

Fig. 8 Temperature-dependent changes in the values of τ of DOPC liposome.

τ values were calculated from the ESR spectra of multilamellar vesicles composed of DOPC and labeled with 16-DSA, and were plotted along the temperature changes. τ values decreased in every series of ESR spectrum as the temperature rose.

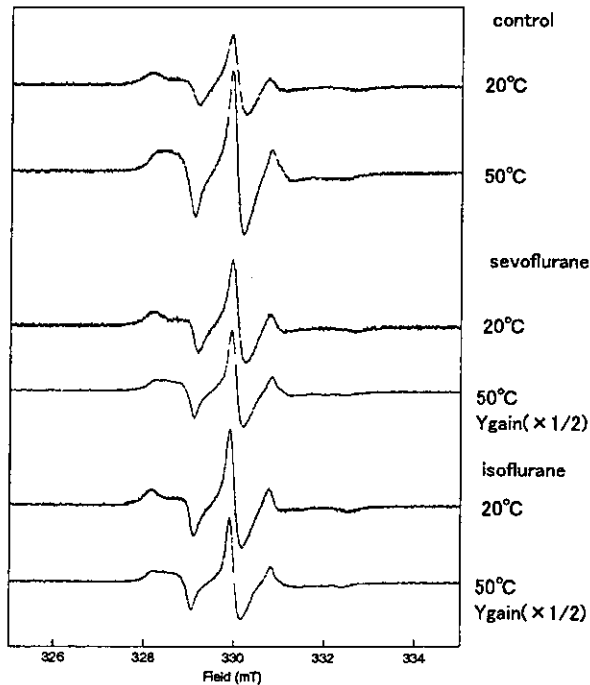


Fig. 9 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multilamellar vesicles composed of egg yolk phosphatidylcholine and labeled with 5-DSA.

The spectra of vesicles composed of egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) 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.

10°CのESRスペクトルは $A_{max} = 2.8\text{mT}$ と5-DSA/EYPC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。温度を上げると、 A_{max} が徐々に減少して50°Cでは2.7mT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あるいはイソフルレンを添加した16-DSA/EYPCのESRスペクトルの温度依存性をFig. 11, sevofluraneおよびisofluraneに示す。controlと同様に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く、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が得られた。

16-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. 9に示す。コントロールのSは10°Cから50°Cで0.18から0.07まで減少したが、5-DSA/EYPC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10°Cから50°Cで0.15から0.08まで、イソフルレンでは0.11から0.08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/EYPCのESRスペクトルから計算した τ の温度依存性の結果をFig. 12に示した。コントロールの τ は10°Cから50°Cで52から20psecまで、高濃度のセボフルレンでは42から23psecまで、イソフルレンでは40から17psec

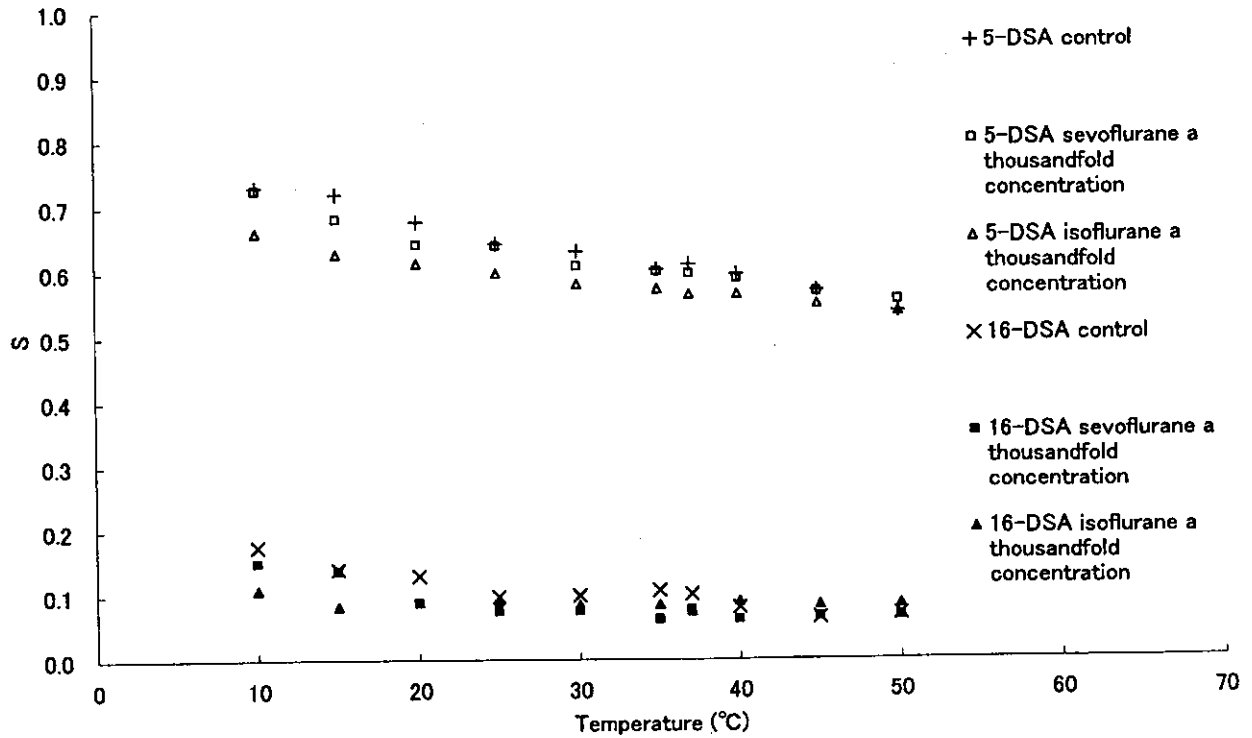


Fig. 10 Temperature-dependent changes in the values of S of EYPC liposome.

S values without (control) or with sevoflurane or isoflurane were calculated from the ESR spectra of liposome composed of EYPC 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.

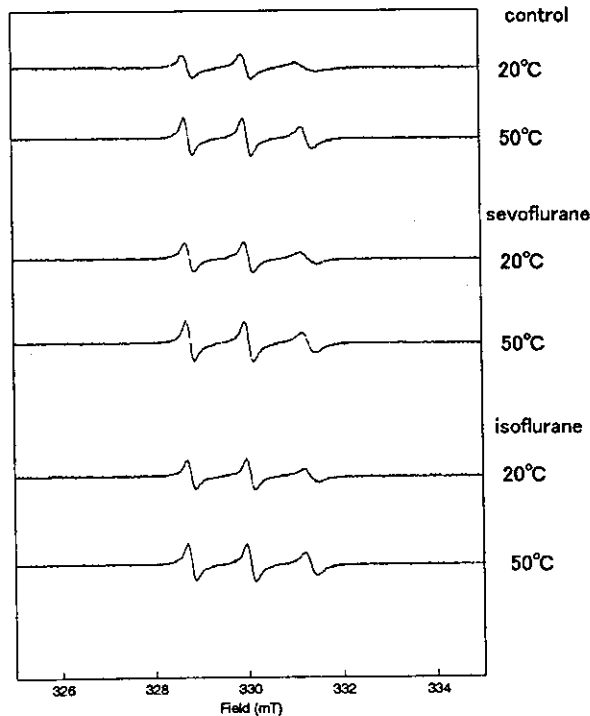


Fig. 11 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multi-lamellar vesicles composed of EYPC and labeled with 16-DSA.

The spectra of vesicles composed of EYPC 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.

まで短くなったが、DMPCのような急減を示す温度域は見られなかった。

考 察

生体膜に対する麻酔薬の作用を研究する上で生体膜構成リン脂質の主成分であるPCを用いて作成したリポソームは極めて有用であり、我々はタンパク質を組み込んだリポソームを作成してスピラベル法により麻酔薬の効果を検討する計画を進めている。しかし、リポソームの物性は構成するPCの種類により、温度によっても変化する。また、麻酔作用には温度が影響することも良く知られている。そこで、タンパク質を組み込む前に、リポソーム単独での物性に対する麻酔薬の作用における構成PCの種類と、測定温度の影響を調べることを目的として行ったのが本研究である。前報での結果を基に⁸⁾、飽和脂肪酸であるDMPC、不飽和脂肪酸のDOPC、そして両者の混合する脂肪酸としてEYPCを選択してリポソームを作成し、5-DSAと16-DSAの2種類のスピラベルを行った。ESRスペクトルの測定によりリポソーム中のスピラベル剤の周辺環境に及ぼす吸入麻酔薬の影響を検討し、さらに温度を変化させた際のスペクトル変化を調べた。実験に用いたスピラベル剤のうち、5-DSAはリポソームの表層付近の環境を、16-DSAは比較的深部の環境を反映することができるとされている²⁰⁾。

