

局所麻酔薬 ropivacaine の α_1 -酸性糖タンパク結合動態と 薬物間相互作用の検討

石崎純子, 下村祥子, 福和千恵, 嶋田 努, 横川弘一, 宮本謙一*
金沢大学医学部附属病院薬剤部

Binding Disposition of Local Anesthetic Ropivacaine to α_1 -acid Glycoprotein and Interactions with Co-administered Drugs

Junko Ishizaki, Shoko Shimomura, Tie Fukuwa, Tsutomu Shimada,
Koichi Yokogawa and Ken-ichi Miyamoto*
Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine, Kanazawa University

{ Received February 18, 2005 }
{ Accepted April 16, 2005 }

We examined the influence of basic drugs and protein variants on the binding disposition of ropivacaine to α_1 -acid glycoprotein (AGP). On doing this, we found the values of the competitive inhibition constant (K_i) for dipyridamole, verapamil, lidocaine and disopyramide with respect to the binding of ropivacaine to commercial AGP (70 mg/dL) to be 2.1, 5.2, 6.0 and 11.0 μ M, respectively. Also, there was a strong correlation between the f_u value and the AGP concentration when ropivacaine was added to plasma samples from ten healthy volunteers ($r=0.861$). Among the volunteers, eight showed F₁S variants and two showed F₁ variants without the S variant of AGP. There was no difference in the f_u value of ropivacaine between these two groups. However, when ropivacaine was added together with dipyridamole, the f_u values of ropivacaine in plasma from volunteers with F₁S variants were clearly higher than those from volunteers without the S variant. When ropivacaine was added together with disopyramide or lidocaine, however, there was no difference in f_u values between these variants.

Our results indicate that variability in the effectiveness and/or adverse effects of ropivacaine are caused by changes in f_u as a consequence of changes in AGP concentration. They also suggest that in combination therapy, it is also important to consider the AGP variant-dependence of the inhibitory effect of concomitantly administered drugs.

Key words — ropivacaine, α_1 -acid glycoprotein, protein binding, drug interaction

はじめに

金沢大学医学部附属病院麻酔科蘇生科において、心拍動下冠動脈バイパス術の周術期に硬膜外麻酔薬として ropivacaine が使用されてきたが、手術の経過や患者個々によって麻酔効果が変動することが経験されていた。局所麻酔薬 ropivacaine は、血漿蛋白結合率が94%の塩基性薬物である¹⁾。一般に、塩基性薬物は血漿 α_1 -酸性糖蛋白質 (AGP) と強く結合することが知られている。また、薬物非結合型分率 (f_u) は、薬理効果や副作用発現に関与することから、しばしば治療域の狭い薬物などでは、重要なパラメータとなっている。すでに、ropivacaine の体内動態は個体間変動が大きく、 f_u 値は血漿

AGP 濃度が同程度にも関わらず大きく異なることが報告されている^{2,3)}。

一方、血漿 AGP 濃度は炎症や外傷で上昇することや、手術後 3～4 日間にピークに達した後、2～4 週間高値を示すことが報告されている⁴⁻⁶⁾。また、膵臓がん、肝炎、ネフローゼ症候群では血漿 AGP 濃度が低下すると報告されている⁷⁻⁹⁾。このことは、患者の病態によって塩基性薬物の f_u 値が変動し、薬物体内動態が変化する可能性、さらに、他種塩基性薬物の併用による薬物間相互作用の誘発を示唆している。したがって、ropivacaine の適正な薬物治療を実践するには、タンパク結合動態を明らかにし、その効果的かつ安全使用上有益な情報を集積する必要がある。

近年、AGP は遺伝子レベルの解析により、3つの遺

* 石川県金沢市宝町13-1 ; 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa, 920-8641 Japan

