HOKKAIDO UNIVERSITY

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; Honma, Shoichi; 平沖, 敏文 他
Citation	北海道歯学雑誌, 44, 49-60
Issue Date	2023-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90506
Type	journal article
File Information	44_08.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　44：49−60，2023.

原　著

^{19}F-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^{19}F-NMRの測定によって検討した．また，^{19}F-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，^{19}F-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（T_1），横緩和時間（T_2）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^{19}F-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】^{19}F-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，^{19}F-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，$1/T_2$値は$1/T_1$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，$1/T_1$及び$1/T_2$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^{19}F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CF_3基とCF_2基のうち，CF_2基がリポソームから大きな影響を受けることから，CF_2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：^{19}F-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γ-aminobutyric acid A（$GABA_A$）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）

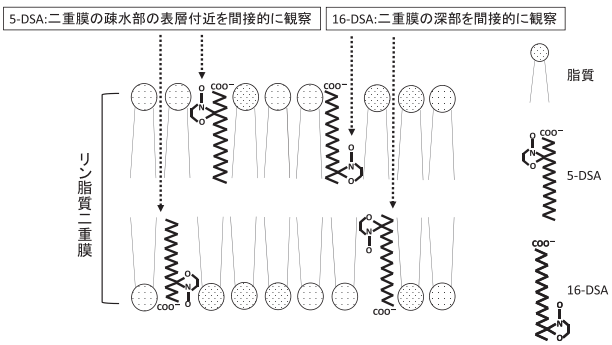

Fig. 1　リポソーム膜中の5-DSA及び16-DSAの位置

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．

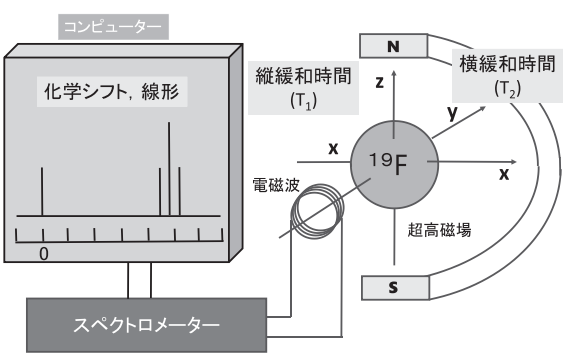

Fig. 2　^{19}Fの核磁気共鳴（^{19}F-NMR）

^{19}Fの核磁気共鳴（^{19}F-NMR）はイソフルランに含まれる磁気モーメントをもつ^{19}F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．^{19}F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（T_1），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（T_2）を計測することにより^{19}F原子の挙動を観察した．

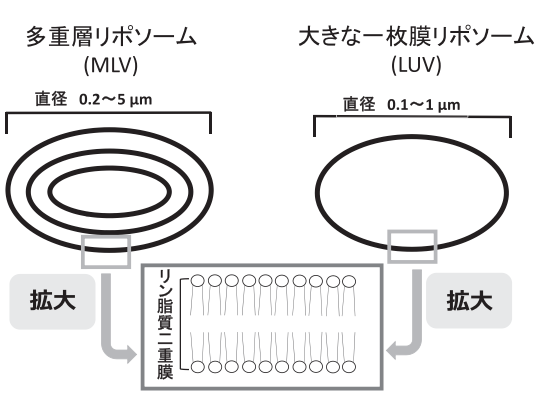

Fig. 3　MLV及びLUVの構造と大きさ

直径が0.2 ～ 5 μm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 ～ 1 μm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．^{19}F原子は生体内，特にタンパク質，細胞膜には含まれず，^{19}F 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^{19}F 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 ～ 5 μm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 ～ 1 μm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^{19}F-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^{19}F-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 $MgCl_2$, 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．^{19}F-NMR測定

1）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．^{19}F-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D_2O 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D_2O 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

^{19}F-NMR測定を行い，得られたTFAのCF_3基とイソフルランのCF_3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）^{19}F-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，^{19}F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^{19}F-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^{19}F-NMRスペクトルの測定には45°パルスを用いた．待ち時間は≧5T_1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（T_1）測定

