

博士学位論文

ラット海馬スライスにおいて見られる、シナプス可塑性の  
リズムバースト位相による変化

西村 基志

九州工業大学大学院 生命体工学研究科 脳情報専攻

神経回路情報処理講座 夏目研究室

指導教員：夏目 季代久教授

2012年12月



## 目次

第1章	序論	1
第1節	緒言	2
第2節	海馬の構造	3
第3節	海馬の役割とその機能	3
第4節	脳内神経振動現象と記憶活動について —機能的リズム—	4
第5節	脳内てんかん発作、記憶活動と抑制 —病的リズム—	4
第6節	シナプスの可塑性	5
第7節	本研究の目的	6
第2章	実験方法	7
第1節	人工脳脊髄液	8
第2節	海馬スライス標本作成法	8
第3節	海馬スライス電場電位測定法	10
第4節	使用薬物	11
第5節	刺激電極と刺激方法、刺激位相	12
第6節	神経組織染色	18
第7節	データ解析	19
第3章	実験結果	20
第1節	Carbachol 誘導 $\beta$ 振動(CIBO)と LTP	21
第1項	Carbachol 誘導 $\beta$ 振動典型例	21
第2項	海馬スライス切断実験	26
第3項	Carbachol 投与前後の pEPSP 変化	28
第4項	CIBO 誘導中での TBS なしの pEPSP の経時変化	29
第5項	CIBO 誘導中におけるバースト位送別 TBS 刺激実験	30
第6項	CIBO 誘導中の LTP に対する mAChR の関与	33
第7項	CIBO 誘導中の LTP に対する NMDA 受容体の関与	35
第8項	CIBO 誘導中での各バースト位相による pEPSP slope 比較	38
第2節	GABAZINE 誘導てんかん様発火(GIED)と LTP	39
第1項	GABAZINE 誘導てんかん様発火典型例	39
第2項	海馬スライス切断実験	41
第3項	GABAZINE 投与前、投与後の pEPSP	44
第4項	GIED 誘導中での TBS なしの pEPSP の経時変化	45
第5項	GIED 誘導中でのバースト位相別 TBS 刺激実験	46
第6項	GIED 誘導中でのシナプス可塑性に対する GIED の関与	50
第7項	GIED 誘導中での NMDAR の関与	52
第8項	GIED 誘導中での各バースト位相による pEPSP slope 比較	54

第3節	CIBO、GIED 誘導中での LTP 実験のまとめ .....	55
第4章	考察 .....	57
第1項	CIBO での LTP について.....	58
第2項	GIED での LTP について.....	58
第3項	神経細胞の興奮性と LTP もしくは LTD 現象 .....	59
謝辞		63
参考文献		64

# 第 1 章 序論

## 第1節 緒言

近年、脳の様々な側面から研究が進み、脳における様々な疾患やシステムが明らかになってきている。その一つとして、脳内では様々な周波数の脳波が引き起こされ、多種多様な状態を反映している。特に海馬、そして海馬における脳波は記憶活動や学習においても注目すべき現象 [1]であるが、未だ明らかになっていないことは多い。

脳内振動現象においては様々な部位で観察され、嗅球での匂い区別のタスク中での *in vivo* において  $\beta$  波 (12 ~ 35 Hz) や  $\gamma$  波 (35Hz ~) が見られたという報告がある [2, 3]。また、ラットの空間学習時に  $\theta$  波が出現する [4, 5]。このように  $\theta$  波、 $\beta$  波、 $\gamma$  波等の機能に関わっている脳波を機能的な脳波と呼ぶ。また海馬では病理的なリズムであるてんかん波も観測される。てんかん発作時においては、異常な脳波であるてんかん波の発生が観察され、てんかん波が観察されると記憶学習が抑制される [6, 7]。だが、 $\theta$  波とてんかん波を初めとして、機能的な脳波と病理的なてんかん波の違いについては未だ明らかになっていない [8]。

これらの  $\beta$  波もしくはてんかん波は *in vitro* においても観察される [9, 10]。海馬スライスにアセチルコリン作動薬である Carbachol を投与すると、 $\beta$  振動が発生し、Free  $Mg^{2+}$  や高濃度  $K^+$ 、抑制性神経阻害薬であるペニシリン、ビキュキュリン、SR-95531(Gabazine) を投与すると、てんかん様発火が発生する。

本実験においては記憶活動という機能に関与している機能的な  $\beta$  波と記憶活動を阻害する病理的なてんかん波を *in vitro* 海馬スライス上に誘導して実験を行った。

海馬内興奮性伝達路に高頻度電気刺激若しくは  $\theta$  波中の錐体細胞の発火を模した  $\theta$  バースト刺激を与えるとシナプス可塑的な変化である長期増強 (LTP) 現象が起こる。また低頻度な電気刺激を与えると長期抑圧 (LTD) 現象が見られる。これらのシナプス可塑的变化は空間記憶等に関わっている。また、先行研究から、カルバコールを投与するとモルモット海馬スライスでは、 $\theta$  様振動がバースト様に起こるが、 $\theta$  振動中と振動外において誘導された LTP では、振動中に誘導された LTP の方が起こりやすい [11]。従ってバースト位相において誘導される LTP 現象に違いがある可能性がある。本研究では薬理的に誘導された海馬スライスにおける  $\beta$  振動の、バースト位相において様々なバースト位相でシナプス可塑的な変化を引き起こす TBS( $\theta$  バースト刺激) を与え機能的な  $\beta$  波とてんかん波で誘導される LTP を比較した。

## 第2節 海馬の構造

海馬は、大脳皮質側頭葉に位置する海馬体の一部であり、錐体細胞 (pyramidal cell) が密集した層と、顆粒細胞の厚い帯状の歯状回 (dentate gyrus; DG) 領域によって特徴付けられている。海馬を長軸方向に直角に切ると、ニューロンの細胞体が大小二つの馬蹄形で噛み合わせた形を取っている。小さい腹側の馬蹄形の細胞集団は顆粒細胞 (granule cell) と名付けられたニューロンで作られており、歯状回を形成している。この歯状回の馬蹄形の口に当たるところから出ている細い帯状の神経細胞層が弧を描いてアンモン角 (Ammon's horn) を作っている。海馬溝は歯状回と海馬傍回の間で海馬裂 (hippocampal fissure) となって歯状回とアンモン角の間を走っている。また、歯状回では表層から、顆粒細胞の樹状突起と入力繊維を含む分子層、顆粒細胞の細胞体を作る顆粒細胞層、錐体形や紡錘型の細胞を含んだ深部の多形細胞層の3層がある。アンモン角は6層に分けられていて、上衣細胞層から順に白板、上昇層、錐体細胞層、放線層、網状層、分子層となっている。

海馬内神経回路ネットワークとしては、歯状回顆粒細胞の軸索は無髄で苔状繊維 (mossy fiber) を作り海馬 CA3,4 の錐体細胞の樹状突起の起始部に通りすがりに次々と大きなシナプスを作っており CA2 との境界まで続く。CA4 と CA3 の錐体細胞から出る主軸索は海馬より出て行くが、途中で反回する側枝を出している。この側枝は有髄繊維で Schaffer collateral といわれ、CA2、CA1、海馬台にシナプスを作っている。これらの神経回路はグルタミン酸を神経伝達物質として用いて伝達を行っている。また、中隔核からアセチルコリン神経や GABA 神経、グルタミン酸作動性神経が投射し複雑な海馬内ネットワークを形作っている [12]。この海馬 CA3 部位は記憶のコード化の役割を [13]、CA1 部位は内嗅皮質からの入力と CA3 からの入力を比較することにより、記憶を照らし合わせる過程への関与が示唆されている [14, 15]。

## 第3節 海馬の役割とその機能

海馬はヒトでの側頭葉内側が破壊された健忘効果等の症例から記憶活動に関わりが深いと言われている。この海馬損傷に由来する健忘症の事例として、H.M. という男性の例が詳しく研究されている。H.M. 氏は重度のてんかん発作に苦しんでおり、緩和の目的で内側側頭葉の切除手術を受け海馬の前部 2/3 を含む部位が切除された。手術により発作は軽減し、知覚、知能、人格にほとんど影響を与えなかったが、これ以後 H.M. 氏は深刻な傾向性健忘症に悩まされた。また、海馬は特に長期記憶と関連が深いと言われている。また、モリス水迷路実験 [16] などにより少なくともラットでは海馬が空間記憶においても重要な役割を担っていることが示されている。

#### 第4節 脳内神経振動現象と記憶活動について —機能的リズム—

ヒトの脳内では、脳波のリズムは劇的に変化している。てんかん発作のような病的な状態以外に、4~12Hzの $\theta$ 波、12~35Hzの $\beta$ 波、35Hz以上の $\gamma$ 波等が観察される、このリズムはヒトの多くの行動と対応しており、この変化は注意や睡眠あるいは覚醒のレベルのような特定の行動の状態などと深く関わっている。特に $\theta$ 波、 $\beta$ 波、 $\gamma$ 波は記憶活動に関わっているとされている [17, 18]。

ラットの海馬内でもこれらのリズムは観察される。ラットが新規の環境に入れられ探索活動を始めた時、初期状態では $\theta$ 波が海馬に引き起こされ、その後 $\beta$ 波が引き起こされた [19]。その他にも、 $\beta$ 波は匂い学習によっても引き起こされ [20]、長距離の同期活動においても重要な役割をしているという結果もある [21]。 $\gamma$ 波は $\theta$ 波と同様に空間学習に関与していると仮定されている [22]。上記のようにこれら $\theta$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 波は記憶活動と関与が深いと考えられ、機能的なリズムであると考えられる。だが、 $\theta$ 波については *in vivo* [23]においても *in vitro* [24]においてもよく研究がされているが、 $\beta$ 波についてはあまり研究されていない。

#### 第5節 脳内てんかん発作、記憶活動と抑制 —病理的リズム—

てんかん発作時には異常な、病理的な脳波であるてんかん波が観察される。てんかんとは、神経細胞の集団が通常に行動しているときには生じないレベルで同期して興奮することにより、痙攣発作が起こるものである。結果として、発作時には非常に振幅の大きい脳波波形が見られる。また、生涯に1回限りのてんかん発作は珍しいものではなく、一般人口の7~10%が、発作を経験する。この発作が慢性的に繰り返し生じる場合、この状態がてんかんと呼ばれている。米国の人口の約1パーセントはてんかんを患っている。また、てんかんは疾患そのものというよりは疾患の症状の1つである。時にはその原因を同定することができるが、多くの症例ではてんかんの原因は不明である。異なるタイプのてんかんは、異なる機序によって生じる。てんかんによっては遺伝的素因が認められているものもあり、いくつかの原因遺伝子が同定されている [25]。てんかんを生じさせる遺伝子変異の1つのグループでは、GABAによるシナプスの抑制が障害されている。

てんかんの研究によると、ある種のてんかん発作は脳内のシナプスにおける興奮と抑制の微妙なバランスの乱れを反映していることが示唆されている。別の発作では過剰に強い、あるいは密度の高い興奮性の神経の相互結合が原因となる。GABA受容体を遮断する薬物は、大変強力な発作誘発物質である。様々な種類の薬物が発作の抑制に効果的であり、これらの抗痙攣薬はさまざまな機序で興奮に拮抗するように働いている。



また、てんかん性の発作は *in vivo* 海馬内でも観察され、ラットにおいて記憶学習の抑制が観察された [26]。また、てんかん発作は短い *interictal spike* と持続する *ictal spike* を持ち [27]、*interictal spike* がラットの記憶や認知の過程を妨害するという報告もある [28]。

## 第6節 シナプスの可塑性

海馬での興奮性の伝導路へ短時間の高頻度電気刺激を与えると、シナプス伝達に長期間の増強 (Long-term potentiation; LTP) が起こる [29]。また、低頻度刺激により長期抑圧 (Long-term depression; LTD) も海馬で起こることが報告されている [30]。今日では LTP のメカニズムについてほとんどの実験は脳薄切標本中のシャーフター側枝が CA1 錐体ニューロンと作るシナプスで行われている。典型的な実験としては、シャーフター側枝のシナプス前の軸索の束に短い電気刺激を与え、それによって起こる CA1 ニューロンの EPSP の大きさを測ることによって観察する。海馬 CA1 ニューロンの長期増強の誘導はシナプス後細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇が LTP の誘導に関係していると考えられている [31]。

海馬での LTP と LTD については Bienenstock, Cooper, Munro (BCM) 仮説 [32] が提案されている。この仮説によると、他からの入力が入力が弱くシナプス後細胞が弱く脱分極している時にだけ、LTP ではなく LTD が誘導される。また、LTP と LTD は細胞外  $Ca^{2+}$  が N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) から流入することにより誘導される [33, 34]。通常、NMDAR は  $Mg^{2+}$  ブロックにより  $Ca^{2+}$  流入は阻害されているが、近隣の AMPAR が活性化されることによる脱分極により  $Mg^{2+}$  ブロックが外れて  $Ca^{2+}$  が流入する。LTP が起きるか、LTD が起きるかは、主にこの NMDAR の活性化レベルの違いにより起こり、NMDAR の活性化が少なく、 $Ca^{2+}$  が少なめに細胞内に流入すると LTD が起こり、一方 NMDAR の活性化が大きいと  $Ca^{2+}$  が多めに細胞内に流入すると LTP が起こるという報告がある。これは BCM 仮説にも一致する。この脳内可塑性と記憶活動を結びつけるために NMDAR のアンタゴニストを水迷路実験でラットの海馬に注入すると、水迷路学習のルールや隠されたプラットフォームの場所学習ができなかった結果から NMDAR の記憶に果たす役割が重要であると考えられている [35]。また、最終的にシナプス増強を引き起こす分子メカニズムとしては AMPAR 受容体をリン酸化することによりシナプスの伝達効率を増大させること、もしくは AMPA 受容体がシナプス後膜へ挿入されることも考えられている。

*in vitro* においては、アセチルコリン受容体のアゴニストである Carbachol によって誘導された  $\theta$  振動のバースト内でより LTP が促進されたという実験結果もある [6]。また、てんかん様発火が電気刺激もしくは薬理的に引き起こされたスライスでは TBS により LTP が起こらなくなる報告もある [36]。

## 第7節 本研究の目的

海馬では上記のように様々な周波数の脳波や、病理的な現象であるてんかん波が観察される。*in vitro*においても Carbachol によって機能的な  $\theta$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  波の振動現象が引き起こされ [37, 38, 39]、GABAZINE により病理的なてんかん様発火も見られる [40, 41]。

上記の通り、シナプス可塑性は記憶の過程において重要な現象であり、振動現象との関与が深い。生体で観察される振動現象は海馬スライスでも観測でき、先行研究からバースト位相で LTP の大きさが異なっているという結果もある。また、てんかん様発火での記憶学習の抑制にはシナプス可塑性の変化が関与しているといわれている。だが、機能的な脳波と病理的なてんかん波の違いについては未だ明らかになっていない。よって、この研究では、機能的なリズムである  $\beta$  振動と病理的なリズムであるてんかん様発火を *in vitro* において誘導し、異なるバースト位相によって誘導されるシナプス可塑性の違いから2つのリズムについて比較し、機能的な脳波と病理的なてんかん波の違いについて明らかにすることを目的とした。

## 第 2 章 実験方法

## 第1節 人工脳脊髄液

海馬スライス標本の保存液として、また灌流液として人工脳脊髄液 (Artificial Cerebrospinal Fluid; ACSF) を用いた。この ACSF の組成は 123mM NaCl, 5mM KCl, 1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Glucose, 26mM NaHCO<sub>3</sub> であり、当溶液は実験当日に各溶液の高濃度ストック溶液から作成した。また、調整された ACSF は 95%の O<sub>2</sub> と 5%の CO<sub>2</sub> の混合ガスを常に通し実験に用いた。

## 第2節 海馬スライス標本作成法

本研究は、九州工業大学動物実験委員会の承認を得て行われた(承認番号は 8-19 である)。実験には、244 匹の雄の Wistar ラット、3~5 週齢を使用、545 枚の海馬スライスを用いた。まず、ジエチルエーテルで麻酔をかけ、心臓打撲法により心停止させた。その後素早く開頭し脳を摘出、氷冷した ACSF に浸し、メスを用いて左右両半球に切り分けた脳半球をマイクロサイザー (堂坂イーエム社製、D.S.K. Microslicer Zero 1) を用いて sagittal section 方向に厚さ 450 $\mu$ m でスライスした。これをさらにメスを用い不要な部分をトリミングし、実験チャンバー (温度を 33.4 $^{\circ}$ に維持し、流速 1.5 ml/min の ACSF を流した上で 95%の O<sub>2</sub> と 5%の CO<sub>2</sub> の混合ガスで通気を行った) 上に移した。一部の実験では上記のホールスライス (図 2-1A) をさらに CA3 部位と CA1 部位を切り分けたスライスである CA3 ミニスライス (図 2-1B)、CA1/DG ミニスライス (図 2-1C) 、そのスライスを CA1 部位と DG 部位に切り分けたスライスである CA1 ミニスライス (図 2-1D)、DG ミニスライス (図 2-1E) を作成した(図 2-2)。これらの海馬スライスはスライス作成時のダメージから回復させるために少なくとも 1 時間は実験チャンバー上で保持した後実験を行った。また、一部のミニスライスの作成では薬品の投与後実験用チャンバーの上でマイクロナイフを用いて作成した。

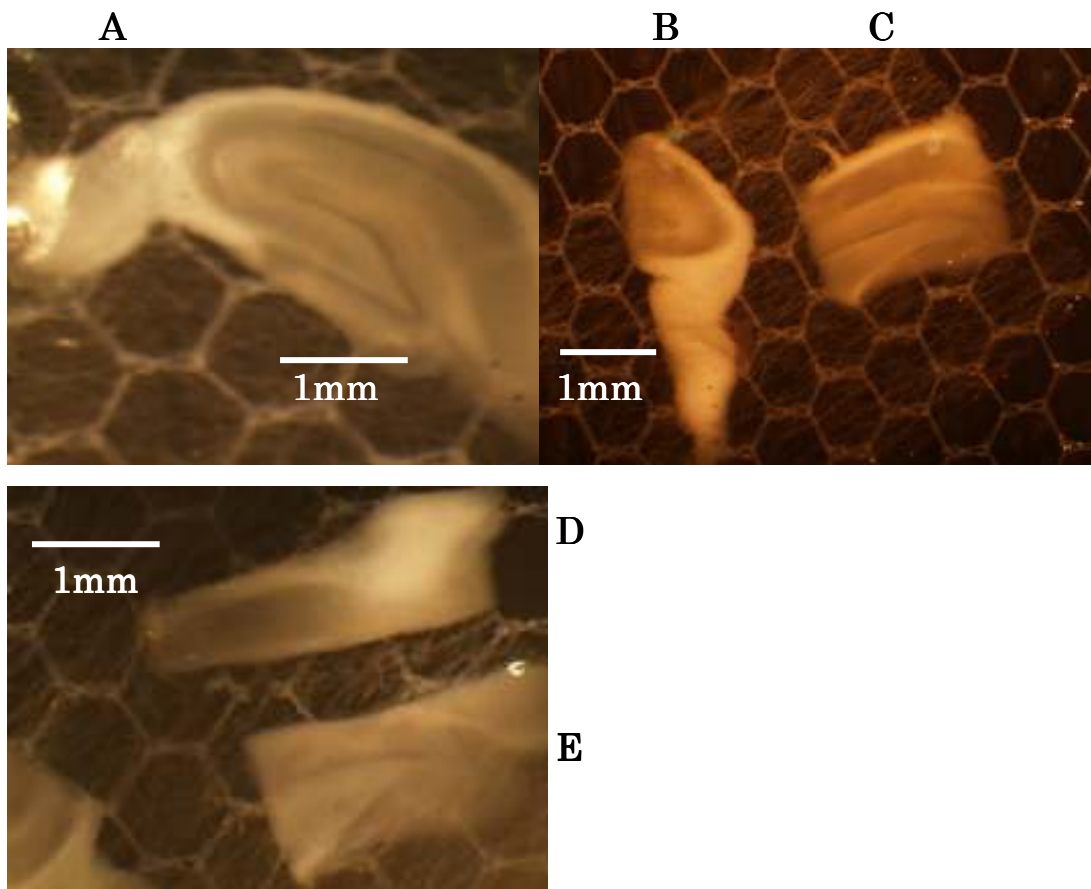


図2-1. 海馬スライス標本 A. ホールスライス B. CA3 ミニスライス  
C. CA1/DG ミニスライス D. CA1 ミニスライス E. DG ミニスライス

### 第3節 海馬スライス電場電位測定法

実験は上記の実験チャンバー上 (図 2-2) で行った。記録電極は 2M NaCl を満たした 1-2 M $\Omega$  のガラス微小電極 (HIRSCHMANN LABORGERATE 社製、内径  $0.85 \pm 0.03$  mm、外径  $1.65 \pm 0.03$  mm、電極抵抗 1-2M $\Omega$ 、図 2-2) を用い、細胞外記録法により行った。記録は CA3 錐体細胞層 (図 2-3A)、CA1 錐体細胞層 (図 2-3B)、DG 顆粒細胞層 (図 2-3C) で行った。測定された電位は高感度生体電位増幅器 (CYGNUS Technology 社製、ER-1 Extracellular Amplifier) を用いて 1000 倍に増幅し、バーストの測定には 0.3kHz のローパスフィルター、1Hz のハイパスフィルター、シナプス可塑性の実験における pEPSP の測定では 3KHz のローパスフィルター、1Hz のハイパスフィルターを通した後、DIGIDATA 1322A (AXON Instruments) を介しコンピューターに取り込んだ。コンピューター上でデータ測定には pClamp10.2 もしくは 9.2 を用い、サンプリング周波数 10kHz で測定しデータを連続記録した。

