

【 194 】

氏名	樋口 仁
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 9 4 号
学位授与の日付	平成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Suppression of the hyperpolarization-activated inward current contributes to the inhibitory actions of propofol on rat CA1 and CA3 pyramidal neurons (過分極作動性電流の抑制によるプロポフォールの海馬CA1およびCA3錐体神経細胞の活動抑制)
論文審査委員	教授 杉本 朋貞 教授 松尾 龍二 教授 北山 滋雄

学位論文内容の要旨

緒言

過分極作動性内向き電流（H電流）は膜電位の過分極によりゆっくりと活性化される内向き電流である。このH電流の中樞神経における主な機能は①神経活動のペース調整，②静止膜電位の修飾，③後過分極後の緩徐脱分極の発生，が挙げられる。これまでに揮発性麻酔薬であるハロセン，エンフルレンはH電流抑制作用を示すことが報告されており，これら麻酔薬の麻酔機序の1つと考えられている。

近年麻酔臨床で多用されている静脈麻酔薬にプロポフォールがある。このプロポフォールの麻酔機序には現在も不明な点がある。そこで，プロポフォールのH電流に対する作用を検討するため，H電流を持つことがすでに報告されている海馬CA1およびCA3領域のニューロンに対するプロポフォールの作用を電気生理学的手法を用いて調べた。

材料と方法

新鮮脳スライス標本の作製

S D系雄性ラットをハロセン麻酔下にて断頭し脳を摘出，0～1℃に冷やした人工脳脊髄液(ACSF)[(mM) 124 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1.6 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose, (95%O₂-5%CO₂にてバブリングを行いpH7.4に調整)]に約1分間浸した後，マイクロスライサーを用いて厚さ約350μmの海馬を含む水平断スライス標本を作製した。これを室温（約24℃）のACSF(95%O₂-5%CO₂にてバブリング)中で少なくとも1時間インキュベーションした後，記録用インターフェースチャンバーに移し，35±0.1℃のACSFで灌流した。

神経活動の記録

プロポフォールのGABA_A受容体に対する作用を除外するため全ての記録はGABA_A受容体拮抗薬のピクロトキシン存在下にて行った。

海馬CA1およびCA3領域のニューロンから，ガラス微少電極（60～100MΩ）を用いて細胞内記録を行うと同時に近傍のフィールド電位をステンレス電極（約1MΩ）を用いて測定した。

またステンレス製双極刺激電極を用いてSchaffer側枝の電気刺激を行いCA1領域の誘発電位を観察した。各電極は実体顕微鏡下において海馬の各部位に設置した。

細胞内記録、細胞外記録ともにデータはアナログ・デジタル変換してコンピューターで収集し、ハードディスクおよびデジタルテープレコーダーに保存した。その後、オフラインにてデータ解析プログラム (P-CLAMPとAxograph) をもちいて解析した。

結果

プロポフォールによる海馬CA1ニューロンの膜特性変化

プロポフォールの投与により“Voltage sag” (過分極パルス通電中に観られる経時的内向き整流作用による再分極現象)の抑制、膜電位の過分極、膜抵抗の増加が濃度依存性に観察された。またH電流の特異的拮抗薬であるZD7288投与によっても同様の結果が得られた。よってプロポフォールはH電流を濃度依存性に抑制し、膜電位の過分極、膜抵抗の増加を起こすことが明らかとなった。

海馬CA1ニューロンにおけるてんかん様発火に対するプロポフォールの影響

プロポフォール投与により、GABA_A受容体を介する入力の遮断 (ピクロトキシン投与) によって誘発されたてんかん様自発発火の頻度・持続時間の減少および膜電位の過分極が生じた。これに対しZD7288投与では自発発火の頻度の減少、膜電位の過分極は観察されたが自発発火の持続時間の減少は観られなかった。

海馬CA3ニューロンの膜特性およびてんかん様発火に対するプロポフォールの影響

海馬CA1の神経活動は密な神経連絡を持つ海馬CA3と深く関係している。そこで海馬CA1とCA3のニューロンネットワークに対するプロポフォールの影響を調べた。海馬CA3ニューロンにおいても海馬CA1ニューロンと同様にプロポフォールの投与により“Voltage sag”の抑制、膜電位の過分極、膜抵抗の増加が観察された。また海馬CA3ニューロンのてんかん様発火に対してもプロポフォールは抑制作用を示し、その反応は海馬CA1と同期していた。このことからプロポフォールのてんかん様発火に対する抑制作用は、プロポフォールの海馬CA3ニューロンに対する作用により生じていることが示唆された。

次に海馬CA3からのニューロン活動の伝播を遮断するためマイクロサージェリーナイフにてCA3領域をスライス標本から切除した。同スライス標本中の海馬CA1ニューロンにはピクロトキシンを投与しても自発発火は観察されなかったが、記録部位の近傍の電気刺激により誘発電位は観察された。このスライス標本においてもプロポフォール投与によって海馬CA1ニューロンの膜電位は過分極し、誘発電位の持続時間の減少が観察された。この結果は海馬CA1ニューロンに対するプロポフォールの直接作用を示すものであった。

考察

プロポフォールは海馬CA1およびCA3ニューロンのH電流を抑制することにより①膜電位の過分極、②自発性発火頻度の減少、を引き起こし海馬における神経活動を抑制した。以上のことからプロポフォールのH電流抑制作用はプロポフォールの中枢神経抑制機序の1つであることが明らかにされた。このことは、海馬ニューロンのようなH電流を持つものに対して、プロポフォールはGABA_A受容体の増強作用に加えてH電流を抑制することにより、より強力にその神経活動を抑制することを示唆するものであった。

論文審査結果の要旨

本学位申請論文は、中枢神経の細胞膜が発生する過分極作動性内向き電流（H電流）に対する静脈麻酔薬プロポフォールの抑制作用を見出し解析したものである。実験ではラットの海馬を含む脳スライス標本を作成し、電気生理学的手技により細胞内電位とフィールド電位を記録している。この実験系を用いてプロポフォールの作用と特異的H電流阻害薬（ZD7288）の作用を比較検討してプロポフォールの作用を抽出している。実験結果では、プロポフォールが海馬CA1およびCA3ニューロンのH電流を抑制することにより、voltage sagの減少、膜電位の過分極と膜抵抗の増大を起こすことを示している。この効果は、CA3ニューロンを介してCA1ニューロンに誘発されるてんかん様自発発火の頻度と持続時間を減少させる（一部はグルタミン酸受容体の抑制によると推察される）ものであった。

プロポフォールはバルビツレートと同様にGABA受容体を修飾して中枢神経の活動を抑制することが主な作用機序であると考えられている。上記の論文はこの作用に加え、細胞膜チャンネルとりわけHチャンネルに対しても抑制作用があることを動物実験により示している。この抑制作用は神経細胞の活動を抑制し、海馬のてんかん様自発発火も抑制するものであり、重要な作用機序の一つであると考えられる。プロポフォールの作用機序を明確にすることは、临床上より安全にプロポフォールを使用する上で重要である。よって、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。