

中枢性呼吸調節機構に対するニコチンおよびニコチン性 アセチルコリン受容体拮抗剤の影響

—新生ラットの単離脳幹脊髓標本を用いた研究—

桑名俊一^[1] 植草学園大学保健医療学部

齋藤基一郎^[2] 植草学園大学保健医療学部

小池和子^[3] 植草学園大学保健医療学部

Effects of Nicotine and Nicotinic Receptor Antagonists on the Central Respiratory Control —Studies in *in vitro* Neonatal Rat Brainstem-Spinal Cord Preparations—

Shun-ichi KUWANA Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Kiichiro SAITO Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Kazuko A. KOIKE Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

喫煙と中枢性呼吸神経回路網の関係を解明するための基礎的実験として、タバコ中の重要な化学物質であるニコチンが脳幹部呼吸神経回路網におよぼす影響とニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の機能的役割を検討した。生後4日までの新生ラットを深麻酔した後、脳幹脊髓を単離摘出し酸素化人工脳脊髄液で持続的に灌流した。頸髄C4前根よりの呼吸性神経活動と同時にホールセルパッチ記録法により延髄腹外側部のニューロン活動を記録した。nAChRのアゴニストあるいはアンタゴニストを作用させ、これらに対する呼吸出力およびニューロンの応答を検討した。その結果、nAChRアゴニストの投与により呼吸性ニューロンおよびCO₂感受性ニューロンは活性化(脱分極, 発火頻度増加, EPSP増加)した。nAChRアンタゴニストの投与は、吸息先行型ニューロン活動を直接抑制(過分極, 発火頻度減少, EPSP減少, 膜抵抗増加)した。吸息性ニューロン活動はシナプス入力減少により抑制された。したがって、nAChRは吸息先行型ニューロンに存在し、呼吸のリズム形成およびCO₂化学受容機構において重要な役割を果たしていると考えられた。ニコチンは新生動物の延髄呼吸ニューロン群に対し興奮性に作用するが、高濃度ニコチン暴露は呼吸ニューロン群の過剰な脱分極を惹起し、呼吸リズム形成機構の障害、すなわち呼吸停止を惹起するこ

[1] 著者連絡先: 桑名俊一

[2] 齋藤基一郎

[3] 小池和子

とが示唆された。

キーワード：ニコチン，ニコチン性アセチルコリン受容体，呼吸ニューロン，単離脳幹脊髓標本，新生ラット

The effects of nicotinic cholinergic neurotransmission on central respiratory control were examined by the addition of nicotinic receptor (nAChR) agonists or antagonists into the superfusion medium, in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. Neural activity of the ventral C4 was monitored as central respiratory output and the activities of neurons in the rostral ventral medulla were recorded with the whole cell configuration. Nicotine (0.1-100 μ M) or RJR-2403 (0.1-10 μ M), an agonist selective for α 4 β 2 nAChR, added to the superfusion medium induced dose-dependent increases in respiratory frequency. In inspiratory (Insp) or pre-inspiratory (Pre-I) neurons, an increase of EPSPs and augmentation of the spike frequency were induced by superfusion with 10 μ M nicotine. In CO₂ sensitive neurons, nicotine induced membrane depolarization. Application of several nAChR antagonists (mecamylamine, dihydro- β -erythroidine, methyllycaconitine, α -bungarotoxin, d-tubocurarine, vecuronium) resulted in dose-dependent reductions in C4 respiratory rate. We examined the effects of d-tubocurarine or vecuronium on activity in medullary respiratory neurons. Both antagonists inhibited drive potential amplitude and intraburst firing frequency in Insp and Pre-I neurons. These antagonists also induced a hyperpolarization and an increase in membrane resistance in Pre-I neurons, however they had no effect on these membrane properties in Insp neurons. These results indicate that these antagonists suppress central respiratory activity mainly through their inhibitory effects on Pre-I neurons and the Pre-I to Insp neuron synaptic drive. Thus, we conclude that nAChRs are directly involved in central respiratory control and these receptors play a modulatory role in the respiratory rhythm generation and/or central CO₂ chemosensitive transmission to the respiratory neuron network.

