

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 5月27日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592264

研究課題名（和文）プロポフォールの高次中枢，特に島皮質の神経回路に対する修飾作用の解明

研究課題名（英文）Pre- and post-synaptic cell type dependent propofol effects on GABAergic synaptic transmission in rat insular cortex.

研究代表者

大井 良之 (OI YOSHIYUKI)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：60271342

研究成果の概要（和文）：

静脈麻酔薬であるプロポフォールの脳皮質における作用の解明を目的として，ラット島皮質においてホールセル・パッチクランプ法を用いて，抑制性シナプスを形成する細胞の組み合わせに着目して，プロポフォールの単一抑制性シナプス後電流（uIPSC）に対する作用の解析を行った。その結果，(1)プロポフォールは fast-spiking (FS) 細胞による抑制を non-FS 細胞による抑制より大きく増強すること，(2)プロポフォールは抑制性介在ニューロンと比較して錐体細胞（Pyr）を強く抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To examine whether propofol effects on unitary inhibitory postsynaptic currents (uIPSCs) are differentially regulated depending on their pre- and postsynaptic cell types, we performed multiple whole-cell patch-clamp recording from layer V GABAergic interneurons and pyramidal (Pyr) cells of rat insular cortex (IC). Comparing the presynaptic FS and presynaptic non-FS connections, the presynaptic FS connections showed larger enhancement of uIPSC charge transfer by propofol. Among the presynaptic FS connections, FS→Pyr connections showed larger enhancement of uIPSC charge transfer than FS→interneurons, indicating that the primary target of propofol to GABAergic synaptic transmission is FS→Pyr connections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：歯科麻酔学，プロポフォール，脳皮質，抑制性シナプス後電流

1. 研究開始当初の背景

麻酔とは、広義的には無痛（鎮痛）、意識の消失（鎮静・睡眠）、筋弛緩、有害反射の除去を達成することとされている。麻酔の発明当初は単一の麻酔薬で全ての条件を達

成しようとしたが、薬剤の調節困難さ、毒性・副作用の問題、そして技術進歩に伴う手術侵襲の拡大にもなって麻酔管理は難しくなった。現在では科学技術進歩の恩恵により個々の目的にあった薬物を組み合わせて

使用することが可能となり、多岐にわたる手術に対応できるようになった。

静脈麻酔薬であるプロポフォールは調節性の良さから全身麻酔の導入や鎮静に多用されており、GABA_A受容体の開口時間を延長させることが知られている。臨床使用可能となった当初はプロポフォールには鎮痛作用があるものとして使用されてきたが、我々はプロポフォールには鎮痛作用がほとんどないという結果を報告し(Exp Brain Res 2007;179 (2): 181-90)、他者の研究からも現在では純粋な鎮静薬であると認識されるようになった。そのため完全な無意識状態にする全身麻酔の場合は、気道確保を行い、吸入麻酔薬、麻薬、硬膜外ブロックなどを併用して強い鎮痛作用を得るため、ほとんどの場合、手術操作に影響を与えず、術後に患者に不快な記憶を残すことはない。一方で、歯科治療ではプロポフォールが気道確保せずに半覚醒状態で用いられることもある。これは誤飲を避けるために咽頭反射を残し、血圧低下や呼吸抑制を避けるためである。しかし、半覚醒状態は正常状態では存在する精神的バランスを崩し興奮状態になる(脱抑制)こともあり、治療に難渋するばかりでなく、術後の不快な記憶に繋がる可能性もある。このようにプロポフォールは調節性に優れているため多岐にわたる状況で使用されるようになったが、鎮痛作用目的に誤用するケースも多々見られるのも現状である。これはプロポフォールの問題点というよりは、使用者の問題であるが、しかし見方によれば、プロポフォールの登場により新たな問題が起きたとも言える。調節性に優れる鎮静薬により患者には快適な歯科治療を提供できる可能性が広がった一方で、覚醒しやすくなったということである。半覚醒状態で治療を施行することは、強い痛みがあった場合には、覚醒するだけでなく興奮状態となる可能性があり、さらには術後に何らかの記憶を残す可能性もある。

