HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Dexmedetomidineがラット海馬シナプス可塑性へ及ぼす影響
Author(s)	伊藤, 亮子
Description	配架番号：2073
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11201号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11201
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58158
Type	doctoral thesis
File Information	Ryoko_Ito.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

Dexmedetomidine がラット海馬シナプス可塑性へ及ぼす影響

(The effect of dexmedetomidine on the rat hippocampal synaptic plasticity)

２０１４年３月

北　海　道　大　学

伊　藤　亮　子

目次

発表論文目録および学会発表目録……..1

緒言……2-4

略語表……..5

実験材料および実験方法……..6-14

実験成績

第一章　デクスメデトミジンがラット海馬シナプス可塑性に及ぼす影響：成ラットでの検討

1. デクスメデトミジン腹腔内投与による海馬シナプス可塑性の変化……15-16

第二章　デクスメデトミジンの幼若期投与が成長後の海馬シナプス可塑性に及ぼす影響

1. 幼若ラットにおけるデクスメデトミジン投与による鎮静作用……17

2. 幼若ラットにおけるデクスメデトミジンの呼吸に及ぼす影響……17-18

3. 成長後の海馬シナプス伝達効率……19

4. 成長後の海馬シナプス長期可塑性……20

5. 成長後の海馬シナプス短期可塑性……21

考察……22-26

総括および結論……27

謝辞……28

参考文献……29-31

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Dexmedetomidine suppresses long-term potentiation in the hippocampal CA1 field of anesthetized rats. Ryoko Ito Kato, Kaori Tachibana, Toshikazu Hashimoto, Koichi Takita, and Yuji Morimoto. (投稿中)

2. Neonatal exposure to high concentration of carbon dioxide produces persistent learning deficits with impaired hippocampal synaptic plasticity. Kaori Tachibana, Toshikazu Hashimoto, Koichi Takita, Ryoko Ito, Rui Kato, and Yuji Morimoto. Brain Res. 2013 Apr 24;1507:83-90

3. Neonatal administration with dexmedetomidine does not impair the rat hippocampal synaptic plasticity later in adulthood. Kaori Tachibana, Toshikazu Hashimoto, Rui Kato, Yosuke Uchida, Ryoko Ito, Koichi Takita, and Yuji Morimoto. Paediatr Anaesth. 2012 Jul;22(7):713-9.

4. Long-lasting effects of neonatal pentobarbital administration on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity. Kaori Tachibana, Toshikazu Hashimoto, Rui Kato, Kenkichi Tsuruga, Ryoko Ito, and Yuji Morimoto. Brain Res. 2011 May 4;1388:69-76.

5. Neonatal exposure to sevoflurane causes significant suppression of hippocampal long-term potentiation in postgrowth rats. Rui Kato, Kaori Tachibana, Naoki Nishimoto, Toshikazu Hashimoto, Yosuke Uchida, Ryoko Ito, Kenkichi Tsuruga, Koichi Takita, and Yuji Morimoto. Anesth Analg. 2013 Dec ;117(6):1429-35

緒言

塩酸デクスメデトミジン（dexmedetomidine; DEX）は，強力かつ選択性の高い中枢性 α_2アドレナリン受容体作動薬である。DEX は脳橋の背外側部にある青斑内の青斑核に存在する中枢性 α_{2A} 受容体を介して鎮静作用を発現するとされるが、このような機序は従来用いられてきた全身麻酔薬や鎮静薬、すなわち γ-aminobutyric acid (GABA) 受容体作動性もしくは glutamate 受容体拮抗性の薬物とは異なるものである。このため、DEX による鎮静作用は他の鎮静薬と異なり、1. 呼吸抑制作用が他の鎮静薬より少ない、2. 鎮痛作用を有する、3. 鎮静時に呼びかけに応答する、等の特徴的な利点をもつとされる。DEX はまた他の鎮静薬と同様に健忘作用を示すことが報告されているが[1]、その詳細な機序は不明である。近年のヒトでの報告では、DEX 投与において functional magnetic resonance imaging (fMRI)上で海馬機能の低下が発生することが報告されており、このような海馬機能の低下が DEX による健忘作用に貢献していると考えられている[2]。

海馬は人間の思考過程に重要な役割を担う脳部位であり、そこで観察されるシナプスの長期増強（Long-term potentiation; LTP）現象は、学習や記憶に関連した電気生理学的現象と考えられている[3]。多くの麻酔薬は海馬における GABA 受容体ならびに NMDA 受容体を修飾し、このため LTP 形成を抑制することが知られているが、このような LTP 形成抑制が麻酔薬の健忘作用と密接に関連する可能性が指摘されている。DEX に関しては、成マウス由来の海馬スライスにおいて LTP を抑制するという報告[4]、また LTP に影響を及ぼさないという報告[5]、すなわち 2 つの相反する報告があり、一定の見解は得られていない。すなわち、DEX が海馬 LTP 形成に及ぼす影響については不明な点が残っており、これを調査することは DEX による健忘作用機序を検討する上で重要と考えられる。

本研究では、以上の背景に基づき、DEX による健忘作用の機序の究明をはかるた

め、成ラットにおけるDEXによる海馬LTP形成の修飾作用を検討した。通常行われる海馬スライスでの電気生理学的検討では青斑核からのノルアドレナリン（Noradrenaline; NA）神経投射が損なわれており、NAによる海馬の修飾が存在しない点で生体と異なっている。DEXの主たる作用部位であるα_{2A}受容体はシナプス前に存在し、フィードバック機構を介してその抑制性の作用を発現する。したがって我々は、DEXによるシナプス機能への影響を調査するには、スライスによる神経回路の入出力の断片化が行われていない生体下での検討が望ましいと考えた。本研究において、我々は青斑核からのNA神経系の投射が正常に存在する生体ラット（麻酔下ラット）を用い、DEXによる海馬LTPの修飾を検討した。生体ラットにおけるDEXによる海馬シナプス可塑性への影響の検討は本研究が初めてであり、DEXによる健忘作用機序の解明に大きな前進をもたらすものと考える。

さらに本研究では、幼若期ラットにDEXを投与した場合の長期的な海馬シナプス可塑性への影響も調査した。近年では、動物実験において幼若期の全身麻酔薬および鎮静薬投与が長期的な神経学的予後を悪化させることが報告されている。発達期における麻酔薬によるGABA受容体もしくはNMDA受容体の修飾から生じる、受容体レベルあるいはシナプスレベルでの長期的な異常が、長期的な神経毒性の機序として示唆されている。幼若期におけるDEX投与が海馬シナプス可塑性に長期的な影響を及ぼすかは不明であるが、DEXの作用機序が他の鎮静薬と異なること、つまりGABA受容体やNMDA受容体ではなく、主としてα_{2A}受容体を介することから、その発達期の海馬への長期的な影響は他の麻酔薬とは異なる可能性がある。幼若期に神経毒性をもたらす可能性の少ない麻酔薬・鎮静薬の検討は、臨床小児麻酔の発展に大きく寄与すると考えられる。

以上より、本研究ではまず、第一報としてDEXが海馬シナプス可塑性へおよぼす影響を成ラットにおいて調査を行った。第二報として、幼若期に投与したDEXが成長後の海馬シナプス機能へ及ぼす影響を長期的に調査した。本研究ではこれらの結果

から、DEX が海馬機能に及ぼす影響を総合的に評価することを目的とした。

略語表

本文及び図中で使用した略語は以下のとおりである。

AUC	Area under the curve
DEX	dexmedetomidine
GABA	γ-aminobutyric acid
HFS	High frequency stimulation
i.p.	intraperitoneal administration
LTP	Long-term potentiation
MAC	minimum alveolar concentration
NA	Noradrenalin
NMDA	N-methyl-D-aspartate
$PaCO_2$	Partial pressure of carbon dioxide in arterial blood
PaO_2	Partial pressure of oxygen in arterial blood
PSA	Population spike amplitude

