

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

扁桃体オシレーション活動の発生原理と生理的意義

研究代表者 橋爪 幹 (医学部 生化学)

緒 言

扁桃体は動物の情動を司る脳部位であり、特に恐怖・不安やストレスなどの負の情動との関わりについて多くの研究が行われてきた。古典的な恐怖条件付け実験では、ネズミに音を聴かせながら電気ショックを与えると、翌日には音を聴かせるだけで硬直状態に陥ることが確認されている。その時間を計測することで恐怖記憶獲得の程度を測る指標としてきた。またこの操作は扁桃体基底外側核の錐体細胞と、聴覚情報を伝える視床由来の入力線維との間に長期増強を引き起こすことが知られており、恐怖記憶獲得の細胞モデルであると考えられている。また、動物は電気ショックを与えられた場所のことを強く記憶しており、電気ショック負荷の翌日に同じ実験用ケージに入れると、やはり長い時間硬直する様子が観察される。この現象には扁桃体だけでなく空間記憶を司る海馬も関係していることが知られている。

扁桃体と海馬はともに大脳辺縁系に属しており、また相互に神経軸索を送り合っている。それゆえ、恐怖条件付け記憶の想起時にこの2つの部位から細胞外記録を行うと、 θ 帯域(4-8 Hz)のオシレーション活動の同期が上昇していることが知られている。一方、個々の扁桃体基底外側核の錐体細胞は周囲の抑制性介在ニューロンから周期的な入力を受け取っている。この自発性の抑制性オシレーション活動(0.1-3 Hz)は複数の錐体細胞間で同期していて、発生・維持には外部ではなく内部の興奮性入力を必要としているが、抑制性入力の振幅や周波数は様々な神経修飾因子によって影響を受けることが解明されている。この現象が扁桃体機能にどのような生理的意義をもたらしているかはいまだ解明されていないが、海馬との関わりから記憶の固定などに影響を与えているのではないかと予想される。

本研究ではラットに恐怖条件付け記憶を成立させ、その場合に扁桃体基底外側核の錐体細胞において抑制性オシレーション活動がどのように変化するかを電気生理学的に解析し、その生理的意義について考察することを試みる。

材料と方法

全ての実験は埼玉医科大学動物実験指針に従い、埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。実験動物の使用数は必要最小限となるように努めた。

生後2-3週齢のラットをFear Condition実験用ケージに入れ、3分間自由に行動しているときの様子をビデオカメラで撮影した。その後卓上型ショッカースクランブラーを使って1 mA、1秒間の電気ショックを与え、それを10秒間隔で10回繰り返した。電気ショック終了後、ラットを再び3分間自由に行動させた後で飼育ケージに戻した。それから24時間後、ラットを再びFear Condition実験用ケージに入れて3分間自由行動させ、その様子をビデオカメラで撮影し、電気ショック負荷前と負荷一日後の動画から動物の硬直時間を計測した。そして3分の自由行動時間に対する硬直時間の割合を算出して比較した。

その後ラットにイソフルラン麻酔を吸引させ、断頭後に脳を摘出し、95% O_2 / 5% CO_2 の混合ガスを飽和させた氷冷Na-Choline Chloride置換液の中に入れた。この脳から扁桃体基底外側核を含む冠状スライス(厚さ400 μm)を、マイクロスライサーを用いて作成した。スライスにはさらに左右に分断し、人工脳脊髄液(組成: 120 mM NaCl, 3 mM KCl, 26 mM $NaHCO_3$, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 15 mM glucose, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$)を回復液として、95% O_2 / 5% CO_2 の混合ガスで満たされたチャンバー内にて室温1時間以上静置した。その後、スライスを正立型顕微鏡のステージ上にあるチャンバーに移し、IR-CCDカメラを通じて扁桃体基底外側核にある錐体細胞を確認しながら、ホールセルパッチ記録を行った。記録中は95% O_2 / 5% CO_2 の混合ガスを飽和させた人工脳脊髄液を31-32度に保って灌流した。記録電極はガラスキャピラリーを電極ブラーで加熱して作成し、その電極抵抗は3-5 M Ω 程度になるようにした。そして電極内液はカリウムベースの組成(150 mM K-methanesulfonate, 5 mM KCl, 0.1 mM K-EGTA, 5 mM Na-HEPES, 3 mM Mg-ATP, 0.4 mM Na-GTP, pH = 7.4)のものを使用した。

