

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2022年度 博士論文

フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いたセボフルランの
大脳皮質体性感覚野への作用の検討

2023年2月28日

妹尾 美幾

Miki Senoo

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

高度先進麻酔科学分野

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2022年度 博士論文

フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いたセボフルランの
大脳皮質体性感覚野への作用の検討

2023年2月28日

妹尾 美幾

Miki Senoo

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

高度先進麻酔科学分野

有坂博史教授 指導

論文内容要旨

セボフルラン (sevo) は現在世界で最も臨床使用されている揮発性吸入麻酔薬であるが, sevo 麻酔下における外部刺激に対して大脳皮質体性感覚野

(SC) がどのように興奮するか十分検討されていない. これまで SC の興奮は電気生理学的手法を用いて検討されており, その興奮を動的イメージングにて可視化する試みはなされていない. そこで本論文は, sevo 麻酔下のマウス頬部皮下への電気刺激に対する SC の興奮をフラビン蛋白蛍光イメージング法 (FFI) にて可視化し, sevo 投与濃度の違いによる変化を検討した.

実験動物は ICR マウス (オス, 週齢 8~12, 11 匹) を使用した. 3.0%sevo を吸入させ, マウス頭蓋骨にイメージング用チャンバーフレームを接着固定し, マウス左側頬部皮下に刺激用双極電極を刺入した. 3.0%sevo の投与を一旦終了し, マウスを覚醒させたのち, 左側頬部皮下への電気刺激 (持続時間 1 ms, 強度 1 V, 頻度 20 Hz, 時間 0.5 s) による SC でのフラビン蛋白蛍光変化を, イメージングシステムを用いて記録した. 測定はマウス覚醒時, 4 つの異なる sevo 濃度 (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%) をそれぞれ 5 分吸入後, sevo 投与終了 10 分, 20 分, 30 分後に行った. 評価項目は, フラビン蛋白蛍光最大値, 蛍光最大値の 75%以上の蛍光領域の面積, 電気刺激開始から終了時における蛍光減少の差, 刺激開始から蛍光最大値までの時間である. 覚醒時におけるフラビン蛋白蛍光は, 電気刺激開始後に減少し, 約 1 秒後に蛍光増加を認め, 約 2 秒後にピーク値に達する二相性変化を示した. この 2 相性変化は sevo0.5%か

ら減少しはじめ、1.5%を超えると消失し、sevo 投与終了 10 分後には再度観察された。フラビン蛋白蛍光最大値は覚醒時に対し sevo1.0%で有意に減少し、1.5%、2.0%で消失した。蛍光最大値の面積と電気刺激開始時から終了時までの蛍光減少値の差も、sevo1.5%、2.0%では消失した。刺激開始時から蛍光最大値までの時間は sevo 濃度による影響を受けなかった。

SC の二相性変化は、刺激により酸化型フラビン蛋白が減少し、その後に増加することを意味する。覚醒時ならびに 1.0%以下の低濃度 sevo 麻酔では 2 相性変化が認められたが、中濃度（1.5%）以上の sevo 麻酔ではその反応が消失するため、中濃度の sevo 麻酔下では中枢において刺激が認知されていない可能性が示唆された。

論文審査要旨

本審査委員会は申請者が博士の学位に十分値するものと認めた。

2022 年 2 月 28 日

主 査：讃岐 拓郎

副 査：高橋 俊介

副 査：小松 知子

目次

緒言	1
実験材料(対象)および方法	4
結果	9
考察	12
結論	18
謝辞	19
文献	19
表および図	
図1	32
図2	33
図3	34
図4	35

1. 緒言

大脳皮質体性感覚野 (SC) は刺激に対する体部位局在があることがわかって
いる¹⁾。これまで、実験動物を用いた脳機能生理学研究では、電気生理学的手
法が広く用いられてきたが、近年の技術進歩により、空間的および経時的な記
録が可能な光学イメージング法が用いられるようになった²⁻⁶⁾。光学イメージ
ング法には、外因性色素を使ったイメージング法があるが、脳を露出して染色
するため侵襲が大きく、染色の不均一が生じるといった問題がある。これに対
し、フラビン蛋白蛍光イメージング法 (FFI) は、脳の露出を必要とせず経頭蓋
的に自家蛍光の測定が可能なイメージング法である。細胞内ミトコンドリア電
子伝達系蛋白の一つであるフラビン蛋白は、脳神経細胞の活動により細胞内カ

ルシウム濃度が上昇し酸素代謝が亢進すると、還元型フラビン蛋白 (FMNH₂) から酸化型フラビン蛋白 (FMN) へと変化する。酸化型フラビン蛋白は、青色励起光を照射すると緑色自家蛍光を発する性質がある⁷⁾。この内因性信号を利用して、特定部位への刺激に対する SC の興奮領域を特定するイメージング法が開発され、高次脳研究に応用されている⁸⁻¹⁸⁾。これらの動物での研究の多くには、麻酔薬としてウレタンやケタミン-キシラジン混合物等が使用されてきた。

一方、揮発性吸入麻酔薬であるセボフルラン (sevo) は、ヒトの全身麻酔時の麻酔薬として臨床的に使用されている。sevoは最小肺胞濃度 (MAC) が約 1.7%, 血液ガス分配係数が0.63と適度な麻酔力価があり、導入と覚醒が速やかで、気道刺激性が少ない特徴を持っている¹⁹⁻²¹⁾。sevoの作用機序は、 γ アミ

