

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462331

研究課題名(和文) 脊髄前角運動ニューロンにおける麻酔薬の作用と神経保護効果の検討

研究課題名(英文) Effects and neuroprotection of the anesthetic agent in the spinal ventral horn neuron

研究代表者

本田 博之 (HONDA, Hiroyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：20535174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬の脊髄における不動化機序の解明は麻酔管理を行う上で重要であるが、前角ニューロンにおけるその機序は明らかではない。さらに、術中の脊髄虚血に対する麻酔薬の保護作用も不明である。本研究では麻酔薬の前角ニューロンにおける作用機序を解析した。

前角ニューロンにおいて、亜酸化窒素はグルタミン酸による興奮性シナプス後電流を抑制させた。その一方、揮発性麻酔薬はガンマアミノ酪酸による抑制性シナプス後電流を増強させた。さらに、脊髄に虚血負荷を与えた結果、亜酸化窒素と揮発性麻酔薬とも細胞死に至るまでの時間を延長させた。これにより麻酔薬が前角ニューロンにおいて虚血耐性作用を有することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The elucidation of the immobilization mechanisms of the anesthetic agent in the spinal cord is important. However, the mechanisms in the ventral horn neurons is not clear. Furthermore, the protection mechanisms of the anesthetic agent for spinal cord ischemia is unknown. Therefore, in this study, we analyzed the mechanisms of the anesthetic agent in the ventral horn neurons. Nitrous oxide inhibited the glutamatergic excitatory postsynaptic currents in the ventral horn neurons. In contrast, the volatile anesthetics increased the gamma-aminobutyric acid mediated inhibitory postsynaptic currents. Furthermore, both of nitrous oxide and the volatile anesthetics extended the time before leading to cell death during the spinal cord ischemia. Thereby, we found that these anesthetic agents had ischemia-resistant effects in ventral horn neurons.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 脊髄前角ニューロン 神経保護

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬は中枢神経系に作用し、意識消失、鎮痛、不動化などの麻酔要素からなる複合現象をもたらすが、どのようにしてそのような複合現象を発揮するのか未だ明確な答えは出されていない。近年の研究成果により、麻酔薬は神経伝達物質依存性のイオンチャンネルに作用することが明らかになってきた。申請者らは *in vitro* 脊髄スライス標本を用いて、亜酸化窒素 (Georgiev SK et al. Pain 2008; Georgiev SK et al. Eur J Pain 2010)、キセノン (Georgiev SK et al. Mol Pain 2010)、イソフルラン (Wakai A, et al. Anesthesiology 2005)の後角ニューロンでの作用機序を解析してきた。その結果、鎮痛に關与する脊髄後角ニューロンでのそれぞれの麻酔薬のターゲットとなるイオンチャンネルが異なることを見出した。

しかし、全身麻酔薬の不動化に關与する脊髄前角ニューロンでの報告はほとんどない。申請者らは脊髄前角運動ニューロンにおける μ オピオイド作動薬やキセノンの作用機序を *in vitro* 脊髄標本を用いて解明してきた (Honda H et al. Anesth Analg 2012; Yamamoto T et al. Anesthesiology 2012)。しかし、亜酸化窒素および臨床で用いているセボフルラン、デスフルランの作用は明らかにされていない。

ところで、大血管手術や脊椎手術などは常に脊髄虚血の危険性を伴い、患者の Quality of life を著しく損なうが、満足できる治療法や予防法は確立していない。これまで、揮発性麻酔薬の脳神経細胞における神経保護作用や心筋細胞における虚血保護作用機序の一部が解明されてきた。しかし、亜酸化窒素や揮発性麻酔薬が同様に脊髄虚血に対して保護作用を有するかどうかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では麻酔薬の前角運動ニューロンにおける作用機序を *in vitro* 脊髄スライス標本を用いて、電気生理学的に解析する。加えて、麻酔薬の脊髄虚血による前角運動ニューロンの保護作用の有無を電気生理学的解析に検討し、その作用機序も明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラットを麻酔し、幼若 Wistar 系ラット (8~14 日齢) にウレタン麻酔 (1.5 g/kg、腹腔内投与) を行い、椎弓切除ののち腰仙部脊髄を切り出し、冷却人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid: ACSF) に浸した。硬膜、くも膜、および軟膜を除去したのち、脊髄を寒天ブロックに移し、マイクロスライサーを用いて厚さ約 500 μm の脊髄横断スライス標本を作成する。切り出した脊髄横断スライスを記録用チャンバーに移し、固定用グリッドで固定後、95%酸素、5%二酸化炭素の混合ガスで飽和し、36 $^{\circ}\text{C}$ に加温した ACSF で 5 ml/分の速度で灌流する。赤外線システムを備えた顕微鏡を用いて、テレビモニター下に脊髄前角ニューロン (第 IX 層) からホールセルパッチクランプ記録を行う (図 1)。記録用電極には先端電極抵抗 4~8M Ω の微小ガラス電極を用いた。得られた結果はパッチクランプ用増幅器により増幅し、データ解析用ソフトを用いて解析する (図 2)。

