

また、細胞層が白く見えるのは、この GABA ニューロンのシナプスがそこに存在することを示す。つまり、錐体細胞や顆粒細胞の細胞体に GABA 性シナプスをつくっているのである。このタイプの GABA ニューロンはどのような抑制回路に関係しているのだろうか。抑制性シナプス回路には、feed-forward と feed-back がある。とくに feed-back 系は反回抑制とよばれる。CA1 領域でいえば、次のようになる（模式図を図 4 に示す）。CA1 錐体細胞が興奮すると (a)、その軸索側枝が GABA 作動性ニューロンを興奮させる (b)。興奮し活動電位を発生した GABA ニューロンはその軸索終末で GABA をシナプスに放出する。放出された GABA が後シナプス膜である CA1 錐体細胞の細胞膜を過分極にする (c)。このように、CA1 錐体細胞自身の興奮が、さらなる興奮を抑制する方向にも働くという回路のしくみである。いいかえれば、反回抑制は、錐体細胞の興奮の調節、すなわち出力の調節をしているということもできる。したがって、GABA ニューロンによる抑制作用が減弱して過分極が減少すれば、神経細胞の過興奮を引き起こしうることになる。かくして、GABA 性抑制機構の減弱は、てんかん発作の原因の一つと考えられている。GABA 抑制を増強するような抗てんかん薬は種々のてんかんを抑制する事が知られており、種々の薬が臨床で使われている。

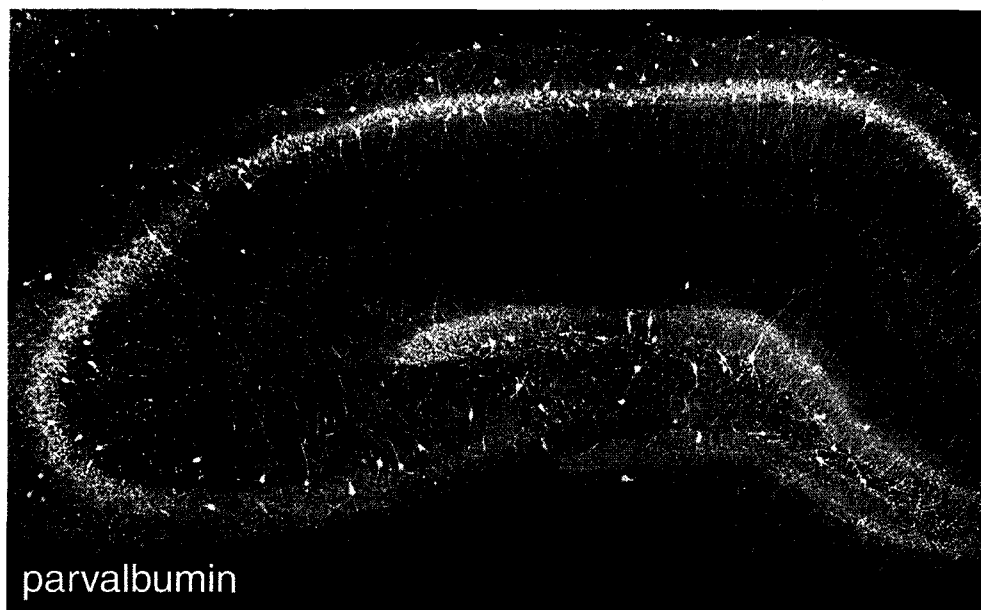


図3 抗パルブアルブミン抗体で免疫染色された GABA 性抑制ニューロンの局在

海馬 CA1、CA3 および歯状回ともに主細胞層に GABA ニューロンの細胞体が存在し、錐体細胞や顆粒細胞の細胞体にシナプスを形成して、興奮を制御していることがうかがわれる。

本研究では、低濃度ホルムアルデヒドの長期吸入曝露により、本態性多種化学物質過敏症モデル作成を検討するにあたり、海馬 CA1 野・歯状回において神経情報処理変化に関与する抑制系のバイオマーカーをペアパルス刺激パラダイムによって検討する。

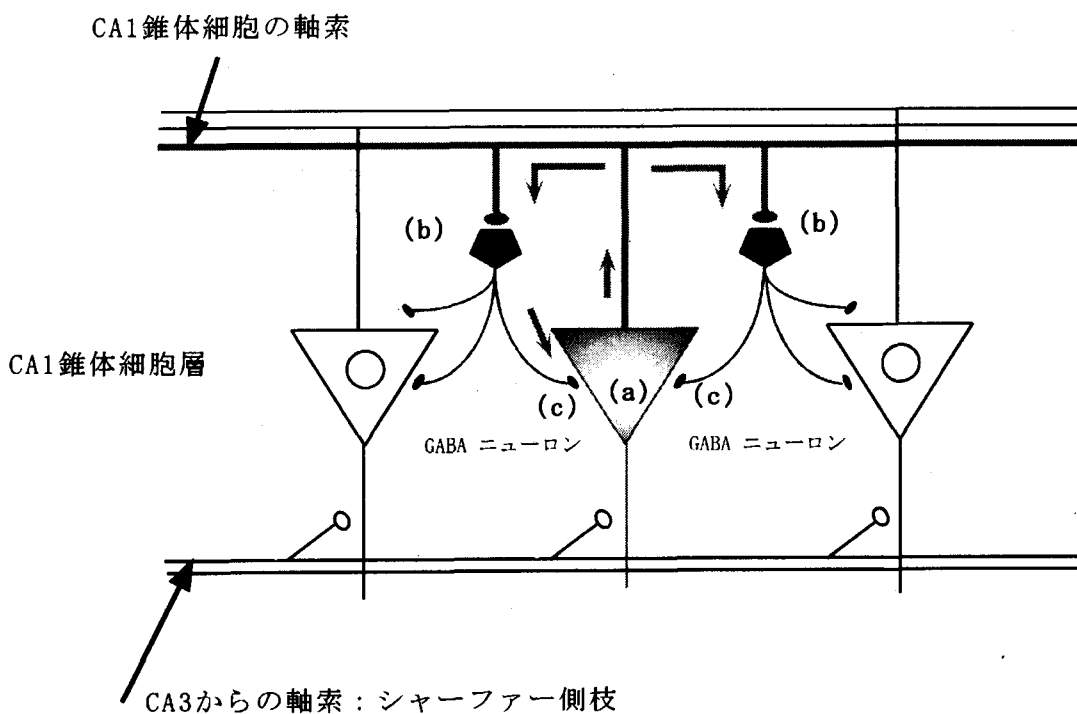


図4 反回性抑制回路の模式図

抑制性ニューロン (b) が、CA1 錐体細胞 (a) からの興奮性入力によって興奮すると、抑制性シナプス (c) を介して CA1 錐体細胞の興奮を制御する。

2-4) シナプスの可塑性

記憶学習過程は、脳内器官である海馬で行われていると考えられている。“物を覚える”とは、物を覚える前後で状態が変わり、その変わった状態が長く継続する事である。このような現象は、神経レベルにおいても観察されており、シナプス長期増強 (long term potentiation; LTP) 及び長期抑圧 (long term depression; LTD) と呼ばれる。脳内のソーセージ型をした海馬から切り出した海馬スライスを用いた実験においても、LTP, LTD

は観察される。高頻度 (100 Hz)、若しくは θ バースト (100Hz X 5 を 5 Hz で 5 回) と呼ばれる刺激パターンで刺激した時には、LTP が観察され、一方、1Hz、1000 パルス等の低周波数の刺激パターンでは LTD が誘導される。これら海馬神経シナプスのレベルで観察される LTP, LTD は、記憶、学習過程に関係していると考えられている。本研究では、この LTP 現象に着目し、2000ppb ホルムアルデヒド長期曝露 (以下 FA) による海馬 CA1 シナプス LTP に対する影響を調べ、LTP 変化と対応したバイオマーカーを検索する事を目的とする。

2-5) 本課題における神経形態学検索の意義

形態学による解析は、主に次の 3 点を明らかにする目的で行う。

- a. 海馬の神経細胞構築に対する影響
- b. 神経細胞の形態 (細胞体、樹状突起、軸索終末) に対する影響
- c. 神経細胞内にある機能分子の免疫細胞化学染色性に対する影響

中枢神経系の神経細胞は、ごく一部の例外を除き生後は細胞分裂を行うことができない。そのため、組織に対する傷害によって神経細胞が壊死に陥ると、それらは再生されることなく脱落し、さまざまな機能的障害に結びつく。上記の第 1 の項目はこの点における変化を調べるものである。次に細胞の脱落には至らなくても、神経細胞が情報処理を行うための基本的構造に変化が生じて、情報処理過程が障害を受けている可能性をみるのが、第 2 の項目である。すなわち、情報の入力部位である樹状突起、統合部位としての細胞体、および出力部位の軸索終末の 3 構造の形態学的変化について、観察を行った。最後に、「かたち」には現れないより軽度の変化をとらえるために、第 3 の検討を行った。さまざまな機能分子が神経細胞の内部のしかるべき場所に必要な量存在することが、神経細胞の正常な活動には必須の要素である。免疫組織化学染色はこの点における変化を視覚的に検出できる優れた方法である。今回はペアパルス解析による結果をふまえて、抑制性伝達物質 GABA の合成と輸送にかかわる物質の局在を調べた。

3. 研究方法

3-1) 反回抑制

神経細胞群の興奮性を示す指標の一つに、集合スパイク電位 (population spike, PS) があり、細胞体層からもっとも大きな電位として記録される。比較電位を細胞外液中におくと、負方向に振れる電位変化は、興奮した (活動電位を発生した) 神経細胞の数を反映し、振れ幅は、個々の細胞の興奮の同期性をあらわす。神経細胞は、連続刺激に対しては、単一刺激に対する応答とは異なる応答を示す。実験では、反回抑制を誘発する方法として、2回連続電気刺激 (ペアパルス刺激、間隔 5、10、20ms) を与えた。そして、一回目の電気刺激に対する電位の応答が2回目の電気刺激に対する応答にどの位影響しているかを調べた。影響の評価は、一般的に広く用いられているペアパルス比で行い、下式のように計算した。

$$\text{集合スパイク電位のペアパルス比} = \text{PS}2 / \text{PS}1$$

PS の振幅の測り方は図 5 参照。1 回目の応答に比べて2回目の応答が増大すること (ペアパルス比が 1 以上) をペアパルス増強という。2 回目の応答の方が減少することをペアパルス抑制という。GABA 受容体は、Cl⁻コンダクタンスを増加させる A 型と K⁺コンダクタンスを増加させる B 型に主に分類される。これらコンダクタンスの増大は膜電位を過分極させ、神経細胞の興奮閾値を高める。CA1 野で GABA_A 受容体の活性化による過分極のピーク潜時がおよそ 6-10ms くらいなので、ペアパルス抑制があれば、GABA 作動性介在ニューロンが間接的に刺激されて、放出された GABA によって錐体細胞の A 受容体が活性化されたことが推測されるのである。

本実験では、ホルムアルデヒド (0ppb、80ppb、400ppb、2000ppb) を 12 週間曝露したマウスをジエチルエーテル麻酔下で断頭した後、両側の海馬を脳より速やかに取り出し、McIlwain tissue chopper で 450 μ m の厚さで海馬スライスを作成した。スライスは、O₂/CO₂ 混合ガス (95%/5%) で飽和した人工脳脊髄液を灌流したインターフェイス型チャンバーで 1 時間インキュベートした後、実験に用いた。人工脳脊髄液の組成は、124mM NaCl、2mM KCl、1.25 mM KH₂PO₄、2mM CaCl₂、2mM MgSO₄、26mM NaHCO₃、10mM グルコースを使用した。

CA1 錐体細胞層に微小ガラス電極を置き、CA3 細胞の軸索である Schaffer の側枝が走行する放線層に刺激電極を配置した。歯状回では、顆粒細胞に微小ガラス電極を置き、貫通線維軸索が走行する外側分子層に刺激電極を配置した。最大の集合スパイク電位を誘発する大きさ (すなわち最大刺激) で電気刺激して、ホルムアルデヒド曝露群マウスと対照群マウスからえられたスライスの実験条件を合わせた。スライス実験に使用したマウスの数は、2000ppb 曝露群 5 匹、400ppb 曝露群 3 匹、80ppb 曝露群 3 匹、対照群 5 匹であった。

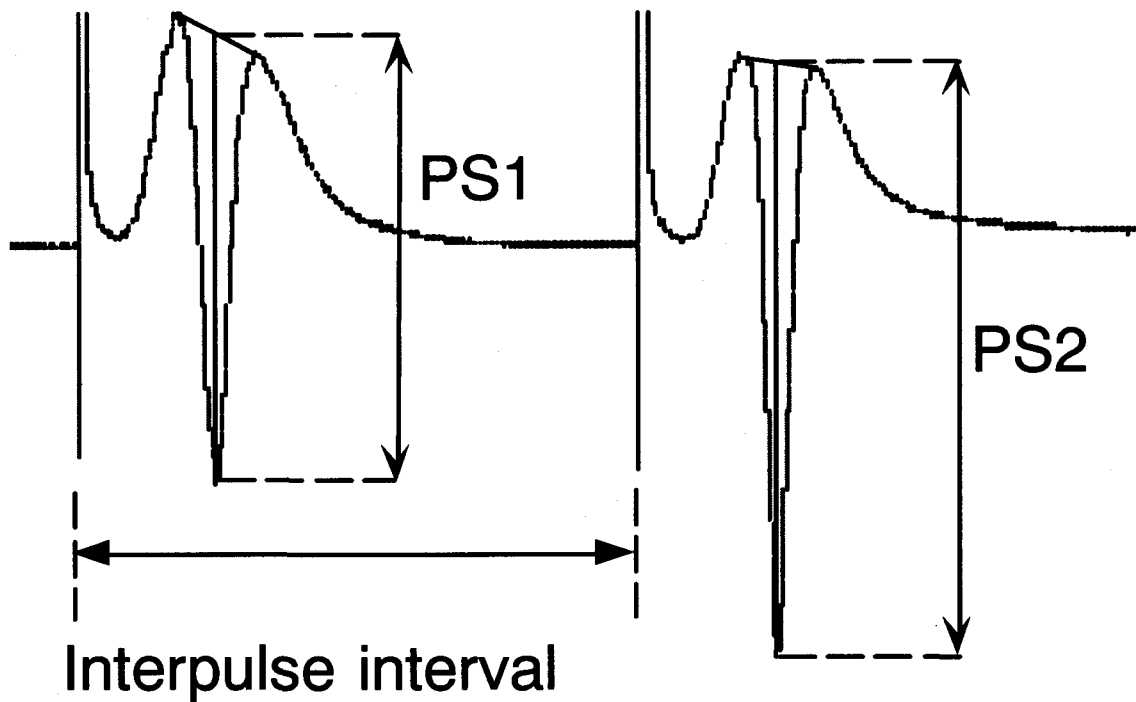


図5 ペアパルス応答の計測のしかた

一定の刺激間隔 (interpulse interval) で入力線維を電気刺激する。1回目の電気刺激に対する細胞の応答 (集合スパイク電位、PS1) と2回目の電気刺激に対する細胞の応答 (集合スパイク電位、PS2) が記録される。PS2/PS1 の比をペアパルス比と定義する。

3-2) 長期増強 (Long Term Potentiation; LTP)

0ppb と 2000ppb 濃度で12週間曝露したマウスをジエチルエーテルで麻酔し、断頭した後、海馬を取り出し、マニュアルで 4-500 μm の海馬スライスを切り出した。スライスは、海馬体の真ん中 1/3 から切り出した。切り出したスライスを ACSF 溶液 (124mM NaCl, 5mM KCl, 1.25mM NaH_2PO_4 , 2mM MgSO_4 , 26mM NaHCO_3 , 10mM Glucose, 2mM CaCl_2) に浸し、スライスして1時間後から測定を開始した。LTP の測定は、CA1 への入力繊維である Schaffer 側枝を両極性のタングステン刺激電極にて刺激して、CA1 のシナプス層 (stratum radiatum) にガラス微小電極 (抵抗 1-2 $\text{M}\Omega$) を指した。テスト刺激は、1/60Hz で行い、LTP を誘導する刺激には、 θ バースト刺激 (theta burst stimulation; 以下 TBS と略す; 100Hz X 5, 5Hz X 5) を使用した。刺激強度は、度テスト刺激、TBS 共に、最大集合シナプス後電位 (pEPSP) の半分の振幅を与える強さに設定した。TBS35-40 分後の pEPSP 傾きの増強度が、TBS 前のレベルの 1.2 以上であるものを LTP とした。LTP の増強度は、pEPSP の傾き (図6参照) の変化