実験材料ならびに実験方法

＜実験動物＞

ラットは恒温（20-23℃）下、12 時間後の明暗サイクル（7:00-19:00 の暗期）で飼育した.水および固形飼料は実験直前まで自由に与えた。動物実験はすべて、「北海道大学における動物実験に関する指針」に準拠して行った。

＜研究 1：成ラットでの検討における動物準備と薬剤投与方法＞

成ラットにおける DEX の影響を調査するために、10-12 週齢の Wistar/ST 雄性ラット（体重 300-390 g）を使用した (Sankyo Labo service, Ltd., Shizuoka, Japan)。DEX (Hospira Japan Co., Ltd.)は 0.9%生理食塩水に溶解し、腹腔内投与（i.p.）した。対照群には生理食塩水を投与した。投与量は 5 ml/kg とした。

ラットは無作為に 5 群に分けられた。

(1) DEX 100 μg/kg i.p. 群 (DEX 100)

(2) DEX 30 μg/kg i.p. 群 (DEX 30)

(3) DEX 10 μg/kg i.p. 群 (DEX 10)

(4) DEX 3 μg/kg i.p. 群 (DEX 3)

(5) 0.9% 生理食塩水 i.p. 群 (vehicle)

＜研究 2：幼若ラットでの検討における動物準備と薬剤投与方法＞

研究 2 では幼若ラットにおける DEX の影響を調査するために、生後 7 日目の Wistar/ST 雄性ラット（体重 10-12 g）を用いた。この際、妊娠 14 日目のラットを 7 腹購入し (Sankyo Labo service, Ltd., Shizuoka, Japan)、それぞれ別ケージで飼育した。実験当日、生後 7 日目ラットの体重測定、雌雄判別ならびにマーキングを行った。ラット

は無作為に次の群に分けられた。

(1) DEX 5 μg/kg i.p. 群（DEX 5）
(2) DEX 10 μg/kg i.p. 群（DEX 10）
(3) 0.9% 生理食塩水 0.02ml/g 投与群（vehicle）

DEX の投与量は、過去の文献に従って決定した。DEX はそれぞれ 0.02ml/g となるよう 0.9% 生理食塩水により溶解され、1ml のシリンジを用いて 0.5 インチ、30 ゲージ針を用いて腹腔内投与された。ラットは薬剤の腹腔内投与後、ただちにヒートパッド上（約 40 度）に置き、観察を行った。ラットの体温が 36.5℃から 37.5℃の間に保たれるよう、サーモフォーカス(TECNIMED,Tokyo,Japan)を用いて頻回に体温測定を行い、ヒートパッド暴露の調節を行った。麻酔深度の測定のため、自発運動の消失の有無が測定された。また、有鉤ピンセットによる toe pinch を与えて体動を評価し、侵襲に対する麻酔深度の測定を行った。Vehicle 群では侵襲による麻酔深度の評価は行わなかった。ラットが覚醒した時点で、ラットは母ラットのケージに戻された。また vehicle 群は、1 時間の隔離の後、母ラットのケージに戻された。隔離時間は DEX 10 μg/kg i.p. 群ににおける覚醒までの時間の平均値を基に規定した。これらの検討では雌雄いずれものラットを用いた。

成長後の電気生理学的検討を行う群では、ラットはケージに戻された。ケージに戻された後、全てのラットが母ラットに受け入れられ、ケアされることを確認した。その後、電気生理学的検討を行う 10-12 週令までケージ内で飼育された。4-5 週令において雌雄は別ケージに分けられて飼育され、性ホルモン由来の中枢神経系発達への影響をさけるため、雄性ラットのみが以降の実験に用いられた。

＜電気生理学的検討＞

成ラットにおける電気生理学的検討では、ラットの麻酔導入・維持にイソフルランを用いた。一方で、幼若ラットにおける検討に際しては、ラットの麻酔維持にハロタンを用いた。いずれの麻酔薬も、1〜1.5%の低濃度では、ラットにおける in vivo 電気生理学的検討において海馬シナプス機能に影響を与えないことが確認されており[6-8]、実験中のラットの安定した不動化をはかるために有用である。電気生理学的検討に際し、ラットは5%イソフルランもしくは5%ハロタンで麻酔を導入した後、気管カニューレを挿入し、人工呼吸器（Rodent Ventilator model 683; Harvard, Boston, MA, USA）を用いて呼吸を調節した。1 回換気量は 0.8 ml/100 g、換気回数は 60 回/min とした。実験中は 1.2%イソフルランもしくは 1%ハロタン、21%酸素、79%窒素の混合ガスで麻酔を維持し、麻酔ガス濃度、吸入酸素濃度、呼気二酸化炭素分圧は麻酔ガスモニター(5250RGM, Detex-Ohmeda GE Healthcare, Waukesha, WI, USA)を用い測定し、呼気二酸化炭素分圧を 35〜45mmHg になるように人工呼吸器を調節した。実験中ラットの体温は 37 ± 0.5℃となるようにヒートパッドを用い保温した。

<u>シナプス伝達効率の測定</u>

Bregma と lambda が水平になるように定位脳固定装置（成茂社製）に固定し、頭蓋骨を露呈し、記録電極および刺激電極の挿入位置に小孔をあけた。記録電極はステンレス製単極電極（先端直径約 100 μm）、刺激電極にはステンレス製双極張り合わせ電極（先端直径約 200 μm、先端間の距離約 500μm）を用いた。記録電極は CA1 領域の錐体細胞層（bregma より尾側 5.0 mm、側方 3.0 mm）に挿入した.刺激電極は CA1 領域に対し同側の Schaffer 側枝（bregma より尾側 3.0 mm、側方 1.5 mm）に挿入し、これらを陽極とし、頚部皮下に挿入した注射針を不関電極およびアースとした（図 1)。得られた波形の誘発電位の開始と終了点に接線を引き、これと誘発電位最下点への垂線の長さを、錐体細胞層の細胞外集合電位 Population spike amplitude（PSA）の大きさ

として記録した（図 2）。

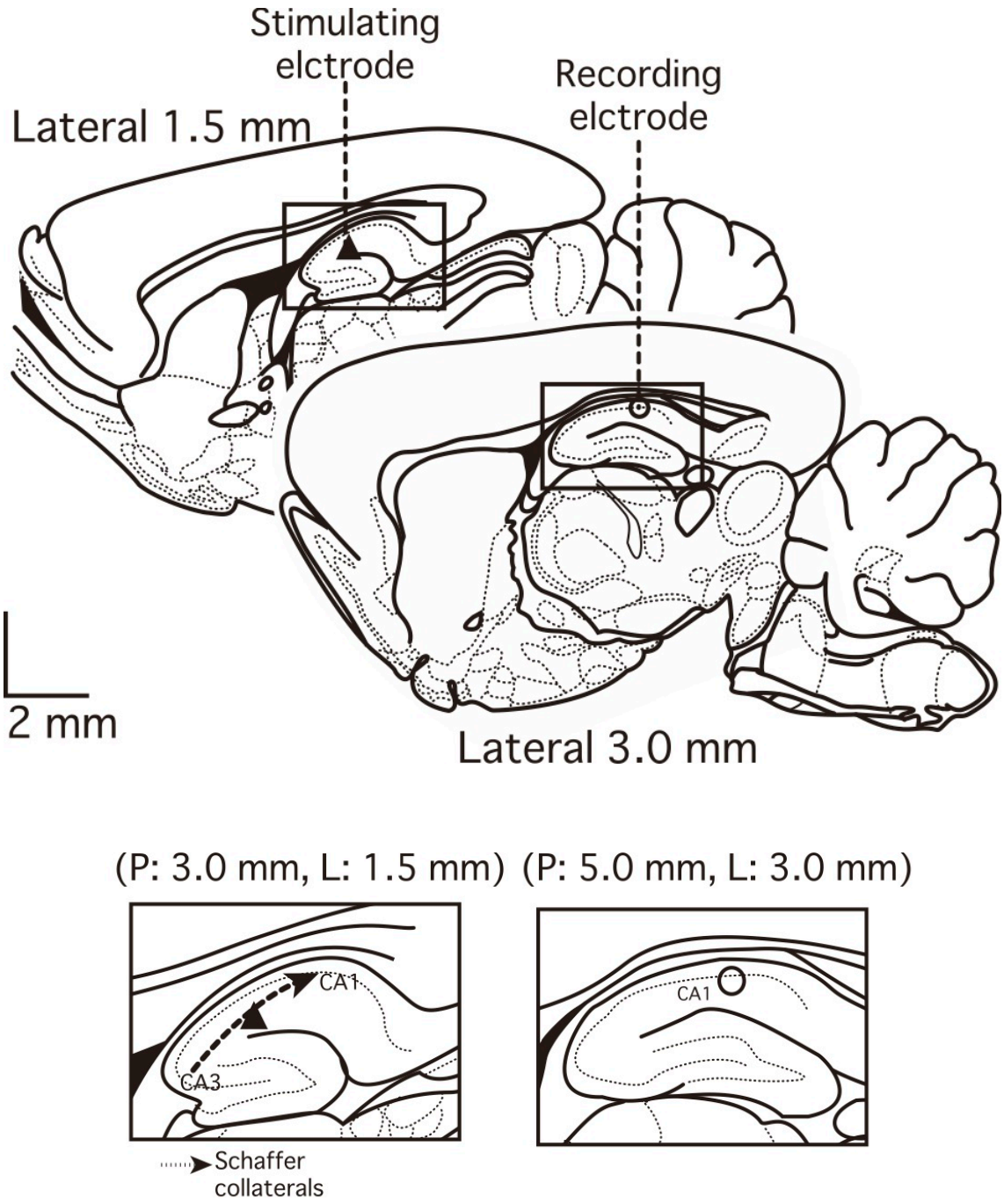


図 1. 海馬における CA1 領域と Schaffer 側枝の位置関係

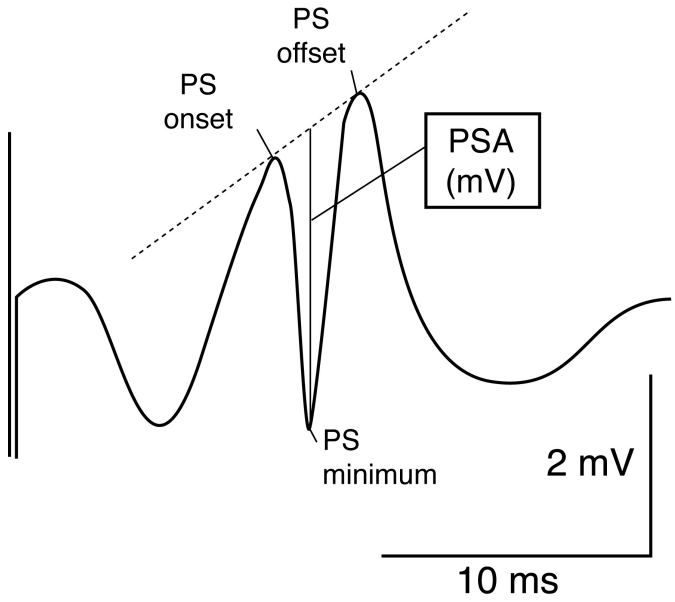


図 2. CA1 錐体細胞の誘発集合電位 (population spike amplitude; PSA)の測定

記録電極および刺激電極の深さは、以下のように決定した。記録電極をアンプに接続して自発電位を測定しながら、油圧式マイクロマニピュレータ（成茂科学 MO-10）を用いて記録電極を進め、海馬錐体細胞層の complex spike が観察される位置で一旦固定した.続いて刺激電極を硬膜より深さ約 2.8 mm まで挿入し、電気刺激（日本光電 SEN-3301）およびアイソレータ（SS-202J）に接続した。持続時間 250 μs、刺激強度 200-500 μA の矩形波で刺激し、誘発電位を高感度増幅器（日本光電 MEG-1200）および高感度前置増幅器（日本光電 S-0476）を介してオシロスコープ（AND AD-5141）で観察した。電気刺激を与えながら記録電極を徐々に下げ、明瞭な興奮性シナプス後電位および集合電位（population spike; p-spike）を認める位置に固定した。刺激電極は最も少ない刺激強度で p-spike が観察される位置に固定した。刺激強度を変化させた際に明確な刺激-反応依存性を確認した後、p-spike の発生しない程度の刺激強度から最大反応の得られる刺激強度まで漸増し、誘発集合電位（population spike amplitude; PSA）が最大反応の約 50%になる強度をテスト刺激強度とした(図 3)。

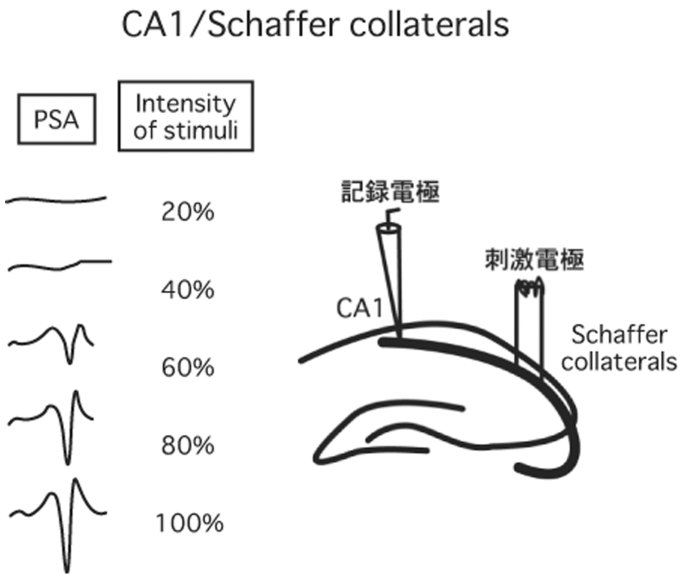


図 3. ラット海馬 CA1 シナプスにおける実波形

LTP の測定

テスト刺激と同電流、同持続時間の矩形波を高頻度、短時間（パルス間隔 2.5 ms (400 Hz)で 8 パルスを 1 秒間隔で 10 回）のテタヌス刺激として与えた。テタヌス刺激後テスト刺激による PSA を 60 分間測定した。テスト刺激は 30 秒毎に与え、オシロスコープに誘発電位反応を表示した。またデータ解析装置（MacLab および PowerLab、ADI Instruments, JAPAN）を用いてアナログ・デジタル変換を行い、5 回の反応を加算して X-Y プロッターに記録した。

抑制性シナプス機能の測定

幼若ラットにおける長期的な海馬への影響を調査するために、研究 2 においては上記のシナプス伝達効率ならびに LTP 形成に関する検討に加え、抑制性シナプスの関与についての検討も行った。このため、in vivo における海馬シナプスでの検討において抑制性シナプス可塑性の指標とされる paired-pulse response の測定を HFS 導入前に行っ

た。Paired-pulse response は刺激を 2 発組み合わせて同じシナプス経路に与え、一つ目の PSA と二つ目の PSA を比較することで評価される。本実験では、Paired-pulse は interpulse interval は 150 ms として 1 分間隔で与えた。3 回の反応を加算して記録し、2 回目の反応と 1 回目の反応の比を計算した。実験終了後、刺激電極ならびに記録電極にそれぞれ 5μA の DC 電流を 30 秒間通電し、剖検を行った上で電極刺入部位の確認を行った。

＜幼若ラットにおける血液ガス分析＞

多くの全身麻酔薬は呼吸抑制作用を持つ。このため、気道確保および呼吸管理のされない幼若ラットでの麻酔薬暴露は、著明な血液ガス異常をもたらすことが指摘されている[9-11]。このような血液ガス異常が成長後の海馬機能に影響を及ぼす可能性が報告されており[12]、幼若ラットにおける麻酔薬暴露時には、血液ガス異常による影響を検討する必要がある。幼若期 DEX 投与が呼吸に与える影響を調査するために、別日程で幼若ラットの血液ガス分析を行った。生後 7 日雌雄 Wistar/ST ラット 20 匹をランダムに生理食塩水投与群（Vehicle）、DEX 5 μg/kg 投与群, DEX 10 μg/kg 投与群に分けた。薬剤投与は、上記項目「幼若ラットにおける薬剤投与」に準じて行った。薬剤投与 15 分後、視診による呼吸数測定、体重測定、ならびに血液ガス分析を行った。血液ガス分析は、経胸郭的に 30 ゲージ針を左心室に挿入し、約 100μl の採血を行い、ガス分析機(ABL510, Radiometer, Tokyo, Japan)にて分析した。血液の pH、PaO_2、$PaCO_2$、BE、HCO_3^-を測定した。

＜成ラットにおける実験プロトコール＞

主な実験プロトコールを下に示す。

研究 1：成ラットにおける DEX の影響に関する実験プロトコール

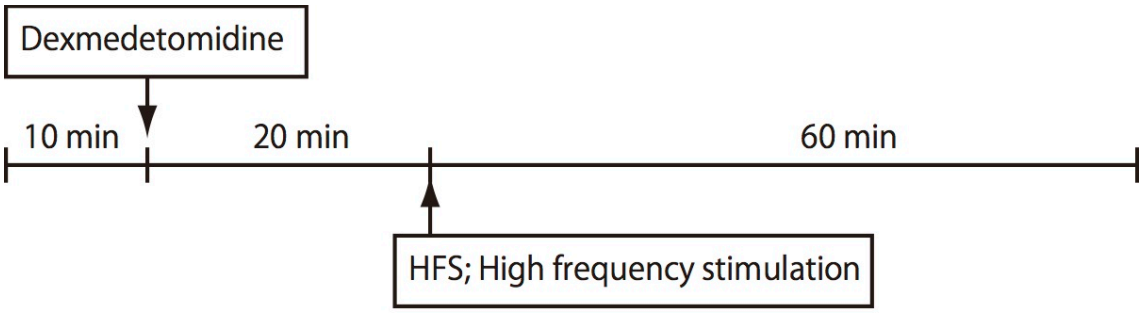


図 4.　研究 1 の実験プロトコール

研究 2：幼若ラットにおける DEX の影響に関する実験プロトコール

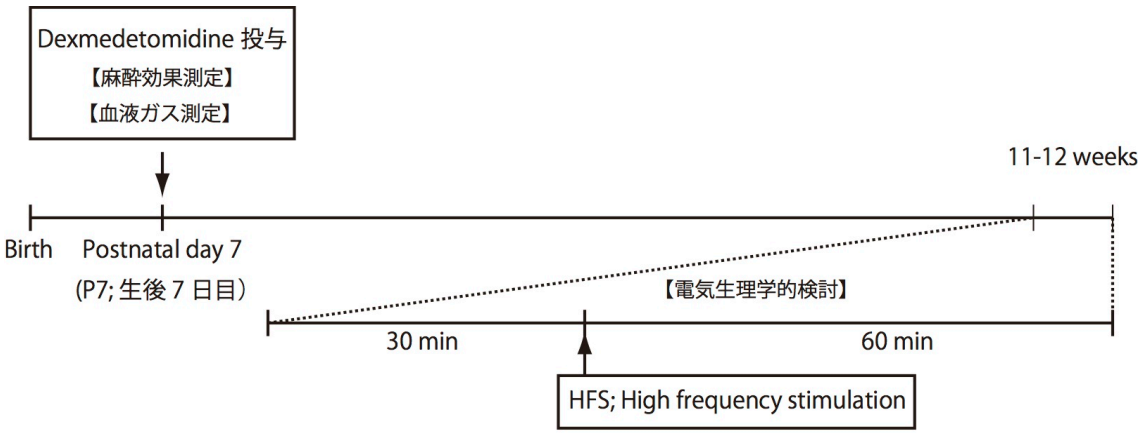


図 5.　研究 2 の実験プロトコール

＜統計学的解析＞

得られた結果はすべて平均値 ± 標準誤差（mean ± SEM）として表した。電気生理学的実験に関しては、HFS 直前の PSA の値を基準とし、百分率で表し、Two-way repeated measure ANOVA を用いて解析を行った。また、HFS 後 60 分間の曲線下面積（area under the curve: AUC (×1000・%・min)により群間の差に関する解析を行った。LTP における AUC ならびに幼若ラットにおける血液ガスデータ、paired-pulse response に関しては、一元配置分散分析の後、Bonferroni 多重比較を用いていずれの場合も危険率5%未満を統計学的に有意とした。統計学的解析にはGraphPad Prism（version 5.0c、GraphPad Software, Inc.、 San Diego、CA、USA）を用いた。

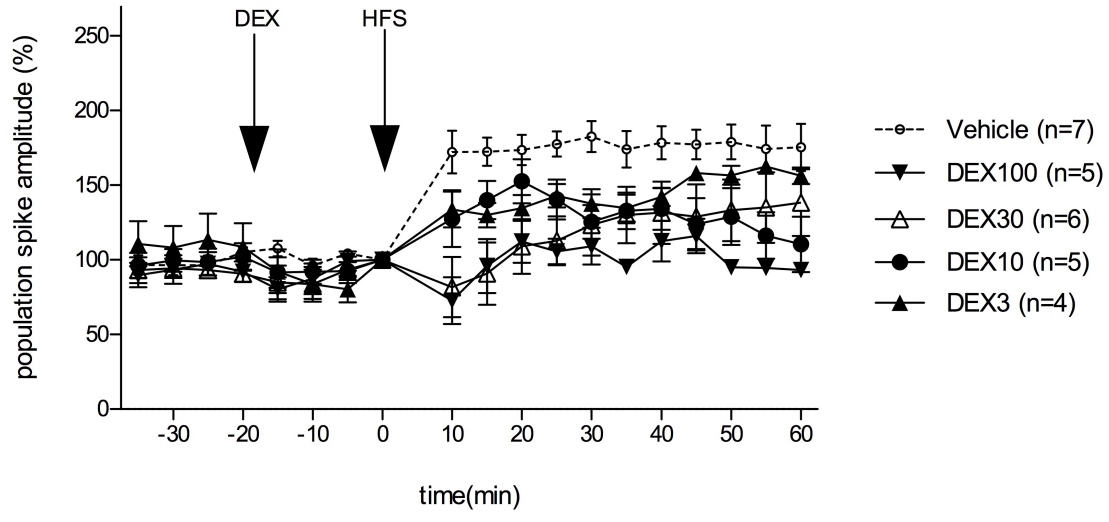
実験成績

第一章　デクスメデトミジンがラット海馬シナプス可塑性に及ぼす影響 : 成ラットでの検討

1. デクスメデトミジン腹腔内投与による海馬シナプス可塑性の変化

Vehicle 群では HFS により PSA は最大で 182.6%（n = 7）まで増加し、LTP が形成された（図 6(A)）。HFS10 分後から 60 分後にかけての LTP データの曲線下面積を求め（図 6(B)）、1 元配置分散分析と Bonferroni 多重比較で検討したところ、DEX100 群、DEX30 群と Vehicle との間にそれぞれ有意な差が認められた(vehicle, 8.81±0.49, n = 7; DEX 100, 5.10±0.43, n = 5, $P < 0.01$ vs. vehicle; DEX 30, 6.02±0.99, n = 6, $P < 0.05$ vs. vehicle, 図 6(B)) 。すなわち DEX 100、30 μg/kg の腹腔内投与で海馬 CA1 領域の LTP 形成を抑制することが示された。

