

Title	 19F-NMR測定によるリポソームを生体膜モデルとしたイソフルランの作用部位の研究
Author(s)	本間, 将一; 平沖, 敏文; 渋谷, 真希子; 鈴木, 邦明; 藤澤, 俊明
Citation	北海道歯学雑誌, 44, 49-60
Issue Date	2023-09-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90506
Туре	article
File Information	44_08.pdf



原著

¹⁹F-NMR測定によるリポソームを生体膜モデルとした イソフルランの作用部位の研究

本間 将一¹⁾ 平沖 敏文²⁾ 渋谷真希子¹⁾ 鈴木 邦明³⁾ 藤澤 俊明¹⁾

抄 録:

【緒言】吸入麻酔薬の作用点は生体膜の脂質二重層膜ではないかと推測し、リポソームを生体膜のモデルとして、 フッ素原子を含む吸入麻酔薬であるイソフルランの局在を¹⁹F-NMRの測定によって検討した.また、¹⁹F-NMRの 測定によるイソフルラン飽和水溶液の濃度決定を試みた.

【方法】卵黄由来ホスファチジルコリンの多重層リポソーム(MLV)及び大きな一枚膜リポソーム(LUV)を作成し、 MLV及びLUVに対するイソフルランの影響を検討するため、¹⁹F-NMRスペクトルを測定し、リポソームの有無で の線形,化学シフト,縦緩和時間(T₁),横緩和時間(T₂)を比較した.また、リポソームにスピンラベル剤5-doxyl stearic acid (5-DSA)あるいは16-doxyl stearic acid (16-DSA)を混入して¹⁹F-NMRスペクトルに対するスピンラ ベル剤の影響を調べることにより、リポソームにおけるイソフルラン分子とスピンラベル剤の位置を検討した. 【結果と考察】¹⁹F-NMRスペクトルの測定により、イソフルラン飽和水溶液の濃度は42.8 mMであった.MLV及び LUV溶液にイソフルランを加えても、¹⁹F-NMRスペクトルの線形と化学シフトには変化は認められなかったが、 1/T2値は1/T1値に比べ著しく増加した.これらの結果は、リポソーム膜上に結合しているイソフルラン分子と結 合していない分子が結合と解離を繰り返す化学交換をしていることを示唆する.イソフルランに対するリポソーム 中のスピンラベル剤の影響を調べると、1/T1及び1/T2値はスピンラベル剤との相互作用によって著しく大きくなり、 その程度は5-DSA系のほうが大きかった.これらの結果は、DSA電子と¹⁹F核との間に磁気的双極子-双極子相互 作用が生じた結果と考えられ、影響の大きい5-DSAのほうが16-DSAより吸入麻酔薬分子との距離は近いことを示す. すなわちイソフルラン分子はリポソーム膜の表層側に存在し、膜の内部に入らないことが示唆された.また、イソ フルランの分子構造中のCF3基とCF2基のうち、CF2基がリポソームから大きな影響を受けることから、CF2基がリ ポソームに向いて結合すると示唆された.

【結論】イソフルラン分子はリポソーム表面と結合と解離を繰り返す状態で存在し内部には入らないと結論づけた.

キーワード:¹⁹F-NMR, リポソーム, イソフルラン, 作用部位

緒言

全身麻酔薬は臨床において不可欠な薬剤として長年使用 されているが、多くの研究にもかかわらずその作用機序に 関してはいまだ不明な点が多い.作用機序の仮説には大き く分けて特異説と非特異説がある^{1.2)}.特異説は全身麻酔薬 が特定のニューロンか、またはニューロン膜の特定部分に 結合して麻酔作用を発揮するという仮説であり、特定の作 用部位として y-aminobutyric acid A (GABAA) 受容体^{3.4)} やニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体⁵⁾ などが挙げ られる.非特異説は全身麻酔薬があらゆる臓器,組織細胞 の生体膜に非選択的に作用し,その結果として麻酔に関係 する機能に変化を起こすという仮説である.このように全 身麻酔薬の作用機序に関して未だ一定の見解が得られてい ないが,生体膜が作用の場であることに関しては一般的に 受け入れられている¹⁾.

著者らは,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に変化を起こすことにより作

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 歯科麻酔学教室(主任:藤澤俊明 教授)
 ²⁾ 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目
 北海道大学大学院工学研究院 応用物理学部門
 ³⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 細胞分子薬理学教室(主任:鈴木邦明 教授)



Fig. 1 リポソーム膜中の5-DSA及び16-DSAの位置 脂質アルキル鎖中のラジカルの位置が異なる5-doxyl stearic acid (5-DSA) および16-doxyl stearic acid (16-DSA) の二種のス テアリン酸スピンラベル剤をホスファチジルコリンから作成し たリポソームに混入して、リポソーム膜の比較的表層の環境に 関する情報を5-DSAから、深部の情報を16-DSAから得た.





¹⁹Fの核磁気共鳴(¹⁹F-NMR)はイソフルランに含まれる磁気 モーメントをもつ¹⁹F原子核を超高磁場の中におき,これに共鳴 条件を満たす周波数の電磁波を加えたときにおこる共鳴現象で ある.¹⁹F原子核を含むイソフルランのスペクトルの線形,基準 物質としてトリフルオロ酢酸(TFA)からの位置である化学シフ ト,z成分(縦軸成分)が熱平衡状態の値に復帰する緩和時間で ある縦緩和時間(T₁),xy成分(横軸成分)が熱平衡状態の値に復 帰する緩和時間である横緩和時間(T₂)を計測することにより ¹⁹F原子の挙動を観察した.





直径が $0.2 \sim 5 \mu m$ で断面が玉ねぎ状で多重層のリン脂質二重 膜を持つ多重層リポソーム (MLV) と直径が $0.1 \sim 1 \mu m$ で断面が 単層の大きな一枚膜リポソーム (LUV) を使用した.

用を発現するという非特異説の立場から, 膜タンパク質で あるNa, K-ATPaseをモデルタンパク質として全身麻酔薬 の影響を調べ⁶⁻⁸⁾, さらには電子スピン共鳴(electron paramagnetic resonance: ESR)を利用してリポソームの 構造あるいは物性に対する全身麻酔薬の作用を明らかにす ることを目的に研究を進めてきた⁹⁻¹³⁾. その過程で, 5-doxyl stearic acid (5-DSA) および16-doxyl stearic acid (16-DSA) の二種のステアリン酸スピンラベル剤をホスファチジルコ リンから作成したリポソームに混入して, リポソーム膜の 比較的表層の環境に関する情報を5-DSAから, 深部の情報 を16-DSAから得ることができた (Fig. 1). ESRスペクトル に対する全身麻酔薬の作用を調べた結果, 全身麻酔薬は脂 質二重膜の表層にとどまっており, ラジカルの存在する脂 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 ないことが示唆された.