痛みの情報処理には、第一次・第二次体性感覚野、島皮質、前帯状回、前頭前野内側部が関与していることがわかっている。さらにこれらの領域の中でも前帯状回と島皮質は痛みの情動的側面を担っているという傍証が多く、島皮質は、ヒトにおいて痛みとして最終的に認識するための最高中枢であると考えられている。島皮質を含む大脳皮質は一般的に、錐体細胞と数種類の抑制性介在ニューロンで構成されているが、これらのニューロンに対してプロポフォールがどのように作用するのか、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究は、シナプスを形成するニューロンの種類を同定して、uIPSCに対するプロポフォールの修飾作用を検討することで、

大脳皮質局所神経回路に対するプロポフォールの修飾作用を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ペントバルビタールで深麻酔を施した幼若ラット(2-4週齢)を断頭し、氷冷した人工脳脊髄液中で脳を摘出する。取り出した脳は、中大脳動脈の前後約3mmの部分を含むブロックとなるようにトリミングし、マイクロスライサー(Zero1, 堂阪EM社製)で前頭断の脳スライス標本(厚さ350μm)を作成する。ノマルスキー微分干渉顕微鏡にCCDカメラを組み合わせ赤外光にて脳スライス標本を観察し、V層に存在する抑制性介在ニューロンおよびPyrからホールセル・パッチクランプ記録を行う。この際、抑制性介在ニューロンにVenus蛍光タンパクを発現したVGAT-Venusラットから脳スライス標本を作製することにより、興奮性細胞と抑制性細胞の区別を厳密に行う。すなわち、蛍光観察下において発光している細胞は抑制性介在ニューロンであり、錐体形の細胞体を持ち、発光していない細胞はPyrである。さらに生理学的発火特性から抑制性介在ニューロンをFSおよびnon-FSに分類した。FSは、高頻度で順応のない、特徴的な発火パターンを示す細胞である。複数の細胞から同時にホールセル記録を行い、抑制性シナプス結合が存在するペアを探した。シナプス結合が存在する場合、シナプス前細胞に相当する抑制性介在ニューロンに脱分極パルスを与えて活動電流を発生させると、シナプス後細胞に相当する細胞からuIPSCの記録ができる。このuIPSCに対するプロポフォールの修飾作用について、シナプスを形成する細胞の組み合わせに着目して、比較・検討した。

ホールセル記録では全て、パッチ電極内液に0.3% biocytinを入れておき、電気生理学的記録後、HRP-ABC法を用いて記録細胞を可視化する。記録細胞は、neuroLucidaを用いて三次元構築し、細胞体の位置および軸索・樹状突起の水平および垂直方向への拡がり、軸索終末の数および密度を定量化する。そして、記録細胞の位置と無顆粒皮質領域での軸索・樹状突起の分布パターンを検索する。

4. 研究成果

シナプス前細胞がFSのシナプスの場合、FS→FSおよびFS→Pyrのシナプスに対してプロポフォール(10μM)はuIPSCの1発目の振幅を有意に増大させた。FS→non-FSのシナプスでも、uIPSCの1発目の振幅の増大傾向を認めた。この振幅の変化がシナプス前細胞からのGABAの放出の増大によるものか、それともシナプス後細胞のGABA_A受容体の増強によるものかを判定するためにpaired-pulse ratioおよびfailure rateの解析を行ったところ、FS→FS/non-FS/Pyrい

ずれのシナプスでも変化は認めなかった。よってプロポフォールはシナプス後膜に作用するものと推測できる。uIPSC の減衰時定数は、プロポフォールにより FS→FS/non-FS/Pyr いずれのシナプスに対しても有意に増大し、プロポフォールはこれらのシナプスに対して uIPSC の持続時間を延長することが明らかとなった。

