

脳高次機能維持標本を用いた悪影響評価の研究

分担研究者 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・研究員
分担研究者 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・第2室室長

研究要旨

脳内で記憶を司ることが知られている海馬のスライス標本を作製し、神経連絡等の機能を維持した状態で培養を行なった。この海馬培養系は外部からの電気刺激に応答し、生理的な神経回路に沿った興奮の伝播が観察された。また、グルタミン酸を適用することにより、虚血時に観察されるような部位特異的な神経細胞死が観察された。このことから、この海馬スライス標本は脳の情報処理機能を保持しており、また、神経障害等の悪影響の評価に適した標本であることが示された。

A. 研究目的

神経間連絡等の生理的機能を維持した状態の脳標本を作製し、内分泌攪乱物質のヒトをはじめとする高等動物の脳機能への影響を評価できる系を確立する。3年計画の初年度である本年度では、脳内で記憶を司る海馬の培養スライス標本を作製し、評価系としての有用性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

海馬スライスはインターフェイス法により培養した。ラットより脳を摘出し、厚さ200 μ mの海馬スライスを作製した。海馬スライスを膜上に置き、培養液中、37 $^{\circ}$ Cにて10日間培養した。神経細胞膜電位の光学的測定では、培養した海馬スライスを膜電位感受性色素で染色した。dentate gyrusを電気刺激し、CA3、CA1に至る神経回路を介する膜電位の変化を記録した。神経細胞障害の光学的測定では、培養した海馬スライスを染色し、共焦点顕微鏡を用いた観察により細胞の障害性を検討した。生細胞はflurecein diacetate, 死細胞はpropidium iodideにより染色し、両者の結果を比較して障害性を決定した。

(倫理面への配慮)

1匹のラットより多数（通常12枚）のスライスを作製することにより、使用する動物の数を抑えた。また、動物を死亡させる際には当研究所の実験動物倫理委員会の規定に従い、与える苦痛が最小限となる方法を用いた。

C. 研究結果

膜電位感受性色素を用いた実験では、神経回路に沿った膜電位変化が記録された。膜電位変化には早い成分と遅い成分が認められた。神経伝達を

抑制することが知られている内因性活性物質であるアデノシンはこの膜電位変化の振幅を低下させた。同様の抑制は、ATP, ADP, AMPによっても観察され、また、これらの物質の作用はアデノシンへの代謝を介することが確認された。神経細胞障害性を調べる実験では、神経細胞死を誘発することが知られている内因性活性物質であるグルタミン酸により生細胞の減少、死細胞の増加が観察された。また、このグルタミン酸による障害性はCA1領域で最も強く認められた。

D. 考察

膜電位感受性色素により検出された膜電位変化は神経興奮の伝導・伝達を反映しており、この標本が生理的な機能を保持していることを示している。また、アデノシンおよびATP等の関連化合物による抑制が観察されたことから、神経興奮の修飾およびアデノシンへの代謝という脳内で必須な機能をもこの系は維持していることが確認された。グルタミン酸による神経細胞障害はCA1領域に選択的であり、生体内での虚血に伴う部位選択的障害と同様の傾向が認められた。このことから、この標本が神経に対する悪影響を検討するのに適した系であることが示された。

E. 結論

本年度の研究により培養海馬スライス標本は脳の生理的な高次機能を保持した系であることが確認され、また、この標本は神経細胞障害等の脳への悪影響を検討するのに適した系であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Sato, K. and Matsuki, N., "HSP70 protects pyramidal neurons in the hippocampus and may modulate region-dependent vulnerability"
29th Annual Meeting of Society for Neuroscience
(1999) (北米神経科学会)

2) 佐藤薫, 中澤憲一, 松木則夫, 大野泰雄,
“培養海馬切片における電氣的興奮伝播に対するATPの作用の光生理学的解析”
第72回日本薬理学会年会 (1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし