

4 . 脳内海馬での情報処理変化の検討

研究協力者

笛田由紀子 (産業医科大学産業保健学部第1 生体情報学)

担当：海馬興奮性の電気生理学的解析

夏目季代久(九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報)

担当：海馬の LTP を電気生理学的に検索

福永 浩司 (東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野)

担当：細胞内シグナル伝達を神経化学的に検索

粟生 修司(九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報)

担当：行動変化を検索

研究補助者

新井 潤 (九州工業大学大学院生命体工学研究科)

緒方元気 (九州工業大学大学院生命体工学研究科)

野村和美 (熊本大学大学院医学研究科)

名倉陽子 (東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野)

(1) 研究要旨

化学物質過敏状態のモデル作成において重要なことは、「過敏になる」すなわち「感作、sensitization」という機構を脳レベルで解明することであろう。その第1歩として、海馬において FA 長期曝露で変化した指標をみだし、その機構の解明に向かってきた。神経の sensitization という問題は、アプリシアのえら引込め反射の長期感作や、齧歯類海馬 CA1 領域が関与する空間記憶や作動記憶について先人たちが多くの成果をあげている。化学物質過敏状態動物モデル作成においては、単に影響の羅列は意味がなく、神経の電気生理学的変化を分子レベルで説明し、さらにはどのような行動変化に影響するかという、分子から行動までの機構軸を構築しなければ、真のモデル作成とはいえないのではないだろうか。

化学物質過敏状態のモデルを作成するという目的にむかって、まず、低濃度ホルムアルデヒド (以下 FA) の長期吸入曝露により、大脳辺縁系の一部である海馬において神経情報処理がどのような影響を受けるか検討した。情報処理の指標としては、シナプスの可塑性として長期増強 (Long term potentiation, 以下 LTP) の程度、抑制系としてペアパルス抑制強度、脳内シグナル伝達に關与する活性化酵素系の種類、海馬が關与すると考えられている行動試験を検討した。

海馬スライス標本 CA1 領域におけるシナプス伝達の LTP については、対照群に比べて、80ppb, 400ppb, 2000ppb で減弱していた。脳内シグナル伝達の検索は、2000ppb 濃度で実験を行った。海馬では CaM キナーゼ系、大脳皮質では MAP キナーゼ系が影響を受け、海馬 CA1 領域と歯状回で synapsin I が増加していた。また、副腎皮質刺激ホルモン (CRH) 濃度は大脳皮質では増加したが、海馬では変化がなかった。2000ppb 曝露群の海馬スライス標本をもちいて、集合スパイク電位と集合シナプス後電位のペアパルス解析をおこなった。歯状回では、対照群と比較して、集合スパイク電位のペアパルス比が 5ms, 10ms, 20ms で増加したが、集合シナプス後電位のペアパルス比は変化しなかった。CA1 領域では、集合シナプス後電位のペアパルス比が 5ms, 10ms で増加

していたが、集合スパイク電位のペアパルス比は、変化しなかった。行動試験は 2000ppb 曝露群をもちいた。活動性、探索行動の評価としてオープンフィールド試験を行い、立ち上がり回数に有意な増加がみられた。不安の指標としては、高架プラス迷路試験を行ったが、曝露群と対照群とのあいだでは差がみとめられなかった。また、くしゃみ回数と LTP との間に相関はなかった。

これら海馬についての検討結果は、シナプス伝達の異常が惹起された可能性を強く示唆する。今回、海馬が関与する空間学習への影響を調べるために、モーリス水迷路試験をおこなったが、活動性の変化を排除した評価方法を用いる必要性が、空間学習試験の今後の検討課題となった。

(2) 研究目的 - いままでの研究成果をふまえて

1) 平成 12 年度の成果

平成 12 年度は、FA 曝露濃度 2000ppb において検討した。その結果、海馬から皮質への出力領域である CA1 領域において、シナプス伝達の LTP が減弱されていた。また、内嗅皮質から海馬への入力部位である歯状回では、集合スパイク電位のペアパルス抑制が低下しており、顆粒細胞層への反回抑制が減弱されていることが示唆された。形態学的な検索としては、免疫組織化学で調べたかぎりでは、細胞やシナプスの脱落等の形態学的に顕著な変化はみられず、機能分子の分布にも顕著な変化はないことを報告した。

2) 平成 13 年度の成果

平成 13 年度は、曝露濃度を 80ppb、400ppb、2000ppb とした。そして、CA1 の LTP は 80ppb 以上で減弱する傾向にあることを示唆する結果をえた。歯状回におけるペアパルス抑制も 80ppb でも減弱の傾向があることがわかった。細胞内シグナルに関しては、2000ppb 濃度で実験を行い、CaM キナーゼ系と MAP キナーゼ系が影響を受けることと、synapsin I や GluR1 に大きな変化がみられることを報告した。ペアパルス解析、細胞内シグナル解析ともに個体のばらつきがあったため、再実験が必要と考えた。

3) 今年度の研究目的

今年度は、海馬 CA1 において観察された LTP の減弱の機序解明のための実験を計画した。LTP の減弱についての量-反応関係を明らかにするために低濃度曝露の実験数を増加した。そして、LTP と関係すると思われる細胞内シグナル伝達分子の検索についても実験数を増やした。くわえて、興奮性の変化との関係を解明するために、歯状回におけるペアパルス解析の実験数を追加し、CA1 領域、歯状回ともに、解析範囲をひろげてシナプス由来成分も解析した。これらの一部は同一個体の海馬各領域について検討されたものであり、指標どうしの相関を検討した。さらに、行動レベルで海馬機能の評価するためオープンフィールド試験、高架プラス迷路試験、モーリス水迷路試験をおこない、空間学習、探索行動、不安情動に及ぼす影響を調べた。また、行動試験に用いたマウスのスライス標本を作成し、海馬 CA1 における LTP を解析した。

4) 細胞内シグナル伝達検索の意義

カルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II)、プロテインキナーゼ C (PKC)、増殖因子活性化プロテインキナーゼ (MAP キナーゼ) は海馬を介する記憶学習の獲得過程に関与している。特に、CaM キナーゼ II は海馬の興奮性入力である錐体細胞の

樹状突起に高濃度発現しており、スパインの形態変化を引き起こすこと、あるいはシナプス後部のグルタミン受容体 (GluR1) の発現量とリン酸化状態を変化させることによってシナプス伝達効率を長期的に変化させる。すなわち、シナプス伝達長期増強 (LTP)、長期抑制 (LTD) などのシナプス可塑性に必須の役割を果たしている。一方、MAP キナーゼは核内の CREB 蛋白質をリン酸化して、神経の回路形成や生存に関する蛋白質発現を調節している。PKC に関してはその標的は不明である。FA はシックハウス症候群に代表されるように、ヒトにおいて疲労感、集中力の低下、記憶力の低下など、精神的ストレス状態を引き起こす。本研究では微量 FA の長期曝露による中枢神経系への影響についてマウスを用いて検討した。特に海馬において記憶、学習に関する CaM キナーゼ II、PKC、MAP キナーゼ系について解析した。また、マウス視床下部室傍核において、副腎皮質刺激ホルモン (CRH) の免疫陽性細胞数が FA 曝露で増加するという佐々木の報告があることから、海馬と大脳皮質における CRH の変化についても解析した。

5) 行動の解析

FA2000ppb 慢性曝露の活動性や探索行動、不安情動および空間学習機能に及ぼす影響を調べるため、オープンフィールド試験、高架プラス迷路試験、モーリス水迷路試験を用いて評価した。モーリス水迷路試験は代表的海馬機能である空間学習記憶機能を評価する行動試験としてよく使われており、海馬への影響を調べる上で重要な行動学的評価法である。また、探索行動や不安情動にも海馬が関与していることが知られている。これらの行動評価試験により、これまでに明らかになった細胞レベルの変化が、個体の行動レベルにどの程度反映されるか検討した。

(3) 研究方法

1) 集合シナプス後電位と集合スパイク電位のペアパルス解析

海馬神経細胞群の興奮性の変化を調べる方法は、1) 刺激強度・反応の関係 (SR 曲線) が変化していないかどうか、2) 興奮系が変化していないかどうか、3) 抑制系が変化していないかどうかの3つである。CA1 領域については、LTP を検討した夏目らが1, 2について報告しているので、ここでは、CA1 領域については抑制系をペアパルス解析によって検討した。歯状回の septo-temporal の抑制系の影響と思われるが、スライスによって SR 曲線のばらつきがみられ、両群間に変化がなかったため、1, 2に関して、集合スパイク電位の閾値刺激、最大集合スパイク電位および最大集合スパイク電位を誘発した電気刺激の大きさでもって比較した。3の抑制系については、最大集合シナプス後電位と集合スパイク電位のペアパルス解析をし、横断実験用に準備された FA (2000ppb) を 12 週間 (12 週間) 曝露した C3H/HeN 雌マウスと対照群 C3H/HeN 雌マウスを用いた。後述する結果には、3年間の総実験解析結果を記載した。

スライス標本の作成方法は、一昨年、昨年と同様におこなったが、今年は、藤巻らのグループで海馬における mRNA の発現量変化を調べるための試料を採取するため、RNAase の混入を防ぐような処置を行って、スライス標本を作成した。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。歯状回 (dentate gyrus, DG) 顆粒細胞層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、FA 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。

平成 12、13 年度同様に、反回（側方）抑制を誘発する方法として、最大の集合スパイク電位を誘発できる刺激の大きさで 2 回連続電気刺激を与えた。とくに今年度は、解析刺激間隔を 5、10、20、50、100、200、500、1000ms と広げた。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くらい影響しているかを調べた。影響の評価は、今まで同様に一般的に広く用いられているペアパルス比を用い、集合スパイク電位 (population spike, PS) のペアパルス比 = PS2/PS1 で行った。今年は細胞体への入力部位についても解析をひろげて、集合シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) の slope のペアパルス比 = fEPSP2/fEPSP1 を追加した。PS の振幅と slope の測り方は平成 13 年度報告書の 354 頁図 1 を参照。

