The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	献血促進に向けた麻酔の活用 ： 血液から麻酔成分を取り除くには
Author(s)	
Citation	令和4（2022）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2023
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/90983
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式６

申請先学部　　薬学部　採択番号　No.　3

令和４年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	ほり　しょう 堀　翔	学部 学科	薬学部薬学科	学年	１年
ふりがな 共同 研究者氏名	たけだ　かなこ 武田　佳菜子	学部 学科	薬学部薬学科	学年	１年
	たにぐち　ひかり 谷口　ひかり		薬学部薬学科		１年
	やました　りゅうせい 山下　龍生		薬学部薬学科		１年
	よしむら　そうた 吉村　奏汰		薬学部薬学科		１年
アドバイザー教員 氏名	原田　和生	所属	薬学部		
研究課題名	献血促進に向けた麻酔の活用～血液から麻酔成分を取り除くには～				
研究成果の概要	研究目的，研究計画，研究方法，研究経過，研究成果等について記述すること．必要に応じて用紙を追加してもよい．（先行する研究を引用する場合は，「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い，盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること．）				

要旨

麻酔薬の lidocaine (2-(diethylamino)-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamide) は生体内では肝臓に局在する薬物代謝酵素 cytochrome 450 (CYP) によって monoethylglycinexylidide (*N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-(ethylamino)acetamide, MEGX) などに代謝され排泄される[1][2][3]. 本研究では生体外において lidocaine を代謝する方法を探索するため，食品から分離した微生物を lidocaine 存在下で培養し，培養液を liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) により分析した．その結果，納豆菌である *Bacillus subtilis* がヒト肝ミクロソームと同一の代謝産物を生成することを見出した．また本研究でこれまでに報告されていない新たな lidocaine 代謝物を発見した．

1.　背景

現在日本では献血者の不足が問題となっている．この問題の原因の一つとして穿刺時の疼痛が挙げられる[4]．注射時の疼痛緩和のため局所麻酔薬である lidocaine を穿刺部位に塗布することがあるが，我々はこれを献血時にも活用することにより，献血者の増加が見込めるのではないかと考えた．この際，献血によって採取された血中に残留する lidocaine を除去する必要がある．

ヒトが摂取した lidocaine は主に肝臓に発現する CYP により代謝され，活性を失う．現在報告されている lidocaine 代謝物として MEGX，glycine xylidine，3-hydroxylidocaine，3-hydroxy MEGX，hydroxylidocaine (2-(diethylamino)-N-[2-(hydroxymethyl)-6-methylphenyl]acetamide)，2,6-dimethylaniline (2,6-xylidine, DMA)，*N*-hydroxylysine，hydroxy DMA，4-hydroxylidocaine，4-hydroxy MEGX が挙げられる[1][2][3]. Fig 1 に既知の lidocaine の代謝経路を示す．肝臓を摘出，破砕し，遠心分離により分離した細胞内小胞 (ミクロソーム) には CYP が含まれ，これを用いると *in vitro* において肝臓での薬物代謝を再現することができる．つまり，ヒト肝ミクロソームを大量に準備することができれば，数百 mL もの血液中に残留する lidocaine を代謝

により除去することが原理的には可能である．

しかし，ヒト肝ミクロソームは実際にヒトの肝臓を原料としており，これを大量に用意することは倫理上問題がある．そこで，リドカイン代謝を他の物質で代替したいと考え，その中でも比較的環境負荷や人体への影響が小さい食品や環境に存在する微生物に注目した．また，lidocaine の分解を行う方法を確立することで医療排水の処理などへの応用も期待できる．このような背景のもと，本研究では lidocaine を生体に無害な物質に代謝させることを目的として lidocaine の代謝を行う微生物の探索，そしてその代謝物の解析を行った．

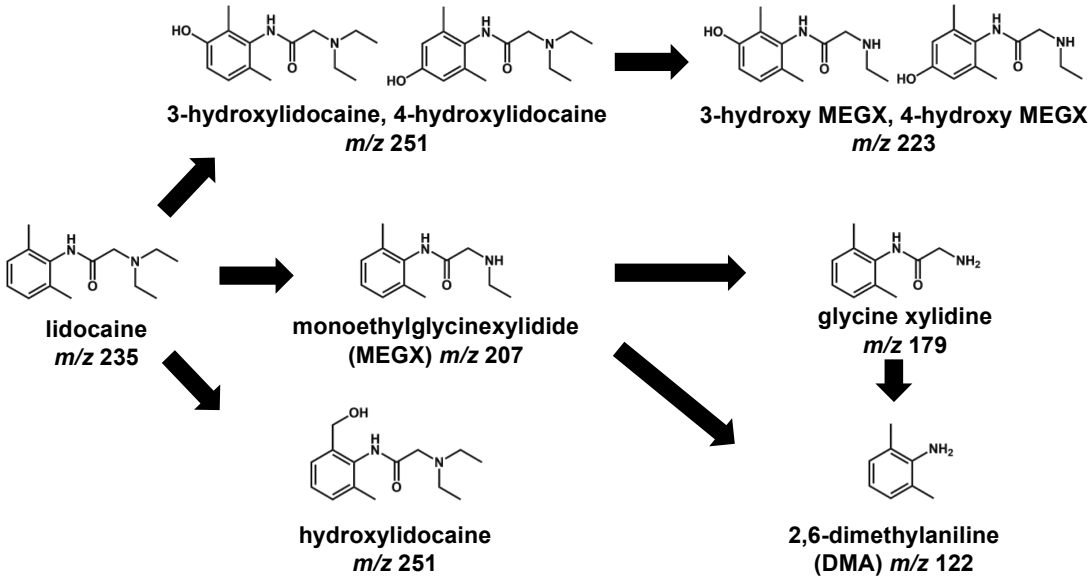

Fig 1.　lidocaine の代謝経路

2.　実験方法

2-1.　材料

Lidocaine を含め本研究で用いた試薬は，特に記載が無い限り富士フイルム和光純薬 (大阪，日本) を用いた．lidocaine は ethanol で 100 mg/mL の溶液を調製後，適宜希釈して使用した．LC/MS に使用した超純水, acetonitrile は LC/MS グレードのものを使用した．未知代謝物の MS/MS スペクトルの参照として使用した 7-methyloxindole は Combi-Blocks 社 (San Diego, CA, U.S.A) から購入した．

2-2.　ヒト肝ミクロソームを用いた代謝

ヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験は以下のように行った．Human microsomes (50 Donors, 0 mg protein/mL, HMMCPL, Thermo Fisher Scientific, MA, U.S.A) 10 μL, NADPH regeneration system solution A (Promega, Madison, WI, U.S.A) 20 μL, NADPH regeneration system solution B (Promega) 4 μ, 0.1 mol/L potassium potassium phosphate buffer pH 7.4 346 μL, 原液から超純水で希釈した 1 mg/mL の lidocaine 溶液 20 μL を混合した．また, lidocaine 代謝が NADPH 依存性か否か確認するため, NADPH regeneration system solution A, solution B を potassium phosphate buffer pH 7.4 に置換した混合液も別途準備した．これらを 37℃で 90 分間インキュベートし，インキュベート開始後 0, 30, 60, 90 分で 100 μL ずつ採取した採取した溶液に methanol をそれぞれ 100 μL ずつ加えてボルテックスし，15,000 x g, 3 分間，遠心分離した．その後，上澄み液 200 μL を採取し, LC/MS で測定した．LC/MS の測定条件は以下の通りである. LC は Acquity UPLC, MS は Quattro Premier XE (いずれも Waters, Millford, MA, U.S.A) を用いた．カラムは内径 2.1 mm，長さ 50 mm，粒子径 1.7 μm の Acquity UPLC BEH C18 (Waters) を用い, 40℃に保温した．溶離液は A 液に 0.1% formic acid in distilled water，B 液に acetonitrile を使用し, B 液の組成を 0% (0 min) - 100% (1.5 min) のよう

に変えた．流速は 0.5 mL /min とした．試料導入量は 10 μL とした．イオン化は electrospray ionization (ESI) で行い，極性は正イオンモードとした．キャピラリー電圧は 4.5 kV，コーン電圧は 35 V とした．代謝物の探索は MS scan モードで，代謝物の構造解析 (MS/MS) は product ion scan モードで行った．共にスキャン範囲は *m/z* 50 – 500 とし，スキャン時間は 0.95 sec，インターバルを 0.05 sec とした．MS/MS 時の collision energy は 25 eV とした．装置制御，データ取得は MassLynx Ver 4.1 を使用した．

