

アナリティカルレポート

イオン選択性電極を用いるタンパク質-麻酔薬間
相互作用の基礎検討正鑄 夕哉¹, 窪内 希恵², 長山 和史², 岡林 南洋²,
秦 隆志^②, 佐竹 弘³, 松木 均⁴, 金品 昌志⁴

1 緒 言

麻酔薬は医療の現場をはじめ, 日常医療 (抗炎症剤やかゆみ止めなど) にも幅広く使用されているものの, いまだ明確な作用機構は解明されていない. ここで, 麻酔作用研究を医療目的に限定することなく, “麻酔薬と生体構成成分との相互作用”としてとらえ物理化学的視点から考察を行うことは, 作用機構を分子間相互作用として扱うことにより定量的な情報を得るなど, 麻酔作用機構の解明に貢献するところは大きい. また, 作用能力の定量的な情報は, より効率の良い麻酔薬の開発に利用できるなど2次的な発展を生むことができる. そのため, 種々の物理化学的手法により, 麻酔薬と生体構成成分との相互作用に関する研究が行われている^{1)~10)}.

特に, 生体構成成分として研究の対象となっているものにタンパク質及び膜脂質が挙げられる. 現在, 麻酔薬とタンパク質との相互作用測定手法としては, 等温滴定型熱測定¹⁾や示差走査熱量測定 (DSC)²⁾, 密度測定³⁾, 粘度測定⁴⁾等が用いられており, 膜脂質においては, 上述のDSC⁵⁾のほか, 限界透過法⁶⁾, 透析平衡法⁷⁾や光透過率測定⁸⁾等が用いられている.

ところで, 著者らは以前に麻酔薬の一種である局所麻酔薬の脂質膜への分配係数測定について, 麻酔薬イオン選択性電極法の有用性を報告した⁹⁾¹⁰⁾. この麻酔薬選択性電極を用いる電位差測定は, 他の手法^{5)~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. そこで本研究では, 脂質膜に代わりタンパク質を用いた場合, つまりタンパク質と麻酔薬の相互作用測定技法として, 麻酔薬選択性電極法の有用性を検討した.

2 実 験

2.1 試 薬

局所麻酔薬にはジブカイン (DC) 及びテトラカイン (TC) の各塩酸塩 (シグマ製) を, タンパク質には牛血清アルブミン (BSA) を用いた (和光純薬工業製). BSA 試料溶液はリン酸緩衝溶液 (pH 5.5) に所定の BSA 量を加え調整した. また, BSA の分子量は 66000 D¹¹⁾ とし, BSA 濃度はモル吸光係数の値: $\epsilon_{280} = 4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて算出した¹²⁾.

2.2 電極の作製

局所麻酔薬 DC 及び TC 選択性電極の作製は既報に準じた¹³⁾¹⁴⁾. 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 0.3~0.6 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, 局所麻酔薬カチオン (価数 1) の対イオンには価数が大きいアニオン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¹⁴⁾, 本研究ではリントングステン酸を用い, 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 及び 37°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 BSA 溶液 3 mL を取り, 局所麻酔薬選択性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, 麻酔薬標準溶液を最終濃度が $10^{-6} \sim 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ となるように滴下し, 添加ごと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に示す通りである.

局所麻酔薬選択性電極/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

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 200-1

² 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 200-1

³ 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 2-1

⁴ 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフシステム部門: 770-8506 徳島県徳島市南常三島町 2-1