伝子 (AGP-A gene, B gene, B' gene) で分類されており, AGP-A gene と AGP-B gene ではペプチド配列が異なる genetic variant が存在していること, 主な AGP variant として, AGP-A gene (ORM 1) に由来する F₁ variant, F₂ variant, S variant の 3 つの対立遺伝子, および AGP-B/B' gene (ORM 2) に由来する A variant の存在が知られている^{10,11)}. また, この 2 種類の遺伝子の発現割合は, 病態時に変化することが報告されており, 悪性中皮腫患者では ORM 2 に比較して ORM 1 の割合が増加し¹²⁾, 健康成人とがん患者を ORM 1 の F₁ variant と S variant とで比較すると, がん患者では, S variant の割合の方が, より影響を受けやすいとの報告がある¹³⁾. また, 健康成人間でも variant の割合には, 個体差があることが報告されている¹⁴⁾. 一方, 塩基性薬物には AGP 結合時に, ある種の variant に選択的に結合するものがあることが明らかになっている¹⁵⁻¹⁷⁾.

本研究では, ropivacaine の効果・副作用発現の個体間変動要因を AGP 結合の観点から明らかにするために, 健康人 10 名による ropivacaine の AGP 結合特性を AGP variant と薬物間相互作用の面から検討した.

方 法

1. 対象

文書による同意を得た健康人 10 名 (男性 5 名, 女性 5 名) は, 年齢が 22~28 歳で, その平均値は 23.8 ± 1.9 歳 (mean ± SD) であった. 健康人より血液を採取し, 遠心分離後, その血漿を -80℃ で保存した.

2. 蛋白結合実験

市販 human α_1 -acid protein (Sigma-Aldrich, USA) の 70 mg/dL 溶液あるいは健康人の血漿に ropivacaine (注射用アナペン®, アストラゼネカ株) を添加し, 結合実験を行った. また, ropivacaine (10 μ M) に各種濃度の dipyrindimole (注射用ペルサンチン®, 日本ベーリンガーインゲルハイム株), disopyramide (注射用リスモダン P®, 中外製薬株), lidocaine (注射用キシロカイン®, アストラゼネカ株) あるいは verapamil (注射用ワソラン®, エーザイ株) を添加し, 37℃ で 30 分間インキュベーションし, 阻害実験を行った. Ropivacaine の非結合型濃度は Centrifree MPS-3 (Amicon, USA) を用いて, 限外ろ過法により求めた. また, ropivacaine の限外ろ過膜への吸着がないことを確認した.

3. 血漿中 AGP 濃度の測定

健康人 10 名の血漿中 AGP 濃度測定は, SRL 社に依頼した.

4. Ropivacaine の測定法

Ropivacaine の測定は Engman ら¹⁸⁾ および Oshima ら¹⁹⁾ に準じて行った. まず, 10 mL の共栓付きガラス遠心管に試料 (100 μ L) を取り, 生理食塩水 900 μ L, mepivacaine (internal standard, 50 ng/mL, Sigma-Aldrich, USA) 500 μ L, 10% Na₂CO₃ 500 μ L, n-heptane : dichloromethane (4 : 1 v/v) 4 mL を加え 20 分間振とう後, 有機層 3.5 mL を他の遠心管に移し, 窒素下 (50℃) で留去した後, 残渣を n-heptane : ethanol (9 : 1 v/v) 100 μ L で溶解し, その 2 μ L を GC-MS に注入した. GC-MS は, QP-5000 システム (株島津製作所) を用いた. 分離カラムは, (5-phenyl)-methyl-polysiloxane を固定相とするキャピラリーカラム (DB-5, 長さ 30 m, 内径 0.315 mm, J&W Scientific Inc., U.S.A) を使用した. ropivacaine および mepivacaine の m/z は, 126 および 98 で, 保持時間は, 19.8 および 18.3 分であった.

Ropivacaine の検量線は 0.039-10 μ g/mL の範囲で, 相関係数 1.00 と良好な直線性が得られた. また, 検量線の同時再現性 (n = 5) および 7 日間の日差再現性の変動係数はいずれの場合も 4% 以下で, 十分な再現性が確認された.

5. 等電点電気泳動法

AGP の phenotyping は, Eap と Baumann の方法に準じて測定した²⁰⁾. 血漿サンプル 5 μ L に 4 M-urea を 5 μ L を加え, 37℃ で 1 時間のインキュベーションを行った後, 1.5 U neuraminidase (和光純薬工業株) 20 μ L 加え, 37℃ で 24 時間のインキュベーションを行った. ゲルを膨張させるために, 8 M-urea (9.6 g), (±)-dithiothreitol (60 mg, 和光純薬工業株), pharmalyte narrow range 4.5-5.5 (0.5 mL, Amersham pharmacia Biotech, UK), Triton-X 100 (0.1 mL) および蒸留水 (12 mL) を混和し, 膨張液とした. 膨張時間は, 室温で 18 時間行った.

等電点電気泳動装置は, NA-1410-R (日本エイドール株) を使用した. プレートに膨張させたゲルをのせ, 1 cm × 0.5 cm のろ紙をゲルの陰極側に置きサンプルを 10 μ L アプライし, 500V, 1 時間, 続いて, 2000V, 10 時間泳動した. その後, ゲルを支持体からはずし, polyvinylidenedifluoride (PVDF) (MILLIPORE, USA) に転写した. 転写 buffer は, Tris-glycine Buffer (pH 8.3) (0.175 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol, 1.34 M glycine, 5~10% methanol 1 L) を用いて, 400 mA で 1 時間の転写を行った.

転写後, PVDF 膜を skim milk (和光純薬工業株) を含む pH 7.6 Tris-buffered saline (TBS) (2.42 g/L Tris base, 8 g/L NaCl) を用いて, 4℃ で 1 時間ブロッキングし, Wash buffer (0.1% Tween-20 in phosphate buffered saline, PBS) にて洗浄した後, 1 次抗体である rabbit anti-human

orosomucoid (DAKO Co., Ltd., Kyoto, Japan)と4℃で一晩反応させた。

Wash Bufferで3回, PBSで1回洗浄後, 2次抗体である biotinylated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology, USA)と4℃で4時間反応させた。Wash Bufferで2回, PBSで1回洗浄した後 ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham pharmacia Biotech, UK)を用い, Typhoon 9200 (Amersham pharmacia Biotech, UK)にて検出した。AGPの各 variant の pI (等電点)は A variant は5.06, S variant は5.03, F₁ variant は4.93, F₂ variant は4.95に検出された。

6. データ解析

有意差検定には Mann Whitney U 検定を用いた。

結 果

Fig. 1には, ropivacaineの市販ヒトAGP結合に対する dipyrindamole, verapamil, lidocaineあるいは disopyramideの阻害効果を Lineweaver-Burk プロットで示した。いずれの薬物も ropivacaine に対して競合阻害効果が認められた。また, 阻害定数(K_i)は dipyrindamole (2.1 μM), verapamil (5.2 μM), lidocaine (6.0 μM), disopyramide (11.0 μM)の順であり, dipyrindamoleの阻害効果が最も強かった。

健常人10名の血漿中アルブミンおよびAGP濃度は, 4.32-5.07g/dL (4.57 ± 0.23, mean ± SD) および 41-68mg/dL (55.0 ± 8.6) といずれも基準値内であった。Fig. 2には, 市販ヒトAGPおよび健常人10名の血漿を neuraminidase 処理した後, 等電点電気泳動を行い, immunoblotting