-（180° - τ - 90° -T-）- n のパルス系列をもつinversion recovery法[17] を用いてT_1を測定した．τ は遅延時間，Tは熱平衡までの待ち時間（≧5T_1）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T_1測定を行った．

5）spin-spin relaxation time（T_2）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T_2を測定した（Fig. 2）．τ_{cp} は1.25 msで待ち時間は≧5T_1とし，スペクトルポイントは4096，積算回数は最大16回でT_2測定を行った．

6）$\Delta 1/T_{ie}$

MLVの効果を調べるためにMLV溶液中の$1/T_1$及び$1/T_2$値（$1/T_{i,\ MLV}$）から緩衝液（Buffer）中の$1/T_1$及び$1/T_2$値（$1/T_{i,\ Buffer}$）を差し引いた値（$\Delta 1/T_{ie}$）を次式のように定義した．

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

7）$\Delta 1/T_{im}$

$1/T_1$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$1/T_2$値（$1/T_{i,\ DSA/MLV}$）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（$\Delta 1/T_{im}$）を求めるため次式を定義した．

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

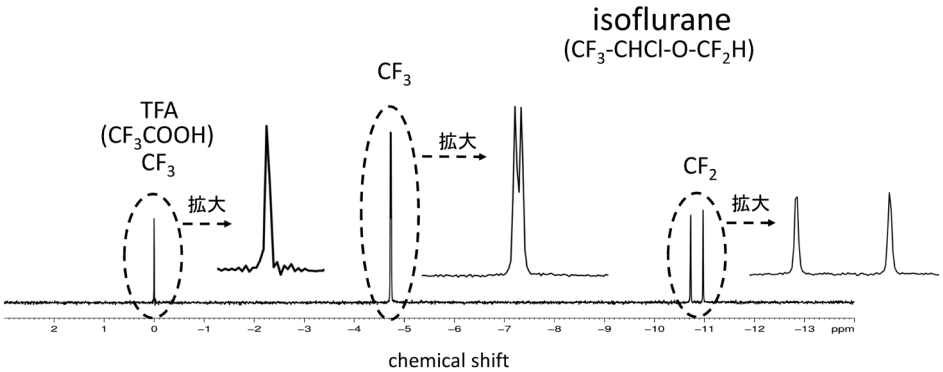

Fig. 4　イソフルランの化学構造式と^{19}F-NMRスペクトル

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^{19}F-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CF_3基，−10.70 ppmと−10.96 ppmにCF_2基のシグナルが観測された．CF_2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CF_3基とCF_2基のスペクトルは隣接する^{19}Fと^{1}Hのスピン－スピン結合のために微細分裂している．

8）$\Delta 1/T_{ir}$

$1/T_1$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（$\Delta 1/T_{ir}$）を次式のように定義した．

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

9）$\Delta 1/T_{id}$

$1/T_1$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$1/T_1$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．

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

結　　果

1．イソフルランの^{19}F-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^{19}F-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CF_3基，−10.70 ppmと−10.96 ppmにCF_2基のシグナルが観測された．CF_2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CF_3基とCF_2基のスペクトルは隣接する^{19}Fと^{1}H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CF_3基とイソフルランのCF_3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^{19}F-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^{19}F-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，CF_3及びCF_2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CF_3基では変化がなかったが，CF_2基では約2倍広くなった．また，CF_3基とCF_2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$1/T_1$及び$1/T_2$値をFig. 6に示した．緩衝液中の$1/T_1$及び$1/T_2$値は24℃で0.2 ～0.4 s^{-1}と同程度の値を示し，温度上昇に伴い$1/T_1$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$1/T_1$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CF_3基では約5倍，CF_2基では約30倍大きくなった．

$\Delta 1/T_{1e}$と$\Delta 1/T_{2e}$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^{19}F-NMRスペクトルをそれぞれFig. 5 c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，CF_3基とCF_2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CF_3基，CF_2基ともに約2倍広く

