

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591988

研究課題名（和文）脳内神経ネットワークからみた吸入麻酔薬の情報伝達機構と作用機序解析に関する研究

研究課題名（英文）Analysis of volatile anesthetics: involvement of intracellular signaling and neural transmission .

研究代表者

西村 欣也（NISHIMURA KINYA）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80164581

研究成果の概要（和文）：

作用機序が未だ解明されていない吸入麻酔薬であるが、脳内神経ネットワーク活動に与える影響を中心に作用機序の解明をはかるため麻酔導入時にみられる“興奮期”の発症メカニズムを検討した。実験はマウスの大脳皮質-線条体の細胞内電極：Whole-cell Patch Clamp法により大脳基底核の入力中継点である線条体細胞、主にMedium spiny neuron：MS細胞の電気生理学的変化を記録分析した。吸入麻酔薬セボフルランは気化器を用いて気化状態として人工脳脊髄液にバブリングし、灌流投与した。セボフルラン5分投与は線状体における抑制性シナプス電流IPSCの振幅を65%と強力に抑制した。これは興奮性シナプス電流EPSCの28%の抑制より明らかに大きく、抑制系と興奮系の効果にアンバランスが生じていることが分かった。またテトロドトキシンを添加した微小電流解析では、セボフルランがIPSCの頻度を著明に低下させたため、シナプス前終末でのGABA放出確率の低下によると思われる。このように一過性に大脳皮質からの興奮性入力が増加すると同時に線状体では抑制性入力より大きく抑制されることで、脳-線条体-視床という神経回路が興奮状態に傾くのではないかと、思われた。すなわち、この興奮-抑制の不均衡がセボフルラン麻酔導入時にみられる興奮期の発生のメカニズムの1つと思われた。

また、SevofluraneはGABA受容体に由来するPhasic GABA電流のみならず、tonic GABA電流が増強されることから、吸入麻酔薬の作用機序としてtonic GABA電流の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Suppression of movement during induction of anesthesia is mediated through subcortical structures. We studied the effects of a brief 5-min application of a clinically relevant concentration of sevoflurane on the electrophysiological activities of the medium spiny neurons of the stratum in brain slice preparations, using a whole-cell patch-clamp technique. We found that sevoflurane depressed the peak, as well as the net, charge transfer of intrastriatally evoked inhibitory postsynaptic currents much more strongly than those of excitatory postsynaptic currents. And this inhibition was accompanied by an elevated paired-pulse ratio. The strong suppression of eIPSCs paralleled a significant suppression of the spontaneous EPSCs.

These results suggest that, in contrast to its effects on other brain structures, sevoflurane shifts the balance between synaptic excitation and inhibition in the

direction of excitation in the stratum, thereby causing involuntary movements during induction of anesthesia by sevoflurane.

And, Sevoflurane has been shown to enhance two types of GABAergic inhibition: a synaptic form (phasic inhibition) regulating neural excitability via the activation of postsynaptic GABA_A receptors by intermittent GABA release from presynaptic terminals; and a persistent tonic form (tonic inhibition) generated by continuous activation of extrasynaptic GABA_A receptors by low concentrations of ambient GABA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 24 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：麻酔

科研費の分科・細目：麻酔

キーワード：吸入麻酔薬，麻酔興奮期，tonicGABA 電流

1. 研究開始当初の背景：作用機序が未だ解明されていない吸入麻酔薬であるが、私たちはこの吸入麻酔薬は線条体を中心とした大脳皮質→基底核→視床ループにおける情報伝達回路に乱れが生じることを見いだした。そこで、その“乱れ”の解析をもとに、吸入麻酔薬が脳内神経ネットワーク活動に与える影響を評価する。これらの結果により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する。

2. 研究の目的：全身麻酔導入時に意識消失に続いて不随意的な筋肉運動や自律神経を介した様々な反応が生じ、ほんの少しの外部刺激でも激しい反応を引き起こす誘因となることがあり、気管支痙攣などの重篤な合併症発生が懸念されている。今回はマウスの大脳皮質-線条体の細胞内電極により大脳基底核の入力中継点である線条体における情報処理状態を観察し、興奮期の発生メカニズムの解析を目的とした。

3. 研究の方法：スライス標本を用いた whole-cell パッチクランプ記録法を用いた。まずは Current clamp において膜電位の変化および Spike 閾値を測定し、のち吸入麻酔薬であるセボフルラン：2MAC 濃度を投与して変化を観察した。次に、paired-pulse

