

[原著]

海馬 CA3ニューロンの電位依存性 Na⁺ チャンネルに対する 吸入麻酔薬の効果

行 平 崇¹ 尾 下 俊 徳²
田 中 哲 子³ 申 敏 哲^{4,*}

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

Takashi YUKIHIRA, Toshinori ONOSHITA, Tetsuko TANAKA, Min-Chul SHIN*

要旨

吸入麻酔薬は主に外科手術の際に、鎮痛、筋弛緩、反射の抑制といった目的で、静脈麻酔薬とともに広く使用されている。吸入麻酔薬は、細胞膜の物理化学的性質、各種タンパクの高次構造、各種受容体・イオンチャンネル、シナプス伝達など、ほとんどすべての生命現象に対して可逆的な影響を与えるとされている。吸入麻酔薬の作用機序の仮説の一つとして、中枢神経系における抑制性シナプス伝達の促進や興奮性シナプス伝達の抑制があげられるているが、神経伝達物質の遊離に必要な神経の興奮電導や神経終末の Ca²⁺ チャンネル開口などの細胞の興奮に関与する電位依存性 Na⁺ チャンネルに吸入麻酔薬がどのような効果をもたらすのかについては、未だ不明な部分が多い。従って、本研究では吸入麻酔薬（セボフルラン、エンフルラン、ハロタン、イソフルラン）が電位依存性 Na⁺ チャンネルに及ぼす効果をラットの海馬 CA3 錐体ニューロンを用いて検証した。Wistar 系ラット（生後12~18日齢）の海馬から400 μm の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、各種吸入麻酔薬の効果を比較検討した。その結果、高濃度のハロタンのみで若干の I_{Na} 抑制作用が見られたが、臨床濃度においてはいずれの吸入麻酔薬も電位依存性 Na⁺ チャンネルに対する抑制効果は認められなかった。これらの結果から、吸入麻酔薬の臨床濃度では Na⁺ チャンネルに影響与えない可能性が示唆された。

キーワード：Na⁺ チャンネル，吸入麻酔薬，CA3ニューロン

I. はじめに

吸入麻酔薬は、細胞膜の物理化学的性質、各種蛋白の高次構造、各種受容体・イオンチャンネル、シナプス伝達など、ほとんど全ての生命現象に対して可逆的な影響を与えるとされている¹⁾。また麻酔薬は、

無痛、意識喪失、骨格筋弛緩、各種反射の抑制を引き起こすとされ、今日の外科的手術には欠かせない存在である。麻酔薬は意識の消失を伴わず作用部位が限られている局所麻酔薬と、全身麻酔薬に分類され、さらに全身麻酔薬は吸入麻酔薬と静脈麻酔薬とに大別される。吸入麻酔薬は呼吸器より体内に取り

所属

¹帝京大学 福岡医療技術学部 理学療法学科

²未病リハビリセンター ハレル

³熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

⁴熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科 理学療法学専攻（兼）大学院 保健科学研究科

*責任著者：karosu94@kumamoto-hsu.ac.jp

込まれた後に肺胞で血液に移行し、血流に乗って脳内に運ばれて脳組織に移行するのに対し、静脈麻酔薬は静脈投与路より血流を通じて作用部位である脳に到達して麻酔作用を発揮する。これらの全身麻酔薬は臨床現場で広く使用されているにも関わらず、その作用機序は未だ十分には明らかにされていない。麻酔の安全性や質、副作用などの改善に繋がり得ることからこれらの作用機序の解明が重要な課題となっている。全身麻酔薬が抑制性シナプス伝達を増強することを Nicoll²⁾ らが報告したのをかわきりに、 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。Richards³⁾ は中枢神経系の標本にてハロタンが興奮性シナプス伝達を抑制することを報告し、Perouansky⁴⁾ ら、MacIver⁵⁾ らはパッチクランプ法により、ハロタンがグルタミン酸受容体を介し興奮性シナプス後電流を抑制することを報告した^{4,5)}。これらは全身麻酔薬が興奮性と抑制性シナプス伝達の双方に関与している可能性を示唆している。しかし、神経終末部からの神経伝達物質の遊離に必要な神経の興奮電導、また終末部に存在している電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口に必要な電位依存性 Na^+ チャネルに吸入麻酔薬がどのような効果をもたらすのかについて、その作用機序は不明な部分が多い。これまでの我々の研究⁶⁾ にて、静脈麻酔薬が Na^+ チャネルに及ぼす効果を検討して来た。今回の研究では、電位依存性 Na^+ チャネルに及ぼす吸入麻酔薬の影響が静脈麻酔薬と何が違うかを検討する為に、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 Na^+ チャネル電流 (I_{Na}) を記録し、吸入麻酔薬 (エンフルラン、セボフルラン、イソフルラン、ハロタン) が I_{Na} に及ぼす効果を比較検討した。

II. 対象および方法

1. 試薬

今回の実験において、セボフルランは丸石製薬 (Osaka, Japan)、エンフルランはアボットジャパン (Osaka, Japan)、ハロタンは AstraZeneca (Alderley Park, UK)、イソフルランは Merck Animal Health (Madrid, Spain) を用いた。また各種麻酔薬は、使用直前に密閉したガラス管の中で 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させて 1 M の原液を作製し、その後 10 ml 外液と混合して使用濃度に調整

した後に細胞に投与した。

2. 実験動物

実験には Wistar 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

生後 12-18 日齢のラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与し、深麻酔下で断頭し、海馬を含む脳部位を素早く摘出した後に、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 35 mm 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 1 A)。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うえで電気生理学的実験に使用した。

4. 電位依存性 Na^+ チャネル電流

電位依存性 Na^+ チャネル電流 (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.) をパッチ電極作製機 (Model PP830; Narishige, Tokyo, Japan) にて作製した。作製したパッチ電極には細胞内液を充填し、電気抵

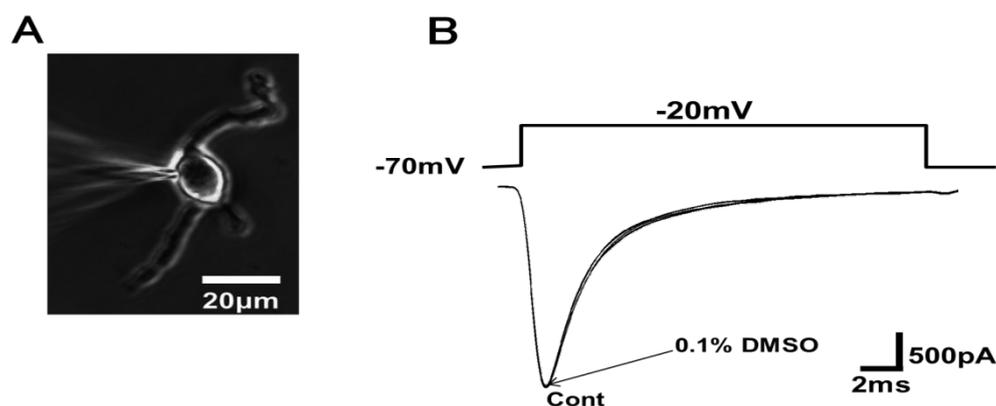


図1. パッチクランプ記録法

(A) 単離 CA3ニューロン標本 (B) Na⁺ 電流 (I_{Na}), Cont : Control DMSO : Dimethyl sulfoxide

抗が 3 ~ 4 M Ω となるよう調整した。細胞内液 (mM) は NaF 30, CsF 105, 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 $^{\circ}$ 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; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) によってデジタル化した。電圧 - パルスのプロトコルは 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 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 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。濃度依存的用量 - 抑制曲線は, Origin software (OriginLab, Northampton, MA) の用量反応方程式を使用して IC₅₀ 値を求め, 各麻酔薬の効果と比較した。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. I_{Na} への TTX による抑制

