

低酸素および低酸素＋無グルコースによる細胞内遊離 カルシウム濃度変化と海馬神経活動障害

—— ラット海馬切片におけるシナプス活動と細胞内遊離
カルシウム濃度の同時記録 ——

新潟大学医学部麻酔学教室 (主任: 下地恒毅教授)

阿 部 崇

Relationship Between Changes in Neuronal Activity and Intracellular free
 Ca^{2+} Concentration Induced by Hypoxia with Glucose Depletion
—— Simultaneous Recordings of Synaptic Activity and Intracellular
free Ca^{2+} Concentration in Rat Hippocampal Slices ——

Takashi ABE

*Department of Anesthesiology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Koki SHIMOJI)*

In order to study the relationship between intracellular free calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and functional neuronal damage by hypoxia, changes in fluorescence of calcium-dependent fluorescence of a Ca^{2+} indicator (fura-2) loaded and synaptic responses (population spike and EPSP) were recorded simultaneously from the CA1 region in rat hippocampal slices superfused with deoxygenated Krebs solution with or without glucose depletion at 36~37°C. When slices were exposed to hypoxia with glucose depletion, synaptic responses disappeared in 2 min. The synaptic responses reappeared transiently in 7~8 min during exposure in a majority of slices. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased in two phases: it increased gradually until the reappearance of the transient synaptic responses, and then it showed a rapid and large increase immediately after the disappearance of the transient synaptic responses. After reoxygenation and glucose resupply, synaptic responses did not recover in the slices (8 of 10 slices) in which $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased steeply in the second phase, while the synaptic responses recovered in the slices (2 of 10 slices) in which $[\text{Ca}^{2+}]_i$ did not show the second phase increase. When slices were exposed to hypoxia in the presence of glucose, only

Reprint requests to: Takashi ABE
Department of Anesthesiology, Niigata
University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部麻酔学教室 阿部 崇

gradual increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed, and synaptic responses recovered with augmentation after reoxygenation. These results suggest that the rapid and large increases in $[Ca^{2+}]_i$ in the second phase link to acute functional neuronal cell damage by hypoxia with glucose depletion. The results also suggest that the presence of glucose prevents the large increase in $[Ca^{2+}]_i$.

Key words: Hippocampal slice, Synaptic responses, Intracellular free calcium, Simultaneous recording, Hypoxia, Glucose depletion

海馬切片, シナプス活動, 細胞内遊離カルシウム, 同時記録, 低酸素, 無グルコース

1. 緒 言

虚血による脳神経細胞の不可逆性障害には細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇が関与していると考えられている¹⁾. 例えば, 脳切片標本において, 灌流液 Ca^{2+} 濃度を減少させておくことと低酸素による神経細胞障害やイオン輸送障害が改善されることが知られている²⁾⁻⁵⁾. 逆に, 灌流液 Ca^{2+} 濃度を増しておくこととシナプス伝達とイオン輸送の回復を阻害するとされる⁴⁾⁵⁾. その機序として N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) タイプのグルタミン酸受容体を介した Ca^{2+} の細胞内への過剰流入が細胞障害をきたすためと考えられている¹⁾. 一方, 脳切片実験では低酸素中のグルコース, 乳酸, グルタミンの添加⁶⁾⁻⁷⁾ や, 低酸素負荷前のクレアチンとのインクベーション²⁾ は低酸素後のシナプス電位の回復を改善するという報告があり, 低酸素時の細胞障害を防ぐには細胞のエネルギーレベルを維持することが重要であることが指摘されている.

海馬 CA1 領域は一過性の虚血に対し最も脆弱な部位の一つとして知られている⁸⁾⁹⁾. この脆弱性は CA1 錐体細胞では NMDA タイプのグルタミン酸受容体が多く存在し, その活性化による細胞内への Ca^{2+} 過剰流入により虚血後の傷害が進行することによると説明されている¹⁰⁾⁻¹³⁾. しかし, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が虚血後の神経細胞の機能障害と結びついているという直接的な証拠はない.

本実験ではラット海馬切片標本を用い CA1 領域から電気的活動と $[Ca^{2+}]_i$ を同時に記録し, 低酸素および低酸素+無グルコース負荷による変化を観察することによって虚血による神経機能に対する過剰な細胞内の Ca^{2+} の毒性を検討した.

2. 方 法

1) 海馬切片標本の作製

体重 120~160 g の雄性 Wistar 系ラットを用いた. 断頭後ただちに大脳を摘出し, 氷冷クレブス液中でマイクロスライサー (Dosaka EM, TDK-1000) を用い, 厚さ 350 μ m の海馬矢状切片標本を作製した. クレブス液の組成を以下に示す (mM): NaCl 117, KCl 3.6, NaH_2PO_4 1.2, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, グルコース 11. 作製した切片標本を 10 μ M fura-2AM (1-(2-(5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy)-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ehtane-N, N, N'-tertraaceticacid, pentaacetoxymethyl ester, 同仁) と非イオン性界面活性物質 Pluronic[®] F-127 (Carbio) 0.01% を含み 95% O_2 -5% CO_2 で通気したクレブス液中で 90 分間染色した.

