

博士論文

てんかん様同期活動の薬理的解析と  
その時間・空間特異性

本郷 良泳

## 【はじめに】

脳機能は多数の神経細胞によって形成される神経ネットワークで統御された活動によって実現している。この神経ネットワークを形成するシナプス結合は、解剖学的な視点からは詳細に明らかにされているが、機能的な視点からは未だ不明な点が多い。機能的な視点からシナプス結合を解明すること、すなわち神経細胞の活動パターンを解析し神経ネットワークの基盤を解明することは、生理的な情報処理機構や、病態時の活動パターン異常およびそのメカニズムの理解に必要不可欠である。本研究では、多数の神経細胞が協調的に活動する同期的神経活動に着目し、多細胞カルシウムイメージング法を用いることでその活動パターンを単一神経細胞レベルの解像度で解析した。同期的神経活動は記憶などの情報処理に関わっているだけでなく、その活動異常は、アルツハイマー病、統合失調症、てんかんといった中枢神経疾患と関連することが知られている。本研究の成果として、まず第一部で、海馬てんかん様同期的神経活動に対する抗てんかん薬の作用を解析することで見出した、抗てんかん薬の新たな薬剤特性について述べる。次の第二部では、海馬 CA3-CA1 神経回路における同期的神経活動の活動パターンを解析することで発見した、興奮性神経活動の伝播様式について述べる。

## 目次

### 第1部 多細胞カルシウムイメージングによる抗てんかん薬の評価

【背景】 .....	5
【目的】 .....	7
【方法】 .....	8
【結果】 .....	12
【考察】 .....	18
【参考文献】 .....	34

### 第2部 海馬 CA3-CA1 領域における神経細胞活動の時間・空間特性

【背景】 .....	43
【目的】 .....	44
【方法】 .....	45
【結果】 .....	48
【考察】 .....	53
【参考文献】 .....	66
【略語】 .....	70
【謝辞】 .....	71

## 第 1 部

多細胞カルシウムイメージングによる  
抗てんかん薬の評価

## 【背景】

てんかんは、大脳の神経細胞が過剰に興奮するために発作が反復性に起こる慢性の脳疾患である。神経ネットワークにおける興奮性と抑制性のバランスが崩壊することが発生のメカニズムと考えられており、同期的な神経活動が特徴的な所見として認められる。これまでに、様々な *in vitro* てんかんモデルを用いた研究が行われている。例えば、海馬など脳スライス標本に、てんかん誘発剤 (Avoli et al., 1993; Borck & Jefferys, 1999) や電気刺激 (Stasheff et al., 1985) を処置するモデルや、低  $\text{Ca}^{2+}$  (Jefferys & Haas, 1982; Taylor & Dudek, 1982)、低  $\text{Mg}^{2+}$  (Anderson et al., 1986; Mody et al., 1987)、高  $\text{K}^{+}$  (Korn et al., 1987; Traynelis & Dingledine, 1988) といった細胞外イオン環境操作を行うモデルがある。上記モデルでは、局所集合電位記録により持続的・同期的なオシレーションとして記録される、てんかん様活動 (seizure-like events, SLEs) が認められる (Anderson et al., 1986; Nyikos et al., 2003)。この SLEs に着目することで、てんかんの特性やメカニズムが解明されてきており、さらに様々な抗てんかん薬の評価が実施されてきた (Fueta & Avoli, 1992; Leschinger et al., 1993; Albus et al., 2012)。

しかし、上記の研究のほとんどは電気生理学的手法により研究されており、その解析対象は数個の細胞もしくは局所の集合電位である。そのため、SLEs における個々の細胞の挙動を、神経ネットワークレベルで明らかにすることはできない。一方、中枢神経系では様々な細胞が協調して機能を発揮しているため、SLEs の正確な理解には、単一細胞レベルの解像度で多細胞の活動パターンを評価することが必要不可欠である。

このような技術的課題を解決するため、近年、多細胞カルシウムイメージング法 (functional multineuron  $\text{Ca}^{2+}$  imaging, fMCI) という、多細胞の活動を単一細胞レベルの解像度で解析する手法が開発された (Smetters et al., 1999; Cossart et al., 2005; Takahashi et al., 2007, 2010)。この手法を用いて、神経ネットワークにおける多細胞の活動パターンの時間空間的な特徴が明らかにされてきた (Cossart et al., 2003; Ikegaya et al., 2004; Sasaki et al., 2007; Bonifazi et al., 2009)。正常時の活動だけでなく、てんかんについても、大脳皮質や海馬において fMCI を用いて検証されている。例えば、SLEs と同様にてんかんの特徴として知られて

いる発作間欠期放電 (interictal discharge) は、局所集合電位記録では、一過的な同期的電位変化として観察されるが、fMCIにより多細胞において同期的な一過性Ca<sup>2+</sup>流入を伴うことが明らかになっている (Badea et al., 2001; Takano et al., 2012)。また、SLEsでは持続的かつ同期的なCa<sup>2+</sup>流入が起こることが報告されており (Gómez-Gonzalo et al., 2010; Cammarota et al., 2013)、Cammarotaら (2013) は、パルブアルブミン陽性fast-spiking抑制性神経細胞がSLEsの伝播を制御することを明らかとしている。また、interictal dischargeを多細胞で解析すると、様々な活動パターンが関与していることが報告されている (Sabolek et al., 2012; Feldt Muldoon et al., 2013)。このように、fMCIにより、てんかんに関連する同期的神経活動の性質やメカニズムが明らかになりつつある。しかし、SLEsにおける多細胞の活動パターンに対する抗てんかん薬の作用を、単一細胞レベルで明らかにした研究はほとんどない。抗てんかん薬をfMCIで評価し、新たな薬剤特性を見出すことができれば、創薬を進める上で大変有益な情報となる。

## 【目的】

本研究では、SLEsにおける多細胞の活動パターンに対する抗てんかん薬の作用を、単一細胞レベルで明らかにすることを目的として、fMCIを用いてラット海馬スライスよりてんかん様同期活動を記録し、種々の抗てんかん薬の作用を解析した。具体的には、ラット海馬急性スライスCA1領域において多細胞イメージングを行い、Mg<sup>2+</sup>非存在下でてんかん誘発剤であるbicucullineを処置し、多細胞の活動を記録・評価した。BicucullineはSLEsに伴う同期的なCa<sup>2+</sup>流入を引き起こしたことから、この同期的Ca<sup>2+</sup>流入をてんかん*in vitro*表現型と捉え、種々の抗てんかん薬（phenytoin、flupirtine、ethosuximide）の作用を評価した。Phenytoinは電位依存性・頻度依存性のNa<sup>+</sup>チャンネル阻害薬である（Mantegazza et al., 2010）。FlupirinteはK<sup>+</sup>チャンネル（Kv7.2/7.3）開口薬であり、同類の作用薬であるretigabineが抗てんかん薬として使用されている（Brown & Passmore, 2009）。EthosuximideはT-type Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害薬である（Gören & Onat, 2007）。

## 【方法】

### 実験動物

実験には生後6–8日齢のWistarラット (SLC、Shizuoka, Japan) を使用した。ラットは自由摂食・摂水下、12時間毎の明暗制御、および温度・湿度を制御した条件下で飼育し、実験に用いた。全ての実験は、塩野義製薬株式会社の動物実験内部ガイドラインと倫理規定に従い、塩野義医薬研究センター動物実験適正運用委員会から承認された手順で実施した。

### スライス標本の作製

ラットを断頭し、摘出した脳をあらかじめ95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>ガスを飽和させた氷冷下のmodified aCSF (artificial cerebrospinal fluid: 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM KCl, 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose, and 215.5 mM sucrose) 中に静置した。海馬を単離し、3%アガロースゲルで包埋し、ビブラトーム (VT1200S; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて海馬スライス標本 (400 μm) を作製した。作製した標本は95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>ガスを飽和させた32°Cのnormal aCSF (113 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, and 11 mM glucose) 中で40分以上回復させてから実験に使用した。

### 多細胞カルシウムイメージング法 (functional Multineuron Calcium Imaging; fMCI)

スライス標本をCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬 Oregon Green 488 BAPTA-1AM (OGB-1) を含む32°Cの染色液中で60分間インキュベートした。染色は以下の組成で実施した：normal aCSF, 0.0005% OGB-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.01% Pluronic F-127 (Invitrogen), 0.005% Cremophor EL (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)。インキュベート後、aCSF中で40分以上回復させた。その後、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>ガスを飽和させた32°CのMg<sup>2+</sup>-free aCSF (113 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, and 11 mM glucose) を2.0 mL/minの流速で灌流させた記録チャンバーにスライス標本を移した。10分間静置した後、CA1領域錐体細胞の自発活動をCa<sup>2+</sup>蛍光シグナルとして記録した。本実験でのイメージングシステムとして、ニポ

ウ板型共焦点レーザースキャナ (CSUX1; Yokogawa Electric, Tokyo, Japan)、冷却CCDカメラ (iXon DU897; Andor Technology, Belfast, UK) が配備された正立顕微鏡 (Eclipse FN1; Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。実験には16×、0.8 NA (Nikon) の水浸対物レンズを使用した。共焦点像は488 nm波長のDPSSレーザー (30 mW, BC-001-B; Melles Griot, Albuquerque, NM, USA) で励起し、11–12 Hzのフレーム速度で撮影した。退色を最小限にするため、レーザー強度をニュートラル・デンシティーフィルターで5%に減弱させた。

記録されたOGB-1イメージング画像より、神経細胞の細胞体の位置を目視で同定した。80個以上の細胞が染色されたスライス標本を解析対象とした。それぞれの細胞において細胞体でのCa<sup>2+</sup>蛍光輝度変化 $\Delta F/F$ を算出した。計算式は以下の通りである。

$$\Delta F/F = (F_1 - F_0)/F_0$$

ここで $F_1$ は任意の時点の蛍光強度、 $F_0$ は記録時間中における蛍光強度の平均値とした。個々の細胞において $\Delta F/F$ が0.05以上のとき、細胞が活性化していると判断した。Ca<sup>2+</sup>シグナルのピーク、Ca<sup>2+</sup>の細胞内への流入量を示すarea under the curve (AUC)、Ca<sup>2+</sup>流入持続時間はPCLAMP software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) を用いて算出した。

神経ネットワーク全体に対する抗てんかん薬の作用を単一細胞レベルで評価するため、まず、抗てんかん薬処置後の作用を薬剤群間で比較した。Bicuculline (10  $\mu$ M) をMg<sup>2+</sup>-free条件下でスライス標本に処置しててんかん様活動を誘発し、1回目に観察された持続的な同期的Ca<sup>2+</sup>流入の1分後から抗てんかん薬もしくはコントロールとしてaCSFを処置した。抗てんかん薬の処置開始後2分から15分間、bicuculline誘発同期的Ca<sup>2+</sup>流入に対する抗てんかん薬の作用を評価した。Bicuculline誘発同期的Ca<sup>2+</sup>流入におけるAUC (Ca<sup>2+</sup>流入量) およびピークはベースラインの平均輝度強度で補正した。2つのタイプの評価指標、すなわち①個々の同期活動における作用の指標 (ピーク、AUC、持続時間) および②記録時間全体における作用の指標 (同期回数、総AUC、活動細胞の割合) を用いて評価した。薬剤群間の比較はSteel's testを用いて解析した。

次に、抗てんかん薬処置前後の個々の細胞の変化を評価するため、抗てんかん薬処置前2–

10分間と、処置後10分間の、同期活動のピーク平均値を同一細胞で比較した。処置前のピークに対する、処置後ピーク/処置前ピークの相関係数は、Spearman rank correlation coefficientを用いて評価した。Z-test for two correlation coefficientsを用いて、2つの相関係数の差を評価した (Kendall et al., 1994)。

### ルーズセルアタッチ記録

CA1錐体細胞をOGB-1蛍光像より視覚的に同定し、 $\text{Ca}^{2+}$ シグナル記録と同時に、aCSFを内液としたハウケイ酸ガラス電極 (3–6 M $\Omega$ ) を用いて同一細胞のスパイク活動を記録した。記録には EPC10 (Heka, Darmstadt, Germany) および PULSE software (Heka) を用い、2.9 kHzのカットオフフィルターを通した。スパイク活動は PowerLab (AD Instruments, Dunedin, New Zealand) を用いて10 kHzでサンプリングし、LABCHART (AD Instruments) を用いて解析した。

### 局所集合電位記録

直径50  $\mu\text{m}$ の電極が64電極配置された記録チャンバー (MED-P50025; Alpha MED Scientific, Osaka, Japan) にスライス標本を設置し、多電極記録システム (Cerebus Data Acquisition System; Blackrock Microsystems, Salt Lake City, UT, USA) およびCENTRAL software (Blackrock Microsystems) を用い、0.3 Hz以下の低周波カットフィルターおよび500 Hz以上の高周波カットフィルターを通し10 kHzでサンプリングした。SLEsの評価では、 $\text{Mg}^{2+}$ -free条件下でてんかん誘発剤を処置した。局所集合電位記録において、同期的な電位変化の後、後発射が検出されたものをSLEsと判定した。SLEsが安定して記録されることを確認した後、種々の抗てんかん薬を処置し、抗てんかん薬の処置前後10分間における、SLEsの持続時間および回数を評価した。処置前後の比較はWilcoxon's signed-rank testを用いて解析した。

## 薬物

薬物処置は、灌流液を切り換えることにより記録チャンバー全体に処置することで実施した。(-)-Bicuculline methobromide (bicuculline) および4-aminopyridine (4-AP) は和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。Pentylentetrazole (pentetrazol)、5,5-diphenylhydantoin (phenytoin)、pilocarpine は Sigma (St Louis, MO, USA) から購入した。Flupirtine maleate (flupirtine) は Tocris Cookson (Bristol, UK) から、ethosuximideは東京化成工業 (Tokyo, Japan) から購入した。

## 統計

多群の比較にはSteel's testを用いた。ペアでない2群比較にはMann–Whitney *U*-testを、ペアの2群比較にはWilcoxon's signed-rank testを用いた。2群の累積分布曲線の比較にはKolmogorov–Smirnov testを用いた。任意の2つの項目の相関の評価にはSpearman rank correlation coefficientを用いた。2つの相関係数の比較にはZ-test for two correlation coefficientsを用いた。全てのデータは平均±標準誤差 (SEM) で表記し、全ての解析において、 $P < 0.05$  を統計学的有意差とした。

## 【結果】

### BicucullineはSLEsを誘導する

てんかん発作は興奮性と抑制性の神経伝達のバランスが崩壊することで生じると考えられている。中枢神経系では $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) が主な抑制性神経伝達物質として知られており、GABA作動性抑制性伝達の機能異常や減弱は、動物てんかんモデルおよびヒトてんかん患者で報告されている (Ribak et al., 1979; Olsen et al., 1985; McDonald et al., 1991; Henry et al., 1993)。そこでまず私は、GABA<sub>A</sub>受容体アンタゴニストである、てんかん誘発剤 bicuculline を海馬急性スライス標本に処置し、局所集合電位記録により電位変化を記録した。Mg<sup>2+</sup>-free 条件下で bicuculline (10  $\mu$ M) を処置したところ、CA1領域においてSLEsが認められた (図1A)。観察されたSLEsは、既報 (Anderson et al., 1986; Nyikos et al., 2003) と同様、同期的に電位変化が発生し、後発射が10秒以上持続し、その同期的電位変化が反復して起こるという特徴を示した。

