

in vitro 脳標本における酸化的エネルギー代謝 および電気活動変化の解析

学位論文内容の要旨

ウシガエルあるいはラット脳より作製した in vitro 脳標本を用いて、酸化的エネルギー代謝の指標の一つとして、ミトコンドリア呼吸酵素（チトクローム）の酸化還元状態変化を非侵襲的に測定した。さらに、標本の電気活動記録を組み合わせることにより、チトクローム酸化還元状態変化と電気活動変化との関係を観察するとともに、標本内の酸化的エネルギー代謝ならびに電気活動変化におけるグリア細胞の寄与を検証した。

(1) ウシガエル脳標本：静止時（実験開始時）における脳血管灌流標本内チトクローム諸酵素（ b , $c + c_1$ および aa_3 ）の酸化還元状態は、灌流中のぶどう糖を 2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）で置換すると、いずれも徐々に酸化側に推移した。また、脳循環代謝改善薬として用いられているイフェンプロジル、あるいは血管作動性ペプチド（vasoactive intestinal peptide, VIP）を含む溶液で灌流することにより、静止時におけるチトクローム諸酵素は著明な酸化を示した。

脊髄後根より求心性に高頻度の電気刺激を加えると、脳血管灌流標本内チトクローム b , $c + c_1$ および aa_3 の還元が観察されると同時に、誘発群放電が記録された。これらの求心性刺激による脳チトクローム還元と誘発群放電は、テトロドトキシン前処置により消失した。求心性刺激による灌流脳チトクローム還元は、2-DG、イフェンプロジル、VIP の投与により消失あるいは減弱したが、誘発群放電はそのパターンが変化したものの、消失することはなかった。チトクローム諸酵素の還元は脳血管灌流標本を灌流停止により無酸素状態においた時、あるいは高カリウム溶液を灌流した時にも観察されたが、標本の電気活動は抑制される傾向を示した。さらに、脳血管灌流標本から作製した脳スライス標本を灌流停止・窒素通気により無酸素状態におくと、脳血管灌流標本と同様にチトクローム諸酵素は還元状態を呈し、標本の自発的電気活動は抑制された。灌流を再開し、酸素を再通気すると、還元型チトクロームは酸化型に転じ、自発的電気活動が回復した。チトクローム諸酵素の還元はまた、スライス標本の嗅神経を高頻度で電気刺激す

ることにより、あるいはスライス標本を高カリウム溶液で灌流することにより観察された。高カリウム溶液灌流による電気活動の抑制は不可逆的であった。

(2) ラット脳嗅皮質スライス標本：静止時(実験開始時)における標本内チトクローム諸酵素、特に aa_3 は、ヨード酢酸 (IAA) を含む 2-DG 置換液を灌流することにより、顕著な酸化を示した。2-DG あるいは IAA 処置では誘発電位の振幅が大きく低下したにもかかわらず、チトクローム酸化還元状態はほとんど変化しなかった。標本の酸素摂取率は 2-DG あるいは IAA 処置により、いずれも有意に減少した。嗅皮質スライス標本をグリア代謝阻害薬であるフルオロ酢酸を含む液で灌流すると、チトクローム aa_3 の著明な酸化が観察された。他のチトクロームの酸化の程度は aa_3 に比べて小さかった。フルオロ酢酸処置による誘発電位の振幅低下はわずかであり、ぶどう糖代謝阻害薬処置時とは対照的であった。しかし、標本の酸素摂取率はフルオロ酢酸処置により有意に低下した。

ラット脳嗅皮質スライス標本に外側嗅素より求心性に高頻度電気刺激を加えると、カエル脳血管灌流標本・カエル脳スライス標本において観察されたと同様に、梨状皮質においてチトクローム諸酵素の還元が観察された。一方、高頻度刺激時に記録された誘発電位は陰性波と振幅の大きい陽性波から構成されていたが、チトクローム諸酵素が還元状態にあるにもかかわらず、消失することはなかった。

ラット脳嗅皮質スライス標本を窒素通気した灌流液で灌流することにより、著明なチトクローム諸酵素の還元が観察された。この時、誘発電位の振幅は大きく低下した。灌流を再開し、酸素を再通気すると、還元型チトクロームは酸化型を示すとともに、誘発電位が回復した。チトクローム諸酵素の還元はまた、嗅皮質スライス標本を高カリウムを含む灌流液で灌流することにより観察された。誘発電位の振幅は高カリウム溶液の灌流により大きく低下した。標準灌流液で再灌流すると、還元型チトクロームは緩やかに酸化型に転じたが、誘発電位は依然として抑制されたままであった。標本の酸素摂取率は高カリウム溶液の灌流により、対照群に比べて有意に上昇した。

上述の実験結果より、以下の結論を導いた。

(1) 本実験で用いた *in vitro* 脳標本を無酸素状態におくと、標本内のチトクローム諸酵素はいずれも還元状態を呈するとともに、標本の電気活動が抑制される。

(2) 代謝基質の供給を低下させる処置による標本内チトクローム諸酵素の酸化は、標本の電気活動の抑制を伴う。

(3) 静止時(実験開始時)における標本内チトクローム諸酵素の軽度の還元状態は、拡散により酸素が供給されていること、静止時においても還元電子が常に呼吸鎖へ流入していることによ

る。還元電子は神経細胞以外の細胞（グリア細胞）の呼吸鎖へも流入していると考えられる。

(4) 刺激により引き起こされる標本内チトクローム還元は、神経ならびにグリア細胞の活動上昇に伴う酸素摂取量の増大、還元電子の呼吸鎖への流入増大および拡散による細胞への酸素供給に起因すると考えられる。標本内のチトクローム酸化還元状態変化が必ずしも電気活動変化と一致しないことは、本実験で用いた *in vitro* 脳標本において、神経細胞に加えて、グリア細胞由来の細胞活動が存在することを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 富 夫
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 前 出 吉 光

申請者は、中枢神経系を構成するニューロンの電氣的活動、グリア細胞の機能、およびそれらを支える代謝エネルギー供給とを解析しようという目的で本研究を行った。

ウシガエルあるいはラット脳より作製した *in vitro* 脳標本を用いて、酸化的エネルギー代謝の指標の一つとして、ミトコンドリア呼吸酵素（チトクローム）の酸化還元状態変化を非侵襲的に測定した。それらの標本の電気活動を同時に記録することにより、チトクローム酸化還元状態変化と電気活動変化との関係を解析し、次のような結果を得た。

(1) ウシガエル脳標本：静止時（実験開始時）における脳血管灌流標本内チトクローム諸酵素（ b 、 $c + c_1$ および aa_3 ）の酸化還元状態は灌流中ぶとう糖を 2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）で置換すると、いずれも徐々に酸化側に推移した。また、脳循環代謝改善薬として用いられているイフェンプロジル、あるいは血管作動性ペプチド（vasoactive intestinal peptide, VIP）を含む溶液で灌流することにより、静止時におけるチトクローム諸酵素は著明な酸化を示した。脳血管灌流標本から作製した脳スライス標本を灌流停止・窒素通気により無酸素状態におくと、脳血管灌流標本と同様にチトクローム諸酵素は還元状態を呈し、標本の自発的電気活動は抑制された。灌流を再開し、酸素を再通気すると、還元型チトクロームは酸化型に転じ、自発的電気活動が回復した。チトクローム諸酵素の還元はまた、スライス標本の嗅神経を高頻度で

電気刺激することにより、あるいはスライス標本を高カリウム溶液で灌流することにより観察された。高カリウム溶液灌流による電気活動の抑制は不可逆的であった。

(2) ラット脳嗅皮質スライス標本：静止時(実験開始時)における標本内チトクローム諸酵素、特に aa_3 は、ヨード酢酸 (IAA) を含む 2-DG 置換液を灌流することにより、酸化方向へ大きく変動した。2-DG あるいは IAA 処置では誘発電位の振幅が大きく低下したにもかかわらず、チトクローム酸化還元状態はほとんど変化しなかった。標本の酸素摂取率は 2-DG あるいは IAA 処置により、いずれも有意に減少した。嗅皮質スライス標本をグリア代謝阻害薬であるフルオロ酢酸を含む液で灌流すると、チトクローム aa_3 の著明な変化が観察された。他のチトクロームの酸化の程度は aa_3 に比べて小さかった。フルオロ酢酸処置による誘発電位の振幅低下はわずかであり、ぶどう糖代謝阻害薬処置時とは対照的であった。しかし、標本の酸素摂取率はフルオロ酢酸により有意に低下した。

ラット脳嗅皮質スライス標本に外側嗅索より求心性に高頻度刺激を加えると、カエル脳血管灌流標本・カエル脳スライス標本において記録されたと同様に、梨状皮質においてチトクローム諸酵素の還元が観察された。一方、高頻度刺激時に記録された誘発電位は陰性波と振幅の大きい陽性波から構成されていたが、チトクローム諸酵素が還元状態にあるにもかかわらず、消失することはなかった。

ラット脳嗅皮質スライス標本を窒素通気した灌流液で灌流することにより、著明なチトクローム諸酵素の還元が観察された。この時誘発電位の振幅は大きく低下した。灌流を再開し、酸素を再通気すると、還元型チトクロームは酸化型を示すとともに、誘発電位が回復した。チトクローム諸酵素の還元はまた、嗅皮質スライス標本を高カリウムを含む灌流液で灌流することにより観察された。誘発電位の振幅は高カリウム溶液の灌流により大きく低下した。標準灌流液で再灌流すると、還元型チトクロームは緩やかに酸化型に転じたが、誘発電位は依然として抑制されたままであった。標本の酸素摂取率は高カリウム溶液の灌流により、対照群に比べて有意に上昇した。

上述の実験結果より、申請者は以下の結論を導いた。

(1) 本実験で用いた *in vitro* 脳標本を無酸素状態におくと、標本内のチトクローム諸酵素はいずれも還元状態を呈するとともに、標本の電気活動が抑制される。

(2) 代謝基質の供給を低下させる処置による標本内のチトクローム諸酵素の酸化は、標本の電気活動の抑制を伴う。

(3) 静止時(実験開始時)における標本内チトクロームの軽度の還元状態は、拡散により酸素が供給されていることと、静止時においても還元電子が常に呼吸鎖へ流入していることによる。

還元電子は神経細胞以外の細胞（グリア細胞）の呼吸鎖へも流入していると考えられる。

(4) 刺激により引き起こされる標本内チトクローム還元は、神経ならびにグリア細胞の活動上昇に伴う酸素摂取量の増大、還元電子の呼吸鎖への流入増大および拡散による細胞への酸素供給に起因すると考えられる。標本内のチトクローム酸化還元状態変化が必ずしも電気活動変化と一致しないことは、本実験で用いた *in vitro* 脳標本において、神経細胞に加えて、グリア細胞由来の細胞活動が存在することを示唆している。

以上のように、申請者は、組織を破壊することなしに細胞内ミトコンドリアのチトクローム酸化還元状態を連続的に記録する方法を用いて、ウシガエルとラットの脳のニューロンとグリア細胞の機能を支えている代謝エネルギー供給系を動的に解析した。この成果は脊椎動物の中樞神経系の機能の研究に貢献するところが大きく、審査員一同は、申請者・齋藤敏之氏が獣医学博士の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。