ノ酪酸 (GABA_A) 受容体等の関与がわかっているが未だ不明な部分が多く、作用機序に関する研究報告が多数されている²²⁻²⁹⁾。

実験動物を用いた一次視覚野でのsevoの影響を調査した研究では、脳波に確認される自発活動は濃度依存的に抑制され、高濃度の吸入で消失するが、視覚刺激に対する誘発電位は残存することを報告している³⁰⁾。これまでのFFIの研究では、ウレタン麻酔下の実験動物における触覚、侵害刺激、視覚刺激、音響刺激に対する大脳皮質の応答が報告されているが、麻酔薬の濃度変化による刺激に対する大脳皮質の応答に関する報告はない⁸⁻¹⁸⁾。

麻酔薬の濃度が至適濃度であれば、刺激に対するSCの興奮は抑制されることが予測される。我々は、sevo麻酔下での刺激に対してMACに近い濃度で、SCでのフラビン蛋白蛍光の応答が確認できなくなると仮説を立てた。その仮説を検

証するために、本研究はFFIを用いてマウスの刺激に対するSCの興奮を可視化し、sevoの濃度変化によるSCへの影響を検討した。

2. 実験材料（対象）及び方法

全米アカデミー研究評議会「Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals」(第8版, 2011年改訂) 及び日本生理学会「Guiding principles for the care and use of animals in the field of physiological sciences」

(2015年4月1日一部改訂) に準拠した。本研究は、植草学園大学実験動物倫理委員会の承認を得ている(承認番号: URAC19-06)。

2-1. 実験手順

実験動物はICRマウスを使用した(オス, 週齢8~12, 11匹, 三協ラボサービス, 東京)。外科処置はsevo3.0% (セボフレン[®]吸入麻酔液, 丸石製薬株式会

社，大阪）を持続吸入させ，入眠後にマウス頭部毛髪をカット後，頭部皮膚を
切除し頭蓋骨を露出した．頭部切除時の局所麻酔薬として2%リドカイン塩酸塩
ゼリー（キシロカイン[®]ゼリー2%，サンド株式会社，東京）を使用した．マウ
ス頭蓋骨にイメージング用チャンバーフレーム（CF-10，NARISHIGE，東京）を
歯科用レジンセメント（スーパーボンド[®]，サンメディカル，滋賀）で接着固
定し，さらにフレームを頭部固定装置（MAG-2，NARISHIGE，東京）に取り付け
た．齧歯類の頬ヒゲの感覚を伝達するバレル野は，SCで大きな領域を占めるた
め，バレル野を記録部位とし，マウス左側頬部皮下に刺激用双極電極を刺入し
た．頭蓋骨表面の乾燥防止のため流動パラフィンを塗布した．

sevo3.0%を一旦終了し，マウスの覚醒を確認した後，左側頬部皮下への電気
刺激によるSCでのフラビン蛋白蛍光変化を，イメージングシステムMiCAM02

(ブレインヴィジョン, 東京) を用いて記録した (図1). 刺激は電気刺激装置 (SEZ3100, 日本光電, 東京) を用い, 持続時間1 ms, 強度1 V, 頻度20 Hz で0.5 s間与えた. 体温は保温パッドを使用して37°Cに維持し, 実験は自発呼吸下で行った.

2-2. フラビン蛋白蛍光イメージング

先行実験としてShibukiら⁹⁾の実験に則り, FFIを用いて左側頬部への刺激に対する右側SCバレル野のフラビン蛋白蛍光変化を確認した (図1, 2Aa). SCに, 高輝度LED光源 (LEX2-B, ブレインヴィジョン, 東京) から青色励起光 (450 – 490 nm) を照射すると緑色自家蛍光 (500 – 550 nm) を発する. これを冷却 CCD

カメラシステム (MiCAM02) を取り付けた正立蛍光顕微鏡 ($\times 1.0$ 倍, THT, ブ
レインビジョン, 東京) を用いて記録した (図1) .

光学イメージングとデータ解析は, MiCAM02ハードウェアおよびソフトウェ
アパッケージ (BV Ana, ブレインビジョン, 東京) を用いた. 撮影範囲は
 96×64 ピクセル ($6 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) , 総フレーム数は512フレーム, サンプリン
グ時間は10 ms/フレーム, 総記録時間は5120 msに設定した. 電気刺激は記録
開始から128フレーム後, すなわち記録開始後1280 msに刺激を開始した. 信号
雑音比の向上のため, 0.15 Hzで10回施行して検出された信号を加算平均した
イメージを出力した. データは 3×3 ピクセルの空間フィルターと25%のdF/Fmax
フィルターを通して表示した (図2Ab, 3) . 測定はマウス覚醒時 (awake) と,
sevo0.5%, sevo1.0%, sevo1.5%, sevo2.0%を各5分吸入後, sevo2.0%の記録後

にsevoを終了し，sevo終了10分後 (off10 min) ， 20分後 (off20 min) ， 30分後 (off30 min) に測定した． 覚醒時とsevoの濃度変化におけるSCの興奮を比較するため，神経細胞の活動量の大きさの比較に，フラビン蛋白蛍光最大値 (peak $\Delta F/F$ (%)) ， 活動領域の範囲の比較を， 蛍光最大値の75%以上の蛍光領域の面積 (Activated area (pixels)) ， 電気刺激中の活動量の比較を， 電気刺激開始から終了時における蛍光減少の差 ($\Delta F/F$ at end of stim (%)) ， 活動が最高潮に達する時間を， 刺激開始から蛍光最大値までの時間 (Latency (ms)) として測定した (図2B) ．

