



Title	脳幹スライス標本における中枢ニューロンの生命力に対するポリエチレングリコールの作用
Author(s)	石尾, 知亮; 平井, 喜幸; 井上, 農夫男; 船橋, 誠
Citation	北海道歯学雑誌, 32(1), 25-34
Issue Date	2011-09-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/47226
Type	article
File Information	03_ishio_gencho.pdf



[Instructions for use](#)

原 著

脳幹スライス標本における中枢ニューロンの生命力に対する
ポリエチレングリコールの作用石尾 知亮¹⁾ 平井 喜幸²⁾ 井上農夫男¹⁾ 船橋 誠²⁾

抄 録：本研究は、電気生理学的手法を用いた単一ニューロンの機能を調べる実験において広く用いられている脳幹スライス標本における各部のニューロンの経時的細胞死の詳細と、ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol, PEG) 投与による細胞死抑制効果について検討したものである。SD 系雄性ラットを用いて舌下神経核、孤束核、最後野を含む前頭断脳幹スライス標本を作製し、30% PEG 溶液中に1分間浸漬した後に細胞死のマーカであるヨウ化プロビジウム (PI) を添加した人工脳脊髄液中で15, 60, 240分間培養し、直後に4%パラホルムアルデヒドにて固定した。凍結切片を作成し、nissl 染色を行った後、PI 集積部位を蛍光顕微鏡下で同定して各部におけるニューロンの生存率を算出した。その結果、舌下神経核ニューロンの経時的生存率が孤束核および最後野のニューロンと比較して有意に低いことが明らかとなった。一方で最後野においては240分間培養群においても著明に高い生存率(約75%以上)を示した。また、PEG 投与により舌下神経核ニューロンの生存率は増加し、統計学的に有意な増加が認められたのは、舌下神経核の60分間培養群、孤束核の60分間培養群および240分間培養群であった。PEG 濃度の影響を明らかにするために、浸漬する PEG 濃度を20, 30, 40%と変化させた際の各ニューロンの生存率について、PEG を投与しないコントロール群と比較したところ、20% PEG 投与群および30% PEG 投与群で有意に生存率が増加した。本研究の結果から、運動ニューロンは自律系ニューロンと比較して経時的な生存率が低いこと、PEG は運動ニューロンの経時的生存率を増加させ、その最適濃度は20%以上40%以下の範囲で、30%前後が最適濃度であることが示唆された。

キーワード：脳幹スライス標本、ニューロン、ポリエチレングリコール、細胞死

緒 言

近年、神経幹細胞が脳内にも存在することが明らかとなり、脳の神経細胞は再生しないという定説は覆された¹⁾。最近では、脳細胞の再生治療の研究も盛んに行われている。一方で、この半世紀において、脳機能の解明に向けて膨大な研究がなされ、中枢神経細胞のアポトーシスのメカニズムや、脳の各部における単一ニューロンの特性や機能についても解析が進められてきたが、その全貌解明には遠く、さらに解析をすすめることが重要である。

中枢神経系の機能の研究には電気生理学的手法が不可欠であり、細胞レベルでの解析を行うためには、できる限り生理的条件下で生きているニューロンを分離して研究材料とする必要がある。この目的のため、脳スライスを用いた神経研究がこの数十年間において確立され、特に単一ニューロンの機能やシナプス伝達を調べる実験に広く用いら

れてきた²⁾。

急性切除した動物の脳を数百ミクロンの厚さに薄切して脳スライスを作成し、人工脳脊髄液中に保持することによりニューロンを生存させることができる。この方法を用いると、脳内の任意の部分の標本を作成して生かしておくことが可能であり、これまでの我々の研究においても多用してきた³⁾。脳を薄切することによって生じる損傷は、自律系ニューロンよりも運動系ニューロンにおいての方が著しく大きいことを経験的に知っていたが、これを定量的に示した報告はなく、そのメカニズムについても不明であった。

Carp らはスライス標本において損傷され易い脊髄運動ニューロンからの細胞内記録法にポリエチレングリコール (Polyethylene glycol, PEG) を応用し、成功率を有意に上昇させる事が可能であったと報告している⁴⁾。PEG はエチレングリコールが重合した親水性の高分子化合物であり、細胞膜保護作用をもち脊髄損傷の治療を促進すること

〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

¹⁾北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室 (主任：井上農夫男 教授)²⁾北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔生理学教室 (主任：船橋 誠 教授)

が報告されてから多くの実験が行われてきた^{5,6)}。In vivoの実験においても、PEGを応用することで損傷した脊髄運動ニューロンの経時的な生存率が増加し、細胞外記録法による活動電位の回復と運動機能の修復が認められたことも報告されている⁷⁻⁹⁾。

PEGには細胞膜融合効果があり、ニューロンの損傷部位の細胞膜を閉鎖して原形質の流出を防ぐことによって細胞死を抑制することが、Luoらによって明らかにされている^{10,11)}。さらに、PEGは細胞膜損傷部位より細胞質内に取り込まれて、ミトコンドリアを保護するとされる^{12,13)}。ミトコンドリアの損傷が少なければ、フリーラジカルの発生を抑制することができ、これにより細胞の傷害が軽減されると考えられる^{14,15)}。

以上のように、PEGは脊髄運動ニューロンの生存率を高めるといふ報告がたくさんある中で、形態や膜特性の異なる脳の神経細胞や自律系のニューロンに対しても同様の効果があるのかについては全く不明である。そこで本研究では、運動ニューロンと自律系ニューロンのin vitroにおける生命力の違いと、各ニューロンに対するPEGによる細胞死抑制効果について明らかにするために、前頭断脳幹スライス標本中の運動ニューロンである舌下神経核と、自律系ニューロンである孤束核および最後野の各部のニューロンの経時的な生存率を測定し、PEGの効果を比較し検討した。そして、脳幹部ニューロンの生命力の違いに関する知見から、今後の中枢神経系の機能の研究手法について考察した。

