

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463150

研究課題名(和文) 静脈麻酔薬による意識消失時の脳波変化と大脳皮質局所神経回路メカニズムの解明

研究課題名(英文) Neuronal mechanisms of propofol-induced alpha rhythm in rat cerebral 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

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)：静脈麻酔薬プロポフォールによる意識消失時のアルファ周波数帯増強のメカニズムを解明するために、ホールセル・パッチクランプ法を用いて抑制性シナプス伝達および大脳皮質錐体細胞(Pyr)の発火タイミングに対するプロポフォールの修飾作用を検討した。その結果、プロポフォールは、皮質において代表的な抑制性介在ニューロンであるfast-spiking細胞(FS)とPyrで構成される抑制性シナプスの単一抑制性シナプス後電流を、他のサブタイプの細胞で構成される抑制性シナプスと比較して強力に増強することが分かった。またその結果として、同一のFSから抑制性入力を受けるPyrの発火は、同期性が増強することが分かった。

研究成果の概要(英文)：The general anesthetic propofol raises frontal alpha rhythm at the dose that is sufficient to induce loss of consciousness. However, the neural mechanisms of propofol-induced alpha rhythm in the cerebral cortex remain unknown. Using dual whole-cell patch clamp technique, we found that the fast-spiking cell (FS) to pyramidal cell (Pyr) connections exhibited greater enhancement of unitary inhibitory postsynaptic current compared to FS FS/non-FS and non-FS Pyr/FS/non-FS connections. In addition, triple whole-cell patch clamp recordings were performed from one FS and two Pyr which were received inhibitory input from the FS. We found that propofol reduced the coefficient of variation of spike timing among postsynaptic Pyr during FS activation. These results suggest that propofol facilitates Pyr firing synchrony by enhancing inhibitory inputs from FS. This synchrony of Pyr may induce the frontal alpha rhythm that associates with propofol-induced loss of consciousness.

研究分野：麻酔学

キーワード：プロポフォール 大脳皮質 脳波 アルファ周波数帯 fast-spiking細胞 抑制性シナプス伝達 GABA(A)受容体 ホールセル・パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔は無痛とともに、意識消失、自律神経反射抑制、身体の不動化の要素から成り立っており、特に局所麻酔にはない意識の消失と身体の不動化という全身麻酔の効果に関しては、歯科・口腔外科で麻酔法を選択するうえで重要である。

プロポフォールは、わが国では 1995 年に承認を受けた静脈麻酔薬であり、全身麻酔の導入や維持のほか、手術室内外での鎮静にも使用され、今日ではバルビツレートを凌駕し、最もよく用いられている。さらに歯科領域での静脈内鎮静法においても、調節性の良さからミダゾラムなどとともに汎用されている。プロポフォールの詳細な作用機序は十分明らかにされてはいないが、電気生理学的研究から中枢神経系に対して、GABA_A 受容体の活性時間を延長することで、GABA 誘導性クロールイオン電流を増強させ、催眠作用を発揮することが報告されている (Hara et al., 1994; Sanna et al., 1995; Kitamura et al., 2004)。さらに近年、プロポフォールは、脳波を覚醒時の低振幅速波から高振幅・徐波化させ、アルファ周波数帯を増強することで意識消失をひき起こす可能性が示されている (Feshchenko et al., 2004; Ching et al., 2010; Andrada et al., 2012)。しかし、大脳皮質内でどのようにしてアルファ周波数帯の脳波増強がひき起こされるか、そのシナプスレベルでのメカニズムについては、ほとんど解明されていない。

一般的に大脳皮質には、興奮性細胞である錐体細胞 (グルタミン酸作動性ニューロン) と抑制性介在ニューロン (GABA 作動性ニューロン) が存在する。抑制性介在ニューロンは、電気生理学および形態学的特性の差異によりさらに数種類のサブタイプに区別され、サブタイプの違いにより異なる機能的意味を持つと考えられている (Kawaguchi and Kubota, 1997; Uematsu et al., 2008)。抑制性入力発火タイミングをそろえることが報告されている (Hu et al., 2011)。しかし、発火タイミングに対する麻酔薬の影響については、いまだ不明である。

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえ、申請者は、プロポフォールによるアルファ周波数帯の脳波増強のシナプスレベルでのメカニズムとして、以下の仮説を立てた。

- (1) プロポフォールは GABA_A 受容体に作用して、錐体細胞 (Pyr) に対する抑制性入力を増強する。
- (2) 抑制性介在ニューロンの先行発火による抑制性入力に呼応して、Pyr 間の発火タイミングは同期する。
- (3) 脳波は皮質における Pyr の活動性を反映していると考えられているので、Pyr の発火タイミングの同期により脳波は高振幅・徐波化し、アルファ周波数帯の増強を

生み出す。

この仮説を証明し、プロポフォールによる意識消失のメカニズムの一端を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

前述の仮説を証明するために、本研究では、電気生理学的手法を用いて以下に示す 2 つの実験を行った。

(1) プロポフォールの単一抑制性シナプス後電流 (uIPSC) に対する修飾作用の検討

実験には VGAT-Venus ラットを用いた。これは GABA 作動性ニューロンに Venus 蛍光タンパクを発現させたラットで、蛍光顕微鏡観察下で抑制性介在ニューロンを容易に同定できる (Nagai et al., 2002; Uematsu et al., 2008)。Pentobarbital によって深麻酔した 2~5 週齢の VGAT-Venus ラットを用いて、通常に従い、前頭断の島皮質を含む脳スライス標本 (厚さ 350 μm) を作製した。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、島皮質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った。Venus 発現の有無に加えて、電流固定モードで静止膜電位、発火閾値、発火パターンを参考に、記録している細胞の電気生理学的タイプ分類を行った。記録ニューロンのタイプを同定した後、さらに複数の細胞から同時にホールセル記録を行い、抑制性介在ニューロンから Pyr または他の抑制性介在ニューロンに対してシナプス結合を有するペアを見つけた。シナプス結合が存在する場合、電位固定モードでシナプス前細胞に相当する抑制性介在ニューロンに電流注入により活動電流を発生させた時に、シナプス後細胞から uIPSC が記録できる。シナプス前細胞および後細胞に相当するニューロンのサブタイプ別に、プロポフォールの uIPSC に対する修飾作用について解析した。

(2) プロポフォール存在下での Pyr 発火同期性に対する単一抑制性シナプス後電位 (uIPSP) の作用の検討

抑制性介在ニューロン Pyr 間の uIPSC に対するプロポフォールの効果がどのように Pyr 同士の発火タイミングに影響するかを検討するため、次に、同一の抑制性介在ニューロンから投射を受ける 2 つ以上の Pyr の発火タイミングに対するプロポフォールの影響を検討した。前述の方法によって VGAT-Venus ラットから島皮質を含む脳スライス標本を作製したのち、3 個以上のニューロンから同時にホールセル・パッチクランプ記録を行った。記録ニューロンのタイプを同定した後、電位固定モードで 1 つの抑制性介在ニューロンから同時に 2 つ以上の Pyr にシナプス結合を有する細胞のペアを探し出した。電流固定モードにて、シナプス後細胞に相当する 2 つ以上の Pyr に脱分極パルスを

与えて活動電位を発生させておき、シナプス前細胞に相当する抑制性介在ニューロンが発火し、 μ IPSP がシナプス後細胞の Pyr で発生した際の Pyr の発火タイミングに対するプロポフォールの影響を検討した。

4. 研究成果

(1)プロポフォールの μ IPSC に対する修飾作用の検討

本研究では、抑制性介在ニューロンを電気生理学的発火特性から fast-spiking 細胞 (FS) と non fast-spiking 細胞 (non-FS) の 2 つのサブタイプに分類した FS は、矩形電流注入にตอบสนองして順応のない 100Hz 以上の高頻度な発火パターンを示し、大脳皮質において強力な代表的な抑制性介在ニューロンと考えられている。よって、 μ IPSC を記録する細胞のペアは、FS \rightarrow Pyr, FS \rightarrow FS, FS \rightarrow non-FS, non-FS \rightarrow Pyr, non-FS \rightarrow FS, non-FS \rightarrow non-FS の 6 種類となり、これらの μ IPSC に対するプロポフォールの修飾作用を検討した。その結果、島皮質においてプロポフォールは、いずれの抑制性シナプスにおいても μ IPSC の持続時間を延長させた。そこで次に、抑制性シナプス伝達を構成する細胞の種類により、プロポフォールによる μ IPSC の修飾作用の大きさに差があるかどうかを検討するために、 μ IPSC の最大点と基線の面積で構成される μ IPSC の charge transfer のプロポフォールによる増加量を比較した。その結果プロポフォールは、シナプス前細胞が non-FS の場合と比較して FS の場合に、Pyr に対する μ IPSC の charge transfer を有意に増大させることが明らかとなった。さらに、シナプス後細胞が抑制性介在ニューロンの場合と比較して Pyr の場合に、プロポフォールは μ IPSC の charge transfer を有意に増大させることが明らかとなった。これらの結果から、大脳皮質においてプロポフォールは、FS から Pyr に対する抑制性シナプス伝達を選択的に強く増強することによってニューロン活動を調節し、脳波変化を惹き起こしている可能性が考えられた。これらの結果は、麻酔学分野で最も著名な国際誌である *Anesthesiology* 誌に掲載された (Koyanagi et al., 2014)。また、国内外において広く学会発表を行った。さらに、本実験を行う過程で、鎮痛作用を持たないプロポフォールと併用して一般的に全身麻酔法に用いられる麻薬性鎮痛薬の作用ターゲットであるオピオイド受容体も、島皮質において μ IPSC を修飾することが明らかとなった。この派生したデータについても、国内の学会にて発表を行った。

(2)プロポフォール存在下での Pyr 発火同期性に対する μ IPSP の作用の検討

(1)の結果から、大脳皮質におけるプロポフォールの主要なターゲットは FS \rightarrow Pyr の抑制性シナプスであることが分かった。そこで、

1 つの FS から 2 つ以上の Pyr に同時に抑制性シナプスを構成するニューロンからホールセル記録を行い、シナプス後細胞である Pyr 間の発火タイミングに対するプロポフォールの修飾作用を検討した。その結果、プロポフォール適用により、シナプス後細胞に相当する Pyr は、シナプス前細胞である FS から μ IPSP 入力を受けることで同期性発火を示すことを見出した。さらに詳細な解析を行うため、シナプス前細胞に相当する FS からの μ IPSP 入力頻度を变化させたところ、アルファ周波数帯である 10 Hz で μ IPSP を発生させている間、シナプス後細胞に相当する 2 つの Pyr の発火タイミングは同期傾向を示した。一方、 μ IPSP を 1, 5, および 20 Hz で発生させた場合、シナプス後細胞に相当する 2 つの Pyr の発火同期は、 μ IPSC を 10 Hz で発生させた場合と比較して弱かった。また、2 つの Pyr のうち 1 つのみ FS からの入力を受ける Pyr 間では、シナプス前細胞である FS からの μ IPSP 入力を発生させても発火の同期は見られなかった。以上の結果から大脳皮質は、プロポフォールによりアルファ周波数帯特異的に発火タイミングを調節する局所回路を構成している可能性が示唆された。また、これらの発火タイミング調節に抑制性神経回路が重要な役割を果たしていると考えられた。これらの結果は、国内外の麻酔および神経科学関連学会において発表された。さらに実験の過程で、高用量のプロポフォールは、大脳皮質の FS および Pyr の発火応答を可逆的に直接抑制することが明らかとなった。この派生データについても、国内の学会にて発表を行った。

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 1 件)

Koyanagi Y, Oi Y, Yamamoto K, Koshikawa N, Kobayashi M (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. 査読有
DOI:10.1097/ALN.0000000000000183

[学会発表](計 8 件)

Kaneko K, Koshikawa N, Kobayashi M (2016) Neuronal subtype-dependent modulation of electrophysiological properties by propofol in rat cerebral cortex. 第 89 回日本薬理学会年会, 3 月 9-11 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Koyanagi Y, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2015) Propofol facilitates pyramidal cell firing synchrony in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 2015, Oct. 17-21, Chicago (USA)

横田英子, 小林真之, 越川憲明 (2015) Opioidergic effects on synaptic transmission in rat insular cortex. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 8月24-26日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

横田英子, 小柳裕子, 小林真之, 越川憲明, 大井良之 (2015) 高次痛覚中枢におけるオピオイド受容体のシナプス伝達修飾作用. 第67回日本大学歯学会総会・学術大会, 5月17日, 日本大学大講堂(東京都千代田区)

Koyanagi Y, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2014) Propofol preferentially enhances fast-spiking interneuron connections to pyramidal neurons in rat insular cortex. Anesthesiology 2014, Oct. 11-15, New Orleans(USA)

横田英子, 小柳裕子, 小林真之, 越川憲明, 大井良之 (2014) 高次痛覚中枢におけるモルヒネのシナプス伝達修飾作用. 日本麻酔科学会第61回学術集会, 5月15-17日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小柳裕子, 一杉岳, 内田琢也, 高田耕司, 岡俊一, 見崎徹, 大井良之 (2013) プロポフォルの単一抑制性シナプス伝達増強作用はシナプスを形成するニューロンサブタイプにより異なる. 第41回日本歯科麻酔学会学術集会, 10月2-4日, 新横浜国際ホテル(神奈川県横浜市)

小柳裕子, 小林真之, 越川憲明, 大井良之 (2013) Propofolによる抑制性入力の増強効果は抑制性介在ニューロンより錐体細胞において強い. 日本麻酔科学会第60回学術集会, 5月23日, ロイトン札幌他(北海道札幌市)

〔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:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 良之 (OI, Yoshiyuki)
日本大学・歯学部・准教授
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

小柳 裕子 (KOYANAGI, Yuko)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号: 20609771

(3) 研究協力者

横田 英子 (YOKOTA, Eiko)
日本大学・歯学部・大学院