本研究においては、全身麻酔薬のうち使用頻度の高い吸 入麻酔薬であるイソフルランの持つフッ素原子に注目して、 フッ素原子の核磁気共鳴(nuclear magnetic resonance: NMR)スペクトルを測定することにより、イソフルランと 生体膜モデルであるリポソーム膜との位置関係を明らかに することを計画した(Fig.2).NMRを用いた吸入麻酔薬の 作用機序に関する研究はいくつかあり、イソフルランの分 子運動の解析から、nACh受容体に9~10個のイソフルラ ン分子が結合すること⁵⁾やイソフルラン分子が水-脂質界 面に近接する領域に存在すること¹⁴⁾が報告されている. ¹⁹F原子は生体内、特にタンパク質、細胞膜には含まれず、 ¹⁹F のNMRスペクトルには生体内にある他の分子からの 信号が寄与しないので、イソフルランの¹⁹F を直接観測す ることができることも利点である.

脂質から構成される二重層構造のリポソームは、作成の 容易さから広く生体膜モデルとして使われ有用な情報を提 供してきた. リポソームはその形態から多重層リポソーム (multilamellar vesicle: MLV),大きな一枚膜リポソーム (large unilamellar vesicle: LUV),および小さな一枚膜リ ポソーム (small unilamellar vesicle: SUV)がある^{15,16)}. MLVは大きさが $0.2 \sim 5 \mu$ mと不均一であるものの、熱力 学的に安定し、調整法が最も簡便である. LUVは $0.1 \sim 1 \mu$ m 程度の直径で内水相に高分子を保持できるため薬物や遺伝 子などを内包させて生体内に投与する薬物キャリアーとし て期待されている.一方,SUVは大きさが100 nm以下で比 較的均一であるが安定性は多少問題があるとされている. そこで、本研究においては多重層膜と単層膜に対するイソ フルランの作用を比較するために、MLVと一枚膜リポソー ムはLUVを使用した (Fig.3).

本論文ではegg yolk phosphatidylcholine (EYPC)から 作成したMLV及びLUVと相互作用するイソフルラン分子 の挙動を¹⁹F-NMRを用いて観察し、イソフルランのMLVと LUVに対する作用部位を検討した. さらにMLVおよび LUVに5-DSAあるいは16-DSAを混入して¹⁹F-NMRスペク トルに対するスピンラベル剤の影響を調べることにより, MLVとLUVにおけるイソフルラン分子とスピンラベル剤 の位置を推測した.また、リポソームの層状構造がイソフ ルランの作用に影響を及ぼすか否か検討するためにMLV とLUVの比較を行った.

材料と方法

1. 材料

5-DSA, 16-DSAおよびEYPCはSigma-Aldrich社(セン トルイス, MO)のものを使用した. イソフルランはアッヴ ィ合同会社(東京), その他の試薬は特級を使用した. 5-DSA と16-DSAは50 mMの濃度になるようにメタノールに溶解 し, -40℃にて保存した.

2. 試料の作成

1) EYPCを使用したMLVの作成^{15, 16)}

EYPCをクロロホルムに溶解し、37 ℃の保温下で回転式 エバポレーターにて、次いで減圧デシケーターに2時間以 上保管して完全に溶媒を除去した.作成した脂質フィルム に緩衝液 (20 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM 塩化コリン, 1 mM EDTA-tris (pH 7.0), 1 mM cysteine, 30 mM imidazole-HCl (pH 7.0))を加えてボルテックスミキ サーにてよく撹拌し、EYPCの最終濃度が10 mg/mlの白濁 したMLV溶液を得た.

5-DSA/MLV溶液と16-DSA/MLV溶液は、5-DSAあるいは16-DSAを最終濃度が166 μMとなるように加えたEYPCクロロホルム溶液を使用して、MLV溶液と同様に作成した。
 2) EYPCを使用したLUVの作成^{15,16)}

MLVの作成と同様の手順でEYPCの脂質フィルムを作成 した. 作成したフィルムに、24 mMになるようにコール酸 ナトリウムを添加した緩衝液を加えてボルテックスミキサ ーにてよく撹拌した. その溶液を4℃で緩衝液に対して48 時間透析を行い, EYPCの最終濃度が10 mg/mlのLUV溶液 を得た.

5-DSA/LUV溶液と16-DSA/LUV溶液は、5-DSAあるい は16-DSAを最終濃度が166 μMとなるように加えたEYPC クロロホルム溶液を使用して、LUV溶液と同様に作成した.

3. ¹⁹F-NMR測定

試料の作成

緩衝液にイソフルランを液滴が生じるように過剰に添加 し、密栓して4℃で一晩撹拌し、イソフルラン飽和水溶液を 得て、下記の2) で濃度を決定した.¹⁹F-NMR測定には直径 5 mmのNMR試料管を使用し、化学シフト(0 ppm)及びイ ソフルラン濃度測定の基準物質としてトリフルオロ酢酸 (TFA)を使用した(Fig. 2).緩衝液中の試料は0.365 M TFA 水溶液 3 µl, イソフルラン水溶液200 µl, および磁場ロッ クのためのD₂O 100 µlを加えた. リポソームおよびスピン ラベル剤を含む溶液は0.365 M TFA水溶液 3 µl, イソフル ラン水溶液300 µl, リポソーム溶液200 µl (MLVとLUVの 最終濃度4.5 mM) およびD₂O 100 µlを加えた. 測定試料を NMR試料管に加えた後, イソフルランの揮発を防止するた め, 試料管を封管した.

2) イソフルランの濃度決定

¹⁹F-NMR測定を行い,得られたTFAのCF₃基とイソフル ランのCF₃基との面積比を測定してイソフルラン飽和水溶 液の濃度を決定した.

3)¹⁹F-NMRスペクトル測定

全てのNMRスペクトルの測定は核磁気共鳴分光計 (Bruker DSX300 (7.05T))を用いて行い,¹⁹F測定周波数 は282.38 MHzで,温度依存性を調べた測定以外は24 ℃で 測定した.イソフルランの¹⁹F-NMRスペクトル測定の取り 込みスペクトル幅は7062.147 Hz,データポイントは16384 とした.溶液の¹⁹F-NMRスペクトルの測定には45°パルスを 用いた.待ち時間は \geq 5T₁とした.スペクトルポイントは 16384,積算回数は最大64回であった.

4) spin-lattice relaxation time (T1) 測定

- (180° - τ - 90° - T-) - nのパルス系列をもつinversion recovery法¹⁷⁾を用いてT₁を測定した. τ は遅延時間, Tは 熱平衡までの待ち時間 (\geq 5T₁)とした (Fig. 2). スペクト ルポイントは4096, 積算回数は最大16回でT₁測定を行った. 5) spin-spin relaxation time (T₂) 測定

90° x- (-τ_{cp}-180° y-τ_{cp}-echo-)-nのパルス系列をもつ Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 法¹⁷⁾を用いてT₂を測 定した (Fig. 2). τ_{cp}は1.25 msで待ち時間は≥5T₁とし,ス ペクトルポイントは4096,積算回数は最大16回でT₂測定を 行った.

6) ⊿1/Tie

MLVの効果を調べるためにMLV溶液中の1/T₁及び1/T₂ 値(1/T_i, _{MLV})から緩衝液(Buffer)中の1/T₁及び1/T₂値 (1/T_i, _{Buffer})を差し引いた値(△1/T_{ie})を次式のように 定義した.

$$\Delta \frac{1}{T_{ie}} = \frac{1}{T_{i, MLV}} - \frac{1}{T_{i, Buffer}}, \quad i = 1, 2$$
(1)

$7)\,\varDelta 1/T_{im}$

 $1/T_1及び1/T_2値に対するDSAの効果を調べるために$ $DSA/MLV溶液中の1/T_1及び1/T2値(1/T_i, DSA/MLV)から$ $MLV溶液中の1/T_1及び1/T2値(1/T_i, MLV)を差し引いた$ $値(<math>\Delta$ 1/T_{im})を求めるため次式を定義した.

$$\Delta \frac{1}{T_{im}} = \frac{1}{T_{i, DSA/MLV}} - \frac{1}{T_{i, MLV}}, \quad i = 1, 2$$
(2)



Fig. 4 イソフルランの化学構造式と¹⁹F-NMRスペクトル

イソフルランの化学構造式と緩衝液中のイソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルを示した.化学シフト(0 ppm)の基準物質として トリフルオロ酢酸(TFA)を使用した.イソフルランは-4.72 ppmにCF₃基,-10.70 ppmと-10.96 ppmにCF₂基のシグナルが観測された. CF₂基の化学シフトは2つの化学シフトの中点を示し,半値幅は2つのシグナルで同じ3 Hzであった.拡大したCF₃基とCF₂基のスペクト ルは隣接する¹⁹Fと¹Hのスピン-スピン結合のために微細分裂している.

 $8)\, \varDelta 1/T {\rm ir}$

 $1/T_1 及び1/T_2 値に対するMLVとLUVの影響を比較する$ $ためにLUV溶液中の1/T_1及び1/T_2 値(1/T_i, LUV)から$ $MLV溶液中の1/T_1及び1/T_2 値(1/T_i, MLV)を差し引いた$ $値(<math>\Delta 1/T_{ir}$)を次式のように定義した.

$$\Delta \frac{1}{T_{ir}} = \frac{1}{T_{i, LUV}} - \frac{1}{T_{i, MLV}}, \quad i = 1, 2$$
(3)

9)⊿1/T_{id}

 $1/T_1 及び1/T_2 値に対するスピンラベル剤を含んだMLV$ $とLUVの影響を比較するためにDSA/LUV溶液中の<math>1/T_1 及$ び $1/T_2 値 (1/T_i, DSA/LUV)$ からMLV溶液中の $1/T_1 及び$ $1/T_2 値 (1/T_i, DSA/MLV)$ を差し引いた値 ($\Delta 1/T_{id}$)を次 式のように定義した.

$$\Delta \frac{1}{T_{id}} = \frac{1}{T_{i, DSA/LUV}} - \frac{1}{T_{i, DSA/MLV}}, \quad i = 1, 2$$
(4)

結 果

1. イソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルとイソフルラン 飽和水溶液の濃度決定

イソフルランの化学構造式と緩衝液中のイソフルランの ¹⁹F-NMRスペクトルをFig. 4に示し,化学シフトと半値幅 をTable 1に示した.イソフルランは-4.72 ppmにCF₃基, -10.70 ppmと-10.96 ppmにCF₂基のシグナルが観測された. CF₂基の化学シフトは2つの化学シフトの中点を示し,半 値幅は2つのシグナルで同じ3 Hzであった.拡大したCF₃ 基とCF₂基のスペクトルは隣接する¹⁹Fと¹Hのスピン-ス ピン結合のために微細分裂している.

イソフルラン飽和水溶液の濃度決定のためにFig.4に示 した緩衝液中のTFAのCF3基とイソフルランのCF3基の面 積比を測定すると1:7.8であった.面積比から計算すると イソフルラン飽和水溶液の濃度は42.8 mMであった.

2. イソフルランに対するMLVの影響

MLV溶液中のイソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルを Fig. 5 bに,化学シフトと半値幅をTable 1に示した. TFAの半値幅は変化しなかった.MLV溶液中のイソフル ランの¹⁹F-NMRスペクトルの化学シフトと半値幅を緩衝液 中のそれらと比較すると,CF₃及びCF₂基の化学シフトの 値には変化が見られなかった.一方,MLV溶液中の半値 幅は緩衝液中と比較してCF₃基では変化がなかったが, CF₂基では約2倍広くなった.また,CF₃基とCF₂基のスペ クトルの微細分裂が不明瞭になった.

緩衝液及びMLV溶液中のイソフルランの1/T₁及び1/T₂ 値をFig. 6に示した. 緩衝液中の1/T₁及び1/T₂値は24℃で $0.2 \sim 0.4 \text{ s}^{-1}$ と同程度の値を示し,温度上昇に伴い1/T₁値と $1/T_2$ 値はともに減少した(結果は示さない). MLV溶液中 のイソフルランの1/T₁値は緩衝液中の1/T₁値と同程度で あったが, $1/T_2$ 値はCF₃基では約5倍, CF₂基では約30倍大 きくなった.

 $<math>\Delta 1/T_{1e} \ge \Delta 1/T_{2e}$ の温度依存性をFig. 7に示した. 温度 上昇に伴って $\Delta 1/T_{1e}$ はわずかに減少したが, $\Delta 1/T_{2e}$ は著 しく減少した.