Keywords : Nicotine, Nicotinic acetylcholine receptor, Respiratory neuron, Isolated brainstem-spinal cord, Neonatal rat

1. はじめに

乳幼児のタバコ誤飲は血中ニコチン濃度の急激な上昇とともに呼吸停止を惹起する¹⁾。動物実験でもニコチンの急速な静脈内投与は呼吸停止を起こすことが報告されている²⁾。一方、動物実験において、ニコチンを延髄腹側表層部に投与すると呼吸増強反応が起こるとの報告もあり³⁾、ニコチンが呼吸調節機構に及ぼす影響について体系的理解は未だなされていない。また妊娠中に母親が喫煙者であった場合や、児の出生後も両親が喫煙者であった場合、それら乳幼児は乳幼児突然死症候群 (SIDS) のため突然死する確率が約5倍も高くなる事が疫学的に証明されている^{4,5)}。SIDSの主たる病因は、睡眠中に乳幼児の呼吸停止によるとの説が有力であるが、我々は両親の喫煙に伴う妊娠中及び乳幼児期における児血中ニコチン濃度の変動が児脳幹部呼吸調節機能を障害するという作業仮説を提唱している⁶⁾。

そこで本研究においては、喫煙に伴う血中ニコチン濃度上昇が中枢性呼吸調節機構に及ぼす生理学的、病態生理学的影響を明らかにすることを目的とし、そのためモデル実験動物として新生ラットの単離脳幹-脊髓標本を用いて、脳幹部呼吸ニューロン群に対する nAChR のアゴニストおよびアンタゴニストの作用について検討した。

2. 方法

エーテルで麻酔した新生ラット (0~4 日齢) より脳幹-脊髓を単離摘出し、小型記録用チェンバー内に固定し酸素化人工脳脊髄液 (aCSF) で連続灌流を行った。中枢性呼吸出力の指標として、横隔神経を含む頸髄第4神経 (C4) の放電を記録しながら、aCSF に混ぜた各種ニコチン濃度 (0.1, 1.0, 10, 100 μ M) による呼吸増強効果を観察した。標準灌流

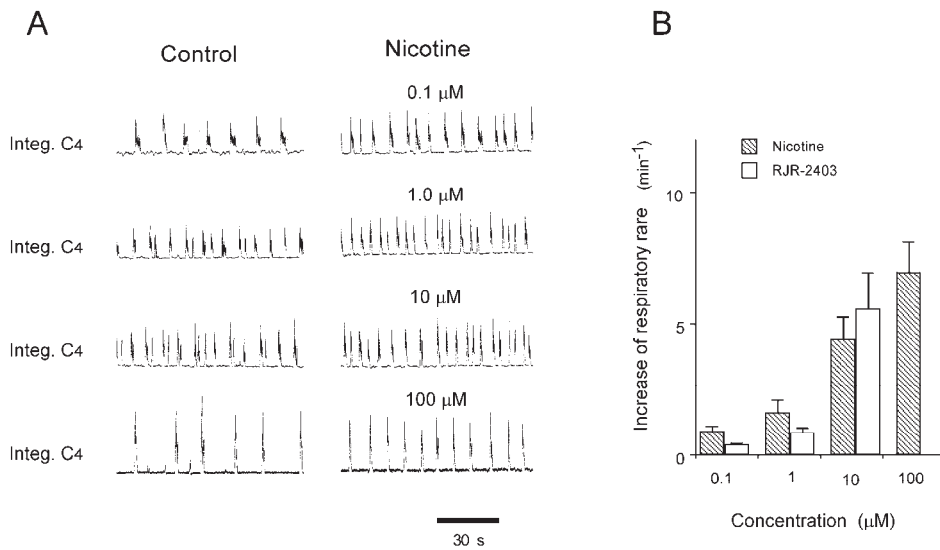


図1. ニコチン性受容体アゴニストによる呼吸出力増強効果
 A. 各種ニコチン濃度に対するC4活動(積分波形)の応答。灌流によって呼吸数の増加がみられた。B.呼吸数の増加分と灌流液ニコチンおよびRJR-2403濃度の関係。

