

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462349

研究課題名(和文) GABAおよびグルタミン酸作動性シナプス応答へのキセノンの作用

研究課題名(英文) Effect of xenon on GABA and glutamatergic synaptic responses

研究代表者

野中 喜久 (Nonaka, Kiku)

熊本保健科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：70259745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔に用いられるガス性麻酔薬のキセノン(Xe)が興奮性と抑制性のシナプス伝達をどのように修飾するかを、機械的に単離したラット海馬CA3ニューロンのシナプス・ブートン標本を用いて検討した。その結果、Xeは興奮性グルタミン酸伝達機構をシナプス前終末部とシナプス後膜上のシナプス外受容体の両方で抑制するが、前者により強く作用する。抑制性GABA伝達機構ではシナプス前終末部のみを抑制した。本成果はXeの作用部位は興奮・抑制系共にシナプス後膜側のみであるとの今迄の報告の全てを改める新知見である。

研究成果の概要(英文)：To clarify how a gaseous anesthetic xenon (Xe) modulates the excitatory and inhibitory synaptic transmission, present electrophysiological study was performed in namely “synapse bouton” preparation of rat hippocampal CA3 neurons dissociated mechanically. The preparation allows the detail analysis of Xe action at single and multy synapse levels. Xe inhibits both pre- and postsynaptic sites in glutamatergic transmission while Xe inhibits only presynaptic site in GABAergic transmission, though the predominant action of Xe on glutamatergic transmission is due to presynaptic site. The present result is absolutely a new finding that does not agree with all reports in which Xe acted only the postsynaptic site in both the excitatory and inhibitory system.

研究分野：神経生理

キーワード：シナプス キセノン GABA グルタミン酸

## 1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬は手術等で意識を喪失させるために用いられるが、投与経路によって、吸入麻酔と静脈麻酔に分類される。吸入麻酔薬は気道を経由して投与し、肺胞で血液に溶解されて血流を通じて脳に到達し、麻酔効果を発揮する。現在、よく用いられている吸入麻酔薬のセボフルランやイソフルランは常温では液体なので、気化器が必要(揮発性麻酔薬と呼ばれる)だが、亜酸化窒素(笑気ガス:  $N_2O$ )はそのまま吸引することからガス性麻酔薬に分類される。但し、 $N_2O$  単独での麻酔効果は得られず、静脈麻酔薬と併用しなければならない。

同じガス性麻酔薬に分類されるキセノン( $Xe$ )は分子量が 131.29 と小さく、ガス分配係数(0.115)も低いことから全身麻酔への導入とその覚醒が揮発性吸入麻酔薬(セボフルラン、イソフルラン他)に比べると非常に早い。また、催奇形性もなく、理想の麻酔薬である。しかし、不活性ガスの  $Xe$  は工業的に化学合成出来ず、大気からの分離、濃縮に依存するため高コストである。一方、セボフルランは二酸化炭素吸収剤(ソーダライム)と反応して副産物を生じ麻酔効果が不安定である。また、エンフルランは心血管系および呼吸器系の抑制作用が強い。さらに静脈麻酔薬のプロポフォールもエンフルラン同様、心血管系に対して強い抑制効果を有するため過剰に投与した場合、心拍数や血圧の低下を招く。従って高齢者や循環器・呼吸器合併症の患者への全身麻酔薬の使用には格別の注意が必要となる。そこで、 $Xe$  の作用機序を詳細に検討し、臨床使用への道を新たに開くことは大いに価値がある。

## 2. 研究の目的

$Xe$  による全身麻酔は他の吸入麻酔薬に比し速い麻酔の導入と覚醒が特徴である。しかしその作用機序はいまだ解明されておらず、従って速い麻酔の導入と覚醒の機序も不明である。 $Xe$  は高コストのため現在臨床用されていないが、他の吸入麻酔薬の使用がためられる患者に対しては有用と考えられる。従ってその作用機序に関する基礎研究は重要である。これまで一般的には吸入麻酔薬(揮発性とガス性)と静脈麻酔薬はシナプス後膜に作用し、中枢興奮性シナプス伝達の抑制と抑制性シナプス伝達の促進によって麻酔効果をもたらすと考えられてきている。我々はこれまで多くの揮発性麻酔薬を用いて、ラット中枢単一細胞レベルでシナプス前または後膜、さらには両者にどのように作用するかを明らかにしてきた。本研究では、ガス性麻酔薬の  $Xe$  が既存の揮発性麻酔薬作用とどのように相違するのかをラット中枢単一細胞を用いて比較検討する。

