

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791084

研究課題名 (和文) 麻酔薬の内因性睡眠経路に及ぼす影響

研究課題名 (英文) Effects of anesthetics on the endogenous sleep pathway

研究代表者

與那覇 哲 (YONAHA TETSU)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70468023

研究成果の概要 (和文) : プロポフォール (P) あるいは muscimol を投与すると GABA_A 受容体を介して TMN (乳頭結節核) 細胞の膜電位は低下。P、muscimol、DEX を投与すると脳波上、高振幅徐波が認められ、筋電図上体動も認められなくなった。P およびセボフルランは TMN 膜電位を低下。P の過分極作用は Cl⁻ 電流による。青斑核 (LC) の膜電位は P によって低下し、これも Cl⁻ 電流。α₂ 受容体作動薬であるデクスメドトミジン (DEX) を LC の細胞に投与すると膜電位は低下し、膜電流は外向きで α₂ 受容体遮断薬の tertiapin を前投与すると抑制された。DEX は α₂ 受容体を介して K 電流を惹起することで膜電位を低下。P を VLPO に投与すると GABA_A 受容体を介して Cl⁻ 電流を惹起し、過分極作用を示した。その反応は LC や TMN よりも大きかった。

研究成果の概要 (英文) : Propofol and muscimol inhibited TMN neuron activity mediated by GABA_A-receptor. Dexmedetomidine (DEX) inhibited TMN neuronal activity mediated by α₂-receptor. P, muscimol, and DEX induced high-amplitude and slow wave on the EEG, and immobilization on the EMG. Sevoflurane decreased firing frequency of TMN. DEX decreased the neuronal firing rate of LC neuron, however, little hyperpolarization and only a small reduction of the input resistance of the neurons were seen. Higher concentrations of dexmedetomidine resulted not only in a greater inhibition of firing but also in the hyperpolarization of the membrane and a decreased input resistance. The α₂-adrenergic receptor antagonist, yohimbine (100 nM), partially blocked the dexmedetomidine-induced hyperpolarization. The application of yohimbine produced a parallel, dose-related shift to the right of the dexmedetomidine dose-response curve. The hyperpolarizing effect of DEX was antagonized by tertiapin. DEX decreased membrane potential mediated by activation of G-protein coupled inwardly rectified K channels (GIRK). The hyperpolarizing effect of P on the VLPO was larger than in LC and TMN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：麻酔薬、睡眠経路、脳神経核、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景：麻酔薬(吸入麻酔薬および静脈麻酔薬)のもたらす鎮静・催眠作用は、一部内因性睡眠経路を介するといわれている。例えば麻酔薬の鎮静作用は、生理的な睡眠経路の GABA_A 受容体を介すること (Nat Neurosci 2002;979-84)。プロポフォールおよびイソフルランの麻酔時間は睡眠妨害によって延長する (Anesthesiology 2002;97:906-11)。Propofol による鎮静中に生理的睡眠が生じているといわれている (Anesthesiology 2004;100:1419-26)。これらのメカニズムについては明らかではない。内因性睡眠経路のうち特に、後部視床下部の TMN (tuberomammillary nucleus; 乳頭結節核)、腹外側視索前核 (ventrolateral preoptic nucleus; VLPO) や脳幹部の青斑核 (locus coeruleus; LC) が関与しているといわれている。これらの脳神経核への麻酔薬の影響については明らかでない。
2. 研究の目的：麻酔薬の作用機序の一部を明らかにするために、睡眠調節機構で重要な役割を担う大脳皮質や脳神経核 (乳頭結節核; TMN、腹外側視索前核; VLPO や脳幹部の青斑核; LC) の活動に及ぼす麻酔薬の影響を *in vivo* ならびに *in vitro* の実験で調べる。
3. 研究の方法 *in vivo* の実験法：動物は雄のウイスターラット (250-300 g) を用いる。意識下でラットに麻酔薬を投与して実験を施行する。吸入麻酔薬 (セボフルラン) あるいは静脈麻酔薬 (プロポフォール、muscimol、デクスメデトミジン、ケタミン) による全身麻酔時の脳波、TMN (乳頭結節核)、VLPO (腹外側視索前核) および LC (青斑核) の単一活動電位、筋電図変化および循環動態の変化として心拍数と血圧を記録する。最初にネンブタール麻酔下 (50 mg/kg) 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。次にラットの頭部を脳定位固定装置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。筋電図は板状筋か