2-3. 解析

覚醒時と各データ間を一元配置分散分析に続いて，Dunnett法で検定した．

P < 0.05を統計的に有意とし，記録は平均値±標準偏差(mean ± SD)で示し

た． Latencyは， 刺激に対する反応がなかったsevo1.5%， 2.0%をデータとしな
かった．

3. 結 果

マウス左側頬部皮下への電気刺激に対し， 右側 SC ではフラビン蛋白蛍光の
強度が刺激直後に減少し， その後増加する二相性の変化が生じた． 覚醒時の典
型例を示す（図2）． 電気刺激後にフラビン蛋白蛍光変化は， SC バレル野で確
認された後， 蛍光は増大し SC 全体に広がった（図2A）． 経時的な蛍光変化は，
電気刺激開始から蛍光強度が減少し， 約 0.9 秒後に蛍光強度が増加し始め， 約
2.1 秒に最大値に達した（図2B）．

awakeに比べてsevo0.5%では、二相性変化の減少が認められ、sevo1.5%ではSCでの蛍光変化が消失した。off10 minで、再びフラビン蛋白蛍光の二相性変化を確認でき、off20 minと経時的に蛍光変化の増強を認めた (図3)。

awakeとsevo濃度変化との比較を示す (図4)。peak $\Delta F/F$ は、awakeでは $0.79 \pm 0.59\%$ (mean \pm SD) であった。sevo0.5%では $0.45 \pm 0.49\%$ に減少したが、awakeとの間に有意差は認められなかった。sevo1.0%では $0.19 \pm 0.30\%$ まで有意に低下し ($p < 0.01$)、sevo1.5%および2.0%では、刺激によるフラビン蛋白蛍光の応答が確認できなかった。また、off10 minで $0.47 \pm 0.09\%$ までフラビン蛋白蛍光の上昇が認められ、off20 minに $0.60 \pm 0.32\%$ 、off30 minに $0.70 \pm 0.39\%$ とawakeに近い値まで回復した (図4A)。Activated areaではawakeで 3013 ± 2165 pixels, sevo0.5%で 2259 ± 2070 pixels, sevo1.0%で $1387 \pm$

2147 pixelsと徐々に面積縮小傾向が見られたが有意差はなく, sevo1.5%, 2.0%で有意差を認めた. off10 minでは 2879 ± 1959 pixels, off20 minで 2995 ± 1712 pixels, off30 minで 3397 ± 1761 pixelsと経時的に面積拡大を示したが有意差は認められなかった (図4B). $\Delta F/F$ at end of stimは, awake で $-0.66 \pm 0.58\%$, sevo0.5%で $-0.28 \pm 0.21\%$, sevo1.0%で $-0.26 \pm 0.27\%$, off10 minで $-0.56 \pm 0.18\%$, off20 minで $-0.50 \pm 0.13\%$, off30 minで $-1.11 \pm 1.30\%$ であった. awakeとの有意差はsevo1.5%と2.0%で認められた (図4C). Latencyでは, awakeで 2151 ± 775.9 ms, sevo0.5%で 1679 ± 709.2 ms, sevo1.0%で 2433 ± 782.4 ms, off10 minで 2259 ± 922.7 ms, off20 minで 22518 ± 984.8 ms, off30 minで 1597 ± 677.1 msであったが, awakeとの有意差は認められなかった (図4D).

以上の結果，電気刺激に対するフラビン蛋白蛍光の二相性変化および蛍光面積は，sevo0.5%，1.0%で減少を示し，sevo1.5%，2.0%で消失したが，off10 min以降回復が見られた．刺激開始から蛍光最大値に達する時間には，有意差は認められなかった．

4. 考 察

我々は，FFIを用いて，電気刺激により誘発されたSCの興奮と思われるフラビン蛋白の二相性変化を記録した．フラビン蛋白蛍光の最大値は，sevoの濃度上昇に伴い減少を示し，sevo0.5%で覚醒時の約57%、sevo1.0%で約24%に減少した．sevoの投与を終了して，10分後に約60%に回復し，30分後には覚醒時に近い値まで回復を認めた．

覚醒時において、電気刺激開始からフラビン蛋白蛍光が低下し、その後約0.9秒遅れて蛍光が上昇に転じ、約2.1秒後に最大値に達した。脳組織にはミトコンドリアが多く存在しており、脳活動には有酸素性のエネルギー代謝が重要である。好気性エネルギー代謝の活性化とそれに伴うミトコンドリア系フラビン蛋白の酸化型への変化が、緑色自家蛍光反応のメカニズムであり、このことから、FFIが生体内の神経活動を忠実に反映するイメージング法であることを示唆している⁸⁾。マウスは頭蓋骨が薄いことから、経頭蓋的なイメージングが可能のため、外科的侵襲が低く抑えられる。また、内因性信号として、フラビン蛋白は安定した記録を得られる可能性が高く、FFIを用いた脳生理学研究において経験依存的な可塑性が証明されている¹¹⁾。しかし、フラビン蛋白蛍光には様々な代謝反応が関与しているため、蛍光変化の反応には時間を有す