液には、5% CO₂ + 95% O₂ 混合ガスで平衡させた人工脳脊髄液 (pH=7.4) を用いた。化学感受性の実験には、2%CO₂ で平衡させた液 (pH=7.8) および 8% CO₂ で平衡させた液 (pH=7.0) を用いた。さらにこの標本においてホールセルパッチ記録法⁶⁾ を適用して延髄の吻側腹外側部のニューロン活動を記録した。これに対するニコチンおよび nAChR 拮抗剤の影響を検討した。

使用した薬剤は、ニコチンおよび RJR-2403 (nAChRα4β2 サブユニットのアゴニスト), mecamylamine (非選択的アンタゴニスト), dihydro-β-erythroidine (nAChRα4β2 サブユニットのアンタゴニスト), methyllycaconitine (nAChRα7 サブユニットのアンタゴニスト), α-bungarotoxin (nAChRα7 サブユニットのアンタゴニスト), d-tubocurarine (nAChRα4β2 サブユニットのアンタゴニスト), vecuronium (筋性 nAChR のアンタゴニスト) である。

得られた結果は、平均値±標準偏差で表し、Student t test を用いて有意差検定を行った。

3. 結果

3.1 呼吸出力に対する nAChR アゴニスト投与の影響

灌流液中のニコチンが 0.01μM 以下の濃度では呼吸出力に対する作用を認めなかった。0.1 から 100μM の範囲では濃度依存性に呼吸出力が増強した (図1)。ニコチン灌流は 6 分間行い、その後 40~60 分、Washout を行ったが、高濃度のニコチン灌流後、呼吸数の回復は完全でなかった。10 および 100μM では灌流開始直後にほぼ全例で一過性の持続性活動が出現した。nAChRα4β2 サブユニットの選択的アゴニストである RJR-2403 も濃度依存性に呼吸出力を増加させた (図1B)。

3.2 呼吸出力に対する nAChR アンタゴニスト投与の影響

図2に nAChR の各種アンタゴニスト投与の結果を示す。いずれのアンタゴニストも濃度依存性に呼吸数を減少させた。α-bungarotoxin では 0.01μM 以上、mecamylamine, dihydro-β-erythroidine, methyllycaconitine では 0.1μM 以上、d-tubocurarine, vecuronium では 10μM 以上の濃度で呼吸抑制効果を

桑名俊一：中枢性呼吸調節とニコチン性アセチルコリン受容体

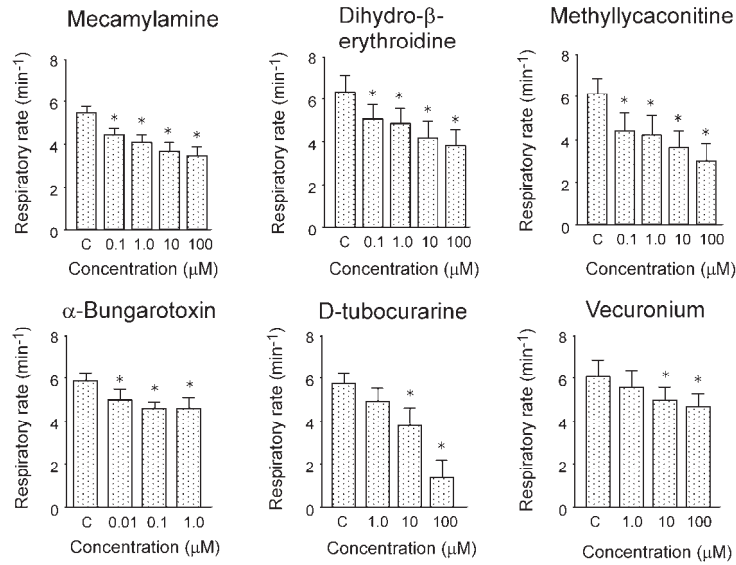


図2. 呼吸出力に対する各種ニコチン性受容体アンタゴニストの影響
*P<0.05

示した。nAChR $\alpha 4\beta 2$ サブユニットのアンタゴニストだけでなく $\alpha 7$ サブユニットのアンタゴニストも効果を示したことから、これらのサブユニットが呼吸神経回路網に関与していると考えられた。