ら記録するために頸背部に電極を留置する。次に単一活動電位の記録電極を留置する。この実験で最も困難で時間を要するのは TMN、VLPO、LC の single unit activity (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) で多層コートしたニクロム線を作製し、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 50 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。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ガイド管の中を介して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。

In vitro の実験法：静脈麻酔薬 (プロポフォール、muscimol、デクスメデトミジン、ケタミン) あるいは吸入麻酔薬 (セボフルラン) の TMN、VLPO および LC の膜電位および膜電流に及ぼす影響とそのメカニズムを調べる。動物は生後 11-20 日のウイスターラットを用いてイソフルラン吸入麻酔下で断頭する。採脳後、TMN、VLPO あるいは LC を含む 250 μ m のスライス切片を作製する (Microslicer, TK1500; 現有)。作製したスライス切片は、酸素化した人工脳脊髄液中 (aCSF) に 2-3 時間放置して室温まで温めた後、aCSF を持続灌流したチェンバー内に固定し、防振台 (M1210; 現有) の上に設置した顕微鏡下 (AQUA-C; HAMAMATSU) に CCD カメラ (ORCA-3CCD; 現有) を介してモニター上 (I・O DATA; 現有) で観察しながら細胞膜の電気活動をホールセルパッチクランプ法で記録する。各薬物はチェンバー内に灌流投与する。プラー (ModelPB-7 Narishige; 現有) でガラス電極 (芯入りガラス管; Narishige、電極フィルター; Milex) を作製する。顕微鏡下にマニピュレータ (Narishige; 現有) で操作してガラス電極先端を細胞表面に密着させ、ホールセル状態になったら、膜電流固定モード (アンプ; Axopatch200B 現有) で膜電位を測定す

る。静脈麻酔薬は、aCSF 中に溶解してスライステンバー内に灌流投与する。吸入麻酔薬は、aCSF 中に酸素とともに気化させて bubbling して灌流投与する。この実験でも各麻酔薬を投与濃度で3群に分ける。膜電位に変化を生じ、用量依存性を認めたら膜電流に及ぼす影響を調べ、変化を生じる原因となるイオン(Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- など)を調べる。イオンが判明したら、想定される受容体の拮抗薬(gabazine, yohimbine など)を使って反応を介する受容体を調べる。

4. 研究成果 意識下でラットの静脈内にプロポフォール (P) を投与すると後部視床下部の乳頭結節核 (TMN) の活動電位の頻度および振幅は減少した。その反応は、濃度依存性(1mg/kg/hr $25 \pm 14\%$, 2mg/kg/hr $31 \pm 25\%$, 3mg/kg/hr $41 \pm 12\%$)であり、GABA_A受容体拮抗薬(GABA_A antagonist)の同時投与によって遮断された。P を投与すると脳波上最初は興奮期を示したが、徐々に高振幅徐波がとなった。筋電図上も麻酔中は、体動が少なくなるのが認められた。GABA 受容体作動薬である muscimol (1 μM) を投与すると TMN 細胞の発火活動の発火頻度は有意に減少し ($37 \pm 12\%$)、活動電位の膜電位の低下 ($10.2 \pm 3.5 \text{ mV}$) を認めた。その作用は GABA 受容体拮抗薬(ピククリン)の同時投与で有意に抑制された。これより P や muscimol の作用は GABA_A 受容体を介していることが明らかになった。P や muscimol 投与によって脳波は高振幅徐波となり体動の減少も認めた。次に α_2 受容体作用薬のデクスメデトミジン (DEX) を投与した。DEX を静脈内投与すると TMN 細胞の発火活動は有意に、用量依存性に抑制された (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ $5 \pm 14\%$, 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ $21 \pm 31\%$, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ $45 \pm 20\%$)。DEX を投与すると徐々に脳波上、高振幅徐波が認められ、筋電図上体動も認められなくなった。DEX 投与前に α_2 受容体拮抗薬であるヨヒンビン投与すると DEX の作用は有意に抑制された。これより DEX の作用は α_2 受容体を介していることが明らかになった。各麻酔から覚醒時には、TMN の発火頻度は徐々に増大し、脳波上も低振幅速波となり、筋電図上も体動の増加を認めた。次に吸入麻酔薬であるセボフルランを投与した。セボフルランをラットのケージ内に投与すると入眠するまでは興奮期を認め、体動も増

