

氏名(本籍)	並木重宏(千葉県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第4992号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Neuronal Microarchitecture of Synchronized Waves in Developing Cerebral Cortex (発達期大脳皮質における同期波の解析)		
主査	筑波大学准教授	医学博士	中谷敬
副査	筑波大学教授	理学博士	山岸宏
副査	筑波大学准教授	理学博士	古久保-徳永 克男
副査	東京大学准教授	薬学博士	池谷裕二

論文の内容の要旨

発達期の神経系においては、局所的な同期活動が広域にわたって伝播する同期波という現象が知られている。同期波は細胞の分化、移動、シナプス形成等を制御し、脳発達に重要な役割をもつと考えられているが、多様な神経回路の配線を実現する過程は明らかになっていない。大脳皮質では、出産前後より興奮性シナプス結合を介する皮質同期波が報告されているが、高時間分解能による計測が困難で、あったため、進行波としての性質に関する研究は少なく、また、細胞レベルのダイナミクスは未知である。本研究は、皮質同期波の速いダイナミクスを初めて細胞レベルの分解能で明らかにした論文である。

生後1～6日齢の幼若ラットより急性脳切片標本を作成し、人工脳脊髄液中に静置し、Ca²⁺蛍光指示薬を負荷した。488nmのレーザーで指示薬を励起、蛍光を507nmのロングパスフィルターで捉え、その蛍光強度を10-50Hzで記録し、本人が自作したMATLABルーチンにより解析を行った。先行研究では、二光子励起法による、単一焦点の励起・測光を連続して行う方式を採用しているが、この方式では高信号雑音比が得られるものの、時間分解能が低いという欠点があった。本論文では、多点励起・多点測光による高速撮影が可能で、回転盤共焦点顕微鏡を利用することにより、速いダイナミクスの観察を行うという工夫をしている点の特筆される。

全脳切片標本にて、低倍レンズによる広域Ca²⁺画像法を適用したところ、同期波は皮質後部の嗅内皮質において発生し、その他の皮質領域全体に伝播することが明らかになった。皮質同期波はしばしば海馬・扁桃核へも伝播し、線条体・視床・視床下部への伝播は観察されなかった。嗅内皮質の活動を観察したところ、同期波は主として嗅内皮質前方部の嗅周囲皮質との境界付近の第3層で発生し、嗅内皮質前方へ伝播、傍海馬支脚との境界付近で停止、あるいは反射し、再び発生源との境界部まで伝播・停止するという2種類のダイナミクスが観察された。多ニューロンCa²⁺画像法により細胞レベルの分解能で、活動を観察したところ、発生源近辺のネットワークでは多くの細胞が同期波の発生に先行して活動し、また、これらの活動順序には複数のパターンが存在した。伝播中のネットワークでは、多くの細胞の活動開始時刻が揃っていた。停止・反射の起こる部位では、近い細胞が同様の応答性を示し、境界部は精確な空間構造を持つことがわかった。

薬剤存在下での同期波の発生頻度を測定することにより、同期波発生メカニズムの薬理的検討を行った。20 μM CNQX あるいは 50 μM AP5 の単独処置では、同期波の発生は阻害されず、共処置によって阻害されたことから、同期波の発生には両イオンチャンネル型のグルタミン酸受容体のシナプスが必要であることがわかった。100 μM picrotoxin では阻害されなかったことから GABA 性のシナプス伝達は不要であることがわかった。また 100 μM carbenoxolone で発生頻度が有意に低下したことから、特定のギャップ結合が同期波の発生を促進することがわかった。更に、100 μM flufenamic acid あるいは 30 μM riluzole の単独処置によって、同期波の発生が阻害されたことから、 Ca^{2+} 非選択的陽イオン電流と持続性 Na^{+} 電流が必要であることがわかった。シナプス伝達、ギャップ結合遮断下での多ニューロン画像法の適用から、内因的に活動する細胞が嗅内皮質 2, 3 層に多く存在することがわかった。嗅内皮質内の各領域を観察したところ、発生源となる部位にはより多くの内因性活動細胞が存在する傾向にあった。

更に、嗅内皮質を複数の小切片に分割したところ、どの小切片も自発的な同期波を発生させたことから、嗅内皮質の局所的な領域はいずれも同期波を発生させる能力をもつことがわかった。細胞外電極によって、皮質各領域を刺激したところ、嗅内皮質のいずれの領域においても外部刺激によって、同期波を誘導可能であることがわかった。また刺激間隔を違えたところ、刺激直後には同期波の誘導確率が低い期間（ネットワーク性の不応期）があることがわかった。

本論文は、進行波としての発達期電気活動を細胞レベルで記述し、その多様性を同定した初めての報告であり、同期波のダイナミクスの細胞レベルでの記述は、回路発達のみならず、てんかん・発作後の同期活動、睡眠時・思考時にみられる脳波活動等を含め、広範な神経活動の伝播現象の研究に貢献するものであり、神経生物学分野における重要な成果である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は幼若期動物の大脳皮質の未熟な回路における初期活動の様式を追求したものである。すでに単発的な先行研究は部分的にあったものの、並木氏は広視野型の機能的多ニューロン Ca^{2+} 画像法を独自に開発することで、回路活動を網羅的に解析することに成功した。この手法は大脳皮質の複数の層や複数の領域を跨いで広範囲で数千としづ膨大なニューロンの活動を記録することができ、なおかつ単細胞の解像度を保持しているという世界最高レベルの驚異的な手法である。これによって、初期皮質オシレーション（彼はこれを「同期波」と名付けている）は大脳皮質全体に伝播するものの、その開始点が嗅内皮質にほぼ限られることと、その伝播には方向性があること、しかし、ときには反射などの複雑な挙動を見せることなど、同手法を活用しなければわからなかった新現象を数多く記載するに至った。

彼のデータを総合すると、以下のような同期波の形成メカニズムが想定される。まず内因性の活動を示す細胞からの興奮性出力により、嗅内皮質の 3 層のネットワークの活性が増大する。これがある閾値を超えたところで同期波が発生し、領域全体を活性化させる。伝播後は全領域が不応期に入る。内因性の自発活動を示す細胞が多い領域は最初に閾値に到達するため、毎回同一の領域が発生源となる。

以上の発見の同分野に与える影響は大きく、オリジナリティの極めて高い論文である。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。