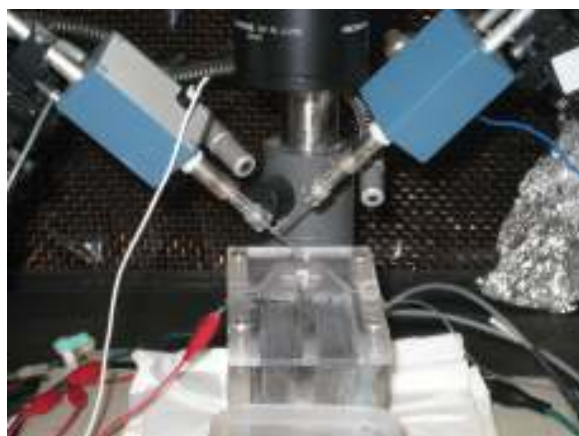


図 2-2. 実験用チャンバー

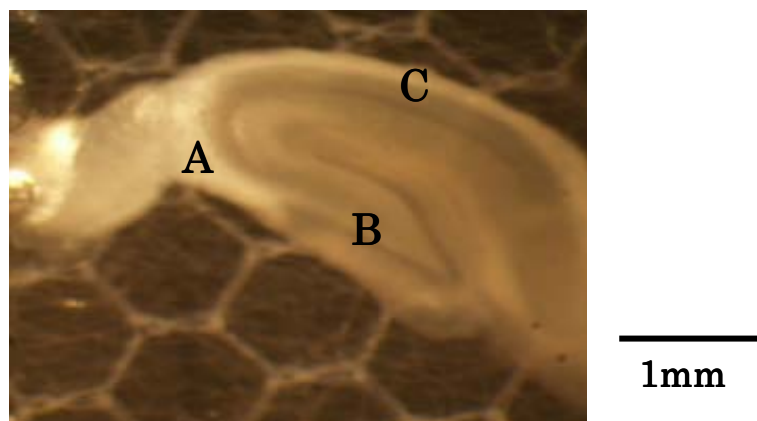


図 2-2. 海馬スライス測定位置。 A,B,C はそれぞれ、CA3,DG,CA1 である。

#### 第 4 節 使用薬物

使用薬物は以下の通りである。

薬品名	作用	使用濃度
Carbachol	AChR(acetylcholine receptor) agonist	30 $\mu$ M
SR95531(Gabazine)	GABA <sub>A</sub> R antagonist	10 $\mu$ M
CNQX (6-cyano-2,3-dihydroxy-7- nitro-quinoxaline )	AMPA antagonist	10 $\mu$ M
AP5(2-amino-5-phosphonovaleric acid)	NMDAR antagonist	100 $\mu$ M
Atropine	m(muscarinic)AChR antagonist	10 $\mu$ M
Muscimol	GABA <sub>A</sub> receptor agonist	30 $\mu$ M

使用薬物は全てシグマから購入した。使用薬品は、CNQX、Nifedipine は DMSO に、AP5 は 100mM Tris buffer で溶解し、他は水に溶かして高濃度ストック溶液を作り、使用時に ACSF 溶液に加えることで使用した。

また、Carbachol-induced  $\beta$  oscillation(CIBO)の誘導には Carbachol を投与、GABAZINE-induced epileptic discharge(GIED)の誘導には、GABAZINE を投与した。

## 第5節 刺激電極と刺激方法、刺激位相

刺激には外径 300 $\mu$ m の同心円双極性刺激電極 (FHC 社製、CBDPF75) を用いた。測定位置は CA3 放線層 (図 2-4C) もしくは CA1 放線層 (図 2-4A) で行い、電極の刺激には電気刺激装置 (日本光電 SEN-7203) とアイソレータ (日本光電 SS-202J) を用いて、最大 pEPSP の傾きの 2/3 になるように刺激強度を調節し pEPSP の測定をした。また、LTP を引き起こすための TBS (Theta-burst stimulation, 100Hz、5 発の刺激を 200 ミリ秒おきに 5 回、図 2-5) にシャーフアー側枝 (図 2-4B) に行うことで LTP を引き起こし [42]、Carbachol、GABAZINE 投与時の pEPSP の変化の経時変化を観察した。

また、両バースト共に全体を 360° と置き、それらのバースト中 (0°)、バースト直後 (てんかん様発火: 15° or  $\beta$  振動: 60°)、バーストとバーストの間 (180°)、バーストの直前 (330°) に行った (図 2-6)。テスト刺激による pEPSP の測定時間は、 $\beta$  振動、てんかん様発火共にバースト直後で行った。

全体的なプロトコルとしては、Carbachol によって誘導される  $\beta$  振動、GABAZINE によって誘導されるてんかん様発火が安定した、薬物投与 20 分後に最初のテスト刺激を行い、その後、30 秒おきに 2 回、合計 3 回 pEPSP を測定した。その 1 分後に、 $\theta$  バースト刺激 (TBS) を各バースト位相で行い、その後 10 分ごとに、同じく 3 回のテスト刺激を行った。CNQX や Atropine 等の薬物を加えた際には、 $\beta$  振動やてんかん様発火が安定したカルバコール、GABAZINE 投与 20 分後にこれら薬物を投与、その 30 分後に 3 回のテスト刺激、その 1 分後に TBS を行い、その後同じく 10 分ごとに 3 回ずつのテスト刺激を行った (図 2-7)。また、記録を行ったシナプスはシャーフアー側枝から、CA3 放線層で逆行的に、CA1 放線層で順行的に刺激を受けており、この部位で集合興奮性シナプス後電位を測定している (図 2-8)。

また、コントロール実験として  $\beta$  振動、もしくはてんかん様発火のリズムを発生させた後 AMPAR のアンタゴニストである CNQX を 30 分投与すると、どちらのリズムにおいても pEPSP 成分の著しい減少が見られた。本実験においては、この pEPSP の減少部位である刺激後 3 ~ 10 ms における電場電位変動を用い、pEPSP の傾きを評価した (図 2-8)。

また LTP 実験の結果においては、各スライスの差を無くす為に Relative pEPSP slope を経時変化として用いた。この Relative pEPSP slope では、全てのスライスにおいて TBS 刺激を行う前のテスト刺激で記録した pEPSP の値を 1 と設定し、その変化の比率によって考察を行った。



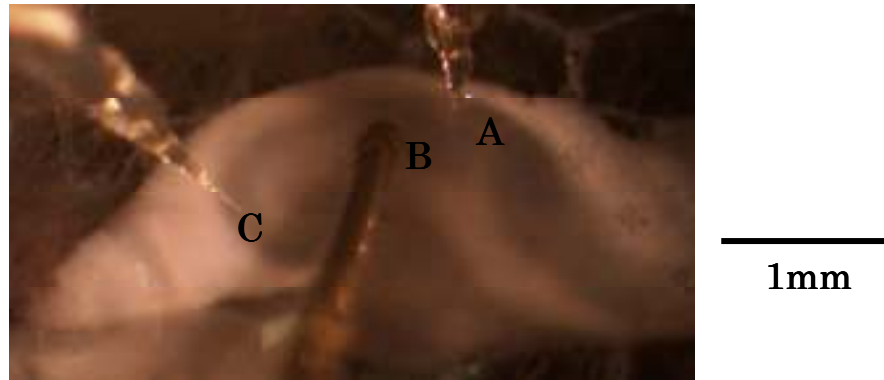


図 2-4. 刺激位置と記録部位  
 A→CA3 放線層、B→シャーパー側枝、C→CA1 放線層

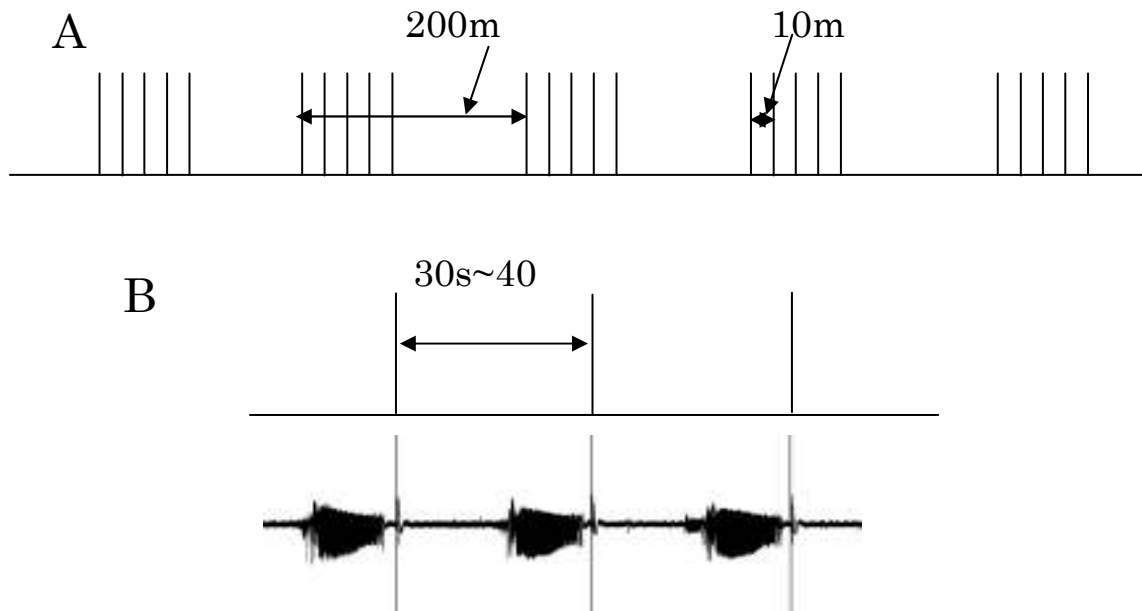


図 2-5. TBS とテスト刺激の刺激方法  
 A:TBS 刺激、B:テスト

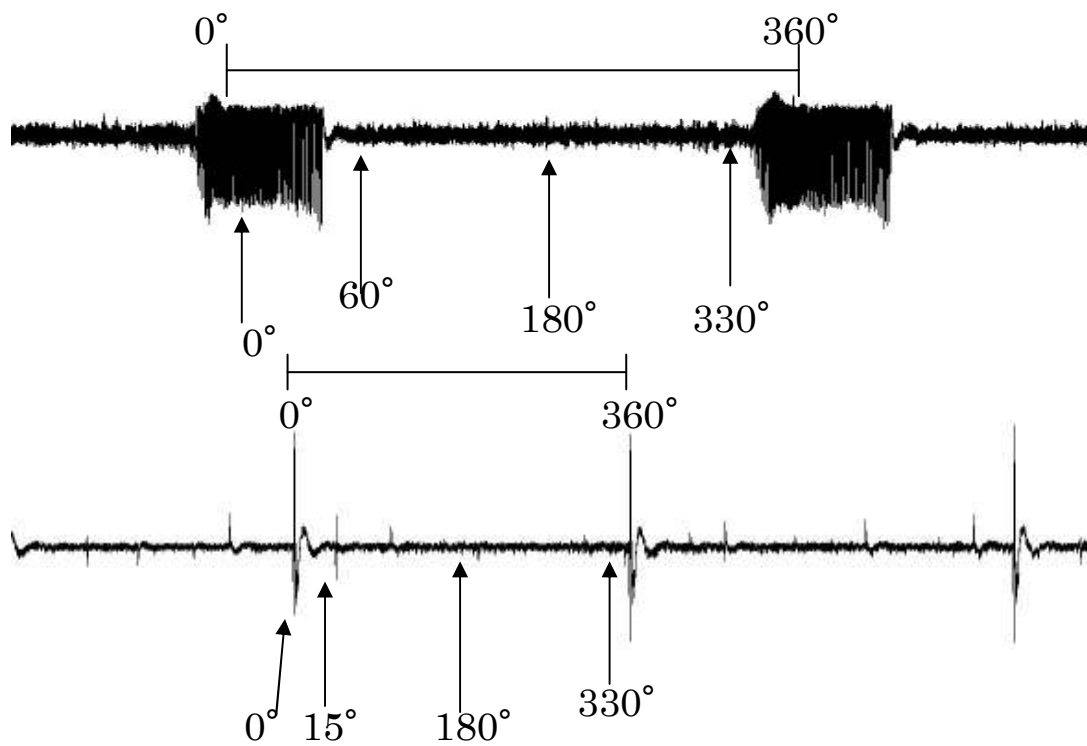


図 2-6. バースト位相

$\beta$  振動上の開始 2s、てんかん様発火の振動上を  $0^\circ$  と置き 4つの位相に分けて実験を行った。

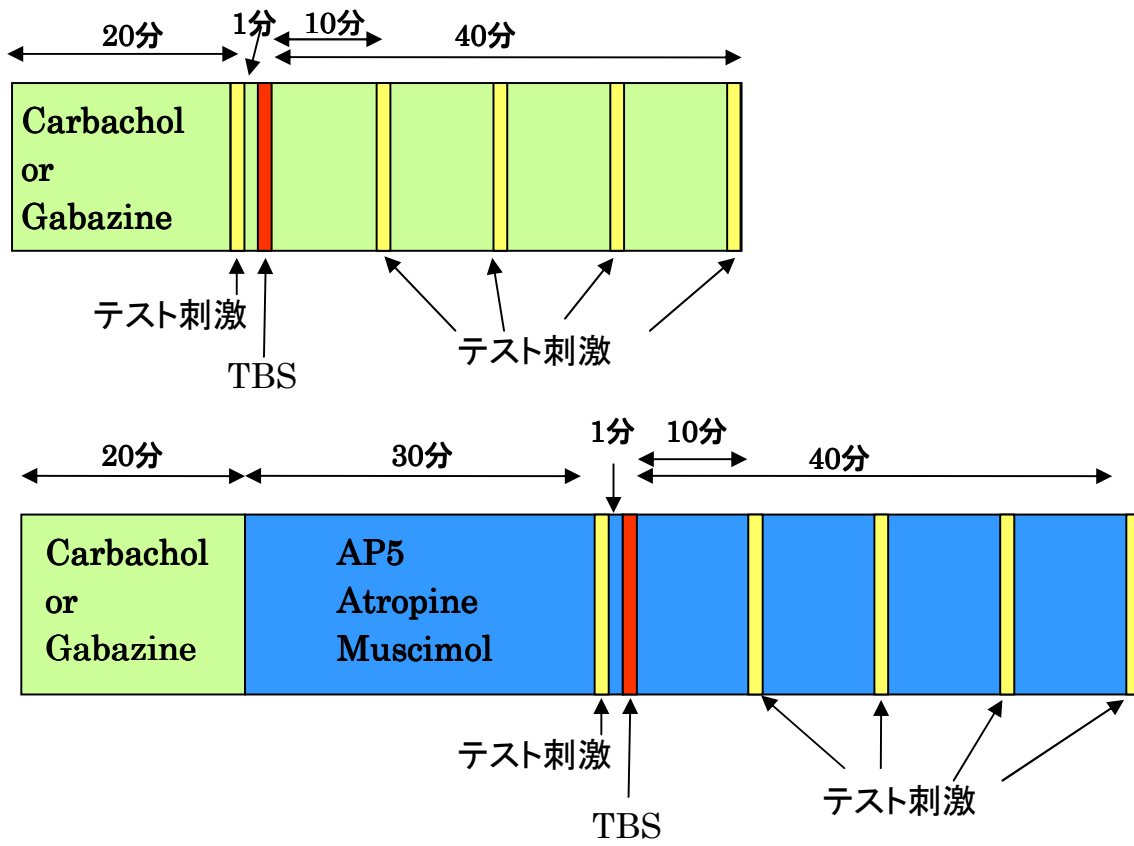


図 2-7. 実験の時間的プロトコル

黄緑色→Carbachol または GABAZINE の投与、黄色→テスト刺激、赤色→TBS 刺激、青色→CNQX、AP5、Atropine、Muscimol の投与。

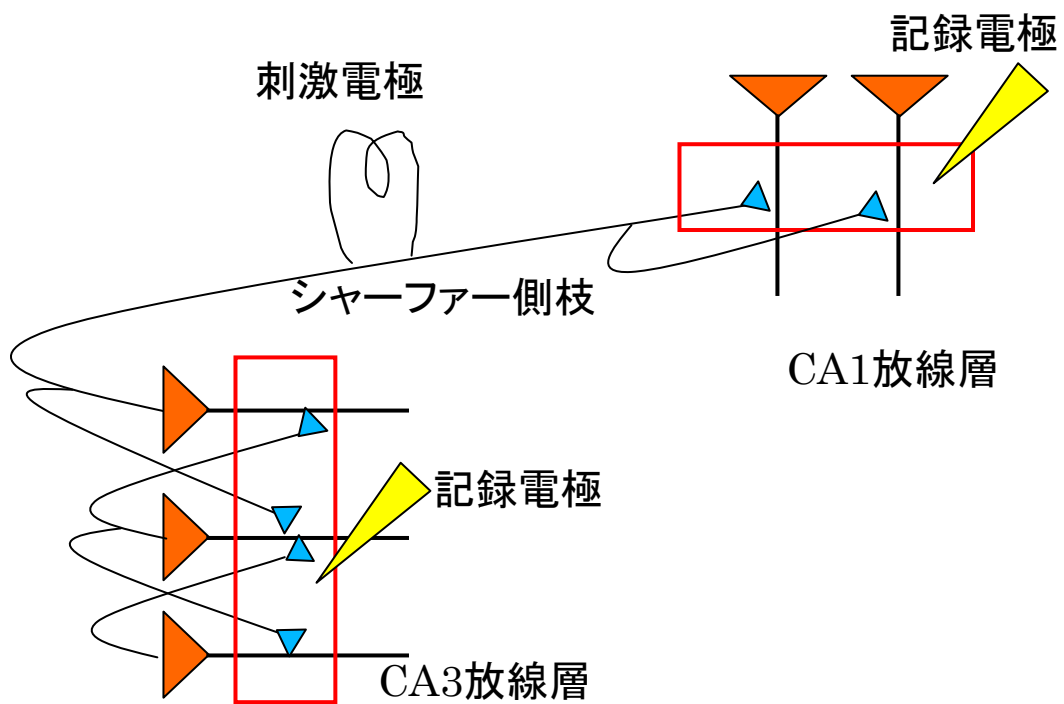


図 2-8. pEPSP 測定シナプス部位

赤四角で測定シナプス部位を示した。CA1 では順向性にシャープファー側枝からの刺激を、CA3 では逆行性にシャープファー側枝からの刺激を受け取っている。

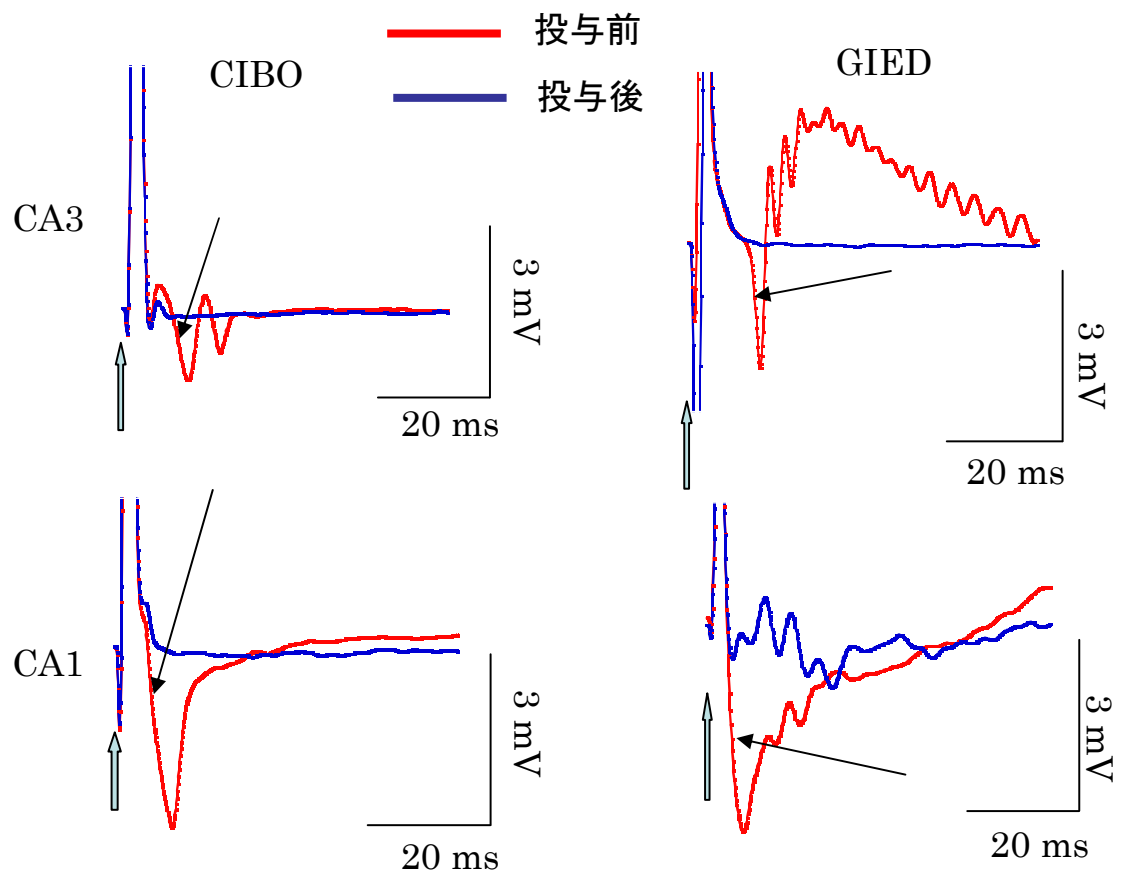


図 2-8. 10 $\mu$ M CNQX 投与実験

赤線は薬品投与前、青線は投与後、水色の矢印は刺激部位、黒の矢印は記録部位(pEPSPの傾き)を示す。

## 第6節 神経組織染色

方法は、神経回路標識法プロトコル集 [43]を参考にした。

まず、海馬スライスを、固定液（8% paraformaldehyde in DW 1.25ml, 25% glutaraldehyde 0.5ml, DW 3.25ml, 0.2M phosphate buffer 5ml）に浸し、固定を行った。固定液におよそ1日浸した後、0.1M リン酸緩衝液で軽く洗浄し、0.1M リン酸緩衝液にシヨ糖を加えた溶液を固定液と入れ替えた。

数日後、温度を-23℃に維持したクライオスタット（CM1510-cryostat LEICA）に海馬スライスを入れ、固定台に厚さ 5mm 程度に切った寒天を乗せ、その上にスライスをマウントした。マウントしたスライスに対してリン酸緩衝液にシヨ糖を加えたものをかぶせ、その後クライオスタットの中で 20 分維持し凍結させた後厚さ 50µm で薄切した。薄切したスライスは APS コート付きスライドガラスにゼラチンエタノールを用いて貼り付けた。1 時間ほど乾燥させた後、クレシルバイオレットもしくはニュートラルレッド染色液に 5 分漬け染色した。それから脱水、透徹（70%アルコール(1min)→80%アルコール(1min)→95%アルコール(1min×2)→100%アルコール(5min×3)→キシレン(5min×3)）の工程を行い、その後乾燥させたものを標本用封入剤（MGK-S 松浪硝子工業株式会社）を用いて封入した。

## 第7節 データ解析

データ解析は、Clampfit 10.2 (Molecular Devices Corporation) を用いて行った。Carbachol 誘導  $\beta$  振動の周波数解析は Clampfit10.2 の高速フーリエ変換解析または連続 wavelet 解析を用いて、 $\beta$  振動内の周波数の経時変化 (図 2-9) から見て振動の周波数が安定している 1500msec 後の 1000ms 間を周波数解析した。また、wavelet 解析は、当研究室の鈴木亮が作成した連続 wavelet 解析ソフトウェアを用い [44]、振動の 1500-2500msec 後の 1000msec 間を周波数解析した。また、GABAZINE 誘導てんかん様発火に対しては 5 分間の発火数から周波数を計算した。

