研究論文

モルモット海馬スライスにおけるカルバコール誘導リズム波の 長期増強 (LTP) に対する効果*¹

夏目 季代久, 米谷 快男児

九州工業大学情報工学部生物化学システム工学科*²

The Effects of Rhythmical Waves Induced by Carbachol on LTP in Guinea Pig Hippocampal Slices

Kiyohisa Natsume and Kaoru Kometani

Department of Biochemical Engineering and Science, Faculty of Computer Science
and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

The cholinergic input to the hippocampus originates in the septum and diagonal band. A bath application of carbachol, a cholinergic agonist, induced different patterns of rhythmical waves depending on its concentration in guinea pig hippocampal slices. Tetanus-induced long-term potentiation (LTP) was differentially facilitated under several concentrations of carbachol. Under the concentrations, which were within the optimum range for generating theta-like waves, LTP was most facilitated. In addition, the higher augmentation of LTP occurred when LTP was induced during the generation of theta-like wave. These results suggested that depending on the activity of the cholinergic septal input to hippocampus, different patterns of rhythmical waves are induced and the plasticity in hippocampal neural networks can be modulated by them.

1. はじめに

脳内海馬において観察される θ リズムは、周波数4~12 Hzの規則的な振動脳波であり、海馬外中隔核由来のコリン作動性神経の活動によって生じる。海馬 θ リズムは、学習中のラットにおいて観察され¹⁾、また、海馬における θ リズムが阻害されたラットは、新しい記憶を獲得しにくい²⁾。従って θ リズムは記憶・学習過程に関与していると考えられている。また、 θ リズムを用いた記憶のモデルも提案されている³⁾。

記憶、学習の基礎機構には、海馬内のグルタミン酸を神経伝達物質とするシナプスにおける長期増強 (LTP) が関与している。LTPとは、例えばテタヌス刺激 (100 Hz, 1秒間刺激) を与えると、シナプス効率が長期にわたって増強する現象のことである。

中隔核からの入力切断された海馬スライスにおいて、コリン作動薬であるカルバコールを灌流投与すると、*in vivo* の θ リズムと電気生理学的、薬理学的に類似したリズム波 (θ 様リズム) が観察される⁴⁾。海馬スライス内神経シナプスにおいて、カルバコールを投与すると、LTPが増強されることが明らかにされている^{5,6)}。しかし、 θ 様リズム発生とLTPの関係については、いまだ明らかにされていない。そこで、今回、 θ 様リズムの出現とLTPとの関係について調べた。

2. 実験方法

モルモットの脳から海馬を取り出し、厚さ450~500 μ mのスライスを作製する。その海馬スライスを用いて電気生理実験を行った。Fig. 1に示すように、海馬への入力繊維である貫通繊維 (PP) を刺激電極 (SE) を用いて、0.1 Hzで電流刺激 (テスト刺激) し、集合EPSP (pEPSP) を歯状回 (DG) 分子層に配置した硝子微小電極 (RE1; 抵抗は1~5

*1996年4月2日受付

*2〒820 福岡県飯塚市川津 680-4

Fig. 1 Schematic diagram of the transverse section of the hippocampus and the placement of electrodes. An extracellular recording electrode (RE1) was placed in *stratum moleculare* of the dentate gyrus (DG) to record pEPSP. PEPSP was evoked by activation of the perforant path fibers with a bipolar stimulation electrode (SE). Another electrode (RE2) in *stratum radiatum* of CA3 was used to measure rhythmic activities induced by carbachol.