る。刺激開始後0.5～0.8秒以内の、蛍光変化の初期反応は血管からの影響を受けないが、蛍光変化の後半では血行動態による影響が論じられている^{9,31)}。本研究においても、同一マウスで覚醒時からsevoの濃度変化を経て、回復までのSCの興奮を連続的に記録したため、神経細胞の活動による酸素消費量や血行動態の影響を受けている可能性が考えられる。

二相性反応は、刺激中あるいは刺激直後に酸化型フラビン蛋白が減少し、その後増加したことを示唆している。Chisholmらは、脳の酸素化とフラビン蛋白の影響の研究に関して、低酸素状態の大脳皮質では動脈周囲組織に酸化型フラビン蛋白が保存され、遠位組織や静脈付近ではフラビン蛋白が減少する特徴的な変化が生じることを報告した³²⁾。shibukiらは、FFIを用いたラットSCの動的イメージングの可視化に成功して以降、齧歯類の触覚、視覚、聴覚刺激に反

応するSCでの部位同定，SCの興奮の経時的および空間的記録を報告している⁸⁾

¹⁸⁾ . 刺激後にはフラビン蛋白蛍光の上昇が報告されており，酸素化ヘモグロ

ビンの増加や血流量の増加に起因すると考えられている．また，刺激後のフラ

ビン蛋白蛍光の低下については，特定の層や無酸素状態での報告がされている

³²⁻³⁴⁾ . 一方，Tsytsarevらは細胞侵入型燐光性酸素感受性プローブ，NanO2-IR

を用いた酸素イメージングを行い，ウィスカー刺激によりSCでの酸素低下が起

こり，その後酸素が増加することを報告した³⁵⁾ . 本研究の結果からも，刺激

中および刺激直後には，神経細胞の活性化に伴い酸素が消費されたため還元型

フラビン蛋白の割合が増加し，その後の血流増加等に伴う酸素化により酸化型

フラビン蛋白の割合が増加したと考えられる．

実験動物での感覚刺激に対する大脳皮質の研究では、ウレタンやケタミン・キシラジンが麻酔薬として使用されていることが多く、これらの麻酔下においては様々な感覚刺激に対して誘発される皮質活動応答が残存する^{2-6, 8-18)}。本研究では、頬部皮下への電気刺激による大脳皮質に誘発されるフラビン蛋白蛍光変化が、sevo1.0%で有意に減少し、1.5%以上では完全に消失した。しかし、sevo終了10分後で再びフラビン蛋白蛍光変化を確認することができた。Arenaらは、sevoは濃度依存的に大脳皮質の自発活動を低下させ、誘発活動に対する濃度依存的増強は、刺激頻度の増加とともに徐々に濃度依存的抑制に変換されると報告した³⁰⁾。このことは、外部刺激の増加が、濃度依存的な感覚反応の促進を消失させるだけでなく、sevoによる濃度依存的な抑制が根底にあることを示唆している。本研究での、sevo1.0%で確認した刺激に対するフラビン蛋白

蛍光変化は、蛍光最大値以外は覚醒時との有意差はなく、sevo1.5%、2.0%で完全に消失することがわかった。このことから、低濃度のsevoは、刺激に対するSC受容野の縮小や興奮の伝導に影響を及ぼさないが、ある濃度に達すると伝導の遮断が起こると推測される。

麻酔薬の作用機序は未だ不明な点があるが、多くの麻酔薬の薬理作用にはGABA_A受容体の関与が明らかになっている。sevoなどの揮発性吸入麻酔薬は、抑制性GABA_A受容体への作用に加え、グルタミン酸受容体を直接抑制していることがわかっている²⁴⁻²⁷⁾。GABA_A受容体は、脳内に最も多く存在する抑制性神経伝達物質受容体で、Drexlerらはin vitroの実験で、sevoが大脳皮質のダウンステート活動を変化させるGABA_A受容体拮抗薬のビククリンの投与が、sevoの効果を減弱させることを報告し、sevoは低濃度でGABA_A受容体を介した抑制

を増強するが大脳皮質の活動は維持されると示唆している³⁶⁾。これは、我々の研究結果より確認できたsevoの影響について、推測を支持するものである。

フラビン蛋白蛍光変化がsevo1.5%で消失した結果は、sevoのMACに近似しており、sevoのSCへの影響をFFIで可視化することができたと考える。

しかし、今後の研究の課題も多く、40 g前後のマウスの採血は難しくpHの測定ができなかったことに加え、ETCO₂、呼気中のsevoの濃度測定も行えなかったため、血行動態が一定と言えない結果となった。また、フラビン蛋白は、実際の神経細胞の活動より反応が遅れるため、FFIと合わせて電気生理学的な手法も行う必要がある。FFIよりも時間分解能の高いカルシウムイメージング法¹⁷⁾の併用により、SCの深層部での活動も記録することは、麻酔薬の作用機序の解明に繋がると考える。

5. 結 論

我々はFFIを用いて、マウスの刺激に対するSCの興奮を経頭蓋的に可視化し、sevoのSCへの影響を検討した。結果より、sevoは濃度依存的に刺激で誘発されるSCでの反応を完全に消失させることがわかった。これは、sevoが感覚情報の伝導を阻害していることを示唆している。今後もFFIを用いて、多角的な研究が必要と考える。

6. 謝 辞

本研究の場を提供いただいた、植草学園大学副学長保健医療学部桑名俊一教授および植草学園大学研究室の皆様にご心より感謝いたします。

7. 利益相反

本研究に関連して、開示すべき利益相反関係はない。

文 献

1. Penfield W, Boldrey E: Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation.

Brain. 60(4) :389-443, 1937.

