細胞内イオン濃度と膜電位の同時測定による 中枢単一ニューロンの動特性解析

山形大学医学部第二生理 宮 川 博 義

Many types of central nervous system neurons generate action potentials not only at their soma and axons but also at the dendrites. It has been a matter of dispute where in the dendrites do dendritic spikes fire. This question was studied by optically monitoring transient Ca/Na changes from single neurons in brain slice preparations. It has been shown 1) that cerebellar Purkinje neurons fire Ca spikes all over the dendritic field ; 2) that cerebellar Purkinje neurons fire Na spikes at the soma and the initial segment ; 3) that hippocampal CA1 pyramidal neurons fire Na spikes at proximal 2/3 of the apical dendrites ; 4) that hippocampal CA1 pyramidal neurons have voltage-gated Ca channels all over the dendrites ; and 5) that most Ca rise at dendrites in cerebellar Purkinje neurons and hippocampal CA1 pyramidal neurons are related to dendritic spikes.

dendritic spike/brain slice/optical recording/hippocampal pyramidal neurons/cerebellar Purkinje neurons

1. はじめに：ニューロンは単位機能素子なのだろうか？

一般に受け入れられている神経系のイメージは次のようなものであろう。“神経系は多数のニューロンの集合である。各ニューロンは樹状突起、細胞体、軸索という三部分からなる。細胞体は神経インパルスが発生し、インパルスは軸索を伝導して神経系内を高速に飛び回る。インパルスが他のニューロンの樹状突起に達すると、シナプス連絡を形成して、後シナプス細胞に膜電位変化をもたらす。樹状突起の膜電位変化は、減衰して細胞体に伝わり、膜電位変化の総和がいき値を越え、細胞は神経インパルスが発生する。”このような、ニューロンを神経系の単位機能素子とする理解を基に、神経系の動作原理・計算理論の研究が進められているわけであるが、実際の神経系は幾つかの点でこのイメージとは異なっている。その一つは、多くのニューロンが、樹状突起においても神経インパル

ス（活動電位、スパイク放電）を発生するという事実である。

樹状突起スパイクは、微小電極による細胞内電位記録法^{4)~8)}、場の電位記録法^{9),10)}、電流源密度法¹¹⁾などをもちいて、もっぱら小脳のプルキンエ細胞と海馬の錐体細胞において研究されてきた。プルキンエ細胞の樹状突起はカルシウムイオンの流入によって発生するカルシウム (Ca) スパイクを発生することが、また海馬錐体細胞の樹状突起はナトリウムイオンの流入によって発生するナトリウム (Na) スパイクを発生することがそれぞれ知られている。これらニューロンの樹状突起は図1に示すようにながりの広がりをもつ。活動電位はどこで発生するのだろうか。Kandel⁴⁾やLlinas⁷⁾が主張するように、活動電位を発生する特別な部位がいくつか点在するのだろうか。それとも全域にわたって興奮性をもつのだろうか。この発生部位の問題は、ニューロンの動作特性に重要な意味を持つために議論的となってきたが、樹状突起が細くて通常の電気生理学的な方法では研究が困難であり、決着がついていなかった。

本稿で紹介する研究は、イオン濃度感受性色素を利用した光学的測定と、細胞内電位記録法とを組み合わせることによって、樹状突起での活動電位の発生部位を明らかにしたものである^{15)~19)}。

Dynamical properties of central nervous system neurons revealed by simultaneously monitoring intracellular ion concentrations and membrane potential.

Hiroyoshi MIYAKAWA

Department of Physiology, Yamagata University School of Medicine

図1. 小脳プルキンエ細胞と皮質錐体細胞の形態。
(Carpenter, Human Neuroanatomy より転載)

2. 光学的方法を使って脳スライス内単一ニューロンの樹状突起の特性を解析する

生きた脳を数百ミクロンの厚さに切り出して（脳スライス標本）人工脳脊髄液中に保つと、その中のニューロンは数十時間にわたってほぼ正常な活動が続ける。ニューロンの活動によって色の変化する色素を、この脳スライス標本中の一個のニューロンに注入し、光学的な装置によって観察すれば、細い樹状突起からでも、同時多点の情報が得られる。使用できる色素や測定装置についての情報は他の総説を見ていただくとして^{13), 14)}、ここでは、以下で紹介する研究に用いた方法をごく手短かに述べる。

正立顕微鏡のステージに、薄型の実験槽をおいて、その中に脳スライス標本を固定する。絶えず新鮮な人工脳脊髄液を還流して標本を維持する。ステージに固定したマニピュレーターに、色素を詰めたガラス微小電極を取り付け、水浸の対物レンズで見ながら細胞に刺入する。5-10分かけて色素を注入する。顕微鏡には光の強度を検出する装置を取り付ける。本稿の例では光検出装置として、冷却型CCDカメラ、フォトダイオードアレイおよび単一のフォトダイオードを用いた。これらの装置によって、蛍光色素ならば蛍光強度を、吸光色素ならば透過光強度を測定する。対象とするのは活動電位なので、数ミリ秒から数10ミリ秒の時間分解能が要求されるが、必要な空間分解能や、色素の応答特性などの理由から、この要求を満たすことは簡単ではない。この点を補うために、色素の注入に使

用した微小電極から細胞内電位記録を同時に行って、光学測定の結果と合わせて解析する。神経細胞の活動は、これまでもっぱら電気的現象を記録することによってなされてきており、多くの重要な知見が蓄積されている。光学的測定によって得られる空間的情報と、これまでに電気的方法によって観察されてきた現象との対応を明らかにすることは、データの解釈に当たって決定的に重要である。

三種類の色素を用いた。Caイオン感受性蛍光色素 Fura-2, Ca感受性吸光色素 Ar III, および Naイオン感受性蛍光色素 SBF1 である。注入して使用できる膜電位感受性色素があれば良いのだが、残念ながら使用に耐える性質のものはまだ開発されていない。

3. 小脳プルキンエ細胞樹状突起のカルシウム (Ca) スパイク

まず電位応答を見てみよう。図2左下の膜電位記録は、これまで報告されてきたのと全く同様の⁷⁾、典型的なプルキンエ細胞の応答を示している。Fura-2の注入が細胞の活動を損なわないことが、このことから分かる。登上線維は、各プルキンエ細胞に一本しか接続しないが、その一本が枝分れして、樹状突起の細胞体に近い方の半分に、いくつものシナプスを作る。このシナプスは中枢神経系においてももっとも強力なもので、40mV にもおよぶ巨大な EPSP と、それに重なる複雑なスパイクとを誘起するのだが、この複雑なシナプス応答が何処でどのようにして起きるのかということは、論争的となってきた。脱分極によって起きる2種類の活動電位の内、速いスパイクは Na スパイクだとされ、細胞体で発生すると考えられている。遅い方のスパイクは Ca スパイクだとされ、樹状突起内のどこかで発生すると考えられている。さて光学的方法によってこれらのスパイクについてどのようなことが分かるだろうか。

Ca スパイクの発生に伴って、樹状突起の細い部分に大きな Ca 変動が見られる（図2左上）¹⁶⁾。より高い時間分解能で測定すると（図3）、この Ca 変動は Ca スパイクの発生と完全に同期している。このことから、いわゆる Ca スパイクは、やはり Ca イオンの流入によって発生する電位であって、その発生部位は、先端の細い部分を含む樹状突起全体である事が分かる。樹状突起の先端は、20万本もの平行線維がシナプスする部位である。そのような部位が Ca スパイクを発生するという事実は、プルキンエ細胞のシナプス応答を考える上で見過すことはできない。

登上線維入力によって起きるCa変動の空間分布は一寸意外であった。というのは、シナプスは近位部にしかないにもかかわらず、遠位部にも大きな変動が起きたのだ(図2左上)¹⁷⁾。より高い時間分解能でこの応答を観察すると(図4)、膜電位変化とCa変動との間には、短いが明らかな遅れがある。もしも登上線維入力によって活性化する受容体チャネルがCaイオンを通し、そのことによるCa上昇が検出されているのであれば、このような遅れは起きないはずである。シナプス入力がCaスパイクを誘起し、CaスパイクがCaの上昇をもたらしたと考えればこの遅れの解釈はつく。登上線維入力に伴うCa変動の空間分布が、脱分極性細胞内通電によって変化するという観察は(図5)、この解釈を裏付けている。シナプス入力が樹状突起に活動電位を誘起し得るのだ。軸索を下って行くインパルスのパターン形成に、樹状突起スパイクがどのような役割を果たすのかという問題は、これからの課題である。

カルシウムは、種々の膜電位感受性チャネルの動特

性を、ミリ秒から秒にわたって変化させることが分かっている²⁾。樹状突起に分布するこれらのチャネルは、プルキンエ細胞の応答特性を規定するのであるから、刻々に発生するCaスパイクは、プルキンエ細胞の特性を刻々に変えているのかも知れない。カルシウムはまた、さまざまな細胞内分子過程を引き起こす事が知られており、学習や記憶の基本となる細胞過程にも重要な役割を果たしていると考えられている³⁾。樹状突起に発生するCaスパイクは、Ca上昇によって引き起こされる細胞内過程の活性化を介して、プルキンエ神経細胞の特性を、長期的に変化されているのかもしれない。

Naスパイク発生と同期したCa変動は、樹状突起部には生じず、細胞体のみに見られる(図2)。Naスパイクが細胞体付近にのみ発生し、その膜電位上昇が、細胞体に分布するCaチャネルからのカルシウム流入を引き起こすのだと理解できる。Na感受性色素を用いた測定によれば、細胞体と軸索初節部は大きなNa上昇を示すが、樹状突起部はNa上昇を示さない(図

図2. Cooled CCDカメラとFura-2蛍光色素の組み合わせで検出した小脳プルキンエ細胞のCa変動。左上の4本のトレースは、右に示した各部位のCa変動である。Aの部分は登上線維入力に対する反応。細い樹状突起部に大きなCa上昇がある。挿入図は膜電位応答を引き伸ばしたもの。Bの部分は、記録電極からの脱分極性通電によって発生したCaスパイクに伴うCa変動。細い樹状突起部で大きい。遠位樹状突起部で最大。通電によってNaスパイクも発生したが、それに伴うCa上昇は細胞体のみに見られた。Ca測定の時間分解能25msec。
(文献¹⁷⁾より許可を得て転載)

図3. Single Photodiode と Fura-2 の組み合わせでプルキンエ細胞樹状突起から検出した Ca 変動。
A: 8 個の Ca スパイクのそれぞれに対応して Ca ジャンプが認められる。
B: A 図の拡大. Ca スパイクのピークと Ca 上昇の立上りが一致している. 測定器の時定数 2 msec.
(文献¹⁶⁾ より許可を得て転載)

図4. Photodiode array (10×10) と ArIII 吸光色素の組み合わせで検出した, 登上線維入力に伴う Ca 変動。
A: 樹状突起の異なる部位から記録した変動を規格化して重ねて描いた. Em は電位記録. Ca 上昇の立上りは膜電位の立上りから 2.5 msec 遅れている. B: 各部分での Ca 変動を記録部位の上に描いて並べたもの. 樹状突起全域で上昇している. 吸光色素使用のため, 変動の大きさの比較はできない. 測定器の時定数 2 msec.
(文献¹⁷⁾ より許可を得て転載)

図5. 登上線維入力による Ca 変動を, 脱分極性通電が修飾する。
右パネル: Photodiode array でとらえた, 反復登上線維入力による Ca 変動. 中央パネル: 右パネルに示したトレースの拡大. 白星は遠位, 黒星は近位樹状突起. 150 msec 間隔 9 回の刺激. 途中で記録電極から脱分極性通電を加えた. 通電中は Ca ジャンプが起きない. 通電後は遠位樹状突起部での Ca 上昇が著しく大きくなる. 左パネル: 通電を加えないと, 中央パネルのような修飾は起きない。
(文献¹⁷⁾ より許可を得て転載)

6)¹⁵⁾。やはり Na スパイクは細胞体の近くにのみ発生しているのである。

図6. SBF1 色素と cooled CCD カメラの組み合わせで検出した、小脳プルキンエ細胞の Na 変動。
細胞内通電によって発生した Na スパイクのバースト放電に伴い、細胞体と軸索初節部に Na 上昇が起きる。樹状突起部には Na 変動は起きない。
(文献¹⁵⁾より許可を得て転載)

4. 海馬錐体細胞樹状突起のナトリウム (Na) スパイク

海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起が活動電位を発生するという証拠は1950年代から見つかった⁹⁾。Kandel は、樹状突起に“hot spot”があり、その部分の興奮がシナプス入力ブースターとして機能するという考えを示した²⁾。今では、樹状突起が Na スパイクを発生すること⁵⁾、また条件によっては Ca スパイクを発生すること⁶⁾が分かっている。

細胞体への脱分極性通電によって発生する活動電位に伴って、尖突樹状突起の近位 2/3 に Ca 濃度上昇および Na 濃度上昇 (図7) が起きる¹⁸⁾。この活動電位は、Na 上昇が伴うことと、電位の大きさ・巾から判断して、明かに Na スパイクである。Ca 上昇は、樹状突起に分布する Ca チャネルが、Na スパイクによる電位変化によって活性化して、Ca が流入したために起きたのだと解釈できる。樹状突起の各部で測定したイオン濃度変動は、拡散によるものではなく、それぞれの部位でのイオンの出入りによって生ずるものだと考えられるので、樹状突起の近位 2/3 は、どの部位にも Na スパイクが発生し得るということになる。興奮性の高い hot spot が点在しているのではない。

高頻度のシナプス入力 (シャーファー側枝入力) に伴う Ca 変動および Na 変動は、脱分極性通電に伴うものと良く似た時空間パターンを示す (図8A1)¹⁹⁾。これらイオン変動の大部分は、樹状突起での Na スパイクの発生に伴うものである (図8D)。シナプス入力に伴って樹状突起に Na スパイクが発生するわけである。残念なことに時間分解能の制約のために、樹状突起の活動電位が細胞体での活動電位発生に先立って起きるのかどうかという興味深い問題にはまだこの方法では答えられない。錐体細胞においても樹状突起における Ca 上昇の大部分が活動電位発生に伴うものだという発見は、神経細胞の興奮がその細胞の応答特性の変化をもたらすという、いわゆるヘップの学習仮説の細胞レベルでのメカニズムを与えるものかも知れない¹⁾。

通常の条件では、Ca 変動も Na 変動も樹状突起の近位 2/3 においてのみ見られたが、K チャネルをブロックした条件 (図9) では、Ca スパイクが発生して、それに伴って遠位部を含む樹状突起全域に Ca 上昇が起きた¹⁸⁾。膜電位感受性 Ca チャネルは、海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起の全域に分布して機能している。

図7. 海馬CA1錐体細胞に脱分極性通電によって生じたCa/Na変動。

脱分極によって活動電位が発生すると、細胞体と樹状突起とにCa上昇とNa上昇とが起きる。Ca, Naとも、上昇が起きるのは細胞体から約200μmまでに限られる。

左パネル：Fura-2で検出したCa変動。右パネル：SBFIで検出したNa変動。

(文献¹⁸⁾より許可を得て転載)

図8. 海馬CA1錐体細胞にシナプス入力によって生じたCa/Na変動。

A1：シャフター側枝入力を100Hz・1秒間あたえたときのCa変動。近位樹状突起でのCa上昇が大きい。
A2：A1と同じ細胞に1nAの過分極性通電をして膜電位を下げた状態で同じ強さの刺激をあたえた。EPSPは大きくなったが活動電位は発生していない。Ca上昇が著しく小さくなった。
C：異なる細胞。20Hz・1秒間の刺激。細胞体より100μmの樹状突起部でのCa変動。活動電位の発生とCa上昇とが相関している。
D：シャフター側枝入力を100Hz・1秒間あたえた際のNa変動。細胞体から160μmの樹状突起部より記録。1では活動電位のバースト放電とそれに伴うNa上昇が見られる。2では過分極性通電をあたえて活動電位の発生を抑えた。Na上昇が著しく小さくなった。

(文献¹⁹⁾より許可を得て転載)

図9. 海馬CA1錐体細胞のCaスパイク発生に伴うCa上昇.
KチャネルのブロックによってCaスパイクが発生しやすくしておいて、脱分極性通電を加えるとNaスパイクと共にCaスパイクも発生した. Caスパイクに伴うCa上昇は樹状突起の全長にわたって見られた. TEA 10mM CNQX 1mM.
(文献¹⁸⁾より許可を得て転載)