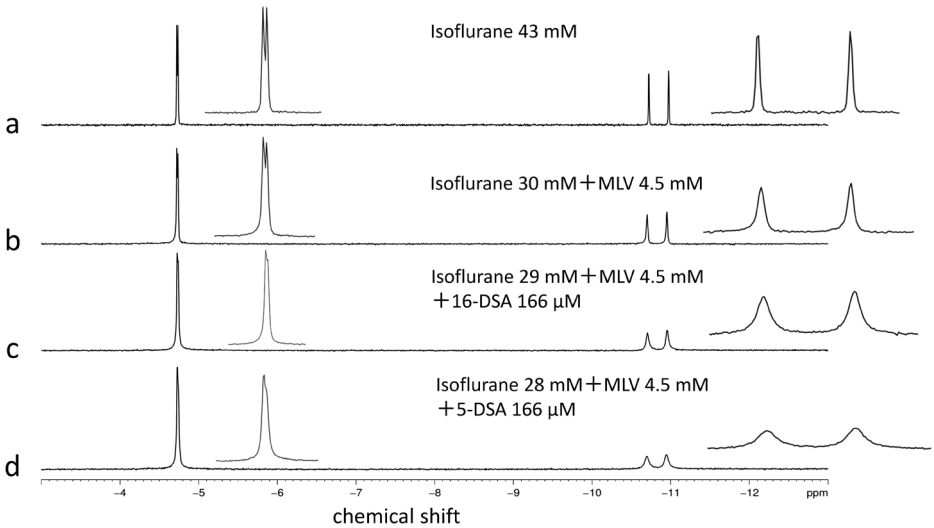

Fig. 5　イソフルランの^{19}F-NMRスペクトルに対するMLVおよびスピンラベル剤の影響

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^{19}F-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^{19}F-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，CF_3及びCF_2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CF_3基とCF_2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，CF_3基とCF_2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，CF_3基とCF_2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．

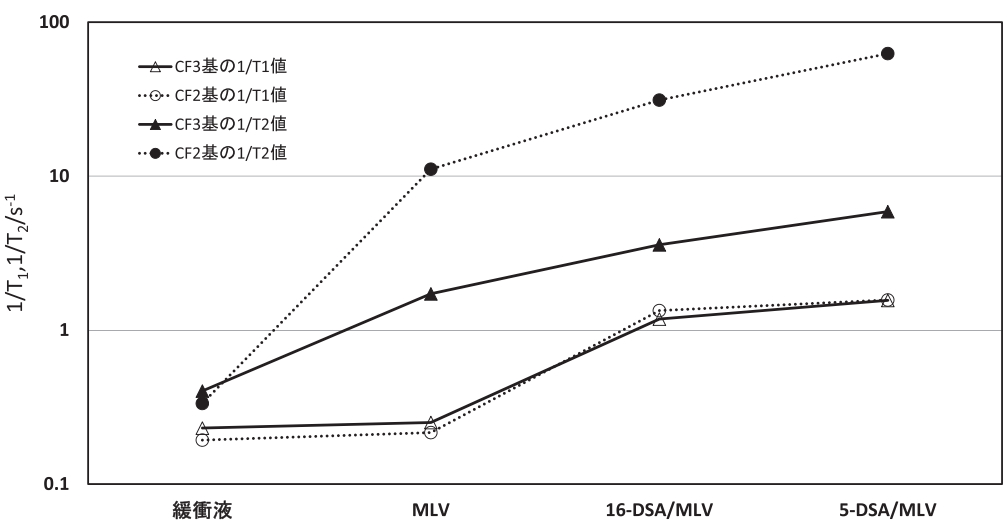

Fig. 6　イソフルランの$1/T_1$値，$1/T_2$値に対するMLVおよびスピンラベル剤の影響

緩衝液中の$1/T_1$及び$1/T_2$値は同程度の値を示し，MLV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CF_3基では約5倍，CF_2基では約30倍大きくなった．16-DSA/MLV溶液中の$1/T_1$値はMLV溶液中と比較して約5倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約2倍，CF_2基では約3倍大きくなった．また，5-DSA/MLV溶液中の$1/T_1$値はMLV溶液中と比較して約8倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約3倍，CF_2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CF_3基は約3倍，CF_2基は約4倍広くなった．また，CF_3基とCF_2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$1/T_1$及び$1/T_2$値をFig. 6に示した．16-DSA/MLV溶液中の$1/T_1$値はMLV溶液中と比較して約5倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約2倍，CF_2基では約3倍大きくなった．また，5-DSA/MLV溶液中の$1/T_1$値はMLV溶液中と比較して約8倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約3倍，CF_2基では約6倍大きくなった．