材料と方法

本研究は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程を遵守し、北海道大学動物実験実施マニュアルに従って行った。

1. 脳スライスの作製

生後5～7週齢のSprague-Dawley系ラット(140～190g)16匹を用いた。ハロセン麻酔後断頭し、頭蓋骨より脳を摘出後に冰冷スクロース置換人工脳脊髄液(SACSF)(mM): 234 Sucrose, 26 NaHCO₃, 1.25 NaHPO₄, 2.5 KCl, 11 glucose, 10 MgSO₄·7H₂O, 0.5 CaCl₂, pH7.4 with 95% O₂-5% CO₂, 中に1分間浸漬した。その後マイクロスライサー(Dosaka EM, 京都)を用いて舌下神経核及び孤束核、最後野を含む400 μ mの前頭断脳幹スライスを作製した(図1A, Bregma-13mm～-14mm)。

2. ポリエチレングリコール溶液への浸漬と脳スライスの培養

作製した脳スライスは、30%ポリエチレングリコール(Sigma Mn=2000)溶液中に1分間浸漬したもの(PEG+群)としなかったもの(コントロール群)に分けた。そ

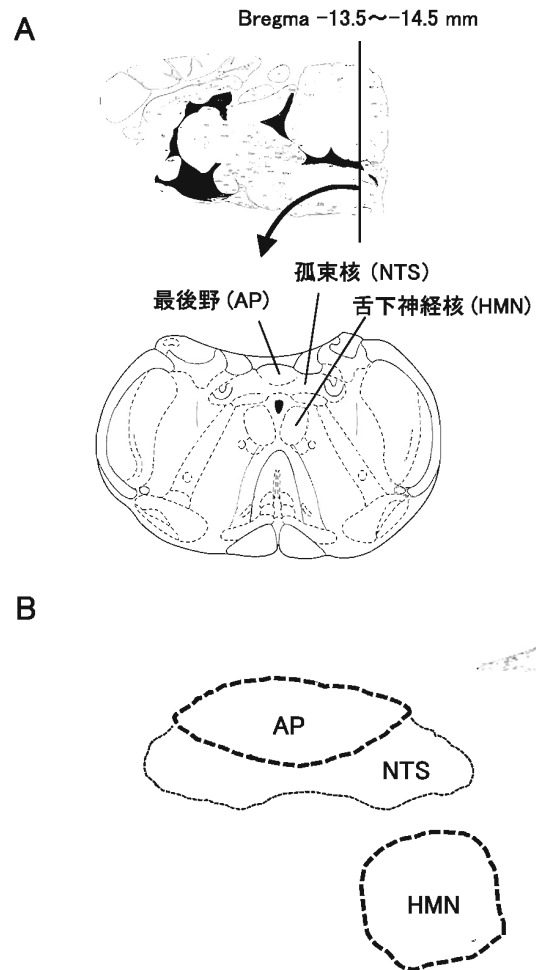


図1 脳幹スライス標本の作成部位と各神経核のnissl染色像
A, ラット脳正中断面(上図), 脳幹部前頭断面(下図) Bregma-13.5mm～-14.5mmの範囲で、舌下神経核(HMN), 孤束核(NTS), 最後野(AP)を含む厚さ400 μ mの前頭断脳幹スライス標本作製した。B, 脳スライス標本から凍結切片(厚さ20 μ m)のnissl染色像。点線は細胞密度の違いから判断した各神経核の境界を示す。

の後、PEG+群とコントロール群を2 μ Mのヨウ化プロピジウム(PI)を添加した人工脳脊髄液(NACSF)(mM): 124 NaCl, 26 NaHCO₃, 5 KCl, 11 glucose, 1.6 MgCl₂, 2.0 CaCl₂ pH7.4 with 95% O₂-5% CO₂. 中で15分間, 60分間, 240分間培養した。PIは細胞障害部位から取り込まれやすい赤色蛍光物質であり、細胞死のマーカーとしてよく用いられる¹⁶⁻¹⁸⁾。PEGの濃度の影響を調べるために、PEGを含む20, 30, 40%溶液を用いて、脳スライスを作成して60分後における舌下神経核ニューロンの生存率を比較検討した(n=3)。

3. 染色と蛍光顕微鏡下の観察

培養後、4%パラホルムアルデヒド(0.1Mリン酸緩衝液, pH7.4)にて一晩浸漬固定し、マイクロトームを用いて

20 μ m の凍結切片を作製した。

作製した切片から3枚抽出し、ニューロンを染色するためクレシルバイオレットにて nissl 染色を行った。図1Bに示すように、nissl 染色によって細胞密度が異なる部位を観察でき、これによって舌下神経核、孤東核、最後野の各部位の境界を同定した。蛍光顕微鏡 (Olympus-IX81) にて舌下神経核及び孤東核、最後野を観察し、CCD カメラにて撮影した (ピクセルサイズ1360 \times 1024)。観察時の倍率は20倍とした。その後画像解析ソフト (Photo filtre) を用いてPI 蛍光染色像と nissl 染色像を画像合成した。合成画像上で各神経核内において境界を含まないようにピクセルサイズ250 \times 250の格子を作図し、目視下で格子内の2重染色された死細胞を全てカウントしてそれぞれの単位面積あたりの生存率を算出した (n = 5)。また、蛍光顕微鏡の焦点深度による観察範囲の誤差を検討するため、焦点深度を10 μ m ずつ変更し各ニューロンの生存率の算出を行ったが、有意差は認めなかった。

4. 統計学的解析

PEG + 群とコントロール群間の生存率の比較は Student's t-test を用い、PEG の濃度変化に対する生存率の比較は、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) により群間比較をおこなった後、Dunnett 法を用いて多重比較を行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結 果

はじめに、死細胞を同定した典型例を図2に示す。ここに示すのは、作製して240分後に固定した脳スライスにおける舌下神経核を含む部位の nissl 染色像と PI 蛍光染色像である。nissl 染色により細胞体を可視化し (図2-a)、PI 蛍光染色によってPI の取り込み部位を同定し (図2-b)、これら二つの染色像を重ね合わせて死細胞を同定した (図2-c)。

1. 脳スライス中における各部ニューロンの経時的生存率

通常の電気生理学の実験環境下での前頭断脳幹スライス標本中において、舌下神経核、孤東核および最後野の各部のニューロンの経時的な生存率の変化について調べた。図3に示すように、全ての部位においてニューロンの生存率が経時的に減少したが、細胞死にいたる速度は舌下神経核ニューロンが最も早く、ついで孤東核ニューロンであり、最後野ニューロンにおいては他の2部位と比較して240分後においても著しく高い生存率を示した。舌下神経核ニューロンの生存率が経時的に著しく減少することは、経験的知見であるが、運動ニューロンからの記録が他の部位のニューロンよりも著しく困難であることの一因であると考えられた。

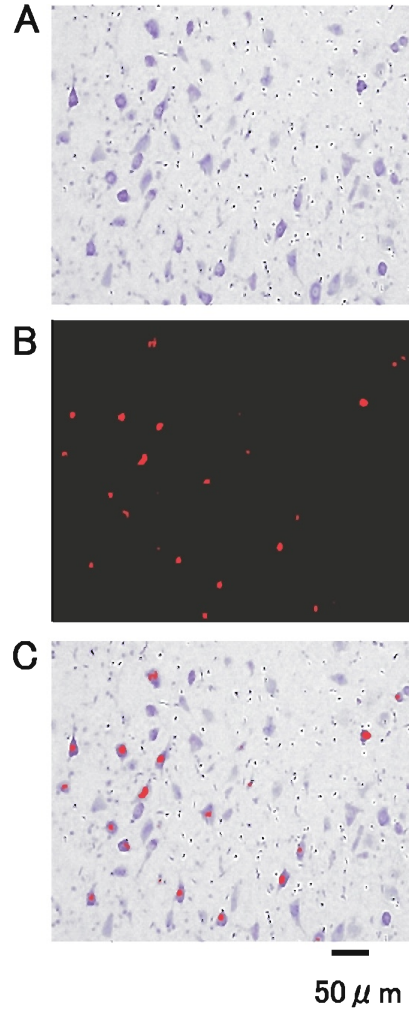


図2 PI 蛍光染色による死細胞の同定
A, B, C, 240時間培養したコントロール群における舌下神経核の nissl 染色像 (A)、PI 染色像 (B)、A と B の合成画像 (C)、細胞体と赤色染色部位が一致することを確認して死細胞としてカウントした。

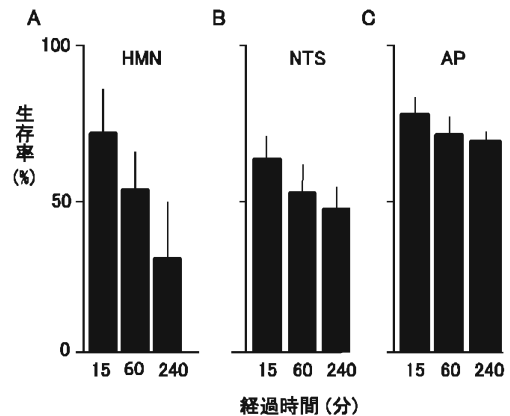


図3 PEG コントロール群における各部ニューロン生存率の経時的変化

A, 舌下神経核 B, 孤東核 C, 最後野, 培養時間が長くなるに従って、各部のニューロンの生存率は減少しているが、舌下神経核ニューロンの生存率の経時的低下は他の部位と比較して特に著しいことがわかる。

2. 各ニューロンにおける PEG の効果

舌下神経核ニューロンの経時的細胞死に対して PEG 投与によってどれくらい抑制効果があるのかについて、孤束核ニューロンおよび最後野ニューロンに対する効果と比較して検討を行った。脳スライスを作成して、15分、60分、240分経過後の舌下神経核、孤束核、最後野の各部位において同定された死細胞を図4、5、6に示す。

図4 A a, b, cは脳スライス作成後に NACSF 中に保持した脳スライスを示し (コントロール群), 図4

A d, e, fは脳スライス作成直後に30% PEG に浸漬後に NACSF 中に保持した脳スライス (PEG +群) を示している。15分後の舌下神経ニューロンの生存率の平均値はコントロール群で72.5±13.9%, PEG +群で66.7±15.6%であり, 統計学的有意差を認めなかった ($P>0.05$)。60分培養した群の生存率の平均値はコントロール群で55.6±11.4%, PEG +群で71.5±11.4%であり, PEG (+)群の生存率の方が有意に高い値を示した ($P<0.05$)。240分培養した群の生存率の平均値は, コントロール群で32.7±

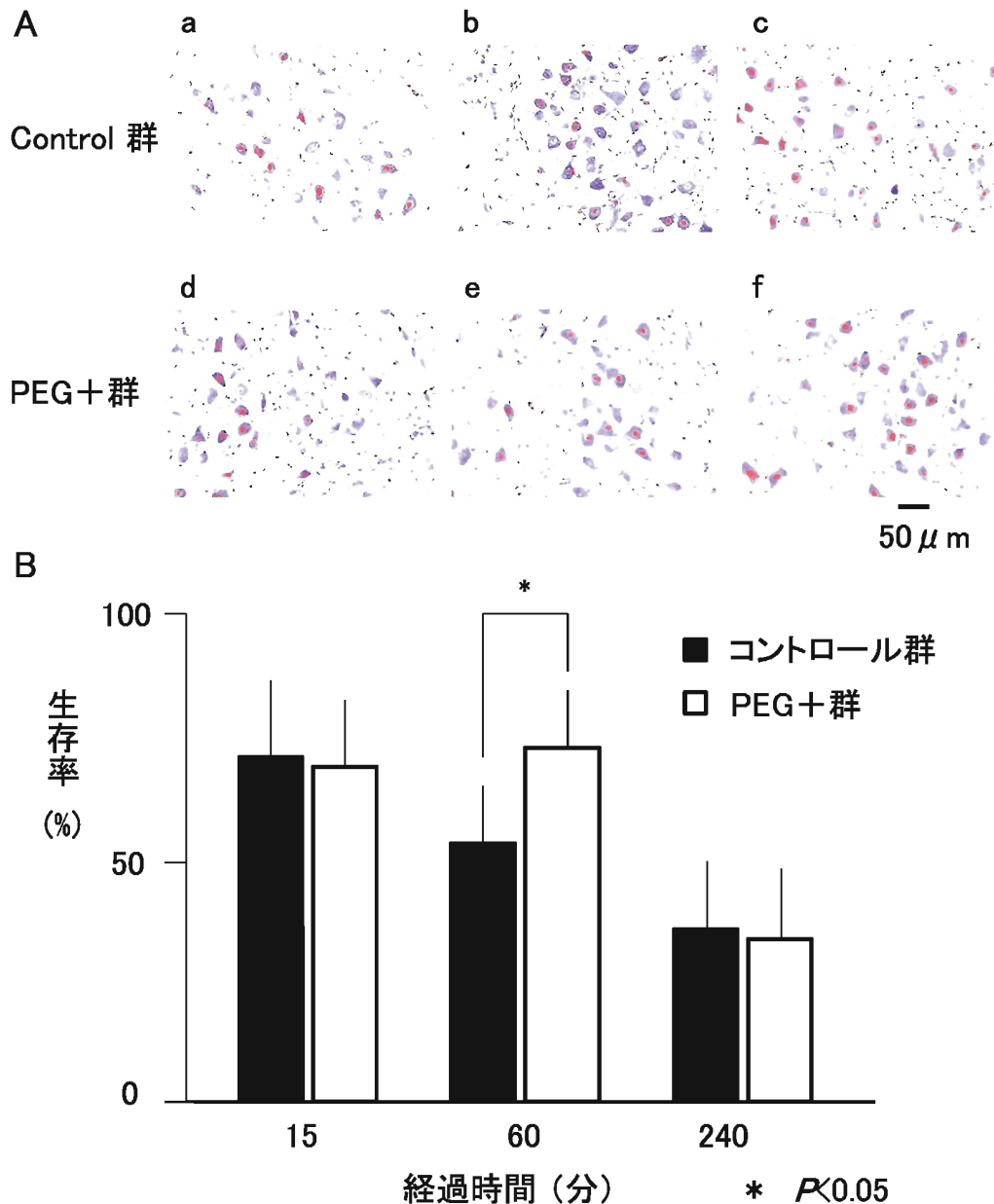


図4 舌下神経核ニューロン生存率の経時的変化に対する PEG 投与の効果

A. nissl 染色と PI 蛍光染色の合成画像, コントロール群の15分後 (a), 60分後 (b), 240分後 (c), PEG 投与群の15分後 (d), 60分後 (e), 240分後 (f). B. 培養開始から15, 60, 240分後におけるニューロン生存率の平均値のプロット。60分培養群において, PEG +群の生存率はコントロール群と比較して有意に高い値を示している。 (* $P<0.05$, $n=5$, Student's t test)

20.0% PEG + 群で $32.2 \pm 18.5\%$ であり、有意差を認めなかった ($P > 0.05$, 図 4 B).

孤束核ニューロンに対する PEG の効果について、組織染色像の一例を示す (図 5 A). 図 5 B のグラフに示すように、孤束核ニューロンにおいては、15分後、60分後、240分後の生存率の平均値はコントロール群でそれぞれ $69.2 \pm 8.5\%$, $61.6 \pm 11.6\%$, $52.3 \pm 7.7\%$ であり、PEG + 群で $74.4 \pm 5.3\%$, $70.6 \pm 10.0\%$, $56.0 \pm 10.2\%$ であった。15分後においては両群に有意差は認められなかったが ($P >$

0.05), 60分後と240分後においては PEG + 群の生存率の方が有意に高い値を示した ($P < 0.05$).

最後野ニューロンに対する PEG の効果について、組織染色像の一例を示す (図 6 A). 図 6 B のグラフに示すように、最後野ニューロンにおいては、15分後、60分後、240分後の生存率の平均値はコントロール群でそれぞれ $82.8 \pm 3.6\%$, $79.8 \pm 4.2\%$, $76.2 \pm 4.9\%$ であり、PEG + 群で $79.2 \pm 4.3\%$, $80.8 \pm 5.1\%$, $78.3 \pm 6.6\%$ であった。最後野ニューロンについては、PEG 投与によって240分後までの全てに

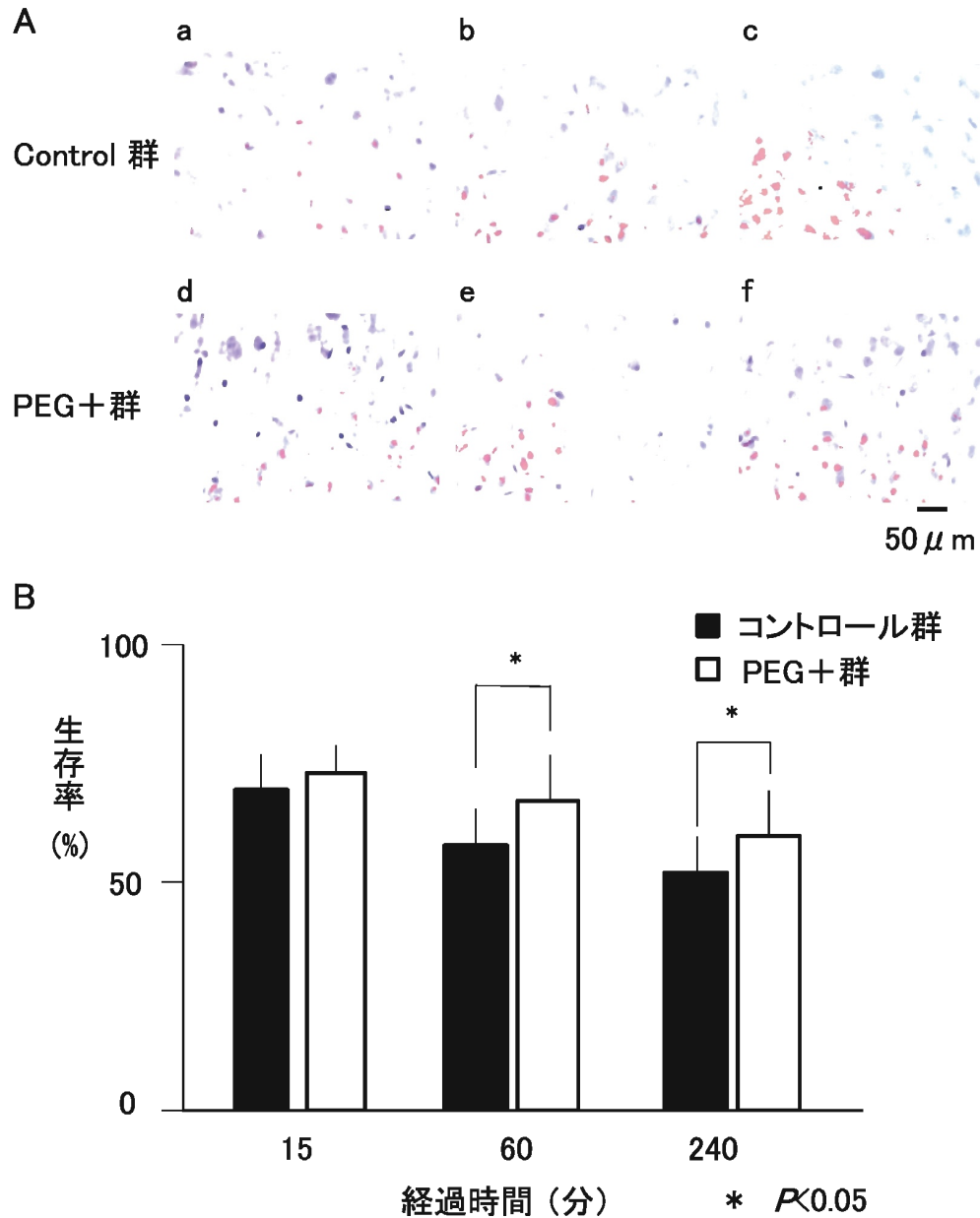


図 5 孤束核ニューロン生存率の経時的変化に対する PEG 投与の効果

A, nissl 染色と PI 蛍光染色の合成画像, コントロール群の15分後 (a), 60分後 (b), 240分後 (c), PEG 投与群の15分後 (d), 60分後 (e), 240分後 (f). B, 培養開始から15, 60, 240分後におけるニューロン生存率の平均値のプロット. 60分および240分培養群において, PEG + 群の生存率はコントロール群と比較して有意に高い値を示している. (* $P < 0.05$, $n = 5$, Student's t -test)

において生存率の有意な増加は認められなかった ($P > 0.05$)。最後野ニューロンは240分後においても著しく生存率が高く、PEG投与によってさらに生存率を増加させることは困難で、さらに長時間に及ぶ場合には影響があるのではないかと推察された。

3. PEGの至適濃度

これまでの実験では脊髄運動ニューロンに対する修復作用に関するこれまでの報告に従って、30% PEGに浸漬す

る方法を用いた。しかし、舌下神経核ニューロンに対する修復作用の最適濃度であるかどうか不明であった。そこで、舌下神経核ニューロンの生存率のPEG濃度依存性について詳しく調べた。PEGの異なる濃度(20, 30, 40%)を用いた場合の舌下神経核ニューロンの生存率を比較したグラフを図7に示す。PEGに浸漬処理をしなかったコントロール群と処理した群の各生存率の平均値は、コントロール群: $55.6 \pm 12.82\%$, 20% PEG群: $66.4 \pm 11.2\%$, 30% PEG群: $74.8 \pm 10.0\%$, 40% PEG群: $63.5 \pm 9.9\%$ で、

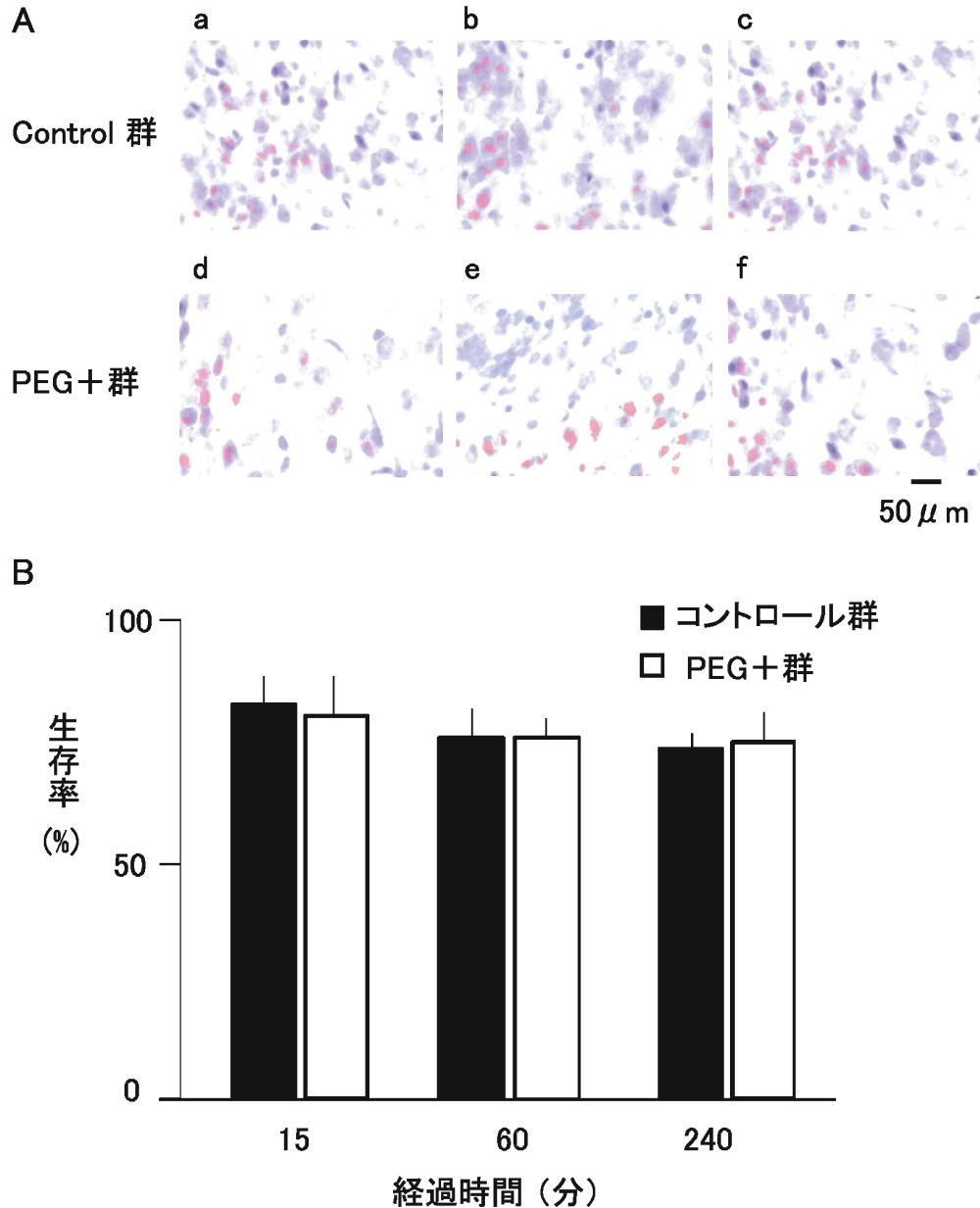


図6 最後野ニューロン生存率の経時的変化に対するPEG投与の効果

A, nissl染色とPI蛍光染色の合成画像, コントロール群の15分後(a), 60分後(b), 240分後(c), PEG投与群の15分後(d), 60分後(e), 240分後(f). B, 培養開始から15, 60, 240分後におけるニューロン生存率の平均値のプロット. PEG+群の生存率はコントロール群と比較して有意差を認めなかった. (* $P > 0.05$, $n = 5$, Student's t -test)

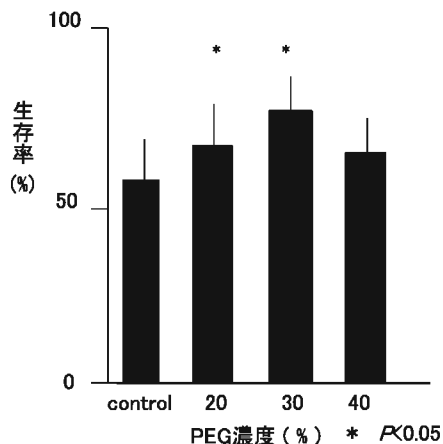


図7 PEGの濃度とニューロン生存率

異なる濃度のPEG (20, 30, 40%)を投与した場合の1時間後の舌下神経核ニューロンの生存率の平均値のプロット。PEG濃度20%および30%を投与した群において有意に高い生存率が認められた。(P < 0.05, n = 3, Dunnett's test)

20%, 30%群における生存率が他の群と比較して有意に高かった。(P < 0.05)

考 察

本研究は脳幹部新鮮脳スライス標本をin vitroの条件下において保持した際に、経時的におこる細胞死について調べたものであり、次のことが明らかとなった。1) 脳幹部ニューロンの脳スライス中での経時変化として、舌下神経核における細胞死の割合が最も高く、次いで孤束核、最後野の順で減少した。2) PEG浸漬により、脳スライス中での経時的細胞死の割合が減少した。3) PEGによる細胞死抑制効果が最大となるPEG濃度は20%以上40%以下の範囲で、30%前後が至適濃度であることが示唆された。

1) 各ニューロンにおける生存率の違いとPEGの効果

舌下神経核に存在するのは全て運動ニューロンであり、舌の運動を制御する。一方、孤束核および最後野は自律系の調節に関与するニューロンからなる。舌下神経核ニューロンは直径が約30~40 μ mと巨大であり¹⁹⁻²¹⁾、樹上突起は長く、分岐に富んでいる。最後野ニューロンは細胞体の直径が10 μ m程度と小さく、樹上突起は比較的短く、分岐も少ないという特徴がある。Davisらは、海馬において樹状突起を温存した標本と脳スライス標本のニューロンの生存率を比較し、樹状突起を切断することでニューロンは細胞死を生じる可能性が高くなると述べている^{22,23)}。また、過去の組織学的研究よりこれら3つのニューロンの樹状突起の分布範囲を比較すると、舌下神経核ニューロン、孤束核ニューロン、最後野ニューロンの順で小さくなっている²⁴⁻²⁸⁾。そのため、脳スライスを作成する際に切断される樹状突起の割合は舌下神経核において最も高くなり、舌下神経核ニューロンの生存率を著しく低下させた原因の一つと推測さ

れた。一方、舌下神経核ニューロン等の運動ニューロンは、特異的に虚血によって損傷を受け易い可能性も示唆されており²⁹⁻³²⁾、今後更なる検討が必要である。

実際に、本研究で用いたのと同じ5~7週齢の成体ラットの脳から作製したスライス標本中の舌下神経核ニューロンから細胞内記録を行うことを試みたが、数分の短時間記録は可能なものの、それ以上の記録は細胞が生きた状態を保持できず途中で記録が不可能となった。CarpらはPEGを用いたプロトコルにより、脊髄ニューロン(下肢運動ニューロン)における細胞内記録の成功率が22%から76%に上昇した事を報告している⁴⁾。本研究においても舌下神経核ニューロンを30%PEG溶液中に浸漬処理を行うと、培養を開始して60分後の生存率が有意に増加することが明らかとなり、細胞死の抑制効果が確認できた。しかし、培養を始めて240分後においては、PEGによる舌下神経核ニューロンの細胞死抑制効果は見られなくなり、脳スライス中の舌下神経核ニューロンから長時間活動記録を行うことは依然として困難であることが分かった。このため、PEG処理を用いても成体ラット脳の舌下神経核ニューロンからの細胞内記録は依然として困難であり、上述のCarpらの報告のような劇的な記録の成功率上昇は認められなかった。反対に、孤束核や最後野のニューロンでは、PEGを用いなくても舌下神経核ニューロンよりも脳スライス中における生存率が高く、これらの部位の単一ニューロン活動の電気生理学的記録がなされた多くの報告が見られることを裏付けている^{33,34)}。特に、延髄最後野においては、コントロール群でも240分後において著明にニューロンの生存率が高いことが明らかとなり、同部のニューロンの特性と考えられた。

2) PEGの最適濃度について

CarpらはPEGを用いた脳スライス作製のプロトコルにおいて、30%PEGを用いて、浸漬時間を1分間にした時が最も効果的であったと報告している⁴⁾。NakajimaとIkadaらは培養細胞を用いて、PEG濃度が30%になると膜融解作用が最も強く生じ、40%になると融解作用が更に強くなり、逆に膜修復作用が弱くなることを示した^{35,36)}。我々の実験からも、舌下神経核ニューロンに対するPEGの最適濃度が20%から40%の範囲で、おそらく30%程度であることが示唆された。またNakajimaとIkadaらの結果と同様にPEG濃度が40%になると、ニューロンの生存率は低下した。本研究は脳幹部スライス標本におけるニューロンの生存率を明らかにしたが、生体内における脳幹各部のニューロンが何らかの損傷を受けた際の生存率を反映したものと考えられる。運動ニューロンの損傷は自律系のニューロンと比べて著しく重篤になる可能性が考えられた。

3) 今後の展望

これまでに PEG による損傷ニューロンの修復効果を期待した抹消神経軸索の治療法が奏功する例が報告されているが、本研究からは、PEG 単独の効果では中枢性運動ニューロンの修復には十分でないことが示された。今後、PEG を中枢ニューロンの損傷に応用していくには、他の物質との併用なども含めてさらに詳しく検討する必要がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室、ならびに口腔機能学講座口腔生理学教室の諸先生方に深くお礼を申し上げますと、心より感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Yamamoto C, McIlwain H : Potentials evoked in vitro in preparations from the mammalian brain. *Nature* 210 (5040) : 1055-6, 1966.
- 2) Funahashi M, Mitoh Y, Kohjitani A and Matsuo R : Role of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in pacemaker activity in area postrema neurons of rat brain slices. *J Physiol* 552. 1 : 135-148, 2003.
- 3) Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH : Dentate Granule Cell Neurogenesis Is Increased by Seizures and Contributes to Aberrant Network Reorganization in the Adult Rat Hippocampus. *J Neurosci* 17(10) : 3727-3738, 1997.
- 4) Carp JS, Tennissen AM, Mongeluzi DL, Dudek CJ, Chen XY, and Wolpaw JR . An In Vitro Protocol for Recording From Spinal Motoneurons of Adult Rats. *J Neurophysiol* 100 : 474-481, 2008.
- 5) Borgans RB, and Shi R : Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. *The FASEB J* 14 : 27-35, 2000.
- 6) Shi R, and Borgans RB : Anatomical repair of nerve membranes in crushed mammalian spinal cord with polyethylene glycol. *J Neurocytol* 29 : 633-643, 2000.
- 7) Donaldson J, Shi R, and Borgans R : Polyethylene glycol rapidly restores physiological functions in damaged sciatic nerves of guinea pigs. *Neurosurgery* 50 : 147-156, 2002.
- 8) Koob AO, Colby JM, and Borgans RB : Behavioral recovery from traumatic brain injury after membrane reconstruction using polyethylene glycol. *J Biol Eng* 2 : 9 doi : 10. 1186/1754-1611-2-9, 2008.
- 9) Britt JM, Kane JR, Spaeth CS, Zuzek A, Robinson GL, Gbanaglo MY, Estler CJ, Boydston EAT, and Bittner GD : Polyethylene Glycol Rapidly Restores Axonal Integrity and Improves the Rate of Motor Behavior Recovery After Sciatic Nerve Crush Injury. *J Neurophysiol* 104 : 695-703, 2010.
- 10) Luo J, Borgans R, and Shi R : Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. *J Neurochem* 83 : 471-480, 2002.
- 11) Luo J, Shi R : Polyethylene glycol inhibits apoptic cell death following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 1155 : 10-16, 2007.
- 12) Cadenaz E, and Davis KJA : Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress And Aging. *Free Radic Biol Med* 29 : 222-230, 2000.
- 13) Liu-Snyder P, Logan MP, Shi R, Smith DT, and Borgans RB : Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. *J Exp Biol* 210 : 1455-1462, 2007.
- 14) Chen H, Quick E, Leung G, Hamann K, Fu Y, Cheng J, Shi R : Polyethylene Glycol Protects Injured Neuronal Mitochondria. *Pathobiology* 76 : 117-128, 2009.
- 15) Iijima T : Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neurosci Res* 55 : 234-243, 2006.
- 16) Macklis JD, and Madison RD. : Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status : a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci methods* 31 : 43-46, 1990.
- 17) Norberg J, Kristensen BW, Zimmer Z . Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Protoc* 3 : 278-290, 1999.
- 18) Bonde C, Norberg J, Zimmer J : Nuclear shrinkage and other markers of neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett* 327 : 49-52, 2002.
- 19) Krammer EB, Rath T, and Lischka MF : Somatotopic organization of the hypoglossal nucleus : a HRP study in the rat. *Brain Res* 170 : 533-537, 1979.
- 20) Wan XST, Trojanowski JQ, Gonatas JO, and Liu CN : Cytoarchitecture of the Extranuclear and Commissural Dendrites of Hypoglossal Nucleus as Revealed by Conjugates of Horseradish Peroxidase with Cholera Toxin. *Exp Neurol* 78 : 167-175, 1982.
- 21) Borke RC, Nau ME, and Ringler Jr RL : Brain Stem Afferents of Hypoglossal Neurons in the Rat. *Brain Res* 269 : 47-55, 1983.

- 22) Andrew RD, Macvicar BA : Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience* 62(2) : 371-383, 1994.
- 23) Davis ML, Kirov SA, Andrew RD : Whole isolated neocortical and hippocampal preparations and their use in imaging studies. *J Neurosci Methods* 166 : 203-216, 2007.
- 24) Ellenberger HH, and Feldman JL : Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res* 513 : 35-42, 1990.
- 25) Schweitzer L, Jin Z, Zhang X, renehan WE : Cell types in the rostral nucleus of the solitary tract. *Brain Res rev* 20 : 185-195, 1995.
- 26) Van Bekstaele EJ, Peoples J, and Telegan P : Efferent Projections of the Nucleus of the Solitary Tract to Peri-Locus coeruleus Dendrites in Rat Brain : Evidence for a Monosynaptic Pathway. *J Com Neurol* 412 : 410-428, 1999.
- 27) Vincent A, and Tell F : Postnatal Development Of Rat Nucleus Tractus Solitarius Neurons : Morphological And Electrophysiological Evidence. *Neuroscience* 93 : 293-305, 1999.
- 28) Schwartz EC, Thompson JM, Conner NP, and Behan M : The effects of Aging on Hypoglossal Motoneurons in Rats. *Dysphagia* 24 : 40-48, 2009.
- 29) Moore WM, and Hollier LH : The influence of severity of spinal cord ischemia in the etiology of delayed-onset paraplegia. *Ann Surg* 213 : 427-432, 1991.
- 30) Sakurai M, Aoki M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K : Selective motor neuron death and heat shock protein induction after spinal cord ischemia in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113 : 159-164, 1997.
- 31) Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y : Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke* 29 : 1007-1013, 1998.
- 32) Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K : Delayed selective motor neuron death and Fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. *Brain Res* 797 : 23-28, 1998.
- 33) Chai Y, Hay M, Bishop VS : Synaptic connections between area postrema and nucleus tractus solitaries. *Brain res* 724 : 121-124, 1996.
- 34) Funahashi M, Mitoh Y, Akaike T, Matsuo R : Variety of morphological and electrophysiological properties of area postrema neurons in adult rat brain slices. *Neurosci. Res* 54 : 43-48, 2006.
- 35) MacDonald RI : Membrane Fusion due to Dehydration by Polyethylene Glycol, Dextran, or Sucrose. *Biochemistry* 24 : 4058-4066, 1985.
- 36) Nakajima N, and Ikada Y : Fusogenic activity of water-soluble polymers. *J Biomater Sci polymer Edn* 6 (8) : 751-759, 1994.

ORIGINAL

Effects of polyethylene glycol on the vitality of central neurons
in rat brainstem slices

Tomoaki Ishio¹⁾, Yoshiyuki Hirai²⁾, Nobuo Inoue¹⁾ and Makoto Funahashi²⁾

ABSTRACT : To establish the number of surviving cells, the time-dependent degeneration of initially vital cells, and the effects of polyethylene glycol (PEG) on cell death, the vitality of neurons in brainstem slice preparations was investigated using immunohistochemical analysis. As early as 1 hour after making slice preparations, cells uptaking propidium iodide (PI), a cell death marker, were detected in approximately half the number of hypoglossal motoneurons, and only one-third of cells are alive 4 hours after the preparation. In contrast with vital cells in the nucleus tractus solitarius (NTS) and in the area postrema, hypoglossal neurons were weakest in the brain slices. A PEG treatment increased the survival ratio of the hypoglossal and NTS neurons, while there was no statistically significant increase in the area postrema neurons which display intrinsic high survival ratios (>76 %) without PEG treatment. To assess the optimum concentration of PEG to ensure cell vitality, different PEG concentration (20, 30, and 40%) were tested. The 20 and 30% PEG + groups showed significantly higher survival ratios ($P < 0.05$). We discuss the differences in the vitality of central neurons in the brain slice preparations and the effect of PEG treatment on cell death.

Key Words : brainstem slice preparations, neuron, polyethylene glycol, cell death

¹⁾ Department of Gerodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586 Japan (Chief : Prof. Nobuo Inoue)

²⁾ Department of Oral Physiology, Division of Oral Functional Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586 Japan (Chief : Prof. Makoto Funahashi)