

海馬苔状線維－CA3野長期増強発現機序およびムスカリン
受容体サブタイプM₁、M₂を介した調節機構に関する
電気生理学的研究

1997

前田 武彦

目次

緒言	1
第一章 海馬苔状線維-CA3野長期増強のコリン作動性薬物による調節	4
実験方法	5
実験結果	7
考察	16
第二章 海馬コリン作動性神経系破壊の苔状線維-CA3野長期増強に対する影響	18
実験方法	19
実験結果	21
考察	27
第三章 パッチセンサー法を用いた単一電気刺激により誘発される海馬切片 グルタミン酸遊離の検出および海馬長期増強発現機序の解明	29
第一節 単一電気刺激により誘発される興奮性アミノ酸遊離の パッチセンサーによる検出	
実験方法	31
実験結果	33
考察	39
第二節 パッチセンサー法を用いた海馬長期増強発現機序の解明	
実験方法	41
実験結果	43
考察	47
総括および結論	48
謝辞	49
発表論文目録	50
引用文献	51

緒言

高齢人口の増加に伴い、老年痴呆症が医療上および社会的に問題となっており、その治療薬の開発が急務となっている。アルツハイマー病は老年痴呆症を呈する代表的な疾患の一つであるが、その剖検脳の知見によれば大脳辺縁系の一部である海馬は老年変化の一つである原繊維変化が早期にかつ最も多発する部位であり、本疾患の早期にみられる記憶障害との関連が示唆されている。さらに、海馬の外科的切除を受けた癲癇患者や実験動物においても記憶障害を生じることから、海馬は「記憶の座」として提唱されている。その海馬における、コリン作動性神経は記憶障害と深く関与することが示されている。例えば、アルツハイマー病患者の海馬におけるコリン作動性神経機能が低下していること、また、海馬コリン作動性神経系の外科的破壊およびコリン作動性神経伝達を遮断する薬物の処置により記憶障害が誘発されることが明らかにされている。これら臨床および基礎研究の知見から、コリン作動性神経系が海馬における学習・記憶の成立過程に影響を与えられていると考えられている。

海馬における神経回路網について、以下に示す興奮性シナプスが知られている。内嗅野からの海馬への入力線維（貫通線維）→歯状回顆粒細胞→（苔状線維）→CA3野錐体細胞→（シャファー側枝）→CA1野錐体細胞。これら全てのシナプスでは、シナプス前終末から遊離された興奮性アミノ酸（EAA）が、シナプス後細胞膜上のグルタミン酸受容体を活性化することにより、神経情報の伝達が行われている。このシナプス前線維の高頻度刺激により、シナプス伝達効率が長期間にわたり増大することが知られている。この現象は長期増強（long-term potentiation: LTP）と呼ばれており、その可塑的性質から学習および記憶のシナプスレベルにおける基礎過程と提唱されている。しかし、その誘導機序は部位により異なることが明らかにされている。例えば、最も研究が進んでいるシャファー側枝-CA1野では、シナプス後細胞に存在するグルタミン酸受容体サブタイプの一つ、NMDA受容体活性化に基づく細胞内Ca²⁺濃度の上昇が重要であるが、苔状線維-CA3野のLTP誘導は他のシナプスとは異なり、シナプス後細胞の興奮性には依存しないことが報告されている。一方、海馬LTPの発現がシナプス前細胞の興奮性（EAAの遊離増大）あるいは後細胞の興奮性（EAAに対する応答性）

のいずれに基づくかについて、研究者の意見は一致していない。

海馬切片のLTPに影響を与える薬物の研究は、抗痴呆薬のスクリーニングにつながる可能性が示されている。佐藤らは、痴呆症モデル動物における記憶障害を改善する薬物が、海馬LTPにも影響を与えることを明らかにしている。また、その薬物が苔状線維-CA3野のLTPに対してのみ作用を示し、他の経路のLTPには影響を与えないこと、さらに、その作用がムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬であるスコポラミンにより遮断されることを報告している。このことは、その薬物の作用における神経回路特異性とムスカリン性アセチルコリン神経系の関与を示唆するものである。そこで著者はこれに着目し、苔状線維-CA3野LTPのコリン作動性神経系による調節とその機序を明らかにする目的で、以下に示す三つの実験を行った。海馬切片苔状線維-CA3野LTPに対するムスカリン受容体作用薬カルバコールの効果（第一章）。同経路のLTP誘導に対する海馬コリン作動性神経破壊の影響（第二章）。同経路のLTPの発現機序の解明（第三章）。本研究で得られた知見について、以上三章に分けて論述する。

なお、本文中で使用した略号は以下の通りである

Acetyl CoA: Acetyl coenzyme A

ACSF: Artificial cerebrospinal fluid

AF64A: Ethylcholine mustard aziridinium ion

AMPA: (±)- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate

ChAT: Choline acetyltransferase

CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione

DAB: 3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride

D(L)-APV: D(L)-2-amino-5-phosphonovalerate

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid

EGTA: Ethylene glycol bis(β -aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

EPSC: Excitatory postsynaptic current

fEPSP: field excitatory postsynaptic potential

GABA: γ -aminobutyric acid

HEPES: 2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

HPLC: High performance liquid chromatography

i.p.: intraperitoneal injection

NMDA: *N*-methyl-D-aspartate

PBS: Phosphate buffered saline

PKA: Protein kinase A

PKC: Protein kinase C

TPB: Tetraphenylboron

第一章

海馬苔状線維-CA3野長期増強のコリン作動性薬物による調節

中隔野を起始核とするコリン作動性神経は、海馬の錐体細胞及び歯状回顆粒細胞に投射するが、その神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) は重要な生理的役割を果たしていると考えられている[6, 18]。脳内コリン作動性神経機能の低下により学習・記憶の障害が起きることが知られている。例えば、ラット中隔-海馬コリン作動性神経の破壊により学習障害が生じる。この学習障害は、ムスカリン受容体作用薬の投与あるいは胎児中隔野神経の移植により改善される[35]。さらに、アルツハイマー型痴呆患者における記憶障害と、ChATをはじめとするコリン作動性神経の生化学的マーカーの消失の間に相関性が認められている[4, 51]。このことは病態生理学的側面からも、AChが学習・記憶に深く関わることを示唆する。

学習・記憶の基礎過程に関与するとされている海馬のLTPは、諸種の神経伝達物質および向知性薬により影響を受けることが知られている。このうち海馬切片における苔状線維-CA3野シナプスのLTPをムスカリンが抑制することが示されてきた[52]。しかし、ムスカリンのLTP減弱作用の薬理的解析は行われていない。本研究では、モルモット海馬切片の苔状線維-CA3野シナプスのLTPに対する、ムスカリン受容体作用薬であるカルバコール (CCh) の作用について調べた。

実験方法

(1) 海馬切片の作製および記録

雄性成熟モルモット (250-350g) から海馬を摘出し、マイクロスライサー (DTK1600, DOSAKA E.M. Kyoto, Japan) を用いて厚さ500 μ mの切片を作製した。切片は直ちに、33 $^{\circ}$ Cで1時間、95% O₂ + 5% CO₂混合ガスで飽和した、以下の組成からなるACSF中にて、インキューベーションを行った。ACSF (単位 mM) : NaCl 124, KCl 2, KH₂PO₄ 1.24, MgSO₄ 3, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 3, および glucose 10。毎分4.5-5.0 mlの流速にてACSFを灌流する記録用チャンバー内に切片を移して、記録を行った。

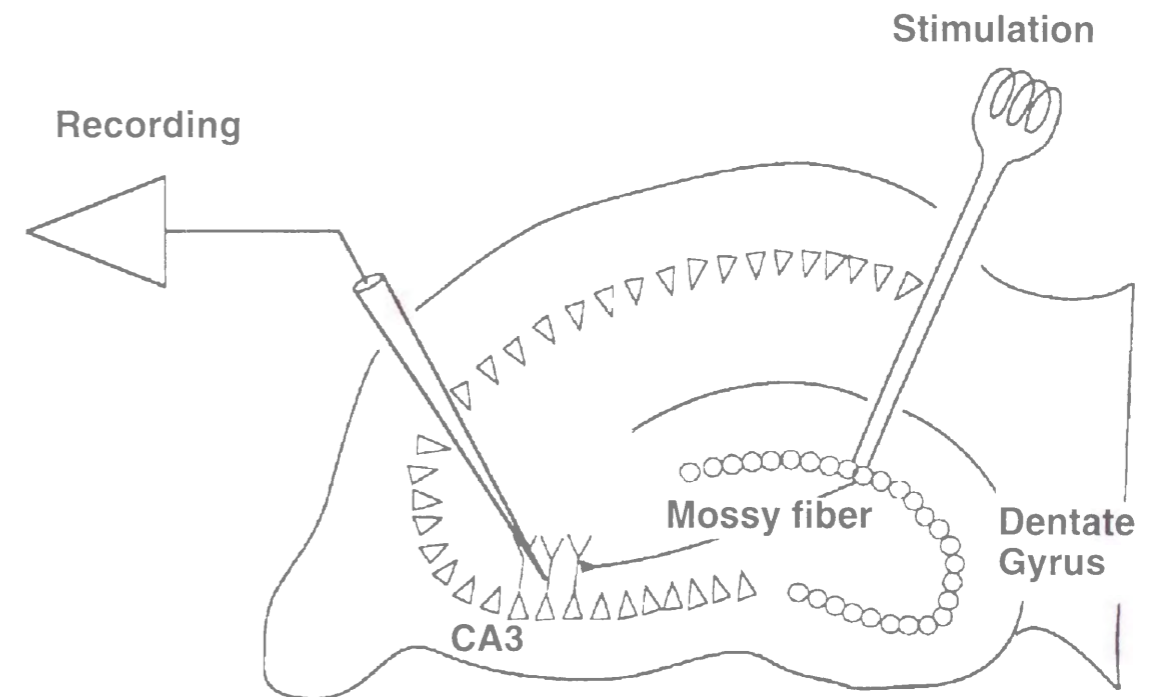


図 1-1 海馬切片における電極の刺入位置

生理的食塩水で満たしたガラス電極をCA3野透明層に刺入し、fEPSPを測定した (図1-1)。白金-イリジウムからなる双極刺激電極を歯状回顆粒細胞層に刺入し、fEPSPの最大振幅の50-60%の大きさを得るように刺激強度を調整し、持続時間100 μ sの矩形波を0.2 Hzで与えた (テスト刺激)。5分毎に10個のfEPSPを記録し、これらを加算平均した。LTPの増大率の計算は二種類の方法で行った。テタヌス刺激28-18分前の3個の加算平均したfEPSPの振幅の平均を基準値として、あるいはテタヌス刺激3分前の

EPSPの振幅の平均を基準値として、増大率を計算した。前者を「増大率」（図1-3および図1-4においてのみ使用）および後者を増大率として示した。

LTPを誘発するために、テスト刺激と同一の電極を用いて苔状線維に33 Hz、5 sの電気刺激を行った（テタヌス刺激）。その後、再びテスト刺激を1時間行った。fEPSPの増大率（%）は、平均値±標準誤差として示した。得られたデータについてMann-Whitney *U*-testあるいはDunn's post testを行い、その結果、危険率が5%未満のとき、統計的有意差があると判断した。

(2) 薬物

使用した薬物を以下に示す。カルバコール（CCh）およびピレンゼピン（Sigma, St. Louis, USA）。D-APV（Tocris, Essex, UK）。アトロピン（Nakalai Tesque, Kyoto, Japan）。AF-DX 116（Dr. Karl Thomae GmbHより供与）。薬物適用は、薬物をACSFに添加し、テタヌス刺激15分前～5分後の20分間にわたり切片を灌流することにより行った。

実験結果

(1) 苔状線維—CA3野シナプスにおけるLTPの誘導

海馬切片苔状線維のテスト刺激により、CA3野透明層においてfEPSPが誘発された。このfEPSPは単シナプス成分からなり、刺激のアーチファクトから応答の開始までの潜時が7～8 msを示した。テタヌス刺激前のfEPSPの平均振幅は、 0.75 ± 0.02 mV（*n*=85）であった（図1-2）。苔状線維のテタヌス刺激によりfEPSPの増大が1時間以上にわたり観察された。テタヌス刺激62分後におけるfEPSPの「増大率」は、 57.3 ± 2.6 %（*n*=13）であった（図1-3）。

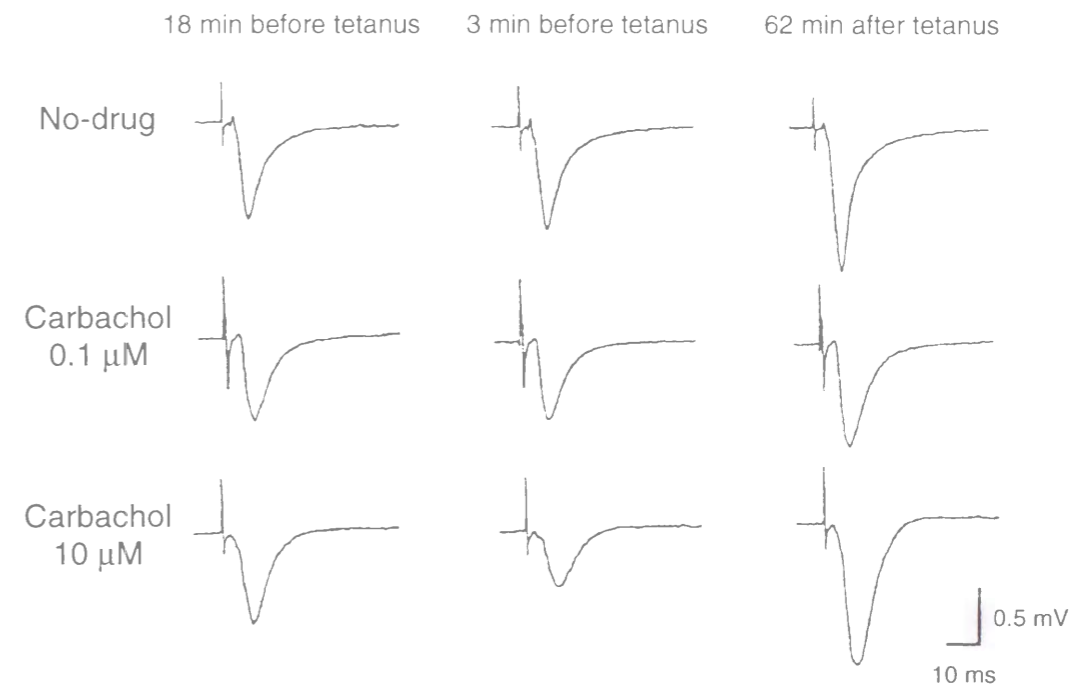


図 1-2 苔状線維—CA3野のLTPに対するカルバコール（CCh）の効果

CA3野透明層から細胞外記録されるfEPSPの典型例。CChはテタヌス刺激15分前から5分後まで切片に灌流適用した。

(2) 苔状線維-CA3野シナプスのLTPに対する低濃度カルバコールの減弱効果
 ムスカリン受容体作用薬であるCCh (0.01および0.1 μ M) を海馬切片に灌流適用した (図1-2および1-3)。低濃度のCChはテタヌス刺激前のテスト刺激により誘発されるfEPSPには影響を与えなかった。適用開始12分後における「増大率」は、0.01 μ M適用時には1.9 \pm 0.9% (n=4) および0.1 μ M適用時には0.8 \pm 0.3% (n=6) であった。テタヌス刺激62分後における「増大率」は、0.01 μ M適用時には30.6 \pm 3.2% および0.1 μ M適用時には28.3 \pm 1.8% であった。

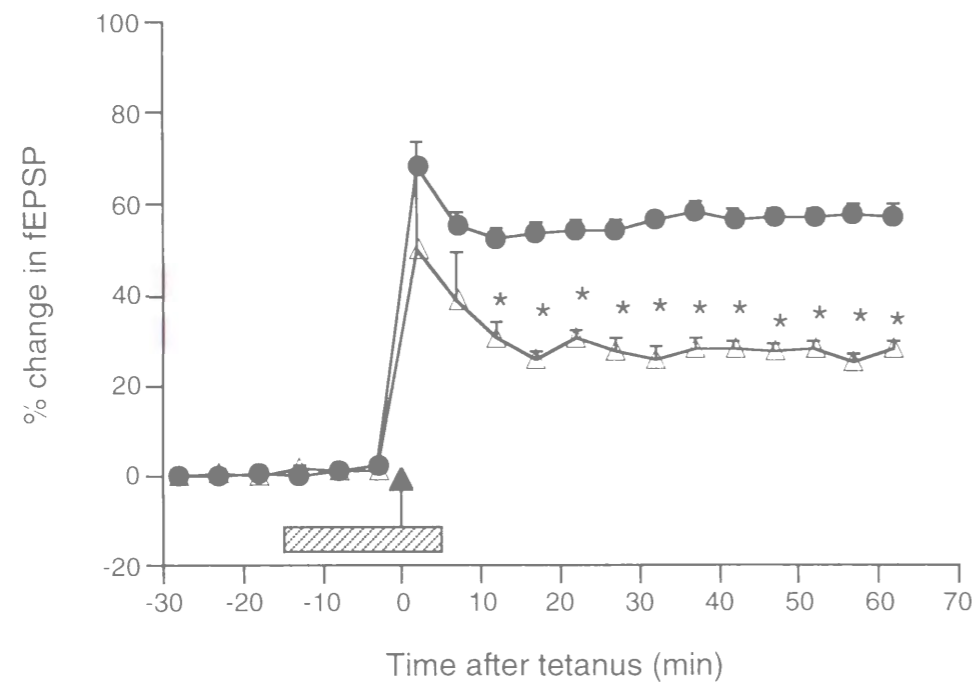


図 1-3 苔状線維-CA3野のLTPに対する低濃度CChの効果の経時変化
 横軸はテタヌス刺激後の時間。縦軸はfEPSP振幅の「増大率」を示す。
 ●、薬物未処置 (n=13)。Δ、0.1 μ MのCCh処置 (n=6)。fEPSP振幅の「増大率」は、テタヌス刺激28分前、23分前、および、18分前のfEPSP振幅の平均値を基準値として計算した。Barに示した時間帯にCChを適用した。テタヌス刺激は矢印に示す時間に行った。* $P < 0.05$ vs. 薬物未処置。

