

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11740

研究課題名(和文) 生体モデル膜および培養細胞における全身麻酔薬の作用部位に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the target of general anesthetics on biological model membranes and cultured cells

研究代表者

渋谷 真希子 (Shibuya, Makiko)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30399951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：揮発性麻酔薬の作用機構を明らかにすることを目的として、神経細胞の興奮性の維持に關与する脳内Na,K-ATPase活性に対するdesflurane, sevofluraneおよび isofluraneの作用を検討した。多くの静脈麻酔薬と同様に、揮発性麻酔薬もNa,K-ATPase活性を抑制し、全身麻酔薬の多様な作用にNa,K-ATPase活性の抑制も關与している可能性が示された。19F-NMRを用いた研究で、揮発性麻酔薬は生体膜モデルであるリポソーム膜の表層に結合して内部には入らないこと、揮発性麻酔薬の膜の流動性に対する影響は膜の表層での作用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膨大な研究の蓄積があるのに全身麻酔薬の作用機構は不明な点が多い。本研究において、脳内で重要な機能に關与するNa,K-ATPaseとMg-ATPase活性を揮発性麻酔薬及び静脈麻酔薬が抑制することを明らかにした。また、申請者がESR(電子スピン共鳴)法により報告した「全身麻酔薬は生体膜の表層で作用する」という仮説を、NMR(核磁気共鳴)を用いた研究により確認した。物理・化学的な測定法と生物学的な解析を融合した申請者の研究手法は、今後の全身麻酔薬の作用機構の研究において新たな視点を提供した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of desflurane, sevoflurane and isoflurane on intracerebral Na,K-ATPase, which is related to maintain excitability of nerve cells, to elucidate the reaction mechanism of inhalational anesthetics. We found that inhalational anesthetics inhibited Na,K-ATPase activity as intravenous anesthetics did, suggesting that inhibition of Na,K-ATPase activity is related to the various pharmacological effects of general anesthetics. We also found that inhalational anesthetics are present in the outer surface of liposome as model of biomembrane and do not enter inside the liposome by 19F-NMR study, suggesting that the effects of general anesthetics on membrane fluidity are caused by interaction with surface of membrane.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：揮発性麻酔薬 静脈麻酔薬 NMR(核磁気共鳴)スペクトル 生体膜モデル リポソーム Na,K-ATPase Mg-ATPase パルピツール酸系薬物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身麻酔薬の作用機構は確定されていない

全身麻酔薬はその臨床的重要性から膨大な量の研究が積み上げられてきているが、未だにその作用機構については確定されていない。申請者は、全身麻酔薬が生体膜の脂質の構造変化を引き起こし、そのことが麻酔作用に大きく寄与していると考えており、本研究を計画した。

(2) 申請者らの研究成果から

申請者は、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルの解析から、麻酔薬はリポソーム膜の流動性を変化させるが外側に存在して内部には入らないこと、膜タンパク質の存在は麻酔薬の作用に影響を及ぼさないこと、静脈麻酔薬と吸入麻酔薬では作用が異なることを示唆する結果を得た。この仮説を、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの解析から確認することを計画した。

Na,K-ATPase や Ca-ATPase などの形質膜の酵素が全身麻酔の濃度域で吸入麻酔薬によって抑制されること、各種麻酔薬の抑制作用の強さと MAC 値の間には強い相関があることを明らかにした。本研究では、脳内の ATPase に対する揮発性及び静脈麻酔薬の作用を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

申請者らの過去の研究成果をベースに (1) リポソームを生体膜モデルとした系で, isoflurane を用いて得られた結果が吸入麻酔薬全般に適用可能なのか検討する, (2) 電子スピン共鳴スペクトルに対する作用から得られた吸入麻酔薬と静脈麻酔薬のリポソームに対する作用の相違に関して、核磁気共鳴スペクトルの測定及び Na,K-ATPase に対する作用から検証する, (3) 神経系細胞において重要な機能を担う Na,K-ATPase をモデルとして、その分子構造やイオン輸送機能に及ぼす麻酔薬の影響を検証する, (4) 培養細胞を用いて、膜タンパクの機能に対する麻酔薬の作用を検証する。

3. 研究の方法

(1) リポソームの作成

生体膜構成脂質である egg yolk phosphatidyl choline を用いて多重層脂質二重層膜 (リポソーム) を作成し、スピラベル剤である 5-doxy stearic acid (5-DSA) あるいは 16-doxy stearic acid (16-DSA) を混入する。

(2) ¹⁹F-NMR スペクトルの測定による揮発性麻酔薬とリポソーム膜との位置関係及び作用についての解析

Desflurane 及び sevoflurane の ¹⁹F-NMR スペクトルを測定し、スペクトルの化学シフト、線幅、スペクトルから計算される縦緩和時間及び横緩和時間を測定することにより、吸入麻酔薬とリポソーム膜との位置関係、さらには 5-DSA 及び 16-DSA の影響からリポソームの深層及び表層に対する麻酔薬の作用を評価する。

(3) Na,K-ATPase 及び Mg-ATPase 活性に対する麻酔薬の作用

ラット及びウサギ脳の Na,K-ATPase 及び Mg-ATPase を精製して使用し、ATPase 反応の結果生じた Pi を Chifflet 法により定量して ATPase 活性を測定する。麻酔薬を添加して ATPase 活性を測定することにより、麻酔薬の作用を評価する。

水系溶媒中での揮発性麻酔薬の濃度決定は極めて困難であり、揮発性麻酔薬の作用の検討において障害となる。そこで、VOC センサー (volatile organic compound sensing) を使用した簡便な濃度決定法を開発すること、及び ¹⁹F-核磁気共鳴 (NMR) スペクトルの測定による麻酔薬濃度決定を導入する。

(4) 培養細胞を用いた細胞レベルでの全身麻酔薬の評価

株化された培養神経細胞に対する各種全身麻酔薬の細胞不活性化作用を、細胞内 ATP 量を測定する方法で調べ、細胞レベルでの全身麻酔薬の麻酔作用と有害作用の総合評価とする。

4. 研究成果

(1) ¹⁹F-NMR を用いた研究で、isoflurane, sevoflurane, desflurane は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、深部ではその作用が低下すること、F 原子を含む吸入麻酔薬に共通な性質であることを示唆した。この結果は、申請者が以前報告した、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルの解析から得られた結果を支持した。

(2) 水系溶媒中での揮発性麻酔薬の濃度決定:

VOC センサーを使用した sevoflurane の簡便な濃度決定法を開発し、ウサギの血中 sevoflurane 濃度の測定も可能であることを示した。また、水系溶媒中の isoflurane, sevoflurane, desflurane の ¹⁹F-NMR スペクトルの面積を測定し、濃度がわかっているトリフルオロ酢酸 (TFA) の面積と比較することによる、水溶液中での各吸入麻酔薬の濃度の測定法を導入した。ATPase 反応に対する定量的な麻酔薬の作用の解析を可能にした。

(3) パルピツール酸系薬物である pentobarbital 及び phenobarbital は Na,K-ATPase の構造を E1 型に変化させることにより活性を促進するが、thiamylal にはその作用がないことを示唆した。

(4) 脳内 Na,K-ATPase 活性に対する isoflurane, sevoflurane 及び desflurane の作用を検討

した。その結果、多くの静脈麻酔薬と同様に、揮発性麻酔薬も Na,K-ATPase 活性を抑制し、全身麻酔薬の多様な作用に Na,K-ATPase 活性の抑制も関与している可能性が示された。

(5) ラット脳に存在する Mg-ATPase を分析して、F 型 ATPase、V 型 ATPase と Basal Mg-ATPase を検出し、静脈麻酔薬の作用を検討した。Propofol は V 型 ATPase 活性と Basal Mg-ATPase 活性を濃度依存的に抑制したが、F 型 ATPase 活性を 80%程度活性化した。Pentobarbital はすべての ATPase 活性を濃度依存的に抑制した。Thiopental もすべての ATPase 活性を抑制したが、その程度は各 ATPase により異なった。以上の結果から、静脈麻酔薬はラット脳 Mg-ATPase 活性を基本的に抑制するが、propofol はミトコンドリアに特異的な作用を及ぼすことが示唆された。

(6) 培養細胞を用いた細胞レベルでの全身麻酔薬の評価については、具体的な成果を挙げる事ができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 古賀瑞之、鈴木邦明、長谷由理、渋谷真希子、木村幸文、藤澤俊明	4. 巻 38(2)
2. 論文標題 Na,K-ATPase活性の基質阻害に対するバルビツール酸系薬物の作用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 北海道歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 203-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鈴木邦明、渋谷真希子、長谷由理、平沖敏文、木村幸文、藤澤俊明	4. 巻 37
2. 論文標題 全身及び局所麻酔薬の作用機序	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 北海道歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 10 - 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 宮本健志、出山義昭、吉村善隆、鈴木邦明、藤澤俊明	4. 巻 38
2. 論文標題 ラット脳各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 北海道歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 28-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibuya M., Hojo T., Hase Y., Fujisawa T.	4. 巻 56
2. 論文標題 Conscious sedation with midazolam intravenously for a patient with Parkinson's disease and unpredictable chorea-like dyskinesia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 546-548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjoms.2018.05.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hase Yuri, Suzuki Kuniaki, Kamekura Nobuhito, Shibuya Makiko, Takahashi Yu, Namba Kosuke, Fujisawa Toshiaki	4. 巻 94
2. 論文標題 Quantitation of sevoflurane in whole blood and aqueous solutions by volatile organic compound sensing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological and Toxicological Methods	6. 最初と最後の頁 71-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vascn.2018.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makiko Shibuya, Toshiaki Fujisawa	4. 巻 38
2. 論文標題 Evaluation of recovery after intravenous sedation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 北海道歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 172-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yuri Hase, Kuniaki Suzuki, Toshiaki Fujisawa
2. 発表標題 Inhalational anesthetic effects on Na,K-ATPase in rabbit and rat brains
3. 学会等名 International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川恵美, 渋谷真希子, 木村幸文, 亀倉更人, 藤澤俊明
2. 発表標題 Cohen症候群患者の全身麻酔経験
3. 学会等名 障害者歯科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	木村 幸文 (Kimura Yukifumi) (00292037)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究 分担者	長谷 由理 (Hase Yuri) (20626121)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究 分担者	藤澤 俊明 (Fujisawa Toshiaki) (30190028)	北海道大学・歯学研究院・教授 (10101)	
研究 協力者	鈴木 邦明 (Suzuki Kuniaki)		
研究 協力者	平沖 敏文 (Hiraoki Toshifumi)		
研究 協力者	古賀 瑞之 (Koga Mizushi)		
研究 協力者	宮本 健志 (Miyamoto Takeshi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	本間 将一 (Honma Shoichi)		