

[原著]

電位依存性 Na⁺ チャネルに対する静脈麻酔薬の効果

尾下 俊徳¹ 深町 翔平² 行平 崇³
田中 哲子⁴ 申 敏哲^{5,*}

Effects of intravenous anesthetics on voltage-dependent Na⁺ channel in hippocampal CA3 neurons

Toshinori ONOSHITA, Shouhei FUKAMACHI, Takashi YUKIHIRA,
Tetsuko TANAKA, Min-Chul SHIN

麻酔薬は臨床領域で広く使用されており、その麻酔の作用機序は未だ明らかにされていないが、麻酔薬作用の発現に関与するのは GABA_A 受容体、NMDA 受容体、イオンチャネルであると考えられている。痛みの感覚を一時的に除去する麻酔薬は局所麻酔薬と全身麻酔薬に分類され、作用機序の仮説の一つとして、静脈麻酔薬による麻酔効果は中枢神経系における興奮性シナプス伝達の抑制および抑制性シナプス伝達の促進があげられる。しかし、化学伝達物質の神経終末部からの遊離に必要な神経の興奮伝導そして神経終末部での Ca²⁺ チャネル開口に必要な Na⁺ 電流 (I_{Na}) に及ぼす静脈麻酔薬の効果は十分に知られていない。また、シナプス前神経終末部の直径は 1 μ m 以下と微小なため、現存のテクニックでは終末部の I_{Na} を直接的に記録できない。よって、本研究ではラット海馬の CA3 錐体ニューロンを機械的に単離、電圧固定法を用いて静脈麻酔薬（ペントバルビタール、プロポフォール、ケタミン）が Na⁺ 電流 (I_{Na}) に及ぼす効果を検討した。実験には生後12~18日齢の Wistar 系ラットを用いた。厚さ400 μ m の海馬スライス標本を作製し、機械的刺激を与え単離した CA3 ニューロンにホールセルパッチクランプ記録法を用いて I_{Na} を記録し、 I_{Na} への静脈麻酔薬の効果を検討した。

静脈麻酔薬は I_{Na} を濃度依存的に抑制し、その抑制効果の強さは、プロポフォール ($IC_{50} = 45 \mu$ M) > ペントバルビタール ($IC_{50} = 2$ mM) > ケタミン ($IC_{50} = 3.8$ mM) であった。これらの結果から静脈麻酔薬は μ M 以上で I_{Na} を抑制することが明らかとなった。上記の静脈麻酔薬が実際に臨床で用いられる場合、濃度は nM から μ M の間と推定されているので、臨床濃度での静脈麻酔薬は Na⁺ チャネルに対し影響を与えないことが示唆された。

キーワード：Na⁺ チャネル、静脈麻酔薬、CA3ニューロン

I. 緒言

麻酔薬は中枢神経系 (Central nervous system;

CNS) 全般に働きかつ特異的に CNS を抑制し、無痛、意識喪失、骨格筋弛緩、自律神経反射の消失を引き起こすので外科的手術には欠かせない。また麻

学科

¹未病リハビリセンター ハレル

²熊本リハビリテーション病院 リハビリテーション部

³帝京大学 福岡医療技術学部

⁴熊本保健科学大学 医学検査学科

⁵熊本保健科学大学 リハビリテーション学科 理学療法学専攻

*責任著者：karosu94@kumamoto-hsu.ac.jp

酔薬は痛みの感覚を一時的に除去する局所麻酔薬と全身麻酔薬に分類され、全身麻酔薬は臨床現場で広く使用されているにもかかわらず、その麻酔の作用機序は未だ明らかにされていない。全身麻酔薬の作用機序の仮説の一つとして、静脈麻酔薬及び吸入麻酔薬による麻酔効果は、中枢神経系における興奮性シナプス伝達の抑制および抑制性シナプス伝達の促進といわれている。Nicollらは最初に全身麻酔薬が抑制性シナプス伝達を増強することを報告し¹⁾、 γ -アミノ酪酸 (GABA) を介するシナプス抑制は麻酔薬の標的部位として研究されてきた。また、興奮性シナプス伝達に対する全身麻酔薬の影響も多く報告されている。これらの知見は全身麻酔薬が興奮性と抑制性シナプス伝達をそれぞれ修飾することにより麻酔作用を発現することを示唆している。しかし、ニューロンの興奮に必須である Na^+ 電流に及ぼす静脈麻酔薬の効果は十分に知られていない。よって、ラット海馬 CA3 錐体ニューロンを機械的に単離して、電圧固定下にホールセルパッチクランプ法によって電位依存性 Na^+ 電流 (I_{Na}) を記録し、テトロドトキシン (TTX) 及び静脈麻酔薬 (ケタミン, ペントバルビタール, プロポフォール) が Na^+ 電流に及ぼす効果を比較検討した。

