

シナプス前終末からの直接記録による
麻酔薬のシナプス伝達抑制作用の研究

--- 哺乳類中枢神経シナプス前終末のパッチクランプによる電気生理学的研究---

(研究課題番号 09470328)

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 竹之下 眞

(滋賀医科大学医学部助教授)

滋賀医科大学附属図書館



2000018630

はしがき

麻酔は神経細胞から次の神経細胞への興奮伝達の抑制によりその作用を発揮する。神経伝達の内、神経軸索そのものは通常の臨床使用濃度の全身麻酔薬では抑制されないことが知られており、シナプス伝達が全身麻酔薬のターゲットとされている。シナプス伝達過程の内、前シナプスの過程が抑制されるのか、あるいは後シナプス過程の抑制が主であるのか未だ決着がついていない。それは後シナプスに相当する神経細胞体からの記録が容易であるのに対し、前シナプスからの記録はその小ささ故にほとんど不可能であったからである。

本研究では、(1)ラット脊髄スライスを用い、電位感受性色素により薬理的に分離した前シナプスの興奮が全身麻酔薬ハロセンにより抑制されることを示した。またそれが塩素イオンを介する抑制性受容体によるものでないこと、Ca channel を介するものでもないこと、および double-pore K channel を介するものではないことを示した。(2) ラット橋に存在する台形体内側核(NMTB)細胞の巨大前シナプスを直接パッチクランプし、ハロセンが前シナプスの Ca 電流を抑制しないこと、Na 電流を抑制しないこと、5-6 mV 過分極させることを示した。

研究組織

研究代表者	竹之下 眞（滋賀医科大学医学部助教授）
研究分担者	内田 一郎（大阪大学大学院医学系研究科講師）
研究分担者	浅井 竜也（福井大学工学部講師）
研究分担者	野坂 修一（滋賀医科大学医学部教授）

研究経費

平成 9年度 8,500 千円

平成 10年度 2,400 千円

平成 11年度 1,900 千円

計 12,900 千円

研究発表

(1) 学会誌等

Asai T, Horiuchi T, Takenoshita M, Murase K: Inhibitory effect of halothane on the presynaptic excitation in the dorsal horn of rat spinal cord slices revealed by optical imaging. Progress in Anesthetic Mechanism 2000; 6:584-589

(2) 口頭発表

浅井竜也、堀内紀宏、竹之下眞：光学的計測法によるラット脊髄後角でのハロセンによる前シナプス興奮抑制の測定。第2回麻酔メカニズム国際ワークショップ(高松)。

1999年12月

楠堂圭、堀内紀宏、竹之下眞、浅井竜也：光学的計測法によるラット脊髄一次求心性線維終末応答の測定と麻酔薬ハロセンの抑制作用の解析。第23回日本神経科学大会(横浜)。2000年4月

研究成果

1. 研究の背景

全身麻酔薬は、神経伝導ではなくシナプス伝達を抑制することによりその作用を発揮する。シナプス伝達の過程は前シナプス過程(①シナプス前終末の脱分極 ②Ca²⁺流入 ③伝達物質放出)と後シナプス過程(④伝達物質のレセプターとの結合 ⑤レセプター電流 ⑥シナプス後細胞の興奮発火)とに分けられる。後シナプス事象に対する麻酔薬の作用に関しては、後シナプス細胞からの直接記録が可能のため、哺乳類に限っても多くの研究がなされてきた。しかし前シナプス事象に関しては、シナプス前終末が小さ過ぎて、そこからの直接記録が技術的に不可能であったため、哺乳類での直接的な研究は無かった。シナプス終末小胞synaptosomeの使用、または微小電位・電流の解析などによる間接的研究があるのみであった。一つの解決方法は光学的に前シナプスの興奮を記録することであり、もう一つの解決法はラット脳の聴覚系中継核である台形体内側核(MNTB; Medial Nucleus of the Trapezoid Body)の巨大シナプス前終末の直接記録をすることである。

