B866

アガロース・マイクロ構造を用いて段階的に構成した神経細胞ネットワークのマイクロ電極アレイを用いた電気生理学特性計測技術の開発

○鈴木 郁郎¹、杉尾 嘉宏¹、森口 裕之¹、金子 智行¹、神保 泰彦²、安田 賢二¹ (¹東大院 総合文化・生命、²NTT基礎研)

【目的】我々はアガロース・マイクロ構造を用いた神経細胞ネットワークの空間パターン追加工術を開発してきたが、このネットワーク形状の複雑化が持つ意味を明らかにするためには、各細胞の電気生理学的な刺激と応答の時空間パターンを計測する技術を組み合わせることが必須である。複数の細胞の電気生理学的特性を同時に計測し、かつ、数十日に及ぶ長期連続して計測するためには、従来のパッチクランプ法に替わり、マイクロ電極アレイを用いる手法が有効であることから、上記、アガロース・マイクロ構造にマイクロ電極アレイ技術を組み合わせた技術を開発し、神経細胞ネットワークの電気生理学的特性のネットワーク形状に依存した変化を計測することを試みた。【方法と結果】神経突起の伸張をアガロースの物理的な立体障壁を用いて誘導するアガロース・マイクロ構造を、神経回路網の細胞外電位を計測することが可能な微小電極アレイ基板上に組み合わせ、我々が意図したネットワーク形状の回路網の発火応答特性を計測することが可能な電極基板を作製した。ここにラット海馬細胞を培養し、回路網からの電気パルス応答を計測した。得られた計測波形の解析結果に関しては本会で詳しく報告する。

I. Ikurou, Y. Sugio, H. Moriguchi, T. Kaneko, Y. Jimbo, and K. Yasuda : Application of agarose-microstructure to MEA for the electrophysiological measurement of topographically controlled nerve cells network

B868

成熟海馬神経回路における神経活動依存的シナプス形成

○中山 貴美子、清末 和之、田口 隆久 (産総研・人間系・ニューロニクス)

神経回路形成期においてNMDA型グルタミン酸受容体を介した興奮性神経伝達には重要な役割を担っている。また、成熟した脳において学習・記憶のモデルであるシナプス可塑性においても重要な役割をしていると考えられている。しかし、成熟した神経回路網における活動依存的なシナプス形成に関しての知見は数少ない。我々は、神経回路形成後の海馬培養細胞を用いて、神経活動依存的なシナプス形成を伴う可塑性を検討した。テトロドトキシン (TTX) 投与により、自発的神経活動を阻害したところ、神経細胞間のシナプス結合率が増加し、神経回路網の可塑的変化がおきていることが明らかになった。さらにこれらのシナプス結合において、サイレントシナプスの割合が増加していた。このサイレントシナプス電流は、NR2Bサブユニットを含む受容体の特異的阻害剤により抑えられた。通常、この成熟した海馬神経細胞では、NR2Bの発現は低下していることから、この受容体の再発現が誘導されていることが示唆された。これを確認するために、NMDA投与により細胞全体の機能的受容体の発現比率 (NR2B/NR2A) を検討した結果、活動を阻害した神経細胞群では、NR2Bを含むNMDA型グルタミン酸受容体の割合の増加が明らかとなった。また、mEPSCの波形解析から、増加したNR2Bサブユニットは、既存の機能的シナプスではなく、エクストラシナプス部位に存在していることが明らかとなり、成熟したNR2Bの再発現がシナプス形成を伴う神経回路網の可塑性に関与していることを示唆された。

K. Nakayama, K. Kiyosue, T. Taguchi : Activity-dependent synaptogenesis in cultured hippocampal neurons after formation of neural network

B867

エストラジオールはシナプス前細胞からの伝達物質放出量を増大させる

○井戸 喜英、城間 晋作、米谷 快男児 (九工大・情報工・生化学システム)

【序論】神経ステロイドの一つである17β-Estradiol (E2)は、シナプス伝達効率を増強することが知られている。これまでの報告によれば、その増強はシナプス後細胞に対する作用により生じる。本研究では、E2がシナプス前細胞に作用し、伝達物質放出量を増大することにより、シナプス伝達を増強することを報告する。

