

学 位 論 文 題 名

Mechanism for propofol inhibition of
 Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat brain(Propofolによるラット脳 Na^+ , K^+ -ATPase活性阻害機構)

学位論文内容の要旨

【緒言】

Propofol は短時間作用型の静脈麻酔薬として全身麻酔の導入維持, 集中治療室での鎮静及び歯科治療における静脈内鎮静法など, 臨床で広く用いられているが, 麻酔作用に関しては未だ不明な点が多い. Na^+ , K^+ -ATPase は生体内に普遍的に存在し, 神経細胞の興奮性の維持など基本的な細胞の機能に関与する. そこで我々は, propofolによる Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害が脳の機能変化に関係し, 麻酔状態や副作用に関連する可能性があると仮説を立てた. Propofol による Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害の報告は1報あるが, その機構については研究されていないため, Na^+ , K^+ -ATPase の反応機構に基づいた propofol による活性阻害機構の解明を目的として本研究を行った.

【材料と方法】

Jorgensen らの方法に従ってラット全脳から抽出したミクロソームを精製して得た Na^+ , K^+ -ATPase を材料とした. Propofol (2, 6-Diisopropylphenol)は水に不溶なため, 吸光度測定分析が可能となるように0.2%の濃度でdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解後水で希釈し実験に用いた. ATP 加水分解の結果生成された無機リン量をChifflet 法に従って定量した. 反応液に各種濃度のpropofolを加えたときの影響から, Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害のpropofol濃度依存性を調べた. また, Na^+ , K^+ -ATPase 活性の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} およびATP濃度依存性に対するpropofolと溶媒として用いたDMSOの影響を調べた. さらに, 部分反応である Na^+ -ATPase 活性の Na^+ 濃度依存性および K^+ -pNPPase 活性の K^+ 濃度依存性に対するpropofolの作用を調べた. 加えて, propofolによる Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害の可逆性を検討するため, propofolの希釈による活性回復実験を行った.

【結果】

Na^+ , K^+ -ATPase 活性および Na^+ -ATPase 活性はpropofolの濃度に依存して低下し, 1.03 mMでほぼ完全に抑制された. 50%活性阻害濃度(IC_{50})は約0.26 mMであった.

Propofol 非存在下の Na^+ , K^+ -ATPase 活性は Na^+ , K^+ , Mg^{2+} 及びATPの濃度に依存して増加し, Hill plotの結果, Na^+ , K^+ , および Mg^{2+} に対する50%活性化濃度($[\text{S}]_{0.5}$)はそれぞれ12.6, 1.5および0.43 mMであった. Propofolは, 濃度依存的に Na^+ , K^+ , Mg^{2+} およびATP濃度を変化させた際の

最大活性(V_{max})を減少させた。一方, $[S]_{0.5}$ に対する影響は一様ではなく, 0.35 mM の propofol 存在下での Na^+ に対する $[S]_{0.5}$ を約 2 倍に増加させ, K^+ に対しては 3 分の 2 に減少させ, Mg^{2+} に対しては顕著な影響を与えなかった。

ATP 濃度依存性の結果を Lineweaver-Burk の二重逆数プロットにより解析すると, propofol や DMSO の有無に関わらず直線は折れ曲がり, それぞれの x 切片と y 切片の値から ATP に対する高・低二つの K_m と V_{max} が計算された。Propofol は濃度依存的に V_{max} を減少させる一方, 両親和性部位の K_m を減少させたことから ATP に対する親和性は増加した。

部分反応の Na^+ -ATPase 活性および K^+ - $pNPPase$ 活性は Na^+ , K^+ -ATPase 活性と同様に propofol により阻害され, Na^+ -ATPase 活性および K^+ - $pNPPase$ 活性ともに V_{max} が減少し, 親和性の変化が認められた。

完全に活性が抑制される 1.03 mM propofol で処理したのちに propofol 濃度を希釈したところ, 最終 propofol 濃度に依存して活性は回復し, 20 倍希釈で 60% の回復が認められた。この過程は温度の影響を受けなかった。

【考察】

Propofol は濃度依存的に Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害し, 完全な阻害濃度は 1.03 mM であった。Propofol によるイヌ腎髄質の Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害濃度を 73–800 μM とする報告があるが, 作用機序については検討されていなかったため, Na^+ , K^+ -ATPase の反応機構に基づき解析を行った。

Post-Albers の反応機構では, Na^+ , K^+ -ATPase は Na^+ および Mg^{2+} 存在下で ATP を加水分解し, ATP の γ 位のリン酸を結合したリン酸化酵素 EP を形成する。ADP と反応して ATP を合成しうる E1P が Na^+ を細胞外に遊離すると K^+ に感受性の高い E2P となる。 K^+ の非存在下で E2P の自然加水分解により無機リンを遊離するのが, 部分反応の Na^+ -ATPase 活性である。 K^+ の存在下では, K^+ が E2P に結合して脱リン酸化すると KE_2 となり, $pNPP$ を加水分解する部分反応である K^+ - $pNPPase$ 活性を示す。Post-Albers の反応機構から, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} および ATP によって Na^+ , K^+ -ATPase 活性は調節されている。Propofol がどの段階で Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害するのかを調べるため, Na^+ , K^+ -ATPase 活性の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} および ATP の濃度依存性に対する propofol の作用について調べた。Propofol は濃度依存的に Na^+ , K^+ , Mg^{2+} および ATP 全てに対する活性の V_{max} を低下させたことから, 反応の特定の過程ではなく, 全体に影響を与えることが示唆された。また, propofol は ATP の高低両親和性部位および K^+ に対する親和性を増加させ, Na^+ に対しては低下させ, Mg^{2+} に対しては変化を与えなかった。 V_{max} を低下させる一方でリガンドに対する親和性に影響を与えることから, その様式は拮抗型や非拮抗型ではなく混合型の酵素阻害であることが示唆された。

