

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：34436

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430013

研究課題名(和文) インビボホールセル記録による無麻酔ラット皮質ニューロン膜電位と脳波との連関の解析

研究課題名(英文) In vivo whole-cell patch-clamp analysis of correlation between ECoG and the membrane potentials of cortical neurons in awake rats.

研究代表者

塚元 葉子(藤原葉子)(Fujiwara-Tsukamoto, Yoko)

羽衣国際大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：90209130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳波とは大脳皮質に発生するリズム性電位変化の集合であり、樹状突起に起こるシナプス後電位の集積であると教科書的には言われている。しかし、いまだその波形の成り立ちは詳細に解明されていない。従来の研究では、技術的な問題から麻酔下動物の記録しか安定せず、覚醒動物の様々な脳波とニューロン膜電位変化との比較は困難であった。本研究では、無麻酔覚醒ラットの前肢レバー押し運動中の脳波とニューロン膜電位を同時誘導し、両者の連関を解析することを試みた。技術的困難は克服され解析に耐えうるデータ取得に成功した。無麻酔ラットの脳波とニューロン膜電位の間には高い相関があり、それが行動の局面によって変動することが分かった。

研究成果の概要(英文)：It is said that electrocorticogram (ECoG) reflects the summation of the synchronous activity of post synaptic potentials occurred in cortical neurons. However, the generation mechanisms of ECoG isn't elucidated in detail yet. Since the movement of animals causes the failure of stable whole-cell patch-clamp recordings, the comparison of the fluctuations of membrane potentials with ECoG without anesthesia has been difficult. In this study, we succeeded in stable simultaneous recordings of ECoG and the membrane potentials of pyramidal cells in cortical M1 area or of medium spiny neurons in striatum in awake, task-performing rats. We observed high correlation between membrane potential fluctuations and the wave form of ECoG, and its behavior-related changes were apparent.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳波 大脳皮質 錐体細胞 線条体 中型有棘神経細胞 インビボ パッチクランプ 無麻酔

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、海馬および大脳皮質における急性スライス標本を用いて、ホールセルパッチクランプ法により錐体細胞および種々の介在細胞の膜電位記録を行い、「脳リズム活動の発現メカニズム」について細胞レベルでの解析を行ってきた。同時ダブルパッチ法、リパッチ法、グラミシジンパッチ法など、スライス標本で行える様々なパッチクランプ技術を駆使し、錐体細胞群の同期的律動的発火のもととなる基本リズムが、介在細胞ネットワークによって形成され得ることを明らかにした。しかし、これらの実験結果はあくまでも、スライス標本という限られたニューロンネットワークについての、局所てんかんなどを反映する病理学的な知見と考えられる。しかも、細胞のおかれた環境が人工的であることから、脳波をはじめとした脳リズム活動の発現メカニズムについて、一般的な説明ができるわけではないことは認識していた。

(2) 研究開始時期に、研究代表者の所属していた玉川大学脳科学研究所の礪村研究室では、無麻酔脳定位固定状態でラットに前肢のレバー押し運動を効率的に学習させ、課題運動遂行中のラットの大脳皮質神経活動の細胞外記録を行うという、従来不可能とされてきた実験方法が確立されつつあった。研究代表者が過去十数年間にわたって研鑽を積んできたスライス標本でのホールセルパッチクランプ技術をこの実験系に適用し、インピボの膜電位記録を試験的に行ったところ、麻酔下はもとより無麻酔運動課題遂行中でも錐体細胞の膜電位記録が可能であり、行動の局面に依存して膜電位上に解析可能なシナプス入力や活動電位が観察されることが分かった。

そこで、脳波の波形の成り立ちに貢献する神経活動の詳細を明らかにする目的で、前肢運動(レバー押し運動)課題遂行中ラットの一次運動野の前肢領域における錐体細胞あるいは介在細胞の膜電位と同領域の皮質脳波(ECoG)を同時誘導することにより、両者の活動の連関を解析できないかと考えた。

(3) 脳波は、大脳皮質の広範囲のニューロンに発生するリズム性の電位変化を巨視的にとらえたもので、様々な周波数帯域の波形から構成されるものである。現象論的に、脳波がさまざまな高次機能と密接に関連した周波数を示すことが分かっており、その「電位変化」は、「樹状突起に起こるシナプス後電位が集積されたもの」と教科書的には説明されている。しかし、活動電位発生への寄与が全く否定されているわけでもなく、その波形の成り立ちについての詳細は明らかになっていない。したがって、当然ながら、大脳皮質ニューロンのうち、2/3層、および5層の錐体細胞、さらに介在細胞のうちの、どの二