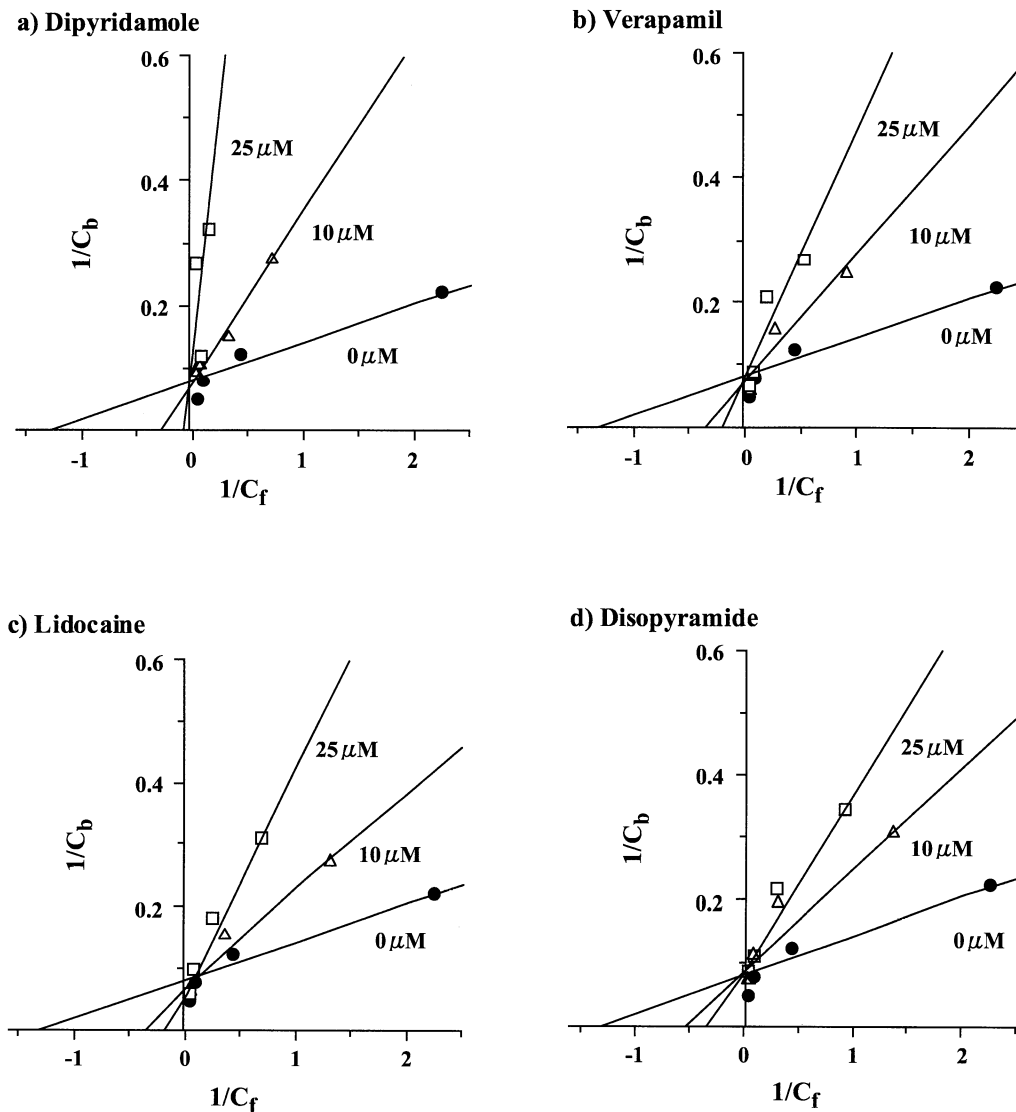


Fig. 1. Lineweaver-Burk Plots for Ropivacaine to Commercial AGP (70 mg/dL) in the Presence of Various Drugs.

により AGP variant を同定した結果を示した。健康人2名(No. 2, No. 8)には S variant が存在せず, F₁ variant と A variant のみであった(non-S variant 群)。他の8名には, F₁ variant, S variant ならびに A variant が存在した(F₁ S variant 群)。

Fig. 3 には, 健康人10名の血漿に ropivacaine (10 μM) を添加した時の f_u 値と AGP 濃度との関係を示した。これらの f_u 値は, 10–25% (16.2 ± 6.2, mean ± SD) と個体差がみられたが, AGP 濃度の上昇に伴い低下し, 高い相関性が認められた (r = 0.861)。また, F₁ S variant 群と non-S variant 群との間に特徴的な違いはみられなかった。さらに, Fig. 4 では, ropivacaine の f_u 値について, F₁ S variant 群の8名の平均値と non-S variant 群の2名の値を比較した。ropivacaine の f_u 値は, 濃度依存的 (5–150 μM) に約7%から50%に上昇したが, 両群間で差は認められなかった。

