

アナリティカルレポート*

イオン選択電極法による脂質二分子膜の相転移観測

山崎 奈穂¹, 松岡 和彦¹, 長山 和史², 秦 隆志^{®2},
松木 均⁴, 佐竹 弘³, 金品 昌志⁴

Observation of Lipid Bilayer Phase Transition Using Ion Sensor

Naho YAMASAKI¹, Kazuhiko MATSUOKA¹, Kazuhito NAGAYAMA², Takashi HATA²,
Hitoshi MATSUKI⁴, Hiromu SATAKE³ and Shoji KANESHINA⁴¹ Advanced Course in Materials Science and Engineering, Kochi National College of Technology, 200-1, Monobe-otsu, Nankoku-shi, Kochi 783-8508² Department of Materials Science and Engineering, Kochi National College of Technology, 200-1, Monobe-otsu, Nankoku-shi, Kochi 783-8508³ Center for Cooperative Research, The University of Tokushima, 2-1, Minamijosanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506⁴ Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima, 2-1, Minamijosanjima-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

(Received 15 April 2005, Accepted 7 August 2005)

Some aromatic amine local anesthetics are a kind of amphiphilic ion. Binding of local anesthetics, dibucaine (DC), bupivacaine (BC), and lidocaine (LC) to a dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayer membrane was studied by potentiometry with ion-selective electrodes sensitive to DC, BC and LC cations, respectively. The DPPC membrane-buffer partition coefficient was directly determined as a function of the anesthetic concentration and the temperature. The DPPC bilayer underwent a thermotropic pretransition from the lamellar gel phase to the ripple gel phase as well as a main transition from the ripple gel phase to the liquid crystal phase. The partition coefficients of anesthetics at pH 5.5 varied with the temperature, namely the bilayer phases. Potentiometry using an ion-selective electrode sensitive to amphiphilic ions is effective for the detection of a bilayer phase transition through partition coefficients.

Keywords : ion sensor; local anesthetic; lipid bilayer membrane; phase transition; partition coefficient.

1 緒 言

生体膜は脂質分子とタンパク質分子から構成されているため、生体膜のモデル系として脂質二分子膜が広く一般に

利用されている。この脂質二分子膜は温度¹⁾や圧力²⁾³⁾等の影響により、様々な相挙動を示すことが知られており、現在のところそれらの相挙動の観測手法として、X線散乱測定⁴⁾や光透過率測定⁵⁾、示差走査熱量測定⁶⁾などが用いられている。

ところで、麻酔薬は代表的な膜作用性薬物であり、その作用解明のために脂質分子と麻酔薬分子との相互作用について詳細な研究が行われている⁵⁾⁶⁾。脂質二分子膜から成る生体モデル膜への麻酔薬の結合量の測定には、限界透過法⁷⁾、透析平衡法⁸⁾や光透過率測定⁵⁾などが用いられている。麻酔薬の一種である局所麻酔薬は構造上両親媒性イオンで

* 若手研究者の初論文特集

¹ 高知工業高等専門学校専攻科物質工学専攻: 783-8508 高知県南国市物部乙 200-1² 高知工業高等専門学校物質工学科: 783-8508 高知県南国市物部乙 200-1³ 徳島大学産学官連携プラザ: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1⁴ 徳島大学工学部生物工学科: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

あるため溶液中の麻酔薬濃度測定にイオン選択性電極法を用いることができ、検量線と脂質溶液中での応答曲線の電位差から、脂質二分子膜への局所麻酔薬の分配係数が測定できる⁹⁾。このイオン選択性電極を用いる電位差測定は、他の手法⁵⁾⁷⁾⁸⁾に比べ簡易な装置で、また短時間で局所麻酔薬カチオンの活量測定が可能という利便性がある⁹⁾。ここで、麻酔作用機構解明に向けた脂質分子と麻酔薬分子との相互作用解析のため、麻酔薬分子存在下での生体モデル膜の相挙動の観測が重要である。そこで本研究では、相挙動により麻酔薬の膜への分配量が変化することが確認されている⁵⁾ことから、イオン選択電極法による脂質二分子膜への局所麻酔薬分配計測を行い、分配係数の変化を相転移と対応させ、麻酔薬存在下での脂質膜の相挙動測定技法としての有用性について検討を行った。