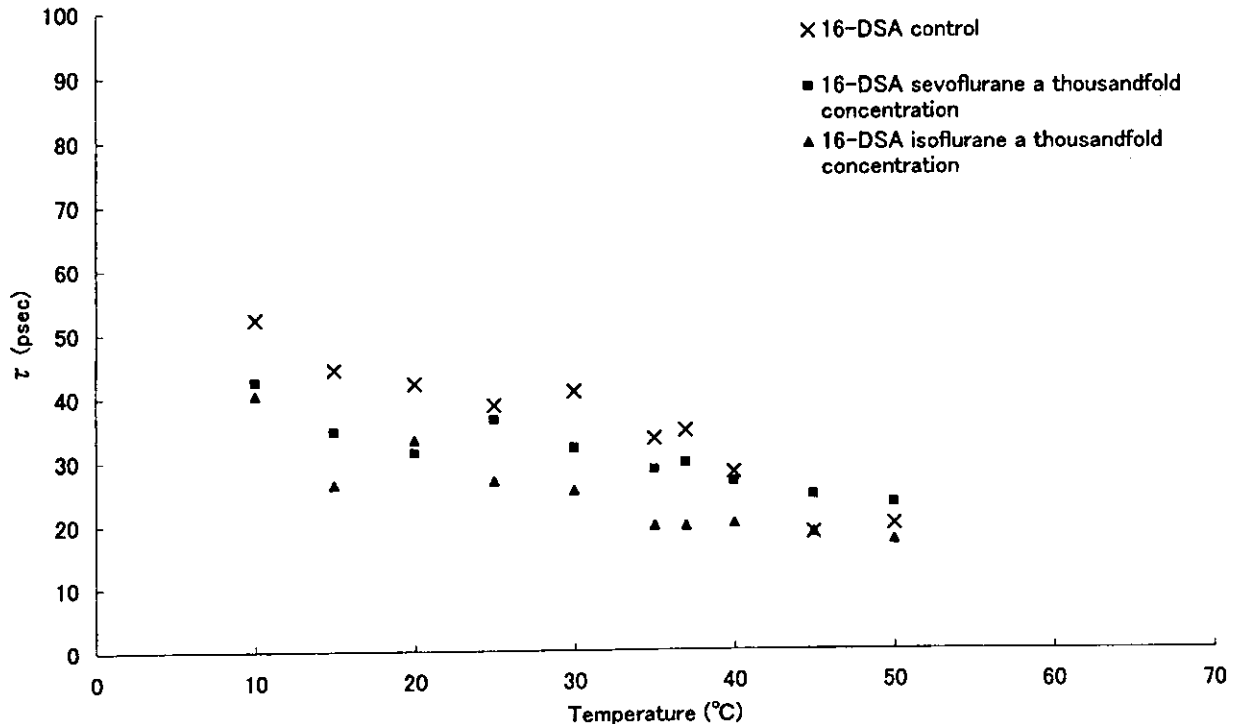


Fig. 12 Temperature-dependent changes in the values of τ of EYPC liposome.

τ values were calculated from the ESR spectra of multilamellar vesicles composed of EYPC and labeled with 16-DSA, and were plotted along the temperature changes. τ values decreased in every series of ESR spectrum as the temperature rose.

飽和脂肪酸である DMPC リポソームのコントロールでは、5-DSA の S および 16-DSA の S, τ の全ての値が温度に依存して減少したが, DMPC の T_c ¹⁵⁾である 23.9°C に近い, 20°C と 25°C の間で大きく減少しており (Figs. 2 and 4), これは膜全体が T_c 付近でゲル相から液晶相に相転移していることを反映している。それに対し, 高濃度のセボフルレンあるいはイソフルレンが存在すると 30°C より低温域での S および τ 値がコントロールに比べて減少し, T_c 付近での両値の大きな変化が消失して, 測定温度域全体で温度に依存した緩やかな減少を示した。これらの結果は, DMPC リポソーム膜の流動性は麻酔薬の存在の有無に関わらず温度に依存して増加すること, 両麻酔薬は低温においてリポソーム膜の流動性を増加させ DMPC リポソーム膜の相転移をより低温にシフトさせること, さらに温度の上昇に伴って麻酔薬の作用が低下しコントロールとの差が消失することを示唆する。また, 16-DSA の τ の値はイソフルレンのほうがセボフルレンよりも約 30% 小さく, 相互作用が強い傾向が示された (Fig. 4)。麻酔薬によって T_c が低下する報告は複数あり^{10, 21)}, 今回の結果も相転移が消失したのではなく, 麻酔薬によって相転移温度が 20°C 以下に低下したため測定できなかったものと推定される。また臨床濃度の麻酔薬による作用は検出されなかったが, 今回の実験では 5°C 間隔で測定を行ったため臨床濃度の麻酔薬による微小な変化を捉えることはできなかった可能性があ

る。 T_c 付近での麻酔薬による影響をみる場合は, より細かい温度変化で測定する必要があると考えられる。

不飽和脂肪酸である DOPC リポソームのコントロールでは 5-DSA の S および 16-DSA の S, τ の全ての値が温度に依存して徐々に減少し, 膜の表層付近および比較的深部の流動性が温度に依存して増加することを示唆するが, DMPC リポソーム膜の場合のような相転移に相当する特定の温度域での急激な変化は検出されなかった (Figs. 6 and 8)。DOPC の T_c は -22°C であることから¹⁵⁾, 今回の測定温度領域の 20°C から 50°C の間では T_c による大きな変化はないと予想されることに一致する。DOPC リポソームにおいては, S 値に対する高濃度のセボフルレンとイソフルレンの影響は非常にわずかであったが, 低温域で作用が強いこと, セボフルレンよりイソフルレンの作用が強い傾向を示した (Fig. 6)。両麻酔薬により DOPC リポソームの 16-DSA の τ 値が短くなり, ニトロキシドラジカルの回転運動速度を増加させることを示す (Fig. 8)。また, その効果は低温においてより強く, セボフルレンよりイソフルレンの作用が顕著であった。

飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が混合している EYPC のリポソームを用いた結果は, DOPC リポソームの結果に類似し, コントロールでは 5-DSA の S および 16-DSA の S, τ の全ての値が温度に依存して徐々に減少し, 膜の表層付近および比較的深部の流動性が温度に依存して増加するこ

とを示唆したが、DMPCリポソーム膜の場合のような相転移に相当する特定の温度域での急激な変化は検出されなかった (Figs. 10 and 12). EYPCの T_c は $-15^\circ\text{C} \sim -7^\circ\text{C}$ であることから¹⁵⁾, DOPCリポソームの場合と同様に今回の測定温度領域の $20^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 間では T_c による大きな変化はないと予想されることに一致する. EYPCリポソームにおいても、S値に対する高濃度のセボフルレンとイソフルレンの影響はわずかであったが、低温域で作用が強いことと、セボフルレンよりイソフルレンの作用が強い傾向を示した (Fig. 10). 両麻酔薬はEYPCリポソームの16-DSAの τ 値を低下させた (Fig. 12). また、その効果は低温においてより強く、セボフルレンよりイソフルレンの作用が顕著であった. Tangらは²²⁾, ^{19}F NMRを用いた研究において、イソフルレンはEYPCリポソームの膜表層に近い内部にとどまり、疎水基の深部までは入り込まないと報告しており、上田ら¹⁾も、麻酔薬は界面の物性に影響を与えると報告している¹⁾. 我々の結果では、高濃度のイソフルレンは、 50°C のような高温ではほとんど5-DSAあるいは16-DSAの環境に影響を与えないが、低温になるとどちらに対しても影響を与えたことから、ある程度内部にまで作用が及ぶことを示唆する.

今回得られた結果は、DMPC, DOPCおよびEYPCリポソームに共通して、膜の流動性を増加させる麻酔薬の作用は低温ほどコントロールに比べて強く、温度の上昇に伴ってコントロールとの差は減少した. 臨床における低体温麻酔は、代謝を低下させて組織・器官の低酸素状態への耐性を増強し、手術操作を行いやすい状況を作ることを目的としたものであり²³⁾, 通常の全身麻酔よりも低濃度で麻酔深度を維持することが可能である. 本研究の結果は、低体温麻酔の機構には、代謝の低下だけでなく、低温状態での麻酔薬の作用の増強が関与する可能性を示唆する.

今回は、リン脂質によるモデル膜を用いて吸入麻酔薬および温度の影響を調べたが、実際のヒトの生体膜には膜タンパク質およびコレステロールも大きな割合で存在している. コレステロールは温度変化に対する膜の安定化において重要な成分であり、一定の割合の存在下では相転移温度を消失させる. また生体膜には多様な膜タンパク質が存在し、麻酔薬は非特異的にタンパク質の疎水部分に結合して分子構造を変化させるという報告もなされている²⁾. リポソームを用いて吸入麻酔薬の作用機構を考える上で、コレステロールや膜タンパク質を組み込んだモデル膜の確立が必要である.

結 論

DMPC, DOPCおよびEYPCから構成された3種のリポソームにスピララベル剤を混入させて、そのESRスペクトルを測定することにより麻酔薬の作用と温度の影響を調べ、以下の結果を得た.

- 1) 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した.
- 2) 麻酔薬のSおよび τ に対する影響は低温ほど大きく、リポソーム膜の流動性の増加とラベル剤の回転速度の増大を示唆した.
- 3) 飽和脂肪酸の相転移温度を麻酔薬は低温にシフトさせた.
- 4) リポソーム膜の流動性に対する作用においては、イソフルレンがセボフルレンに比べて強かった.

文 献

- 1) 上田一作: 吸入麻酔薬にレセプタはあるか?. 麻酔, 44: 480-488, 1995.
- 2) 真下 節: 全身麻酔のメカニズム. 臨床麻酔, 27: 295-311, 2003.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 小野智史: 揮発性麻酔薬の Na^+ , K^+ -ATPase とアルカリ性フォスファターゼに及ぼす影響に関する研究. 北海道歯誌, 21: 245-255, 2000.
- 6) 渋谷真希子, 鈴木邦明, 平沖敏文, 木村邦衛, 堤 耀廣, 福島和昭: スピララベル剤の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.
- 7) 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ララベル剤のESRスペクトルと全身麻酔薬の影響. 北海道歯誌, 25: 68-76, 2004.
- 8) 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ラ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: 188-197, 2004.
- 9) Ohnishi, S., McConnell, H.M.: Interaction of the radical ion of ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc., 87: 2293, 1965.
- 10) Hubbell, W. L., McConnell, H.M., and Metcalfe, J. C.: Magnetic resonance studies of anesthetics in cytomembranes. Br. J. Pharmacol., 35: 374-375, 1965.
- 11) Gulfo, N., Bartucci, R., and Sportelli, L.: Effect of Inhalation Anesthetics on Spin-Labeled Cholesterol Containing DPPC Vesicles. Z. Naturforsch., 43: 264-268, 1988.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 奥 直人：リボソームの作成と実験法. 14-20, 廣川書店, 東京, 1994.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Koga, T., Watanabe, H., Kawada, H., Takahashi, K., Utsui, Y., Domon, H., Ishii, C., Narita, T., Yasuda, H.: Interactions of plautol with bacterial membranes. *J. Antimicrob. Chemother.*, **42** : 133-140, 1998.
- 19) Korkmaz, O., Korkmaz, M.: The effects of mitomycin-C and temperature on dynamical properties of human erythrocyte membrane. *Biophys. Chem.*, **69** : 167-174, 1997.
- 20) 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.
- 21) 松本 均, 楠部真崇, 金品昌志, 釜谷比羅志, 上田一作：ジパルミトイルホスファチジルコリン二分子膜の相転移温度に及ぼすミリスチン酸の影響. *麻酔と蘇生*, **38** : 229-232, 2002.
- 22) Tang, P., Yan, B., Xu, Y.: Different Distribution of Fluorinated Anesthetics and Nonanesthetics in Model Membrane: A ^{19}F NMR Study., *Biophys. J.*, **72** : 1676-82, 1997.
- 23) 吉矢生人, 真下 節：麻酔科入門 改訂第7版. 296-297, 永井書店, 大阪, 2000.

ORIGINAL

Effects of inhalation anesthetics and temperature on
electron spin resonance spectra of spin labels incorporated into liposomeKunie Kimura¹⁾, Toshifumi Hiraoki²⁾, Makiko Shibuya¹⁾,
Kazuaki Fukushima¹⁾ and Kuniaki Suzuki³⁾

ABSTRACT: The effects of inhalation anesthetics, sevoflurane and isoflurane, and the temperature on electron spin resonance (ESR) spectra of multilamellar liposome were investigated. Liposomes were composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) or egg yolk phosphatidylcholine (EYPC), and labeled with 5-doxyl stearic acid (5-DSA) or 16-doxyl stearic acid (16-DSA). The ESR spectra were measured at different temperatures from 10 to 50°C. Changes in the shape of the spectra were observed, and the order parameter S and rotational correlation time τ were calculated from the spectra.

In all liposomes composed of DMPC, DOPC or EYPC, the amplitude of the signal with either of 5-DSA or 16-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting (A_{max}) lessened as the temperature rose, suggesting enhanced mobility of radicals. In the absence of anesthetics, the S value of 5-DSA and the S and τ values of 16-DSA incorporated into a saturated fatty acid, DMPC, sharply decreased at around the phase transition temperature, but those of unsaturated fatty acid, DOPC, and EYPC, decreased gradually as the temperature rose in the wide range of temperatures, also suggesting enhanced mobility of radicals in both. The anesthetics at clinical concentrations did not change the ESR spectrum of any of the liposomes. Sevoflurane and isoflurane of which concentrations were 1000 times higher than clinical dosages decreased the S and τ values in the low temperature range, suggesting an increase in membrane fluidity, but the effects decreased with increases in temperature. The action of sevoflurane was weaker than that of isoflurane and did not affect the S value of 5-DSA in DOPC or EYPC liposome.

These results suggest that the fluidity of the liposome membrane increases with rises in the temperature irrespective of the presence of anesthetics and that the anesthetics increases the fluidity of the membrane especially at the low temperature and shifts the phase transition temperature of saturated fatty acid to a lower temperature.

Key words: electron spin resonance, liposome, inhalation anesthetics, order parameter S , rotational correlation time τ , phase transition

¹⁾Department of Dental Anesthesiology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

²⁾Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

³⁾Department of Dental Pharmacology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

Address: 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: October 12, 2004] [Accepted: October 28, 2004]

原 著

リポソーム中のスピ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

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

抄 録：スピラベル剤 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 (MLV) と dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) の小さな 1 枚膜リポソームの電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルの温度依存性を 10℃ から 50℃ の範囲で検討した。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 τ を計算した。

今回用いられた 5-DSA/ phosphatidylcholine (PC) の ESR スペクトルは中央シグナルの強度が両側に比べて大きく、スピ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た。16-DSA/ PC の ESR スペクトルは同じ PC の 5-DSA の ESR スペクトルに比べ最大分離幅 (A_{max}) が小さく、16-DSA のラジカル運動が異方的な運動であるものの 5-DSA のラジカル運動に比べより等方的な運動であり、回転速度も 5-DSA のラジカル運動より速いことを示唆した。また、5-DSA はリポソーム膜の表層付近に位置し、16-DSA はリポソーム膜の深部に存在して各々の部位の環境を示した。温度の上昇に伴って ESR スペクトルの A_{max} が狭まり、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た。飽和脂肪酸 (DMPC, DPPC) は相転移温度付近で S , τ とともに急減したが、不飽和脂肪酸 (DOPC) と EYPC は測定した温度範囲では大きな変化はみられなかった。

今回用いた PC のリポソーム膜の流動性は、PC の種類により相転移温度が異なるために特定の温度領域での流動性には違いがあるが、同じ液晶相では PC の種類に係わらず温度の上昇に依存して増加した。以上の結果を基に考察すると、リン脂質小胞に対する吸入麻酔薬の影響とその温度依存性を調べる実験には、DMPC, DOPC および EYPC の MLV を研究目的に応じて使い分けるのが有効と考えられた。

キーワード：電子スピン共鳴, リポソーム, オーダーパラメーター S , 回転相関時間 τ , 相転移

緒 言

可逆的な意識及び反応の消失状態である全身麻酔の作用機序には多数の仮説が存在する。それらの仮説は、全身麻酔薬はすべての生体膜に作用してその構造と機能を変化させることによって麻酔現象を引き起こすという非特異説と、特定のタンパク質の機能に対して選択的に影響を与えるという特異説に大別される^{1,2)}。多くの研究にもかかわらず、分子レベルにおける麻酔薬の作用部位はまだ明らかではないが、生体膜が作用の場であることに關しては一般的に受け入れられている²⁾。我々は、麻酔薬は脂質及びタンパク質を含めた生体膜の物性を物理的あるいは化学的に変化させ、その結果、タンパク質の機能を変化させて麻酔

状態を生ずるという立場から、膜タンパク質である Na, K-ATPase をモデルタンパク質として用いて全身麻酔薬の影響を調べ³⁻⁵⁾、さらには電子スピン共鳴 (ESR) を利用した研究を進めてきた^{6,7)}。

スピラベル法は、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。本法は 1965 年に大西と McConnell⁸⁾ 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⁹⁻¹²⁾。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ベル剤を用いて、ドデシル硫酸ナトリウムのミセルおよび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、

^{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医学専攻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分野

³⁾ 北海道大学大学院歯学研究科口腔医学専攻口腔病態学講座細胞分子薬理学教室

[受付：平成16年10月14日] [受理：平成16年10月28日]

これらを生体膜のモデルとしてラベル剤周囲の環境に与える種々の全身麻酔薬の影響について検討した^{6,7)}。その結果、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が明らかになった⁶⁾。また、5-DSAと16-DSAは脂質アルキル鎖中のラジカルの位置が異なるので、PCのリポソームを用いたESRスペクトルの解析から、5-DSAのラジカルはPC 2重膜の表層付近に、そして16-DSAでは内部に存在することが示された⁷⁾。さらに、両ラベル剤のESRスペクトルから計算され膜流動性の指標となるオーダーパラメーターと回転相関時間に麻酔薬はほとんど影響を与えないことから、麻酔薬の作用は2重膜の内部には及ばないことも示された⁷⁾。これらの結果を基に、リポソーム中にタンパク質を組み込んだ系で麻酔薬の作用を調べることにした。

生体膜は主にタンパク質と脂質で構成されている。脂質の主成分であるPCは飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の混合物であり、脂肪酸はアルキル鎖の炭素数、不飽和結合の位置およびその数によってその性質が変化する。また、生体膜リン脂質のアルキル鎖組成はその生物の生育温度に依存し、低温では不飽和脂肪酸が増大し、高温では飽和脂肪酸が増大するとされている¹³⁾。また、温度変化によって脂質膜がゲル相と液晶相で相転移することはよく知られている。以上のことから、生体膜に対する麻酔薬の作用のモデルとしてタンパク質を組み込んだリポソームを使用する上で、PCの成分および温度変化の影響はリポソーム膜の物性を変化させる重要な因子であると考えられるので、これらについて検討することとした。実験には、飽和脂肪酸として dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) および dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)、不飽和脂肪酸として dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)、そして両者の混合する脂肪酸として egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) を用いた。DMPCはアルキル鎖の炭素数が14、相転移の main transition の温度 (T_c) が23℃の飽和脂肪酸である。DPPCはDMPCと同様に飽和脂肪酸ではあるが、アルキル鎖の炭素数が16と異なり、 T_c は41℃である。DOPCはアルキル鎖の炭素数が18で9番目の炭素がシス不飽和結合している不飽和脂肪酸であり、 T_c は-22℃である。EYPCは飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合が約50%ずつの混合物である。主に、アルキル鎖の炭素数が16と18の脂肪酸で構成されており、 T_c は-15℃から-7℃である^{14,15)}。これらのPCを用いて、5-DSAあるいは16-DSAを含む多重層リポソーム (multilamellar vesicle: MLV) または小さな1枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle: SUV) のESRスペクトルの温度依存性を検討した。

対象と方法

1. 材料

5-DSA, 16-DSA および EYPC, DMPC, DPPC, DOPC

は Aldrich 社製のものを使用した。その他の試薬は特級を使用した。

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

2. 方法

(i) MLVの作成^{14,16)}

PCをクロロホルムに溶解し、最終濃度が500 μ Mとなるように5-DSAまたは16-DSAを加えた。次にDPPCでは55℃、他のPCでは37℃の保温下で回転式エバポレーターにて、次いでデシケーターに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25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を加えてボルテックスミキサーにてよく攪拌し、PCの最終濃度が10mg/mlの白濁したMLV懸濁液を得た。その際、 T_c より10℃以上高い液温で攪拌するために、DMPCでは37℃、DPPCでは55℃で、他は室温で操作を行った。

(ii) SUVの作成^{14,16)}

DPPCを用いてMLVを作成した後、55℃で30分間、プローブ型ソニケーターにて溶液が透明になるまで超音波処理した。その後、3000rpmにて遠心分離操作を行い、ソニケーターのプローブから溶出したチタニウムを沈殿させてSUV懸濁液を得た。SUVはDPPCのみで作成した。

(iii) 測定資料の作成

50 μ lのMLVまたはSUV懸濁液をマイクロシリンジを用いてガラス製キャピラリー (外径1.52mm, 内径1.09mm, 長さ8.5cm) に注入し、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, 9.2GHzにて行った。測定温度は10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45および50℃である。スペクトルの分離幅 A_{max} および A_{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 ΔH を Fig. 1 に示したように求めた。マイクロ波の出力は1 mWとし、その他の測定条件は以下の様に設定した。

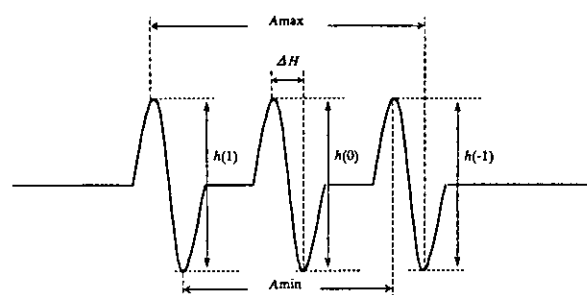


Fig. 1 A representative ESR spectrum of a nitroxide radical.

scan width : 330 ± 5 mT, sweep time : 4 min, modulation frequency : 100kHz, modulation width : 0.08-0.20 mT, amplitude : 2 × 100, response : 0.1sec

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) およびスピラベル剤の回転運動の速さを示す回転相関時間 (τ) は得られたスペクトルより以下の式を用いて計算した^{7, 17, 19}.

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

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

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

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

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

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¹⁷ が使用した値 ($A_{xx} = 0$,

63 mT, $A_{yy} = 0.58$ mT, $A_{zz} = 3.16$ mT) を用いた. また, 16-DSA については引用可能なテンソル値が得られないため, 5-DSA のテンソル値を用いた.

τ 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 ΔH の値を用いて以下の式により計算した¹⁹.

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

なお, 5-DSA のスペクトルの線形は τ が 10^{-9} sec よりも遅いことを示したため, 5-DSA 系の τ は算出できなかった.

結 果

1. DPPC の SUV の ESR スペクトルについて

DPPC の MLV を作成して ESR 測定を試みたが, DPPC の T_c は 41°C であることから室温ではゲル相になり, ガラス製キャピラリーに注入後測定までの間に DPPC と溶媒とが相分離してしまい, ESR 測定が行えなかった. DPPC の SUV では ESR 測定終了まで相分離しなかったため, DPPC は SUV にて ESR 測定を行った.

5-DSA/ DPPC の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 2 に示す. 15°C の ESR スペクトルは最大分離幅 $A_{max} = 5.2$

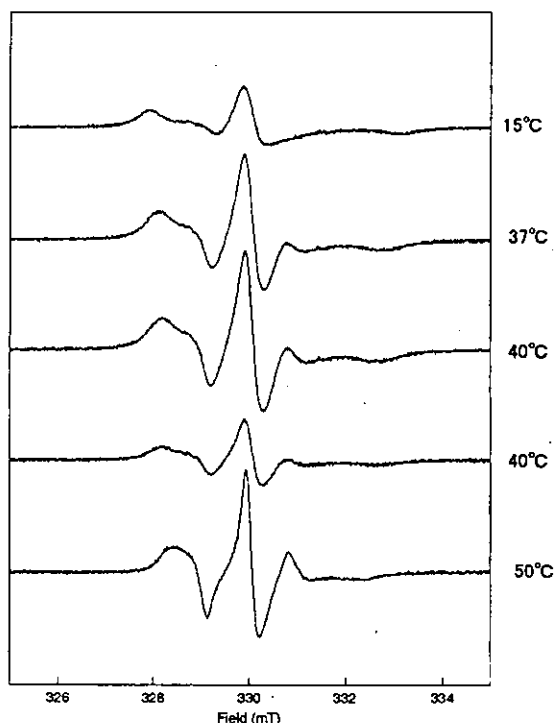


Fig. 2 Temperature-dependent changes in ESR spectra of small unilamellar vesicles composed of dipalmitoylphosphatidylcholine and labeled with 5-doxyl stearic acid.

The spectra of vesicles composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and labeled with 5-doxyl stearic acid (5-DSA) were measured with modulation width of 0.20 mT at 15, 37 and 40°C (upper three spectra) and with modulation width of 0.08 mT at 40 and 50°C (lower two spectra). The amplitude of the signal with 5-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting (A_{max}) lessened as the temperature rose.

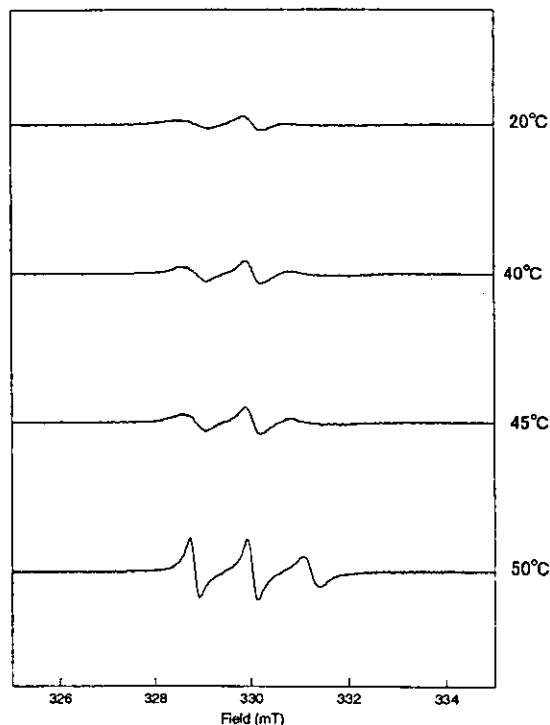


Fig. 3 Temperature-dependent changes in ESR spectra of small unilamellar vesicles composed of dipalmitoylphosphatidylcholine and labeled with 16-doxyl stearic acid.

The spectra of vesicles composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and labeled with 16-doxyl stearic acid (16-DSA) were measured with modulation width of 0.08 mT at 20, 40, 45 and 50°C. The amplitude of the signal with 16-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting (A_{max}) lessened as the temperature rose.

