

モデル生体膜を用いた吸入麻酔薬の作用機序に関する 磁気共鳴による研究

学位論文内容の要旨

【目的】全身麻酔薬は脂質及びタンパク質を含めた生体膜の構造あるいはその物性を変化させることにより作用するという立場から、モデル生体膜としてリポソームを作成し、吸入麻酔薬の影響を電子スピン共鳴 (ESR) 法および ^{19}F の核磁気共鳴 (^{19}F -NMR) を用いて検討した。

【方法】ホスファチジルコリン (PC) として, DPPC, DMPC, DOPC および EYPC を用いた。リポソームは PC のみを構成成分とした多重層 (MLV), 及び大, 小単層膜 (LUV, SUV), さらに PC に Na, K-ATPase を再構成した LUV を作成した。実験に応じてリポソームにスピンラベル剤 (5-DSA, 16-DSA, HGSL) を組み込んだ。吸入麻酔薬はセボフルレンおよびイソフルレンを用いた。 ^{19}F -NMR によりイソフルレンの濃度を決定した。ESR スペクトルの線形とその線形から計算されるオーダーパラメーター (S) および回転相関時間 (τ) によりリポソーム膜の流動性の変化を推定した。 ^{19}F -NMR スペクトルの線形, longitudinal relaxation time (T_1) および transverse relaxation time (T_2) からイソフルレンとリポソームの相互作用を検討した。また, リポソームに 5-DSA か 16-DSA を混入することでイソフルレンに対するニトロキシドラジカルの常磁性効果も観察した。

【結果と考察】DPPC (SUV) および DMPC (MLV) において, 5-DSA では pretransition の温度 (T_{pre}) 付近で膜の流動性の大きな増加がみられ, 16-DSA では main transition の温度 (T_c) 付近で膜の流動性の大きな増加がみられた。ラジカルの位置から予想されたように 16-DSA はリポソームの深部の環境を, 5-DSA は表層付近の環境をモニターしていることが示された。DOPC (MLV) および EYPC (MLV) においては, 5-DSA, 16-DSA とともに温度の上昇に伴い膜の流動性が増加したが, 特定の温度域での急激な変化は見られなかった。

DMPC (MLV) に高濃度の麻酔薬を添加した実験では, T_c 付近で S および τ の大きな変化が消失して, 測定温度域全体で温度に依存した緩やかな減少を示した。両麻酔薬は低温においてリポソーム膜の流動性を増加させたが, 温度の上昇に伴って麻酔薬の作用が低下した。また, 16-DSA の τ をイソフルレンはセボフルレンに比べて約 30% 強く低下させた。DOPC (MLV) と EYPC (MLV) に高濃度の麻

酔薬を添加した実験では、Sに対する高濃度のセボフルレンとイソフルレンの影響は非常にわずかであったが、低温域で作用が強いことと、セボフルレンよりイソフルレンの作用が強い傾向を示した。両麻酔薬により DOPC (MLV) の 16-DSA の τ が短くなり、ニトロキシドラジカルの回転運動速度を増加させることを示した。また、その効果は低温においてより強く、セボフルレンよりイソフルレンの作用が顕著であった。高濃度のイソフルレンは、50°Cのような高温ではほとんど 5-DSA あるいは 16-DSA の環境に影響を与えないが、低温になるとどちらに対しても影響を与えたことから、吸入麻酔薬は膜の深部よりも表層付近での作用が強いものの、ある程度内部にまで作用が及ぶことを示唆した。

5-DSA と 16-DSA の場合は、イソフルレン 26 mM でのみ S, τ ともに変化がみられたが、それ以下の濃度では変化がみられなかった。しかし、HGSL/ LUV にイソフルレンを添加した実験では、イソフルレン 1.7 mM でも S の減少がみられた。この結果は、イソフルレンが膜の疎水部よりも表層に対する作用が強いことを示す。5-DSA/ MLV, 16-DSA/ MLV および HGSL/ MLV に対するイソフルレンの影響をみると、S の変化量は HGSL, 5-DSA, 16-DSA の順に減少し、 τ の変化も 16-DSA に比べて HGSL で大きいことが示された。これらの結果はイソフルレンが膜の表層に強く作用し、深部に進むに従ってその作用が弱くなることを示している。