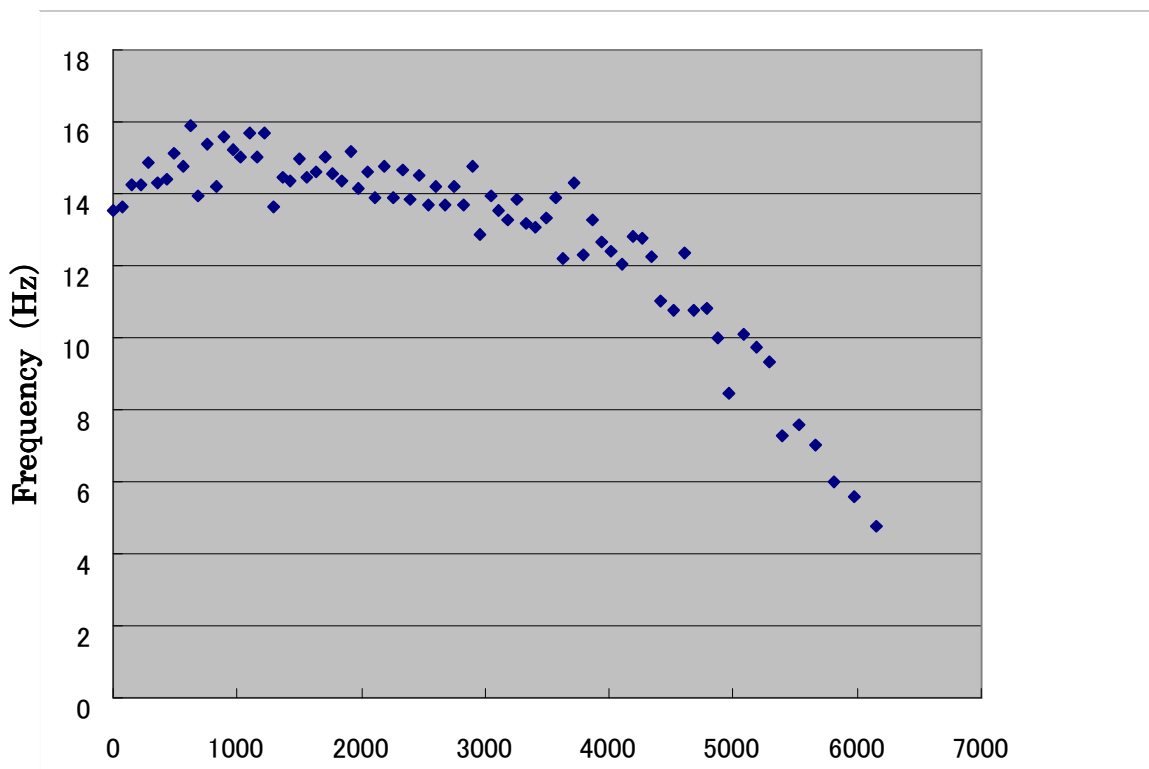


図 2-9.  $\beta$  振動内周波数の経時変化。バースト開始からバースト終了までを示す。横軸は  $\beta$  振動開始からの時間を示す。

## 第 3 章 実験結果



## 第 1 節 Carbachol 誘導 $\beta$ 振動(CIBO)と LTP

### 第 1 項 Carbachol 誘導 $\beta$ 振動典型例

海馬スライスに、アセチルコリン受容体のアゴニストである Carbachol ( $30\mu\text{M}$ ) を加えると、投与後 7~8 分後から、CA3(図 3-1)、CA1(図 3-2)部位で共に間欠的なバースト発火が見られた(Carbachol を加えることで 60% のホールスライス上で観察された)。Carbachol を投与 30 分後のバースト内周波数は CA3 で  $15.1 \pm 0.7\text{Hz}$  で、CA1 で  $14.6 \pm 0.7\text{Hz}$  振幅は CA3 で  $4.5 \pm 0.6\text{mV}$ 、CA1 で  $2.0 \pm 0.5\text{mV}$ 、持続時間は、 $6.8 \pm 0.2$  秒、IBI(Inter burst interval)は  $24.9 \pm 2.7$  秒であった(平均値  $\pm$  標準平均誤差、 $n=6$ )。このバースト内周波数は  $\beta$  周波数帯域であったので、以後、Carbachol 誘導  $\beta$  振動を CIBO と呼ぶ。

control

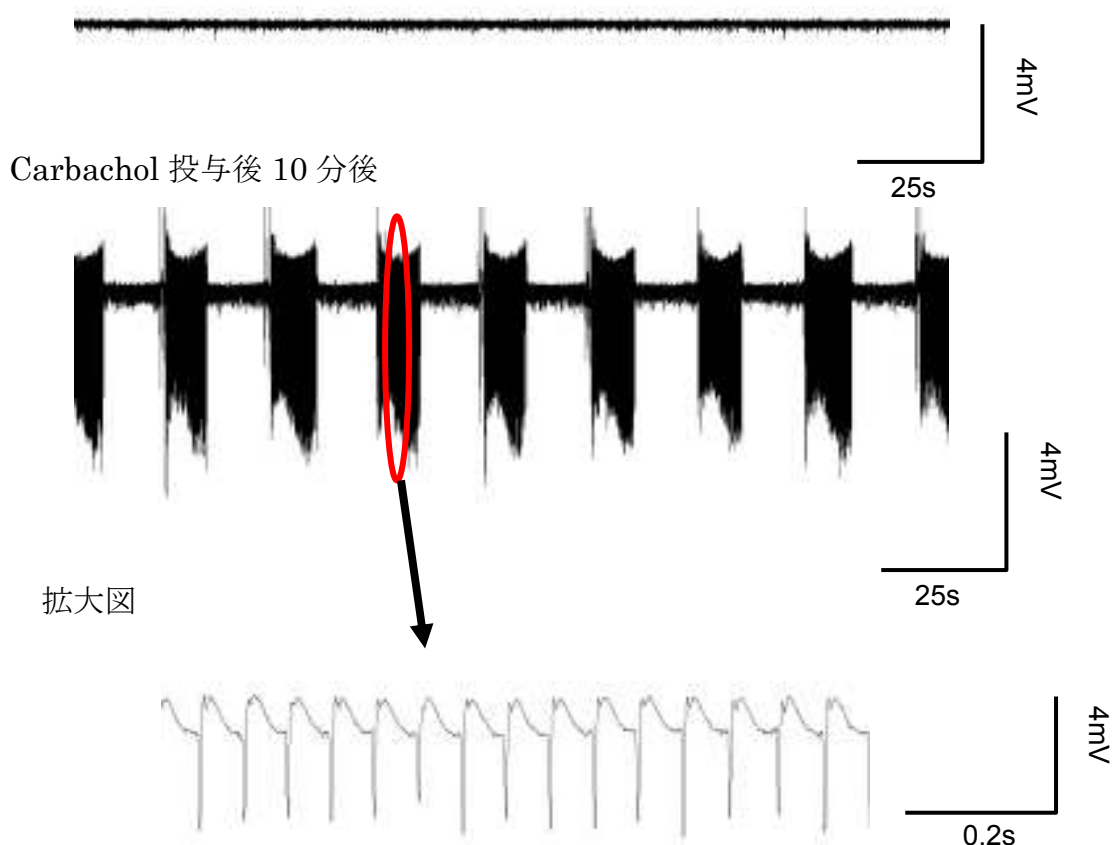
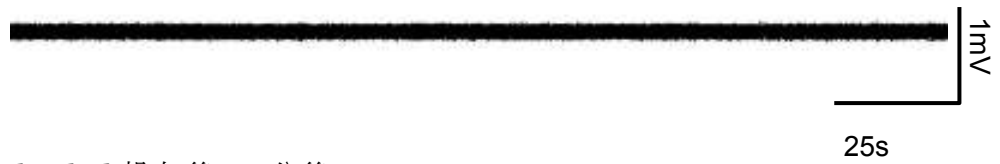


図 3-1. Carbachol 誘導  $\beta$  振動 ホールスライス CA3 部位での測定。  
矢印先の図は、その拡大図

control



Carbachol 投与後 10 分後



拡大図

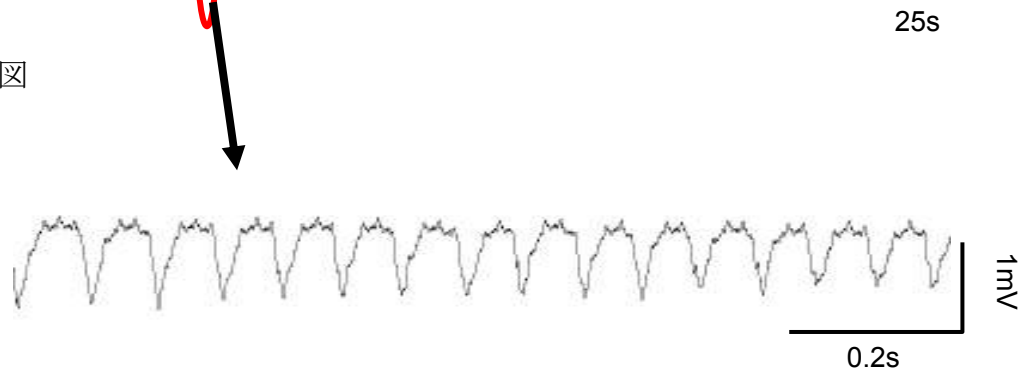


図 3-2. Carbachol 誘導  $\beta$  振動 ホールスライス CA1 部位での測定。  
矢印先の図は、その拡大図

また、 $\beta$  振動が誘導された海馬ホールスライスにおいて 2 本のガラス微小電極を用いて 2 点同時記録を試みたところ、CA3、DG 細胞体層間、CA3、DG 細胞体層間で同期が見られ、海馬スライス内、CA1,CA3,DG 間で同期していることが分かった (図 3-3)。

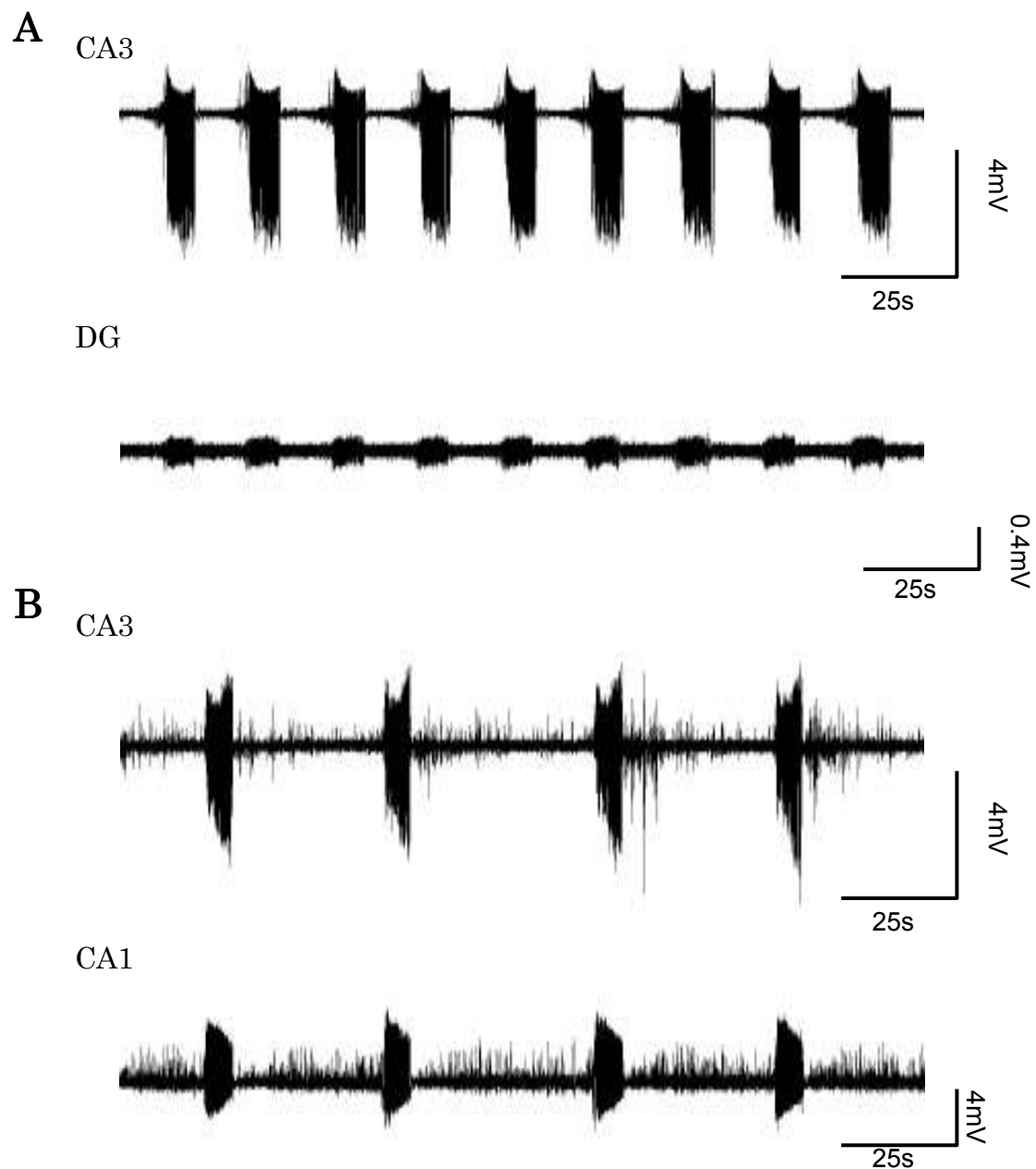
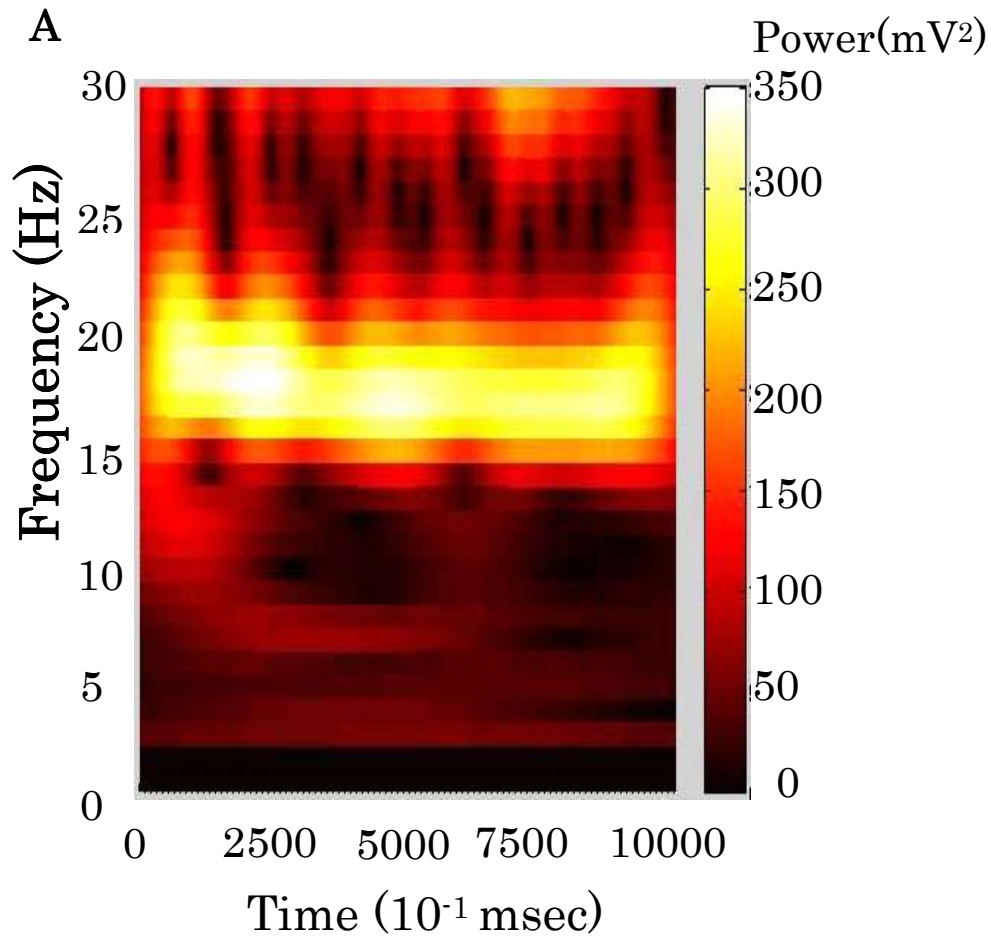


図 3-1.  $\beta$  振動のホールスライス内同期

A. CA3,CA1 での測定。 B. CA3,DG での測定。

B では IBI が伸びていて、またノイズ多いが同期はしている。

連続ウェーブレット変換 (Continuous Wavelet Transform) 解析を用いて周波数解析をしたところ、周波数ピークは 15~20Hz であった (図 3-4A)。その周波数は、少なくとも 1 時間は安定に持続した (図 3-4B)。



B

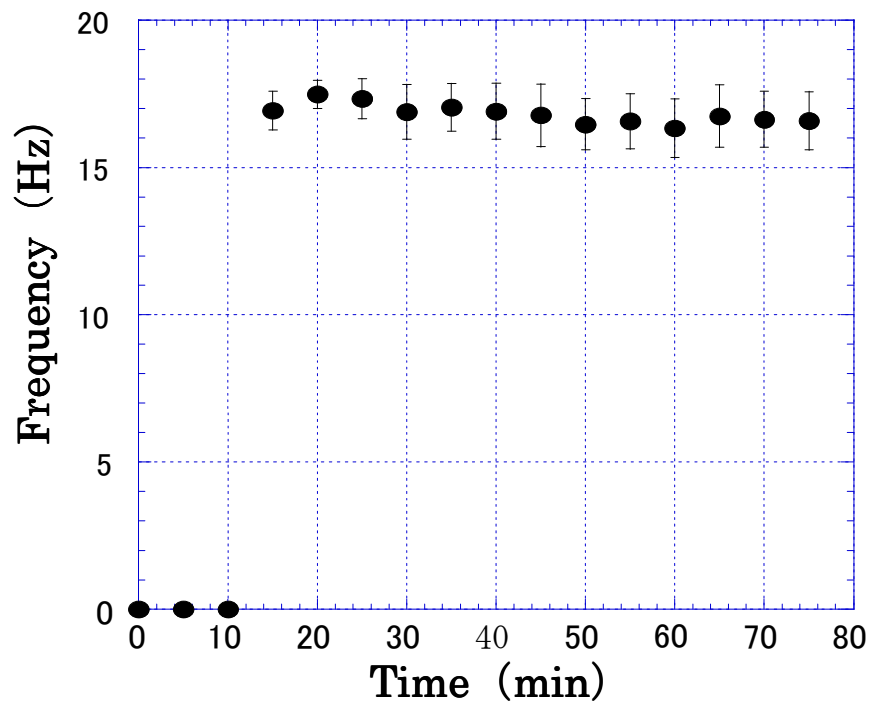


図 3-4.  $\beta$  振動の周波数とその経時変化 ホールスライス CA3 部位にて測定した。

A. CWT の解析結果、CA3 部位、B. 5 分毎の  $\beta$  振動経時変化 (n=3)

## 第2項 海馬スライス切断実験

ホールスライスにおいて CA3、CA1、DG で同期した  $\beta$  振動が見られた。そこで発生部位を明らかにするため切断実験を行った。Carbachol はミニスライスを作った後に投与した。CA3 ミニスライスでは常に  $\beta$  振動が見られたが (図 3-5、 $n=24$ )、CA1/DG ミニスライスでは多くの場合 CA1,DG 部位共に  $\beta$  振動は観察されなかった (図 3-6、 $n=10$ )。また、DG 部位において図 3-6 A のように  $\beta$  振動が観察される場合があったが、それは CA3 錐体細胞体層が多く DG ミニスライス側に入り込んでいる時であった。その時、 $\beta$  振動が観察された ( $n=11$ )。一方、図 3-6 B のように、CA3 錐体細胞体層部位が少ないときには  $\beta$  振動は観察されなかった ( $n=14$ )。

### CA3 ミニスライス



### CA1/DG ミニスライス CA1 部位

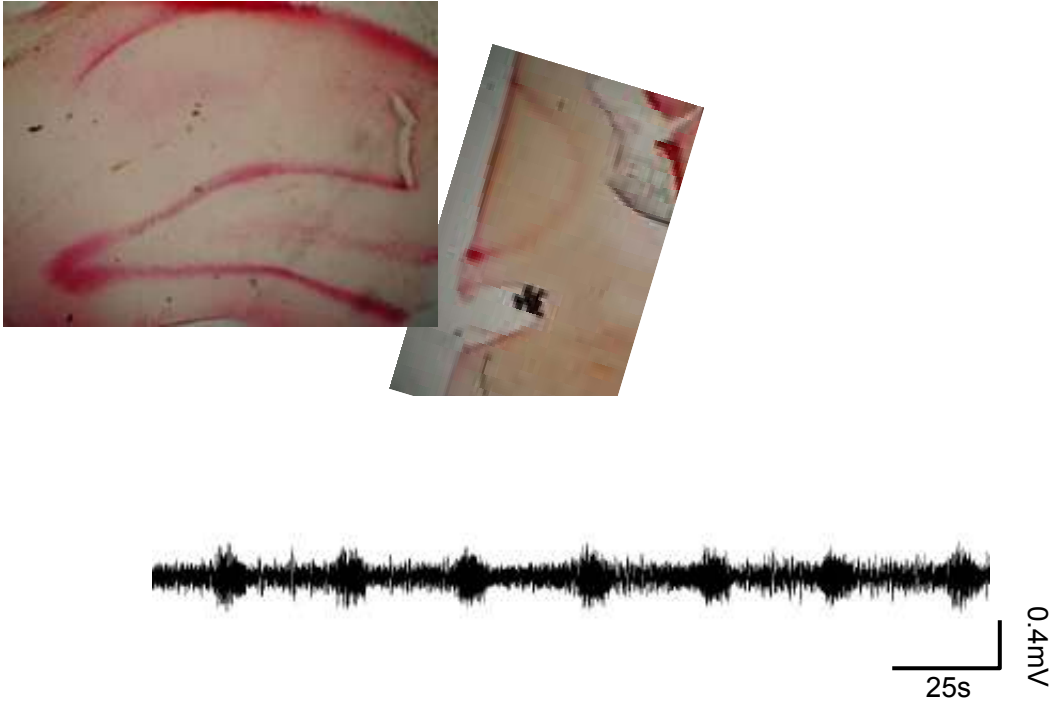


### CA1/DG ミニスライス DG 部位



図 3-5. ミニスライスにおける  $\beta$  振動

A



B

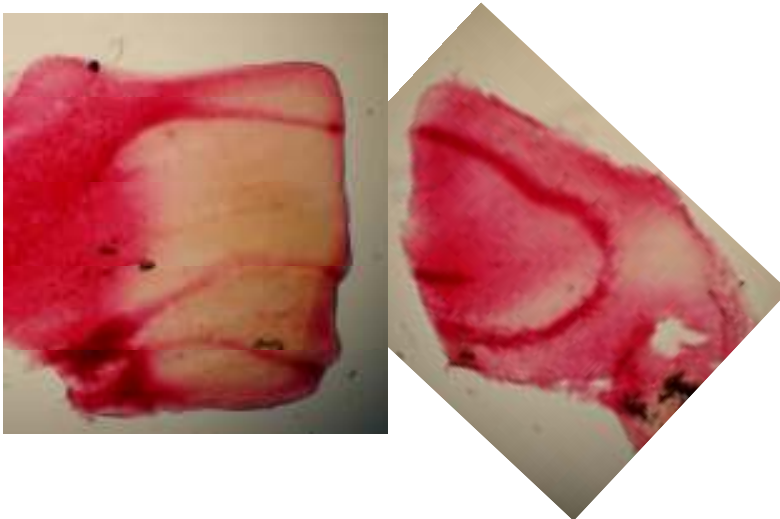


図 3-6. 海馬スライス切断実験における B 振動

A. CA1/DG ミニスライス内に CA3 錐体細胞体層が多く存在すると B 振動が観察された。下はこのスライスで観察されたベータ振動。B のように CA3 錐体細胞層が少ないと観察されなかった。両図とも、左側写真上部が CA1,下部が DG,右写真が CA3 部位である。

### 第3項 Carbachol 投与前後の pEPSP 変化

Carbachol を用いた LTP 実験を行う前に、Carbachol による pEPSP の変化を調べる実験を行った。Carbachol 投与前の pEPSP を 1 とすると CA3 で  $0.34 \pm 0.06$  (図 3-7、 $n=5$ )、CA1 で  $0.36 \pm 0.05$  (図 3-8、 $n=6$ ) となり、投与後には有意な pEPSP の減少が見られた。この結果は先行研究と一致する [45]。

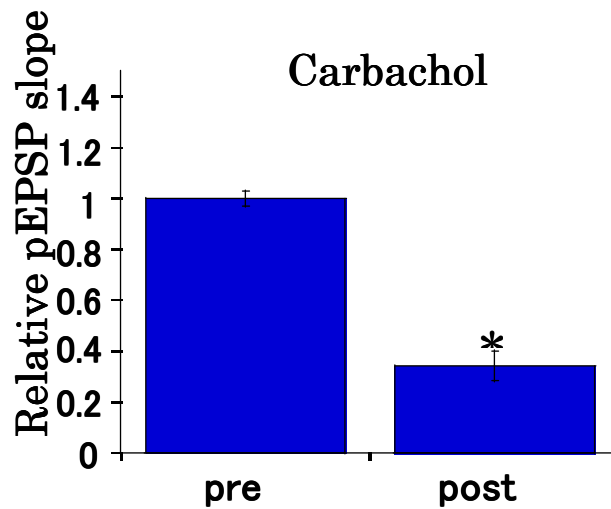


図 3-7. Carbachol 投与前後の CA3 部位における pEPSP  
pre は Carbachol 投与前を、post は Carbachol 投与後を表している。(\* $p < 0.05$ )

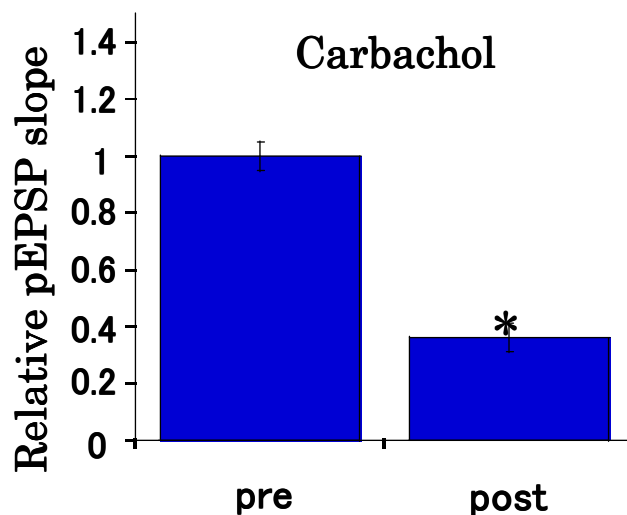


図 3-8. Carbachol 投与前後の CA1 部位での pEPSP  
pre は Carbachol 投与前を、post は Carbachol 投与後を表している。(\* $p < 0.05$ )



#### 第4項 CIBO 誘導中の TBS なしの pEPSP の経時変化

コントロール実験として、TBS を行わないで経時変化を観察した。薬品を 20 分投与した後、テスト刺激を行い、その後 TBS を行わずに 10 分ごとにテスト刺激を行った。CA3、CA1 部位共に CIBO 上で pEPSP の有意な変化は見られず、TBS を行わなければ Carbachol だけでは有意な pEPSP の変化は起こらないことが示された (図 3-9、n=3)。

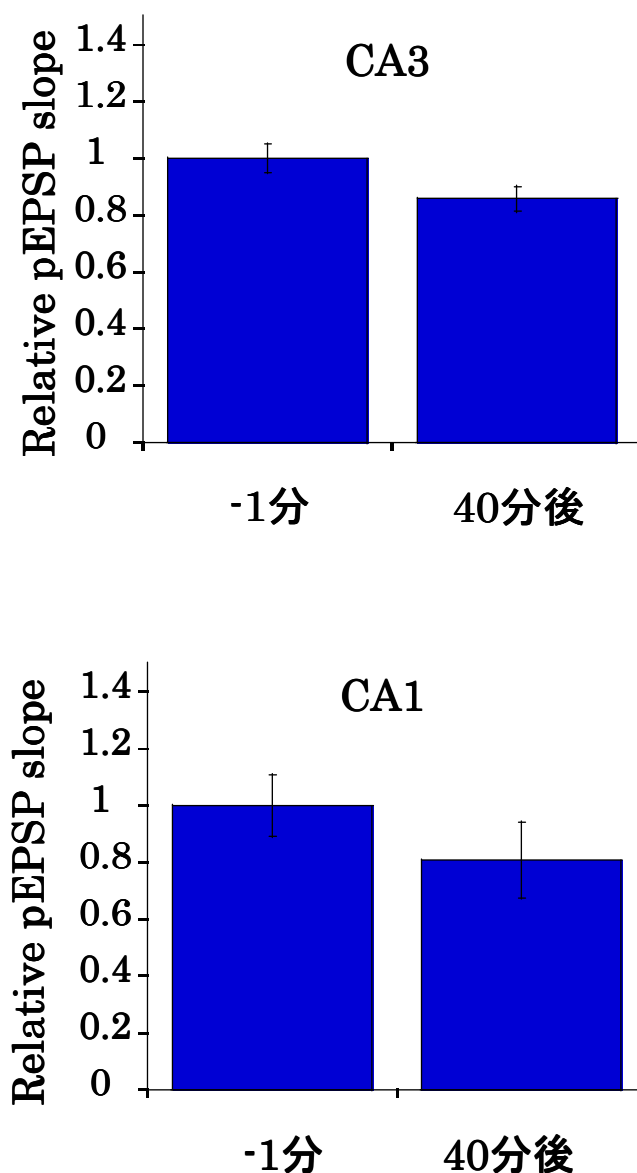


図 3-9. CIBO 誘導下、TBS なしの pEPSP の変化, 上図 CA3、下図 CA1

## 第5項 CIBO 誘導中におけるバースト位送別 TBS 刺激実験

Carbachol を投与して 20 分後、安定した  $\theta$  振動に対して振動中 ( $0^\circ$ )、振動直後 ( $60^\circ$ )、振動と振動の間 ( $180^\circ$ )、振動の直前 ( $330^\circ$ ) 各バースト位相において、TBS 刺激を行い、TBS 前、TBS 後 10 分、TBS 後 20 分、TBS 後 30 分、TBS 後 40 分のそれぞれの pEPSP の変化からシナプス可塑性の違いについて調べた。

### 1. CIBO での位相 $0^\circ$ 刺激

CIBO 上  $0^\circ$  で TBS 刺激を行うと、CA3 部位では 40 分にわたり pEPSP の有意な増加が見られ、LTP が引き起こされた。CA1 部位においては短期的には有意な増加が見られたが持続せず、LTP は見られず、STP であった (図 3-10. CA3 : n = 6, CA1 : n = 3)。

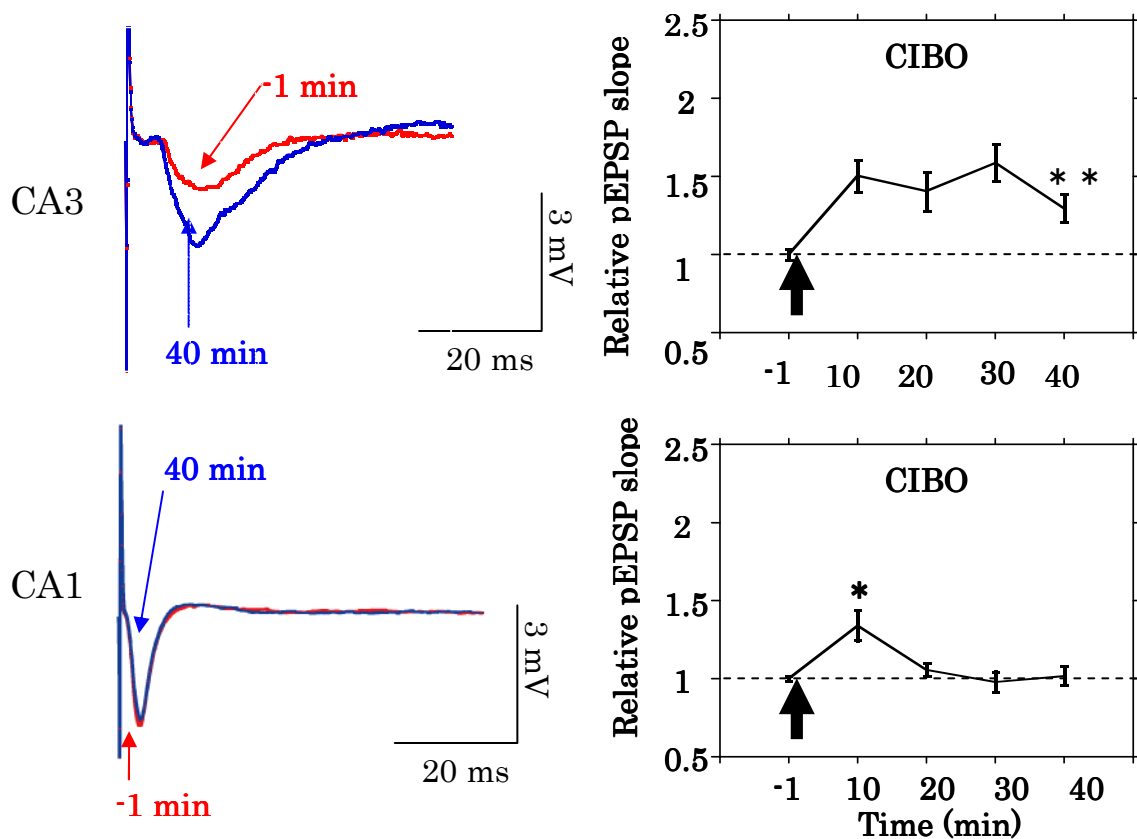


図 3-10. CIBO でのバースト位相  $0^\circ$  での TBS 刺激 右図上矢印の時、TBS 刺激を行った。左図が pEPSP の典型例、右図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

## 2. CIBO での位相 60° 刺激

CIBO 直後の 60° で TBS 刺激を行うと、CA3 部位では 40 分にわたりある程度の pEPSP slope の増加が見られ、40 分後の slope は -1 分に比べ、有意に大きかった。LTP が引き起こされた。CA1 部位においては有意な pEPSP の変化は見られなかった (図 3-11. CA3 : n = 8, CA1 : n=3)。

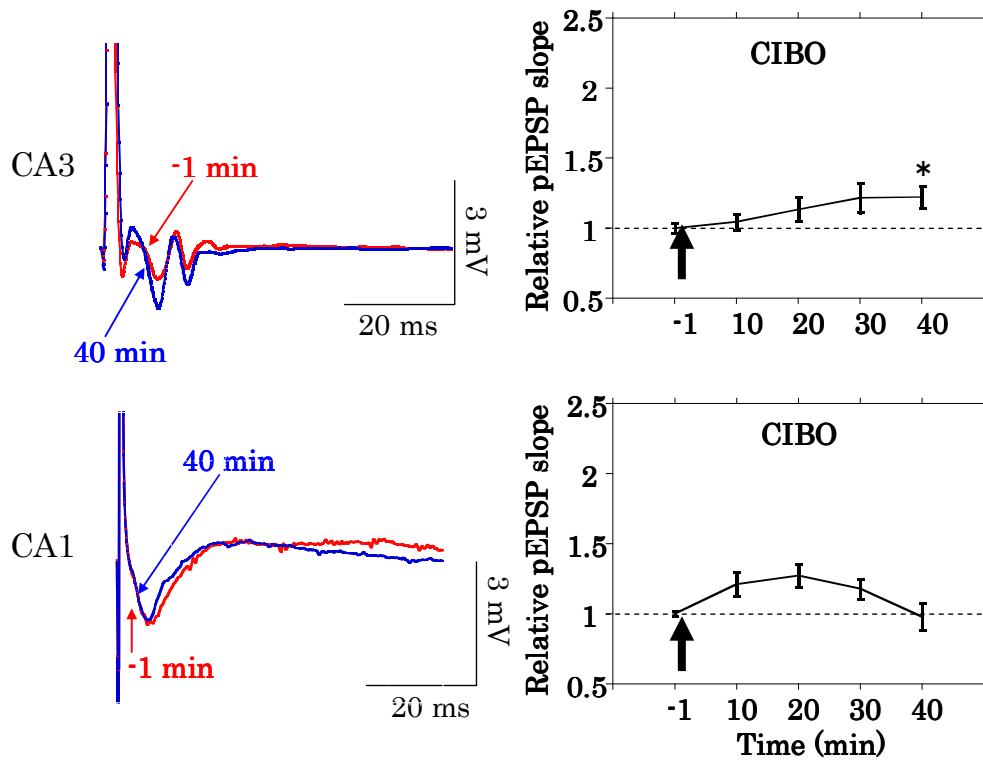


図 3-11. CIBO でのバースト位相 60° 刺激 (\* $p < 0.05$ )

左図が pEPSP の典型例、右図が Relative pEPSP slope の経時変化を表していて、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

### 3. CIBO 上での位相 180° 刺激

バーストとバーストの間に当たる 180° で TBS 刺激を行うと、CA3 部位、CA1 部位で共に 40 分にわたり pEPSP 増加が見られ、40 分後の傾きは有意に増強し、LTP が引き起こされた (図 3-12. CA3 : n = 5, CA1 : n = 3)。

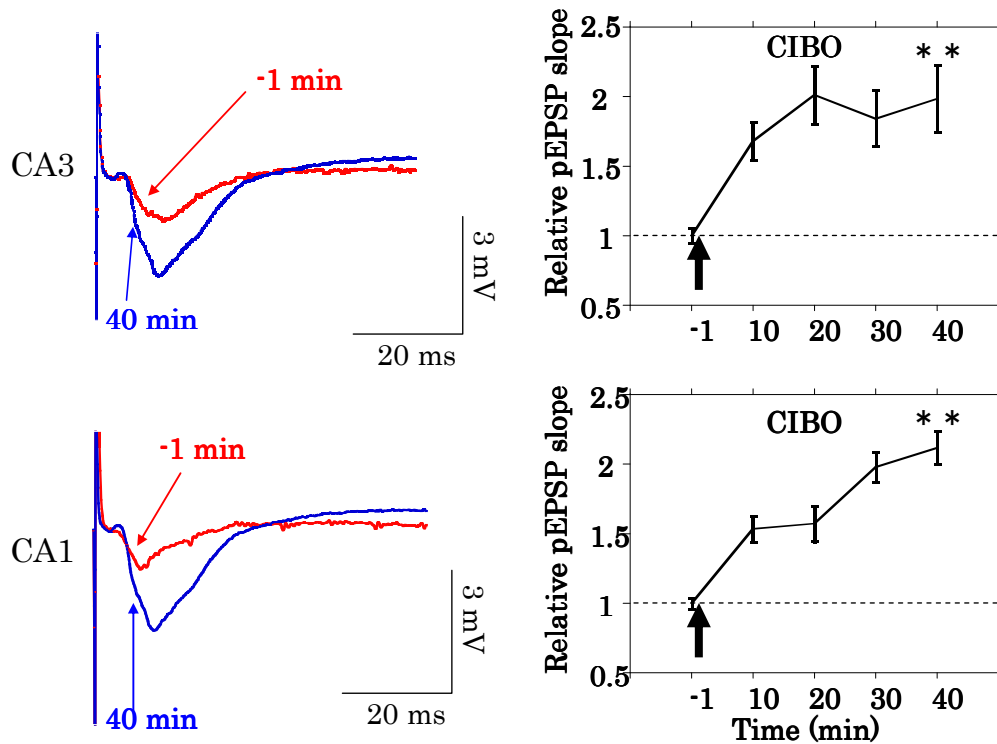


図 3-12. CIBO 上での位相 180° 刺激

左図が pEPSP の典型例、右図が Relative pEPSP slope の経時変化を表していて、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

#### 4. CIBO 上での位相 330° 刺激

CIBO 直前に当たる 180° で TBS 刺激を行うと、CA3 部位、CA1 部位で共に 40 分にわたり pEPSP 増加が見られ、LTP が引き起こされた (図 3-13. CA3 : n = 5, CA1 : n = 4)。40 分後の slope は有意に増強していた。

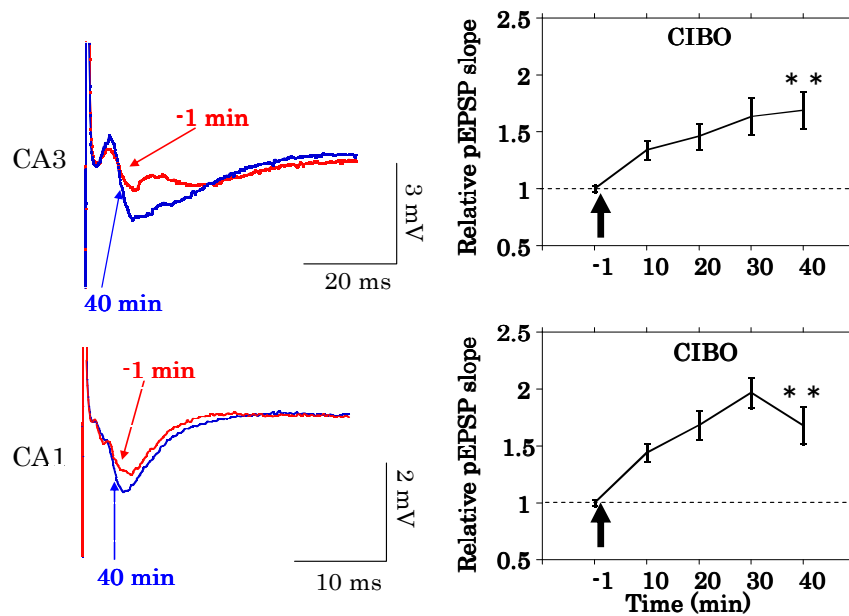


図 3-13. CIBO 上での位相 330° 刺激

左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表していて、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

#### 第 6 項 CIBO 誘導中の LTP に対する mAChR の関与

$\beta$  振動に対して atropine を投与すると CA3 (図 3-14、n=3)、CA1 (図 3-15、n=3) 部位共に 10 分後に  $\beta$  振動の消失が見られ、IFA (Individual field activity) に変化した。その後ランダムな位相で TBS を行うと TBS 後 40 分では CA3 と CA1 での Relative pEPSP slope は、 $1.08 \pm 0.06$ (n=3) および  $0.95 \pm 0.04$ (n=3) で有意な増強は観察されなかった。また、atropine により pEPSP の変化が起こり、それによる LTP が起こらなかった可能性を考え、atropine 投与後の pEPSP の最大値との比率を調べてみると CA3 と CA1 でそれぞれ  $37 \pm 7\%$ (n=3) および  $34 \pm 5\%$ (n=3) であった。このことからこの可能性は除去された。よって  $\beta$  振動もしくは  $\beta$  振動を起こすゆっくりとしたリズムによって LTP が制御されていることがわかった。

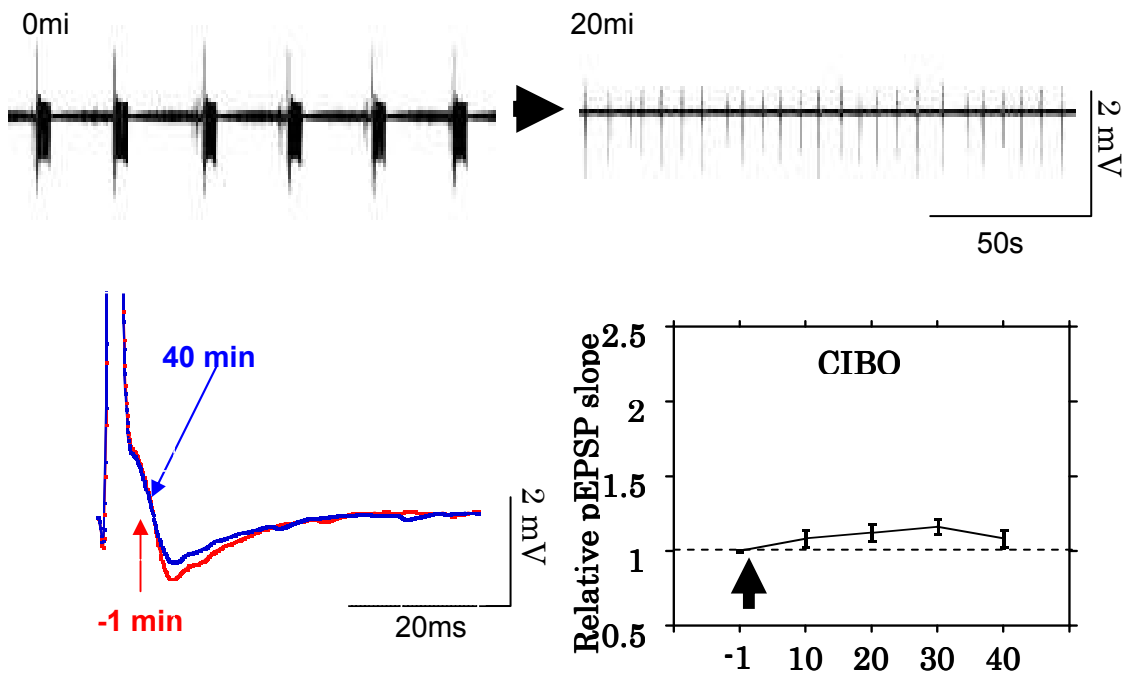


図 3-14. CIBO 上 LTP に対する mAChR の関与(CA3)

上の図は Atropine 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

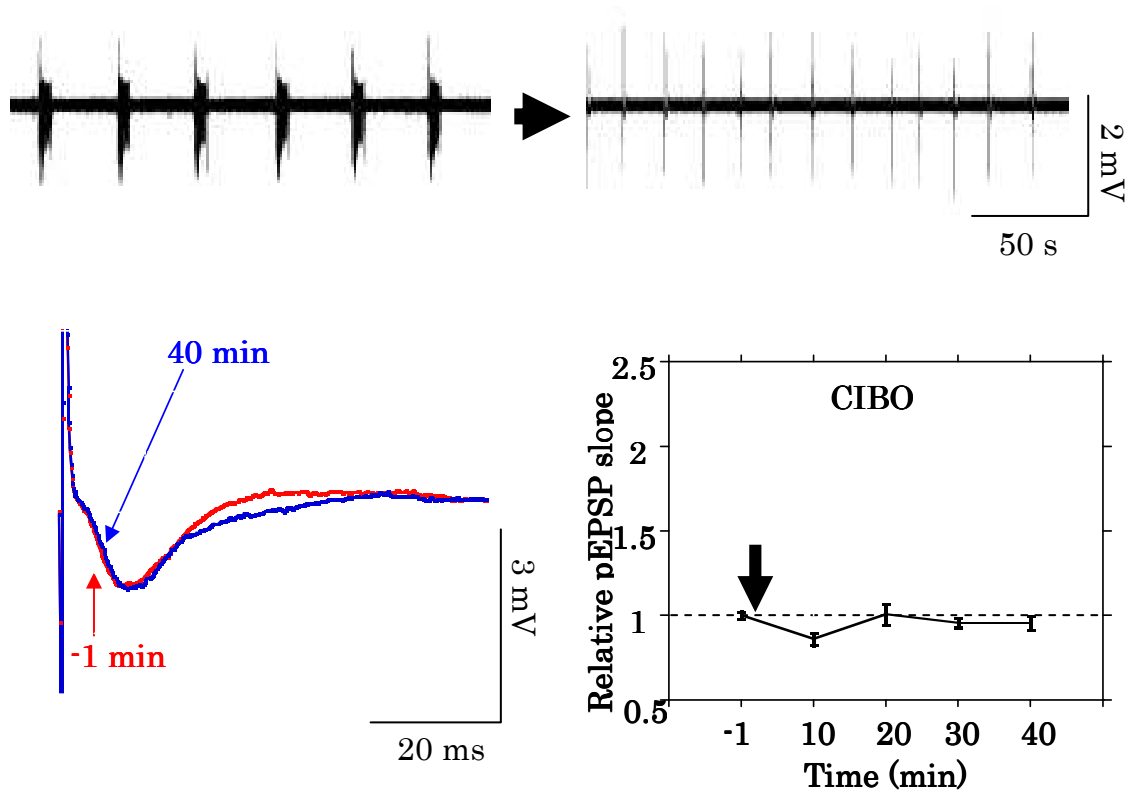


図 3-15. CIBO 上 LTP に対する mAChR の関与(CA1)

上の図は Atropine 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

## 第 7 項 CIBO 誘導中の LTP に対する NMDA 受容体の関与

$\beta$  振動に対して AP5 を投与すると、AP5 の投与の前に周波数は  $14.7 \pm 0.47\text{Hz}$ 、duration は  $8.4 \pm 0.6$  秒で、IBI は  $17.6 \pm 2.8$  秒、振幅は  $5.4 \pm 1.1\text{mV}$  ( $n=3$ )、であったものが AP5 の投与後に  $15.3 \pm 1.2\text{Hz}$ 、duration は  $8.5 \pm 1.0$  秒で、IBI は  $22.1 \pm 3.7$  秒、振幅は  $5.1 \pm 1.2\text{mV}$  ( $n=3$ ) となり有意な変化は見られなかった (Paired t-test;  $p>0.05$ )。以前の報告 [46] によると、AP5 により、わずかに CIBO は影響を受けるとされていたが、今回の結果からは、その結果は観測できなかった。

また、TBS により LTP が発生したバースト位相上の全てで AP5 を投与してみたところ、LTP は引き起こされなかった。図 3-16 は CA3 部位で  $330^\circ$  ( $n=5$ )、図 3-17 は CA1 部位で  $180^\circ$  ( $n=4$ ) にて TBS 刺激を行った典型例で、も 40 分後の TBS 前の Relative pEPSP

slope は  $0.91 \pm 0.03$  ( $n = 3$ ) および  $1.16 \pm 0.11$  ( $n = 3$ ) となった。LTP は観察されなかった。AP5 投与後の pEPSP の最大値との比率を調べてみると CA3 および CA1 シナプスでそれぞれ  $53 \pm 9\%$  ( $n = 3$ ) および  $12 \pm 2\%$  ( $n = 3$ ) であり、pEPSP の最大値に近くなる事で LTP が抑制された訳で無いことがわかった。このことから  $\beta$  振動中に誘導される LTP は NMDAR が関与していることが証明された。

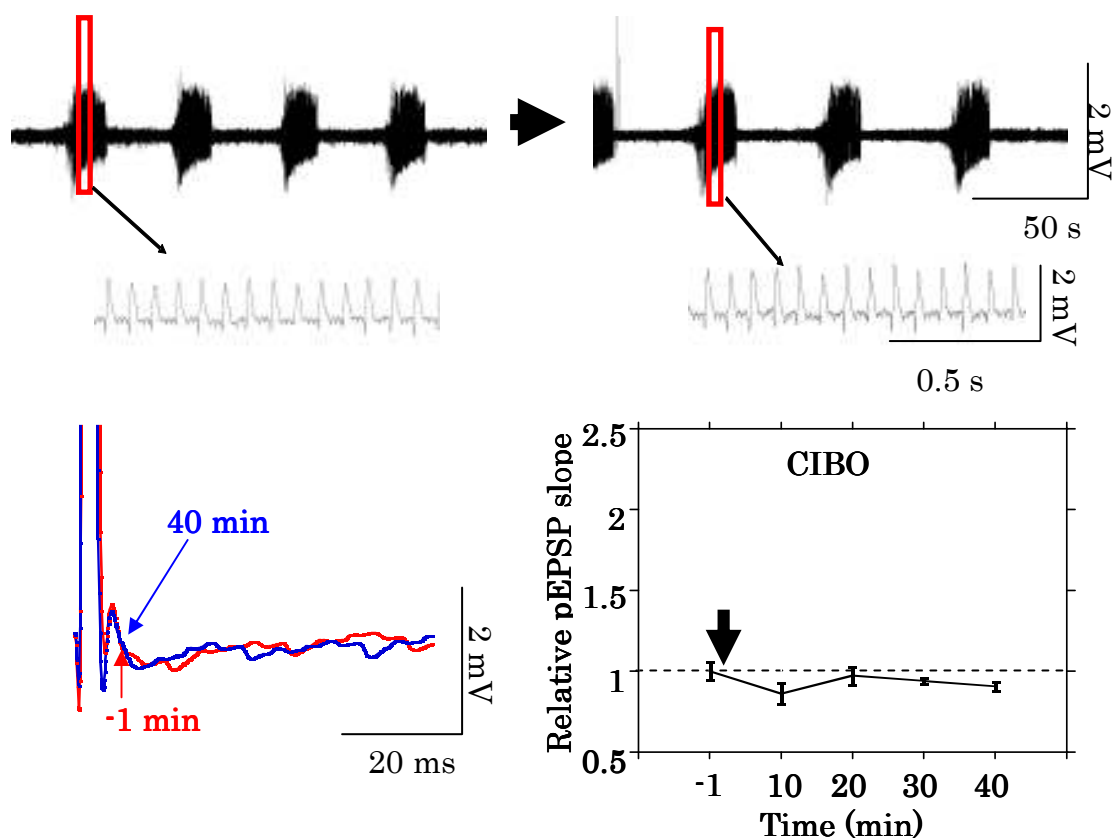


図 3-16. CIBO 上 LTP に対する NMDAR の関与(CA3)

上の図は AP5 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。



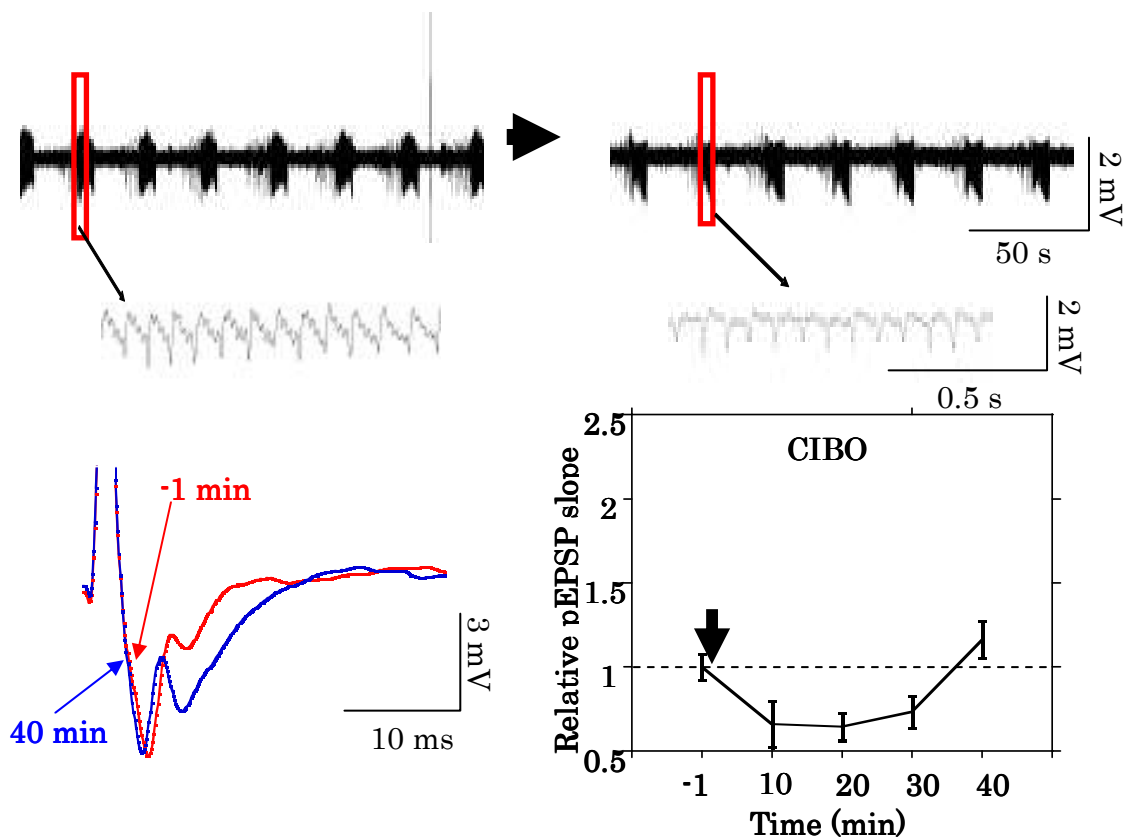


図 3-17. CIBO 上 LTP に対する NMDAR の関与(CA1)

上の図は AP5 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

## 第 8 項 CIBO 誘導中での各バースト位相による pEPSP slope 比較

CIBO 上のバースト位相による刺激の pEPSP の傾きの変化により、40 分後の pEPSP の変化が生じた可能性があると考え、1 枚のスライスのバースト上での各位相でテスト刺激を行った。その結果、どのバースト位相においても有意差は無かったため、pEPSP slope の大きさは CIBO バースト位相で誘導される LTP と関係が無かった (図 3-18.CA3 : n = 5, 図 3-19.CA1 : n = 4)。

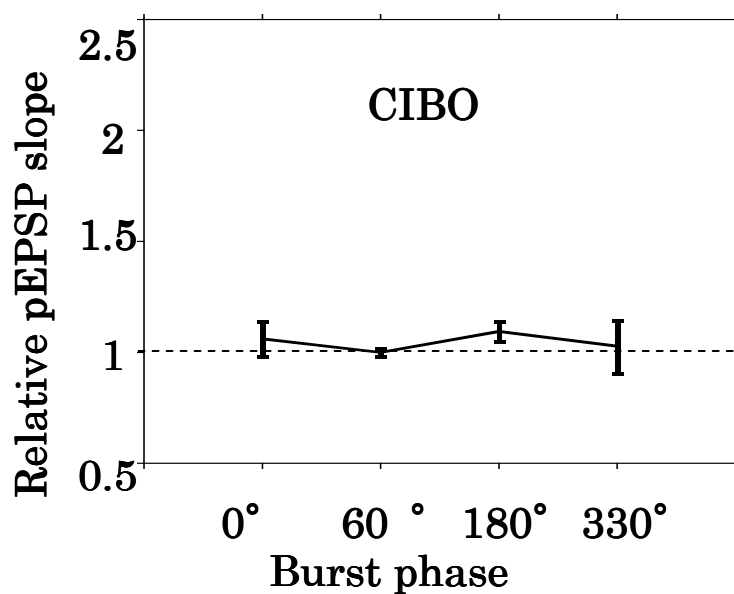


図 3-18. CIBO 上での各バースト位相による pEPSP slope 比較 (CA3)

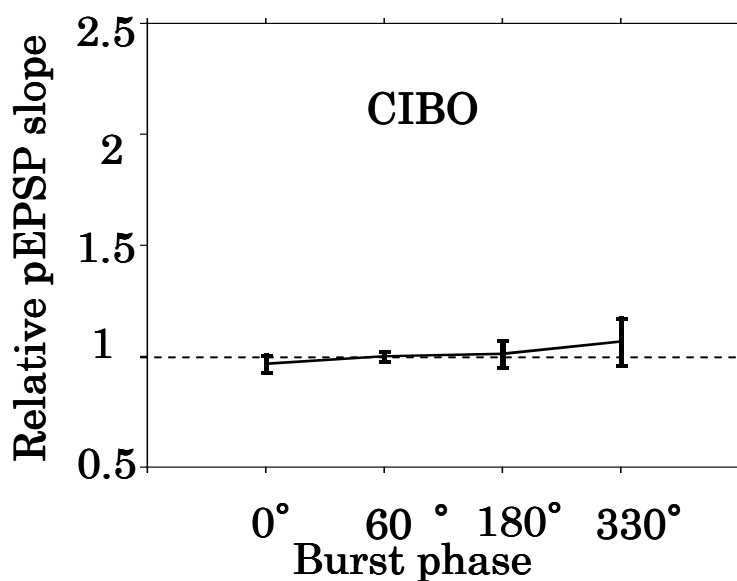


図 3-19. CIBO 上での各バースト位相による pEPSP slope 比較 (CA1)

## 第 2 節 GABAZINE 誘導てんかん様発火(GIED)と LTP

### 第 1 項 GABAZINE 誘導てんかん様発火典型例

海馬スライスに、GABA<sub>A</sub> 受容体のアンタゴニストである GABAZINE (10 $\mu$ M) を加えると、ホールスライス、ミニスライス共にてんかん様発火が表れた (図 3-20、GABAZINE を加えることで 91%のホールスライスで観察された)。また、20%程のスライスではより長く集合スパイクが続く ictal 様のてんかん発火が見られたが、今回の実験では集合スパイクが 1.5s 以下しか続かない interictal 様てんかん様発火についての結果を調べた。GABAZINE を投与後 30 分時の周波数は  $0.066 \pm 0.012\text{Hz}$ 、振幅は、CA3  $10.1 \pm 1.7\text{mV}$ 、CA1  $8.7 \pm 1.1\text{mV}$ 、DG  $1.6 \pm 0.4\text{mV}$ 、IBI は  $13.3 \pm 0.7\text{s}$  であった (図 3-21、平均値  $\pm$  標準平均誤差、n=6)周波数は GABAZINE 投与後 20 分ほどで安定化し、定常状態になった (図 3-21)。また、CA3 部位、CA1 部位、CA1、DG 部位を 2 本のガラス微小電極を用いて同時記録した所、それぞれ同期して発火が見られた (図 3-21)。

以後 GABAZINE で誘導したてんかん様発火を、簡単のために、GIED と呼ぶ。

control



20 分後

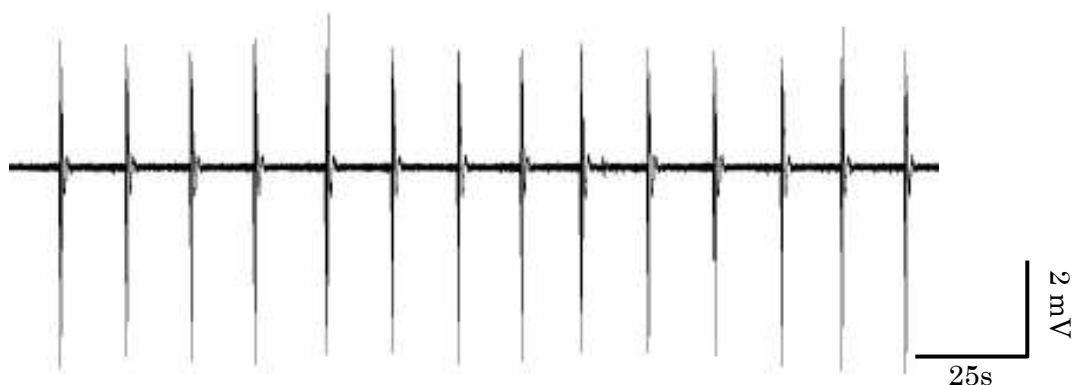


図 3-20. ホールスライス CA3 部位で測定されるてんかん様発火の典型例

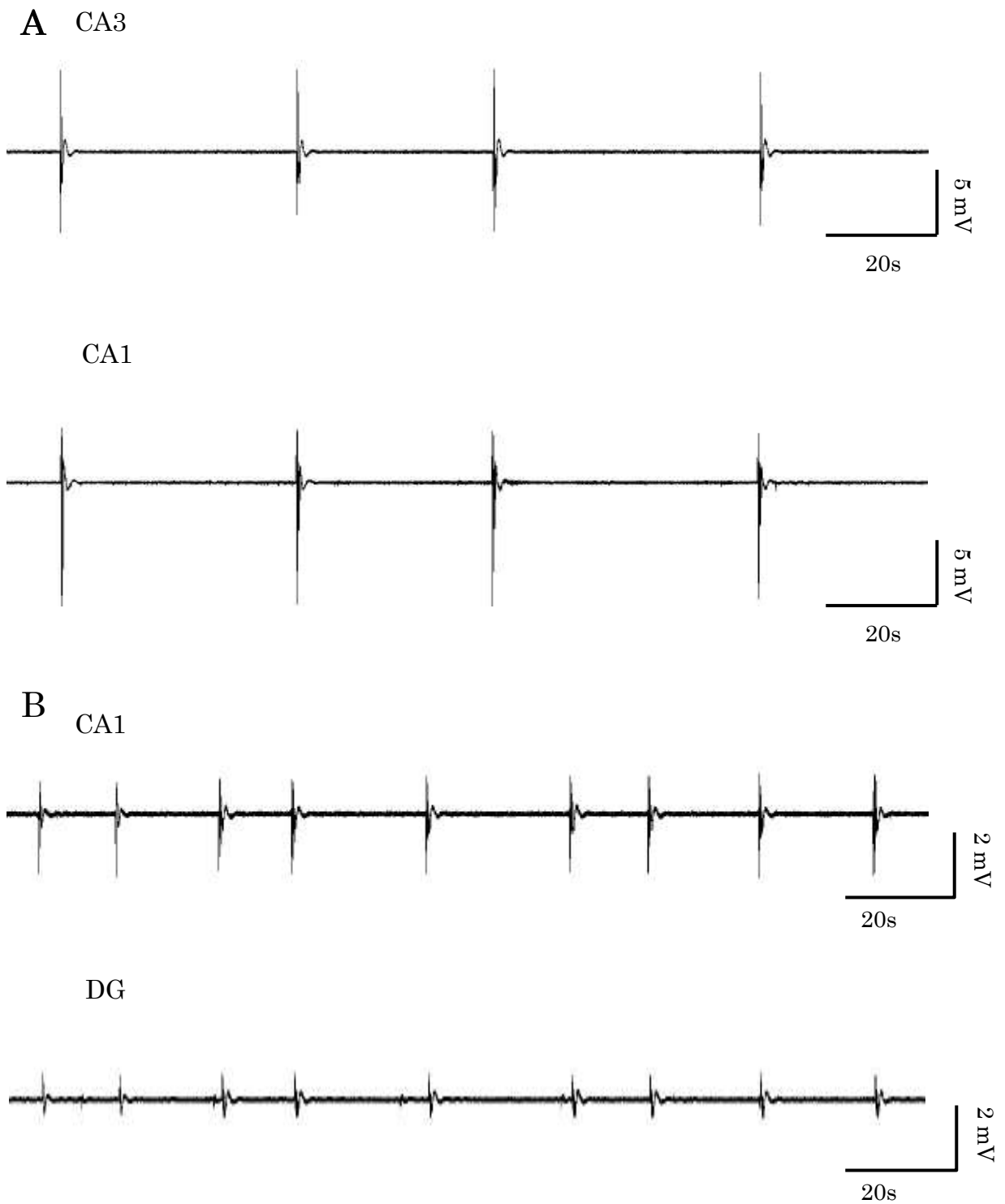


図 3-21. 海馬ホルスライスで観察されるてんかん様発火  
 A. CA3、CA1 同時測定結果。B. CA1、DG 同時測定結果。

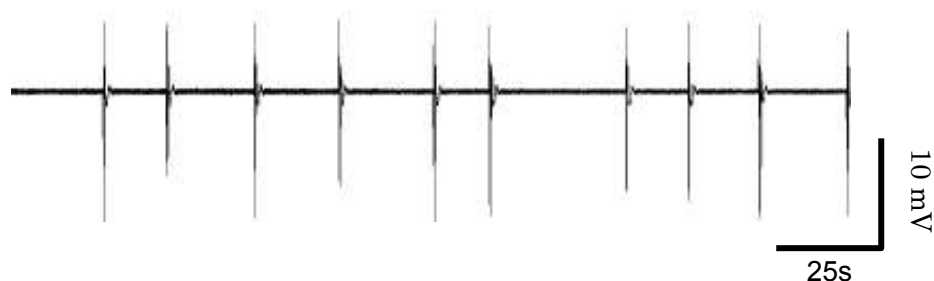
## 第2項 海馬スライス切断実験

第1項にて、CA3、CA1、DG細胞体層において同期したてんかん様発火が見られた。てんかん様発火の発生がどの部位で行われているのかを調べるためにそれぞれを切り分けてミニスライスを作り実験を行った。GABAZINEはミニスライスに切り分けてから投与した。CA3とCA1/DGミニスライスを作成後GABAZINEを投与しても、CA3 (n=14)、CA1 (n=15)、DG (n=9)でてんかん様発火が見られた(図3-22、n=3)。また、CA1、DGは同期したてんかん様発火が見られた。それぞれCA3発生源で周波数は $0.053 \pm 0.013\text{Hz}$ 、CA1で $0.041 \pm 0.038$ 、振幅はCA3で $6.15 \pm 2.09\text{mV}$ 、CA1で $4.75 \pm 1.65\text{mV}$ 、DGで $1.17 \pm 0.28\text{mV}$ 、IBIはCA3で $21.86 \pm 4.29\text{s}$ 、CA1で $12.7 \pm 4.17\text{s}$ (平均値 $\pm$ 標準平均誤差、n=5)であった。

### CA3 ミニスライス



### CA1/DG ミニスライス CA1 部位



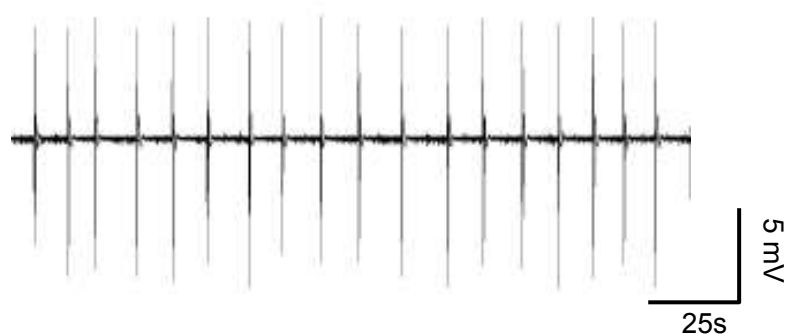
### CA1/DG ミニスライス DG 部位



図 3-22. CA3 ミニスライス、CA1/DG ミニスライスにおける CA1、DG 部位のてんかん様発火典型例

これまでの実験結果はミニスライスを作成した後 GABAZINE を投与したものである。しかし GABAZINE を投与した後、てんかん様発火ネットワークが誘導、構築され、てんかん様発火が維持される可能性があるとも考えられる、そのため、GABAZINE を投与してからミニスライスにする実験も行った。結果はこの条件でも CA3 ミニスライス (n=8)、CA1/DG ミニスライス (n=8) において、てんかん様発火は見られた (図 3-23)。

### CA3 ミニスライス



### CA1/DG ミニスライス

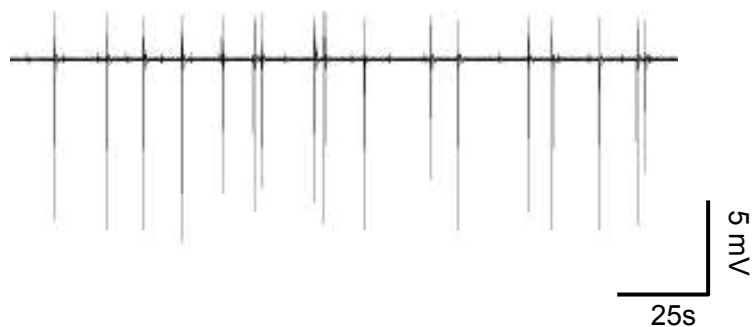
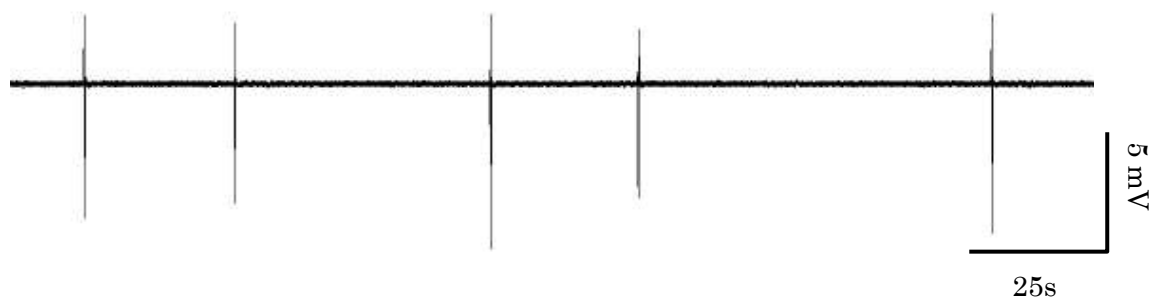


図 3-23. GABAZINE 投与後切断した CA3 ミニスライスにおけるてんかん様発火と CA1/DG ミニスライスにおけるてんかん様発火典型例

CA1/DG ミニスライス中、CA1,DG 部位で共にてんかん様発火が見られた。従ってさらに CA1 部位と DG 部位に切り分けた。すると、CA1 ミニスライスにおいてはてんかん様発火が見られたが (n=4)、DG ミニスライスにおいては見られなかった (n=3)。よっててんかん様発火の発生源は CA1 部位にある事が示唆された (図 3-24)。従って、CA1/DG ミニスライスにおける DG 部位のてんかん様発火は、CA1 で発生したてんかん様発火が伝搬したものであると考えられる。DG 部位にてんかん様発火発生源が無い事が明らかになったので、以後、CA1/DG ミニスライスにおけるデータは全て CA1 部位から測定されたものである。

### CA1 ミニスライス



### DG ミニスライス

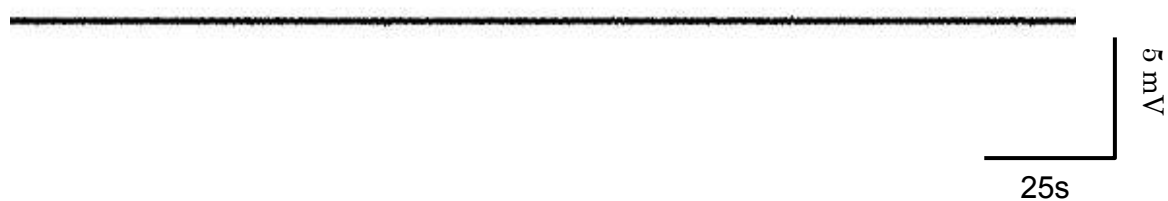


図 3-24. CA1,DG ミニスライスにおけるてんかん様発火

### 第3項 GABAZINE 投与前、投与後の pEPSP

GABAZINE による pEPSP の変化を調べる実験を行った。GABAZINE 投与前の pEPSP の最大値の 2/3 を 1 とすると投与後には CA3 は  $1.29 \pm 0.08$  (図 3-25、n=5)、CA1 は  $1.07 \pm 0.04$  (図 3-26、n=5) になっており、CA3 において pEPSP の有意な増強が見られた。また、増強が見られた CA3 部位において、GABAZINE 投与後の pEPSP の投与前に 2/3 に設定したものを 1 とすると投与後の最大値は 1.9 になっており、pEPSP が上昇する可能性は残っていることも実験結果から分かった。

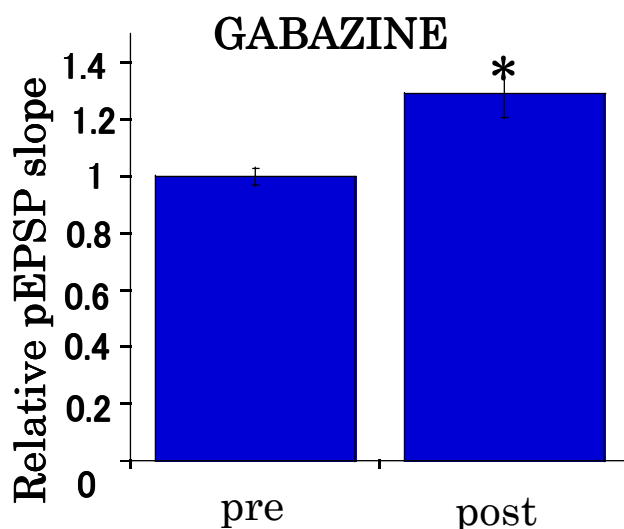


図 3-25. GABAZINE 投与前、投与後の pEPSP,CA3  
pre は GABAZINE 投与前を、post は GABAZINE 投与後を表している (\*p < 0.05)。

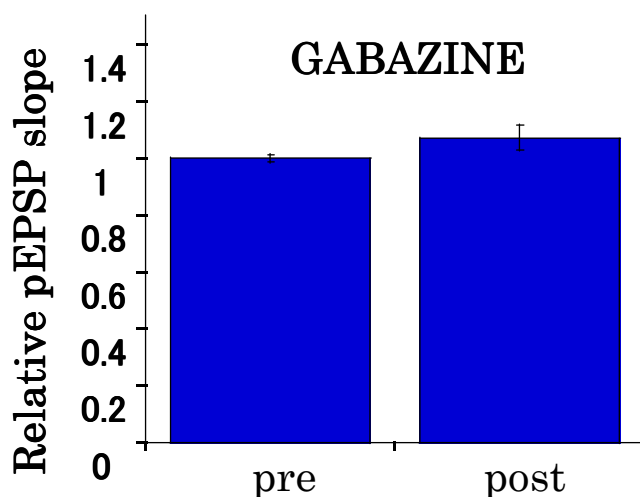


図 3-26. GABAZINE 投与前後の pEPSP slope,CA1 部位での測定  
pre は GABAZINE 投与前を、post は GABAZINE 投与後を表している。



#### 第4項 GIED 誘導中での TBS なしの pEPSP の経時変化

GIED での TBS なしのコントロール実験コントロール実験として、TBS なしでの経時変化を観察した。薬品を 20 分投与した後、テスト刺激を行い、その後 TBS を行わずに 10 分ごとにテスト刺激を行った。GIED でも CA3 (図 3-27、n=3)、CA1 (図 3-28、n=3) 両方で pEPSP の有意な変化は見られず、TBS を行わなければ有意な pEPSP の変化は起こらないと示された。

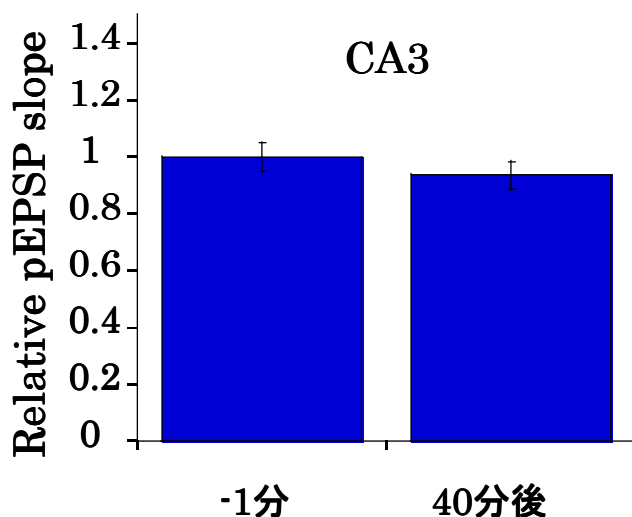


図 3-27. CIBO 上、TBS なしの pEPSP の変化,CA3

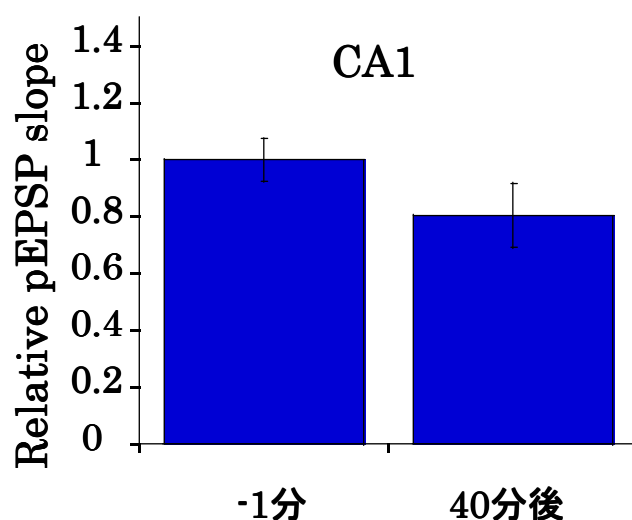


図 3-28. CIBO 上、TBS なしの pEPSP の変化,CA1

## 第5項 GIED 誘導中でのバースト位相別 TBS 刺激実験

GABAZINE を投与して 20 分後、安定したてんかん様発火に対して振動中 (0°)、振動直後(15°)、振動と振動の間(180°)、リズムの直前(330°)に対して TBS 刺激を行い、TBS 前、TBS 後 10 分、TBS 後 20 分、TBS 後 30 分、TBS 後 40 分での pEPSP の変化からシナプス可塑性の違いについて調べた。

### 1. GIED 上でのバースト位相 0°

てんかん様発火中であるバースト位相 0°で TBS 刺激を行うと、CA3 部位、CA1 部位で共に pEPSP slope の有意な増加は見られなかった (図 3-29. CA3 : n = 4, CA1 : n = 4)。

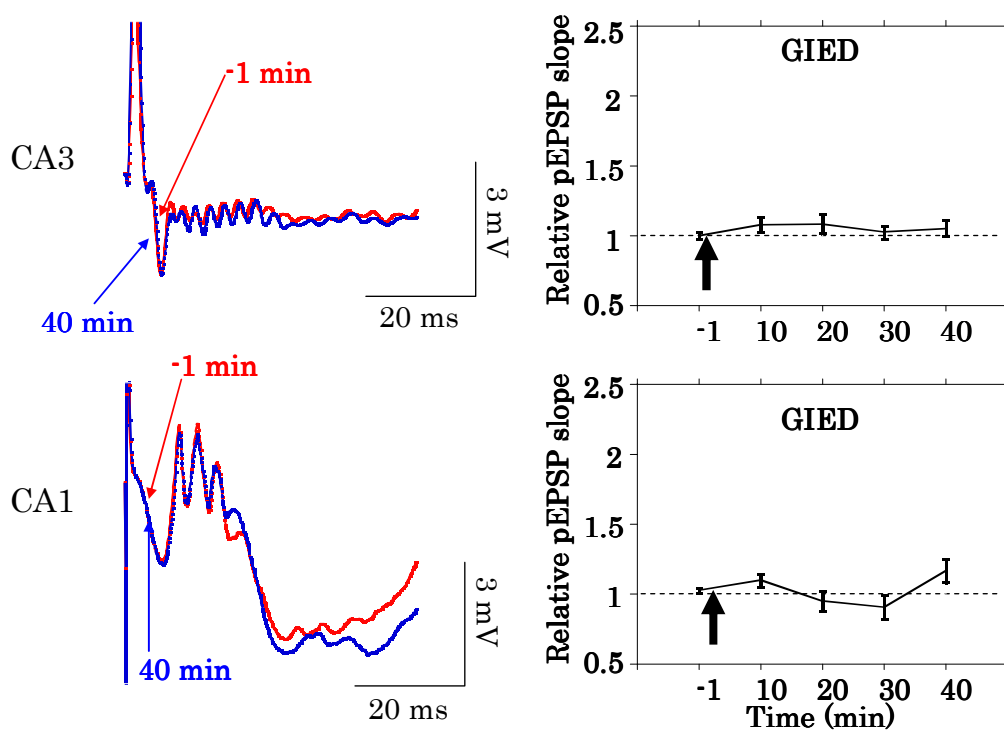


図 3-29. GIED 上での位相 0°TBS

左図が pEPSP の典型例、右図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している

## 2. GIED 上での位相 15°刺激

てんかん様発火上での 15°で TBS 刺激を行うと、CA3 部位、CA1 部位で共に pEPSP の有意な変化が見られなかった (図 3-30. CA3 : n = 5, CA1 : n = 4)。

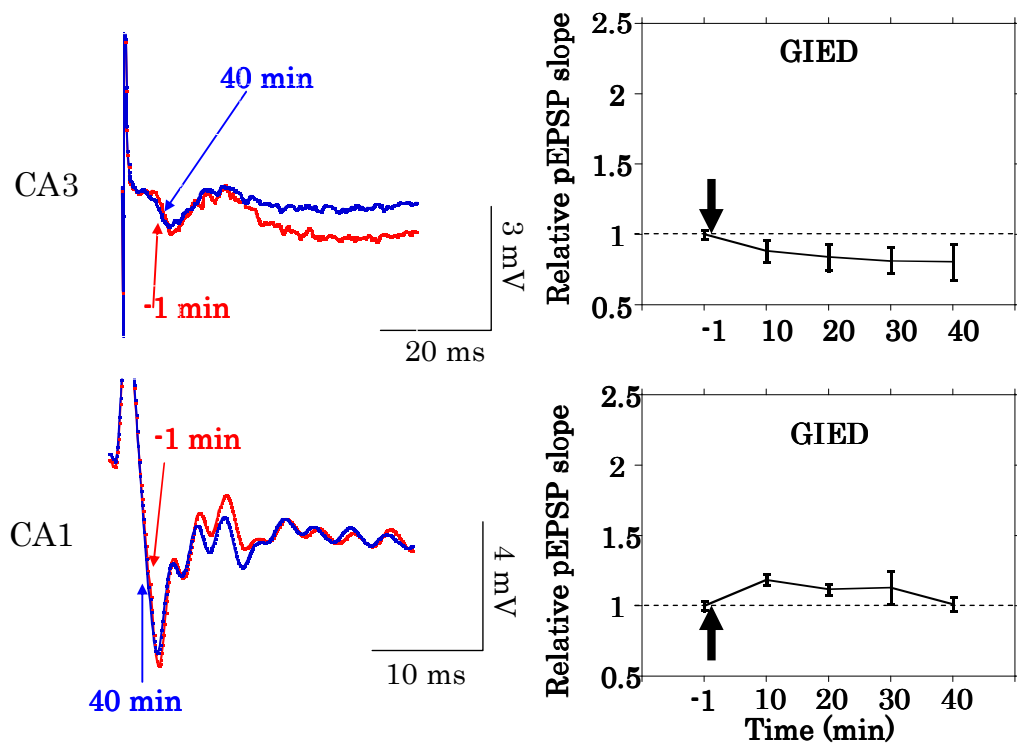


図 3-30. GIED 上でのバースト位相 15°での TBS による pEPSP slope 変化  
左図が pEPSP の典型例、右図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している

### 3. GIED 上での位相 180°

GIED と GIED の間に当たる 180°で TBS 刺激を行うと、CA3 部位では 40 分後に pEPSP slope の有意な減少が見られ、LTD が引き起こされた。CA1 部位においては 40 分後に有意な pEPSP の増加が見られ LTP が引き起こされた (図 3-31. CA3 : n = 3, CA1 : n = 3)。

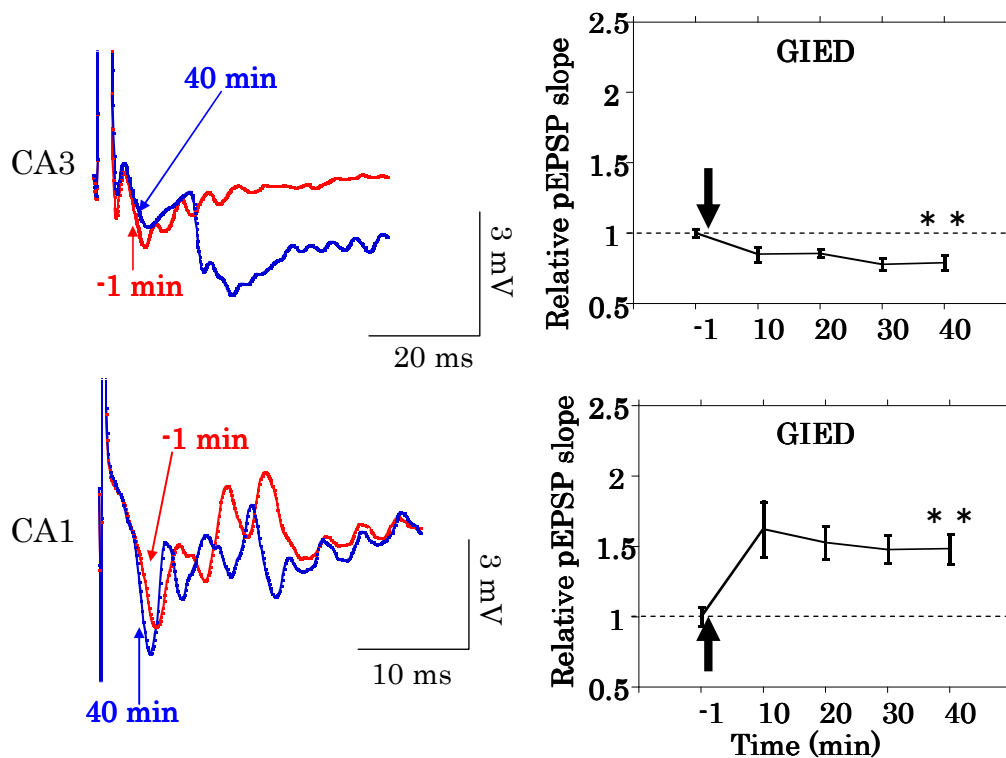


図 3-31. GIED 上でのバースト位相 180°での TBS により引き起こされるシナプス可塑性。左図が pEPSP の典型例、右図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している。

#### 4. GIED 上での位相 330°

てんかん様発火直前に当たる 330°で TBS 刺激を行うと、CA3 部位では 40 分後に pEPSP slope の有意な減少が見られ、LTD が引き起こされた。また、CA1 部位においては 40 分後の有意な pEPSP の増加が見られ LTP が引き起こされた (図 3-22. CA3 : n = 3, CA1 : n = 3)。

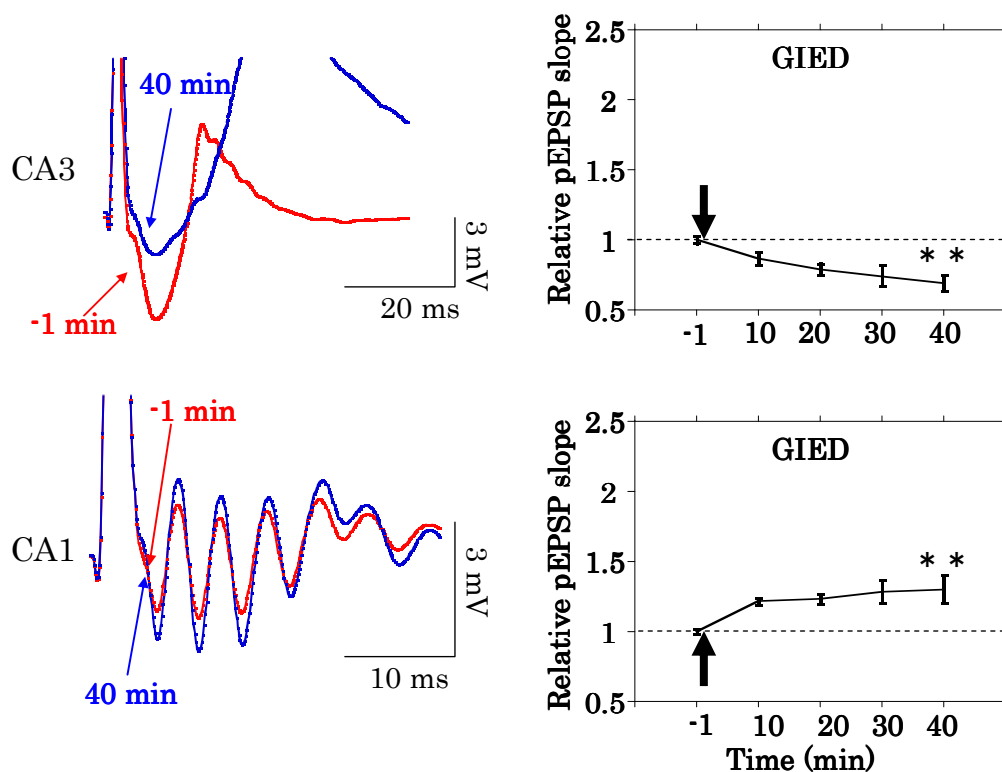


図 3-32. GIED 上でのバースト位相 330°の TBS によって誘導されるシナプス可塑性  
左図が pEPSP の典型例、右図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している

## 第6項 GIED 誘導中でのシナプス可塑性に対する GIED の関与

てんかん様発火に対して Muscimol を投与すると CA3、CA1 部位共に 30 分後にてんかん様発火の消失が見られた (図 3-3、n=3)。その後ランダムな位置で TBS を行うと、TBS 後 40 分での Relative pEPSP slope は、CA3 部位で  $0.95 \pm 0.04$ (図 3-4、n=3)、CA1 部位で  $0.80 \pm 0.14$ (n=3)で、Muscimol が無い条件下で見られた CA3 での LTD や CA1 での LTP は観察されなかった。また、atropine 投与後の pEPSP の最大値との比率を調べてみると CA1 で  $35 \pm 15\%$ (n=3)であり、LTP のための余地があり、よっててんかん様発火が抑制されると LTP も抑制されることが示された。

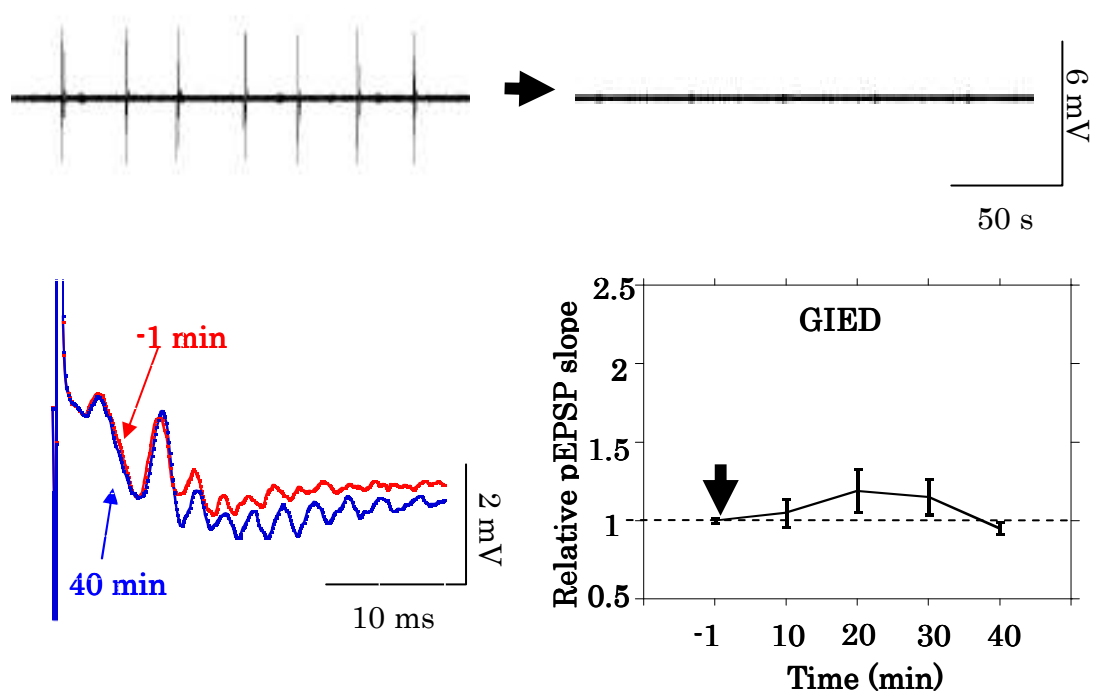


図 3-33. GIED 上でのシナプス可塑性に対する GIED の関与(CA3)

上の図は Muscimol 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

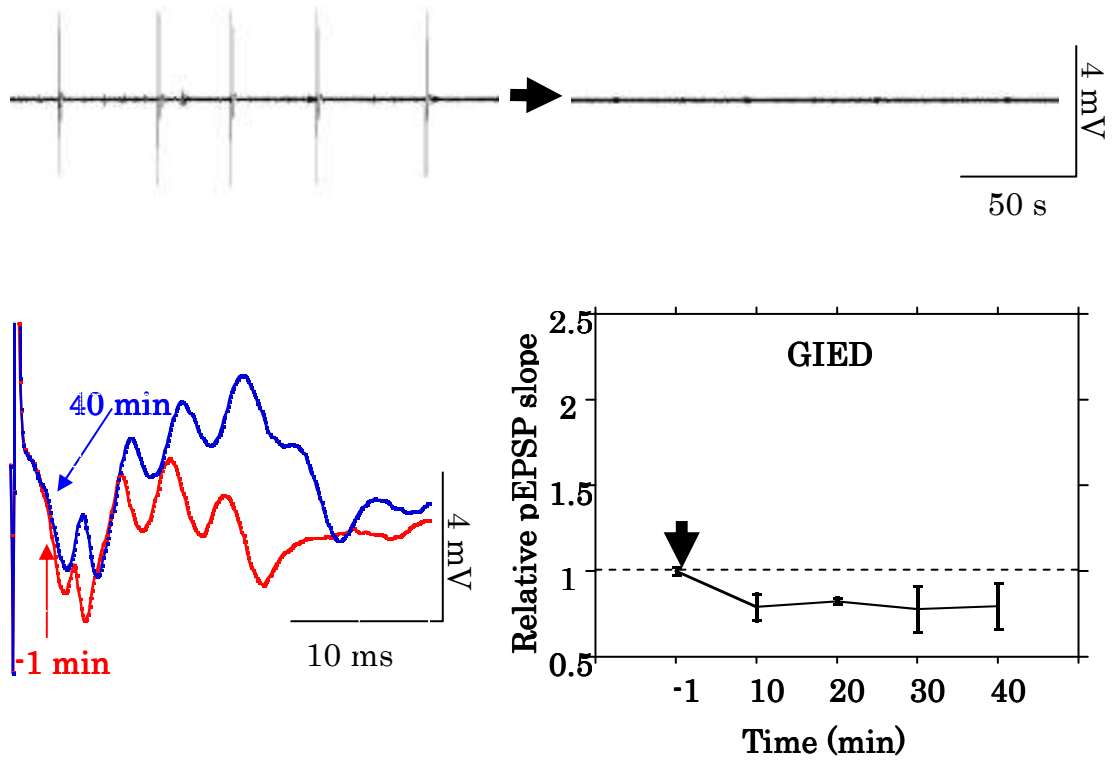


図 3-34. GIED 上でのシナプス可塑性に対する GIED の関与(CA1)

上の図は Muscimol 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

## 第7項 GIED 誘導中での NMDAR の関与

てんかん様発火に対して AP5 を投与すると周波数は  $0.046 \pm 0.004\text{Hz}$ 、IBI は  $15.9 \pm 5.3$  秒、振幅は  $5.3 \pm 1.3\text{mV}(n=3)$ であったものが AP5 の投与後、GIED の周波数は  $0.047 \pm 0.005\text{Hz}$ 、IBI は  $15.9 \pm 5.6$  秒、振幅は  $5.8 \pm 1.4\text{mV}(n=3)$ となり有意な変化は見られなかった。

TBS により LTP、LTD が発生した位相上の全てで AP5 を投与して TBS を試みたところ、LTP や LTD は引き起こされなかった。図 3-5 は、CA3 部位で  $180^\circ(n=3)$ 、は、図 3-6 は、CA1 部位での  $180^\circ(n=3)$ にて TBS 刺激を行った典型例で、40 分後の TBS 前の Relative pEPSP slope は  $0.91 \pm 0.03(n=3)$ および  $1.16 \pm 0.11(n=3)$ となった。

LTP や LTD は引き起こされなかった。また、AP5 投与後と pEPSP の最大値との比率を調べてみると CA1 で  $50 \pm 7\%(n=3)$ であった。このことからこのてんかん様発火上での LTP や LTD には NMDAR が関与していることが証明された。

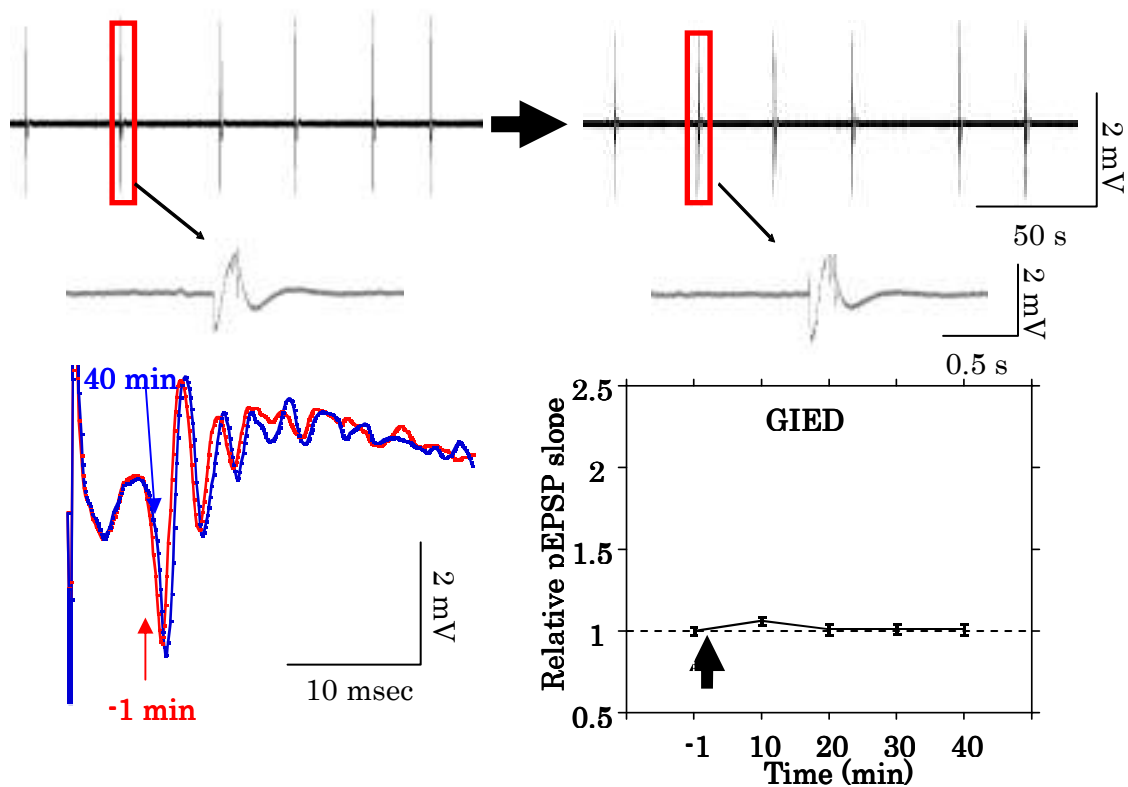


図 3-7. GIED 上での NMDAR の関与(CA3)

上の図は AP5 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表していて、右図の矢印は TBS 刺激を表している。



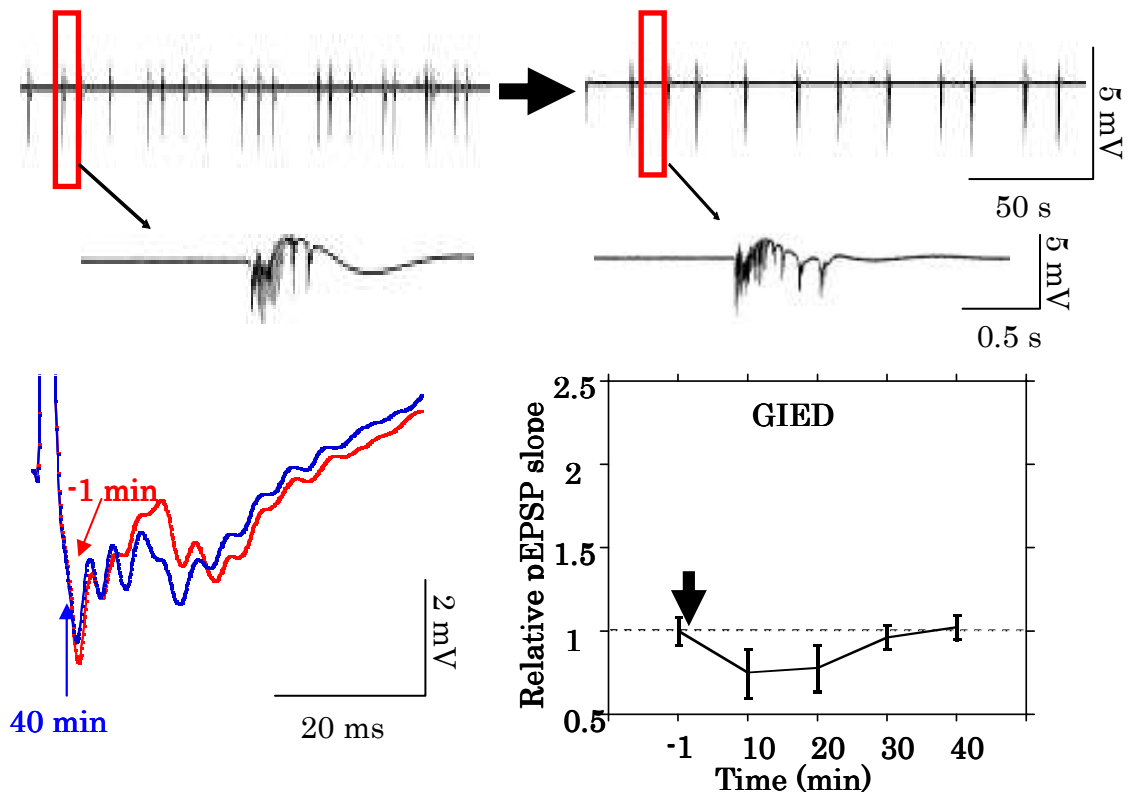


図 3-8. GIED 上での NMDAR の関与(CA3)

上の図は AP5 投与前と投与後の典型例、下の図は左の図が pEPSP の典型例、右の図が Relative pEPSP slope の経時変化を表している、右図の矢印は TBS 刺激を表している。

## 第8項 GIED 誘導中での各バースト位相による pEPSP slope 比較

GIED 上のバースト位相による刺激の pEPSP の slope 変化が、40 分後の pEPSP の変化と関係している可能性があると考え、1 枚のスライスのバースト上での各バースト位相でテスト刺激を行った。どのバースト位相においても、pEPSP slope の値は変わらず、有意差は無かったため、pEPSP の強さは GIED バーストでの LTP や LTD と関係が無かった (図 3-37.CA3 : n = 3, 図 3-38.CA1 : n = 3)。

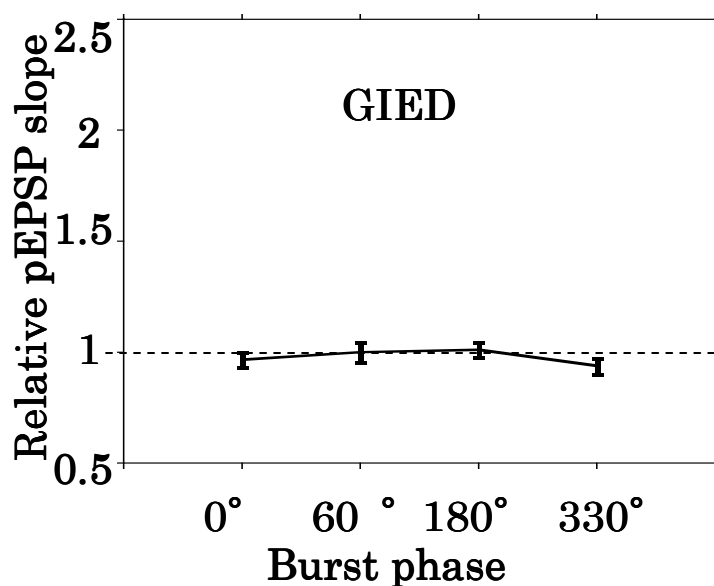


図 3-37. GIED 上での各バースト位相による pEPSP slope 比較 (CA3)

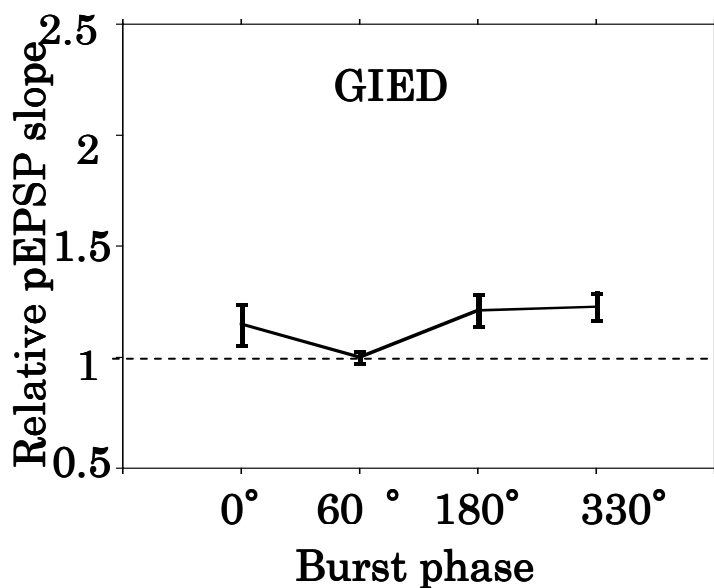


図 3-38. GIED 上での各バースト位相による pEPSP slope 比較(CA1)

### 第3節 CIBO、GIED 誘導中での LTP 実験のまとめ

この実験を CIBO、GIED での 4つのバースト位相で行った実験結果の TBS 40 分後の値をまとめた (図 3-39)。CIBO では CA3 の全ての位相で LTP が有意に起こり、0°、180° や 330°において大きな有意差が見られた。また、CA1 では CIBO のバーストの外である 180°、330°において有意な LTP が見られた。GIED では CA3 においては全く pEPSP slope の増加が見られず、180°と 330°において有意な LTD が見られた。CA1 では 180°と 330°において pEPSP slope の増加が見られ、有意な LTP が見られた。

CIBO もしくは GIED バースト上で表してみると(図 3-40)、LTP は、CIBO 上での CA3 では全てのバースト位相で観察され、その他は振動外で主に LTP や LTD が発生しているのが観察される。

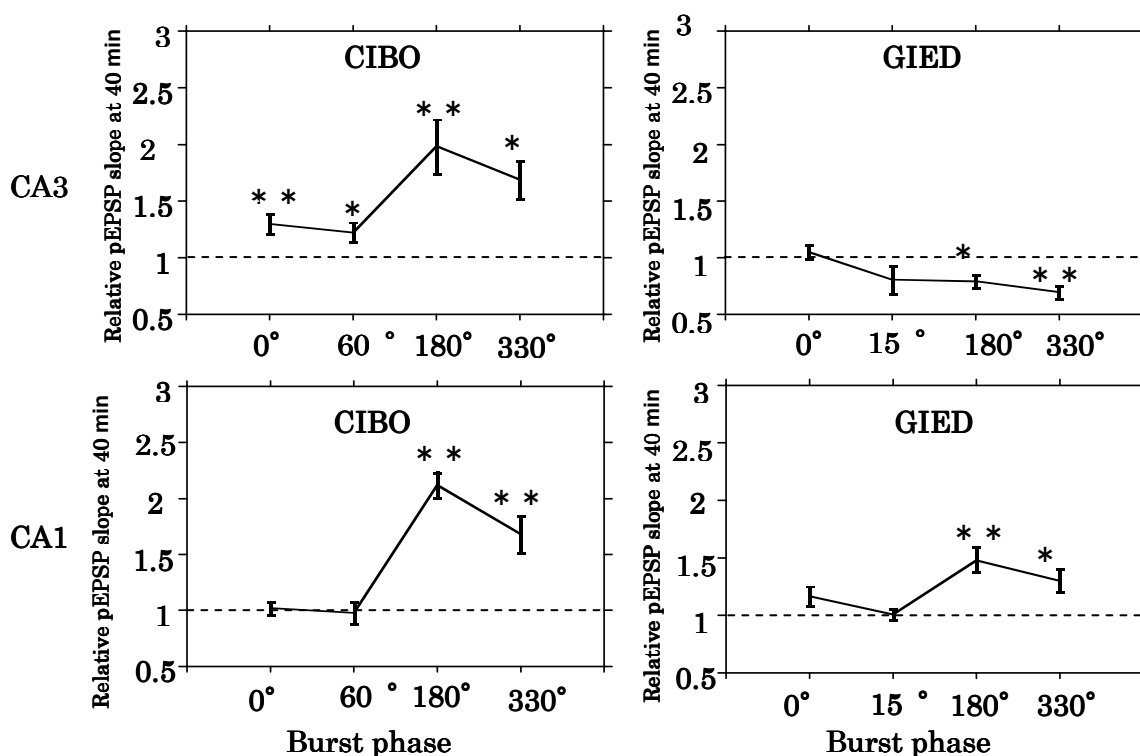


図 3-9. LTP 実験位相まとめ(\*\*p < 0.01, \*p < 0.05)

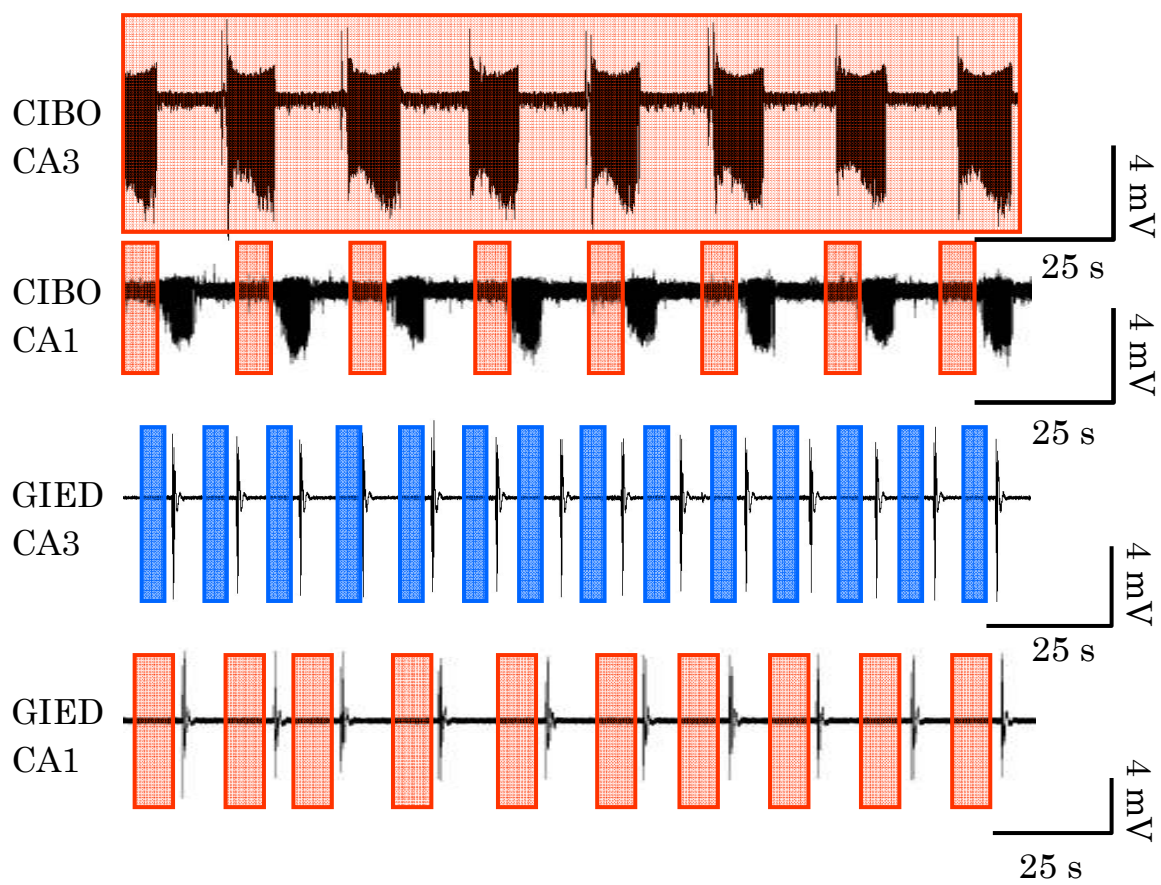


図 3-40. バースト上での LTP 実験位相のまとめ  
赤部分で LTP が、青部分で LTD が誘導される。

## 第4章 考察

## 第 1 項 CIBO での LTP について

まず、今回の実験で観察された CIBO での LTP は NMDAR 依存性であった、これは従来の結果 [47] と一致し、記憶活動に関与している LTP であると考えられる。そして、CA3 シナプス部位では CIBO 上の全てのバースト位相において LTP を誘導することができた。先行研究 [48] より、CA3 の場所細胞はエピソード記憶に関わっているという報告があるが [49]、CA3 部位においてはどの位相で情報が入ってきても容易に処理ができると考えられる。また、atropine により完全に LTP の位相が阻害された為、CIBO は LTP の位相の調節に関与していると考えられる。また、海馬ホールスライスでは CA3 と同じく DG、CA1 でも  $\beta$  振動は観察されたが、CA3 部位と CA1/DG 部位を切り離すことにより、CA3 では  $\beta$  振動が残り CA1/DG ミニスライスでは観察されなくなった。よって、 $\beta$  振動の発生源は CA3 部位にしか存在しないと考えられた。このことから、機能的な脳波とエピソード記憶に関わっている CA3 部位との関係性は深く、なんらかの相互関係によって記憶や学習を容易にする状態を作り出しているのかもしれない。

## 第 2 項 GIED での LTP について

今回の実験で観察された GIED での LTP や LTD は NMDAR 依存性であった、これは CIBO と同じく従来の結果と一致し、記憶活動に関与している LTP、LTD が今回観察されたと考えられる。また、CA3 シナプス部位では全く LTP が見られなかったが、GABAZINE 投与後では pEPSP はまだ上昇する可能性が残っており、pEPSP slope が GABAZINE 投与後に増強し飽和状態になった結果によって、LTP を行うことができなかった可能性は除去された。この GIED 上の CA3 部位では全てのバースト位相において LTP ができなかったことから、機能的な脳波では処理できている情報が、GIED 中では処理できないと考えられる。これにより、病的なてんかん波である interictal 波が起こると、CA3 シナプスにおいて LTD しか行われないのでエピソード記憶ができないのではないかと示唆された。

### 第3項 神経細胞の興奮性と LTP もしくは LTD 現象

今回の研究で得られた LTP や LTD がなぜ起こったのか神経細胞レベルで考察してみる。図 4-1 と図 4-2 では、赤い点は **most excited cell** であり、既に最も興奮性が高い状態の神経細胞で大量に ATP を消費している細胞、黄色が **excited cell** である程度の興奮性のためさらに高い興奮性の状態へシフトする事ができる細胞、青が **resting cell** で **inhibited cell** の状態などから回復した細胞、黒色が **inhibited cell** での興奮性が高まった後で ATP など枯渇している、刺激を受け入れることができない状態を表している。

CA3 での CIBO においては、一つの細胞集団において、 $\beta$  振動は振幅などを見ても分かる様に、てんかん様発火と比べると緩やかな、同期している神経細胞数の少ない発火と考えられるため、ATP の消費も少なく、CIBO 中でも TBS によりさらに多くの神経細胞が発火することができる。その結果、興奮性が高まり、細胞集団中での多くの神経細胞でのカルシウムストアの働き等から細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、それにより LTP を誘導する事ができる。また、 $\beta$  振動直後の  $60^\circ$  でもある程度の **resting cell** が残っていると考えられ、それらによって **small LTP** を引き起こすことができると考えられる。 $180^\circ$ 、及び  $330^\circ$  ではより多くの神経細胞が **resting** 状態に回復しており、TBS により、さらに大きな LTP を引き起こす事ができると考えられる (図 4-1 上)。

CA3 での GIED においては、てんかんによって引き起こされる神経細胞の強い同期発火により、**Most excited cell** や **inhibited cell** など、ATP が枯渇している神経細胞が多く、 $180^\circ$ 、 $330^\circ$  でもてんかん様発火により多くの神経細胞が未だ **inhibited cell** の状態であり、TBS によっても ATP の枯渇によりカルシウムストアが働かない事等から LTP をすることができただけの細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を伴う事ができない。しかし、BCM 仮説が提案する通り、細胞集団内でのごく少量の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により LTD を引き起こしてしまうと考えられる (図 4-1 下)。

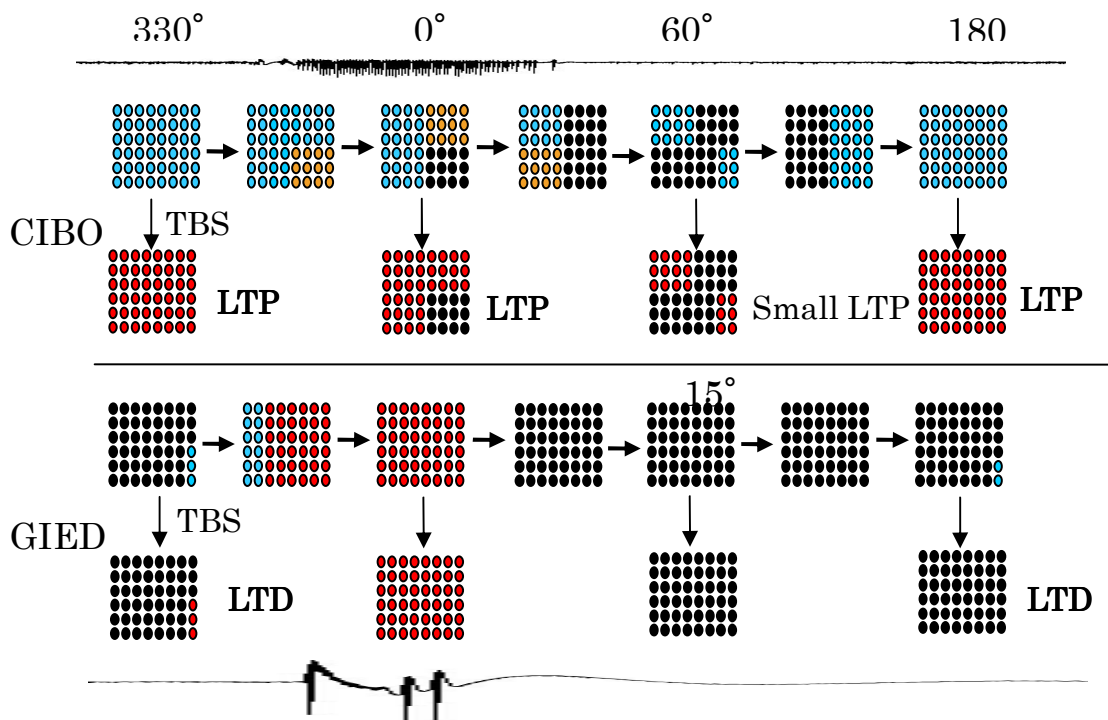


図 4-1. 神経細胞の興奮性と LTP もしくは LTD 現象 CA3 部位

CA1 での CIBO においては、まず、CA1 がてんかん様発火においてジェネレーターとなっていることから考えると、この実験で用いたラットにおいては CA1 においてもリカレント構造をもっていると考えられる。このリカレント構造でつながった細胞集団が CA3 部位と同じく CA1 部位にも存在すると考えられる。ホールスライスでは CA1 においても CIBO が CA3 と同期することによって見られるが、切断実験からも CA1 だけでは CIBO を引き起こすことはできない。これは先行研究 [50]からも GABA 性の抑制性ニューロンが CA3 より少ない事により引き起こされると考えられる。これらの事から、抑制性ニューロンの影響が CA1 には少ない事によって自身で  $\beta$  振動を作る事はできないが、CA3 から伝わった振動の発火が CA1 においては、CA3 よりさらに強い同期発火を引き起こし、ATP が枯渇した状態を引き起こしてしまい、0°、60°での振動上における LTP を起こらなくしていると考えられる。(図 4-2 上)



CA1 での GIED においては、CA3 よりも抑制性ニューロンが少ない事によって、CA3 での GIED よりも弱いてんかん様発火が発生し、 $0^\circ$ 、 $15^\circ$ では CA3 と同じく Most excited cell や inhibited cell が多く ATP の枯渇からカルシウムイオン濃度が上昇せず LTP が発生しないが、 $180^\circ$ や  $330^\circ$ では回復し resting cell が増えるので TBS の入力を受けるとカルシウムイオン濃度が上昇する事ができ、LTP を行う事ができると考えられる (図 4-2 下)。

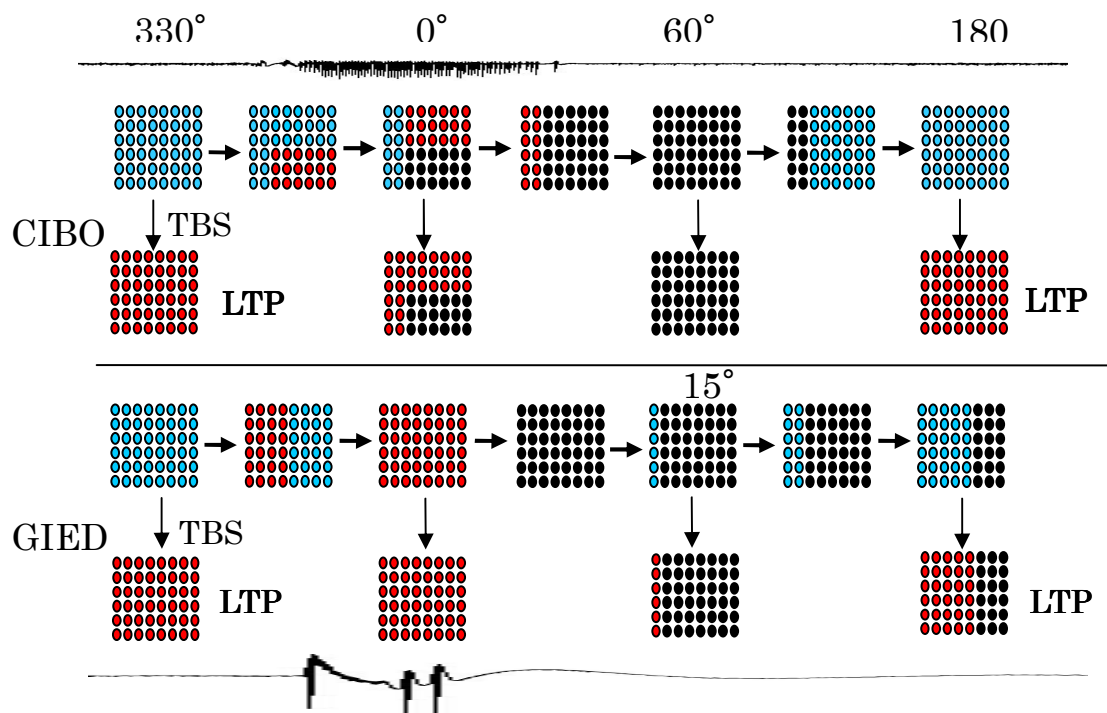


図 4-2. 神経細胞の興奮性と LTP もしくは LTD 現象 CA1 部位

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始多大なる御指導ならびに御鞭撻を承りました、夏目季代久教授に心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、本研究を進めるにあたって、常日頃ご援助頂きました夏目研究室の全ての皆様に感謝致します。

## 参考文献

- [1]Buzsaki G. ,Rhythms of the brain. Oxford University Press. 2006.
- [2]Kay L. M and Beshel J. ,A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. *J. Neurophysiol.* 2010; 104:829-39.
- [3]Grossberg S. ,Beta oscillations and hippocampal place cell learning during exploration of novel environments. *Hippocampus.* 2009; 19:881-885.
- [4]Winson J. ,Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science.* 1978; 201:160-63.
- [5]Holscher C. ,Anwyl R. ,Rowan M. J. ,Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo. *J. Neurosci.* 1997; 17:6470-6477.
- [6]Abegg M. H. and Natasa S. ,Ehrensgruber M. U. ,McKinney R. A. ,Gahwiler. B. H. ,Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses. *J. Physiol.* 2003; 052662.
- [7]Gallassi R, Epileptic amnesic syndrome: an update and further considerations . *Epilepsia.* 2006; 47(Suppl 2):103-105.
- [8]Williams J. H. and Kauer J. A. ,Properties of carbachol-induced Oscillatory Activity in Rat Hippocampus. I. *Neurophysiol.* 1997; 78:2631-40.
- [9]Arai J. and Natsume K. ,The properties of carbachol-induced beta oscillation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Res.* 2006; 54:95-103.
- [10]Behrens C. J. , Vand Den Boom L. P. ,Heinemann U. ,Effects of the GABAA receptor antagonists bicuculine and gabazine on stimulus-induced sharp wave-ripple complexes in adult rat hippocampusu in vitro. *E. J. Neurosci.* 2007; 25(7):2170-2181.
- [11]Natsume K. and Kometani K. , $\theta$ -activity-dependent and-independent muscarinic facilitation of long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Res.* 1997; 27:335-41.
- [12]Szabadits E. ,Cserep C. ,Szonyi A. ,Fukazawa Y. ,Shigemoto R. ,Watanabe M. . ,Itohara S. ,Freund T. F. ,Nyiri G. ,NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. *J. Neurosci.* 2011; 31(16):5893-904.
- [13]Hasselmo M E. ,Schnel E. ,Barkai E. ,Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J. Neurosci.* 1995; 15:5249-5262.
- [14] Hasselmo M E. ,Wyble B. P. ,Free recall and recognition in a network model of the hippocampus: simulating effects of scopolamine on human memory function. *Behav. Brain Res.* 1997; 89:1-34.

- [15]Lisman J E. and Otmakhova N A. ,Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus*. 2001; 11:551-568.
- [16]Morris R. G. M. ,Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 1981; 12:239-60.
- [17]Bland B. H. ,The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Progress in Neurobiology*, 1986;26(1):1-54.
- [18]Hasselmo M. E. ,What is the function of hippocampal theta rhythm?-Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus*, 2005;15(7):936-949.
- [19]Berke J. D. ,Hetrick V. ,Breck J. ,Greene R. W. ,Transient 23-30 Hz oscillations in mouse hippocampus during exploration of novel environments*Hippocampus*, 2008; 18(5):519-29.
- [20]Martin C. ,Beshel J. ,Kay L. M. ,An olfacto-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning. *Journal of Neurophysiol*, 2007; 98(4):2196-205.
- [21]Bibbig A. and Traub R. D. ,Whittington MA. 2002. Long-range synchronization of gamma and beta oscillations and the plasticity of excitatory and inhibitory synapses: a network model. *J. Neurophysiol*. 2002; 88(4):1634-54.
- [22]Lisman J. ,The theta/gamma discrete phase code occurring during the hippocampal phase precession may be a more general brain coding scheme. *Hippocampus*, 2005; 15(7):913-22.
- [23]Commins S. ,Anderson M. ,Gigg J. ,O'Mara S. M. ,The effects of single and multiple episodes of theta patterned or high frequency stimulation on synaptic transmission from hippocampal area CA1 to the subiculum in rats. *Neuroscience Letters*, 1999; 270:99-102.
- [24]Huerta P. T. and Lisman J. E. ,Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron*, 1995; 15:1053-63.
- [25]Hwang S. K. and Hirose S. ,Genetics of temporal lobe epilepsy. *Brain & Development*, 2011; 15(19).
- [26]Butler C. R. and Zeman A. Z. ,Recent insights into the impairment of memory in epilepsy: transient epileptic amnesia, accelerated long-term forgetting and remote memory impairment. *Brain*. 2008; 131(Pt 9):2243-63.
- [27]Engel J. and Pedley T. A. ,*Epilepsy a comprehensive textbook*. 2nd ed.Philadelphia. 2008.
- [28]Kleen J. K. ,Scott R. C. ,Holmes G. L. ,Lenck-Santini P. P. ,Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats. *Ann. Neurol*. 2010; 67(2): 250-57.

- [29] Grover L. M. , Kim E. , Cooke J. D. , Holmes W. R. , LTP in hippocampal area CA1 is induced by burst stimulation over a broad frequency range centered around delta. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009; 16: 69-81.
- [30] Waldbaum S. and Dudek F. E. , Single and repetitive paired-pulse suppression: A parametric analysis and assessment of usefulness in epilepsy research. *Epilepsia*. 2009; 50(4): 904-916.
- [31] Ji J. , Zhang X. , Li B. ,  $\beta$ -adrenergic modulation of in vivo long-term potentiation in area CA1 and its role in spatial learning in rats. *Science in China. Series C*. 2003; 46(6): 605-14.
- [32] Alzoubi K. H. , Alesia A. M. , Alkadhi K. A. , The sliding threshold of modification on hypothesis: Application to the effect of hypothyroidism or chronic psychosocial stress and nicotine on synaptic plasticity. *Neuroscience Letters*, 2008; 430:203-206.
- [33] Binstock E. L. , Cooper L. N. , Munro W. P. , Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(38):16697-702.
- [34] Morgan S. L. and Teyler T. J. , VDCCs and NMDARs Underlie Two Forms of LTP in CA1 Hippocampus In Vivo. *The American Physiological Society*. 1999; 99:10022-3077.
- [35] Ge Y. , Dong Z. , Bagot R. C. , Howland J. G. , Philips A. G. , Wong T. P. , Wang Y. T. , Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Neurosci*. 2010; 107(38):16697-16702.
- [36] Abegg M. H. , Savic N. , Ehrenguber M. U. , McKinney R. A. , Gähwiler B. H. , Epileptiform activity in rat hippocampus strengthens excitatory synapses. *J. Physiol*. 2004; 554(Pt 2):439-48.
- [37] MacIver M. B. , Harris D. P. , Konopacki J. , Roth S. H. , Bland B. H. , Carbachol induced rhythmical slow wave activity recorded from dentate granule neurons in vitro. *Proc West Pharmacol*, 1986; Soc 29:159-61.
- [38] Shimono K. , Brucher F. , Granger R. , Lynch G. , Taketani M. , Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J. Neurosci*. 2000; 20(22):8462-73.
- [39] Konopacki J. , Maciver M. B. , Bland B. H. , Roth S. H. , Theta in hippocampal slices: relation to synaptic responses of dentate neurons. *Brain Res. Bull*. 1987; 18:25-27.
- [40] Sokal D. M. , Mason R. , Parker T. L. , Multi-neuronal recordings reveal a differential effect of thapsigargin on bicuculline- or gabazine-induced epileptiform excitability in rat hippocampal neuronal networks. *Neuropharmacology*. 2000; 39(12):2408-2417.

- [41] Sokal D. M. ,Mason R. ,Parker T. L. , Multi-neuronal recordings reveal a differential effect of thapsigargin on bicuculine- or gabazine-induced epileptiform excitability in rat hippocampal neuronal networks. *Neuropharmacology*, 2000; 39:2408-2417.
- [42] Larson J. and Lynch G. ,Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the induction of synaptic potentiation by burst stimulation patterned after the hippocampal  $\theta$ -rhythm. *Brain Research*. 1988; 441:111-118.
- [43] 神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座神経発生学分野, 神経回路標識法プロトコル集. URL:[http://www.med.kobe-u.ac.jp/anat01/education/neuroanat/index\\_assets/doctor\\_neuroanat\\_chap2.pdf](http://www.med.kobe-u.ac.jp/anat01/education/neuroanat/index_assets/doctor_neuroanat_chap2.pdf).
- [44] 鈴木 亮, 英語リズム学習脳波検出システムにおけるウェーブレット法の検討. (修士論文) 2007.
- [45] Jonathan M. Auerbach and Menahem Segal, Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *Journal of Physiology*. 1996;492.2:479-493.
- [46] 太田 好徳, カルバコール誘導  $\beta$  振動におけるグルタミン酸受容体の関与. (修士論文) 2007
- [47] Tsien J. Z. ,Huerta P. T. ,Tonegawa S. ,The essential Role of hippocampal CA1 NMDA.receptor-Dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 1996; 87:1327-1338.
- [48] Rolls E. T. ,A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*, 1996; 6(6):601-20.
- [49] Zynyuk L. ,Huxfer J. ,Muller R. U. ,Fox S. E. ,The presence of a second rat has only subtle effects on the location-specific firing of hippocampal place cells. *Hippocampus*, 2011; hippo.20977.
- [50] Woodson W. ,Nitecka L. ,Ben-ari Y. , Organization of the GABAergic System in the Rat Hippocampal Formation: A Quantitative Immunocytochemical Study. *J. Comparative Neurology*. 1989; 280:254-71