2) 測定法

切片を測定用チャンパーに移し, 液温を 36~37°C に維持し, 95% O_2 -5% CO_2 を十分に通気したクレブス液で毎分 5 ml の速度で灌流した. 蛍光源 (日本光電, CAM-500) から 340 nm および 380 nm の励起光を交互に切片に照射し, 励起された 500 nm の蛍光を SIT カメラ (浜松ホトニクス, C-2400-08) を用いて CA1 領域から記録した. 得られた 2 波長励起による蛍光強度比 ($R_{340/380}$) を求め, 画像処理装置 (浜松ホトニクス, ARGUS-200) を用いて蛍光強度比画像を作製した.

双極電極を用いて Schaffer 側枝を supramaximal の強度で刺激し, 2M NaCl で満たした 1~10 M Ω の微小ガラス電極で CA1 錐体細胞層からシナプス電位を導出し, 微小電極増幅器 SEN-3301 (日本光電) で増幅し, メモリーオシロスコープ VC-11 (日本光電) を用い記録した.

グルコース除去灌流液はクレブス液のグルコースを当量の NaCl で置換した灌流液を用いた. 低酸素負荷は 95% N_2 -5% CO_2 で十分に通気した灌流液を用いて 10 分間行なった. 灌流液の酸素分圧 (PO_2) は血液ガス分析装置 (ABL-3, Radiometer, Copenhagen) を用いて, グル

コース濃度は酵素学的血糖測定キット (Blood Sugar-GOD-Perid-Test, Boeringer, Mannheim) を用いて測定した。

3) 分 析

切片実験においては自家蛍光による蛍光強度への影響を無視できず、また、細胞内の fura-2 の解離定数も正確には求められていない。そこで本実験では $[Ca^{2+}]_i$ の変化を $R_{340/380}$ の変化として表し、低酸素負荷前の値を 100% とし、そこからの変化率として表した。データ解析に用いた $R_{340/380}$ はガラス微小電極先端部周辺の錐体細胞層、それに隣接する起始層および放射層に約 $100 \mu m \times 100 \mu m$ のウインドウを設定し、そのウインドウ内各画素の $R_{340/380}$ の平均値を採用した。データは全て平均±標準偏差で示し、一元分散分析によって有意差を検定した。 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

Population spike は低酸素負荷前の振幅を 100% とし、変化率として表した。全切片で population spike が観察されなかった時点では、振幅はノイズレベル (負荷前の population spike 振幅に対し $3 \pm 2\%$, mean ± SD, $n=14$) 以下とみなし、Mann-Whitney U 検定

を用いて負荷前値との有意差を検定した。

グルコース濃度が検出限界以下の時点では、Mann-Whitney U 検定を用いて負荷前値との有意差を検定した。

3. 結 果

1) 灌流液 PO_2 とグルコース濃度の変化 (図 1, I および II)

PO_2 は酸素化クレブス液では 582 ± 13 mmHg (mean ± SD, $n=7$) を示したが、低酸素+無グルコース負荷 1 分で 129 ± 9 mmHg ($p < 0.0001$; vs 負荷前値), 5 分で 83 ± 2 mmHg ($p < 0.0001$), 10 分で 66 ± 3 mmHg ($p < 0.0001$) まで低下した。再酸素化後 1 分で 465 ± 17 mmHg ($p < 0.01$) まで上昇し、5 分で 571 ± 20 mmHg と負荷前値まで回復した ($p < 0.95$)。グルコース濃度は 0.5 分で負荷前の $1/25$ まで低下し、1 分で測定限界以下に低下した。