2. Gochin PM, Bedenbaugh P, Gelfand JJ, et al. : Intrinsic signal optical imaging in the forepaw area of rat somatosensory cortex. *Proc Natl*

Acad Sci USA. 89(17) :8381-8383, 1992.

3. Masino SA, Kwon MC, Dory Y, et al. : Characterization of functional organization within rat barrel cortex using intrinsic signal

optical imaging through a thinned skull. *Proc Natl Acad Sci*

USA. 90(21) :9998-10002, 1993.

4. Nguyen TT, Yamamoto T, Stevens RT, et al. : Reorganization of adult rat barrel cortex intrinsic signals following kainic acid induced central lesion. *Neurosci Lett.* 288(1) :5-8, 2000.

5. Harel N, Mori N, Sawada S, et al. : Three distinct auditory areas of cortex (AI, AII, and AAF) defined by optical imaging of intrinsic signals. *Neuroimage.* 11(4) :302-312, 2000.

6. Schuett S, Bonhoeffer T, Hübener M: Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci.* 22(15) :6549-6559, 2002.

7. Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, McKhann GM: Cellular autofluorescence— is it due to flavins? *J Histochem Cytochem.* 27(1) :44-48, 1979.

8. Shibuki K, Hishida R, Murakami H, et al. : Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol.* 549(3) :919–927, 2003.

9. Shibuki K, Hishida R, Tohmi M, et al. : Flavoprotein fluorescence imaging of experience-dependent cortical plasticity in rodents; In vivo optical imaging of brain function. 2nd edition. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton (FL), Chapter 7, 2009.

10. Murakami H, Kamatani D, Hishida R, et al. : Short-term plasticity visualized with flavoprotein autofluorescence in the somatosensory cortex of anaesthetized rats. *Eur J Neurosci.* 19(5) :1352–1360, 2004.

11. Tohmi M, Kitaura H, Komagata S, et al. : Enduring critical period plasticity visualized by transcranial flavoprotein imaging in mouse primary visual cortex. *J Neurosci.* 26(45):11775–11785, 2006.

12. Husson TR, Mallik AK, Zhang X, et al. : Functional imaging of primary visual cortex using flavoprotein autofluorescence. *J Neurosci.* 27(32):8665–8675, 2007.

13. Kubota Y, Kamatani D, Tsukano H, et al. : Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex. *Neurosci Res.* 60(4):422–430, 2008.

14. Tohmi M, Takahashi K, Kubota Y, et al. : Transcranial flavoprotein fluorescence imaging of mouse cortical activity and plasticity. *J Neurochem.* 109(1) :3-9, 2009.
15. Komagata S, Chen S, Suzuki A, et al. : Initial phase of neuropathic pain within a few hours after nerve injury in mice. *J Neurosci.* 31(13) :4896-4905, 2011.
16. Tohmi M, Meguro R, Tsukano H, et al. : The extrageniculate visual pathway generates distinct response properties in the higher visual areas of mice. *Curr Biol.* 24(6) :587-597, 2014.
17. Baba H, Tsukano H, Hishida R, et al. : Auditory cortical field coding long-lasting tonal offsets in mice. *Sci Rep.* 6:34421, 2016.

18. Yanagawa Y, Osanai H, Tateno T: Transcranial flavoprotein-
autofluorescence imaging of sound-evoked responses in the mouse
auditory cortex under three types of anesthesia. *Neurosci Lett.*
633:189-195, 2016.
19. Shiraishi Y, Ikeda K: Uptake and biotransformation of sevoflurane
in humans: a comparative study of sevoflurane with halothane,
enflurane, and isoflurane. *J Clin Anesth.* 2(6):381-386, 1990.
20. Patel SS, Goa KL: Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic
and pharmacokinetic properties and its clinical use in general
anaesthesia. *Drugs.* 51(4):658-700, 1996.

21. Smith I, Nathanson M, White PF: Sevoflurane—a long-awaited volatile anaesthetic. *Br J Anaesth.* 76(3):435-445, 1996.
22. Mi WD, Ichinose F, Goto T, et al.: 7-Nitroindazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase: effect on sevoflurane MAC and cerebellar cyclic GMP in mice. *J Anesth.* 12(3):137-141, 1998.
23. Ichinose F, Mi WD, Miyazaki M, et al.: Lack of correlation between the reduction of sevoflurane MAC and the cerebellar cyclic GMP concentrations in mice treated with 7-nitroindazole. *Anesthesiology.* 89(1):143-148, 1998.

24. Cheng G, Kendig JJ: Enflurane directly depresses glutamate AMPA and NMDA currents in mouse spinal cord motor neurons independent of actions on GABA_A and glycine receptors.

Anesthesiology. 93(4) :1075-1084, 2000.

25. Joo DT, Gong D, Sonner JM, et al. : Blockade of AMPA receptors and volatile anesthetics: Reduced anesthetic requirements in GluR2 null mutant mice for loss of the righting reflex and antinociception but not minimum alveolar concentration.