3. イソフルランに対する16-DSA/MLV及び5-DSA/MLV の影響

16-DSA/MLV及び5-DSA/MLV溶液中のイソフルランの ¹⁹F-NMRスペクトルをそれぞれFig.5cとdに,化学シフト と半値幅をTable 1に示した.両系の化学シフトと半値幅 をMLV溶液中のそれらと比較すると,CF3基とCF2基の化 学シフトの値には変化が見られなかった.一方,両系のシ グナルの強度がMLV溶液と比較して減少し,半値幅は 16-DSA/MLV溶液中ではCF3基,CF2基ともに約2倍広く

¹⁹F-NMR測定によるリポソームを生体膜モデルとした イソフルランの作用部位の研究



Fig.5 イソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルに対するMLVおよびスピンラベル剤の影響

緩衝液,MLV溶液,16-DSA/MLV及び5-DSA/MLV溶液中のイソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルをそれぞれFig.5 a, b, c, dに示した. MLV溶液中のイソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルの化学シフトと緩衝液中のそれを比較すると,CF₃及びCF₂基の化学シフトの値には 変化が見られなかった.一方,MLV溶液中のスペクトルは緩衝液中と比較してCF₃基とCF₂基のスペクトルの微細分裂が不明瞭にな った.16-DSA/MLV及び5-DSA/MLV溶液中の化学シフトとMLV溶液中のそれと比較すると,CF₃基とCF₂基の化学シフトの値には 変化が見られなかった.一方,両系のシグナルの強度がMLV溶液と比較して減少した.また,CF₃基とCF₂基のスペクトルの微細分裂 はDSAを混入することによりさらに不明瞭になった.



Fig. 6 イソフルランの1/T₁値、1/T₂値に対するMLVおよびスピンラベル剤の影響 緩衝液中の1/T₁及び1/T₂値は同程度の値を示し、MLV溶液中のイソフルランの1/T₁値は緩衝液中の1/T₁値と同程度であったが、 1/T₂値はCF₃基では約5倍、CF₂基では約30倍大きくなった。16-DSA/MLV溶液中の1/T₁値はMLV溶液中と比較して約5倍大きくなり、 1/T₂値はCF₃基では約2倍、CF₂基では約3倍大きくなった。また、5-DSA/MLV溶液中の1/T₁値はMLV溶液中と比較して約8倍大き くなり、1/T₂値はCF₃基では約3倍、CF₂基では約6倍大きくなった。測定値と測定値は視覚的に数値を比較するために結んだ。

なり、5-DSA/MLV溶液中ではCF3基は約3倍、CF2基は約 4倍広くなった.また、CF3基とCF2基のスペクトルの微細 分裂はDSAを混入することによりさらに不明瞭になった.

16-DSA/MLV及び5-DSA/MLV溶液中のイソフルランの 1/T₁及び1/T₂値をFig. 6に示した. 16-DSA/MLV溶液中の 1/T₁値はMLV溶液中と比較して約5倍大きくなり, 1/T₂値 はCF₃基では約2倍, CF₂基では約3倍大きくなった. また, 5-DSA/MLV溶液中の1/T₁値はMLV溶液中と比較して約 8倍大きくなり、1/T2値はCF3基では約3倍、CF2基では約 6倍大きくなった.

さらに、イソフルランのCF₃基とCF₂基の半値幅は 5-DSA/MLV溶液のほうが 16-DSA/MLV溶液よりも約2倍 広くなった、5-DSA/MLV溶液中の1/T₁値と1/T₂値は 16-DSA/MLV溶液よりもそれぞれ約1.5倍、約2倍大きくな った.

イソフルランの⊿1/T1m値及び⊿1/T2m値の温度依存性

本間将一ほか



Fig. 7 イソフルランの⊿1/T_{1e}値及び⊿1/T_{2e}値の温度依存性

MLVの効果を調べるためにMLV溶液中の1/T₁及び1/T₂値(1/_{Ti, MLV})から緩衝液(Buffer)中の1/T₁及び1/T₂値(1/T_i, Buffer) を差し引いた値(△1/T_{ie})を次式のように定義した.

$$\Delta \frac{1}{T_{ie}} = \frac{1}{T_{i, MLV}} - \frac{1}{T_{i, Buffer}}, \quad i = 1, 2$$
 (2)

温度上昇に伴って⊿1/T_{1e}はわずかに減少したが, △1/T_{2e}は著しく減少した.これらの結果は,温度上昇に伴いイソフルランの化学 交換がより速くなることを示している.

	イソフルラン				
	CF ₃		CF₂(中央値)		
	化学シフト(ppm)	半値幅(Hz)	化学シフト(ppm)	半値幅(Hz)	
緩衝液	-4.72	3	-10.83	3	
MLV	-4.72	3	-10.82	6	
16-DSA/MLV	-4.72	5	-10.82	12	
5-DSA/MLV	-4.72	10	-10.82	22	

Table 1	イン	/フルラ	ンの化学シフ	ŀ	と半値幅	(MLV)
---------	----	------	--------	---	------	-------

	イソフルラン				
	CF ₃		CF ₂ (中央値)		
	化学シフト(ppm)	半値幅(Hz)	化学シフト(ppm)	半値幅(Hz)	
緩衝液	-4.72	3	-10.83	3	
LUV	-4.72	3	-10.82	8	
16-DSA/LUV	-4.72	6	-10.61	27	
5-DSA/LUV	-4.72	12	-10.54	46	

Table 2 イソフルランの化学シフトと半値幅(LUV)

をFig. 8に示した. 温度上昇とともに $\triangle 1/T_{1m}$ 値及び $\triangle 1/T_{2m}$ 値が減少した. また, 5-DSAの $\triangle 1/T_{1m}$ 値と $\triangle 1/T_{2m}$ 値が16-DSAのそれらよりも大きかった.

16-DSA/MLV溶液及び5-DSA/MLV溶液のイソフルラン の1/T₁及び1/T₂値は16-DSA濃度及び5-DSA濃度の上昇 とともに大きくなった(結果は示さない).

4. イソフルランに対するLUVの影響

LUV溶液中のイソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルを Fig. 9bに, 化学シフトと半値幅をTable 2に示した. TFA の半値幅は変化しなかった. LUV溶液中のイソフルランの ¹⁹F-NMRスペクトルの化学シフトと半値幅を緩衝液中のそ れらと比較すると, CF₃及びCF₂基の化学シフトの値には 変化が見られなかった. 一方, LUV溶液中の半値幅は緩衝 液中と比較してCF₃基では変化がなかったが, CF₂基では約 3倍広くなった. また, CF₃基とCF₂基のスペクトルの微細 分裂が不明瞭になった.

緩衝液, LUV溶液中のイソフルランの $1/T_1$ 及び $1/T_2$ 値 をFig. 10に示した. LUV溶液中のイソフルランの $1/T_1$ 値 は緩衝液中の $1/T_1$ 値と同程度であったが, $1/T_2$ 値はCF₃基 では約4倍, CF₂基では約6倍大きくなった.

5. イソフルランに対する16-DSA/LUV及び5-DSA/LUV の影響

16-DSA/LUV及び5-DSA/LUV溶液中のイソフルランの ¹⁹F-NMRスペクトルをFig. 9cとdに, 化学シフトと半値幅



Fig. 8 イソフルランの $\Delta 1/T_{1m}$ 値及び $\Delta 1/T_{2m}$ 値の温度依存性

1/T₁及び1/T₂値に対するDSAの効果を調べるためにDSA/MLV溶液中の1/T₁及び1/T₂値(1/T_i, _{DSA/MLV})からMLV溶液中の1/T₁ 及び1/T₂値(1/T_i, _{MLV})を差し引いた値(△1/T_{im})を求めるため次式を定義した.

$$\Delta \frac{1}{T_{im}} = \frac{1}{T_{i, DSA/MLV}} - \frac{1}{T_{i, MLV}}, \quad i = 1, 2 \quad (3)$$

温度上昇とともに△1/T_{1m}値及び△1/T_{2m}値が減少したことは,磁気的双極子-双極子相互作用が大きく,化学交換はこれらの値に寄 与しないことを示している. 5-DSAの△1/T_{1m}値と△1/T_{2m}値が16-DSAのそれらよりも大きいので,イソフルラン分子は測定した全 ての温度で16-DSAよりも5-DSAの近くに存在することを示している.



Fig. 9 イソフルランの19F-NMRスペクトルに対するLUVおよびスピンラベル剤の影響

緩衝液,LUV溶液,16-DSA/LUV及び5-DSA/LUV溶液中のイソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルをそれぞれFig.9a,b,c,dに示した. LUV溶液中のイソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルの化学シフトと緩衝液中のそれを比較すると,CF₃及びCF₂基の化学シフトの値には 変化が見られなかった.一方,LUV溶液中のスペクトルは緩衝液中と比較してCF₃基とCF₂基のスペクトルの微細分裂が不明瞭になった. 16-DSA/LUV及び5-DSA/LUV溶液中の化学シフトとLUV溶液中のそれと比較すると,CF₃基の化学シフトの値には変化が見られな かったが,CF₂基の化学シフトの値はLUV溶液中の-10.82 ppmから16-DSA/LUV溶液中では-10.61 ppm,5-DSA/LUV溶液中では -10.54 ppmと大きくなった.両系のシグナルの強度がLUV溶液と比較して減少した.また,CF₃基とCF₂基のスペクトルの微細分裂は DSAを混入することによりさらに不明瞭になった.

本間将一ほか



Fig. 10 イソフルランの1/T₁値、1/T₂値に対するLUVおよびスピンラベル剤の影響 緩衝液中の1/T₁及び1/T₂値は同程度の値を示し、LUV溶液中のイソフルランの1/T₁値は緩衝液中の1/T₁値と同程度であったが、 1/T₂値はCF₃基では約4倍、CF₂基では約6倍大きくなった。16-DSA/LUV溶液中の1/T₁値はLUV溶液中と比較してCF₃基では約6倍、 CF₂基では約9倍大きくなり、1/T₂値はCF₃基では約2倍、CF₂基では約4倍大きくなった。また、5-DSA/LUV溶液中の1/T₁値は LUV溶液中と比較してCF₃基では約10倍、CF₂基では約19倍大きくなり、1/T₂値はCF₃基では約8倍、CF₂基では約21倍大きくなった。 測定値と測定値は視覚的に数値を比較するために結んだ。

	0E	⊿1/T _{1r}	0.021
A1 /T:	OF3	⊿1/T _{2r}	0.45
	CF ₂	⊿1/T _{1r}	0.012
		⊿1/T _{2r}	0.38
	CF₃	⊿1/T _{1d}	0.35
		⊿1/T _{2d}	0.81
	CF ₂	⊿1/T _{1d}	1.1
		⊿1/T _{2d}	10
	0E	⊿1/T _{1d}	1.3
A1/Tid (a set)	OF3	⊿1/T _{2d}	2.9
∠17/110 (5-DSA)	CF ₂	⊿1/T _{1d}	2.7
		⊿1/T _{2d}	188

Table 3 riangle 1/Tir, ighterrow 1/Tid i=1,2

をTable 2に示した.両系の化学シフトと半値幅をLUV溶 液中のそれらと比較すると,CF3基の化学シフトの値には 変化が見られなかったが,CF2基の化学シフトの値はLUV 溶液中の-10.82 ppmから16-DSA/LUV溶液中では-10.61 ppm,5-DSA/LUV溶液中では-10.54 ppmと大きくなった. また,両系のシグナルの強度がLUV溶液と比較して減少し, 半値幅は16-DSA/LUV溶液中ではCF3基は約2倍,CF2基は 約3倍広くなり、5-DSA/LUV溶液ではCF3基は約4倍、CF2 基は約6倍広くなった. CF3基とCF2基のスペクトルの微細 分裂はDSAを混入することによりさらに不明瞭になった.

16-DSA/LUV及び5-DSA/LUV溶液中のイソフルランの 1/T₁及び1/T₂値をFig. 10に示した. 16-DSA/LUV溶液中の 1/T₁値はLUV溶液中と比較してCF₃基では約6倍, CF₂基で は約9倍大きくなり, 1/T₂値はCF₃基では約2倍, CF₂基では 約4倍大きくなった. また, 5-DSA/LUV溶液中の1/T₁値は LUV溶液中と比較してCF₃基では約10倍, CF₂基では約19 倍大きくなり, 1/T₂値はCF₃基では約8倍, CF₂基では約21 倍大きくなった.

さらに、イソフルランのCF3基とCF2基の半値幅は 5-DSA/LUV溶液のほうが 16-DSA/LUV溶液よりも約2倍 広くなり、CF2基の化学シフト値も5-DSA/LUV溶液のほ うが大きくなった. 5-DSA/LUV溶液中のイソフルランの $1/T_1値と1/T_2値は16-DSA/LUV溶液よりも1/T_1値は約1.5$ 倍、 $1/T_2値は約2倍大きくなった.$

16-DSA/LUV溶液及び5-DSA/LUV溶液のイソフルラン の1/T1及び1/T2値は16-DSA濃度及び5-DSA濃度の上昇と ともに大きくなった(結果は示さない).