ューロンへの入力や脳波波形に対する貢献度の高いものなのか、あるいは、皮質のどの局所神経回路の活動が脳波に一番貢献しているのか、線条体の影響はどのぐらいなのか、などの疑問に答えられるような知見も皆無であった。このように解明が進まない背景には、閾値以下の膜電位軌跡をin vivo標本から取得することの電気生理学的な困難さがある。特に覚醒動物が様々な高次機能を発現している際には、動物の動きに合わせて脳が動いてしまうためパッチが外れやすく、個々のニューロンの膜電位を長時間記録することは極めて難しいと言われていた。実際、当時「麻酔下」において皮質ニューロン膜電位と脳波を同時誘導した報告は多数あったが、「無麻酔」の動物において脳波とニューロン膜電位について検討した報告は希少であり、「課題運動遂行中」の動物において検討した報告は見当たらなかった。

2. 研究の目的

(1) 1で述べたような背景から、覚醒動物で、脳定位固定状態の運動課題遂行中ラットから、錐体細胞膜電位と皮質脳波の同時誘導を行い、集合電位として記録される脳波の波形と、細胞内記録でなければ得られない閾値以下のシナプス入力や膜電位軌跡の関連を検討することを目的として研究計画が立てられた。一次運動野の錐体細胞には、レバー押し運動の各局面に特異的に発火する様々なタイプがあることがすでに分かっていたが、これはあくまでも細胞外記録の結果、つまり活動電位の有無のみの情報であり、発火閾値以下でのシナプス入力やどのように観察されるかはいまだ明らかではなかった。前肢運動中に発現するガンマ波の周波数が、レバー押し運動の局面によって異なる可能性も示されつつあり、これらを手掛かりとしてシナプス入力による閾値下の膜電位変動を解析し、脳波の波形の成り立ちに関する基礎的なデータを得て脳内神経活動の機序と機能の解明につながる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Long-Evans ラット(約200g)を馴化させた後、イソフルラン吸入麻酔下でスライド式頭部固定具と脳波用電極ならびに接地・参照電極を頭蓋骨に取り付ける手術を行った。手術回復後、飲水制限したうえで脳定位固定オペラント訓練装置を使って頭部固定状態での前肢レバー操作課題の訓練を施した。この課題は約3~5日間で学習することが可能であり、玉川大学・礪村研究室と同様、月4~8頭の訓練完了ラットを行動・生理記録実験に効率よく供給できる体制を同志社大学・藤山研究室においても整えた。

(2) 訓練完了後、一次運動野の前肢領域直上の頭蓋骨と硬膜を開窓し、あらかじめ手術

時に仮留置しておいた脳波用電極を挿入固定することにより、安定した皮質脳波が記録できるようにした。そして運動課題遂行中に、バイオサイチン 5mMを含むパッチ電極内液を詰めたガラス微小電極を慎重に皮質内に挿入して、錐体細胞をホールセルパッチ記録し、運動に関連した活動を記録した。当初の目的は皮質ニューロンであったが、電極をさらに進めて線条体まで刺入しても、中型有棘神経細胞から膜電位記録できることが分かった。そこで、電極形状の改良等を行い、脳表面から3mm以上深い位置からも安定的な膜電位記録ができるように工夫した。このように、大脳皮質錐体細胞と線条体中型有棘神経細胞の両者をターゲットに実験を行った。

得られた電気生理学的データ（膜電位、皮質脳波、レバーの動きの同時誘導）はすべてコンピュータのデジタルメモリに格納し、解析を行った。

(3) 記録終了後は灌流固定し脳を取りだし切片下ののち、ディアミノベンジジン (DAB) を発色基質としたアビジン - ビオチン複合体 (ABC) 法により記録細胞を可視化し、その存在位置や形態的特性による細胞種を同定した。中型有棘神経細胞のサブタイプ同定を行う際には、免疫組織化学的手法によりサブタイプ特異的マーカー (プレプロエンケファリン) を染色した (同志社大学・藤山教授との連携研究)。