さらに，イソフルランのCF_3基とCF_2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$1/T_1$値と$1/T_2$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$\Delta 1/T_{1m}$値及び$\Delta 1/T_{2m}$値の温度依存性

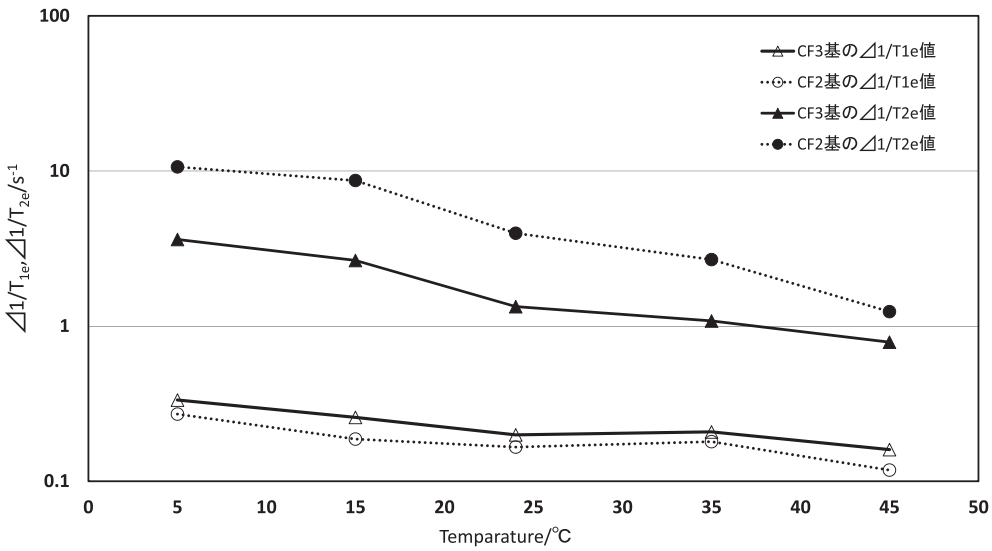

Fig. 7　イソフルランの⊿1/T_{1e}値及び⊿1/T_{2e}値の温度依存性

MLVの効果を調べるためにMLV溶液中の1/T_1及び1/T_2値（1/$T_{i,\ MLV}$）から緩衝液（Buffer）中の1/T_1及び1/T_2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．

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

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		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
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　イソフルランの化学シフトと半値幅（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⊿1/T_{1m}値及び⊿1/T_{2m}値が減少した．また，5-DSAの⊿1/T_{1m}値と⊿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/T_1及び1/T_2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^{19}F-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^{19}F-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，CF_3及びCF_2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CF_3基では変化がなかったが，CF_2基では約3倍広くなった．また，CF_3基とCF_2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CF_3基では約4倍，CF_2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^{19}F-NMRスペクトルをFig. 9cとdに，化学シフトと半値幅

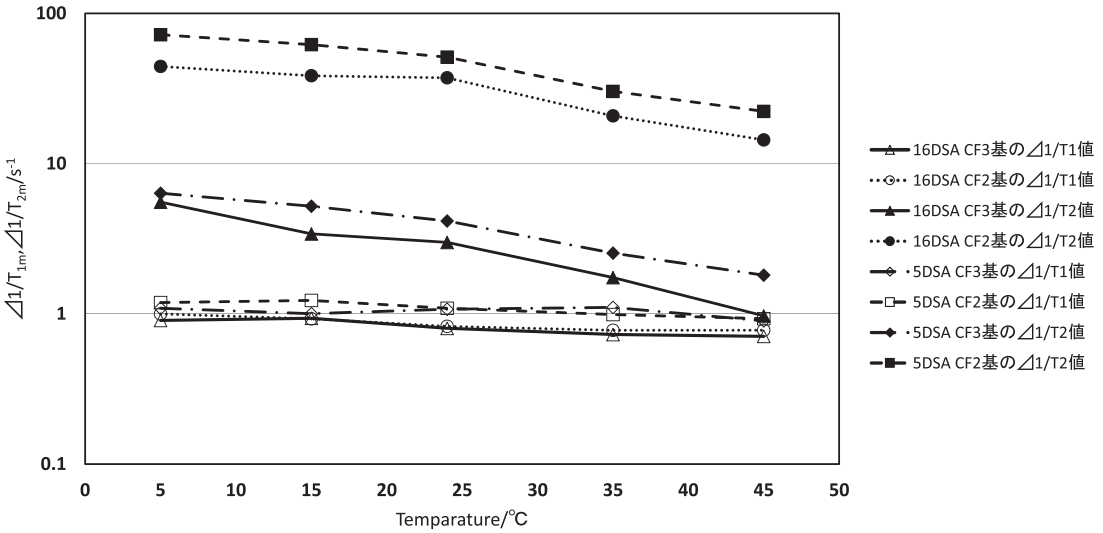

Fig. 8　イソフルランの⊿1/T_{1m}値及び⊿1/T_{2m}値の温度依存性

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/T_2値（1/$T_{i,\ DSA/MLV}$）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（⊿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．

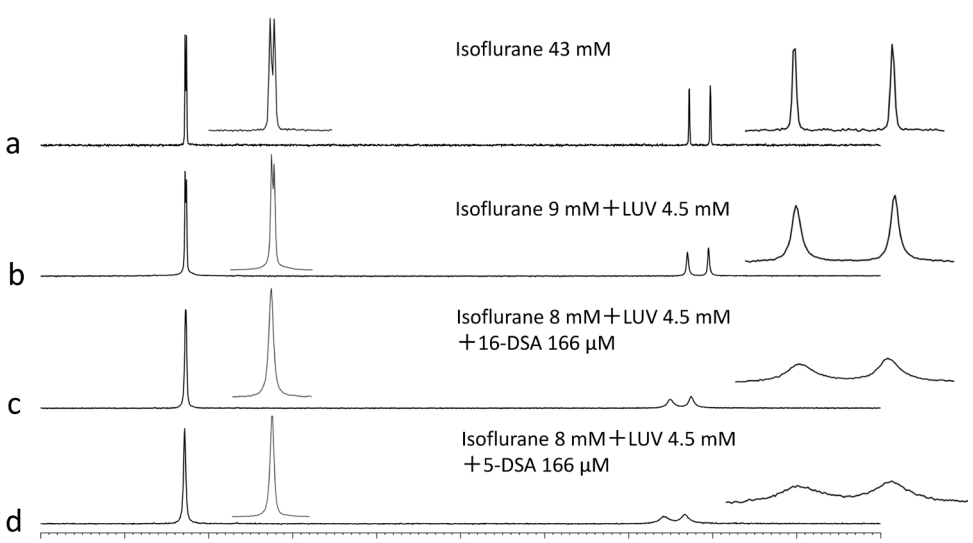

Fig. 9　イソフルランの^{19}F-NMRスペクトルに対するLUVおよびスピンラベル剤の影響

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^{19}F-NMRスペクトルをそれぞれFig. 9 a, b, c, dに示した．LUV溶液中のイソフルランの^{19}F-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，CF_3及びCF_2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CF_3基とCF_2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，CF_3基の化学シフトの値には変化が見られなかったが，CF_2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，CF_3基とCF_2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．