MΩ) で細胞外記録した。長期増強を誘導するテタヌス刺激には、100 Hz、1 秒間刺激を用い、刺激強度はテスト刺激と同一にした。また、カルバコールをスライスに投与した時、得られるリズム活動を海馬 CA3 領野から硝子微小電極 (RE2; 抵抗 1~5 MΩ) を用いて記録した。

カルバコール灌流下での LTP は、カルバコールをスライスに投与し、pEPSP が定常になった後、テタヌス刺激を行った。LTP が誘導されたかどうかは、テタヌス前後の pEPSP の傾きの比で評価した。カルバコールは、テタヌス前後、常に投与した。

3. 実験結果

3.1 カルバコール灌流下、誘導されるリズム波

Fig. 2 には、様々なカルバコール濃度によって、誘導されるリズム活動を示す。海馬スライスに、10 μ M 以上のカルバコールを投与すると、種々のリズムが観察された。10 μ M のカルバコールを投与すると、投与後 5~10 分で、Fig. 2 B1 に示すように、負極性の波が観察された。Fig. 2 A に示すように、この波は周期的には観察されず、周期は非常に変動した (平均周波数及び振幅は、 0.30 ± 0.08 Hz、 0.522 ± 0.012 mV

Fig. 2 Rhythmical wave induced by different concentrations of carbachol. The concentrations in (A) are the concentrations of carbachol. The activities in (B) are shown at a faster time scale of the waves at the numbers in (A). The application of 10 μ M carbachol induced the negative waves (B1). Concentrations of 50 or 100 μ M carbachol induced theta-like waves (B2). These waves were generated intermittently (A). The application of 200 μ M carbachol elicited small negative waves (the positions of the character "v"s in B3 indicate these waves). The rhythmical waves could also be observed in CA1 and the dentate gyrus of the same slice (data not shown). Calibrations: (A) 10 s, 1 mV, (B) 0.5s, 1 mV, positive up.

(平均値 $\pm$ 標準誤差))。ところが、カルバコールを 50 μ M で投与すると (Fig. 2 B2)、振動周波数が 5.91 ± 0.75 Hz、振幅 0.24 ± 0.03 mV の規則的なリズムが出現した。このリズムは、薬理学的にも *in vivo* で、見られる θ リズムと同様の性質を有することから、

以後 θ 様リズムと呼ぶことにする。 θ 様リズムは、CA 3 のみならず、歯状回 (DG), CA 1 でも観察された。今回, LTP を測定した DG の分子層の領域においても観察されたが, その振幅は小さかった。 θ 様リズムは, カルバコール灌流中, 連続的に出現するわけではなく, Fig. 2 A に示すように, “バースト” 的に, 約 25 秒周期で出現した。100 μ M カルバコールの投与も同様に θ 様リズムが誘導された。さらに 200 μ M

Fig. 3 Effects of different concentrations of carbachol on pEPSP. (A) The thick bar indicates the period of the application of carbachol. The ordinate “relative pEPSP slope” is the ratio of the averaged pEPSP slope before the application of the drug to that in the steady state after the application. Calibration in insets: 2 ms, 1 mV, positive up. (B) Columns and bars represent means and standard errors (S.E.).

Fig. 4 Effects of different concentrations of carbachol on LTP. (A) PEPS before and after the induction of LTP under different concentrations of carbachol. The arrow indicates the time of tetanic stimulation. Calibration: 2 ms, 1 mV, positive up. (B) Data indicate means and S.E. ** Significantly different from the value at the other concentrations of carbachol ($p < 0.01$; ANOVA and Bonferroni's multiple t -test). (0 μ M: $n=7$, 1 μ M: $n=4$, 10 μ M: $n=5$, 50 μ M: $n=6$, 100 μ M: $n=5$, 200 μ M: $n=3$).

Fig. 5 Effects of a theta-like wave on the magnitude of LTP. (A) The time course of the relative pEPSP slope. The arrow indicates the time of tetanic stimulation. "No tetanic stim" means tetanic stimulation was not given although the theta-like waves were induced and test stimulation was done. The facilitation of pEPSP slope was not induced only with the theta-like waves. LTP induced in a theta-like activity ("tetanic stim in activity") was most facilitated. "No carbachol" is the same as "0 μ M carbachol" in Fig. 4. Calibrations in insets: 2 ms, 1 mV, positive up. (B) *Significantly different ($p < 0.05$; ANOVA and Bonferroni's multiple t -test). ("No tetanic stim" column: $n=6$, "tetanic stim in a wave" column: $n=7$, "tetanic stim out of the waves" column: $n=6$)

