

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24593044

研究課題名(和文)核磁気共鳴法と電子スピン共鳴法を用いた全身麻酔薬の作用部位に関する研究

研究課題名(英文)The study of the site of action of volatile general anesthetics using ESR and NMR

研究代表者

渋谷 真希子 (SHIBUYA, MAKIKO)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30399951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：電子スピン共鳴法を用いた研究では、デスフルランは脂質単独のリポソームの表層にとどまること、Na,K-ATPaseの存在はリポソーム膜中でのスピンラベル剤の周囲環境および麻酔薬の作用に影響を及ぼさないこと、揮発性麻酔薬の存在および温度の上昇は膜の流動性を上げること、本実験系においては、リポソームの形態の相違が結果に影響しないこと、以上4点を示した。

核磁気共鳴法を用いた研究では、脂質単独のリポソームにおいて、膜上で結合している麻酔薬分子と結合していない分子が速い速度で化学交換をしていること、麻酔薬が膜の表層側に存在しており、電子スピン共鳴での研究結果を支持すること、以上2点を示した。

研究成果の概要(英文)：In the research using the electron spin resonance method, the following four results are shown. Desflurane remains on the surface of lipid bilayer in liposome. The existence of Na,K-ATPase does not affect the environment around the spin labels in the liposome and the effects of anesthetics on liposome as a model membrane. The fluidity of liposome membrane increase with rises in the temperature and the existence of anesthetics. The difference in membrane form does not affect the action of anesthetics on liposome.

In the study using nuclear magnetic resonance method, the following two results are shown. Anesthetic does chemical-exchange process between free and bound anesthetic on liposome. Isoflurane molecules locate in the outer surface of liposome. This result supports our research results using ESR.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：全身麻酔薬 麻酔薬の作用機序 電子スピン共鳴 核磁気共鳴 スピンラベル剤 生体モデル膜 リポソーム

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬は広く臨床の場で用いられているが、その作用機序についてはまだ一定の見解は得られていない。昨今、特定のタンパク質、中でも GABA_A やアセチルコリン、NMDA などの各受容体が麻酔作用の主軸をなすとする報告が相次いでいる。しかし、化学構造に大幅な相違がある物質でも全身麻酔作用を生じることを考慮すると、**特定のタンパク質への影響のみで全身麻酔作用を説明することは不可能であり、生体膜中に存在するタンパク質を含めた膜全体への作用が欠かせない**と研究代表者らは考え、電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いて研究を行ってきた。その手法としては、構造のシンプルな生体モデル膜を作成し、全身麻酔薬を作用させ、膜がどのように全身麻酔薬の影響を受けるかを、モデル膜中に存在する不対電子 (ラジカル) を、ESR 法で測定するものである。その結果、全身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、比較的表層に近い部分にも影響を及ぼさないことを示した。その次の段階として、ESR 法による検討の継続することに加え、電子と共に原子を構成する原子核の情報から得られる核磁気共鳴 (NMR) 法を合わせて測定することにより、今までの研究の確証を得ようとしたものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体モデル膜における脂質あるいはタンパク質と、全身麻酔薬との位置関係や相互作用について、物理化学的手法 (核磁気共鳴法や電子スピン共鳴法) と生物学的な手法 (酵素活性測定など) の双方を用いて検討することにより、全身麻酔薬の細胞膜における作用点や機序を解明することである。具体的な目的を以下に示す。

- (1) 麻酔薬と生体モデル膜中の脂質あるいはタンパク質との詳細な位置関係の検討
- (2) 麻酔作用に関連すると言われるタンパク質を含むモデル膜は麻酔薬に特異的に反応するかの検討
- (3) 麻酔薬により酵素活性への影響は変化するかの検討

