

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791087

研究課題名 (和文)

報酬系神経回路の抑制性介在ニューロンおよびドパミン放出に対する麻酔薬の影響

研究課題名 (英文)

The influences of the anesthetics on inhibitory interneurons and dopamine release in reward neural circuit in rats.

研究代表者 石和 大 (Ishiwa Dai)

横浜市立大学 医学研究科 客員研究員

研究者番号：30457858

研究成果の概要 (和文)：麻酔薬による依存性の細胞メカニズムを明らかにする目的で、報酬系回路の中心である腹側被蓋野でのシナプス伝達をラット脳スライスを用いて細胞外電位記録法により観察した。麻酔薬プロポフォールは臨床使用濃度以下のごく低濃度 (0.5 μ M) で約25%の増強作用を示した。同部位におけるドパミン放出におけるプロポフォールの作用は *in vitro* の実験系では明らかにすることが出来なかった。

研究成果の概要 (英文)：To clarify the cellular mechanisms of addiction with anesthetics, I performed extracellular field potential recording on rat VTA slices. I found that subclinical concentration of propofol (0.5 μ M) potentiated the field potential in VTA about 25 % of control value even though much higher concentration of propofol (5–50 μ M) suppressed it dose dependently. I could not evaluate influences of propofol in dopamine release in the VTA with *in vitro* setting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

薬剤の耽溺性に関しては中脳ドパミンシステムの関与が指摘されており、*in vivo*, *in vitro* において、麻薬、ニコチン、エタノール、

覚醒剤等で、薬物依存に重要な役割を果たすことが知られている腹側被蓋野(Ventral Tegmental Area: VTA)や側座核(Nucleus Accumbens: NAcc)のドパミンニューロンの

興奮や神経終末におけるドパミン放出の増加が観察されている。今までのところ吸入麻酔薬やプロポフォール等の麻酔薬による耽溺性を検討した論文は散見されているが、VTA や NAcc におけるドパミン放出に対する麻酔薬の影響については、in vivo でドパミンの放出を増加させるといった報告があるのみであり、一定の見解を得るに到っていない。また、今まで行われてきた研究は in vivo での行動学的実験やマイクロダイアリス法、in vitro では遺伝子発現系を用いた特定の受容体に対する薬剤の作用を検討したものが多く、シナプスに対する詳細な研究が可能な脳スライスを用いた研究は意外と少ない。

麻酔薬による脱抑制に関する研究では、吸入麻酔薬が海馬の抑制性介在ニューロンを抑制するという報告や、 μ -opioid 受容体刺激が青班核(locus coeruleus)-脊髄神経間のシナプス伝達を脱抑制のメカニズムで促進するという報告があるが、麻酔薬の耽溺性と関連付けた研究は今のところ見当たらない。

2. 研究の目的

本研究では麻酔薬による耽溺性の細胞レベルおよび神経ネットワークでのメカニズム解明の手がかりとすることを目的として、①VTA の抑制性介在ニューロンにおける興奮性に対する静脈麻酔薬(プロポフォール、ミダゾラム)の作用を、ラット脳スライスを用いたパッチクランプ法を用いて、麻酔薬の濃度による神経細胞の興奮性の差を検討する。また、薬物依存には中脳ドパミンシステムの可塑的变化を伴うことが知られているので、②VTA局所におけるシナプス伝達に上記静脈麻酔薬がどのように影響するのかを、多点皿電極細胞外電位記録システム(MED system)を用いて、ラット脳スライス上での興奮性シナプス伝達に対する検討を行う。さらに③VTAならびにVTAからの投射を受ける側座核にin vivoマイクロ

ロダイアリス法によるドパミン遊離量測定法を同時に適応する事により、実際に上記静脈麻酔薬が報酬系神経回路のドパミン放出にどのように影響するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

①麻酔薬が腹側被蓋野(VTA)介在性抑制ニューロンの興奮性に及ぼす影響の電気生理学的検討

生後15～25日の幼弱ラットから腹側被蓋野(VTA)を含むラット脳スライスを作成し、VTAに存在する介在性抑制ニューロンに対してスライスパッチを行い、膜電流固定法(current clamp)でプロポフォール(0.5、5、50 μ M)の還流液への投与により神経細胞の興奮性がどのように変化するかを観察する。

②麻酔薬が VTA 内興奮性シナプス伝達に与える影響の検討

上記①で使用したものと同様の脳スライスを MED probe(皿電極)上に静置し、刺激により細胞外シナプス電位が得られる電極を探した後に最大刺激の 50%程度の刺激強度で 50msec 間隔で 2 発のシナプス電位を測定する。20 分程度電位を記録し、安定していればコントロールとする。上記麻酔薬を還流液中に 0.5、5 μ M の濃度となるように投与し、麻酔薬による PPF への影響を記録する。