(3) 苔状線維-CA3野シナプスのLTPに対する高濃度カルバコールの増大効果
 高濃度のCCh (1および10 μ M) を海馬切片に灌流適用したとき、テタヌス刺激前のfEPSPの振幅は、波形および潜時が変化することなく用量依存的に減少した (図1-2)。適用開始12分後における平均振幅は、1 μ M適用時には14.3 \pm 0.2% (n=4) および10 μ M処置時には34.5 \pm 0.4% (n=7) だけ、適用開始前に比べて、それぞれ減少した。テタヌス刺激後、高濃度のCChで処置した切片におけるfEPSPは、徐々に増大した。10 μ Mの処置切片におけるテタヌス刺激7分後の「増大率」は、10.5 \pm 8.6%であったが、62分後は57.3 \pm 7.7%であり、薬物未処置の「増大率」とほぼ同じ値であった (図1-4)。高濃度のCCh処置切片におけるテタヌス刺激62分後の増大率をテタヌス刺激3分前のfEPSPの振幅を基準値として計算すると、その増大率は149.8 \pm 11.1%であり、薬物未処置切片と比較して高い値となった。

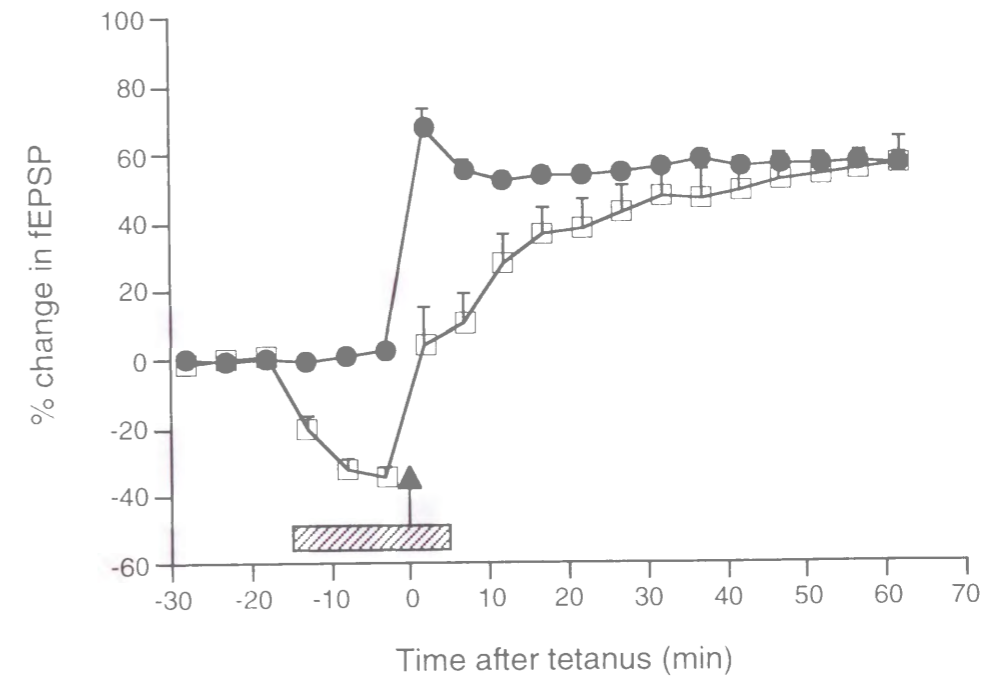


図 1-4 苔状線維-CA3野のLTPに対する高濃度CChの効果の経時変化
 縦軸はfEPSP振幅の「増大率」を示す。●、薬物未処置 (n=13)。□、10 μ MのCCh処置 (n=7)。fEPSP振幅の「増大率」は、テタヌス刺激28分前、23分前、および、18分前のfEPSP振幅の平均値を基準値として計算した。

10 μ MのCChの適用を開始した後、テタヌスを与えずに、薬物を含まないACSFで灌流しても、薬物灌流終了後のfEPSPの振幅は薬物適用前の振幅に回復するにとどまった。適用開始3分前および適用終了32分後の平均振幅は、それぞれ、0.70 \pm 0.04 mVおよび0.72 \pm 0.05 mVであった (n=3)。また、テタヌス刺激を行うことなく、1 μ MのCChを77分間にわたり切片に適用したとき、その振幅は適用開始12分後で最大に減少した後、顕著な変化はなく安定していた (図1-5)。一方、1 μ MのCChの適用開始15分後にテタヌス刺激を行い、テタヌス刺激62分後までCChの適用を続けた切片は、70.2 \pm 11.1% (n=4) の増大率を示し、この値は、薬物未処置切片の増大率 (41.5 \pm 4.6%、n=4) より有意に高かった (図1-5)。さらに高濃度の10 μ MのCChを持続適用した時、テタヌス刺激22-32分後、多シナプス成分からなるfEPSPが記録され、振幅の正確な測定が行えなくなったため実験を中止した。これらのことより、高濃度のCChによるLTP増大作用は薬物適用終了後のリバウンドによる可能性はないことが示された。

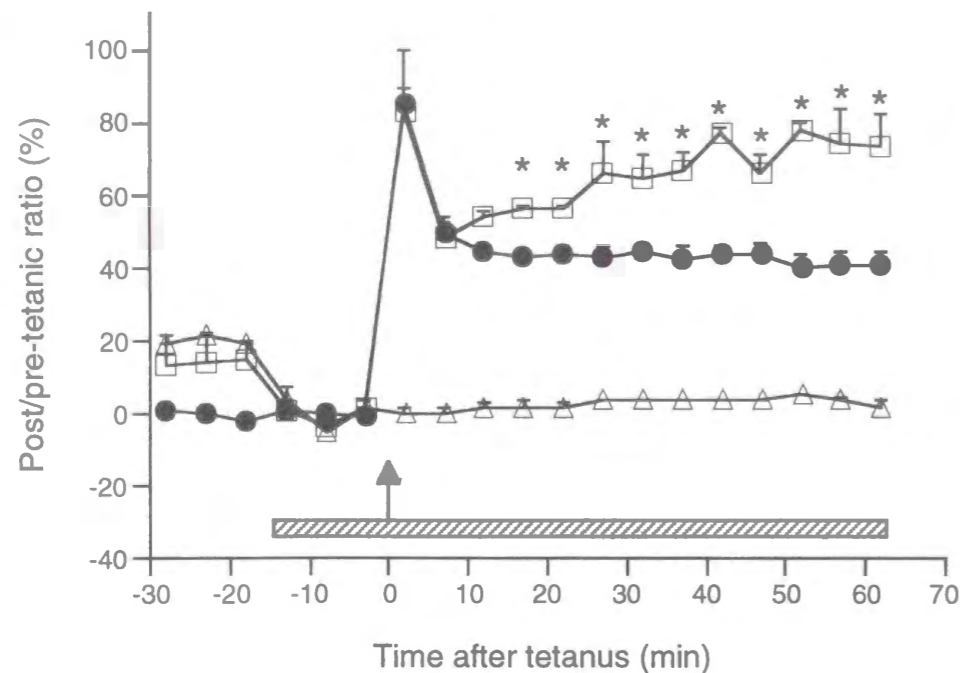


図 1-5 CA3野LTPに対するCCh (1 μ M) の持続適用の効果

●、薬物未処置 (n=4)。△、テタヌス刺激を伴わない1 μ MのCCh処置 (n=3)。□、テタヌス刺激を伴う1 μ MのCCh処置 (n=4)。CChはテタヌス刺激15分前から62分後 (Barで示す時間) まで切片に灌流適用した。縦軸はテタヌス刺激3分前のfEPSP振幅を基準としたときの増大率を示す。* P <0.05 vs. 薬物未処置。

海馬切片の興奮性シナプスにおいて、AChがシナプス前性に作用して、シナプス伝達を抑制することを示唆する報告がなされてきた[23, 48]。高濃度のCChが興奮性シナプスにおけるEAA遊離を抑制すると仮定して、以下に示す実験で、そのテタヌス刺激前のfEPSPのシナプス前性の抑制を補う処置を行った時の、高濃度のCChのLTPに対する影響を調べた。はじめに、薬物未処置切片において電気刺激の強度を減少することにより、fEPSPの振幅を減少させる処置を行った。強度を20%だけ減弱することにより、10 μ MのCCh適用により誘発されるfEPSPの振幅の減少と同程度の減少が観察された。これとは別の薬物未処置切片において、通常は3 mMであるCa²⁺濃度を1.5 mMに低下させたACSF (低濃度Ca²⁺液) で切片を灌流することにより、10 μ MのCCh適用によって誘発されるfEPSPの振幅の減少と同程度の減少が観察された。これらの処置をCCh適用時間に相当するテタヌス刺激15分前から行った。刺激強度を減弱した切片では減弱した強度でテタヌス刺激を行い、テタヌス刺激7分後から、減弱前の強度に戻してテスト刺激を行った。低濃度Ca²⁺液を適用した切片ではテタヌス5分後から通常のACSFにて切片を灌流した。刺激強度の減弱処置および低濃度Ca²⁺液の適用を行った切片はテタヌス刺激62分後に、それぞれ84.9 \pm 3.1% (n=4) および80.4 \pm 8.5% (n=4) の増大率を示し、10 μ MのCCh処置切片における同時点での値 (142.8 \pm 13.8%、n=7) に比べ有意に低かった (図1-6)。

さらに、NMDA受容体拮抗薬であるD-APVの高濃度CChのLTP増大作用に対する影響について調べた。切片に25 μ MのD-APVを10 μ MのCChと同時に適用したところ、テタヌス刺激62分後のfEPSPは143.8 \pm 12.1% (n=4) の増大率を示し、10 μ MのCCh処置切片の場合との間に有意な差はみられなかった。

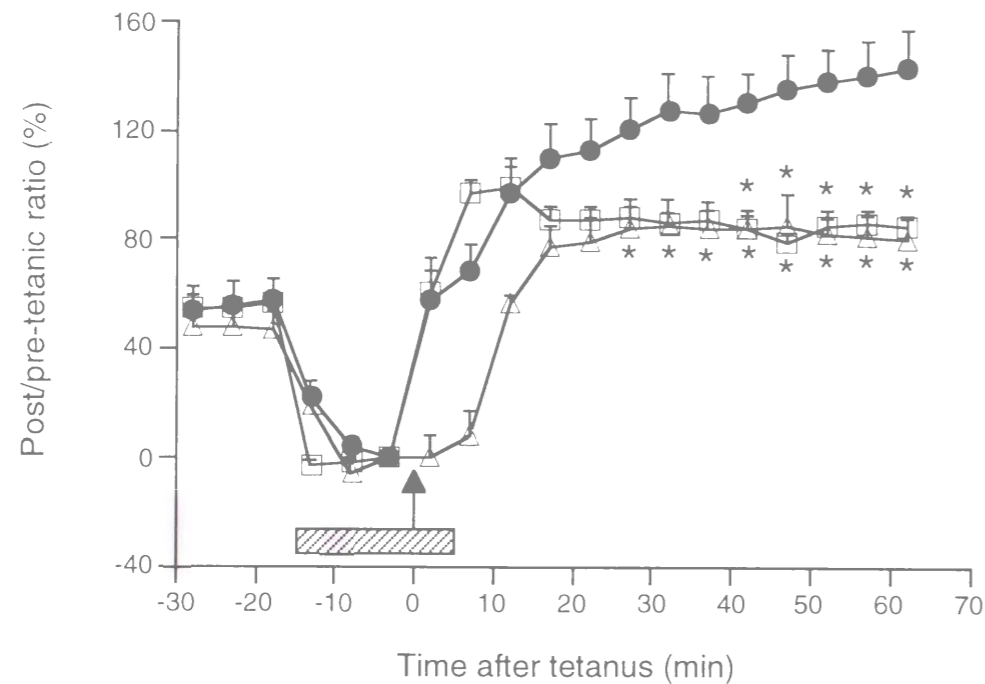


図 1-6 CA3野LTPに対するCCh (10 μ M)、低濃度Ca²⁺溶液、および刺激強度減弱の効果

●、10 μ MのCCh処置 (n=7)。□、テスト刺激とテタヌス刺激の強度の減弱処置 (5.1 \pm 0.3 Vから4.0 \pm 0.1 Vへ減弱、n=4)。Δ、Ca²⁺濃度を3 mMから1.5 mMに低下したACSFの処置 (n=4)。いずれの処置も、テタヌス刺激15分前から5分後 (Barで示す時間) までの間だけ行った。*P<0.05 vs. CCh (10 μ M) 処置。

(4) カルバコールのLTP調節作用に対するムスカリン受容体拮抗薬の影響

苔状線維-CA3野のLTPに対するCChの作用がムスカリン受容体を介するか否かを明らかにするために、アトロピンの効果を調べた。LTPに対して0.1 μ Mのアトロピン単独では有意な影響を与えなかった。同濃度のアトロピンを0.1 μ MのCChと同時に適用したところ、0.1 μ MのCChによるLTP減弱作用は拮抗された。同時適用を行った切片のテタヌス刺激62分後のfEPSPは、52.6 \pm 2.9% (n=4)の増大率を示し、この値は0.1 μ MのCChを単独適用した切片に比べて有意に高かった (図1-7A)。また、0.1 μ Mのアトロピンは10 μ MのCChによるテタヌス刺激前のfEPSP抑制およびLTP増大の、いずれの作用も抑制した。同時適用を行った切片のテタヌス刺激62分後のfEPSPは、57.2 \pm 2.5% (n=4)の増大率を示し、この値は10 μ MのCChを単独適用した切片に比べて有意に低かった (図1-7B)。

苔状線維-CA3野のLTPに対するCChの作用について、いずれのムスカリン受容体サブタイプが関与するかを明らかにするため、選択的M₁受容体拮抗薬であるピレンゼピンおよび選択的M₂受容体拮抗薬であるAF-DX 116のCChの作用に対する影響について調べた。ピレンゼピンおよびAF-DX 116、いずれも0.1 μ Mの濃度で、単独ではLTPに有意な影響を与えなかった。同濃度のAF-DX 116は0.1 μ MのCChによるLTP減弱作用に対して有意な拮抗作用を示したが、10 μ MのCChによるLTP増大作用には有意な影響を与えなかった (図1-8A)。これとは対照的に、10 μ MのCChによるLTP増大作用はピレンゼピンにより拮抗されたが、1 μ MのCChによるLTP減弱作用は有意な影響を受けなかった (図1-8B)。テタヌス刺激前のfEPSPの10 μ MのCChによる抑制作用は、0.1 μ Mのピレンゼピンによっては影響を受けなかったが、1 μ Mのピレンゼピンによって部分的に拮抗された。しかし、AF-DX 116は0.1および1 μ Mのいずれの濃度によっても、10 μ MのCChによる抑制作用は影響を受けなかった。