【方法】ラット (4-6W) 海馬スライスのCA1放線層、およびCA3明瞭層よりEPSPを細胞外記録した。E2 (0.1nM) は30min投与し、その後washoutした。また、CA1ではadenylate cyclase (AC) の活性化を調節しているアデノシン A1 レセプターのアンタゴニストであるDPCPX (200nM) を先行投与し、E2を追加投与する実験を行った。全ての実験において薬物の投与前後でペーパルス刺激 (50ms 間隔) を行い、PP値を調べた。

【結果と考察】E2の投与を投与すると、CA1及びCA3のシナプス伝達を増強した。この増強はPP値の減少を伴っていたので、シナプス前細胞からの伝達物質放出量の増大が原因である事を示唆する。E2をwashoutすると、CA1での応答は元に戻り、PP値も元に戻ったが、CA3の応答は増強が持続し、PP値の減少も持続した。DPCPX存在下でE2を投与すると、CA1での応答はwashoutしても元に戻らず、持続的な増強状態となった。この状態ではPP値の減少も持続した。ここで得られたE2の効果は、forskolinに関する報告¹⁾と同様の効果である。ForskolinはACを活性化し、cAMPレベルを上昇させることが知られている薬物である。したがって、本研究の結果は、E2はforskolinと同様の作用を有し、cAMPレベルの上昇を引き起こし、伝達物質放出量を増大させてシナプス伝達を増強している事を示している。1) Lu&Gean Neuroscience 88:69-78 ('99), Weisskopf et al. Science 265:1878-82 ('94).

Y Ido, S siroma & K Kometani : Estradiol increases the amount of transmitter release from presynaptic terminals in the hippocampus

B869

シマミミズ仮想這行に関わる神経細胞の機能的分類

○下井 利修¹、水谷 賢史¹、高矢 智宏¹、北村 美一郎¹、小川 宏人²、岡 浩太郎¹ (¹慶大院・理工・基礎・生命、²埼玉医大・基礎・生物)

ミミズ這行運動には周期性が見られ、定型的なモーターパターンを形成するCPGの存在が示唆されている。我々はこれまでに、オクトパミン (OA) 添加によりシマミミズ (*Eisenia fetida*) のモーターパターンが周期的にバーストする仮想這行誘引に成功してきている。しかし、それら仮想モーターパターンを形成する神経細胞個々の働きについては詳しく調べられていない。そこで本研究では、カルシウムイメージング法を用いて上記パターンを形成する末梢神経細胞を選択的に染色し、その活動動態を調べた。染色はモーター出力路である側神経束からデキストラン付加型の感受性色素を逆行性標識させることでおこなった。標識された神経細胞は各体節の腹側神経節腹側表面から20-40μm層に約40個存在した。これらの神経細胞にOAを10⁻⁶-10⁻³M添加すると、濃度上昇に対して応答頻度が上昇するOA感受性興奮細胞、減少するOA感受性抑制細胞、そして変化のないOA非感受性細胞に分類されることがわかった。さらに、仮想這行時 (10⁻⁴M OA) と自発活動時 (0 M OA) の応答を周波数解析により比較したところ、興奮性、抑制性神経細胞群の双方で仮想這行誘引によって活動周波数帯域の異なる細胞 (0.5-2.0 Hzと2.0-3.5 Hz) が存在することがわかった。また非感受性細胞は周波数応答においても有意な変化は示さなかった。さらに分類により同じタイプになった神経細胞群はクラスタリングする傾向をみせた。別種のミミズ (*Lumbricus terrestris*) における神経細胞のマッピングと比較したところ、興奮性細胞は運動ニューロンに、非感受性細胞は感覚ニューロンの位置に一致するものが存在した。以上から、仮想這行誘引による応答性により、運動ニューロン、感覚ニューロンを網羅的に分類できることが示唆された。

T. Shimoi, K. Mizutani, T. Takaya, Y. Kitamura, H. Ogawa and K. Oka : Functional characterization of neuron concerning the fictive locomotion in the ventral nerve cord of the earthworm, *Eisenia fetida*