

論文の内容の要旨

氏名：加藤 梨紗子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The role of pentobarbital in spike timing regulation in the rat insular cortex

（ラット島皮質でのペントバルビタールの発火タイミング制御における役割）

大脳皮質は、認知や随意運動、予測および学習などの高次脳機能を担う重要な領域であり、全身麻酔薬は、そのグルタミン酸作動性の興奮性ニューロンと γ -aminobutyric acid (GABA) 作動性の抑制性ニューロンの活動バランスを変調させることで意識を消失させると考えられている。島皮質は、大脳皮質側頭葉と頭頂葉下部を分ける外側溝に位置し、味覚、嗅覚、内臓感覚、温度感覚など複数の知覚情報に加え、情動、自己意識などに関与することが知られている。島皮質は扁桃体や視床下部外側から投射を受けることから、感覚情報と情動の統合を担っている可能性がある。特に侵害情報は、体性感覚野のみならず島皮質にも入力することから、全身麻酔薬による痛覚の鈍麻もしくは消失に島皮質が関与することが示唆されている。

ペントバルビタールは短-中時間作用型バルビツール酸系の静脈麻酔薬であり、 $GABA_A$ 受容体に結合して同受容体への GABA の親和性を亢進するとともに、 Cl^- チャンネルの開口時間を延長する。それに伴い、 Cl^- が細胞内に流入することで膜電位を過分極させ、興奮性シナプス伝達を抑制して意識を消失させると考えられている。しかし、ペントバルビタールの皮質局所回路に対する作用については不明な点が多い。そこで本研究では、8 週齢ラットの覚醒時およびペントバルビタール麻酔時における島皮質ニューロンからシリコンプローブ電極を用いて細胞外記録を行い、ニューロン発火の規則性に対するペントバルビタールの影響を検討した。なお、発火頻度は同一ニューロンにおいても多様であることから、規則性の検出は多くの場合困難である。そこで解析に当たっては、random matrix theory (RMT) を用いて任意の局所的な平均発火間隔を定義し、ニューロン固有の発火密度の変動を取り除くことで、規則性を検討した。

ニューロン記録に先立ち、覚醒時にラットが不快に感じることなく細胞外記録を行うことが出来るよう、以下のトレーニングを行った。まず頭部固定装置を装着したラットを絶水させた後、拘束オペラント実験装置に固定した。そして、合図音後 1.5 秒以内にラットが前肢でレバー操作を行うと報酬として 5 mM サッカリン水溶液を 15 μ l 得ることができる課題を 1 日当たり 2 時間遂行させ、3-4 日間このトレーニングを行った。トレーニング終了翌日、細胞外記録用電極を刺入し、覚醒時における島皮質ニューロンの細胞外記録を行った。その後、尾静脈からペントバルビタール (30 mg/kg) を投与し、麻酔後のニューロン活動を記録した。また同時に記録した脳波から周波数解析を行い、麻酔深度を推定した。

細胞外から記録した活動電位を最大振幅、振幅平方和、半値幅から単一ニューロン活動に選別した。記録したニューロンは、クラスター解析を用いて、自発発火頻度が高く (> 5 Hz) バースト発火するものを high frequency with bursting (HFB) ニューロン、自発発火頻度が低く (< 10 Hz) バースト発火しないもの non-HFB ニューロンに分類した。HFB ニューロンはその発火特性から fast-spiking (FS) 細胞、non-HFB ニューロンは錐体細胞であると推察された。ペントバルビタール投与により、すべての HFB ニューロンと 78% の non-HFB ニューロンにおいて発火頻度が減少した。また、覚醒時の脳波では 3 Hz 以下にピークが認められたのに対し、麻酔時では barbiturate spindle と呼ばれる特徴的な神経活動が認められ、脳波のピークが 1-3 Hz から 7-10 Hz へ移動した。

記録したニューロン活動は、RMT 解析によって unfolding した発火時系列から interspike interval (ISI) ヒストグラムを作成し、片対数、または両対数グラフにプロットした。そして、各ニューロンの発火時系列をべき関数的減衰、指数関数的減衰、べき関数的減衰と指数関数的減衰の中間に分類した。べき関数的減衰はニューロン発火の間に相関があることを、指数関数的減衰は発火がランダムに起きており発火間に相関がないこと、その中間はべき関数的減衰よりも弱く指数関数的減衰よりも強い相関があることを意味している。さらに、ヒストグラムから repulsion の有無を確認した。Repulsion とは unfolding 後の ISI のうち、平均発火間隔 1 よりも短い間隔で生じる発火が減少したものに認められ、短い間隔で発火することを避けることで発生すると考えられる。すなわち、発火間に相関があることを意味する。RMT 解析によって全身麻酔時では、どちらのニューロンも repulsion が増加することが明らかとなった。覚醒時において、50%の HFB ニューロンと 40%の non-HFB ニューロンのヒストグラムはべき関数的減衰であったが、ペントバルビタール麻酔時は non-HFB ニューロンの 80%が指数関数的減衰を示すことがわかった。一方、HFB ニューロンは麻酔前後で減衰の割合にほとんど変化が認められなかった。これらの結果から、non-HFB ニューロンは麻酔時において短い間隔の発火における相関は増加するものの、多くのニューロンは長時間の発火間で相関を失うのに対し、HFB ニューロンは短時間・長時間ともに発火間の相関を維持していることが明らかとなった。

このメカニズムの一端を明らかにするため、生後 20-30 日齢の幼弱期 VGAT-Venus ラットを用いて島皮質スライス標本作製し、錐体細胞および FS 細胞から細胞内記録を行い、ペントバルビタールによる神経活動の修飾作用について検討した。500 ms の脱分極電流 (50-150 pA) を細胞に与えて持続的発火を誘発し、1-10 番目までの ISI の分散を計測した。その結果、投与前では FS 細胞の各 ISI の分散が錐体細胞と比較して有意に小さかった。またペントバルビタールを投与すると、錐体細胞では分散が有意に変化しなかったのに対して、FS 細胞では分散が有意に減少した。これらの結果から、FS 細胞は錐体細胞と比較して発火の規則性が高く、ペントバルビタールによる GABA_A 受容体の活性化でさらにその規則性は増大することが示唆された。スライス標本を用いた実験から得られた結果は、non-HFB ニューロンではペントバルビタール麻酔時において発火間の相関が失われるものが多く、HFB ニューロンは規則性を維持しているという *in vivo* の実験結果を支持するものであった。

以上の所見は、ペントバルビタールによるニューロン発火に対する効果が、錐体細胞と FS 細胞で異なっており、FS 細胞の発火は麻酔下においても規則性が維持される傾向にあることを示唆する。