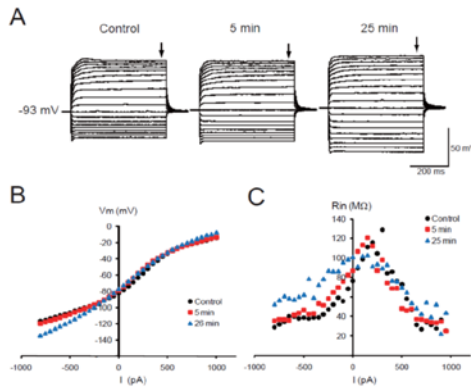
facilitation (2発刺激増強)をはじめ誘発性の IPSC (inhibitory postsynaptic current: 抑制性シナプス後電流) および EPSC (excitatory postsynaptic current: 興奮性シナプス後電流) の観察、さらに自発性 IPSC, EPSC, 加えて微小シナプス後電流の頻度測定を行い、吸入麻酔薬の脳内神経伝達に与える影響に関して実験を行った。

4. 研究成果：吸入麻酔薬は、手術可能な麻酔深度に達する前に興奮期を経由する。ここでは意識消失に伴い、不随運動、呼吸抑制、心拍数異常など引き起こすが、運動に関する脳内処理系統は大脳皮質-大脳基底核系が強く関与していることから、この興奮期の運動症状は大脳基底核の入力部である線条体での情報処理変化を観察することにした。

1) Current clamp における大脳皮質と線条体との比較結果

Spike 閾値に関してはセボフルラン投与により上昇したが、5分間では約 1mV、10-15分では約 3mV であり、統計学的に 10-15分間に有意差が見られた。さらに内向きおよび外向き整流性に与える影響を I-V グラフより検討したが、同様に 10-15分では整流性に変化がみられた。

Fig1 :セボフルラン 2 MAC 添加による線条体 MS ニューロンの膜抵抗変化と整流性に関する解析

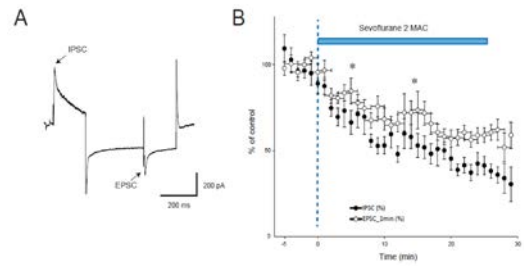


A, B, C:線条体細胞のうち約 90%を占める投射ニューロンである MS ニューロン (Midium Spiny Neuron) に対するセボフルランの効果 Current clamp 法により観察した. セボフルランの作用は 5 分では明らかではないが, 10-15 分さらには 25 分と経過するに従い, 閾値の増大, 内向き整流性の漸減, 静止膜電位の変化が見られた. これらの結果から 15 分と時間経過を経て作用し, Na チャネルや K チャネルへ作用することが示された.

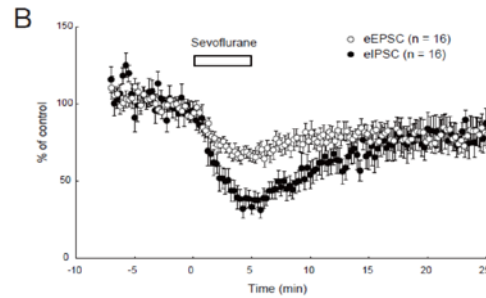
2) 線条体 Midium Spiny Neuron における誘発性の抑制性および興奮性シナプス後電流 (eIPSC, eEPSC) 変化

eIPSC および eEPSC は 500ms ごとに分割し, +10mV と -60mV の静止膜電位に固定して記録した. セボフルランの投与により eIPSC, eEPSC の両方の電流は減少したが, eIPSC の方が eEPSC に比べてより強く減少した. さらに興奮期を想定して 5 分間という時間に限ってセボフルランを投与して EPSC, IPSC を観察した. その結果もやはり統計学的有意をもって eIPSC は抑制された. また, paired Pulse 比は eEPSC に変化はなく, eIPSC で変化が見られた. これらの結果より抑制よりも興奮が凌駕しており, eIPSC の抑制は線条体 GABA ニューロンのシナプス前ターミナルから放出される GABA の放出確率の減少に起因するものではないかと思われた.

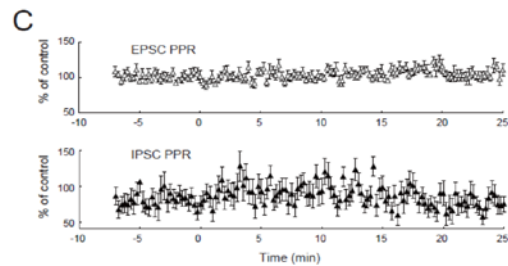
Fig 2 :セボフルランによる誘発性 evoked EPSC と IPSC の変化と Paired Pulse Ratio.



A: 大脳皮質および線条体内刺激を行い, 長時間にわたるセボフルラン添加による eEPSC, eIPSC の変化ではより -IPSC がより抑制されている.



B:セボフルラン 5 分投与で EPSC の薬 30% に対して, IPSC では約 65%の抑制が観察. 明らかに抑制系と興奮系の効果にアンバランスが生じている.

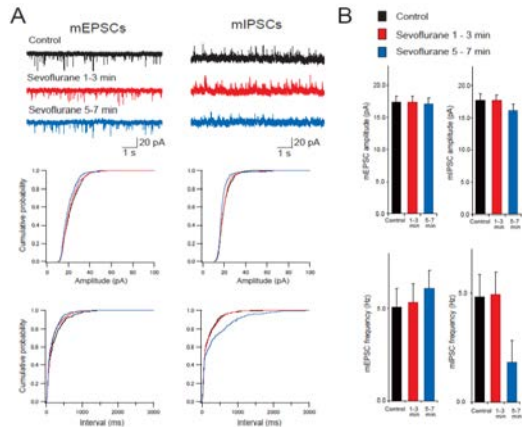


C:EPSC では PPR(Paired pulse ratio)に変化がないのに対して, IPSC では PPR が増大. よって, GABA の放出確率が低下していることが考えられる.

3) 微小 (m:miniature) IPSC と EPSC 変化

テトロドトキシン存在下に mIPSC, mEPSC を観察した. その結果, mEPSC の頻度増加は見られず, mIPSC の頻度減少のみが見られた.

Fig 3 : 微小シナプス後電流

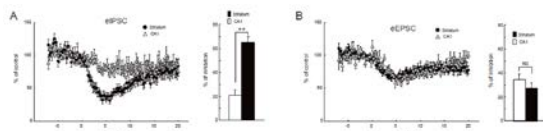


A, B: テトロドトキシン (TTX) を添加し, 外界からの入力を遮断した状態での EPSC, IPSC (miniature Post Synaptic Current, 微小シナプス後電流) の変化を観察した. セボフルランの 2MAC 投与 (約 4%) により導入期にあたる 1-3 分では mEPSC のみならず, mIPSC に影響を与えないが, 5 分を過ぎたあたりから 7 分までに mIPSC での頻度 (Interval) のみが有意に低下した. なお, mEPSC には変化がなかった.

このことから GABA の放出確率の低下が示唆された. これは PPR (Paired Pulse Ratio) の結果とよく一致した.

4) 海馬との比較

海馬については多くの研究報告があり, 吸入麻酔薬は IPSC を軽度抑制もしくは増強するとの報告が多くある. 一方, 線条体では海馬とは異なり eIPSC は強力に抑制されていた. なお, eEPSC は海馬とほぼ同程度であった. このように IPSC がより強く抑制されるのは線条体特有の現象であることをつきとめた. また従来の研究結果と同様に海馬では放出確率を下げるような変化は見られていない. 脳内において海馬と線条体では異なる働きをしており, 脳内神経ネットワークのユニークさに起因すると考えられた.



A: EPSC における比較では海馬と線条体では明らかな違いが観察された. すなわち, 線条体はより抑制されている.

B: IPSC では海馬, 線条体ともほぼ同じ変化であった.

5) GABA 放出確率低下の原因解析

GABA 放出抑制は線条体の GABA からのものであるのかを検証した. このため Ca イオンチャネルの阻害薬であるカドニウム (Cd) を添加して微小 IPSC, EPSC を観察したところ, セボフルラン投与でも IPSC での頻度に減少はみられなかった. また K チャネルブロッカーを添付して同様の実験を行ったが, IPSC の頻度に減少がみられていた. このことからセボフルランによる線条体ではカルシウムを介して作用したと考えられた.

6) セボフルラン麻酔にみられる興奮期の発現に対する考察

一過性に大脳皮質からの興奮性入力が増加すると同時に, 線条体では抑制性入力により抑制されることで, いわゆる興奮状態に傾くものと思われた. この線条体での不均衡な抑制がセボフルラン麻酔導入時にみられる興奮期の発生のひとつのメカニズムと考えられた. 海馬での結果と線条体での作用が異なることから吸入麻酔薬は神経ネットワーク間でのそれぞれの変化が起こり, 結果的に高次脳機能に影響を与えるものと思われる. この神経ネットワークには複数の核が関与していると思われる. またこの変化が脳発育に悪い影響を与えるかに関しては今後の研究が待たれる.

7) GABA 性 Tonic 抑制に与えるセボフルランの効果について

GABA (γ -アミノ酪酸: gamma-amino butyric acid) は中枢神経活動における抑制性神経伝達物質として重要な役割を果たしている. われわれが日常に使用する多くの麻酔薬がこの GABA 抑制系を介して鎮静や鎮痛作用を得ており, 臨床で重要な神経伝達物質の 1 つである. この GABA 抑制系の作用は古くからシナプス上の GABA_A 受容体 (synaptic receptor) と介して働く一過性 (phasic) 電流が知られている. さらに近年, シナプス外 GABA_A 受容体 (extrasynaptic receptor) を介して働く持続性 (tonic) 電流の存在が明らかとなり, 今回の研究では吸入麻酔薬との関連性に注目した. この Tonic 電流は GABA に対して高い親和性があり, 脱感作されにくいことを特徴としており, 全身麻酔薬との関連性を取り出されている. そこで私たちの実験室でも, 脳発達期に与える吸入麻酔薬の影響を目的として, セボフルランが Tonic GABA 電流に与える影響について検討を行った. その結果, MS 細胞にセボフルランを還流させると,

Tonic GABA電流は緩やかに増大した(図:9). その大きさは生後7日から28日までは日齢とともに増加したが、35日齢では28日齢より大きくなることなく低下した. さらに細胞膜容量(τ)で補正すると、この日齢とTonic GABA電流には相関がみられた. すなわちマウスではセボフルラン投与により生後14日から28日にかけてTonic GABA電流が強く発現することが観られた. この時期におけるTonic GABA電流増大が神経発達にどのような影響を与えるかは今後のさらなる研究を待たなければならないが、マウスを用いた研究報告の多くはこの時期に麻酔薬を投与し、『脳発達に影響を与える可能性がある』と結論づけている. このため発達期のGABA作用と相まってTonic GABA電流増幅が脳神経発育に影響を与える可能性を感じさせる結果であった.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. 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(9):1396-405.

2. Thoracoscopic Plication for Diaphragmatic Eventration in a Neonate. Takahashi T, Nishimura K, et al, Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2012, Epub.

3. Pulmonary artery size as an indication for thoracoscopic repair of congenital diaphragmatic hernia in neonates.

Okazaki T, Nishimura K, et al. Pediatr Surg Int. 2012, 28:883-6.

4. Indications for thoracoscopic repair of congenital diaphragmatic hernia in neonates. Okazaki T. Nishimura K, et al, Pediatr Surg Int. 2011;27:35-8.

5. Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. Aosaki T, Nishimura K, et

al. Geriatr Gerontol Int. 2010 :S148-57.

6. The benefit of stay sutures during thoracoscopic esophagoesophagostomy in patients with esophageal atresia: a technical report. Shimotakahara A, Nishimura K, et al. Pediatr Surg Int. 2010, 26:443-6.

7. 渡辺朝香, 工藤 治, 西村欣也, 他: 新生児, 乳児の肥厚性幽門狭窄症の麻酔管理におけるレミフェンタニル併用時の麻酔薬投与量, 抜管時間の検討, 日本臨床麻酔学会誌, Vol, 31, 5411-5412, 2011.

8. 西村欣也, 工藤 治, 渡辺浅香, 他: MEPモニタリングと側彎症に対する周術期管理. 臨床麻酔, 35:81-87, 2011.

9. 工藤 治, 西村欣也, 稲田英一: 脳内神経ネットワークからみた吸入麻酔薬の作用機序の解析. 臨床麻酔, 2012.

[学会発表] (計6件)

Ando N, Nishimura K, et al: Influence of Sevoflurane on tonic GABAergic inhibitions during postnatal development. Neuroscience 2012, Nagoya.

Oose Y, Nishimura K, et al: Imbalanced suppression synaptic transission onto mouse striatal projection neurons during induction of anesthesia with sevoflurane. Neuroscience 2011, Kobe.

工藤 治, 西村欣也, 稲田英一, 他: 神経ネットワークへの吸入麻酔薬の影響, 2010年5月 兵庫県神戸市, 日本麻酔学会.

工藤 治, 西村欣也, 稲田英一, 他: 神経ネットワークへの吸入麻酔薬の影響, 2011年11月 石川県金沢市, 日本医療ガス学会.

工藤 治, 西村欣也, 稲田英一, 他: 神経ネットワークへの吸入麻酔薬の影響, 2011年5月 兵庫県神戸市, 日本麻酔学会.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 欣也 (NISHIMURA KINYA)

順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：80164581