

学位論文題名

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

学位論文内容の要旨

脳スライス法はこの数十年間において確立された実験方法であり、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いる。脳を薄切する際に運動ニューロンが著しく大きな損傷を受けることは経験的に知られていたが、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。ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol, PEG) を投与することで、脊髄運動ニューロンの経時的な生存率が増加するという報告がされて以来、多くの研究が行われてきたが、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を定量的に明らかにし、また、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ことを目的とした。このために、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。

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作製した。従来の電気生理学的実験に用いていた脳スライス作製法に従って作製した脳スライスをコントロール群とし、途中で 30% ポリエチレングリコール溶液中に 1 分間浸漬したスライスを PEG+ 群とした。その後、各脳

スライス群を細胞死のマーカー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(厚さ 20 μ m)を作成し、ニューロンを染色するために nissl 染色を行った後、蛍光顕微鏡にて蛍光フィルターの波長 546.1nm を用いて舌下神経核及び孤束核、最後野を観察し、CCD カメラにて撮影した。その後画像解析ソフトを用いて PI 蛍光染色像と nissl 染色像を画像合成し死細胞を同定した。合成画像上で各神経核内において目視下で 2 重染色された細胞を死細胞として計算してそれぞれの単位面積あたりのニューロンの生存率を算出した。

脳スライス中における各部ニューロンの経時的生存率を比較すると、全ての部位でニューロンの生存率が経時的に減少したが、その変化は舌下神経核ニューロンにおいて最も著明で、ついで孤束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。

次に各ニューロンの生存率に対する PEG の効果を以下に示す。舌下神経ニューロンにおける 15 分後の生存率の平均値はコントロール群で $72.5 \pm 13.9\%$, PEG+群で $66.7 \pm 15.6\%$ 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 $55.6 \pm 11.4\%$, PEG+群で $71.5 \pm 11.4\%$ 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 $32.7 \pm 20.0\%$, PEG+群で $32.2 \pm 18.5\%$ であり、有意差を認めなかった ($P > 0.05$)。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 分後までの全てにおいて生存率の有意な増加は認められなかった ($P > 0.05$).

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, 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, 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. ($P < 0.05$)

本研究の結果から 1) 脳幹部ニューロンの脳スライス中での経時的変化として, 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, 最後野の順で低い値を示した. 2) PEG 浸漬により, 脳スライス中での舌下神経核および孤束核ニューロンにおいて経時的生存率が増加した. 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.

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のニューロンは自律系の調節に関与する. 舌下神経核ニューロンは直径が約 30~40 ミクロンと巨大であり, 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 ミクロン程度と小さく, 樹上突起は比較的短く, 分岐も少ないという特徴がある(Funahashi et al., 2006). また, 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ことが報告されている(Davis et al., 2007). 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(Borke et

al.,1982 , Vincent et al.,1999) . そのため, 脳スライスを作成する際に樹状突起が切断される確率は舌下神経核において最も高くなり, 生存率を著しく低下させる原因の一つと推測された. PEG を用いたプロトコールにより, 下肢運動ニューロンにおける細胞内記録の成功率が有意に上昇した事が過去に報告されているが, 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. 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を電気生理学的手法を用いて解析した多くの報告があることを裏付けている.

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ことが示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農夫男

副 査 教 授 船 橋 誠

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

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

審査は、審査担当者全員の出席の下、申請者の研究内容の説明がなされ、関連事項について口頭試問が行われた。

1. 申請者による研究内容について以下の通り説明された。

脳スライスを用いた電気生理学的手法は脳の任意の部位を薄切して人工脳脊髄液中でニューロンを生存させておく方法であり、これまでに幾多の工夫がなされて確立されてきた。申請者がこの手法を用いて実験を行う中で、脳幹スライス中における舌下神経核などの運動系ニューロンは、最後野などの自律系ニューロンと比べて、経時的生存率が低いのではないかと経験的推察に至ったが、これを示すためには科学的根拠が必要であると考えた。また、ポリエチレングリコール (PEG) 投与が脊髄運動ニューロンの生存率を増加させるという報告に着目し (Carp et al, 2008), 脳幹部ニューロンに対する効果を検証したいと考えた。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を定量的に明らかにし、また、各ニューロンに対する PEG の作用について明らかにすることを目的として実験を行った。

SD 系雄性ラット (5~7 週齢) 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 (厚さ 400 μ m) を作製し、ヨウ化プロビジウム (PI) を添加した人工脳脊髄液中にて 15, 60, 240 分間培養し、固定後、nissl 染色を施して組織学的解析および PI 集積細胞の計測を行い、各部ニューロンの生存率を算出した。一部の脳スライスは作成直後に PEG 溶液中に 1 分間浸漬した。

すべての部位においてニューロンの経時的生存率の低下が認められたが、240 分後における生存率 (%) は舌下神経核 32.7 ± 20 , 孤束核 53.2 ± 9.5 , 最後野 79.6 ± 5.2 であり、舌下神経核ニューロンの生存率は他の部位と比較して著しく低い

ことが明らかとなった。PEG 浸漬により、舌下神経核および孤束核において有意な生存率の増加が認められた（60 分後における比較）。PEG 濃度（%）を 20, 30, 40 と変化させた実験から、30%前後が PEG 至適濃度であることが分かった。

本研究により舌下神経核ニューロン活動の細胞内記録が著しく困難であることの一因が定量的に示された。特に舌下神経核ニューロンの樹状突起は長く、分布範囲が著しく広いため、薄切時の損傷が生じやすいことが予測され、生存率を著しく低下させる原因の一つと推測された。また、PEG が著明に舌下神経核ニューロンの経時的生存率を増加させるのは 60 分後までであり、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。以上より、PEG 投与に加えて他の物質も併用して、舌下神経核ニューロンの生存率を増加させる新たな方法を模索することが必要であり、今後の課題となった。

2. 申請者に対する口頭試問の内容

- 1) 自律系ニューロンと運動ニューロンの具体的な区別および定義.
- 2) 95%酸素と 5%二酸化炭素でバブリングした理由とその機序.
- 3) PEG と同様の効果があるとされる高濃度のスクロース等を代わりに用いた場合の知見
- 4) 舌下神経核ニューロンの生存率が著しく低いことの機序
- 5) 本研究におけるアポトーシスとネクローシスの区別
- 6) 樹状突起の損傷のみによる細胞死と軸索切断による細胞死について
- 7) nissl 染色の方法と意義
- 8) PEG の臨床応用について
- 9) 今後の展望について高齢者歯科との関連における考察
- 10) 今後の研究の展望

3. 口頭試問に対する申請者の回答

すべての質問に対して申請者から、文献的考察も含めて適切かつ明快な回答、説明が得られた。また、今後も研究を継続して行い、本研究内容をさらに発展させて、臨床応用も含めた将来展望が示された。

以上より、本研究には結果の新規性が認められると同時に、論文には根拠に基づいた論理の展開がなされており、申請者が学位取得に十分な業績と知識を有していることが確認された。今後の脳機能に関する研究や治療の発展へつながる可能性が高いことも評価され、本研究は歯学領域に寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位にふさわしいものと認められた。