

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460329

研究課題名(和文) 麻酔薬が脳皮質興奮性に及ぼす影響についての二連発感覚刺激を用いた解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of anesthetics on cerebral cortical excitability using dual somatosensory stimulations.

研究代表者

藤木 通弘 (Fujiki, Nobuhiro)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：80334928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二連発の電気刺激により頭蓋骨上から記録される体性感覚誘発電位は、麻酔深度が深い場合には、300 msの短い刺激間隔では二発目の刺激に対する誘発反応の振幅が、麻酔が浅い時と比べて有意に低下するという現象が見られる。この現象の機序を調べるために電流源密度推定法を用いて検討した。本研究の結果から、麻酔薬による皮質興奮性の低下は、全ての神経細胞に一律に引き起こされているわけではない可能性が示唆された。また、皮質のアミノ酪酸作動性介在神経の役割については、本研究からは明らかとはならなかった。今後同現象の詳細な機序についてのさらなる研究が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When we record the somatosensory evoked potentials from the skull with two consecutive electrical stimuli, the amplitude of the response to the second stimulus is significantly reduced with a short stimulation interval of 300 ms under deep anesthesia. In order to investigate the mechanism of this phenomenon, we evaluated the excitability profile of the somatosensory cortex by using current source density estimation method. From the results of this study, it was suggested that the decrease in cortical excitability by anesthesia may not be uniformly developed in all cortical neurons. In addition, the role of cortical gamma aminobutyric acid mediating suppression of the cortical activity was not clarified from this study. Further research will be needed to elucidate the mechanism of this phenomenon.

研究分野：生理学、睡眠医学

キーワード：麻酔深度 体性感覚誘発電位 電流源密度推定法

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、麻酔の深さと二連発刺激による体性感覚誘発電位の振幅比とに相関が見られる現象を報告してきた。具体的には、四肢末梢に二連発の電気刺激を与えて頭蓋骨上から記録した体性感覚誘発電位は、麻酔深度が浅いときには刺激感覚が1秒でも300msでも二つの誘発電位の振幅に大きな差は見られないが、麻酔深度を深くすると300msの刺激間隔では二発目の刺激に対する誘発反応の振幅が有意に低下するという現象である。この全く新しい発見は、客観的な麻酔深度の新しい評価方法の開発につながると同時に、麻酔薬によって大脳皮質の神経細胞の興奮性が変化する事象に対して生理学的な理解を深めることにもつながると考えられる。

この現象を説明する仮説として、体性感覚誘発電位を誘発する刺激が与えられた場合、麻酔深度が深い場合には、大脳皮質に局所するガンマアミノ酪酸 (GABA) 作働性介在ニューロンから放出された GABA の影響が消失しにくくなる何らかの機序が働くために、刺激間隔が短い場合には、皮質ニューロンの興奮性が一様に低下し、二発目の刺激に対しては十分に反応しないという機序が想定されるが、現在のところ本現象の機序は全く明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的はこの現象の機序を明らかにすることであり、次の二つの検討を行うこととする。一つ目はこの現象が大脳皮質層のどの部位で発生しているのかを、電流源密度推定法によって検討することである。二つ目は、刺激間隔が短い場合には皮質局所における GABA 濃度が上昇している可能性について、マイクロダイアリーシス法を用いて検討することである。

3. 研究の方法

(1) 電流源密度推定法による検討

実験には正常ラット (Sprague-Dawley) を用いた ($n = 3$)。セボフルラン麻酔およびベンチレータによる呼吸管理下で、刺激針電極をラットの下肢末端に刺入設置した。ラットを脳定位固定装置に固定し、刺激と対側の体性感覚野上の頭蓋骨にドリルで穴を開け硬膜を切開し、電流源密度推定法のための多チャンネル電極であるミシガンプローブ

(A1x16-3mm-50-703-A16) を、電極マニピュレータを用いて、下肢の体性感覚野皮質に刺入した。刺入部位はブレグマを基準点として $AP = -2.0$, $ML = 2.5$ の位置で、電極先端の位置は皮質表面から2mmとした (図1)。

ミシガンプローブからの記録は、プレアンプ (μ PA16, MultiChannelSystem 社) を介し、生体アンプ (AB621G, 日本光電) にて増幅し、AD コンバータ (NI9215, ナショナルインスツルメンツ) を通じてコンピュータ

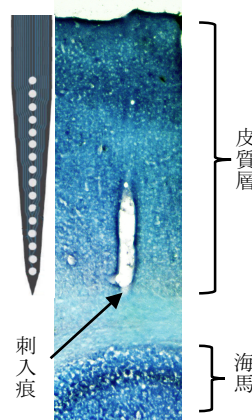


図1: 左はミシガンプローブの模式図で右は本実験で用いたラットの灌流固定脳組織。脳組織の皮質層の最深部に電極の先端が位置するように刺入してある。なお、アンプのチャンネル数の制限のため、16ある電極のうち、一つおきの合計8個のみ、本実験では使用した。