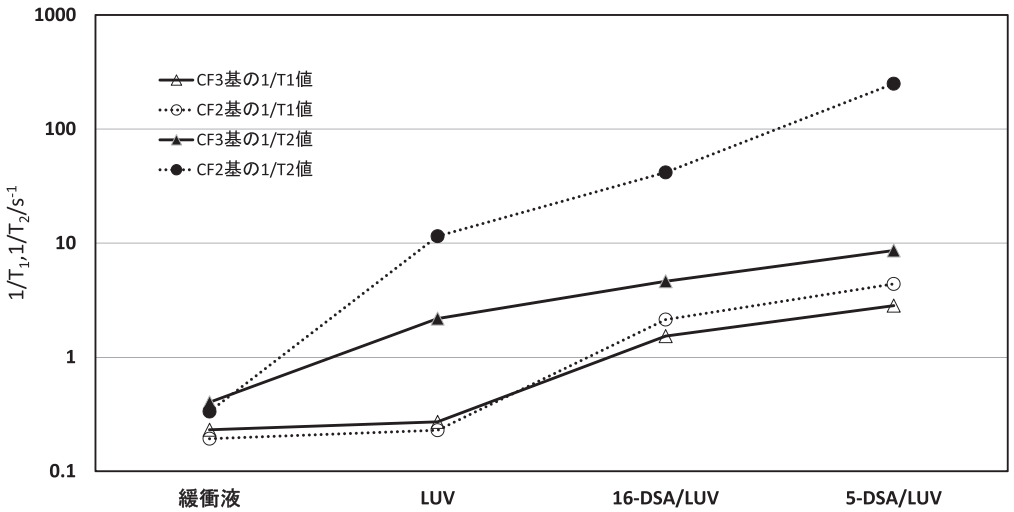

Fig. 10　イソフルランの$1/T_1$値，$1/T_2$値に対するLUVおよびスピンラベル剤の影響

緩衝液中の$1/T_1$及び$1/T_2$値は同程度の値を示し，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CF_3基では約4倍，CF_2基では約6倍大きくなった．16-DSA/LUV溶液中の$1/T_1$値はLUV溶液中と比較してCF_3基では約6倍，CF_2基では約9倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約2倍，CF_2基では約4倍大きくなった．また，5-DSA/LUV溶液中の$1/T_1$値はLUV溶液中と比較してCF_3基では約10倍，CF_2基では約19倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約8倍，CF_2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．

⊿1/Tir	CF_3	⊿$1/T_{1r}$	0.021
		⊿$1/T_{2r}$	0.45
	CF_2	⊿$1/T_{1r}$	0.012
		⊿$1/T_{2r}$	0.38
⊿1/Tid (16-DSA)	CF_3	⊿$1/T_{1d}$	0.35
		⊿$1/T_{2d}$	0.81
	CF_2	⊿$1/T_{1d}$	1.1
		⊿$1/T_{2d}$	10
⊿1/Tid (5-DSA)	CF_3	⊿$1/T_{1d}$	1.3
		⊿$1/T_{2d}$	2.9
	CF_2	⊿$1/T_{1d}$	2.7
		⊿$1/T_{2d}$	188

Table 3　⊿1/Tir , ⊿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，CF_3基の化学シフトの値には変化が見られなかったが，CF_2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CF_3基は約2倍，CF_2基は約3倍広くなり，5-DSA/LUV溶液ではCF_3基は約4倍，CF_2基は約6倍広くなった．CF_3基とCF_2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$1/T_1$及び$1/T_2$値をFig. 10に示した．16-DSA/LUV溶液中の$1/T_1$値はLUV溶液中と比較してCF_3基では約6倍，CF_2基では約9倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約2倍，CF_2基では約4倍大きくなった．また，5-DSA/LUV溶液中の$1/T_1$値はLUV溶液中と比較してCF_3基では約10倍，CF_2基では約19倍大きくなり，$1/T_2$値はCF_3基では約8倍，CF_2基では約21倍大きくなった．

さらに，イソフルランのCF_3基とCF_2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，CF_2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$1/T_1$及び$1/T_2$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）．