2) 低酸素+無グルコースによる変化

低酸素+無グルコース負荷によりシナプス電位は 2 分以内に消失した。興味深いことに 18 切片中 14 切片で 7.5

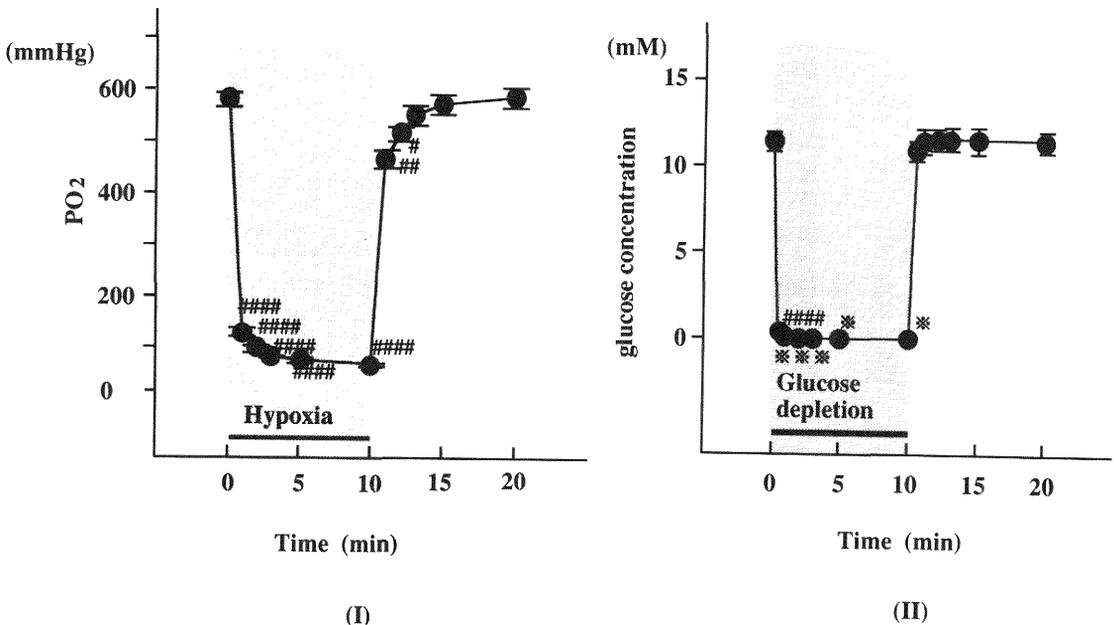


図 1 低酸素+無グルコース灌流液による測定チャンパー内灌流液の酸素分圧 (PO_2) 変化 (I), 及びグルコース濃度変化 (II) (mean ± SD, $n=7$)

PO_2 は 1 分間で急速に減少し、その後徐々に減少した。グルコースの除去および再投与は 1 分以内に完了した。(#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.0001$ vs 低酸素+無グルコース負荷前値, *: $p < 0.01$; vs 低酸素+無グルコース負荷前値, 有意差検定については本文を参照)。

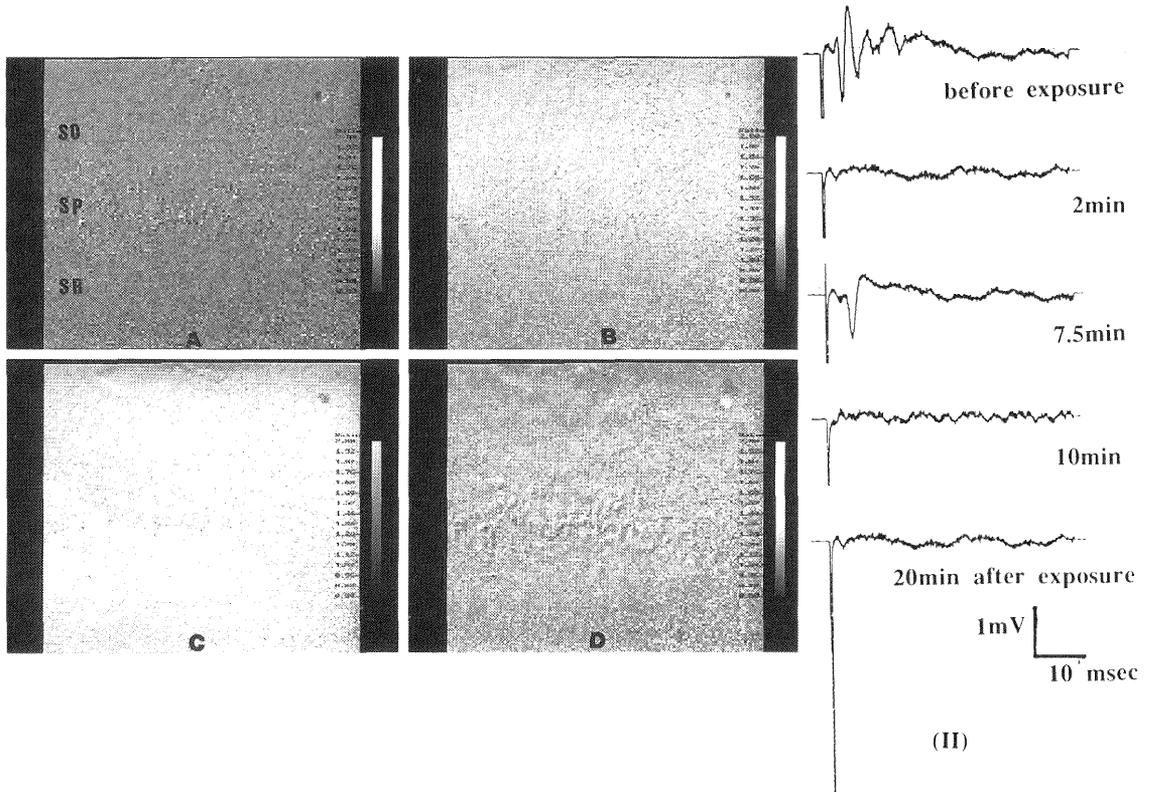


図2 低酸素+無グルコース負荷による CA1 領域の蛍光強度比 ($R_{340/380}$) 画像 (I) とシナプス電位 (II) の変化

(SO; 起始層, SP; 錐体細胞層, SK; 放射層)

(I) $R_{340/380}$ と濃淡の関係を各画像の右に示す。(A) 負荷前. 変化率を求めるため, 全領域の $R_{340/380}$ を1.0としている。(B) 負荷開始7.5分. 放射層の $R_{340/380}$ は起始層および錐体細胞層より低い。(C) 負荷10分. $R_{340/380}$ は大きく上昇している. 放射層は他の2層より高くなっている。(D) 負荷終了10分後. $R_{340/380}$ は低下したが3層とも負荷前よりも高い。

(II) シナプス電位は低酸素+無グルコース負荷2分で消失し, 7分から9分まで一過性に出現した. 酸素化クレブス液再灌流後, シナプス電位は回復しなかった。

± 0.5 分でシナプス電位が再び出現し 8.9 ± 0.6 分には消失した. この一過性シナプス電位の振幅は負荷前に比べ $70.6 \pm 18.7\%$ と有意に ($p < 0.05$) 小さかった. 酸素化クレブス液再灌流後, シナプス電位は一過性電位が出現した14切片中2切片, 出現しなかった4切片中1切片で回復した。

同時測定は上記18切片中10切片で行い, このうち2切片で酸素化クレブス液再灌流後, 電位が回復した. 得られた $R_{340/380}$ 画像と population spike の変化の1例を図2に示す. さらに population spike 振幅および $R_{340/380}$ の変化を電位非回復例と回復例に分けてそれぞ

れ図3および図4に示す. シナプス電位は負荷2分以内に消失したが, $R_{340/380}$ に著明な変化はなかった。

$R_{340/380}$ は負荷初期は3領域とも徐々に上昇した. 負荷5分から7分までは放射層の変化率は他の領域より有意 ($p < 0.05$) に低かった (負荷5分: 起始層 $113 \pm 7\%$, 錐体細胞層 $109 \pm 3\%$, 放射層 $107 \pm 2\%$. 負荷7分: 起始層 $124 \pm 8\%$, 錐体細胞層 $12 \pm 7\%$, 放射層 $116 \pm 6\%$). その後, $R_{340/380}$ は3領域とも急峻に上昇した. 低酸素+無グルコース負荷10分により $R_{340/380}$ は負荷前に比べ起始層 $157 \pm 23\%$ ($p < 0.01$), 錐体細胞層 $158 \pm 19\%$ ($p < 0.01$), 放射層 $174 \pm 19\%$ ($p < 0.01$) まで上昇

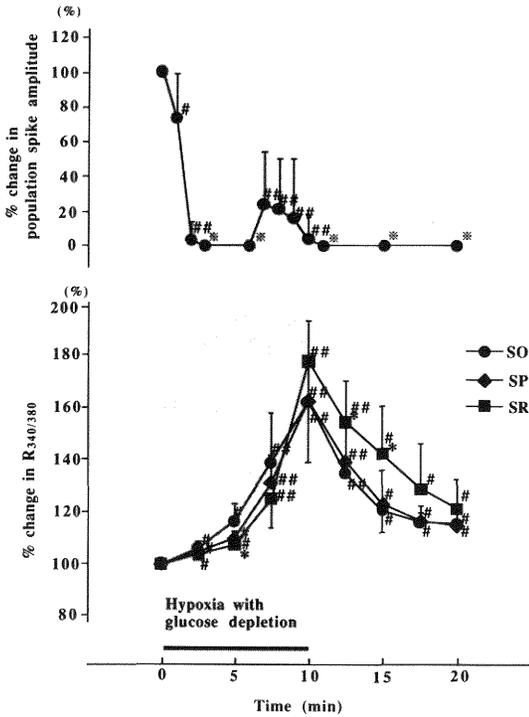


図3 低酸素+無グルコース負荷によりシナプス電位が回復しなかった切片における population spike 振幅と $R_{340/380}$ の%変化 (mean±SD, n=8)

低酸素+無グルコース負荷により population spike は3分で全切片で消失した。population spike はその後、負荷7分から10分まで8切片中6切片で一過性に観察されたが、再び消失し酸素化 Krebs 液再灌流後も観察されなかった (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$; vs 低酸素+無グルコース負荷前値, *: $p < 0.01$; vs 低酸素+無グルコース負荷前値, 有意差検定については本文を参照)。 $R_{340/380}$ は負荷5分までは徐々に上昇したが、その後急峻に上昇した。(#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$; vs 低酸素+無グルコース負荷前値)。放射層の $R_{340/380}$ は負荷中の5~7分は他の層と比べ有意に低く、また、負荷後の3.5~5.5分まで有意に高い値を示した (*: $p < 0.05$, 放射層 vs 錐体細胞層)。錐体細胞層と起始層の間には有意差はなかった。

した。酸素化 Krebs 液再灌流後、 $R_{340/380}$ は低下したが、10分後も起始層 $114 \pm 4\%$ 、錐体細胞層 $114 \pm 5\%$ 、放射層 $120 \pm 17\%$ と負荷前よりも有意に ($p < 0.05$) 高かった。また放射層では3.5分から5.5分まで錐体細胞層より有意に ($p < 0.05$) 高かった (3.5分: 起始層 $126 \pm$