2 実験

2.1 試薬

局所麻酔薬にはジブカイン (DC)、ブピバカイン (BC) 及びリドカイン (LC) の各塩酸塩を、脂質にはジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を用いた (以上、すべてシグマ製)。脂質二分子膜の調製は、DPPC を pH 5.5 に調整したリン酸緩衝溶液に 5 mmol dm^{-3} の濃度で溶解させた後、粒子径が約 $200 \sim 300 \text{ nm}$ に均一になるように超音波処理を施し調製した。

2.2 電極の作製

被覆線型イオン選択性電極の作製は既報に準じた^{9)~11)}。テフロン管に銅線を通しエポキシ樹脂で固定し、更に、銅線の片方の先端にエポキシ樹脂の球をつけ、固定した部分から球にかけて感応膜を膜厚が $0.3 \sim 0.6 \text{ mm}$ となるように被膜した。感応膜はポリ塩化ビニルをマトリックスとして、各局所麻酔薬イオン対及び可塑剤としてニトロフェニルフェニルエーテルをそれぞれテトラヒドロフランに溶解し作製した。なお、各局所麻酔薬イオン対のカウンターイオンには、局所麻酔薬 (価数 1) と反応モル数が多いものを用いた場合に感度の高い安定した電極が作製できることから¹¹⁾、本研究ではリントングステン酸を用い、各局所麻酔薬とリントングステン酸の混合溶液による沈殿物を単離精製したものを各局所麻酔薬イオン対として使用した。

2.3 電極電位の測定

$25 \sim 45^\circ\text{C}$ に設定した恒温水を循環した容器に緩衝溶液あるいは脂質二分子膜溶液 3 ml を取り、イオン選択性 (局所麻酔薬カチオン) 電極及び自作のダブルジャンクション型銀-塩化銀電極を浸した後、各麻酔薬標準溶液を最終濃度が $10^{-7} \sim 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ となるように滴下し、添加毎の電極電位から応答曲線を作成した。なお、電気化学

セル構成は以下のとおりである。

局所麻酔薬カチオン電極/試料溶液/緩衝溶液-電解隔膜/飽和塩化カリウム/銀-塩化銀電極

3 結果及び考察

3.1 脂質二分子膜への局所麻酔薬の分配係数の算出

Fig. 1 に局所麻酔薬に BC を用いた 35°C での緩衝溶液及び DPPC 二分子膜溶液中における電極電位-応答曲線を示す。麻酔薬の全濃度 C_t における電極電位と等しい電位を示す検量線上の濃度 C_f は、脂質二分子膜と結合平衡にある遊離の麻酔薬濃度とみなすことができるため、脂質二分子膜中及び緩衝溶液中の麻酔薬のモル分率はそれぞれ、

$$X_A^m = \frac{C_t - C_f}{(C_t - C_f) + C_m} \quad (1)$$

及び、

$$X_A^w = \frac{C_f}{1000/M_w + C_f + C_s} \quad (2)$$

と表せる。ここで、 C_m はリン脂質濃度、 M_w は水の分子量、 C_s は緩衝溶液濃度である。また、麻酔薬の脂質二分子膜/緩衝溶液分配係数 K は、両式の比として

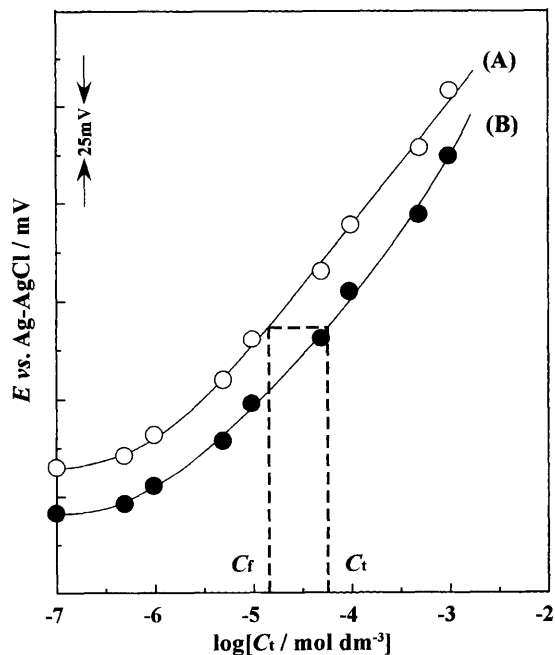


Fig. 1 Response curves of the bupivacaine electrode at 35°C

(A) Calibration curve in the phosphate buffer, pH 5.5; (B) Response curve in the presence of DPPC bilayer membrane

$$K = \frac{X_A^m}{X_A^w} \quad (3)$$

と表すことができる。

Fig. 1 から算出されたそれぞれのモル分率について, X_A^m を X_A^w の関数として Fig. 2 に示した. 分配係数 K は一定にならず濃度依存性を示すものの, 麻酔薬の低濃度領域では X_A^m vs X_A^w プロットは直線となり, この傾きから麻酔薬の無限希釈における分配係数として決定することができる⁹⁾.

なお, 本研究で用いた局所麻酔薬は第3級アミンの塩酸塩であるため, pH 環境によりカチオン型あるいは中性型分子種で存在するが, 本研究の pH 5.5 環境下では各麻酔薬の pK_a の値 (25°C での pK_a 値は DC: 8.72, BC: 8.16, LC: 7.91)¹²⁾ から, ほぼすべてがカチオン型分子種で存在

すると考えられる。

3・2 分配係数の推移による脂質二分子膜の相転移現象の観測

DPPC 二分子膜は温度上昇に伴い相転移現象をおこす. 本測定温度範囲において, DPPC 二分子膜は温度上昇に伴い 34.1°C にラメラゲル ($L\beta'$) 相からリップルゲル ($P\beta'$) 相への前転移及び 41.2°C に $P\beta'$ 相から液晶 ($L\alpha$) 相への主転移が観測される. その模式図を Fig. 3 に示す.

種々の温度における DPPC 二分子膜への各麻酔薬の分配係数を算出し, Fig. 4 に各麻酔薬毎に温度-分配係数曲線を作成した. Fig. 4 から DPPC 二分子膜の各相転移温度近辺にて分配係数に大きな変化が確認され, また, 同一の相状態間ではほぼ一定の値を示すことが確認された. 分配係数の大きな変化から読み取られる相転移温度は, DPPC

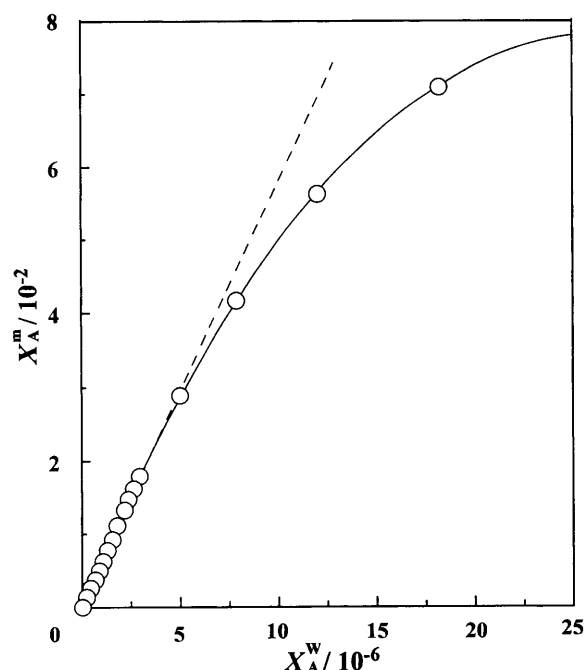


Fig. 2 A relationship between anesthetic mole fractions in DPPC bilayer membrane (X_A^m) and anesthetic mole fractions in buffer solution (X_A^w) at 35°C

The slope of a broken line refers to the limiting partition coefficient

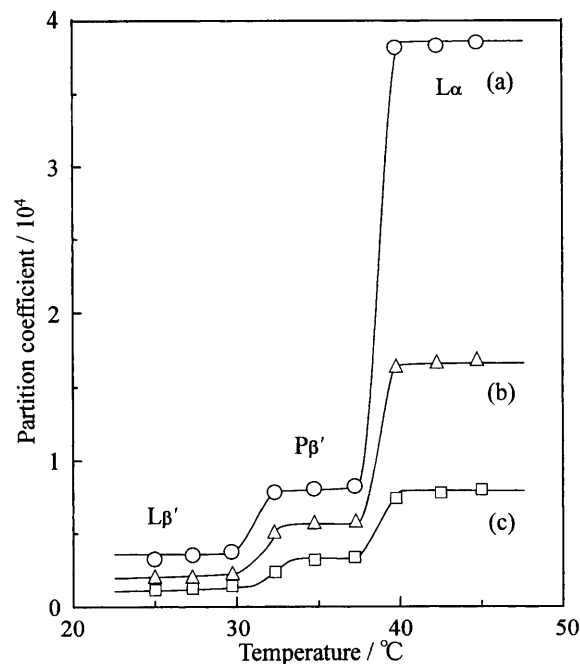


Fig. 4 Effect of temperature on the limiting partition coefficients of anesthetics into DPPC bilayer membranes

(a) DC, (b) BC and (c) LC. Bilayer phases: liquid crystal ($L\alpha$), ripple gel ($P\beta'$) and lamellar gel ($L\beta'$)

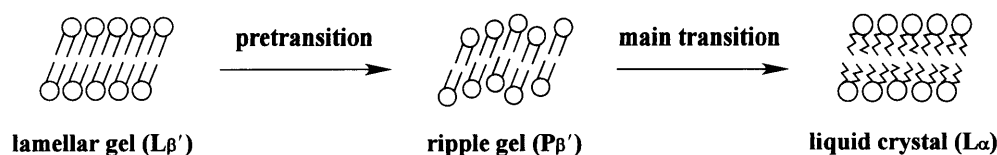


Fig. 3 Schematic representations of the phase transition of DPPC bilayer membrane

二分子膜のみで観測される相転移温度と若干異なるが、これは麻酔薬により相転移温度が変化したことによる⁵⁾⁶⁾。算出された分配係数の大きさの順は、DPPC 二分子膜の各相に対しては $L\beta'$ 相 $<$ $P\beta'$ 相 $<$ $L\alpha$ 相となり、麻酔薬間ではすべての相において $LC < BC < DC$ の順であった。これら分配係数の大きさの順序は、相転移温度降下から熱力学的に見積もられた以前の結果⁵⁾と良い一致を示した。

このように麻酔薬の脂質二分子膜への分配係数は麻酔薬の種類や膜の相状態によって変化することから、麻酔薬の種類別に、膜相状態間の分配係数の差から膜相転移の観測が可能である。また、この分配係数測定には、簡便な装置で、かつ短時間で測定が可能なイオン選択性電極法が利便性に優れ有用である。

本研究は財団法人日本科学協会の笹川科学研究助成を得て行われたことを付記いたします。

文 献

- 1) H.-J. Hintz, J. M. Sturtevant: *J. Biol. Chem.*, **247**, 6071 (1972).
- 2) H. Ichimori, T. Hata, T. Yoshioka, H. Matsuki, S. Kaneshina: *Chem. Phys. Lipids*, **89**, 97 (1997).
- 3) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki, S. Kaneshina: *Biochim. Biophys. Acta*, **1414**, 165 (1998).
- 4) D. Chapman, R. M. Williams, B. D. Ladbroke: *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 445 (1967).
- 5) T. Hata, H. Matsuki, S. Kaneshina: *Colloids Surf. B*, **18**, 41 (2000).
- 6) T. Hata, H. Matsuki, S. Kaneshina: *Biophys. Chem.*, **87**, 25 (2000).
- 7) N. Janes, J.W. Hsu, E. Rubin, T.E. Taraschi: *Biochemistry*, **31**, 9467 (1992).
- 8) K. Fukushima, M. Someya, R. Shimoza: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 1613 (1993).
- 9) 西本真琴, 松岡和彦, 長山和史, 秦 隆志, 松木均, 佐竹 弘, 金品昌志: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 781 (1993).
- 10) H. Satake, T. Miyata, S. Kaneshina: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 3029 (1991).
- 11) 佐竹 弘, 若槻美保, 金品昌志, 横野敦子, 横野論, 小栗顕二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **41**, 573 (1992).
- 12) H. Kamaya, J. J. Hayes Jr., I. Ueda: *Anesth. Analg.*, **62**, 1025 (1983).