

学 位 論 文 題 名

全身麻酔薬および関連薬がウサギ脳 Na^+ , K^+ -ATPase
に及ぼす影響に関する研究

学位論文内容の要旨

目 的

本研究は Na^+ , K^+ -ATPase の反応機構の解析結果をもとに、全身麻酔の導入または維持に使用される全身麻酔薬および関連薬全般について Na^+ , K^+ -ATPase に対する作用とその機構を比較検討することを目的として実験を行った。

材料と方法

Jørgensen らの方法に準じて、ウサギ全脳より得られた膜分画から Na^+ , K^+ -ATPase の部分精製を行なった。

Na^+ , K^+ -ATPase 活性、 Na^+ -ATPase 活性および K^+ -pNPPase 活性は、生成された無機リン量あるいは *p*-nitrophenol 量を定量することにより計測した。また、 ^{32}P を用いてリン酸化反応中間体 (EP) 量の測定と、EP の K^+ または ADP に対する感受性を調べた。

結 果

1. 全身麻酔薬および関連薬がウサギ脳 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に与える影響

実験に用いたすべての全身麻酔薬および関連薬はフェンタニルを除いて、濃度依存性に Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害した。バルビタール群ではペントバルビタール、チオペンタールのいずれも 10 mM で活性を完全に阻害し、ベンゾジアゼピン群ではミダゾラムとジアゼパムがそれぞれ 0.8 mM、1.5 mM で活性を完全に阻害した。揮発性麻酔薬群においてはハロタン、ジエチルエーテルがそれぞれ 2 %、10 %で活性を完全に阻害した。イソフルランおよびセボフルランは濃度依存性に活性を阻害したが、10 %でもイソフルランで約 10 %、セボフルランで約 35 % 活性が残存した。その他の麻酔薬群では、ドロペリドールと塩酸ケタミンはそれぞれ 3.8 mM、15 mM で完全に阻害した。

2. Na^+ -ATPase および K^+ -pNPPase 活性に与える影響

Na^+, K^+ -ATPase の部分反応である Na^+ -ATPase および K^+ -pNPPase 活性に与える影響を調べた結果、各麻酔薬および関連薬による阻害は薬物群によって傾向が異なった。10 mM チオペンタールでは K^+ -pNPPase 活性が約 20 %、 Na^+ -ATPase 活性が約 60 % 残存した。また、ジアゼパムでは Na^+, K^+ -ATPase と Na^+ -ATPase 活性を完全に、 K^+ -pNPPase 活性をほぼ完全に阻害したが、 Na^+ -ATPase 活性が最も低濃度で阻害され、 K^+ -pNPPase 活性の阻害に最も高濃度を要した。イソフルランにおいては K^+ -pNPPase 活性が最も感受性が高く、 Na^+ -ATPase 活性は完全には阻害されなかった。その他の麻酔薬群では、塩酸ケタミンとドロペリドールは濃度依存性に各活性を阻害したが、フェンタニルは Na^+, K^+ -ATPase 活性と同様に Na^+ -ATPase および K^+ -pNPPase 活性のいずれも阻害しなかった。

3. Na^+, K^+ -ATPase、 Na^+ -ATPase および K^+ -pNPPase 活性に対する 50 % 阻害濃度

各薬物において Na^+, K^+ -ATPase、 Na^+ -ATPase および K^+ -pNPPase 活性に対する 50 % 阻害濃度 (IC_{50} 値) を比較すると、薬物群によって以下の阻害パターンに分けられた。1) バルビタール群では Na^+ -ATPase > K^+ -pNPPase > Na^+, K^+ -ATPase、2) ベンゾジアゼピン群では K^+ -pNPPase > Na^+, K^+ -ATPase > Na^+ -ATPase、3) ドロペリドールおよび塩酸ケタミンでは Na^+, K^+ -ATPase > K^+ -pNPPase > Na^+ -ATPase となり、4) 揮発性麻酔薬においては K^+ -pNPPase 活性が最も低濃度で阻害された (IC_{50} 値が最も低い)。

4. 0 °C での Na^+, K^+ -ATPase 活性と EP 形成量に与える影響

イソフルランおよび塩酸ケタミンでは濃度を変えても EP 形成量はほとんど変化しなかったのに対して、ミダゾラムにおいては濃度依存性に EP 形成量が減少していた。また、塩酸ケタミン存在下ではコントロールに比べ、形成される EP は K^+ 感受性が高く、ADP 感受性が低かった。一方、イソフルラン存在下では EP の K^+ 感受性が低下していた。

5. Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害する強さと臨床的麻酔作用の強さとの関連

揮発性麻酔薬としてさらにトリクロロエチレン、クロロホルムおよびエンフルランについて実験を加え、最小肺胞内麻酔濃度 (minimum alveolar concentration, MAC) と IC_{50} 値との関係をみた。その結果、揮発性麻酔薬の麻酔作用の強さと Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害する強さには強い相関関係 ($r=0.938$) があった。

考 察

1. 全身麻酔薬の作用部位としての Na^+, K^+ -ATPase について

フェンタニルを除くすべての全身麻酔薬および関連薬は濃度依存性に Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害した。また、ハロタンのヒトにおける EC_{50} 値は 0.25 mM という報告があり、本研究に

における IC_{50} 値 (0.28 mM) と近似しており、ハロタンによる Na^+, K^+ -ATPase 活性抑制は麻酔という非生理的状态に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

2. 各薬物群の Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害機構の差異

本実験で用いた全身麻酔薬および関連薬は、薬物群によって Na^+, K^+ -ATPase、 Na^+ -ATPase、 K^+ -pNPPase 活性に対する IC_{50} 値に異なるパターンが認められ、阻害機構はそれぞれの薬物群によって異なることを示唆する。さらに、EP 形成量に対する効果を調べると、ベンゾジアゼピンであるミダゾラムは濃度依存性に EP 形成量を抑制した。このことはミダゾラムが Na^+, K^+ -ATPase への ATP の結合を阻害するか、ATP 結合酵素からの EP の形成を阻害していることを示唆している。一方、揮発性麻酔薬であるイソフルランと塩酸ケタミンにおいては EP 形成は抑制されなかった。そこで、EP の ADP と K^+ に対する感受性について調べたところ、 K^+ に対する感受性がイソフルランでは低下し、塩酸ケタミンでは増加していた。この結果は、イソフルランは EP の K^+ 感受性を低下させることにより、E2P から K^+ 結合酵素への反応過程を阻害した結果 Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害すること、塩酸ケタミンの場合は、KE2 から K^+ が遊離して一連の反応が終了する段階で何らかの阻害作用が行われることを示唆する。

3. 揮発性麻酔薬における IC_{50} 値と MAC 値の間の相関

揮発性麻酔薬において、 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する IC_{50} 値と MAC 値の間に強い相関関係が認められた。他の膜タンパク質においても同様の相関関係が報告されており、揮発性麻酔薬においては広範囲にわたるタンパク質に非特異的に作用することを示唆すると同時に、 Na^+, K^+ -ATPase が全身麻酔薬のタンパク質に対する非特異的あるいは一部特異的作用を調べる上で良いモデルになりうることが示唆された。

4. 全身麻酔における Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害の意義

本研究において化学構造が異なる薬物が共通に Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害し、その阻害機構は薬物群によって異なる可能性を示した。この結果は、 Na^+, K^+ -ATPase 以外の膜タンパク質にも当てはめることができる可能性があり、臨床濃度の全身麻酔薬によって阻害されることから、その作用部位と考えられている種々の膜タンパク質にも同様の研究を進めていく必要がある。その結果は、全身麻酔薬および関連薬の麻酔作用とその他の生体に及ぼす作用の機序を解析する一助になると考えられる。

結 論

1. フェンタニルを除くすべての全身麻酔薬および関連薬は濃度依存性に Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害した。

2. 活性阻害の様式は薬物のカテゴリーごとに異なっており、バルビタール群、ベンゾジアゼピン群、揮発性麻酔薬群およびその他の群に分けられた。
3. バルビタール群については今回その阻害機構を明らかにできなかったが、ベンゾジアゼピン群の薬物は Na^+, K^+ -ATPase の反応サイクルの中でリン酸化反応中間体 (EP) の形成を抑制した。
また、揮発性麻酔薬は EP の K^+ 感受性を低下させさせることによって、E2P から K^+ 結合酵素 (KE2) への反応過程を阻害し、塩酸ケタミンは KE2 から K^+ が遊離して一連の反応が終了する段階で何らかの阻害作用を行っていると考えられた。
4. 揮発性麻酔薬においては、 Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害の強さと麻酔作用の強さとの間には強い相関関係があり、中でもハロタンは臨床濃度で Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害したことから、その活性阻害が全身麻酔という非生理的状态に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。
5. 今後、全身麻酔薬のタンパク質に対する作用機構を明らかにするために、反応機構が良く研究されている Na^+, K^+ -ATPase は良いモデルになると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 島 和 昭
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

全身麻酔薬および関連薬がウサギ脳 Na^+ , K^+ -ATPase に及ぼす影響に関する研究

審査は福島主査、松本および久保木両副査それぞれの口頭試問および筆記試験によって行われた。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