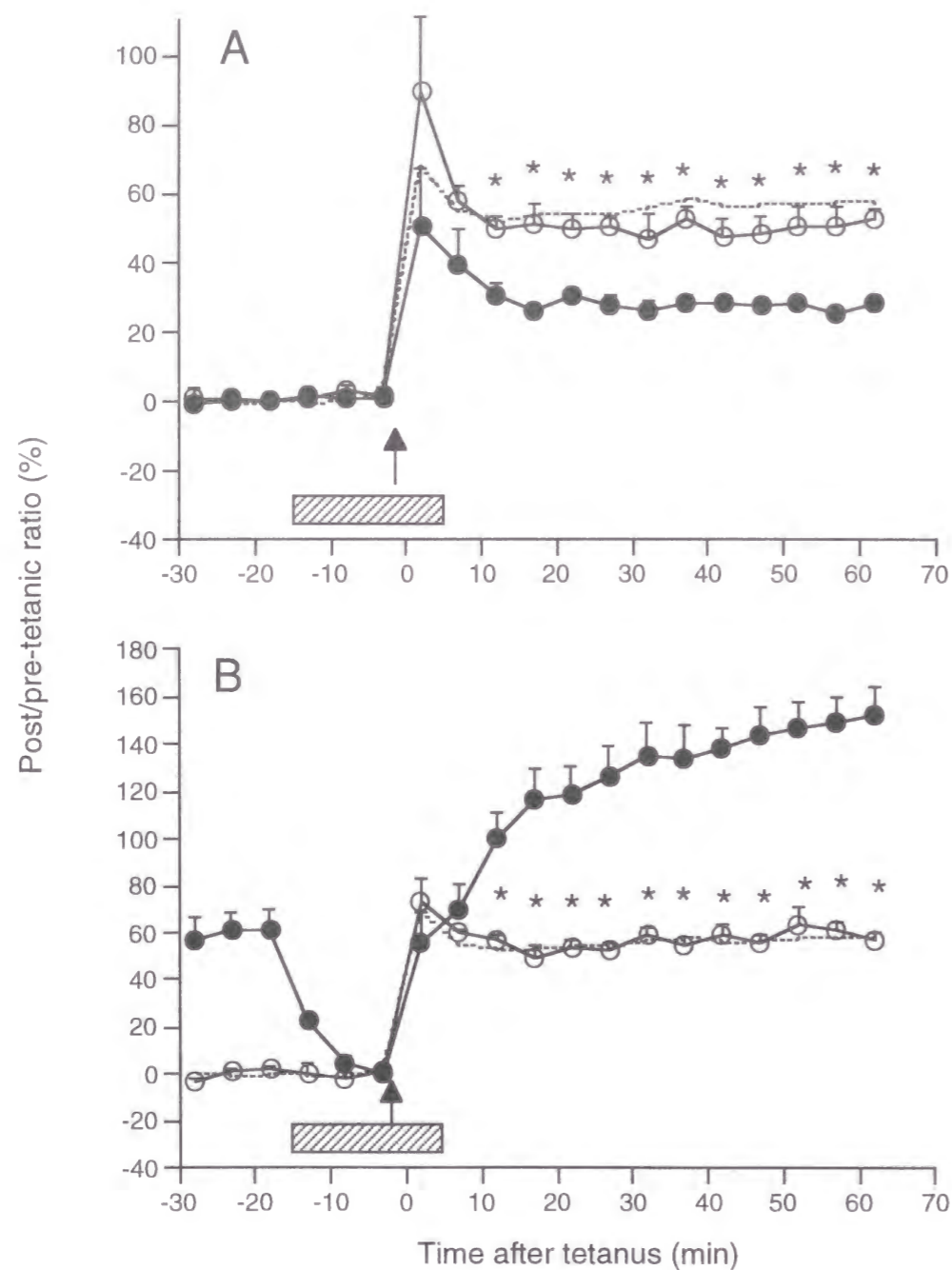


図 1-7 CA3野LTPに対するカルバコールの二相性の効果に及ぼすアトロピンの影響
 A: 低濃度のCCh (0.1 μM) によるLTP減弱作用に対するアトロピンの効果。
 ●、CCh処置 (n=6)。○、CChとアトロピンの同時処置 (n=4)。
 B: 高濃度のCCh (10 μM) によるLTP増大作用に対するアトロピンの効果。
 ●、CCh処置 (n=7)。○、CChとアトロピンの同時処置 (n=4)。図中の波線は薬物未処置群 (n=13) を示す。アトロピンは0.1 μMの濃度を使用した。
 *P<0.05 vs. CCh処置。

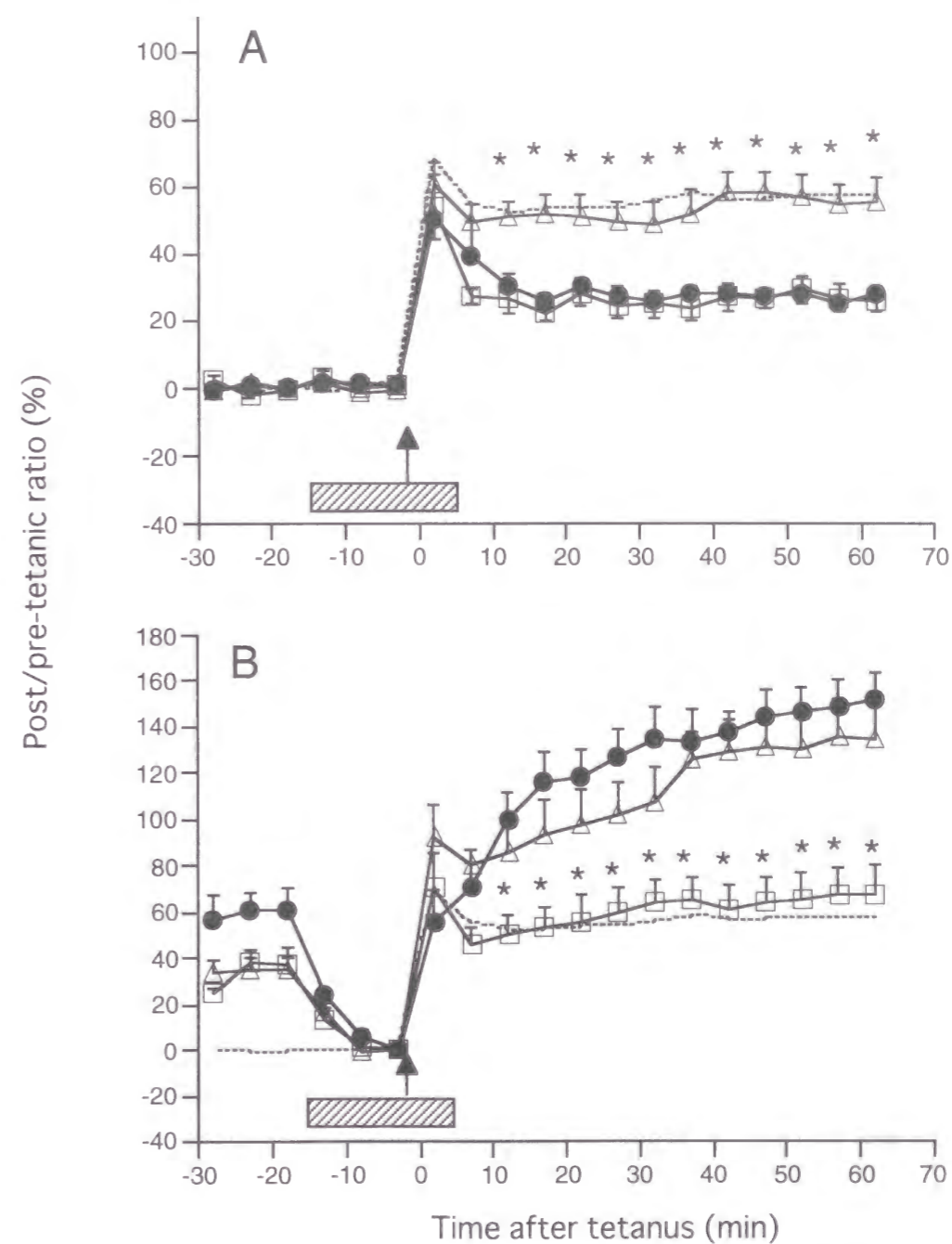


図 1-8 カルバコールの二相性の効果に対するM₁およびM₂受容体拮抗薬の影響
 A: CCh (0.1 μM) によるLTP減弱作用に対するピレンゼピンおよびAF-DX 116の効果。●、CCh処置 (n=6)。□、CChとピレンゼピンの同時処置 (n=5)。△、CChとAF-DX 116の同時処置 (n=5)。B: CCh (10 μM) によるLTP増大作用に対するピレンゼピンおよびAF-DX 116の効果。●、CCh処置 (n=6)。□、CChとピレンゼピンの同時処置 (n=5)。△、CChとAF-DX 116の同時処置 (n=5)。図中の波線は薬物未処置群 (n=13) を示す。ピレンゼピンおよびAF-DX 116の濃度は0.1 μMを使用した。*P<0.05 vs. CCh処置。

考察

モルモット海馬切片苔状線維-CA3野のLTPに対して、ムスカリン受容体作用薬であるCChは低濃度（ $0.01\mu\text{M}$ および $0.1\mu\text{M}$ ）でテタヌス刺激前のfEPSPに影響を与えず、減弱作用を示した。組織学的研究によればM₂受容体のmRNAの発現は特定の脳部位に限られており、海馬では発現量が低いことが知られている[3, 8, 32]。しかしその一方で、海馬切片あるいはシナプトソームを用いた研究から、海馬においてM₂受容体が自己受容体として機能し、アセチルコリンの遊離を抑制的に調節することが報告されている[38, 42]。また、佐藤らは苔状線維-CA3野のLTPがスコポラミンにより減弱されることを報告している[45]。今回の研究結果ではM₂受容体の局在やアセチルコリン遊離量の変化を確認していないが、苔状線維-CA3野のLTP誘導に対するCChによる抑制の機序として、テタヌス刺激時におけるM₂受容体を介したアセチルコリン遊離の抑制が考えられる。その結果、LTP誘導機構を促進するアセチルコリン量が減少し、LTPが減弱する。薬理的に特徴づけられているM₂受容体は、遺伝子学的に同定されたm2ムスカリン受容体サブタイプに相当し、このクローンを発現させた細胞で、このサブタイプがcAMP抑制系と共役することが示されている[2]。神経伝達物質遊離機構において、シナプス小胞蛋白の一種であるシナプシン1はそのリン酸化状態によりシナプス小胞のシナプス前膜への融合を制御していることが知られている。すなわち脱リン酸化状態で抑制的に、リン酸化状態で促進的に膜融合を調節する[34]。また、PKAはシナプシン1をリン酸化することが知られている。このことより、LTP減弱に関わるM₂受容体刺激以降の細胞内情報伝達系として、細胞内cAMP量の減少に基づくPKA活性の減少、これによるリン酸化シナプシン1の減少がACh遊離量を低下する機序が推察される。

M₂受容体を介した苔状線維-CA3野のLTPの減弱作用とは対照的に、高濃度CChによるLTPの促進作用はM₁受容体を介することが明らかにされた。M₁受容体を介したLTP増大作用に必要なCChの濃度はM₂受容体を介したそれに比べ100倍高く、これはCChのM₁およびM₂受容体への親和性の差と一致する[7]。高濃度のCChは、LTP増大作用と同時にテタヌス刺激前の低頻度刺激によるfEPSPの抑制作用を示した。さらに、 $10\mu\text{M}$ のCChの処置切片において、テタヌス刺激は行わず、20分間の薬物適用のみ行った切片では、適用終了後にfEPSPの増大は観察されず、また $1\mu\text{M}$ のCChを持続適用した切片で

はLTPが観察されなかったことから、このLTP増大作用はCCh誘発性のfEPSP抑制あるいは薬物適用終了後のリバウンドによるものではないと考えられる。また、CCh誘発性のfEPSP抑制作用により減少した反応の大きさと同じ反応を得るために灌流液中のCa²⁺濃度の減少あるいは刺激強度の減弱処置を行った切片におけるLTPの増大率よりも $10\mu\text{M}$ のCChによるLTP増大作用がさらに大きかったことから、テタヌス刺激前のfEPSP抑制効果のLTPへの寄与は排除されるであろう。ムスカリン受容体作用薬による興奮性シナプス伝達のシナプス前性の抑制作用については、これまでに多くの報告がある。Marchiらはラット海馬シナプトソーム標本を用いて、ムスカリン受容体作用薬がM₂受容体を介して高K⁺誘発性グルタミン酸遊離を抑制することを示した[38]。しかし、この報告は本章の研究結果と矛盾するものである。すなわち、 $10\mu\text{M}$ のCChによるテタヌス刺激前の低頻度刺激誘発性fEPSPの抑制作用は、AF-DX 116よりもピレンゼピンの方が有効であった。ピレンゼピンのムスカリン受容体サブタイプに対する選択性を考慮すると、低頻度刺激による苔状線維終末からのEAA遊離の抑制はM₂受容体刺激によるとは考えにくい[12]。また、高濃度のCChによるテタヌス刺激前のシナプス伝達への作用とLTP誘導に対する作用とは別の機構によるという可能性を示唆する本章の結果も考慮すると、低頻度刺激誘発性fEPSPの抑制作用には、M₁およびM₂受容体とは異なるムスカリン受容体サブタイプの関与が考えられる。

M₁受容体活性化以降の細胞内情報伝達系として、イノシトールリン酸の加水分解による細胞内Ca²⁺濃度の増加およびPKC活性化を引き起こすことが知られており、その結果、神経細胞の興奮性が増大する[19]。これまでに、苔状線維-CA3野のLTPの誘導の起源は、シナプス前ニューロンに存在することを示唆する結果が報告されている[28, 29, 59]。苔状線維終末におけるM₁受容体の局在については明らかではないが、M₁受容体の活性化によりシナプス前ニューロンにおけるLTP誘導機序に促進的に影響を与える可能性が示唆される。

第二章

海馬コリン作動性神経系破壊の苔状線維—CA3野長期増強に対する影響

海馬コリン作動性神経の脱落は、アルツハイマー病型の老人性痴呆における主要な組織化学的徴候であることが、多くの研究結果により示されている[10]。従って、記憶障害の研究およびこれに対する治療薬の開発にあたり、コリン作動性神経機能の低下を示す病態の動物モデルは、非常に有用であると予想される。齧歯類動物の脳室内に5 nmolのAF64Aを投与することにより、海馬のChAT活性をはじめとするコリン作動性神経機能が長期間にわたり低下することが報告されていることから、AF64Aはコリン作動性神経障害および記憶力障害モデル動物の作製のための有用な薬物とされてきた[15]。

海馬切片における苔状線維—CA3野のLTPを、5-HT₂受容体拮抗薬[36]、ソマトスタチン[40]および向知性薬[45]が増大すること、またこの作用がムスカリン受容体拮抗薬により抑制されることが示されている。このことより、これら薬物の増大作用には海馬コリン作動性神経系の関与が指摘されている。著者は第一章でモルモット海馬切片苔状線維—CA3野のLTPをカルバコール（CCh）が低濃度でM₂受容体を介して減弱し、高濃度でM₁受容体を介して増大することを示した。本章では、海馬内在性アセチルコリン（ACh）の苔状線維—CA3野のLTPにおける役割を明らかにする目的で、AF64A誘発性海馬コリン作動性神経系機能低下のLTPに及ぼす影響と、ムスカリン受容体関連薬物のLTPに対する効果について調べた。

実験方法

(1) 海馬切片における電気生理学的研究

第一章に記述した方法で切片を作製、記録、および、データの解析を行った。

(2) AF64Aの調整

AF64AはFisherらの方法に従い、AF64塩酸塩より用時調整した[12]。AF64塩酸塩溶液のpHが11.2-11.6になるように水酸化ナトリウムを加えて調整し、この溶液を室温で20分間攪拌した。その後、溶液のpHが7.4になるように塩酸を加え、最終的に1 mMになるように調整し、使用直前まで氷冷下で保存した。

(3) AF64Aのモルモット側脳室内投与

ペントバルビタール麻酔（35-40 mg/kg; i.p.）を行ったモルモットの頭部を、脳定位固定装置にて固定した。ハンドドリルにて頭蓋に穴を開けた後、マイクロシリンジを用いて5 μ lのAF64A溶液（5 nmolに相当）を左側脳室内に投与した。対照動物には、AF64A溶液と同じ投与量の生理食塩水を同様の手法で投与した。AF64A投与動物および生理的食塩水投与動物から投与7日後に海馬切片を作製した（それぞれAF64A切片および対照切片とする）。

(4) ChAT活性の測定

電気生理学的実験終了後の海馬切片をChAT活性の測定サンプルとして用いた。10倍量の氷冷Triton溶液（0.5% Triton X-100、10 mM EDTA、pH 7.4）中で、一枚の切片をホモジナイズした。遠心機を用いて10,000 gで10分間遠心し、その上清をChAT活性測定実験のサンプルとした。

ChAT活性の測定はFonnumの放射性化学法に従った[17]。基質として[³H]Acetyl CoAを使用し、TPBを用いて生成された放射標識性AChを単離した。8 μ lのサンプルと20 μ lの基質溶液（50 mM PBS、300 mM 塩化ナトリウム、8mM 臭化コリン、20 mM EDTA、0.1 mM フィゾスチグミン、0.2 mM [³H]Acetyl CoA）をサンプルチューブ内に加え、37℃で15分間のインキュベーションを行った。続いて、氷冷PBSを加えることにより酵素反応

を停止させ、次いで、2 mlの5 mg/ml TPB-アセトニトリル液を加えた。反応液中の有機層を5 mlのトルエンシンチレーションを含むバイアル内に移し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。

(5) ChAT免疫組織化学

電気生理学的実験終了後の海馬切片を4% ハラホルムアルデヒドを含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) 中で、24時間インキュベートした。続いて、20% sucroseを含むPBS (4°C) 中で、4時間インキュベートした。切片を凍結した後、ミクロトームを用いて50 μ mの薄切片を作製した。作製した薄切片は0.1% メタ過ヨウ素酸ナトリウムを含むPBS中でインキュベートを行った。

Armstrongらの方法に従い、抗ChAT抗体およびABC-POキットを使用して海馬薄切片の免疫染色を行った[11]。以下の手順で薄切片のインキュベートを行った。1) 500倍希釈濃度の抗ChAT抗体を含むPBS中で4°C下、24時間。2) 200倍希釈濃度のビオチン化二次抗体溶液中で4°C下、30分間。3) ABC-PO溶液中で室温下、60分間。4) 0.16%のDAB反応液中で室温下、10分間。以上のインキュベートを行った後、35%のH₂O₂で発色し、エタノールで脱水後、封入して顕微鏡観察を行った。

(6) 薬物

前章に記述した薬物に加え、以下に示す薬物を使用した。AF64塩酸塩 (acetylcholine mustard hydrochloride: Research Biochemicals, Wayland, USA)。ABC-POキット (Vector Laboratories, Burlingame, USA)。抗ChATポリクロナール抗体 (Chemicon, Temecula, USA)。[³H]Acetyl CoA (New England Nuclear, Boston, USA)。フィゾスチグミン (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)。

実験結果

(1) AF64A投与による海馬コリンアセチルトランスフェラーゼへの影響

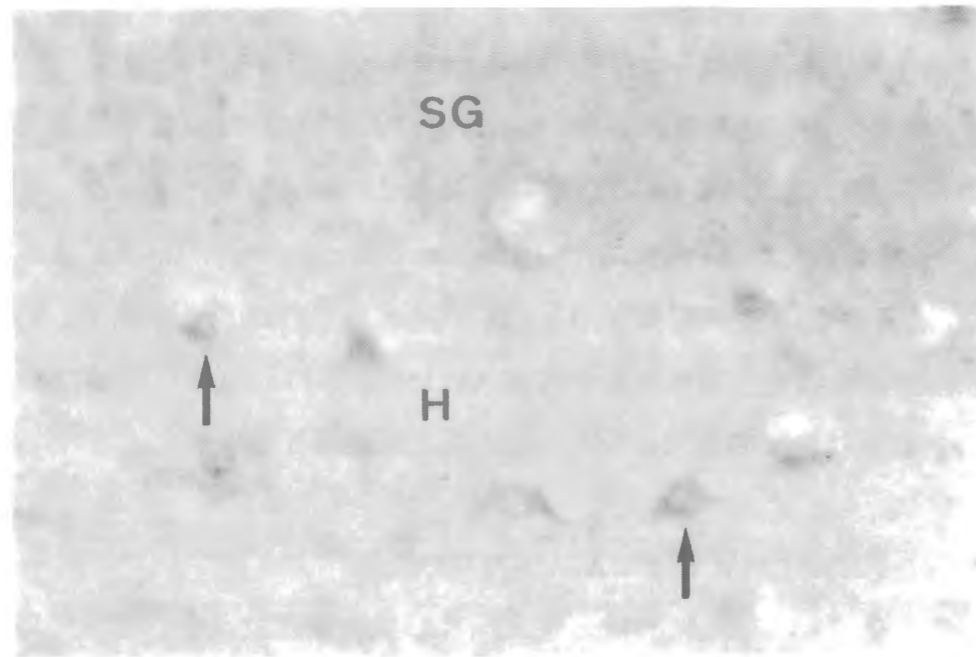
電気生理実験後の海馬切片を用いて、ChAT活性およびChATの免疫組織化学的染色を行った。対照切片におけるChAT活性は、73.1 \pm 2.9 nmol/h/mg protein (n=9)であった。一方、AF64A切片のChAT活性は、42.1 \pm 4.2 nmol/h/mg protein (n=10)を示し、対照切片に比べて有意に低い値であった。ChATの免疫組織化学的染色の結果、対照切片では主にhilus領域にChAT免疫陽性細胞が観察された(図2-1)。しかし、AF64A切片ではChAT免疫陽性細胞は全ての領域にわたりほとんど観察されなかった。

(2) 苔状線維-CA3野LTPに与えるAF64A投与の影響

対照切片およびAF64A切片における苔状線維の試験刺激強度とCA3野にて誘発されるfEPSPの振幅との関係について調べた。最大振幅の50%の振幅のfEPSPを誘発する刺激強度について、対照切片 (3.9 \pm 0.2 V, n=14) とAF64A切片 (3.5 \pm 0.3 V, n=15) の間で有意な差は認められなかった。また、そのときの振幅についても、対照切片 (0.77 \pm 0.06 mV, n=14) とAF64A切片 (0.74 \pm 0.07 mV, n=15) の間で有意な差は認められなかった。薬物の適用およびテタヌス刺激の前に、多シナプス成分からなる応答やピークの潜時が長い応答は対照切片では全く見られなかったが (n=14)、AF64A切片では2例において観察された (n=17)。

両切片における後テタヌス増強は同程度であった。しかし、LTP (テタヌス62分後におけるfEPSPの増大率が20%以上) の発生率は異なっていた(図2-2)。対照切片の薬物未処置群では、全例においてLTPは発生した (テタヌス62分後の平均増大率 50.3 \pm 4.1%, n=9)。しかし、AF64A切片の薬物未処置群では、10例中4例においてのみLTPが発生し (テタヌス62分後の平均増大率 10.9 \pm 5.6%, n=10)、テタヌス62分後におけるfEPSPの増大率は対照切片の薬物未処置群に比べ、有意に低いものであった。しかし、両切片において抑圧現象 (テタヌス62分後におけるfEPSPの増大率が0%より低い) はみられなかった。

Control slice



AF64A slice

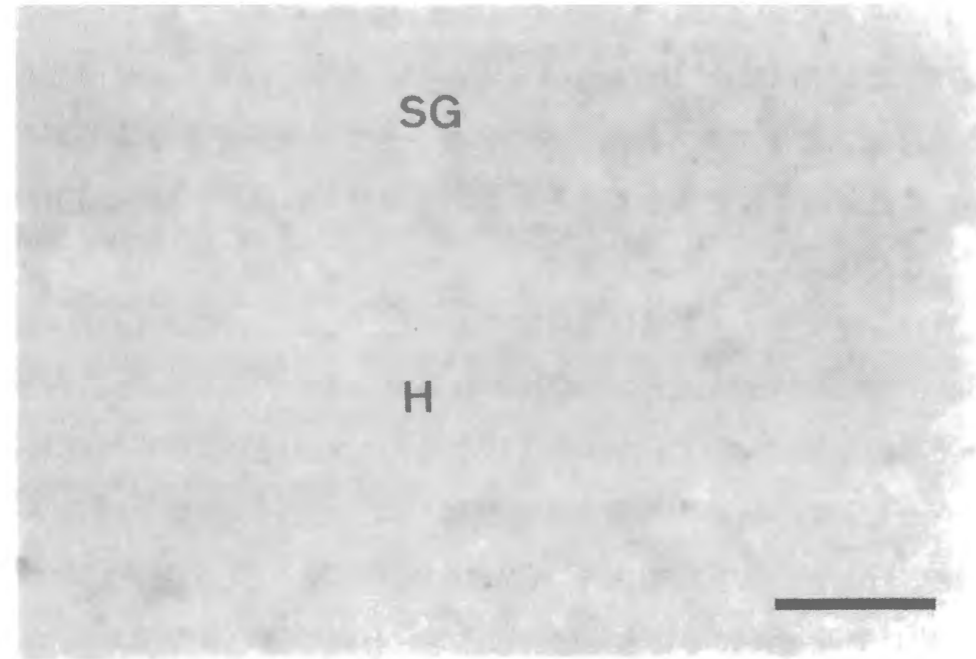


図 2-1 AF64Aおよび溶媒投与モルモットから作製した海馬切片の抗ChAT抗体染色像
SG、齒状回顆粒細胞層。H、hilus。矢印は抗ChAT抗体陽性細胞。スケール
バーは50 μ mを示す。

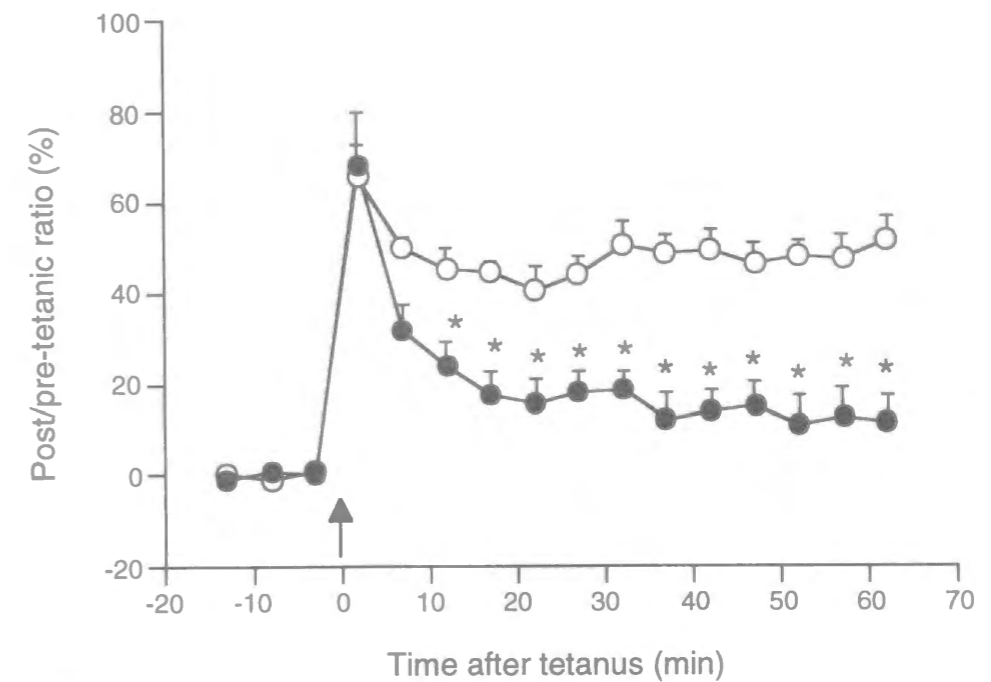


図 2-2 苔状線維—CA3野のLTPに対するAF64Aの効果
○、対照切片 (n=9)。●、AF64A切片 (n=10)。横軸はテタヌス刺激後の
時間。縦軸はテタヌス刺激3分前のfEPSP振幅を基準としたときの増大率を示
す。テタヌス刺激は矢印に示す時間に行った。* $P < 0.05$ vs. 対照切片。

(3) 内在性アセチルコリンに影響を与える薬物のLTPに対する効果

アセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるフィゾスチグミンの苔状線維—CA3野のLTPに対する効果を調べた(図2-3)。0.1 μ Mのフィゾスチグミンを切片に灌流適用したとき、対照切片およびAF64A切片いずれの切片においても、テタヌス刺激前のテスト刺激誘発性fEPSPの振幅に有意な変化はみられなかった。しかし、対照切片ではテタヌス刺激62分後に18.3 \pm 4.1% (n=4)の増大率を示し、この値は同切片での薬物未処置群に比べ有意に低いものであった。一方、AF64A切片での増大率は20.7 \pm 6.6% (n=4)であり、同切片での薬物未処置群に比べ有意な差はみられなかった。高濃度(10 μ M)のフィゾスチグミンの適用により対照切片におけるテタヌス前のfEPSPは減弱したが、AF64A切片でのfEPSPには影響を与えなかった。適用開始12分後(テタヌス3分前)のfEPSPの振幅は適用開始前に比べて、対照切片において69.9 \pm 7.9% (n=5)だけ減少したのに対し、AF64A切片において1.9 \pm 0.3% (n=5)であった。10 μ Mのフィゾスチグミンは対照切片でのLTPを増大したが、AF64A切片でのLTPには影響を与えなかった。対照切片におけるテタヌス62分後の増大率は87.6 \pm 18.6% (n=5)であり、同切片

での薬物未処置群に比べ有意に高い値であった。しかし、AF64A切片におけるその増大率は $20.7 \pm 6.6\%$ ($n=4$)であり、同切片での薬物未処置群に比べ有意な差はみられなかった。

ピレンゼピンおよびAF-DX 116の苔状線維-CA3野LTPに対する効果を調べた(図2-3)。 $1\mu\text{M}$ のピレンゼピンは、対照およびAF64A両切片におけるテタヌス前のfEPSPには影響を与えず、対照切片におけるLTPに対して有意な減弱効果を示した(テタヌス62分後の平均増大率: $25.8 \pm 6.3\%$, $n=7$)。しかし、AF64A切片でのLTPには有意な影響を与えなかった(テタヌス62分後の平均増大率: $16.4 \pm 5.4\%$, $n=4$)。同様に、 $1\mu\text{M}$ のAF-DX 116は両切片におけるテタヌス前のfEPSPには有意な影響を与えなかったが、対照切片におけるLTPに対して有意な増大効果を示した(テタヌス62分後の平均増大率: $69.5 \pm 3.9\%$, $n=7$)。しかし、AF64A切片でのLTPには有意な影響を与えなかった(テタヌス62分後の平均増大率: $15.0 \pm 9.2\%$, $n=4$)。

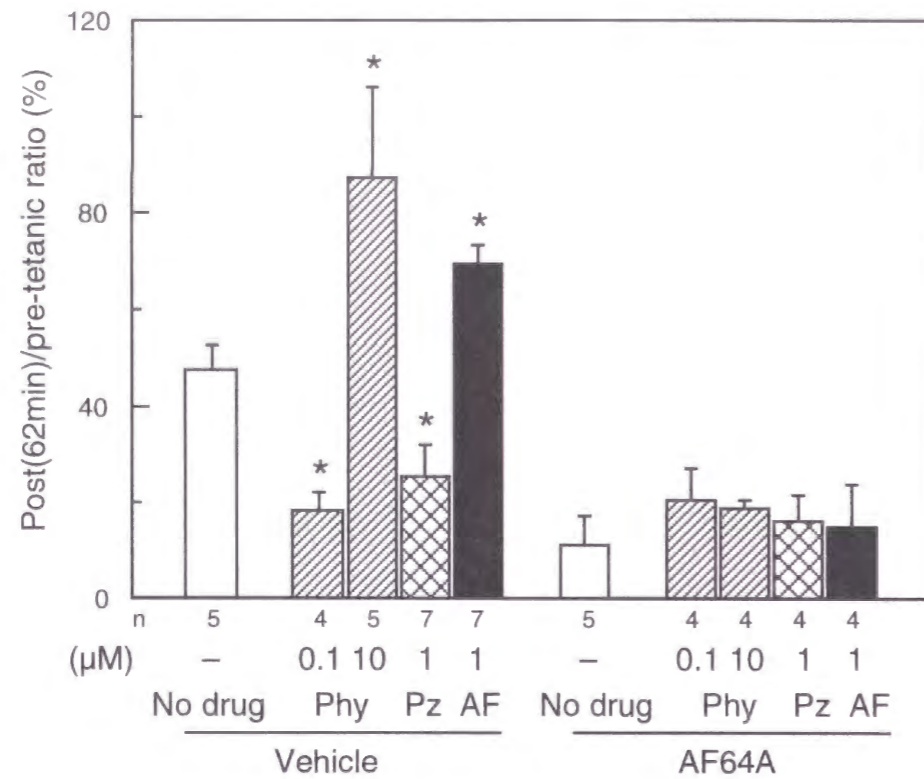


図 2-3 AF64Aおよび対照切片におけるCA3野のLTPに対するムスカリン性アセチルコリン関連薬物の効果
縦軸はテタヌス刺激62分後の増大率を示す。Phy、フィゾスチグミン。Pz、ピレンゼピン。AF、AF-DX 116。* $P < 0.05$ vs. 対照切片における薬物未処置。

(4) カルバコールの対照切片およびAF64A切片におけるLTPに対する効果

第一章の結果と同様に、ナノモル濃度およびマイクロモル濃度のカルバコール(CCh)は、対照切片における苔状線維-CA3野LTPをそれぞれ減弱および増大した(図2-4)。AF64A切片において、1あるいは10 nMのCChはテタヌス前のfEPSPには有意な影響を与えなかった。CChの適用開始12分後(テタヌス3分前)におけるfEPSPの振幅は適用開始3分前に比べて、1 nMでは $3.3 \pm 2.6\%$ ($n=4$)および10 nMでは $2.3 \pm 2.7\%$ ($n=5$)だけ減少した。一方、100 nMから $10\mu\text{M}$ のCCh適用によりテタヌス前のfEPSPの振幅は減少した。適用開始12分後(テタヌス3分前)におけるfEPSPの振幅は適用開始3分前に比べて、100 nMでは $6.3 \pm 0.2\%$ ($n=5$)、 $1\mu\text{M}$ では $22.5 \pm 1.3\%$ ($n=5$)および $10\mu\text{M}$ では $12.9 \pm 0.7\%$ ($n=4$)だけそれぞれ減少した。LTPに対して10 nMから $10\mu\text{M}$ のCChは濃度依存的に増大作用を示し、その最大効果は $1\mu\text{M}$ でみられた(テタヌス62分後の平均増大率: $66.2 \pm 11.4\%$, $n=5$)。

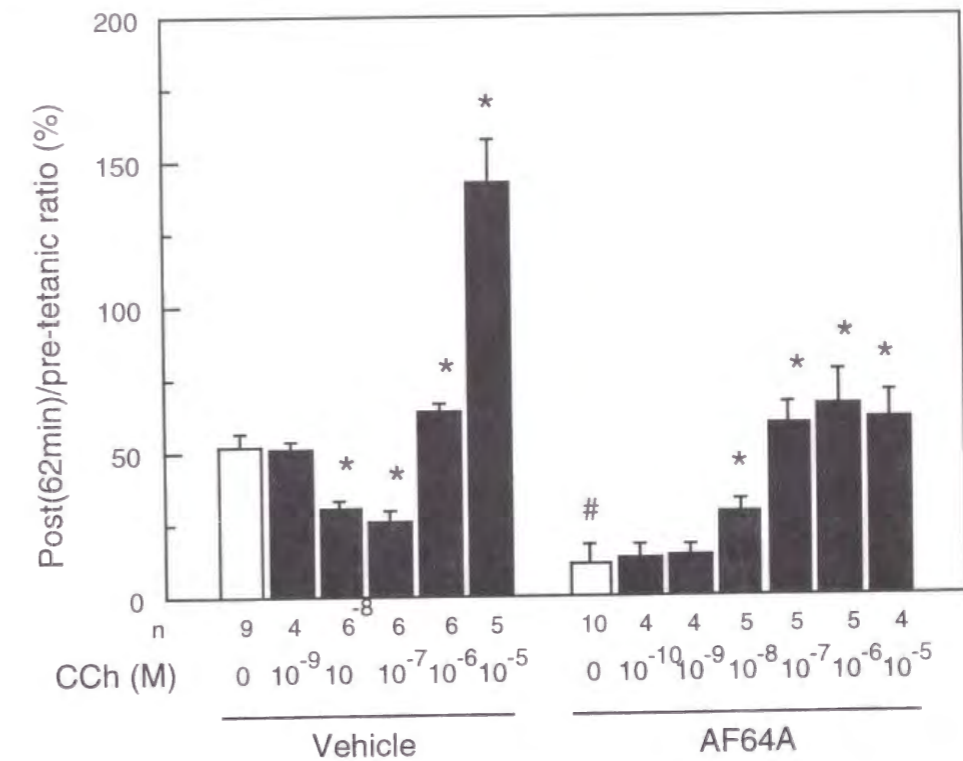


図 2-4 AF64Aおよび対照切片におけるCA3野のLTPに対するCChの効果
Phy: フィゾスチグミン。Pz、ピレンゼピン。AF、AF-DX 116。* $P < 0.05$ vs. 対照切片あるいはAF64A切片における薬物未処置。# $P < 0.05$ vs. 対照切片における薬物未処置。

(5) AF64A切片におけるカルバコールのLTP増大効果に対するピレンゼピンの拮抗作用

AF64A切片におけるCChのLTP増大効果がいずれのムスカリン受容体サブタイプを介するか明らかにするために、ピレンゼピンおよびAF-DX 116の影響を調べた(図2-5)。100 nMのピレンゼピンあるいはAF-DX 116は、LTPには有意な影響を与えなかった。1 μ MのCChによるLTP増大効果は100 nMのピレンゼピンの同時投与により拮抗された。AF64A切片における1 μ MのCChと100 nMのピレンゼピンの同時適用時のテタヌス62分後の平均増大率は25.4 \pm 3.2% (n=4)であり、CCh単独適用時の増大率(66.2 \pm 11.4%, n=5)に比べ、有意に低い値であった。一方、1 μ MのCChによるLTP増大効果は100 nMのAF-DX 116の同時適用により有意な影響を受けなかった。

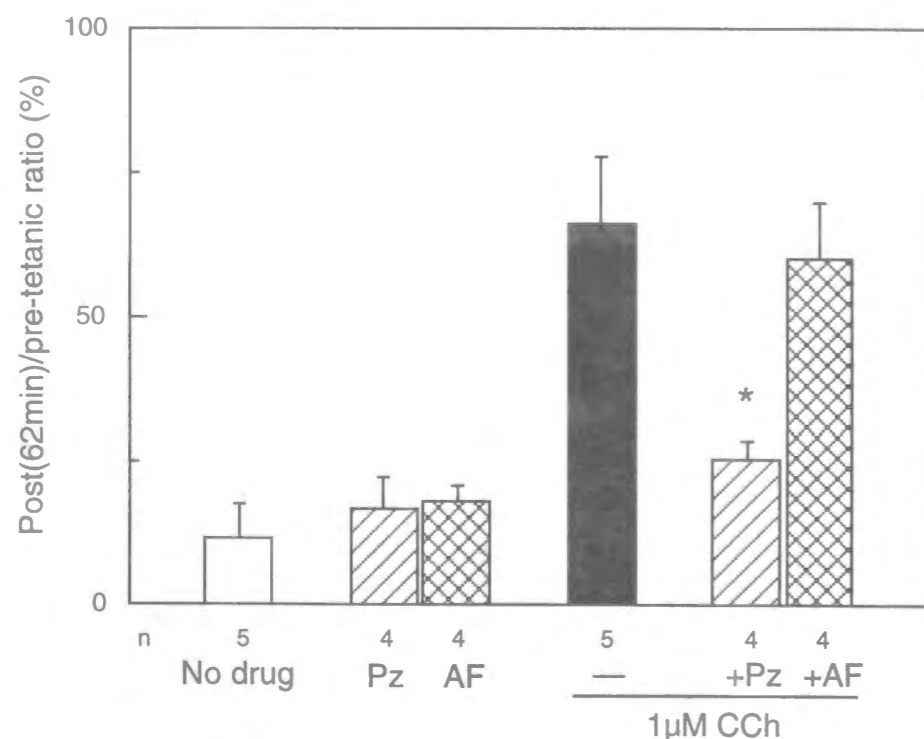


図 2-5 AF64A切片におけるCA3野LTPのCChによる増大作用に対するムスカリン受容体拮抗薬の効果

Pz、ピレンゼピン。AF、AF-DX 116。拮抗薬は0.1 μ Mの濃度で使用した。

* $P < 0.05$ vs. CCh単独処置。

考察

本研究において、著者はモルモット海馬苔状線維-CA3野LTPにおけるコリン作動性神経系の役割について調べた。コリンエステラーゼ阻害薬であるフィゾスチグミンが、対照切片での苔状線維-CA3野LTPを0.1 μ Mで減弱し、10 μ Mで増大した。このフィゾスチグミンの作用は、第一章で示した同経路に対するCChの二方向性の作用と一致する。フィゾスチグミンがLTPに対して影響を示すことは、テタヌス刺激により歯状回のhilusに存在するコリン作動性神経細胞(図2-1)が興奮すること、そして、それにより遊離されたAChがLTPを調節する可能性を示す。本研究において苔状線維-CA3野のLTPが、 M_1 受容体拮抗薬のピレンゼピンにより減弱し、 M_2 受容体拮抗薬のAF-DX 116により増大した。このことは、本実験系において、海馬内在性AChがLTPの調節機構に関与すること、また、 M_1 受容体および M_2 受容体活性化により同経路のLTPが、それぞれ促進性および抑制的に調節されることを示唆する。

内在性コリン作動性神経系の役割は、コリン作動性神経毒であるAF64Aを用いた実験により明らかにされた[20]。AF64A投与動物より作製した海馬切片におけるChAT免疫陽性細胞数、および、その細胞質分画中におけるChAT活性は減少した。電気生理学的研究においては、苔状線維電気刺激の強度とCA3野応答の振幅との関係は、AF64A処置により影響を受けなかった。しかし、AF64A切片におけるLTPの大きさは、対照切片に比べて小さかった。これらの結果は、AF64Aは少なくとも海馬内コリン作動性神経活動に障害を与えること、また、コリン作動性神経系の障害は低頻度刺激による苔状線維-CA3野のシナプス伝達には影響を与えないものの、高頻度刺激によるシナプス伝達の増大に著明な影響を与えることを示唆する。AF64A切片において、CChは10 nMから10 μ Mにわたり濃度依存的にLTPを増大した。そのCChのLTP増大効果はピレンゼピンの同時適用により拮抗されたが、AF-DX 116の同時適用による影響は受けなかった。この結果は、AF64A処置によるLTPの減弱がCChの M_1 受容体刺激により回復することを示唆する。AF64Aは投与量や投与方法によっては、コリン作動性神経だけでなく他の神経系の機能に影響を与えることが知られている[24, 41]。本研究において、内在性アセチルコリンを介して影響を与える薬物のLTPに対する作用がAF64Aの処置により消失した。このことは、AF64Aがコリン作動性神経系の機能低下を介して苔状線維-

CA3野のLTPに影響を与えること、および、コリン作動性神経系が同経路のLTP誘導において重要な役割を果たしていることを示唆する。

上記の結果は、対照切片における低濃度のCChによるM₂受容体を介したLTPの減弱がAF64A処置により消失したことを示す(図2-4)。これまでの報告により、コリン作動性神経系の終末にM₂受容体が存在し、AChの遊離を抑制的に調節する可能性が示されている。PotterおよびNittaは、オキソトレモリンが海馬切片におけるアセチルコリン遊離を減少するが、AF64A投与動物由来の海馬切片における遊離には影響を与えないことを報告している[42]。Leventerらは電気刺激および高濃度カリウムイオンにより誘発されるACh遊離が、AF64A処置動物由来の海馬切片では減少していることを報告した[31]。また、海馬のコリン作動性神経系における自己受容体はM₂受容体の薬理的性質を有することが報告されている[43]。それゆえ、AF64A処置によるM₂受容体機能の低下が、マイクロモル濃度以下のCChのLTP減弱効果が消失した原因であると考えられる。

実験動物へのAF64Aの投与により、海馬ChAT活性の低下を伴う記憶障害が誘発されることは興味ある知見である[14, 57]。これらの研究結果とAF64A処置が苔状線維-CA3野のLTPを減弱するという本研究の知見は、海馬LTPは学習および記憶の成立過程における必須因子であることを示唆する。したがって、海馬内在性アセチルコリンは海馬の神経活動を調節することにより認知機能を調節することが予想される。

第三章

パッチセンサー法を用いた単一電気刺激により誘発される海馬切片グルタミン酸遊離の検出および海馬長期増強発現機序の解明

シナプス前終末から遊離される神経伝達物質はシナプス伝達を担う機能分子であり、その動態および空間的分布は、シナプス可塑性および伝達物質遊離に対する薬物効果と関連して研究されてきた。これまでに、HPLCによる伝達物質およびその代謝物の測定[50, 44]、あるいは、放射標識した神経伝達物質の放射活性の測定などの生化学的手法により伝達物質の遊離が検出されてきた。しかし、いずれの測定法も検出に十分な量の伝達物質を遊離させる目的で、反復性かつ強い刺激が要求される。すなわち、標本に対して長時間かつ高頻度の電気刺激、これに加えて高濃度のカリウムイオン液の適用など非生理的刺激が必要とされる。一方、電気生理学的研究において、低頻度でかつ微弱な強度で入力線維を電気刺激することにより、シナプス後ニューロンにおいてシナプス応答が容易に誘発される。この現象を利用した素量解析法は、シナプス応答の振幅の分布を統計学的近似式にあてはめることによりシナプス前ニューロンからの伝達物質遊離の変化を推定する数理的解析方法である。この方法は神経-筋終末部において精力的に研究され多くの成果を挙げてきたが、近年では中枢神経系のシナプスにも応用されている。しかし、末梢と中枢神経系のシナプスの構造の顕著な差異や研究者間で使用する近似式の違いから、その方法の妥当性については議論のあるところである。

パッチクランプ法の開発により、現在、単一チャンネル電流のレベルでリガンド作動性イオンチャンネルの特性を研究することが可能である[22]。パッチクランプ法の一種であるアウトサイドアウトパッチクランプにおいて、パッチ膜内の受容体-チャンネル複合体をそのリガンドを検出するセンサーとして用いる試みがなされてきた[25, 58, 33]。例えば、ニコチン性アセチルコリン受容体チャンネルを含む筋細胞膜からアウトサイドアウトパッチクランプを行い、これを用いてナノモル濃度のAChが検出された[21]。また、この方法を利用して培養神経細胞から遊離される伝達物質が検出された[9, 55]。しかし、これまでに中枢神経系切片標本における単一の短期電気刺激により誘発される

伝達物質遊離の動態についての研究は報告されていない。

シナプス可塑性の恰好の研究対象である海馬LTPのうち、シャプファー側枝-CA1野錐体細胞シナプスのLTP (CA1野LTP) は精力的に研究されており、このCA1野LTPの誘導機序については、シナプス後ニューロンを起源とする実験的証拠が数多く報告されている[5]。しかし、その発現過程におけるシナプス伝達効率の増大がシナプス前ニューロン[39, 46]あるいは後ニューロン[30, 37]のいずれに帰因するかは意見が分かれている。すなわち、シナプス前終末からの神経伝達物質の遊離量が増大しているのか、あるいは、シナプス後細胞の応答性が増大しているのかは、まだ明らかにされていない。さらに、前章までに紹介した苔状線維-CA3野のLTP (CA3野LTP) 発現機序についても、同様の議論がなされているが一致した見解は得られていない[47, 49, 53, 54, 56]。これら研究結果が異なる一つの理由は、シナプス前終末からの神経伝達物質の遊離をはじめとするシナプス前細胞の興奮性を間接的にしか測定できないところにある。

本研究では、アウトサイドアウトパッチクラブ法を応用して、海馬切片における入力線維の単一電気刺激により誘発される神経伝達物質の遊離を半定量的に検出する方法を確立した。著者はこの方法をパッチセンサー法と名付け、これにより空間的および時間的に優れた分解能で神経伝達物質の遊離を検出することが可能となった。さらに、この方法を用いて、CA3野LTPおよびCA1野LTPのテタヌス刺激後の神経伝達物質の遊離を解析し、それらの発現機序について調べた。

第一節 単一電気刺激により誘発される興奮性アミノ酸遊離のパッチセンサーによる検出

実験方法

(1) パッチ電流の記録

常法に従い、海馬切片の錐体細胞にホールセルクランプおよびアウトサイドアウトパッチクランプ (パッチセンサー) を行った[13, 28]。20-28日齢のラットより厚さ200 μm の海馬切片を作製した。切片は95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスで飽和し、30-33 $^{\circ}\text{C}$ に保温した以下の組成からなるACSF中で1時間以上インキュベートした (単位 mM) : NaCl 124, KCl 2, KH_2PO_4 1.24, MgSO_4 3, NaHCO_3 26, CaCl_2 3, および glucose 10。インキュベート終了後の切片を記録用チャンバーに移し、GABA作動性神経系の影響を抑制するためにピクロトキシン (10 μM) を添加したACSFで切片を灌流した。インサイドアウトパッチクランプを行う実験では以下の組成からなる高濃度 K^+ 液で灌流した (単位 mM) : KCl 140, MgCl_2 1, EGTA 5, および HEPES 5。プレーを用いてボロシリケートガラスから先端口径が1.0-1.5 μm のパッチピペットを作製し、マニキュアを先端部以外の管壁に塗布したものをを用いた。ピペットに充填するピペット内液の組成は以下の通りである (単位 mM) : パッチセンサー用内液; CsCl 130, MgCl_2 2, EGTA 5, HEPES 10。インサイドアウトパッチクランプ用内液; KCl 140, MgCl_2 1, CaCl_2 1, EGTA 5, HEPES 5。それぞれの内液とACSF間に生じる液間電位を3 M KCL-Agar電極を用いて、電位の測定値の補正を行った。パッチセンサーおよびインサイドアウトパッチクランプの電位は特に述べない限り、-70 mVに固定した。

神経線維の電気刺激には前章までと同様の双極性刺激電極を用いた。刺激電極を歯状回顆粒細胞層あるいはCA1野放線層に刺入し、前章までと同様の矩形波パルスをも1分毎に与えた。プレーを用いてボロシリケートガラスから先端口径が1.0-5.0 μm のピペット (パフピペット) を作製し、グルタミン酸受容体作用薬を含むACSFを充填した。このパフピペットをパッチピットの先端との距離が3-5 μm になるように、且つ、シナプス領域の切片表面上に位置するように固定した。このパフピペットの後端から圧力