CA3ニューロンの膜電位を -70 mV に固定し, -30 mV ~ -10 mV の脱分極ステップパルス (10 ms の刺激時間) を与え, I_{Na} を誘発させた。各種麻酔薬は, DMSO に溶解させ, その後 DMSO の濃度が 0.1% 以下になるよう使用濃度を調整した為, I_{Na} に対する 0.1% DMSO の影響を検討した。図 1 B は 0.1% DMSO の影響を示す。0.1% DMSO は I_{Na} に対して影響を与えなかった。図 2 A は, I_{Na} に対する TTX の抑制効果を示す。TTX は I_{Na} を濃度依存的に抑制し, 300 nM 以上で I_{Na} を完全に抑制させた。図 2 B は 10 nM TTX による I_{Na} 抑制効果を示す。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 (図 2 C)。TTX 投与後, I_{Na} は素早く抑制され, 洗浄後, 濃度依存的に時間がかかって回復する過程を示した (図 2 D)。

2. 単離 CA3ニューロンの I_{Na} に及ぼす吸入麻酔薬の効果

海馬 CA3ニューロンに様々な濃度の吸入麻酔薬 (セボフルラン: 図 3, エンフルラン: 図 4, ハロタン: 図 5, イソフルラン: 図 6) を与えた場合の I_{Na} に対する効果を確認した。その結果, 臨床濃度⁷⁾ (セボフルラン: 300 μ M, エンフルラン: 600 μ M, ハロタン: 300 μ M, イソフルラン: 300 μ M) においてはいずれの吸入麻酔薬も I_{Na} に対して抑制効果を示さなかった。しかしハロタンのみ臨床濃度を超

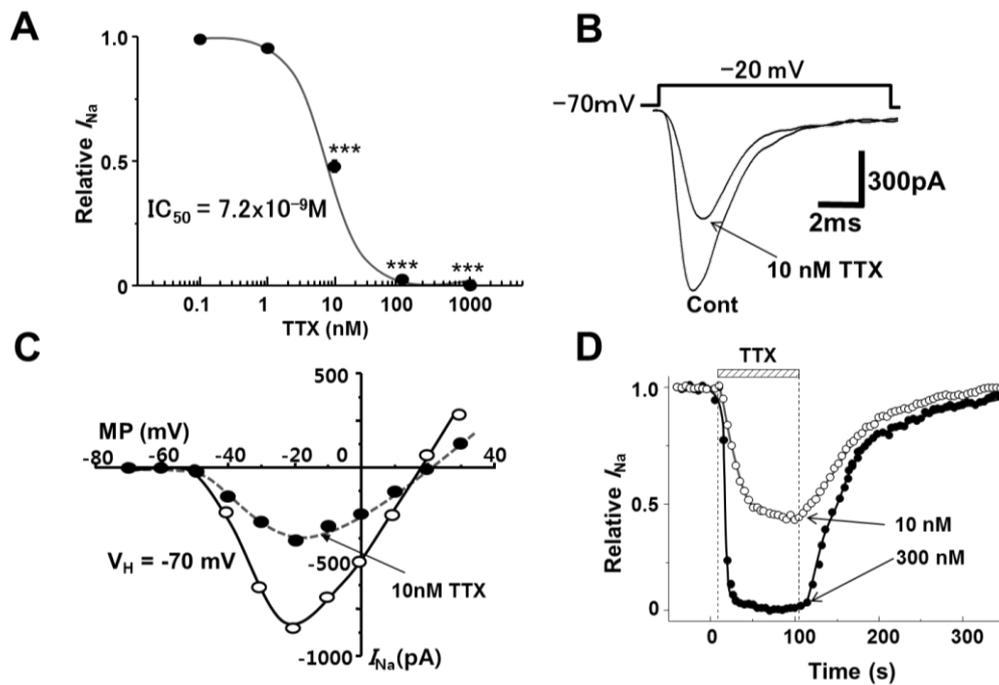


図2. TTX による I_{Na} の抑制効果

- (A) TTX による I_{Na} の用量 - 反応曲線. 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. Cont : Control
- (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

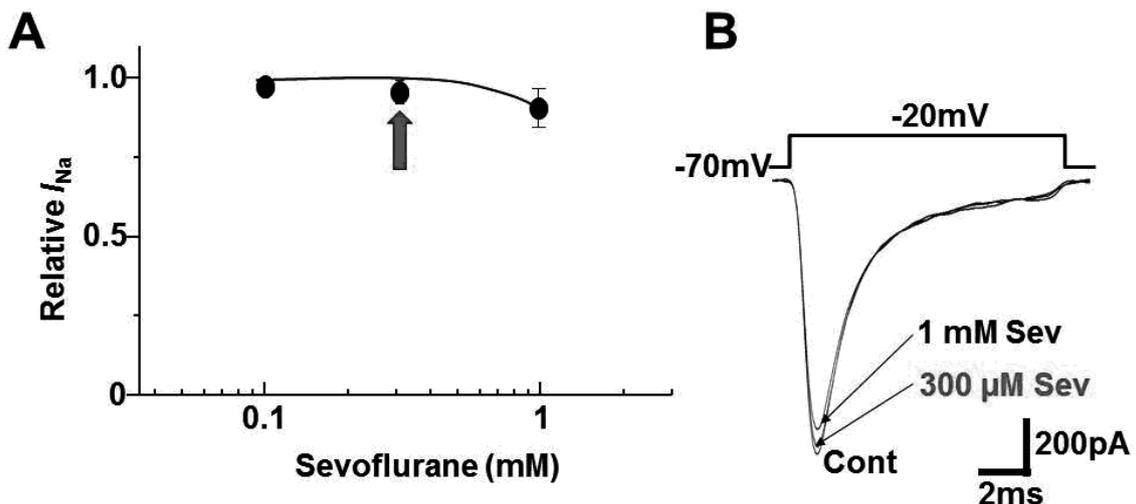


図3. セボフルランによる I_{Na} の抑制効果

- (A) セボフルランによる I_{Na} の濃度抑制曲線. 横軸はセボフルランの濃度, 縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率. 各点は, 5 - 6 個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM. 矢印はセボフルランの臨床濃度を示す.
- (B) セボフルラン投与時の代表波形. Cont : Control, Sev : セボフルラン