3.3 呼吸ニューロンに対するニコチンおよび nAChR アンタゴニスト投与の影響

呼吸ニューロンはその発火パターンから吸息先行型ニューロン、吸息性ニューロンおよび呼息性ニューロンの3タイプに分類される。ニューロン活動

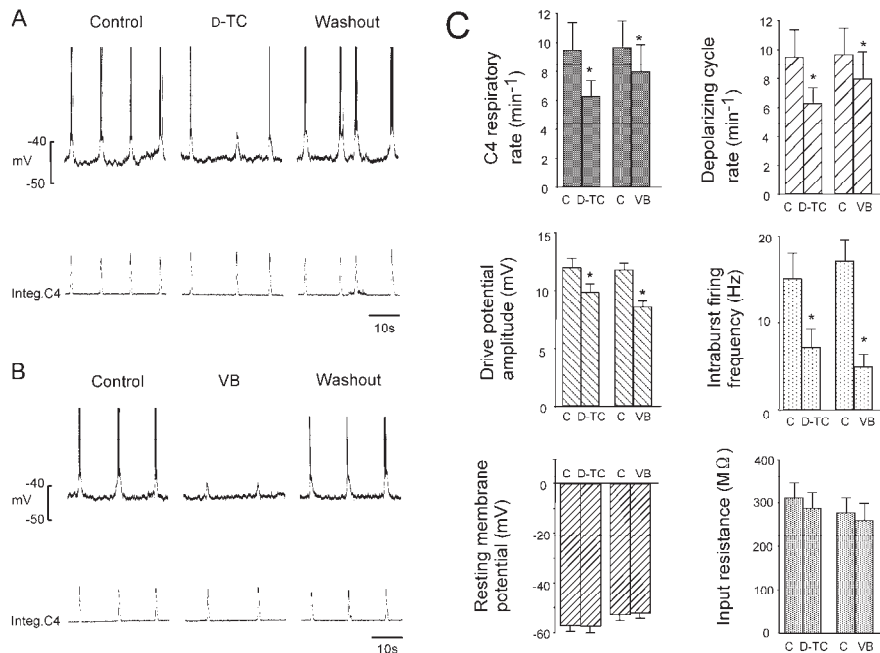


図3. 吸息性ニューロンに対する d-tubocurarine(D-TC)および vecuronium (VB)の効果
A,B:ニューロンの膜電位記録と呼吸出力記録。C:吸息性ニューロン(n=10)の電気生理学的特性。
D-TC, VB とも 40μM で灌流。*P<0.05

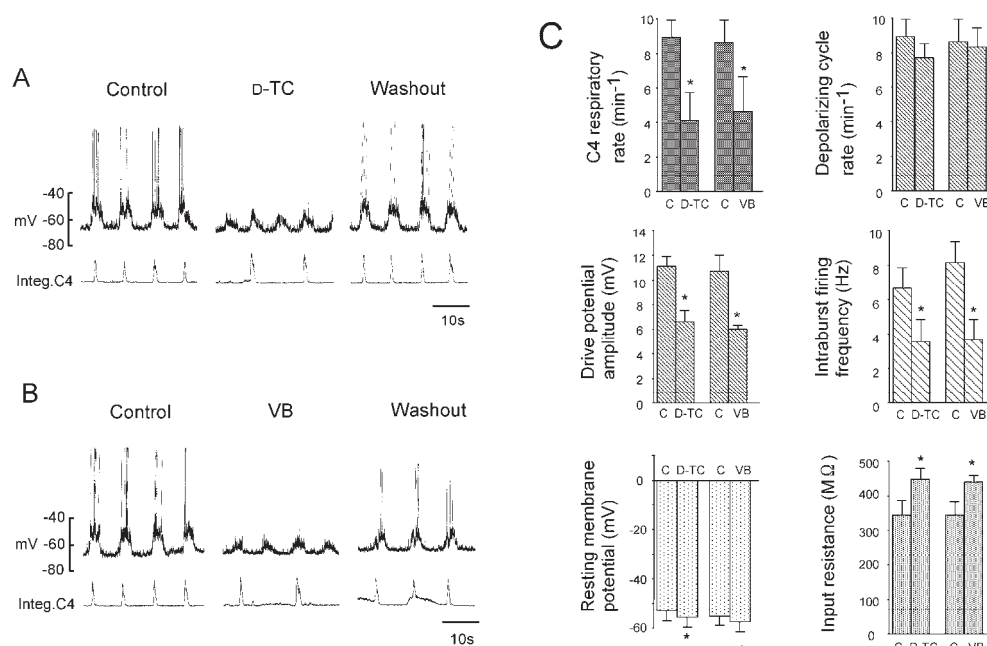


図4. 吸息先行型ニューロンに対する d-tubocurarine(D-TC)および vecuronium (VB)の効果
 A,B:ニューロンの膜電位記録と呼吸出力記録。C:ニューロン(n=6)の電気生理学的特性。D-TC, VB とも 40 μ M で灌流。*P<0.05

を記録しながらニコチンを投与すると、吸息先行型ニューロンおよび吸息性ニューロンでは投与によるニューロン活動の活性化（脱分極、発火頻度の増加、EPSP の増加、膜抵抗の低下）がみられた。この脱分極は mecamylamine 存在下では抑制された。

吸息性ニューロンではニコチンによって顕著な脱分極は認められなかった。しかしながら、吸息性ニューロンと同様にニコチンによる PSP の増加ならびに膜抵抗の減少がみられた。

各呼吸ニューロンに対する nAChR アンタゴニスト、特に d-tubocurarine と vecuronium の影響を詳細に検討した。吸息性ニューロンにおいては、これらアンタゴニストの灌流により吸息時の脱分極 (Drive potential) の減少および発火頻度の低下がみられた。静止膜電位および入力抵抗は変化しなかった (図3)。吸息先行型ニューロンでも、Drive potential の減少が認められた (図4)。しかしながら、吸息性ニューロンと違って、アンタゴニストの灌流により静止膜電位は過分極方向にシフトし、入力抵抗は増加した。このことから、呼吸ニューロン回路網において吸息先行型ニューロン活動あるいはこのニューロンの前段階のニューロンレベルで

nAChR が機能しているものと考えられた。

3.4 呼吸の中枢性化学感受性に対するニコチンおよび nACh アンタゴニスト投与の影響

2%CO₂ ガスで平衡させた灌流液から 8%CO₂ ガスで平衡させた灌流液に替えると、呼吸数の増加 (CO₂ 応答) が認められるが、この応答は nAChR 非競合的アンタゴニストの mecamylamine の灌流により低下した。同様な抑制効果は、 α 4 β 2 nAChR アンタゴニストの dihydro- β -erythroidine で認められた。高 CO₂ 液の灌流で脱分極およびスパイク発火頻度の増加が見られるニューロン、いわゆる CO₂ 感受性ニューロンもニコチンによって顕著な脱分極およびスパイク発火頻度の増加が認められた。このことから、呼吸の中枢性化学受容機構においても nAChR が関与しているものと思われた。