カルバコールを投与すると、不規則に出現する小さな負極性波が観察された (Fig. 2 B 3; 平均周波数及び振幅は, 1.26 ± 0.12 Hz, 0.114 ± 0.003 mV)。

以上のことから、海馬スライスにおいては、カルバコール濃度依存的に、様々なリズム波が誘導されることが明らかになった。

3.2 カルバコール灌流下、誘導される LTP

カルバコールを投与すると、Fig. 3 A に示すように、pEPSP の傾きは減少した。この傾き減少のカルバコール濃度依存性を Fig. 3 B に示す。10 μ M 以上のカルバコール濃度では、pEPSP 減少の割合に有意差は観察されなかった。

ところが、LTP 振幅 (テタヌ刺激前後の pEPSP の傾きの比) のカルバコール濃度依存性を調べてみると、Fig. 4 に示すように、カルバコール濃度が 50, 100 μ M の時、振幅は約 1.9 倍となり、他の濃度に比べ、顕著に増強された ($p < 0.01$; ANOVA and Bonferroni's multiple t -test)。

3.3 θ 様リズムと LTP

50 もしくは 100 μ M カルバコール投与により、 θ 様リズムが間欠的に出現する (Fig. 2 A)。LTP 誘導に対する θ 様リズムの効果を調べるために、テタヌ刺激を、 θ 様リズム "バースト" 出現時、または非 "バースト" 出現時に行い、得られた LTP の振幅を比較した (Fig. 5)。その結果、"バースト" 出現時にテタヌ刺激をした方が、LTP の振幅は有意に増強された ($p < 0.05$; ANOVA and Bonferroni's multiple t -test)。以上のことから、 θ 波発現時に誘導される LTP は増強されると考えられる。

4. 考 察

4.1 カルバコールによって誘導されるリズム波

様々な濃度のコリン作動薬であるカルバコールは、海馬スライスに、様々なリズムを誘導する (Fig. 2)。海馬におけるアセチルコリンの放出は、中隔核からのコリン作動性神経に依っているため、海馬内のアセチルコリン濃度は、これらコリン作動性神経の活動度に依存すると考えられる。今回の結果 (Fig. 2) は、その活動度に応じて、海馬内で様々なリズム生成が観察され得ることを示唆している。

海馬の中には、フィードフォワード及びフィードバック抑制に関与する多数の抑制性神経が存在する。Traub らが提案している θ 様リズムのモデル⁷⁾によれば、抑制性神経の効果を変化させると、海馬内神経回路に周期の異なる様々な振動パターンが生成する。また、*in vivo* 海馬 θ リズムの誘導には、興奮性神経

への興奮性作用と同時に抑制性神経の脱抑制が必要であることが報告されている^{8,9)}。従って、カルバコールによって誘導される様々な振動パターンの発現には、海馬内に存在する抑制性神経が重要な役割を果たしていると考えられる。

今回観察された θ 様リズムは、海馬スライス内、DG, CA 3, CA 1各領域で観察された。領域間を切断した実験によれば、 θ 様リズムのgeneratorは、CA 3, DGに存在し、CA 1へはCA 3からのリズム信号が伝搬していると考えられている¹⁰⁾。CA 3の θ 様リズム発生回路に関しては、前記Traubらによるモデル⁷⁾が提出されており、領域内錐体細胞間の相互興奮結合と時間遅れで生じる抑制性細胞の活動がリズム誘導に重要であることがわかっている。一方、DG領域には、顆粒細胞間の相互興奮結合が発見されておらず、リズム発生機構は、現在の所、不明である。しかし、歯状回hilus領域には、まだ機能が解明されていない多くの介在神経が存在するので、これらにより顆粒細胞間の相互興奮結合とゆっくりした抑制結合を持つ回路が形成され、CA 3同様、リズムが誘導されると我々は考えている。