ーに記録した。電気刺激のタイミングの制御及び、誘発電位記録のためのソフトウェアは LabVIEW (ナショナルインスツルメンツ) を用いて作成した。なお、今回用いた二連発の電気刺激のパターンは、二連発の刺激間隔は300msとし、二発目の刺激から次の一発目の刺激までの間隔を1秒とした。また、刺激は電気刺激装置 (KS-402U, ユニークメディカル) を用いて、末梢で筋収縮が観察され始める程度の強度 (0.6mA) で行った。

解析は、刺激間隔が300msの刺激によって誘発される体性感覚誘発電位の一発目、二発目の刺激に対する反応を、麻酔深度が1最小肺胞濃度 (MAC) の場合と1.5MACの場合とで、それぞれ200回平均加算したデータを用い、国際的にも用いられている MATLAB ベースのツールボックスである CSDplotter

(<http://web.eng.fiu.edu/~jrrieradi/CSDPlotter/CSDplotter-0.1.1>) を用いて電流源密度を推定した。推定には10分刺激を行った最後の260秒の区間を用いて200回の反応を平均加算したものをを用いた。

なお、すべての記録を終了した後、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定を行い、脳を摘出した。取り出した脳を20%スクロースに浸透させた後、マイクロトーム (REM-710, 大和光機工業) を用いて厚さ30 μ mのスライス切片を作成した。その後、1%クレシルバイオレット溶液にてニッスル染色を行い、記録電極刺入部位の確認を行った (図1)。

(2) マイクロダイアリーシスによる体性感覚野の GABA 濃度の測定

実験1)と同様、正常SDラットを用いた。セボフルラン麻酔およびベンチレータによる呼吸管理下で、ラットを脳定位固定装置に固定し、両側の体性感覚野上の頭蓋骨にドリルで穴を開け、硬膜を切開してマイクロダイアリーシスプローブ (D-I-6-0, エイコム) を、マニピュレータを用いて設置した。マイクロダイアリーシスプローブは、リンゲル液 (1L純水中、NaCl 8.6g, KCl 0.3g, CaCl₂ 0.25g) をシリンジポンプ (Legato

101, kdScientific 社) を用いて、 $2\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で灌流させた。

1MAC の麻酔深度と、1.5MAC の麻酔深度において、上肢の末端に刺入した針電極を用い、末梢で筋収縮が観察され始める程度の強度 (0.6mA) で、刺激なし、刺激間隔 300ms 、刺激間隔 1s の三つの条件で 15 分間刺激しながら灌流液を $30\mu\text{l}$ 回収した。回収にはマイクロフラクションコレクタ (EFC-96、エイコム) を用いた。サンプル中の GABA 濃度の拘束液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定は株式会社 SRL に依頼した。

4. 研究成果

(1) 実験結果について

① 電流源密度推定法による検討

1MAC の場合と 1.5MAC の場合とで、それぞれ 200 回平均加算したデータを図 2 に示す。1MAC では一発目刺激に対する反応 (R1) と二発目刺激に対する反応 (R2) は、 8 チャンネル全ての記録それぞれで、ほぼ同じ大きさで認められた (図 2 A)。

図 2 A

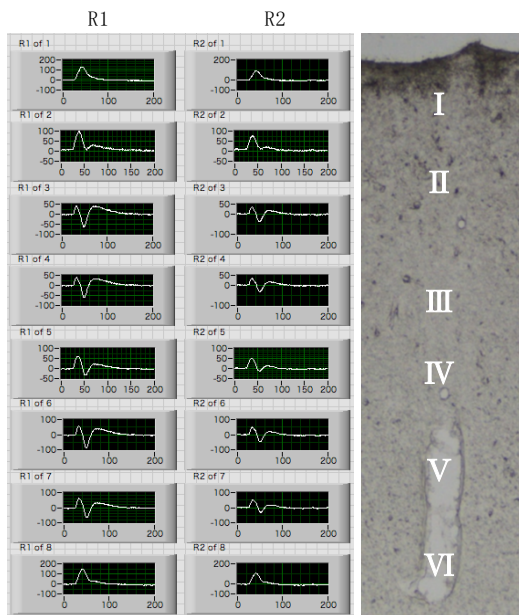
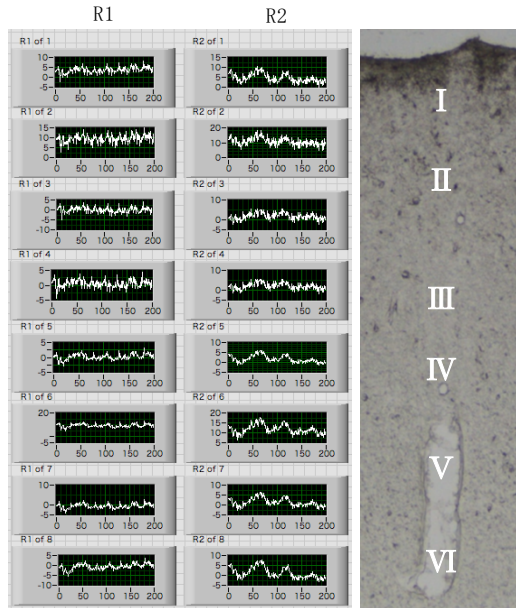


図 2 : A) 1MAC の麻酔深度において、ミシガンブローブから得られた大脳皮質感覚野における体性感覚誘発電位記録の典型例。R1 は一発目刺激に対する反応。R2 は一発目刺激から 300ms 後の二発目刺激に対する反応。1MAC では R1 と R2 は、全ての電極でほぼ同様に得られた記録の典型例。B) 1.5MAC の麻酔深度では、R1、R2 とも全ての電極において反応が得られず、記録はノイズのみとなっている。記録の右側には記録位置に相当すると考えられる皮質構組織と層構造を示した。波形記録の縦軸の単位はマイクロボルトで、図の上向きがプラスの極性を示す。横軸は時間で単位は ms である。

しかし 1.5MAC と麻酔深度を深くした場合には、反応が消失し記録はノイズのみとなった (図 2 B)。

図 2 B



反応が記録された 1MAC での R1 と R2 の反応について CSDplotter を用いて電流源密度を推定した結果を図 3 に示す。

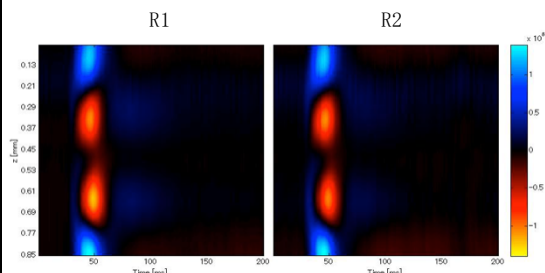


図 3 : 1MAC の麻酔深度における R1 と R2 の誘発電位の電流源密度推定法による解析結果の典型例。R1 は一発目刺激に対する反応。R2 は一発目刺激から 300ms 後の二発目刺激に対する反応。赤色が電流の吸い込み (sink) で青色が電流の湧き出し (source) に相当する。

1MAC では R1 と R2 の電流源密度のプロファイルに大きな差は認めず、1MAC の麻酔深度では誘発電位の形成において、 300ms の刺激間隔では体性感覚野皮質層の興奮性に差は見られないことが明らかとなった。今後詳細な組織学的な検討が必要ではあるが、今回の所見からは、まず皮質第 II 層および第 VI 層近傍にまず電流の湧き出しが認められ、その直後に III 層および第 V 層において電流の吸い込みが認められるものと考えられた。

一方、1.5MAC では、誘発電位が記録されなかったため、電流源密度を算出することが不可能であった。

② マイクロダイアリースによる体性感覚野の GABA 濃度の測定

今回、諸般の事情から GABA の HPLC による測定を SRL に依頼して行った。残念ながら全てのサンプルで測定限界以下という結果であり、有用な知見が得られなかった。

(2) 結果の考察と今後の展望について

①電流源密度推定法による検討

頭蓋骨上から体性感覚誘発電位を記録した場合には、1.5MAC の麻酔深度でも記録が消失することはなく、R2 の振幅が R1 に比べて有意に小さくなるという現象は明らかであるにもかかわらず、今回の実験では記録を行った 3 例とも 1.5MAC においては刺激に対する反応の消失が認められた。

この結果からは、麻酔の影響は皮質の神経細胞において一様に現れるものであるとは考えにくいことが示唆される。今回記録した皮質領域では全ての記録において 1.5MAC の深い麻酔条件下で興奮性が失われてしまっていたが、記録ができていない皮質領域において、興奮性が完全には失われてはいない部分も存在していた可能性が考えられる。この場合、頭蓋骨からはその総和として誘発電位が記録されるために、1.5MAC の麻酔深度でも完全に反応が見られなくなるということはない。この仮説は記録部位数をさらに増やすことによって確認ができると考えられる。

② マイクロダイアリースによる体性感覚野の GABA 濃度の測定

今回探索してきた現象の機序として、麻酔深度が深くなった際の皮質ニューロンの興奮性の低下が一様に起こっているものでないとすると、皮質局所における GABA の濃度にも明らかな変化が得られない可能性も考えられる。いずれにしても、電流源密度推定法の実験を継続し、この現象の機序を明らかに確認した後、GABA の役割についても検討したいと考えている。その場合、検出感度が低かったことについては、外注で測定するのではなく、本大学内で GABA を測定するための HPLC システムを構築し、測定系全体として、検出感度を高める工夫が必要であると考えているところである。

今回の助成期間では、麻酔の深さと二連発刺激による体性感覚誘発電位の振幅比とに相関が見られる現象のメカニズムの解明には残念ながら至らなかったが、今後も本実験を継続し、本現象の機序を明らかにしていきたいと考えている。

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〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤木 通弘 (FUJIKI, Nobuhiro)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授
研究者番号：80334928

(2) 研究分担者

藤原 広明 (FUJIHARA, Hiroaki)

産業医科大学・産業生態科学研究所・助教
研究者番号：10369051