5. 終わりに

最終的な出力がall-or-noneの活動電位であり、それが軸索を非減衰的に伝導して、つぎのニューロンに情報を伝えるという意味では、確かにニューロンは単位情報素子と見なされるに値する性質を備えている。しかし、どのようにして情報が運ばれるかということよりも、集まった情報がどのようにして統合されるのかという問題の方がより重要である。ニューロンをあたかも単純ないき値素子と見なし、神経系はいき値素子の集合体であるとして、脳神経系の基本計算原理を探ろうという戦略は、妥当なものとは思えない。なぜなら、本稿で述べてきたことから明らかなように、中枢神経系のニューロンの樹状突起は、非線型のな性質を強く持っており活動電位さえ発生する。便宜的に幾つかのいき値素子の集合としてニューロンを記述しようとしても、樹状突起部で起きている過程を表すのには、かなりの数の素子が必要になってしまうことだろう。神経系の計算原理を探るには、ニューロンが単一細胞レベルで行っている情報処理過程を明らかにし、そこから、本質を失わないように単一細胞での基本計算原理を抽出することが必要である。オペアンプの組み合わせ回路を理解し設計するには、オペアンプの特性を知らなければならないのと同じことだ。光学的な手法を用いて単一ニューロンの樹状突起の活動を観察するという方法は、この目的に現時点ではもっともかなったものであろう。更に必要なことは、こうしたボトムアップアプローチと、ニューロンの動作原理を合成的に理解するトップダウンアプローチとの協力である。

本研究の遂行にあたり文部省科学研究費(05274204, 05267208)およびHFSPの援助を受けた。

文 献

- 1) Hebb, D. O. (1949) *The Organization of Behavior*, Wiley, New York.
- 2) Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membrane*, 2nd ed., Sinauer Associates Inc.
- 3) Bliss, T. V. P., Collingridge, G. L. (1993) *Nature*, **361**, 31-39.
- 4) Spencer, W. A., Kandel, E. R. (1961) *J. Neurophysiol.*, **24**, 272-285.
- 5) Fujita, Y. (1968) *J. Neurophysiol.* **31**, 131-141.
- 6) Wong, R. K. S., Prince, D. A., Basbaum, A. I. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 986-990.
- 7) Llinas, R. R., Sugimori M. (1980) *J. Physiol.* **305**, 197-213.
- 8) Turner, R. W., Meyers, D. E. R., Richardson, T. L., Barker, J. L. (1991) *J. Neurosci.* **11**, 2270-2280.
- 9) Cragg, B. G., Hamlyn, L. H. (1955) *J. Physiol.*, **129**, 608-627.
- 10) Turner, R. W., Meyers, D. E. R., Barker, J. L. (1989) *J. Neurophysiol.*, **62**, 1375-1387.
- 11) Miyakawa, H., Kato, H. (1986) *Brain Res.*, **399**, 303-309.
- 12) Tank, D., Sugimori, M., Conner, J. A., Llinas, R. R. (1988) *Science*, **242**, 773-777.
- 13) Tsien, R. Y. (1989) *Ann. Rev. Neurosci.* **12**, 227-253.
- 14) Ross, W. N. (1989) *Ann. Rev. Physiol.*, **51**, 491-506.
- 15) Lasser-Ross, N., Ross, W. N. (1992) *Proc. R. Soc. Lond. (B)* **247**, 35-39.
- 16) Lev-Ram, V., Miyakawa, H., Lasser-Ross, N., Ross, W. N. (1992) *J. Neurophysiol.*, **68**, 1167-1177.

- 17) Miyakawa, H., Lev-Ram, V., Lasser-Ross, N., Ross, W. N. (1992) *J. Neurophysiol.*, **68**, 1178-1189.
- 18) Jaffe, D. B., Johnston, D., Lasser-Ross, N., Lisman, J. E., Miyakawa, H., Ross, W. N. (1992) *Nature*, **357**, 244-246.
- 19) Miyakawa, H., Ross, W. N., Jaffe, D., Callaway, J. C., Lasser-Ross, N., Lisman, J. E., Johnston, D. (1992) *Neuron*, **9**, 1163-1173.

みやかわ ひろよし

1979年 東北大学理学部化学科博士課程退学。1983年 東北大学医学部博士課程修了。量子化学をあきらめて神経生理学をはじめたつもりだったのに、このごろは蛍光色素を使った光学的計測を試みたり、ニューロンのシミュレーターを動かしてみたりと、昔やったことに助けられています。神経科学は若い科学。いろんな分野で育ったいろんな考え方の人と協力しながら仕事を進めて行きたいと思っています。

〒990-23 山形市飯田西2-2-2 山形大学医学部第二生理

TEL 0236-33-1113

E-mail MG108@kdw01.kj.yamagata-u.ac.jp