イソフルランの¹⁹F-NMRスペクトルに対するMLV とLUVの影響の比較

MLV溶液とLUV溶液のイソフルランの化学シフト値及 び半値幅を比較すると化学シフト値はLUV溶液のCF2基の み大きくなった(Table 1及び2).半値幅はCF3基では同 程度だが,CF2基ではLUV溶液のイソフルランのほうが広 くなった(Table 1及び2). Table 3より $\Delta 1/T_{ir}$, $\Delta 1/T_{id}$ ともに正数となったため, LUV溶液のほうが $1/T_1$ 及び $1/T_2$ 値に強く影響を及ぼして いた.

考察

イソフルランの¹⁹F-NMRスペクトル測定によるイソフ ルラン飽和水溶液の濃度決定

著者らはEYPCから作成したリポソームに16-DSAおよび 5-DSAを組み込んだ生体膜モデルを用いて全身麻酔薬の影 響を研究し、全身麻酔薬の作用は膜の深部よりも表層付近 に対して強いことを報告した⁹⁻¹³⁾. 核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance: NMR)を用いた麻酔薬の作用機序に 関する研究はいくつかある^{5,14)}. ¹⁹F原子は生体成分には存 在せず,そのNMRスペクトルには他の分子からの信号が寄 与しないことから、¹⁹Fを含む全身麻酔薬の研究に¹⁹F-NMR を用いる方法は利点が多い. そこで、¹⁹F-NMRを用いて二 つの生体膜モデルMLV及びLUVと相互作用するイソフル ランの局在部位を検討した.

はじめに緩衝液中のTFAとイソフルランの¹⁹F-NMRス ペクトルをもとに、イソフルランの水溶液中での濃度を測 定した.TFAとイソフルランは相互作用しないため、イソ フルラン飽和水溶液の濃度決定が可能となり、イソフルラ ン飽和水溶液の濃度は42.8 mMであった(Fig. 4).Pravat らはTFAと吸入麻酔薬水溶液を特殊な二つの試料管に分 けて¹⁹F-NMRスペクトルを測定し、吸入麻酔薬の水溶液濃 度を0.3 mM ~ 2.6 mMと決定している¹⁸⁾が、著者らは一 つの試料管にTFAとイソフルランを混合してイソフルラ ン飽和水溶液濃度を決定した.吸入麻酔薬の作用を水溶液 系で調べるには、吸入麻酔薬は脂溶性であるため、実際の 溶液中での濃度決定が困難であることが問題となる.



Fig. 11 リポソーム膜に対するイソフルランの作用部位 リポソームに5-DSAあるいは16-DSAを混入して¹⁹F-NMRスペ クトルに対するスピンラベル剤の影響を調べたところ、イソフ ルランがリポソーム膜の表層に結合し、イソフルラン分子はリ ポソーム膜の脂肪鎖の中、また小腔内部に入り込まないことが 示唆された。

¹⁹F-NMRスペクトルによる濃度測定は、フッ素元素を持つ 他の麻酔薬にも応用できることから、今後の実験において も極めて有用である.

2. イソフルラン分子に対するMLV及びLUVの影響

MLV及びLUV溶液ともにイソフルランのCF2基のほう がCF3基よりも半値幅が広くなり、1/T2値は大きくなった. これらの結果は、イソフルランのCF2基がCF3基よりもリ ポソームから大きな影響を受けることを示し、CF2基がリ ポソームに向いて結合していることを示唆する.

また, MLV及びLUV溶液をイソフルラン水溶液に混入し, 緩衝液中の1/T1あるいは1/T2値と比較すると, 1/T1値は変 化がないが1/T2値が著しく大きくなった.

1/T₂と半値幅(Δv₁)には以下の等式が成り立つ.

$$\frac{1}{T_2} = \pi \Delta \nu_{\frac{1}{2}} \tag{5}$$

半値幅には真の半値幅に加えて磁場不均一性が寄与して, 誤差が大きいので1/T2値で議論を行うこととした. 1/T1 値は一分子のイソフルランの分子回転運動の速さを示す指 標であるが, 1/T2値は分子回転運動に加えて, これよりも 遅い運動モードが一つでも存在すると著しく増加すること が知られている. MLV及びLUV溶液中のイソフルランの 1/T1値は緩衝液中の1/T1値と同程度であったが, 1/T2値 は著しく大きくなった. これらの結果はフリーなイソフル ラン分子とリポソーム膜上に結合しているイソフルラン分 子が結合と解離を繰り返す化学交換をしていることを示唆 した. また, 温度上昇に伴い1/T1値と1/T2値はともに減少 した. この結果はイソフルランの分子回転運動の速さが十 分に速いことを示している.

さらに, 温度上昇に伴って△1/T₁eはわずかに減少したが, △1/T₂eは著しく減少した (Fig. 5) ことは, 温度上昇に伴い イソフルランの化学交換がより速くなることを示している.

3. イソフルランに対するスピンラベル剤の影響から推測 されるリポソームとの位置関係

スピンラベル剤を添加したMLV及びLUVのイソフルラ ンに対する影響を調べたところ、CF3及びCF2基の半値幅 がMLV及びLUV溶液と比較して広くなり、1/T1値と1/T2 値がともに大きくなった.これらはスピンラベル剤のNO ラジカルの電子スピンとイソフルランの¹⁹F核間の磁気的 双極子-双極子相互作用が新たに生じた結果と考えられる.

さらに、MLV及びLUV溶液ともにイソフルランのCF3 基とCF2基の半値幅は5-DSA溶液のほうが16-DSA溶液より も広くなり、5-DSA溶液中の1/T1値と1/T2値は16-DSA溶 液よりも大きくなった。磁気的双極子-双極子相互作用は 1/T1値と1/T2値に対して5-DSA及び16-DSA電子と¹⁹F原子 間の距離の6乗に反比例するため、イソフルラン分子は 16-DSAよりも5-DSAの近く, つまり膜の表層側に存在する ことを示す(Fig. 11).