加したが、いったん鎮静されると濃度依存性 (1%; $7 \pm 13\%$, 2%; $17 \pm 28\%$, 3%; $52 \pm 32\%$) に TMN 細胞の発火活動は抑制され、発火頻度の低下を認めた。次に VLPO 細胞での発火活動記録を試みたが、明らかな発火活動記録はできなかった。次に細胞レベルの反応を調べた (in vitro)。後部視床下部の TMN に、プロポフォール (P)、muscimol (M)、デクスメデトミジン (DEX) を投与した。P を投与すると濃度依存性 ($10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ M}$) に下向き電流を生じた。その惹起電流の平衡電位は -70 mV で Cl^- 電流と予想された。同様に GABA を灌流すると下向き電流が生じ平衡電位は -70 mV 付近だった。P の惹起電流は、GABA_A 受容体拮抗薬である GABA_A antagonist を同時投与によって遮断された。P は GABA 受容体を介して Cl^- 電流を生じることが明らかになった。M を TMN に投与すると濃度依存性 ($10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ M}$) に下向き電流を生じた。その惹起電流の平衡電位は -70 mV で Cl^- 電流と予想された。M の惹起電流は、GABA_A 受容体拮抗薬である GABA_A antagonist を同時投与によって遮断された。P と M の惹起電流の振幅の大きさを比較すると有意に M の惹起電流の振幅が大きかった。P と M は GABA_A 受容体を介して Cl^- 電流を惹起して膜の過分極作用をもたらした、細胞活動を抑制することが明らかになった。DEX を TMN に投与すると明らかな反応は認めなかった。次に P ($10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ M}$) を青斑核 (LC) に投与した。膜電位は濃度依存性に低下し、この作用は GABA_A antagonist (10^{-3} M) の同時灌流によって抑制された。この過分極作用も GABA_A 受容体を介した Cl^- 電流の誘導によるものであった。同様に次に α_2 受容体作動薬である DEX を LC の細胞に灌流投与 ($10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ M}$) した。膜電位は濃度依存性に低下をしめし、膜電流は外向きの電流が生じた。それは塩化バリウム投与に抑制された。 α_2 受容体遮断薬の tertiapin を前投与するとその電流は抑制された。DEX 投与により惹起される電流の平衡電位は $-90 \pm 10.3 \text{ mV}$ で K の平衡電位に近似した。細胞外液の K 濃度を変化 (4.5 mM から 20 mM) させると対応する K の平衡電位となった。これより DEX は α_2 受容体を介して K 電流を惹起することで膜電位を下げるのが明らかになった。DEX は α_2 受容体を介して G 蛋白質共役型内向き整流性 K 電流 (GIRK) を惹起することで膜の過分極作用をもたらした、細胞活動を抑制した。同

様に DEX を TMN の細胞に投与 ($10^{-6} \sim 10^{-3}$ M) すると、 10^{-3} M 投与群でのみ有意な膜電位の低下 (5.2 ± 1.6 mV) を認め、LC に投与した時と比較して反応が有意に小さかった。次に NMDA 受容体遮断薬であるケタミンを LC 投与すると用量依存性に脱分極反応を示した。ケタミンによる内向き電流は Na^+ イオンによるものだった。DEX およびケタミンを腹外側視索前核 (VLPO) に投与しても反応を認めなかったが、P を投与すると GABA 受容体を介して Cl^- 電流を惹起し、過分極作用を示した。その反応は LC や TMN よりも大きかった。脳神経核によって反応する受容体が異なることが示唆された。つまり VLPO および TMN における反応は GABA 受容体が関与し、LC の反応は $\alpha 2$ 受容体が関与することが示唆された。

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 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)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

與那覇 哲 (YONAHA TETSU)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号 : 70468023

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :