

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：17601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K16739
研究課題名(和文)オレキシン神経活動に及ぼす麻酔薬の影響

研究課題名(英文)Effects of anesthetics on orexin system

研究代表者
須江 宣俊(SUE, NOBUTAKA)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：80625509
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳弓周囲視床下部(PFH)および外側視床下部(LH)のOX細胞は、プロポフォール(Pro)静脈内投与で単一活動電位(single unit activity; SUA)の頻度は用量依存性に抑制されたが、振幅は変化しなかった。NMDA受容体拮抗薬であるケタミンおよび α_2 受容体作動薬であるデクスメトミジンはPFHおよびLHの細胞のSUAに影響しなかった。吸入麻酔薬のセボフルラン(SEV)はPFHおよびLHのOX細胞のSUAの頻度を濃度依存性に抑制した。ProおよびSEVの作用はGABA受容体拮抗薬であるgabazineによって拮抗された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
臨床で頻用されているプロポフォール(Pro)とセボフルラン(SEV)がGABA受容体を介してオレキシン細胞活動を抑制した。覚醒機構と関連するOX細胞を麻酔薬が抑制することが明らかになった。麻酔覚醒の機序や睡眠と麻酔の違いに関する機構の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Intravenous (iv) injection of propofol and inhalational anesthesia sevoflurane dose-dependently inhibited the single unit activity (SUA) of the OX cell in the perifornical hypothalamus (PFH) and lateral hypothalamus (LH). These inhibitory effect of propofol and sevoflurane were blocked by GABA-receptor antagonist, gabazine. NMDA antagonist, ketamine and α_2 receptor antagonist, dexmedetomidine did not affect OX cell activity in the LH and PFH.

研究分野：神経科学

キーワード：オレキシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オレキシン(ORX-A,B)は1999年に視床下部から発見された神経ペプチドで、その機能は特に覚醒の維持に重要で、麻酔の覚醒機構においてもORX系が関与していることが報告されている。ORX系は、吸入麻酔薬(セボフルラン、イソフルラン)および静脈麻酔薬(ペントバルビタール、ケタミン、プロポフォール)からの覚醒を促す作用が認められていることから、麻酔薬の標的であり、ORX系と麻酔薬で相互作用があることが予想される。つまり、麻酔薬は覚醒作用もつORX系を抑制して、催眠・鎮静作用を発現するのではないかという着想にいたる。本研究は麻酔薬の作用機序の一部を明らかにするために、麻酔薬(吸入麻酔薬および静脈麻酔薬)のORX細胞活動への直接的な影響を大脳皮質(脳波)および筋緊張(筋電図)の変化とともに記録して調べる。

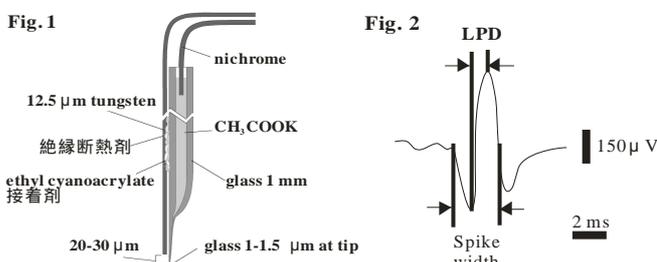
2. 研究の目的

1. 急性モデルの実験(ガラス電極および金属電極を用いた細胞外記録および細胞染色;Fig. 1) 最初に麻酔下でラットのVTAに電気刺激を与えて反応する(刺激に対して活動電位を生じる)PFHおよびLHの細胞の活動電位を記録する。一定の電気刺激を与えてその細胞が反応して生じる活動電位の特徴(スパイクの幅、振幅、Long-lasting later positive deflection;LPD;Fig.2、自発発火頻度)をガラス電極(1本)および金属電極(1本)で記録して分析する。その細胞が記録細胞であることを後で確認するためにNeurobiotin(Nb;Vector laboratories Inc.)をガラス電極から細胞に投与する。また、実験終了後にその細胞がORX細胞であることを確認するためにORX抗体を含む培養液で培養し確認する。ORX細胞の多くは自発活動電位があり発火頻度は少ない(Mileykovskiy BY et al, Neuron 2005;46:787-98)。このようにしてPFHおよびLHに存在するORX細胞の活動電位の特徴と存在部位を把握する。同様にLC(青斑核)に電気刺激を与えてPFHおよびLHの反応した細胞の誘発電位と細胞染色の結果でORX細胞の活動電位の特徴と存在部位を把握する。2. 慢性モデルの実験(金属電極を用いたsingle unit activityの記録) ラットを意識下自由行動下の状態にして単一活動電位記録を行う。これは金属微小電極(8本)で記録する。密閉性のあるケージにラットを移して意識下自由行動下の状態で、PFHおよびLH領域の細胞の活性が高い覚醒期に実験を行う。麻酔薬として吸入麻酔薬と静脈麻酔薬を投与する。吸入麻酔薬の実験では酸素とセボフルラン(0.5-3%)に暴露させて麻酔導入を行う。セボフルランに2時間暴露後、投与を中止して覚醒させる。この間の単一活動電位を記録する。同時に大脳皮質活動を観察するための脳波および身体活動を測定するための筋電図を記録する。また同時に循環動態の変化として血圧および心拍数も記録する。麻酔によるPFHおよびLHのORX細胞の神経活動と大脳皮質および身体活動の変化を同時記録し、全身麻酔によってこれらのパラメータがどう影響されるかを調べる。麻酔薬は吸入麻酔薬以外にも静脈麻酔薬であるプロポフォールおよびmuscimol(GABA受容体作動薬)やデクスメトミジン(α_2 受容体作動薬)およびケタミン(NMDA受容体拮抗薬)を用いる。麻酔薬投与によって単一活動電位に変化を認める場合には、その濃度依存性についても調べる。拮抗薬のある麻酔薬(例:デクスメトミジンにはヨヒンビン、プロポフォールおよびmuscimolにはgabazine)については拮抗薬投与によってその作用が拮抗されるかを調べる。拮抗作用についても濃度依存性の有無を調べる。

3. 研究の方法

急性実験モデル:細胞外記録と細胞染色を行う。動物は雄性のウィスターラット(250-300g)を使用する。最初にネブタール麻酔下で、薬物投与や血圧および心拍数測定に用いるカテーテルを右の大腿動静脈より挿入する。筋電図を板状筋から記録するために頸部に電極(AS633;Cooner Wire)を留置する。次にラットの頭部を脳定位固定装置(Model SR-6R Narishige;現有)に固定して皮質脳波を測定するためのステンレス製のネジ(ユニクロ;+Aナベ)を頭蓋骨に固定する。次に頭蓋骨にBregma(Br)から後方2-7mm、midlineから3mmの長さで左右対称に長方形の穴を開ける。細胞外記録と細胞染色(イオントフォレーシス)はガラス電極(Fig.1)を用いて、Axoclamp-2AとA-Mシステム増幅器(model 1700;Axon Instruments 現有)の連結装置で行う。記録電極挿入はBr後方2.2-3.4mm、左右0.6-1.8mmの範囲で約300 μ m間隔で行う。刺激電極は、二極刺激電極(ステンレス製100 μ m)を同側の腹側被蓋野(VTA; Br=-5.6mm, L=0.5mm, H=8.5mm)あるいは同側の青斑核(LC; Br=-9.8mm, L=1.3mm, H=7.4mm)に留置し、定電流矩形波を刺激装置(SEN-3401,日本

光電;現有)で与える。細胞外記録と細胞染色は、signal/noise 比(SN比)が7:1以上のよく単離された単一のPFHあるいはLHの神経細胞で行う。自発発火頻度は10秒間隔で計算する。ORX細胞記録が微小ガラス電極から金属電極に移行した際(慢性モデルの実験)に活動電位のLong-lasting later positive deflection(LPD; Fig. 2)やスパイクの特徴(潜時、振幅、間隔)の変化を評価するために並行する金属電極でも同時記録(MEZ-8301;日本光電)を行う。このため金属電極(径12.5 μ m)をガラス電極(径1mm)に接着する(Fig. 1)。細胞染色はNeurobiotin(Nb; Vector Laboratories Inc)を0.5M CH₃COOKに溶解して4%とし、ガラス電極で投与する(Fig. 1)。電極は電流波(振幅0.5-4.0 nA, 間隔200 ms)で標的細胞の発火頻度を調節できるまで細胞に近づけていく(Pinault et al., J Neurosci Methods 1996;65:113-36)。脳の両側において類似した電気生理学的特徴を持つ細胞のみ標識する。標識から2-5時間後にネブタールを大量投与して心臓にヘパリン化0.1Mリン酸緩衝液と4%パラホルムアルデヒドを灌流する。採脳し冷却した灌流液に12時間置き、30%スクロース液に48時間に浸す。PFHを含む脳切片(40 μ m)を作製する(DTK-1500 Micro slicer; 堂坂イーエム 現有)。Tris-NaClでリンスした後、切片をORX-Aに対するヤギポリクローナルIgG抗体(一次抗体)で24時間室温において培養する。次にヤギIgG-Cy3抗体(二次抗体)とCy2-conjugated streptavidinで3時間培養する。切片は蛍光顕微鏡下(Eclipse 90i; Nikon)で調べる。Nb染色細胞は緑色、ORX-A陽性細胞は赤色に観察できる。この実験でORX細胞を周囲の非ORX細胞と比較分析を行ってORX細胞の発火活動の特徴(刺激から反応までの潜時、spike width、LPD等)を把握する。VTAあるいはLCを刺激することによって得られたORX細胞の反応性および活動電位の特徴の相違も調べる。



慢性実験モデル：ラットが麻酔から覚醒した意識下自由行動下の状態でORX細胞の単一活動電位を記録する。そのためガラス電極では体動によって安定した記録が得られないので微小金属電極を用いる。本実験では、吸入麻酔薬も使用するため密閉性のある専用のケージ(Fig. 3)を用いる。麻酔はウレタン(1.8-2.5g/kg, i.p.)で行う。動脈圧測定および薬物投与のためのカテーテル挿入および脳波、筋電図および心電図電極装着を行う。ガイドカニューレを固定したテフロン製の基盤を頭蓋骨に装着する。カニューレ先端はPFH(Br=-3.14mm, L=0.5mm, H=8.3mm)あるいはLHの3mm上に留置。二極刺激電極を同側VTA(Br=-5.6mm, L=0.5mm, H=8.5mm)あるいは同側LC(Br=-9.8mm, L=1.3mm, H=7.4mm)に留置。活動電位は8本のタングステン線の微小電極(12.5 μ m)を備えたマイクロドライブで記録する。この実験で最も困難で時間を要するのはPFHおよびLHの単一活動電位の記録である。実験効率を良くするために記録電極は、エポキシレジン(model #6001, The EPOXYLITE)で多層コートしたタングステン線を作製し、それを用いる(エポキシレジンによるコーティングにより腐蝕しにくく、長期間脳内に留置しても記録可能である)。この電極は直径12.5 μ mで直径0.6mmのガイド管に8本(各電極の間隔は200-300 μ m)を束ねて挿入する。(電極は三人で協力して作製する)この8本の束になった電極を綺麗な単一活動電位が記録できるまでマイクロドライブで徐々に深部に進めていく。記録できる確率を高めるために8本の電極を使用する(Watanabe et al. Brain Res. 2004;995:97-108)。マイクロドライブは、微小電極を脳内に挿入するための装置で記録前に頭部に装着したテフロン製の基盤に固定する。微小電極、筋電図および脳波のアナログ信号は、A-Mシステム(model 1700)で増幅、デジタル化してソフト(CED1401 Plus; Spike 2 software; Cambridge Electronic Design)で解析しコンピューター画面上(Inspiron15; DELL)に示し記録する。急性実験と同様にVTAおよびLC刺激によって誘発される活動電位をPFHあるいはLHで記録してORX細胞を同定する。SN比が3:1以上の活動電位のみを記録する。活動電位の特徴および電極位置でORX細胞を同定する。ORX

細胞と予想される細胞の活動電位をとらえたら、自発発火活動と身体活動(睡眠時、覚醒時および身体活動が活発な時)との関係を調べる。ORX 細胞は、覚醒時の筋緊張の増加している時に発火頻度が増大し、睡眠時の筋緊張の低下している時に発火活動は低下する(Lee et al, J Neurosci 2005;25:6716-20)。脳波はスペクトル分析(波, 波, 波, 波, 波)も行う。実験は、麻酔から完全に覚醒した術後 2 日以上経過して安定した ORX 細胞活動が記録できている状態で開始する。最初にコントロールとして各パラメータを 1 時間測定したのち麻酔薬投与を開始する。静脈麻酔薬(プロポフォール、muscimol、デクスメトミジン、ケタミン)を静脈カテーテルから投与する。静脈麻酔薬は、loading dose なしに、持続投与を微量注入ポンプ(シリンジポンプ KDS101; 現有)で開始する。持続投与速度は実際に実験を行って決める。呼吸・循環抑制等の問題が生じた場合は投与量を適宜変更する。各静脈麻酔薬について投与速度で 3 群に分ける。吸入麻酔薬はセボフルランを用いて酸素 3l/min と気化器(Vapor19. 3; Dräger; 現有)で混合して投与する。投与濃度で次の 3 群に分ける。1 群:1%, 2 群:2%, 3 群:3%とし、ケージ内のセボフルランおよび酸素濃度は持続モニター(Datex; IMI 現有)するとともに麻酔ガスは回収する(麻酔ガス回収装置; BRC)。各麻酔薬によって濃度依存性に反応が認められた場合には、拮抗薬を投与して各麻酔薬の作用が遮断されるかを確認する。記録終了後は、記録細胞位置確認のため先端中央電極に通電(25-40 μ A, 20-30 s)する。実験後にネンブタールを大量投与後採脳し、脳切片を作製後免疫染色して記録細胞の位置を確認する。

4 . 研究成果

慢性モデル(金属電極を用いた single unit activity の記録)の実験では、ラットを意識下自由行動下の状態にして単一活動電位記録を実施した。脳弓周囲視床下部(Perifornical hypothalamus; PFH) および外側視床下部(Lateral hypothalamus; LH) のオレキシン(orexin; OX) 細胞と同定された細胞の活動電位を記録しながら麻酔薬を投与して変化を調べた。脳弓周囲視床下部(PFH) の OX 細胞は、プロポフォール(Pro) 静脈内投与(800 μ g/kg/min)で単一活動電位(single unit activity; SUA) の頻度は有意に抑制(33.1 \pm 6.6%; n=4)されたが、振幅は変化しなかった(96 \pm 10.6%; n=4)。Pro の投与量を変える(400 μ g/kg/min)と SUA の頻度は有意に抑制(24 \pm 7.7%; n=4)された。さらに Pro の投与量を減らすと(200 μ g/kg/min) SUA の頻度は変化しなかった(7.1 \pm 2.9%; n=4)。このように Pro を静脈内投与すると用量依存性に PFH の OX 細胞の SUA の頻度は抑制されたが、振幅には影響しなかった。次に外側視床下部(LH)の OX 細胞を同定し、Pro(800 μ g/kg/min)を静脈内投与すると SUA の頻度は有意に抑制(41.5 \pm 7.3%; n=4)されたが、振幅は変化しなかった(92.2 \pm 11.9%; n=4)。抑制に用量依存性は認めなかった。

同様に 2 受容体作動薬であるデクスメトミジン(DEX)を静脈内投与(1.0 μ g/kg/min)すると OX 細胞の SUA の頻度は影響しなかった(88.5 \pm 9.6%; n=4)。DEX 投与量を増加(2.0 μ g/kg/min)しても SUA の頻度(86.1 \pm 12.3%; n=4)は影響しなかった。DEX は SUA の振幅にも影響しなかった。NMDA 受容体拮抗薬であるケタミンを静脈内投与(1mg/kg/min)すると OX 細胞の SUA の頻度は影響しなかった(85.2 \pm 10.3%; n=4)。ケタミン投与量を(2.0 mg/kg/min)に増加しても SUA の頻度(90.2 \pm 11.4%; n=4)は影響しなかった。ケタミンは SUA の振幅の大きさにも影響しなかった。吸入麻酔薬であるセボフルラン(SEV)を密閉ケージで吸入(2%)させると OX 細胞の SUA の頻度は有意に抑制され(28.7 \pm 6.1%; n=4) その作用は GABA 受容体拮抗薬である gabazine によって拮抗された(8.1 \pm 5.6%; n=4)。SEV 濃度を 4%に変えると SUA の頻度は有意に抑制された(35.1 \pm 10.9%; n=4)。1%の SEV の吸入では、(8.7 \pm 4.4%; n=4)変化なかった。このように SEV の OX 細胞の SUA に対する影響は、濃度依存性を認めた。SEV を 2%にした時の OX 細胞の SUA に対する抑制作用は、gabazine の濃度を変えると濃度依存性に(1mg/kg/hr: 25.2 \pm 10.1%; n=5, 3mg/kg/hr: 38.2 \pm 12.1%; n=5, 5mg/kg/hr: 45.8 \pm 9.9%; n=4)抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----