

学 位 論 文 題 名

電子スピン共鳴法を用いた全身麻酔薬の
作用機序に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的】全身麻酔薬の作用機序の詳細は未だに不明である。我々は、全身麻酔薬が特定のタンパク質を標的とするのではなく、脂質およびタンパク質を含めた生体膜の構造あるいは物性の変化を引き起こして作用すると考え、その変化の実態を、電子スピン共鳴（ESR）法を用いて解明することを目的に本研究を行った。ESR法は物質中の電子がもつ磁気の運動を使って電子周囲の環境を調べる方法である。今回は安定なラジカルを持つスピンラベル剤を用いて、その周囲の環境に及ぼす全身麻酔薬の影響を検討した。

【方法】スピンラベル剤として、脂質に類似した構造をもつ 5-DSA と 16-DSA の二種類を用いた。全身麻酔薬としてセボフルレン、イソフルレン、ハロセン、エーテル、プロポフォール、サイアミラルを用い、エタノールの効果も調べた。麻酔薬は、臨床で用いた際に測定された血中濃度と同程度の濃度を臨床濃度とし、1～1000 倍になるように加えた。最初、膜タンパク質である Na,K-ATPase に直接スピンラベル剤を導入してスペクトルを測定したところ、その解析が極めて困難であった。そこで、単純な環境から段階的に測定系を積み上げていくこととし、メタノール、水、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）水溶液、ホスファチジルコリンリポソーム水溶液、Na, K-ATPase 及びマイクロソーム分画中に含まれる膜タンパク質を含んだリポソーム溶液の各溶液をラベル剤の周囲環境として用いた。得られた ESR スペクトルの線形変化、スペクトルを基に算出されるオーダーパラメーター S および回転相関時間 τ の3つの指標により麻酔薬による変化を解析した。オーダーパラメーター S はラジカルの可動域を示すもので、膜構造をとる物質に組み込んだ場合、膜の流動性を示す指標となる。0 から 1 の値をとり、0 に近いほど膜がやわらかいことを示す。また、回転相関時間 τ はラジカルの回転運動の速さを示す。

【結果と考察】

- 1) 5-DSA を Na,K-ATPase にラベルして得られたスペクトルの線形は全体にブロードであり、ラジカルの動きが遅く、運動方向が制限されていることを示したが、それ以上の解析が困難であった。
- 2) メタノール溶液中での 5-DSA および 16-DSA のスペクトルはいずれもシャープな

3本のシグナルを示し、麻酔薬を添加してもスペクトルの変化はみられなかった。

3) 水溶液中では 5-DSA、16-DSA のいずれのスペクトル強度もメタノール溶液中に比べて著しく減弱し、脂質様分子である DSA が水溶液中で会合体を形成したため、ラジカルが空間的に接近してスピンスピン相互作用が生じたことを示唆した。麻酔薬を加えると、臨床濃度ではスペクトル強度が軽度回復したが、高濃度では再び減少し、麻酔薬による DSA の周囲環境の変化を検出できた。

4) 臨界ミセル濃度以上での SDS 水溶液中ではスペクトルの強度が回復し、DSA が SDS ミセル中に入り込んでスピンスピン相互作用を生じない程度の距離に分散したことを示唆した。SDS ミセルを生体膜のモデルとし、麻酔薬による ESR パラメーターの変化を測定した。スペクトルの線形が変化するかどうかとその程度は、麻酔薬の種類によって異なった。S の値は、ハロセン、エーテル、エタノール、プロポフォル、サイアミラルでは変化量は小さいものの有意に変化したが、セボフルレン、イソフルレンでは変化しなかった。また、ハロセン、エーテル、エタノール、サイアミラルでは τ が有意に変化したが、セボフルレン、イソフルレン、プロポフォルでは変化しなかった。変化の程度はスピンラベル剤の種類や加えた麻酔薬の種類によって異なり、麻酔作用を示すという共通点があっても麻酔薬の種類によりスピンラベル剤周囲の環境変化の程度が異なることが示された。

5) 5-DSA を組み込んだ多重層リポソームの ESR スペクトルは、SDS 水溶液中のスペクトルに比べてラジカルの運動に異方性があり、回転運動の速さが遅いことを示した。16-DSA を組み込んだ標本のスペクトルは 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 τ 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り、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 τ 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。

6) 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 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。 τ 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。

【結語】

1. ESR スペクトルの測定により、麻酔薬の添加によるスピンラベル剤周囲の環境の変化を検出した。変化の程度は添加した麻酔薬の種類により異なっていた。
2. 5-DSA と 16-DSA のラジカルは脂質二重モデル膜の異なる部分に存在することを示した。
3. 麻酔薬は脂質二重膜の表層にとどまっており、膜深層のみならず、比較的表層にも影響を及ぼさないことが示された。
4. 今回作成した脂質とタンパク質の重量比で Na,K-ATPase と microsome 膜タンパク質を再構成しても、リポソーム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。
5. 最も重要な結論は麻酔薬が生体モデル膜の内部に入らなかったことであり、これは麻酔薬が膜の内部に入るという仮説を否定するものである。現在、さらに研究を継続している。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	福 島 和 昭
副 査	教 授	鈴 木 邦 明
副 査	教 授	赤 池 忠
副 査	助教授	平 沖 敏 文

学 位 論 文 題 名

電子スピン共鳴法を用いた全身麻酔薬の 作用機序に関する研究

審査は、担当者全員が出席して提出論文の内容ならびに関連事項について、口頭試問により行われた。はじめに学位申請者に対し、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。

全身麻酔薬が脂質およびタンパク質を含めた生体膜の構造あるいは物性の変化を引き起こして作用するのではないかと考え、その変化を電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いて解析することを目的として研究を行った。具体的には脂質様構造をもつ 5-doxyl stearic acid(5-DSA)と 16-doxyl stearic acid(16-DSA)の2種類のスピンラベル剤を用いて ESR スペクトルを測定し、ラベル剤周囲の環境に及ぼす全身麻酔薬の影響を検討した。全身麻酔薬としてセボフルレン、イソフルレン、ハロセン、エーテル、プロポフォール、サイアミラルを用い、エタノールの効果も調べた。ラベル剤の周囲環境として、メタノール、水、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液、ホスファチジルコリンリポソーム水溶液、Na,K-ATPase 及びミクロソーム分画を含んだリポソーム溶液を用いた。得られた ESR スペクトルの線形変化、スペクトルを基に算出されるオーダーパラメーター (S) および回転相関時間 (τ) の3つの指標により麻酔薬による変化を解析した。Sは膜構造をとる物質に組み込んだ場合、膜の流動性を示す指標となり、 τ はラベル剤中のラジカルの回転運動の速さを示す。

最初に Na,K-ATPase に 5-DSA を直接ラベルして麻酔薬の作用を調べようと試みたが、得られたスペクトルの線形が複雑であり解析が困難であったため溶媒中でのスペクトルの解析から始めた。メタノール溶液中では 5-DSA、16-DSA いずれもシャープな3本のシグナルを示し、麻酔薬を添加してもスペクトルの変化はみられなかった。水溶液中ではメタノール溶液

中より強度が著しく減弱し、DSA が会合体を形成してスピンスピン相互作用が生じたことを示した。麻酔薬の添加によりその濃度に依存した DSA の周囲環境の変化を検出できた。臨界ミセル濃度以上での SDS 水溶液中ではスペクトル強度が回復し、DSA が SDS ミセル中に入り込んで相互作用を生じない距離に分散したことを示した。1 %SDS 水溶液中におけるスペクトルの線形および S や α に対する麻酔薬の作用は麻酔薬の種類によって異なり、麻酔作用を示すという共通点があってもラベル剤周囲環境に対する作用は異なることが示された。

5-DSA および 16-DSA を組み込んだ多重層リポソームの ESR スペクトルの線形と S の値は大きく異なり、5-DSA のラジカルは二重膜の比較的表層、16-DSA は深層と異なる部分にあることを示した。麻酔薬を添加するとスペクトル強度が増大するものも存在したが、いずれの麻酔薬も膜流動性の指標となる S や α 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留まり、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ても結果は多重層の場合と同様であり、得られた結果はリポソーム膜の形態に影響されないことが示された。さらに、より生体に近いモデル膜として Na, K-ATPase あるいはミクロソーム分画を組み込んだリポソームを作成して実験を行っても同様の結果が得られ、今回の実験条件で Na, K-ATPase あるいはミクロソーム分画をリポソームに再構成しても、膜中での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は影響を及ぼさないことが示された。

最も重要な結論は麻酔薬が生体モデル膜の内部に入らなかったことであり、従来提唱されてきた麻酔薬が膜の内部に入るという仮説を否定するものである。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、従来提出されてきた全身麻酔薬の作用機構と今回の研究結果との関連、麻酔薬の作用機構の解析にスピンラベル法を導入した背景、電子スピン共鳴スペクトルの結果の解釈とその意義、リポソームにおいて麻酔薬が浸透している部位の決定法など多岐にわたったが、いずれの質問に対しても学位申請者から適切かつ明快な回答が得られた。また、申請者が確立した解析法を、細胞膜タンパク質を含めた生体膜に対する麻酔薬の作用の解析へと発展させていく研究を進行中で、今後の研究の方向性と将来の展望などについても明確な方針が示された。

本論文の内容は高いレベルにあり、今後の全身麻酔薬の作用機序解明を目指す研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるのにふさわしいと認められた。