### Bicucullineは同期的なCa<sup>2+</sup>流入を引き起こす

CA1領域においてルーズセルアタッチ記録とCa<sup>2+</sup>イメージングの同時記録を実施し、Mg<sup>2+</sup>-free条件下 bicuculline (10  $\mu$ M) 処置による活動を観察したところ、一過적および持続的な細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇 (一過的: 数秒でベースラインに戻る反応、持続的: 10秒以上続く反応) が、それぞれスパイクおよび持続的なバースト発火に対応することが認められた (図1B)。既報から (Nyikos et al., 2003)、単一細胞での持続的なバースト活動は、細胞外記録におけるSLEsと考えられる。続いて多細胞での活動パターンを明らかにするため、fMCIによりCA1細胞の活動を測定した (図1C)。本研究において1スライス標本あたり平均129.9  $\pm$  2.7細胞を検出し ( $n = 64$  slices)、平均の蛍光退色率は1.89  $\pm$  0.13%/minであった ( $n = 9$  slices)。Mg<sup>2+</sup>-free 条件下 bicuculline (10  $\mu$ M) の処置により、CA1領域では同期的なCa<sup>2+</sup>流入が誘発された。このCa<sup>2+</sup>流入は持続的な細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇を伴い、反復して認められた (図1D)。一過的Ca<sup>2+</sup>活動では5–20%の $\Delta F/F$ の変化を伴ったが (図1Dの青色)、持続的な同期的Ca<sup>2+</sup>流入では30%以

上の大きな $\Delta F/F$ の変化が認められた (図1Dの赤色)。9スライス標本で記録された113同期イベントについて解析したところ、それぞれのイベントで $99.988 \pm 0.009\%$ の神経細胞が活動した (1273 neurons)。同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入のイベント間隔および $\text{Ca}^{2+}$ 流入持続時間は、SLEsのイベント間隔および持続時間と同程度であった (interval of SLEs,  $136.9 \pm 13.9$  s, 7 slices; interval of  $\text{Ca}^{2+}$  influx,  $95.2 \pm 17.2$  s, 9 slices,  $P = 0.0907$ ,  $U = 15$ , Mann–Whitney test; duration of SLEs,  $26.6 \pm 3.6$  s, 7 slices; duration of  $\text{Ca}^{2+}$  influx,  $20.0 \pm 2.4$  s, 9 slices,  $P = 0.2509$ ,  $U = 20$ , Mann–Whitney test)。以上から、CA1領域におけるbicuculline誘発同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入は細胞外記録におけるSLEsを反映することが示された。

### 他のてんかん誘発剤も同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入およびSLEsを引き起こす

同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入は他のてんかん誘発剤においても共通の表現型であるか検証するため、*in vivo*てんかんモデルで用いられる、作用メカニズムの異なる3つの誘発剤、4-AP ( $\text{K}^+$  channel blocker)、pentetrazol ( $\text{GABA}_A$  receptor antagonist)、pilocarpine (muscarinic receptor agonist) の作用を検証した (Turski et al., 1983; Diehl et al., 1984; Cramer et al., 1994)。どの薬剤も $\text{Mg}^{2+}$ -free条件下、CA1領域で同期的な $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こした (図2A–D)。図2E–Hで、25分間で発生した同期イベントについて種々の評価指標 (イベント回数、イベント間隔、イベント持続時間、最初のイベントまでの潜時) の結果を示した。これらの結果から、作用メカニズムの異なる複数のてんかん誘発剤でも、bicuculline同様、同期的な $\text{Ca}^{2+}$ 流入が共通の表現型であることが示された。

上記の実験で使用した、 $\text{Mg}^{2+}$ -free条件とてんかん誘発剤処置の併用は、SLEs誘導条件としてはかなり激しい条件である。そこで、上記で認められた同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入が、てんかんの表現型として妥当であるかを検証するため、 $\text{Mg}^{2+}$ -free aCSF単独およびbicuculline単独処置でも同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入が認められるか検討した。 $\text{Mg}^{2+}$ -free aCSF単独処置では40分間記録しても同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入は観察されなかったが、bicuculline単独処置 (normal aCSF条件下) では全てのスライス標本で同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入が認められた (data not shown, 5 slices each)。イオン操作は

てんかん誘発剤に比べてSLEsを引き起こすまでの時間が長くかかるため (Karlocai et al., 2014)、Mg<sup>2+</sup>-free aCSF単独で同期的Ca<sup>2+</sup>流入が認められなかったのはMg<sup>2+</sup>-free aCSF処置時間が十分でなかった可能性が考えられる。しかし、少なくともbicuculline単独処置で同期的Ca<sup>2+</sup>流入が認められたことから、併用条件で認められる同期的Ca<sup>2+</sup>流入がてんかんと関連する表現型として一定の妥当性はあると判断した。

**Phenytoinおよびflupirtineは同期活動のCa<sup>2+</sup>流入量を減少させ、一方でethosuximideは同期活動持続時間を延長させる**

抗てんかん薬が同期的Ca<sup>2+</sup>流入に影響を与えると推測し、phenytoin (電位依存性Na<sup>+</sup> channel阻害薬)、flupirtine (Kv7.2/7.3 channel開口薬、抗てんかん薬retigabineの類縁体)、ethosuximide (T-type Ca<sup>2+</sup> channel阻害薬) の3種類の抗てんかん薬について、bicuculline誘発同期的Ca<sup>2+</sup>流入に対する作用を検証した。同期的Ca<sup>2+</sup>流入の誘発条件として、bicuculline単独処置では同期的Ca<sup>2+</sup>流入の発生頻度が併用条件 (Mg<sup>2+</sup>-free条件下bicuculline処置) と比べて低かったため、短時間で評価を実施し、蛍光退色を最小限に抑えるために併用条件を採用した。最初に、薬剤群間での比較を行い、神経ネットワーク全体の活動に抗てんかん薬が与える影響を単一細胞レベルで解析した (図3A)。この評価では、局所集合電位記録など多細胞の活動の総和を解析する従来の手法と比較して、多細胞の活動パターンの分布を解析することができる。図3B-EではCA1領域において記録した全細胞のCa<sup>2+</sup>流入および代表例の3細胞の波形を示している。Mg<sup>2+</sup>-free条件下bicuculline処置によって最初に誘発される同期的Ca<sup>2+</sup>流入について、ピーク、AUC、持続時間をaCSF群と抗てんかん薬処置群で比較したところ違いは認められなかった (data not shown)。1回目の同期的Ca<sup>2+</sup>流入を確認した後、抗てんかん薬を処置し、15分間のbicuculline誘発同期的Ca<sup>2+</sup>流入に対する薬効を評価した。同期的Ca<sup>2+</sup>流入のピークおよびAUCを、個々の細胞について散布図としてプロットした (図4A)。色分けはスライス標本の違いを示す。コントロール群と比較して、phenytoin、flupirtine処置群は、図の下側に分布し、Ca<sup>2+</sup>応答のAUCを減少させることが認められた。EthosuximideではAUCが

高い値へ分散する傾向が認められた。これらのデータを図4Bに纏め、Ca<sup>2+</sup>応答のピーク、AUCの累積分布を示した (aCSF, 1273 cells from 9 slices; phenytoin, 1123 cells from 8 slices; flupirtine, 1070 cells from 8 slices; ethosuximide, 1118 cells from 8 slices)。ピークおよびAUC共に、phenytoinおよびflupirtineはコントロールと比較して左側へシフトさせた (Kolmogorov–Smirnov test: control vs. phenytoin in peaks,  $D = 0.66$ ,  $P < 0.0001$ ; control vs. flupirtine in peaks,  $D = 0.61$ ,  $P < 0.0001$ ; control vs. phenytoin in AUCs,  $D = 0.80$ ,  $P < 0.0001$ ; control vs. flupirtine in AUCs,  $D = 0.83$ ,  $P < 0.0001$ )。Ethosuximideでは、AUCの分布はコントロールに比べ右にシフトし、ピークの分布をわずかに変化させた (Kolmogorov–Smirnov test: control vs. ethosuximide in peaks,  $D = 0.062$ ,  $P = 0.021$ ; control vs. ethosuximide in AUCs,  $D = 0.44$ ,  $P < 0.0001$ )。次に、これらの結果を定量評価した。個々の同期イベントにおける作用評価として、1スライス標本あたりのピーク、AUC、持続時間の平均値で解析し、評価時間中の総合的な作用評価として、同期回数、総AUC、同期イベント中の活動細胞の割合で解析した (図5)。Phenytoinおよびflupirtineはピークおよび持続時間を減少させ (Steel’s test: control vs. phenytoin peak,  $P = 0.0148$ ; control vs. flupirtine peak,  $P = 0.0081$ ; control vs. phenytoin duration,  $P = 0.0043$ ; control vs. flupirtine duration,  $P = 0.0081$ ; 図5A、C)、AUCを顕著に減少させた (Steel’s test: control vs. phenytoin,  $P = 0.0022$ ; control vs. flupirtine,  $P = 0.0016$ ; 図5B)。Phenytoinは同期回数を増加させたが (Steel’s test: control vs. phenytoin,  $P = 0.0331$ ; 図5D)、全体としてはphenytoin、flupirtine共に総AUC、すなわち評価時間中に発生した同期イベント全てを介して流入したCa<sup>2+</sup>の総量を有意に減少させた (Steel’s test: control vs. phenytoin,  $P = 0.0437$ ; control vs. flupirtine,  $P = 0.0016$ ; 図5E)。一方で、ethosuximideは、ピーク、同期回数および総AUCを変化させなかったものの、持続時間を有意に延長させ、AUCを増加させる傾向があった (Steel’s test: control vs. ethosuximide duration,  $P = 0.0437$ ; control vs. ethosuximide AUC,  $P = 0.0894$ ; control vs. ethosuximide peak,  $P = 0.9952$ ; control vs. ethosuximide number of events,  $P = 0.0859$ ; control vs. ethosuximide total AUC,  $P > 0.9999$ ; 図5A–E)。どの薬剤も同期活動そのものを消失させることはなく、興味深いことに、各薬剤群における同期イベント中の活動細胞の割合はaCSF群と

比較して違いはなかった (Steel's test: control vs. phenytoin,  $P = 0.3302$ ; control vs. flupirtine,  $P = 0.9638$ ; control vs. ethosuximide,  $P = 0.3814$ ; 図5F)。これらの結果から、phenytoinおよびflupirtineは同期活動自体を消失させるのではなく、同期イベントにおける $\text{Ca}^{2+}$ 流入量を減少させること、一方でethosuximideは同期イベントの持続時間を延長させることが示された。

### 個々の細胞におけるphenytoinの薬効は、同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入のピークの大きさに依存する

上記から、抗てんかん薬は神経ネットワークにおける多細胞の活動パターンに対し、多様な作用を示すことが明らかとなった。しかし一方で、これらの薬剤が個々の細胞に与える影響（薬剤処置前後の変化）や、薬剤に対する感度の高い細胞集団の有無については不明である。この疑問を明らかとするため、薬剤処置前2-10分間と薬剤処置後10分間において、個々の細胞の、同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入の変化を同一細胞で評価した（図6A、B）。ここでは図5の評価項目のうち、蛍光退色による影響が小さいと思われた、同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入のピークを用いて解析した。図6Cでは、個々の細胞について、薬剤処置前の同期的 $\text{Ca}^{2+}$ 流入のピーク平均値をx軸、薬剤処置後のピーク平均値を処置前のピーク平均値に対する比で表した値をy軸にプロットした (aCSF, 1119 cells from 8 slices; phenytoin, 1143 cells from 8 slices; flupirtine, 1081 cells from 8 slices; ethosuximide, 1199 cells from 9 slices)。色分けはスライス標本の違いを示す。処置前のピークと、処置後のピーク/処置前のピークは全ての薬剤群で負の相関を示した (Spearman rank correlation coefficient  $R$ : aCSF,  $R = 0.34$ ,  $P < 0.0001$ ; phenytoin,  $R = 0.44$ ,  $P < 0.0001$ ; flupirtine,  $R = 0.18$ ,  $P < 0.0001$ ; ethosuximide,  $R = 0.36$ ,  $P < 0.0001$ )。Phenytoinの相関係数はコントロールおよびflupirtineと比較して有意に低く、大きな $\text{Ca}^{2+}$ 応答を示す細胞ほどphenytoinへの感受性が高いことが示された (Z-test for two correlation coefficients: control vs. phenytoin,  $Z = 2.99$ ,  $P = 0.00275$ ; phenytoin vs. flupirtine,  $Z = 7.00$ ,  $P < 0.0001$ )。Flupirtineの相関係数はコントロールと比べてゼロに近い値となった (control vs. flupirtine,  $Z = 4.01$ ,  $P < 0.0001$ )。コントロールとethosuximideの間では、相関係数に違いは認められなかった (control vs. ethosuximide,  $Z = 0.538$ ,  $P = 0.590$ )。

## PhenytoinおよびflupirtineはSLEsの持続時間を短縮させ、ethosuximideは延長させる

最後に、CA1領域の局所集合電位記録において、抗てんかん薬処置前後10分間の記録を比較し、SLEsに対する薬剤の作用を評価した（図7A）。PhenytoinとflupirtineはSLEsの持続時間を有意に短縮させたが（Wilcoxon's signed-rank test: control vs. phenytoin,  $P = 0.0313$ ; control vs. flupirtine,  $P = 0.0313$ , 図7B、C）、SLEsを完全に消失させることはなく、SLEsのイベント回数を増加させた（Wilcoxon's signed-rank test: control vs. phenytoin,  $P = 0.0313$ ; control vs. flupirtine,  $P = 0.0313$ ; 図7B、D）。一方、ethosuximideはSLEsの持続時間を有意に延長させ、イベント回数を変化させなかった（Wilcoxon's signed-rank test: control vs. ethosuximide for duration,  $P = 0.0313$ ; control vs. ethosuximide for number of events,  $P > 0.9999$ ; 図7B–D）。

## 【考察】

本研究において、 $Mg^{2+}$ -free条件下bicuculline処置海馬スライスにおける神経活動をfMCIにより観察し、SLEsにおける個々の細胞の挙動を多細胞で評価したところ、SLEsに伴い同期的な $Ca^{2+}$ 流入が反復して起こることが認められた。そこで、SLEsにおける多細胞の活動パターンに対する抗てんかん薬の作用を単一細胞レベルで明らかにするため、この同期的な $Ca^{2+}$ 流入を*in vitro*てんかんモデルの表現型と捉え、それらに対する抗てんかん薬の作用を単一細胞レベルで解析した。その結果、抗てんかん薬であるphenytoin、flupirtine、ethosuximideが*in vitro*てんかんモデルにおいて多様な作用を示すことを明らかとした。

まず、bicucullineが同期的な $Ca^{2+}$ 流入を引き起こすこと、そしてこの同期的 $Ca^{2+}$ 流入はSLEsを反映することを確認した。4-AP、pentetrazol、pilocarpineといった、てんかんモデルとして*in vitro*でSLEsを引き起こすと報告されている他のてんかん誘発剤も (Piredda et al., 1986; Avoli et al., 1993; Rutecki & Yang, 1998)、bicuculline同様、同期的 $Ca^{2+}$ 流入を引き起こした。また、これら全ての薬剤は $Mg^{2+}$ -free条件下の細胞外記録によりSLEsを引き起こすことが観察された (data not shown: 4-AP, 3 slices; pentetrazol, 2 slices; pilocarpine, 2 slices)。従って過去の報告と一致して、てんかん誘発剤による同期的な $Ca^{2+}$ 流入がてんかんモデルとして*in vitro*において重要な表現型であることを示した。