Fig. 5 には, ropivacaine (10 μM) の血漿タンパク結合に対する dipyrindamole (a), lidocaine (b) あるいは disopyramide (c) の阻害効果について示した。各阻害剤の濃度

による f_u 値の上昇は, コントロール値に対する比で示した。また, F₁ S variant 群における f_u の上昇比は8名の平均値で示した。Dipyridamole の阻害効果は F₁ S variant 群で non-S variant 群の2名に比較して, 有意に強かった (p < 0.05)。一方, disopyramide あるいは lidocaine の阻害効果は, 両群間でほぼ等しかった。

考 察

心拍動下冠動脈バイパス術の周術期に, 硬膜外麻酔薬として使用されている ropivacaine は, 手術適応となる心疾患治療薬である dipyrindamole, verapamil, lidocaine, disopyramide などの塩基性薬物と併用されることが多い。そこで, ropivacaine の AGP 結合に対するこれらの薬物の阻害効果を検討した結果, いずれの薬物も競合的阻害効果を示し, dipyrindamole が最も強く, verapamil, lidocaine, disopyramide の順であることがわかった (Fig. 1)。

すでに, AGP には主な variant として, F₁ variant, S

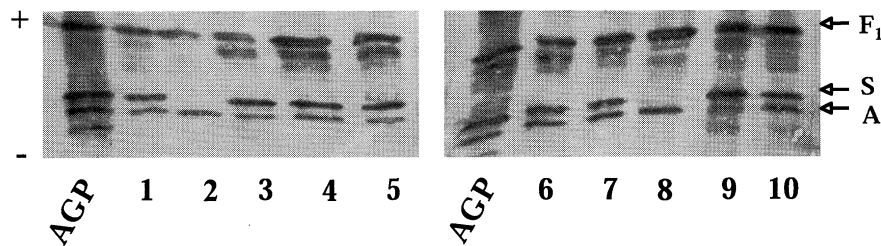


Fig. 2. ORM Phenotypes in Plasma of ten Healthy Volunteers (1–10) Analyzed by Isoelectric Focusing after Desialylation of AGP.
AGP: commercially obtained AGP

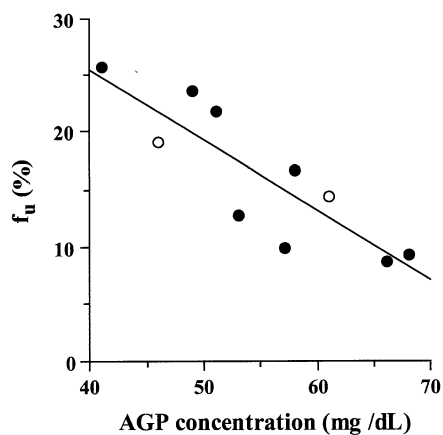


Fig. 3. Correlation between the Unbound Fraction of Ropivacaine (10 μM) and Plasma AGP Concentration in ten Healthy Volunteers.
Symbols: ●, eight volunteers with F₁S variant ; ○, two volunteers without S variant

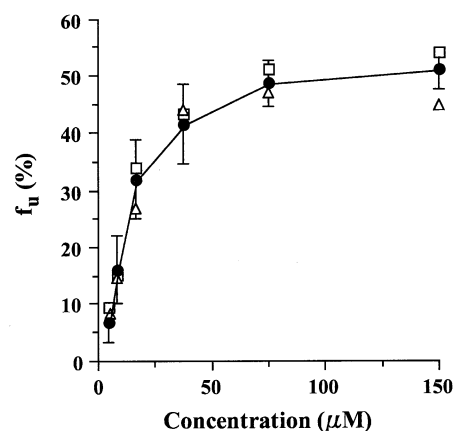


Fig. 4. Profiles of the Unbound Fraction of Ropivacaine in Plasma of ten Healthy Volunteers.
Symbols: ●, eight volunteers with F₁S variant (mean ± SD); △, □, two volunteers without S variant

