

は0.03増大したが、セボフルレン、イソフルレン、ハロセン、エーテル、プロポフォルではほとんど変化しなかった。 $\tau$ はプロポフォルの添加によりコントロールに比べて4 psec増加したがそれ以外の麻酔薬では4-11 psec減少した。

### 3. 麻酔薬の濃度と MLV の ESR スペクトルについて

次に、各麻酔薬の濃度に依存したスペクトル変化を臨床濃度とその10倍量、100倍量、1000倍量について調べた。なお、ハロセン、エーテル、サイアミラルについては1000倍量の麻酔薬添加により溶液が分離したため、ハロセン、サイアミラルは100倍量まで、エーテルは50倍量まで行った。5-DSAでは、セボフルレン、イソフルレンではスペクトル強度が麻酔薬の濃度と共にコントロールより20-25%まで増加した。一方、スペクトルの線形はほとんど変化しなかった (Fig. 3)。ハロセン、エーテル、エタノールでは100-1000倍の高濃度を添加した標本のスペクトル強度がコントロールより13-30%増加した。スペクトルの線

形はほとんど変化しなかった。プロポフォル、サイアミラルではスペクトルの強度・線形ともほとんど変化がなかった。16-DSAでは、セボフルレン、イソフルレン、エーテルにおいて麻酔薬の濃度が高濃度になるにつれ高磁場側のシグナル強度が増加した (Fig. 4)。

次に、5-DSA および 16-DSA での S の濃度依存性について調べた結果を Table 3 にまとめた。5-DSA においては、サイアミラル以外の麻酔薬では高濃度を添加したときに S はコントロールに比べ0.03-0.07減少したが、サイアミラルの場合にはほとんど変化しなかった。16-DSA においても 5-DSA と同様に、サイアミラル以外の麻酔薬を高濃度添加したときはコントロールに比べ0.02-0.06減少したが、サイアミラルの場合にはほとんど変化しなかった。

次に、16-DSA について得られた ESR スペクトルより算出した  $\tau$  の値を Table 4 にまとめた。 $\tau$  は臨床濃度と同濃度あるいは臨床濃度の10倍量を添加した場合、いずれの麻酔薬においてもほとんど変化しなかった。100-1000倍量の

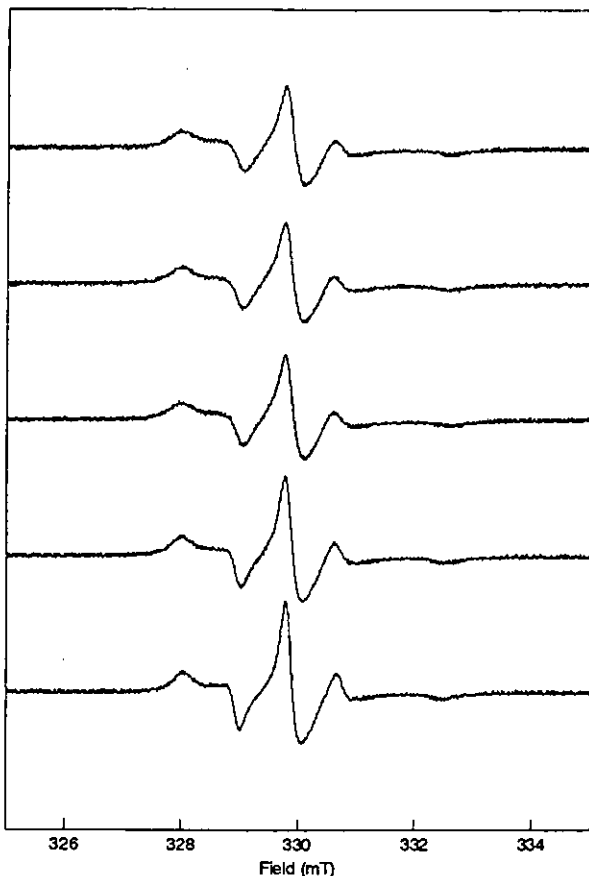


Fig. 3 ESR spectra of MLV labeled with 5-DSA in which concentrations of isoflurane were different.

The amplitude of the signal with 5-DSA increased by 20-25 % as the concentration of isoflurane became higher. The shape of the spectra did not change very much.

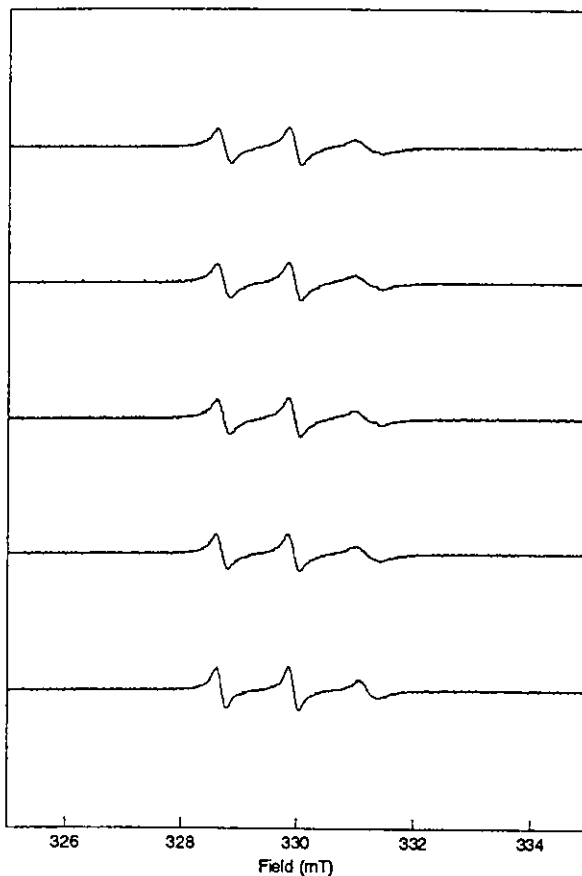


Fig. 4 ESR spectra of MLV labeled with 16-DSA in which concentrations of isoflurane were different.

The amplitude of the upfield signal in 16-DSA increased as the concentration of isoflurane became higher.

Table 3 Concentration of anesthetics dependent-changes of order parameter S of MLV labeled with 5-DSA and 16-DSA.

S values obtained with 5-DSA decreased except for thiamylal, when the concentration of anesthetics was 100-1000 times higher than clinical dose. The results with 16-DSA were almost the same as those with 5-DSA.

	orderparameter S				
	control	clinical concentration	a tenfold concentration	a hundredfold concentration	a thousandfold concentration
5DSA					
sevoflurane	0.69	0.70	0.69	0.68	0.66
isoflurane	0.68	0.68	0.69	0.65	0.63
halothane	0.68	0.69	0.69	0.65	-
ether	0.68	0.68	0.67	0.65*	-
EtOH	0.70	0.68	0.68	0.63	-
propofol	0.70	0.70	0.68	0.68	0.67
thiamylal	0.69	0.70	0.70	0.70	-
16DSA					
sevoflurane	0.15	0.14	0.14	0.14	0.12
isoflurane	0.15	0.15	0.16	0.13	0.09
halothane	0.15	0.15	0.15	0.11	-
ether	0.15	0.13	0.13	0.11*	-
EtOH	0.15	0.15	0.11	0.13	-
propofol	0.15	0.14	0.13	0.14	0.10
thiamylal	0.15	0.15	0.16	0.15	-

\*: fiftyfold concentration

Table 4 Concentration of anesthetics dependent-changes of rotational correlation time  $\tau$  of MLV labeled with 5-DSA and 16-DSA.

$\tau$  values decreased by 9-15 pico-second compared with control by the addition of sevoflurane, isoflurane, and halothane. However,  $\tau$  values increased by 9-15 pico-second by ethanol and propofol, remained unchanged by ether and thiamylal

	$\tau$ ( $10^{-12}$ S)				
	control	clinical concentration	tenfold concentration	hundredfold concentration	thousandfold concentration
sevoflurane	41	44	44	42	32
isoflurane	41	40	48	40	34
halothane	41	37	45	24	-
ether	37	45	42	37*	-
EtOH	37	38	32	46	-
propofol	37	43	45	48	52
thiamylal	37	38	42	36	-

\*: fiftyfold concentration

高濃度を添加した際は、セボフルレン、イソフルレン、ハロセンでは  $\tau$  は9-15 psec 減少し、エタノール、プロポフォルでは9-15 psec 増加した。エーテル、サイアミラルではほとんど変化しなかった。

以上、この測定において、スピンラベル剤を含むリボソーム溶液が添加する麻酔によって希釈された結果、ラジカル

の濃度が増加してスペクトルの線形が変わる可能性がある。そこで、添加する麻酔薬の容積を考慮した上で水を添加したコントロール実験を行った。その結果、添加する水の量が10% (v/v) まではスペクトルの線形にほとんど変化はなかった。したがって、今回設定した実験条件において10% (v/v) 以下になるように麻酔薬を添加した場合に

は、ラジカル濃度の変化によるスペクトル強度への影響はないと思われた。また、添加する水の量が10% (v/v) 以上になると添加する水の量に比例してスペクトル強度が減少したことから、スペクトル強度が増大した実験結果は麻酔薬による影響であると結論した。また、 $S$ や $\tau$ は添加する水の量に関わらずほとんど変化しなかったことから、今回の実験で用いた添加液量においてはスペクトルより計算されるパラメーターが影響されないことも確認できた。

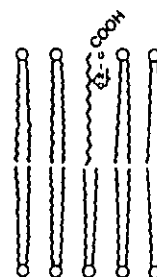
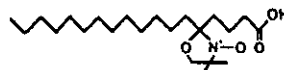
#### IV. 考 察

リポソームにおける麻酔薬の作用をESRで測定するにあたり、前の研究と同様に5-DSAと16-DSAという2種類のスピラベル剤を使用した<sup>2)</sup>。スピラベル剤のESRスペクトルから算出されるオーダーパラメーター $S$ は、ニトロキシドラジカルを含むスピラベル剤がどのように配向し、回転運動を行っているのかを示すものである。 $S$ は0から1の間の値をとり、完全に等方的な運動をしている場合は $S = 0$ 、完全に一方向にのみ向いている場合は $S = 1$ となる。

5-DSAと16-DSA両者の $S$ の相違についてSDS水溶液中にて測定した結果<sup>2)</sup>と比較すると、SDS系における5-DSA、16-DSAの $S$ がそれぞれ0.07-0.09、0.03-0.07でその差が約0.02-0.05であったのに対し、PC系ではそれぞれが0.67-0.69、0.13-0.15となり、差が0.5程度とSDS系に比べ顕著であった。これは、SDSが水溶液中にて分子数60数個のミセル構造をとるのに対し、PCが二重膜構造をとり、そのサイズが100nm-10 $\mu$ mとミセルに比べ格段に大きく、ラジカルの運動が制限されることによるものである。Seeligら<sup>15)</sup>は、DPPC二分子層膜中におけるアシル鎖中の様々な位置の炭素を重水素にて置換したところ、重水素の位置により $S$ が異なり、膜の中心に近づくにつれその値が小さくなることを示した。このことは二重膜の内部の方がより高いことを示す。今回DSAを用いた測定結果においても重水素を用いたSeeligらの研究とほぼ同様の $S$ 値が得られた。5-DSAと16-DSAの二重膜でのラジカルの位置を比較すると、分子構造の違いから5-DSAは膜の表層付近に存在し、16-DSAは比較的内部に存在すると推定される<sup>3,4)</sup> (Fig. 5)が、両者の $S$ の差が明確にでており、ラベルされている部位の環境の相違が反映されており、二重膜の内部の方がより可動性が高いことが示された。

オーダーパラメーターや回転相関時間の麻酔薬添加による変化は、いずれの麻酔薬を加えても顕著には認められなかった。膜構造をとる物質にスピラベル剤をラベルした場合、 $S$ は物理的性質のひとつである膜の流動性を示す指標として用いられている<sup>16)</sup>。したがって、今回の結果は、麻酔薬は膜の表層付近でも比較的内部においても脂質二重膜の流動性にほとんど影響を及ぼしていないことを示す。すなわち、麻酔薬は脂質二重膜の表層にとどまっており、

5-doxyyl stearic acid (5-DSA)



16-doxyyl stearic acid (16-DSA)

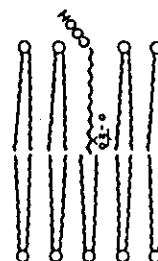
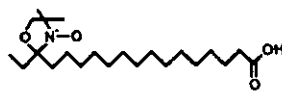


Fig. 5 The nitroxide radical location of 5-DSA and 16-DSA in the membrane bilayer.

This figure was altered from reference 4.

脂質の深い疎水部だけでなく比較的浅い親水部にも侵入しないことを示唆している。この結果はハロセンやエタノールの脂質二重膜における膜内分布について核磁気共鳴法で調べた研究結果<sup>17-20)</sup>とも一致した。

ところで、MLVはその構造が不均一で二重膜全体の10%程度が最外層となっているに過ぎず<sup>5)</sup>、したがってMLVでは得られたパラメーターの値が麻酔薬に接していない残り90%程度を占める内層の膜に含まれるラベル剤の信号に影響され、その変化がマスクされる可能性も考えられる。そこでSUVによる実験を行ったが、結果はMLVで得られた結果と顕著な差はなかった。したがって、主にMLVを用いて得られた今回の結果は、作成したリポソームの種類によって制限されるものではないと考えられる。

#### V. 結 論

PCリポソーム中にニトロキシドラジカル5-DSAおよび16-DSAを混入してESR測定を行った。ESRスペクトルのオーダーパラメーターは両者で異なり、ニトロキシドラジカルは二重膜の表層付近と内部に存在することが示された。麻酔薬を添加してもオーダーパラメーターや回転相関時間の値はほとんど変化しないことから、ラベル剤の存在する位置まで麻酔薬は影響を及ぼさないことが示された。さらに、PC多重層と単層のリポソームでのESRパラメーター値の変化はなく、得られた結果はリポソーム膜の形態により制限されるものではないことが示された。

## 文 献

- 1) Ohnishi, S. and McConnell, H.M.: Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**: 2293, 1965.
- 2) 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.
- 3) Griffith, O. H. and Jost, P. C.: Lipid spin labels in biological membranes. edited by Berliner, L.J., Spin labeling. Theory and applications. 500-504, Academic Press, New York-San Francisco-London, 1976.
- 4) 深澤 学: 慢性腎不全における赤血球膜流動性に関する研究. *聖マリアンナ医科大学雑誌*, **20**: 531-539, 1992.
- 5) 奥 直人: リボソームの作成と実験法. 14-20, 廣川書店, 東京, 1994.
- 6) 砂本順三, 岩本 清: リボソームの調整. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三編, *リボソーム*, 21-40, 南江堂, 東京, 1988.
- 7) 新宮 興, 大沢正巳, 森健次郎: ICI 35, 868 (プロポフォール) 第 1 相試験. *麻酔*, **39**: 219-229, 1990.
- 8) 藤井宏融: セボフルレン麻酔時のセボフルレン血中濃度及び代謝に関する研究. *麻酔*, **35**: S 373, 1986.
- 9) 吉矢生人, 太城力良, 山村秀夫: [イソフルレン] イソフルレン第 1 相臨床試験. *麻酔*, **36**: 1506-1518, 1987.
- 10) 小坂 誠: 血中ハロセン・エンフルレン麻酔濃度の循環動態に及ぼす影響の比較. *麻酔*, **40**: 1466-1476, 1991.
- 11) 隅本 彰, 越山健二郎, 白東 栄: エーテル麻酔時における血中エーテル濃度の推移. *麻酔*, **5**: 372-375, 1956.
- 12) 高橋長雄, 半沢辰夫, 立花 肇: 高速液体クロマトグラフィーによる血漿中サイアミラル濃度の測定. *麻酔*, **35**: 1402-1407, 1986.
- 13) Koga, T., Watanabe, H., Kawada, H., Takahashi, K., Utsui, Y., Domon, H., Ishii, C., Narita, T., and Yasuda, H.: Interactions of plauonol with bacterial membranes. *J. Antimicrob. Chemother.*, **42**: 133-140, 1998.
- 14) Korkmaz, O. and Korkmaz, M.: The effects of mitomycin-C and temperature on dynamical properties of human erythrocyte membrane. *Biophys. Chem.*, **69**: 167-174, 1997.
- 15) Seelig, A. and Seelig, J.: The dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry*, **13**: 4839-4845, 1974.
- 16) 大西俊一: 生体膜の動的構造 第 2 版. 113-122, 東京大学出版会, 東京, 1993.
- 17) Yoshida, T., Takahashi, K. and Ueda, I.: Molecular orientation of volatile anesthetics at the binding surface: <sup>1</sup>H- and <sup>19</sup>F-NMR studies of submolecular affinity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **985**: 331-333, 1989.
- 18) Yokono, S., Ogi, S. and Ueda, I.: 400 MHz two-dimensional nuclear Overhauser spectroscopy on anesthetic interaction with lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta.*, **982**: 300-302, 1989.
- 19) Trudell, J.R., and Hubbell, W.L.: Localization of molecular halothane in phospholipid bilayer model nerve membranes. *Anesthesiology*, **44**: 202-205, 1976.
- 20) 岡村恵美子, 中原 勝: <sup>13</sup>C NMR による麻酔薬の膜内分布の決定法. *麻酔と蘇生*, **37**: 91-92, 2001.

ORIGINAL

## The effects of general anesthetics on ESR spectra of spin labels in phosphatidylcholine vesicles

Makiko Shibuya<sup>1</sup>, Toshifumi Hiraoki<sup>2</sup>, Kunie Kimura<sup>1</sup>,  
Akihiro Tutsumi<sup>2</sup>, Kuniaki Suzuki<sup>3</sup> and Kazuaki Fukushima<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** We investigated the effects of general anesthetics on liposome with spin labels, 5-doxy stearic acid (5-DSA) and 16-doxy stearic acid (16-DSA), using an electron spin resonance (ESR) spectroscopy.

The lipid-composed liposome was made from phosphatidylcholine, and two kinds of liposome, multilamellar vesicle (MLV) and small unilamellar vesicle (SUV), were prepared. Sevoflurane, isoflurane, halothane, ether, ethanol, propofol, and thiamylal were selected as the anesthetics. Changes in the shape of spectra were observed, and the order parameter  $S$  and rotational correlation time  $\tau$  were calculated from the spectra.

The ESR spectra of MLV labeled with 5-DSA suggested that the movement of radicals in MLV is more anisotropic, and the speed of rotation is slower than that in the SDS solution. The spectra of MLV labeled with 16-DSA showed three sharp signals not appearing with 5-DSA. The differences in the order of the parameter  $S$  value of 5-DSA and 16-DSA suggest that the nitroxide radical location of 5-DSA and 16-DSA were different in the membrane bilayer.

The addition of sevoflurane and isoflurane increased the amplitude of signals as the concentration of the anesthetics was higher. Addition of halothane, ether and ethanol increased the amplitude of signals when the concentration of the anesthetics was 100-1000 times higher than usual clinical doses. However, the anesthetics did not alter the  $S$  and  $\tau$  values, which are indices of the fluidity of the membrane.

The  $S$  and  $\tau$  values of SUV differed very little and suggest that differences in membrane form do not affect the results of this research.

These results suggest that anesthetics remain on the surface of the lipid bilayer and do not act on the inside hydrophobic area of the relatively hydrophilic area near the surface.

**Key words:** electron spin resonance, liposome, general anesthetics, order parameter  $S$ , rotational correlation time  $\tau$

---

1. Department of Dental Anesthesiology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kazuaki Fukushima)

2. Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University (Chief : Prof. Akihiro Tutsumi)

3. Department of Dental Pharmacology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki)

1. and 3. Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586 Japan

2. Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060-8586 Japan

[Received: April 20, 2004] [Accepted May 21, 2004]

## 原 著

## スピラベル剤の ESR スペクトルに対する全身麻酔薬の影響

渋谷真希子<sup>1)</sup> 鈴木 邦明<sup>2)</sup> 平沖 敏文<sup>3)</sup>  
木村 邦衛<sup>1)</sup> 堤 耀廣<sup>3)</sup> 福島 和昭<sup>1)</sup>

抄 録：スピラベル剤 5-DSA および 16-DSA の電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを指標に全身麻酔薬がスピラベル剤周囲の環境に与える影響について検討した。

5-DSA 及び 16-DSA のメタノール, 水, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液中でのスペクトルを測定した。全身麻酔薬として, セボフルレン, イソフルレン, ハロセン, エーテル, エタノール, プロポフォル, サイアミラールを用い, 各溶液中に臨床で用いた際に測定された血中濃度と同程度の濃度およびその10~100倍の濃度になるように麻酔薬を加えた。ESR スペクトルよりオーダーパラメーター S および回転相関時間  $\tau$  を計算した。

メタノール溶液中では 5-DSA, 16-DSA のいずれもシャープな 3 本のシグナルを示し, 麻酔薬を添加してもスペクトルの変化はみられなかった。一方, 水溶液中では 5-DSA, 16-DSA のいずれのスペクトルもメタノール溶液中に比べ著しく減弱した。しかし, SDS を加えミセルを形成させた溶液にて測定したところ, スペクトルの強度が回復した。これは, 脂質様分子である DSA が水溶液中で会合体を形成したためスペクトルが減弱し, SDS がミセルを形成すると DSA がミセル中に分散したためスペクトル強度が回復したものと考えられた。

次に, SDS ミセルを生体膜のモデルとし, 麻酔薬による ESR パラメーターの変化を測定した。S の値は小さく, その変化量は小さいものの, ハロセン, エーテル, エタノール, プロポフォル, サイアミラールにて有意に変化した。一方, セボフルレン, イソフルレンでは変化しなかった。また,  $\tau$  に関してはハロセン, エーテル, エタノール, サイアミラールにて有意に変化した, セボフルレン, イソフルレン, プロポフォルでは変化しなかった。さらに, 変化の度合いはスピラベル剤の種類や加えた麻酔薬の種類によって異なった。したがって, 麻酔作用を持つという共通点があっても麻酔薬の種類によりスピラベル剤周囲の環境変化の度合いが異なることが示唆された。

キーワード：電子スピン共鳴, スピラベル剤, 全身麻酔薬, オーダーパラメーター, 回転相関時間

## 緒 言

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長年議論が続いており, まだ一定の見解は得られていない。数多くの仮説が存在するが, 大別すると非特異説と特異説の 2 つに分けることができる。前者は麻酔作用を持つ薬物の分子構造に一貫した類似性がないこと, 麻酔薬の脂質溶解性など様々な物性と麻酔作用に相関関係がみられることなどから, 麻酔薬はある特定の部位に作用するのではなく非選択的・非特異的に作用するものとする仮説である。一方, 後者は臨床濃度の麻酔薬が特定のニューロン, あるいはレセプターなどに作用することによ

り麻酔作用が発現されるという仮説であり, GABA<sub>A</sub> レセプターやアセチルコリンレセプターなどのリガンド閉鎖型イオンチャンネル, Na<sup>+</sup> チャンネルなどの電位依存型イオンチャンネル, PKC などの細胞内情報伝達物質などに関する報告がある。我々は, 膜タンパク質である Na,K-ATPase に全身麻酔薬を加えた際の影響を調べた研究結果から, 麻酔薬は特定のタンパク質に選択的に作用するだけではなく, 脂質およびタンパク質を含めた生体膜に物理化学的に作用すると考えている<sup>1-3)</sup>。

電子スピン共鳴 (ESR) を用いるスピラベル法は, 1965年に大西と McConnell<sup>4)</sup>により考案された, 安定なラジカルをもつスピラベル剤を対象物に化学的に結合させ

<sup>1), 2)</sup> 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

<sup>3)</sup> 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目

<sup>1)</sup> 北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座歯科侵襲生体反応解析学 (主任: 福島和昭 教授)

<sup>2)</sup> 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 (主任: 鈴木邦明 教授)

<sup>3)</sup> 北海道大学大学院工学研究科量子物理工学専攻物質物理工学講座分子物理学 (主任: 堤 耀廣 教授)

[受付: 平成15年9月12日] [受理: 平成15年10月8日]

て、そのラジカルのESRスペクトルから対象物の周囲の環境および運動状態を調べるという方法である。スピラベル法を用いた全身麻酔薬に関する研究としては、Hubbellらによる全身麻酔薬にて赤血球膜の膜流動性が増大したとの報告<sup>5)</sup>を始めとし、生体膜脂質やアセチルコリンレセプター<sup>6,7)</sup>との関連性などに関する報告がなされている。また、スピラベル剤は、100種類以上が存在するが、全身麻酔薬が作用すると考えられる生体膜の研究によく用いられているものとして、ステアリン酸スピラベル剤がある。今回我々は、ESRスペクトルの測定による全身麻酔薬作用機構の解明を目的に、アルキル鎖中のラジカルの位置が異なることから異なる部位にラベルできると考えられる、二つのステアリン酸スピラベル剤、5-doxyl stearic acid (以下5-DSA) および 16-doxyl stearic acid (以下16-DSA) (構造式をFig.1に示す)を用いてESRスペクトルの測定を行い、スピラベル剤の周囲の環境に与える麻酔薬の影響について検討したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 材料

5-DSA および 16-DSA は Aldrich 社製のものを使用した。セボフルレン、イソフルレンはアボットジャパン社製、ハロセンは武田薬品工業社製、プロポフォルはアストラゼネカ社製、サイアミラールは三菱ウェルファーマ社製、その他の試薬は特級のものを使用した。

5-DSA および 16-DSA は50mMの濃度になるようにメタノールで溶解し、 $-40^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

#### 2. 方法

メタノール、水、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液の各溶液中に  $500\ \mu\text{M}$  になるように5-DSAまたは16-DSAを加えたものをcontrolとした。麻酔薬は、臨床で用いた際に測定された血中濃度と同程度の濃度 (エタノールに関しては酩酊状態となる血中濃度と同程度の濃度) を臨

床濃度<sup>9-13)</sup> (セボフルレンは  $350\ \mu\text{M}$ , イソフルレンは  $10.5\ \text{mg/dl}$ , ハロセンは  $28.1\ \text{mg/dl}$ , エーテルは  $150\ \text{mg/dl}$ , エタノールは  $0.2\%$ , サイアミラールは  $25\ \mu\text{g/ml}$ , プロポフォルは  $10\ \text{mg/ml}$ ), 臨床濃度の10~100倍を高濃度とした。それぞれの濃度になるように麻酔薬を加えた後ただちにキャップをして麻酔薬が揮発するのを防止した。Vortexにて攪拌した後  $50\ \mu\text{l}$  をマイクロシリンジにて取り出しガラス製キャピラリー (外径  $1.52\ \text{mm}$ , 内径  $1.09\ \text{mm}$ , 長さ約  $8.5\ \text{cm}$ ) に注入し、揮発を防ぐため栓をして測定した。測定は各々5本ずつ行い、結果はスペクトルを基に算出した計算値またはコントロールを100とした相対値にて平均と標準偏差を示した。

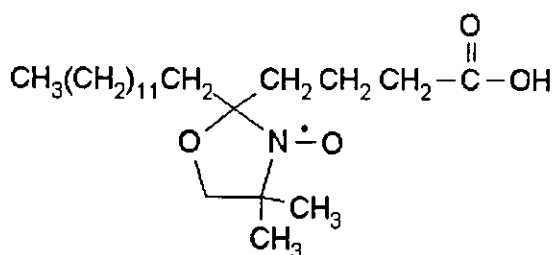
#### 3. ESR 測定

ESRスペクトルの測定は、日本電子社製FE1Xを用い、X band,  $9.2\ \text{GHz}$ ,  $22^{\circ}\text{C}$  に行った。得られたスペクトルより、スペクトルの分離幅  $A_{\text{max}}$  および  $A_{\text{min}}$ , 3本のシグナルの強度  $h(1)$ ,  $h(0)$ ,  $h(-1)$ , 中央のシグナルの線幅  $\Delta H$  を Fig. 2 のように計測した。マイクロ波の出力は  $1\text{--}3\ \text{mW}$  とし、その他の測定条件は以下の様に設定した。

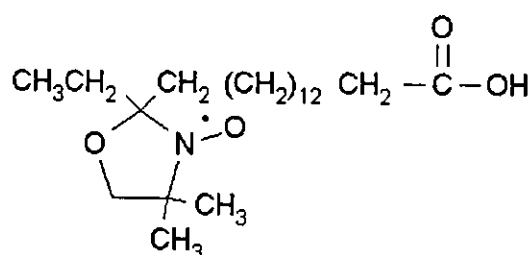
scan width :  $330 \pm 5\ \text{mT}$ , sweep time : 4-8 min, modulation :  $100\ \text{kHz}$ ,  $0.08\text{--}0.16\ \text{mT}$ , amplitude :  $2 \times 100$ , response : 0.1 sec

#### 4. 各パラメーターの計算方法

オーダーパラメーター  $S$  はニトロキシドラジカルを含むスピラベル剤がどのように配向し、異方的回転を行っているのかを示すものであり、膜構造をとる物質にスピラベル剤をラベルした場合、 $S$  は物理的性質のひとつである膜の流動性を示す指標として用いられている<sup>14)</sup>。  $S$  は0から1の間の値をとり、完全に等方的な運動をしている場合は  $S = 0$ , 完全に一方向にのみ向いている場合は  $S = 1$  となる。  $S$  は得られたスペクトルの分離幅  $A_{\text{max}}$  および  $A_{\text{min}}$  を用い、以下の式を用いて計算した。



5-Doxyl-Stearic Acid (5-DSA)



16-Doxyl-Stearic Acid (16-DSA)

Fig. 1 Structures of 5-DSA and 16-DSA.

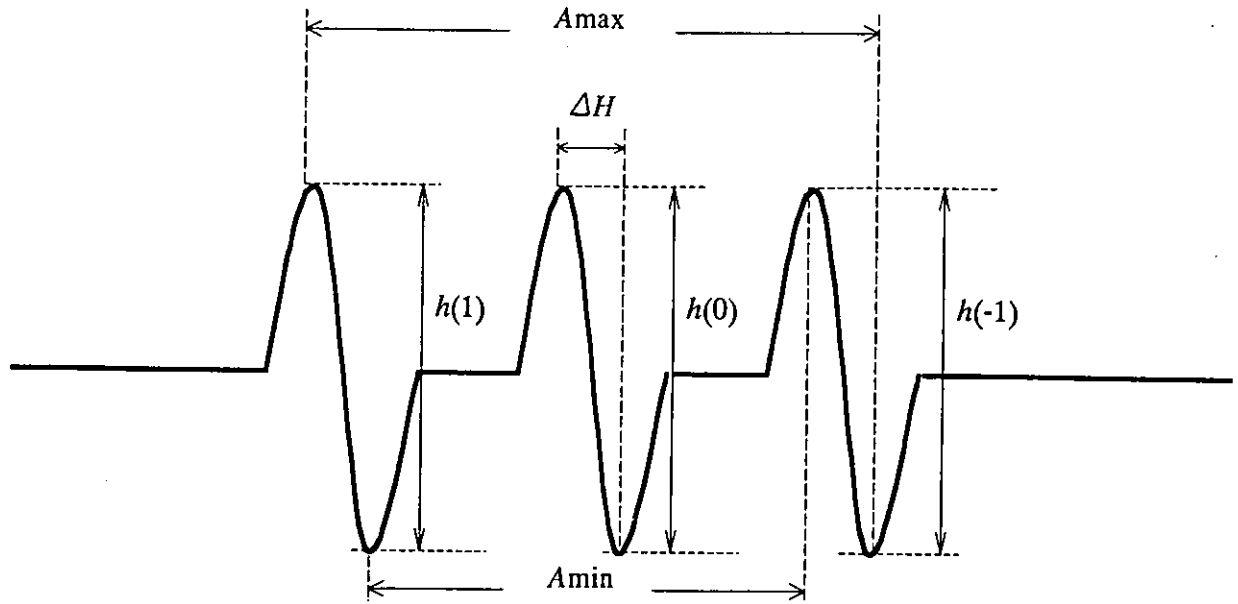


Fig. 2 A representative ESR spectrum of a nitroxide radical.

$$S = (A_{//} - A_{\perp}) / [A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2] k \quad (1)$$

ここで、 $A_{//}$ 、 $A_{\perp}$ 、 $k$  は以下のように規定した。

$$A_{//} = A_{\max}$$

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4 (1 - S_{\text{app}}), S_{\text{app}} = (A_{\max} - A_{\min}) / [A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2]$$

$$k = a_0 / a'_0, a_0 = (A_{//} + 2A_{\perp}) / 3, a'_0 = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) / 3$$

また、 $A_{xx}$ 、 $A_{yy}$ 、 $A_{zz}$  はスピラベル剤のテンソル値であり、5-DSA については、Koga ら<sup>15)</sup> が使用した値 ( $A_{xx} = 0.63 \text{ mT}$ 、 $A_{yy} = 0.58 \text{ mT}$ 、 $A_{zz} = 3.16 \text{ mT}$ ) を用いた。また、16-DSA のテンソル値は文献上で見あたらないため、5-DSA のテンソル値を用いた。

スピラベル剤の回転運動の速さを示す回転相関時間 (以下  $\tau$ ) は 3 本のスペクトルの強度  $h(1)$ 、 $h(0)$ 、 $h(-1)$ 、中央シグナルの線幅  $\Delta H$  の値を以下の式に用いて計算した<sup>16)</sup>。

$$\tau = 341.8 \times 10^{-12} \times \Delta H \left[ \sqrt{h(0)/h(-1)} - \sqrt{h(0)/h(1)} \right] \quad (2)$$

### 5. 統計処理

統計処理は各々の control 値に対して  $t$  検定を行い、危険率  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

## 結 果

### 1. メタノール中の ESR スペクトルについて

メタノール溶液中では、5-DSA (Fig. 3)、16-DSA のいずれもシャープな 3 本のシグナルを示した。右のシグナルが他の 2 本に比べ短く、わずかに異方性があることが示唆された。Fig. 3 に示したイソフルレンと同様に、いずれの麻酔薬を添加してもスペクトルの大きな変化は観察され

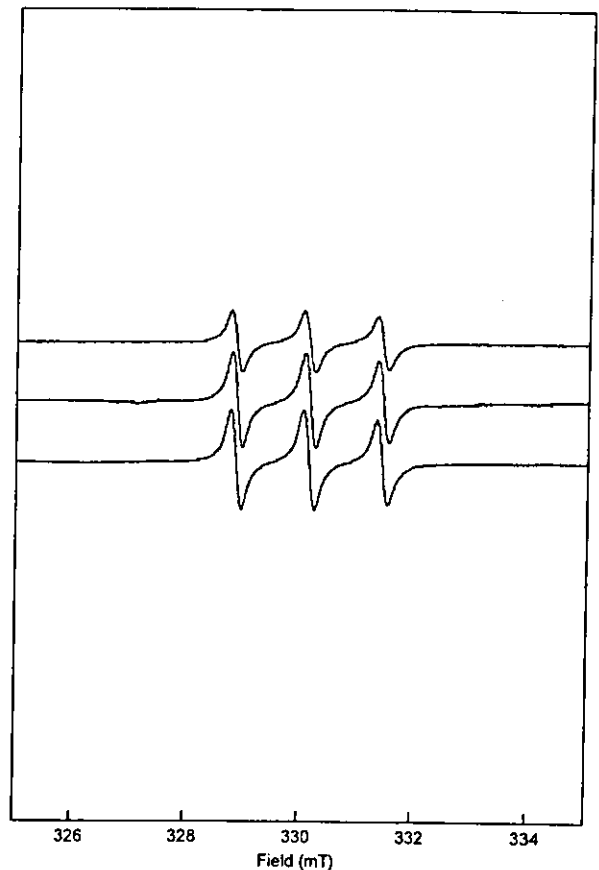


Fig. 3 ESR spectra of 5-DSA in methanol. upper: in methanol (control), middle: + isoflurane of a clinical concentration, lower: + isoflurane of a high concentration. The spectra of 5-DSA in methanol showed three sharp signals. Isoflurane did not alter the spectra.



ず、5-DSAのSはcontrol, 臨床濃度, 高濃度の順に, 0.056, 0.056, 0.058とほとんど変化しなかった。 $\tau$ は $4.5 \times 10^{-12}$ ,  $5.0 \times 10^{-12}$ ,  $5.7 \times 10^{-12}$  (sec)と軽度が増大した。16-DSAについてもSは0.067, 0.066, 0.068とほとんど変化しなかった。 $\tau$ は $2.0 \times 10^{-12}$ ,  $2.4 \times 10^{-12}$ ,  $2.4 \times 10^{-12}$  (sec)と軽度が増大した。また、16-DSAのSと $\tau$ は常に5-DSAより小さい値を示した。

## 2. 水溶液中のESRスペクトルについて

水溶液中では5-DSA, 16-DSA (Fig. 4の1と1')のいずれのスペクトルもラジカルの濃度が同濃度であるのにメタノール溶液中に比べスペクトル強度が著しく減弱し、基線がS字状に変化した。基線のS字状変化は、3本のシグナルとは異なるブロードなスペクトルが存在することを示している。イソフルレンを添加したところ、臨床濃度ではスペクトル強度が軽度に回復したが (Fig. 4の2), 高濃度のイソフルレンでは再びスペクトル強度が減少した

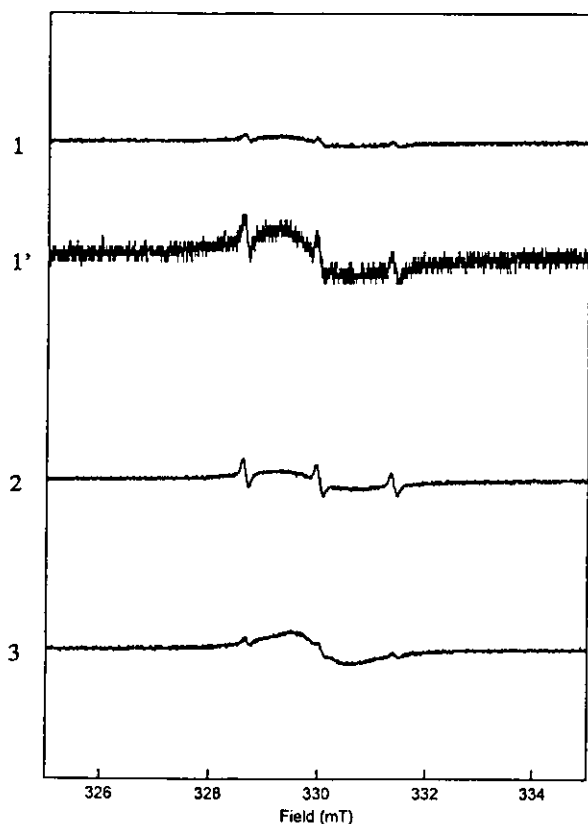


Fig. 4 ESR spectra of 16-DSA in H<sub>2</sub>O. 1: in H<sub>2</sub>O (control), 1': control (vertical axis  $\times 5$ ), 2: + isoflurane of a clinical concentration, 3: + isoflurane of a high concentration. Signals of 16-DSA spectra in H<sub>2</sub>O decreased remarkably compared with those in methanol. The baseline of the spectra changed from straight to sigmoidal curve, suggesting that the existence of broad spectra that are different from the three sharp signals.

(Fig. 4の3). ハロセンに関してはイソフルレンと殆ど同様の変化がみられた。その他の麻酔薬に関しては、イソフルレンの場合のように顕著ではないものの、同様な基線の形状変化がみられた。

なお、Sおよび $\tau$ に関しては、スペクトルが二成分であるため、スペクトルのパラメーターが得られず、計算できなかった。

## 3. SDS水溶液中のESRスペクトル

Fig. 4の1および1'にて16-DSAについて示したのと同様に、5-DSAにおいても水溶液中でスペクトルの減弱とS字状変化がみられた。(Fig. 5の5)。そこでSDSを加えたSDS濃度依存性をみたところ、SDS濃度が0.05%w/v以下の場合は、水溶液中と同様に出力を上げるなどの操作を行わないとスペクトルが観察できなかったが (Fig. 5の4), SDS濃度が0.5%w/v以上になると基線の平坦化、すなわちブロードな成分が消失し、信号強度が増大した

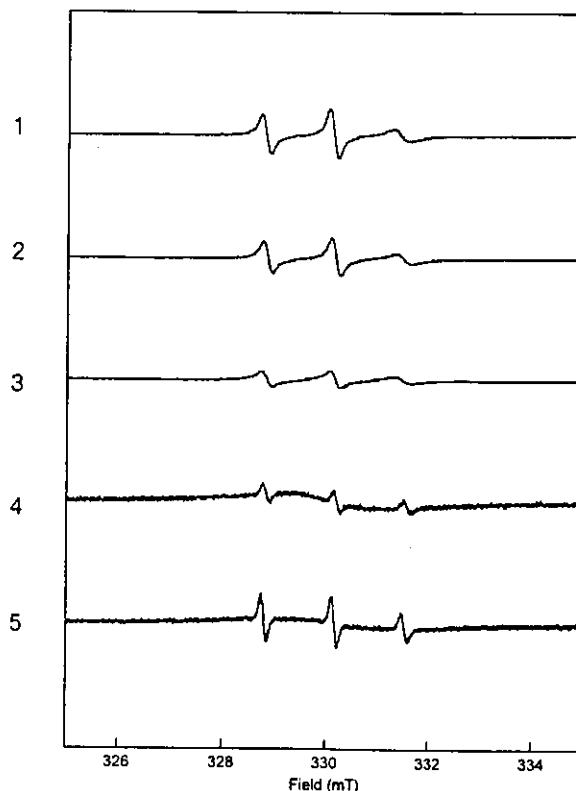


Fig. 5 ESR spectra of 5-DSA in SDS solution. 1: 2% SDS, 2: 1% SDS, 3: 0.5% SDS, 4: 0.05% SDS, 5: H<sub>2</sub>O (control). Signal amplitudes recovered and the baseline became flat in SDS solution of which concentrations were above 0.5%.

(Fig. 5 の 3). さらに, 2%w/v までは濃度に依存してスペクトルの強度が回復した (Fig. 5 の 1-3).

次に, SDS 濃度を 1%w/v に固定した SDS 水溶液中に麻酔薬を加えた際のスペクトル変化を Fig. 6 に示した. 5-DSA にエーテルやエタノールを加えた場合は, 右のシグナルの強度が増大しスペクトル全体が高磁場側に軽度シフトした (Fig. 6 の 1). セボフルレン, プロポフォールの場合はスペクトルの形状に大きな変化は認められなかった (Fig. 6 の 2). サイアミラルの場合, 臨床濃度ではコントロールに比べ右のシグナルの強度が減少しスペクトル全体が高磁場側に軽度シフトしたが, 高濃度では右のシグナルの強度が回復しスペクトル全体がさらに高磁場側にシフトした (Fig. 6 の 3). ハロタンを加えた場合はスペクトル強度が増大した. イソフルレンを加えた場合はスペクトル強度が増大しスペクトル全体が低磁場側に軽度シフトした. 16-DSA にセボフルレン, プロポフォールを加えた場合はスペクトルの形状に大きな変化は認められなかった. エーテルやエタノールを加えた場合は, 右のシグナルの強度が増大しスペクトル全体が高磁場側に軽度シフトした. ハロタン, サイアミラルを加えた場合はスペクトル強度が増大した.

次に, 5-DSA および 16-DSA について各麻酔薬存在下に計算した S と  $\tau$  の値を Table 1 にまとめた. 求めた S は, control では 5-DSA で 0.073-0.090, 16-DSA で 0.028-0.068 といずれも非常に小さく, 等方的な運動を示した. また, 16-DSA の S は常に 5-DSA より小さい値を示した. 臨床濃度および高濃度の麻酔薬の添加により, S の平均値は 5-DSA で 0.072-0.141, 16-DSA で 0.021-0.116 の範囲で増減したが, その変化量自体は少なかった.  $\tau$  に関しては, control の平均値において 5-DSA で  $39.0-49.0 (\times 10^{-12} \text{sec})$ , 16-DSA で  $17.9-20.7 (\times 10^{-12} \text{sec})$  と 16-DSA は 5-DSA の約 1/2 の値を示した. 臨床濃度および高濃度の麻酔薬の添加により,  $\tau$  の平均値は 5-DSA で  $32.3-63.3 (\times 10^{-12} \text{sec})$ , 16-DSA で  $11.6-22.2 (\times 10^{-12} \text{sec})$  の範囲で増減した.

次に, 麻酔薬非存在下の S と  $\tau$  を 100% とし, 各麻酔薬による変化を Fig. 7~Fig. 10 に示した. 5-DSA ではエーテルの臨床濃度と高濃度, エタノールの高濃度, プロポフォールの臨床濃度で有意に S の減少が見られたがサイアミラルの高濃度添加では逆に有意に S の増加が見られた. その他の麻酔薬では有意な変化はみられなかった (Fig. 7). 16-DSA についてはエーテル, エタノールの高濃度で有意に S の減少が見られ, ハロセンの臨床濃度, サイアミラルの高濃度では有意に S の増加が見られた (Fig. 8).  $\tau$  に関しては, 5-DSA では, エーテルの臨床濃度と高濃度, エタノールの高濃度で有意に  $\tau$  が減少したが, ハロセンの臨床濃度と高濃度, サイアミラルの高濃度では逆に有意に増加した (Fig. 9). 16-DSA ではエーテル, エタノール,

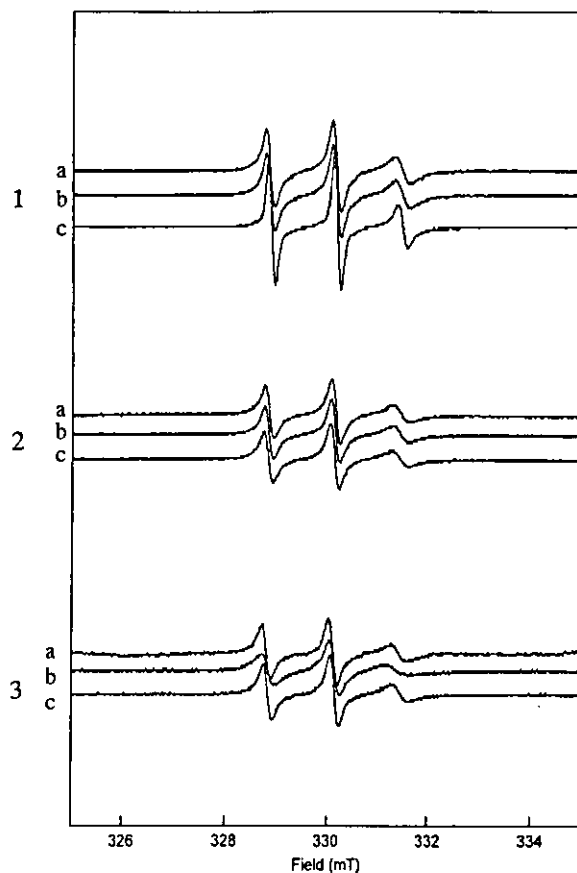


Fig. 6 Effects of ether, propofol and thiamylal on ESR spectra of 5-DSA in 1% SDS solution. 1: ether, 2: propofol, 3: thiamylal. a: without anesthetics, b: a clinical concentration of anesthetics, c: a high concentration of anesthetics.

The manner of changes in spectra was different in each anesthetics. An addition of ether increased the amplitude of the right signal and shifted the whole spectra slightly to the side of upfield. An addition of propofol did not change the spectra significantly. An addition of thiamylal at a clinical concentration reduced the amplitude of the right signal and shifted the whole spectra slightly to the side of upfield. An addition of thiamylal at high concentration recovered the amplitude of the right signal to the control level and shifted the whole spectra more to the side of upfield.

サイアミラルの高濃度のみで有意な  $\tau$  の減少がみられた (Fig. 10). 麻酔薬の濃度別にみると, 臨床濃度にて変化がみられたのは S に関しては 5-DSA におけるエーテルとプロポフォール, 16-DSA におけるハロセン,  $\tau$  に関しては, 5-DSA におけるハロセンとエーテルであった.

### 考 察

ESR を用いた全身麻酔薬の生体膜への作用を研究するにあたり, 我々は当初, 膜タンパク質である Na,K-ATPase にスピララベル剤をラベルすることにより周囲の環境に対する情報を得ようと試みた. しかし, 実際に得られた

Table 1 A summary of order parameter ( $S$ ) and rotational correlation time ( $\tau$ ).

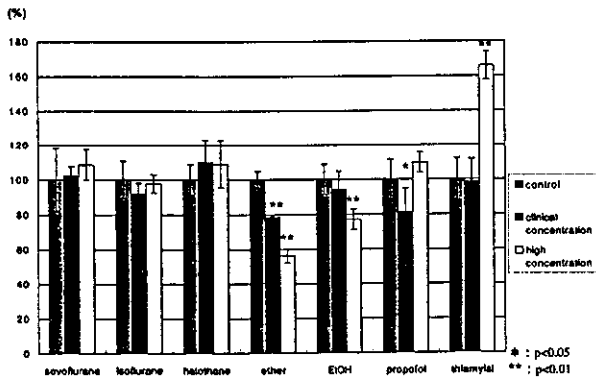
$S$  values were small, suggesting that the motion of the probe was isotropic.  $S$  and  $\tau$  values of 16-DSA were smaller than those of 5-DSA.

Order parameter  $S$ 

	5DSA			16DSA		
	control	clinical concentration	high concentration	control	clinical concentration	high concentration
sevoflurane	0.076 ± 0.014	0.078 ± 0.004	0.082 ± 0.007	0.031 ± 0.001	0.031 ± 0.003	0.029 ± 0.004
isoflurane	0.082 ± 0.009	0.075 ± 0.005	0.080 ± 0.004	0.028 ± 0.002	0.031 ± 0.003	0.030 ± 0.003
halothane	0.073 ± 0.007	0.081 ± 0.010	0.080 ± 0.010	0.031 ± 0.003	0.035 ± 0.001	0.033 ± 0.004
ether	0.088 ± 0.004	0.069 ± 0.001	0.049 ± 0.004	0.032 ± 0.004	0.028 ± 0.002	0.021 ± 0.001
EtOH	0.077 ± 0.007	0.072 ± 0.008	0.059 ± 0.005	0.060 ± 0.007	0.053 ± 0.008	0.038 ± 0.002
propofol	0.090 ± 0.010	0.073 ± 0.012	0.099 ± 0.005	0.065 ± 0.008	0.052 ± 0.010	0.075 ± 0.005
thiamylal	0.085 ± 0.010	0.084 ± 0.011	0.141 ± 0.007	0.068 ± 0.009	0.067 ± 0.004	0.116 ± 0.009

Rotational correlation time  $\tau$  ( $\times 10^{-12}$  s)

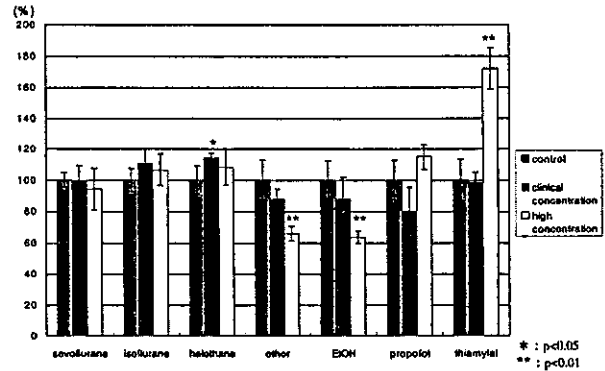
	5DSA			16DSA		
	control	clinical concentration	high concentration	control	clinical concentration	high concentration
sevoflurane	43.1 ± 2.9	44.3 ± 2.7	42.5 ± 1.9	18.4 ± 1.1	18.7 ± 2.0	18.9 ± 0.8
isoflurane	44.4 ± 3.7	45.6 ± 2.8	42.3 ± 4.0	19.8 ± 1.3	20.4 ± 0.9	20.3 ± 1.6
halothane	39.0 ± 1.3	48.1 ± 3.5	43.1 ± 1.2	18.6 ± 0.9	18.7 ± 0.4	19.7 ± 0.7
ether	43.7 ± 1.3	41.4 ± 1.4	32.3 ± 1.6	17.9 ± 0.9	17.0 ± 1.3	11.6 ± 0.9
EtOH	43.6 ± 1.5	41.4 ± 1.5	36.4 ± 1.5	20.7 ± 0.6	20.4 ± 0.7	13.6 ± 0.4
propofol	49.0 ± 5.4	45.1 ± 2.6	49.1 ± 2.5	20.1 ± 3.2	19.6 ± 2.2	22.2 ± 1.0
thiamylal	46.5 ± 1.6	48.6 ± 7.2	63.3 ± 3.0	21.4 ± 1.3	20.6 ± 2.0	17.7 ± 0.7

Fig. 7 The effects of anesthetics on order parameter  $S$  of 5-DSA.

$S$  value decreased significantly with ether at clinical and high concentrations, EtOH at a high concentration, and propofol at a clinical concentration. It increased significantly with thiamylal at a high concentration.

情報が複雑であり、そのままでは解析する事が困難であった。そこで、まずはより単純な実験系で麻酔薬の添加によるスペクトル変化の解析を行うことが必要となり、検討したものが本研究である。

メタノール中での ESR スペクトルシグナルがシャープな 3 本線を示したことにより、ニトロキシドラジカルが速くほぼ等方的 (物理的性質が方向によって異なること)

Fig. 8 The effects of anesthetics on order parameter  $S$  of 16-DSA.

$S$  values decreased significantly with ether and EtOH at high concentrations. It increased significantly with halothane at a clinical concentration and thiamylal at a high concentration.

な運動を行っている」と類推された。このことは 5-DSA および 16-DSA が脂質様物質であり、メタノールに溶解しやすい性質であることとよく整合する。

一方、水溶液中においてはスペクトル強度が著しく減弱したが、これは脂質様分子である DSA が水溶液中で自己会合体を形成し、分子の NO ラジカルが空間的に接近してスピンスピン相互作用が生じ、各シグナルの線幅が広

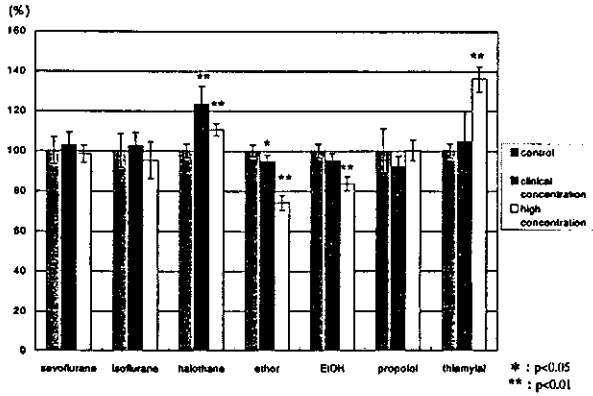


Fig. 9 The effects of anesthetics on  $r$  of 5-DSA.

$r$  values decreased significantly with ether at clinical and high concentrations and EtOH at a high concentration. It increased significantly with halothane at clinical and high concentrations and thiamylal at high concentration.

がったためと推定された。麻酔薬を加えるとスペクトルの強度が軽度上昇したが、これは麻酔薬が水より DSA により高い親和性を持つため、麻酔薬が自己会合体の中に入り込みスピンスピン相互作用が減少したことを示す。

SDS 水溶液の場合、SDS 濃度が 0.05% w/v 以下では水溶液とほとんど同じスペクトルがみられたが、0.5% w/v 以上になるとスペクトル強度の回復がみられ、かつブロードな成分が消失した。これは、SDS の水溶液中での臨界ミセル濃度、すなわち界面活性剤である SDS がミセル構造を取り始める濃度が 8.2mM であり<sup>17)</sup>、パーセント濃度で約 0.2% w/v であることから、SDS がミセルを形成すると DSA がミセル中に分散し、スピンスピン相互作用を生じない程度の距離を保つことができたためと考えられた。

分子中のラジカル位置を 5-DSA と 16-DSA で比較すると、5-DSA は親水頭部付近にあり、16-DSA は疎水部にあるので、二重膜ではそれぞれ膜の表層付近と比較的内部という異なる場所の情報を与える<sup>18)</sup>。SDS は水中にて分子数 60 数個の球状ミセル構造をとり<sup>17)</sup>、生体膜のような二重膜とは異なるものの、表層が親水基で内部が疎水基であるという基本的構造は同様である。この点と 5-DSA および 16-DSA の分子構造 (Fig. 1) さらに今回の実験結果において 5-DSA および 16-DSA の S と  $r$  の相違を考慮すると、SDS ミセル中に DSA を加えた本実験は、スピラベルの位置と環境変化に関して、生体膜に DSA を加えた場合と同様に論議できることが確認できたと考えられる。

SDS がミセルを形成した水溶液中に麻酔薬を添加すると、全身麻酔作用はいずれの麻酔薬にもあるものの、オーダーパラメーター S の変化は麻酔薬の種類や濃度により様々であった。オーダーパラメーターについては 5-DSA ではエーテル、エタノール、プロポフォル存在下で有意にオーダーパラメーターの減少が見られたことから、これらの麻酔薬により 5-DSA 周囲の環境がより無秩序になっ

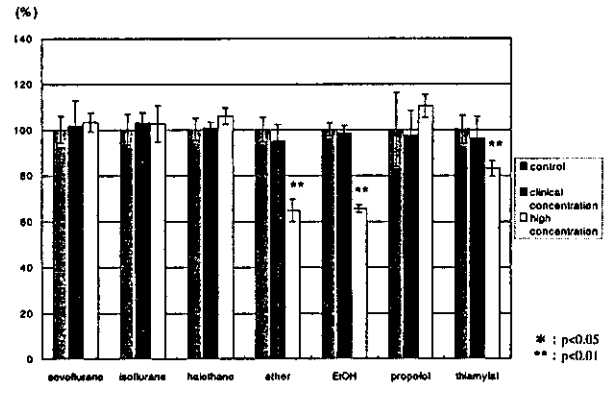


Fig. 10 The effects of anesthetics on  $r$  of 16-DSA.

$r$  values decreased significantly with ether, EtOH and thiamylal at high concentrations.

たことを示す。逆にサイアミラル存在下では 5-DSA 周囲の環境がより秩序のある状態になったことを示す。また、16-DSA でも同様にエーテル、エタノール存在下で 16-DSA 周囲の環境がより無秩序になったことを示し、ハロセン、サイアミラル存在下では秩序のある状態になったことを示す。生体膜の研究においてオーダーパラメーターの値は膜流動性の指標であることを考慮すると、もし先に述べた SDS ミセル中における DSA の位置関係の仮定が正しければ、今回の結果により、例えば高濃度のエタノール存在下では SDS ミセルの表層および内部のいずれの膜流動性も増大していると考えられる。

ただ、今回の結果においてオーダーパラメーターの変化は有意だったものの、その変化量は小さく、その意義に対して疑問が生じるかもしれない。しかし、膜流動性が変化することにより、膜を介して機能を発現する膜酵素やタンパク質、レセプター機能が大きな影響を受けることが知られており<sup>19,20)</sup>、たとえ膜流動性自体の変化量が小さくてもそれらに影響する可能性があると考えられる。また、麻酔薬により膜流動性の相違があることは、個々の麻酔薬の特性と関連している可能性もあると考えられるだろう。

回転相関時間についても同様に 5-DSA のみで有意に変化しているものや 5-DSA, 16-DSA 両者で変化しているものなど麻酔薬の種類により変化の度合いが異なり、SDS ミセルにおいて影響を及ぼしている部位の相違が示唆された。

今回の研究において、モデル膜の材料として SDS を選択した。SDS は、臨界ミセル濃度が既知であることや比較的扱いやすいこと等のメリットがあるが、実際に生体内に存在する物質ではない。そこで、本研究にて得られた知見を生かし、現在、生体膜構成脂質存在下での ESR スペクトルに対する麻酔薬の効果を検討中である。

## 結 論

SDS ミセルに分散したスピラベル剤を含む水溶液中に麻酔薬を添加した際における ESR スペクトルのパラメーター変化は、その変化量は小さいものの、ハロセン、エーテル、エタノール、プロポフォル、サイアミラールにて有意な変化がみられ、変化の度合いは加えた麻酔薬の種類によって異なった。したがって、麻酔薬の種類によりスピラベル剤周囲の環境変化の度合いが異なることが示唆された。

## 文 献

- 1) 鈴木邦明, 松本 章: 歯の病気に使用する“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.
- 2) 川田 達: 全身麻酔薬及び関連薬がウサギ脳 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase に及ぼす影響に関する研究. 北海道歯誌, **20**: 39-50, 1999.
- 3) 小野智史: 揮発性麻酔薬の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase とアルカリ性ホスファターゼにおよぼす影響に関する研究. 北海道歯誌, **21**: 245-255, 2000.
- 4) Ohnishi, S., McConnell, H.M.: Interaction of the radical ion of ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J Am chem Soc*, **87**: 2293, 1965.
- 5) Hubbell, W. L., McConnell, H. M., Metcalfe, J. C.: Magnetic resonance studies of anaesthetics in cytomembranes. *Br. J. Pharmacol.*, **35**: 374-375, 1969.
- 6) Seto, T., Firestone, L. L.: Effects of normal alcohols and isoflurane on lipid headgroup dynamics in nicotinic acetylcholine receptor-rich lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1509**: 111-122, 2000.
- 7) Fraser, D. M., Louro, S. R., Horvaath, L. I., Miller, K. W., Watts, A.: A study of the effect of general anesthetics on lipid-protein interactions in acetylcholine receptor enriched membranes from *Torpedo nobiliana* using nitroxide spin-labels. *Biochemistry*, **29**: 2664-2669, 1990.
- 8) Bigelow, D. J., Thomas, D. D.: Rotational dynamics of lipid and the Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum. The molecular basis of activation by diethyl ether. *J. Biol. Chem.*, **262**: 13449-13456, 1987.
- 9) 新宮興, 大沢正巳, 森健次郎: ICI 35,868(プロポフォル) 第1相試験. 麻酔, **39**: 219-229, 1990.
- 9) 藤井宏融: セボフルレン麻酔時のセボフルレン血中濃度及び代謝に関する研究. 麻酔, **35**: S373, 1986.
- 10) 吉矢生人, 太城力良, 山村秀夫: [イソフルレン] イソフルレン第1相臨床試験. 麻酔, **36**: 1506-1518, 1987.
- 11) 小坂 誠: 血中ハロセン・エンフルレン麻酔濃度の循環動態に及ぼす影響の比較. 麻酔, **40**: 1466-1476, 1991.
- 12) 隅本彰, 越山健二郎, 白東栄: エーテル麻酔時における血中エーテル濃度の推移. 麻酔, **5**: 372-375, 1956.
- 13) 高橋長雄, 半沢辰夫, 立花 肇: 高速液体クロマトグラフィによる血漿中サイアミラール濃度の測定. 麻酔, **35**: 1402-1407, 1986.
- 14) 大西俊一: 生体膜の動的構造 第2版. 113-122, 東京大学出版会, 東京, 1993.
- 15) Koga, T., Watanabe, H., Kawada, H., Takahashi, K., Utsui, Y., Domon, H., Ishii, C., Narita, T., Yasuda, H.: Interactions of plaunotol with bacterial membranes. *J. Antimicrob. Chemother.*, **42**: 133-140, 1998.
- 16) Korkmaz, O., Korkmaz, M.: The effects of mitomycin-C and temperature on dynamical properties of human erythrocyte membrane. *Biophys. Chem.*, **69**: 167-174, 1997.
- 17) 清宮 懋, 佐々木恒孝: 界面活性剤. 日本生化学会編, 生化学実験講座 (14) 生体膜, 165-185, 東京化学同人, 1977.
- 18) Griffith, O. H. and Jost, P. C.: Lipid spin labels in biological membranes. edited by Berliner, L.J., Spin labeling. Theory and applications. 500-504, Academic press, New York-San Francisco-London, 1976.
- 19) Shinizkey, M.: Membrane fluidity and receptor function. edited by Kates, M. and Manson, L. A., *Biomembranes*. vol. 12. 585-601, Plenum Press, New York-London, 1984.
- 20) Kimmelberg, H. K., Papahadjopoulos, D.: Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **249**: 1071-1080, 1974.

## ORIGINAL

## The effects of general anesthetics on ESR spectra of spin labels

Makiko Shibuya<sup>1</sup>, Kuniaki Suzuki<sup>2</sup>, Kunie Kimura<sup>1</sup>,  
Toshifumi Hiraoki<sup>3</sup>, Akihiro Tutsumi<sup>3</sup>, and Kazuaki Fukushima<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** We investigated the effects of general anesthetics on the environment of spin labels, 5-doxyl stearic acid (5-DSA) and 16-doxyl stearic acid (16-DSA), using electron spin resonance (ESR) spectroscopy. The spectrum was measured in methanol, H<sub>2</sub>O, and sodium dodecyl sulfate (SDS) solution. Anesthetics (sevoflurane, isoflurane, halothane, ether, ethanol, propofol, thiamylal) were added at the concentration which concentration were clinical or 10-100 times higher than clinical. Order parameter *S* and rotational correlation time ( $\tau$ ) were calculated from the spectra.

The spectra of both 5-DSA and 16-DSA in methanol showed three sharp signals and the anesthetics did not alter the spectra. The signals of 5-DSA and 16-DSA in H<sub>2</sub>O decreased remarkably compared with those in methanol, suggesting that DSA, lipid-like molecules, formed aggregation.

The amplitude of signals recovered in SDS solution, suggesting that DSA molecules were dispersed into the SDS micell.

We also studied the effects of general anesthetics on ESR spectra of DSAs in SDS solution. Control *S* values were small, and additions of halothane, ether, ethanol, propofol and thiamylal altered them significantly though the degree of change was small. Additions of sevoflurane and isoflurane did not alter *S* values significantly. Additions of halothane, ether, ethanol and thiamylal altered  $\tau$  values significantly and additions of sevoflurane, isoflurane, and propofol did not alter them significantly. The degree of changes was different depending on the kind of spin labels and anesthetics, and concentrations of anesthetics. These results suggest that each anesthetic affects the environment of spin labels in different manner.

**Key words:** electron spin resonance, spin labeling, general anesthetics, order parameter, rotational correlation time

---

1. Department of Dental Anesthesiology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Kazuaki Fukushima)  
2. Department of Dental Pharmacology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Kuniaki Suzuki)  
3. Division of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University (Chief: Prof. Akihiro Tutsumi)  
Address: 1. and 2. Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586 Japan  
3. Kita 13, Nishi 8, Kita-ku, Sapporo 060-8628 Japan  
[Received: September 12, 2003] [Accepted: October 8, 2003]

原 著

## リポソーム中のスピラ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

木村 邦衛<sup>1)</sup> 平沖 敏文<sup>2)</sup> 渋谷真希子<sup>1)</sup> 福島 和昭<sup>1)</sup> 鈴木 邦明<sup>3)</sup>

抄 録：スピララベル剤 5-doxyl stearic acid (5-DSA) および 16-doxyl stearic acid (16-DSA) を組み込んだ dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) の多重層リポソームに対する全身麻酔薬、セボフルレンとイソフルレンの作用と温度の影響を電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルの測定を行って解析した。ESR の測定は10℃から50℃の範囲で行い、得られた ESR スペクトルの線形変化を見ると同時にオーダーパラメーター  $S$  および回転相関時間  $\tau$  を計算した。DMPC, DOPC および EYPC から構成された3種のリポソームの 5-DSA および 16-DSA に共通して、温度を上げるとスペクトルの最大分離幅が減少してスペクトル強度が増加し、運動性が高くなることを示した。麻酔薬の非存在下では 5-DSA の  $S$  および 16-DSA の  $S$ ,  $\tau$  値とも温度の上昇に伴って減少し、膜の流動性が增大することを示唆したが、飽和脂肪酸である DMPC の場合は相転移温度付近で急速な変化を示し、不飽和脂肪酸である DOPC と両者の混合である EYPC の場合は測定温度全域にわたり徐々に減少した。臨床濃度の麻酔薬はこれら ESR スペクトルに変化を与えなかった。高濃度のイソフルレンおよびセボフルレンは低温領域でより強く  $S$  および  $\tau$  値を減少させて膜の流動性を増大させることを示唆したが、温度の上昇に伴いその作用は低下した。イソフルレンに比べてセボフルレンの作用は弱く、特に DOPC と EYPC の 5-DSA の  $S$  に対してはほとんど影響を与えなかった。以上の結果は、麻酔薬の存在に関わらず温度の上昇に伴いリポソーム膜の流動性が増加することと、麻酔薬は低温ほど顕著にリポソーム膜の流動性を増大し飽和脂肪酸の相転移温度を低温にシフトさせることを示唆する。

キーワード：電子スピン共鳴, リポソーム, 吸入麻酔薬, オーダーパラメーター  $S$ , 回転相関時間  $\tau$

### 結 言

全身麻酔薬の作用機序は特異説, 非特異説に大別されるが<sup>1,2)</sup>, 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<sup>2)</sup>。我々は、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を変化させることにより作用するという立場から、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<sup>3-5)</sup>, さらには電子スピン共鳴 (ESR) を利用して構造あるいは物性の変化を明らかにすることを目的に研究を進めてきた<sup>6-8)</sup>。

安定なラジカルをもつスピララベル剤を対象物に化学的に結合させて、そのラジカルの ESR スペクトルから対象物の周囲の環境及び運動状態を調べる方法であるスピララベル法は、大西と McConnel<sup>9)</sup>により考案され、全身麻酔

薬に関する研究にも応用されてきた<sup>10-13)</sup>。我々は、5-doxyl stearic acid (5-DSA) および 16-doxyl stearic acid (16-DSA) の二つのステアリン酸スピララベル剤を卵黄由来のホスファチジルコリン (PC) のリポソームに混入し、リポソーム膜の比較的表層と深部の異なる位置にラベルすることに成功した<sup>7,8)</sup>。これらを生体膜のモデルとして、麻酔薬の種類によりスピララベル剤の周辺環境に与える影響は異なること、および麻酔薬の作用は2重膜の内部には及ばないことを明らかにした<sup>7)</sup>。さらに、PC の成分および温度変化が生体膜の物性に影響する重要な因子であることから、前報において飽和脂肪酸である dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), 不飽和脂肪酸である dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), および両者の混合した egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) の4種類のリン脂質の PC に 5-DSA およ

1), 3) 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

2) 〒060-8628 札幌市北区北13条西8丁目

1) 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

2) 北海道大学大学院工学研究科量子物理学専攻物質物理学講座分子物理学

3) 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

[受付:平成16年10月12日] [受理:平成16年10月28日]

び 16-DSA を組み込んだ多重層リポソーム (multilamellar vesicle: MLV) または小さな 1 枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle: SUV) を生体膜のモデルとして作成し、各々の性質と温度依存性を ESR によって検討した<sup>6)</sup>。その結果、飽和脂肪酸のリポソーム膜の深部では相転移の main transition の温度 ( $T_c$ ) で膜の流動性が大きく増加し、表層付近では  $T_c$  と相転移の pretransition の温度 ( $T_{pc}$ ) で膜の流動性が増加すること、および、液晶相では PC の種類に係わらず温度の上昇に依存して流動性が増加することを明らかにした。また、ESR スペクトルを基にリポソームに及ぼす吸入麻酔薬の影響とその温度依存性を調べる材料として、DMPC、DOPC および EYPC の MLV を用いることが有効と考えられた。

上記の結果から、本論文においては、DMPC、DOPC および EYPC の MLV に吸入麻酔薬を添加して種々の温度で ESR スペクトルを測定することにより、PC リポソームに混入したラベル剤周囲の環境に与える麻酔薬の作用と温度の影響を検討した。

材料と方法

1. 材料

5-DSA, 16-DSA および EYPC, DMPC, DOPC は Aldrich 社製のものを使用した。セボフルレン、イソフルレンはアボットジャパン社製、その他の試薬は特級を使用した。

5-DSA および 16-DSA は既報<sup>6,7)</sup>と同様に 50 mM の濃度でメタノールに溶解し、 $-40^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

2. 測定資料の作成方法

MLV の作成<sup>14,15)</sup>は、前報<sup>6,8)</sup>に記載したように行った。麻酔薬は、最近臨床でよく使用される吸入麻酔薬であるセボフルレンおよびイソフルレンを使用した。臨床で用いた際に測定された血中濃度と同程度の濃度を臨床濃度<sup>16,17)</sup>(セボフルレンは  $350\ \mu\text{M}$ 、イソフルレンは  $10.5\ \text{mg/dl}$ )とし、臨床濃度およびその 1000 倍量 (高濃度) の麻酔薬を MLV 懸濁液に添加した。麻酔薬添加後はただちにキャップをして麻酔薬が揮発するのを防止し、ボルテックスミキサーにて攪拌した後、溶液  $50\ \mu\text{l}$  をマイクロシリンジにてガラス製キャピラリー (外径  $1.52\ \text{mm}$ 、内径  $1.09\ \text{mm}$ 、長さ  $8.5\ \text{cm}$ ) に注入し、揮発を防止するためワックスとパラフィルムを用いて密栓して測定に供した。

3. ESR 測定

ESR スペクトルの測定は、日本電子製 FE1X を用い、X band,  $9.2\ \text{GHz}$  にて行った。測定温度は 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45 および  $50^{\circ}\text{C}$  とした。スペクトルの分離幅  $A_{\text{max}}$  および  $A_{\text{min}}$ 、3 本のシグナルの強度  $h(1)$ ,  $h(0)$ ,  $h(-1)$ 、中央のシグナルの線幅  $\Delta H$  の計測は、前報に詳しく記載した方法で行った<sup>6,8)</sup>。マイクロ波の出力は  $1\ \text{mW}$  とし、

その他の測定条件は以下の様に設定した。

scan width:  $330 \pm 5\ \text{mT}$ , sweep time:  $4\ \text{min}$ , modulation frequency:  $100\ \text{kHz}$ , modulation width:  $0.08\text{-}0.20\ \text{mT}$ , amplitude:  $2 \times 100$ , response:  $0.1\ \text{sec}$

また、S/N 比を上げるために、最大 4 回まで積算を行った。

4. ESR パラメーターの計算方法

ニトロキシドラジカルの配向や、異方的回転を示すオーダーパラメーター (S) およびスピンラベル剤の回転運動の速さを示す回転相関時間 ( $\tau$ ) は、得られた ESR スペクトルを基に前報に詳しく記載した方法で計算した<sup>6,8,18,19)</sup>。

なお、5-DSA のスペクトルの線形は  $\tau$  が  $10^{-9}\ \text{sec}$  よりも遅いことを示しており、5-DSA 系の  $\tau$  は算出できなかった。

結 果

1. DMPC リポソームの ESR スペクトルに対する麻酔薬と温度の影響

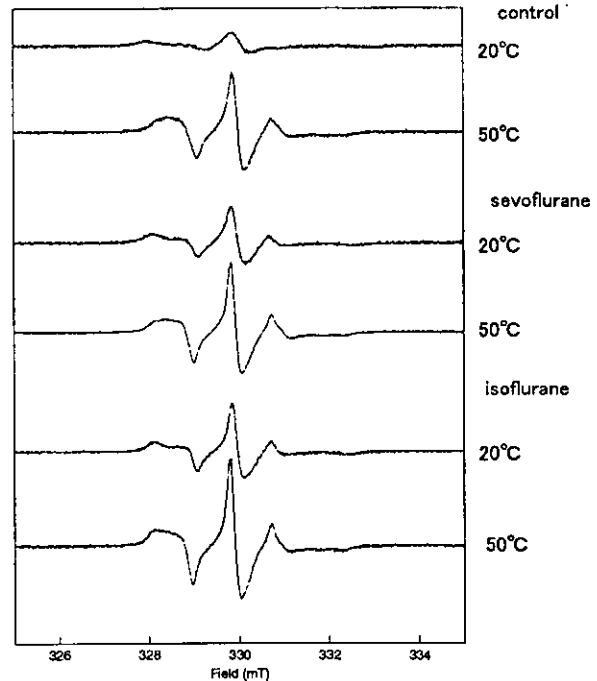


Fig. 1 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multilamellar vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine and labeled with 5-doxy stearic acid.