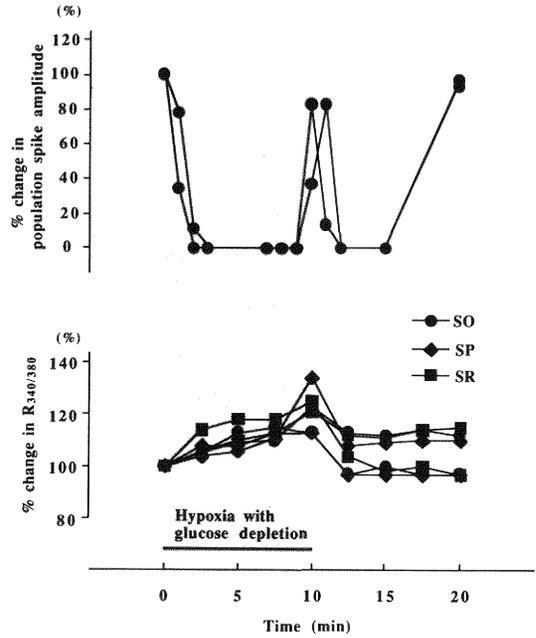


図4 低酸素+無グルコース負荷後、シナプス電位が回復した切片における population spike 振幅及び $R_{340/380}$ の%変化 (2例の個別値)

Population spike は負荷2分で消失した後、10~11分で一過性に出現し、再び消失した。酸素化 Krebs 液再灌流後10分には population spike はほぼ負荷前のレベルまで回復した。 $R_{340/380}$ は電位非回復切片のような後半の急峻な上昇を示さなかった。

16%、錐体細胞層 $126 \pm 15\%$ 、放射層 $142 \pm 20\%$ 。5.5分: 起始層 $117 \pm 7\%$ 、錐体細胞層 $120 \pm 11\%$ 、放射層 $133 \pm 18\%$ 。). 起始層と錐体細胞層の間に有意差はなかった。電位が回復した2切片では $R_{340/380}$ のこのような急峻で大きな変化はみられなかった。

3) 低酸素負荷による変化

低酸素負荷にともなう population spike 振幅および $R_{340/380}$ の変化の6切片の平均を図5に示す。シナプス電位は負荷2分以内に消失したが、 $R_{340/380}$ に著明な変化はなかった。低酸素負荷により $R_{340/380}$ は徐々に上昇し、10分で負荷前値に比し起始層 $113 \pm 14\%$ 、錐体細胞層 $107 \pm 3\%$ 、放射層 $115 \pm 7\%$ と有意に ($p < 0.05$) 上昇した。3領域間の有意差はなかった。

再酸素化後、population spike は 4.6 ± 0.5 分で再び出現し、その振幅は10分では負荷前に比べ $133 \pm 30\%$ と有意に ($p < 0.05$) 増大した。この電位の増強は少なく

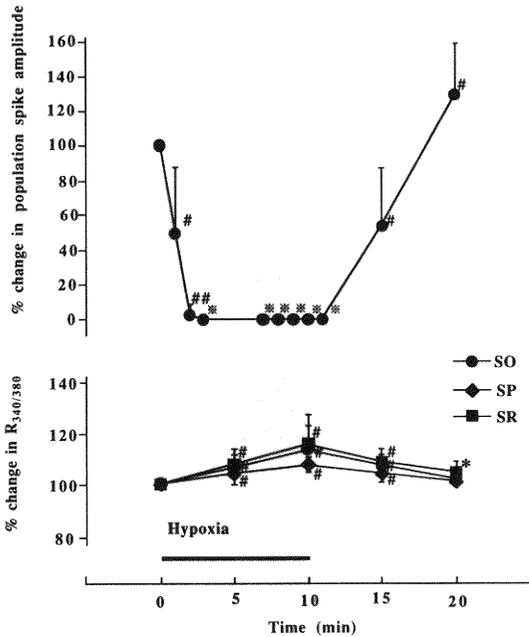


図5 低酸素負荷した6切片の population spike 振幅と $R_{340/380}$ の%変化 (mean \pm SD, n=6)

Population spike は全切片とも低酸素負荷3分で消失し、その後の負荷中には消失したまま出現しなかった。再酸素化後は5分以内に全切片とも再び出現し、その振幅は10分では負荷前よりも有意に増大した (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$; vs 低酸素負荷前値, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; vs 低酸素負荷前値, 有意差検定については本文を参照)。 $R_{340/380}$ は低酸素負荷中徐々に上昇したが、再酸素化後負荷前のレベルまで回復した (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$; vs 低酸素負荷前値)。再酸素化後10分の $R_{340/380}$ は放射層では錐体細胞層より有意に高かった (*: $p < 0.05$, 放射層 vs 錐体細胞層)。錐体細胞層と起始層の間には有意差はなかった。

とも10分以上は持続した。再酸素化10分で $R_{340/380}$ はほぼ負荷前値に回復したが放射層では $104 \pm 4\%$ と錐体細胞層 ($101 \pm 1\%$) より有意に ($p < 0.05$) 高い値を示した。

4. 考 察

本実験ではシナプス電位と fura-2 の蛍光強度を同一の脳切片で同時に計測することにより神経機能障害と $[Ca^{2+}]_i$ 変化との関係を明確にする事ができた。シナプス電位はグルコースの有無に関わらず低酸素負荷2分