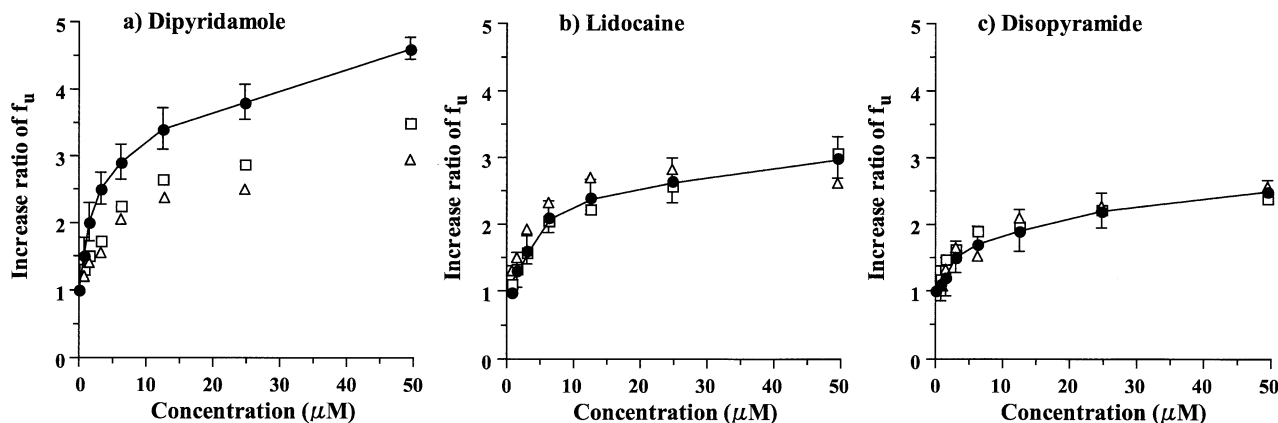


Fig. 5. Effect of Dipyridamole, Lidocaine or Disopyramide on the Unbound Fraction of Ropivacaine ($10\mu\text{M}$) in Plasma of ten Healthy Volunteers.
 Symbols : ●, eight volunteers with F_1S variant (mean \pm SD);
 △, □, two volunteers without S variant

variant と A variant が知られており、これらの variant と特異的に結合する薬物も明らかになっている¹⁵⁾. disopyramide は A variant に、ropivacaine や dipyridamole は F_1S variant に、そして lidocaine は F_1S variant と A variant の両方に結合することが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾. 一方、AGP variant の構成には個体差があること、また、病態時に変動することが知られている。これらのことから、ropivacaine を含め、塩基性薬物の AGP に対する結合親和性は、個人ごとに AGP variant のタイプにより異なり、薬物が選択的に結合する AGP variant のタイプが個人の有する variant と一致した時に、結合親和性が高くなることが推測される。また、ropivacaine の AGP 結合に対する併用薬の阻害効果において、ropivacaine と同じタイプの AGP variant に高い親和性を有する薬物との併用により、阻害効果が大きくなるものと推察される。

一般に、人口に占める各 AGP variant の割合は、 F_1S variant/A variant が 50%、 F_1 variant/A variant が 35%、S variant/A variant が 15% と報告されている²¹⁾。また、 F_1 variant と S variant は、3 : 2 の割合で混在していると報告されている¹⁵⁾。今回、等電点電気泳動法を用いて、健常人 10 名の血漿 AGP variant の同定を行った結果、S variant が存在する F_1S variant/A variant が 8 名、S variant が存在しない F_1 variant/A variant が 2 名の 2 群に分かれた (Fig. 2)。