The spectra of vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and labeled with 5-doxy stearic acid (5-DSA) were measured with modulation width of  $0.20\ \text{mT}$  at  $20$  and  $50^{\circ}\text{C}$  without (control) or with sevoflurane or isoflurane. The amplitude of the signal with 5-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting ( $A_{\text{max}}$ ) lessened as the temperature rose.



5-DSA を混入した DMPC リポソーム (5-DSA/DMPC) の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 1 の control に示す。20℃ の ESR スペクトルは最大分離幅  $A_{max} = 4.9$  mT で、中央シグナルの強度が両側に比べて大きく、スピララベルした位置では遅い異方的な運動が生じていることを示唆している。温度を上げると  $A_{max}$  が徐々に減少して 50℃ では 3.9 mT となり、スペクトル強度も増加して運動性が高くなることを示している。臨床濃度の麻酔薬を添加して同様の測定を行っても、5-DSA/DMPC の ESR スペクトルはコントロールとほとんど変化がなかった (結果は示さない)。高濃度のセボフルレンを添加した 5-DSA/DMPC の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 1, sevoflurane に示す。20℃ の ESR スペクトルの  $A_{max}$  は 4.4 mT で、コントロールと同様に中央シグナルの強度が両側に比べて大きく、スピララベルした位置では遅い異方的な運動が生じていることを示唆している。温度を上げると、 $A_{max}$  が徐々に減少して 50℃ では 3.9 mT になり、スペクトル強度も増加して運動性が高くなることを示している。高濃度のイソフルレンを添加した 5-DSA/DMPC の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 1, isoflurane に示す。セボフルレンの場合と同様なスペクトル変化であった。

5-DSA/DMPC の ESR スペクトルから計算したオーダーパラメーター, S の温度依存性を Fig. 2 に示す。コントロールの S は 20℃ から 50℃ で 0.79 から 0.52 まで減少した。特に

25℃ 付近で 0.18 の急減が見られた。高濃度のセボフルレンを添加した 5-DSA/DMPC の S は 20℃ から 50℃ で 0.63 から 0.50 まで減少したが、コントロールのような 25℃ 付近での急減は見られなかった。高濃度のイソフルレンを添加した 5-DSA/DMPC の S も 20℃ から 50℃ で 0.59 から 0.53 まで減少し、コントロールのような 25℃ 付近での急減は見られなかった。

16-DSA を混入した DMPC リポソーム (16-DSA/DMPC) の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 3, control に示す。20℃ の ESR スペクトルは  $A_{max} = 2.9$  mT と 5-DSA/DMPC の ESR スペクトルに比べて  $A_{max}$  が減少し、中央シグナルの強度は両側、特に高磁場シグナルの強度に比べて大きいものの、中央シグナルと両側のシグナル強度の相対的な差は 5-DSA/DMPC に比べて小さかった。これは 16-DSA のニトロキシドラジカルの運動は異方的な運動を示すが 5-DSA のラジカル運動に比べるとより等方的な運動であり、運動の速さは 5-DSA のラジカル運動より速いことを示唆している。温度を上げると  $A_{max}$  が徐々に減少して 50℃ では 2.7 mT になり、スペクトル強度も増加して運動性が高くなることを示している。臨床濃度の麻酔薬を添加した 16-DSA/DMPC の ESR スペクトルはコントロールとほとんど変化がなかった (結果は示さない)。高濃度のセボフルレンを添加した 16-DSA/DMPC の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 3, sevoflurane に示す。20℃ の ESR スペクトル

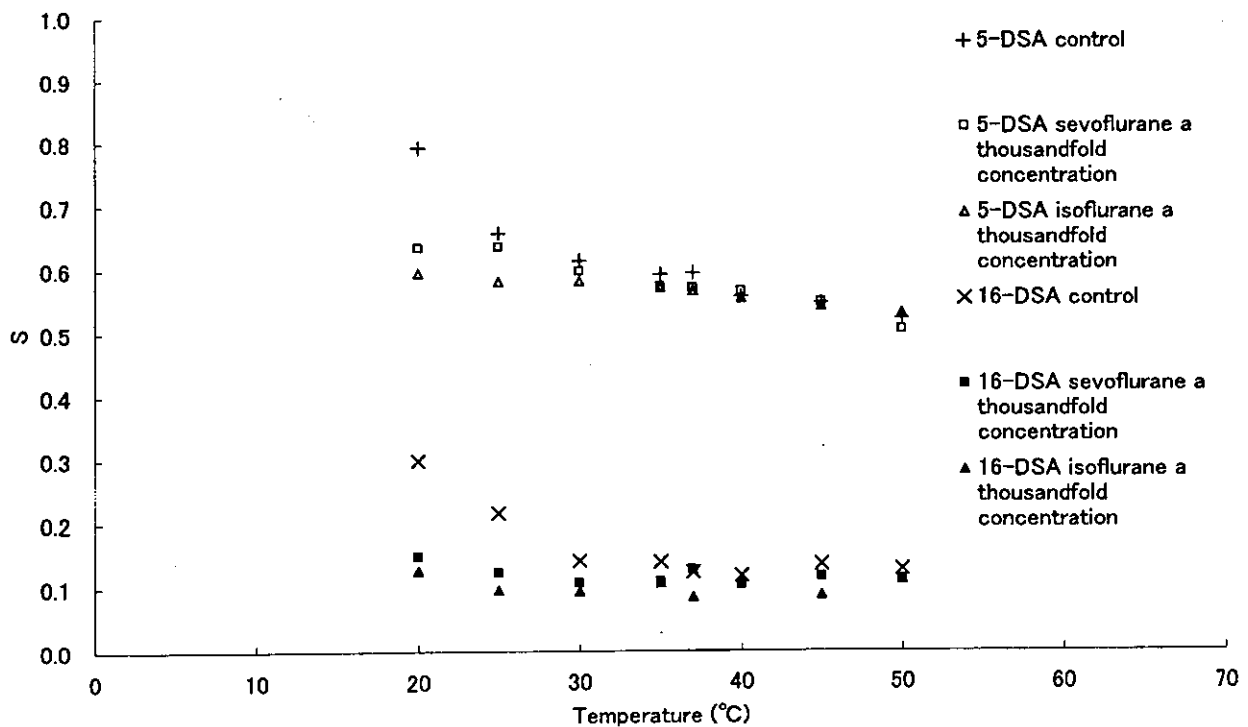


Fig. 2 Temperature-dependent changes in the values of order parameter S of DMPC liposome.

S values without (control) or with sevoflurane or isoflurane were calculated from the ESR spectra of liposome composed of DMPC and labeled with 5-DSA or 16-DSA, and were plotted along the temperature changes. S values decreased in every series of ESR spectrum as the temperature rose.

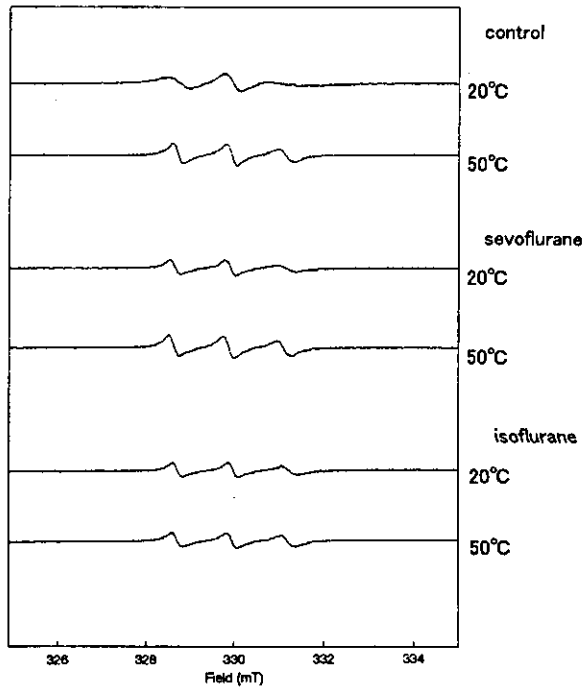


Fig. 3 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multi-lamellar vesicles composed of DMPC and labeled with 16-DSA.

The spectra of vesicles composed of DMPC and labeled with 16-DSA were measured with modulation width of 0.20 mT at 20 and 50 °C without (control) or with sevoflurane or isoflurane. The amplitude of the signal with 16-DSA expanded and the  $A_{max}$  lessened as the temperature rose.

ルの  $A_{max}$  は 2.8 mT と 5-DSA/DMPC の  $A_{max}$  に比べて小さく、中央シグナルと両側のシグナルの強度の相対的な差は小さかった。温度を上げて  $A_{max}$  の変化は小さかったが、スペクトル強度は増加して運動性が高くなることを示している。Fig. 3, isoflurane に示した高濃度のイソフルレンを添加した 16-DSA/DMPC の ESR スペクトルの温度依存性は、sevoflurane の場合と同様の傾向を示した。温度を上げるとスペクトル強度が増加し、運動性が高くなることを示している。

16-DSA/DMPC の ESR スペクトルを基に計算した  $S$  の温度依存性を、Fig. 2 に示す。コントロールの  $S$  は 20°C から 50°C で 0.30 から 0.13 まで減少した。特に 25°C 付近で 0.16 の急減が見られた。高濃度のセボフルレンを添加した 16-DSA/DMPC の  $S$  は 20°C から 50°C で 0.15 から 0.11 まで、イソフルレンでは 0.13 から 0.11 まで減少したが、いずれもコントロールのような 25°C 付近での急減は見られなかった。

16-DSA/DMPC の ESR スペクトルを基に計算した  $\tau$  の温度依存性の結果を Fig. 4 に示す。コントロールの  $\tau$  は 20°C から 50°C で 96 から 20 psec まで急激に短くなった。高濃度のセボフルレンを添加した 16-DSA/DMPC の  $\tau$  は 20°C から 50°C で 35 から 15 psec まで、イソフルレンでは 15 から 8 psec まで減少したが、いずれもコントロールのような 25°C 付近での急減は見られなかった。

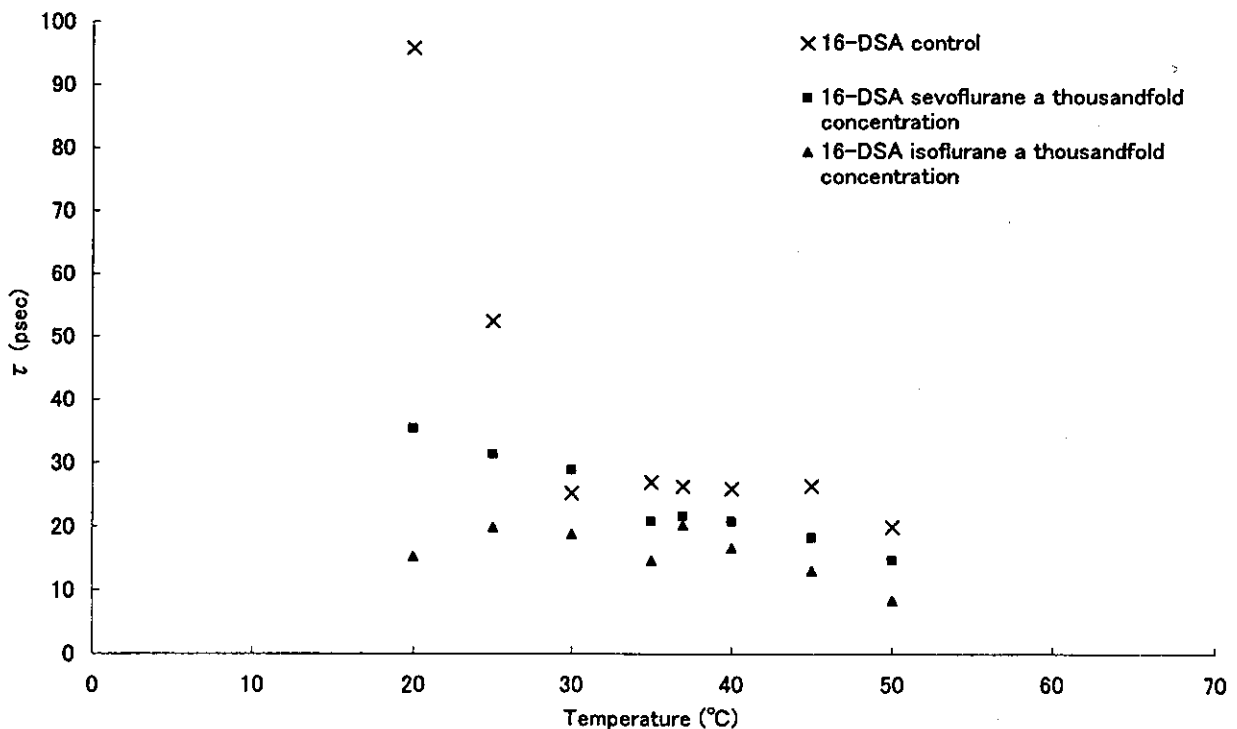


Fig. 4 Temperature-dependent changes in the values of rotational correlation time  $\tau$  of DMPC liposome.

$\tau$  values were calculated from the ESR spectra of multi-lamellar vesicles composed of DMPC and labeled with 16-DSA, and were plotted along the temperature changes.  $\tau$  values decreased in every series of ESR spectrum as the temperature rose.

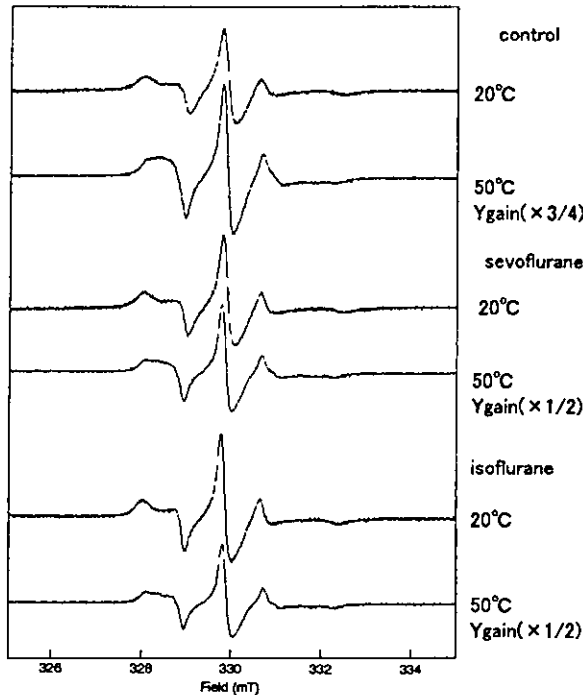


Fig. 5 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multilamellar vesicles composed of dioleoylphosphatidylcholine and labeled with 5-DSA.

The spectra of vesicles composed of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and labeled with 5-DSA were measured with modulation width of 0.20 mT at 20 and 50°C without (control) or with sevoflurane or isoflurane. The amplitude of the signal with 5-DSA expanded and the  $A_{max}$  lessened as the temperature rose.

## 2. DOPC リポソームの ESR スペクトルに対する麻酔薬と温度の影響

5-DSA を混入した DOPC リポソーム (5-DSA/DOPC) の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 5, control に示す。20°C の ESR スペクトルは  $A_{max} = 4.5$  mT で、DMPC の 5-DSA の ESR スペクトルと同様に、中央シグナルの強度が両側に比べて大きく、スピンラベルの位置では遅い異方的な運動が生じていることを示唆している。温度を上げると  $A_{max}$  が徐々に減少して 50°C では 4.0 mT になり、スペクトル強度も増加して運動性が高くなることを示している。臨床濃度の麻酔薬を添加した 5-DSA/DOPC の ESR スペクトルはコントロールとほとんど変化がなかった (結果は示さない)。高濃度のセボフルレンを添加した 5-DSA/DOPC の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 5, sevoflurane に示す。20°C の ESR スペクトルは  $A_{max} = 4.5$  mT で、中央シグナルの強度が両側に比べて大きく、スピンラベルした位置では遅い異方的な運動が生じていることを示唆している。温度を上げると  $A_{max}$  が徐々に減少して 50°C では 4.2 mT になり、スペクトル強度も増加して運動性が高くなることを示している。Fig. 5, isoflurane に示した高濃度のイソフルレンを添加した 5-DSA/DOPC の ESR スペクトルの温度依存性も、sevoflurane の場合と同様の結果を示した。

5-DSA/DOPC の ESR スペクトルから計算した S の温度依存性の結果を Fig. 6 に示す。コントロールの S は 20°C か

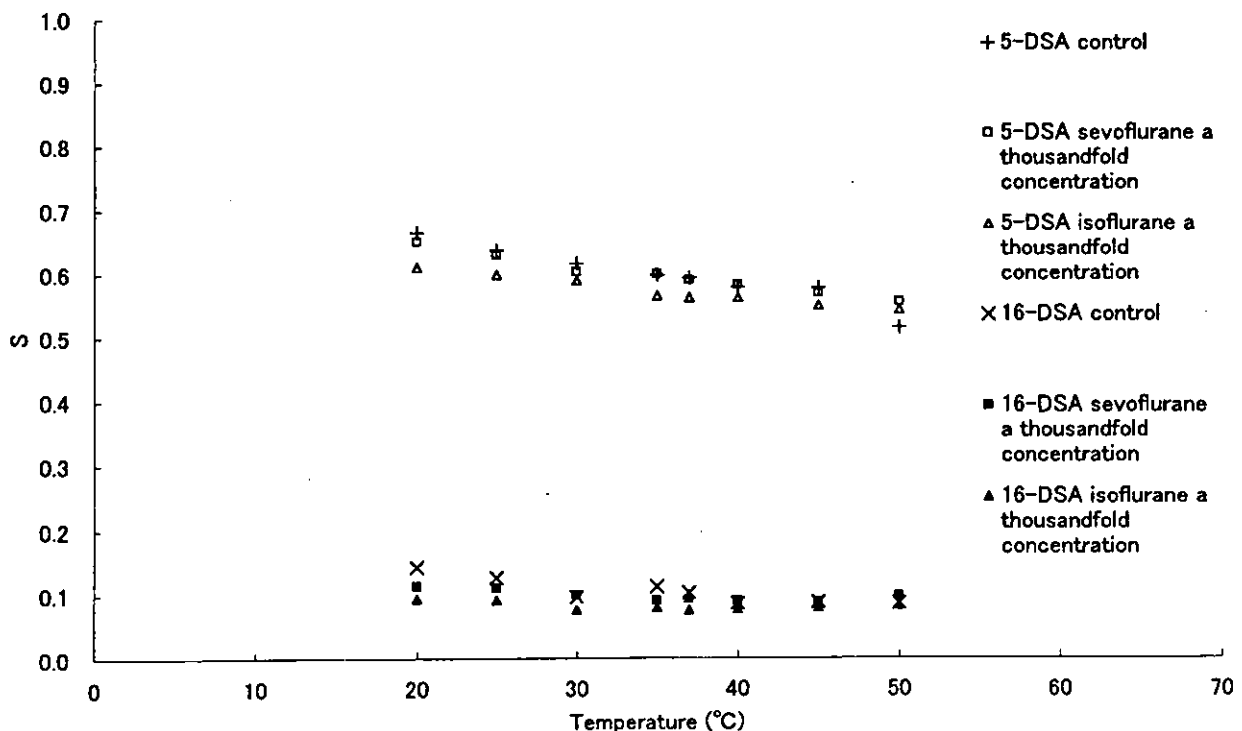


Fig. 6 Temperature-dependent changes in the values of S of DOPC liposome.

S values without (control) or with sevoflurane or isoflurane were calculated from the ESR spectra of liposome composed of DOPC and labeled with 5-DSA or 16-DSA, and were plotted along the temperature changes. S values decreased in every series of ESR spectrum as the temperature rose.

ら50℃で0.66から0.51まで減少した。DMPCの場合と異なり急減を示す温度域は見られなかった。高濃度のセボフルレンを添加したSは20℃から50℃で0.65から0.55まで、イソフルレンでは0.61から0.54まで減少したが、いずれも急減を示す温度域は見られなかった。

16-DSAを混入したDOPCリポソーム(16-DSA/DOPC)のESRスペクトルの温度依存性をFig. 7に示す。20℃のESRスペクトルの $A_{max}$ は2.8 mTであった。DMPCの場合と同様に5-DSA/DOPCのESRスペクトルに比べて $A_{max}$ が小さく、中央シグナルの強度は両側、特に高磁場シグナルの強度に比べて大きいものの、中央シグナルと両側のシグナル強度の相対的な差は小さかった。温度を上げると $A_{max}$ が徐々に減少して50℃では2.7 mTになり、スペクトル強度も増加して運動性が高くなることを示している。臨床濃度の麻酔薬を添加した16-DSA/DOPCのESRスペクトルはコントロールとほとんど変化がなかった(結果は示さない)。高濃度のセボフルレンを添加した16-DSA/DOPCのESRスペクトルの温度依存性をFig. 7, sevofluraneに示す。20℃のESRスペクトルは $A_{max}=2.8$  mTと5-DSA/DOPCのESRスペクトルに比べて小さく、中央シグナルの強度と両側のシグナル強度の相対的な差は小さかつ

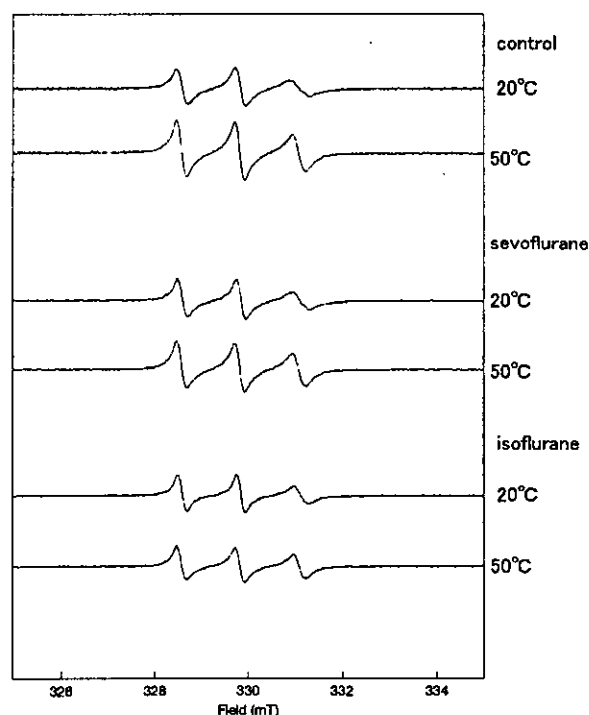


Fig. 7 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multi-lamellar vesicles composed of DOPC and labeled with 16-DSA.

The spectra of vesicles composed of DOPC and labeled with 16-DSA were measured with modulation width of 0.20 mT at 20 and 50 °C without (control) or with sevoflurane or isoflurane. The amplitude of the signal with 16-DSA expanded and the  $A_{max}$  lessened as the temperature rose.

た。温度を上げるとスペクトル強度が増加して運動性が高くなることを示している。Fig. 7, isofluraneに示した高濃度のイソフルレンを添加した16-DSA/DOPCのESRスペクトルの温度依存性も、sevofluraneの場合と同様に説明される結果を示した。

16-DSA/DOPCのESRスペクトルから計算したSの温度依存性の結果をFig. 6に示す。コントロールのSは20℃から50℃で0.14から0.09まで減少した。5-DSA/DOPCと同様にDMPCのような急減を示す温度域は見られなかった。高濃度のセボフルレンを添加したSは20℃から50℃で0.11から0.10まで、イソフルレンでは0.09から0.08までわずかに減少したが、いずれも急減を示す温度域は見られなかった。

16-DSA/DOPCのESRスペクトルから計算した $\tau$ の温度依存性の結果をFig. 8に示す。コントロールの $\tau$ は20℃から50℃で39から17psecまで短縮したが、DMPCのような急減を示す温度域は見られなかった。高濃度のセボフルレンを添加した16-DSA/DOPCの $\tau$ は20℃から50℃で29から15psecまで、イソフルレンでは23から11psecまで半減したが、急減を示す温度域は見られなかった。

### 3. EYPCリポソームのESRスペクトルに対する麻酔薬と温度の影響

5-DSAを混入したEYPCリポソーム(5-DSA/EYPC)のESRスペクトルの温度依存性をFig. 9, controlに示す。10℃のESRスペクトルは $A_{max}=4.7$  mTで、DMPCおよびDOPCの5-DSAのESRスペクトルと同様に、中央シグナルの強度が両側に比べて大きく、スピンラベルした位置では遅い異方的な運動が生じていることを示唆している。温度を上げると、 $A_{max}$ が徐々に減少して50℃では4.1 mTになり、スペクトル強度も増加して運動性が高くなることを示している。臨床濃度の麻酔薬を添加した5-DSA/EYPCのESRスペクトルはコントロールとほとんど変化がなかった(結果は示さない)。高濃度のセボフルレンあるいはイソフルレンを添加した5-DSA/EYPCのESRスペクトルの温度依存性をFig. 6, sevofluraneおよびisofluraneに示す。controlと同様に、スピンラベルした位置では遅い異方的な運動が生じており、温度を上げると運動性が高くなることを示すスペクトル変化が得られた。

5-DSA/EYPCのESRスペクトルから計算したSの温度依存性の結果をFig. 10に示す。コントロールのSは10℃から50℃で0.73から0.54まで減少したが、DMPCの場合と異なり急減を示す温度域は見られなかった。高濃度のセボフルレン存在下のSは10℃から50℃で0.73から0.55まで、イソフルレンでは0.66から0.54まで減少したが、急減を示す温度域は見られなかった。

16-DSAを混入したEYPCリポソーム(16-DSA/EYPC)のESRスペクトルの温度依存性をFig. 11, controlに示す。