Anesthesiology. 94(3) :478-488, 2001.

26. Campagna JA, Miller KW, Forman SA: Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med*. 348(21) :2110-2124, 2003.

27. Petrenko AB, Yamakura T, Sakimura K, et al. : Defining the role of NMDA receptors in anesthesia:Are we there yet? *Eur J Pharmacol.* 723:29-37, 2014.
28. Aksenov DP, Miller MJ, Dixon CJ, et al. : The effect of sevoflurane and isoflurane anesthesia on single unit and local field potentials. *Exp Brain Res.* 237(6) :1521-1529, 2019.
29. Upton DH, Popovic K, Fulton R, et al. : Anaesthetic-dependent changes in gene expression following acute and chronic exposure in the rodent. *brain. Sci Rep.* 10(1) :9366, 2020.
30. Arena A, Lamanna J, Gemma M, et al. : Linear transformation of the encoding mechanism for light intensity underlies the paradoxical

enhancement of cortical visual responses by sevoflurane. *J*

Physiol. 595(1) :321-339, 2017.

31. Kitaura H, Uozumi N, Tohmi M, et al. : Roles of nitric oxide as a

vasodilator in neurovascular coupling of mouse somatosensory

cortex. *Neurosci Res.* 59(2) :160-171, 2007.

32. Chisholm KI, Ida KK, Davies AL, et al. : In vivo imaging of

flavoprotein fluorescence during hypoxia reveals the importance

of direct arterial oxygen supply to cerebral cortex tissue;

Oxygen Transport to Tissue XXXVII. *Advances in Experimental*

Medicine and Biology, vol876. First edition. Springer New

York, NY, 233-239, 2016.

33. Petersen CC, Hahn TT, Mehta M, et al. : Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(23) :13638–13643, 2003.
34. Wu JY, Huang X, Zhang C: Propagating waves of activity in the neocortex: what they are, what they do. *Neuroscientist*. 14(5) :487–502, 2008.
35. Tsytsarev V, Arakawa H, Borisov S, et al. : In vivo imaging of brain metabolism activity using a phosphorescent oxygen-sensitive probe. *J Neurosci Methods*. 216(2) :146–151, 2013.
36. Drexler B, Kreuzer M, Jordan D, et al. : Sevoflurane-induced loss of consciousness is paralleled by a prominent modification of

neural activity during cortical down-states. *Neurosci*

Lett. 548:149–154, 2013.