4. 研究成果

(1) 研究期間中、運動課題訓練に成功し電気生理学実験を行えたのは 88 匹であった。そのうち、解析に耐えうる十分な時間、安定的な膜電位記録に成功したのが 57 ニューロン、中でも特に状態の良い例は 34 ニューロンであった。

(2) 5 層錐体細胞からは、レバー押し運動のレバーを引くタイミングに発火するニューロンの膜電位と、レバーを押すタイミングに発火するニューロンの膜電位記録に成功した (図 1)。

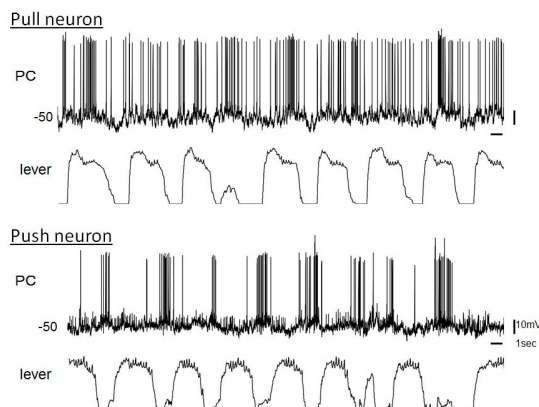


図 1. 前肢レバー押し運動関連ニューロン

磯村研究室における細胞外記録の実験から、このようなタイプのニューロンが存在することは分かっていたが、発火閾値以下の膜電位変化やシナプス入力を観察されたのは大きな進歩と考えられる。

(3) 実験中、動物は常にレバー押しをしているのではなく、むしろ長い休憩時間の合間に渴きをいやすために短時間レバー押し運動による飲水をしていた。この長い休憩時間の間には睡眠もするが、明らかに覚醒状態でありながら無動である場合があった。このような状態では、high voltage spindle (HVS) と呼ばれる 7-12 Hz の大きな振動活動が脳波に見られることが報告されていた。本研究においても HVS 様の大きな振動活動が観察された (図 2)。その際、5 層錐体細胞の膜電位にも大きな膜電位オシレーションが惹起され、閾値を超えて活動電位が発生する場合もあった。

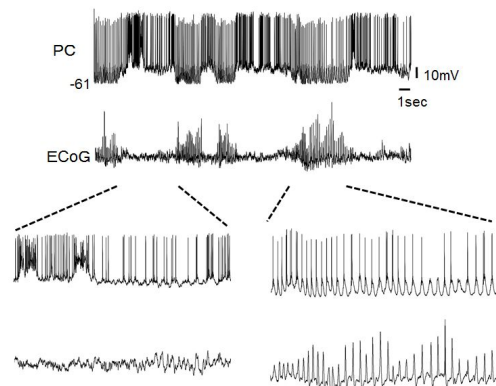


図 2. 無動状態における HVS 様振動活動

(4) 大脳皮質 5 層錐体細胞よりも深い位置に存在する線条体中型有棘神経細胞の安定的な膜電位記録にも挑戦し、成功した (図 3)。皮質脳波との関連については、現在定量的かつ詳細な解析を行っている。

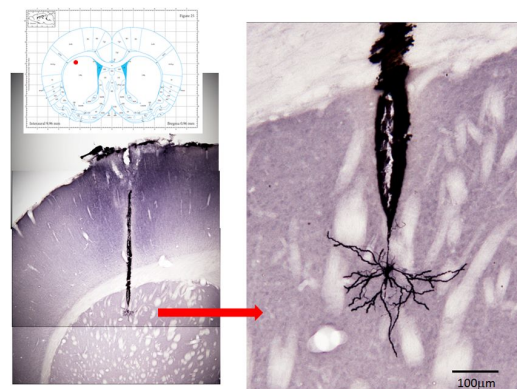
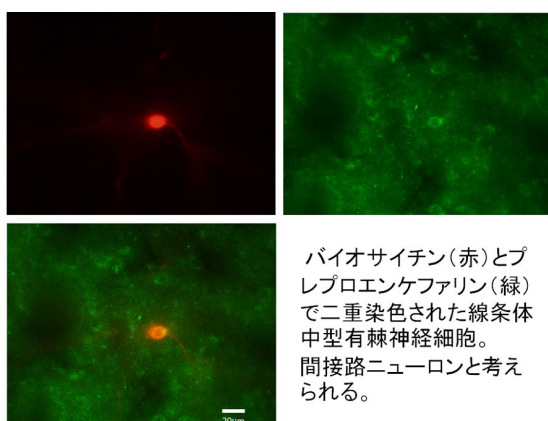


図 3. 膜電位記録した線条体中型有棘神経細胞

5 層錐体細胞や中型有棘神経細胞の膜電位に見られる振動のうち、過分極方向の振れが GABA 作動性シナプス入力によりもたらされる過分極なのかどうかを確かめるために、パ

ツチ電極内液を高 Cl 溶液にしてホールセルパッチクランプを行った。この条件下では、GABA の逆転電位が上昇し、GABA 入力 that 脱分極性になるはずであったが、膜電位の軌跡は高 Cl 内液でも低 Cl 内液でもあまり違いがあるようには見えなかった。したがって、膜電位の過分極性の振れは、必ずしも GABA 作動性の抑制性シナプス入力によるものではないのかもしれないと考えている。

(5) 膜電位記録の成功した線条体中型有棘神経細胞が、大脳皮質-大脳基底核ループの直接路と間接路どちらのニューロンなのかを識別する目的で、間接路ニューロンに特異的に発現しているプレプロエンケファリン (PPE) とバイオサイチンとの二重染色を試みた (図 4)。



バイオサイチン(赤)とプレプロエンケファリン(緑)で二重染色された線条体中型有棘神経細胞。間接路ニューロンと考えられる。

図 4 . PPE 陽性の記録ニューロン

このように、無麻酔運動課題遂行中のラットにおいて、インビボホールセルパッチクランプ法により、皮質錐体細胞や線条体中型有棘細胞からの膜電位記録が可能であり、解析に耐えうる時間長のデータが取得できることが明らかとなった。また、組織学的手法を用いた神経回路内のニューロンの同定も可能であった。得られた電気生理学的データに関しては、現在詳細な解析が連携研究者である玉川大学磯村教授の指導のもと、続けられている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Saiki A, Kimura R, Samura T, Fujiwara-Tsukamoto Y, Sakai Y, Isomura Y (2014) Different modulation of common motor information in rat primary and secondary motor cortices. *PLoS ONE* 9(6): e98662. 査読有
DOI:10.1371/Journal.pone.00983662

Moriya K, Endoh K, Fujiwara-Tsukamoto Y, Ichikawa M (2013) Three-dimensional reconstruction of electron micrographs

reveals intrabulbar circuit differences between accessory and main olfactory bulbs. *Frontiers in Neuroanatomy* 7(Article 5):1-8 査読有

DOI:10.3389/fnana.2013.00005

〔学会発表〕(計 5 件)

荒田晶子、西山紋恵、伊藤真理、塚元葉子 発達初期におけるオキシトシンの呼吸神経回路に対する効果 (2015) 第 68 回日本自律神経学会

Akiko Saiki, Rie Kimura, Yoko Fujiwara-Tsukamoto, Yutaka Sakai, Yoshikazu Isomura (2014) Different modulation of common information in rodent primary and secondary motor cortices. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, Japan

Rie Kimura, Akiko Saiki, Yoko Fujiwara-Tsukamoto, Yutaka Sakai, Yoshikazu Isomura (2014) Population characteristics of spike synchrony in rat motor cortices during movement task. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, Japan

Akiko Saiki, Rie Kimura, Yoko Fujiwara-Tsukamoto, Yutaka Sakai, Yoshikazu Isomura (2013) Neuronal ensemble activity of motor control with different forces in rat caudal and rostral forelimb areas. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan

Rie Kimura, Akiko Saiki, Yoko Fujiwara-Tsukamoto, Yutaka Sakai, Yoshikazu Isomura (2013) Cooperative multineuronal spike activities related to externally- and internally- initiated movements in rat primary and secondary motor cortices. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

塚元葉子 (藤原葉子)

(FUJIWARA-TSUKAMOTO, Yoko)

玉川大学脳科学研究所嘱託研究員

(平成 26 年度まで)

羽衣国際大学人間生活学部食物栄養学科・准教授 (平成 27 年度より)

研究者番号 : 9 0 2 0 9 1 3 0

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

磯村宜和 (ISOMURA, Yoshikazu)

玉川大学脳科学研究所・教授

研究者番号：00415077

藤山文乃 (FUJIYAMA, Fumino)

同志社大学脳科学研究科・教授

研究者番号：20244022