2-3.　lidocaine を代謝する微生物のスクリーニング

大阪大学吹田キャンパス近郊のスーパーマーケットでしいたけ，ブルーチーズ，納豆，ドライイースト，ヨーグルトを購入した．枯草菌標準株は，独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC) から *Bacillus subtilis* subsp. Spizizenii NBRC 3134 を購入し使用した．しいたけ及びブルーチーズ由来の微生物は，これらの食材を生理食塩水に懸濁後し，懸濁液を YPDA 寒天培地 (Clontech, Mountain View, CA, U.S.A) 上に塗抹し，25℃で培養することによって得た．納豆由来の微生物は生理食塩水懸濁液を LB 寒天培地（ナカライテスク社，京都，日本）上に塗抹し，37℃で培養することにより得た．各寒天培地上に確認されたコロニーを釣菌，それぞれの液体培地に植菌した．使用した液体培地は LB 培地または YPDA 培地 3 mL に 1 mg/mL の lidocaine 溶液 150 μL を加えたものである．Lidocaine 溶液を加えたのは lidocaine が存在する環境に微生物を適応させるためである．しいたけから分離した微生物及びブルーチーズから分離した微生物は 25℃で，納豆から分離した微生物は 37℃でそれぞれ 2 日間振とう培養した．振とう培養した液体培地 50 μL を新鮮培地 3 mL に継代し，しいたけ分離菌及びブルーチーズ分離菌は 25℃で，納豆分離菌は 37℃で半日振とう培養した．その後，培養液をそれぞれ 500 μLずつ回収し，methanol 500 μL を加えてボルテックスし，15,000 x g, 3 分間遠心分離した．上澄み 200 μLを LC/MS バイアルに移し，LC/MS で測定した．ドライイーストは 3 g を 95.2 mg/mL の glucose 水溶液 30.5 mL に加え，37℃で 15 分間インキュベートした．ヨーグルトは 0.583 g に超純水 583 μL 加え，37℃で 15 分間インキュベートした．それぞれの溶液 20 μL に potassium phosphate buffer pH 7.4 360 μL と 1 mg/mL の lidocaine 溶液 20 μL を加えた後，37℃で 90 分間インキュベートし，インキュベート開始後 0, 30, 60, 90 分で 100 μL ずつ採取した．採取した溶液に methanol をそれぞれ 100 μL ずつ加えてボルテックスし，15,000 x g, 3 分間，遠心分離した．その後，上澄み液 200 μL を採取し，LC/MS で測定した．

2-4.　枯草菌の lidocaine 代謝物の精製

LB 培地 3 mL に 1 mg/mL の lidocaine 溶液 150 μL，納豆分離菌，及び枯草菌標準株を植菌したものを加え 7 日間ほど振とう培養した．培養液を 200 μL 採取し，methanol 200 μL を加えボルテックスしたのちに 15,000 x g, 3 分間遠心分離した．上澄み液を 200 μL 採取し LC/MS で測定した．

3.　結果

3-1.　ヒト肝ミクロソーム中で生成する lidocaine 代謝物の分析

ヒト肝ミクロソーム中で生成する lidocaine 代謝物を LC/MS により分析した．　LC/MS の分析結果を Fig 2 に示した．NADPH 再生系添加では *m/z* 122，148，251 でピークが見られたが，NADPH 再生系非添加では *m/z* 122 でのみピークが見られた (Fig 2 (b), (d))．参考文献[1][2]より *m/z* 122 での保持時間 2.00 min のピークは DMA，*m/z* 251 での保持時間 1.75 min のピークは 4-hydroxylidocaine だと考えられる．4-hydroxylidocaine と *m/z* 148 でのピークの物質は NADPH の存在下でのみ存在したため，CYP による lidocaine 代謝物だと考えられる．よって，DMA, 4-hydroxylidocaine，*m/z* 148 でのピークの物質と考えられる *m/z* 122，148，251 のピークをヒト肝ミクロソームの特徴的な代謝物のピークだと考え，3-2 の実験を行った．

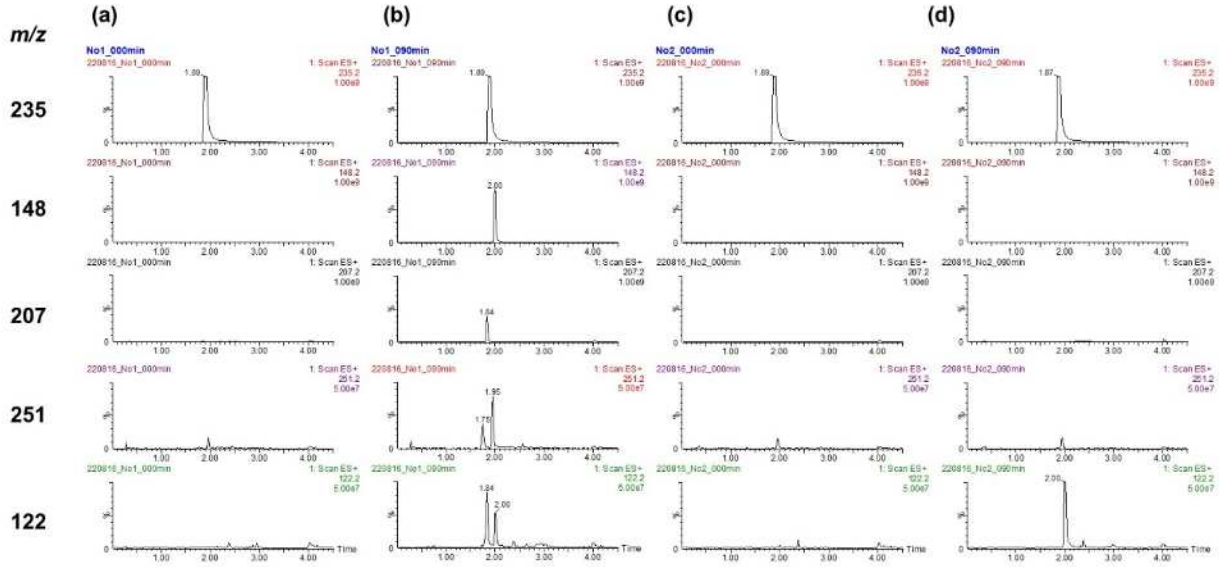

Fig 2. ヒト肝ミクロソーム **lidocaine** 代謝物の **LC/MS** 測定結果

最上段から *m/z* 235，148，207，251，122（それぞれ lidocaine，未知代謝物，MEGX，hydroxylidocaine, DMA のプロトン化イオンの質量に相当）のマスクロマトグラムを示す. (a) NADPH 再生系添加, 反応 0 分, (b) NADPH 再生系添加, 反応 90 分, (c) NADPH 再生系非添加, 反応 0 分, (d) NADPH 再生系非添加, 反応 90 分.

3-2.　lidocaine を代謝する微生物のスクリーニング

入手の容易さと安全性を考慮し，市販の納豆，ブルーチーズ，しいたけ，ドライイースト，ヨーグルトを lidocaine の代謝を行う候補として選定した．各微生物の培養液の LC/MS の分析結果を Fig 3 に示す．ブルーチーズ分離菌，しいたけ分離菌，イースト菌，ヨーグルト分離菌ではヒト肝ミクロソームと同じピークは見られなかった．納豆分離菌では *m/z* 148 でピークが見られた．電荷質量比と保持時間が同一であることから，ヒト肝ミクロソームでの代謝物と納豆分離菌での代謝物が同一であると考えられた．そこで 納豆分離菌と考えられる枯草菌に注目した 3-3 の実験を行った．

