

学位の種類	博士(医学)	氏名	長島 君元
学位論文題目			
<p>Propofol Inhibits Long-term Potentiation but not Long-term Depression in Rat Hippocampal Slices</p> <p>(プロポフォールは、ラット海馬スライスにおいて長期抑制は修飾せず、長期増強のみを阻止する)</p>			
共著者名	Zorumski F Charles, Izumi Yukitoshi		
掲載雑誌名	Anesthesiology 103巻:318頁-326頁 2005年		
研究目的			
<p>プロポフォールは、ペントバービタール同様、中枢神経系における抑制系伝達物質GABAの作用を増強する。さらに強力な催眠作用を有し、麻酔の導入、覚醒が速やかなため、現在では吸入麻酔薬と並び、全身麻酔に広く使用される静脈麻酔薬である。多くの麻酔薬同様、プロポフォールも健忘効果を有する。健忘効果の程度に関しては、プロポフォール投与中止後、数時間経過後も記憶と学習機能が一過性に傷害されるとする報告がある一方、プロポフォールの催眠、鎮静作用に比し、その健忘効果の強さは必ずしも強力ではないとの報告もある。健忘機序においては、in vivoラットの報告が一例あるものの、in vitro実験では明らかにされていない。今回我々は、記憶に重要な役割を担う海馬で、シナプス可塑性を示す代表例である長期増強 (LTP) 及び長期抑制 (LTD) が、ラット海馬スライスを用いて、プロポフォールによってどのように影響されるかを検討した。</p>			
材料・方法			
<p>I. 方法論</p>			
<p>1. ラット海馬スライスの作成</p> <p>Sprague-Dawley系雄性ラット (生後30日) を対象に、ハロセン吸入麻酔下で断頭した。脳を頭蓋内より取り出し、95%酸素5%二酸化炭素でバブリングした氷冷下人工脳脊髄液 (ACSF) の中で、ヴァイブラトームを使用し、500 <math>\mu</math>mの厚さの海馬スライスを作成した。各々のスライスは、95%酸素5%二酸化炭素で飽和させたACSF入りの溶液で1時間灌流させた。</p>			

## 2. 細胞外電位記録法

海馬スライスを、95%酸素5%二酸化炭素で飽和させたACSFで浸されているチェンバー内に載せ固定した。チェンバー内の温度は30°Cに設定した。CA3の軸索であるSchafferの側枝が走行する放線層に刺激電極を配置し、CA1領域のシナプス層に微小ガラス電極（抵抗5-10M $\Omega$ ）を置き、興奮性シナプス後電位（EPSP）を記録した。LTP、LTDはEPSPの傾きの変化で評価した。刺激強度は、最大EPSPの振幅の50-60%に設定された。また反回抑制を誘発する方法として、2回連続電気刺激（ペアパルス刺激、間隔21ms）を与え、CA1領域の錐体細胞層から集合電位（PS）を記録し、最初のPS（1<sup>st</sup>PS）に対する2つめのPS（2<sup>nd</sup>PS）の比（2<sup>nd</sup>PS/1<sup>st</sup>PS）を計算しGABA<sub>A</sub>抑制効果の増強程度を評価した。

## 3. LTPとLTDの誘導

LTP誘導には、 $\theta$ バースト刺激（theta burst stimulation ;100Hz或いは200Hzを4回のパルス刺激を200ms間隔で5回）を繰り返した。100Hzの高頻度刺激はNMDA受容体依存性にLTPを誘導するが、200Hzの高頻度刺激によるLTPはNMDA受容体非依存性である。このため、200HzのLTP誘導においては、NMDA antagonistであるMK801 1 $\mu$ Mが全過程において投与された。またLTD誘導には1Hz-900 pulseの刺激方法を用いた。

## 4. 薬物

実験の主要対象薬物としてプロポフォール並びに薬理作用の比較のため、ペントバービタールを使用した。

## 5. 統計

結果は、平均 $\pm$ 標準誤差で表した。統計処理は2群比較にはStudent *t*-test、或いは、Mann-Whitney U testを用い  $p < 0.05$ を有意とした。

## 成績

1. プロポフォールとペントバービタールの濃度決定とGABA<sub>A</sub>増強効果；シナプス可塑性に対する影響を検討するための濃度決定に際し、通常シナプス応答を変えない最大濃度をプロポフォールとペントバービタール各々で検討した。また、GABA<sub>A</sub>受容体を介するGABA<sub>A</sub>増強効果も同時に検討した。20分間の投与時間の中で、両薬物とも30 $\mu$ M以下の濃度においては、EPSPにおける通常シナプス応答を抑制しなかった。またGABA<sub>A</sub>抑制効果の増強程度については、プロポフォール30 $\mu$ Mの2<sup>nd</sup>PS/1<sup>st</sup>PSは、20 $\pm$ 9%、ペントバービタール30 $\mu$ Mでは、47 $\pm$ 9%であった。また両薬物は1 $\mu$ Mのピクロトキシン（GABA<sub>A</sub>拮抗薬）によってGABA<sub>A</sub>の効果は相殺された。

## 2. NMDA受容体への影響（プロポフォールv.s.ペントバービタール）

プロポフォール30 $\mu$ MはNMDA受容体の活性化を介するシナプス応答を部分的に抑制したが、ペントバービタール30 $\mu$ Mは、NMDA成分を抑制しなかった。

## 3. プロポフォールによるNMDA依存性LTP(100Hz)とNMDA非依存性LTP(200Hz)への影響

プロポフォール30 $\mu$ Mを高頻度刺激（各々100、200Hz）直前まで20分間投与し、LTPへの影響を調べた。その結果、LTPの誘導は100、200Hz共に完全に抑制された。

## 4. LTP誘導機序におけるGABA<sub>A</sub>受容体との関わり（プロポフォールv.s.ペントバービタール）

プロポフォール30 $\mu$ MによるLTP誘導抑制機序がNMDA受容体の抑制によるものではないことが示唆されたため、次のステップとして、プロポフォールの薬理的な主作用であるGABA<sub>A</sub>受容体の関与を考えた。GABA<sub>A</sub>拮抗薬であるピクロトキシン1 $\mu$ Mを100Hzあるいは、200HzのLTP誘導実験の全経過に投与し続け、60分後のLTP誘導効果を調べた。その結果、100、200Hz共にLTPは抑制されなかった。一方、プロポフォールと似た薬理作用（GABA<sub>A</sub>受容体に作用し、GABAに仲介される抑制効果を増強させる）を持つ静脈麻酔薬、ペントバービタールを用い、LTP誘導に対する影響をプロポフォールと同様に検討した。その結果、プロポフォールとは対照的にLTPの誘導は60分後において部分的にしか抑制されなかった。

## 5. プロポフォールとLTD

プロポフォールは、LTDには影響を及ぼさなかった。

## 考 案

今回の結果より、プロポフォール30 $\mu$ Mは、LTP誘導を阻止し、LTDの誘導は修飾しなかった。LTPの誘導阻止は、臨床的にはプロポフォールが記憶の形成を制御することを意味する。一般にLTPの誘導には、NMDA受容体の一時的な活性化が不可欠とされる。プロポフォール30 $\mu$ Mは、NMDA受容体を部分的にしか拮抗せず、またNMDA受容体非依存性LTPの誘導も制止したことから、LTPの抑制機序にNMDA受容体の拮抗は関与していないことが示唆された。このため、次のステップとして、プロポフォールの主作用であるGABA<sub>A</sub>受容体の関与に注目した。その結果、GABA<sub>A</sub>の拮抗薬である、ピクロトキシン存在下ではプロポフォールは100、200HzともにLTP誘導を抑制しなかった。このことは、プロポフォールによるLTP誘導の抑制機序にGABA<sub>A</sub>受容体が大きく関わっていることが示唆された。しかし、LTPの誘導にはGABA受容体の関与が不可欠か否かはしばしば議論されるところである。そこで、我々は薬理作用がプロポフォールに類似するペントバービタールを用いて、LTPの誘導抑制にGABA<sub>A</sub>受容体が大きく関与しているかを検討した。結果として、ペントバービタールは、コントロールに比し、100、200HzのLTPを部分的には抑制したが、完全には阻止

しなかった。このことは、GABA<sub>A</sub>増強効果のみでは、LTP誘導抑制の機序を十分には説明できないことを意味するのかもしれない。以上、一連の考察を踏まえると、プロポフォールによるLTP誘導の阻止を担う機序として、GABA<sub>A</sub>の関与が大きいことは確認できた。しかし、それ以外の要因も関与しているものと推測された。

#### 結 論

ラット海馬スライスにおいて、プロポフォールはLTP誘導を抑制した。そのメカニズムとして、NMDA受容体の拮抗よりもプロポフォールの主作用であるGABA<sub>A</sub>受容体を介するGABAの抑制効果の増強が、大きく関与していると考えられた。

## 引用文献

- 1) Sebel PS, Lowdon JD: Propofol: a new intravenous anesthetic. *Anesthesiology* 1989; 71: 260-77
- 2) Bashir ZI, Alford S, Davies SN, Randall AD, Collingridge GL: Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 1991; 349: 156-8
- 3) Albertson TE, Walby WF, Stark LG, and Joy RM: The effects of propofol on CA1 pyramidal cell excitability and GABA<sub>A</sub>-mediated inhibition in the rat hippocampal slice. *Life Sci* 1996; 58: 2397-407
- 4) Orser BA, Bertlik M, Wang LY, MacDonald JF: Inhibition by propofol (2,6 di-isopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptor in cultured hippocampal neurones. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 1761-8
- 5) Schummers J, Bentz S, Browning MD: Ethanol's inhibition of LTP may not be mediated solely via direct effects on the NMDA receptor. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 404-8
- 6) Grover LM, Teyler TJ: Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 1990; 347: 477-9

---

## 参考論文

- 1) **Nagashima K.**, Zorumski CF., Izumi Y. Nitrous Oxide (Laughing Gas) Facilitates Excitability in Rat Hippocampal Slices through  $[\gamma]$ -Aminobutyric Acid A Receptor-mediated Disinhibition. *Anesthesiology* 102: 230-4, 2005
- 2) Izumi Y. **Nagashima K.**, Murayama K., Zorumski CF. Acute effects of ethanol on hippocampal long-term potentiation and long-term depression are mediated by different mechanisms. *Neuroscience*. 136: 509-17, 2005

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	長島君元
<p>審査委員長 田中達也 ㊞</p> <p>審査委員 清水恵子 ㊞</p> <p>審査委員 岩崎寛 ㊞</p>			
<p>学位論文題目</p> <p>プロポフォールは、ラット海馬スライスにおいて長期抑制は修飾せず、長期増強のみを阻止する</p> <p>Propofol Inhibits Long-term Potentiation but not Long-term Depression in Rat Hippocampal Slices</p>			
<p>プロポフォールは、全身麻酔や人口呼吸管理のための睡眠や鎮静を目的として用いられる静脈麻酔薬である。多くの麻酔薬同様、プロポフォールは、可逆的かつ一過性に健忘効果をもたらすことが知られている。しかし、その健忘作用の根本となる機序については知られていない。本論文提出者は、その機序を探るべく、ラット海馬スライスを用い、細胞外電位記録による電気生理学的手法から、プロポフォールによる細胞レベルでの記憶・学習のモデルとされるシナプス可塑性(長期増強、長期抑制)への影響を検討した。その結果、プロポフォールは、30<math>\mu</math>Mにおいて長期抑制を修飾せ</p>			

ず、長期増強の誘導プロセスだけを抑制した。

一般に、古典的な長期増強の誘導には、NMDA受容体の一時的な活性化が不可欠であるといわれている。プロポフォール 30 $\mu$ Mの濃度でのNMDA受容体への拮抗作用は弱く、部分的なものであった。また、プロポフォールは、NMDA受容体非依存性の長期増強においても誘導プロセスを抑制した。一方、プロポフォールは、GABA<sub>A</sub>の拮抗薬を同時に投与すると、NMDA受容体依存性、非依存性に関わらず、長期増強を抑制しなかった。以上より、プロポフォールの長期増強抑制の機序にはNMDA受容体よりもGABA<sub>A</sub>受容体が大きく関与している可能性を実験的に明らかにした。

本研究は、細胞レベルでの記憶・学習に深く関与するとされるシナプス応答の可塑性が、プロポフォールによってどのように修飾され影響を受けるのかをみた興味深い実験結果であるばかりでなく、日常の臨床の中で、プロポフォールを使用した麻酔や鎮静の方法を大きく変化させる可能性があるかを検討する上で非常に有意義な知見であり、すぐれた研究成果といえる。本論文の内容および関連領域についての諮問に対して、著者から明解、かつ適切な回答が得られた。以上の理由により、本論文は学位論文として適切なものと判断した。