また、健常人の血漿中 AGP 濃度は、いずれも正常範囲内であったが、個人差がみられ、ropivacaine の f_u 値も変動していることがわかった。しかし、血漿中 AGP 濃度と ropivacaine の f_u 値の間には、高い相関性が認められ、ropivacaine 単独の場合、 f_u 値の変動は、血漿中 AGP 濃度に依存することがわかった (Fig. 3)。また、この個

体間変動には性差は認められなかった。さらに、ropivacaine の AGP への選択的結合は F_1S variant とされているが、ropivacaine の f_u 値が、 F_1S variant 群と non-S variant 群の両群間で明らかな違いがみられなかったことから (Fig. 4)、ropivacaine の AGP 結合は S variant よりも F_1 variant への親和性が高いものと推察された。また、 F_1S variant 群における ropivacaine 結合に対する dipyridamole、disopyramide あるいは lidocaine の阻害効果は、 K_i 値とよく一致していた (Fig. 5)。一方、non-S variant 群における ropivacaine 結合に対する阻害効果は、dipyridamole のみで、 F_1S variant 群よりも弱かった (Fig. 5)。Ropivacaine と dipyridamole は AGP の F_1S variant への結合選択性が一致しているとの報告¹⁵⁻¹⁷⁾があるが、本研究の結果から、ropivacaine は dipyridamole より F_1S variant に対する結合親和性が高いことが示唆された。

硬膜外麻酔による ropivacaine の中枢神経系、心臓への中毒発現域は、非結合型濃度で $0.34-0.85\mu\text{g/mL}$ ($1.03-2.58\mu\text{M}$) と報告されている²²⁾。本研究の結果、臨床濃度レベルにおいても ropivacaine の f_u 値は、これらの併用薬の阻害効果により 2 ~ 3 倍上昇する結果が得られた。さらに、手術による外的侵襲に伴う AGP 濃度の上昇、塩基性薬物の併用頻度が高いことなど、臨床使用時には、ropivacaine の f_u 値が変動することが麻酔効果や副作用発現の個体差の要因であることが示唆された。

結論として、ropivacaine 局所麻酔における効果・副作用発現の患者個体差は、単独投与の場合、血漿中 AGP 濃度に依存する ropivacaine の非結合型濃度の変動が要因であること、薬物併用においては、薬物の AGP variant への選択的結合タイプと患者の特異的な AGP variant のタイプに影響されることが示唆された。