4. 考察

ニコチンは新生動物延髄の呼吸ニューロン回路網

に対し興奮性に作用した。ニコチンは種々の呼吸性ニューロンの nAChR を活性化させ、脱分極を惹き起こした。各種の nAChR アンタゴニストの投与により呼吸出力の減少および CO₂ 感受性の低下が認められた。正常状態において呼吸の CO₂ 感受機構およびリズム形成機構において nAChR が機能していると考えられた⁹⁻¹¹⁾。本研究における呼吸ニューロンのホールセル記録から、呼吸リズム形成のペースメーカーと考えられている吸気先行型呼吸ニューロン群が nAChR アンタゴニストの影響を直接受けることが明らかとなった。したがって、nAChR は中枢性の呼吸リズムを維持する上で重要な働きをしていることが示唆された。最近、呼吸ニューロン群に存在する nAChR サブユニットとしては $\alpha 4\beta 2$ の関与が報告されている¹²⁾。本研究の nAChR アンタゴニスト投与の結果から、 $\alpha 4\beta 2$ だけでなく $\alpha 7$ サブユニットの関与も示唆されたため、nAChR サブユニットの同定には、更なる検討が必要である。これまで、ニコチンの急速な静脈内投与は一過性の呼吸増強後、呼吸停止を起こすことが報告されている²⁾。本研究では、その効果が、中枢の呼吸ニューロンレベルで生ずることを示唆している。すなわち、脳幹部呼吸リズム形成神経機構が高濃度ニコチンに曝露されると、呼吸ニューロンの過剰な脱分極が起こり、その結果、呼吸ニューロン回路網の機能が障害され、呼吸リズム形成の不全、さらには呼吸停止に至ると推測される。

5. 倫理的配慮

実験動物の取り扱いに関しては、「生理学領域による動物実験に関する基本的指針」（日本生理学会平成 15 年改訂）に従った。また、本研究は、植草学園大学保健医療学部動物実験委員会の承認

(URAC08-01) を得たものである。

6. 謝辞

本研究は、文部科学省の科研費 (19603015) の助成を得たものである。

7. 文献

- 1) Singer J. and Janz T. Apnea and seizures caused by nicotine ingestion. *Pediatric Emergency Care.* 1990 ; 6 : 135-137
- 2) Sasaki M, Yamaya M, Hida W, Nakamura M, Sasaki T, Sasaki H and Takishima T. Effect of hypercapnea on ventilatory response to intravenous nicotine administration in anesthetized dogs. *Respir Physiol.* 1989 ; 78 : 177-186
- 3) Dev NB and Loeschcke HH. Cholinergic mechanism involved in the respiratory chemosensitivity of the medulla oblongata in the cat. *Pflügers Arch.* 1979 ; 379 : 29-36
- 4) Poets CF, Schlaud M, Kleemann WJ, Rudolph A, Diekmann U and Sens B. Sudden infant death and maternal cigarette smoking: results from Lower Saxony Perinatal Working Group. *European J Pediatrics.* 1995 ; 154 : 326-329
- 5) Schellscheidt J, Oyen N and Jorch G. Interactions between maternal smoking and other prenatal risk factors for sudden infant death syndrome (SIDS). *Acta Paediatrica.* 1997 ; 86 : 857-863
- 6) Okada Y, Kuwana S and Iwanami M. Respiratory suppression induced by nicotine withdrawal in the neonatal rat brainstem: implications in the SIDS risk factor. *Adv Exp Med Biol.* 2001 ; 499: : 187-194
- 7) Kuwana S, Okada Y and Natsui T. Effects of extracellular calcium and magnesium on central respiratory control in the brainstem-spinal cord of neonatal rat. *Brain Res.* 1998 ; 786 : 194-204
- 8) Kuwana S, Okada Y, Sugawara Y, Tsunekawa N and Obata K. Disturbance of neural respiratory control in neonatal mice lacking GABA synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Neuroscience.* 2003 ; 120 : 861-870
- 9) Fukuda Y and Loeschcke HH. Cholinergic mechanism involved in the neuronal excitation by H⁺ in the respiratory chemosensitive structures of the ventral medulla oblongata of rats in vitro. *Pflügers Arch.* 1979 ; 379 : 125-35
- 10) Okada Y, Chen Z and Kuwana S. Cytoarchitecture of central chemoreceptor in the mammalian ventral medulla. *Respir Physiology.* 2001 ; 129 : 13-23
- 11) Okada Y, Chen Z, Jiang W, Kuwana S and Eldridge FL. Anatomical arrangement of hypercapnia-activated cells

in the superficial ventral medull of rats. *J Appl Physiol.*
2002 ; 93 : 427-439

- 12) Shao XM and Feldman JL. Pharmacology of nicotine receptors in preBötzinger complex that mediate modulation of respiratory pattern. *J Neurophysiol.* 2002 ; 88 : 1851-1858