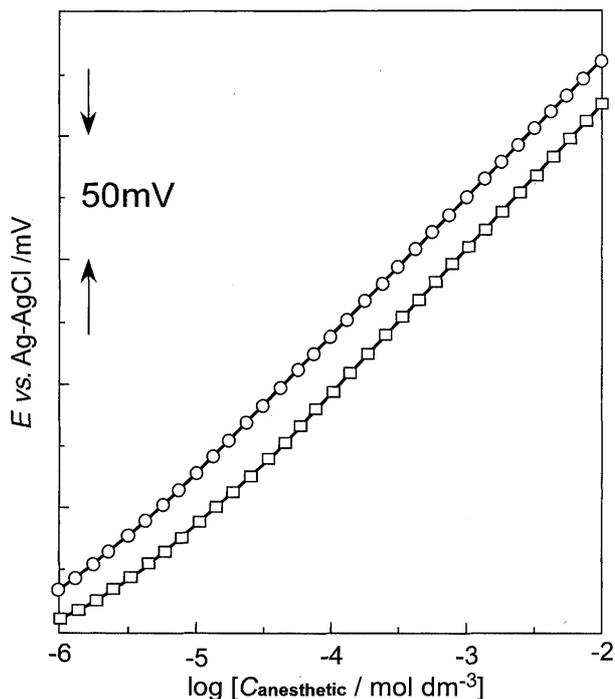


Fig. 1 Response curves of anesthetic electrodes in phosphate buffer solution (pH 5.5) at 25°C
(○) dibucaine, (□) tetracaine

3 結果及び考察

血清中には多くのタンパク質が存在しているが、本研究で用いたアルブミンは血清タンパク質全体量の約 50～65% を占める主要な血清タンパク質であり、物質、例えば脂肪酸や無機イオン、薬剤などの保持や運搬の役割を担っている。通常、体内に入った低分子物質は各臓器に取り込まれて代謝・排出されるが、アルブミンに結合した物質は臓器に取り込まれず、血液中を循環することができる。そのため、麻酔薬の作用機構解明や体内輸送メカニズム解明に向け、麻酔薬との相互作用が研究されている^{1)~4)}。

まず、作製した電極が有用であることを確認するため、試料溶液に緩衝溶液を用いて各麻酔薬の電位差測定を行った。局所麻酔薬等、イオンに対する選択性電極の指示電位は、次式のネルンストの電位-活量の関係式に従う。

$$E = E^0 + \frac{2.303RT}{zF} \log \alpha \quad (\text{カチオン})$$

ここで、 R は気体定数、 T は温度、 z は測定対象麻酔薬の価数、 F はファラデー定数である。イオン選択性電極の指示電位は、ある濃度範囲内で電位-活量関係で直線性を示すため、対象物質の濃度測定に有用である¹⁵⁾。Fig. 1 に 25°C 条件下での各麻酔薬の麻酔-電位応答曲線を示す。

Fig. 1 のように、ある濃度以上でネルンストの式に従う直線関係が確認された。更に、本測定のすべての温度下においてもこの直線関係が観測されたため、作製した電極の有用性を確認した。また、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: 8.73, TC: 8.46)¹⁶⁾ 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。なお、麻酔薬の滴下に対する pH の変動は、本実験条件では観測されなかった ($\pm 0.5\%$ 程度の変動)。

次いで試料を BSA 溶液に変え、所定の各温度で電位差測定を行った。Fig. 2 に各温度での麻酔-電位応答曲線を示す。DC 及び TC の両麻酔薬共に 37°C 条件下では、麻酔薬の低濃度領域 ($10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 以下) において、ネルンスト勾配より小さい傾きが観測された。他の麻酔薬においても低濃度領域での応答曲線に湾曲現象が観測されており、考えられる要因として BSA の電極への吸着や BSA による溶液の粘性増加が挙げられている¹⁴⁾。一方、麻酔薬の高濃度側 (約 $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 以上) では、両麻酔薬、両測定温度 (25°C 及び 37°C) において、ある濃度までは検量線で得られた直線関係に従うが、ある濃度以上では検量線から高濃度側へ“ズレ”る挙動を示した。BSA が電位測定に与える影響は BSA 濃度に依存するため¹⁴⁾、BSA 濃度一定での本測定条件では BSA の影響は麻酔薬全濃度範囲にわたって一律的なものと考えられる。そのため、麻酔薬高濃度において初めて BSA の電極への吸着や汚損が現れるとは考え難く、この“ズレ”が観測されることは、麻酔薬の BSA への結合によって、BSA 溶液のバルク水中の麻酔薬濃度が減少していることを意味し、言い換えれば結合が始まる濃度を意味する。

ここで、高濃度側への“ズレ”が観測される麻酔薬濃度以降において、検量線上の濃度を C_t 、検量線と同電位を示す応答曲線の濃度を C_b 、BSA のモル濃度を C_p とすると、BSA への麻酔薬の結合数 ν は次式により算出される。

$$\nu = \frac{C_t - C_b}{C_p}$$

上式により算出された麻酔薬の BSA への結合数と麻酔薬濃度との関係を Fig. 3 に示す。結合挙動は、麻酔薬の低濃度領域においては指数関数的な増加を示すものの、ある麻酔薬濃度に達すると結合数の増加の程度が変化する箇所が現れ、更にその麻酔薬濃度以上では再び指数関数的な増加を示した。以上のように結合挙動は一律的な指数関数的増加を示さず、これは BSA に対する麻酔薬の結合形式が多段階的であることを意味する。

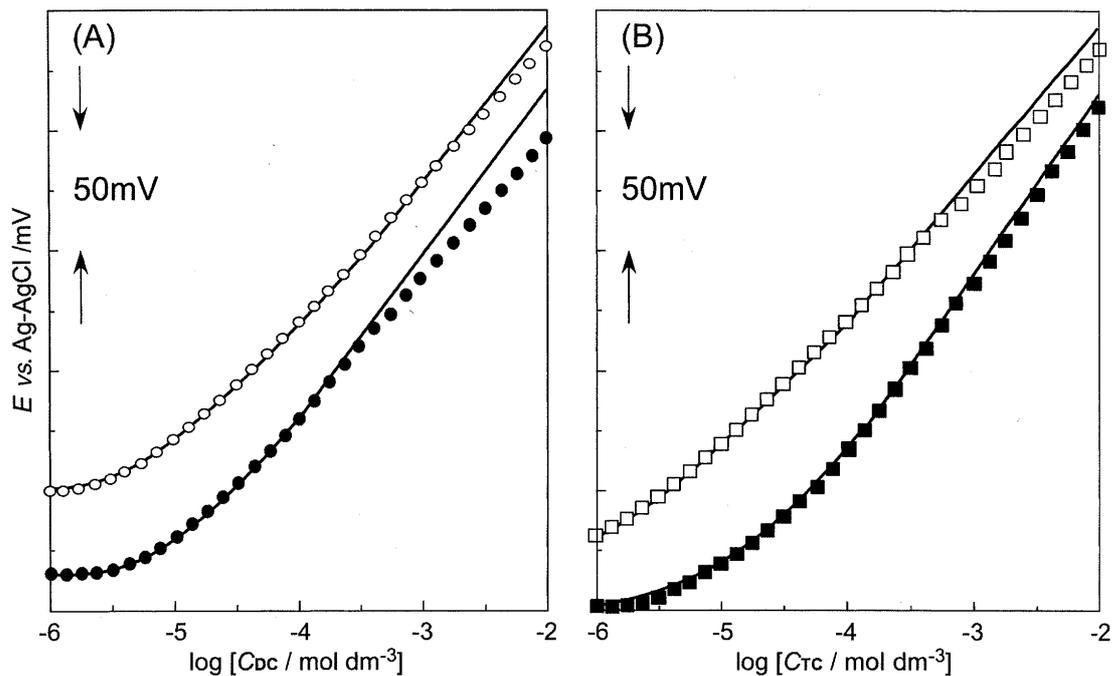


Fig. 2 Response curves of anesthetic electrodes in BSA solution at pH 5.5
(A) dibucaine; (B) tetracaine, open symbol: 25°C, closed symbol: 37°C

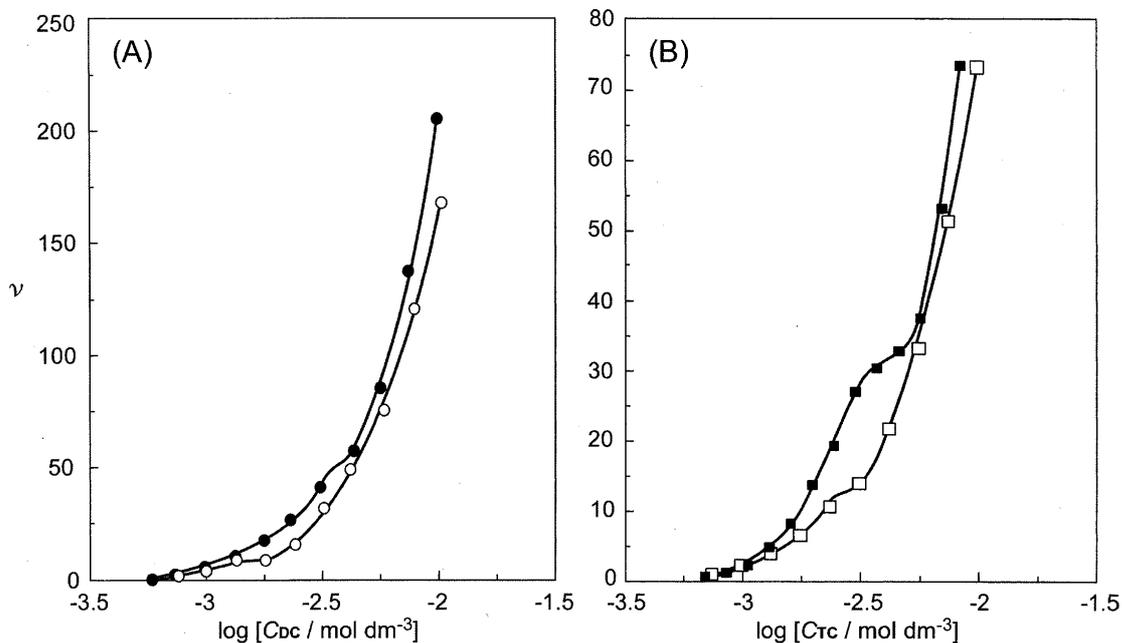


Fig. 3 Binding isotherms of BSA with local anesthetics at pH 5.5
(A) dibucaine; (B) tetracaine, open symbol: 25°C, closed symbol: 37°C

竹原らは蛍光色素を用いた実験手法によりアルカン類似体のBSAへの結合モデルを調査し、結合形式が一律でないこと、結合数の挙動に変曲点が生じることを見いだしている¹⁷⁾。用いた結合対象となる分子が異なるため、詳細な結合形式までは比較できないが、本測定技法でもBSAへ