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50
℃では $A_{max}=3.9$ mTになりスペクトル強度も増加し、運
動性が高くなることを示している。得られたスペクトルと
式 (1) によりSを求めた。その結果をFig. 8に示す。S
は15℃から50℃で0.82から0.53まで減少した。特に40℃付
近で0.14の急減が見られた。

16-DSA/ DPPCのESRスペクトルの温度依存性をFig. 3
に示す。15℃のESRスペクトルは $A_{max}=3.1$ mTと5-DSA/
DPPCのESRスペクトルに比べて小さく、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シグナルの強度との相対的な
差は小さかった。これは16-DSAのラジカル運動も異方的
な運動であるものの5-DSAのラジカル運動に比べより等
方的な運動であり、回転速度も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。しかし A_{max}
の減少幅は5-DSA/ DPPCのESRスペクトルに比べ小さ
かった。得られたスペクトルと式 (2) によりSを求めた
結果をFig. 8に示す。Sは15℃から50℃で0.36から0.09ま
で減少した。特に45℃付近で0.21の急減が見られた。さら
に、スペクトルと式 (2) により τ を求めた。その結果を

Fig. 9に示す。 τ は15℃から50℃で141から30psecまで短
縮した。特に45℃付近で53psecの急減が見られた。

2. DMPCのMLVのESRスペクトルについて

DMPCはDPPCと同じく飽和脂肪酸であるが、 T_c が23
℃で室温でも相分離せずMLVでESR測定を行うことが
できた。

5-DSA/ DMPCのESRスペクトルの温度依存性をFig. 4
に示す。10℃ではスペクトルの最大分離幅 A_{max} は5.1 mT
であり、5-DSA/ DPPCの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} は徐々に減少して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。得られたスペクトルと式 (1) によりSを
求めた結果をFig. 8に示す。Sは10℃から50℃で0.88から
0.52まで減少し、特に25℃付近で0.18の急減が見られた。

16-DSA/ DMPCのESRスペクトルの温度依存性をFig.
5に示す。10℃のスペクトルでは $A_{max}=2.9$ mTであり、
DPPCのスペクトルと同様に5-DSA/ DMPCのスペクトル
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
ナルと両側シグナルの強度の相対的な差は小さかった。こ
れは16-DSA/ DPPCのスペクトルと同様に16-DSAのラジ

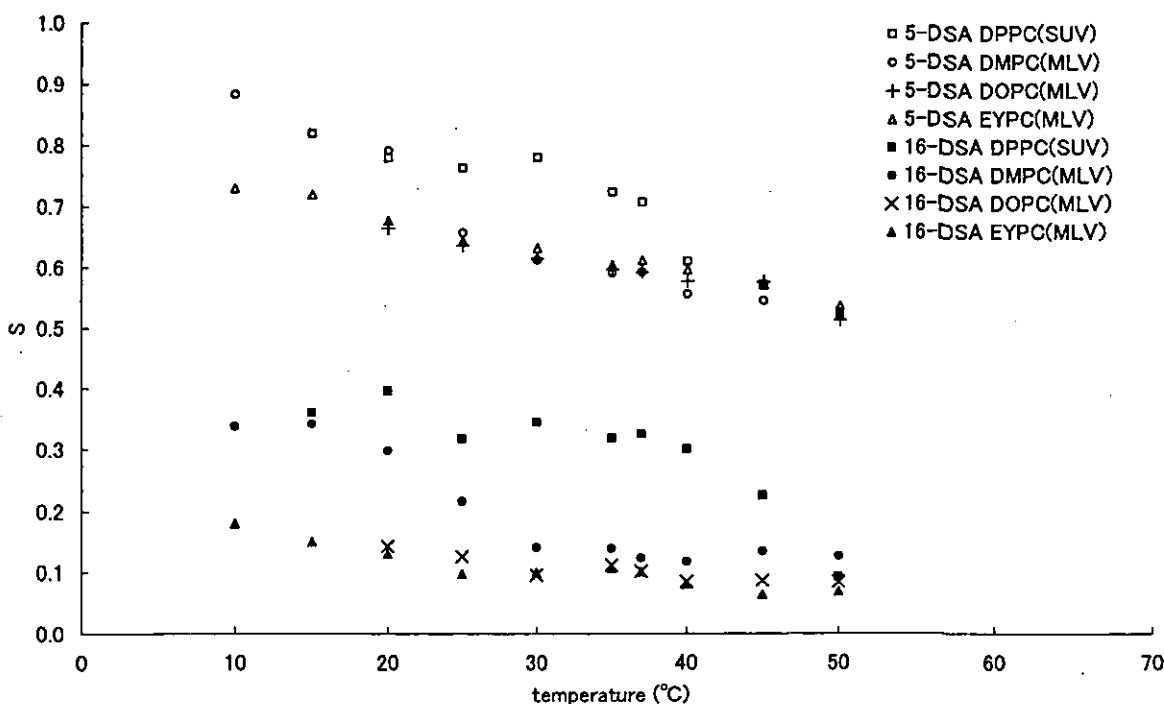


Fig. 8 Temperature-dependent changes in the values of order parameter S. S values were calculated from the ESR spectra of MLVs or SUVs composed of DPPC, DMPC, DOPC or EYPC and labeled with 5-DSA or 16-DSA, and were plotted along the temperature changes. S values decreased in every series of ESR spectrum as the temperature rose.

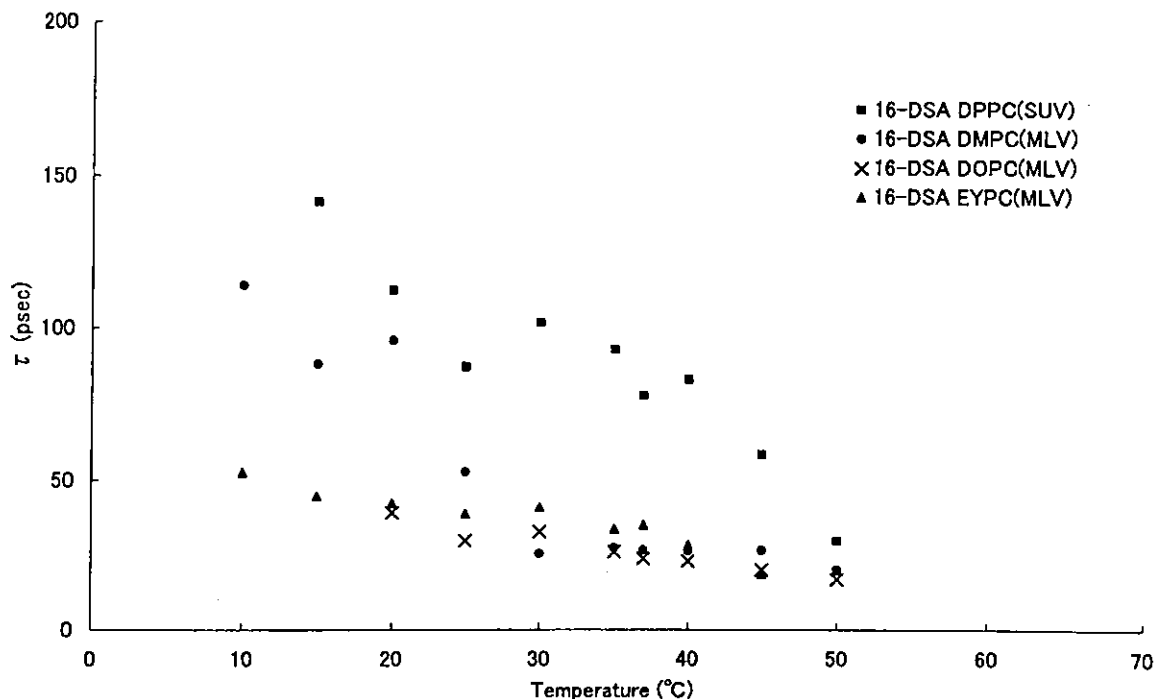


Fig. 9 Temperature-dependent changes in the values of rotational correlation time τ .

τ values were calculated from the ESR spectra of MLVs or SUVs composed of DPPC, DMPC, DOPC or EYPC and labeled with 16-DSA, and were plotted along the temperature changes. τ values decreased in every series of ESR spectrum as the temperature rose.

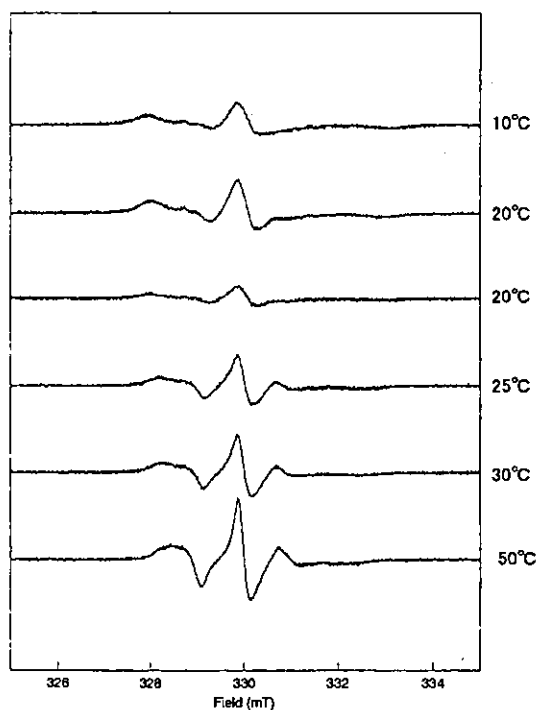


Fig. 4 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multi-lamellar vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine and labeled with 5-doxyl stearic acid.

The spectra of vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and labeled with 5-doxyl stearic acid (5-DSA) were measured with modulation width of 0.20 mT at 10 and 20 °C (upper two spectra) and with modulation width of 0.08 mT at 20, 25, 30 and 50 °C (lower four spectra). The amplitude of the signal with 5-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting (A_{max}) lessened as the temperature rose.

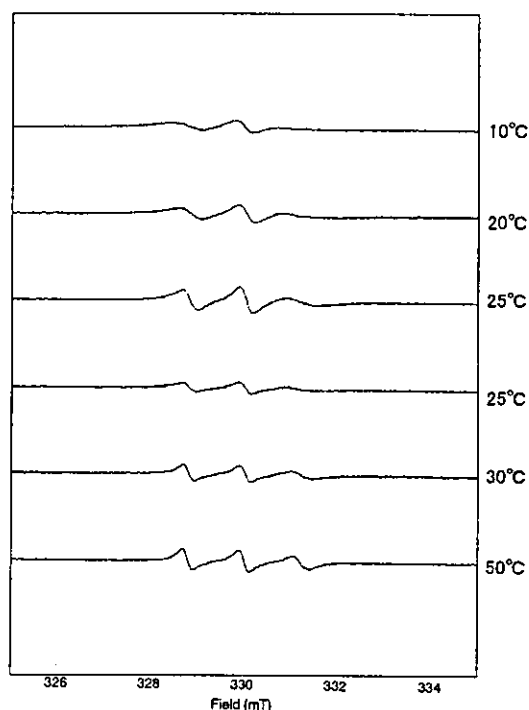


Fig. 5 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multi-lamellar vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine and labeled with 16-doxyl stearic acid.

The spectra of vesicles composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and labeled with 16-doxyl stearic acid (16-DSA) were measured with modulation width of 0.20 mT at 10, 20 and 25 °C (upper three spectra) and with modulation width of 0.08 mT at 25, 30 and 50 °C (lower three spectra). The amplitude of the signal with 16-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting (A_{max}) lessened as the temperature rose.

カル運動が異方的な運動であるものの5-DSAのラジカル運動に比べより等方的な運動であり、回転速度も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。しかし A_{max} の減少幅は5-DSA/DMPCのESRスペクトルに比べ小さかった。スペクトルと式(1)によりSを求めた結果をFig. 8に示す。Sは10℃から50℃で0.34から0.13まで減少した。特に25℃付近で0.16の急減が見られた。さらに、スペクトルと式(2)により τ を求めた結果をFig. 9に示す。 τ は10℃から50℃で114から20psecまで短縮した。特に25℃付近で71psecの急減が見られた。

3. DOPCのMLVのESRスペクトルについて

5-DSA/DOPCのESRスペクトルの温度依存性をFig. 6に示す。20℃ではスペクトルの最大分離幅 A_{max} は4.5 mTであり、飽和脂肪酸の5-DSAの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} は徐々に減少して50℃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。スペクトルと式(1)によりSを求めた結果をFig. 8に示す。Sは20℃から50℃で0.66から0.51まで減少した。飽和脂肪酸の場合と異なり急減を示す温度域は見られなかった。

16-DSA/DOPCのESRスペクトルの温度依存性をFig. 6に示す。20℃ではスペクトルの A_{max} は2.8 mTであり、飽和脂肪酸のESRスペクトルと同様に5-DSA/DOPCのスペクトルに比べ 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シグナルの強度の相対的な差は小さかった。これは飽和脂肪酸の16-DSAのスペクトルと同様に、16-DSAのラジカル運動は異方的な運動であるものの5-DSAのラジカル運動に比べると等方的であり、回転速度も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。しかし A_{max} の減少幅は5-DSA/DOPCのスペクトル

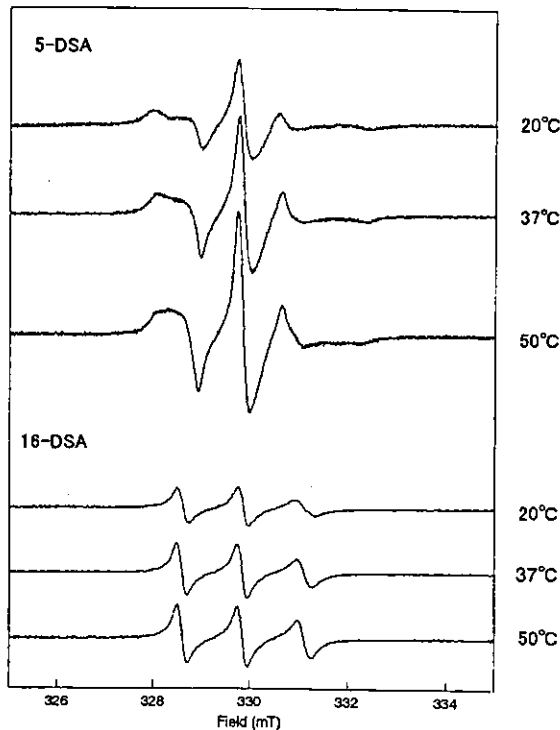


Fig. 6 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multilamellar vesicles composed of dioleoylphosphatidylcholine and labeled with 5-doxyl stearic acid or 16-doxyl stearic acid.

The spectra of vesicles composed of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and labeled with 5-doxyl stearic acid (5-DSA) (upper three spectra) or 16-doxyl stearic acid (16-DSA) (lower three spectra) were measured with modulation width of 0.08 mT at 20, 37 and 50°C. The amplitude of the signal with 5-DSA or 16-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting (A_{max}) lessened as the temperature rose.

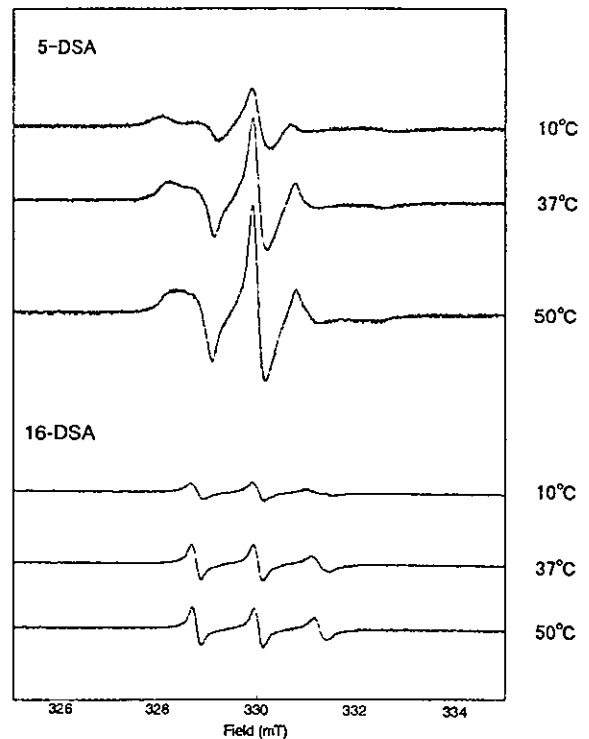


Fig. 7 Temperature-dependent changes in ESR spectra of multilamellar vesicles composed of egg yolk phosphatidylcholine and labeled with 5-doxyl stearic acid or 16-doxyl stearic acid.

The spectra of vesicles composed of egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) and labeled with 5-doxyl stearic acid (5-DSA) (upper three spectra) or 16-doxyl stearic acid (16-DSA) (lower three spectra) were measured with modulation width of 0.08 mT at 10, 37 and 50°C. The amplitude of the signal with 5-DSA or 16-DSA expanded and the spectral hyperfine splitting (A_{max}) lessened as the temperature rose.

に比べ小さかった。スペクトルと式 (1) から S を求めた結果を Fig. 8 に示す。 S は 20°C から 50°C で 0.14 から 0.09 まで減少した。さらに、スペクトルと式 (2) により τ を求めた結果を Fig. 9 に示す。 τ は 20°C から 50°C で 39 から 17 psec まで短縮した。5-DSA/ DOPC と同様に飽和脂肪酸の場合と異なり急減を示す温度域は見られなかった。

4. EYPC の MLV の ESR スペクトルについて

5-DSA/ EYPC の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 7 に示す。 10°C でのスペクトルの A_{\max} は 4.7 mT であり、他の 5-DSA/PC の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°C 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。スペクトルと式 (1) により S を求めた結果を Fig. 8 に示す。 S は 10°C から 50°C で 0.73 から 0.54 まで減少した。DOPC と同様に、飽和脂肪酸の場合と異なり急減を示す温度域は見られなかった。

16-DSA/ EYPC の ESR スペクトルの温度依存性を Fig. 7 に示す。 10°C ではスペクトルの A_{\max} は 2.8 mT であり、飽和脂肪酸の ESR スペクトルと同様に 5-DSA/ EYPC の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シグナルの強度の相対的な差は小さかった。これは飽和脂肪酸の 16-DSA のスペクトルと同様に、16-DSA のラジカル運動は異方的な運動であるものの 5-DSA のラジカル運動に比べると等方的な運動であり、回転速度も 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} は徐々に減少して 50°C 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。しかし A_{\max} の減少幅は他の PC の場合と同様に 5-DSA/ EYPC のスペクトルに比べ小さかった。スペクトルと式 (1) により S を求めた結果を Fig. 8 に示す。 S は 10°C から 50°C で 0.18 から 0.07 まで減少した。さらに、スペクトルと式 (2) により τ を求めた結果を Fig. 9 に示す。 τ は 10°C から 50°C で 52 から 20 psec まで短縮した。5-DSA/ EYPC と同様に飽和脂肪酸の場合と異なり急減を示す温度域は見られなかった。

考 察

生体膜に対する麻酔薬の作用を研究する上で生体膜構成リン脂質の主成分である PC を用いて作成したリポソームは極めて有用である。しかしリポソームの物性は構成する PC の種類によっても変化し、温度によっても変化する。また、麻酔作用には温度が影響することも良く知られている。このようなことから、タンパク質を組み込んだリポソームを作成して麻酔薬の効果を研究するにあたり、適切な

PC を選択し、温度を変化させた際のリポソームの物性を調べておくことは重要なことである。また、我々は、リポソームに対する麻酔薬の作用を検出するために、スピンラベルされた脂質が混入したリポソームの ESR スペクトルを測定することによりラベル剤周囲の環境をモニターする予定である。そこで、PC として飽和脂肪酸の DMPC および DPPC、不飽和脂肪酸の DOPC、そして両者の混合する脂肪酸として EYPC を選択してリポソームを作成し、5-DSA と 16-DSA の 2 種類のスピンラベルを行った。今回は、PC の違いによるスペクトル変化と、測定温度変化による影響を解析した。

飽和脂肪酸である DPPC で MLV を作成したが、室温ではすぐに DPPC と溶媒が相分離してしまうため、今回の研究には使用できず SUV を作成して実験に用いた。MLV は T_c が 41°C¹⁸⁾ と高いため室温ではゲル相であったためと推定される。一方、SUV は MLV に比べて相転移温度が広い温度範囲にわたるため¹⁹⁾、室温でも完全なゲル相になっておらず、分離しにくかったものと考えられる。DPPC の実験結果において、リポソームの比較的表層にラジカルが存在するとされる 5-DSA では、37°C から 40°C に温度が上がるとオーダーパラメータ S の値が大きく減少し膜の流動性の増大を示唆した。また 37°C から 40°C よりも小さいが 30°C から 35°C でも同様の傾向が見られた。一方ラジカルが比較的深部に存在して周囲の環境を反映するとされる 16-DSA では、40°C から 45°C で S と τ の値が大きく減少し膜の流動性の増加を示唆した。相転移には main transition と pretransition があり、main transition は膜内部の炭化水素鎖の部分の変化であり、pretransition は膜表面の物性の変化とされる¹⁾。DPPC の T_c は 41°C、相転移の pretransition の温度 (T_{pre}) は 35°C である¹⁴⁾。5-DSA で膜の流動性の大きな増加が 40°C から 45°C ではなく 37°C から 40°C でみられたのは、実験が SUV で行われたため相転移が広い温度の範囲で起こったためと考えられた。また、16-DSA では pretransition に相当する変化が認められなかったのに、5-DSA では pretransition に相当する温度域で変化が認められたことから、ラジカル位置から予想されたように 16-DSA はリポソームの深部の環境を、5-DSA はリポソームの表層付近の環境をモニターしていることが示された。

DMPC は DPPC と同じく飽和脂肪酸であるがアルキル鎖の炭素数が異なり、前者の 14 に対し後者が 16 である。それに伴い相転移温度も異なり、DMPC の T_c は 23°C、 T_{pre} は 14°C である¹⁴⁾。結果において 5-DSA では 20°C から 25°C で S 値が大きく減少して膜の流動性の増大を示唆し、また 20°C から 25°C よりも小さいが 10°C から 15°C でも同様の傾向が示された。一方、16-DSA では 25°C 前後で膜の流動性が大きく増加した。以上の結果は、5-DSA は DPPC の場合と同様に T_c および T_{pre} に相当する温度域で S 値が変化し、16-DSA では T_c に相当する温度域での変化であることを示

している。

DOPCはDPPC, DMPCとは異なり不飽和脂肪酸である。アルキル鎖の炭素数は18であり9番目の炭素がシス不飽和結合している。脂肪酸に不飽和結合, 特にシス不飽和結合があると T_c は著しく低くなりDOPCの T_c は -22°C である¹⁴⁾。ちなみに, アルキル鎖の炭素数が18の飽和脂肪酸 distearoylphosphatidylcholine (DSPC) の T_c は 54.9°C である¹⁴⁾。今回の結果では, 5-DSA, 16-DSAともに温度の上昇に伴い膜の流動性が増加したが, 特定の温度域での急激な変化は見られなかった。これは T_c が -22°C であり, 今回の実験における 20°C から 50°C での測定では相転移はみられず, 全て液晶相であったからと推定される。また, DOPCについては T_c が -22°C ということから 10°C , 15°C においても温度依存的な変化しかみられないと予測し, 実験は 20°C から 50°C の間でのみ行った。

EYPCはDPPC, DMPC, DOPCとは異なり飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の混合である。主に, アルキル鎖の炭素数が16と18の脂肪酸で構成されており, 飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合は約50%ずつである¹⁵⁾。 T_c は不飽和脂肪酸が含まれることから -15°C から -7°C と低温であり¹⁴⁾, 様々な脂肪酸が混合しているためDPPC, DMPC, DOPCと異なり T_c の範囲が広い。温度依存性の結果はDOPCとほぼ同様であり, 5-DSA, 16-DSAともに温度上昇に伴い膜の流動性が増加したが, 特定の温度域での急激な変化は観察されなかった。DOPCと同様に T_c が -15°C から -7°C と低温であることから, 今回の実験における 10°C から 50°C での測定では全て液晶相であり相転移が見られなかったからと考えられる。

今回用いた飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のリボソーム膜の温度変化に対する流動性を見てみると, PCの種類により T_c が異なることから, 膜の流動性の大きな変化とそのときの温度はPCの種類によって異なった。しかし温度ではなくゲル相および液晶相での膜の流動性をみてみると, PCの種類にかかわらず同じ相での膜の流動性はほとんど変わらなかった。EYPCは飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合は約50%ずつであり¹⁵⁾, 飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の両方の性質が合わさって見られるのではないかと考えていたが, 今回の研究では測定温度が全て T_c 以上であったこともあり液晶相での膜の流動性の変化しか見ることができず, 不飽和脂肪酸であるDOPCと同様の結果しか見ることができなかった。

以上の結果を基にリボソームに対する吸入麻酔薬の影響とその温度依存性を研究するうえで必要な条件を検討した。麻酔薬は T_c および T_{pre} でより強い作用を示すことはよく知られており, 体温に比較的近い温度の範囲で相転移をみるためにも飽和脂肪酸を用いる必要があると考えられる。今回の研究にはDPPCとDMPCを用いたがDPPCは T_c が 41°C と高くSUVでは問題ないが, MLVでは扱いにくい。

実際の生体膜ではその膜物性は集合体の単位としての大きさ, 曲率などからSUVよりもMLVに類似しているため¹⁴⁾, DMPCを用いてMLVを作成して使用するほうがよいと考えられる。不飽和脂肪酸を用いる欠点は体温に近いような温度での測定の場合には液晶相での吸入麻酔薬の影響しかみることができないということであるが, 同じ液晶相の状態で吸入麻酔薬が飽和脂肪酸, 不飽和脂肪酸のどちらに強く作用するかをみるのには有効である。今回使用したDOPCは扱いやすく, 今後の研究にも有用であると考えられる。EYPCは飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の混合であり, 実際の生体膜も様々な脂質で構成されている。今回用いたリン脂質の中でEYPCは最も生体膜に近いことから今後の実験において有用なリン脂質であると思われる。今回の研究結果から, 測定温度と相転移を考慮してリボソームに用いるPCの選択を行う必要性が明らかになった。今後予定しているリボソームに対する吸入麻酔薬の影響とその温度依存性を調べる実験には, DMPC, DOPCおよびEYPCのMLVを研究目的に応じて使い分けるのが有効だと考えられる。

結 論

今回の実験では, 4種類のPCのリボソーム中に5-DSAおよび16-DSAを組み込んで温度変化させながらESR測定を行った。5-DSAはリボソームの分子表面付近に位置し, 16-DSAは深部に存在して各々の部位の環境を示した。DMPC, DPPCのリボソーム膜の深部では T_c で膜の流動性が大きく増加し, 表層付近では T_c と T_{pre} で膜の流動性が大きく増加した。DMPC, DOPC, EYPCのMLVおよびDPPCのSUVの膜の流動性は, PCの種類により相転移温度が異なるために特定の温度領域での流動性には違いがあるが, 同じ液晶相ではPCの種類に係わらず温度の上昇に依存して増加した。今回用いたリン脂質では, 今後我々が考えているリン脂質小胞に対する吸入麻酔薬の影響とその温度依存性を調べることににおいて, DMPC, DOPCおよびEYPCのMLVを研究目的に応じて使い分けるのが有効と考えられた。

文 献

- 1) 上田一作: 吸入麻酔薬にレセプタはあるか?。麻酔, 44: 480-488, 1995.
- 2) 真下 節: 全身麻酔のメカニズム。臨床麻酔, 27: 295-311, 2003.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 小野智史：揮発性麻酔薬のNa⁺,K⁺-ATPaseとアルカリ性フォスファターゼに及ぼす影響に関する研究. 北海道歯誌, **21**: 245-255, 2000.
 - 6) 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.
 - 7) 渋谷真希子, 平沖敏文, 木村邦衛, 堤 耀廣, 鈴木邦明, 福島和昭：リボ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.
 - 8) Ohnishi, S., McConnell, H.M.: Interaction of the radical ion of ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**: 2293, 1965.
 - 9) Hubbell, W. L., McConnell, H.M., and Metcalfe, J. C.: Magnetic resonance studies of anesthetics in cytomembranes. *Br. J. Pharmacol.*, **35**: 374-375, 1965.
 - 10) Gulfo, N., Bartucci, R., and Sportelli, L.: Effect of Inhalation Anesthetics on Spin-Labeled Cholesterol Containing DPPC Vesicles. *Z. Naturforsch.*, **43**: 264-268, 1988.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 大西俊一：生態膜の動的構造 第2版. 28-38, 東京大学出版会, 東京, 1993.
 - 14) 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.
 - 15) 井上圭三：ホスファチジルコリン. 日本生化学会編, 脂質の化学, 256-257, 東京化学同人, 東京, 1974.
 - 16) 奥 直人：リボソームの作成と実験法. 14-20, 廣川書店, 東京, 1994.
 - 17) 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.
 - 18) Korkmaz, O., Korkmaz, M.: The effects of mitomycin-C and temperature on dynamical properties of human erythrocyte membrane. *Biophys. Chem.*, **69**: 167-174, 1997.
 - 19) 大西俊一：生態膜の動的構造 第2版. 77-79, 東京大学出版会, 東京, 1993.