次に、温度上昇とともに△1/T_{1m}値及び△1/T_{2m}値が減少 した(Fig. 8)ことは、温度上昇とともに磁気的双極子 – 双 極子相互作用が大きくなり、化学交換はこれらの値に寄与 しないことを示している、5-DSAの△1/T_{1m}値と△1/T_{2m} 値が16-DSAのそれらよりも大きいので、イソフルラン分子 は測定した全ての温度で16-DSAよりも5-DSAの近くに存 在することを示している、また、MLV及びLUV溶液ともに イソフルランの1/T₁及び1/T₂値が16-DSA濃度及び5-DSA 濃度の上昇とともに大きくなったことは、DSAの濃度の上 昇に伴い、イソフルランの¹⁹F核と磁気的双極子 – 双極子相 互作用を行うDSAの電子スピンの数が増加したことを示す。

もしイソフルラン分子がリポソーム膜の脂肪鎖の中に入り込むと仮定すると、16-DSA溶液と5-DSA溶液において半 値幅、1/T1と1/T2値に差は生じないと考えられる。今回の 結果から、イソフルランは脂溶性の薬剤ではあるが、イソ フルラン分子はリポソーム膜の脂肪鎖の中に入り込まない ものと示唆された(Fig. 11).

Table 3より △1/T_{ir}, △1/T_{id}ともに正数となったため, LUV溶液のほうが1/T₁及び1/T₂値に強く影響を及ぼして いた.しかし,各溶液中でのイソフルラン水溶液の濃度が 異なるため,イソフルラン濃度を規格化し,1/T₁及び1/T₂ 値に対するスピンラベル剤のみの影響を調べるため次式(6), (7)を定義した.ここでfは各溶液中のイソフルラン水溶液 濃度とする.

$$\Delta \frac{1}{T_{if, MLV}} = \frac{1}{T_{i, DSA/MLV}} \times \frac{1}{f_{DSA/MLV}} - \frac{1}{T_{i, MLV}} \times \frac{1}{f_{MLV}}, \ i = 1, 2 \quad (6)$$

$$\Delta \frac{1}{T_{if, LUV}} = \frac{1}{T_{i, DSA/LUV}} \times \frac{1}{f_{DSA/LUV}} - \frac{1}{T_{i, LUV}} \times \frac{1}{f_{LUV}}, \ i = 1, 2$$
(7)

イソフルラン濃度を規格化した⊿1/Tif, MLV値と⊿1/Tif, LUV値の比率を求めるため次式を定義した.

$$\frac{1}{T_{ip}} = \Delta \frac{1}{T_{if, MLV}} \div \Delta \frac{1}{T_{if, LUV}}, \quad i = 1, 2$$
(8)

(8) 式の結果をTable 4に示した. 1/Tip値は0.06~0.21
 で1より小さいため,同一のイソフルラン濃度においてMLV
 溶液よりLUV溶液のほうが16-DSA, 5-DSAの影響を強く
 受けていた.

この結果が、MLVとLUVの構造的な相違によるものか、 あるいはDSAの分布濃度の相違によるのかを考察するため に、MLV及びLUVの膜構造とその大きさを仮定し、MLV 及びLUVの最外層のスピンラベル剤の量の比率を検討した。 MLVは直径が $0.2 \sim 5 \mu m$ 程度で不均一に存在していて数 層の膜構造からなり、LUVは直径が $0.1 \sim 1 \mu m$ 程度で一 枚膜である^{6,7)}. MLV、LUVをそれぞれ大きさの中央値で ある直径2 μm 及び $0.4 \mu m$ とし、NMRを用いた実験にてリ ン脂質二重膜の厚さは37Åである¹⁹⁾との報告があるため、 MLVの2層目の直径を1.8 µm, 3層目の直径を1.6 µmと仮 定した. また、MLV及びLUVの内部にはイソフルランが 入り込まなく、スピンラベル剤が均一に分散していると仮 定すると、スピンラベル剤の濃度が166 µMであるので、最 外層の単位面積当たりのスピンラベル剤の数がMLV溶液 は $3.2 \times 10^{18} / \mu m^2$. LUV溶液は $2.0 \times 10^{16} / \mu m^2$ となる. よっ て、最外層の単位面積当たりのMLV溶液とLUV溶液のス ピンラベル剤の比率は0.016となる. これではTable 4に示 した1/Tin値より著しく小さい値のため、MLV、LUVをそ れぞれ大きさの中央値である直径0.8 µm及び0.4 µmとし, MLVの2層目の直径を0.6 µm, 3層目の直径を0.4 µmと仮 定した. すると、最外層の単位面積当たりのスピンラベル 剤の数がMLV溶液は2.8×10¹⁷μM/μm², LUV溶液は 2.0×10¹⁶ / µm²となり, MLV溶液とLUV溶液のスピンラベ ル剤の比率は0.14となる. すなわちMLV及びLUVの膜構造 とその大きさをこのように仮定するとTable 4に示した 1/Tip値とほぼ一致する比率となり、MLV溶液よりLUV溶 液のほうが16-DSA, 5-DSAの影響を強く受ける理由をDSA の個数の差として説明可能である.また、イソフルラン分 子はリポソーム膜の小胞内部に入り込まないとする前提も 成立する (Fig. 11).

吸入麻酔薬の作用機構において,非特異説を主張する際 の根拠のひとつが麻酔薬の脂溶性と麻酔作用の強度との間 にきれいな相関関係があるという事実であり,脂質の2重 層膜である生体膜に容易に取り込まれて作用するとされて きた.しかし,実際に膜内に存在する,あるいは膜を通過 して細胞内に入り込むという証拠は乏しい.生体膜モデル としてのリポソームを使用した研究であるという限界はあ っても,イソフルランはリポソーム膜内にも、リポソーム 内腔にも入り込まないことを示唆する本研究で得られた結 果は,吸入麻酔薬の作用機構の検討において新たな材料を

			1/Tip
16-DSA	CF₃	$1/T_{1p}$	0.206
		$1/T_{2p}$	0.136
	CF₂	$1/T_{1p}$	0.165
		$1/T_{2p}$	0.185
5-DSA	CF ₃	$1/T_{1p}$	0.148
		$1/T_{2p}$	0.156
	CF ₂	$1/T_{1p}$	0.094
		$1/T_{2p}$	0.063

Table 4 1/Tip i=1,2

提供するものと考える.

吸入麻酔薬を含む全身麻酔薬の作用機構は解明されてい ないが,新たな研究もほとんど行われていない.しかし, 作用機構の確立は,全身麻酔の技術に理論的裏付けを与え、 麻酔薬の選択及び新規麻酔薬開発に新たな指標を与える。 また,麻酔薬の作用をもとに、意識、睡眠などの脳機能を 支える物質レベルの情報の解明につながる可能性があると 考えられる.