謝辞 本研究は、独立行政法人日本学術振興会「平成16年度科学研究費補助金(奨励研究)」によるものである。

引用文献

- 1) A. Lee, D. Fagan, M. Lamont, G.T. Tucker, M. Halldin, D.B. Scott, Disposition kinetics of ropivacaine in humans, *Anesth. Analg.*, **69**, 736-738 (1989).
- 2) C.J. Erichsen, J. Sjøvall, H. Kehlet, C. Hedlund, T. Arvidsson, Pharmacokinetics and analgesic effect of ropivacaine during continuous epidural infusion for postoperative pain relief, *Anesthesiology*, **84**, 834-842 (1996).
- 3) A.G. Burm, R. Stienstra, R.P. Brouwer, B.M. Emanuelsson, J.W. van Kleef, Epidural infusion of ropivacaine for postoperative analgesia after major orthopedic surgery : pharmacokinetic evaluation, *Anesthesiology*, **93**, 395-403 (2000).
- 4) P.D. Booker, C. Taylor, G. Saba, Perioperative changes in alpha 1-acid glycoprotein concentrations in infants undergoing major surgery, *Br. J. Anaesth.*, **76**, 365-368 (1996).
- 5) K. Shirao, C. Kusano, S. Natsugoe, H. Yoshinaka, T. Fukumoto, T. Aiko, H. Shimazu, Postoperative changes in acute phase protein in patients with esophageal cancer, *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, **93**, 675-683 (1992).
- 6) F.O. Holley, K.V. Ponganis, D.R. Stanski, Effects of cardiac surgery with cardiopulmonary bypass on lidocaine disposition, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **35**, 617-626 (1984).
- 7) K. Trautner, E.H. Cooper, S. Haworth, A.M. Ward, An evaluation of serum protein profiles in the long-term surveillance of prostatic cancer, *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **14**, 143-149 (1980).
- 8) J. Raynes, Variations in the relative proportions of microheterogeneous forms of plasma glycoproteins in pregnancy and disease, *Biomed. Pharmacother.*, **36**, 77-86 (1982).
- 9) K.M. Piafsky, O. Borga, I. Odar-Cederlof, C. Johanson, F. Sjöqvist, Increased plasma protein binding of propranolol and chlorpromazine mediated by disease-induced elevations of plasma alpha 1 acid glycoprotein, *N. Engl. J. Med.*, **299**, 1435-1439 (1978).
- 10) I. Yuasa, H. Nakamura, L. Henke, J. Henke, M. Nakagawa, Y. Irizawa, K. Umetsu, Characterization of genomic rearrangements of the alpha 1-acid glycoprotein/orosomucoid gene in Ghanaians, *J. Hum. Genet.*, **46**, 572-578 (2001).
- 11) H. Nakamura, I. Yuasa, K. Umetsu, M. Nakagawa, E. Nanba, K. Kimura, The rearrangement of the human alpha(1)-acid glycoprotein/orosomucoid gene : evidence for tandemly triplicated genes consisting of two AGP 1 and one AGP 2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 779-784 (2000).
- 12) J.C. Duche, S. Urien, N. Simon, E. Malaurie, I. Monnet, J. Barre, Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer, *Clin. Biochem.*, **33**, 197-202 (2000).
- 13) J. Mittermuller, S. Weidinger, Genetic study of orosomucoid by isoelectric focusing and immunoprinting in patients with carcinoma, *Electrophoresis*, **13**, 785-786 (1992).
- 14) J.C. Duche, F. Herve, J.P. Tillement, Study of the expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in healthy subjects using isoelectric focusing and immunoblotting, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci.*, **715**, 103-109 (1998).
- 15) F. Herve, E. Gomas, J.C. Duche, J.P. Tillement, Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human alpha 1-acid glycoprotein, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 241-249 (1993).
- 16) S. Taheri, L.P. Cogswell 3rd, A. Gent, G.R. Strichartz, Hydrophobic and ionic factors in the binding of local anesthetics to the major variant of human alpha 1-acid glycoprotein, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 71-80 (2003).
- 17) C.B. Eap, C. Cuendet, P. Baumann, Binding of d-methadone, l-methadone, and dl-methadone to proteins in plasma of healthy volunteers : role of the variants of alpha 1-acid glycoprotein, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**, 338-346 (1990).
- 18) M. Engman, P. Neidenstrom, C. Norsten-Hoog, S.J. Wiklund, U. Bondesson, T. Arvidsson, Determination of ropivacaine and [²H 3] ropivacaine in biological samples by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection or mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci., Appl.* **709**, 57-67 (1998).
- 19) T. Ohshima, T. Takayasu, Simultaneous determination of local anesthetics including ester-type anesthetics in human plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **726**, 185-194 (1999).
- 20) C.B. Eap, P. Baumann, Isoelectric focusing of alpha-1 acid glycoprotein (orosomucoid) in immobilized pH-gradients with 8 M urea : detection of its desialylated variants using an alkaline phosphatase-linked secondary antibody system, *Electrophoresis*, **9**, 650-654 (1988).
- 21) F. Herve, J.C. Duche, J. Barre, M.C. Millot, J.P. Tillement, pH titration curves of the desialylated human alpha 1-acid glycoprotein variants by combined isoelectrofocusing-electrophoresis : utilization in the development of a fractionation method for the protein variants by chromatography on immobilized metal affinity adsorbent, *J. Chromatogr.*, **577**, 43-59 (1992).
- 22) D. Wiedemann, B. Muhl nickel, E. Staroske, W. Neumann, W. Rose, Ropivacaine plasma concentrations during 120-hour epidural infusion, *Br. J. Anaesth.*, **85**, 830-835 (2000).