4.2 θ 様リズムとLTP

10 μ M未満のカルバコール濃度では、pEPSPの傾きは減少した (Fig. 3)。アセチルコリン存在下、後シナプス細胞にグルタミン酸を局所的に投与しても、アセチルコリン投与前と同様の興奮性シナプス後電流が流れる¹¹⁾ので、カルバコールによるpEPSPの傾き減少は、シナプス前終末への作用によるものと考えられる。また、カルバコール投与下、テタヌス刺激によって誘導されたLTPの振幅は、 θ 様リズムを誘導する50, 100 μ Mの濃度時、他の濃度と比べて有意な増強が観察された (Fig. 4)。さらに、 θ 様リズム“バースト”時にテタヌス刺激をして得られたLTPは、非“バースト”時に得られたLTPに比べて、有意に増強されていた (Fig. 5)。以上のことから、海馬スライスにおいて、 θ 様リズム発現時、誘導されるLTPは増強されることが示された。

θ 様リズム発現時、LTPの振幅が増強する機構について、我々は、3つの可能性を考えている。1)カルバコール投与による海馬内神経細胞の脱分極¹³⁾の関与。LTPの誘導には、シナプス前終末の発火とシナプス後細胞の脱分極が必要である。最近の仮説¹⁴⁾によると、誘導されるLTPの振幅は、シナプス後細胞の脱分極の程度によって大きさが変化する。 θ 様リズム発生時、誘導されるLTPは増強される (Fig. 5)ので、 θ 様リズム発現時、シナプス後細胞は、より脱

分極しているかもしれない。2)海馬内抑制性神経の関与。抑制性神経は、 θ 様リズム生成と同様、LTP発現にも関与している¹²⁾。今回、測定した貫通線維・歯状回シナプス付近にはフィードフォワード抑制、フィードバック抑制の2種類の抑制性神経が存在する。通常、これらの抑制性神経は、テタヌス刺激によるシナプス後細胞の膜の脱分極の加重現象を抑制する働きがある。 θ 様リズム中、これらの抑制性神経が抑制されることにより、テタヌス刺激中のシナプス後細胞の脱分極が効率よく起こり、LTP振幅の増強現象が生じていると考えられる。3) θ 様リズム発現時の神経細胞間コヒーレンス増加の効果。 θ 様リズム発生時、海馬内における錐体細胞は同期して振動¹⁵⁾発火している。この同期化には、海馬神経回路内錐体細胞間の相互興奮結合が関与していると考えられる。錐体細胞同様、DG顆粒細胞間の相互興奮結合が強くなれば、テタヌス刺激時において、シナプス後細胞の脱分極は大きく起こり、非リズム時に比べ、より大きなLTPが生成すると考えられる。現在、3つの可能性について、検討中である。

4.3 θ リズムと記憶・学習過程

カルバコールのようなコリン様物質は、シナプス前終末からの神経伝達物質の放出を抑制する。この抑制効果のみであれば、シナプス後細胞の脱分極は、それほど起こらず、LTPの生成は起こらないはずである。しかし、コリン様物質には、LTPに対する増強現象が観察される (Fig. 3 B) ので、前シナプスへの抑制効果が補償されていると考えられる。このようなコリンアゴニストのシナプス前終末への抑制効果とLTPの増強効果の2つの効果により、神経回路網への記憶埋め込み時、記憶される神経発火パターンのパターン間の干渉が妨げられ^{16,17)}、海馬神経回路網におけるパターン想起がスムーズに行われると考えられる。

θ 様リズム発現時、誘導されるLTPは、非リズム時に比べ、さらに増強される (Fig. 5)。この θ 様リズム発現時におけるさらなるLTP増強の学習過程における役割は現在不明であるが、上記記憶パターン間の干渉回避に加えて、 θ リズム発現時、リズム発生を利用したダイナミカルな学習過程が起こっているかもしれない。森田⁹⁾の連想記憶海馬モデルでは、 θ リズム発現時、海馬神経回路内に時々刻々変化する空間的な神経発火のパターンが生成され、海馬への入力刺激との間での連合が起こる。今回、観察された θ 様リズム中でのLTPの増強現象は、そのような学習過程を反映しているものかもしれない。

4.4 結 論

以上まとめると、海馬内のアセチルコリン濃度は、中隔核からのコリン作動性神経の活動性によって決まる。従って、生体内では、海馬に入力しているコリン作動性神経の適度な活動によって、海馬において θ リズムが発生し、海馬神経回路は、シナプス増強が起こりやすい状態に移行し、学習しやすくなるのではないかと考えられる。

謝 辞 帝人(株)システム技術研究所の沢野哲也氏、帝人(株)生物医学研究所の吉岡昇博士、九州大学歯学部石塚智博士には、非常に多くの技術的なコメントを頂き感謝します。また多くのご助言を頂いた九州工業大学神経科学グループの皆様、国際高等研究所数理科学ワークショップ「複雑系の秩序と構造」参加の皆様には感謝致します。この研究の一部は、財団法人日本科学協会笹川科学研究助成の援助(8-300)によるものです。心より感謝します。

参 考 文 献

- 1) Otto, T., Eichenbaum, H., Wiener, S.I. and Wible, C. G. (1991) : Learning-related patterns of CA1 spike trains parallel stimulation parameters optimal for inducing hippocampal long-term potentiation, *Hippocampus*, Vol. 1, No. 2, pp. 181-192
- 2) Winson, J. (1978) : Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat, *Science*, Vol. 201, pp. 160-163
- 3) 森田昌彦(1989) : 連想記憶の海馬モデル, 信学論, J-72-D-II, pp. 272-288
- 4) Konopacki, J., MacIver, M. B., Bland, B. H. and Roth, S. H. (1987) : Carbachol-induced EEG 'theta' activity in hippocampal brain slices, *Brain Res.*, Vol. 405, pp. 196-198
- 5) Burgard, E. C. and Sarvey, J. M. (1990) : Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus, *Neurosci. Lett.*, Vol. 116, pp. 34-39
- 6) Blitzer, R. D., Gil, O. and Landau, E. M. (1990) : Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of the rat hippocampus, *Neurosci. Lett.*, Vol. 119, pp. 207-210
- 7) Traub, R. D., Miles, R. and Buzsaki, G. (1992) : Computer simulation of carbachol-driven rhythmic population oscillations in the CA3 region of the *in vitro* rat hippocampus, *J. Neurophysiol.*, Vol. 451, pp. 653-672
- 8) Colom, L. V., Nassif-Caudarella, S., Dickson, C. T., Smythe, J. W. and Bland, B. H. (1991) : *In vivo* intrahippocampal microinjection of carbachol and bicuculine induces theta-like oscillations in the septally deafferented hippocampus, *Hippocampus*, Vol. 1, No. 4, pp. 381-390
- 9) Heynen, A. J. and Bilkey, D. K. (1991) : Induction of RSA-like oscillations in both the *in-vitro* and *in-vivo* hippocampus, *NeuroReport*, Vol. 2, pp. 401-404
- 10) 白神洋子, 山田大志, 夏目季代久, 米谷快男児(1993) : カルバコールによる海馬 θ リズムの発生機構, 生物物理, Vol. 33, p. S 221
- 11) Segal, M. (1989) : Presynaptic cholinergic inhibition in hippocampal cultures, *Synapse*, Vol. 4, pp. 305-312
- 12) Wigström, H. and Gustafsson, B. (1983) : Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition, *Nature*, Vol. 301, pp. 603-604
- 13) Nicoll, R. A. (1985) : The septo-hippocampal projection: a model cholinergic pathway, *TINS*, Vol. 8, pp. 533-536
- 14) Artola, A. and Singer, W. (1993) : Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation, *TINS*, Vol. 16, No. 11, pp. 480-487
- 15) MacVicar, B. A. and Tse, F. W. Y. (1989) : Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices, *J. Physiol.*, Vol. 417, pp. 197-212
- 16) Hasselmo, M. E. and Schnell, E. (1994) : Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice physiology, *J. Neurosci.*, Vol. 14, No. 6, pp. 3898-3914
- 17) 北島龍雄, 鹿野 淳, 渋谷 徹, 原 健一(1996) : アセチルコリン抑制を考慮した嗅覚系における自己連想記憶の神経回路網モデル, 信学技法, NC95-178, pp. 177-184