5-DSA/ Na, K-ATPase, 16-DSA/ Na K-ATPase および HGSL/ Na, K-ATPase に対するイソフルレンの影響を調べた。イソフルレンの添加により膜の流動性は減少したが、その変化は Na, K-ATPase を再構成していない PC 単独のリポソームの結果とほとんど変わらなかった。

次に、 ^{19}F -NMR を用いることでリポソーム膜と相互作用するイソフルレンを直接観察し、イソフルレンの膜に対する作用部位を検討した。はじめに solution A 中の TFA とイソフルレンの ^{19}F -NMR スペクトルよりイソフルレンの溶液中の濃度を決定した。その結果、上記の実験で使用した、添加量としては臨床濃度の 1000 倍濃度 (高濃度) となる溶液は 26 mM であり、過飽和の状態であることが判明した。

イソフルレンに対する EYPC (LUV) の影響から、イソフルレンは CF_2H 基がリポソームに向いて結合しており、リポソーム上でフリーなイソフルレン分子と化学交換をしていることが示された。イソフルレンに対する 5-DSA および 16-DSA のニトロキシドラジカルの常磁性効果を調べた。16-DSA/ LUV または 5-DSA/ LUV の添加によりイソフルレンの ^{19}F -NMR スペクトルは EYPC (LUV) を添加したイソフルレンと比べより広い線形となり、 T_1 , T_2 の値はともに小さくなった。16-DSA よりも 5-DSA の影響を強く受けていることから、イソフルレンは 16-DSA よりも 5-DSA の近く、つまり膜の表層側に存在していることが示された。

イソフルレンに対する Na, K-ATPase/ LUV の影響を見ると、EYPC (LUV) を添加したときと比べて T_1 ではあまり大きな変化がみられなかったが、 T_2 は小さく

なり、イソフルレンが Na, K-ATPase に結合している可能性を示唆した。

結論

1. 5-DSA はリポソームの分子表面付近に位置し、16-DSA は深部に存在して各々の部位の環境を反映することを示した。
2. DMPC, DPPC のリポソーム膜の深部では T_c で膜の流動性が大きく増加し、表層付近では T_c と T_{pre} で膜の流動性が大きく増加した。
3. DMPC, DOPC, EYPC の MLV および DPPC の SUV の膜の流動性は、同じ液晶相では PC の種類および麻酔薬の有無に係わらず温度の上昇に依存して増加した。
4. 飽和脂肪酸の相転移温度を麻酔薬は低温にシフトさせた。リポソーム膜の流動性に対する作用においては、イソフルレンがセボフルレンに比べて強かった。
5. ^{19}F -NMR の測定により、溶液中でのイソフルレンの濃度を決定することができた。
6. イソフルレンは CF_2H 基がリポソームに向いて結合しており、リポソーム上でフリーなイソフルレン分子と化学交換をしていることを示した。この結果は DSA のニトロキシドラジカルの常磁性効果によっても支持された。
7. イソフルレンが Na, K-ATPase に結合している可能性を示唆した。
8. イソフルレンの膜の流動性に対する影響は、膜の表層に強く作用し、深部に進むに従ってその作用が弱くなることを示した。

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

モデル生体膜を用いた吸入麻酔薬の作用機序に関する 磁気共鳴による研究

審査は、福島、鈴木、赤池および平沖の各審査担当者が学位申請者に対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。

全身麻酔薬は脂質及びタンパク質を含めた生体膜の構造あるいはその物性を変化させることにより作用するという立場から、モデル生体膜としてリポソームを作成し、吸入麻酔薬の影響を電子スピン共鳴 (ESR) 法および ^{19}F の核磁気共鳴 ($^{19}\text{F}\text{-NMR}$) 法を用いて検討した。モデル生体膜としてスピンラベル剤を組み込んだリン脂質 (PC) によるリポソームを作成し、吸入麻酔薬のセボフルランとイソフルランの作用を検討した。リン脂質は DPPC、DMPC、DOPC、EYPC を用いた。スピンラベル剤は脂質類似構造をもつ HGSL、5-DSA、16-DSA を用いた。膜タンパク質はウサギ脳のマイクロソームか Na, K-ATPase を用いた。ESR スペクトルの線形とその線形から計算されるオーダーパラメーター (S) および回転相関時間 (τ) によりリポソーム膜の流動性の変化を推定した。NMR スペクトルの線形、化学シフト、縦緩和時間 (T_1)、横緩和時間 (T_2) からイソフルランに対する EYPC リポソームの相互作用を検討した。さらに、リポソームに 5-DSA か 16-DSA を混入することでイソフルランに対するニトロキシドラジカルの常磁性効果も観察した。また、三フッ化酢酸 (TFA) を用いて $^{19}\text{F}\text{-NMR}$ によるイソフルランの濃度を決定することを試みた。

その結果、下記の結論が導き出された。

1. 5-DSA はリポソームの分子表面付近に位置し、16-DSA は深部に存在して各々の

部位の環境を反映することを示した。

2. DMPC、DPPC のリポソーム膜の深部では T_c で膜の流動性が大きく増加し、表層付近では T_c と T_{pre} で膜の流動性が大きく増加した。
3. DMPC、DOPC、EYPC の MLV および DPPC の SUV の膜の流動性は、同じ液晶相では PC の種類および麻酔薬の有無に係わらず温度の上昇に依存して増加した。
4. 飽和脂肪酸の相転移温度を麻酔薬は低温にシフトさせた。リポソーム膜の流動性に対する作用においては、イソフルランがセボフルランに比べて強かった。
5. 各種ラベル剤周囲のリポソーム膜の流動性に対するイソフルランの影響をみると、HGSL、5-DSA、16-DSA の順に強いことが示された。これはイソフルランが膜の表層に強く作用し、深部に進むに従ってその作用が弱くなることを示している。
6. HGSL/LUV にイソフルランを添加した実験では、MLV では変化がみられなかったイソフルラン 1.7 mM でも S の減少がみられ、これはイソフルランが膜の疎水部よりも表層に対する作用が強いことを示している。
7. Na, K-ATPase を再構成した LUV に対するイソフルランの影響をみると、イソフルランの添加により膜の流動性は減少したが、その変化は Na, K-ATPase を再構成していない PC 単独のリポソームの結果とほとんど変わらなかった。
8. ^{19}F -NMR の測定により、溶液中でのイソフルランの濃度を決定することができた。
9. イソフルランは CF_2H 基がリポソームに向いて結合しており、リポソーム上でフリーなイソフルラン分子と化学交換をしていることを示した。この結果は DSA のニトロキシドラジカルの常磁性効果によっても支持された。
10. イソフルランが Na, K-ATPase に結合している可能性を示唆した。

試問では、本論文の内容とその関連事項について、吸入麻酔薬の作用機序に関する最近の説およびそれに対する申請者の考えについての質疑応答がなされた。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回答を行った。また、本研究では生体膜に対する吸入麻酔薬の作用部位と脂質の流動性に対する影響を検討するに留まったが、これからの展望として、Na, K-ATPase を含む膜たんぱく質の機能に対する吸入麻酔薬の影響を検討する旨が報告された。

本研究は、イソフルランがリポソーム膜の表層に結合して化学交換を行っており、その膜の流動性に対する影響は膜の表層に強く作用し、深部に進むに従ってその作用が低下することを示した。これは吸入麻酔薬の作用部位を示す研究のひとつとして大変有意義なものであると考えられ、今後更なる発展が期待できる研究と考えられる。

以上より、審査委員は全員、本研究が学位論文に十分値し、申請者が博士（歯学）の学位授与に相応しいと認定した。