

平成 13 年度日米科学技術協力事業「脳研究」分や共同研究者派遣実施報告書

所属機関・職名・氏名：

群馬大学・医学部・助教授 関野祐子

研究課題：

視床一皮質ネットワーク制御におけるダイナミックシナプス活動の時間空間パターン変動の解析

米国側研究機関・共同研究者：

Department of Pharmacology, Southern Illinois University School of Medicine

(南イリノイ大学 医学部 薬理学教室)

Amy Christine Arai, Ph.D. Assistant Professor

派遣期間：

平成 14 年 2 月 3 日 ～ 平成 14 年 5 月 2 日

研究概要：

non-REM 睡眠開始時に脳波で記録される徐波・紡錘波は、視床-皮質回路の発振（オシレーション）により発生すると考えられている。脳が覚醒から睡眠へ状態を変える時に生ずる意識の低下、すなわち、注意力の喪失、外的情報の処理能力の低下を起こす神経メカニズムとして、視床皮質回路のオシレーションが注目されている。視床皮質回路のオシレーションは、これまで電気生理学的に詳しく研究されてきた。視床網様核から抑制性入力を受けた視床神経細胞が **GABA_B** 受容体による過分極応答からの回復時に再び発火することが、オシレーションの細胞メカニズムであることが明らかになっている。しかし、従来の電気生理学的手法ではネットワークレベルでのオシレーションの解析は困難であり、オシレーションの時間的空間的な広がりに関する解析はなされていなかった。この研究では、新生仔ラット視床スライスに膜電位感受性色素で染色し、低マグネシウム、ピクロトキシン存在下でオシレーションを発生させ、オシレーションを発生する神経群がどのように広がっているか、光学測定法を用いて解析した。

生後 11 日から 14 日令のウイスターラットをハロセン麻酔し断頭後摘出した全脳から、マイクロスライサー（ライカ社）により厚さ **400 μ m** の水平断スライスを作製する。水平断スライスを半切して、皮質・内包・後腹側核・海馬を含むスライスを作製し、内包の線維束が明確に確認できるスライスを実験に用いた。スライスを回復用チェンバーで最低 **1 時間** インキュベーションした後、染色用チェンバー内で膜電位感受性色素（**di-2-ANEPEQ, 50 μ M ; 1 時間**）により染色し、光学測定用カメラ（**MiCAM, BrainVision 社**）を装着した実体顕微鏡（**x 1, ライカ**）下の記録用チェンバー（**interphase 型**）にマウントした。刺激用双極電極（白金イリジウム）を内包に挿入し、網様核と視床への入力線維を電気刺激した（刺激強度: **0.3-0.5 mA, 150 μ s**）。細胞外スパイク記録は、網様核に挿入したガラス微小電極（**2 MNaCl**）により行った。記録用灌流液の組成は、**NaCl 126, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, NaCO 26, CaCl₂ 2, MgSO₄ 0.1 mM, Picrotoxin 50 μ M** であった。膜電位感受性色素の蛍光光量は、膜電位が脱分極すると減少し、過分極すると増加することが知られている。光学測定システム（**MiCAM**）のデーター処理システムにより、刺激していない場合の光量に対して刺激した時の光量変化分を計算し、減少分を黄色から赤、増加分を緑から青の疑似カラーで表示した。

内包刺激により網様核に **100〜300ms** 持続する強い脱分極信号が観察された。脱分極性光学信号が小さくなるとともに視床後外側腹側核（**VPL**）部位に過分極性光学信号が現れ始め、徐々に広がり、後腹側核全域（**VPL, VPM**）に過分極性光学信号が観察された。過分極性光学信号は、**300〜400 ms** 持続した。この過分極性光学信号が小さくなると同時に、再び網様核に脱分極性光学信号が発生するが、電気刺激により最初に誘発される脱分極領域よりも狭かった。反復的に発生した脱分極性光学信号に遅れて、再び視床後外側腹側核で過分極性光学信号が観察される部位は、非常に狭かった。網様核の刺激部位を変えると反復性の過分極性光学信号が消失する場合もあった。

網様核の細胞外スパイク記録により群発発火のオシレーションが記録された部位の光学応答を調べたところ、スパイク発火の繰り返しのタイミングに同期した脱分極性信号が反復して記録できた。また、群発発火のオシレーションが電氣的に記録できなかった部位の光学応答は、電気刺激に誘発される単発の脱分極性光学信号のみであった。逆に、光学応答の脱分極性信号が反復して観察される部位に細胞内記録電極を挿入すると、群発発火のオシレーションが電気

的に記録できた。**GABA_B** 受容体阻害剤であるサクロフェン (**100 μ M**) により、脱分極性光学信号の持続時間は延長し、過分極性光学信号は消失した。それとともに、網様核の反復性脱分極性光学信号及び、視床の反復性過分極性光学信号が消失した。細胞外記録からもサクロフェンにより電氣的なオシレーション発火が消失することを確認した。

本実験で、皮質視床スライスにおける脱分極性光学信号が細胞外スパイク記録と対応していることを示した。また、皮質視床回路のオシレーションの研究において、従来の電気生理学的手法では電気刺激に応ずる神経細胞群の空間的広がり解析することが難しかったが、皮質視床スライスを膜電位感受性色素を用いて染色して光学信号を計測すればネットワークレベルの解析ができることを示した。さらに、光学測定法により神経回路を研究したこれまでの報告では、長い過分極性光学信号の記録は報告されていなかったが、本研究で用いた皮質視床スライスでは、**GABA_B** 受容体由来の **300–400 ms** 持続する過分極性光学信号が記録できることを示した。**GABA_B** 由来の過分極応答が消失すると、網様核の脱分極性光学信号が増強することから、視床からのリバウンドにより網様核の抑制性ニューロンも活動していたことが判明した。

光学測定法により皮質視床スライスでオシレーションを観察する限りにおいて、皮質視床ネットワークによるオシレーションは、発散性に全体的に広がっていくものではなく、ある部位に収束していく性質があると考えられる。この現象は、オシレーションの減衰及び、脳波上の睡眠紡錘波の消失のメカニズムを考える上で興味深い。