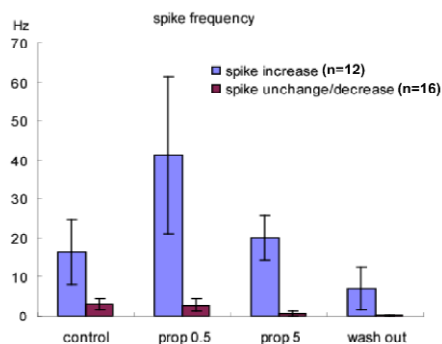
③マイクロダイアリス法によるドパミン放出に対する麻酔薬の作用の検討

生後10～20日の幼弱ラットから線条体および側坐核を含む脳スライスを作成し、還流液中に遊離するドパミンをマイクロダイアリス法によって濃度測定することによって麻酔薬のドパミン遊離作用に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

①麻酔薬が腹側被蓋野(VTA)介在性抑制ニューロンの興奮性に及ぼす影響の電気生理学的検討

生後 14 から 21 日のラットから VTA を含むスライスを作成し 0.5 から $50 \mu\text{M}$ のプロポフォールを灌流液中に加算的に加えて電流固定法および電位固定法を用いて細胞の興奮性を検討した。膜電流固定法において 0.5 から $5 \mu\text{M}$ の低濃度のプロポフォールによって 8/18 個の VTA ニューロンが活動電位の発生頻度を増加させた (control: 9.3 ± 4.2 spikes/min, $0.5 \mu\text{M}$: 27.5 ± 10.1 spikes/min, $5 \mu\text{M}$: 19.0 ± 8.2 spikes/min, washout: 1.8 ± 0.8 spikes/min, $p < 0.05$)。他の 10 個のニューロンでは活動電位の頻度は不変ないし軽度に減少した (control: 0.75 ± 0.71 spikes/min, $0.5 \mu\text{M}$: 0.43 ± 0.37 spikes/min, $5 \mu\text{M}$: 0.06 ± 0.04 spikes/min, washout: almost no spikes, $p > 0.05$)。プロポフォールによって活動電位が増加したニューロンはそうでないものに比べ有意に膜電位が浅く活動電位の頻度が多かった。VTA において膜電流固定法における発火頻度は介在神経のほうが多いことが一般に知られているため、介在神経の一部は低濃度のプロポフォールで興奮しやすいことが示唆された。



②麻酔薬が VTA 内興奮性シナプス伝達に与える影響の検討

ラット腹側被蓋野 (VTA) におけるシナプス応答に対する麻酔薬プロポフォールの影響を検討する目的で、多点皿電極を用いた細胞外シナプス電位記録法を試みた。ごく低濃度 ($0.5 \mu\text{M}$) のプロポフォールが VTA におけるシナプス伝達をおおよそ 25% 程度増強することが明らかになった。また、より高濃度のプロポフォール ($5, 50 \mu\text{M}$) では、VTA におけるシナプス伝達を抑制することが明らかになった。しかしながらこの方法ではプロポフォールの洗い出しが不十分であり、また、安定したシナプス電位を記録することが困難だったため、以降通常のスライスパッチ法に切り替え実験を行った。スライスパッチ法を用いたシナプス電流に対するプロポフォールの作用は、 $0.5 \mu\text{M}$ では $147 \pm 15.1\%$ 、 $5 \mu\text{M}$ では $66.7 \pm 5.7\%$ 、 $50 \mu\text{M}$ では $16.1 \pm 7.3\%$ と多点皿電極を用いた実験と同様であった。

③マイクロダイアリシス法によるドパミン放出に対する麻酔薬の作用の検討

生後 17~25 日齢ラットから VTA および VTA ドパミンニューロンの投射先である側坐核を含む脳スライスを用いて遊離してくるドパミンの検出を試みた。チャンバー内に脳スライスを静置し、人工脳脊髄液 (aCSF) に $0.5 \sim 50 \mu\text{M}$ のプロポフォールを加算的に加え還流し、5 分毎に分注した。後に高速液体クロマトグラフを用いて aCSF 中に含まれるドパミンとセロトニンを定量した。ドパミンおよびセロトニンは検出可能であったが、プロポフォールによるこれら神経伝達物質放出に及ぼす一定の影響は見出せなかった。予定していたラットを用いたインビボ微小透析法は当研究室で所有する高速液体クロマトグラフィーが長期にわたって故障していたことに加え、研究代表者の移動に伴う研究時間の制約があり、実現できなかった。

現在研究結果をまとめ、学会発表及び英文誌への投稿を準備している段階である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石和 大 (Ishiwa, Dai)

横浜市立大学 医学研究科 客員研究員

研究者番号：30457858

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし