

学 位 論 文 題 名

細胞内二次情報伝達系に対する揮発性麻酔薬の抑制的作用の解析

－ mRNA 注入アフリカツメガエル卵母細胞の受容体発現モデルを用いて－

学位論文内容の要旨

全身麻酔薬は中枢神経系のシナプス伝達を著明に抑制することが知られている。この機序として、麻酔薬によるシナプス前膜からの伝達物質の放出抑制、シナプス後膜の受容体の応答性低下、イオンチャネル活性の抑制、膜の興奮性の変化などが検討されてきた。これまでの研究成果は全身麻酔の機序が複数の作用点をもつ複合的な作用の結果であることを示している。最近、種々の細胞においてアゴニストに対する受容体の親和性、脱感作の速度、イオンチャネルの開閉頻度などが、細胞内の Ca^{2+} 濃度や種々の細胞内二次情報伝達系によって影響を受けることが明かとなってきた。これらの報告は細胞内の代謝調節系の変化がシナプス伝達の変性を変化させる可能性を示唆するものであり、麻酔薬の細胞内二次情報伝達系に対する影響を検索することは重要な課題である。

本研究では中枢神経系の細胞内二次情報伝達系モデルとして、ラット脳から抽出のmRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞の遺伝子発現系を用い、揮発性麻酔薬の細胞内二次情報伝達系に対する影響を解析した。

方法

アフリカツメガエルの卵母細胞は外来性のmRNAを効率よく翻訳し、細胞膜表面に受容体やイオンチャネルを発現することが知られている。このなかには受容体がG蛋白質と接合する代謝型情報伝達系も含まれ、セロトニン(5-hydroxytryptamine: 5-HT)をアゴニストとする系が知られている。アフリカツメガエルに発現する5-HT受容体のサブクラスは5-HT_{1c}であり、この受容体はイノシトールリン酸(PI)代謝と接合する。アゴニストの結合により、G蛋白質を介してinositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)とdiacylglycerol(DG)を生成する。IP₃は小胞体から Ca^{2+} を放出し、最終的に Ca^{2+} 依存性Cl⁻チャネルを開閉させる。

本研究ではこのCl⁻電流を指標として揮発性麻酔薬の細胞内二次情報伝達系に対する影響を解析した。また、作用部位の同定のために細胞内二次情報伝達物質であるIP₃およびCa²⁺を直接細胞内に注入し、誘発されるCl⁻電流に対する揮発性麻酔薬の影響も解析した。

アフリカツメガエル卵母細胞は低体温麻酔のもとで下腹部の切開により卵巣の一部を取り出し、ND96培養液中でピンセットにて機械的に分離した後、細胞分離用コラゲナーゼで細胞を酵素的に除去することで単離遊離細胞を得た。mRNAはWister系雄性成熟ラットの全脳より、ethanol沈殿法にて抽出した。卵母細胞へのmRNAの微量注入は先端の開口径が15 μmのガラス管を用いて微量注入器(Drummond microdispensor)にて50 nlずつ注入した。

電気生理学的測定は、記録槽に卵母細胞を静置し、灌流液を2～3 ml/分の速度で灌流し、二電極膜電位固定法にて膜電位を-60 mVに固定した際の電流変化から解析した。薬物の投与はY-tube法により迅速に行った。電気的応答の記録はA/D変換器を介してHP300コンピュータにて処理し、実時間のディスプレイに表示とともにフロッピーディスクに記録した。5-HTに対する濃度-反応曲線はHillの式にて近似した。

IP₃およびCa²⁺の細胞内注入は先端開口径が3 μmの微小ガラス管を用いて、窒素ガスによる圧注入法（駆動圧2kg/cm²）で行った。1回注入量はソレノイドバルブの開放時間によって調節し、mineral oil中で放出される水球の大きさを測定してIP₃ 5 fmol, Ca²⁺ 2.5 pmol となるようにした。

揮発性麻酔薬のハロタン、イソフルラン、メトキシフルランの作用機序は共通するものと考え、定性的実験はこれら3種の麻酔薬で行い、定量的実験はメトキシフルランで行った。定量的実験にメトキシフルランを用いた理由は、これら3種類の揮発性麻酔薬の中で最も水溶性が高く、かつ最も蒸発しにくいため、安定した水溶液となるからである。ハロタン、イソフルランの投与は専用の気化器から、バブリングストーンを介して灌流液を曝気し、10分間の灌流後に5-HT投与により誘発される電流応答の変化を観察した。麻酔薬の濃度はガスクロマトグラフィで測定した。メトキシフルランは超音波振盪器で溶解させ

て用いた。

結果

mRNAを注入した卵母細胞は-60 mV電位固定下で5-HTを投与すると鋭い一過性の内向き電流（T成分）とそれに引き続くゆらぎをともなった遅い成分（S成分）からなる二相性の内向き電流を生じた（図2）。T成分に関して、5-HTの濃度を0.001~3 μ Mの間で変化させて、濃度-反応曲線をプロットするとED₅₀, ED₉₅は各々0.095、1.12 μ MでHill係数は1.2であった。T成分の最大振幅は859.2 $\pm$ 44.8 nA(n=51)であった。ハロタン1%, 3%投与でT成分の振幅は対照値の各々70%, 30%となり、イソフルラン1%, 3%投与で各々54%, 20%, メトキシフルランでは1mM, 3mM投与で各々63%, 25%であった。定量的検討はメトキシフルランを用い、濃度-反応曲線を作成した。メトキシフルランの0.5, 1, 3 mM投下で電流応答の最大値は対照の75, 60, 20%に抑制された。メトキシフルランによる濃度-反応曲線はED₅₀が右方偏位することなく最大値が抑制されたので非競合的抑制であることが示唆された。

IP₃, Ca²⁺の細胞内注入によって誘発される電流応答はハロタン、イソフルラン、メトキシフルランのいずれによっても変化は認められなかった。

考察

本研究で得られた成績から5-HTで惹起されるCl⁻電流はハロタン、イソフルランおよびメトキシフルラン投与で抑制され、この変化は可逆的であることが判明した。5-HTで誘発されるCl⁻電流に対する揮発性麻酔薬の影響をメトキシフルランを用いて定量的に解析した結果、以下の2点が明らかとなった。すなわち、1) 5-HTの濃度-反応曲線は非競合的に抑制される、2) 揮発性麻酔薬はIP₃, およびCa²⁺の細胞内注入で誘発されるCl⁻電流を抑制しない。これらの成績は、揮発性麻酔薬が細胞内のCa²⁺貯蔵からのCa²⁺放出、およびCa²⁺によるCl⁻チャネルの開口のいずれをも抑制しないことを示唆する。したがって、揮発性麻酔薬は受容体、G蛋白質、PLCのいずれかの活性過程、あるいはそのカブリングを抑制するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劔 持 修

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 本 間 研 一

学位論文

細胞内二次情報伝達系に対する揮発性麻酔薬の抑制的作用の解析：

mRNA注入アフリカツメガエル卵母細胞の受容体発現モデルを用いて

本研究では、揮発性麻酔薬の細胞内二次情報伝達系に及ぼす影響を検討するために、中枢神経系モデルとしてラット脳より抽出したmRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞の受容体発現モデルを作成した。このモデルにおいては代謝調節型受容体、G蛋白質、phospholipase C (PLC) を介してinositol trisphosphate (IP₃) が産生され、細胞内Ca²⁺storeからCa²⁺が放出され、最終的にCa²⁺依存性Cl⁻チャネルが開く。また、このモデルにおいて発現する代謝調節型受容体の中には、5-hydroxytryptamine (5-HT)受容体が存在することが知られている。本研究では5-HT投与により生じる代謝調節型受容体を介する内向きCl⁻電流を指標として、細胞内二次情報伝達系に及ぼす揮発性麻酔薬の影響を検討した。さらに、直接細胞内にIP₃, Ca²⁺を注入して誘発されるCl⁻電流を指標にして揮発性麻酔薬の作用部位の同定を行った。

<方法>

アフリカツメガエルの下腹部を氷冷による低体温麻酔下に切開し、卵巣を取り出した。ピンセットで卵母細胞およびろ胞を機械的に分離した後、細胞分離用コラゲナーゼで処理して単離遊離細胞を得た。mRNA の抽出は Wistar 系ラットの全脳から guanidium/CsCl 平衡密度勾配遠心法にて行った。mRNA の卵母細胞への注入は Drumond digital

microdispenser を用いて50nlずつ注入した。mRNA注入後の卵母細胞は培養液シャーレ中で振盪培養した。電気生理学的測定は記録槽（容積0.3ml）内に静置した卵母細胞を記録槽の側孔より2-3ml/分の速度で灌流して行った。5-HTの投与はY-tube 法によりソレノイドバルブを介して迅速に行った。電気生理学的応答は二電極膜電位固定法にて膜電位を-60mVに固定した際の電流変化から解析した。IP₃およびCa²⁺の細胞内注入は窒素ガスによる圧注入法で行い、1回注入量はソレノイドバルブの開放時間によって調節し、IP₃ 5fmol, Ca²⁺ 2.5pmol となるようにした。揮発性麻酔薬であるハロタン、イソフルラン、メトキシフルランの作用機序は共通するものと考え、定性的実験はこれら3種の麻酔薬で行い、定量的実験はメトキシフルランで行った。その理由はメトキシフルランは物理的性質からこれら3種の麻酔薬の中で最も水溶性が高く、安定した水溶液が得られるからである。ハロタンとイソフルランの投与はそれぞれ専用の気化器からバブリングストーンを介して灌流液を曝気し（空気0.3l/分）、濃度を1%, 3%として10分間灌流後、5-HT投与により誘発される電流応答の変化を観察した。定量的実験においてはメトキシフルランを超音波振盪器で溶解させて用いた。濃度-応答曲線を得るために、5-HT濃度を0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 μ Mと変化させて電流応答のT成分の振幅をプロットした。

<結果>

定性的実験において、5-HT誘発電流は濃度依存性に抑制され、ハロタンでは1%, 3%投与でT成分の振幅は対照値の各々70%, 30%となり、イソフルランでは1%, 3%投与で各々54%, 20%、メトキシフルランでは1mM, 3mM投与で各々63%, 25%となった。これら麻酔薬による5-HT 反応の抑制には再現性が認められ、麻酔薬の洗い流しによってほぼ対照値に復帰した。定量的実験においてはメトキシフルランの0.5, 1, 3mM 投与下で電流応答の最大値は対照値の75, 60, 20%に抑制された。メトキシフルランによる濃度-反応曲線はED₅₀ が右方偏位することなく、最大値が抑制されたので非競合的抑制であることが示唆された。IP₃, Ca²⁺注入によって誘発される電流応答はハロタン、イソフルラン、メトキシフルランのいずれの濃度によっても変化は認められなかった。

<考察>

5-HT で誘発される Cl^- 電流に対する揮発性麻酔薬の影響について解析した結果、以下の2点が明らかとなった。1) 5-HTの濃度-反応曲線は非競合的に抑制されること、2) 揮発性麻酔薬は IP_3 および Ca^{2+} の細胞内注入で誘発される Cl^- 電流を抑制しないこと、である。今回の成績は、揮発性麻酔薬が細胞内の Ca^{2+} store からの Ca^{2+} 放出、および Ca^{2+} による Cl^- チヤネルの開口のいずれをも抑制しないことを示唆する。したがって、揮発性麻酔薬は代謝調節型受容体、G 蛋白質、PLC のいずれかの活性過程あるいはそのカップリングを抑制するものと考えられる。

< 結語 >

- 1) 揮発性麻酔薬の細胞内情報伝達系に対する影響を検討するため、中枢神経系モデルとしてラット脳 mRNA を注入したアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。
- 2) 揮発性麻酔薬は代謝調節型受容体を介する細胞内二次情報伝達系を非競合的に抑制した。
- 3) 代謝調節型受容体、G 蛋白質、PLC などの細胞膜に存在する成分が揮発性麻酔薬の重要な作用点であることが示唆された。