ORIGINAL

Effects of phosphatidylcholine components and temperature on electron spin resonance spectra of spin labels incorporated into liposome

Kunie Kimura¹, Toshifumi Hiraoki², Makiko Shibuya¹,
Kazuaki Fukushima¹ and Kuniaki Suzuki³

ABSTRACT: The effects of phosphatidylcholine components and the temperature on electron spin resonance (ESR) spectra of small unilamellar vesicles (SUVs) or multilamellar vesicles (MLVs) were investigated. SUVs or MLVs were composed of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) or dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), and labeled with 5-doxyl stearic acid (5-DSA) or 16-doxyl stearic acid (16-DSA). The ESR spectra were measured at different temperatures from 10 to 50 °C. Changes in the shape of the spectra were observed, and the order parameter S and rotational correlation time τ were calculated from the spectra.

The amplitude of the center signal in 5-DSA incorporated into phosphatidylcholine (PC) was large compared to those of the upfield and downfield signals, suggesting that the movement of the radicals was slow and anisotropic. The spectral hyperfine splitting (A_{\max}) of the spectra with 16-DSA/PC was smaller than that with 5-DSA incorporated into the same kind of PC, suggesting that the movement of radicals of 16-DSA was more isotropic and that the speed of rotation was faster than those of 5-DSA. It was also suggested that the radical of 5-DSA located nearer to the surface of liposome than that of 16-DSA, as the S values of 16-DSA were smaller than those of 5-DSA.

The amplitude of the signal with 5-DSA and 16-DSA expanded and A_{\max} lessened as the temperature rose, suggesting enhanced mobility of radicals. The S and τ values of two saturated fatty acids, DMPC and DPPC, decreased sharply at around the phase transition temperature, but those of unsaturated fatty acid, DOPC, and EYPC, decreased gradually in the wide range of temperature changes.

These results suggest that the fluidity of the liposome membrane increased with rises in the temperature in the liquid crystal phase and that extents of the change at the phase transition temperature varied depending on the PC components. It was also suggested that MLVs composed of DMPC, DOPC, or EYPC, should be selected according to the experimental purposes when studying the effects of general anesthetics on liposomes as a model of the biomembrane and the temperature dependency.

Key words: electron spin resonance, liposome, order parameter S , rotational correlation time τ , phase transition

¹ Department of Dental Anesthesiology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

² Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

³ Department of Dental Pharmacology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

Address: 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: October 14, 2004] [Accepted: October 28, 2004]

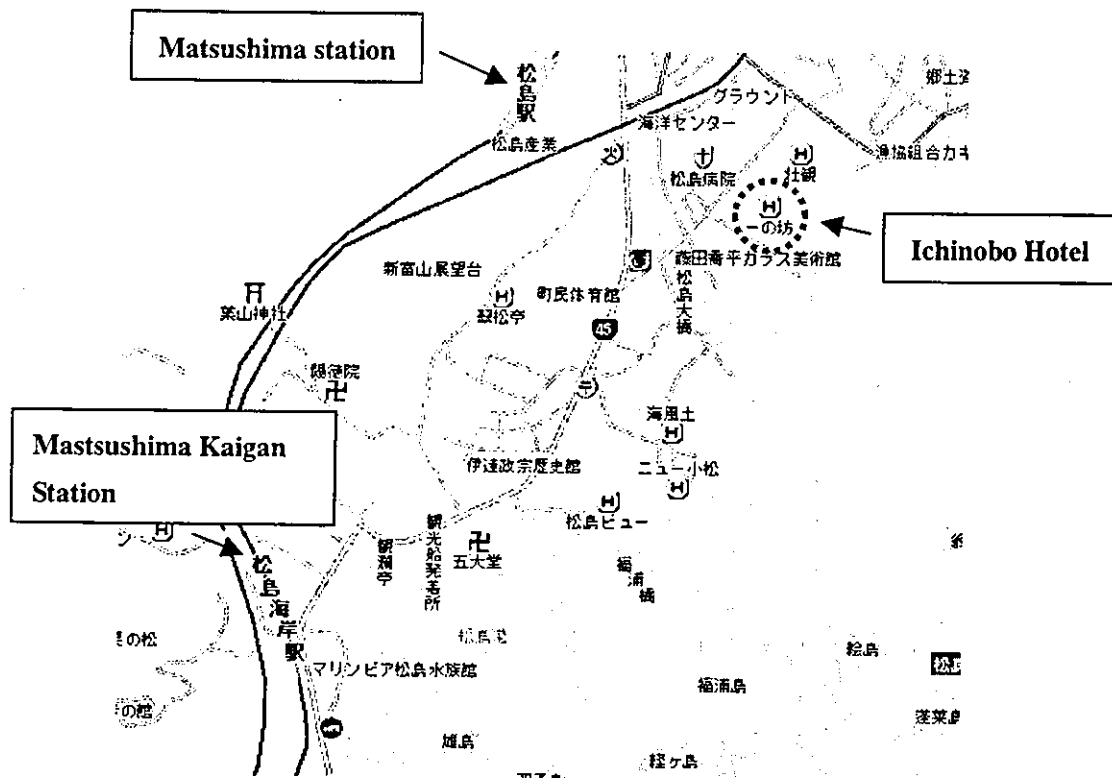
International Symposium of Tissue Response and Biomedical Application of Carbon Nanotubes, Nanofibers, and Nanoparticles



December 20, 2004

**Ichinobo Hotel
Matsushima, Miyagi, Japan**

Matsushima's Map



Information of Ichinobo Hotel

Address: 1-4 Hama Takagi, Miyagi-gun, Miyagi, 981-0215, Japan

T E L: +81-22-353-3333

F A X: +81-22-353-3339

E-mail: m_yoyaku@ichinobo.com

Traffic Information

Pathway (Train)	Necessary Time	Fare (One Way)
JR Tohoku line: From Sendai to Matsushima	25 min	400 yen
JR Senseki line:	Rapid train: 25 min	400 yen
From Sendai to Matsushima Kaigan	Local train: 40 min	

Monday, December 20, 2004

Symposium Program

14:00-14:10

Opening Remark

Prof. Kazuyuki Tohji

Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

14:10-14:20 Topic 1

1

Particles and Reaction of Cells and Tissue

Prof. Fumio Watari

Graduate School of Dental Medicine Sapporo, Hokkaido University

14:20-15:20 Invited Talk 1

2

Using Near-Infrared Methods to Explore the Interactions of Carbon Nanotubes with Biological Systems

Prof. R. Bruce Weisman

Department of Chemistry, Center for Nanoscale Science and Technology and Center for Biological and Environmental Nanotechnology, Rice University

15:20-15:30

Break

15:30-16:00 Topic 2

Biological Behavior of Hat-stacked-type Carbon Nanofibers in the Subcutaneous Tissue in Rats

3

Atsuro Yokoyama¹, Yoshinori Sato², Yoshinobu Nodasaka¹, Satoru Yamamoto¹, Takao Kawasaki¹, Masanobu Shindoh¹, Takao Kohgo¹, Tsukasa Akasaka¹, Motohiro Uo¹, Fumio Watari¹, Kazuyuki Tohji²

¹Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

²Graduate School of Engineering, Tohoku University

16:00-16:30 Invited Talk 2

5

Peptides that recognize the surface of carbon nanohorns and titanium

Prof. Kiyotaka Shiba

Department of Protein Engineering, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, and CREST, JST

16:30-18:00

Break and Free Discussion

18:00-21:00 **Poster Session and Dinner**

- P01 Water-Soluble Hat-Stacked-Type Carbon Nanofibers for Biomedical Applications** 7
Yoshinori Sato¹, Balachandran Jeyadevan¹, Kazuyuki Tohji¹, Rikizo Hatakeyama², Kazuchika Tamura³, Tsukasa Akasaka³, Motohiro Uo³, Atsuro Yokoyama³, Ken-ichiro Shibata³, Fumio Watari³
¹Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University
²Graduate School of Engineering, Tohoku University
³Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University
- P02 Carbohydrate Coating of Carbon Nanotubes for Biological Recognition** 8
Tsukasa Akasaka¹, Motohiro Uo¹, Fumio Watari¹, Yoshinori Sato², Kazuyuki Tohji²
¹Department of Dental Materials and Engineering, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University
²Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University
- P03 Effects of Ti, Ni and Fe Particles on Cell Function and Particle Size Dependent Cytotoxicity** 10
Kazuchika Tamura¹, Noriyuki Takashi², Fumio Watari¹, Yasunori Totsuka²
¹ Biomaterials and Engineering, Graduate School of Dental Medicine,
² Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University
- P04 The Cytotoxicological Study of Metal Encapsulating Carbon Nanocapsules** 19
Motohiro Uo¹, Kazuchika Tamura², Yoshinori Sato³, Atsuro Yokoyama⁴, Fumio Watari¹, Yasunori Totsuka², Kazuyuki Tohji³
¹ Department of Biomedical, Dental Materials and Engineering, Hokkaido University
² Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hokkaido University
³ Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University
⁴ Department of Oral Functional Science, Hokkaido University