シナプス前細胞が non-FS のシナプスの場合、non-FS→FS のシナプスではプロポフォール灌流投与により uIPSC の 1 発目の振幅は有意に増大した。Non-FS→non-FS/Pyr のシナプスではプロポフォールによる uIPSC の 1 発目の振幅に有意な変化は認めなかった。paired-pulse ratio および failure rate は non-FS→FS/non-FS/Pyr いずれのシナプスでも変化は認めなかった。uIPSC の減衰時定数は、プロポフォールにより non-FS→FS/non-FS/Pyr いずれのシナプスに対しても有意に増大し、プロポフォールはこれらのシナプスに対して uIPSC の持続時間を延長することが明らかとなった。

プロポフォールの抑制性シナプス伝達に対するトータルの増強作用を、シナプスを形成する細胞の種類により比較するため、charge transfer の増大分の比較を行った。その結果、(1)シナプス前細胞のサブタイプの違いによるプロポフォールの charge transfer の増大量の比較を行ったところ、シナプス前細胞が fast-spiking (FS) 細胞のシナプスは、シナプス前細胞が non-FS のシナプスと比較してプロポフォールによる uIPSC の charge transfer 増大が有意に大きかった。(2)シナプス後細胞の種類の違いによるプロポフォールの charge transfer の増大量の比較を行ったところ、FS→FS/non-FS と比較して FS→錐体細胞のシナプスにおいて、プロポフォールによる uIPSC の charge transfer 増大は大であった。以上の結果から、プロポフォールは島皮質において、抑制性介在ニューロンと比較して錐体細胞を強く抑制することが明らかとなった。また、抑制性シナプス前細胞のサブタイプによりシナプス後膜上に異なるサブタイプの GABA_A 受容体が発現しており、プロポフォールの作用は GABA_A 受容体サブタイプにより異なる可能性が示唆された。

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 17 件)

- 1) Miyamoto M, Tsuboi Y, Honda K, Kobayashi M, Takamiya K, Huganir RL, Kondo M, Shinoda M, Sessle BJ, Katagiri A, Kita D, Suzuki I, Oi Y, Iwata K (2012) Involvement of AMPA receptor

GluR2 and GluR3 trafficking in trigeminal spinal subnucleus caudalis and C1/C2 neurons in acute-facial inflammatory pain. PLoS One, 査読有, 7(8): e44055.

- 2) Adachi K, Kobayashi M, Kawasaki T, Yokoyama C, Waddington JL, Sakagami H, Onoe H, Koshikawa N (2012) Disruption of programmed masticatory movements in unilateral MPTP-treated monkeys as a model of jaw movement abnormality in Parkinson's disease. J Neural Transm, 査読有, 119(8): 933-41.
- 3) Adachi K, Fujita S, Yoshida A, Sakagami H, Koshikawa N, Kobayashi M (2012) Anatomical and electrophysiological mechanisms for asymmetrical excitatory propagation in the rat insular cortex: In vivo optical imaging and whole-cell patch-clamp studies. J Comp Neurol, 査読有, 521(7): 1598-613.
- 4) Ebihara K, Yamamoto K, Ueda K, Koshikawa N, Kobayashi M (2012) Cholinergic interneurons suppress action potential initiation of medium spiny neurons in rat nucleus accumbens shell. Neuroscience, 査読有, 236: 332-44.
- 5) Saigusa T, Aono Y, Sekino R, Uchida T, Takada K, Oi Y, Koshikawa N, Cools AR (2012) In vivo neurochemical evidence that newly synthesised GABA activates GABA(B), but not GABA(A), receptors on dopaminergic nerve endings in the nucleus accumbens of freely moving rats. Neuropharmacology, 査読有, 62: 907-913.
- 6) Kobayashi M, Takei H, Yamamoto K, Hatanaka H, Koshikawa N (2012) Kinetics of GABA(B) autoreceptor-mediated suppression of GABA release in rat insular cortex. J Neurophysiol, 査読有, 107: 1431-1442.
- 7) Kohnomi S, Koshikawa N, Kobayashi M (2012) D(2)-like dopamine receptors differentially regulate unitary IPSCs depending on presynaptic GABAergic neuron subtypes in rat nucleus accumbens shell. J Neurophysiol, 査読有, 107: 692-703.
- 8) Mizoguchi N, Fujita S, Koshikawa N, Kobayashi M (2011) Spatiotemporal dynamics of long-term potentiation in rat insular cortex revealed by optical imaging. Neurobiol Learn Mem, 査読有, 96: 468-478.

