

	くぼた やまと
氏 名	窪田 和
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第251号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Transcranial photo-inactivation of neural activities in the mouse auditory cortex (マウス聴覚野神経活動の経頭蓋光不活化)
論文審査委員	主査 教授 長谷川 功 副査 教授 澁木克栄 副査 教授 高橋 姿

博士論文の要旨

【はじめに】

フラビン蛋白はミトコンドリア電子伝達系に存在し、神経活動に伴い酸素代謝が更進すると、緑色蛍光を発する酸化型になる。従って青色励起光 (450-490 nm) 下に緑色自家蛍光 (500-550 nm) の強度変化を解析することにより脳機能イメージングが可能となる。ことにマウスの頭蓋骨は薄くて透明であり、脳活動の経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングが可能となる。逆にフラビン蛋白を強力な青色光で退色させた場合、酸素代謝が阻害され、神経活動が抑圧されることが予想される。本研究ではこの原理を用い、マウス聴覚野神経活動の経頭蓋光不活化が可能かどうかを検証した。

マウスの大脳皮質聴覚野は、前聴覚野、一次聴覚野などに区分される。前聴覚野では刺激に対して速く応ずるニューロンが多くを占めるのに対し、一次聴覚野ではニューロンの刺激周波数特異性が高く、マップ構造が鮮明である。本研究では、前聴覚野と一次聴覚野の神経活動をそれぞれ選択的に抑圧し、抑圧前後での応答変化を解析した。

【方法】

脳切片標本を用いた実験： まず C57BL/6 マウスより聴覚野の脳切片標本を作製し、神経活動の光不活化が可能かどうかを検証した。脳切片の皮質 VI 層に電気刺激を与えて皮質 II/III 層で電場電位を測定した。安定した電場電位が記録されることを確認した後、50 分間の青色レーザー光 (475 nm) を記録部位に照射し、電場電位の振幅変化を測定した。

麻酔したマウスを用いた実験： C57BL/6 マウスをウレタン麻酔 (1.7 g/kg, 腹腔内投与) し、露出した頭蓋骨越しに右聴覚野を可視化した。スピーカーから刺激音 (周波数：5-20 kHz, 20 Hz のサイン波で振幅変調, 持続時間：500 ms, 強度：60 dB) を発し、フラビン蛋白蛍光イメージングにより聴覚野の機能マップを確認した。画像データから前聴覚野と一次聴覚野の境界を同定し、前聴覚野もしくは一次聴覚野の一方だけをカーボン紙により遮蔽しつつ、青色レーザー光を 40 分間脳表に照射した。光照射後、フラビン蛋白蛍光イメージングで神経活動の再評価を行った。

【結果と考察】

脳切片標本を用いた実験： 電気刺激により、錐体細胞の逆行性興奮と経シナプス性興奮に相当する二相性の陰性波からなる電場電位が記録された。青色レーザー光の照射により逆行性電場電位は殆ど影響されなかったが、経シナプス性電場電位はほぼ完全に抑圧された。酸素代謝阻害に対して解糖系促進が補うとの予想の元に、脳切片還流液のグルコース濃度を 5 mM から 20 mM に増加したところ、抑圧幅は有意に小さくなった。また、新規に合成されるフラビンが増加すれば、フラビン退色の効果が減じるとの予想の元に、グルコース濃度は 5 mM のままで種々のフラビンの材料となるリボフラビン 1 μ M を還流液に添加したところ、抑圧幅は非常に小さくなった。以上のデータから、脳組織に青色光を照射すると、電子伝達系のフラビンが退色し、酸素代謝が阻害され、シナプス伝達が阻害されると結論された。

麻酔したマウスを用いた実験： 一次聴覚野に選択的に青色光を照射したマウスでは、一次聴覚野の反応は低下していたが前聴覚野の反応に変化は見られなかった。従って、青色光を照射された一次聴覚野において、選択的にシナプス伝達が阻害され、活動が低下したと思われる。しかし、前聴覚野に選択的に青色光を照射したマウスでは、前聴覚野の反応が低下するだけでなく青色レーザー光から保護されていた一次聴覚野の反応低下も有意に認められた。この結果は前聴覚野の活動によって一次聴覚野の二次的な活動が生ずることを意味すると思われる。即ち、これまで前聴覚野と一次聴覚野への感覚入力、視床からの投射によるものが主であると考えられていたが、本研究の結果により、マウス前聴覚野から一次聴覚野への感覚情報伝達経路が存在することが示唆された。

結語： 経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングは、低侵襲で高解像度の情報を得られ、聴覚野周波数マップの構築など、神経活動を短時間で解析することが可能である。さらに経頭蓋的に青色光を照射することにより神経活動を阻害することも可能であり、経頭蓋イメージングと経頭蓋光不活化を組み合わせる方法はマウス大脳皮質の機能解析において有用であると思われる。

(論文審査の要旨)

フラビン蛋白はミトコンドリア電子伝達系に存在し、神経活動に伴い酸素代謝が亢進すると、緑色蛍光を発する酸化型になる。従って青色励起光下に緑色自家蛍光の強度変化を解析することにより脳機能イメージングが可能となる。ことにマウスの頭蓋骨は薄くて透明であり、経頭蓋イメージングができる。逆にフラビン蛋白を強力な青色光で退色させた場合、酸素代謝が阻害され、神経活動が抑圧されることが予想される。申請者はマウス脳切片標本を用いてこの原理を検証し、脳活動の光不活化ができることを示した。マウス聴覚野は、前聴覚野と一次聴覚野に区分される。申請者はさらに一次聴覚野を選択的に光不活化すると、一次聴覚野の反応は低下するが前聴覚野の反応は変化しないことを見いだした。しかし、前聴覚野を選択的に光不活化すると、前聴覚野の反応が低下するだけでなく、一次聴覚野の反応低下も有意に認められた。この結果は、前聴覚野の活動によって一次聴覚野を活動させる皮質回路が存在することを示唆している。

本研究は経頭蓋イメージングと経頭蓋光不活化を組み合わせる方法がマウス大脳皮質の機能解析において有用であることを示した。この点に学位論文としての価値を認める。