[1] 光学的計測法によるラット脊髄後角でのハロセンによる前シナプス興奮抑制の測定

1. 方法

(1)スライス作成・記録装置

村瀬 et al(1) の方法によった。生後2-4週のSDラット脊髄を摘出し、腰仙部の後根

付き横断スライス標本(350-500 μm)を作成した。電位感受性色素 RH-482(0.1mg/ml)で20分間染色した後、150W ハロゲンランプと倒立顕微鏡を設置した記録用チェンバー(容量 0.2ml)に移し、95%O₂ + 5%CO₂を通気した Ringer 液で灌流した。Ringer 液の組成は(in mM)127.1 NaCl, 1.9 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.2KH₂PO₄, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgSO₄, and 10 glucose である。実験は室温(20-24℃)で行った。後角の 0.55mm 平方または 0.83mm 平方の領域の 700nm 波長光吸収の変化を測定した。イメージングシステム (SD 1001, Fuji Micro Devices, 東京)は frame rate 0.6ms で 128 x 128 pixel の photo sensor から構成されている。吸引電極により後根を刺激した。後角浅層または後根の侵入部位から細胞外ガラス電極により細胞外記録し、一次求心線維を上行する電位の種類を区別した。C 線維興奮のための刺激の条件は 1.5mA, 0.5ms であり、A 線維興奮の条件は 0.1-0.2 mA, 0.05ms であった。光学的記録ではその潜時により A 線維と C 線維を区別同定した。

(2) 記録方法

後根を 12-15 秒の間隔で 32 回単発刺激した。刺激開始 10ms 前より、連続 128 frame の吸収画像を 0.6ms 間隔で記録した。刺激前の参照吸収像(15 回加算平均)を各 frame より差し引いた後、32 回分を加算平均した。分解能は計算上 4.3 μm (0.55mm 平方)または 6.5 μm (0.83mm 平方)であるが、焦点の深さ、スライス・灌流液による光散乱、染色の均一性により影響される。Space constant は 6.5 μm 平方/pixel では 2 pixel (<13 μm)、4.3 μm 平方/pixel では 4 pixel (<17 μm)である。一回の後根刺激により光吸収が 0.05-0.2%上昇した。この上昇は刺激後 1-5ms で増強し、10ms-1s で減衰した。この反応は少なくとも 3 時間は安定していた。20 分後の減少は 1.3%であり、3 時間後の減少は 3.7%であった。

(3) ハロセンの適用と灌流液中のハロセン濃度の測定

ハロセンは気化器を通した 95%O₂ + 5%CO₂ をバブリングした灌流リンゲル液を 20 分間投与した。記録チェンバー内灌流液中のハロセン濃度はガスクロマトグラフィーで測定した(2)。

(4) 薬品

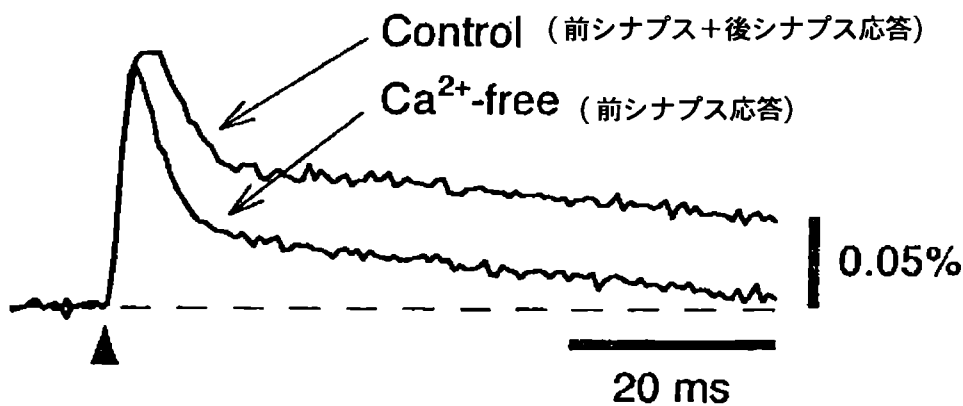
RH-482(日本感光色素、岡山)、DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5)、テトロトキシシン(TTX, Sigma) は蒸留水で溶かし冷凍保存した。CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione 1 H₂O)(Tocris Cookson) は DMSO で溶かし冷凍保存した。

2. 結果

(1) シナプス前終末からの光学的応答 (Fig 1)

脊髄後根の単発性電気刺激により、脊髄後角第II層を中心に100ms以上持続する神経興奮が光学的に記録された。2 mM EGTA を含み、Ca を含まないリンゲル液の灌流により、シナプス後膜の反応を抑え、シナプス前終末からの光学的応答のみを記録できた。また30 μ M AP-5 と1 μ M CNSQX を含むリンゲル液の灌流により、同様にシナプス後膜の反応を抑え、シナプス前終末からの光学的応答のみを分離記録できた。シナプス後膜の反応抑制により、初期の立ち上がりは変化しなかったが、それに続く tail 部位は大きく抑制された。またこれらの応答は TTX により完全にブロックされた。