結 論

¹⁹F-NMRを用いた研究から、イソフルラン飽和水溶液の 濃度を決定することができた.イソフルランのMLVとLUV に対する局在を検討したところ、CF2基がリポソームに向 いて結合しており、イソフルランはリポソーム膜上でフリ ーなイソフルラン分子と化学交換をしていることが示され た.リポソームに5-DSAあるいは16-DSAを混入して ¹⁹F-NMRスペクトルに対するスピンラベル剤の影響を調べ たところ、イソフルランがリポソーム膜の表層に結合し、 イソフルラン分子はリポソーム膜の脂肪鎖の中、また小腔 内部に入り込まないことが示唆された.

謝 辞

本稿を終えるにあたり,本研究に多大なる御支援と御協 力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講 座歯科麻酔学教室ならびに細胞分子薬理学教室の教室員各 位に厚く御礼申し上げます.

引用文献

- 真下節:全身麻酔のメカニズム.臨床麻酔,27:295-311,2003.
- 瀬戸倫義,尾崎将之,今井隆志,谷口吉弘,野坂修一: 全身麻酔のメカニズムに関する新しい知見と考え方. 麻酔,57:4-21,2008.
- 3) Krasowski MD, Koltchine VV, Rick CE, Ye Q, Finn SE, Harrion NL : Propofol and other intravenous anesthetics have sites of action on the γ aminobutyric acid type A receptor distinct from that for isoflurane. Mol Pharmacol, 53 : 530-538, 1998.
- Weng Y, Yang L, Corringer PJ, Sonner JM : Anesthetic sensitivity of the Gloeobacter violaceus proton-gated ion channel. Anesth Analg, 110 (1) : 59-63, 2010.
- Xu Y, Seto T, Tang P, Leonard F : NMR Study of Volatile Anesthetic Binding to Nicotinic Acetylcholine receptors. Biophys.J., 78 : 746-751, 2002.

- 6) 鈴木邦明, 松本章:歯の病気に関する"くすり"の効き 方についての最新情報 局所及び全身麻酔薬の作用機 構の現状と新しい視点からの展望.歯科薬物療法, 18:202, 1999.
- 7) 川田達:全身麻酔薬及び関連薬がウサギ脳Na⁺, K⁺-ATPaseに及ぼす影響に関する研究.北海道歯誌, 20: 39-50, 1999.
- 8) 小野智史:揮発性麻酔薬のNa⁺, K⁺-ATPaseとアルカ リ性フォスタファーゼに及ぼす影響に関する研究.北 海道歯誌, 21:245-255, 2000.
- 渋谷真希子,鈴木邦明,平沖敏文,木村邦衛,堤耀廣, 福島和昭:スピンラベル剤のESRスペクトルに対する 全身麻酔薬の影響.北海道歯誌,24:135-143,2003.
- 10) 渋谷真希子,平沖敏文,木村邦衛,堤耀廣,鈴木邦明, 福島和昭:リポソーム中に存在するスピンラベル剤の ESRスペクトルと全身麻酔薬の影響.北海道歯誌,25: 68-76,2004.
- 11) 木村邦衛, 平沖敏文, 渋谷真希子, 福島和昭, 鈴木邦明: リポソーム中のスピンラベル剤の周辺環境に及ぼす ホスファチジルコリンの種類と温度の影響. 北海道歯 誌, 25:346-355, 2004.
- 12) 木村邦衛, 平沖敏文, 渋谷真希子, 福島和昭, 鈴木邦明: リポソーム中のスピンラベル剤の周辺環境に及ぼす 吸入麻酔薬の影響とその温度依存性. 北海道歯誌, 25:356-367, 2004.
- 13) Shibuya M, Hiraoki T, Kimura K, Fukushima K, Suzuki K : The effects of general anesthetics on ESR spectra of spin labels in phosphatidylcholine vesicles containing purified Na,K-ATPase or microsomal protein. Applied Surface Science, 262 : 102-106, 2012.
- 14) Tang P, Yan B, Xu Y : Different Distribution of Fluorinated Anesthetics and Nonanesthetics in Model Membrane : A ¹⁹F-NMR Study. Biophys J , 72:1672-1682, 1997.
- 15) 奥直人:リポソームの作成と実験法. 14-20, 廣川書店, 東京, 1994.
- 16) 砂本順三,岩本清:リポソームの調整.野島庄七,砂本順三,井上圭三編,リポソーム,21-40,南江堂,東京,1988.
- Clarige, T: 有機化学のための高分解能NMRテクニ ック. 13-44, 講談社, 東京, 2004.
- 18) Pravat KM, Jay WP : Clinically Relevant Concentration Determination of Inhaled Anesthetics (Halothane, Isoflurane,Sevoflurane, and Desflurane) by ¹⁹F-NMR. Cell Biochem Biophys, 52 : 31-35, 2008.
- Haug C, Mason JT : Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. Biophysics, 75 : 308-310, 1978.

ORIGINAL

Effect of isoflurane on multilamellar liposome-Analysis by ¹⁹F-NMR

Shoichi Honma¹⁾, Toshifumi Hiraoki²⁾, Makiko Shibuya¹⁾ Kuniaki Suzuki³⁾ and Toshiaki Fujisawa¹⁾

ABSTRACT :

[Objectives] To investigate the interaction of a general anesthetic with biological membranes, we measured ¹⁹F nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of isoflurane on the isoflurane-multilamellar liposome (MLV) system. The paramagnetic effect of the spin-probe was examined to obtain the spatial structure between isoflurane and spin-probe in the MLV.

[Methods] We made the MLV solution including spin probe, 5- or 16-doxyl stearic acid (5- or16-DSA), added isoflurane to the MLV solution and obtained chemical shifts, the spin-lattice relaxation time (T1) and the spin-spin relaxation time (T2) of isoflurane on the spectra at 7T.

[Results and Discussion] The addition of isoflurane did not change the chemical shifts and the T1, but line widths became slightly broad and the T2 decreased remarkably, suggesting that isoflurane affects a chemical-exchange process between free and bound isoflurane on MLV. T1 and the T2 furthermore decreased in the presence of 5-DSA or 16-DSA due to the paramagnetic interaction between ¹⁹F nuclei of isoflurane and the electron of the spin-probe. T1 and T2 with 5-DSA were shorter than those of 16-DSA. These results suggest that the distance between isoflurane and 5-DSA in MLV is closer than that of 16-DSA, and that isoflurane molecules locate in the outer surface of MLV.

Key Words: ¹⁹F-NMR, isoflurane, liposome, the action site

¹⁾ Division of Dental Anesthesiology (Chief: prof. Toshiaki Fujisawa), and ³⁾ Cellular and Molecular Pharmacology (Chief: prof. Kuniaki Suzuki), Department of Oral Pathobiological Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾ Division of Applied Physics, Hokkaido University Graduate School Faculty of Engineering, Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo, 060-8628, Japan