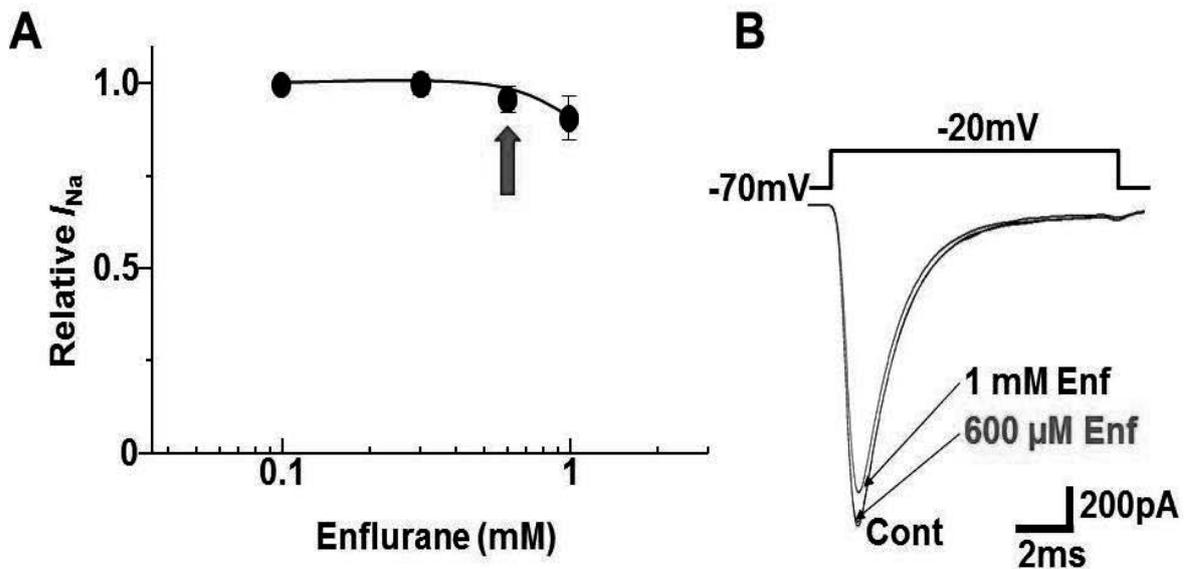


図4. エンフルランによる I_{Na} の抑制効果

- (A) エンフルランによる I_{Na} の濃度抑制曲線. 横軸はエンフルランの濃度, 縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率. 各点は, 6 個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM. 矢印はエンフルランの臨床濃度を示す.
- (B) エンフルラン投与時の代表波形. Cont: Control, Enf: エンフルラン.

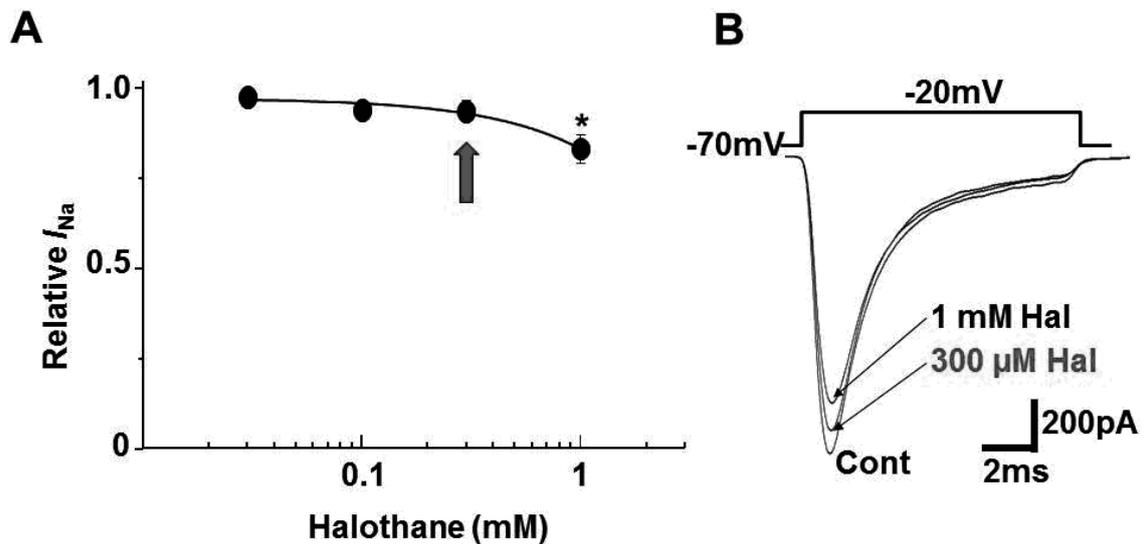


図5. ハロタンによる I_{Na} の抑制効果

- (A) ハロタンによる I_{Na} の希釈-抑制曲線. 横軸はハロタンの濃度, 縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率. 各点は, 5 - 6 個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM. 矢印はハロタンの臨床濃度を示す.
- (B) ハロタンによる I_{Na} の抑制効果の代表波形. Cont: Control, Hal: ハロタン.