II. 方法

1. 試薬

静脈麻酔薬はペントバルビタール, プロポフォールとケタミンで、全て Sigma (St. Louis, MO, USA) を用いた。

2. 実験動物

ウイスター系ラット (12-18日齢) を用いた。

ラットは市販の飼料および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は12時間ごとに明暗のコントロールを行った。さらに室温22.0°C, 湿度55±5%の条件下で飼育した。動物の飼育および実験に関しては熊本保健科学大学実験規則を遵守した。

3. 海馬 CA3 錐体ニューロンの単離

CA3 錐体ニューロンはラット海馬の背側部から分離したものを使用した。生後12-18日齢のウイスター系ラットにペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) を腹腔内投与し、深麻酔後に断頭し、海馬を含む脳部位を素早く摘出した。次に、氷冷したインキュベーション溶液で満たしたチャンバーに摘出脳を浸漬し、マイクロスライサー (VT1200S; Leica) で厚さ400 μm の脳海馬薄切片 (スライス) 標本作製した。インキュベーション溶液の組成 (mM) は NaCl 124, KCl 15, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.3, CaCl_2 2.4, glucose 10と NaHCO_3 24で、95 % O_2 -5% CO_2 ガスで飽和して用いた。スライス標本は、室温 (21-24°C) でインキュベーション溶液中に約1時間静置してニューロンの生理機能を十分に回復させた後、標準細胞外液で満たした35mm 培養皿 (Primaria 3801; Becton Dickinson) に移した。標準細胞外液の組成 (mM) は、NaCl 150, KCl 5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, Glucose 10, HEPES 10で Tris-base により pH を7.40に調整した。その後、実体顕微鏡下でスライス標本の CA3 領域を確認し、その標本表面に先端を火炎で丸めた微小ガラスピペット先端を接触させ、0.3~0.5 mmの振幅で50~60 Hzの機械的振動を与えて CA3 ニューロンの単離標本作製した (図1A)²⁾。単離した CA3 ニューロンは、標準細胞外液中に10~15分程度放置して、培養皿底に付着させた後、電気生理学的実験に使用した。

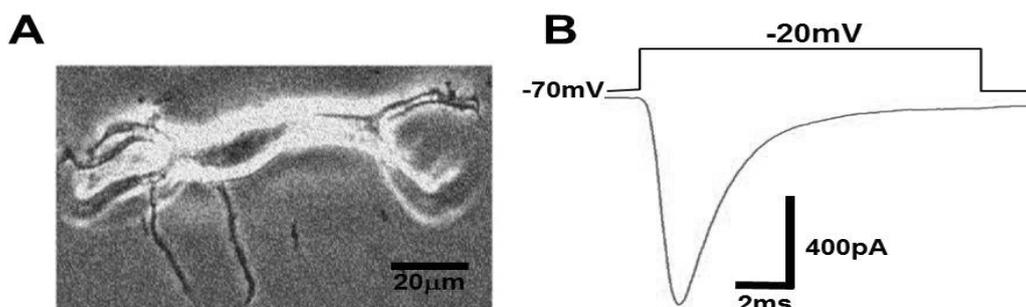


図1. パッチクランプ記録法

(A) 単離 CA3 ニューロン標本

(B) Na^+ 電流 (I_{Na})