注入機を用いて、10–50 psiの気圧、および、持続時間40–60 msの窒素ガスによる圧力を与えて、上記の薬液を適用した（パフ適用）。

(2) データの解析

電流応答は10 kHzのフィルター処理を行い、DATテープ（DTC-1000 ES: SONY, Tokyo, Japan）に記録した。記録後、DATテープの記録内容について、パーソナルコンピューター（PC9801: NEC, Tokyo, Japan）上で、解析ソフト（OP111J: Nihon Kohden, Tokyo, Japan）を用いて解析を行った。全てのデータは、平均値±標準誤差として示した。

(3) 薬物

本章までに用いた薬物に加え、以下に示す薬物を使用した。L-グルタミン酸 (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan)。AMPAおよびCNQX (Research Biochemicals International, MA, USA)。

実験結果

(1) グルタミン酸受容体作用薬誘発性パッチ電流の性質

CA1野およびCA3野錐体細胞から作製したアウトサイドアウトパッチ（パッチセンサー）のグルタミン酸受容体の応答性を調べるために、それぞれのパッチセンサーにグルタミン酸受容体作用薬をパフ適用し、電流応答を記録した（図3-1A）。-70 mVに電位固定した両パッチセンサーにおいて、グルタミン酸適用により顕著に脱感作する内向き電流応答が誘発された（図3-1B）。グルタミン酸あるいは非NMDA受容体作用薬であるAMPAの適用濃度と電流応答との関係について調べた（図3-1CおよびD）。グルタミン酸についてのEC₅₀値はCA1およびCA3パッチセンサーで、それぞれ451 μMおよび389 μMであった。AMPAについてのEC₅₀値はCA1およびCA3パッチセンサーで、それぞれ159 μMおよび165 μMであった。いずれの薬物のEC₅₀値についても、CA1およびCA3パッチセンサー間で有意な差はなかった。

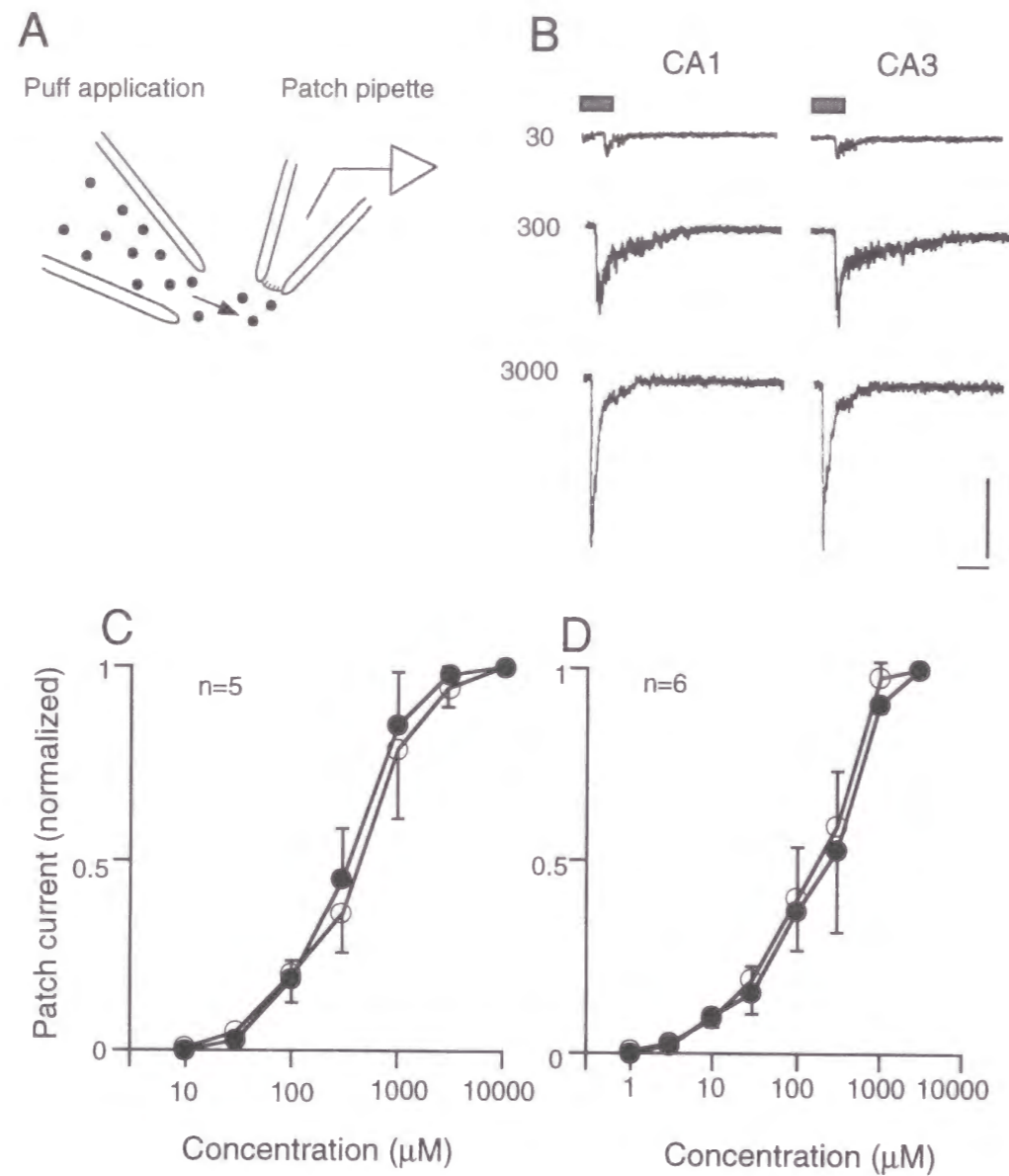


図 3-1 CA1およびCA3パッチセンサーにおけるグルタミン酸受容体作用薬誘発パッチ電流の比較
 A: パッチセンサー配置図。グルタミン酸受容体作用薬 (●) を充填したパフピペットは、パッチセンサーの先端から3-10 μ mの位置に固定した。
 B: 諸種濃度のグルタミン酸誘発パッチ電流の典型例。Barで示す持続時間(50 ms)で、グルタミン酸(30、300、および、3000 μ M)のパフ適用を行った。
 CおよびD: グルタミン酸受容体作用薬濃度と電流応答の関係。○、CA1パッチセンサー。●、CA3パッチセンサー。縦軸は10 mMのグルタミン酸 (C) および3 mMのAMPA (D) パッチ電流応答の振幅に対する各電流応答の割合を示す。

(2) パッチセンサーの切片表面からの距離とパッチ電流応答の関係

グルタミン酸遊離を測定するため、CA3パッチセンサーをCA3野透明層の切片表面から3 μ mの位置に固定した(図3-2A)。電気刺激誘発パッチ電流応答は71枚の切片中、14枚で検出された。苔状線維の単一電気刺激によりパッチ電流応答は刺激後まもなく観察され、一過性に開口するチャンネル電流の性質を示した(図3-2B)。パッチ電流応答のピークの平均潜時は 28.3 ± 8.1 ms、また、平均振幅は 10.8 ± 3.1 pAであった(n=5)。パッチセンサーと切片表面との距離が長くなるにつれパッチ電流応答の振幅は減少し、潜時は増大した。距離が50 μ mまで離れると、パッチ電流応答は全く観察されなかった。

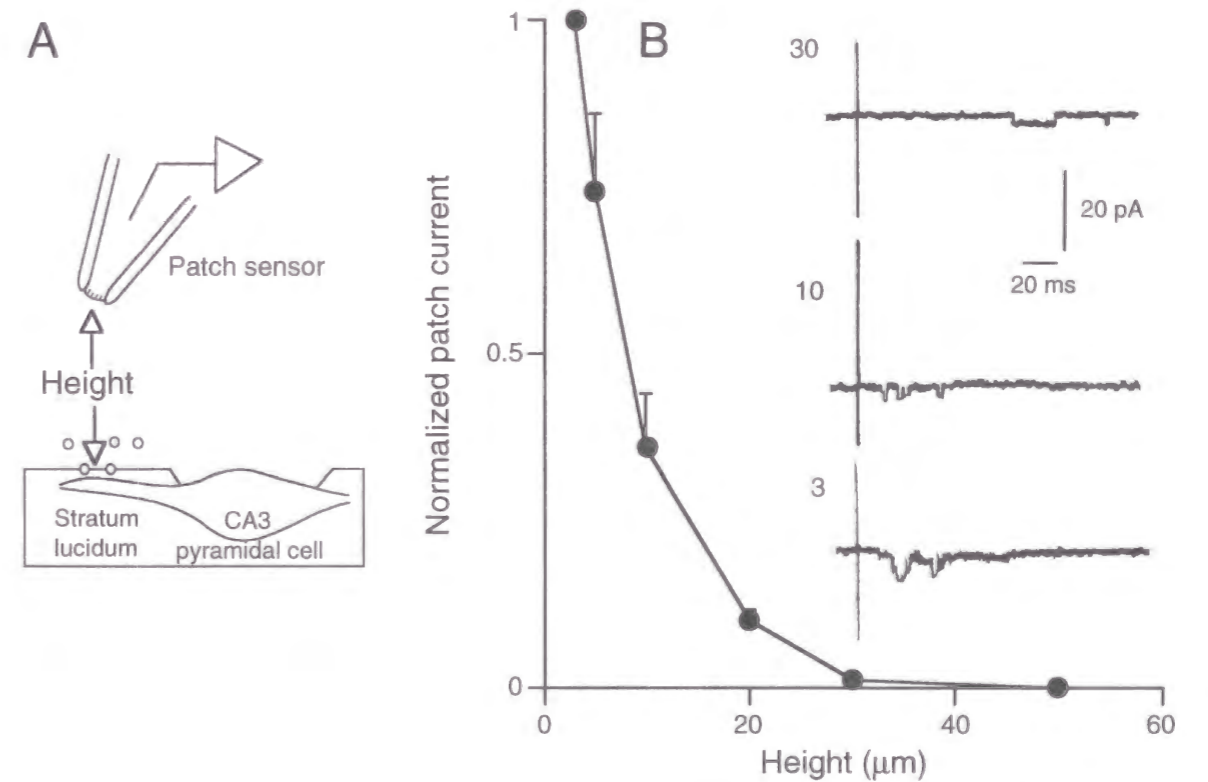


図 3-2 パッチセンサーと切片表面までの距離と電気刺激誘発性パッチ電流との関係
 A: パッチセンサー配置図。CA3野透明層の切片表面から垂直方向に諸種の距離(Height、3-50 μ m)にセンサーを固定し、苔状線維を電気刺激することにより誘発されるパッチ電流を記録した。B: 距離と電流との関係。縦軸は3 μ mに固定したパッチセンサーから記録されるパッチ電流の振幅に対する各距離における電流の割合を示す。グラフ内の波形は諸種の距離(3、10、および、30 μ m)にて記録される電気刺激誘発性パッチ電流の典型例。

(3) パッチ電流応答における集合電位混在の可能性

シナプス領域から記録される電気刺激誘発性パッチ電流応答に、パッチセンサー周囲の集合電位が混在している可能性がある。この可能性を調べるために、CA3野錐体細胞から調整したインサイドアウトパッチクピペットを、CA3野透明層の直上に設置したCA3パッチセンサーの横に固定した(図3-3A)。苔状線維の電気刺激によりパッチセンサーから電流応答が記録されたが、インサイドアウトパッチクピペットから電流応答は刺激後500 msまで検出されなかった(図3-3B、n=5)。これらの実験終了後に、インサイドアウトパッチにGTP γ Sの灌流適用を行い、電流応答が検出されたことから、インサイドアウトパッチが形成されていることを確認した(図3-3D)。

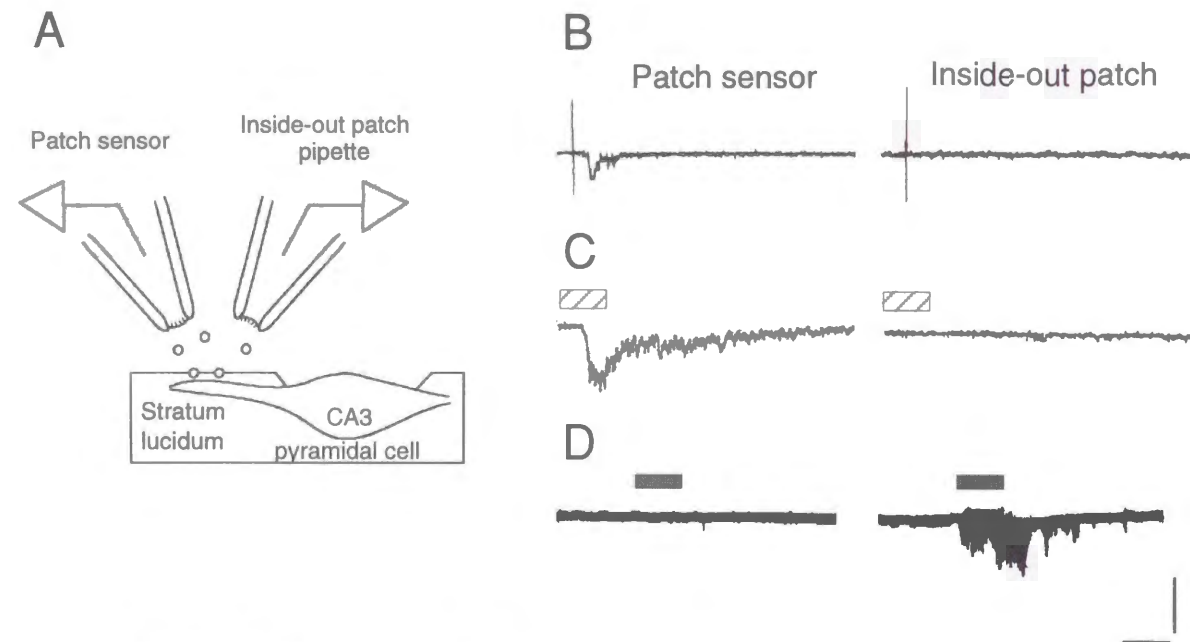


図 3-3 電気刺激誘発性パッチ電流成分へのfEPSP関与の否定

A: パッチセンサーおよびインサイドアウトパッチクピペットの配置図。CA3野透明層の切片表面にセンサーおよびインサイドアウトパッチクピペットを固定した。B: 苔状線維の電気刺激誘発性パッチ電流の典型例。C: AMPA (30 μ M) 誘発性パッチ電流の典型例。Barはパフ適用の時間を示す (50 ms)。D: GTP γ Sにより誘発されるパッチ電流の典型例。切片表面から500 μ mの距離に、センサーおよびインサイドアウトパッチクピペットを固定した。高濃度K⁺液(実験方法参照)の灌流下で、Barで示す時間(3 min)だけGTP γ S (10 μ M)を灌流適用した。スケールバーは、図BおよびCにおいて20 pAおよび50 msを、図Dにおいては5 pAおよび3 minを示す。

(4) 電気刺激誘発性パッチ電流応答の膜電位依存性

CA3パッチセンサーにおける苔状線維の電気刺激誘発性パッチ電流およびグルタミン酸誘発性パッチ電流のパッチ膜電位依存性について調べた(図3-4A, B, およびC)。パッチセンサーの膜電位を-90 mVから+30 mVまで10 mV毎に電位固定し、各刺激により誘発される電流応答を測定した(図3-4C、I-Vプロット)。また、NMDA受容体拮抗薬であるDL-APVを灌流液中に添加して測定を行った。いずれの電流応答も0 mV付近で逆転し、正の膜電位で内向き整流の性質を示すI-Vプロットを示した。また、全ての膜電位における電流応答は非NMDA受容体拮抗薬であるCNQX (30 μ M)により遮断された。

CA1パッチセンサーのパッチ電流の測定は、DL-APVを灌流液に添加せずに行った。CA1野放線層に固定したCA1パッチセンサーから記録されるシャフター側枝の電気刺激誘発性パッチ電流のI-Vプロットは、グルタミン酸誘発性パッチ電流と類似していた(図3-4D)。パッチ電流応答のピークの平均潜時は32.1 \pm 9.2 ms、また、平均振幅は13.5 \pm 4.1 pAであった(n=3)。CNQX (30 μ M)を灌流適用した結果、-30 mV付近の電流応答は完全には抑制されなかった。このことより、電気刺激誘発性パッチ電流およびグルタミン酸誘発性パッチ電流のいずれにおいてもNMDA受容体電流成分が含まれていることが考えられる。しかし、-70 mVの膜電位ではそのNMDA受容体電流の成分は、全パッチ電流の成分に比べ非常に小さかった。

考察

海馬切片錐体細胞より調整したアウトサイドアウトパッチ（パッチセンサー）にグルタミン酸受容体作用薬を適用したところ、濃度依存的にパッチ電流応答が誘発された。グルタミン酸受容体作用薬誘発性のパッチ電流応答の薬理的性質は、CA1およびCA3パッチセンサー間で差異はみられなかった。JonasおよびSakmannは、グルタミン酸受容体チャネルの脱感作がCA3よりもCA1アウトサイドアウトパッチで早い点を除けば、薬理的性質およびチャネル電流の動力学的性質の点で非常に類似していると報告している[27]。また、グルタミン酸受容体作用薬に対するCA1およびCA3パッチセンサーの電流応答の振幅は、少なくとも1時間以上は一定していた。このことより海馬切片錐体細胞より調整したアウトサイドアウトパッチは、リガンドに対する感度の安定性を有することが示唆される。これは、センサーとして重要な特性である。

パッチセンサーを海馬切片の表面より $3\mu\text{m}$ 直上に設置することにより、入力線維の電気刺激誘発性のパッチ電流応答が検出された。パッチセンサーと切片表面との距離が長くなるにつれパッチ電流応答の振幅は減少し、またその電流応答のピークの潜時は増大した。記録可能な生細胞が表面よりも、むしろ内部に存在する切片ではパッチ電流はほとんど観察されなかった。また電気刺激誘発性のパッチ電流応答を検出するためには、パッチセンサーを透明層あるいは放線層の直上に固定することが必要であった。これらの結果は、切片作製時あるいは作製後の時間経過に伴う切片の劣化によるシナプス領域の損傷の程度が小さいほど、電気刺激誘発性の伝達物質遊離をパッチセンサーにより検出することが容易であることを示す。そのパッチセンサーの電気刺激誘発性パッチ電流応答とグルタミン酸誘発性パッチ電流応答は、その電流応答の膜電位依存性の点で類似していた。これらの結果は、海馬切片シナプス領域における電気刺激誘発性のEAA遊離により、パッチ電流応答が誘発されることを示唆する。一方、同一の錐体細胞より調整したインサイドアウトパッチにより、電気刺激誘発性電流応答は検出されなかったことから、電気刺激誘発性パッチ電流応答がパッチセンサー固定場所付近の場の電位に影響される可能性は低い。

これまでにEAA遊離は海馬切片の灌流液の回収分画をサンプルとするHPLC法により測定されてきた[44, 50]。脳切片におけるパッチセンサー法はIsaacsonらが報告している

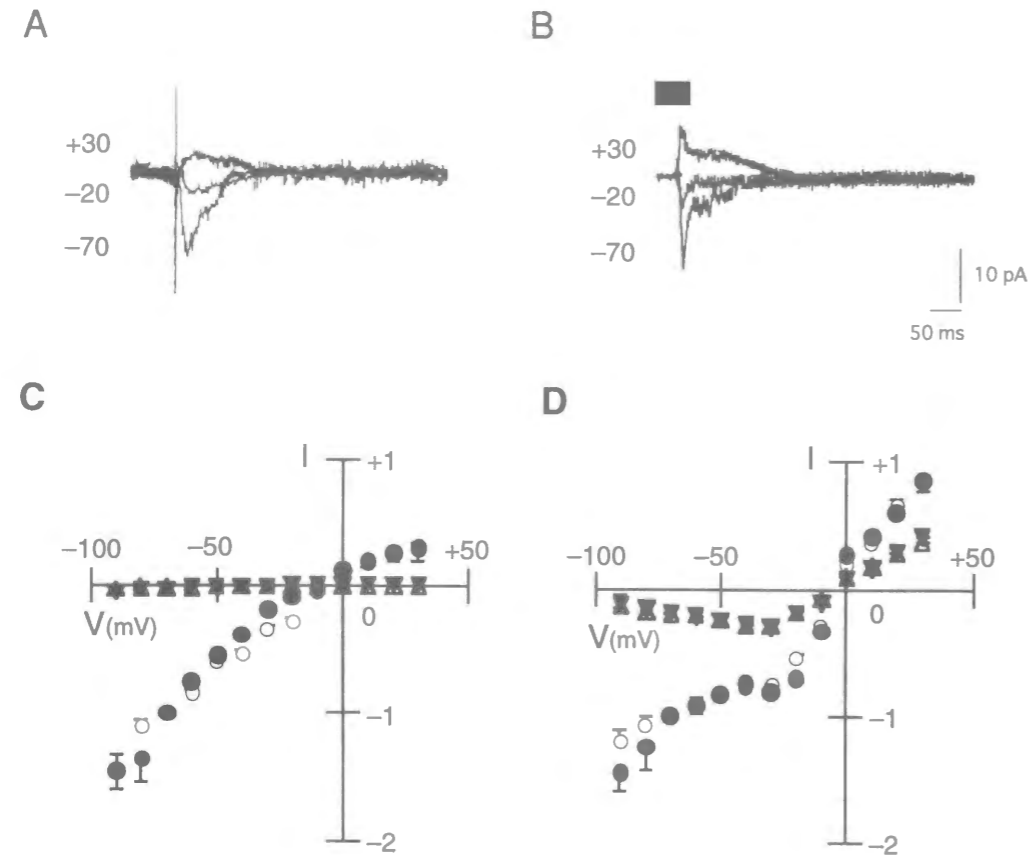


図 3-4 パッチセンサーの電流電圧相関

A: CA3パッチセンサーにおける苔状線維の電気刺激誘発性パッチ電流の典型例。B: CA3パッチセンサーにおけるグルタミン酸 ($300\mu\text{M}$) 誘発性パッチ電流の典型例。膜電位 $+30$ 、 -20 、および、 -70 mV 固定時の電流応答が示されている。Barで示す時間だけグルタミン酸をパフ適用した。C: CA3パッチセンサーの電流電圧相関 ($n=4$)。灌流液中には常時、NMDA受容体拮抗薬であるDL-APV ($30\mu\text{M}$) を添加した。D: CA1パッチセンサーの電流電圧相関 ($n=3$)。CA1パッチセンサーをCA1野放線層の切片表面上 ($3\mu\text{m}$) に固定し、シャフター側枝の電気刺激を行った。○、電気刺激誘発性パッチ電流。●、グルタミン酸誘発性パッチ電流。△、CNQX ($30\mu\text{M}$) の灌流液中存在下における電気刺激誘発性パッチ電流。▼、CNQX ($30\mu\text{M}$) の灌流液中存在下におけるグルタミン酸誘発性パッチ電流。横軸は膜電位、および、縦軸は -70 mV 固定時のパッチ電流振幅に対する各電位固定下の電流の割合を示す。

のみである[26]。彼らは、GABA取込阻害薬存在下で、海馬錐体細胞から調整したアウトサイドアウトパッチを用いて、著者が用いた切片よりも厚い海馬切片からのGABA遊離を検出した。HPLC法と比較して、パッチセンサー法は以下の利点がある。第一に、単一および短期の電気刺激により遊離される微量の神経伝達物質の検出が可能である。第二に、空間的にはマイクロメートル、そして、時間的にはミリ秒の分解能で神経伝達物質の検出が可能である[25, 58]。このパッチセンサーは、中枢組織切片におけるシナプス可塑性や低酸素・低グルコース負荷によるシナプス伝達効率の変化の解明に有用な手技となりうることが予想される。

第二節 パッチセンサー法を用いた海馬長期増強発現機序の解明

実験方法

(1) パッチ電流とホールセル電流の同時記録

前節と同じ方法で、海馬切片およびパッチセンサーを作製した。ホールセルクランプ用ピペットには、以下に示す組成の内液を充填した: K^+ -gluconate 128, KCl 7, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 0.1, EGTA 1, ATP 2, HEPES 10。また、同時記録の手順は以下の通りである(図3-5)。はじめに、双極性刺激電極を歯状回顆粒細胞層あるいはCA1野放線層に刺入し、前章までと同様の矩形波パルスを与えた。作製したパッチセンサーを用いて、苔状線維あるいはシャファー側枝の電気刺激誘発性パッチ電流が検出される位置を探索し、その位置にセンサーを固定した。前節で示したAMPA溶液(30–50 μ M)を充填したパフピペットをセンサーから3–5 μ mの距離に固定した。次いで、センサーの近くに位置する錐体細胞に、ホールセルクランプ用ピペットを用いてホールセルクランプを行った。テスト刺激として、神経線維の電気刺激とAMPAのパフ適用を30 s毎に交互に行った。テタヌス刺激として、テスト刺激の電気刺激と同一の矩形波を100 Hz、1 s間を与え、これを5 s間隔で3回行った。

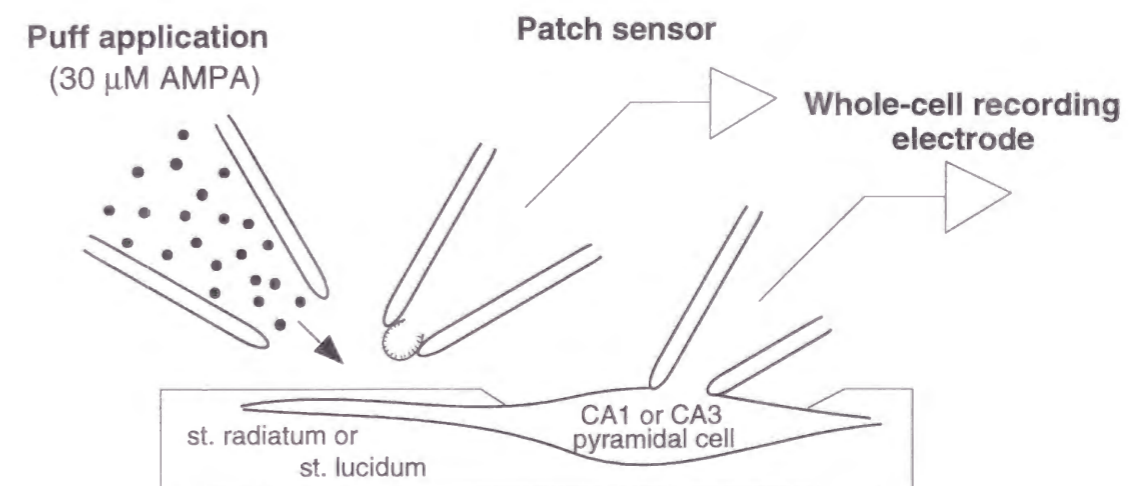


図 3-5 パッチ電流およびホールセル電流の同時記録方法

(2) データの解析

記録した電流応答の保存および解析は前節に記述した方法で行った。電流応答の振幅の増大率は、テタヌス直前の電流応答の振幅を基準値として計算した。全てのデータは、平均値±標準誤差として示した。

実験結果

(1) 苔状線維—CA3野長期増強の機序

CA3パッチセンサーを用いて、苔状線維—CA3野LTPにおけるEAA遊離の変化を調べた。CA3野透明層におけるパッチ電流およびホールセル電流を、112枚の試行の中、19枚にて同時記録に成功した。CA3野錐体細胞からのホールセル電流の記録から、静止膜電位は -64 ± 5 mV、および入力抵抗は 191 ± 18 M Ω であった (n=19)。苔状線維の単一の電気刺激によりホールセル電流およびパッチ電流が同時に記録された。ホールセル電流記録において、刺激のアーチファクトから反応開始までの時間(潜時)が3 ms以内の値を示すEPSCが観察された (n=16)。しかし、3例においては、3 msを越える潜時を示したので記録を中止した。テタヌス刺激10分前のホールセルおよびパッチ電流の平均振幅は、それぞれ 196 ± 29 pAおよび 9 ± 2 pAであった (n=16)。テタヌス刺激前において、AMPA誘発性ホールセル電流およびEPSCの振幅が安定しているにもかかわらず、電気刺激誘発性パッチ電流の振幅は、16枚の切片中3枚において不安定であった。これら3枚の切片については記録を中止し、13枚の切片にテタヌス刺激を行った。

苔状線維をテタヌス刺激することにより、13枚の切片中10枚においてLTP (20%を越える電流振幅の増大) が発生した (テタヌス刺激1—60分後のEPSCの平均増大率 $46.6\pm 9.3\%$ 、図3-6A)。LTPが発生した切片において、テタヌス刺激後、電気刺激誘発性パッチ電流の振幅もまた増大した (テタヌス刺激1—60分後のEPSCの平均増大率 $35.1\pm 7.7\%$ 、n=10)。しかし、電気刺激誘発性パッチ電流の潜時に有意な変化はなかった。テタヌス刺激1分前およびテタヌス刺激60分後における電気刺激誘発性パッチ電流の潜時は 26.7 ± 6.9 msおよび 24.8 ± 8.2 msで、両時点間で潜時に有意差はなかった。一方、テタヌス刺激後、AMPA誘発性パッチ電流に変化はなかった。テタヌス刺激1—60分後およびテタヌス刺激1—15分前における電気刺激誘発性パッチ電流の平均増大率は、それぞれ $7.8\pm 0.4\%$ および $5.1\pm 1.3\%$ で、有意差は見られなかった。同様に、テタヌス刺激後、AMPA誘発性ホールセル電流に変化はなかった。テタヌス刺激1—15分前およびテタヌス刺激1—60分後における電気刺激誘発性パッチ電流の平均増大率は、それぞれ $3.2\pm 0.7\%$ および $4.7\pm 2.9\%$ で、有意差は見られなかった。

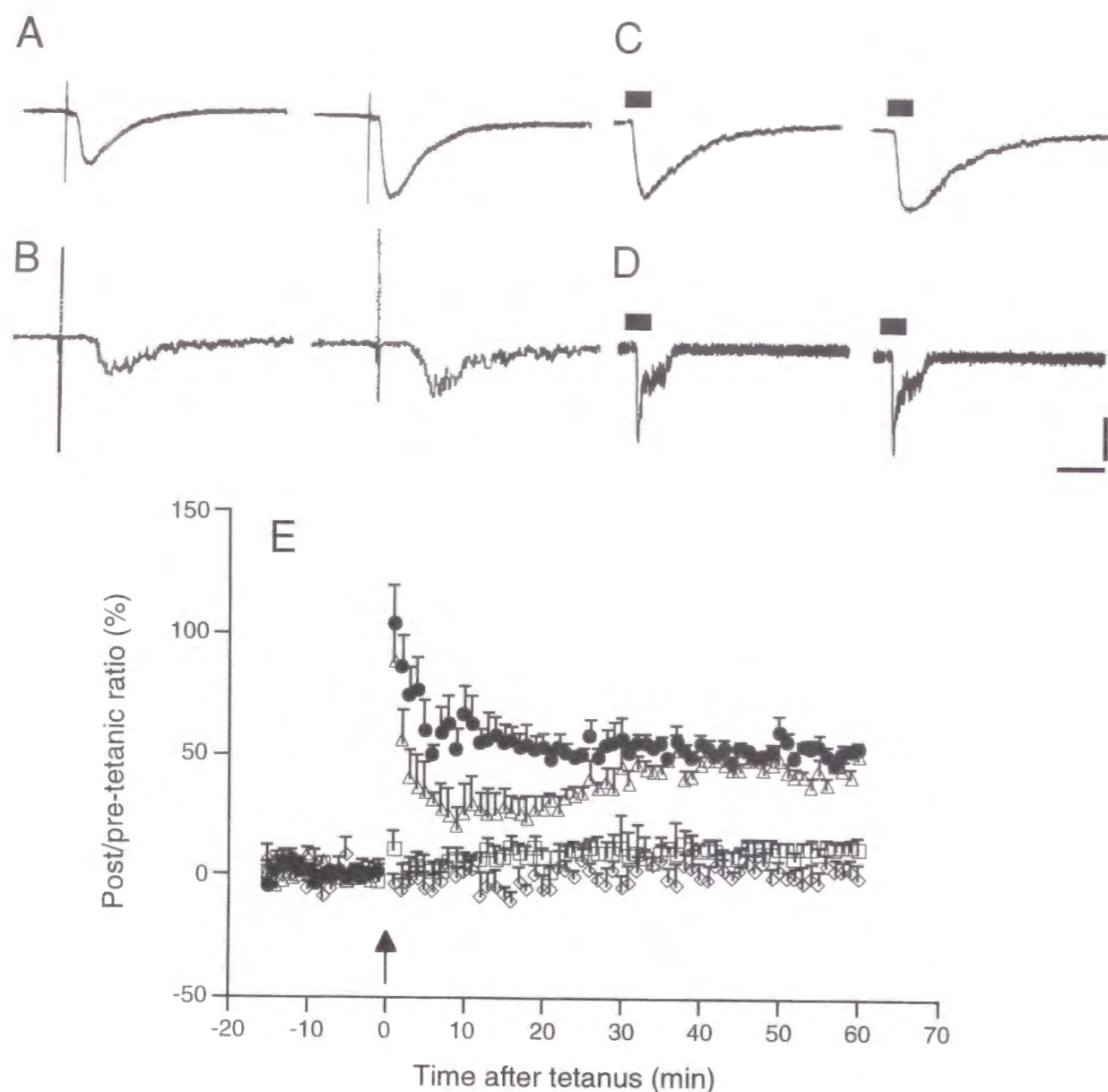


図 3-6 苔状線維—CA3野LTP発現時における電気刺激誘発性パッチ電流の増大
 A: EPSC。B: 電気刺激誘発性パッチ電流。C: AMPA誘発性ホールセル電流。
 D: AMPA誘発性パッチ電流。波形はテタヌス刺激1分前（左）および60分後の
 電流応答（右）を示す各波形のスケールバーは以下の通り。A: 200 pAおよび
 10 ms。B: 10 pAおよび20 ms。C: 200 pAおよび100 ms。D: 10 pAおよび100
 ms。E: LTPの経時変化（n=10）。●、EPSC。△、電気刺激誘発性パッチ電
 流。□、AMPA誘発性ホールセル電流。◇、AMPA誘発性パッチ電流。

