

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10082

研究課題名（和文）吸入麻酔薬による大脳皮質局所神経回路修飾様式の網羅的解析

研究課題名（英文）Effects on inhalational anesthetics on unitary inhibitory postsynaptic currents in the rat insular cortex

研究代表者

小柳 裕子 (KOYANAGI, Yuko)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：20609771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：VGAT-Venusラットを用いて大脳皮質急性脳スライス標本を作製し、単一抑制性シナプス伝達（uIPSCs）に対するイソフルランの修飾作用を検討した。その結果、イソフルランはuIPSCsの振幅、半値幅、およびcharge transferを増大させる傾向が観察された。さらに2発目に対する1発目のuIPSCの振幅比であるpaired-pulse ratioは増大する傾向を認めた。これらの結果から、イソフルランは抑制性シナプス前細胞に作用してシナプス終末からのGABAの放出を抑制する一方、シナプス後膜に存在するGABA(A)受容体の作用を増強する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後はシナプス前細胞および後細胞の種類の違いによるイソフルランのuIPSCs修飾作用の強度の違いを調べ、これまでに我々が示してきた静脈麻酔薬プロポフォールによるuIPSCs修飾様式と比較することで、全身麻酔薬には共通の類似したシナプス伝達修飾作用があり麻酔作用を発揮するのか、それとも異なるシナプス伝達修飾作用の結果として類似した麻酔作用を発揮するのかがわかり、意識を形成する脳機能の解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We examined the modulatory effects of isoflurane on unitary inhibitory postsynaptic currents (uIPSCs) in acute brain slice preparations of rat insular cortex. Isoflurane tended to increase the amplitude, half-width, and charge transfer of the uIPSCs. Furthermore, the paired-pulse ratio, the amplitude ratio of the first uIPSCs to the second uIPSCs, tended to be increased by isoflurane. These results suggest that isoflurane inhibits the release of GABA from inhibitory synaptic terminals while potentiating the GABA(A) receptors in the postsynaptic membrane.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：イソフルラン 大脳皮質 抑制性シナプス伝達 ホールセル・パッチクランプ法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬の作用機序、すなわち「どのようにして意識は全身麻酔薬により可逆的に消失するのか」についてこれまでに様々な研究が行われてきた。細胞膜である脂質二重層がその主要ターゲットと考える Meyer-Overton 法則は現在否定されつつあり、全身麻酔薬は種々の電位依存性およびリガンド依存性イオンチャンネルに作用することでその効果を発現すると考えられている (Herold et al., 2017; Franks and Lieb, 1978)。これらのイオンチャンネルに対する作用の結果として、各脳領域内でのニューロンの活動が変化し、別領域への出力が変化することが考えられる。このことは脳波の変化としてマクロの現象がとらえられている (Walsh et al., 2018; Purdon et al., 2015; Vijayan et al., 2013) が、どのように脳領域内の局所神経回路がシナプスレベルで変化するかについてはいまだ不明である。

大脳皮質は高次中枢であり、視床や海馬、扁桃体など様々な領域から入力を受け、感覚情報や思考・判断、および記憶など種々の情報の最終的な処理・統合を行う部位と考えられている。大別して興奮性ニューロンと抑制性ニューロンから構成されており、これらのニューロンが互いにシナプスを形成し、皮質に入力した情報を局所神経回路内で処理し、下位中枢へ出力を行っている。全身麻酔薬の大脳皮質における局所神経回路レベルでの作用メカニズムとして、以下の2通りの仮説が考えられる。

- (1) 麻酔薬は神経細胞の活動を一律に変化させ、局所神経回路内でのニューロン活動バランスは変化させずに出力を変化させる。
- (2) 麻酔薬は神経細胞の種類により異なる作用を示し、局所神経回路におけるニューロン活動バランスを変化させて情報処理機構を変化させることで出力を変化させる。

