

学位論文題名

マウス海馬の長期増強による神経活動の空間的变化

ならびにトリクロロエチレンの影響

学位論文内容の要旨

緒言

長期増強(long-term potentiation; LTP)は記憶と学習に関わる現象として近年注目を集めている。光計測は電気生理学的計測の限界を補うものとして開発され、電位に依存して吸光度が変化する色素で試料を染色することで、脳スライスなどにおける電気的活動の時間変化を画像として得ることができる。LTPについても光計測を用いた研究が行われ始めているが、LTP誘導の前後で神経活動を起こす領域が増大するかどうかについて定量的な報告はない。本研究ではLTP前後の神経活動の空間的变化を明らかにするため、128x128ピクセルの空間解像度をもつ光計測法を用いてマウス海馬のLTPを観察し、その特性について検討した。

さらに、LTPによる中枢神経活動の空間的变化におよぼす trichloroethylene(TCE)の影響を検討し、急性暴露によるヒトの記憶障害がLTPの抑制によるものかどうかを明らかにするために、マウスを用いてTCEを投与し、24時間後に海馬を取りだし、in vitro でLTPを誘導し、その抑制の度合いについて検討した。また光計測を用いた実験も行い、LTP誘導後の神経活動の空間的变化におよぼすTCEの影響について検討した。

方法

LTP前後の神経活動の空間的变化については、4~5週令の雄性ddYマウスから海馬スライスを作成し、電位依存性色素で染色した。倒立型顕微鏡のステージ上で、通常の電気生理学的方法によりCA1領域で30秒おきに一回のテスト刺激を行い、それに対する細胞外電位を導出した。刺激電極は2本用い、一方の電極のみから高頻度刺激を加える(LTP経路)ことでその経路のLTPを誘導した。光計測はLTP誘導前およびLTP誘導20分後に行い、テスト刺激に対する神経活動を吸光度変化としておよそ300ms、500枚の画像として記録した。この画像から吸光度変化のピーク値(ピーク吸光度変化)および反応領域をLTP誘導の前後で比較した。

反応領域についてはCA1領域以外の吸光度変化を起こさない領域(バックグラウンド)を選び、そのヒストグラムから半値幅を計算し、CA1領域においてこれを超える吸光度変化を起こしたピクセルをテスト刺激3ms後から33ms後まで積算し反応領域とした。これをLTP誘導の前後で比較した。

TCEのLTPに対する影響については、4~6週令のddYマウスを実験群とコントロール群に分け、実験群はTCEの投与量によって、体重1kgあたり300mg(低濃度群)と1000mg(高濃度群)の2つの投与群に分けた。実験群は屠殺の24時間前にTCEをオリーブ油に溶解して腹腔内注射した。コントロール群はオリーブ油のみを腹腔内注射した。テスト刺激に対する細胞外電位を導出し、その後高頻度刺激を加えてLTPを誘導した。LTP誘導前の電気生理

学的応答を100%としたときのLTP誘導40分後の応答を各群について比較した。

TCE投与後のLTP前後の神経活動の空間的变化についても光計測を行い検討した。4～6週令のddYマウスを実験群とコントロール群に分け、実験群は体重1kgあたり1000mgのTCEを上記方法で投与した。電気生理学的応答、光計測による吸光度変化および反応領域についてLTP誘導の前後で比較した。

結果

LTP前後の神経活動の空間的变化については、海馬CA1領域の高頻度刺激20分後に光計測によって得られた、テスト刺激に対する反応として生じた吸光度変化はLTP誘導前と比べて増強した。高頻度刺激を行ったLTP経路に生じたピーク吸光度変化の平均値はLTP誘導前を100%とすると $131.69 \pm 3.03\%$ (平均 $\pm$ SEM)であり、有意に増加した。一方、高頻度刺激を行わなかった経路(reference経路)では $98.22 \pm 3.68\%$ であった。反応領域はLTP経路では $107.78 \pm 2.10\%$ であり、有意に増加したが、reference経路では $99.41 \pm 2.21\%$ と有意な変化が認められなかった。

TCEのLTPに対する影響については、TCE投与群、コントロール群のいずれも高頻度刺激の40分後にLTPが誘導された。その増強の度合いはLTP誘導前の電気生理学的応答を100%とすると、高濃度群では $116.18 \pm 8.17\%$ (平均 $\pm$ SEM)、低濃度群では $134.22 \pm 6.97\%$ 、コントロール群では $156.82 \pm 6.17\%$ であり、高濃度群とコントロール群および低濃度群とコントロール群のあいだに有意差が認められた(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.002$)。

光計測によって検討したTCEのLTPに対する影響については、高頻度刺激の40分後にTCE投与群、コントロール群のいずれもLTPが誘導され、その増強の度合いはLTP誘導前の吸光度変化を100%としたとき、TCE投与群(1000mg/kg)では $130.74 \pm 4.11\%$ (平均 $\pm$ SE)、コントロール群では $164.27 \pm 9.11\%$ であった。TCE投与群とコントロール群の間に有意差が認められた($p < 0.01$)。一方、神経活動を起こす領域についてはコントロール群で $120.86 \pm 6.38\%$ 、TCE投与群で $128.42 \pm 11.33\%$ と両者のあいだで有意な変化を認められなかった。

考察

LTP前後の神経活動の空間的变化については、LTP誘導後、フィールド電位のみならず光計測によって得られた吸光度変化は増大し、さらに吸光度変化を起こす領域も有意に増加した。これは主に刺激電極より海馬台方向への拡がりが増大したためだと考えられる。すなわち、海馬台に近い神経線維の興奮が高頻度刺激前より増大し、それが統合されて光計測によって観察されるようになったものだと考えられる。このことからマウス海馬CA1錐体細胞のLTP誘導後にはLTP誘導前と比べ大きな興奮が起き、それが嗅内皮質へ伝えられることで記憶と学習に影響を与える可能性が示唆された。

TCEのLTPに対する影響については、TCE投与群でも高頻度刺激後にLTPが誘導されるもののその増強の度合いが低下することから、TCEによる記憶減弱にはLTPの増強の度合いの低下が関与する可能性が示唆された。光計測による検討でも、TCE投与群においてLTP誘導後の吸光度変化が低下することで、電気生理学的計測によって得られた結果が確認された。神経活動を起こす領域は、TCE投与群でもLTP誘導後に増強することから、LTP誘導後に生じる神経活動の空間的な増大へTCEが影響を与えない可能性も考えられるが、これについてはさらなる研究が必要であると考えられた。

結語

1. マウス海馬CA1領域のLTP後に、神経活動を起こす領域は空間的に増大した。
2. マウスに対するトリクロロエチレン腹腔内投与により、海馬CA1領域におけるLTP後の神経活動の増強の度合いは低下するが、神経活動を起こす空間的領域の増大には影響は認められなかった。
3. トリクロロエチレンによって生じる記憶減弱には、トリクロロエチレンによるLTPの増強度合いの低下が関与する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 和 雄

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

マウス海馬の長期増強による神経活動の空間的变化

ならびにトリクロロエチレンの影響

長期増強 (LTP)は記憶と学習に関わる現象として、近年注目を集めている。光計測は脳スライスを電位依存性色素で染色することにより、多点の電位変化を動画として得ることができる方法である。LTPについても光計測を用いた研究が行われ始めているが、LTP誘導後に神経活動を起こす領域が増大するかどうかについて定量的な報告はない。これを明らかにするため、光計測法を用いてマウスの海馬のLTPを観察し、その特性について検討した。さらに、工業的に重要な有機溶剤であるtrichloroethylene(TCE)は、急性暴露により人の即時記憶が低下すると報告されているが、短期記憶を司ると考えられるLTPとの関連については報告がない。これを明らかにするために、TCEのLTP誘導に及ぼす影響を電気生理学的方法ならびに光計測を用いて検討した。

LTP誘導前後の神経活動の空間的变化については、4～5週齢マウス海馬スライスを作成し、電位依存性色素で染色した。顕微鏡のステージ上で、電気生理学的方法によりCA1領域でレスポンスを得、高頻度刺激を加えることでLTPを誘導し、LTP誘導前後に光計測を行い、テスト刺激に対する神経活動を吸光度変化として記録した。この画像からピーク吸光度変化および反応領域をLTP誘導の前後で比較した。

TCEのLTPに対する影響については4～6週齢のマウスを実験群と対象群にわけ、実験群はTCEを体重1kgあたり300mg(低濃度群)と1,000mg(高濃度群)の2つの投与群にわけ、屠殺の24時間前に腹腔内注射した。海馬スライスのLTPは高頻度刺激を加えて誘導し、LTP誘導前後の電気生理学的応答を各群について比較した。また、高濃度群については、別のマウスを用いて光計測も行い検討した。

LTP誘導前後の神経活動の空間的变化についてはCA1領域の高頻度刺激20分後のテスト刺激に対する吸光度変化はLTP誘導前と比べて増強し、ピーク吸光度変化の平均値はLTP誘導前を100%とすると $131.69 \pm 3.03\%$ (平均 $\pm$ SEM)で有意の増加であった。反応

領域はLTP誘導後 $107.78 \pm 2.10\%$ とLTP誘導前と比べ有意に増加し、これは主に刺激電極より海馬台方向への拡がりが増大した結果であり、海馬台に近い神経線維の興奮が高頻度刺激前より増大し、それが統合されて光計測によって観察されたものと考えられた。このことからマウス海馬CA1錐体細胞のLTP誘導後には誘導前と比べ大きな興奮が起こり、それが嗅内皮質へ伝えられることで記憶と学習に影響を与える可能性が示唆された。

TCEのLTPに対する影響では高頻度刺激40分後の電気生理学的な実験における増強の度合いは高頻度刺激前と比較して、高濃度群では $116.18 \pm 8.17\%$ 、低濃度群では $134.22 \pm 6.97\%$ 、対象群では $156.82 \pm 6.17\%$ であり、高濃度群と対象群および低濃度群と対象群の間で有意差が認められた。光計測を用いた検討でも、LTP誘導前を100%としたとき、高濃度群では $130.74 \pm 4.11\%$ 、対照群では $164.27 \pm 9.11\%$ であり、両者の間に有意差が認められた。これらのことから、TCE急性暴露により人で起こる即時記憶の低下にはLTPの増強の度合いの低下が関与する可能性が示唆された。一方、光計測を用いて得られた反応領域については、高濃度群で $128.42 \pm 11.33\%$ 、対象群で $120.86 \pm 6.38\%$ と両者の間で有意な変化は認められなかった。このことから、LTP誘導後に生じる神経活動の空間的な増大へTCEが影響を与えない可能性も考えられた。

審査にあたって、副査の吉岡教授から、腹腔内投与されたTCEの吸収と代謝、半減期、高頻度刺激後に神経活動を起こす部位の拡がりの意味、TCE投与によりLTP誘導後の空間的拡がりの抑制についての解釈、それと記憶力低下との関連について、さらに副査の長嶋教授からLTPの誘導をとらえる光計測の方法と精度、CA1から嗅内皮質までの経路の興奮の光計測の可能性について質問があったが、申請者は何れに対しても研究結果と文献的考察を加えて妥当な回答を行った。

本研究はマウス海馬を用いてこれまで報告のなかったLTPの空間的拡がりを明らかにし、さらにTCEのLTPに及ぼす影響を求め、TCEによる人の即時記憶の低下との関連について検討を行ったものであり、審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などを併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。