(2) シヤフアー側枝—CA1野長期増強の機序

CA1パッチセンサーを用いて、CA1野LTPにおけるEAA遊離を調べた。CA1野放線層におけるパッチ電流およびホールセル電流を、97枚の試行の中、22枚にて同時記録に成功した。CA1野錐体細胞の静止膜電位は -69 ± 4 mV、および、入力抵抗は 289 ± 31 M Ω であった（n=22）。シヤフアー側枝の単一の電気刺激によりホールセル電流およびパッチ電流が同時に記録された。テタヌス刺激10分前のホールセルおよびパッチ電流の平均振幅は、それぞれ 219 ± 38 pAおよび 9 ± 2 pAであった（n=22）。テタヌス刺激前において、AMPA誘発性ホールセル電流およびEPSCの振幅が安定しているにもかかわらず、電気刺激誘発性パッチ電流の振幅は、22枚の切片中8枚において不安定であった。これら8枚の切片については記録を中止し、14枚の切片にテタヌス刺激を行った。

シヤフアー側枝をテタヌス刺激することにより、14枚の切片中11枚においてLTP（20%を越える電流振幅の増大）が発生した（テタヌス刺激1—60分後のEPSCの平均増大率 $100 \pm 4.5\%$ 、図3-7）。LTPが発生した切片において、テタヌス刺激後、AMPA誘発性ホールセル電流の振幅もまた増大した（テタヌス刺激1—60分後の平均増大率 $67.8 \pm 6.1\%$ 、n=11）。一方、テタヌス刺激後、電気刺激誘発性パッチ電流に変化はなかった。テタヌス刺激1—15分前およびテタヌス刺激1—60分後における電気刺激誘発性パッチ電流の平均増大率は、それぞれ $5.3 \pm 1.1\%$ および $11.4 \pm 5.7\%$ で、有意差は見られなかった。同様に、テタヌス刺激後、AMPA誘発性パッチ電流に変化はなかった。テタヌス刺激1—60分後およびテタヌス刺激1—15分前におけるAMPA誘発性パッチ電流の平均増大率は、それぞれ $4.1 \pm 0.3\%$ および $2.7 \pm 1.1\%$ で、有意差は見られなかった。

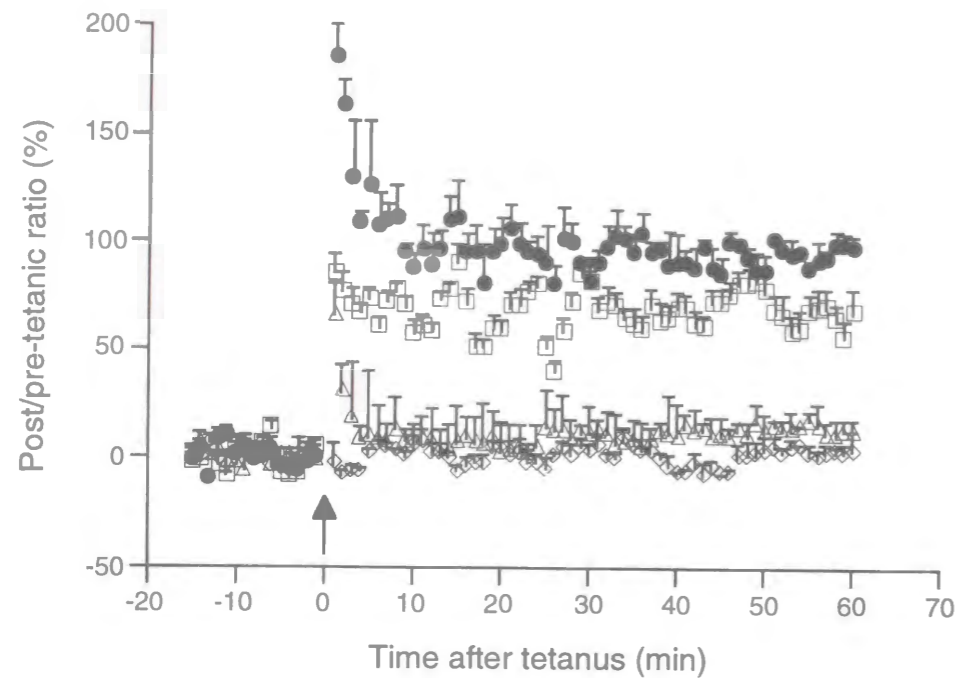


図 3-7 シャフアー側枝-CA1野LTPの経時変化

●、EPSC。△、電気刺激誘発性パッチ電流。□、AMPA誘発性ホールセル電流。◇、AMPA誘発性パッチ電流。n=9。

考察

苔状線維のテタヌス刺激後、EPSCの持続的かつ著明な増大に伴い、そのEPSCの増大と同程度の電気刺激誘発性パッチ電流の増大が観察された。しかし、苔状線維-CA3野のLTPの発現中、AMPA誘発性パッチ電流の振幅は変化しなかった。これらの結果は、パッチセンサーのEAAに対する感度は記録期間中安定していたこと、また、LTP誘導後、単一刺激応答性EAA遊離量が増大していることを示唆する。一方、AMPA誘発性ホールセル電流がLTP発現時に有意な変化がなかったことから、シナプス後ニューロンのAMPAに対する応答性は変化しなかったことが示唆される。これらの結果は、苔状線維-CA3野のLTPの発現時において、シナプス前終末からのEAAの遊離が増大していることを初めて直接的に明らかにしたものであり、これまでに提唱されてきたシナプス前ニューロン起源の発現メカニズムと一致する[47, 49, 54]。そのような特徴は、シャフアー側枝-CA1野のLTPの特徴とは対照的である。すなわち、CA1野LTPの発現時には、シナプス後ニューロンのAMPAに対する応答性は増大するが、電気刺激誘発性EAA遊離は変化しなかった。そのCA1野LTPにおけるシナプス後ニューロンのAMPAに対する応答性は、テタヌス刺激直後から増大し、60分間にわたり安定した増大を示した。この結果は、Daviesらの報告とは、経時変化の点で異なる[11]。彼らは、海馬切片CA1野放線層へのAMPAの電気泳動的適用により、CA1野のLTP発現時におけるシナプス後ニューロンのAMPAに対する応答性を細胞外記録した。そして、テタヌス刺激後、AMPA応答が徐々に増大し、2時間後に最大に達する結果を報告している。著者が使用した薬物のパフ適用法は、電気泳動的適用に比べて、より正確にシナプス後ニューロンの応答性を反映するものと思われる。その理由として、第一に、彼らが記録したAMPA応答は1秒間という長期にわたる電気泳動的適用により誘発されたものである。非NMDA受容体はミリ秒のオーダーで脱感作することが知られており、記録したAMPA応答は、主に脱感作状態のAMPA電流から構成されると考えられる。第二に、彼らは細胞外記録法によりAMPA応答を記録したことから、LTPを生じていないシナプス後ニューロンの応答性もAMPA応答に含まれている可能性がある。従って、格段に優れた時間的・空間的分解能を有する著者の方法によって得られたテタヌス刺激直後からのAMPA誘発性ホールセル電流の増大という成績は、速やかなシナプス後ニューロンの応答性増大を強く示唆するものである。

総括および結論

本研究において著者は、海馬切片苔状線維-CA3野のLTPの発現機序、および、これに対するムスカリン受容体作用薬の影響について検討し、以下の新知見を得た。

1. ムスカリン受容体作用薬のカルバコールは、苔状線維-CA3野のLTPを低濃度ではM₂受容体を介して減弱し、高濃度ではM₁受容体を介して増大する。
2. AF64Aによる海馬切片コリン作動性神経機能の低下は、苔状線維-CA3野のLTPを減弱させる。また、海馬内在性アセチルコリンは苔状線維-CA3野のLTPをM₁受容体を介して促進性に、M₂受容体を介して抑制性に調節する。
3. 海馬切片において、単一電気刺激により誘発される神経伝達物質の遊離を実時間で検出するパッチセンサー法を確立した。これを用いて、苔状線維-CA3野のLTP発現時におけるシナプス前細胞からの伝達物質の遊離が増大することを明らかにした。

本研究の成果は、抗痴呆薬としてのムスカリン受容体作用薬の作用機序の解明、および、新たな抗痴呆薬の探索に有用な基礎的知見であると考えられる。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜りました、京都大学薬学部教授 佐藤公道 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接ご指導を賜り、多くの有益なご助言をいただいた、京都大学薬学部助教授 金子周司 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益なご助言をいただきました、京都大学薬学部教授 赤池昭紀 先生に深く感謝いたします。

本研究の実験技術に関し、ご指導を賜りました現東京大学薬学部助手 香月博志 博士、現共立薬科大学講師 藤井健志 博士、ならびに、現東レ株式会社基礎研究所研究員 田島 敦 修士に深く感謝いたします。

発表論文目録

本研究の全ての内容は以下の論文に公表した。

1) Maeda, T., Kaneko, S. and Satoh, M.

Bidirectional modulation of long-term potentiation by carbachol via M_1 and M_2 muscarinic receptors in guinea pig hippocampal mossy fiber-CA3 synapses
Brain Research, 619 (1993): 324-330

2) Maeda, T., Kaneko, S. and Satoh, M.

Roles of endogenous cholinergic neurons in the induction of long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses
Neuroscience Research, 20 (1994): 71-78

3) Maeda, T., Shimoshige, Y., Mizukami, K., Shimohama, S., Kaneko, S., Akaike, A. and Satoh, M.

Patch sensor detection of glutamate release evoked by a single electrical shock
Neuron, 15 (1995): 253-257

4) Maeda, T., Kaneko, S., Akaike, A. and Satoh, M.

Direct evidence for increase in excitatory amino acids release during mossy fiber LTP in rat hippocampal slices as revealed by the patch sensor methods
Neuroscience Letters (in press)

引用文献

1. Armstrong, D.M., Manley, L., Haycock, J.W. and Hersh, L.B.
J. Chemical Neuroanatomy, 3 (1990) 133-140.
2. Ashkenazi, A., Winslow, J.W., Peralta, E.G., Peterson, G.L., Schimerlik, M.I., Capon, D.J. and Ramachandran, J.
Science, 238 (1987) 672-675.
3. Aubert, I., Cecyry, D., Gauthier, S. and Quirion, R.
Eur. J. Pharmacol., 217 (1992) 173-184.
4. Bartus, R.T., Dean, R.L., Bernard, B. and Lippa, A.S.
Science, 217 (1982) 408-418.
5. Bliss, T.V.P. and Collingridge, G.L.
Nature, 361 (1993) 31-39.
6. Brown, D.A., Gahwiler, B.H., Griffith, W.H. and Halliwell, J.V.
Progress Brain Res., 83 (1990) 141-160.
7. Brown, J.H. and Brown, S.L.
J. Biol. Chem., 259 (1984) 3777-3781.
8. Buckley, N.J., Bonner, T.I. and Brann, M.R.
J Neurosci., 8 (1988) 4646-4652.
9. Copenhagen, D.R., and Jahr, C.E.
Nature, 341 (1989) 536-539.
10. Coyle, J.T., Price, D. L. and DeLong, M.
cience, 219 (1983) 1184-1190.
11. Davies, S.N., Lester, R.A., Reymann, K.G. and Collingridge, G.L.
Nature, 338 (1989) 500-503.
12. Dong, G.Z., Kameyama, K., Rincken, A. and Haga, T.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 274 (1995) 378-384.
13. Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., and Takahashi, T.
Pflugers Arch. 414 (1989) 600-612.
14. Fisher, A. and Hanin, I.
Life Sci. 27 (1980) 1615-1634.

15. Fisher, A. and Hanin, I.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 26 (1986) 161-181.
16. Fisher, A., Mantione, C.R., Abraham, D.J. and Hanin, I.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 222 (1982) 140-145.
17. Fonnum, F.A.
J. Neurochem., 24 (1975) 407-409.
18. Frotscher, M. and Leranth, C.
J. Comp. Neurol., 239 (1985) 237-246.
19. Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, H., Mishina, M. and Numa, S.
Nature, 335 (1988) 355-358.
20. Gal, Gy., Potter, P.E., Hanin, I., Kakucska, I. and Vizi, E.S.
Neuroscience, 19 (1986) 1197-1205.
21. Grinnell, A.D., Gundersen, C.B., Meriney, S.D. and Young, S.H.
J. Physiol. 419 (1989) 225-251.
22. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J.
Pflugers Arch. 391 (1981) 85-100.
23. Hounsgaard, J.
Exp. Neurol., 62 (1978) 787-797.
24. Hortnagl, H., Potter, P.E. and Hanin, I.
Neuroscience, 22 (1987) 203-213.
25. Hume, R.I., Role, L.W. and Fischbach, G.D.
Nature, 305 (1983) 632-634.
26. Isaacson, J.S., Solis, J.M. and Nicoll, R.A.
Neuron, 10 (1993) 165-175.
27. Jonas, P., and Sakmann, B.
J. Physiol., 455 (1992) 143-171.
28. Katsuki, H., Kaneko, S., Tajima, A. and Satoh, M.
Neurosci. Res., 12 (1991) 393-402.
29. Katsuki, H., Kaneko, S. and Satoh, M.
Brain Res., 581 (1992) 108-114.
30. Kullmann, D.M.
Neuron, 12 (1994) 1111-1120.
31. Leventer, S., McKeag, D., Clancy, M., Wulfert, E. and Hanin, I.
Neuropharmacology, 24 (1985) 453-459.
32. Li, M., Yasuda, R.P., Wall, S.J., Wellstein, A. and Wolfe, B.B.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 40 (1991) 28-35.
33. Lipton, S.A.
J. Neurosci., 8 (1987) 3857-3868.
34. Llinas, R.R., McGuinness, T.L., Leopard, C.S., Sugimori, M. and Greengard, P.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82 (1985) 3035-3039.
35. Low, W.C., Lewis, P.R., Bunch, S.T., Dunnett, S.B., Thomas, S.R., Iversen, S.D., Bjorklund, A. and Stenevi, U.
Nature, 300 (1982) 260-262.
36. Maeda, T., Kaneko, S. and Satoh, M.
Neurosci. Res., 18 (1994) 277-282.
37. Manabe, T. and Nicoll, R.A.
Science, 265 (1994) 1888-1892.
38. Marchi, M. and Raiteri, M.
Pharmacol. Exp. Ther., 248 (1989) 1255-1260.
39. Margaroli, A. and Tsien, R.W.
Nature, 357 (1992) 134-139.
40. Matsuoka, N., Kaneko, S. and Satoh, M.
Brain Res., 553 (1991) 188-194.
41. Potter, P.E., Tedford, C., Kindel, G. and Hanin, I.
Brain Res., 487 (1989) 238-244.
42. Potter, P.E. and Nitta, S.
Neuropharmacology, 32 (1993) 519-526.
43. Richards, M.H.
Br. J. Pharmacol., 99 (1990) 753-761.
44. Roisin, M.P., Brassart, J.L., Charton, G., Crepel, V. and Ben Ari, Y.
J. Neurosci. Methods, 37 (1991) 183-189.

45. Satoh, M., Ishihara, K. and Katsuki, H.
Neurosci. Lett., 93 (1988) 236-241.
46. Stevens, C.F. and Wang, Y.
Nature, 371 (1994) 704-707.
47. Tong, G., Malenka, R.C. and Nicoll, R.A.
Neuron, 16 (1996) 1147-1157.
48. Valentino, R.J. and Dingledine, R.
J. Neurosci., 1 (1981) 784-792.
49. Weisskopf, M.G. and Nicoll, R.A.
Nature, 376 (1995) 256-259.
50. West, D.C., Thomson, A.M. and Do, K.Q.
J. Neurosci. Methods, 43 (1992) 35-42.
51. Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T. and DeLong, M.R.
Science, 215 (1982) 1237-1239.
52. Williams, S. and Johnston, D.
Science, 242 (1988) 84-87.
53. Williams, S. and Johnston, D.
Neuron, 3 (1989) 583-588.
54. Xiang, Z., Greenwood, A.C., Kairiss, E.W. and Brown, T.H.
J. Neurophysiol., 71 (1994) 2552-2556.
55. Xie, Z.-P., and Poo, M.-M.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (1986) 7069-7073.
56. Yamamoto, C., Sawada, S. and Kamiya, H.
Neurosci. Lett., 138 (1992) 111-114.
57. Yamazaki, N., Kato, K., Kurihara, E. and Nagaoka, A.
Psychopharmacology, 103 (1991) 215-222.
58. Young, S.H. and Poo, M.M.
Nature, 305 (1983) 634-637.
59. Zalutsky, R.A. and Nicoll R.A.
Science, 248 (1990) 1619-1624.