- 9) Kobayashi M, Sasabe T, Shigihara Y, Tanaka M, Watanabe Y (2011) Gustatory imagery reveals functional connectivity from the prefrontal to insular cortices traced with magnetoencephalography. PLoS One, 査読有, 6: e21736.
- 10) Takei H, Fujita S, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Insulin facilitates repetitive spike firing in rat insular cortex via phosphoinositide 3-kinase but not mitogen activated protein kinase cascade. Neuroscience, 査読有, 170: 1199-1208.
- 11) Yamamoto K, Koyanagi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Postsynaptic cell type-dependent cholinergic regulation of GABAergic synaptic transmission in rat insular cortex. J Neurophysiol, 査読有, 104: 1933-1945.
- 12) Tomiyama K, Song L, Kobayashi M, Kinsella A, Kanematsu T, Hirata M, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Orofacial movements in phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP)-1/2 double knockout mice: effect of the GABAergic agent diazepam and the D1 dopamine receptor agonist SKF 83959. Synapse, 査読有, 64: 714-720.
- 13) Fujita S, Kiguchi M, Kobayashi M, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Involvement of NMDA receptors in the ventrolateral striatum of rats in apomorphine-induced jaw movements. Brain Res, 査読有, 1322: 30-37.
- 14) Fujita S, Kiguchi M, Kobayashi M, Kinsella A, Koshikawa N, Waddington JL (2010) Assessment of jaw movements by magnetic sensor in relation to topographies of orofacial behaviour in freely moving rats: Studies with the dopamine D(1)-like receptor agonists SKF 83822 vs SKF 83959. Eur J Pharmacol, 査読有, 632: 39-44.
- 15) Sekino R, Saigusa T, Aono Y, Uchida T, Takada K, Oi Y, Koshikawa N, Cools AR (2010) Dopamine D-like receptors play only a minor role in the increase of striatal dopamine induced by striatally applied SKF38393. Eur J Pharmacol, 査読有, 648: 80-86.
- 16) Oka S, Chapman C R, Kim B, Shimizu O, Noma N, Takeichi O, Imamura Y, Oi Y (2010) Predictability of painful stimulation modulates subjective and physiological responses. J Pain, 査読有, 11: 239-246.
- 17) Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) Presynaptic interneuron subtype- and age-dependent modulation of GABAergic synaptic transmission by beta-adrenoceptors in rat insular cortex. J Neurophysiol, 査読有, 103: 2876-2888.

[学会発表] (計 21 件)

- 1) 小柳裕子. プロポフォールによる抑制性シナプス伝達修飾作用はシナプス前細胞の抑制性介在ニューロンサブタイプにより異なる. 第 40 回日本歯科麻酔学会学術集会, 2012 年 10 月 05 日, アクロス福岡 (福岡県)
- 2) 小柳裕子. プロポフォールは脳皮質錐体細胞におけるアルファ周波数帯での発火を促進する. 第 6 回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会, 2012 年 07 月 08 日, 日本大学歯学部 (東京都)
- 3) 小柳裕子. 多チャンネル同時ホールセル記録による propofol の抑制性シナプス伝達に対する修飾作用の検討. 日本麻酔科学会第 59 回学術集会, 2012 年 06 月 07 日, 神戸国際展示場 (兵庫県)
- 4) Adachi K. Responses of insular cortical neurons to orofacial noxious stimulation. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 16 日, 国立京都国際会館(京都府)
- 5) Yamamoto K. Target-cell dependent synaptic modulation of inhibitory synapses by nitric oxide in rat insular cortex. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 15 日, 国立京都国際会館(京都府)
- 6) 安達一典. 島皮質 AI の舌侵害刺激への応答. 第 5 回三叉神経領域における感覚-運動統合機構研究会, 2011 年 12 月 4 日, 高原の宿スカイランドきよみず (長野県)
- 7) 小林真之. GABA_B 自己受容体による抑制性シナプス伝達の修飾機構. 第 5 回三叉神経領域における感覚-運動統合機構研究会, 2011 年 12 月 3 日, 高原の宿スカイランドきよみず (長野県)
- 8) 鰐原賀子. 側坐核中型有棘ニューロン間の抑制性シナプス伝達に対するコリン作動性調節. 第 125 回日本薬理学会関東部会, 2011 年 10 月 15 日, 日本大学薬学部 (千葉県)
- 9) 小林真之. レプチンによる島皮質局所回路の制御機構. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 10 月 2 日, 長良川国際会議場 (岐阜県)
- 10) 小林真之. 味覚想起課題において前頭前

- 野は島皮質に先行して活性化される. 第4回三叉神経領域における感覚-運動統合機構研究会, 2010年11月28日, 池田不死王閣 (大阪府)
- 11) 安達一典. 島皮質錐体細胞の特性とネットワークの全動物パッチクランプ記録法による解析. 第4回三叉神経領域における感覚-運動統合機構研究会, 2010年11月28日, 池田不死王閣 (大阪府)
 - 12) Saito M. Inter- and intracolumnar desynchronization by presynaptic GABA_B inhibition in the rat barrel cortex. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010年11月15日, San Diego (U.S.A.)
 - 13) Fujita S. Pilocarpine-induced status epilepticus causes hyper-excitatory propagation and interneuron loss in rat agranular insular cortex. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010年11月15日, San Diego (U.S.A.)
 - 14) Koyanagi Y. β -Adrenoceptors differentially regulate inhibitory synaptic transmission depending on presynaptic interneuron subtype in rat cerebral cortex. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010年11月14日, San Diego (U.S.A.)
 - 15) Yamamoto K. Postsynaptic cell type-dependent cholinergic regulation of GABAergic synaptic transmission in rat insular cortex. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2010年11月14日, San Diego (U.S.A.)
 - 16) 藤田智史. GABA_B受容体による島皮質興奮伝播の制御機構. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月21日, タワーホール船堀 (東京都)
 - 17) 小林真之. 島皮質における興奮伝達の長期増強. 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月21日, タワーホール船堀 (東京都)
 - 18) Kobayashi M. β -Adrenoceptors differentially modulate inhibitory synaptic transmission depending on presynaptic interneuron subtype. Neuro2010, 2010年9月3日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
 - 19) Yamamoto K. Postsynaptic cell type-dependent cholinergic regulation of GABAergic synaptic transmission in rat insular cortex. Neuro2010, 2010年9月2日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
 - 20) 齋藤敏之. 麻酔針と脊髄神経後枝の走行に関する基本的研究. 第57回日本麻酔科学会学術集会, 2010年6月3-5日, 福岡

サンパレス (福岡県)

- 21) 武井浩樹. 島皮質におけるインスリン受容体を介した神経活動の修飾作用. 第61回日本大学歯学会総会・学術大会, 2010年5月15日, 日本大学歯学部 (東京都)

[図書] (計2件)

- 1) 大井良之. 学建書院. 歯科麻酔・生体管理学. 2012, 155-167.
- 2) Kobayashi M. Academic Press. Translating Mechanisms of Orofacial Neurological Disorder (Kobayashi M, Koshikawa N, Iwata K, Waddington JL eds.) International Review of Neurobiology. 2011, 285-303.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 良之 (OI YOSHIYUKI)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 60271342

(2) 研究分担者

小林 真之 (KOBAYASHI MASAYUKI)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号: 00300830
齋藤 敏之 (SAITOH TOSHIYUKI)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号: 50195997

(3) 連携研究者

()

研究者番号: