

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20059

研究課題名(和文) GABA動態から見た脳成長過程に与える吸入麻酔薬の影響に関する研究

研究課題名(英文) Influence of volatile anesthetics to mouse striatal neurons in postnatal development

研究代表者

安藤 望 (ANDO, NOZOMI)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：20570930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマウス線条体神経細胞におけるSevofluraneの影響をWhole-cell patch clamp法を用いた電気生理学的アプローチにより検討を行った。吸入麻酔薬は臓器保護的なプレコンディショニング効果を持つ。作用機序としてATP感受性Kチャンネル(KATPチャンネル)の関与が報告されているが、マウス線条体MS細胞においてSevofluraneがKATPチャンネルを介して膜電位維持に寄与していることを示した。SevofluraneがKATPチャンネルを介してMS細胞の神経活動に影響を与え、低酸素下での臓器保護効果を持つ可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of volatile anesthetics to mouse striatal neurons using the whole-cell patch clamp technique. Sevoflurane, which is widely used in pediatric surgery, has drawn attention, because the preconditioning effects on hypoxia. It is recently reported that the effects of volatile anesthetics are partly mediated by ATP-sensitive potassium (KATP) channels. Our analyses showed that sevoflurane prolonged the time to depolarization of medium spiny neuron of mouse striatum under hypoxia during development from 7 to 35 days of age.

研究分野：麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 線条体 KATPチャンネル whole-cell patch clamp

1. 研究開始当初の背景

麻酔科領域において吸入麻酔薬は広く使用されている薬物の一つであるが、その作用機序や安全性など明確になっていない点が多く、昨今『麻酔・鎮静は脳に対して安全!?』という極めて基本的な問題に対して疑問詞がつけられている。高齢者での術後認知機能障害をはじめ、小児期の麻酔暴露がその後の脳発達に悪影響を与えるという報告が数多くなされており、更なる研究解明が期待されている。

作用機序が明確には解明されていない吸入麻酔薬ではあるが、神経細胞における作用部位の主座として γ -アミノ酪酸 (GABA) が密接に関わっていると考えられる。神経細胞間の情報伝達はシナプスを介するネットワークが主要な機能構造であると考えられていたが、1995年頃よりシナプス領域外に存在する受容体の機能と特性が明らかとなり、それまで脇役であったこの領域外受容体が脳機能調節の主要な役割を担っていると考えられてきた。なかでもシナプス領域外 GABA 受容体は GABA に対する高い親和性と緩慢な脱感作特性から細胞周囲の GABA 濃度センサーとして働き、持続的電流 (Tonic GABA 電流) を提供している。そこで私たちも実験を進め、吸入麻酔薬がこの領域外 GABA 受容体によって引き起こされる Tonic GABA 電流に対する“強い”抑制効果を持つことを報告してきた¹⁾。具体的な結果としては、マウス線条体において medium spiny neuron (MS ニューロン) に対して Sevoflurane が、Tonic GABA 電流を増大させ、さらにその大きさを日齢 3 日 (P3) から 35 日 (P35) までは日齢とともに増加させた。また、得られた Tonic GABA 電流を細胞膜容量で補正すると日齢との間に強い相関関係がみられた。この時期の Tonic GABA 電流の増大が、吸入麻酔薬のもつ『興奮性』と関連して、その後の脳発達に影響を与える可能性を示唆された。さらに関連するサブユニットの解析では Sevoflurane の濃度依存性には δ サブユニットが関与していることを明らかになった。これらの結果から、Sevoflurane がマウス線条体神経細胞における GABA 伝達において強い影響を及ぼしており、その作用は日齢によって変化することが明らかとなった。以上をふまえ、マウス線条体神経細胞における Sevoflurane の影響を電気生理学的分野において多角的に評価する必要性を考え、昨今注目されている過分極活性化陽イオン電流 (I_h) および ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP} チャンネル) に着眼し追加研究を行うこととした。