Fig 1 脊髄後角浅層の光学的応答 (前シナプス反応の分離)

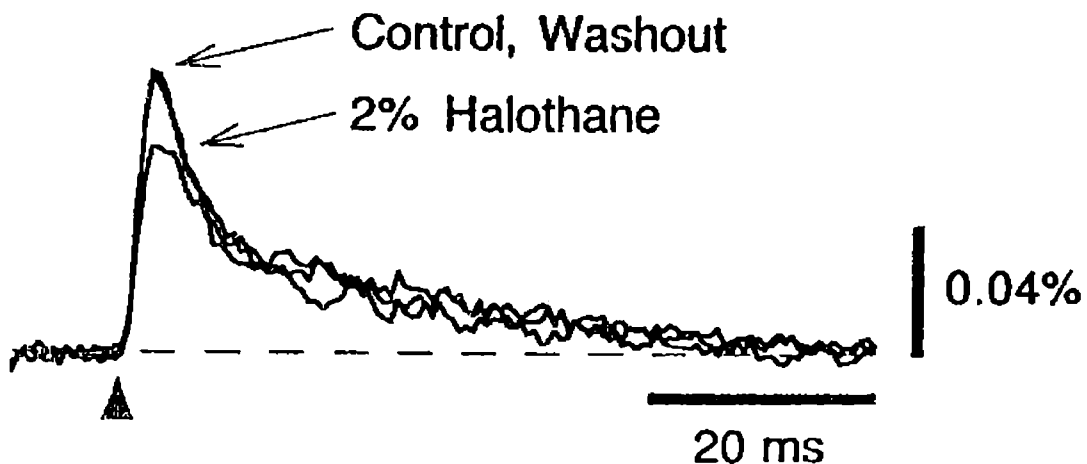


灌流 Ringer 液を Ca-free + 2mM EGTA にするか、あるいは 30 μ M AP-5 と 1 μ M CNSQX を添加することにより後シナプス反応を抑え、前シナプス反応のみを観察する

(2) ハロセンによるシナプス前終末からの光学的応答の抑制 (Fig 2)

1-4 %のハロセンにより、シナプス前終末の光学的応答は容量依存的にまた可逆的に抑制された。抑制の程度は1%ハロセンにより $85 \pm 1 \%$ ($n=7$) へ、2%ハロセンにより $72 \pm 2 \%$ ($n=7$) へ、3%ハロセンにより $62 \pm 3 \%$ ($n=7$) へ、4%ハロセンにより $58 \pm 2 \%$ ($n=4$) へと減少した。IC50 は約 2.8%であった。刺激回数を9回にして抑制の時間経過を5分毎に測定した ($n=4$)。3%ハロセン適用5分後、応答は約38%減少した。10分後約48%減少した。以後15分、20分後の抑制の程度は同じであった。すなわちハロセンの作用は速く、10分で平衡に達した。時に高濃度(3-4%)のハロセンにより初期反応の振幅は減少したが tail 部位の振幅はかえって増強した。

Fig 2 前シナプス応答に対する2%ハロセンの抑制作用

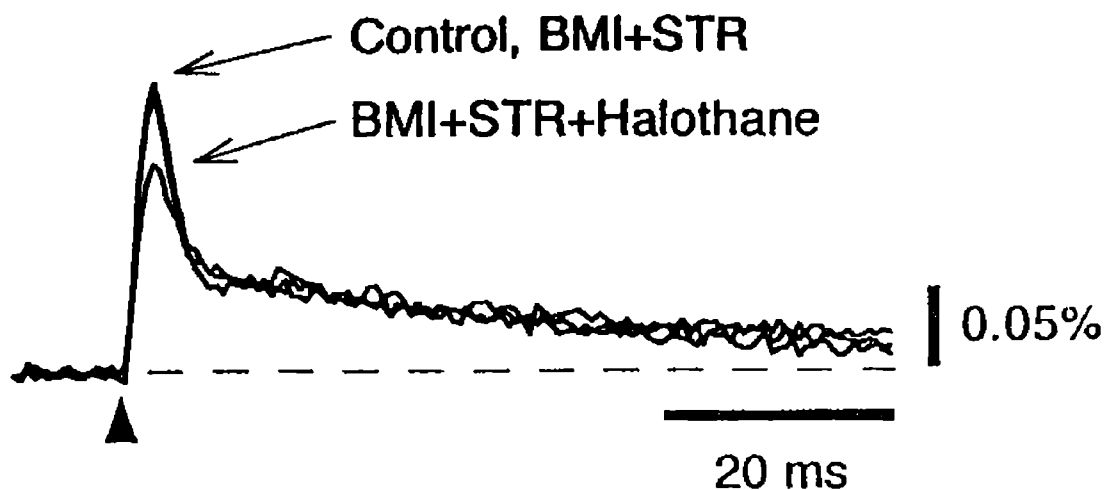


Ca-free の灌流液。2%ハロセンを15分間適応した。ハロセンにより初期応答の振幅が抑制され、ハロセンの washout により可逆的に元にもどった。

(3) ハロセンの抑制作用における抑制性レセプターの関与 (Fig 3)

ハロセンの抑制作用において GABA や glycine などの抑制性レセプターが関与しているか否かを検討するため、 $10 \mu\text{M}$ bicuculline と $1 \mu\text{M}$ strychnine の存在下でハロセンの作用を検討した。さらに低い Cl の灌流液でのハロセンの作用を検討した。いずれにおいても、ハロセンの作用は対照灌流液に比べ差がなかった。

Fig 3 抑制性受容体ブロック下でのハロセンによる抑制



灌流液は Ca-free で $10 \mu\text{M}$ bicuculline と $1 \mu\text{M}$ strychnine を含む。2%ハロセンを15分間適応した。ハロセンにより初期応答の振幅が抑制され、ハロセンの washout により可逆的に元にもどった。ハロセンによる抑制は bicuculline と strychnine を含まない状態 (Fig 2)と同じであった。

3. 考察

後根刺激により誘発された脊髄後角浅層における前シナプスの興奮が臨床使用濃度 (1-4%) のハロセンにより抑制された。 麻酔薬による興奮性シナプス伝達抑制の作用部位が presynapse、postsynaps のどちらが主であるのか議論の多いところである。

Presynapse 作用の方が強いとの報告も多い(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)が、また postsynapse の作用の方が大きい(11)(12)との報告もある。 このほかにも麻酔薬が presynapse を抑制するとの報告は多い(13)(14)(15)(16)が、いずれも presynapse の事象を直接記録したものではなく間接的証明である。今回我々は臨床濃度のハロセンが前シナプス終末の電位変化を抑制することを電位感受性色素により直接証明した。これはラット海馬スライス標本において、1MAC ハロセンが Schaffer-collateral axon fiber volley の振幅を 18%減少させるという Milulec(1998) の報告と一致している(17)。また 1MAC のイソフルレンが presynaptic fiber volley の振幅を 17%減少させるという報告もある(18)。

GABA_A が presynapse の脱分極を介して Na channel の不活化を促進し presynapse を抑制するというメカニズムが報告されている(19)。ハロセンは GABA_A 受容体反応を亢進することが知られているので、ハロセンによる前シナプスの抑制に GABA_A が関与しているか否かを検討した。ハロセンによる抑制は bicuculline および strychnine 存在下でも変化しなかった(Fig 3)。また低クロールの灌流液中でもハロセンの作用に変化が見られなかった。これらのことよりハロセンの抑制作用に抑制性伝達物質は関与していないと言える。

ハロセンによる抑制作用のメカニズムは不明である。前シナプスの Na channel がハロセンにより抑制されることが報告されている(20)(21)。ハロセンは神経細胞を過分極させることが知られており(22)、前シナプスでも関与しているかも知れないが、本実験

では究明できない。

[2] ラット台形体内側核(MNTB; Medial Nucleus of the Trapezoid Body)の巨大シナプス前終末の直接記録によるハロセンの前シナプス作用の解明

1. 方法

(1) 台形体内側核細胞から EPSC 記録

生後10日-2週間のラット脳をセボフルレン麻酔下に摘出し、台形体内側核細胞を含む橋部のスライス切片(300 μ)を作成し、37°Cで1時間インキュベートした。ノマルスキー検鏡下、台形体内側核細胞を直視下に同定し、ホールセルパッチクランプした。-70mV に電位固定し、シナプス前線維束の刺激により EPSC を記録した。灌流液の組成はスライスは 120 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 3.0 mM myo-inositol, 2.0 mM sodium pyruvate, 0.5 mM ascorbic acid, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ である。95% O₂ + 5% CO₂ で酸素化した。後シナプス細胞体のピペット内液組成は 97.5 mM K gluconate, 32.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, and 10 mM HEPES (pH=7.3)。時に 5 mM QX314 を加えた。

(2) 台形体内側核の巨大シナプス前終末の電位記録

台形体内側核を含む橋部のスライス切片(150 μ)を作成し、37°Cで1時間インキュベートした。ノマルスキー検鏡下、台形体内側核細胞近傍のシナプス前終末を直視下に同定し、ホールセルパッチクランプした。ピペット内液組成は 110 mM CsCl, 40 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2.0 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na₂-GTP, 12

mM Phosphocreatinine, 10 mM TEA-Cl (pH=7.3) である。

(3) 台形体内側核の巨大シナプス前終末の Na 電流記録

シナプス前終末を直視下に同定し、ホールセルパッチクランプし、10 mM TEA-Cl 存在下、Ca 非存在下に Na 電流を記録した。良好な voltage-clamp のために適当濃度のテトロドトキシン(TTX)を使用した。

(4)台形体内側核の巨大シナプス前終末の Ca 電流記録

シナプス前終末を直視下に同定し、ホールセルパッチクランプし、10 mM TEA-Cl と 1 μ M TTX を加えた。ピククリン, ストリキニン存在下に Ca 電流を記録した。

(5) ハロセンの適用

ハロセンは気化器を通した 95%O₂ + 5%CO₂ をバブリングしたリンゲル液を 5 分間灌流した。

2. 結果

(1) 台形体内側核細胞から記録した興奮性後シナプス電流(EPSC)に対するハロセンの作用 (Fig 1)

1-5%の全身麻酔薬ハロセンが epsc を用量依存性に可逆的に 30-90%抑制した。Figure 1 は 1 個の MNTB 細胞からの記録の例である。5%ハロセン 5 分間投与により EPSC 振幅は 0.81 nA から 0.26 nA に抑制され、washout により 0.55 nA に回復した。Figure 2 に normalized した変化を示す。

Figure 1

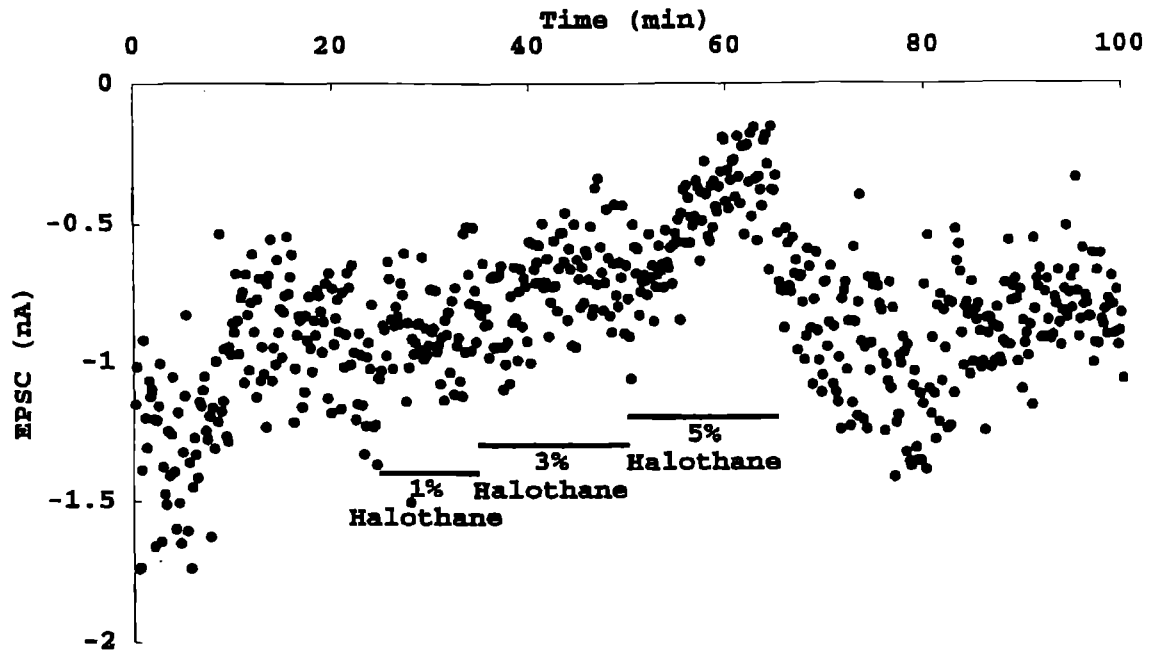
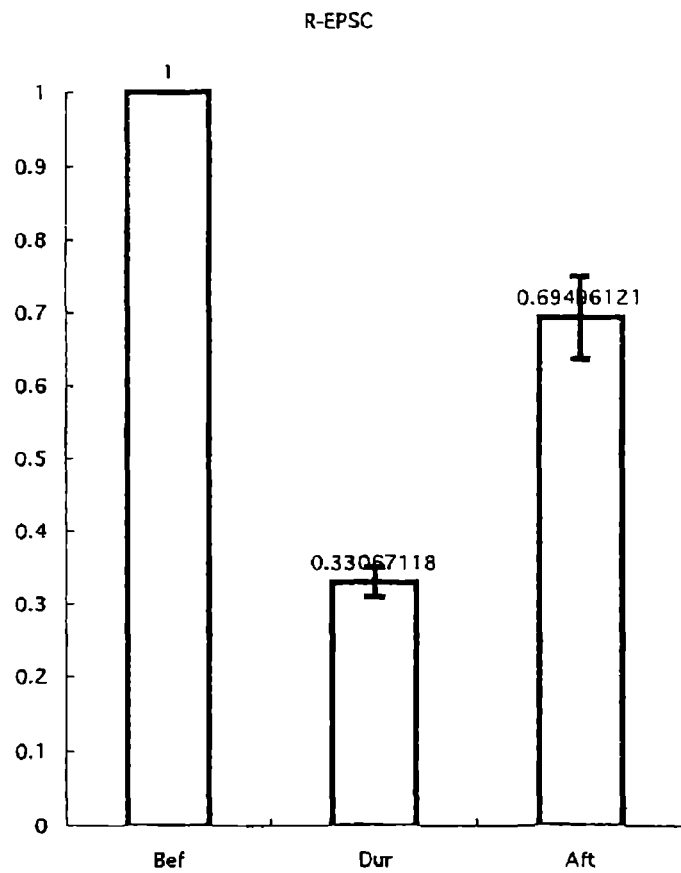


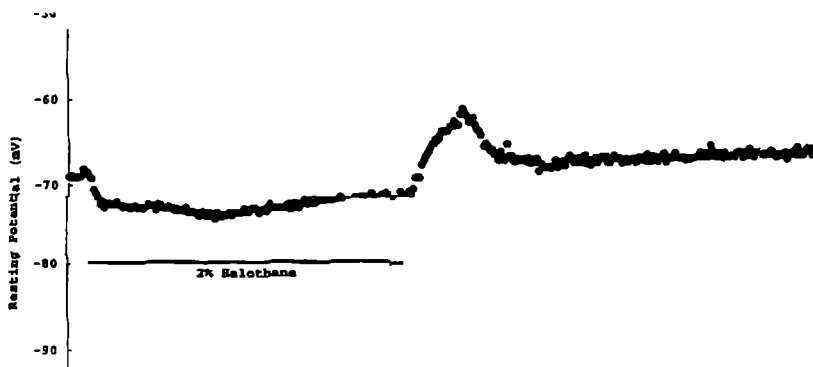
Figure 2



(2) 台形体内側核の巨大シナプス前終末の静止膜電位に及ぼすハロセンの作用

2-3%ハロセンにより presynapse は 5-6mV 過分極した(Figure 3)。

Figure 3



(3) シナプス前終末の Na 電流に及ぼすハロセンの作用

2-3%ハロセンは pre-synapse の Na 電流・活動電位を抑制しなかった(Figure 4,5)。

Figure 4 (左より control、2%ハロセン5分、washout)

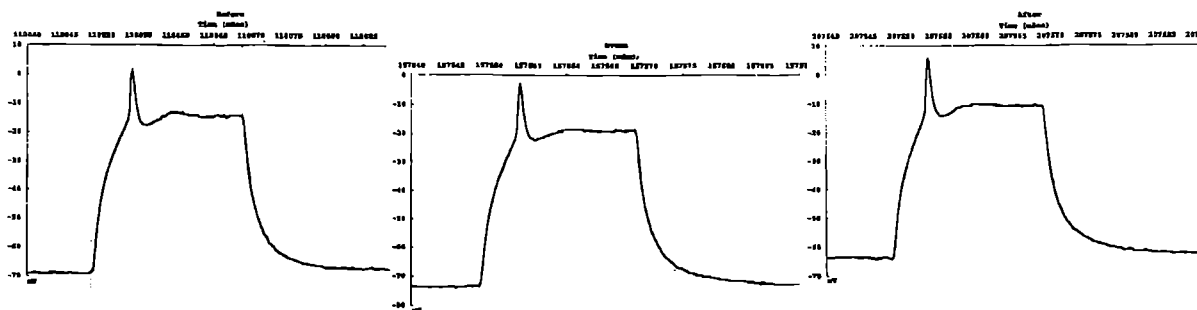
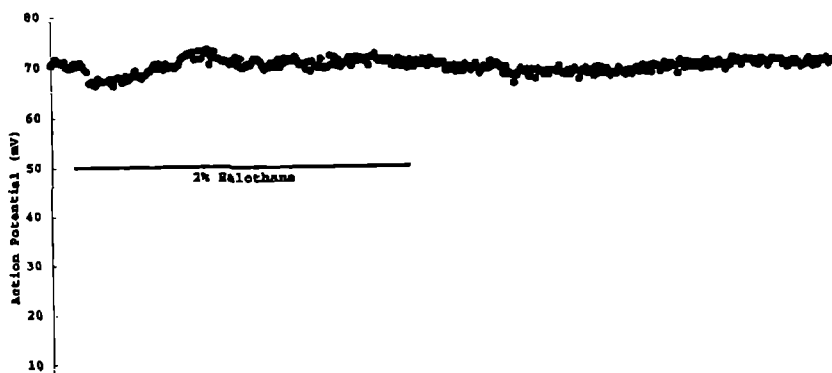


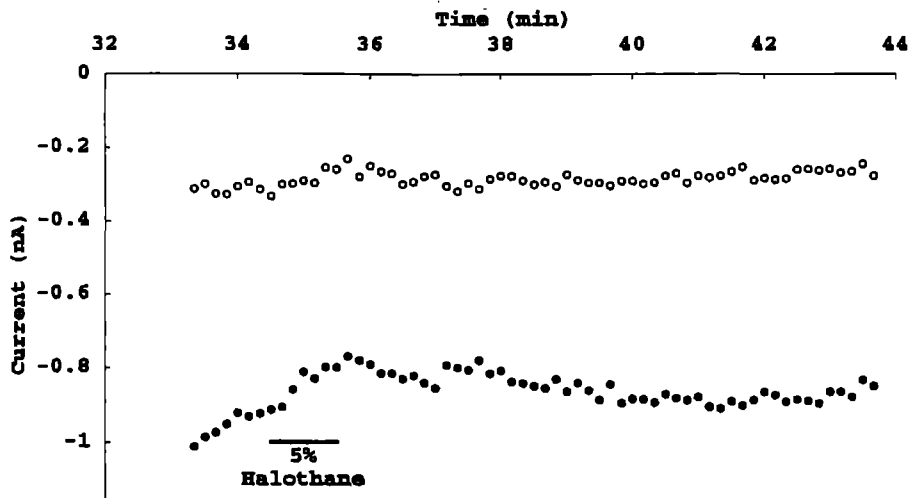
Figure 5



(4) シナプス前終末の Ca 電流に及ぼすハロセンの作用

5%ハロセンにより Ca 電流は影響を受けなかった。Figure6 に1例を示す。

Figure 6



白丸は presynapse の Ca 電流を、黒丸は同時に測定した postsynapse の EPSC を示す。

3. 考察

今までに presynapse からの直接記録によって麻酔薬の作用を見た報告はなく本研究が初めてである。以前我々はハロセンが脊髄運動神経を過分極させることを報告した(22)が、シナプス前終末においても過分極させることが明らかとなった。また Na 電流を抑制しないという結果になったが、報告のあるハロセンによる不活化の増強・左方移動と前述の過分極との相互作用は不明である。Ca 電流もハロセンの影響を受けなかった。これは N-type, P-type Ca channel が麻酔薬に抵抗性であるという報告と合致する。

参考文献

- (1) Ikeda H, Ryu PD, Park JB, Tanifuji M, Asai T, Murase K. Optical responses evoked by single-pulse stimulation to the dorsal root in the rat spinal dorsal horn in slice. *Brain Res* 1998; 812:81-90
- (2) Stern RC, Weiss CI, Steinbach JH, Evers AS: Isoflurane uptake and elimination are delayed by absorption of anesthetic by the scimed membrane oxygenator. *Anesth Analg* 1989; 69:657-662
- (3) Kirson ED, Yaari Y, Perouansky M: Presynaptic and postsynaptic actions of halothane at glutamatergic synapses in the mouse hippocampus. *Br J Pharmacol* 1998; 124:1607-14
- (4) Kullmann DM, Martin RL, Redman SJ: Reduction by general anaesthetics of group Ia excitatory postsynaptic potentials and currents in the cat spinal cord. *J Physiol Lond* 1989; 412:277-96
- (5) Nishikawa K, Kidokoro Y: Halothane presynaptically depresses synaptic transmission in wild-type *Drosophila* larvae but not in halothane-resistant (*har*) mutants. *Anesthesiology* 1999; 90:1691-7
- (6) Nishikawa K, MacIver MB: Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology* 2000; 92:228-36
- (7) Perouansky M, Baranov D, Salman M, Yaari Y: Effects of halothane on glutamate receptor-mediated excitatory postsynaptic currents. A patch-clamp study in adult mouse hippocampal slices. *Anesthesiology* 1995; 83:109-19
- (8) Perouansky M, Kirson ED, Yaari Y: Halothane blocks synaptic excitation of inhibitory interneurons. *Anesthesiology* 1996; 85:1431-8; discussion 29A
- (9) Richards CD, Smaje JC: Anaesthetics depress the sensitivity of cortical neurones to L-glutamate. *Br J Pharmacol* 1976; 58:347-57

- (10) Zorychta E, Capek R: Depression of spinal monosynaptic transmission by diethyl ether: quantal analysis of unitary synaptic potentials. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 207:825-36
- (11) Pocock G, Richards CD: Excitatory and inhibitory synaptic mechanisms in anaesthesia. *Br J Anaesth* 1993; 71:134-147
- (12) Richards CD: Cellular mechanisms of anaesthesia. *Curr Opin Anaesth* 1993; 6:616-619
- (13) MacIver MB, Mikulec AA, Amagasa SM, Monroe FA: Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiology* 1996; 85:823-34
- (14) Miao N, Frazer MJ, Lynch C3: Volatile anesthetics depress Ca²⁺ transients and glutamate release in isolated cerebral synaptosomes. *Anesthesiology* 1995; 83:593-603
- (15) Saint DA, Quastel DM, Chirwa S: Effect of a volatile anesthetic upon presynaptic excitability in mammalian hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 1986; 64:221-3
- (16) Schlame M, Hemmings HJ: Inhibition by volatile anesthetics of endogenous glutamate release from synaptosomes by a presynaptic mechanism. *Anesthesiology* 1995; 82:1406-16
- (17) Mikulec AA, Pittson S, Amagasa SM, Monroe FA, MacIver MB: Halothane depresses action potential conduction in hippocampal axons. *Brain Res* 1998; 796:231-8
- (18) Berg-Johnsen J, Langmoen IA: Isoflurane effects in rat hippocampal cortex: a quantitative evaluation of different cellular sites of action. *Acta Physiol Scand* 1986; 128:613-8
- (19) Zhang SJ, Jackson MB: GABA_A receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary. *J Physiol*

(Lond) 1995; 483:583-95

(20) Rehberg B, Xiao YH, Duch DS: Central nervous system sodium channels are significantly suppressed at clinical concentrations of volatile anesthetics . *Anesthesiology* 1996; 84:1223-33

(21) Ratnakumari L, Hemmings HC: Inhibition of presynaptic sodium channels by halothane . *Anesthesiology* 1998; 88:1043-54

(22) Takenoshita M, Takahashi T: Mechanisms of halothane action on synaptic transmission in motoneurons of the newborn rat spinal cord in vitro . *Brain Res* 1987; 402:303-310