(A)



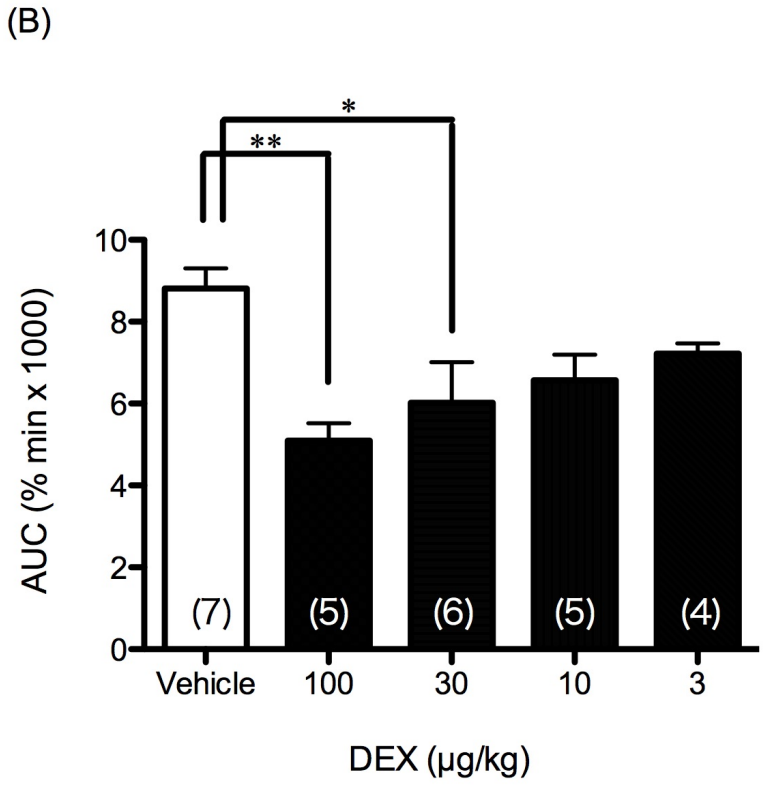


図 6. CA1 領域の long-term potentiation におよぼす dexmedetomidine (DEX)(100, 30, 10 または 3 μg/kg, i.p.)の影響： (A) 経時的変化、 (B) AUC (Area under the curve)の比較。括弧内に n を示す。HFS; high frequency stimulation. **$P < 0.01$ vs. Vehicle. *$P < 0.05$ vs. Vehicle.

第二章　デクスメデトミジンの幼若期投与が成長後の海馬シナプス可塑性に及ぼす影響

1.　幼若ラットにおけるデクスメデトミジン投与による鎮静作用

生後 7 日目ラットにおいて、DEX（5 μg/kg, 10 μg/kg）の投与により、ラットの自発運動は抑制された（5 μg/kg 投与により 25.2 ± 3.0 分、10 μg/kg 投与により 47.8 ± 2.5 分)。しかしながら、ピンセットによる足底への刺激に対しては両投与群においてペダリング反応を示し、痛覚の残存を示した。本研究で用いた量の DEX（5 μg/kg, 10 μg/kg）は、幼若ラットにおいて鎮静作用を示すが、疼痛抑制作用は示さない、すなわち鎮静量であることが示された。

2.　幼若ラットにおけるデクスメデトミジンの呼吸に及ぼす影響

生後 7 日目ラットに DEX を投与し、15 分経過後の血液ガス分析結果、ならびに呼吸数、血糖値を Table 1 に示す。Table 1 に示されるように、DEX 投与（5 μg/kg, 10 μg/kg）による呼吸抑制作用は認められなかった。

Table 1. 生後 7 日目ラットにおける dexmedetomidine が呼吸ならびに血液ガスにおよぼす影響（投与 15 分後）

		Dexmedetomidine	
	Vehicle (n=6)	5 μg/kg (n=4)	10 μg/kg (n=5)
呼吸数	195 ± 6	195 ± 17	200 ± 7
pH	7.43 ± 0.03	7.41 ± 0.01	7.41 ± 0.02
PaO_2 (mmHg)	115.2 ± 7.1	93.1 ± 10.5	100.1 ± 13.3
$PaCO_2$ (mmHg)	40.4 ± 2.9	42.7 ± 3.2	48.1 ± 3.4
HCO_3^-	28.9 ± 0.7	28.0 ± 0.5	29.2 ± 2.1
SBE	4.5 ± 0.7	4.1 ± 0.5	5.8 ± 1.5

3.　成長後の海馬シナプス伝達効率

CA1 領域において PSA が最大値を示した刺激強度について、各群に有意差は認められなかった（Vehicle; 713 ± 92 μA, n=6: DEX 5 μg/kg; 660 ± 108 μA, n=5: DEX10 μg/kg 700 ± 109μA, n=5）。また、テスト刺激強度、すなわち PSA が最大反応の約 50%となる刺激強度について、各群に有意差は認められなかった（Vehicle; 280 ± 15 μA, n=6: DEX5 μg/kg; 272 ± 47 μA, n=5: DEX 10 μg/kg 296 ± 50 μA, n=5）。幼若期 DEX 投与により、海馬における成長後のシナプス伝達効率、すなわち刺激強度に対する PSA の反応性は変化しなかった（図 7）。

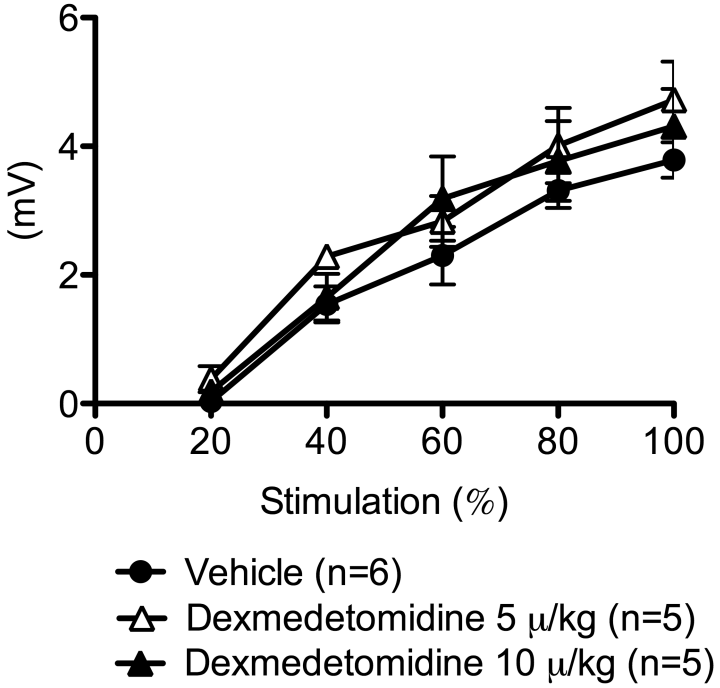


図 7. 成長後の海馬 CA1 領域における入出力曲線. 刺激強度に対する PSA（Population spike amplitude; 集合スパイク電位）をプロットした。

4.　成長後の海馬シナプス長期可塑性

Vehicle 群では、HFS により PSA は最大で 216.0 ± 11.8%まで増加し、LTP が形成された。このような LTP 形成の立ち上がりは幼若期 DEX 投与群でも同様に認められた（図 8）。すなわち、幼若期における DEX の投与は、海馬 CA1 シナプス可塑性に長期的な影響を及ぼさない可能性が示唆された。

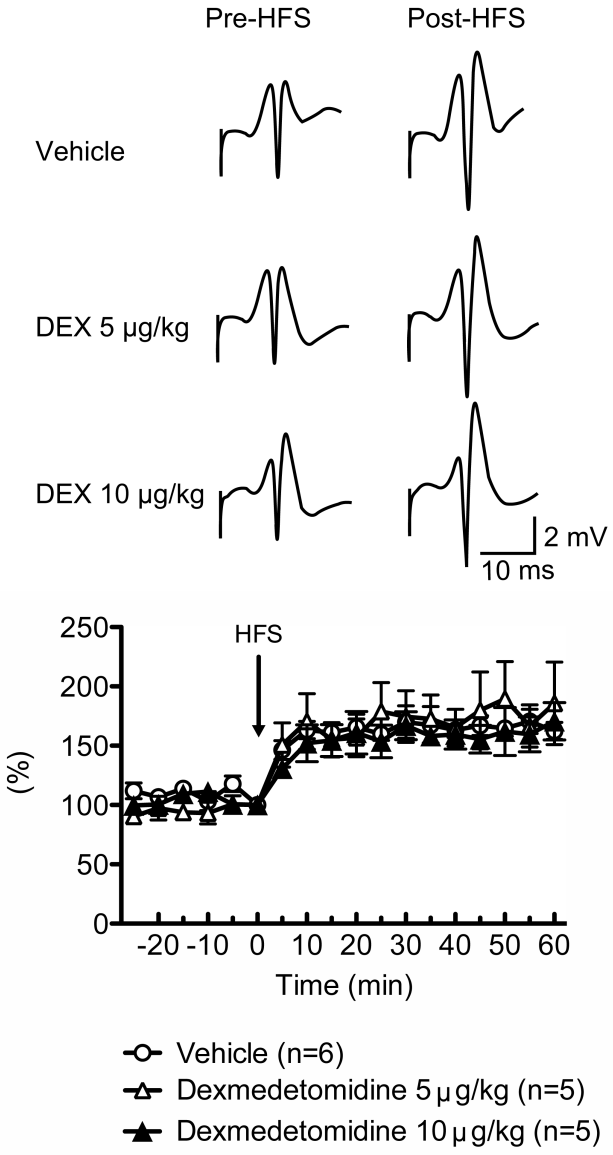


図 8. 幼若期に dexmedetomidine (DEX)を投与したラットにおける成長後の海馬 LTP 形成。生波形および集合スパイク電位（Population spike amplitude; PSA）の系時的変化を示す。HFS; high frequency stimulation.

5.　成長後の海馬シナプス短期可塑性

海馬において短間隔の二連発刺激を行うと抑制性シナプスによるフィードバック機能の発動により、二発目のPSAは抑制される（Paired-pulse inhibition; PPI）。このようなPPIは、正常な抑制性シナプス入力が保たれている生体海馬において特徴的であり、抑制性シナプス機能が破綻している場合、PPIは減少する。PPIについて、幼若期DEX (5 or 10 μg/kg) の投与による有意な変化は認められなかった。（図9）。すなわち、幼若期におけるDEX投与は、抑制性シナプスの機能発達に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

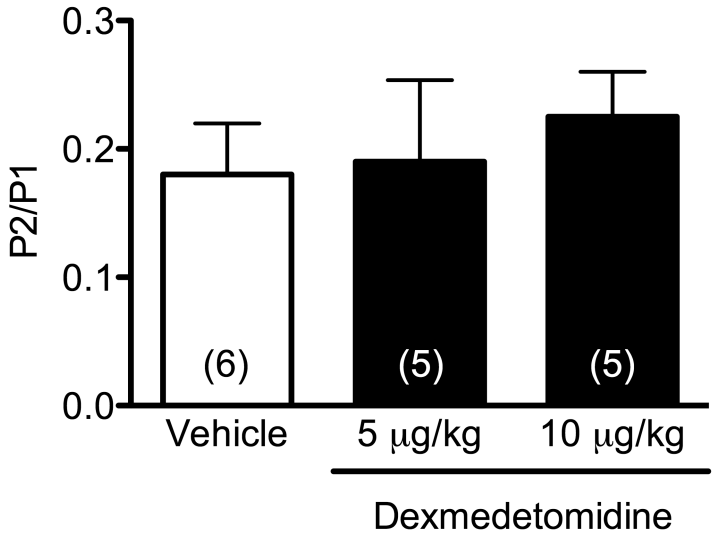


図 9.　成長後の海馬シナプス短期可塑性. 二連発刺激（刺激間隔 150 ms）による集合スパイク電位（Population spike amplitude; PSA）の変化を、二回目刺激による反応（P2）と一回目刺激による反応（P1）の比で評価した。

考察

DEX がラット海馬シナプス可塑性に及ぼす影響を明らかにする目的で、NA 神経系の入出力が保たれている条件、すなわち生体下での海馬 LTP の評価を行った。さらに、DEX による NA 神経系を介した鎮静作用という特殊な点に着目し、幼若期における DEX 投与が海馬シナプス応答に及ぼす影響を調査し、以下の結果を得た。

第一章　Dexmedetomidine がラット海馬シナプス可塑性に及ぼす影響：成ラットでの検討

成ラットにおいて30あるいは100μg/kgのDEXを腹腔内投与することで、海馬LTPを抑制することが示された。30μg/kg未満の投与では有意な影響を認めなかった。これらの結果はマウスの海馬スライスを用いてDEXがLTPを抑制すると報告したTakamatsuらの研究[4]と矛盾しない。彼らはマウスのスライスを用いて実験を行いDEXによりLTPが抑制されることを示した。一方で、ラットを用いたもう一つの*in vitro*の研究[5]では同じ濃度のDEX（50 nM）を用いているがLTP抑制は得られなかった。レセプターの発現や感受性の違いなど、種の違いが影響した可能性がある。さらにはLTP測定の刺激プロトコールや記録方法の違いによる影響もあるかもしれない。本研究は、これら二つの研究の矛盾点を解明する手がかりとなる可能性がある。

本研究においては、DEX を腹腔内に単回投与してから 20 分後に HFS を行い、以降 60 分間 PSA の観察を行った。すなわち、単回投与後 80 分間にわたり DEX の効果を調査したことになる。臨床においては DEX の持続投与が行われ、持続的に血中濃度を維持することで治療効果が得られるとされる[13]。一方で、動物実験においては、腹腔内に DEX を単回投与することで十分かつ長時間にわたる血中濃度が維持されると報告されている。例えば、DEX の効果時間は tail flick で痛みを評価した場合、ED_{50} は 27.6 ± 5.1 μg/kg で、効果は 90 分持続することが報告されている[14]。すなわち、本研究における DEX 30 μg/kg 以上の投与は、80 分以上に及ぶ電器生理実験中にも十分

な血中濃度が保たれていると考えられた。

DEXがLTPを抑制した機序は不明であるが、いくつかの機序が考えられる。海馬におけるLTPの形成や維持には、正常なNMDA受容体の活動が必須であると報告されている[15] が、一方でその形成はNAを初めとする多数の神経伝達物質により修飾される。そのひとつが青斑核から海馬に至るNA神経の投射であり[16]、また海馬CA1領域にはα_1、βアドレナリン受容体がpostsynapticに存在し、それらの活性化がLTP形成に必須であることはよく知られている[17]。

特筆すべきは我々の実験系は生体であることである。この条件では青斑核から海馬に至るシナプス投射が保たれており、DEXの投与により青斑核から海馬へのNAの放出が減少する。DEXによりシナプス前に存在するα_{2A}受容体が刺激されると、フィードバック機構を介してその抑制性の作用を発現し、NAの放出量が減少してα_1、βアドレナリン受容体の活性化が阻害される。α_1、βアドレナリン受容体の活性化はLTP形成に必須であるため、それらが阻害された結果、DEXにより間接的にLTPが抑制されると我々は考えた。

海馬CA1におけるLTP形成はまた、GABA神経系により修飾を受ける。DEXは抑制性NA神経系を抑制し、その結果腹外側視索前野核（ventrolateral preoptic nucleus; VLPO）が活性化されGABAを放出すると報告されている[18]。SevofluraneやpropofolによるLTP抑制がGABAを介する作用であることが過去に報告されてきた[19,20]ように、DEXのLTP抑制の作用機序においてもGABAが関与する可能性がある。

本研究から、吸入麻酔薬の作用が残存する時に DEX を投与する状況では、より強い健忘作用をもたらす可能性が示された。臨床においては手術麻酔で吸入麻酔薬を使用した後、術後鎮静目的に DEX を使用することがある。手術後の集中治療室入室直後のように処置が頻回で強い健忘作用を得たい時、この作用は好都合の効果となる可能性がある。

第二章　デクスメデトミジンの幼若期投与が成長後の海馬シナプス可塑性に及ぼす影響

生後 7 日目ラットへの DEX 単回投与（5 もしくは 10 μg/kg）は、成長後の海馬シナプス可塑性ならびに海馬シナプス伝達効率に影響を及ぼさなかった。成ラットで認められた海馬シナプス可塑性への影響は、幼若ラットにおいては認められないか、少なくとも一過性であり、その効果は成長後まで永続するものではないことが明らかになった。この結果は、過去の文献、すなわち幼若期に DEX 投与したラットは成長後の記憶学習能が正常であった報告と一致し[21]、海馬機能に関する幼若期 DEX の安全性が示唆する。また、これらの量の DEX は生後 7 日目ラットを十分に鎮静したが、鎮静中の呼吸抑制は認められなかった。多くの全身麻酔薬が幼若ラットに重篤な呼吸抑制作用をもたらすことを考慮すると[9,11]、DEX は呼吸維持の点からも、幼若ラットにおいて比較的安全な麻酔薬と考えられた。

幼若ラットが全身麻酔薬に暴露されると、脳の広範囲の部位に神経細胞死が生じることが 2003 年に報告された[22]。以降、多くの研究において、幼若期、特に生後 7 日目の齧歯類における麻酔薬の長期的な神経毒性が明らかになっている[22-24]。ラットにおける生後 7 日目は、妊娠中の胎児から生後数年間というヒト中枢神経系の重要な発達期に相当すると考えられている[25]。現在では臨床医療の場面において、新生児や胎児が全身麻酔薬に暴露される機会は多く、麻酔によりこの時期の脳に神経毒性が起こることが事実であれば、これは極めて重大な問題であると考えられる。これまでに神経毒性に関する報告のあった多くの全身麻酔薬は GABA 作動性、あるいは Glutamate 作動性である。これらの薬剤を幼若動物に投与した場合、海馬シナプス可塑性を含む種々の神経学的予後に影響があると報告されている[22,23]。我々は以前、GABA 作動性の鎮静薬であるペントバルビタールを生後 7 日目ラットに投与した場合、成長後の海馬 LTP 形成が抑制され、さらに記憶学習能も阻害されると報告した[9]。これらの海馬機能異常は、ラットの神経発達時期におけるペントバルビタールによる GABA 受容体の過剰な刺激により、GABA 作動性抑制性シナプスの正常な成熟が妨げられたために発

生したと考えられた。このような幼若期における GABA 受容体の刺激による GABA 神経系発達の異常は、特に生後 7 日目での暴露において著しいと報告されている[24]。この日齢以外、例えば生後 3 日目や生後 10 日目における全身麻酔薬の投与が、中枢神経系の発達に影響を及ぼしたという報告はほとんど認められない。GABA は生後 7 日目前後において、興奮性から抑制性の神経伝達物質へとその役割を変える[26]。このような GABA 神経系の著明な発達時期である生後 7 日目においては、GABA 神経系への過剰な入力は、おそらく GABA 受容体、ひいては GABA 神経系の成熟を強く修飾し、神経学的予後に影響を及ぼした可能性がある。

DEX は他の全身麻酔薬と異なり、α_2 受容体を介して鎮静作用をもたらす。α_2 受容体が海馬シナプスの成長におよぼす影響は不明であるが、本研究の結果から、生後 7 日目における α_2 受容体の刺激は、海馬シナプス機能に長期的な影響を及ぼさないと考えられた。海馬における α_2 受容体の成熟の時期は GABA 受容体や glutamate 受容体の成熟と大きく異なると報告されている[27]。すなわち、α_2 受容体は、中枢神経系の多くの部位で、生後第 2 週目に最高レベルに達すると報告されている。海馬 CA1 領域においては、誕生から生後 10 日目まで α_2 受容体の数に変化は認められず、その後徐々に増加する[27]。したがって、生後 7 日目という時期は、α_2 受容体を介したノルアドレナリン神経系発達における外部からの刺激に対する感受性が低い時期かもしれない。この時期は GABA 神経系の著しい発達時期であるから、GABA 神経系の修飾には敏感である可能性があるが、α_2 受容体の修飾に関しては高い感受性をもたないのかもしれない。この仮定に基づけば、このような時期における DEX による一時的な刺激による海馬シナプス機能への影響は、あったとしても一時的かつ可逆的なものであった可能性がある。このため、成ラットで認められたような海馬 LTP 形成抑制作用は、幼若期投与により認められなかったと考察している。一方で、海馬と異なる中枢神経系の他の部位、たとえば皮質や中隔などは、生後 1 週間という時期に、α_2 受容体の感受性が高いと報告されている[27,28]。したがって海馬以外の中枢神経系の他の部位では、生後 7 日目における DEX 投与により、長期的影響が発生する可能性は、本研究では除外できない。幼若期 DEX の神経学的予後への影響を評価するにあたり、今後、海馬

のみならず中枢神経系の他の部位における神経発達への影響、また生後 7 日目のみならず、他の発達時期における神経発達への影響に関する検討が必要と考えられる。

幼若ラットは成ラットに比して、DEX 投与に際し低い ED_{50} を示すと報告されている[29]。すなわち、成ラットでは ED_{50} がおよそ 30 μg/kg であるのに対し、生後 7 日目ラットにおける ED_{50} はおよそ 0.8 μg/kg である[29]。この報告に基づいて、我々は成ラットより低用量（5 or 10 μg/kg）を幼若ラットの鎮静量として使用し、評価に用いた。DEX は通常、有効血中濃度を保つために持続静脈内投与により臨床使用される[13]。これと異なり、我々は本研究においては DEX 腹腔内単回投与を行った。腹腔内投与は動物において静脈内投与と同程度の効果を持つ事が報告されており、ラットも就眠していた事から、単回投与によっても十分有効な投与効果が得られていた事が考えられる。本研究では DEX の血中濃度を測定してないため、今回行った DEX 単回投与が、どの程度の血中濃度をもたらしたかは不明である。しかしながら、単回投与によっても十分な血中濃度が保たれるという報告も存在する。例えば、ヒトにおいて 2 μg/kg の DEX 単回投与により、投与直後に 2.35 ng/ml の血中濃度が得られ、投与 3 時間後の血中濃度も 0.26 ng/ml 以上であったと報告されている[30]。この濃度は、ヒトを鎮静するに十分な血中濃度とされる。また、成ラットにおいても、DEX 単回投与により持続した血中濃度の増加が認められている。成ラットでは DEX 30 μg/kg 投与 90 分後に、血中濃度は 1 ng/ml 以上を示したと報告されている（成ラットは 1.09 ng/ml 以上の血中濃度で鎮静される）[31]。以上から、 本研究における幼若ラットにおける DEX 単回投与は、十分な有効血中濃度を保っていたことが推察された。

幼若動物における全身麻酔薬の神経毒性は今や明らかであるが、そのほとんどが GABA 神経系作動性、glutamate 神経系拮抗性、もしくはその両方の性質を持つ麻酔薬によるものである。中枢神経系の発達時期における GABA 神経系や glutamate 神経系の修飾が何らかの神経学的異常をもたらしうるならば，これらの神経系を介さない麻酔薬の使用を考慮するのは必然である。本研究では、α_2 受容体作動薬である DEX の幼若期投与による長期的な海馬機能への影響は認められず、DEX が幼若動物において比較的安全に使用できる可能性が示唆された。

総括および結論

本研究では、DEX による海馬シナプス可塑性への影響を、生体ラットを用いて電気生理学的に追求した。また、ノルアドレナリン神経系への作用に着目し、海馬シナプス応答に及ぼす幼若期 DEX の影響を検討した。その結果、①DEX は海馬 CA1 領域における LTP 形成を抑制することが明らかとなった。一方で、②幼若期に DEX を投与したラットでは、成長後の海馬シナプス応答に変化が認められないことから、DEX による海馬シナプス可塑性の修飾は、幼若期とくに生後 7 日目ラットにおいては軽微である可能性が示唆された。

このような成ラットならびに幼若ラットを用いた電気生理学的解析は、DEX による鎮静・健忘作用の機序を解明するとともに、臨床小児麻酔における安全な麻酔薬の展開に結びつくものと期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に対し暖かい御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科　麻酔・周術期医学分野　森本　裕二教授に甚大なる謝意を表します。また、本研究において多大なる御助言と御指導を賜りました麻酔・周術期医学分野　橘　かおり先生に厚く御礼申し上げます。また、実験に御協力いただいた麻酔・周術期医学分野の皆様の御理解と御協力に感謝いたします。

引用文献

1 Pryor, K. O. *et al.* Visual P2-N2 complex and arousal at the time of encoding predict the time domain characteristics of amnesia for multiple intravenous anesthetic drugs in humans. *Anesthesiology* 113, 313-326 (2010).

2 Hayama, H. R. *et al.* Event-related functional magnetic resonance imaging of a low dose of dexmedetomidine that impairs long-term memory. *Anesthesiology* 117, 981-995.

3 Bliss, T. V., Lancaster, B. & Wheal, H. V. Long-term potentiation in commissural and Schaffer projections to hippocampal CA1 cells: an in vivo study in the rat. *J. Physiol.* 341, 617-626 (1983).

4 Takamatsu, I. *et al.* Dexmedetomidine reduces long-term potentiation in mouse hippocampus. *Anesthesiology* 108, 94-102 (2008).

5 Niittykoski, M., Haapalinna, A. & Sirvio, J. Diminution of N-methyl-D-aspartate-induced perturbation of neurotransmission by dexmedetomidine in the CA1 field of rat hippocampus in vitro. *Neurosci. Lett.* 281, 95-98 (2000).

6 Tachibana, K. *et al.* Isoflurane bidirectionally modulates the paired-pulse responses in the rat hippocampal CA1 field in vivo. *Anesth. Analg.* 105, 1006-1011 (2007).

7 Thiels, E. *et al.* NMDA receptor-dependent LTD in different subfields of hippocampus in vivo and in vitro. *Hippocampus* 6, 43-51 (1996).

8 Yeckel, M. F. & Berger, T. W. Spatial distribution of potentiated synapses in hippocampus: dependence on cellular mechanisms and network properties. *J. Neurosci.* 18, 438-450 (1998).

9 Tachibana, K. *et al.* Long-lasting effects of neonatal pentobarbital administration on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity. *Brain Res.* 1388, 69-76 (2011).

10 Loepke, A. W. *et al.* The effects of neonatal isoflurane exposure in mice on brain cell viability, adult behavior, learning, and memory. *Anesth. Analg.* 108, 90-104 (2009).

11 Danneman, P. J. & Mandrell, T. D. Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab. Anim. Sci.* 47, 386-395 (1997).

12 Tachibana, K. *et al.* Neonatal exposure to high concentration of carbon

dioxide produces persistent learning deficits with impaired hippocampal synaptic plasticity. *Brain Res.* 1507, 83-90 (2013).

13 Kamibayashi, T. & Maze, M. Clinical uses of alpha2 -adrenergic agonists. *Anesthesiology* 93, 1345-1349 (2000).

14 Dawson, C., Ma, D., Chow, A. & Maze, M. Dexmedetomidine enhances analgesic action of nitrous oxide: mechanisms of action. *Anesthesiology* 100, 894-904 (2004).

15 McEntee, W. J. & Crook, T. H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl).* 111, 391-401 (1993).

16 Loy, R., Koziell, D. A., Lindsey, J. D. & Moore, R. Y. Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 189, 699-710 (1980).

17 Katsuki, H., Izumi, Y. & Zorumski, C. F. Noradrenergic regulation of synaptic plasticity in the hippocampal CA1 region. *J. Neurophysiol.* 77, 3013-3020 (1997).

18 Nelson, L. E. *et al.* The alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine converges on an endogenous sleep-promoting pathway to exert its sedative effects. *Anesthesiology* 98, 428-436 (2003).

19 Ishizeki, J. *et al.* Amnestic concentrations of sevoflurane inhibit synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons through gamma-aminobutyric acid-mediated mechanisms. *Anesthesiology* 108, 447-456 (2008).

20 Nagashima, K., Zorumski, C. F. & Izumi, Y. Propofol inhibits long-term potentiation but not long-term depression in rat hippocampal slices. *Anesthesiology* 103, 318-326 (2005).

21 Sanders, R. D. *et al.* Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats. *Anesthesiology* 110, 1077-1085 (2009).

22 Jevtovic-Todorovic, V. *et al.* Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J. Neurosci.* 23, 876-882 (2003).

23 Loepke, A. W. & Soriano, S. G. An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth. Analg.* 106, 1681-1707 (2008).

24 Yon, J. H., Daniel-Johnson, J., Carter, L. B. & Jevtovic-Todorovic, V. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the

intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 135, 815-827 (2005).

25 Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B. & Anand, K. J. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 28, 931-937 (2007).

26 Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R. & Khazipov, R. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215-1284 (2007).

27 Happe, H. K. *et al.* Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. *Neuroscience* 123, 167-178 (2004).

28 Podkletnova, I. *et al.* Neonatal 6-hydroxydopamine treatment affects GABA(A) receptor subunit expression in the frontal cortex but not the hippocampus of rats during postnatal development. *Dev. Neurosci.* 22, 296-302 (2000).

29 Sanders, R. D. *et al.* Dexmedetomidine exerts dose-dependent age-independent antinociception but age-dependent hypnosis in Fischer rats. *Anesth. Analg.* 100, 1295-1302, table of contents (2005).

30 Bloor, B. C., Ward, D. S., Belleville, J. P. & Maze, M. Effects of intravenous dexmedetomidine in humans. II. Hemodynamic changes. *Anesthesiology* 77, 1134-1142 (1992).

31 Bol, C. J., Vogelaar, J. P. & Mandema, J. W. Anesthetic profile of dexmedetomidine identified by stimulus-response and continuous measurements in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 153-160 (1999).