Propofol は全反応と同様に部分反応を阻害した。この結果も propofol は Na^+ , K^+ -ATPase 反応の特定の過程ではなく, 全過程に影響することを支持する。また活性の回復実験から, propofol の濃度が低下すると propofol は Na^+ , K^+ -ATPase から離れて活性が回復することが明らかになった。Propofol による Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害は *in vivo* でも可逆的であると推測され, 生体の麻酔からの覚醒に必要な要件である。

本実験の結果から 65 μM の propofol 存在下では Na^+ , K^+ -ATPase の 29% が阻害されていた。麻

酔に必要とされる propofol 濃度に関しては議論があるが, 麻酔維持中の血漿を採取して HPLC 法により propofol 濃度を測定すると, 皮膚切開, 腹膜切開, 腹壁牽引に必要な血漿 propofol 濃度はそれぞれ 72, 96, 109 μM であると報告されている. 同じ濃度域で $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ 活性の約 30% が阻害されることから, この阻害が麻酔作用に関係する可能性があると考えられた. 100 μM 相当の濃度の propofol が 10-20% の過分極作動性 H チャネルを抑制するという報告も, 我々の見解を支持する.

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 船 橋 誠

学 位 論 文 題 名

Mechanism for propofol inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat brain

(Propofolによるラット脳 Na^+ , K^+ -ATPase活性阻害機構)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。主査、副査の前で申請者が提出論文の内容をスライド形式で発表し、ついでその内容および関連分野について主査、副査が口頭により諮問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

Propofol は短時間作用型の静脈麻酔薬として臨床で広く用いられているが、麻酔作用に関しては未だ不明な点が多い。 Na^+ , K^+ -ATPase は生体内に普遍的に存在し、神経細胞の興奮性の維持など基本的な細胞の機能に関与する。そこで、propofol による Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害が脳の機能変化に関係し、麻酔状態や副作用に関連する可能性があるとの仮説を立てた。Propofol による Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害の報告は1報あるが、その機構については研究されていないため、 Na^+ , K^+ -ATPase の反応機構に基づいた propofol による活性阻害機構の解明を目的として本研究を行った。

得られた結果と考察は以下の通りである。

- ① Propofol は濃度依存的に Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害し、完全な阻害濃度は 1.03 mM であった。
- ② Propofol は濃度依存的に Na^+ , K^+ , Mg^{2+} および ATP 全てに対する活性の V_{\max} を低下させたことから、反応の特定の過程ではなく、全体に影響を与えることが示唆された。また、propofol は V_{\max} を低下させる一方でリガンドに対する親和性に影響を与えることから、混合型の酵素阻害様式であることが示唆された。
- ③ Propofol は全反応と同様に部分反応を阻害した。この結果も propofol は Na^+ , K^+ -ATPase 反応の特定の過程ではなく、全過程に影響することを支持する。また活性の回復実験から、propofol の濃度が低下すると propofol は Na^+ , K^+ -ATPase から離れて活性が回復することが明らかになった。Propofol による Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害は *in vivo* でも可逆的であると推測され、このことは生体の麻酔からの覚醒に必要な要件を満たしている。

④ 臨床的に麻酔に必要とされる propofol 濃度に関しては議論があるが、65 μM で Na^+, K^+ -ATPase 活性の約 30%が阻害されることから、この阻害が麻酔作用に関係する可能性があると考えられた。

Na^+, K^+ -ATPaseは生体内で基本的な細胞の機能に関与し、神経細胞においてはATPの約70%が消費されている。 Na^+, K^+ -ATPaseは細胞内外のイオン濃度勾配を形成するため、ATP加水分解エネルギーを用いて3分子の Na^+ を細胞外にくみ出し、2分子の K^+ を細胞内に取り入れる。心筋において強心配糖体ジギタリスが、 Na^+, K^+ -ATPase 活性の抑制の結果として $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換体による Ca^{2+} 排出遅延から心筋収縮力を増大させ、強心作用を呈するのは既知の事実であるが、同様に脳においても、 Na^+, K^+ -ATPaseがpropofolにより阻害されると、細胞内 Na^+ が増加し、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換系が働くことで Ca^{2+} が細胞内情報伝達系の変化に関与すると考えられる。 Na^+, K^+ -ATPaseは Na^+ と K^+ の能動輸送を担っているだけでなく、それにより維持される Na^+ 濃度勾配を駆動力とする活動電流の発生やイオン交換系を介して Ca^{2+} や H^+ の細胞内濃度の調節などにも重要な働きを果たしている。申請者は研究の立案と実行に基づいた明晰なデータとともに、propofolによる Na^+, K^+ -ATPase活性阻害機構を明らかにした。研究遂行および結果評価について十分な能力があることが認められた。また、本研究はこの分野での新しい知見を提供しており、生体に作用する薬物の作用機構を理解するうえでも極めて有用だと考えられた。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。主な質問内容は、

1. 麻酔作用に関連して、 Na^+, K^+ -ATPase の阻害を調べた理由
2. 麻酔の定義に関して
3. Na^+, K^+ -ATPase と全身麻酔薬、局所麻酔薬との関連性
4. 酵素阻害様式に関する知識
5. Na^+, K^+ -ATPase と反応機構
6. Propofol の臨床濃度と本実験の濃度の比較
7. 今後の研究の展開と将来の展望

これらの質問に対して、積極的な議論が行われ、申請者は適切に回答した。

審査担当者との質疑応答をとおして、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分になされており、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展、今後の研究が期待された。審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与する十分な学識・資質を有しているものと認めた。