

平成22年 4月19日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591792
 研究課題名（和文） 揮発性全身麻酔薬の副作用の分子機構：モーター蛋白1分子レベルでの解明
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of various side effects of volatile anesthetics
 研究代表者 宮本 善一（MIYAMOTO YOSHIKAZU）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：70278844

研究成果の概要（和文）：細胞内モーター蛋白キネシン-微小管系の運動再構成モデルを用い、揮発性麻酔薬セボフルラン・イソフルランがキネシン運動能に与える直接作用を調べた。実験系を揮発性麻酔薬で飽和させることにより、大部分の微小管が滑り運動を停止し、麻酔薬を除去すると大部分の微小管の滑り運動が再開することが確認された。以上から、揮発性麻酔薬は細胞内モーター蛋白キネシンの運動能を直接阻害すること、またこの阻害作用については可逆性が認められることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：By using *in vitro* motility assay, we determined the direct effects of inhalational anesthetics sevoflurane and isoflurane on microtubule-based kinesin motility. By applying inhalational anesthetics, most of the microtubules stopped sliding movements, and their motility almost recovered after washing out of the anesthetics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：揮発性麻酔薬、麻酔メカニズム、モーター蛋白、キネシン、微小管

1. 研究開始当初の背景

揮発性麻酔薬には本来の全身麻酔作用以外に様々な副作用が存在する。現在臨床の場で全

身麻酔薬として広く用いられている揮発性麻酔薬には本来の全身麻酔作用以外に、心筋収縮能抑制、平滑筋収縮抑制、細胞分裂阻害、精

子の鞭毛運動抑制, 不妊・胎児の催奇性, 白血球の遊走抑制など様々な副作用が存在する。また近年、幼若ラットに揮発性麻酔薬を主とした全身麻酔(イソフルラン・亜酸化窒素・ミダゾラム)を6時間行ったところ、脳細胞にアポトーシスによる広範な神経変性・海馬シナプス機能の欠損・遷延する記憶学習障害が認められたという報告が目され、現在臨床で新生児の全身麻酔薬としても広く用いられている揮発性麻酔薬の安全性について疑問が投げかけられた。この中枢神経障害作用は主にNMDA受容体阻害あるいはGABA_A受容体賦活を介するものと推定されているが、そのメカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。上述の揮発性麻酔薬の種々の副作用のうち、心筋収縮抑制作用の一部は細胞内カルシウム濃度の低下に加え、アクチン系系の直接抑制作用によるものである可能性も大きいと考えられる。また、揮発性麻酔薬が神経細胞樹状突起棘内アクチンフィラメントの運動を直接阻害するとの報告もある。これらの傍証及び揮発性麻酔薬の物理化学的性質より、揮発性麻酔薬は局所麻酔薬と同様(Tsuda Y. et al. Biophys J 71:2733-2741, 1996, Miyamoto Y. et al. Biophys J 78:940-949, 2000)、種々の細胞内モーター蛋白運動能に対する直接抑制作用を有する可能性が高いと考えられる。そしてこの直接阻害作用を明らかにすることができれば、上述の種々の副作用の機序を一元的に解明できることになる。

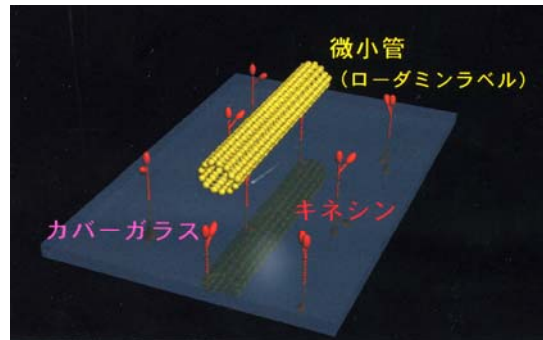
2. 研究の目的

揮発性麻酔薬のモーター蛋白に対する直接阻害作用を明らかにし、上述の種々の副作用の機序の一元的解明を目指す。

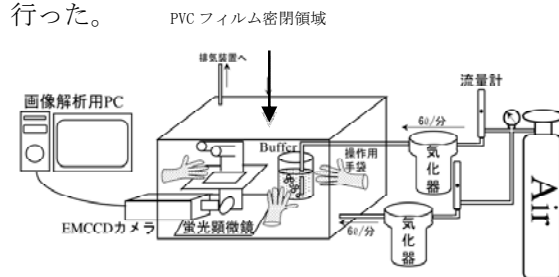
3. 研究の方法

(1)キネシン・微小管運動再構成系に対する揮発性麻酔薬の作用 (in vitro motility assay)

キネシン及び微小管構成蛋白チューブリンはブタ脳から抽出精製した。チューブリンに蛍光色素テトラメチルローダミンをラベルし、重合させて蛍光微小管を作成した。キネシン分子をカバーガラス表面にまばらに吸着させ、その上に蛍光微小管・1mM ATP を含む buffer (80mM HEPES [pH 7.4], 2mM MgCl₂, 1mM EDTA, 25°C) を灌流、微小管がキネシン分子上をATP存在下で滑走する様子を蛍光顕微鏡下に観察、画像処理用コンピュータに画像を記録解析した。



揮発性麻酔薬の投与にあたっては、蛍光顕微鏡を含む作業領域 (約 60cm×50cm×40cm, 120L) を厚手のポリ塩化ビニル(PVC)フィルムで密閉し、PVCフィルム側面に取り付けられた操作用の穴から操作用手袋を介して実験を行った。