次に、作用メカニズムの異なる3つの抗てんかん薬 (phenytoin、flupirtine、ethosuximide) がbicuculline誘発同期的 $Ca^{2+}$ 流入およびSLEsに与える影響を検証した。同期的 $Ca^{2+}$ 流入をてんかん*in vitro*表現型と捉えると、抗てんかん作用の理想像は同期的 $Ca^{2+}$ 流入およびSLEsを消失あるいは減弱させることであると考えられる。しかし、興味深いことに、どの薬剤も同期的 $Ca^{2+}$ 流入のイベントそのものを消失させることはなく、同期的 $Ca^{2+}$ 流入における活動細胞の割合さえ変化させなかった。同期的イベントを消失させなかった一方で、Phenyroinとflurpirtineは同期的 $Ca^{2+}$ 流入のピーク、AUC、持続時間を減少させ、特にAUCの減少は顕著であった。これらの結果は個々の細胞の活動分布を示した結果でも一致しており、phenytoinおよびflupirtineはコントロールと比較して個々の細胞におけるピークとAUCの累積分布を

左にシフトさせた。同様の結果は局所集合電位記録でも認められ、phenytoinとflupirtineはSLEsの持続時間を短縮させた。これらの結果は、phenytoinとflupirtineがSLEsの持続部分を抑制することを示している。両薬剤はこれまでにいくつかの*in vitro*てんかんモデルでもSLEsを抑制することが報告されている(Armand et al., 1999, 2000; Dost & Rundfeldt, 2000)。SLEsの持続部分にのみ作用する理由として、これら薬剤の特性が関係していると考えられる。Phenytoinは電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルに作用するが、静止状態のチャンネルには親和性が低い一方、不活性化状態のチャンネルに高い親和性を示し、その状態を安定化するという、state-dependent effectを有する (Mantegazza et al., 2010)。このことから、SLEsの初期にはチャンネルが静止状態から開口状態へシフトするチャンネルが多いため、不活性化状態のチャンネルが少なく作用しにくいと思われる一方、同期的Ca<sup>2+</sup>流入の持続的部分に相当するSLEs後発射においては、不活性化状態のチャンネルが増え、phenytoinがチャンネルに結合しやすいと考えられる。FlupirtineはKv7.2/7.3チャンネル活性を亢進することが知られている。Kv7チャンネルは、活動電位発生後50–200 ms続く神経細胞の興奮性を制御する、medium after-hyperpolarizationに関わっており (Storm, 1989; Gu et al., 2005)、この性質により薬剤の作用動態が遅くなっていると考えられる。実際、flupirtineの類縁体であるretigabineは、持続した脱分極刺激で誘発させた高頻度もしくはバースト発火を減弱させるものの、単発の活動電位には影響を与えないことが報告されている (Yue & Yaari, 2004)。以上から、phenytoinおよびflupirtineは活動細胞の割合、すなわち同期活動自体は消失させず、SLEsの持続部分を抑制すると考えられる。

PhenytoinとflupirtineはSLEsの持続部分を抑制する点では類似した作用を示したが、一方、同期イベント回数と細胞感受性の点では違いがあることが明らかとなった。まず同期イベント回数では、phenytoinは同期的Ca<sup>2+</sup>流入の回数およびSLEsの回数の両方を増加させたが、flupirtineはSLEsの回数を幾分増加させたものの、同期的Ca<sup>2+</sup>流入の回数は増加させなかった。この結果には、bicuculline誘発同期イベントの性質と、phenytoinおよびflupirtineの薬剤プロファイルの違いという、2つの要因が関与していると思われる。1つ目の要因であるbicuculline誘発同期イベント (図3BのaCSF群) では、或る同期イベントのAUCは、次の同期イベント

までの休止期間と正の相関を示した (Spearman rank correlation coefficient:  $R = 0.68$ ,  $P < 0.0001$ , 113 events, 9 slices)。これはAUCが小さいほど同期イベントが頻回生じることを意味し、抗てんかん薬が同期イベント休止期間の神経活動を抑制しない限り、SLEsの持続部分の抑制は同期活動の増加を促進すると考えられる。2つ目の要因として、phenytoinは、同期イベント休止期ではSLEsに比べて神経発火頻度がかなり低く大部分のNa<sup>+</sup>チャンネルが静止状態であることから、チャンネルへの作用は弱いと考えられる。従って、これらの要因から、本研究においてphenytoinはAUCを抑制したが、同時にイベント回数を増加させたと考えられる。一方、flupirtineはKv7.2/7.3チャンネルの活性化により静止膜電位を過分極させることが知られている (Wladyka & Kunze, 2006)。休止期間の膜電位の安定化は、AUC抑制によるイベント回数の増加促進作用を相殺すると思われる。実際、flupirtineはイベント回数に対してわずかな作用しか示さなかった。Phenytoinはイベント回数を増やしたものの、記録時間全体における作用を表す総AUC、すなわち同期イベントの総Ca<sup>2+</sup>流入量を、phenytoin、flupirtine共に有意に減少させたことから、同期的Ca<sup>2+</sup>流入の持続部分の抑制が、両薬剤の抗てんかん作用に重要であると考えられる。

抗てんかん薬処置前後の解析により、同期回数の違いに加えて、phenytoinはflupirtineと異なり、個々の細胞の同期的Ca<sup>2+</sup>流入のピークの大きさに依存して薬効が変動することが明らかとなった。大きなCa<sup>2+</sup>ピークを伴う応答は蛍光退色を促進することから、この解析ではコントロール群においても、薬剤処置前のピークと処置後/処置前のピーク比は負の相関を示すと考えられる。Phenytoinはコントロールと比較して、より負の相関を示し、大きなCa<sup>2+</sup>応答を示す細胞に強い作用を発揮することが明らかとなった。これは、上記で述べたphenytoinのstate-dependent effectにより、発火頻度の高い細胞により強く作用を示したためだと考えられる。Phenytoinと異なり、flupirtineの相関係数はコントロールと比較して弱くなった。これは、flupirtineの作用がstate-dependentではないこと、またflupirtineにより同期的Ca<sup>2+</sup>流入が減弱したためコントロールと比べて蛍光退色の影響が小さかったことによると考えられる。

Phenytoin、flupirtineと異なり、ethosuximideでは同期的Ca<sup>2+</sup>流入およびSLEsの持続時間が有意に延長し、AUCが増加する傾向が認められた。この結果と一致して、ethosuximideではコントロールと比較して、個々の細胞のAUCの累積分布が右にシフトした。EthosuximideがAUCや持続時間を減少させなかった理由として次のことが考えられる。Ethosuximideは視床皮質中継神経細胞のT-type Ca<sup>2+</sup>電流を抑制することで欠神発作に効果がある一方、強直間代発作の患者に投与すると悪化させる場合があることが知られている (Perucca et al., 1998)。高濃度ではあるものの、ethosuximideは、*in vitro*側頭葉てんかんモデルにおいても後発射発生を促進することが報告されている (Ohno & Higashima, 2002)。さらに、臨床用量に対応する濃度でGタンパク質活性化内向き整流性K<sup>+</sup>チャネルをethosuximideは阻害することから、Gタンパク質活性化内向き整流性K<sup>+</sup>チャネルへの作用が強直間代発作患者の症状悪化へ関わる可能性が提唱されている (Kobayashi et al., 2009)。これらのことから、今回観察されたAUCの増加や持続時間の延長はethosuximideの副作用を反映している可能性がある。

本研究では生後6–8日齢の動物を使用した。発達期における脳の成熟程度は日齢に依存するため、使用する日齢は神経ネットワーク機能を評価する上で重要な点となる。例えば、GABAは成体脳では主な抑制性神経伝達物質であるが、生後数日の早期には、Cl<sup>-</sup>トランスポーター発現が未成熟なため細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が高く、Cl<sup>-</sup>透過性GABA作動性神経伝達は興奮作用を示し、その結果、GABA<sub>A</sub>受容体の活性化は神経細胞膜の脱分極を引き起こすことが知られている (Cherubini et al., 1991)。またこの時期には、自発的な同期的神経活動がバースト発火する、giant depolarizing potentialがしばしば観察されることが知られている (Ben-Ari et al., 1989, 2007)。さらに発達期ではGABAによる興奮がてんかん発作活動に関与していることも報告されている (Dzhala & Staley, 2003)。一方fMCIでは、成体組織を用いるとCa<sup>2+</sup>指示薬の取り込みが困難となるため、通常幼若期の組織を用いる (Namiki & Ikegaya, 2009)。上記のgiant depolarizing potentialやてんかん様活動は、GABA<sub>A</sub>受容体antagonistであるbicucullineで抑制されるが、本研究の同期的神経活動はbicucullineで誘発されたため、今回使用した日齢では少なくともGABAは抑制性に作用していると思われる。従って本研究では、神経ネッ

トワークの成熟性と、実験の実現性を両立することができたと考える。

本研究では、bicucullineを用いてGABA性神経伝達を阻害した条件で抗てんかん薬の作用評価を実施した。一方、GABA<sub>A</sub>受容体が過剰に活性化された条件では成体動物でもGABAは興奮性に作用することから (Staley et al., 1995; Taira et al., 1997)、GABA性入力がSLEsの後発射を促進するという報告がある (Köhling et al., 2000; Fujiwara-Tsukamoto et al., 2003, 2006)。今後、4-APやpilocarpineなど他のてんかん誘発剤を用いた検討や、低Ca<sup>2+</sup>、高K<sup>+</sup>、電気刺激など他の*in vitro*てんかんモデルを用いて評価を行うことで、抗てんかん薬のより正確なメカニズムの解明に繋がると考える。

結論として、本研究ではfMCIを用いて、ラット海馬CA1領域におけるbicuculline誘発同期的Ca<sup>2+</sup>流入に対する、抗てんかん薬の多様な作用を示した。Phenytoinおよびflupirtineは同期的Ca<sup>2+</sup>流入のAUC、ピーク、持続時間を減少させ、SLEsの持続時間を短縮させたが、同期イベント自体を消失させることはなく、イベント中の活動細胞の割合も変化させなかった。Ethosuximideは同期的なCa<sup>2+</sup>流入およびSLEsの持続時間を延長させた。さらに、個々の細胞において、同期的Ca<sup>2+</sup>流入のピークに対するphenytoinの抑制作用の大きさは、それぞれの細胞の同期的Ca<sup>2+</sup>流入のピークの大きさに関連することを明らかとした。

今回発見した薬剤特性は、従来法である単一細胞記録や局所集合電位測定といった電気生理学的手法では見出すことができなかった特徴である。臨床で抗てんかん作用を示すphenytoinやflupirtineが、同期イベント自体の消失ではなく、同期的Ca<sup>2+</sup>流入の抑制によって効果を発揮することは興味深い。また、今後、fMCIを用いた*in vitro*薬剤スクリーニングにより、従来法では評価できない指標である同期イベント中の活動細胞の割合を減少させる薬剤を発見できれば、発作自体を消失させる薬剤や、病態の根本を回復できる薬剤の開発へ繋がると期待される。さらに、phenytoinで認められたように、てんかん活動の大きさに関連して薬効を発揮する薬剤を見出せば、異常活動を示す細胞のみをターゲットとした薬剤の開発に繋がるだろう。従って、fMCIを用いた薬剤評価による新たな薬剤プロファイルの発見は、今後の創薬に有用であると考えられる。

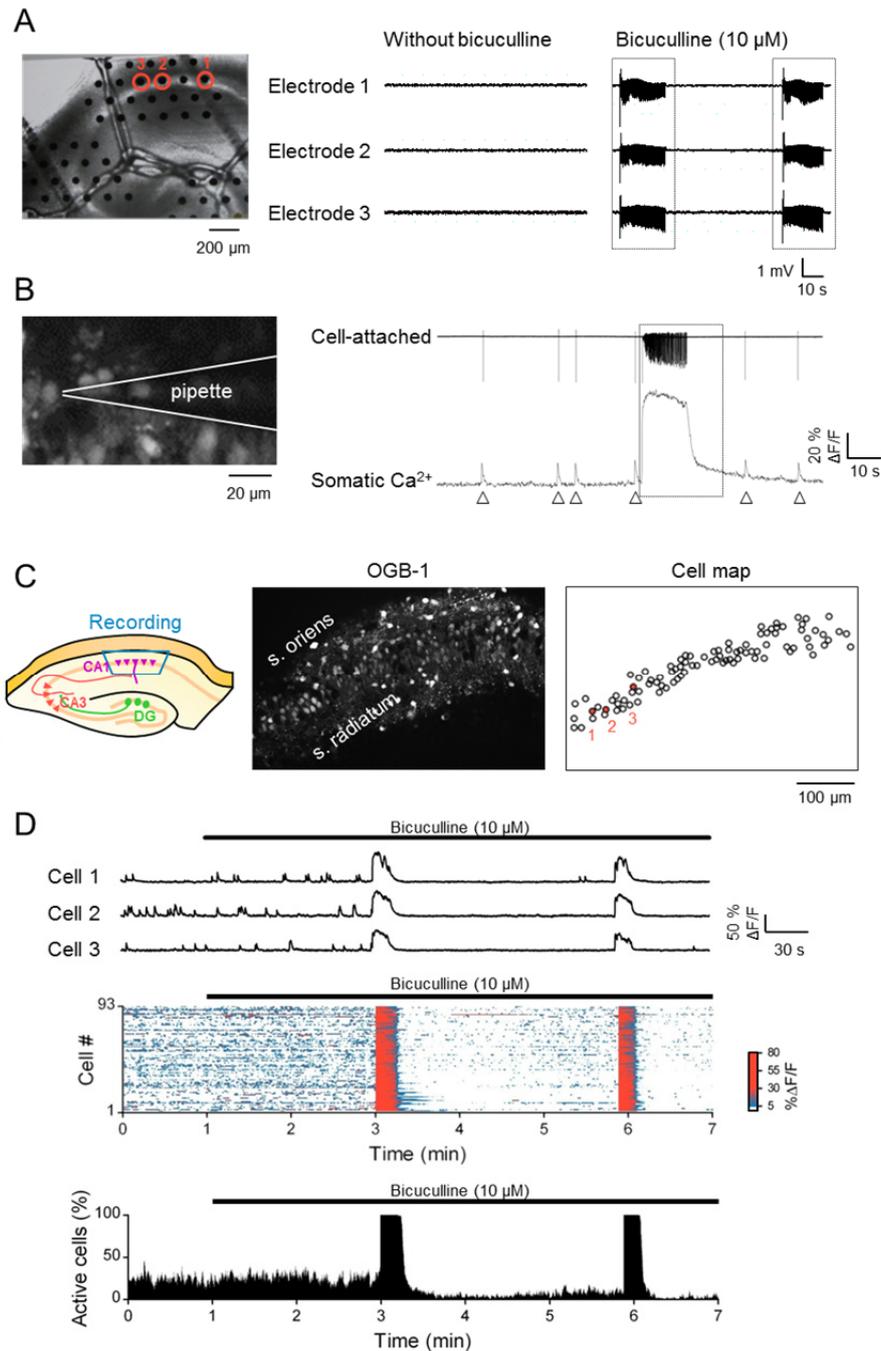


図1 Bicucullineにより SLEs と同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入が引き起こされる

(A) 海馬スライス標本における多電極の配置 (左)。Bicuculline ( $10 \mu\text{M}$ )非存在下もしくは存在下で記録した CA1 錐体細胞層の局所集合電位の代表波形 (中央および右)。Bicuculline ( $10 \mu\text{M}$ )は  $\text{Mg}^{2+}$ -free 条件下で SLEs を引き起こした (右の破線部分)。