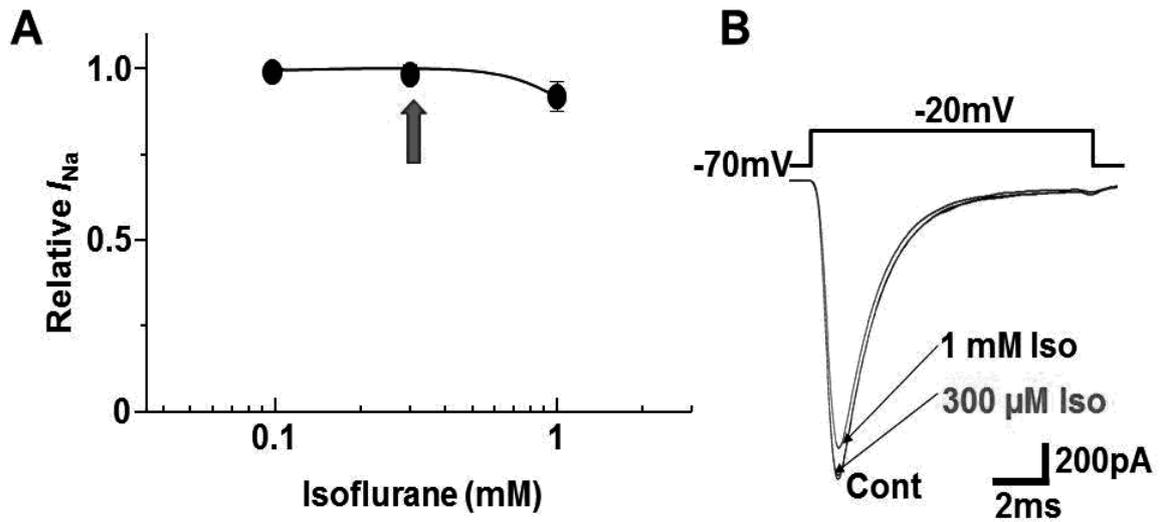


図6. イソフルランによる I_{Na} の抑制効果

- (A) イソフルランによる I_{Na} の濃度抑制曲線. 横軸はイソフルランの濃度, 縦軸は相対的な I_{Na} の抑制率. 各点は, 7個のニューロンにより記録したデータの平均値 \pm SEM. 矢印はイソフルランの臨床濃度を示す.
- (B) イソフルラン投与時の代表波形. Cont: Control, Iso: ソフルラン.

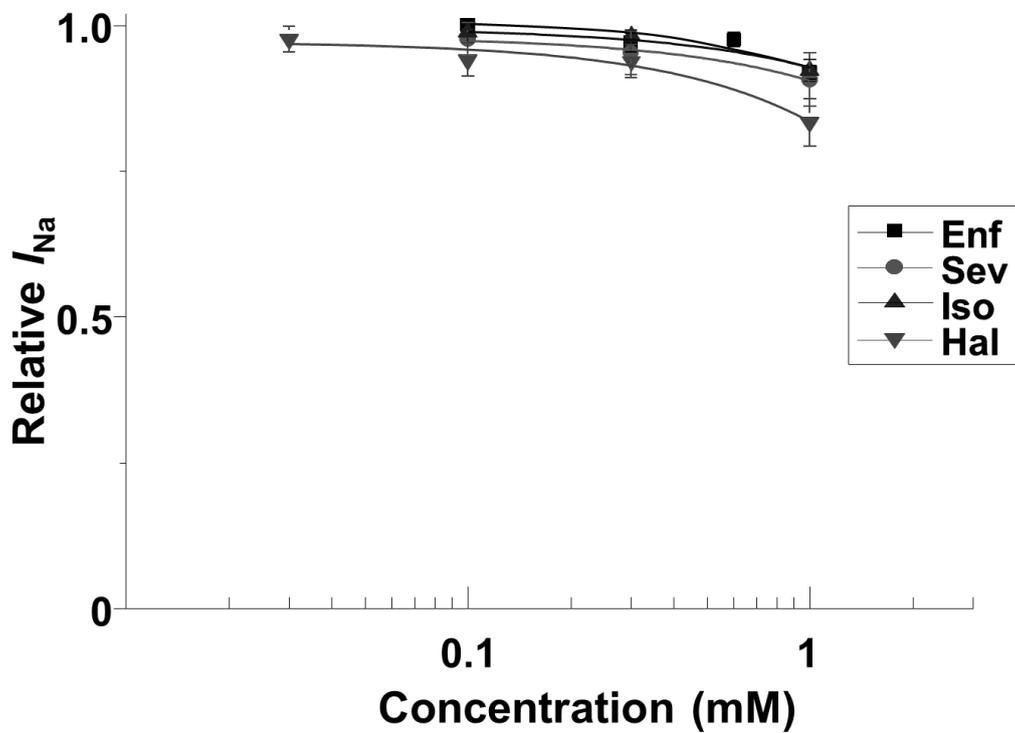


図7. 各吸入麻酔薬による濃度-抑制曲線

Enf: エンフルラン, Sev: セボフルラン, Iso: ソフルラン, Hal: ハロタン
平均値 \pm SEM

えた高濃度において I_{Na} を有意に抑制 ($p < 0.05$) したものの、その他の吸入麻酔薬では抑制効果が認められなかった。

図7は各吸入麻酔薬による濃度-抑制曲線を示す。高濃度のハロタンのみで若干の I_{Na} 抑制作用が見られたが、臨床濃度では抑制効果を示さないことが示唆された。

IV. 考察

Hille は局所麻酔薬が軸索膜内側の Na⁺ チャネル上あるいはその近傍の特異的部位に結合することによりその作用が出現する可能性を電気生理学的手法により示唆した⁸⁾。しかし、電位依存性 Na⁺ チャネルに対する吸入麻酔薬の作用はまだ不明な部分が多い。電位依存性 Na⁺ チャネルは、Hodgkin と Huxley によりその存在が予測されて以来、様々な研究がなされ、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; Nav1.1~1.9, β サブユニット; $\beta 1 \sim \beta 3$) が明らかとなっている⁹⁾。中枢神経系だけでなく、末梢神経系、骨格筋、心筋、内分泌細胞等に広く存在する Na⁺ チャネルは細胞の興奮のトリガーであり、細胞膜の脱分極を効率良くもたらす。近年、全身麻酔薬が Na⁺ チャネルに対して抑制効果を示すことが報告されており、その効果はシナプス後膜側ニューロン細胞体に作用するだけでなく、シナプス前終末部にも作用し、GABA やグルタミン酸のような神経伝達物質の放出にも影響を及ぼすことも報告されている¹⁰⁾。

Yamakura によると、臨床濃度の吸入麻酔薬は GABA_A 受容体やグリシン受容体の著名な機能増強とニコチン性アセチルコリン受容体の著名な機能抑制を示すと報告されており¹¹⁾、Eger によると、いくつかの吸入麻酔薬は電位依存性 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ チャネルに対し、通常臨床的に使用されている濃度よりも高い濃度を必要とする報告されている¹²⁾。本研究でもハロタンのみが臨床濃度を超えた高濃度において若干の I_{Na} の抑制効果を認めたものの、その他の吸入麻酔薬ではそれぞれの臨床濃度で I_{Na} を抑制しないことが明らかとなった。Houston によると吸入麻酔薬の重要な作用ターゲットはニコチン性アセチルコリン、GABA_A、グルタミン酸各受容体

の活性変化に関連があると報告している¹³⁾。また Herold らは、シナプス前終末部に存在する Na⁺ チャネルが、臨床的濃度の吸入麻酔薬によって阻害されると報告しており^{10, 14)}、このことは吸入麻酔薬が細胞体の Na⁺ チャネルよりも神経終末に存在する Na⁺ チャネル、GABA_A 又はグルタミン酸受容体に作用する可能性を示唆する。

中枢神経系と末梢神経系に発現する電位依存性 Na⁺ チャネルは、種類が異なることが知られており、Yu らは中枢神経系に分布する電位依存性 Na⁺ チャネルは Nav1.1, 1.2, 1.6 が広く分布し、1.3 は胎児期の場合に多く発現すると報告しており、なかでもニューロンの細胞体に分布する Na⁺ チャネルは Nav1.1, 1.3 であることが確認されている。末梢神経系において、痛みに関与する Na⁺ チャネルは Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 として知られており、特に Nav1.7 が末梢神経に広く分布し、痛みに関与するとされている¹⁵⁾。したがって、中枢神経系と末梢神経系に分布する電位依存性 Na⁺ チャネルの種類が異なることで、本実験と同様な作用が末梢神経では見られない可能性がある。従って、末梢神経系での作用も検討すべきである。

本研究において、全身麻酔薬の一つである吸入麻酔薬は I_{Na} に対して、臨床濃度では抑制効果をもたないことが示された。今後はシナプス前終末部に存在する Na⁺ チャネルに対する各種麻酔薬の抑制効果を検証する必要がある。