の麻酔薬の結合の程度が一律的ではなく変化することが追認された。

このように本測定技法は簡便な手法にもかかわらず、局所麻酔薬の脂質膜への分配係数測定だけでなく、麻酔薬のタンパク質への結合数測定に対しても有用である。更に、

測定された結合数を Hill 式やギブス自由エネルギー式等へ展開することにより有用な物理化学量が得られるなど、本測定技法の応用性は高い。

本研究は財団法人理工学振興会の助成を得て行われたことを付記いたします。

文 献

- 1) I. Ueda, M. Yamanaka: *Biophys. J.*, **72**, 1812 (1997).
- 2) J. W. Tanner, R. G. Eckenhoff, P. A. Liebman: *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**, 46 (1999).
- 3) M. Yamanaka, S. Kaneshina, H. Kamaya, I. Ueda: *Colloids Surf. B*, **22**, 23 (2001).
- 4) K. Ogli: "Molecular and Basic Mechanisms of Anesthesia", p. 36 (2002), (Pabst Scientific Publishers, Berlin).
- 5) T. Hata, H. Matsuki, S. Kaneshina: *Biophys. Chem.*, **87**, 25 (2000).
- 6) N. Janes, J. W. Hsu, E. Rubin, T. E. Taraschi: *Biochemistry*, **31**, 9467 (1992).
- 7) K. Fukushima, M. Someya, R. Shimozawa: *Bull. Chem Soc Jpn*, **66**, 1613 (1993).
- 8) T. Hata, H. Matsuki, S. Kaneshina: *Colloids Surf. B*, **18**, 41 (2000).
- 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 (2003).
- 10) 山崎奈穂, 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*), **54**, 10 (2005).
- 11) P. F. Spahr, J. T. Edsall: *J. Biol. Chem.*, **239**, 850 (1964).
- 12) H. A. Saber, R. A. Harter: "Handbook of Biochemistry", 2nd ed, (1973), (CRC Press, Cleveland).
- 13) H. Satake, T. Miyata, S. Kaneshina: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 3029 (1991).
- 14) 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).
- 15) 宗森 信, 日色和夫訳: "イオン選択性電極", (1977), (共立出版); G. J. Moody, J. D. R. Thomas: "Selective Ion Sensitive Electrodes", (Merrow Publishing Co. Ltd., England).
- 16) H. Kamaya, J. J. Hayes Jr., I. Ueda: *Anesth. Analg.*, **62**, 1025 (1983).
- 17) K. Takehara, Y. Morinaga, S. Nakashima, S. Matsuoka, H. Kamaya, I. Ueda: *Anal. Sci.*, **22**, 1571 (2006).

Measurement of the Interaction between Protein and Anesthetics Using Ion Selective Electrode

Yuya MAMASI¹, Kie KUBOUCHI², Kazuhito NAGAYAMA², Minahiro OKABAYASHI²,
Takashi HATA², Hiromu SATAKE³, Hitoshi MATSUKI⁴ and Shoji KANESHINA⁴

¹ Advanced Course in Materials Science and Engineering, Kochi National College of Technology, 2001-1, Monobeotsu, Nangoku-shi, Kochi 783-8508

² Department of Materials Science and Engineering, Kochi National College of Technology, 2001-1, Monobeotsu, Nangoku-shi, Kochi 783-8508

³ Center for Cooperative Research, The University of Tokushima, 2-1, Nanjomishimacho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

⁴ Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima, 2-1, Nanjomishimacho, Tokushima-shi, Tokushima 770-8506

(Received 13 April 2007, Accepted 23 July 2007)

Anesthetics have in common the capacity to partition indiscriminately into all biological membranes and act as general perturbants of the membrane structure and function. However, anesthetic mechanisms have not yet been clarified. Some measurement techniques are used to investigate the interaction between anesthetic and biological materials. Thus, in this research we examined the utility of the electrode selectively sensitive to local anesthetics as a measurement technique of the interaction of the bovine serum albumin (BSA) with local anesthetics. The electromotive forces (EMF) of the local anesthetic dibucaine and tetracaine cation-selective electrodes were measured relative to an Ag-AgCl reference electrode in both the absence and presence of BSA at pH 5.5. In the absence of BSA, both the dibucaine and tetracaine electrodes showed a linear response with a Nernstian slope over the concentration of 10^{-5} mol dm^{-3} . Most of local anesthetic molecules must exist as the protonated cation at pH 5.5, judging from the pK_a values. In the presence of BSA, the response curve was shifted toward the higher concentration of anesthetics, which means a decrease of the concentration of free anesthetic cation due to binding to BSA. The binding isotherms of anesthetics to BSA were calculated from a pair of response curves. The slope of the binding isotherm increased steeply above a certain concentration of local anesthetics, which means that the binding form of local anesthetic into BSA is multiple-step.

Keywords : ion sensor ; local anesthetic ; bovine serum albumin ; binding isotherm.