2. 研究の目的

過分極活性化陽イオン電流 (I_h) は、主に心臓や中枢神経系において発達や周期的な調律形成に重要な役割を担っており、不整脈やてんかん、神経障害性疼痛との関連も指摘さ

れ、治療薬の標的としても近年注目を集めている。新生児期より全身麻酔時に広く使用されている吸入麻酔薬は中枢神経ネットワークの構築に影響を与えている可能性もあり、吸入麻酔薬の I_h への影響、特に幼少脳に与える影響は少なからず考慮する必要があると考えられる。

また、吸入麻酔薬はプレコンディショニング効果という臓器保護効果があり、神経細胞においては、脳血管障害の抑制効果があることが報告されている。主に ATP 感受性カリウムチャンネルが神経細胞膜電位を調整し、細胞保護に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。さらに今まで結合組織とされてきたグリア細胞は神経伝達物質の調整やシグナル伝達を行うなど動的な役割を果たすことが明らかになり、近年注目されている。吸入麻酔薬には、神経細胞に対しての保護作用があると考えられているが、グリア細胞に対して保護効果があるかはわかっていない。臓器虚血の観点から神経細胞、特にグリア細胞におけるプレコンディショニング作用機序の解明は非常に重要であると考えられ、今回線条体神経細胞における吸入麻酔薬 Sevoflurane の K_{ATP} チャンネルへの影響についての検討を行うこととした。

上記研究を進めるにあたり、最終目標として吸入麻酔薬の機序解明と副作用のない麻酔薬開発に寄与することを目的としたい。

3. 研究の方法

今回、我々は神経ネットワーク解析を専攻とする立場から Whole-Cell Patch clamp 法を中心とした電気生理学的仕法を用い、未熟脳および成熟期脳において吸入麻酔薬暴露がマウス線条体神経細胞に与える影響について検討を行った。

(1) 脳スライス作成：日齢 (P) 7 ~ 35 の C57BL/6J マウスをエーテルで麻酔後、脳標本を摘出し、95%酸素および 5%二酸化炭素で灌流した人工脳脊髄液内に取り出し、速やかに冷却した。線条体組織を含む冠状断の脳スライスを作成し、32 の人工脳脊髄液内で 30 分間灌流した後、室温 (21 ~ 25 °C) での灌流を維持した。

(2) 95%酸素、5%二酸化炭素を添加した 30 の脳脊髄液を顕微鏡記録チャンパー内に灌流し、取り出した脳スライスチャンパーに設置した。顕微鏡下に線条体組織および神経細胞を同定し、線条体 Medium spiny neuron および Cholinergic interneuron から Whole-cell patch clamp 法を用いて電圧固定の細胞内電流を測定した。吸入麻酔薬 Sevoflurane は 1 ~ 2MAC (呼吸終末 Sevoflurane 濃度 2 ~ 4%) を人工脳脊髄液内にバブリングすることでその影響を観察した。Sevoflurane の灌流液内濃度については過去の報告において添加開始後 5 分で一定濃度となり、その後同濃度が保たれことを明らかにしている²⁾。

(3) 各種薬物(内向き整流性カリウムチャンネル電流遮断薬であるバリウム、 K_{ATP} チャンネル阻害薬グリベンクラミド、モノカルボン酸トランスポーター阻害薬 4-CIN)を灌流液に添加することで各種電流への Sevoflurane の電流記録への影響を測定した。

3. 研究成果

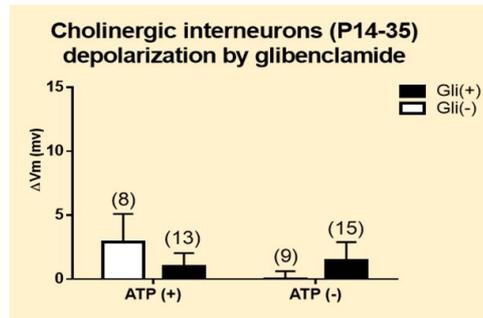
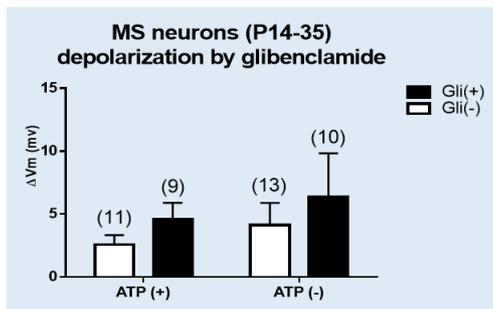
(1) 日齢 7 ~ 28 のマウス線条体 Cholinergic interneuron において、日齢増加に伴う神経細胞膜の状態変化と過分極活性化陽イオン電流 (I_h) の絶対値増加を認めた。Sevoflurane は濃度依存性に I_h を抑制し、 I_h 活性化抑制による activation curve の偏位を認めたが、日齢間では Sevoflurane の効果に差を認めなかった。

(1) 内向き整流性カリウムチャンネル電流 (K_{ir}) は中枢神経系の調律形成に I_h と同様に重要とされるが、 K_{ir} 遮断薬であるバリウムを用いた実験結果から、Sevoflurane の K_{ir} への直接作用は小さく、また Sevoflurane の I_h に対する作用への K_{ir} の影響は小さいことが示された。

(1) Sevoflurane は、視床、皮質からの感覚応答に重要とされる Cholinergic interneuron の rebound activation を抑制し、cell-attached recordings の解析では、 I_h が関与する生理的条件下での発火頻度を変化させることが判明した。

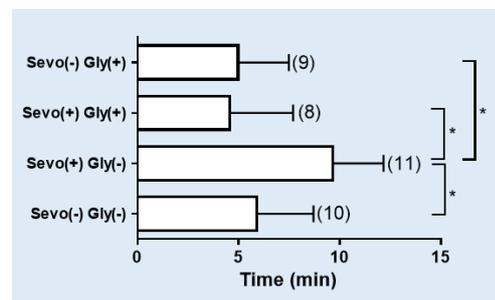
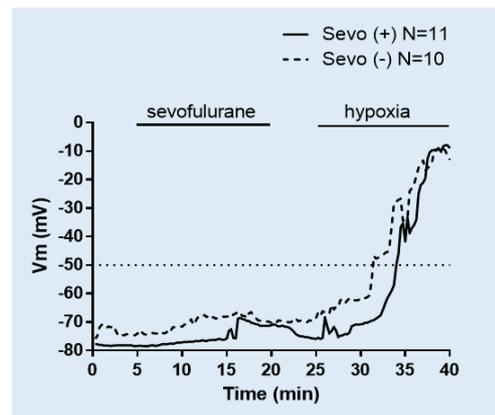
(1) 以上の結果から、Sevoflurane による I_h 抑制は、出生後早期の線条体における神経ネットワークに影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) 次に Sevoflurane の K_{ATP} チャンネルへの影響を検討した。ATP 添加および添加なしの電極内液を用いて記録を行い、ATP を抜くことにより細胞内のエネルギーが枯渇し K_{ATP} チャンネルが開くことを明らかにした。



K_{ATP} チャンネル阻害薬グリベンクラミドを 10 分間投与し、投与前後の膜電位の差を調べた。MS 細胞は内液の ATP 添加時は 5mV ほど脱分極するが、Cholinergic interneuron の脱分極はほぼ認められなかった。また、ATP を抜くことにより MS 細胞の脱分極は増大し、約 7mV 脱分極したものの、Cholinergic interneuron はほとんど脱分極が見られなかった。この実験から、Cholinergic interneuron よりも MS 細胞でグリベンクラミド投与前後の膜電位の変化が大きかったことがわかった。このことから K_{ATP} チャンネルは MS 細胞の膜電位維持により寄与していると考えられた。

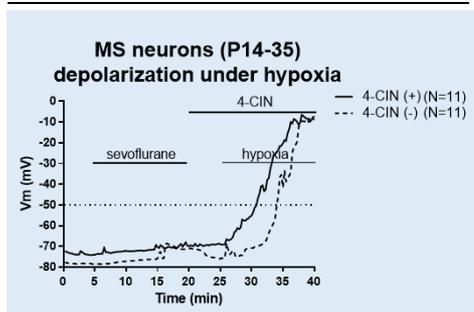
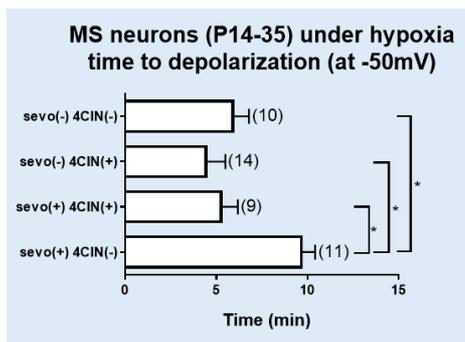
(2) 次に、MS 細胞における低酸素条件時の Sevoflurane の影響について実験を行った。



MS 細胞の膜電位を計測し、平均化したグラフを示した。記録開始 5 分後に Sevoflurane 4% を 15 分間投与し、その 5 分後から低酸素環境として、膜電位が -50mV まで脱分極する時間を計測し比較した。Sevoflurane 投与群は平均 9.5 分、非投与群は 6 分と脱分極するまでにかかった時間は Sevoflurane 投与群では有意に延長した。Sevoflurane と K_{ATP} チャンネル阻害薬グリベンクラミドを一緒に投与

した群では平均 4.5 分と短縮した。すなわち、グリベンクラミドを共に投与した群ではその延長効果が消失することから Sevoflurane の延長効果は K_{ATP} チャンネルを介していると考えられた。

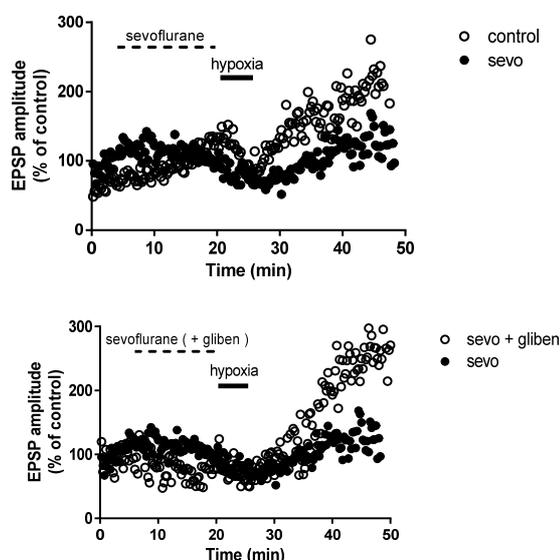
(2) 次に、乳酸が MS 細胞の膜電位維持に寄与していることを明らかにした。



低酸素環境下で乳酸輸送に関わるモノカルボン酸トランスポーター阻害薬 (4-CIN) を投与した群は平均 5.2 分、非投与群の 9.5 分と比較すると有意に短縮した。このことから、MS 細胞はエネルギー枯渇時、膜電位維持のために乳酸を利用していると考えられた。Sevoflurane 投与群ではやや脱分極するまでの時間を延長させたが有意な差は示されず、Sevoflurane の影響は認められなかった。次に、ニューロンへの乳酸供給単独での膜電位に与える影響をみた。4-CIN を単独で投与を行い、4-CIN 投与により一過性の脱分極が生じる結果が得られた。そこに Sevoflurane 前投与 15 分間行った。Sevoflurane 前投与は一過性の脱分極となる個数を減らす傾向を認めたものの、有意差は得られなかった。同様にグルコースをスクロース置換することで、グルコース枯渇状態を作成し、同様の実験を行った。スクロース置換群では、一部の細胞は持続的な脱分極を示し、脱分極のパターン 4-CIN と比較すると激しく脱分極を生じた。この脱分極は Sevoflurane 投与で個数の減少を認めたが、有意な差は認められなかった。ニューロンはエネルギー枯渇時、乳酸から高エネルギー化合物を産生し、神経活動や膜電位維持に利用するが、今回の結果から Sevoflurane の乳酸に対する効果は得られなかった。