図 1: 脊髄スライスと脊髄前角ニューロン

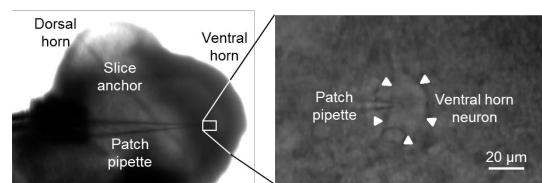
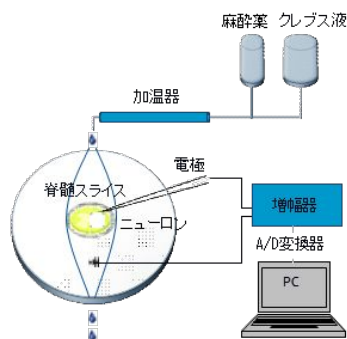


図 2：パッチクランプ記録の実験セット

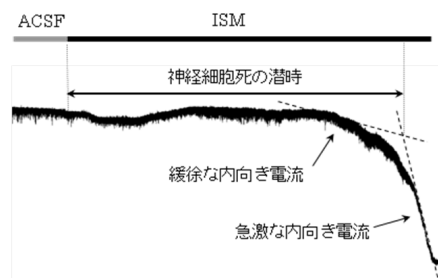


まず、脊髄前角運動ニューロンにおける、グルタミン酸受容体を介した興奮性伝達とガンマアミノ酪酸・グリシン受容体を介した抑制性伝達に対する麻酔薬の作用を検討する。麻酔薬の灌流は50%亜酸化窒素と、揮発性麻酔薬のセボフルラン、デスフルラン1MACをバブリングし溶解したACSFで脊髄スライス標本を灌流した投与する。保持電位は興奮性シナプス後電流を観察する時は-70 mV、抑制性シナプス後電流を観察する時は0 mVとした。

(2) ACSFに含まれる酸素とグルコースをそれぞれ窒素とスクロースに置換したACSF 模倣液で脊髄スライス標本を灌流し虚血負荷を与える。虚血開始から細胞死に至るまでの時間 (潜時)を測定する。潜時は虚血開始から虚血によって誘起される連続した二種類の内向き電流の傾きの交点までの時間とする (図 3)。次いで、50%亜酸化窒素と、揮発性麻酔薬のセボフルラン、デスフルラン 1MAC をバブリングし溶解した ACSF で脊髄スライス標本を灌流し、これらの麻酔薬の存在下で同様に虚血負荷を与え、虚血負荷開始から細胞死に至るまでの潜時など上記の項目について記録し、麻酔薬非存在下での記録データと比較する。これにより麻酔薬が前角運動ニューロンにおいて虚血耐性作用を有するかどうかを検討する。続

いて、これらの麻酔薬が脊髄虚血に対して神経保護的に作用するかを解析する。

図 3：虚血開始から細胞死に至るまでの時間 (潜時)の測定



4. 研究成果

保持膜電位を -70 mV に固定して自発性興奮性シナプス後電流を、0 mV に膜電位固定して抑制性シナプス後電流が記録できた。前角ニューロンにおける亜酸化窒素、揮発性麻酔薬の作用機序の解析を行った結果、亜酸化窒素はグルタミン酸による興奮性シナプス後電流を抑制させた。その一方、揮発性麻酔薬のセボフルランやデスフルランはガンマアミノ酪酸による抑制性シナプス後電流を増強させた。

さらに、人工脳脊髄液の酸素とグルコースをそれぞれ窒素とスクロースに置換した ACSF 模倣液で脊髄スライス標本を灌流し虚血負荷を与えた。虚血開始から細胞死に至るまでの時間を測定すると、亜酸化窒素と揮発性麻酔薬ともこの時間を延長させた。これにより麻酔薬が前角運動ニューロンにおいて虚血耐性作用を有することが明らかになった。

これまでに活性酸素の一つである過酸化水素の脊髄前角シナプス伝達への作用機序をホールセルパッチクランプ法により解析した報告がある。過酸化水素投与により、興奮性シナプス後電流の頻度はコントロールに対して増加したが、その後は減少に転じた。その頻度増加は N 型

電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害薬、リアノジン受容体阻害薬、イノシトール3リン酸受容体阻害薬により抑制されたことより、過酸化水素は興奮性シナプス前終末に直接作用し、N型 Ca^{2+} チャンネル、リアノジン受容体、イノシトール3リン酸受容体の活性化を介してグルタミン酸放出を増強させることが示されたと報告されている。亜酸化窒素と揮発性麻酔薬が虚血開始から細胞死に至るまでの時間を延長させた機序は定かではないが、虚血によって産生された過酸化水素によるグルタミン酸放出増強を抑えることが関与している可能性はある。

今回の研究成果により、亜酸化窒素と揮発性麻酔薬の麻酔薬による前角運動ニューロンに対する興奮性または抑制性シナプス後電流に対する作用機序は異なるが、どちらの麻酔薬も虚血耐性作用を有することがわかった。

5 . 主な発表論文等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田 博之 (HONDA, Hiroyuki)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：20535174

(2)研究分担者

河野 達郎 (KOHNO, Tatsuro)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：00313536