, Kazuaki) 北海道大学、名誉教授、研究者番号: 00002361

(2) 研究分担者:

鈴木 邦明 (SUZUKI, Kuniaki) 北海道大学・大学院歯学研究科、教授
研究者番号: 40133748

平沖 敏文 (HIRAOKI, Toshifumi) 北海道大学・大学院工学研究科、特任教授
研究者番号: 10125346

藤澤 俊明 (FUJISAWA, Toshiaki) 北海道大学・大学院歯学研究科、教授
研究者番号: 30190028

渋谷 真希子 (SHIBUYA, Makiko) 北海道大学・大学院歯学研究科、助教
研究者番号: 30399951

木村 幸文 (KIMURA, Yukifumi) 北海道大学・大学病院、助教
研究者番号: 00292037