



Title	中枢神経系の賦活領域におけるエネルギー代謝：無酸素無グルコースによる海馬切片神経活動変化の光学測定による検出
Author(s)	野村, 保友; 馬場, 欣哉; 山内, 芳子
Citation	電子科学研究, 5, 47-51
Issue Date	1998-01
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/24407">http://hdl.handle.net/2115/24407</a>
Type	bulletin (article)
File Information	5_P47-51.pdf



[Instructions for use](#)

# 中枢神経系の賦活領域におけるエネルギー代謝 —無酸素無グルコースによる海馬切片神経活動変化 の光学測定による検出—

超分子分光研究分野 野村保友  
神経情報研究分野 馬場欣哉  
適応制御研究分野 山内芳子

ラットの海馬スライス標本を用いて、CA1領野の無酸素無グルコース（虚血様負荷）に対する電気生理学的反応の変化を検討するために、RH795で染色し光学測定した。フィールドポテンシャルを同時記録し、以下のような結果を得た。

1. 虚血様負荷により興奮が伝播する領域が狭くなった。さらに負荷を維持すると刺激近傍の応答が消失した。
2. 速い応答が残っている間に再灌流すると興奮の伝播は素早く回復する。
3. 速い応答が消失した後で再灌流すると回復の程度は悪い。
4. フィールドポテンシャルから期待される虚血様負荷の効果を光学測定により興奮伝播の変化として得た。

## 1 はじめに

一般に脳は他の臓器に比べて虚血に対する脆弱性が高く、さらに脳の中でもその脆弱性に部位差がある。虚血に対する脆弱性が最も高い部位の一つである海馬ではCA1領野錐体細胞で選択的にニューロン死が観察される。一方虚血の急性期にはニューロンへの酸素やグルコースの供給が減少する。それによる高エネルギー化合物の減少に伴い膜電位と細胞内外のイオン濃度が変化し、活動電位に依存してシナプス伝達が抑制され始める。さらに虚血が続くと膜電位は0mVになり、イオン勾配の大きな変化が伴う<sup>[1]</sup>。これら各ステージの海馬神経細胞の活動は微小電極を用いて電気生理学的に観察でき、多くの報告例がある<sup>[2]</sup>。しかしながら記録電極近傍の局所的な神経活動だけでは中枢神経系の機能的なネットワークの活動を測定することは困難である。一方最近の長足の進歩を遂げている光学測定は、高い精度でこのようなネットワークを解析でき、特に応答の速い蛍光プローブ及び画像取得システムの開発に伴い、光学測定の時間

空間分解能は大きく改善された<sup>[3]-[5]</sup>。脳切片を用いて虚血様負荷（無酸素・無グルコース）による興奮伝播パターンの変化を光学測定した報告はあまりない。虚血急性期と再灌流期の電気活動と興奮伝播の変化の関係をj知ることは虚血に対して脆弱な中枢神経系の機能消失を解明する上で重要な手がかりになると考えられる。そのため本研究では海馬スライスを用いて興奮伝播に及ぼす虚血様負荷の影響を光学測定により検討した。集合電位の振幅から予想された虚血様負荷による神経機能低下を画像として得ることができた。

## 2 実験

6-12週のおスウイスターラットをエーテル麻酔後、断頭して脳を摘出し、95%O<sub>2</sub> + 5%CO<sub>2</sub>で飽和した氷冷温度の標準人工脳脊髄液 (NaCl 125, KCl 3.5, MgCl<sub>2</sub> 1.3, NaHPO<sub>4</sub> 1.3, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 16, Glucose 10, pH7.4)に入れた。マイクロスライサーで海馬の長軸に直角になるように厚さ400ミクロンに薄切りした。

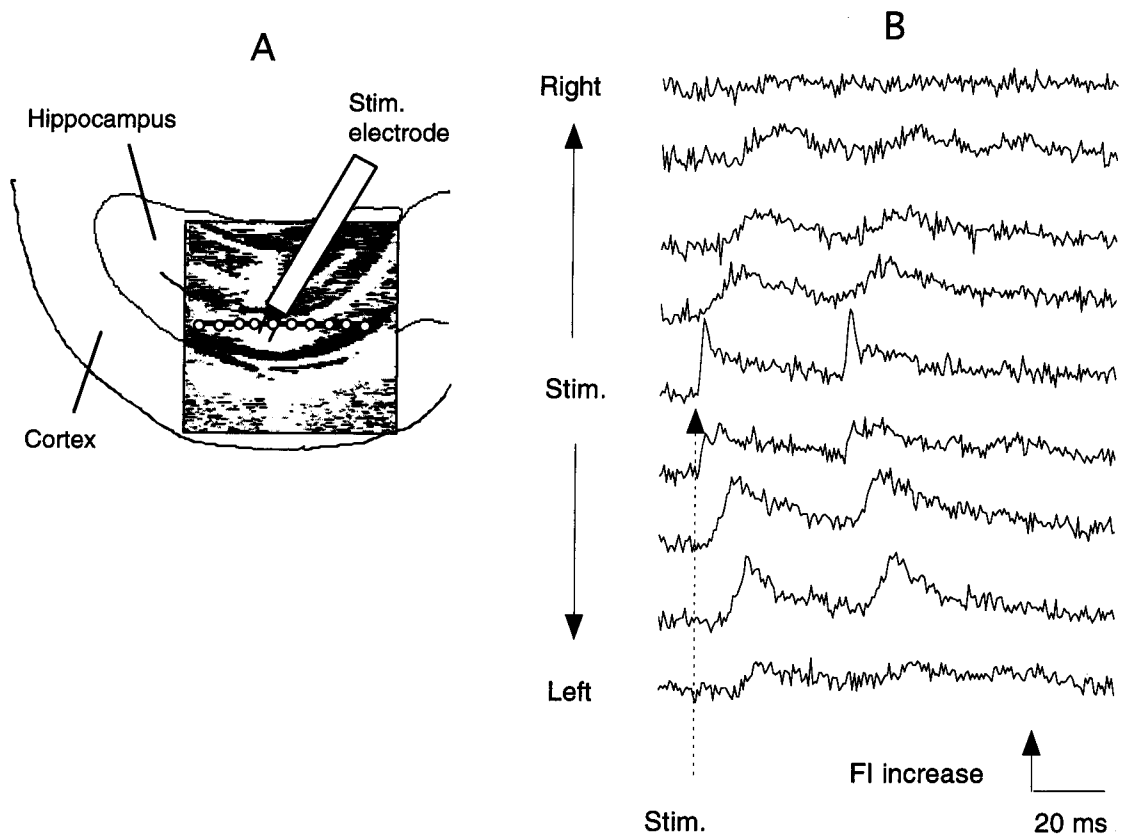


図1 A 海馬スライス観察領域の模式図。海馬CA1領野のシェーファー側枝に電気刺激を加えると左右に興奮が広がった。白丸の点の蛍光強度をBに示した。B ペアパルス刺激によるCA1領野の虚血様負荷前の部位別蛍光強度経時変化。Aの9点の変化を左から右に並べた。CA1領野のシェーファー側枝を0.8 mA, 100  $\mu$ secで40 ms間隔で二回の定電流刺激を行った。

作製したスライスは酸素化した室温の人工脳脊髄液に浸漬し1時間以上の回復期間を置いた。膜電位感受性色素RH795 (1 mg/ml)で15分間染色した。室温の人工脳脊髄液を5 ml/minで灌流している浸水型の実験チャンバーに移し記録した。蛍光顕微鏡(ローパスフィルター540 nm, ダイクロイックミラー500-600 nm全反射, ハイパスフィルター590 nm)で観察し、蛍光像を光学測定システム(デルタロン1700, 128×128 ホトダイオードアレイセンサー及びイメージプロセッサ)で取り込んで解析した。同時にCA1領野のシェーファー側枝を0.8 mA, 100  $\mu$ secで定電流刺激し、錐体細胞層でフィールドポテンシャルを記録した。虚血様負荷(無酸素・無グルコース)は95%N<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>で飽和し、さらにグルコースを除いた人工脳脊髄液で灌流することにより行った。フィールドポテ

ンシャルを連続記録し、集合電位の消失を確認した後で、標準人工脳脊髄液に切り替えて回復過程を観察した。

### 3 結果

虚血様負荷に対して2-3分で集合電位は低下し始めた。4-6分で50%になり、8-10分でほぼ消失した。その後、酸素とグルコースの供給を再開すると、回復の早いスライスでは5分で集合電位がわずかに現れ、10-15分で虚血負荷以前の振幅に戻った。回復が遅いものは標準人工脳脊髄液に切り替えて40分後でも虚血様負荷前の振幅より明らかに小さかった。全く回復しないスライスもあった。このように集合電位の回復の程度が異なるスライスについて興奮伝播との関係を調べた。

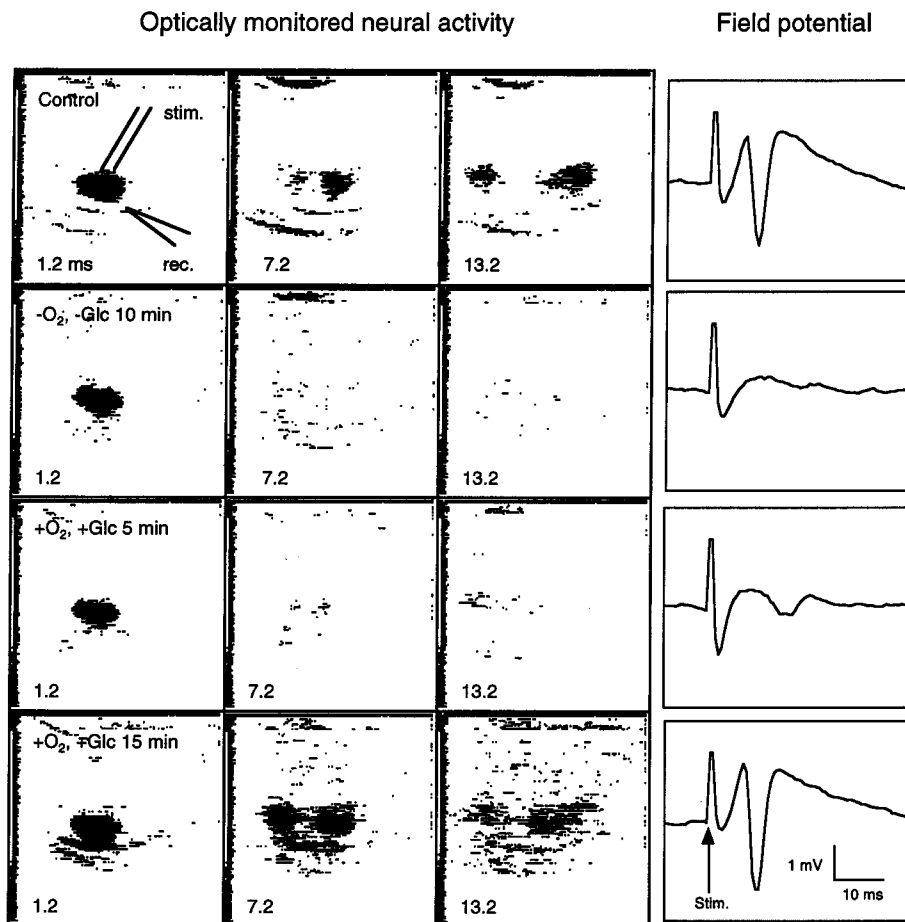


図2 興奮伝播に及ぼす虚血様負荷の影響。興奮の広がり示すために刺激後1.2, 7.2, 13.2ミリ秒の画像を示した。フィールドポテンシャルはrec.の位置で記録した。このスライスでは虚血様負荷後10分で興奮の伝播は消失し、再酸素化後15分で虚血様負荷前と同様に回復した。

図1に示すように虚血負荷前の興奮伝播は二相性である。刺激後すぐに1.2msで刺激部位近傍にシグナルが現れる。シグナルの場所と応答時間から、この第一相のシグナルはシェーファー側枝と近傍のニューロンの活動電位を表している。このシグナルはすぐに広がるのではなく10ミリ秒前後経過してから、左右に興奮は広がっていった。この第二相の遅れて広がるシグナルはシェーファー側枝の刺激によって誘発された後シナプス電位あるいは錐体細胞の活動電位を表すと考えられた。

虚血様負荷の効果はまず第二相から現れ、集合電位の減少に伴って興奮が伝播する領域が狭くなった。虚血様負荷の進行とともに第一相の応答だけが残りに、最後にそれも消失した。この時点で集合

電位も消失した。標準人工脳脊髄液に切り替えると虚血様負荷時の変化とは逆の順番で回復した。はじめに第一相の速い応答が現れ、次に集合電位の回復とともに興奮が伝播する領域が広がった。

図2は観察時間40分の中の早い時間に集合電位が完全に回復した典型例である。このスライスでは虚血様負荷後10分で集合電位は消失した。刺激1.2ミリ秒の第一相の応答は現れた。しかしながら、虚血様負荷前の7.2あるいは13.2ミリ秒の興奮の伝播は観察されなかった。再酸素化後5分で、集合電位はわずかに回復し、画像解析からわずかな興奮の伝播が認められた。再酸素化後15分の集合電位及び興奮伝播は虚血前と同じものに回復した。この例では虚血再灌流により興奮伝播のみ消失し

たが、完全に回復した。再酸素化後40分の観察時間内で完全回復しなかったスライスでは、集合電位が消失した虚血様負荷10分で、第二相の興奮伝播ばかりでなく第一相の応答も完全に消失していた。再酸素化後40分では第一相がわずかに回復したが、明らかな集合電位は記録されなかった。