電極内液を充填した記録電極を錐体細胞に接触させ、細胞膜を破ることでホールセル記録状態を成立させた後、

パッチクランプアンプ (Axopatch 200B: Axon Instruments) を用いて細胞膜電位や膜電流を測定した。得られたデータはADコンバータ (Digidata 1322A: Axon Instruments) を介してコンピュータへ送信しソフトウェアを用いて取り込んだ。

錐体細胞の同定は形態的特徴 (大きな細胞体, 錐体様の形状) や電気生理学的性質 (脱分極電流を流した時, 発生する活動電位が時間とともに出現しにくくなる) などから判断して行った。その後電流固定モードから電位固定モードに切り替え, 固定電位を -40 mV に設定した状態でイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス後電流 (EPSC) や GABA_A 受容体を介した抑制性シナプス後電流 (IPSC) を測定した。この自発的なシナプス入力を 2 分程度記録し, 0.1-3 Hz の帯域についてパワースペクトル解析を行うことでオシレーション活動の大きさを定量化した。

結 果

ラットを Fear Condition 実験用ケージに入れて 3 分間自由に行動させると, 新規の環境に対して盛んに探索行動を行っていた。具体的にはケージの壁に沿って歩行・走行し, ケージの隅に鼻先を突き込みながらヒゲを盛んに動かして空間を認知し, 後肢で立ち上がって垂直方向を探索し, あるいは移動を停止してグルーミング (毛づくろい行動) を行っていた。一方, 電気ショック刺激による恐怖条件付け操作を行った後のラットでは, その 24 時間後に実験用ケージに入れたときにこのような行動をしている時間が著しく減少し, 身体をまったく動かさない硬直時間が 1 日目と比較して有意に上昇した (図 1)。

一方, 上述した実験操作によって恐怖記憶を獲得したラットから扁桃体基底外側核を含むスライスを作成し, その錐体細胞において抑制性オシレーション活動をホールセル電位固定法によって測定した。固定電位 -40 mV の状態では GABA_A 受容体を介した IPSC は外向きの電流として記録され, 0.1-3 Hz の周波数で発生するものは特に大きな振幅と持続時間を持っており (図 2), これは複数の抑制性介在ニューロンの入力時間が時間的に同期して送られているものであると考えられる。この抑制性オシレーションを 2 分程度記録し (図 3), その時系列データのパワースペク

トル解析を行い (図 4), 0.1-3 Hz の周波数帯内におけるパワーを積分した。なお, Fear Condition 実験用ケージに入れて 3 分間自由に行動させたが電気ショックを与えなかった対照群ラットに対しても同様の解析を行った。すると恐怖記憶を獲得したラットでは周期的な IPSC の振幅が減少している傾向が観察され, そのパワーの値も対照群と比べて小さくなっていた (図 3・4, 右側)。

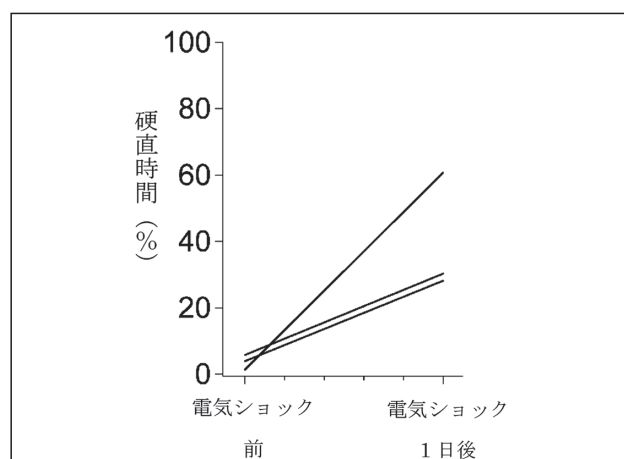


図 1. 電気ショック負荷前後の硬直時間。硬直時間は 180 秒間の全撮影時間あたりのラットの停止時間で表示した。ラット 3 匹使用。

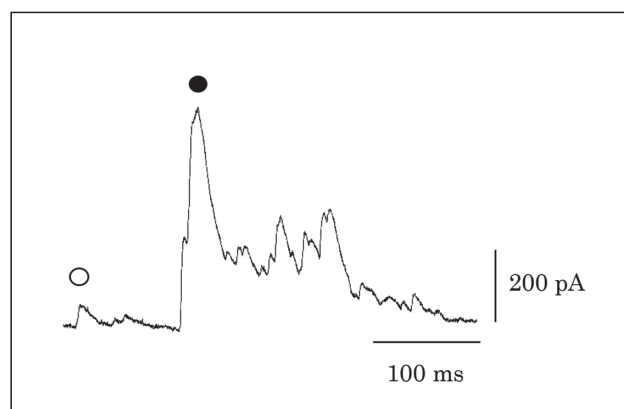


図 2. 周期性を示す巨大な IPSC (黒丸) と, その近傍にある小さな IPSC (白丸)。

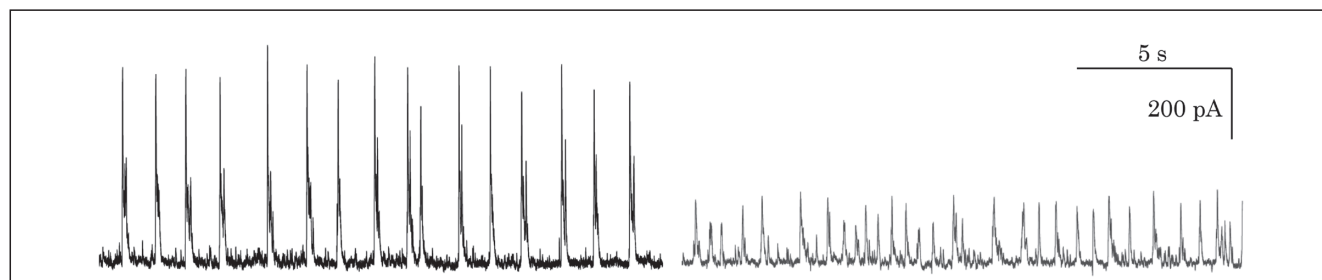


図 3. 対照群 (左側) と条件付け群 (右側) の示す抑制性オシレーション活動。

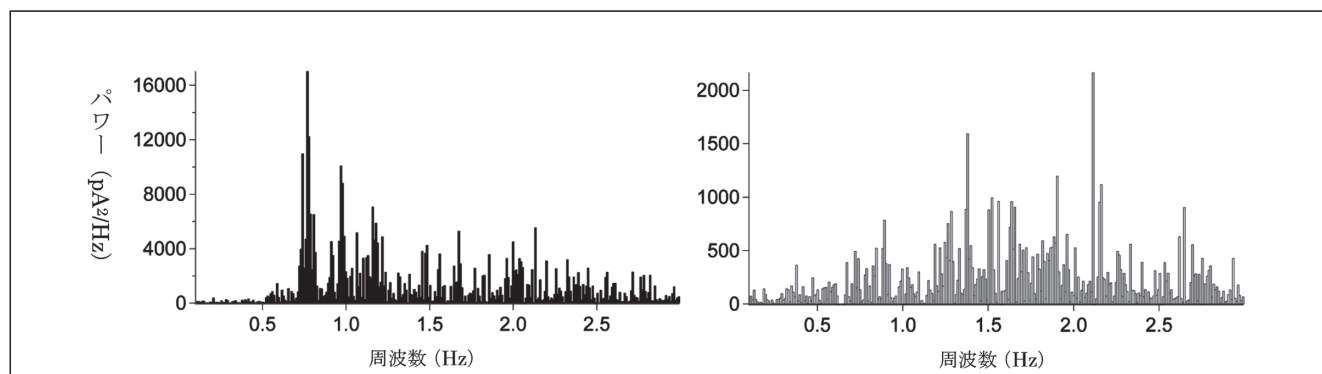


図 4. 対照群 (左側) と条件付け群 (右側) の示す抑制性オシレーション活動のパワースペクトル。

考 察

本研究の結果、恐怖記憶を獲得したラットでは扁桃体基底外側核の抑制性オシレーション活動が減弱していることが明らかとなった。先行研究で、恐怖条件付け刺激を行った動物では扁桃体錐体細胞に対する興奮性伝達が長期増強 (LTP) を引き起こしていることが解明されている。抑制性オシレーション活動には基底外側核内部の興奮性入力が必要不可欠となっているので、長期増強によって

変化した錐体細胞の活動が周辺の抑制性介在ニューロンの活動に影響を与えた結果、抑制性オシレーション活動のパワーが減少した可能性が考えられる。

また恐怖記憶の獲得と抑制性オシレーションの関係について、現時点では記憶の獲得とパワーの減少は関連のある要素なのか、まったく独立の現象であるのかは区別できない。今後は記憶獲得の程度 (硬直時間の長さ) とパワーの大きさとの間に相関関係があるかどうかを詳細に分析していく予定である。