4. 電位依存性 Na⁺ チャンネル電流

Na⁺ 電流 (I_{Na}) は、膜電位固定下でホールセルパッチクランプ法によって記録した。記録用パッチ電極は外径1.5 mm, 内径0.9 mm のガラス管 (Model GD-1.5; Narishige Scientific Instruments Lab.) をパッチ電極作成機 (Model PP830; Narishige, Tokyo, Japan) にて作製した。作成したパッチ電極には細胞内液を充填し、電気抵抗が 3~4M Ω となるよう調整した。細胞内液 (mM) は NaF30, CsF105, CsCl 5, TEA-Cl 5, EGTA 2, ATP-Mg 2, HEPES 10を用い、pH を Tris-base で7.20に調節した。また、すべての実験は室温 (21-25°C) で行った。 I_{Na} は 2 kHz のフィルターをかけ、アンプ (Multiclamp 700B; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で増幅し、A/D コンバータ (Digidata 1440A; Axon Instruments, Foster City, CA) によってデジタル化した。電圧-パルスプロトコルは A/D コンバータ (Digidata 1440A; Axon Instruments, Foster City, CA) にて作成した。データの収集は pCLAMP 10.2 ソフトウェア (Axon Instruments) を使用した。

5. 統計解析

各種麻酔薬による I_{Na} の抑制率は、以下の式にて算出した。

$$\text{Relative } I_{Na} = I / I_0$$

I はテトロドトキシン (TTX) または麻酔薬投与後の I_{Na} ピーク値, I_0 は何も添加していない対照の I_{Na} ピーク値を示す。用量-抑制曲線は、Origin software (OriginLab, Northampton, MA) の用量反応方程式を使用して IC_{50} 値を求め、各麻酔薬の効果を比較した。またグループ間の有意差は分散分析 (ANOVA) によって統計処理し、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

III. 結果

1. TTX による電位依存性 Na⁺ 電流の抑制

単離 CA3 錐体ニューロンの膜電位を -70 mV に固定し、-20 mV の脱分極ステップパルス (10ms の刺激時間) を与え、電位依存性 Na⁺ 電流 (I_{Na}) を誘発した (図 1 B)。図 2 A に、TTX による I_{Na} の用量-抑制曲線を示す。300 nM TTX により I_{Na}

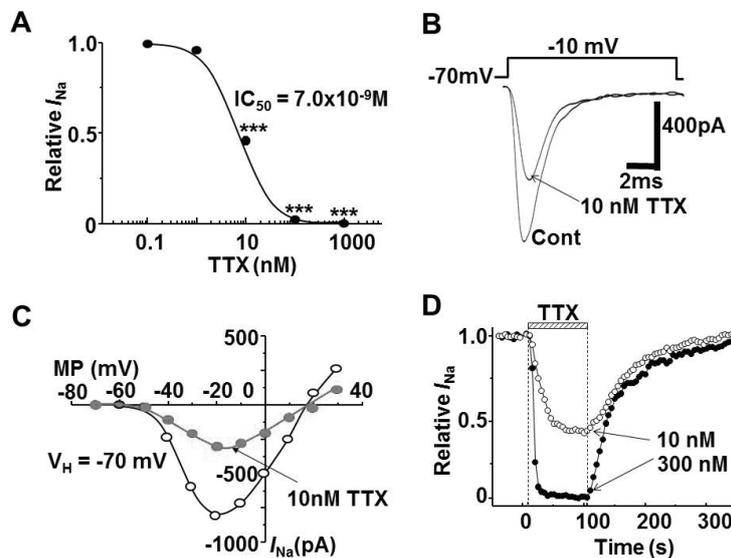


図2. TTX による I_{Na} の抑制効果

- (A) TTX による I_{Na} の用量-抑制曲線. 横軸は TTX の濃度, 縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率. 各点は, 5-8個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM.
- (B) 10 nM TTX による I_{Na} の抑制を示す典型例.
- (C) TTX 存在下 (●) または TTX 無し (○) での I_{Na} の電流-電圧曲線 (I-V 曲線). 脱分極パルスを, 保持電位 (V_H) -70mV から +50 mV まで 10 mV ずつ段階的に増加させて記録.
- (D) TTX 添加による I_{Na} の抑制と洗浄後の回復時間
 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; MP, 膜電位; V_H , 保持電位

が完全に抑制されることが分かる。図2Bは10 nM TTXによる I_{Na} 抑制効果を示す。図2Cは、TTXの有無による I_{Na} の電流-電圧($I-V$)曲線を示す。 I_{Na} は -20 mVで最大ピーク電流値に達し、その後電圧を上げるに従って電流は減少し、 $+20$ mV周辺で逆転電位に達している(電流が内向きから外向きへ逆転)。これは実験に使用した細胞外と細胞内の Na^+ 濃度が、それぞれ60 mMと30 mMであることから、ネルンストの式により算出される理論上の Na^+ 平衡電位(E_{Na})の理論値である17.5 mVとよく合致した。また、TTXは電流-電圧曲線の形を変えず、電流を全体的に押しこむように抑制した。すなわちTTXの効果に電位依存性の抑制は見られなかった。図2Dでは、TTX添加後、 I_{Na} は素早く抑制され、TTX洗浄後、時間をかけて回復する過程を示した。

2. 単離 CA3 ニューロンの I_{Na} に及ぼす 静脈麻酔薬の効果

1) ケタミンの効果

海馬 CA3 ニューロンに様々な濃度のケタミンを与えた場合の I_{Na} に対する効果を確認した。ケタミ

ンは濃度依存的に I_{Na} を抑制した(図3A)。図3Bと図3Cは3 mM ケタミンが I_{Na} の膜電位や平衡電位を変化させることなく I_{Na} を著明に抑制することを示す。図3Dはケタミンが I_{Na} を抑制する時間経過をTTX(300 nM)と比較したものを示す。また、ケタミンはTTXと同様に洗浄により I_{Na} の緩やかな回復を示した。

2) ペントバルビタールの効果

I_{Na} に対するペントバルビタールの効果を検討するため、海馬 CA3 ニューロンに様々な濃度のペントバルビタールを与えた場合の I_{Na} に対する効果を検討した。ペントバルビタールは図4Aに示すように濃度依存的に I_{Na} を抑制する。図4Bは、300 μ M ペントバルビタールの I_{Na} への効果である。ペントバルビタールは I_{Na} の膜電位や平衡電位を変化させることなく抑制率は低いものの I_{Na} を抑制した(図4C)。図4Dはペントバルビタールが I_{Na} を抑制する時間経過を示す。ペントバルビタールの洗浄により I_{Na} は緩やかに回復したが完全に回復した。

3) プロポフォールの効果

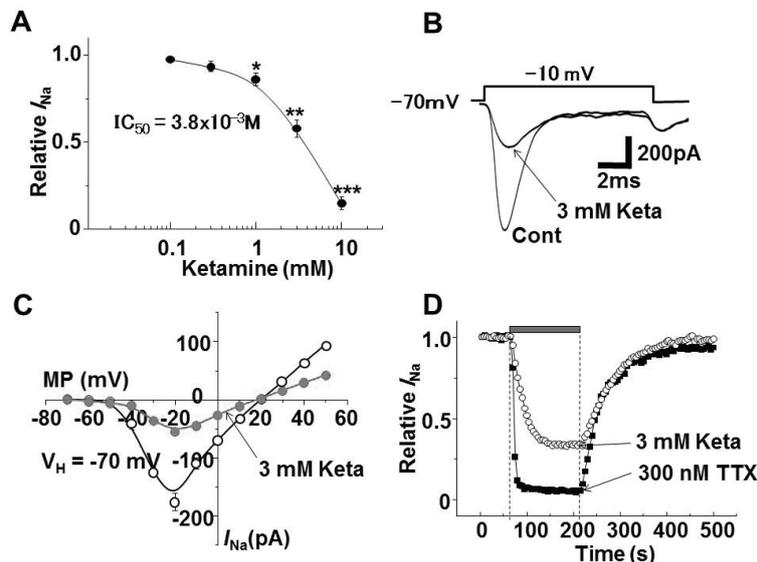


図3. ケタミンによる I_{Na} の抑制効果

- (A) ケタミンによる I_{Na} の用量-抑制曲線。横軸はケタミンの濃度、縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率。各点は、5-8個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM。
 (B) 3 mM ケタミンによる I_{Na} の抑制の典型例。
 (C) ケタミン存在下(●)またはケタミン無し(○)での I_{Na} の電流-電圧曲線。
 (D) ケタミン添加による I_{Na} の抑制とその回復時間の経過。

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; MP, 膜電位; V_H , 保持電位

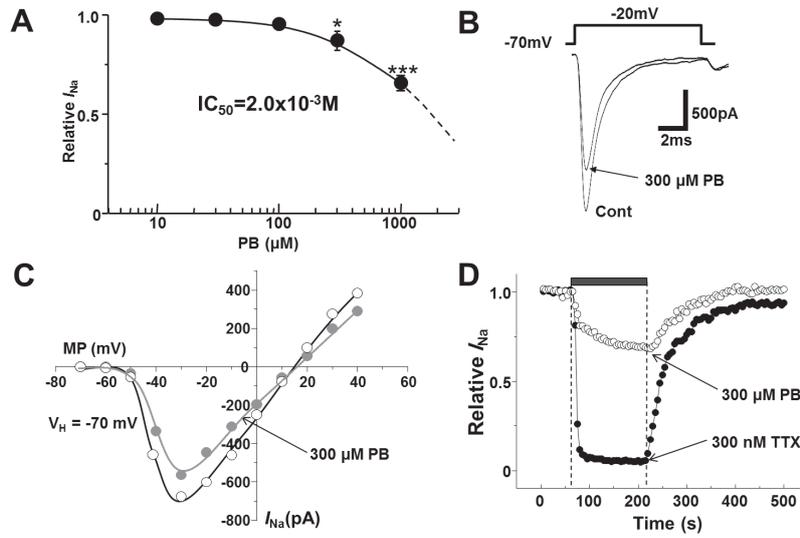


図4. ペントバルビタールによる I_{Na} の抑制効果

- (A) ペントバルビタールによる I_{Na} の用量-抑制曲線. 横軸はペントバルビタールの濃度, 縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率. 各点は, 5-8個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM.
- (B) 300 μ M ペントバルビタールによる I_{Na} の抑制効果
- (C) ペントバルビタール存在下 (●) またはペントバルビタール無し (○) での I_{Na} の電流-電圧曲線.
- (D) ペントバルビタール添加による I_{Na} の抑制とその回復時間の経過.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; MP, 膜電位; VH, 保持電位

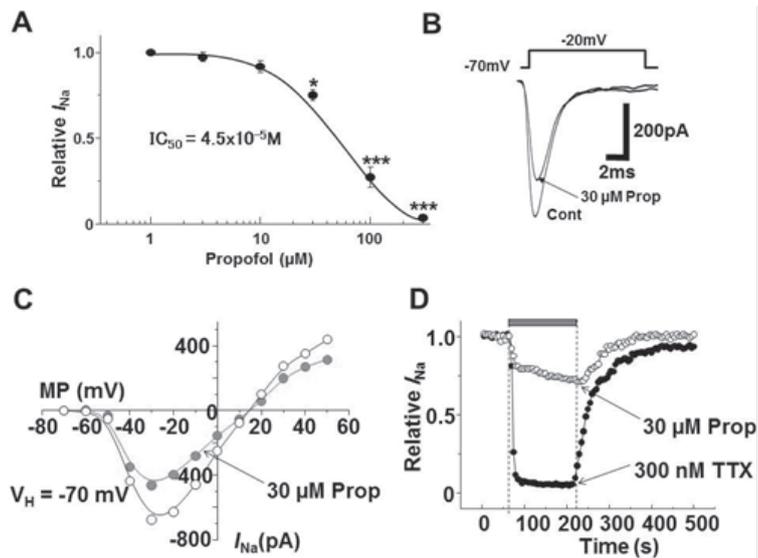


図5. プロポフォール (Propofol) による I_{Na} の抑制効果

- (A) プロポフォールによる I_{Na} の用量-抑制曲線. 横軸はプロポフォールの濃度, 縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率. 各点は, 5-8個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM.
- (B) 30 μ M プロポフォールによる I_{Na} の抑制効果.
- (C) プロポフォール存在下 (●) またはプロポフォール無し (○) での I_{Na} の電流-電圧曲線.
- (D) プロポフォール添加による I_{Na} の抑制とその回復時間の経過.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; MP, 膜電位; VH, 保持電位

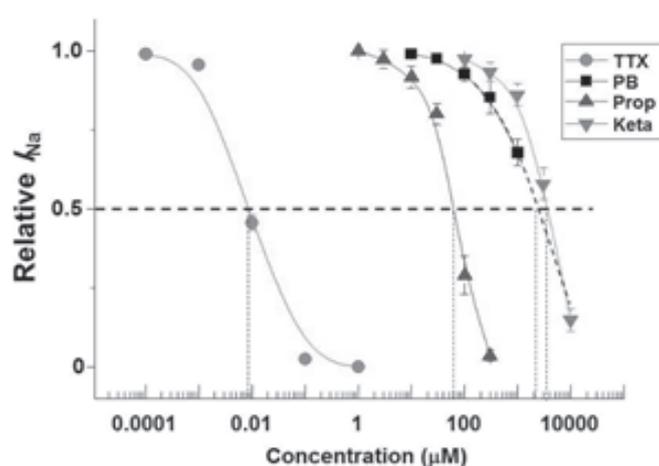


図6. 各静脈麻酔薬による希釈-抑制曲線

それぞれの点は、5-8個のニューロンにより記録したデータの平均値±SEM.

これまでの静脈麻酔薬同様、様々な濃度のプロポフォールを与えた場合の I_{Na} に対する効果を確認した。図5Aで示すようにプロポフォールは濃度依存的に I_{Na} を抑制した。図5Bは、30 μ Mプロポフォール存在下の I_{Na} の抑制波形を示している。プロポフォールは電流-電圧曲線の形を変えず電流のみを全般的に抑制した(図5C)。図5Dはプロポフォールによる I_{Na} の抑制とプロポフォール洗浄後の I_{Na} 回復の時間経過を示す。

3. 各静脈麻酔薬の I_{Na} への抑制効果のまとめ

3種の静脈麻酔薬により I_{Na} は濃度依存的に抑制され、IC₅₀値から得られる抑制の強さは、プロポフォール>ペンバルビタール>ケタミンという結果になった(図6)。しかし、これらの抑制は臨床濃度よりも高い濃度でのみみられた。

IV. 考察

電位依存性 Na^+ チャネルはHodgkinとHuxleyによるイカの巨大軸索を用いた研究によりその存在が予測され、1984年に沼博士らによって遺伝子が同定された³⁾。 Na^+ チャネルは細胞の興奮のトリガーである。 Na^+ チャネルは細胞外に量が最も多い陽イオンである Na^+ を細胞外から内へ透過させることで、大きな内向き電流を生じて細胞膜の脱分極を効率良くもたらす。この Na^+ チャネルは中枢神経や末梢神経、骨格筋、心筋、内分泌細胞等に広く存在し、

電位依存性 K^+ チャネルと膜電位を介して機能的に共役することで、活動電位の発火およびその伝搬に本質的な役割を担っている。また、現在ではチャネルの構造と機能の関係もかなり理解が進んでいる。 Na^+ チャネルは α サブユニットと β サブユニットから構成され、それぞれサブタイプ(α サブユニット; $NaV1.1\sim 1.9$, β サブユニット; $\beta 1\sim \beta 3$)が明らかになっている。これらはそれぞれの発現部位や発生段階における発現のタイミング、および分子特性や薬理学的特徴が異なっている⁴⁾。最近の報告によると、全身麻酔薬が神経興奮に必須である Na^+ チャネルに対して抑制効果を示すとの報告がある。全身麻酔薬の作用機序の仮説の一つとして、静脈麻酔薬による麻酔効果は中枢神経系の興奮の抑制によるといわれている。静脈麻酔薬は麻酔を速く誘導するために使用されるが、回復も早いので他の吸入麻酔薬と一緒に使用される。静脈麻酔薬は鎮痛効果が少なく、筋弛緩作用などを起こす。これまでペンバルビタール、ケタミン、プロポフォールなど静脈麻酔薬の Na^+ チャネルに対する効果は多く報告されている^{5,6)}。Rehbergらはペンバルビタールとプロポフォールがラットの脳及び筋バイオ細胞の Na^+ チャネルに対する抑制効果を報告しており^{5,6)}、RehbergやHaeselerらはプロポフォールがチャイニーズハムスター卵巣細胞とヒト骨格筋の Na^+ チャネルを抑制することを報告している^{6,7)}。また、WagnerやHaraらは、ケタミンがラット骨格筋及びモルモット心室筋細胞の Na^+ チャネルを抑制す

ることを報告した⁸⁾。しかし、これらの報告は筋又は末梢神経細胞での報告である。

本研究はラット中枢神経 CA3 ニューロンを用いた実験を遂行した。その結果、これらの静脈麻酔薬は I_{Na} を濃度依存的に抑制したが、その I_{Na} の抑制は μ M 以上で発現した。実際に臨床で用いられる場合、これらの静脈麻酔薬は、ペントバルビタールが 15μ M、ケタミンは 88μ M、プロポフォールは 1.7μ M⁹⁾ といわれており、今回の結果から臨床濃度の静脈麻酔薬では I_{Na} に対する抑制効果を示さないことが示唆された。

V. 結語

全身麻酔薬である静脈麻酔薬の I_{Na} に対する抑制効果を確認した。その結果、臨床濃度では影響が認められないことが示唆された。よって、今後の研究では吸入麻酔薬や各種麻酔薬のシナプス前終末部に存在する Na⁺ チャネルへの特異的抑制効果の有無を活動電位依存性の化学伝達物質の遊離による応答を指標として検証する必要がある。

VI. 文献

- 1) Ogata N, Ohishi Y: Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn. J. Pharmacol.* 88 (4) : 365-377, 2002
- 2) Nicoll RA: The effects of an aesthetics on synaptic excitation and inhibition in the olfactory bulb. *J. Physiol. (Lond)* 223 : 803-814, 1972
- 3) Perouansky M, Baranov D, Salman M: Effects of halothane on glutamate receptor-mediated excitatory postsynaptic currents. *Anesthesiol.* 83 : 109-119, 1995
- 4) Rehberg B, Duch DS, Daniel S: Suppression of central nervous system sodium channels by propofol. *Anesthesiol.* 91 (2) : 512-520, 1999
- 5) Richards CD: On the mechanism of halothane anesthesia. *J. Physiol. (Lond)* 233 : 439-456, 1973
- 6) Wagner L, Gingrich K, Kulli J, et al: Ketamine blockade of voltage-gated sodium channels: evidence for a shared receptor site with local anesthetics. *Anesthesiol.* 95 (6) : 1406-1413, 2001
- 7) Haeseler G, Störmer M, Bufler J, et al: Propofol blocks human skeletal muscle sodium channels in a voltage-dependent manner. *Anesth. Analg.* 92 (5) : 1192-1198, 2001
- 8) Hara Y, Chugun A, Nakaya H, et al: Tonic block of the sodium and calcium currents by ketamine in isolated guinea pig ventricular myocytes. *J. Vet. Med. Sci.* 60 (4) : 479-483, 1998
- 9) MacIver MB, Mikulec AA, Amagasu SM: Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiol.* 85 : 826-834, 1996

(平成29年2月8日受理)

Effects of intravenous anesthetics on voltage-dependent Na⁺ channel in hippocampal CA3 neurons

Toshinori ONOSHITA, Shouhei FUKAMACHI, Takashi YUKIHIRA,
Tetsuko TANAKA, Min-Chul SHIN

There are many reports about the theories of anesthetics mechanisms, though the mechanisms are unclear. Therefore, effects of intravenous (ketamine, pentobarbital, and propofol) anesthetics were examined on voltage-dependent sodium current (I_{Na}) recorded from cell body of dissociated single rat hippocampal CA3 neurons. I_{Na} was evoked by a depolarizing step pulse with 10 ms duration in dissociated CA3 neurons from holding potential (V_H) of -70 to -20 mV. In the present results, ketamine, pentobarbital, and propofol inhibited I_{Na} in a concentration-dependent manner, respectively. The inhibitory effects estimated from IC_{50} values of intravenous anesthetics on I_{Na} were in the order of propofol (0.045 mM) > pentobarbital (2.0 mM) > ketamine (3.8 mM). In summary, the present study has shown that both intravenous anesthetics did not affect on voltage-dependent Na⁺ channels at their clinically relevant concentrations at all. These results suggest that clinical concentrations of intravenous (ketamine, pentobarbital, and propofol) anesthetics may be act more strongly on different sites such as the post synaptic or presynaptic receptors of inhibitory (GABA) or excitatory (glutamate) than the voltage-dependent Na⁺ channels.

Keywords : voltage-dependent Na⁺ channel, intravenous anesthetics, hippocampal CA3 neuron rat