ほぼ完全に消失したが、 $R_{340/380}$ はこの時期には著明な変化はなかった。低酸素+無グルコース負荷により $R_{340/380}$ が急峻で大きな上昇を示した切片では酸素化クレブス液再灌流後 $R_{340/380}$ は低下したが、シナプス電位は回復しなかった。対照的にシナプス電位が回復した切片では $R_{340/380}$ の急峻な上昇はみられなかった。また、グルコース存在下の低酸素負荷では $R_{340/380}$ の上昇は低くとどまり、シナプス活動も全例回復した。これらの事実から低酸素+無グルコース負荷による $[Ca^{2+}]_i$ の急峻で大きな上昇はシナプス活動の急性かつ不可逆的な障害に強く関与していることが示唆される。

$R_{340/380}$ の急峻で大きな上昇は低酸素・無グルコース負荷の後半に出現する一過性シナプス電位消失とともに起こった。この一過性シナプス電位に関しては以前から知られており³⁾⁶⁾⁷⁾, Rader と Lanthorn³⁾ は一過性電位に続いて大きく急峻な膜電位の脱分極が約7.5分で起きると報告している。また、Higashi¹⁴⁾ は低酸素+無グルコース負荷6分以降に急峻な脱分極が起こり、膜電位は0 mV 近くに達するとしている。この脱分極の起こるまでの時間は本実験における一過性電位の出現時期と非常によく一致している。これらのことから、一過性シナプス電位は膜電位が神経細胞の発火閾値近くまで脱分極した時に出現し、その後、膜電位が急激に脱分極してしまうため再び消失すると考えられる。

$[Ca^{2+}]_i$ の急峻で大きな上昇には、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネル¹²⁾¹⁵⁾、興奮性アミノ酸受容体を介する Ca^{2+} 流入¹⁶⁾、 Ca^{2+} の細胞外への放出抑制¹⁷⁾、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの放出¹⁾¹⁸⁾、非イオン選択性の陽イオンチャネルからの流入¹⁴⁾、 Na^+/Ca^{2+} 交換系の逆転¹⁹⁾²⁰⁾などいくつかの因子が考えられる。

膜電位が脱分極したときには電位依存性 Ca^{2+} チャネル活性化¹²⁾¹⁵⁾ や Na^+/Ca^{2+} 交換系の逆転が生じる¹⁹⁾²⁰⁾。Takahashi ら¹⁵⁾ は海馬 CA1 錐体細胞には4種の電位依存性 Ca^{2+} チャネルがあり、なかでもLタイプは膜電位が0~10 mV の時最大の電流が流れると報告している。低酸素+無グルコース負荷により膜電位が大きく脱分極したとき、このLタイプ Ca^{2+} チャネルを通して細胞外 Ca^{2+} が流入することが考えられる。しかし、Krnjević と Leblond²¹⁾ は CA1 錐体細胞ではLタイプ電流は低酸素負荷1~2分ではほぼ完全に阻害されると報告している。一方、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には Na^+/Ca^{2+} 交換系の逆転が重要な役割を果たすといわれる¹⁹⁾。Dipolo と Beauge²⁰⁾ は Na^+/Ca^{2+} 交換系による Na^+ の放出には ATP の存在が必要であるとして

いるが、Whittingham ら²²⁾ はモルモット海馬切片において低酸素＋無グルコース負荷 6 分には ATP は大幅に減少していると述べている。したがって、低酸素＋無グルコース負荷による急峻で大きな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はこれらの膜脱分極によって活性化されるメカニズムのみでは十分には説明できないと思われる。

砂ネズミの海馬では CA1 領域における NMDA タイプのグルタミン酸受容体の高密度の存在が知られている²³⁾。Mitani ら³³⁾ は砂ネズミ海馬切片を用いて低酸素＋無グルコース負荷 80～170 秒で CA1 領域において $[Ca^{2+}]_i$ の急激な上昇が起こることを報告している。しかし、この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の潜時は本実験と比べかなり短い。砂ネズミ海馬における $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が NMDA タイプグルタミン酸受容体の活性化によるとするならば、その関与はラット海馬においては砂ネズミほど大きくはないのかも知れない。

Lipton と Lobner¹⁷⁾ は低酸素＋無グルコース負荷中の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は ATP 依存性の Ca^{2+} 放出機構の抑制によるとしている。また、低酸素＋無グルコース負荷中には代謝性グルタミン酸受容体を介する小胞体からの Ca^{2+} 放出も誘導される¹⁸⁾。本実験における急峻で大きな $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対するこれらの細胞内 Ca^{2+} の関与の程度は不明であるが、重要な役割を果たしているかも知れない。

放射層における $R_{340/380}$ の変化率は低酸素＋無グルコース負荷 5～7 分では他の領域より有意に小さかった。しかし負荷 10 分では他の領域より大きくなり、酸素化クレブス液再灌流後も高い値を示した。このことから神経細胞の部位によって Ca^{2+} の増加機序や緩衝能力に差があることも示唆される。

fura-2 には Ca^{2+} に対する緩衝作用²⁵⁾があり、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑え、 Ca^{2+} の毒性から神経細胞を保護する可能性はある。しかしその効果は fura-2 の Ca^{2+} 結合能力、すなわち fura-2 の細胞内濃度とその解離定数（室温、溶液中で 220 nM）により限定されている²⁵⁾。したがって、低酸素＋無グルコース負荷による急峻で大きな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は fura-2 の Ca^{2+} 結合能力を越えていると考えられる。

グルコース存在下の低酸素負荷 10 分では、再酸素化後、シナプス電位は全切片で回復し、さらに振幅が増大した。このシナプス電位の低酸素による消失と再酸素化後の興奮性の増大は Schiff と Somjen²⁶⁾ によっても報告されている。彼らの実験では 30 分間の低酸素負荷によっても細胞外 Ca^{2+} 濃度は変化していないが、本実験では

$R_{340/380}$ は 10 分間の低酸素負荷で上昇した。細胞外 Ca^{2+} 濃度は $[Ca^{2+}]_i$ に比べかなり高いので、 $[Ca^{2+}]_i$ のわずかな変化では影響されないと考えられる。さらに本実験の灌流温度が 36～37 °C であったのに対し彼らの実験は 29 °C で行われている。低酸素下において、脳切片内のエネルギーレベルは灌流温度が高いほど早く減少するとされている⁵⁾²⁷⁾。したがって本実験では ATP がより早く枯渇し、ATP 依存性の Ca^{2+} 細胞外放出がより強く抑制され、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こったとも考えられる。Fujiwara ら²⁸⁾ や Hansen ら²⁹⁾ は 10 分間の低酸素負荷では大きな膜脱分極は生じないことを示している。この事からグルコース存在下の低酸素負荷中の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は電位依存性 Ca^{2+} チャネルなど脱分極により活性化されるメカニズムによるものではないと考えられる。

再酸素化後、 $R_{340/380}$ は速やかに低下したが、シナプス電位の振幅は持続性に増大した。Kudo ら³⁰⁾ は貫通枝のテタヌス刺激によって歯状回に一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と population spike の持続性の増強が起こることを示した。また、海馬で観察される長期増強現象は細胞内で増加した Ca^{2+} により細胞内の情報伝達機構が活性化されるため神経細胞の興奮性が増すことによると考えられている³¹⁾。同様のことが低酸素中の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によって誘起されるならば、それが再酸素化後の神経細胞興奮性を増強させる原因となっているかもしれない。

測定チャンパー内のグルコース濃度の変化は 0.5 分でほぼ完了したのに対し、 PO_2 の変化はそれより緩徐であった。灌流回路内には時折小さな気泡が見られたが、この気泡内に残る気体が PO_2 の変化を遅くしていたのかもしれない。脳切片では組織内 PO_2 は表面から 25 μm 深くなる毎に 50% 低下するという報告もある³²⁾。したがって低酸素負荷 1 分後にはチャンパー内の灌流液 PO_2 は 129 ± 9 mmHg あるとしても、切片の深部ではかなりの低酸素条件になっていると考えられる。

以上、本実験により低酸素負荷初期のシナプス電位の消失は $[Ca^{2+}]_i$ の変化によるものではないことが示唆された。また低酸素＋無グルコース負荷による急峻で大きな $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は急性不可逆的神経活動障害と深い関係があること、さらに低酸素負荷中のグルコースの存在はこの急峻な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を防ぎ急性の神経細胞障害を防ぐことがわかった。 $[Ca^{2+}]_i$ の変化はその大きさによっては低酸素下で神経細胞を傷害し、あるいはシナプス活動を修飾する重要な因子である事が強く示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜わりました下地恒毅教授に厚く御礼申し上げます。また、研究を進めるにあたり、御助言、御協力いただきました藤原直士講師、佐藤由紀夫技官、久留米大学東英穂助教授に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) **Siesjö, B.K. and Bengtsson, F.:** Review; calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-released pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis, *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, **9**: 127~140, 1989.
- 2) **Kass, I.S. and Lipton, P.:** Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice, *J. Physiol.*, **332**: 459~472, 1982.
- 3) **Rader, R.K. and Lanthorn, T.H.:** Experimental ischemia induces a persistent depolarization blocked by decreased calcium and NMDA antagonists, *Neurosci. Lett.*, **99**: 125~130, 1989.
- 4) **Roberts Jr, E.L. and Sick, T.J.:** Calcium-sensitive recovery of extracellular potassium and synaptic transmission in rat hippocampal slices exposed to brief anoxia, *Brain Res.*, **456**: 113~119, 1988.
- 5) **Schurr, A. and Rigor, B.B.:** Reviews; cerebral ischemia revisited: new insights as revealed using in vitro brain slice preparation., *Experientia*, **45**: 684~695, 1989.
- 6) **Dong, W.Q., Schurr, A., Reid, K.H., Shields, C.B. and West, C.A.:** The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia, *Stroke*, **19**: 498~502, 1988.
- 7) **Schurr, A., Chantgaris, D.G. and Rigor, B.M.:** Glutamine protects neuronal function against cerebral hypoxia: a study using the in vitro hippocampal slice preparation, *Brain Res.*, **412**: 179~181, 1987.
- 8) **Kawasaki, K., Traynelis, S.F. and Dingledine, R.:** Different responses of CA1 and CA3 regions to hypoxia in rat hippocampal slice, *J. Neurophysiol.*, **63**: 385~394, 1990.
- 9) **Kirino, T. and Sano, K.:** Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia, *Acta Neuropathol.*, **62**: 201~208, 1984.
- 10) **Ellré, K. and Lehmann, A.:** Calcium dependency of N-methyl-D-aspartate toxicity in slices from the immature rat hippocampus, *Neurosci.*, **32**: 371~379, 1989.
- 11) **Meldrum, B., Evans, M., Griffiths, T. and Simon, R.:** Ischemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry, *Br. J. Anesth.*, **57**: 44~46, 1985.
- 12) **Miller, R.J.:** Multiple calcium channels and neuronal function, *Science*, **235**: 46~52, 1987.
- 13) **Urban, L., Neill, K.H., Crain, B.J., Nadler, J.V. and Somjen, G.G.:** Postischemic synaptic excitation and N-methyl-D-aspartate receptor activation in gerbils, *Stroke*, **21(suppl III)**: 23~27, 1990.
- 14) **Higashi, H.:** Membrane dysfunction of the mammalian hippocampal CA1 neurons induced by lack of oxygen and/or glucose, In K. Shimoji (Eds.) *Mechanisms of Ischemic Brain Damage*, PharMa International Inc., Tokyo, 30~37, 1990.
- 15) **Takahashi, K., Wakamori, M. and Akaike, N.:** Hippocampal CA1 pyramidal cells of rats have four voltage-dependent calcium conductances, *Neurosci. Lett.*, **104**: 229~234, 1989.
- 16) **Fagg, G.E.:** L-glutamate, excitatory amino acid receptors and brain function, *TINS*, **8**: 207~210, 1985.
- 17) **Lipton, P. and Lobner, D.:** Mechanisms of intracellular calcium accumulation in the CA1 region of rat hippocampus during anoxia in vitro, *Stroke*, **21(suppl III)**: 60~64, 1990.
- 18) **Berridge, M.J. and Irvine, R.F.:** Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction, *Nature*, **312**: 315~321, 1984.
- 19) **Dipolo, R. and Beaugé, L.:** The calcium pump and sodium-calcium exchange in squid axons, *Ann. Rev. Physiol.*, **45**: 313~324, 1983.
- 20) **Dipolo, R. and Beaugé, L.:** Reverse Na-Ca exchange requires internal Ca and/or ATP in squid axons, *Biochem. Biophys. Acta.*, **854**: 298~306, 1986.
- 21) **Krnjević, K. and Leblond, J.:** Changes in