3. 研究の方法

- (1) 生体モデル膜の作成
生体膜構成脂質であるホスファチジルコリンを用いて脂質二重層膜の小胞 (= リポソーム) を作成する。
- (2) 不対電子の情報から得られる ESR スペクトルの測定
リポソーム作製の際、ESR スペクトルを測定するのに必要な不対電子を持つ化合物 (= スピンラベル剤) を脂質二重膜内に組み込む。スピンラベル剤は不対電子の位置により種類が異なる。

ESR スペクトルの形状、およびその線形から計算される Orderparameter S と回転相関時間 の値から、膜の流動性等の物性を評価する。

- (3) 原子核の情報から得られる NMR スペクトルの測定

麻酔薬の存在部位の検討

リポソームにフッ素を含む麻酔薬を加え、¹⁹F-NMR 測定を行う。シグナル強度や化学シフトの差から、麻酔薬分子の存在状態も推定できる。

スピンラベル剤を含むリポソームと麻酔薬との相互作用の検討

スピンラベル剤の存在により ¹⁹F-NMR スペクトルのシグナルは著しく変化すると推定され、より精密に麻酔薬分子の存在位置と存在時間を割り出すことが出来る。

以上の事項を遂行することにより生体モデル膜における脂質あるいはタンパク質と、全身麻酔薬分子との位置関係や存在状態、相互作用について解析し、全身麻酔薬の細胞膜における作用点や機序の手がかりを探る。

4. 研究成果

- (1) ESR 法を用いた麻酔薬の作用部位の研究

脂質単独で構成されるリポソームに関して

セボフルランやイソフルランなど、今までの研究で使用した麻酔薬に加え、昨今日本で新たに導入された揮発性吸入麻酔薬であるデスフルランがリポソーム中のスピンラベル剤 5-DSA および 16-DSA に及ぼす影響を ESR スペクトル測定することから着手した。その結果、脂質単独の ESR スペクトルにおいて、デスフルランによる影響は、セボフルランやイソフルランにおける影響と同様の結果を示した。すなわち、スペクトル強度は、高濃度のデスフルランを加えたときに増大したものの、いずれの麻酔薬を添加しても膜流動性の指標となる Orderparameter S や回転相関時間 にはほとんど影響しなかった。この結果は、今回の作成条件においてデスフルランも他の麻酔薬と同様にリポソームの表層にとどまっており、スピンラベル剤中のニトロキシドラジカルが存在する脂質の深い疎水部や比較的浅い親水部付近まで影響を及ぼさないことが示すものである。

タンパク質を含んだリポソームに関して

大多数の動物細胞の形質膜に存在し、神経系では細胞の興奮性の維持に関与する酵素である Na, K-ATPase を組み込んだリポソームを作製し、スピンラベル剤 5-DSA および 16-DSA における ESR スペクトルを検討した。その結果、デスフルランを含む揮発性麻酔薬は脂質単独のときと同様、リポソームの表層

にとどまっていること、Na,K-ATPase の存在は膜中でのスピラベル剤の周囲環境および麻酔薬の作用に影響を及ぼさないことを示すことができた。

リポソーム中のスピラベル剤における測定温度の影響に関して

揮発性吸入麻酔薬であるデスフルラン、セボフルラン、イソフルランがリポソーム中のスピラベル剤 5-DSA および 16-DSA に及ぼす温度の影響について、ESR スペクトル測定し検討した。その結果、いずれの麻酔薬でも温度が上昇するとスペクトルの高さが高くなる傾向が見られた。また、スペクトルから導かれる 2 つの指標、Orderparameter S と回転相関時間は共に、いずれの麻酔薬でも温度が上昇すると減少した。また、control に比べ麻酔薬の存在する方が Orderparameter S が低く、回転相関時間は短くなった。これらの結果は、麻酔薬の存在および温度の上昇は膜の流動性を上げることが示している。

リポソームの形態の相違に関して

従来の実験において生体モデル膜として使用してきたリポソームは多重層であるが、実際の生体膜は単層である。そこで、単層のモデル膜を作製し、同様の実験を行った。その結果、いずれも多重層のものと同様であったことから、本実験系においては、作製の簡便な多重層のリポソームを生体モデル膜として使用しても支障ないことが示された。

(2) NMR 法を用いた麻酔薬の作用の研究

脂質単独のリポソームにおける麻酔薬の存在部位に関して

脂質単独のリポソームにフッ素を含む麻酔薬としてイソフルラン、セボフルラン、デスフルランを加え、¹⁹F-NMR 測定を行った。その結果、いずれの麻酔薬でも線形と化学シフトに変化は認められなかったが、線幅は少し広がり、横緩和時間(T₂)は縦緩和時間(T₁)に比べ著しく減少した。この結果は、リポソーム膜上で結合している麻酔薬分子と結合していない分子が速い速度で結合と乖離を繰り返す化学交換をしていることを示す。

スピラベル剤を含むリポソームと麻酔薬の常磁性効果について

線形と化学シフトには変化が認められなかったが、T₁、T₂ はスピラベル剤との相互作用によって著しく短くなった。両スピラベル剤で比較すると 16-DSA よりも 5-DSA のほうが麻酔薬の T₁、T₂ は短くなった。これらの結果から、麻酔薬と 5-DSA の距離は麻酔薬と 16-DSA より近く、麻酔薬が膜の表層側に存在していることが示唆された。

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 2 件)

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: 全身および局所麻酔薬の作用機序、北海道歯学雑誌、査読有り、37(2)、2017、116-123
渋谷真希子、鈴木邦明、平沖敏文、藤澤俊明: 揮発性全身麻酔薬の作用機序に関する仮説の変遷と最近の話題、北海道歯学雑誌、査読なし、35(1)、2014、70-72

(学会発表)(計 5 件)

Shouchi Honma, Toshifumi Hiraoki, Makiko Shibuya, Toshiaki Fujisawa, Kuniaki Suzuki: Effect of isoflurane on multilamellar liposome-Analysis by ¹⁹F-NMR, The 88th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, May 18-20, 2015, Nagoya.

本間 将一、渋谷 真希子、鈴木 邦明、藤澤 俊明: セボフルラン、デスフルランの多重層リポソームに対する影響 ¹⁹F-NMR による解析、日本歯科麻酔学会、2015 年 10 月 30 日-11 月 1 日、東京

Makiko Shibuya, Toshifumi Hiraoki, Kuniaki Suzuki, Toshiaki Fujisawa: The effects of general anesthetics on ESR spectra of spin labels in multilamellar and small unilamellar vesicles, 14th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation and Pain Control of the International Federation of Dental Anesthesiology Societies, October 8-10, 2015, Berlin.

Y. Hase, K. Suzuki, M. Shibuya, M. Koga, T. Fujisawa: Inhibition of Na,K-ATPase activity by propofol, lidocaine and procaine and the reversal of inhibition, 14th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation and Pain Control of the International Federation of Dental Anesthesiology Societies, October 8-10, 2015, Berlin.

本間 将一、渋谷 真希子、鈴木 邦明、藤澤 俊明: イソフルレンの多重層リポソームに対する影響 ¹⁹F の NMR による解析、第 42 回日本歯科麻酔学会学術集会、2014 年 10 月 10-12 日、新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋谷 真希子 (SHIBUYA, Makiko)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30399951

(2)研究分担者

平沖 敏文 (HIRAOKI, Toshifumi)
北海道大学・大学院工学(系)研究科
(研究院)・准教授
研究者番号：10125346

長谷 由理 (HASE, Yuri)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：20626121

藤澤 俊明 (FUJISAWA, Toshiaki)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30190028

木村 幸文 (KIMURA, Yukifumi)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：00292037

鈴木 邦明 (SUZUKI, Kuniaki)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40133748
(平成27年より研究協力者)

(3) 研究協力者

本間 将一 (HONMA, Shouichi)