- (B) OGB-1 を取り込ませたスライス標本 CA1 領域の共焦点像 (左)。ルーズセルアタッチ記録と  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの同時記録 (右)。スパイクおよびバーストにより、細胞体においてそれぞれ一過的 (矢頭) および持続的 (破線部分) な  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が誘発された。
- (C) 海馬スライス標本 CA1 領域の神経活動を調べるための  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの実験デザイン (左)。OGB-1 を取り込ませたスライス標本の共焦点イメージ像 (中央)。解析した 93 個の神経細胞の配置図 (右)。図中に赤丸で示した代表例 3 細胞の蛍光輝度変化の波形を D で示した。
- (D) CA1 領域で観察された bicuculline 誘発神経活動の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング。C で示した代表例 3 細胞の蛍光輝度変化の波形 (上)。同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ) 処置数分後から誘発され、10 秒以上持続する同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入が反復して引き起こされた。解析した全 93 細胞の自発的な  $\text{Ca}^{2+}$  活動 (中央)。カラースケールは蛍光輝度変化を示しており、bicuculline 誘発同期的活動では、赤色で示される大きな  $\text{Ca}^{2+}$  流入が起こった。解析細胞数に対する活動した細胞の割合 (下)。ほとんど全ての細胞が同期イベントで活動した。

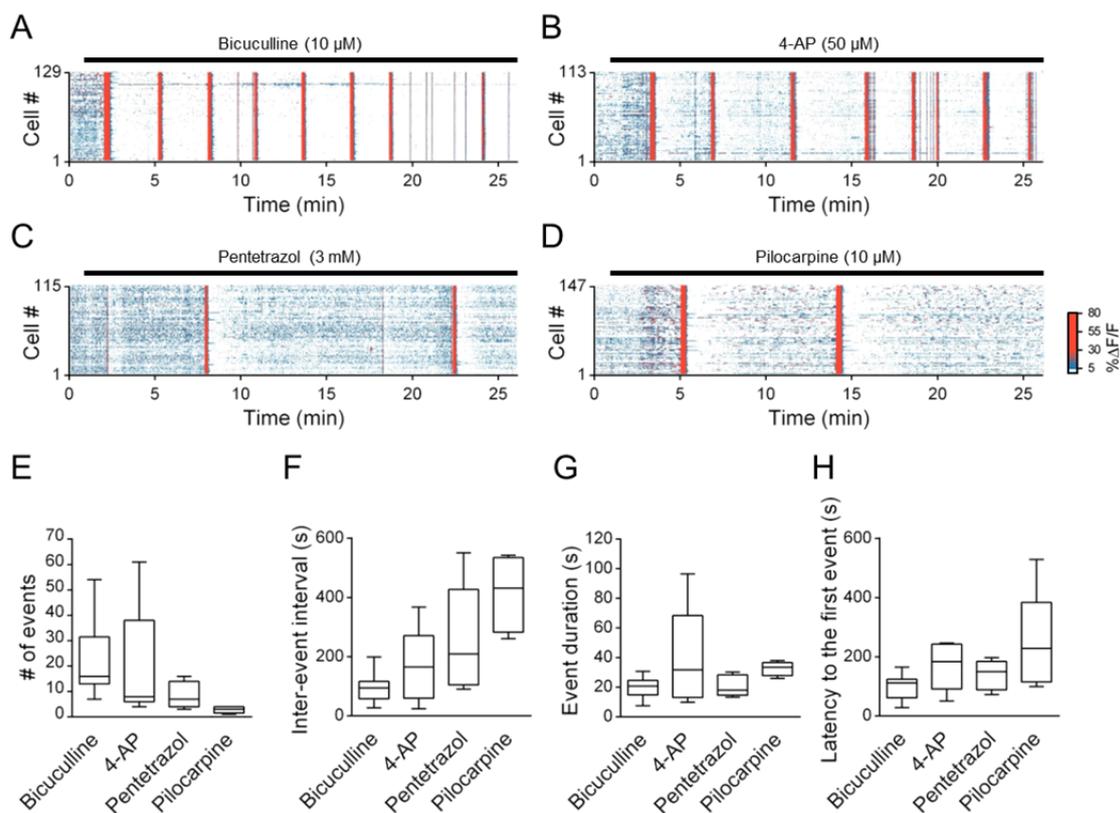


図2 種々のてんかん誘発剤は CA1 領域において同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こす

(A–D) Bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ) (A)、4-AP (50  $\mu\text{M}$ ) (B)、pentetrazol (3 mM) (C)、pilocarpine (10  $\mu\text{M}$ )

(D)処置による CA1 領域の多細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング。全てのてんかん誘発剤により同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入が反復して認められた。

(E–H) 同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入の解析結果を示した箱ひげ図。同期イベント回数 (E)、イベント間

隔 (F)、イベント持続時間 (G)、最初のイベントまでの潜時 (H)。箱は第一四分位数と第三四分位数、箱の内側の線は中央値、ひげは最小値と最大値をそれぞれ示す

(bicuculline, 9 slices; 4-AP, 5 slices; pentetrazol, 5 slices; pilocarpine, 5 slices)。同期間隔 (E)

については、記録時間中 (25 分間) に 2 回以上イベントが観察されたスライス標本を解析した (pilocarpine 以外は全スライス、pilocarpine は 4/5 slices)。

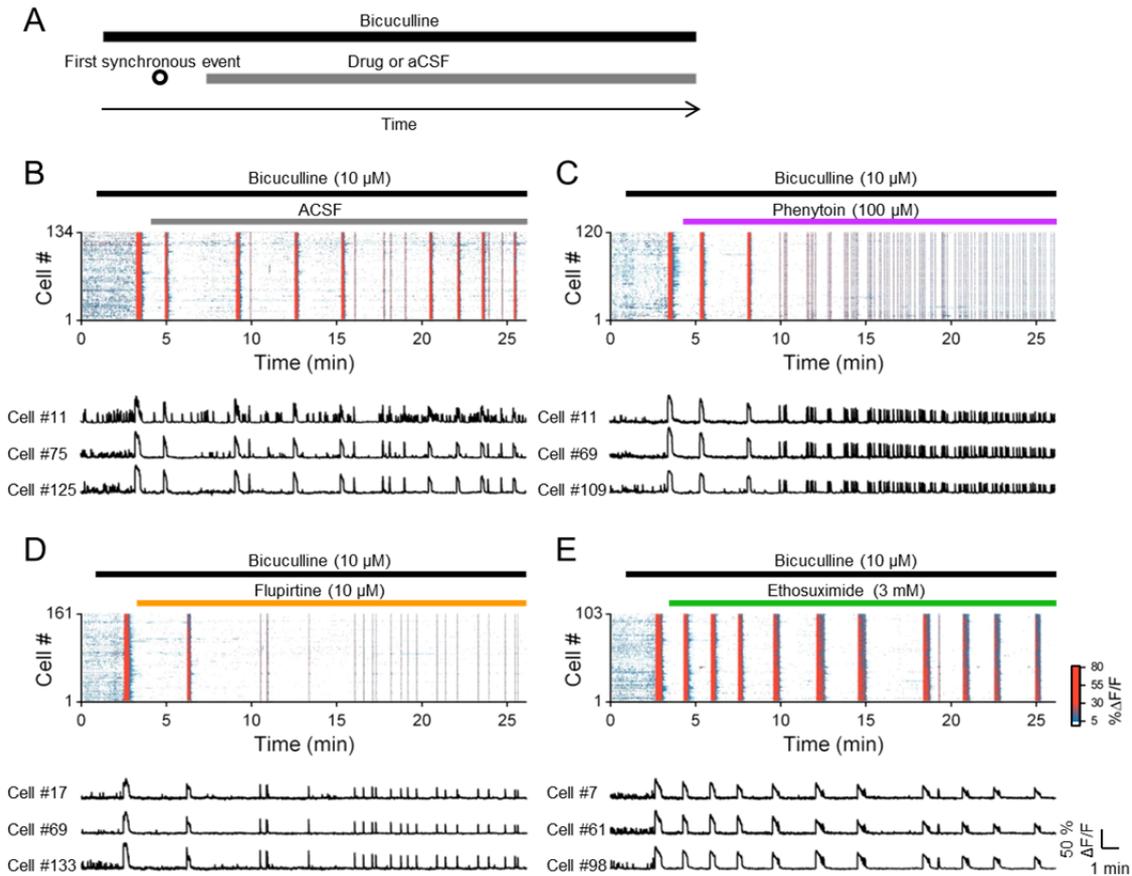


図3 多細胞の挙動を単一細胞レベルで記録することによる、bicuculline 誘発同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入に対する抗てんかん薬の評価

(A) 実験スケジュール。最初の持続的同期イベントが観察された後、抗てんかん薬もしくは aCSF (control) を処置した。薬剤処置下、bicuculline 誘発同期イベントを評価した。

(B-E) ACSF (B、上)、phenytoin (100  $\mu\text{M}$ ) (C、上)、flupirtine (10  $\mu\text{M}$ ) (D、上)、ethosuximide (3 mM) (E、上) の bicuculline 誘発同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入に対する作用。代表例 3 細胞の蛍光輝度変化の波形 (B-E、下)。

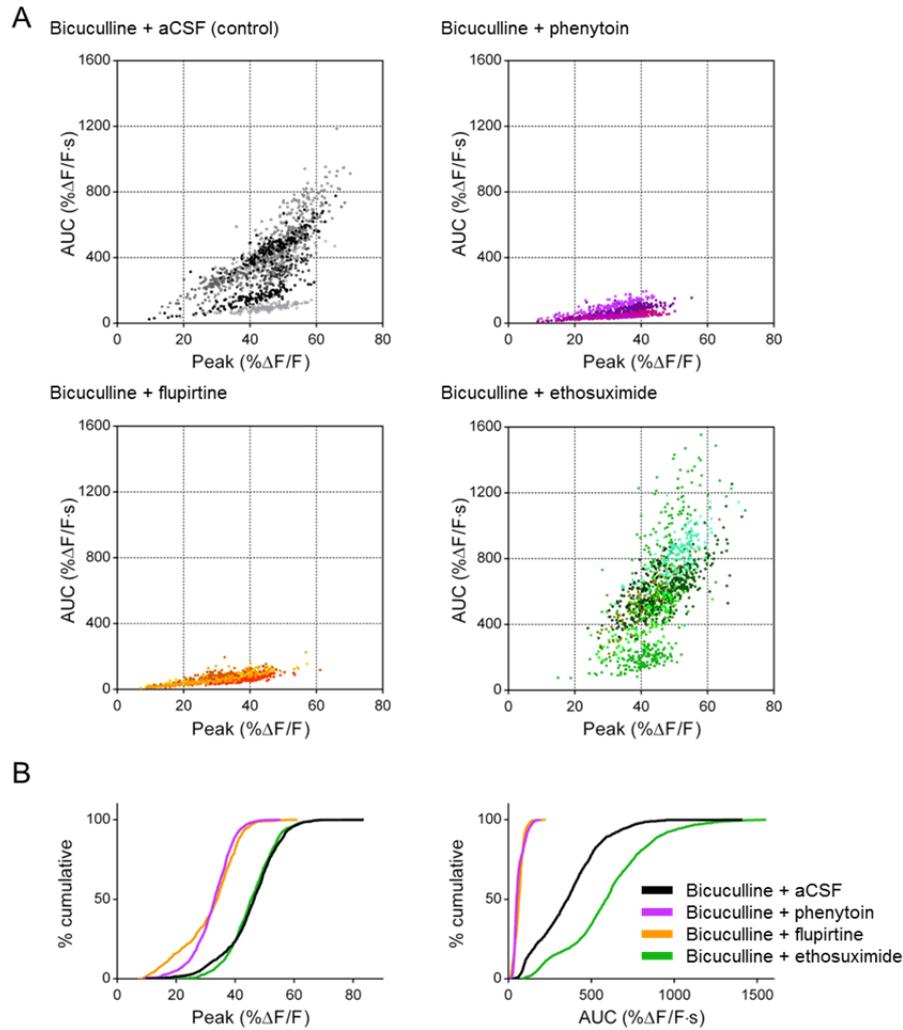


図 4 個々の細胞の bicuculline 誘発同期的  $Ca^{2+}$  流入のピーク、AUC に対する、抗てんかん薬の作用

(A) 個々の細胞について、15 分間の同期イベントのピーク平均値、AUC 平均値をプロットした。左上は control、右上は phenytoin、左下は flupirtine、右下は ethosuximide。色分けはスライス標本の違いを示す。

(B) ピーク (左)、AUC (右) について、全データを集計し累積分布として示した (control, 1273 cells from 9 slices; phenytoin, 1123 cells from 8 slices; flupirtine, 1070 cells from 8 slices; ethosuximide, 1118 cells from 8 slices)。

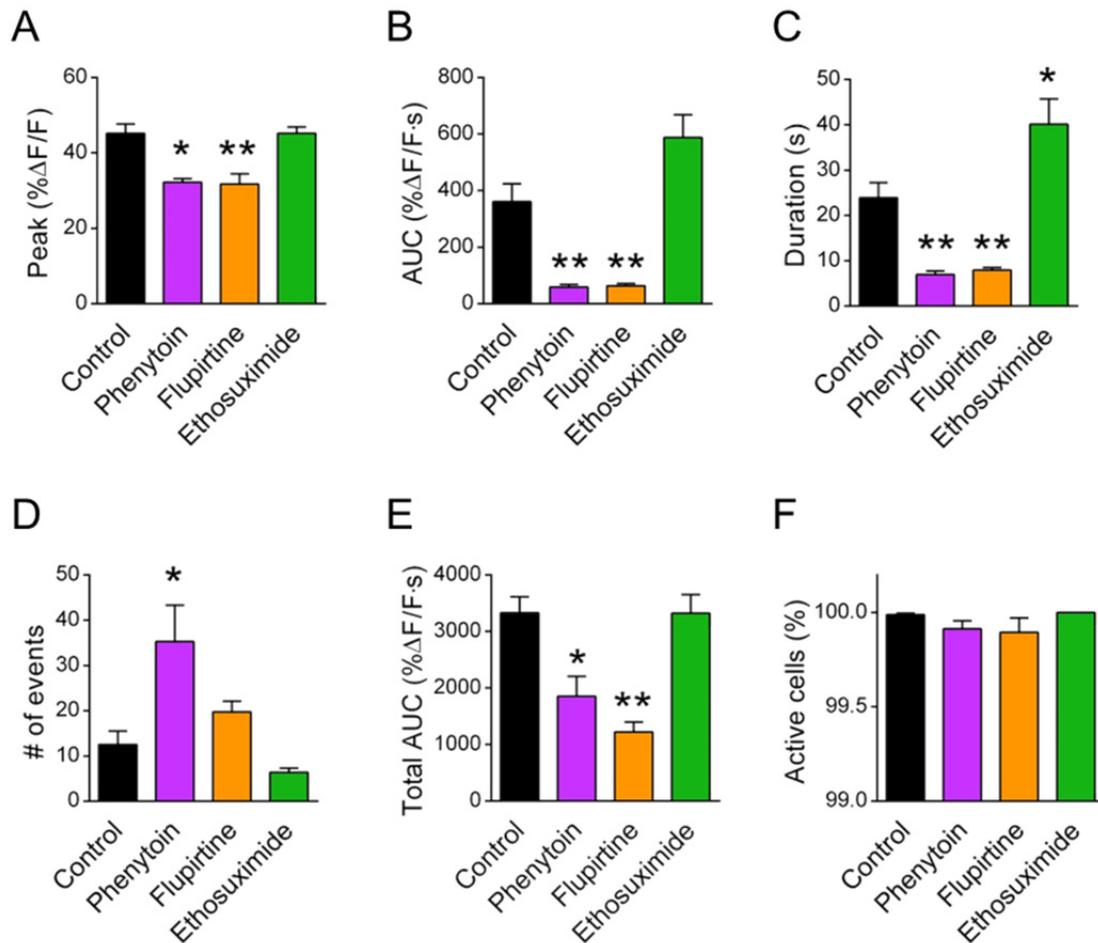


図5 Phenytoin および flupirtine は  $\text{Ca}^{2+}$  流入量を減少させるが、ethosuximide は同期イベント持続時間を延長させる