揮発性麻酔薬の投与に際しては、bufferを目的の揮発性麻酔薬分圧で平衡させるため、最初に揮発性麻酔薬の気化器を用いてガラス密閉領域を目的濃度の揮発性麻酔薬を含む空気(6L/min)で灌流しておいた。またこのガラス密閉領域内でもう一台の気化器を用いてbufferに目的濃度の揮発性麻酔薬を含む空気(6L/min)をバブリングさせておくこと

により、ガラス密閉領域内の気相と液相を目的濃度の揮発性麻酔薬で平衡させた。

揮発性麻酔薬非存在下で大部分の微小管に滑り運動が認められる系に、セボフルラン(5%)あるいはイソフルラン(4%)で平衡させた buffer を灌流し、微小管の滑り運動の変化を記録・解析した。さらに揮発性麻酔薬による効果の可逆性を検討するため、ガラス密閉領域を麻酔薬を含まない空気ですら再灌流、スライドガラス上の試料も麻酔薬を含まない buffer で再灌流し、微小管滑り運動の変化を記録・解析した。

(2) キネシン ATPase 活性 (microtubule-activated ATPase) の測定

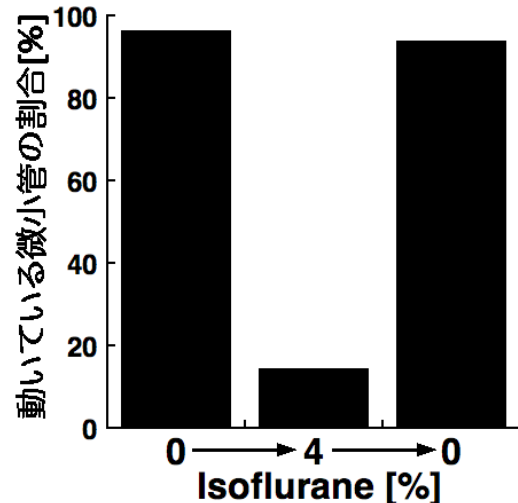
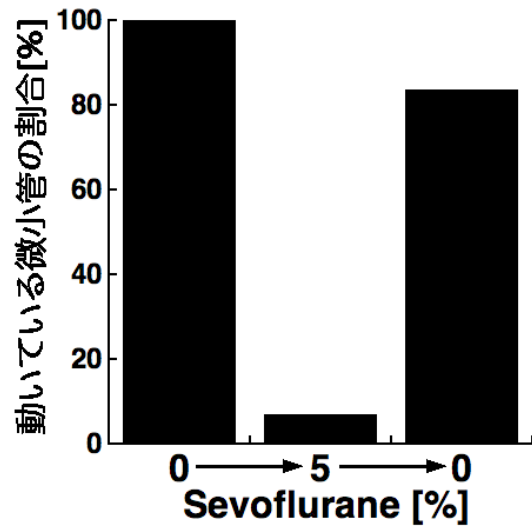
次に、揮発性麻酔薬による上記の阻害作用がキネシン ATPase 活性を阻害することによるものか否かを検討するため、揮発性麻酔薬存在下・非存在下において microtubule-activated kinesin ATPase 活性測定を行った。揮発性麻酔薬存在下での ATPase 活性測定は困難を極めたが、MESG/PNP 法を改変することにより測定に成功した。試料を揮発性麻酔薬と平衡させるため、実験(1)と同様の PVC フィルム密閉領域を用いた。使用する麻酔薬及びその濃度は(1)と同様で、実験温度も同じ 25℃とした。

4. 研究成果

(1) キネシン・微小管運動再構成系に対する揮発性麻酔薬の作用 (in vitro motility assay)

揮発性麻酔薬非存在下でほぼ全ての微小管に滑り運動が認められる *in vitro* motility assay の系を、セボフルラン(5%)あるいはイソフルラン(4%)で平衡させた buffer で灌流したところ、大部分の微小管の滑り運動が停止した。次にこの系を麻酔薬を含まない buffer で再灌流したところ、8割以上の微小管で滑り運動の再開が認められた。灌流前後

の微小管の滑り運動速度に有意差は認められなかった。



以上から、セボフルラン・イソフルランはいずれも微小管に沿ったキネシンの運動能を直接・可逆的に阻害することが明らかとなった。

(2) キネシン ATPase 活性 (microtubule-activated ATPase) の測定

セボフルラン(5%)あるいはイソフルラン(4%)存在下において、kinesin ATPase 活性は麻酔薬非存在下と同等の V_{max} 値を示し、セボフルラン・イソフルランによるキネシン運動能阻害作用は ATPase 活性を介するものではないことが示された。これは研究代表者らが以前局所麻酔薬について示した結果

(Miyamoto Y. et al. Biophys J 78:940-949, 2000)と同様の結果であり、揮発性麻酔薬も局所麻酔薬と類似のメカニズムでキネシン運動能を阻害することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

宮本善一、松本充弘、眞下 節、岩根敦子、西山雅祥、柳田敏雄. 揮発性麻酔薬による細胞内モーター蛋白質キネシン運動能の直接阻害作用、第56回日本麻酔科学会学術集会、2009年8月17日、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 善一 (MIYAMOTO YOSHIKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70278844

(2) 研究分担者

岩根 敦子 (IWANE ATSUKO)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号：30252638

柳田 敏雄 (YANAGIDA TOSHIO)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号：30089883

眞下 節 (MAHIMO TAKASHI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10110785

西山 雅祥 (NISHIYAMA MASAYOSHI)
京都大学・理学研究科・助教
研究者番号：10346075
(H19→H20 連携研究者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：