6．イソフルランの^{19}F-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CF_2基のみ大きくなった（Table 1及び2）．半値幅はCF_3基では同程度だが，CF_2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⊿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/T_1及び1/T_2値に強く影響を及ぼしていた．

考　　察

1．イソフルランの^{19}F-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]．^{19}F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，^{19}Fを含む全身麻酔薬の研究に^{19}F-NMRを用いる方法は利点が多い．そこで，^{19}F-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^{19}F-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^{19}F-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．

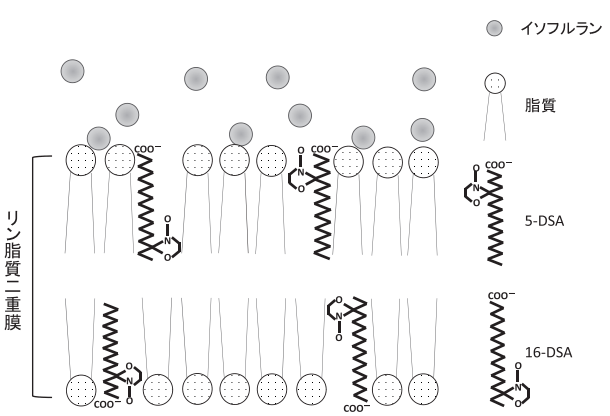

Fig. 11　リポソーム膜に対するイソフルランの作用部位
リポソームに5-DSAあるいは16-DSAを混入して^{19}F-NMRスペクトルに対するスピンラベル剤の影響を調べたところ，イソフルランがリポソーム膜の表層に結合し，イソフルラン分子はリポソーム膜の脂肪鎖の中，また小腔内部に入り込まないことが示唆された．

^{19}F-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CF_2基のほうがCF_3基よりも半値幅が広くなり，1/T_2値は大きくなった．これらの結果は，イソフルランのCF_2基がCF_3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，CF_2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/T_1あるいは1/T_2値と比較すると，1/T_1値は変化がないが1/T_2値が著しく大きくなった．

1/T_2と半値幅（$\Delta\nu_{\frac{1}{2}}$）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/T_2値で議論を行うこととした．1/T_1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/T_2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/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/T_1値と1/T_2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/T_{1e}はわずかに減少したが，⊿1/T_{2e}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，CF_3及びCF_2基の半値幅がMLV及びLUV溶液と比較して広くなり，1/T_1値と1/T_2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^{19}F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CF_3基とCF_2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/T_1値と1/T_2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/T_1値と1/T_2値に対して5-DSA及び16-DSA電子と^{19}F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/T_1及び1/T_2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^{19}F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/T_1と1/T_2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/T_1及び1/T_2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/T_1及び1/T_2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．

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

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

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

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

(8)式の結果をTable 4に示した．1/T_{ip}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0.2～5 μm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0.1～1 μm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 μmとし，NMRを用いた実験にてリン脂質二重膜の厚さは37 Å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3.2×10^{18}/μm^2，LUV溶液は2.0×10^{16}/μm^{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/T_{ip}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2.8×10^{17} μM/μm^2，LUV溶液は2.0×10^{16}/μm^{2}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/T_{ip}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	CF_3	1/T_{1p}	0.206
		1/T_{2p}	0.136
	CF_2	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

^{19}F-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，CF_2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^{19}F-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

1) 真下節：全身麻酔のメカニズム．臨床麻酔, 27:295-311, 2003.
2) 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.
4) 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.
5) 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.
9) 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 ^{19}F-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.
17) 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 ^{19}F-NMR. Cell Biochem Biophys, 52：31-35, 2008.
19) Haug C, Mason JT：Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. Biophysics, 75：308-310, 1978.

Hokkaido J. Dent. Sci., 44 : 49−60, 2023.

ORIGINAL

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

Shoichi Honma[1)], Toshifumi Hiraoki[2)], Makiko Shibuya[1)]
Kuniaki Suzuki[3)] and Toshiaki Fujisawa[1)]

ABSTRACT :

[Objectives] To investigate the interaction of a general anesthetic with biological membranes, we measured ^{19}F 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 ^{19}F 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 : ^{19}F-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