- membrane currents of hippocampal neurons evoked by brief anoxia, *J. Neurophysiol.*, **62**: 15~30, 1989.
- 22) **Whittingham, T.S., Lust, W.D. and Passonneau, J.V.**: An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice, *J. Neurosci.*, **4**: 793~802, 1984.
- 23) **Monaghan, D.T., Holets, V.R., Toy, D.W. and Cotman, C.W.**: Anatomical distribution of pharmacologically distinct ^3H -L-glutamate binding sites, *Nature*, **306**: 176~179, 1983.
- 24) **Rader, R.K. and Lanthorn, T.H.**: Experimental ischemia induces a persistent depolarization blocked by decreased calcium and NMDA antagonists, *Neurosci. Lett.*, **99**: 125~130, 1989.
- 25) **Tsien, R.Y.**: Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic calcium, *TINS*, **11**: 419~424, 1988.
- 26) **Schiff, S.J. and Somjen, G.G.**: The effect of graded hypoxia on the hippocampal slices: An in vitro model of the ischemic penumbra, *Stroke*, **18**: 30~37, 1987.
- 27) **Lipton, P. and Whittingham, T.S.**: Energy metabolism and brain slice function, In R. Dingledine (Eds.), *Brain Slice*, Plenum Press, New York, 113~153, 1984.
- 28) **Fujiwara, N., Higashi, H., Simoji, K. and Yoshimura, M.**: Effects of hypoxia on rat hippocampal neurons in vitro, *J. Physiol.*, **384**: 131~151, 1987.
- 29) **Hansen, A.J., Hounsgaard, J. and Jahnsen, H.**: Anoxia increases potassium conductance in hippocampal nerve cells, *Acta Physiol. Scand.*, **115**: 301~310, 1982.
- 30) **Kudo, Y., Ito, K., Miyakawa, H., Izumi, Y., Ogura, A. and Kato, H.**: Cytoplasmic calcium elevation in hippocampal granule cell induced by perforant path stimulation and L-glutamate application, *Brain Res.*, **407**: 168~172, 1987.
- 31) **Lynch, G., Kessler, M., Arai, A. and Larson, J.**: The nature and causes of hippocampal long-term potentiation, *Prog. Brain Res.*, : 233~250, 1990.
- 32) **Bingmann, D., Kolde, G. and Lipinski, H.G.**: Relation between PO_2 and neuronal activity in hippocampal slices, In D.W. Lübbers, H. Acker, E. Leiger-Follet, and T.K. Goldstick (Eds.), *Oxygen Transport to Tissue, Vol. V*, New York, : 215~226, 1984.
- 33) **Mitani, A., Kadoya, F. and Kataoka, K.**: Distribution of hypoxia-induced calcium accumulation in gerbil hippocampal slice, *Neurosci. Lett.* **120**: 42~45, 1990.

(平成4年2月28日受付)