## 3. 研究の方法

生後 10~18 日齢の Wistar 系ラットにソムノペンチル(ペントバルビタール)を腹腔内投与(50 mg/kg)して深麻酔後、脳を摘出した。その後、摘出した脳を氷冷した 95% $O_2$ -5% $CO_2$  ガスで飽和したインキュベーション溶液に移し、厚さ 400  $\mu m$  の脳スライス標本を作製した。神経機能を回復させるため 1 時間放置し、実体顕微鏡下で、海馬 CA3 領域に先端を丸くしたガラスピペットを接触させ、機械的振動(40~50Hz)を与えて CA3 ニューロンを単離した。本ニューロンには興奮性のグルタミン酸(Glu)や抑制性の GABA 作動性神経終末部が正常な生理機能を維持したまま多数付着しており「シナプス・ブートン標本」と呼んでいる。本研究はこの標本を用いて行った。

まず、シナプス下膜の海馬 CA3 錐体細胞上にあるシナプス外  $GABA_A$  受容体と Glu 受容体に対する  $Xe$  の作用を確認した。単離した海馬 CA3 錐体細胞にホールセルパッチクランプ記録法を適用し、細胞外液に GABA またはグルタミン酸(Glu)を添加することによって発生する電流応答を記録した。得られた  $GABA_A$  や Glu 受容体のシナプス外電流応答に対して、 $Xe$  がどのような作用を与えるのか解析した。 $Xe$  は気体であるため、細胞外液に常にバブリングしながら飽和溶解した状態で標本に投与している。

次に、GABA や Glu 作動性神経の自発性シナプス後電流である IPSC や EPSC (sIPSC, sEPSC) を記録した。 $Xe$  の作用は sIPSC と sEPSC の発火頻度、電流振幅と電流のキネティクスを指標として検討した。次にフォ・カル(焦点)電気刺激法(ダブルパルス)で GABA 作動性と Glu 作動性の単一シナプス前神経終末部をそれぞれ選択的に刺激し、活動電位で惹起される抑制性または興奮性シナプス後電流(eIPSC, eEPSC)を記録し、第 1 と第 2 の刺激によって発生した電流応答(P1 と P2)の電流振幅、電気刺激に対するこれらの応答の失敗回数の比(失敗率,  $R_f$ )、P1 と P2 の電流振幅比(P2/P1 ratio; PPR)の ~ を指標に、シナプス前神経終末部からの伝達物質遊離機構への  $Xe$  作用を明らかにした。

## 4. 研究成果

(1) シナプス下膜の海馬 CA3 錐体細胞上にあるシナプス外  $GABA_A$  受容体とグルタミン酸(Glu)受容体に対する  $Xe$  の作用

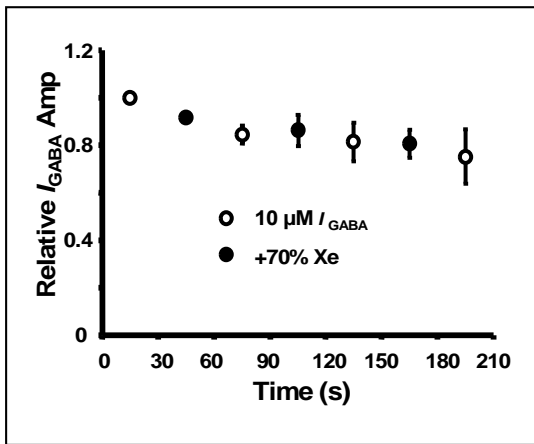


図 1

単離した CA3 シナプス・ブートン標本にパッチ電極を密着させ、保持電位を 0mV にして GABA 10 μM を添加してシナプス後膜側ニューロン上に存在するシナプス外 GABA<sub>A</sub> 受容体で発生する  $I_{GABA}$  を記録する。図 1 に時間経過とともに相対的な電流振幅を示した。 $I_{GABA}$  は経時的に減衰 (run down) を示すが、その減衰経過は Xe によって影響を受けなかった。

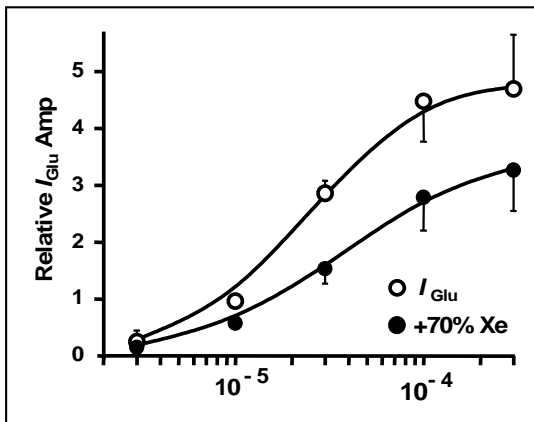


図 2

図 2 は Glu の用量反応曲線で Xe は有意にシナプス外 Glu 受容体によって発生する  $I_{Glu}$  を抑制した。また、2 曲線のパターンから Xe が非競合的に  $I_{Glu}$  を抑制することが示唆され、ラインウェーバー・バークプロットもこのことを確認した。なお、このときの保持電位は GABA 応答の平衡電位に近い -65mV に設定した。

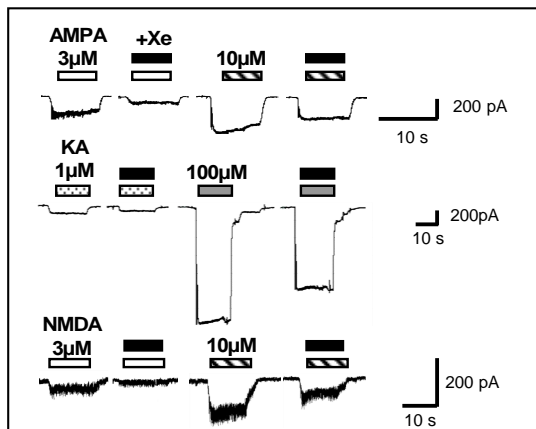


図 3

イオンチャネル型 Glu 受容体は 3 種類のサブタイプがある。よってそれぞれのサブタイプ受容体を選択的に活性化するアゴニストを用いて、70% Xe の影響を確認したところ、いずれのサブタイプ応答も抑制され、その抑制は非競合的であった (図 3)。

(2) 細胞体に付着した抑制ならびに興奮性神経終末部 (ブートン) からの GABA と Glu の自発性遊離によって生じるシナプス後電流への Xe の作用

シナプス・ブートン標本は正常な生理機能を維持したまま神経終末部が付着している。よって付着した多数の神経終末部から自発的に放出された GABA や Glu などの化学伝達物質で惹起される微弱なシナプス後電流をそれぞれ記録できる (sIPSC, sEPSC)。

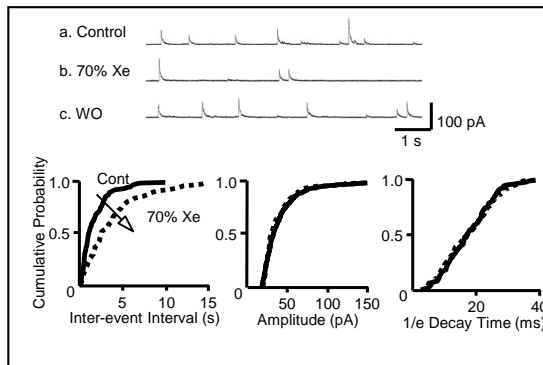


図 4

図 4 は自発性 GABA 放出によるシナプス後電流 (sIPSC) への Xe の作用を示す。Xe は発火頻度 (Inter-event interval) を抑制したが、電流振幅 (Amplitude) と電流キネティクス (Decay time) に影響を与えなかった。

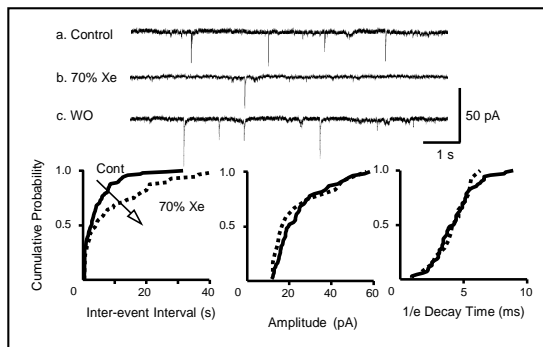


図 5

図 5 は自発性 Glu 放出による sEPSC の結果を示す。GABA による sIPSC と同じように、Xe は sEPSC の発火頻度のみを抑制した。

(3) フォーカル電気刺激法によって神経終末部を電気刺激することによって生じる活動電位依存性シナプス後電流への Xe の作用

神経終末部を電気刺激し、GABA 作動性または Glu 作動性の単一シナプス前神経終末部をそれぞれ選択的に興奮させ、活動電位により

惹起される抑制性または興奮性シナプス後電流 (eIPSC、eEPSC) を記録し Xe の作用を検討した。

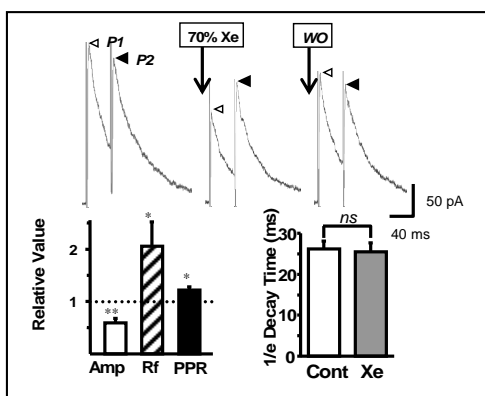


図 6

図 6 は GABA 作動性単一神経終末部を電気刺激 (ダブルパルス) した時の抑制性シナプス後電流 (eIPSC) への Xe 作用を示す。P1 の電流振幅は Xe によって有意に抑制され、電流応答の失敗率 (Rf) と P2/P1 ratio (PPR) は増加した。

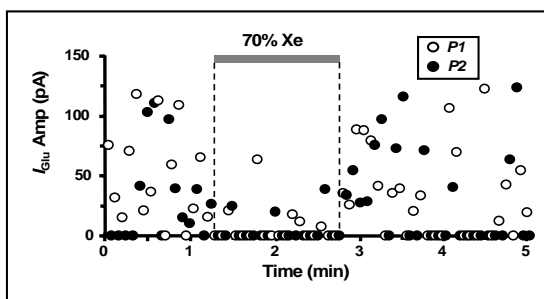


図 7

図 7 は Glu 作動性 eEPSC への Xe 作用を経時的に示した。縦軸に電流振幅、横軸は時間を表し、第 1 刺激 (P1) と第 2 刺激 (P2) の結果を示す。Xe の eEPSC への作用は eIPSC に対するものよりも強く発現した。

表 1

GABA 作動性 sIPSC			
	発火頻度	電流振幅	特異性
70% N <sub>2</sub> O	変化なし	変化なし	変化なし
30% Xe	40%	変化なし	変化なし
70% Xe	45%	変化なし	変化なし

Glu 作動性 sEPSC			
	発火頻度	電流振幅	特異性
70% N <sub>2</sub> O	変化なし	変化なし	変化なし
30% Xe	30%	変化なし	変化なし
70% Xe	70%	変化なし	変化なし

表 2

GABA 作動性 eIPSC					
	電流振幅	Rf	PPR	特異性	
30% N <sub>2</sub> O	25%	1.8 倍	1.2 倍	変化なし	
70% N <sub>2</sub> O	45%	2.2 倍	1.4 倍	変化なし	
30% Xe	データなし	データなし	データなし	データなし	
70% Xe	40%	2.0 倍	1.2 倍	変化なし	

Glu 作動性 eEPSC					
	電流振幅	Rf	PPR	特異性	
30% N <sub>2</sub> O	45%	2.5 倍	1.5 倍	変化なし	
70% N <sub>2</sub> O	50%	3.0 倍	1.5 倍	変化なし	
30% Xe	50%	2.8 倍	1.3 倍	変化なし	
70% Xe	100%	失敗のみ	計測不可	計測不可	

表 1 と 2 はこれまで我々の研究グループで行ってきたガス性麻酔薬の笑気ガス (N<sub>2</sub>O) と今回の Xe 作用の結果を比較したものである。表 1 にシナプス内 GABA および Glu 受容体に対する Xe の影響をまとめた。Xe はシナプス前神経終末部に作用し、GABA や Glu の自発性放出を抑制した。一方、N<sub>2</sub>O は自発性放出には全く影響を与えなかった。

また、Xe は活動電位依存性の GABA 放出と Glu 放出で発生するシナプス後電流を共に抑制し、その抑制効果は興奮性シナプス電流がより強かった (表 2)。

表 3

	シナプス外 GABA 受容体応答 (I <sub>GABA</sub> )	シナプス外 Glu 受容体応答 (I <sub>Glu</sub> )
30% N <sub>2</sub> O	変化なし	15%
70% N <sub>2</sub> O	変化なし	25%
70% Xe	変化なし	40%

シナプス外の GABA および Glu 受容体に対する Xe と N<sub>2</sub>O の影響を比較したものが表 3 である。Xe と N<sub>2</sub>O はシナプス外 GABA 受容体には全く影響を与えず、両者共に Glu 受容体の方に作用しその抑制効果は Xe が N<sub>2</sub>O よりも強かった。

以上のことから、Xe は興奮性グルタミン酸伝達機構をシナプス前終末部とシナプス後膜上のシナプス外受容体の両方を抑制するが、前者により強く作用する。抑制性 GABA 伝達機構では Xe はシナプス前終末部のみを抑制した。本成果は Xe の作用部位は興奮・抑制系共にシナプス後膜側のみであるとの今迄の報告を覆す新知見である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Kiku Nonaka, Min-Chul Shin, Norio Akaike  
「 Effects of xenon on inhibitory or  
excitatory presynaptic nerve terminals 」  
NEUROSCIENCE 2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

野中 喜久 (NONAKA Kiku)

熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科・准教授

研究者番号：70259745