2) CA1 における LTP

測定には、59 匹のメス（10 週齢）の C3H/HeN マウスを用いた。使用したマウスを 2 群（コントロール群 19 匹、曝露群 40 匹）に分けて、そのうち、曝露群に FA（80、400、2000ppb）を 12 週間曝露した。曝露濃度によるマウス匹数の内訳は、80ppb：8 匹、400ppb：16 匹、2000ppb：16 匹であった。コントロール群は、通常空気下中、飼育した。曝露終了後、両群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、スライスチョッパー (McIlwain tissue chopper) 及びマニュアルで 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人工脳脊髄液溶液（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 M Ω ）を指した。テスト刺激は、1/60 Hz で行い、LTP を誘導する刺激には、バースト刺激 (theta burst stimulation; TBS; 100Hz X 5, 5Hz X 5) を使用した。テスト刺激、TBS 共に、集合シナプス後電位 (pEPSP) の最大値の半分の振幅を与える刺激強度に設定した。LTP の増強度は、TBS 前の 5 分間の平均傾きを 1 とした時の、TBS 35 - 40 分後の pEPSP の傾きで示した。測定したスライス数は、コントロール：30 枚、80ppb：12 枚、400ppb：30 枚、2000ppb：42 枚であった。

また、行動実験に用いた動物より海馬スライスを作成し、上記方法により、LTP の大きさを測定した。行動実験で用いた 12 匹（コントロール群 6 匹、曝露群 6 匹）のマウスから海馬スライス（コントロール群 11 枚、曝露群 14 枚）を作成し、LTP 測定を行った。但し、今回は、過去 2 年間と異なり、スライス毎に、LTP 測定前、異なる刺激強度に対する pEPSP 反応を測定し、刺激強度・反応曲線 (SR 曲線) が S 字状になるスライスに関してのみデータを測定した。以上の操作によって、スライス毎の条件が、過去 2 年間に比べそろい、それらの結果に比べ、よりばらつきが小さくなった。

3) 細胞内シグナル伝達

C3H マウス (12 匹) を FA の 2000 ppb に 12 週間曝露した。コントロール群としては清浄空

気を同様に曝露した C3H マウス (12 匹)を用いた。最終曝露後に大脳皮質(頭頂部)、海馬を摘出した。海馬においては CA1, CA3, 歯状回(DG)の各領域に分割して液体窒素で凍結後、-80 °C に保存した。各組織を 0.5 % Triton X-100、プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤を含む可溶性バッファーでホモゲナイズした。Bradford 法で蛋白定量した後、Laemmli 法のサンプルバッファーと混合して、100 °C、3 分間熱処理した。

CaM キナーゼ II の活性化反応には、分子内の Thr-286 の自己リン酸化反応が必要である。私達は Thr-286 の自己リン酸化を特異的に認識する抗体(抗リン酸化 CaM キナーゼ II 抗体)を作成した。一方、MAP キナーゼ (ERK) は上流の酵素 MAP キナーゼキナーゼ (MEK) によって、活性化ループ内の Thr-183 と Tyr-185 がリン酸化され、活性化される。プロテインキナーゼ C (PKC) は分子内の Ser-657 が活性化反応に伴って自己リン酸化される。以上のことから、それぞれの分子内のリン酸化部位を認識する抗体に対する反応性を測定することによって、各々のプロテインキナーゼの活性化状態をモニターすることができる。本研究では、FA 曝露後の海馬、大脳皮質のプロテインキナーゼの活性を測定するために、これらのリン酸化認識抗体を用いて免疫プロットを行った。笛田、夏目らの研究により、シナプス伝達効率が海馬で変化することが明らかにされたことから、神経終末において興奮性伝達物質、グルタミン酸の放出に参与する synapsin I の量、後シナプスにおいてはグルタミン酸受容体のうち AMPA 受容体 (GluR 1)の量を免疫プロットにて測定した。また、CRH の定量は同様に、抗体による免疫プロット法を用いた。

4) 行動試験

オープンフィールド試験

中央にオブジェクトを置いたオープンフィールドにマウスを入れ、10 分間の観測期間中の総移動距離、立ち上がり回数、中央部侵入回数、中央部滞在時間を測定した。総移動距離は活動性の指標であり、他の 3 項目は探索行動の指標となる。

高架プラス迷路試験

高架プラス迷路の中央部にマウスを置き、5 分間の観測期間中の総移動距離、オープンアーム侵入回数、オープンアーム滞在時間を測定した。オープンアーム侵入回数および滞在時間が不安レベルの指標であり、これらの値が大きいほど不安が少ないとされている。

モーリス水迷路試験

マウスを円形プールの 4 ケ所からランダムに入れ、プラットホーム(ゴール)に到達するまでの時間を測定した。1 日 4 回の試行を 1 ブロックとして、連続 4 日間訓練を行い、ゴール到達時間の経時変化を調べた。次に probe test として、訓練終了後プラットホームを取り去り、プラットホームの反対側からマウスをプールに入れ、100 秒間行動を観察し、プール内の総移動距離、ゴールエリア侵入回数、ゴールエリア滞在時間を測定した。

(4) 研究結果

1) 単一刺激および 2 連続刺激に対する誘発電位の解析

CA1 領域と歯状回で単一誘発電位記録を行ったときの、集合スパイク電位(PS)の subthreshold、PS の最大値 (maximum PS) 最大の PS が得られたときの刺激値(maximum stimulation)の値を表 1 にまとめた。曝露群と対照群ではいずれの値も差はなかった。

CA1 領域と歯状回から記録された集合シナプス後電位と集合スパイク電位のペアパルス比を刺

刺激間隔 5ms ~ 500ms (CA1) または 5ms ~ 1000ms ごとにまとめたプロファイルを図 1 に示す。対照群から得られたプロファイルは、同様の電気刺激で得られたマウスやラットのものと同様であったので、対照群からの変化に注目した。2000ppb 曝露群の CA1 領域では、5、10ms 刺激間隔の集合シナプス後電位についてのみペアパルス比の増加がみられた (Student's t-test)。一方、歯状回では、集合シナプス後電位の比には差がみられなかったが、集合スパイク電位のプロファイルでは、刺激間隔 10ms, 20ms, 50ms でペアパルス比の増加がみられた (Welch's t-test)。

表 1 歯状回、CA1 領域で単一電気刺激による誘発電位記録時の subthreshold, maximum stimulation, maximum PS。3 年間のデータをスライスごとの平均 +/-SD でまとめた。N はスライスの数である。いずれのパラメーターも、2000ppbFA 曝露群と 0ppb 対照群では差がなかった。

| | | 0 ppb | 2000ppb | |
|-----|-------------------------|----------------|---------|--------------------|
| DG | subthreshold (μ A) | 91 \pm 59 | | 86 \pm 68 |
| | max stim. (μ A) | 755 \pm 287 | n=37 | 678 \pm 300 n=61 |
| | max PS (mV) | 8.7 \pm 3.9 | | 7.7 \pm 4.3 |
| CA1 | subthreshold (μ A) | 36 \pm 26 | | 32 \pm 13 |
| | max stim. (μ A) | 225 \pm 123 | n=11 | 183 \pm 71 n=18 |
| | max PS (mV) | 14.8 \pm 4.1 | | 14.7 \pm 4.7 |

2) CA1 領域における LTP

まず横断実験に用いた FA2000ppb 曝露の結果を示す。その後、その他の濃度のデータを示し、最後に、行動実験に用いたマウスより切り出した海馬スライスにおける LTP の結果について報告する。

2000ppb の FA 曝露したマウス海馬スライスの LTP

pEPSP の傾きの大きさを、曝露群及びコントロール群で比較した所、両者に違いは観察されなかった (図 2 と 3)。

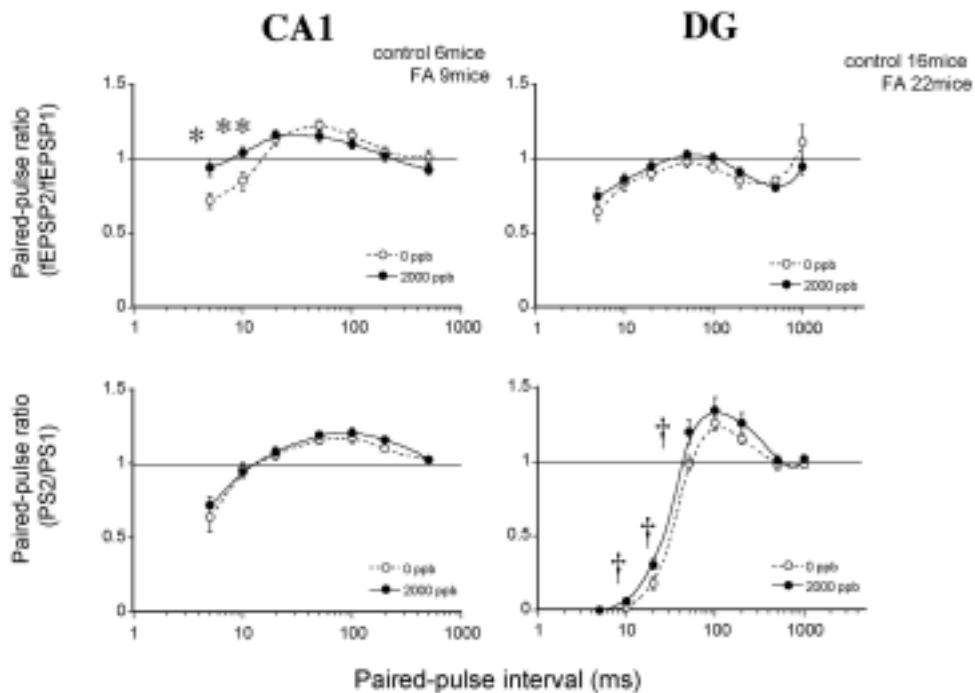


図1 海馬 CA1 領域と歯状回における集合シナプス後電位と集合スパイク電位のペアパルスプロファイル。スライス実験に使用したマウスの数は、2000ppb 曝露群計 22 匹、対照群計 16 匹であった。スライス数は、CA1 からの記録には、曝露群 18 枚、対照群 11 枚、歯状回からの記録には曝露群 61 枚、対照群 37 枚であった。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, by Student's t-test, † $p < 0.05$ by Welch's t-test。

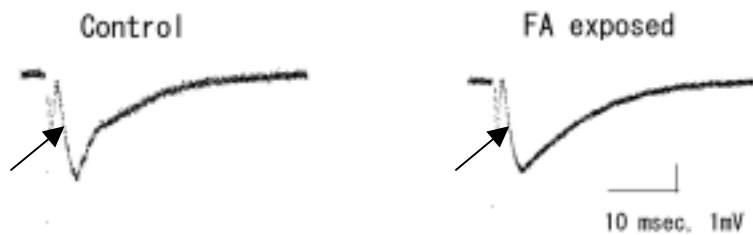


図2 コントロール群、FA 曝露群 (FA exposed; 2000ppb) マウス海馬スライスから測定された LTP。pEPSP の傾き (矢印の先) は、両者で違いは観察出来なかった。

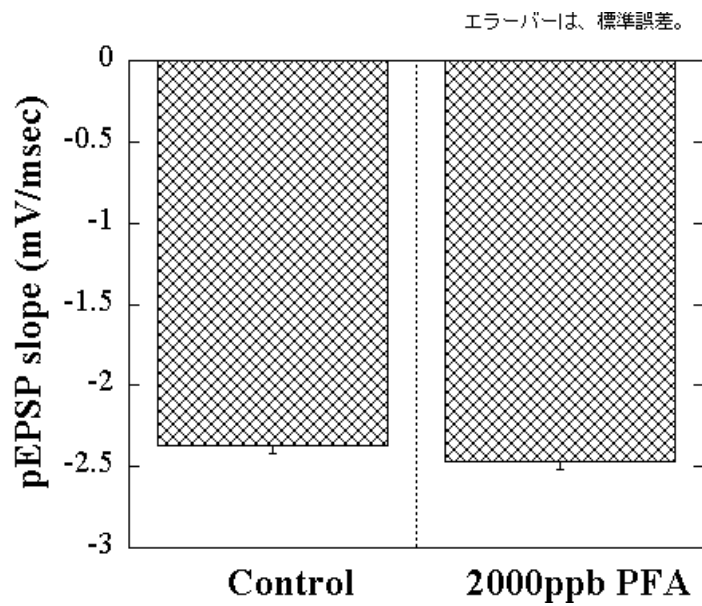


図 3 FA 曝露の pEPSP に対する影響



図 4 コントロール群、FA 曝露群マウス海馬スライスから測定された LTP。大きくなっている信号が、TBS 後の pEPSP の波形である。スケールバーは、10 ミリ秒、1 mV。

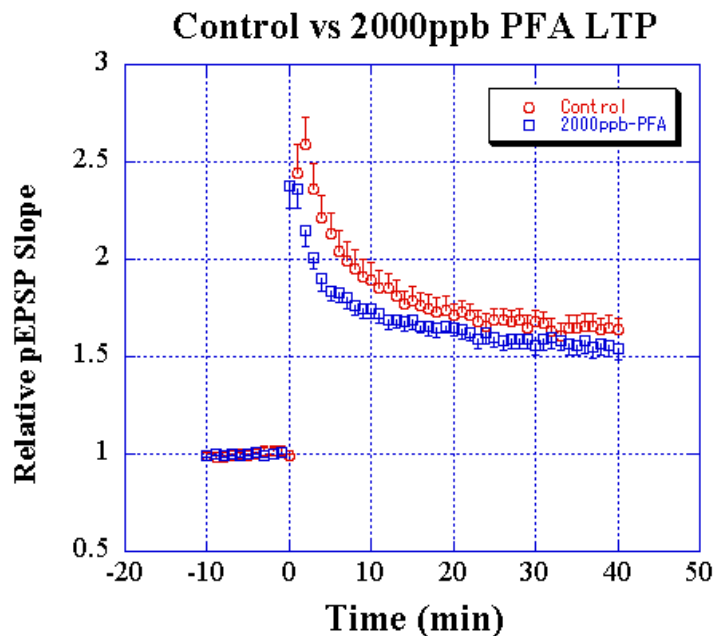


図5 コントロール群と曝露群マウス海馬スライスにおける LTP の経時変化 . 0 分で TBS 刺激を行った。TBS 前 10 分間の平均 pEPSP 傾きを 1 とした時の pEPSP 傾きを、縦軸にプロットしている。バーは、標準誤差である。

そこで、TBS によって誘導される LTP を測定すると、図 5 に示すような結果になった。コントロール群、曝露群共に TBS によって LTP が形成された。TBS 直後の TBS 後増強に差が見られた他に、誘導された LTP の大きさに差が見られた。曝露群の方の LTP は、有意に抑制されていた(図 6)。この結果は、平成 13 年度報告書で報告した結果と同様の結果であった。但し、コントロール群、曝露群の差は以前のデータに比較して、小さかった。これは、本年度より、LTP 測定前、スライス毎に SR 曲線を測定し、LTP 測定する海馬スライスの条件をそろえたためと考えられる。SR 曲線の違いは、測定場所近辺の神経回路の違いを反映しているためと考えられるので、図 5, 6 に図示したデータは、昨年度までの 2 年間のデータより、より同一条件スライスでの LTP データと考えられる。本年度のデータにおいても、過去 2 年間同様、FA 曝露による LTP 抑制が測定出来たので、本年度得られた曝露群による LTP 抑制の効果は、小さいながらも、確実なものであると考えられる。

図 7, 8 に、今年度得られたデータを掲載した。

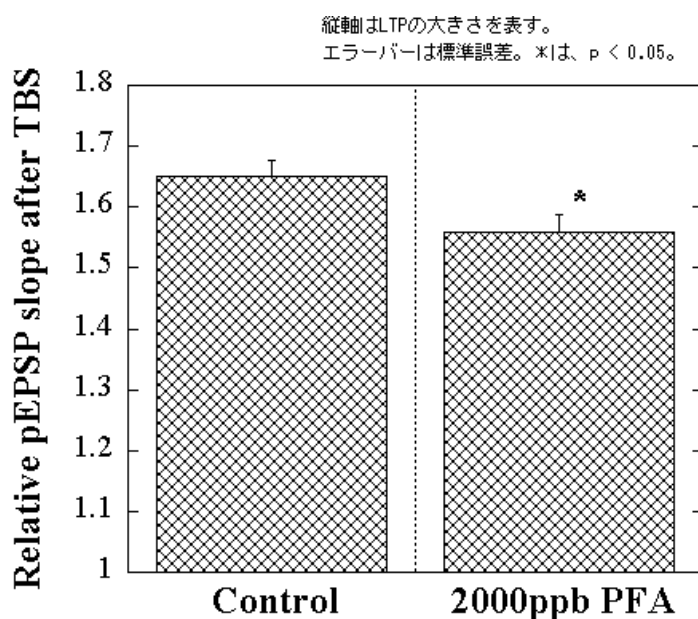


図 6 FA 曝露による LTP に対する影響 . 検定方法は、t-test (対応なし) である。縦軸は、TBS 前 10 分間の平均 pEPSP 傾きを 1 とした時の pEPSP の傾きである。

FA 曝露の LTP に対する濃度依存性

LTP の FA 濃度依存性を測定する実験を行った。この実験は、過去の報告では、例数が少なかったで行った。FA を 80, 400, 2000ppb 曝露した時の LTP の結果を図 7 に示す。過去の報告同様、FA80ppb 以上で LTP が抑制された。さらに、図 7 を見ると、FA 曝露が、TBS による刺激直後増強 (PTP) 及び短期増強 (STP ; 正確な定義は無いが、TBS 後、数 10 分の増強) にも影響があるかもしれない。LTP の大きさについては、図 8 に示した。80ppb 以上で、LTP が有意に抑制されていた。

くしゃみ回数と LTP 抑制の関係

昨年度報告があったように、FA 濃度に依存してくしゃみの回数が増加した。そこで、同一個体からくしゃみ回数と LTP を測定し、それらの間の相関関係を調べた。曝露群マウスのくしゃみ回数と LTP の大きさを図 9 に示した。顕著な相関関係は観察できなかった。

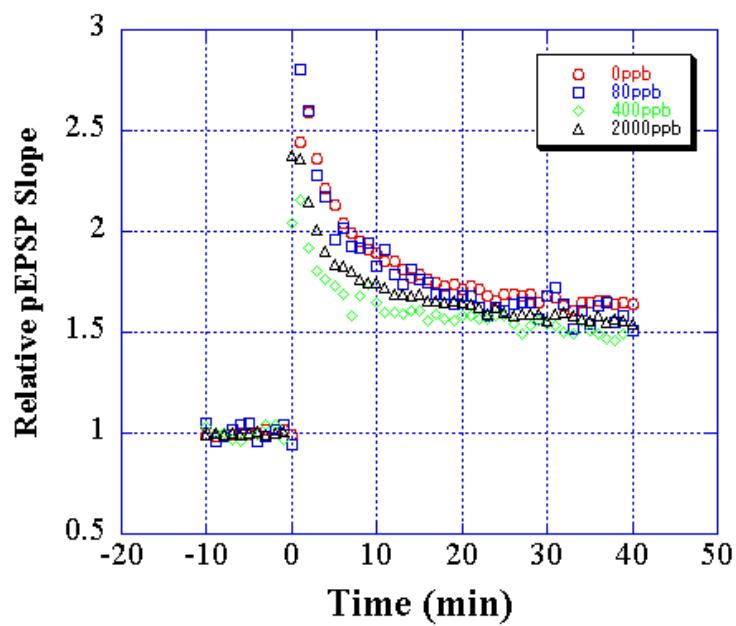


図 7 0, 80, 400, 2000ppb の FA の LTP に対する効果。見やすいように、図には平均値のみをプロットした。

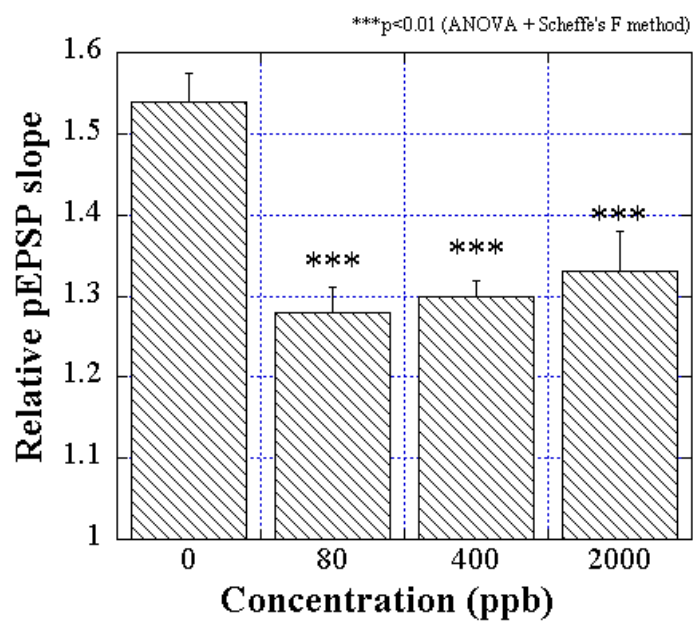


図 8 FA の様々な濃度の LTP に対する効果。バーは、標準誤差である。

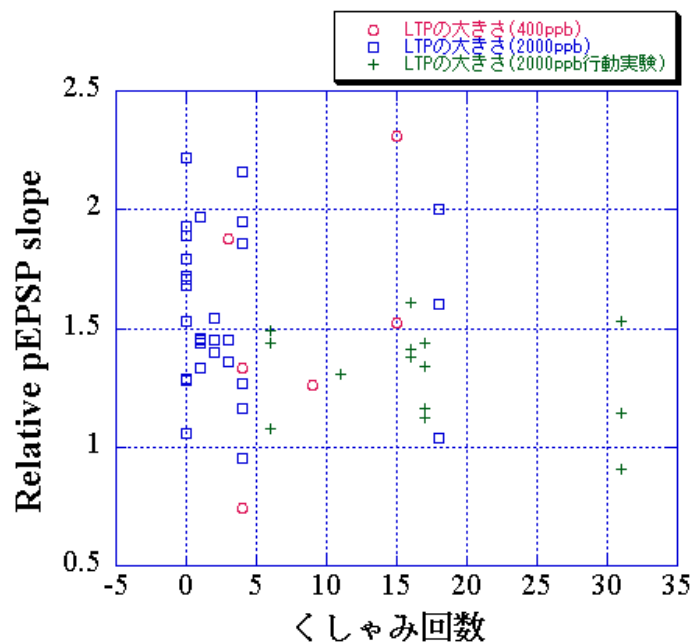


図9 曝露群マウスのくしゃみ回数と、そのマウス海馬スライスから測定されたLTP。

行動実験に使用したマウス海馬スライスのLTP

当該研究班において、本年度より行動実験が始まったが、行動実験で用いたマウスの海馬スライスを用いて、今まで同様、pEPSPの傾きの大きさとLTPを測定した。pEPSPの傾きの大きさを曝露群及びコントロール群で比較した所、両者に違いは観察されなかった(図10)。

一方、TBSにより誘導されるLTPの大きさを比較すると(図11)、有意差は無いが、曝露群の方が抑制される傾向にあった。

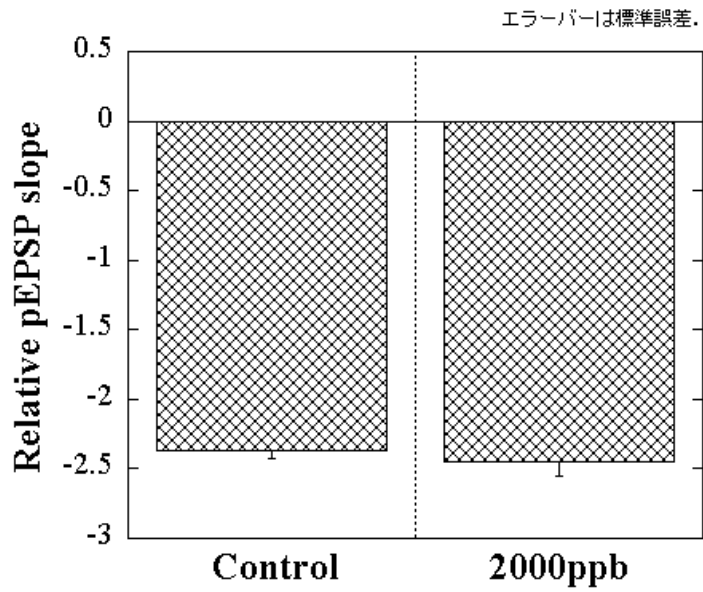


図 10 行動実験で使用したマウス海馬スライスにおける、曝露群、コントロール群の pEPSP。

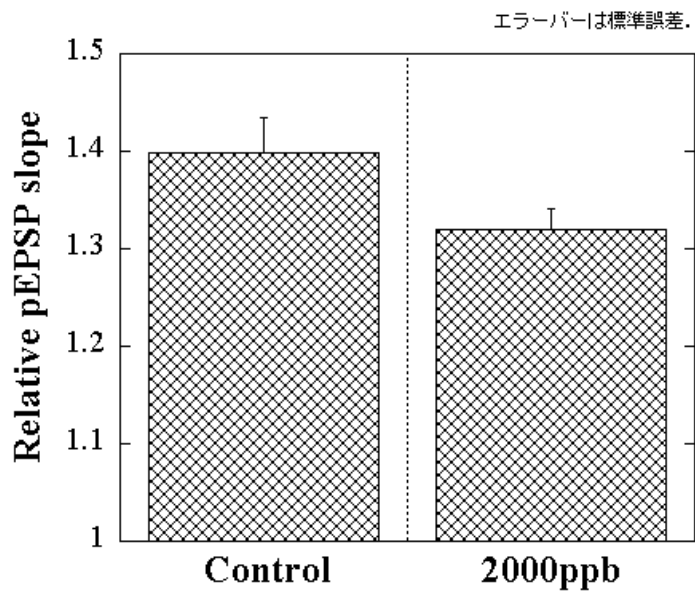


図 11 行動実験で使用したマウス海馬スライスにおける LTP。

3) 細胞内シグナル伝達

CaM キナーゼ II は分子量約 5~6 万の、 α 、 β 、 γ 分子が 10~12 分子会合するオリゴマーとして存在する。海馬、大脳皮質では主に α と β が発現していることから、CaM キナーゼ II の活性型 α と β の量を測定した。2000 ppb 曝露によって海馬の CA1 領域のみにおいて α 型と β 型 CaM キナーゼ II の活性が有意に上昇した (図 12)。同様に、活性型のキナーゼを認識する特異抗体を用いて、PKC と MAP キナーゼ (MAPK) の活性を測定した。いずれの部位においても PKC の活性には変化が見られなかった。一方、MAP キナーゼにおいては 大脳皮質のみで有意な活性の上昇が見られた。

次に、synapsin I とグルタミン酸受容体の GluR1 の定量を行った。海馬 CA1 と DG 領域において synapsin I が有意に上昇した。しかし、大脳皮質では逆に有意に減少した (図 13)。GluR1 はいずれの部位においても変化は見られなかった。

CRH は GABA 神経系に作用して、神経細胞の興奮性を調節している。マウス視床下部室傍核での CRH 陽性ニューロンの増加は海馬、大脳皮質での CRH 量に影響するのか検討した (図 14)。大脳皮質での CRH 量が有意に上昇した。海馬では変化は見られなかった。

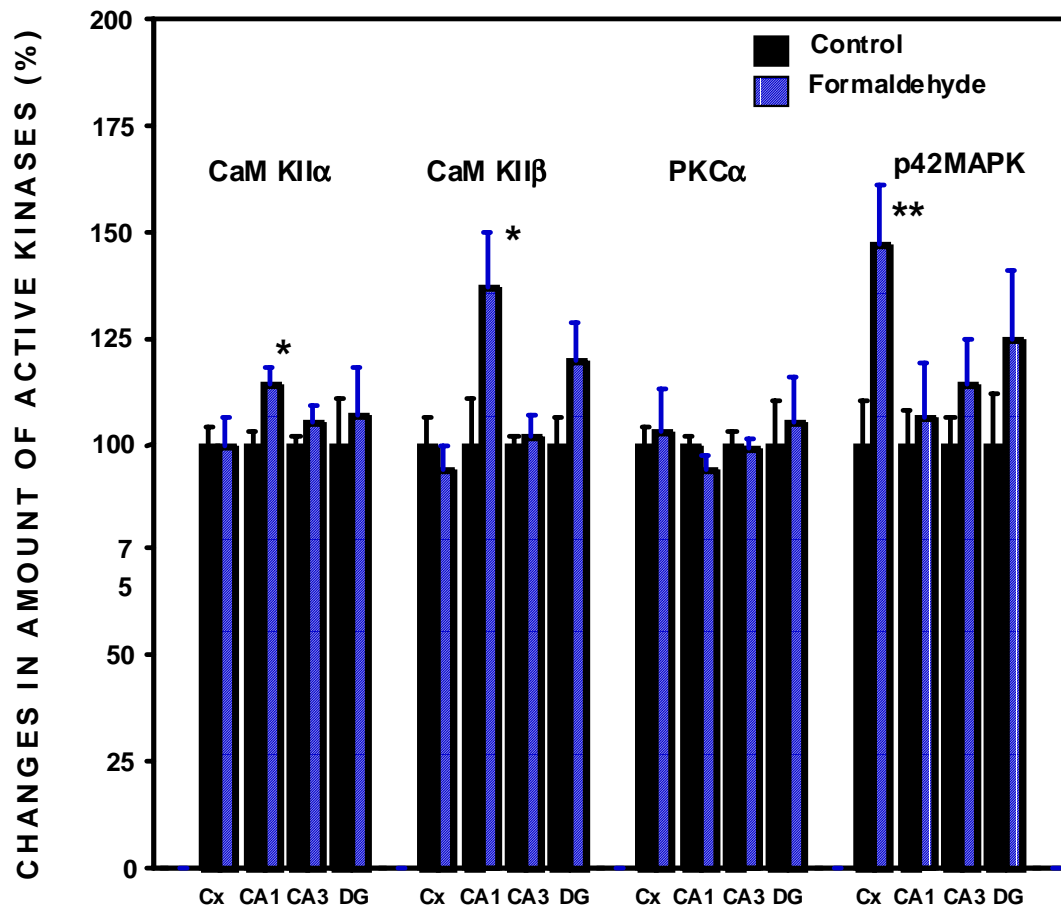


図 12 ホルムアルデヒド暴露に伴う活性型プロテインキナーゼの変化

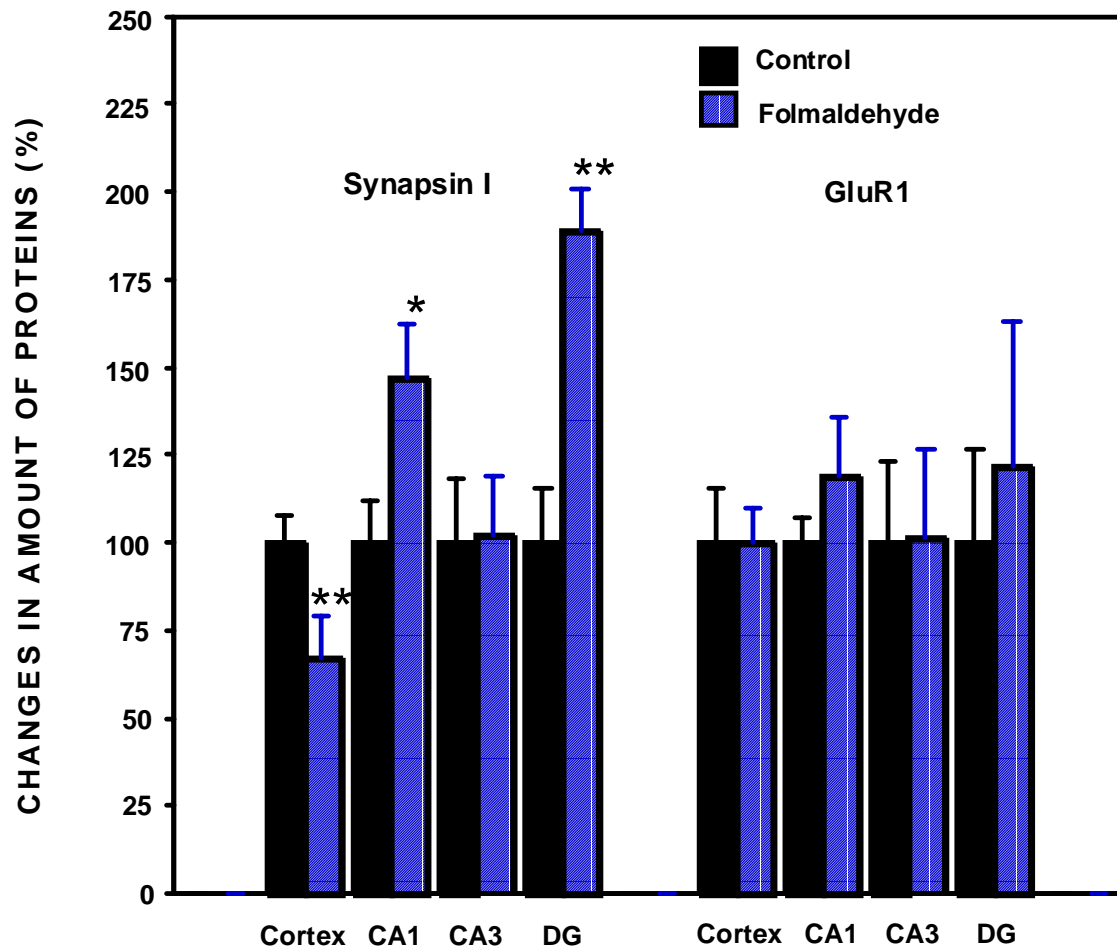


図 13 ホルムアルデヒド暴露に伴う synapsin I と GluR1 の変化

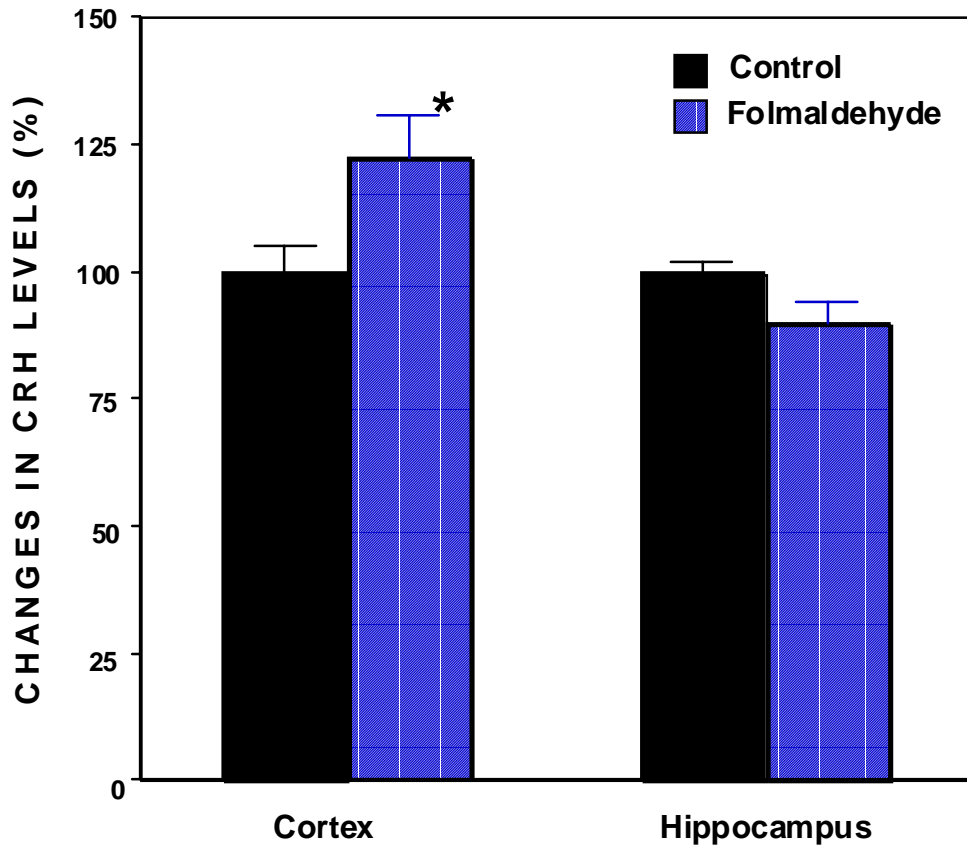


図 14 ホルムアルデヒド暴露による CRH の変化

4) 行動試験

オープンフィールド試験

FA 曝露群は立ち上がり回数が対照群に比べ有意に多かった (図 15)。総移動距離も曝露群の方が高値を示したが、両群に有意の差は認められず、また中央部侵入回数、中央部滞在時間にも同様に有意の差はなかった。

高架プラス迷路試験

高架プラス迷路試験における総移動距離、オープンアーム侵入回数、オープンアーム滞在時間を調べると、どの指標も曝露群と対照群の間に有意な差は認められなかった (図 16)。不安レベルの指標となるオープンアーム滞在時間は見かけ上、対照群の方が長い、これは対照群の 1 匹が対照群の全体の平均値を引き上げるほどの高値を示したためであった。

モーリス水迷路試験

4 日間の訓練中、対照群のゴール到達時間はほとんど変化を示さなかった (図 17)。一方、FA 曝露群は 3 日目までゴール到達時間が短縮する傾向にあり、3 日目における平均ゴール到達時間は対照群に比べ有意に短縮していた。しかし 4 日目にはゴール到達時間の短縮は認められなかった。

訓練終了後の probe test ではゴール到達までの総移動距離、ゴールエリア侵入回数、ゴールエリア滞在時間に両群で有意差は認められなかった (図 18)。

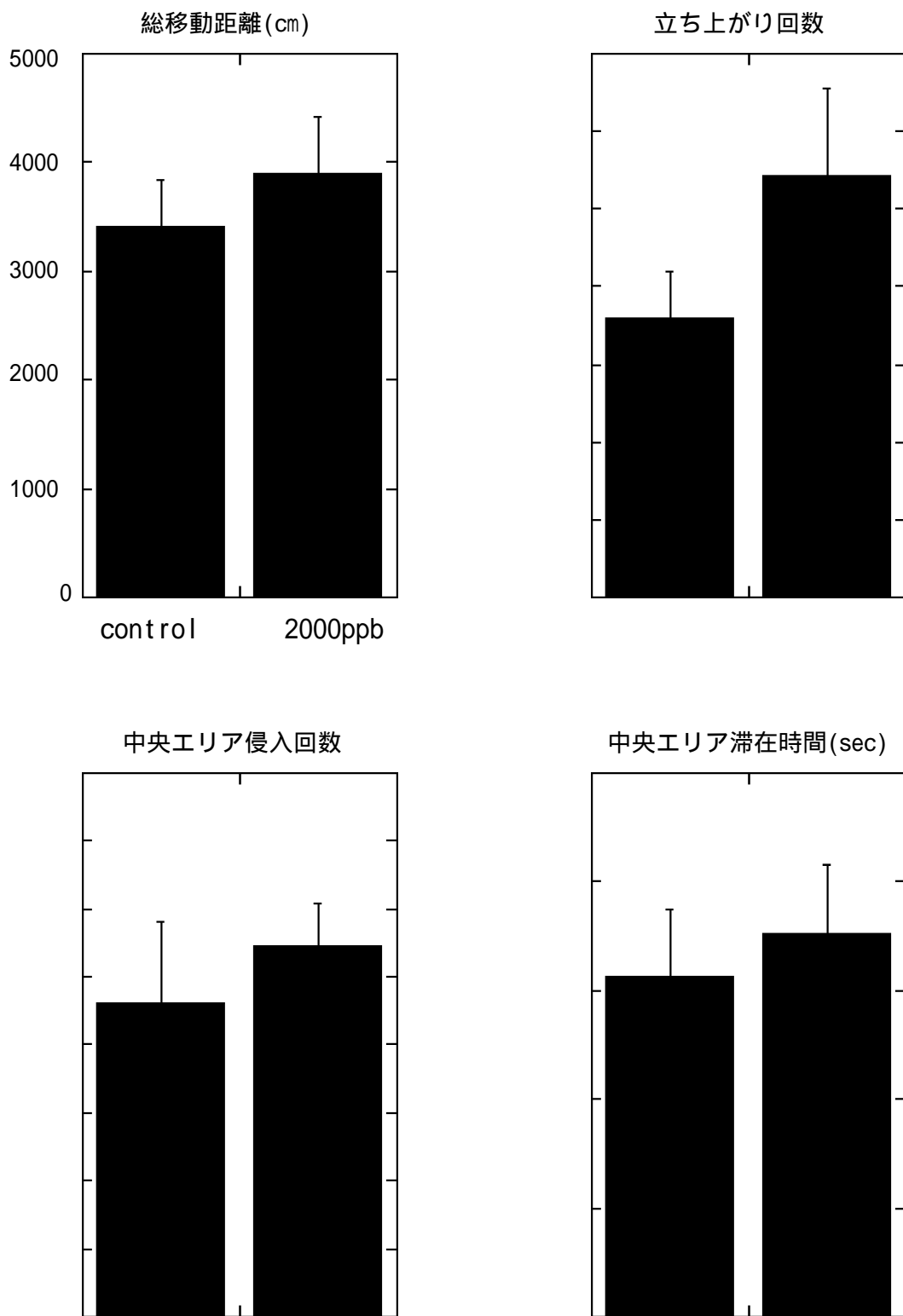


図 15 オープンフィールド試験

control 群(n=9) vs 2000ppb 曝露群(n=10) 平均値 ± SE

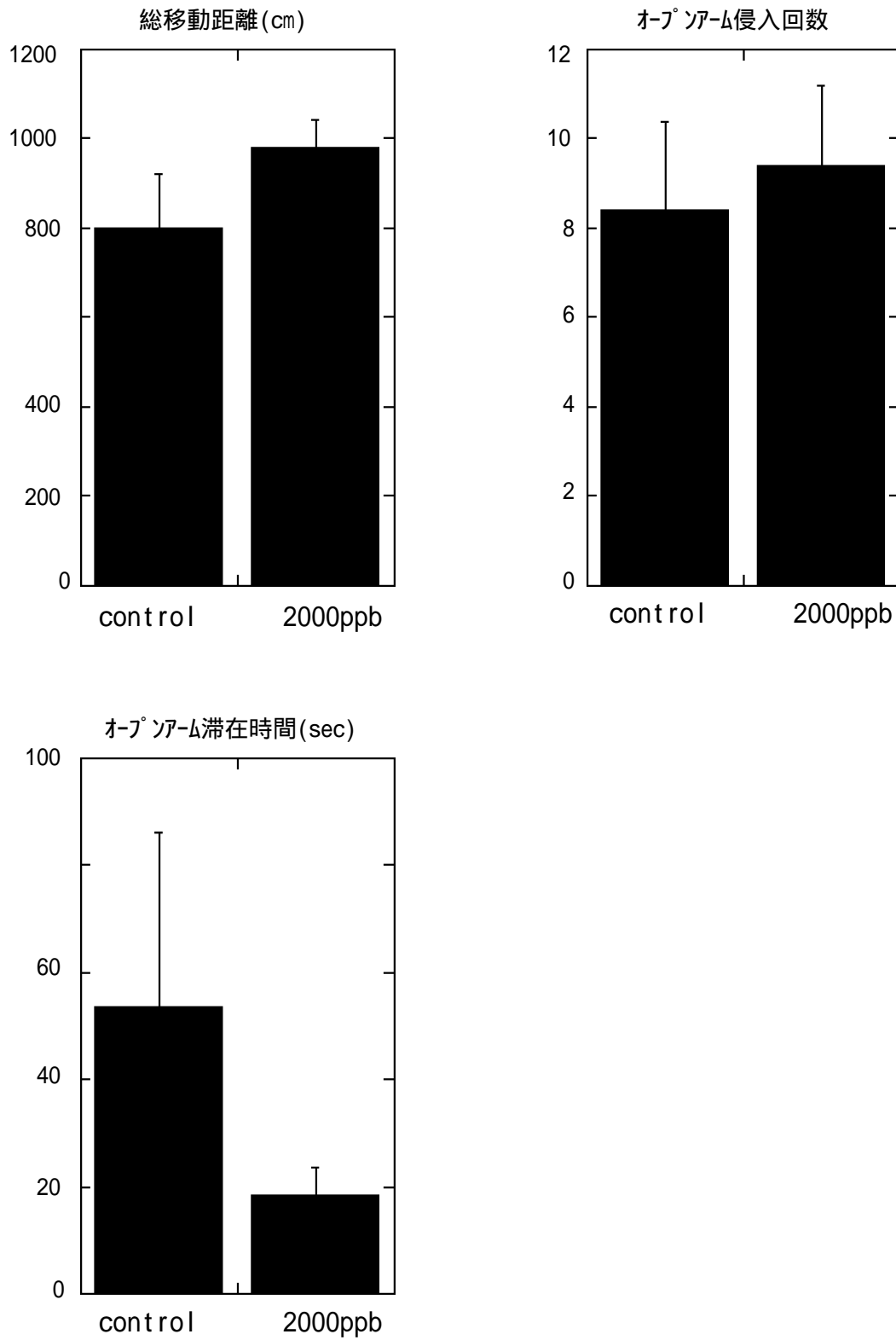


図 16 高架プラス迷路試験

control群(n=7) vs 2000ppb曝露群(n=10) 平均値 ± SE

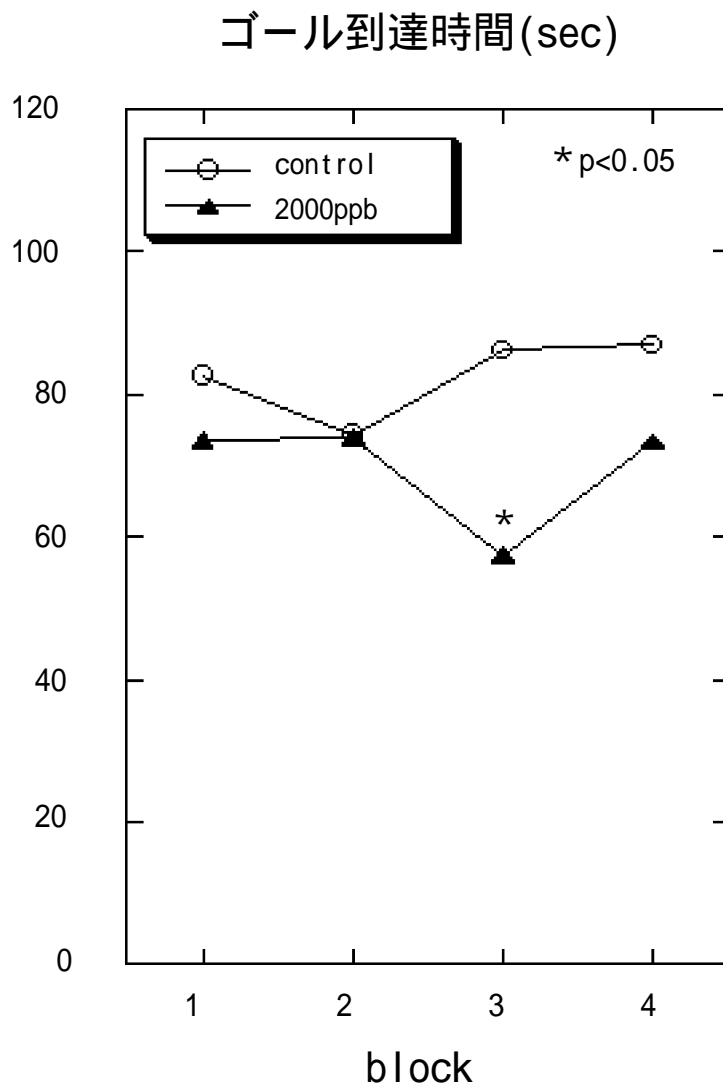


図 17 モーリス水迷路試験-学習曲線

control群(n=9) vs 2000ppb曝露群(n=10)

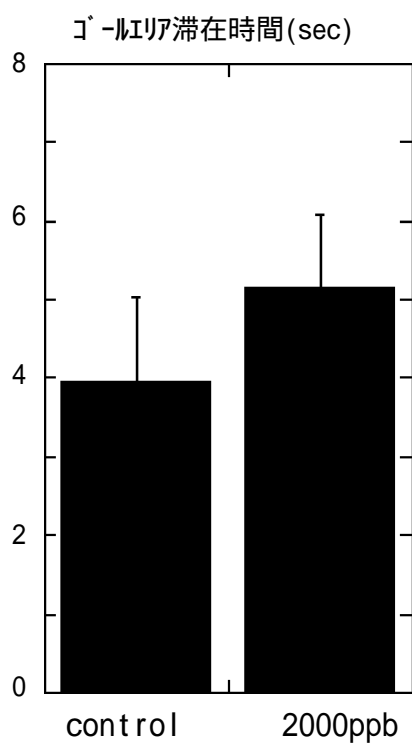
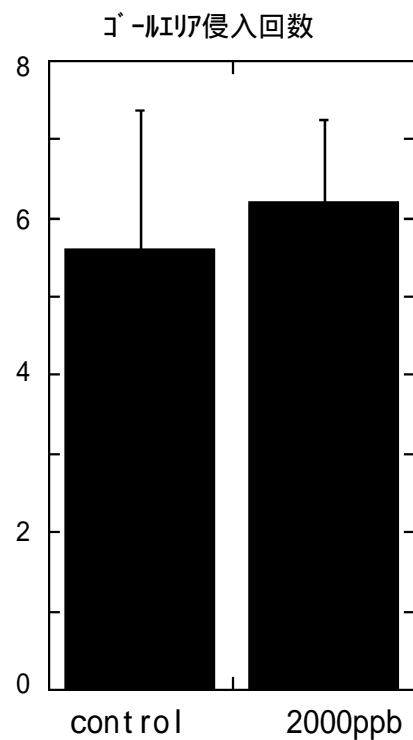
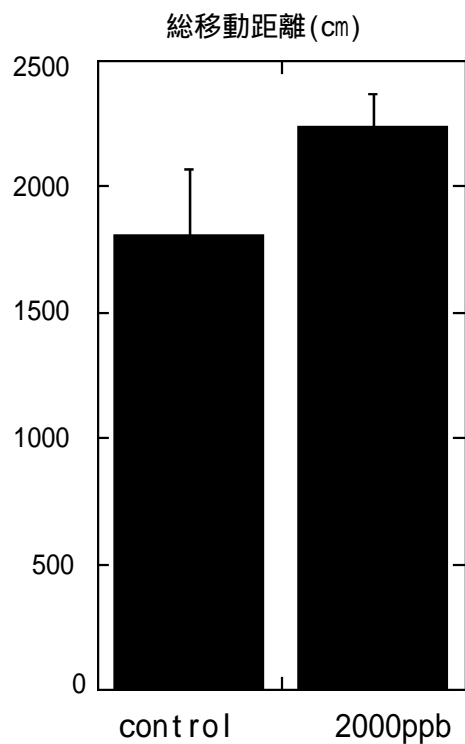


図 18 モーリス水迷路試験-probe test

control群(n=9) vs 2000ppb曝露群(n=10) 平均値 ± SE

(5) 考察

1) CA1 と歯状回のペアパルス比増加について

Subthreshold 値、最大集合スパイク電位の大きさ、最大刺激値などについては、2000ppb と 0ppb 群とで 2 領域ともに差が認められなかった(表 1)。錐体細胞や顆粒細胞の興奮閾値、活動電位の同期性などへの曝露の顕著な影響はないと思われる。海馬 CA1 領域と歯状回における集合スパイク電位と集合シナプス後電位のペアパルス解析を行った。その結果、図 1 に示したように、CA1 領域では集合シナプス後電位について、歯状回では集合スパイク電位について、短い刺激間隔でペアパルス比が増加した。

CA1 における集合シナプス後電位のペアパルス比の増加の解釈については、1) CA3 錐体細胞からの興奮性シナプス終末の伝達物質放出確率の増加と、2) feed-forward 抑制の減弱が考えられる。シナプス終末では、グルタミン酸などの伝達物質は vesicle 単位で Ca^{2+} 依存性にシナプス間隙に放出される。その vesicle が細胞骨格から自由になれるかどうかにかかわる蛋白群が、synapsin family、cAMP 依存性のキナーゼおよび CaMKII キナーゼと考えられている。終末の脱分極によって Ca^{2+} 濃度が上昇すると、CaMKII キナーゼは活性化されて、基質である synapsin I が燐酸化されると考えられる。その結果 vesicle は細胞骨格から free となり、active zone へと移動が可能になり、シナプス間隙へと放出される。福永が報告した synapsin I の蛋白量の増加と CaMKII の増加は、2 回目の電気刺激後このプロセスの効率をあげるのに関わっているのではないかと推測される。fEPSP の slope には差がないという夏目らの結果と、AMPA 型グルタミン酸受容体である GluRI の蛋白量に変化がないという福永らの結果は、この解釈と矛盾しないと考えられる。しかし、synapsinI のノックアウトマウスを用いた実験では、ノックアウトマウスの興奮性シナプス電位のペア比が変化する刺激間隔がもっと大きな区間であるので、我々の結果は、グルタミン酸放出の増加によるものと考えられるよりも、feed-forward 抑制の減弱と考えるべきかも知れない。この確認のためには、集合スパイク電位を誘導しない閾値刺激値でのペアパルスプロファイルを比較する実験が必要であろう。

歯状回では集合シナプス後電位のペアパルス比は変化しない(図 1)。よって、CA1 とは別のメカニズムすなわち、feedback 抑制の減弱が、集合スパイク電位のペアパルス比の増加の原因メカニズムではないかと考えられた。このような例は、てんかんモデルマウスやフロン代替化合物 1-プロモプロパン吸入曝露ラットで報告をしたからである。初年度の研究報告で、九州大学の福田は、抑制性介在神経細胞 (GABA ニューロン) の分布を GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) と GABA 作動性神経細胞のサブグループをマーカー分子 (parvalbumin、calretinin、nitric oxide synthase) に対する抗体を用いてそれぞれ免疫染色を行ったが、曝露による GABA ニューロンへの影響はみとめられなかった。顆粒細胞や介在神経細胞の形態的な変化がほとんどないとすれば、シナプスの伝達効率への影響は、形態変化には至らない機能蛋白分子の機能の変化と考えられる。このように、GABA シナプスの関連機能分子の機能変化と考えて抑制性シナプス電位/電流のキネティクスの変化と考えるならば、GABA 作動性介在神経細胞の終末に存在すると考えられている B 型の GABA autoreceptor の機能亢進が報告されているので、GABA B 受容体の拮抗薬や GABA トランスポート阻害剤への脱抑制の感受性を検討する必要があるだろう。

福永らによれば、歯状回で synapsinI が顕著に増加した。SynapsinI 増加の機構として、興奮性シナプスの発芽によるものか、興奮性シナプス部位の軸策末端におけるグルタミン酸の細胞

骨格アンカーによるものかは現在のところ不明であり、下記の脳内シグナル伝達の変化の考察で述べているような詳細な実験が必要となろう。

2) LTP の抑制効果について

昨年度、2000ppb の FA 曝露における結果同様、今年度も、2000ppb の曝露によって、海馬スライス CA1 領野における LTP が抑制された(図 6)。曝露は、海馬 CA1 領野における pEPSP には影響しなかった(図 3)ので、興奮性の神経伝達には影響が無いと考えられる。一方、LTP は抑制されたので、曝露は、LTP 誘導プロセスに影響があると考えられる。TBS によって、CA1 錐体細胞であるシナプス後細胞が脱分極すると、NMDA レセプター/チャネルが開き、錐体細胞内に Ca²⁺ が流入する。その後、Ca²⁺依存性の細胞内蛋白キナーゼが活性化し、LTP が誘導される。このうちのどこかの機構に曝露が影響すると考えられる。また、この LTP は、抑制性神経、神経成長因子などの影響を受ける。

本報告書にもあるように、産業医科大学笛田らによると、曝露により、海馬スライスにおける抑制性神経の抑制、つまり脱抑制が誘導されている。脱抑制によって、CA1 LTP は増強すると考えられる。しかし、過去3年間に得られたデータによると、曝露によって、LTP はむしろ逆に抑制された。この事は、LTP 抑制の原因には、脱抑制が関与していない事を示唆している。また、国立環境研の藤巻らは、FA 曝露により脳内神経成長因子(NGF)が増加することを明らかにした。最近の知見によれば、NGF の一種である脳由来神経成長因子(BDNF)により、LTP は増強されるが、環境研の藤巻らは、BDNF は、曝露により増加しないことも報告している。従って、観察された LTP 抑制現象には、海馬内における抑制性神経や BDNF、NGF は関与せず、それら以外の因子の影響によるものと推察される。私たちは、本報告書にも記載がある細胞内蛋白キナーゼの関与を考えている。昨年 Bejar らの報告によると、遺伝子工学的に、細胞内の CaMKII 活性を上げた場合、海馬スライス CA1 領域における LTP は抑制された。本報告書の福永らの結果によれば、曝露によって、CaMKII α 、CaMKII β 共に活性型が増加しているため、CaMKII の活性型が増加した結果、LTP が抑制されているのかもしれない。

さらに、LTP に対する FA 濃度を変化依存性を調べた実験結果によると、80ppb 以上の FA 濃度で、LTP の抑制が生じた。さらに、図 5 の結果より、曝露の影響は、TBS 後 30 分以降の LTP のみでなく、TBS 後、すぐに観察できる PTP、STP にも影響しているように見える。LTP、PTP、STP 等には、CA1 錐体細胞上の NMDA レセプターが関与していると考えられているので、曝露の影響は、シナプス後細胞にある NMDA レセプター周辺に影響があるものと思われる。

行動実験に用いたマウスの海馬スライスにおいても、曝露群からのスライスでは、神経伝達には有意差は無かった(図 10)が、LTP が抑制される傾向にあった(図 11)。

以上まとめると、FA 曝露により、海馬 CA1 領域における LTP は、80ppb 以上の濃度で、抑制されることが明らかになった。この作用点の一つは、おそらく、LTP 誘導機構に関与する CA1 錐体細胞膜上にある受容体(NMDA レセプター)等の変化であると考えられる。今後は、LTP 抑制現象の詳細機構を明らかにするために、ホールセル記録実験法によって、曝露群と対照群における受容体やイオンチャネルなどを流れる電流を比べて行きたいと考えている。

3) 脳内シグナル伝達の変化について

2000 ppb の FA 曝露によって、特に、海馬においては CaM キナーゼ II が大脳皮質において

は MAP キナーゼが影響を受けることが明らかとなった。これまでの報告から海馬 CA1 領域ではシナプス伝達長期増強(LTP) の抑制が FA 曝露で起こることが知られている。海馬において CaM キナーゼ II は LTP の発現に必須の役割を果たしているが、恒常的な CaM キナーゼ II の活性化反応は LTP の発現に対して、むしろ抑制的に働くという報告もある。今回の CaM キナーゼ II の CA1 領域での活性上昇に関してはさらに、そのターゲットである GluR1 や synapsin I のリン酸化反応の詳細な解析が必要である。また、CaM キナーゼ II の恒常的活性化反応は GABA 合成酵素 (GAD65)の発現を誘導することによって LTP を障害するという報告もあるので GAD65 の発現についても詳細に検討する。同様に、MAP キナーゼの脳皮質での活性上昇についても、その基質である CREB のリン酸化反応と CREB によって活性化される c-Fos の誘導を調べる必要がある。c-Fos は種々ストレスで誘導される蛋白質であり、FA が脳のどの部位でストレスを与えているかを知ることができる。

さらに、今回最も、顕著な変化が見られた synapsin I は興奮性伝達物質を含む神経終末の数を反映している。歯状回でみられる脱抑制による興奮性増大との関連が示唆される。GAD65 と synapsin I の二重染色によって GABA 神経終末での synapsin I の発現量を解析する。synapsin I は CaM キナーゼ II と MAP キナーゼで異なる部位がリン酸化される。その結果、CaM キナーゼ II は神経伝達の放出機構に、MAP キナーゼは発芽やシナプス形成に関わっている。synapsin I の発現部位とリン酸化部位を同定することによって FA の作用部位を今後、明らかにする。また、CRH に関しては脳皮質全体ではなく視床下部室傍核からの投射部位での詳細な免疫組織学的解析が必要である。

4) 行動試験について

今回の実験で用いた行動試験はすべて海馬機能に少なくとも一部は依存していることが明らかとなっている。しかしながら、行動レベルで海馬機能の障害を明確に示す結果は得られなかった。オープンフィールド試験では、すべての項目で、曝露群が高値を示したが、有意差が認められたのは立ち上がり回数だけであった。FA 曝露で探索行動が促進される可能性が示唆された。この傾向はこれまでの研究でも観察されており、今回の結果もそれを支持するものである。ただし、曝露群 10 匹のうち、2 匹のマウスはオープンフィールド上でほとんど動かず、残りのマウスと異なる行動様式を示した。これらの 2 匹のマウスは調べた 4 項目全てが他のマウスと比べ極端に低値を示した。ヒトにおいても化学感受性に個体差が認められるが、曝露効果の個体差については今後の研究課題である。

オープンフィールド試験で活動抑制を示した 2 匹は高架プラス迷路試験でも総移動距離およびオープンアーム滞在時間ともに低値を示した。曝露群全体の平均総移動距離値は対照群より高値を示したが有意差は無かった。オープンアーム滞在時間、オープンアーム進入回数ともに差がないので、不安情動については FA は影響を及ぼしていないことが示唆された。

モーリス水迷路試験では FA 曝露群の方が 3 日目のゴール到達時間が短縮していたことは、対照群より空間学習がよい可能性を示している。しかし、今回の実験では対照群に十分な学習効果が得られていない。曝露室で飼育し、測定のために行動実験室に輸送したため、移動および行動実験がストレスとして作用している可能性がある。また、曝露群は活動性が高いため、見かけ上訓練時のゴール到達時間が短縮し、ゴールエリア侵入回数や滞在時間が増加する可能性がある。モーリス水迷路試験は空間学習能の評価法としてよく使われるが、その過程には様々な要素が存

在する。FA 曝露が記憶学習能に影響を及ぼしているかどうか判断するのは、対照群で十分学習効果が認められる条件で検討する必要があると思われる。

(6) 結論

低濃度 FA 経気道曝露による海馬情報処理への影響を検討した。平成 13、14 年で、FA 曝露によって、反回抑制の減弱による興奮性の増加、LTP の抑制によるシナプス可塑性の変化を確認した。LTP の抑制は 80ppb から観察された。さらに、LTP が抑制される機構を解明するために、細胞シグナル伝達の変化を検討した。海馬では特に CaMKII 系が変化しており、MAPK 系に変化がなかったことは、活性化される酵素系特異的な反応を示すことが示唆される。LTP が抑制される機構に関しては、LTP に関連すると考えられる因子をひとつずつ検討していく必要があった。今回の成果として、1) AMPA 受容体蛋白量が変化していないこと、2) BDNF などの因子が変化していないこと (国立環境研究所の藤巻ら報告) 3) 抑制系の減弱は通常 LTP を増加するので FA 曝露では脱抑制との関連は低い、そして、4) 曝露群では CaMKII 活性化型増加が背景としてあるので逆に LTP が抑制された可能性がある、等々が明らかになってきた。今後さらに検討をくわえることとして、1) NMDA 受容体を基質とする細胞内酵素系の検討、2) リン酸化部位の詳細な検討、3) GABA 抑制系との関連として、GAD などの共染色を検討するなどがあげられる。行動については、活動性および探索行動が増加したが、不安行動は明らかな影響は受けなかった。FA 曝露の空間学習に及ぼす影響は活動性の変化を排除した評価法を用いて検討する必要がある。

低濃度 (80-2000ppb) の FA 曝露の海馬への影響については、文献で調べる限りでは、今回の研究成果が新知見と考える。3年間の研究成果として、低濃度 FA 長期曝露はマウス海馬の興奮性やシナプス可塑性に影響を与えることがわかったが、LTP の抑制機構解明には、上に述べたようにさらに実験を積み重ねていく必要があると思われた。

(7) Abstract

Electrophysiological, neurochemical and behavioral analysis on disturbance of neuronal information processing in mice chronically exposed to a low concentration of formaldehyde

Yukiko FUETA¹, Kiyohisa NATSUME², Kohji FUKUNAGA³, Shuji AOU²

(The authors were in equal contribution.)

¹Department of Medical Technology I, School of Health Sciences, University of Occupational and Environmental Health

² Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

³Department of Pharmacology, Tohoku University, Graduate School of Pharmacology Sciences

To investigate effects of long-term inhalation (12w) of a low concentration of formaldehyde (FA) on neuronal information processing in the hippocampal formation, we analyzed paired-pulse responses of population spike (PS) and field excitatory postsynaptic potential (fEPSP), and long-term potentiation (LTP) using slices, and then combined the

electrophysiological results with neurochemical study of intracellular signaling. LTP induced by a γ -burst stimulation applied to Schaffer collaterals in the CA1 was significantly suppressed in the mice exposed to 80, 400 and 2000 ppb FA. In mice exposed to 2000ppb FA, granule cell disinhibition in the dentate gyrus and a decrease in paired-pulse inhibition of fEPSPS in the CA1 were confirmed. The electrophysiological results suggest that inhibitory system and memory processing can be impaired in the mice exposed to FA. Since the suppression of LTP induction was observed following exposure to FA, we next investigated amount of the active forms of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) which are involved in the hippocampal LTP induction. We also assessed amount of the synaptic components such as synapsin I and an AMPA type glutamate receptor (GluR1 subunit). The amount of active CaMKII α and CaMKII β significantly increased in the CA1 without changes in the active PKC α . Significant increases in amount of synapsin I in the CA1 region and the DG were also evident in the FA-exposed mice. An open field test disclosed an increase in searching behavior, rearing, while there was no change in the fear behavior of the FA-exposed mice in the elevated maze test. The abnormalities in the expression of the signaling molecules and synaptic components may be associated with the suppression of LTP induction and disturbance of the neural functions by exposure to FA.