

## 論文の内容の要旨

氏名：金子啓介

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Propofol-induced potentiation of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated tonic Cl<sup>-</sup> currents in the rat insular cortex

(ラット島皮質でのプロポフォールによる GABA<sub>A</sub> 受容体を介する持続性 Cl<sup>-</sup> 電流の増強)

静脈麻酔薬であるプロポフォールは、意識、記憶、随意運動など様々な高次機能を司る大脳皮質において、GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制性シナプス後電流を増強することでニューロン活動を抑制し、麻酔薬としての作用を発揮する。近年、プロポフォールは GABA<sub>A</sub> 受容体以外のイオンチャネルに対する作用、すなわち興奮性錐体細胞 (Pyr) における過分極活性化内向き電流 ( $I_h$ ) の阻害、電位依存性 Na<sup>+</sup> 電流の阻害、K<sup>+</sup> 電流の阻害などが報告されている。したがってプロポフォールは、電気生理学的発火特性を直接あるいは間接的に修飾することで、Pyr の発火を抑制すると考えられる。

大脳皮質を構成するニューロンは、Pyr を代表とするグルタミン酸作動性興奮性細胞と GABA 作動性抑制性細胞に大別され、大脳皮質の活動性はこれらのニューロン活動のバランスにより決定されると考えられる。興味深いことにプロポフォールは、抑制性介在ニューロンと比較して Pyr において抑制性シナプス後電流を強力に増大させることで、興奮性細胞を抑制して皮質活動性を減弱させる可能性が報告されている。一方、プロポフォールのニューロン発火特性に対する作用に関する興奮性細胞と抑制性細胞の差異は不明である。

そこで「プロポフォールは抑制性細胞と比較して興奮性細胞の発火特性を大きく変化させることで、皮質活動性を減弱する」という仮説を立て、以下の実験を行った。まず、電気生理学的特性に対するプロポフォールの効果について検討するために、ラットから急性脳スライス標本を作製し、大脳皮質の一領域である島皮質において、単一ニューロンあるいは複数のサブタイプの異なるニューロンから電流固定下でホールセル・パッチクランプ記録を行った。なお VGAT-Venus トランスジェニック・ラットを用いることで、抑制性介在ニューロンを蛍光顕微鏡観察下で光学的に同定した。抑制性介在ニューロンは複数のサブタイプが存在するため、Venus 蛍光タンパク質の発現有無に加えて、電流固定モードで静止膜電位、閾膜電位、発火パターンを参考にして、抑制性介在ニューロンの分類を行った。すなわち、後過分極が大きく高頻度発火が特徴である fast-spiking neuron (FS)、閾膜電位が低くリバウンド電位が特徴である low threshold spike neuron (LTS)、ランプ状の脱分極と遅延性の活動電位が特徴である late-spiking neuron (LS)、非錐体細胞で低頻度発火が特徴である regular-spiking nonpyramidal neuron (RSNP) の 4 サブタイプである。

プロポフォール (100 μM) 灌流投与により、Pyr と全ての抑制性介在ニューロンで静止膜電位の過分極、入力抵抗の減少、閾膜電位の上昇、最大発火数の減少、およびランプ電流パルスで発生する活動電位の潜時の延長を認めた。また、Pyr と LTS において観察される  $I_h$  は、プロポフォールによって抑制され、LTS の特徴であるリバウンド電位もプロポフォールにより抑制された。Pyr と抑制性介在ニューロンにおけるこれらのプロポフォールの作用を比較したところ、Pyr における静止膜電位の過分極は FS と比較して有意に大きかったが、LS、LTS および RSNP との比較では差がなかった。一方、プロポフォールによる入力抵抗の減少、閾膜電位の上昇、最大発火数の減少は、Pyr と FS、LS、LTS あるいは RSNP との間に差は認められなかった。これらの結果から、プロポフォール (100 μM) は Pyr および抑制性介在ニューロンにおいて電気生理学的膜特性を変化させ、その作用は種々の抑制性介在ニューロンと比較して Pyr において最も強い可能性、および抑制性介在ニューロン間においてもそのサブタイプにより異なる可能性が示唆された。

そこでプロポフォールの電気生理学的膜特性に対する作用について、Pyr と抑制性介在ニューロンに対する作用の大きさを比較するために、飽和的な影響を及ぼす 100 μM ではなく、30 μM プロポフ

オールの影響を検討した。その結果、30  $\mu\text{M}$  プロポフォールにより Pyr の静止膜電位は過分極し、入力抵抗の減少、閾膜電位の上昇および最大発火数の減少、ならびに活動電位の潜時の延長を認めた。一方、同時記録した FS および LTS に対して 30  $\mu\text{M}$  プロポフォールは明らかな作用を示さなかった。したがってプロポフォール (30  $\mu\text{M}$ ) は、抑制性介在ニューロンより Pyr の発火活動を選択的に抑制すると考えられた。

プロポフォールは抑制性シナプス後電流を増強するが、このメカニズムはシナプス後膜に存在する  $\text{GABA}_A$  受容体の開口時間の延長による一過性  $\text{Cl}^-$  電流の増強であることが知られている。一方、大脳皮質の Pyr ではシナプス外にも  $\text{GABA}_A$  受容体が存在することが報告されており、その活性化により持続性  $\text{Cl}^-$  電流が誘発される。持続性  $\text{Cl}^-$  電流は、ニューロンの入力抵抗を減少させ、興奮性入力に対する電位依存性  $\text{Na}^+$  チャネルや  $\text{K}^+$  チャネルの応答を減弱させることで、ニューロン活動を抑制する。したがってプロポフォールによるニューロンの電気生理学的膜特性および発火特性の変化は、持続性  $\text{Cl}^-$  電流の増強により生じている可能性がある。この可能性を検証するために、 $\text{GABA}_A$  受容体のアンタゴニストであるピクロトキシン (100  $\mu\text{M}$ ) あるいはビククリン (10  $\mu\text{M}$ ) の先行投与とともにプロポフォール (100  $\mu\text{M}$ ) を灌流投与し、ニューロンの電気生理学的膜特性および発火特性に対する作用を調べた。その結果 Pyr および FS において、プロポフォールによる静止膜電位、入力抵抗、閾膜電位、最大発火数、および活動電位の潜時の変化はピクロトキシンの先行投与により阻害された。またビククリンの先行投与でも、ピクロトキシン同様にプロポフォールによるニューロンの電気生理学的膜特性の変化は阻害された。したがって、プロポフォールによる電気生理学的膜特性の変化には、 $\text{GABA}_A$  受容体を介した持続性  $\text{Cl}^-$  電流の増強が重要な役割を果たしていると考えられた。

以上、ラット大脳皮質急性脳スライス標本において、

- ① プロポフォール (100  $\mu\text{M}$ ) は、Pyr, FS, LS, LTS, および RSNP において電気生理学的膜特性を変化させ、これらのニューロンの活動性を抑制する
- ② プロポフォール (30  $\mu\text{M}$ ) は抑制性介在ニューロンではなく Pyr のニューロン発火を選択的に抑制する
- ③ プロポフォールによる電気生理学的膜特性の変化は、 $\text{GABA}_A$  受容体を介した持続性  $\text{Cl}^-$  電流の増強が重要な役割を果たす

ことが明らかになった。したがって、プロポフォールは抑制性細胞と比較して興奮性細胞の活動をより強力に抑制することで皮質回路の興奮性を減弱させ、その結果として意識消失作用を発揮する可能性が示された。