

脳神経細胞の回路網形成に及ぼす神経細胞活動の影響

Effects of neuronal activities on the network formation of brain neurons

代表研究者 大阪大学基礎工学部生物工学科助手
Assist., Fac. of Eng. Sci., Osaka Univ.
Takahisa TAGUCHI

田 口 隆 久

Some kinds of electrical stimulation or electrical circumstance supposedly affect brain neurons in various stages of formation and maintenance of neuronal networks. Although several evidences in the line with the hypothesis have been reported, further investigations are urgently required in order to establish the general rules for construction of neuronal architecture. In the study, I have been trying to elucidate effects of neuronal activities or electrical circumstance on behavior of neurons, using primary culture system with embryonic telencephalic neurons of chick. Until the present, I found mainly two facts, though these results are yet preliminary. Field electrical stimulation with relatively small and restricted current increases the number of survived cells. Secondly, extracellular stimulation of a certain neuron modulates the motion of other neurons to which the neuron sends the neurites.

研究目的

脳神経系の複雑な回路網がどのようにして形成されるか、という問題は、今日の神経科学の重要な課題の一つである。分裂を終えた神経細胞がどのような情報を基にして目的地へ移動し、正しい標的細胞へ軸索を伸ばし、シナプスを形成し維持するのか。このメカニズムを解明することがこの課題のポイントである。現在のところ、化学物質によってこの機構が制御されているという仮説、すなわち神経細胞の生存には蛋白性の栄養因子が存在し、ある種の蛋白質の濃度勾配及び標識分子や接着分子を成長円錐が認識し、化学屈性によって軸索が伸長しシナプスを形成するという説が有力である。作用機序は不明な点が多いが、このような化学物質の関与は疑いのないところである。我々もニワトリ胚の脳細胞の生存と分化に効果をもつ蛋白因子の存在を発見した。しかし、化学物質の存在のみによって複雑な回路網形成のすべてが達成されるとは考えにくい。他の機構として考えられるのが、細胞自身の活動に起因する電気的な影響である。神経細胞は、その成長に伴って電気的な活動を行う。その影響はマクロに、あるいは

は、ミクロに周辺の細胞に及ぶものと思われる。具体的には、(i) 細胞集団が形成する電場が、それ自身の生存や活性を高める、(ii) ある一つの神経細胞の活動が他の神経細胞の神経繊維伸長の速度や方向を制御する (iii) 神経細胞の活動のパターンの変化がシナプス結合の変更を促す、というような仮説が考えられる。本研究においては、培養脳神経細胞系を用いて、*in vitro* でこの仮説の当否を検討する。このような研究の積み重ねが、脳の複雑な神経回路網形成の基本原理のいくつかを明らかにするものと期待される。

研究経過

1. *In vitro* 神経細胞培養系の確立

基本的には、フ卵5日目のニワトリ胚の終脳を培養に用いるようにした。終脳は実体顕微鏡下で切り出し、トリプシン処理により解離し、若干の添加物を加えた F12 あるいは MCDDB201 の無血清培地を用いて、5%CO₂ 存在下で培養した。

2. 実験装置の製作

倒立型顕微鏡にマイクロマンピュレーターを組み込み、パーソナルコンピューターで制御された電気刺激装置から細胞へ刺激を与えられるように

した。顕微鏡には、小型テレビカメラを取り付けそこから取り込んだ画像はタイムラップスビデオレコーダーで記録し解析できるようにした。顕微鏡のステージ上である程度長期間細胞の培養ができるように、保温セルを自作した。このセルにはヒーターを入れ、サーミスタで温度制御ができるようにしてある。この装置は、単一細胞刺激実験に用いた。

次に、適当な大きさの抵抗を取りつけ電流量を制御できるように35 mm 径の培養皿に電流刺激を行えるセルを自作した。このセルは、直接CO₂ インキュベーターの中に置き、外部の電気刺激装置から刺激が行えるようにした。この装置は、フィールド刺激実験に用いた。

さらに培養細胞のパッチクランプ測定用の装置を組み上げ、個々の培養神経細胞の電気的特性が測定できるようにした。

研究成果

1. 培養神経細胞の電気的特性

本研究で用いたニワトリ胚終脳神経細胞初代培養系に関する即往の研究は、生化学的、あるいは形態学的研究が主で、その電気的性質について行われたものは、未だ報告されていない。電子顕微鏡を用いた知見から、シナプス様構造の存在は確認されているが、シナプス形成は、電気生理学的には未確認である。そこで、発生初期の脳細胞を *in vivo* から *in vitro* へ移し、無血清・グリア細胞非存在下という環境下で培養する本系で、機能素子としてのニューロンが正常な電気的特性を発現しているかどうかを調べた。本培養系のニューロンは平均して10~20 μ m 程直径しかなく、通常の微小ガラス電極を用いた細胞内記録は困難であり、微小ガラス吸収電極を用いたパッチクランプ法で実験を行った。培養開始、6時間後の測定では、静止膜電位は-40 mV 前後と浅く、脱分極刺激に伴う内向き、外向き、電流共に小さく、活動電位も観測できなかった。2日目ぐらいからはっきりとした活動電位を示す細胞が現れはじめ、膜電位も-60~-70 mV と深くなった。この活動電位は TTX 感受性であることから Na スパイクであると思われる。4日目位から不活性型

外向き K 電流も現れ始め、また連続した刺激電流に対して反復発火する細胞も観察されるようになった。その後、細胞体の胞体の肥大、神経繊維の伸長に伴い、膜電流量は緩やかに増加し、6日目ぐらいまで続いた。最終的には、ここで用いた電極液の条件下で、膜電位は-80~-90 mV になった。まだ、自発発火は観測できていない。8日目の培養ニューロンの単一細胞からの測定で、刺激を行っていないにもかかわらず、EPSP 様の比較的長い時定数を持つ脱分極が観測された。おそらく、これは培養ニューロン間のシナプス形成によるものであると思われる。現在のところ、2細胞同時記録によるシナプス形成の確認には成功していない。

2. フィールド刺激の効果

4日間無血清培養したニワトリ胚終脳細胞に、CO₂ インキュベーター内で、定電圧刺激装置からの50 msec 矩形波でフィールド刺激を与えて、生存細胞数に対する効果を調べた。4日間の刺激の後、生存細胞数を数え、電流値に対してプロットすると、0.1 nA 以下では、コントロールとの有意な差がなく、また、0.1~0.6 nA の範囲では、コントロールとの細胞数比が1~1.23 となり、有意な差が得られた。さらに0.6~4.6 nA の範囲では、逆に、細胞数比が1以下になり、生存細胞数が減少した。正の効果のピークは、この場合0.47 nA になった。この効果を確認するために、刺激の日数を3, 4, 6日間と変化させたところ、0.5 nA の刺激では、コントロールとの比が、1.1, 1.2, 1.4, と増加し、この効果の有意性がさらに確実になった。測定上、改良すべき点は多いが、定性的には、ある範囲の電気刺激が、ニューロンの生存にプラスの効果を及ぼすことが明らかになった。

3. 単一ニューロン刺激の効果

2バレルガラス電極をある一つのニューロンに接近させ、100msec 間隔の10 msec パルスの電気刺激を与え続けた場合の周辺のニューロンの挙動をタイムラップスビデオに記録することにより観察した。4時間刺激を続けた場合、刺激した細胞と神経繊維で結合しているように見える細胞の約半数以上が移動をする。移動速度は、細胞に

よって異なるが、平均すると、 $40\mu\text{m/hr}$ である。神経繊維でつながっていない周辺の細胞はそのような挙動を示さないことから、これは刺激に特異的現象で、かつ、神経繊維による連絡を介しての何らかの情報伝達の結果であると考えられる。

細胞体の移動と同時に神経繊維の消失と縮みも観察された。細胞死により神経繊維が消失する場合は、それが存在した場所が消失後も同定可能であるが、この場合はそれと違い、徐々に繊維が細くなり、最終的には消失する。繊維が縮む場合は、二つの型がある。一つは、先端が自由な長い繊維が縮むものであり、もう一つは、短かくて、近くのニューロンの細胞体や繊維と結合しているものが、結合をはずしたり、またつながったりの繰り返しをするものである。前者は、成長円錐が丸く

なり先端から縮むように見えるが、後者は細胞体との近くから縮んでいるように見える。

今後の課題と発展

本研究の課題は、1年で完了する予定のものではなく、少なくとも3年ぐらいは必要であると考えていた。今年度は、装置の設定と定性的予想的予備実験に主眼を置いた。その意味では面白い結果が得られたものと思われる。今後の研究では、再現性の確認、刺激条件の広範な検討が要求される。個々の実験は、みた長時間を要するものばかりなので、すぐには結論は出ないであろうが、このような努力の積み重ねにより、*in vitro*ではあるが、ニューロンの挙動の基本的性質が明らかになってくるものと思われる。