## 4 考察

海馬スライスの光学シグナルの帰属は詳細に行われており<sup>[3]</sup>、興奮伝播の第一相は三成分に分けられ、電気刺激に誘発されたシナプス前線維の脱分極、同時に誘発されたシナプス後電位、その時の緩電位である。AMPA型レセプターアンタゴニストの効果が小さいことからシナプス前線維の脱分極が主要な成分と考えられている。第二相は電気刺激したシェーファー側枝により直接的に誘発されたものではなく、それ以降のシナプス性に誘発されたシナプス後電位及びほぼ同時に誘発されるシナプス前線維の脱分極と考えられている。第二相はAMPA型レセプターアンタゴニスト投与により完全に消失する。

神経活動の中で虚血様負荷の影響を受ける部位を考える。酸化的リン酸化が低下しても嫌気性解糖あるいはクレアチンリン酸などのATPバッファーなどで補償できる虚血初期ではイオンポンプが正常に機能できるので静止電位を維持する<sup>[1]</sup>。この場合には電気刺激による軸索の興奮誘導や膜電位依存性ナトリウムチャンネル、前シナプス末端の電位依存性カルシウムチャンネル、カルシウムカルモジュリンによるアミノ酸放出は可能である。同様にシナプス後細胞もアミノ酸レセプターの活性化が起こり興奮は伝達される。さらにATPの産生が低下すると静止電位が低下し、シナプス前細胞の活動電位の低下とともに電位依存性カルシウムチャンネルの開口効率が低下して興奮伝達が停止する。またATP減少はこのような細胞内外のイオン濃度勾配ばかりでなく興奮性アミノ酸の生合成系や細胞内への取り込みに影響するだろう。

このような全か無かの応答では、本実験で確認されたように虚血様負荷で興奮が伝播する領域が狭くなることを説明できない。光学測定及びフィー

ルドポテンシャルは単一ニューロンの応答をモニターしているわけではなく細胞集団としての応答である。虚血様負荷によるATP減少の程度がニューロンごとに異なる場合、虚血様負荷初期には多くのニューロンが応答できるが、その負荷が持続されると応答できるニューロンの数が減少する。その結果、集団としての応答は弱くなる。また集団としての応答が限られた時間内に起これば強いシグナルになるが、アミノ酸放出の減少によりレセプターチャンネルの興奮が緩慢になれば活動電位は同期せず細胞集団の応答は弱くなる。さらに、刺激部位から離れると、刺激部位のニューロンと直接あるいは間接的なシナプスの形成は少なくなる。個々のニューロンでの虚血様負荷の影響が集団としてのバラエティやシナプス形成の程度によって興奮が伝播する領域が狭くなるという結果をもたらすと考えられた。シグナルの帰属を考慮すると、この仮説の一部は検証できる。AMPA型レセプターアンタゴニストを添加することで、容量依存的に興奮が伝播する領域が狭くなれば、シナプス応答のバラエティとシナプス形成の減少による可能性が高くなる。

第一相の光学シグナルが消失すると、回復に時間を要するのは、その時点で多くのニューロンが静止電位を維持できなくなった結果と考えられる。第一相の主要な信号はシナプスを介さないシナプス前線維の脱分極である。従って第一相が消失するのはATP減少によりイオンポンプの機能が低下し、イオン濃度勾配形成が不十分になった可能性がある。細胞内には様々なATPを基質とする酵素が存在するが、本研究の結果からその親和性はシナプス伝達に関与するものよりナトリウムカリウムポンプなどイオン勾配維持に関与する酵素系の方が高いことを示唆している。これはニューロンが情報伝達という機能より自身の恒常性の維持を優先することであり、危機的状況に立たされた場合の細胞としてはその選択が合理的なのであろう。

## 謝辞

貴重なご助言、ご指導を賜りました本学、歯学部、生理学教室、赤池 忠教授に深謝いたします。

---

[参考文献]

- [1] Martin, R. L., Lloyd, H. G. E., and Cowan, A. I., Trends Neurosci., 17, 251-257 (1994)
- [2] Kurihara, E., Ishikawa, A., Tamaki, N., and Okada, Y., Neurosci. Lett., 204, 197-200 (1996)
- [3] Akaike, T., Jian, W., and Sokabe, M., Neurosciences, 1995, 21, 81-89 (1995)
- [4] Akaike, T., Jian, W., Obata, K., and Sokabe, M., Bioimages, 4, 157-166 (1996)
- [5] Grinvald, A., Manker, A., and Segal, M., J. Physiol., 333, 269-291 (1982)