(2) 虚血再灌流障害の一因である虚血誘導性の興奮性シナプス後電位 (EPSP) の増大に対して Sevoflurane がその増大を抑制し、

グリベンクラミド投与によって Sevoflurane の抑制効果が消失することを示した。



上に EPSP の振幅をプロットした図を示す。3 分間の虚血後にコントロール群では EPSP が小さくなるが、その後徐々に増大した。これが虚血再灌流障害性の EPSP の興奮性アミノ酸放出を反映している現象である。Sevoflurane 前投与群ではコントロール群と比較すると虚血再灌流後の EPSP の増大が抑えられることが観察された。グリベンクラミドを投与した群では有意に EPSP が増大した。虚血後 20 分での EPSP の大きさを比較すると Sevoflurane 単独群と比較して、コントロール群とグリベンクラミド投与群は有意に EPSP が増大しており、このことから Sevoflurane の効果が K_{ATP} チャンネルを介していることを示された。Sevoflurane は K_{ATP} チャンネルを活性化させることで神経細胞の膜電位を維持に寄与し、脱分極を起こしにくくする。さらに再灌流障害においても Sevoflurane は K_{ATP} チャンネルを介して、EPSP の過度な増大を押さえ、細胞保護に寄与している可能性が推測された。

(2) 以上の結果から、Sevoflurane が K_{ATP} チャンネルを介して、低酸素による脱分極や興奮性アミノ酸物質の放出を抑えることによって臓器保護的に働く可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) *Effects of the volatile anesthetic sevoflurane on tonic GABA currents in the mouse striatum during postnatal development.* : Ando N, Sugawara Y, Inoue R, Aosaki T, Miura M, Nishimura K. : Eur J Neurosci. : 2014 Aug 19.
- 2) *Imbalanced suppression of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto mouse striatal projection neurons during induction of anesthesia with sevoflurane in vitro.* : Oose Y, Miura M,

Inoue R, Andou N, Aosaki T, Nishimura K: Eur J Neurosci 2012; 35: 1396-405

研究者番号：20570930

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sugasawa Y, Fukuda M, Ando N, Inoue R, Nakauchi S, Miura M, Nishimura K.

Modulation of hyperpolarization-activated cation current I_h by volatile anesthetic sevoflurane in the mouse striatum during postnatal development.

Neuroscience Reserch. 2017 Sep 29.

pii:S0168-0102(17)30402-9.

doi:10.1016/j.neures.2017.09.009.

〔学会発表〕(計7件)

第40回日本神経科学大会

Volatile anesthetic pretreatment alleviates the hypoxia-induced depolarization through the ATP-sensitive potassium channels in the striatal medium spiny neurons of mice

福田 征孝、安藤 望、井上 律子、中内 さくら、三浦 正巳、西村 欣也

第64回日本麻酔科学会学術集会

発達期における線条体 cholinergic interneuron の過分極活性化陽イオン電流 (I_h) に対するセボフルランの影響

菅澤 佑介、福田 征孝、安藤 望、三浦 正巳、西村 欣也、稲田 英一

第64回日本麻酔科学会学術集会

ビデオ喉頭鏡導入が挿管困難症例の気管挿管に及した影響の解析と考察

安藤 望、赤澤 年正、掛水 真帆、片岡 久実、福田 征孝、稲田 英一

第23回 日本小児麻酔科学会

低酸素環境下での幼若脳線条体における吸入麻酔薬セボフルランの影響

福田 征孝、安藤 望、菅澤 佑介

第23回 日本小児麻酔科学会

両方向性グレン術後患者の肝切除術の麻酔経験

安藤 望、一柳 彰吾、渡辺 朝香、諸石 耕介、石田 千鶴、奥山 克巳

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安藤 望 (ANDO, Nozomi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教