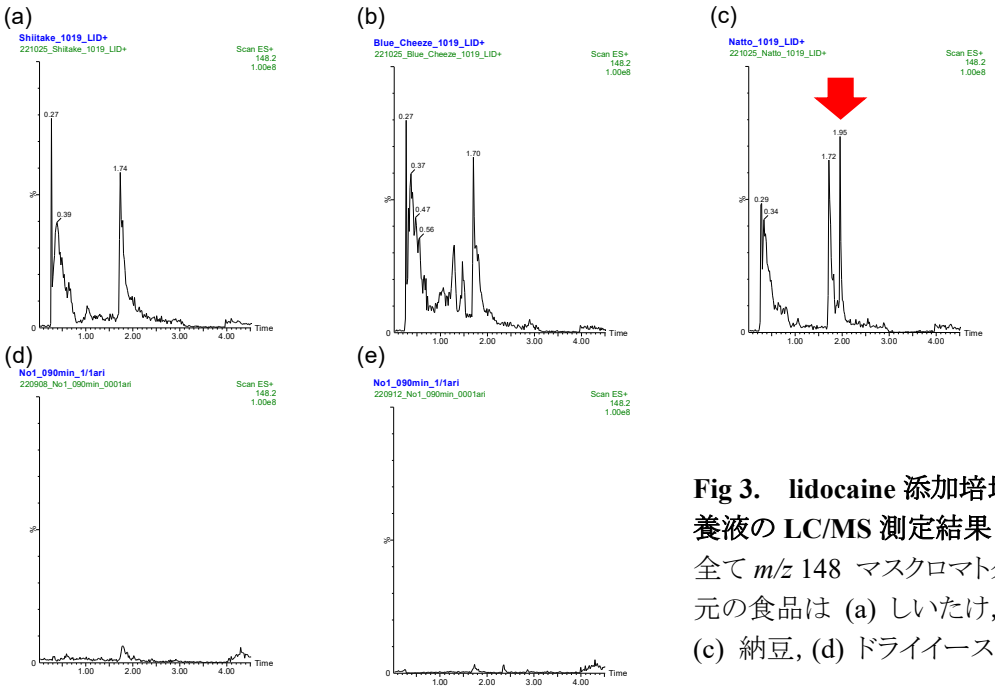

Fig 3.　**lidocaine** 添加培地を用いた微生物培養液の **LC/MS** 測定結果

全て *m/z* 148 マスクロマトグラムを示す．分離元の食品は (a) しいたけ, (b) ブルーチーズ, (c) 納豆, (d) ドライイースト, (e) ヨーグルト

3-3.　枯草菌の lidocaine 代謝物の分析

3-2 の実験は納豆分離菌の培養により lidocaine が分解されることが分かった．これが枯草菌による代謝であることを確かめるため，購入した *Bacillus subtilis* を枯草菌標準株として，納豆分離菌と比較して lidocaine 代謝の実験を行った．納豆分離菌と枯草菌標準株は共に *m/z* 148 でピークが見られた．よって，枯草菌がヒトと同じ代謝経路を持つと考えられる．また，枯草菌やヒト肝ミクロソームの lidocaine 代謝から得られた分子量 147 の代謝物，ヒト肝ミクロソームの lidocaine 代謝から得られた DMA，7-methyloxindole を LC/MSMS した結果を Fig 4 に示す．DMA や 7-methyloxindole の LC/MSMS の結果 (Fig 4 (c), (d)) と比較をすると，DMA の *m/z* 77，79，103，105 のピークと，7-methyloxindole の *m/z* 91，118 のピークが分子量 147 の代謝物のピークと部分的に一致した．よって，分子量 147 の代謝物は DMA や 7-methyloxindole と部分的に類似した構造を持つと考えられる．

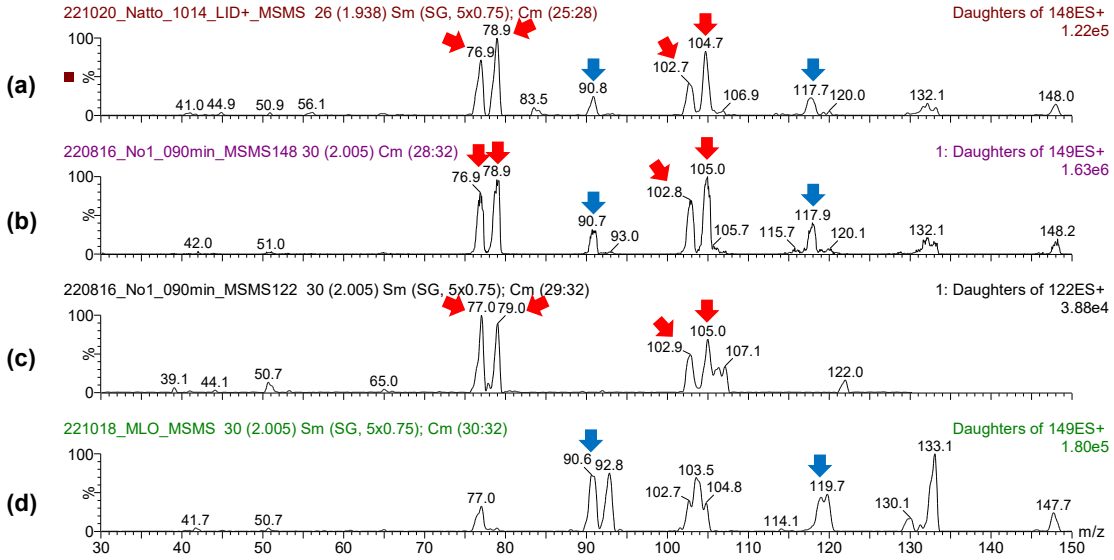

Fig 4. 各種試料から検出された代謝物の MS/MS スペクトル

各スペクトルの試料とプレカーサーイオンはそれぞれ (a) 納豆分離菌培養液，*m/z* 148, (b)ヒト肝ミクロソーム，*m/z* 148, (c) ヒト肝ミクロソーム，*m/z* 122, (d) 7-methyloxindole, *m/z* 148.

4.　考察

本研究で，ヒト肝ミクロソームや枯草菌による lidocaine 代謝物として分子量 147 の化合物が確認された．この化合物の条件を満たす lidocaine 代謝物は報告されておらず，未知の代謝物だと考えられる．今後は，分子量 147 の代謝物を単離し，NMR を用いて構造式を決定したいと考えている．また，分子量 147 の代謝物の毒性を評価することで，代謝物の安全性の評価や lidocaine の新たな副作用のメカニズムの解明も行いたい．加えて，当初の目的である献血への応用に向け，枯草菌の lidocaine の代謝速度の評価，代謝速度の向上も今後の課題として挙げられる．

医薬品開発時に開発医薬品成分の代謝物の解析は必要不可欠である．医薬品成分代謝物の探索は，モデル動物への投与，もしくはヒト肝ミクロソームによる処理により生成したものを LC/MS などの機器分析に供して行われることが多い．しかし，生成量が極めて微量であるため，代謝物の構造は質量分析によって得られる分子量とフラグメントの情報を用いた推定に留まり，完全に同定できることは稀である．構造を決定するためには，動物，あるいはヒト肝ミクロソームを大量に準備する必要があるが，コスト，労力を要し，倫理的にも問題がある．代謝酵素を同定し，当該酵素遺伝子を大腸菌，酵母，カイコに導入し大量発現させる，あるいは無細胞翻訳系により発現させることができれば，代謝物の大量調製は可能であるが，技術的に困難な場合も多い．

そのような場合に，本研究で行ったように，ヒトと同一の代謝物を生成する微生物種をスクリーニングし，見出すことができれば，大量培養を行い，培養物の中から代謝物を分離，精製し，構造を決定することが可能となる．このように安全に大量培養可能な微生物を用いた医薬品成分代謝物探索のスキームは，医薬品開発の新たなツールとしても期待できる．

5.　結論

lidocaine 存在下で市販のしいたけ，ブルーチーズ，納豆，ドライイースト，ヨーグルトから分離した微生物を培養すると，納豆分離菌を培養したときのみ lidocaine はヒト肝ミクロソームと同様に代謝され，しいたけ分離菌，ブルーチーズ分離菌，イースト菌，ヨーグルト分離菌では lidocaine はヒト肝ミクロソームと同様には代謝されなかった．lidocaine 存在下で枯草菌標準株を培養したところ納豆分離菌と同様の代謝物を生じたため，lidocaine の代謝は納豆分離菌に含まれる枯草菌が行っていると考えられる．枯草菌標準株による lidocaine 代謝物の LC/MS のピークはヒト肝ミクロソームによる lidocaine 代謝物のピークとほぼ一致し，LC/MSMS のピークも一致した．したがって，枯草菌はヒト肝ミクロソームと同じ代謝経路を持つと考えられる．

6.　参考文献

[1] Yasuhiro Masubuchi. e*t. al*. (1991) Selective 3-hydroxylation deficiency of lidocaine and its metabolite in Dark Agouti rats. *Biochem. Pharmacol.*, 42 , 693-695.

[2] Jian-Dong Duan. *et. al*. (2008) Assessment of the Medicines Lidocaine, Prilocaine, and Their Metabolites, 2,6-DMA and 2-Methylaniline, for DNA Adduct Formation in Rat Tissues. *Drug Metab. Dispos.,* 8 , 1470-1475

[3] Gregory S Doran. *et. al.* (2018) Direct detection of glucuronide metabolites of lidocaine in sheep urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* , 1076 , 84-90

[4] 厚生労働省. “若年層献血意識に関する調査結果報告書:未経験者編”. 2006-03. https://www.　mhlw.go.　jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/7n.　html, (参照 2022-12-12)