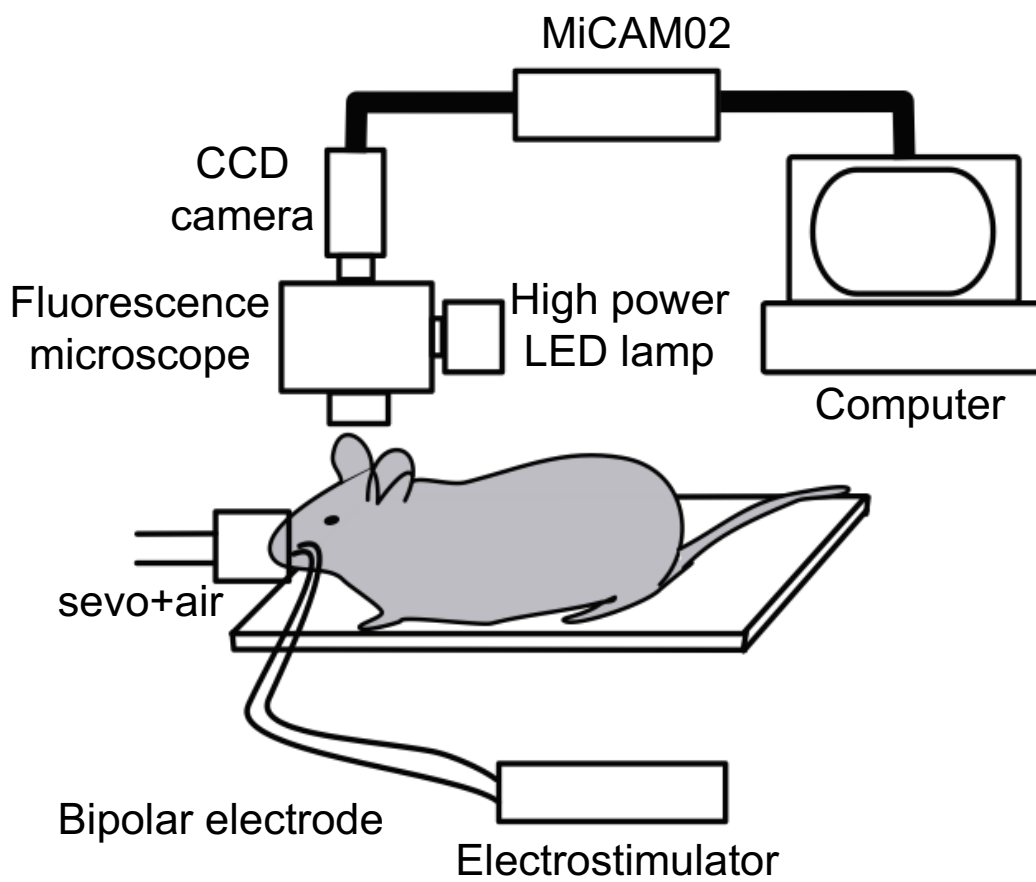


図1. 実験模式図

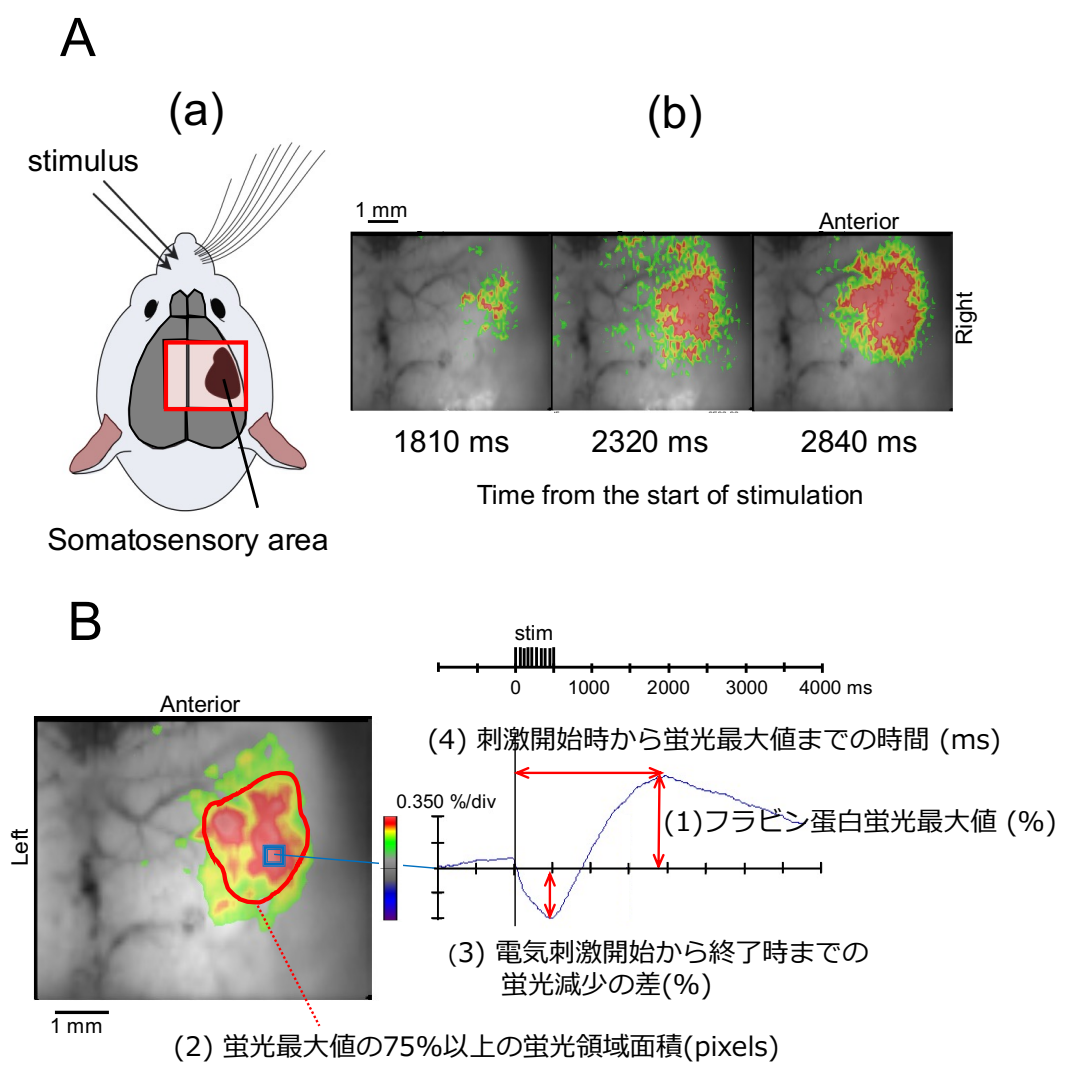


図2. 覚醒時のフラビン蛋白蛍光変化の記録(0.350%/div=蛍光の変化)

A : 記録領域の模式図(a), 覚醒時のフラビン蛋白蛍光の経時的変化(b)

B : 覚醒時と sevo の濃度変化における SC の影響を比較する測定項目

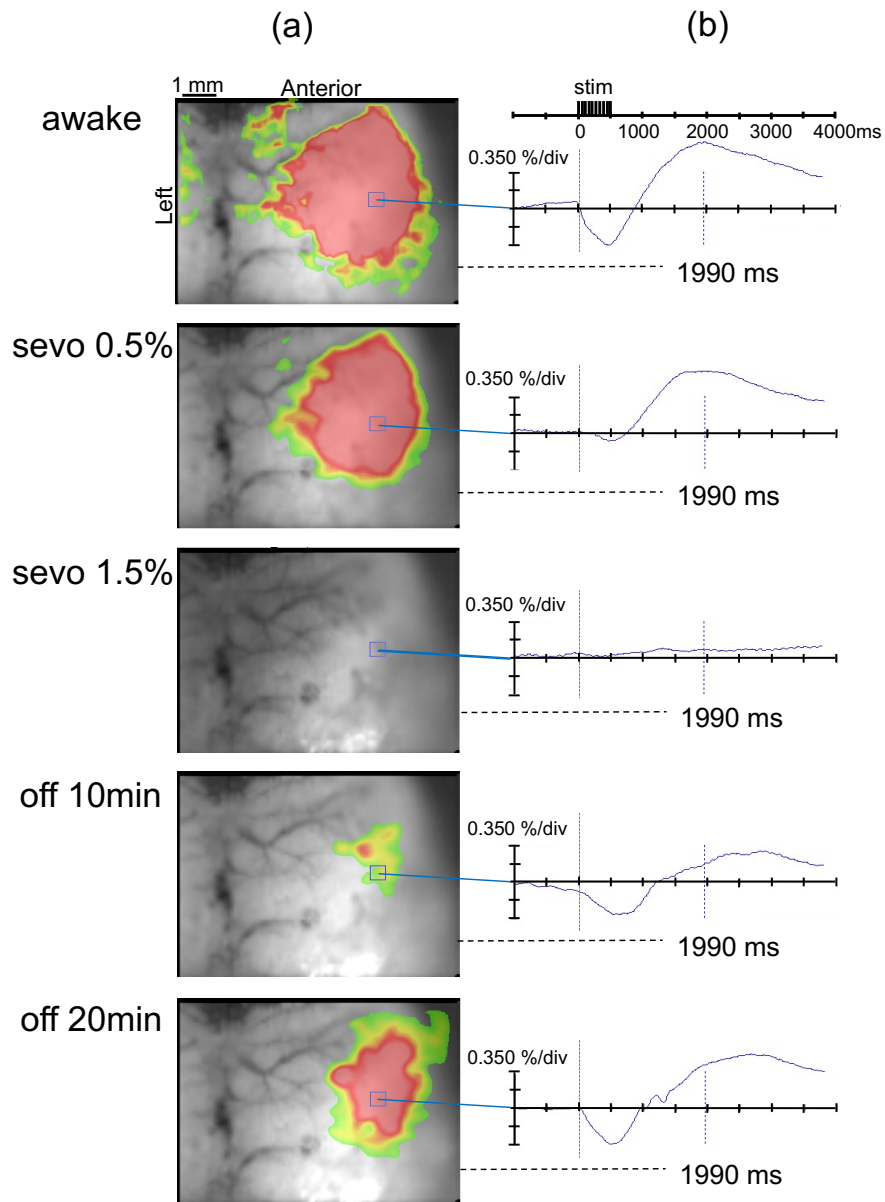


図3. 各フラビン蛋白蛍光変化の記録 (0.350%/div=蛍光の変化)

刺激開始後 1990 ms 時の各フラビン蛋白蛍光イメージ(a)

各測定時におけるフラビン蛋白蛍光の時間変化(b)を示す

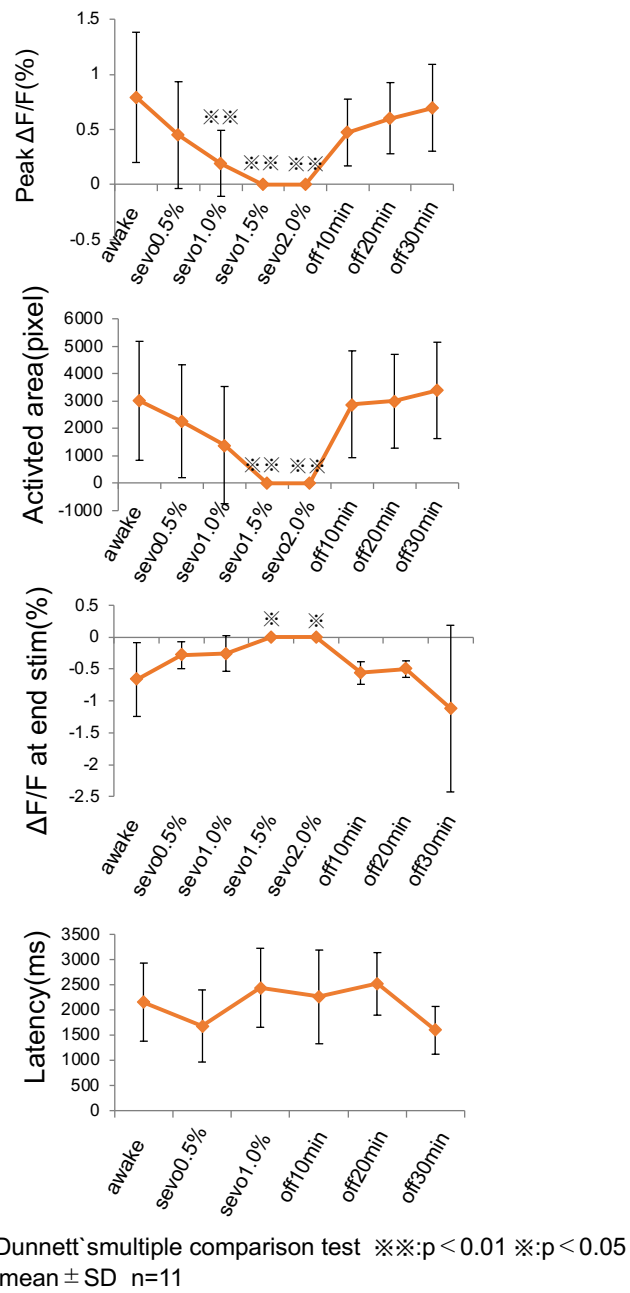


図4. 覚醒時と sevo 濃度変化の比較

Latency は、反応のなかった sevo1.5%, 2.0%をデータとしていない