V. 結論

全身麻酔薬のひとつである吸入麻酔薬が I_{Na} に及ぼす影響を検討した。その結果、セボフルラン、エンフルラン、ハロタン、イソフルラン共に、臨床濃度では電位依存性 Na⁺ チャネルに対しては影響与えない可能性が示唆された。今後は、2011年以降用いられるようになったデスフルランを加えた形で、シナプス前終末部に存在する Na⁺ チャネルへの影響の有無も検討する必要がある。

利益相反

本研究における利益相反は存在しない。

VI. 引用文献

- 1) Campagna JA, Miller KW, Forman SA : Mechanisms of action of inhaled anesthetics. *N Engl J Med*, 348 : 2110-2124, 2003.
- 2) Nicoll RA: The effects of anaesthetics on synaptic excitation and inhibition in the olfactory bulb. *J Physiol*, 223 : 803-814,1972.
- 3) Richards CD: On the mechanism of halothane anesthesia. *J Physiol (Lond)*, 233 : 439-456, 1973.
- 4) Perouansky M, Baranov D, Salman M: Effects of halothane on glutamate receptor-mediated excitatory postsynaptic currents. *Anesthesiol*, 83 : 109-119, 1995.
- 5) MacIver, M.B., Mikulec, A.A., Amagasu, S. M.,: Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiol*. 85 : 826-834, 1996.
- 6) 尾下俊徳, 深町翔平, 行平崇, 他 : 電位依存性 Na^+ チャネルに対する静脈麻酔薬の効果., *保健科学研究誌 No.14* : 77-84, 2017.
- 7) Naoki Kotani, Norio Akaike : The effect of volatile anesthetics on synaptic and extrasynaptic GABA-induced neurotransmission. *Brain Research Bulletin* 93 : 69-79, 2013.
- 8) Hille, B.: Local anesthetics; hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor. *reaction J. Gen. Physiol.* 69 : 497-515, 1977.
- 9) Rehberg B, Duch DS, Daniel S: Suppression of central nervous system sodium channels by propofol. *Anesthesiol*, 91 (2): 512-520, 1999.
- 10) Herold KF, Hemmings HCJr : Sodiumchannels as targets for volatile anesthetics. *Front Pharmacol*, 3 : 50, 2012.
- 11) Yamakura T, Bertaccini E, et al: Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol* 41 : 23-51 2001.
- 12) Eger EI, Fisher DM, Dilger JP, et al : Relevant concentrations of inhaled anesthetics for in vitro studies of anesthetic mechanisms. *Anesthesiol*, 94 (5): 915-921, 2001.
- 13) Houston CM, McGee TP, Mackenzie G, et al : Are extrasynaptic GABA_A receptors important targets for sedative/hypnotic drugs? *J Neurosci*, 32 (11): 3887-3897, 2012.
- 14) Herold KF, Nau C, Ouyang W, et al: Isoflurane inhibits the tetrodotoxin resistant voltage-gated sodium channel Nav1.8. *Anesthesiol*, 111 : 591-599, 2009.
- 15) Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4 (3): 207. 2003.

(平成29年12月4日受理)

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

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

Abstract

There are many reports about the theories of anesthetics mechanisms, though the mechanisms are unclear. Therefore, effects of inhalation anesthetics (enflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane) were examined on voltage-dependent sodium current (I_{Na}) recorded from 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, enflurane, sevoflurane, isoflurane, and halothane at their clinically relevant concentrations did not show any effect on I_{Na} , while halothane at higher concentration (1mM) significantly inhibited I_{Na} (to 0.83 ± 0.04 of control, $n=6$, $p<0.05$). In summary, the present study has shown that inhalation anesthetics did not affect on voltage-dependent Na⁺ channels at their clinically relevant concentrations at all. It was revealed that these inhalation anesthetics did not I_{Na} , and it was suggested by this result that these anesthetics did not act for the voltage-dependent Na⁺ channels on a postsynaptic membrane.

Keywords : Na⁺channel, inhalation anesthetics, CA3 neuron