

Title	培養系を用いたニワトリ胚大脳神経細胞のシナプス形成の研究
Author(s)	時岡, 良
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38830">https://hdl.handle.net/11094/38830</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	とき 岡	おか 良
博士の専攻分野の名称	博 士	(理 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 8 3 5	号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 5 月 27 日	
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当	
	基礎工学研究科 物理系専攻	
学 位 論 文 名	培養系を用いたニワトリ胚大脳神経細胞のシナプス形成の研究	
論 文 審 査 委 員	(主査)	教 授 葛西 道生
	(副査)	教 授 柳田 敏雄 教 授 村上富士夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

脳における情報処理の最小機能単位である、ニューロンの特性についての詳細な知見を得ることは、脳機能の解明に必須である。シナプス形成の分子機構やシナプス伝達の可塑的变化等を単一細胞レベルで研究可能な *in vitro* の系は、その目的のために有効な手段を提供する事になる。

本研究では胚期の大脳細胞の解離培養系の確立とシナプス形成過程の解析を試みた。実験には発生の各段階の胎児が容易に入手可能で、種々の胚操作技術が応用可能なニワトリ胚の大脳神経細胞を用いた。

まず、この系でのシナプス伝達を Whole-cell 記録法を用いて2細胞からの同時記録により調べた。培養条件を工夫することにより（用いる胚齢を遅くし、ウシ胎児血清 (FCS) を培地に添加)、興奮性と抑制性の化学シナプス伝達と電気シナプスが確認できた。興奮性シナプス伝達の多くは薬理効果 (CNQX による阻害) やカイニン酸・グルタミン酸投与の応答の相同性等から非 NMDA 型のグルタミン酸レセプターを介したものであることが同定された。抑制性シナプス伝達の伝達物質の多くはビキュキュリンでブロックされたことから GABA を介したものであることがわかった。抗 GABA 抗体による染色から GABA 作動性のニューロンの存在を、また、シナプス前部の膜蛋白質であるシナプトフィジンに対する抗体を用いた組織化学によっても、シナプス形成が確認できた。さらに自発性シナプス入力が高頻度で観察され、これがシナプス形成の指標として用いることができることを示唆した。この自発性入力は数秒間隔で周期的に起こり、TTX, CNQX 等の細胞外投与により消失、灌流により再現された。

さらに本系でのシナプス形成過程を探るためにニワトリ胚の摘出時期 (E 6 ~ E12) と、培養日数を変えて調べた。その結果、*in vitro* でのシナプス形成過程は培養に用いたニワトリ胚の胚齢によって、時間的なずれがあることが分かった。つまり、シナプス形成は E. E. days (embryonic equivalent days = 培養開始時の胚齢 + 培養日数) に依存し、13 E. E. days 頃から19 E. E. days 頃にかけてシナプス形成が進行していった。このことは *in ovo* から解離培養という通常の発生過程とは異なる人工的な *in vitro* の系に細胞を移しても、発生の過程は同じように進行することを示唆している。培養条件を変える (血清・グリア細胞の有無) ことにより、その過程が影響を受けることも明らかになった。このことはシナプス形成に必須な要因を探索する上でも有用な系であると思われる。

シナプス形成が進行した系では、複数のニューロンを介した回路性の入力と思われる応答も観測された。微小電極を用いた電気生理学的手法では、同時に観測できる神経細胞数が2, 3個に限定される。そこで、電位感受性色素を用いたニューロンの電氣的活動の光学的測定を試みた。この方法はニューロン間の情報伝達を多点同時記録することが可能で、神経回路網の動的変化がリアルタイムで解析できる利点がある。光源のノイズをフィードバック回路で除去し、パッチクランプ法により、細胞の膜電位を制御することにより、 $\Delta F/F$  3% per 100mV (m. p.) の光学的記録が可能な条件を見いだせた。色素や測定法をさらに改良することにより神経回路網も動的変化も記録できるようになるものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

脳における情報処理は複雑に組織された神経回路網によって行われている。この回路網の形成のメカニズムを知ることが、脳機能の解明に必須である。本論文は、そのような研究一環として、ニワトリ胚の大脳細胞を用いて *in vitro* でのシナプス形成のメカニズムを研究したものである。

申請者は発生の各段階の胚が簡単に入手できる系としてニワトリ胚を選んだ。発生の各段階のニワトリ胚の大脳細胞を取り出し試験管内で培養し、シナプスが形成される系を確立した。先ず、シナプス伝達を Whole-cell 記録法を用いて2細胞から同時記録することによって調べた。培養条件を工夫して興奮性と抑制性の化学シナプスと電気シナプスが形成されることを確認した。そのうち興奮性シナプスに関しては、多くは CNQX, カイニン酸, グルタミン酸投与などの薬理効果の研究から非 NMDA 型のグルタミン酸レセプターを介したものであることを明らかにした。また、抑制性のシナプス伝達については多くはビキュキュリンによって伝達が阻害されることから GABA を介したものであることを明らかにした。更に、抗 GABA 抗体による染色によって GABA 作動性ニューロンの存在を確認し、また、シナプス前部の膜蛋白であるシナプトフィジンに対する抗体による染色によってシナプスが形成されていることを確認した。一方、シナプスへの自発性入力が高頻度に行っていることを観察し、これがシナプス形成の1つの指標として使えることを示唆した。

次に、シナプス形成過程を探るためにニワトリ胚の摘出時期と培養日数を変えてシナプス形成の経時変化を調べた。その結果、シナプス形成過程は培養に用いたニワトリ胚の胚齢によって時間的なずれがあることが分かったが、この現象は培養開始時の胚齢と培養日数を加えた E. E. days (embryonic equivalent days) という概念を用いると統一的に説明できることを示した。その結果、培養系でのシナプス形成は13 E. E. days から19 E. E. days にかけて進行することが分かった。このことは培養系でも神経細胞の分化は生体内と同じように進行していることを示唆するもので、重要な知見である。また、このシナプス形成過程は培養条件を変えると影響されることも明らかになり、シナプス形成に必須な因子の探索などに利用できる可能性も示唆された。

シナプス形成が進行した系では、複数のニューロンを介した回路が形成されていることを示す結果が得られたが、現在の電気生理学的方法では測定できる細胞の数が限られている。そこで、多くの神経細胞間を伝わる電位変化を同時計測するために膜電位感受性の色素を用いた計測の予備実験を行った。その結果、シグナル・ノイズ比が3%程度で計測できる系を開発した。

以上のように、本論文は神経細胞間のシナプス形成のメカニズムの研究分野に重要な知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認める。