Na^+ , K^+ -ATPase は生体内に普遍的に存在し、多様でかつ重要な機能を有していることから全身麻酔薬の作用部位と想定した研究がなされ、全身麻酔薬によって阻害されるという報告はあるが、その阻害機構あるいは麻酔作用や副作用における意義については明らかではない。したがって、生体に及ぼす作用に種々の相違が認められる全身麻酔に用いる薬物全般の Na^+ , K^+ -ATPase に対する作用を総合的に比較検討することは、 Na^+ , K^+ -ATPase の阻害機構や麻酔作用および副作用における意義を解明する一助になると考えられる。さらに、全身麻酔薬の膜タンパク質あるいは生体に及ぼす作用機構を明らかにし、麻酔機序の解明に寄与することにつながる可能性がある。 Na^+ , K^+ -ATPase は形質膜に存在する酵素としてはその反応機構の解析が進んでおり、本研究では Na^+ , K^+ -ATPase の反応機構の解析結果をもとに、全身麻酔の導入または維持に使用される全身麻酔薬および関連薬全般について Na^+ , K^+ -ATPase に対する作用とその機構を比較検討することを目的として実験を行った。

Jørgensen らの方法に準じて、ウサギ全脳より得られた膜分画から Na^+ , K^+ -ATPase の部分精製を行なった。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性、 Na^+ -ATPase 活性および K^+ -pNPPase 活性は、生成された無機リン量あるいは *p*-nitrophenol 量を定量することにより計測した。また、 ^{32}P -ATP を用いてリン酸化反応中間体 (EP) 量の

測定と、EP の K^+ または ADP に対する感受性を調べた。

その結果、実験に用いたすべての全身麻酔薬および関連薬はフェンタニルを除いて、濃度依存性に Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害した。 Na^+, K^+ -ATPase 活性とその部分反応である Na^+ -ATPase および K^+ -pNPPase 活性に対する 50 % 阻害濃度 (IC_{50} 値) を比較すると、薬物群によって以下の阻害パターンに分けられた。1) バルビタール群では Na^+ -ATPase $>$ K^+ -pNPPase $>$ Na^+, K^+ -ATPase、2) ベンゾジアゼピン群では K^+ -pNPPase $>$ Na^+, K^+ -ATPase $>$ Na^+ -ATPase、3) ドロペリドールおよび塩酸ケタミンでは Na^+, K^+ -ATPase $>$ K^+ -pNPPase $>$ Na^+ -ATPase となり、4) 揮発性麻酔薬においては K^+ -pNPPase 活性が最も低濃度で阻害された (IC_{50} 値が最も低い)。

0 °C での Na^+, K^+ -ATPase 活性と EP 形成量に与える影響では、イソフルランおよび塩酸ケタミンでは濃度を変えても EP 形成量はほとんど変化しなかったのに対して、ミダゾラムにおいては濃度依存性に EP 形成量が減少していた。また、塩酸ケタミン存在下ではコントロールに比べ、形成される EP は K^+ 感受性が高く、ADP 感受性が低かった。一方、イソフルラン存在下では EP の K^+ 感受性が低下していた。

揮発性麻酔薬における最小肺胞内麻酔濃度 (minimum alveolar concentration, MAC) と IC_{50} 値との関係をみたところ、それぞれの麻酔作用の強さと Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害する強さには強い相関関係 ($r=0.938$) があった。

以上の結果は全身麻酔薬および関連薬は、薬物群によって Na^+, K^+ -ATPase を阻害する機構が異なることを示唆する。EP 形成量に対する効果から、ベンゾジアゼピンであるミダゾラムは Na^+, K^+ -ATPase への ATP の結合を阻害するか、ATP 結合酵素からの EP の形成を阻害し、揮発性麻酔薬であるイソフルランは EP の K^+ 感受性を低下させることにより、E2P から K^+ 結合酵素への反応過程を阻害した結果 Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害すること、塩酸ケタミンの場合は、KE2 から K^+ が遊離して一連の反応が終了する段階で何らかの阻害作用が行われることを示唆する。

揮発性麻酔薬において、 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する IC_{50} 値と MAC 値の間に強い相関関係が認められ、揮発性麻酔薬は広範囲にわたるタンパク質に非特異的に作用することを示唆すると同時に、 Na^+, K^+ -ATPase が全身麻酔薬のタンパク質に対する非特異的あるいは一部特異的作用を調べる上で良いモデルになりうることが示唆された。また、本研究における結果は Na^+, K^+ -ATPase 以外の膜タンパク質にも当てはめることができる可能性があり、臨床濃度の全身麻酔薬によって阻害されることから、その作用部位と考えられている種々の

膜タンパク質にも同様の研究を進めていく必要がある。その結果、全身麻酔薬および関連薬の麻酔作用とその他の生体に及ぼす作用の機序を解析する一助になると考えられる。

試問では、本論文の内容とその関連事項について質疑応答がなされたが、これらに対して申請者は本研究から得た知見と文献を引用して適切な解答を行った。その結果、本研究において全身麻酔薬および関連薬の Na^+, K^+ -ATPase 阻害機構が薬物群によって異なることを見出したことは、今後の全身麻酔の機序解明に対して、極めて有意義な研究であることが認められた。

以上より、審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位授与に相応しいと認定した。