申請者はこれまでに、静脈麻酔薬プロポフォール作用機序についての研究を行ってきた。その結果、プロポフォールは大脳皮質において、GABA(A)受容体を介して興奮性ニューロンを抑制性ニューロンと比較して有意に強力に抑制すること、また抑制性ニューロンのサブタイプにより抑制の強度が異なることを解明した (Kaneko et al., 2016; Koyanagi et al., 2014)。これらの結果は先述の仮説(2)を支持している。一方で吸入麻酔薬に関しては、局所神経回路をどのように修飾するかはいまだ解明されていない。吸入麻酔薬と静脈麻酔薬では受容体・チャンネルレベルでの作用ターゲットが異なり、また *in vivo* レベルで脳波の変化パターンも異なるため、これらの中間に位置するシナプスレベルにおいても異なる局所神経回路調節を行っていると考えられるが、その詳細は不明である。

吸入麻酔薬の作用機序は、分子レベルから細胞・シナプスレベル、さらに組織・個体レベルと様々な視点での研究が行われている。吸入麻酔薬の作用の特徴として、そのターゲットが静脈麻酔薬と比較してより多岐にわたることが挙げられる。例として、吸入麻酔薬イソフルランは GABA(A)受容体の作用を増強するだけでなく、ニコチン型アセチルコリン受容体および AMPA 受容体を抑制すること (Hemmings et al., 2005; Rudolph and Antkowiak 2004)、電位依存性 Na⁺チャンネルを抑制し神経伝達物質の放出を抑制すること (Zhao et al., 2019; Herold and Hemmings HC, 2012) が報告されている。これらの結果としてのシナプス伝達に対する吸入麻酔薬の作用として、ラット皮質培養細胞においてハロタンが自発性微小抑制性シナプス後電流 (mIPSCs) の振幅は変化させずに頻度を減少させる報告 (Kitamura et al., 2003) とラット海馬培養細胞においてイソフルランが mIPSC の振幅を減少させ頻度は変化させない報告 (Dai et al., 2012) が混在し、いまだ定説を得ない。

2. 研究の目的

本研究は、吸入麻酔薬の大脳皮質局所神経回路における作用を明らかにすることで、これまでに報告されている受容体・チャンネルレベルの作用と *in vivo* レベルで観察される脳波の変化 (Purdon et al., 2015) の間のブラックボックスに光を当て、吸入麻酔薬による意識消失のメカニズムの生体における本質的な解明を目指すことを目的とし、シナプスレベルでの吸入麻酔薬の作用について局所神経回路が保存された脳スライス標本を用いて網羅的に解析を行った。

3. 研究の方法

吸入麻酔薬の大脳皮質局所神経回路に対する作用を検討するために、ラット大脳皮質急性脳スライス標本作製し、種々のニューロンで構成される単一抑制性シナプス伝達 (uIPSCs) に対する修飾作用を検討した。

- (1) ラット急性脳スライス標本からのマルチ・ホールセル記録

実験には VGAT-Venus 両性ラット 17~40 日齢を使用した。通常に従い急性脳スライス標本作製し、大脳皮質において Venus 陽性である抑制性ニューロンおよび Venus 陰性である興奮性ニューロン (PN) から同時ホールセル記録を行い、抑制性ニューロン→抑制性または興奮性ニューロンのシナプス結合が存在するペアを探し出した。抑制性ニューロンは矩形脱分極パルス注入による発火特性の違いから、さらに fast-spiking 細胞 (FSN) と non-FSN に分類した。

- (2) 吸入麻酔薬の uIPSCs に対する修飾作用の網羅的検討

シナプス前細胞に相当する抑制性ニューロンに電流注入により活動電流を発生させ、シナプ

ス後細胞から uIPSCs を記録した。uIPSCs に対するイソフルランの修飾作用について、FSN→PN, FSN, non-FSN と non-FSN→PN, FSN, non-FSN の 6 種類のニューロンペアに分類し検討を行った。またイソフルランの濃度を変化させ、濃度依存的な uIPSCs 修飾作用について検討を行った。

4. 研究成果

実験開始に先立ち、スライス・パッチクランプ法において揮発性の高いイソフルランを一定の濃度で投与するため、シリンジポンプ、ガスタイトシリンジ、およびガスタイトチューブを用いた新しい灌流システムを構築した。当初はチューブポンプを用いた従来システムをコントロール群の記録時に併用する予定だったが、記録する uIPSCs の振幅がシステムを変更した際に変化する現象がみられたため、新たに構築した灌流システムをイソフルラン投与中だけでなくコントロール群にも使用することとした。またイソフルランは実験前日から灌流液である人工脳脊髄液中に飽和状態で溶解させたものを目的濃度に適宜希釈して使用した。その結果、1MAC 相当のイソフルランは uIPSCs の振幅を増大させる傾向が観察された。しかし一部の細胞で、イソフルランによる uIPSCs の増強がイソフルラン投与終了後も 15 分以上にわたって持続するあるいはさらに増強する現象が観察された。本実験では揮発性の高いイソフルランを一定の濃度で投与するため、シリンジポンプ、ガスタイトシリンジ、およびガスタイトチューブを用いた灌流システムを用いていたが、本システムを用いた際にスライスへの酸素供給が変化することで uIPSCs の振幅が変化する可能性が考えられた。そのため動物用気化器を用いて酸素と一定濃度のイソフルランを灌流液に添加させるシステムを再構築した。その結果、1, 2, および 3%イソフルランは uIPSCs の振幅を濃度依存的に増大させる傾向が観察された。また uIPSCs の半値幅および charge transfer もイソフルランにより増大する傾向が観察された。さらに 2 発目に対する 1 発目の uIPSC の振幅比である paired-pulse ratio は増大する傾向を認めた。これらのイソフルランの効果は灌流液へのイソフルラン添加を中止するとウォッシュアウトされた。これらの結果から、イソフルランはシナプス前細胞に作用してシナプス終末からの GABA の放出を抑制する一方、シナプス後膜に存在する GABA(A)受容体の作用を増強する可能性が考えられた。シナプス前細胞と後細胞の組合せの違いによるイソフルランの効果の違いは十分な例数が集まりきらず検討できなかった。

実験に使用したイソフルランの濃度を計測するため、灌流液を採取しガスクロマトグラフィーによる分析を試みた。しかし、イソフルランと溶媒である n-オクタンの弁別ができず、濃度計測は行えなかった。

参考文献

- Dai S, et al. (2012) Isoflurane enhances both fast and slow synaptic inhibition in the hippocampus at amnesic concentrations. *Anesthesiology* 116: 816-23.
- Franks NP and Lieb WR (1978) Where do general anesthetics act? *Nature* 274: 339-42.
- Hemmings HC, et al. (2005) Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci* 26: 503-10.
- Herold KF, et al. (2017) Clinical concentrations of chemically diverse general anesthetics minimally affect lipid bilayer properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 3109-14.
- Herold KF and Hemmings HC (2012) Sodium channels as targets for volatile anesthetics. *Front Pharmacol* 3: 50.
- Kaneko K et al. (2016) Propofol-induced spike firing suppression is more pronounced in pyramidal neurons than in fast-spiking neurons in the rat insular cortex. *Neuroscience* 339: 548-60.
- Kitamura A et al. (2003) Effects of halothane and propofol on excitatory and inhibitory synaptic transmission in rat cortical neurons. *JPET* 204: 162-71.
- Koyanagi Y et al. (2014) Fast-spiking cell to pyramidal cell connections are the most sensitive to propofol-induced facilitation of GABAergic currents in rat insular cortex. *Anesthesiology* 121: 68-78.
- Purdon PL et al. (2015) Clinical electroencephalography for anesthesiologists. Part 1: Background and basics signatures. *Anesthesiology* 123: 937-60.
- Rudolph U and Antkowiak B (2004) Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 5: 709-20.
- Vijayan S et al. (2013) Thalamocortical mechanisms for the anteriorization of alpha rhythms during propofol-induced unconsciousness. *J Neurosci* 33: 11070-5.
- Walsh EC et al. (2018) Age-dependent changes in the propofol-induced electroencephalogram in children with autism spectrum disorder. *Front Syst Neurosci* 12: 23.
- Zhao W et al. (2019) Isoflurane modulates hippocampal cornu ammonis pyramidal neuron excitability by inhibition of both transient and persistent sodium currents in mice. *Anesthesiology* 131: 94-104.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小柳裕子, 小林真之
2. 発表標題 プロポフォル誘発アルファ周波数帯増強の皮質内メカニズム
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会第42回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 真之 (KOBAYASHI Masayuki) (00300830)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	金子 啓介 (KANEKO Keisuke) (90906554)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	
研究協力者	梶原 美絵 (KAJIWARA Mie) (70906354)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	
研究協力者	横田 英子 (YOKOTA Eiko) (70998921)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------