- (A) 同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入のピーク。Phenytoin および flupirtine は同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入のピークを減少させたが、ethosuximide は変化させなかった。
- (B) 同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入の AUC。Phenytoin および flupirtine は同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入の AUC を減少させたが、ethosuximide は増加させる傾向があった。
- (C) 同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入の持続時間。Phenytoin および flupirtine は同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入の持続時間を短縮させた。一方、ethosuximide は延長させた。
- (D) 記録時間中に発生した同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入のイベント回数。Phenytoin は同期イベント回数を増加させた。

(E) 同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入の総 AUC。Phenytoin および flupirtine は、記録時間中に発生した同期イベントを介して流入した総  $\text{Ca}^{2+}$  量である、総 AUC を減少させた。

(F) 同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入における活動細胞の割合。どの薬剤も同期イベント中の活動細胞の割合を変化させなかった。

\*印は control との有意差を示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Steel's test)。それぞれのデータは平均 ± 標準誤差を表記している (8 or 9 slices in each group)。

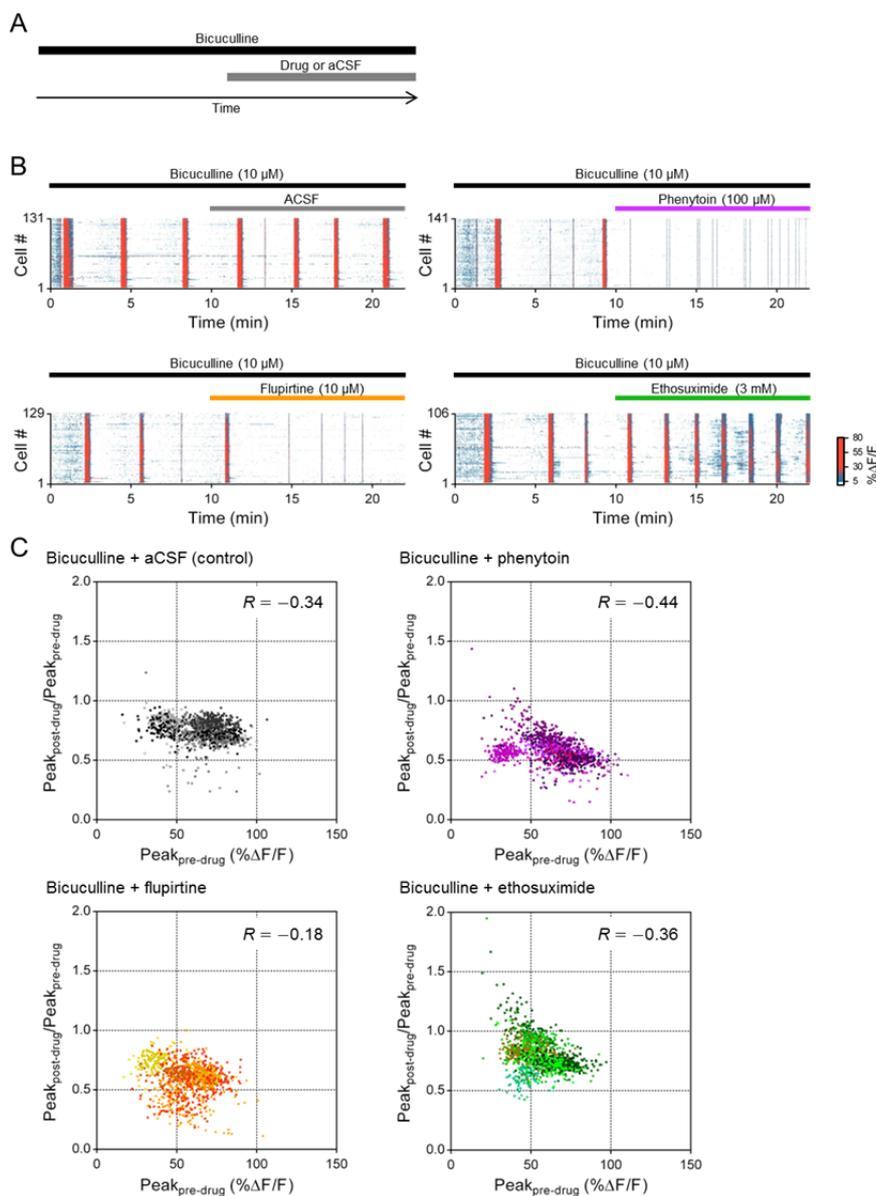


図 6 Phenytoin の同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入ピークに対する薬効は、それぞれの細胞の同期イベントピークの大きさによって変動する

(A) 実験スケジュール。同期イベントの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の平均ピークについて、抗てんかん薬処置前 2–10 分間と、処置後 10 分間評価した。

(B) ACSF (左上)、phenytoin (100  $\mu\text{M}$ ) (右上)、flupirtine (10  $\mu\text{M}$ ) (左下)、ethosuximide (3 mM) (右下) 処置前後の bicuculline 誘発同期的  $\text{Ca}^{2+}$  流入。

(C) 個々の細胞について、処置前のピーク平均値および処置後ピーク平均値/処置前ピーク平均値をプロットした (Spearman rank correlation coefficient: upper left, control,  $R = -0.34$ ,

1119 cells from 8 slices; upper right, phenytoin,  $R = -0.44$ , 1143 cells from 8 slices; lower left, flupirtine,  $R = -0.18$ , 1081 cells from 8 slices; lower right, ethosuximide,  $R = -0.36$ , 1199 cells from 9 slices)。色分けはスライス標本の違いを示す。Phenytoin の相関係数はコントロールや flupirtine と比較して有意に負の値を示した (Z-test for two correlation coefficients: control vs. phenytoin,  $Z = 2.99$ ,  $P = 0.00275$ ; phenytoin vs. flupirtine,  $Z = 7.00$ ,  $P < 0.0001$ )。これは大きな  $\text{Ca}^{2+}$  流入が起きた細胞ほど phenytoin への感受性が高いことを意味する。

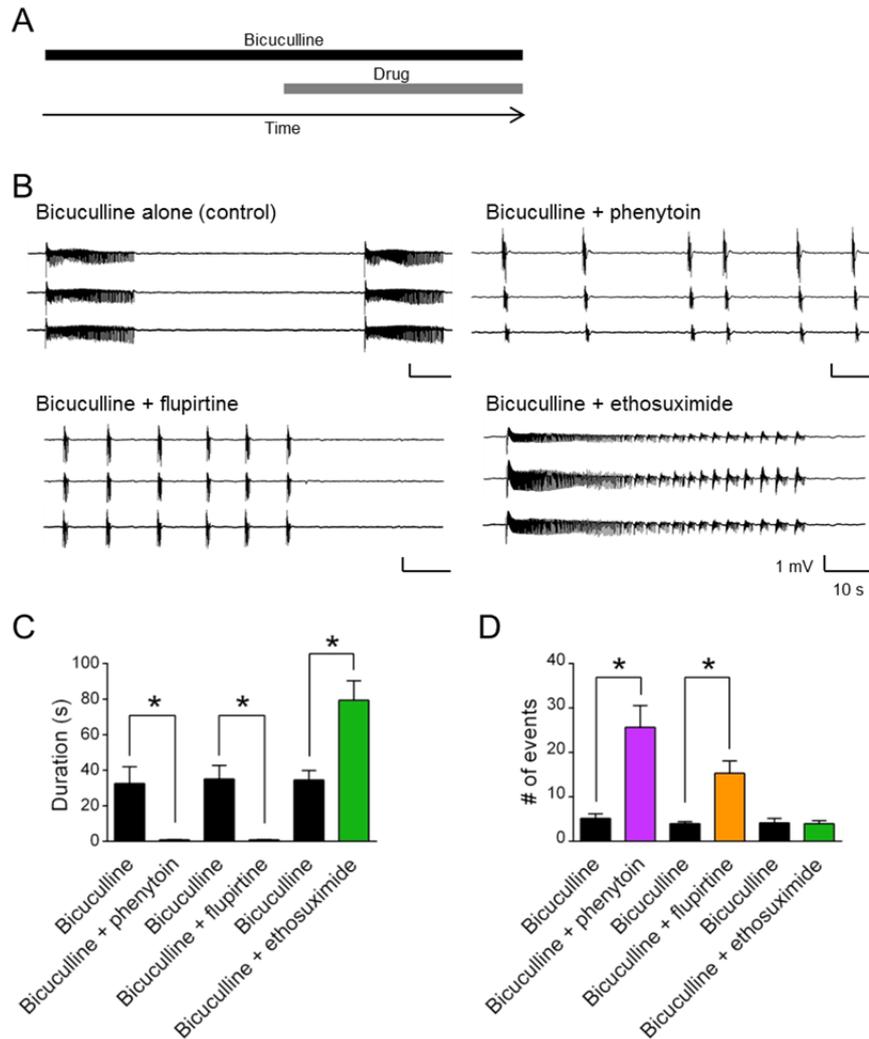


図7 Phenytoin と flupirtine は SLEs の持続時間を短縮させ、一方 ethosuximide は延長させる

(A) 局所集合電位記録の実験スケジュール。Bicuculline 誘発 SLEs が安定して観察された後、抗てんかん薬を処置した。SLEs の平均持続時間および回数は抗てんかん薬処置前後の10分間で評価した。

(B) Bicuculline 誘発 SLEs に対する抗てんかん薬の作用。Phenytoin (100  $\mu$ M) (右上)、flupirtine (10  $\mu$ M) (左下)、ethosuximide (3 mM) (右下) の処置後の局所集合電位記録の代表例を示している。抗てんかん薬処置前 (control, bicuculline alone) は左上に示す。

(C) SLEs の持続時間。Phenytoin と flupirtine は SLEs の持続時間を短縮させ、一方で ethosuximide は延長させた。

(D) SLEs のイベント回数。Phenytoin と flupirtine はイベント回数を増加させた。

\*印は control との有意差を示す (\* $P < 0.05$ , Wilcoxon's signed-rank test)。それぞれのデータは平均±標準誤差を表記している (6 slices in each group)。

## 【参考文献】

1. Albus, K., Wahab, A. & Heinemann, U. (2012) Primary afterdischarge in organotypic hippocampal slice cultures: effects of standard antiepileptic drugs. *Epilepsia*, **53**, 1928-1936.
2. Anderson, W.W., Lewis, D.V., Swartzwelder, H.S. & Wilson, W.A. (1986) Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res.*, **398**, 215-219.
3. Armand, V., Rundfeldt, C. & Heinemann, U. (1999) Effects of retigabine (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat entorhinal cortex hippocampal slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **359**, 33-39.
4. Armand, V., Rundfeldt, C. & Heinemann, U. (2000) Effects of retigabine (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by low magnesium in rat entorhinal cortex hippocampal slices. *Epilepsia*, **41**, 28-33.
5. Avoli, M., Psarropoulou, C., Tancredi, V. & Fueta, Y. (1993) On the synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the CA3 subfield of juvenile rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*, **70**, 1018-1029.
6. Badea, T., Goldberg, J., Mao, B. & Yuste, R. (2001) Calcium imaging of epileptiform events with single-cell resolution. *J. Neurobiol.*, **48**, 215-227.
7. Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. & Gaiarsa, J.L. (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol.*, **416**, 303-325.
8. Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., Tyzio, R. & Khazipov, R. (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.*, **87**, 1215-1284.

9. Bonifazi, P., Goldin, M., Picardo, M.A., Jorquera, I., Cattani, A., Bianconi, G., Represa, A., Ben-Ari, Y. & Cossart, R. (2009) GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science*, **326**, 1419-1424.
10. Borck, C. & Jefferys, J.G. (1999) Seizure-like events in disinhibited ventral slices of adult rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*, **82**, 2130-2142.
11. Brown, D.A. & Passmore, G.M. (2009) Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br. J. Pharmacol.*, **156**, 1185-1195.
12. Cammarota, M., Losi, G., Chiavegato, A., Zonta, M. & Carmignoto, G. (2013) Fast spiking interneuron control of seizure propagation in a cortical slice model of focal epilepsy. *J. Physiol.*, **591(Pt 4)**, 807-822.
13. Cherubini, E., Gaiarsa, J.L. & Ben-Ari, Y. (1991) GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.*, **14**, 515-519.
14. Cossart, R., Aronov, D. & Yuste, R. (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature*, **423**, 283-288.
15. Cossart, R., Ikegaya, Y. & Yuste, R. (2005) Calcium imaging of cortical networks dynamics. *Cell Calcium*, **37**, 451-457.
16. Cramer, C.L., Stagnitto, M.L., Knowles, M.A. & Palmer, G.C. (1994) Kainic acid and 4-aminopyridine seizure models in mice: evaluation of efficacy of anti-epileptic agents and calcium antagonists. *Life Sci.*, **54**, PL271-275.

17. Diehl, R.G., Smialowski, A. & Gotwo, T. (1984) Development and persistence of kindled seizures after repeated injections of pentylenetetrazol in rats and guinea pigs. *Epilepsia*, **25**, 506-510.
18. Dost, R. & Rundfeldt, C. (2000) The anticonvulsant retigabine potently suppresses epileptiform discharges in the low Ca<sup>++</sup> and low Mg<sup>++</sup> model in the hippocampal slice preparation. *Epilepsy Res.*, **38**, 53-66.
19. Dzhala, V.I. & Staley, K.J. (2003) Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J. Neurosci.*, **23**, 1840-1846.
20. Feldt Muldoon, S., Soltesz, I. & Cossart, R. (2013) Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **110**, 3567-3572.
21. Fueta, Y. & Avoli, M. (1992) Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Epilepsy Res.*, **12**, 207-215.
22. Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y. & Takada, M. (2006) Comparable GABAergic mechanisms of hippocampal seizurelike activity in posttetanic and low-Mg<sup>2+</sup> conditions. *J. Neurophysiol.*, **95**, 2013-2019.
23. Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Nambu, A. & Takada, M. (2003) Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience*, **119**, 265-275.

24. Gómez-Gonzalo, M., Losi, G., Chiavegato, A., Zonta, M., Cammarota, M., Brondi, M., Vetri, F., Uva, L., Pozzan, T., de Curtis, M., Ratto, G.M. & Carmignoto, G. (2010) An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *PLoS Biol.*, **8**, e1000352.
25. Gören, M.Z. & Onat, F. (2007) Ethosuximide: from bench to bedside. *CNS Drug Rev.*, **13**, 224-239.
26. Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H. & Storm, J.F. (2005) Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.*, **566(Pt 3)**, 689-715.
27. Henry, T.R., Frey, K.A., Sackellares, J.C., Gilman, S., Koeppe, R.A., Brunberg, J.A., Ross, D.A., Berent, S., Young, A.B. & Kuhl, D.E. (1993) In vivo cerebral metabolism and central benzodiazepine-receptor binding in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, **43**, 1998-2006.
28. Ikegaya, Y., Aaron, G., Cossart, R., Aronov, D., Lampl, I., Ferster, D. & Yuste, R. (2004) Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science*, **304**, 559-564.
29. Jefferys, J.G. & Haas, H.L. (1982) Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature*, **300**, 448-450.
30. Karlócai, M.R., Kohus, Z., Káli, S., Ulbert, I., Szabó, G., Máté, Z., Freund, T.F. & Gulyás, A.I. (2014) Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what's the difference? *Brain*, **137(Pt 2)**, 463-485.
31. Kendall, M.G., Stuart, A., Ord, J.K., Arnold, S.F. & O'Hagan, A. (1994) *Kendall's advanced theory of statistics, 6th Edition*. New York: Halsted Press.

32. Kobayashi, T., Hirai, H., Iino, M., Fuse, I., Mitsumura, K., Washiyama, K., Kasai, S. & Ikeda, K. (2009) Inhibitory effects of the antiepileptic drug ethosuximide on G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Neuropharmacology*, **56**, 499-506.
33. Köhling, R., Vreugdenhil, M., Bracci, E. & Jefferys, J.G. (2000) Ictal epileptiform activity is facilitated by hippocampal GABA<sub>A</sub> receptor-mediated oscillations. *J. Neurosci.*, **20**, 6820-6829.
34. Korn, S.J., Giacchino, J.L., Chamberlin, N.L. & Dingledine, R. (1987) Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *J. Neurophysiol.*, **57**, 325-340.
35. Leschinger, A., Stabel, J., Igelmund, P. & Heinemann, U. (1993) Pharmacological and electrographic properties of epileptiform activity induced by elevated K<sup>+</sup> and lowered Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentration in rat hippocampal slices. *Exp. Brain Res.*, **96**, 230-240.
36. Mantegazza, M., Curia, G., Biagini, G., Ragsdale, D.S. & Avoli, M. (2010) Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.*, **9**, 413-24.
37. McDonald, J.W., Garofalo, E.A., Hood, T., Sackellares, J.C., Gilman, S., McKeever, P.E., Troncoso, J.C. & Johnston, M.V. (1991) Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.*, **29**, 529-541.
38. Mody, I., Lambert, J.D. & Heinemann, U. (1987) Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices *J. Neurophysiol.*, **57**, 869-888.

39. Namiki, S. & Ikegaya, Y. (2009) Current application and technology of functional multineuron calcium imaging. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1-9.
40. Nyikos, L., Lasztóczy, B., Antal, K., Kovács, R. & Kardos, J. (2003) Desynchronisation of spontaneously recurrent experimental seizures proceeds with a single rhythm. *Neuroscience*, **121**, 705-717.
41. Ohno, K. & Higashima, M. (2002) Effects of antiepileptic drugs on afterdischarge generation in rat hippocampal slices. *Brain Res.*, **924**, 39-45.
42. Olsen, R.W., Wamsley, J.K., McCabe, R.T., Lee, R.J. & Lomax, P. (1985) Benzodiazepine/gamma-aminobutyric acid receptor deficit in the midbrain of the seizure-susceptible gerbil. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **82**, 6701-6705.
43. Perucca, E., Gram, L., Avanzini, G. & Dulac, O. (1998) Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures. *Epilepsia*, **39**, 5-17.
44. Piredda, S., Yonekawa, W., Whittingham, T.S. & Kupferberg, H.J. (1986) Effects of antiepileptic drugs on pentylenetetrazole-induced epileptiform activity in the in vitro hippocampus. *Epilepsia*, **27**, 341-346.
45. Ribak, C.E., Harris, A.B., Vaughn, J.E. & Roberts, E. (1979) Inhibitory, GABAergic nerve terminals decrease at sites of focal epilepsy. *Science*, **205**, 211-214.
46. Rutecki, P.A. & Yang, Y. (1998) Ictal epileptiform activity in the CA3 region of hippocampal slices produced by pilocarpine. *J Neurophysiol.*, **79**, 3019-3029.

47. Sabolek, H.R., Swiercz, W.B., Lillis, K.P., Cash, S.S., Huberfeld, G., Zhao, G., Ste Marie, L., Clemenceau, S., Barsh, G., Miles, R. & Staley, K.J. (2012) A candidate mechanism underlying the variance of interictal spike propagation. *J. Neurosci.*, **32**, 3009-3021.
48. Sasaki, T., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2007) Metastability of active CA3 networks. *J. Neurosci.*, **27**, 517-528.
49. Smetters, D., Majewska, A. & Yuste, R. (1999) Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods*, **18**, 215-221.
50. Staley, K.J., Soldo, B.L. & Proctor, W.R. (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science*, **269**, 977-981.
51. Stasheff, S.F., Bragdon, A.C. & Wilson, W.A. (1985) Induction of epileptiform activity in hippocampal slices by trains of electrical stimuli. *Brain Res.*, **344**, 296-302.
52. Storm J.F. (1989) An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol.*, **409**, 171-190.
53. Taira, T., Lamsa, K. & Kaila, K. (1997) Posttetanic excitation mediated by GABA(A) receptors in rat CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **77**, 2213-2218.
54. Takahashi, N., Sasaki, T., Usami, A., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2007) Watching neuronal circuit dynamics through functional multineuron calcium imaging (fMCI). *Neurosci. Res.*, **58**, 219-225.
55. Takahashi, N., Takahara, Y., Ishikawa, D., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2010) Functional multineuron calcium imaging for systems pharmacology. *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 211-218.

56. Takano, H., McCartney, M., Ortinski, P.I., Yue, C., Putt, M.E. & Coulter, D.A. (2012) Deterministic and stochastic neuronal contributions to distinct synchronous CA3 network bursts. *J. Neurosci.*, **32**, 4743-4754.
57. Taylor, C.P. & Dudek, F.E. (1982) Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science*, **218**, 810-812.
58. Traynelis, S.F. & Dingledine, R. (1988) Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J. Neurophysiol.*, **59**, 259-276.
59. Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z. & Turski, L. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.*, **9**, 315-335.
60. Wladyka, C.L. & Kunze, D.L. (2006) KCNQ/M-currents contribute to the resting membrane potential in rat visceral sensory neurons. *J. Physiol.*, **575(Pt 1)**, 175-189.
61. Yue, C. & Yaari, Y. (2004) KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **24**, 4614-4624.

## 第 2 部

### 海馬CA3-CA1領域における神経細胞活動の 時間・空間特性

## 【背景】

海馬CA3神経細胞は機能的に結合しており(Amaral & Lavanex, 2007)、連合記憶やパターン補完に関連付けられる自己連合ネットワークを構成していると考えられている (Hopfield, 1982)。これまでの研究により、CA3領域からの出力は連合学習や記憶固定に関連することが明らかになっている (Nakashiba et al., 2008, 2009)。CA3錐体細胞の主な投射先はCA1錐体細胞であるが、軸索トレーサーを用いた研究により、CA3-CA1投射の空間パターンはランダムではないことが示されている。具体的には、近位CA3神経細胞は、海馬septotemporal軸のうちseptal側のCA1神経細胞に強く投射する一方、遠位CA3神経細胞はtemporal側に強く投射している (Ishizuka et al., 1990) (用語は図1を参照)。最近の精巧な遺伝学的研究により、CA3神経細胞の軸索は樹状突起分枝部分にシナプスを密に形成することが明らかにされ (Druckmann et al., 2014)、CA3-CA1結合は樹状突起の微細な構造のレベルで複雑に構築されていると考えられている。

海馬においては、解剖学的なシナプス結合と比較し、機能的な結合(活動の伝播パターン)の特性は未だ不明な点が多い。個々のシナプスの強さは不均一であるだけでなく、可変性であることから (Sasaki et al., 2012)、機能的な結合は必ずしも構造的な結合と一致する必要はない。その上、海馬では相当な割合のシナプスは機能的には活動していないことが知られている (Liao et al., 1995)。

## 【目的】

本研究では、海馬CA3-CA1神経回路における活動の伝播パターンを明らかにすることを目的として、急性海馬スライスの同期的なバースト活動、すなわちMg<sup>2+</sup>-free条件下bicuculline処置により誘発される、CA1およびCA3領域におけるてんかん様活動に着目し（図2A）、その活動の時間・空間特性を解析した。急性組織スライス標本は、神経ネットワークが保持された生きた組織であることから、神経活動を機能的に記録することが可能である。CA3領域の同期的なバースト活動はCA1領域の同期活動に比べ約10–20 ms早く発生したこと、また、シャッファー側枝を外科的に切断してもCA3領域の同期活動は依然認められたが、CA1領域の同期活動は消失したことから（図2B、C）、同期活動はCA3領域から始まり、CA1領域へ伝播することが示された。CA1領域における個々の同期活動では、近位CA1の電極の方が遠位より活動が早く起こり（図2D）、活動開始時間と電極位置について線形回帰分析を実施したところ、相関係数 $R$ は0.55であり（図2E,  $P = 2.7 \times 10^{-14}$ , Spearman rank correlation coefficient）、同期活動がCA1領域の近位から遠位へ $69 \pm 9$  mm/sの速度で伝播することが示された（horizontal propagation; mean  $\pm$  SD of 161 electrodes in 3 slices）。CA1領域で認められた錐体細胞層に沿った活動伝播パターンは、CA3領域の同期活動では顕著ではなかった（図2F,  $R = -0.07$ ,  $P = 0.51$ ）。これらの結果から、CA3領域とCA1領域では同期活動の開始・伝播メカニズムが異なることが示唆された。そこで本研究では、fMCIを用い、多細胞の活動を単一細胞の解像度で観察し、同期活動の時間・空間特性を詳細に解析した。

## 【方法】

### 実験動物

実験には生後6–8日齢のWistarラット (SLC、Shizuoka, Japan) を使用した。ラットは自由摂食・摂水下、12時間毎の明暗制御、および温度・湿度を制御した条件下で飼育し、実験に用いた。全ての実験は、塩野義製薬株式会社の動物実験内部ガイドラインと倫理規定に従い、塩野義医薬研究センター動物実験適正運用委員会から承認された手順で実施した。

### スライス標本の作製

ラットを断頭し、摘出した脳をあらかじめ95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>ガスを飽和させた氷冷下のmodified aCSF (artificial cerebrospinal fluid: 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM KCl, 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose, and 215.5 mM sucrose) 中に静置した。海馬を単離し、3%アガロースゲルで包埋し、ビブラトーム (VT1200S; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて海馬スライス標本 (400 μm) を作製した。作製した標本は95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>ガスを飽和させた32°Cのnormal aCSF (113 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, and 11 mM glucose) 中で40分以上回復させてから実験に使用した。

### 多細胞カルシウムイメージング法 (functional Multineuron Calcium Imaging; fMCI)

スライス標本をCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬 Oregon Green 488 BAPTA-1AM (OGB-1) を含む32°Cの染色液中で60–80分間インキュベートした。染色は以下の組成で実施した: normal aCSF, 0.0005% OGB-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.01% Pluronic F-127 (Invitrogen), 0.005% Cremophor EL (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)。インキュベート後、aCSF中で40分以上回復させた。その後、特に記載がない限り95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>ガスを飽和させた32°CのMg<sup>2+</sup>-free aCSF (113 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, and 11 mM glucose) を2.0 mL/minの流速で灌流させた記録チャンバーにスライス標本を移した。測定は、10 μM (-)bicuculline methobromide (和光純薬, Osaka, Japan) 処置条件下で実施し、CA1もしくはCA3

領域の神経細胞集団の活動をCa<sup>2+</sup>蛍光シグナルとして記録した。本実験でのイメージングシステムとして、ニポウ板型共焦点レーザーキャナ (CSUX1; Yokogawa Electric, Tokyo, Japan)、冷却CCDカメラ (iXon DU897; Andor Technology, Belfast, UK) が配備された正立顕微鏡 (Eclipse FN1; Nikon, Tokyo, Japan) を使用した。実験には16×、0.8 NA (Nikon) の水浸対物レンズを使用した。共焦点像は488 nm波長のDPSSレーザー (30 mW, BC-001-B; Melles Griot, Albuquerque, NM, USA) で励起し、33 Hzのフレーム速度で撮影した。退色を最小限にするため、レーザー強度をニュートラル・デンシティーフィルターで5%に減弱させた。

記録されたOGB-1イメージング画像より、神経細胞の細胞体の位置を目視で同定した。80個以上の細胞が染色されたスライス標本を解析対象とした。それぞれの細胞において細胞体でのCa<sup>2+</sup>蛍光輝度変化 $\Delta F/F$ を算出した。計算式は以下の通りである。

$$\Delta F/F = (F_1 - F_0)/F_0$$

ここで $F_1$ は任意の時点の蛍光強度、 $F_0$ はその前後15 sの蛍光強度の平均値とした。スパイク活動はMicrosoft Visual Basicで作成したカスタムソフトウェアにより再構築した (Sasaki et al., 2008)。電気刺激による同期活動を惹起するために、双極性タングステン電極 (Inter Medical Co., Ltd., Aichi, Japan)、刺激装置 (SEN-3401, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)、アイソレーター (SS-203J, Nihon Kohden) を用いて200  $\mu$ sの電気刺激を5–90 s間隔で実施した。刺激強度は0.1から3 mAの範囲とし、刺激によってイメージ画像で解析した神経細胞のうち少なくとも90%以上がスパイク活動を示した強度に設定した。

## 電気生理学的記録

ルーズパッチ記録もしくは局所集合電位記録において、CA1もしくはCA3錐体細胞をOGB-1蛍光像より視覚的に同定し、aCSFを内液としたハウケイ酸ガラス電極 (2–6 M $\Omega$ ) を用いて活動を記録した。記録には EPC10 (Heka, Darmstadt, Germany) および PULSE software (Heka) を用い、2.9 kHzのカットオフフィルターを通した。シグナルは PowerLab (AD Instruments, Dunedin, New Zealand) を用いて10 kHzでサンプリングし、LABCHART (AD

Instruments) を用いて解析した。多電極記録では、直径50  $\mu\text{m}$ の電極が64電極配置された記録チャンバー (MED-P50025; Alpha MED Scientific, Osaka, Japan) に海馬スライス標本を設置した。多電極記録システム (Cerebus Data Acquisition System; Blackrock Microsystems, Salt Lake City, UT, USA) およびCENTRAL software (Blackrock Microsystems) を用いて局所集合電位を記録し、0.3 Hz以下の低周波カットフィルターおよび500 Hz以上の高周波カットフィルターを通し10 kHzでサンプリングした。

## 統計

データはGraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) およびMatlab (MathWorks, Natick, MA) で作成したカスタムソフトウェアを用いて解析した。特に記載がない限り、データは平均±標準偏差 (SD) で表記し、 $P < 0.05$ を統計学的有意水準とした。発火順序のフィデリティー (神経活動順序のイベント間における一貫性) を評価するため、順位一致性の指標である、ケンドールの一致係数 ( $W$ ) を適応した (Kendall et al., 1994)。 $W$  は0から1の間の数値をとり、大きい値であるほど一致性が高いことを意味する。活動開始時間と細胞の位置 (上昇層と錐体細胞層との境界線からの距離) との相関を評価するため、スピアマンの順位相関係数 (Spearman rank correlation coefficient) を適応した。2つの相関係数についてのZ検定 (Z-test for two correlation coefficients) は、相関係数間の違いを評価するために用いた (Kendall et al., 1994)。細胞活動の時間的な拡大・縮小の分類にはリサンプリング方法を使用し、1000サロゲートデータセットから偶然起こり得る値の分布 (chance distribution) を作成した。

## 【結果】

### CA1神経細胞の活動は層の深さに応じて連続的に伝播する

海馬スライス標本をbicucullineで脱抑制し、局所集合電位を記録したところ、 $0.68 \pm 0.22/\text{min}$ の頻度で同期的なバースト活動が生じた (図2A、C;  $n = 3$  slices)。次にOGB-1を取り込ませたスライス標本で、上記の同期活動をCA1錐体細胞層においてfMCIを用いて観察した (図3A)。本研究において1スライス標本あたり平均して $146 \pm 29$ 神経細胞が観察され (図3B、 $n = 32$  slices)、自発的なスパイク発生時には細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が起こり、同期的なバースト活動発生時にはスパイク活動と比べ持続的な大きな $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が起きた (図3A)。同期活動の特徴として、それぞれの同期イベントでは、観察した $99.9 \pm 0.3\%$ の神経細胞が活動し (図3C、193 events from 10 slices)、最初のイベント発生後、スパイク活動頻度は低くなり (図3C)、特に各イベント直後で強く抑制された (図3D)。スパイク活動が一過的に抑制されたのは、てんかん様活動が持続して起きたことで、プレシナプス小胞のグルタミン酸貯蔵が枯渇した可能性が考えられる (Staley et al., 1998)。従って、観察されたバースト活動はほぼ全ての細胞が同期して活動する、てんかん様ネットワーク活動と考えられる。同期活動の発生領域を明らかにするため、CA3領域とCA1領域を切断したところ、CA1領域では同期活動は認められず、局所集合電位記録による検討 (図2B) と同様、同期活動はCA3から伝播することが示された (図3E、F,  $n = 4$  slices each)。

それぞれの同期イベントにおける細胞の活動タイミングを詳細に解析したところ、全ての細胞が完全に同時に活動するのではなく、約100 ms間の様々なタイミングで連続して活動することが明らかとなった。個々の細胞が活動する順序はイベント間で厳密ではないものの全体としてある程度保存されている傾向が認められた (図4A)。そこで10スライス標本から記録された193イベントについて、活動タイミングを解析した (12–37 events per slice)。個々のスライス標本において細胞の活動順序を解析したところ、ケンドールの一致係数は0.13から0.42の範囲となり、全てのスライス標本で統計学的に有意であった ( $\chi^2 = 326\text{--}1392$ ,  $P = 8.2 \times 10^{-215}\text{--}1.9 \times 10^{-15}$ )。これは、細胞の活動順序は大まかにはイベント間で保持されていること

を意味する。各同期イベントにおいて、イメージング1フレーム (30-ms bin) で活動した細胞数を計数し、同期活動のピーク時間 (最も多くの細胞が活動したフレーム) を判定した。それぞれのスライス標本で、観察された全ての同期イベントのデータから、ピーク時間に対する細胞の活動時間ヒストグラムを算出した。このヒストグラムを用いて、個々の細胞の平均活動タイミングを決定し、タイミングマップとして表示した (図4B)。代表スライス標本のタイミングマップを図4Bに示しており、上昇層に近い位置の細胞 (錐体細胞層の深い位置) ほど早く活動することが明らかとなった。この傾向は10スライス標本の1444細胞を纏めた結果でも同様に認められた (図4C)。活動タイミングは、上昇層と錐体細胞層の境界線からの距離と負の相関を示し ( $R_{\text{rank}} = 0.61, P = 3.6 \times 10^{-147}$ )、CA1錐体細胞層において、深い細胞から浅い細胞へ活動が垂直方向に伝播することが明らかとなった。回帰解析から、垂直方向の伝播速度は  $2.2 \pm 0.1 \text{ mm/s}$  (10 slices) であり、これは、多電極システムを用いて記録した水平方向の伝播速度と比較して、約30倍遅い速度であった (図2E; cf.,  $69 \pm 9 \text{ }\mu\text{m/s}$ )。

同期活動における細胞の活動パターンが層状である原因がCA1細胞固有の興奮性によるものかを調べるため、CA1細胞を人工的に電気刺激して活動パターンを解析した。CA1領域をCA3ネットワークから外科的に分離し (CA1-CA3 cut)、双極性電極を用いて5–90 s間隔で放線層領域を刺激したところ (図5A)、1回の刺激で  $99.0 \pm 1.4\%$  の細胞が同期的に活動した (80 stimuli in 8 slices)。各刺激におけるケンドールの一致係数は0.095から0.358の範囲となり、5/8スライス標本が有意水準 ( $P < 0.05$ ) に達した。このことは個々の細胞の活動順序は刺激試行間で大まかに保存されていることを意味する。しかし、全スライス標本を纏めた結果、活動タイミングと上昇層からの距離との相関係数  $R_{\text{rank}}$  は0.18であり、自発的な同期活動で認められた値0.61より有意に低かった ( $Z = 13.5, P = 8.4 \times 10^{-42}$ , Z-test for two correlation coefficients)。この結果から、CA3ネットワークを排除した条件でCA1領域を人工的に電気刺激しても、自発的な同期活動で認められた層状の活動パターンは再現できないことが示された。従って、層状の活動はCA1細胞固有の性質の違いにより起こるのではなく、CA3領域の活動パターンがCA1領域へ伝播することによって引き起こされると思われる。

さらにこの仮説を検証するため、CA3-CA1を切断していないスライス標本にnormal aCSF (1 mM Mg<sup>2+</sup>を含む) 条件下bicucullineを処置し、シャッフアー側枝を電気刺激した。この条件ではスライス標本はほとんど自発的な同期活動を示さなかったが、電気刺激により同期活動が引き起こされた (図5B)。電気刺激で誘発された同期活動は、シャッフアー側枝からの入力を介した直接的なCA1活性化と、逆行性にCA3細胞群が活性化されることによる間接的なCA1活性化の両方が含まれる。従って、この同期活動は部分的にはCA3領域の回帰性ネットワークで発生した活動を反映していると考えられる。6スライス標本全てにおいて、ケンドールの一致係数は有意水準に達し (0.19–0.35)、 $R_{\text{rank}}$ は0.32となり、CA3-CA1切断スライス標本と比較して有意に大きかった ( $Z = 3.42$ ,  $P = 6.2 \times 10^{-4}$  vs. stimulation in CA1-CA3 cut slices,  $n = 926$  cells)。上記の結果から、CA3細胞集団の活動が伝播することにより、CA1細胞集団がランダムではなく、層状に連続した活動パターンを示すと考えられる。

### CA3神経細胞の活動はクラスターを形成する

CA1領域へ情報を伝達するCA3領域でも、CA1領域と同様に層状の活動パターンを示すのか明らかにするため、同様の解析をCA3細胞集団について実施した。CA3錐体細胞層において、8スライス標本808細胞から ( $101 \pm 15$  neurons per slice)、全部で188回の同期活動を記録した。8スライス標本全てにおいて、ケンドールの一致係数は統計学的に有意であったことから (0.10–0.18,  $\chi^2 = 140$ –866,  $P = 2.7 \times 10^{-121}$ – $4.1 \times 10^{-4}$ )、CA3細胞の活動も連続的であり、同期イベント間での活動順序は全体として大まかには保持されていることが明らかとなった。しかし、CA1領域とは異なり、層状の活動パターンはCA3領域では認められなかった (図6A、B)。実際、 $R_{\text{rank}}$ は0.16であり、CA1領域における値0.61と比較して有意に低い値であった ( $Z = 12.48$ ,  $P = 9.7 \times 10^{-36}$ )。一方で興味深いことに、早く活動した細胞は、CA3錐体細胞層においてクラスターとして集まって存在し「hot spot」を形成している傾向が認められた (図6A)。そこで、hot spotの有無を検証するため、活動タイミング分布から順位の早い上位5%の細胞を選び、細胞ペアの全ての組み合わせにおいて細胞間距離を算出したところ、早

く活動した細胞ペアの距離は、全細胞集団における細胞ペアの距離と比べて短かった (図6C; 5% vs. all:  $D = 0.28$ ,  $P = 4.6 \times 10^{-6}$ ; Kolmogorov-Smirnov test)。また、活動タイミングの全細胞の分布を各5%の細胞群に分け、それぞれの $D$ 値 (Kolmogorov-Smirnov testの統計値) をプロットしたところ、 $D$ 値は上位5%の細胞群でのみ高い値を示した (図6D)。これらの結果から、早く活動した細胞がクラスターを形成していることが明らかとなった。従って、CA3領域の同期的活動では、お互いの距離が近い細胞群がクラスターを形成し、そこから活動が開始することが示唆された。

### 同期活動には時間的ゆらぎが存在する

反復して発生する同期活動の時間的な安定性を評価するため、イベント間の可変性を解析した。まず代表例として、2つの同期イベント (#1と#9) の、CA1細胞の活動タイミングを比較し (図7A左)、解析した127細胞の全ての活動タイミングをプロットしたところ、イベント#1と#9の活動タイミングの相関係数 $R$ は0.45であり、0より有意に大きかった (図7A右,  $P = 9.0 \times 10^{-8}$ ; Spearman rank correlation coefficient)。図7Bで、10スライス標本で記録した193イベントの2064ペア全てについて $R$ 値の分布を示したところ、1986ペア (96.2%) が有意に相関を示した。この結果から、ここまでの解析結果同様、CA1細胞の活動順序は、同期イベント間で完全に同一ではないものの大まかには保持されていることが確認された。

続いて、2つの同期イベントの伝播速度を比較するため、回帰分析を用いてイベントペアでの回帰直線の傾きを算出した。図7Aの代表例では、最小二乗法を用いて算出した傾きは0.45であり、1より小さかった。この結果は、#9の活動の伝播速度は#1に比べて速いことを意味する。同様の方法で、このスライス標本で観察された15回全ての同期イベントについて解析を実施し、回帰直線の傾きについて $15 \times 15$ のマトリクスを作成した (図7C)。このマトリクスにおいて、各行のピクセルは、対応するイベントの活動伝播速度が比較した活動に対し、時間的に縮小 (速い) もしくは拡張 (遅い) のどちらであるかを示している。

一般に、或るスライス標本で $n$ 個の同期イベントが観察された場合、他のイベントに対し

て $n - 1$ 個の傾きが得られる。この $n - 1$ 個の傾きの分布が1 (平均) より有意に小さい (速い) もしくは大きい (遅い) かを統計学的に検定するため、次のように母平均の $t$ 値を計算した。 $t = (x_i - \mu_0) \times n^{1/2} / s$ 、ここで $x_i$ はマトリクス $i$ 行での傾きの平均値、 $\mu_0$ と $s$ はそれぞれマトリクスにおける傾きの全分布の平均と標準偏差である (Kendall et al., 1994)。代表例として、図7Cで解析した15イベントの $t$ 値を図7Dにプロットした。このプロットにおける1%有意水準レベルを、傾きのマトリクスにおける全ての傾きをランダムにシャッフルすることで作成した、1000サロゲートから推定したchance distributionにより決定した (図7E)。図7Dで、5回のイベント (#1、#3、#5、#6、#15) は拡大と分類され、3回のイベント (#4、#8、#9) は縮小であると分類された。連続して発生する同期イベントは拡大と縮小を繰り返しており、時間的ゆらぎが存在することが明らかとなった。図7Fで、10スライス標本の191イベントを分類したところ、縮小、標準、拡大のイベントの発生頻度は均等ではなく偏りが存在した ( $\chi^2_{[2]} = 11.1$ ,  $P = 0.004$ )。そこで同期イベントの活動伝播速度を決定する因子を探るため、着目するイベントと、その1つ前のイベントとの同期活動休止時間を算出した。前のイベントからの休止時間が長い場合、次のイベントは縮小となりやすく [図7G;  $F_{2,178} = 13.0$ ,  $P = 5.5 \times 10^{-6}$ ; compression vs. normal ( $Q = 2.82$ ,  $P = 0.01$ ); Dunnett's multiple comparison test after one-way ANOVA]、休止時間が短い場合、次に起こるイベントは拡大となりやすいことが明らかとなった (expansion vs. normal,  $Q = 2.80$ ,  $P = 0.011$ )。

## 【考察】

本研究では、急性海馬スライスにおいて、興奮性神経活動を薬理的に分離した検討を実施した。この脱抑制スライスでは、CA3からCA1へ伝播する、空間的・時間的に特徴を示す自発的な同期活動が反復して発生した。従って、この実験モデルを用いることで、GABA性ネットワークの影響を排除した、機能的なCA3-CA1結合を独自の視点で研究することができると考え、観察した同期活動の活動パターンを解析した。本研究で、同期活動はまず、CA3領域でクラスターを形成した複数のhot spotsから開始し、その後CA1領域の深い層の細胞から浅い層の細胞へ順に活性化されることを発見した。また、CA1細胞が層方向に連続的に活動する際の速度は、proximal-distal方向の活動伝播速度と比較して遅く、またその速度は同期イベント前の同期的活動休止期間に依存して変動することを明らかにした。CA1同期活動が約100 msのオーダーで起こるのに対し、海馬での興奮性シナプス後電位 (EPSP) の上昇時間が約5 msであり、EPSPが減衰する際の膜時定数が約50 msであることを踏まえると (Spruston & Johnston, 1992)、同期活動の伝播速度の変動は、連続するシナプス入力が発動電位を発生させるか否かの調節を行っているのかもしれない (縮小の場合、EPSPが減衰する前に次のシナプス入力伝わり、活動電位が発生しやすいと思われる)。

最近の報告により、CA1錐体細胞は少なくとも2つの異なる細胞タイプ、regular-spiking神経細胞とburst-spiking神経細胞から構成されることが知られている (Graves et al., 2012)。Burst-spiking神経細胞は、*in vivo*での研究により、CA1錐体細胞層の深い位置に多く存在することが報告されている (Mizuseki et al., 2011)。一方、浅い層のCA1錐体細胞の大半は、calbindin陽性である (Baimbridge et al., 1991)。Calbindinは、カルシウム結合タンパク質であり、シナプスのCa<sup>2+</sup>緩衝作用を有する (Schmidt, 2012)。また、浅い層の細胞は、シナプスNMDA受容体を阻害し得る (Ueno et al., 2002)、Zn<sup>2+</sup>を高濃度含有していることが知られている (Slomianka, 1992)。従って、このような内因性の性質によって、同期活動におけるCA1細胞の層状の活動パターンを説明できる可能性が考えられる。すなわち、浅い層の細胞では、calbindinやZn<sup>2+</sup>の存在により興奮性を示しにくく、同期活動において反応が遅くなると推測

される。この可能性を検証するため、CA3ネットワークを排除した条件でCA1求心路を人工的に電気刺激した実験を実施したところ、人工的に誘発した同期イベントでは、浅い層のCA1神経細胞は遅い応答を示さなかった。この結果は、calbindinの発現有無はスパイク様式とは相関しないという報告や (Baimbridge et al., 1991)、regular-spiking神経細胞とburst-spiking神経細胞は最初のスパイク閾値には違いがないという報告 (Graves et al., 2012) を支持するものである。従って、同期活動の層状活動パターンは、CA1神経細胞の内因性の特性の違いによるものではなく、CA3-CA1ネットワーク特性から作り出されるものであると考えられる。

層の深さによって、CA1錐体細胞は、発火特性や形態的特性が異なるが、加えて、海馬外からの入力 (Mizuseki et al., 2011; Scheffer-Teixeira et al., 2012) や皮質下への出力 (Sorensen et al., 1993) という点でも異なることが知られている。これらの点に加えて本研究では、早く活動するCA3神経細胞が空間的にクラスターを形成し、CA1錐体細胞のうち深い層の細胞へ強く投射していることを示した。従って、深い層および浅い層の細胞は海馬において異なる神経回路を形成し、情報処理において機能的に異なる役割を担っていると示唆される。興味深いことに、*in vivo*で深い層は浅い層に比べて空間情報を伝達する細胞が多く、また、深い層に多く認められる特定の種類の細胞群はリップル波に伴い多くのスパイク活動を生じることが報告されている (Mizuseki et al., 2011)。リップル波とは、主にCA3領域から起こる、高頻度オシレーションを伴う同期棘波複合であり、直近の獲得記憶や場所細胞の自発的な再賦活に伴うことが知られている (Lee & Wilson, 2002)。本研究の結果と併せると、行動経験では、クラスターを形成したCA3神経細胞が優先的に活動し、hot spotsとしてリップル波を引き起こす可能性が考えられる。また、場所細胞は、動物が迷路学習などで特徴的な位置を通過した際に或るパターンで活動するが、その活動パターンは順方向もしくは逆方向で圧縮され、リップル波中でしばしば再生されることが知られている (Lee & Wilson, 2002; Diba & Buzsaki, 2007)。その活動パターンは新奇環境探索前の睡眠時にも検出されることから、探索前に活動パターンの一部は既に形成されていると考えられている (Dragoi & Tonegawa,

2011)。活動パターンの再生は、報酬位置の学習記憶に重要であると考えられているが (Girardeau et al., 2009; de Lavilleon et al., 2015)、その詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究で、内因性ネットワークにおいて、CA3領域とCA1領域の解剖学的に異なる部位で認められる特徴的な活動パターンを発見した。この結果を既報と併せて考察すると、発見した活動パターンと類似した現象、すなわちCA1領域の深い層の細胞が最初に活動し、続いて浅い層の細胞が活動するという現象が、リップル波に伴う細胞の活動パターンでも起こるのかもしれない。活動パターン再生の最初に、報酬位置に関連する細胞が活動しやすいことを考慮すれば、CA1領域の深い層の細胞の大半が、側坐核や前頭前皮質、中隔野といった目標や報酬に関与する脳領域に投射していること (Slomianka et al., 2011) は適当であると考えられる。一方、活動パターン再生の後期で発火する細胞は、報酬への道程の初期部分に関与すると考えられ、実際、浅い層の細胞は主に嗅内皮質へ投射している (Slomianka et al., 2011)。従って、深い層から浅い層へ細胞の活動が徐々にシフトすることにより、再生の間、CA1領域からの入力が報酬の中心から、徐々に報酬から遠い位置へシフトするのかもしれない。このメカニズムは、報酬位置の学習記憶に重要であると考えられる。

最後に、成熟した海馬神経細胞ではCa<sup>2+</sup>指示薬の取り込み効率が良くないため、本研究では幼若ラットから作製した*in vitro*海馬スライス標本を用いていることに注意が必要である。成体海馬のCA3錐体細胞は、海馬3次元において長軸方向に軸索を広範囲に伸長しており (Ishizuka et al., 1990)、単一のCA3錐体細胞でさえ、その軸索はseptotemporal軸方向において3分の2のCA1領域へ高度に分岐している (Li et al., 1994)。今後、未切断海馬標本や成体動物から作製した標本を用いることで、海馬における情報処理をより総合的に解明することが期待される。本研究はその端緒となると考えられる。

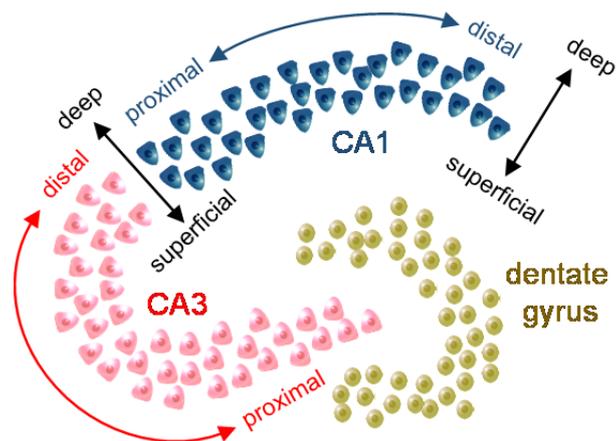


図1 海馬組織の模式図

Proximal (近位) および distal (遠位) という用語は、歯状回から錐体細胞層の沿った距離を表す。例えば proximal CA1はCA3に近い部位を意味する。 Superficial (浅い) および deep (深い) という用語は放線層から錐体細胞層への方向で、放線層からの距離を表す。例えば deep CA1とは上昇層に近い部位を意味する。

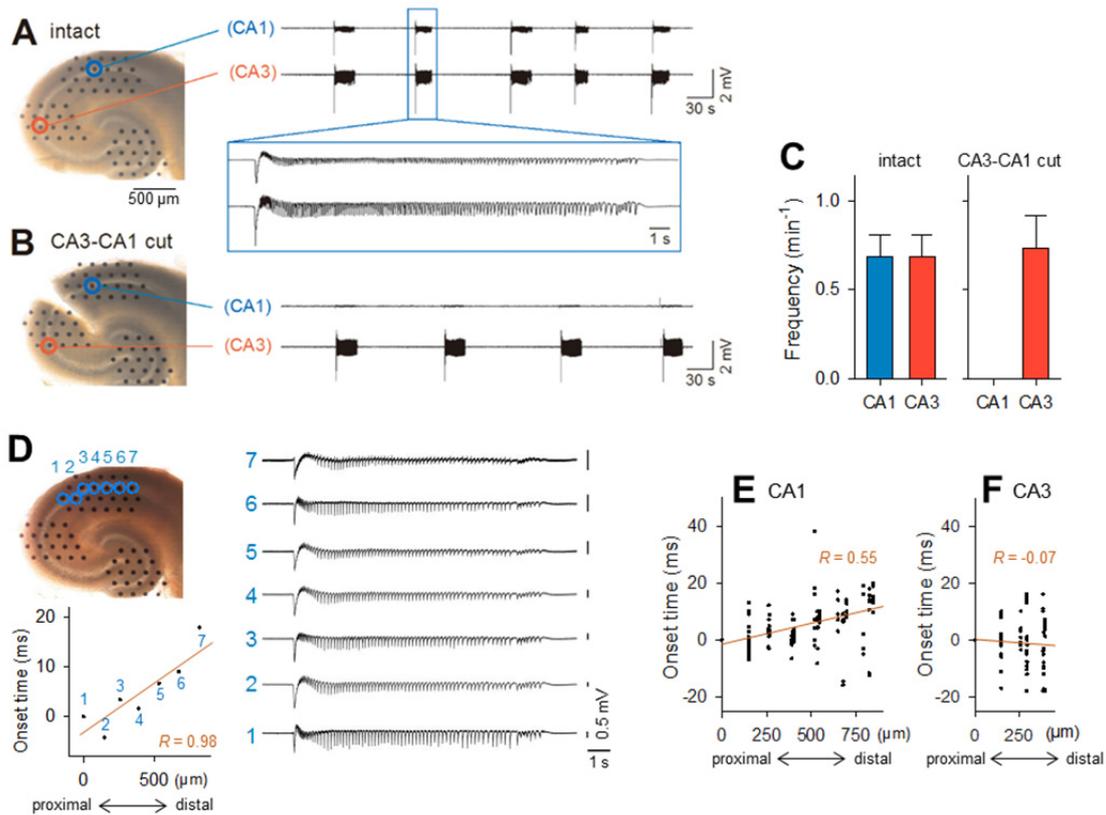


図2 同期活動は脱抑制した海馬スライス標本において自発的に生じる。多電極システムを用いた局所集合電位 (LFP) 記録による解析

- (A)  $Mg^{2+}$ -free条件下bicuculline (10  $\mu M$ )を処置した海馬急性スライス標本におけるCA1およびCA3神経活動の多電極電気生理記録。自発的に発生するバースト活動のLFPsはCA1領域とCA3領域との間で同期した。
- (B) CA3領域とCA1領域との間を外科的に切断した (CA3-CA1 cut) 以外はAと同じ条件での記録。CA1領域の同期活動が消失した。
- (C) 未切断スライス標本と、CA3-CA1切断スライス標本のCA3およびCA1領域における同期活動のイベント頻度 (mean  $\pm$  SEM of 3 slices each)。
- (D) 代表スライス標本の1つの同期的なバースト活動について実施した回帰解析結果。CA1錐体細胞層の7電極 (左上) から記録した同期活動の開始時間 (右) を、CA3領域に近い電極からのユークリッド距離でプロットした (左下)。
- (E) 3スライス標本の161電極から記録した23イベントのデータを纏めた。相関係数 $R$ は0.55

( $P < 0.0001$ ) であり、同期活動がCA1領域の近位から遠位へ伝播することが示された。

(F) CA3領域のデータについてEと同様に実施した解析結果。CA3領域では近位から遠位への同期活動の伝搬は認められなかった。

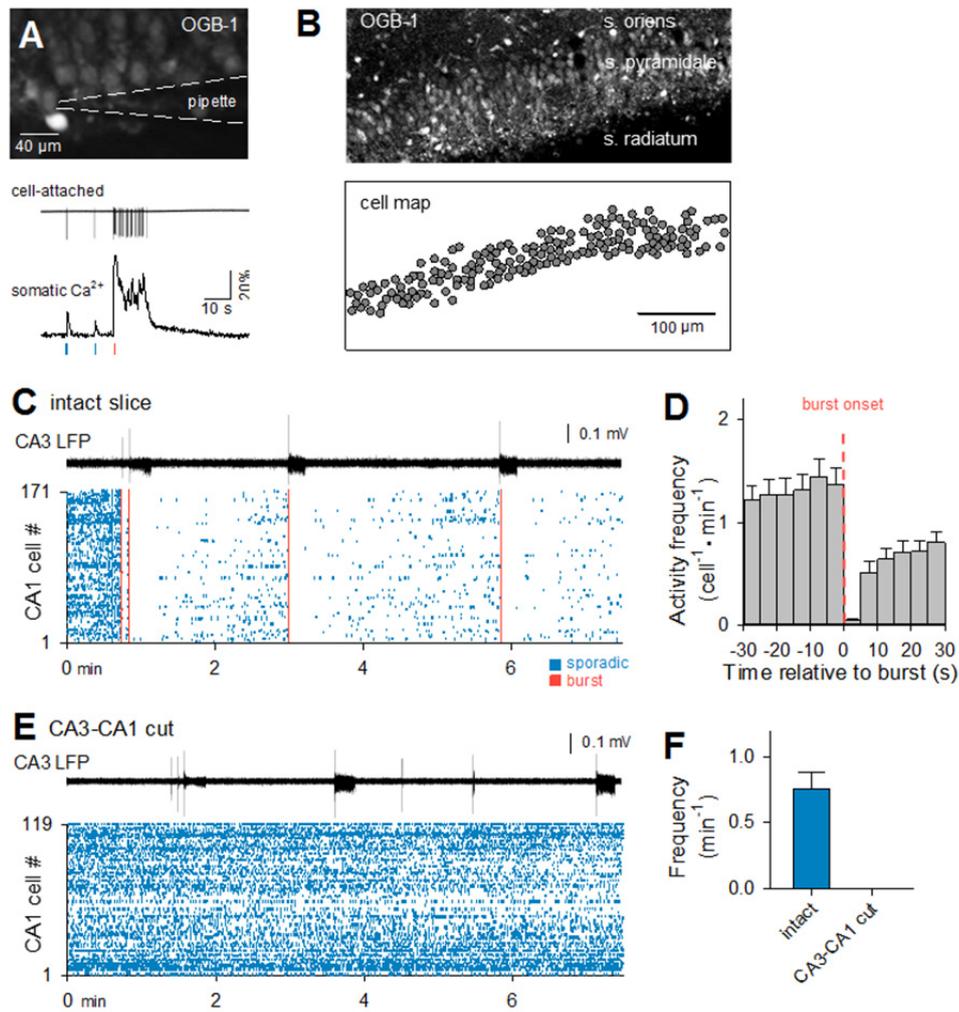


図3 脱抑制海馬スライス標本における同期活動。多細胞カルシウムイメージング法による解析

- (A) OGB-1を取り込ませたスライス標本のCA1領域の共焦点イメージ像（上）。破線はルースセルアタッチ記録の電極位置を示す。スパイク活動が発生する際、細胞体で $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が起きた（下）。青と赤の線は、それぞれスパイク活動およびバースト活動を表す。
- (B) CA1錐体細胞層のOGB-1蛍光イメージ像の代表例（上）、および観察した全部で171細胞の配置（下）。
- (C) 脱抑制スライス標本における個々のCA1神経細胞の $\text{Ca}^{2+}$ イメージングのラスタープロット。青と赤の線は、それぞれスパイク活動および同期的なバースト活動を表す。ラスタープロットの上を示す波形は、CA3錐体細胞層で同時に測定したLFP記録であり、CA1

領域の同期活動はCA3領域のバースト活動と同時に起きることが示された。

- (D) CA1神経細胞の同期イベント前後の平均スパイク活動 (means  $\pm$  SEMs of 30 bursts in 4 slices)。
- (E) CA3-CA1切断スライス標本である以外はCと同様の実験結果。CA1領域の同期活動は消失した。
- (F) 未切断スライス標本および切断スライス標本における、CA1領域での同期活動のイベント頻度 (means  $\pm$  SEMs of 4 slices each)。

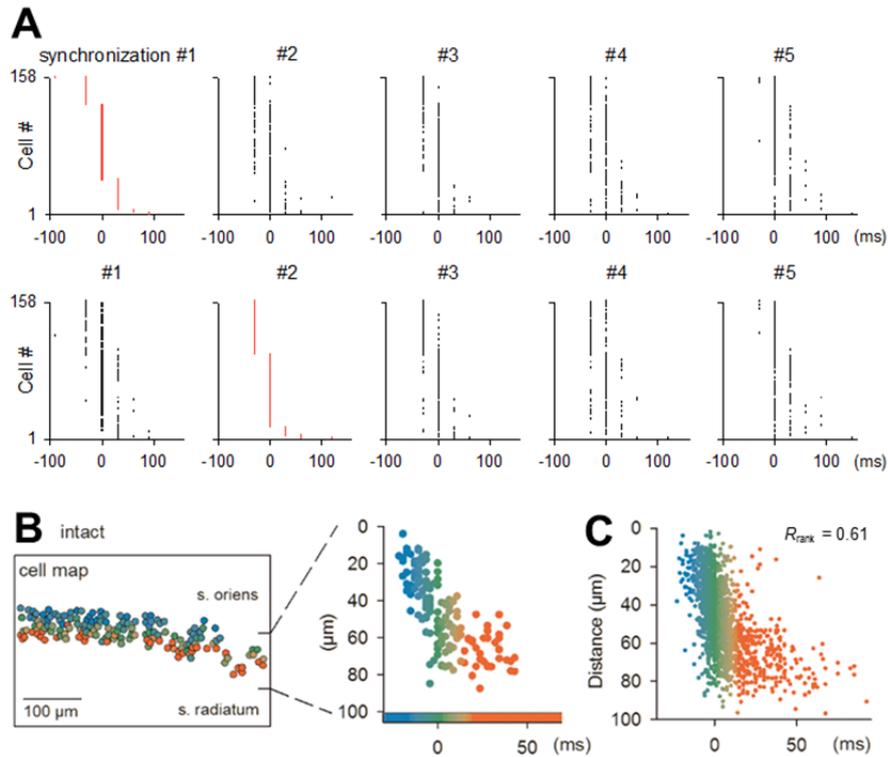


図4 同期活動において、CA1細胞は層状の活動パターンを示す

- (A) 代表スライス標本における、同期イベント中の細胞の活動順序について、記録されたイベントのうち最初の5回分を示している。158細胞の $\text{Ca}^{2+}$ 応答の開始時間を比較した。それぞれの図の縦軸は、1回目のイベント（上）もしくは2回目のイベント（下）の活動順序に従って並べた。イベント間で活動順序は大まかに保持されていた。
- (B) Aで示したスライス標本の14回分の同期イベントを細胞マップに纏めた。左のマップのうち、細胞の色は同期活動のピーク時間に対する個々の細胞の平均活動タイミングを表す。右の図では、左と同じデータについて、活動タイミングと距離（上昇層と錐体細胞層との境界線からの距離）との関係を散布図で示した。
- (C) 10スライス標本から記録した1444細胞のデータについて、Bと同様の散布図を示したところ、負の相関が認められた ( $R_{\text{rank}} = 0.61, P = 3.6 \times 10^{-147}$ )。

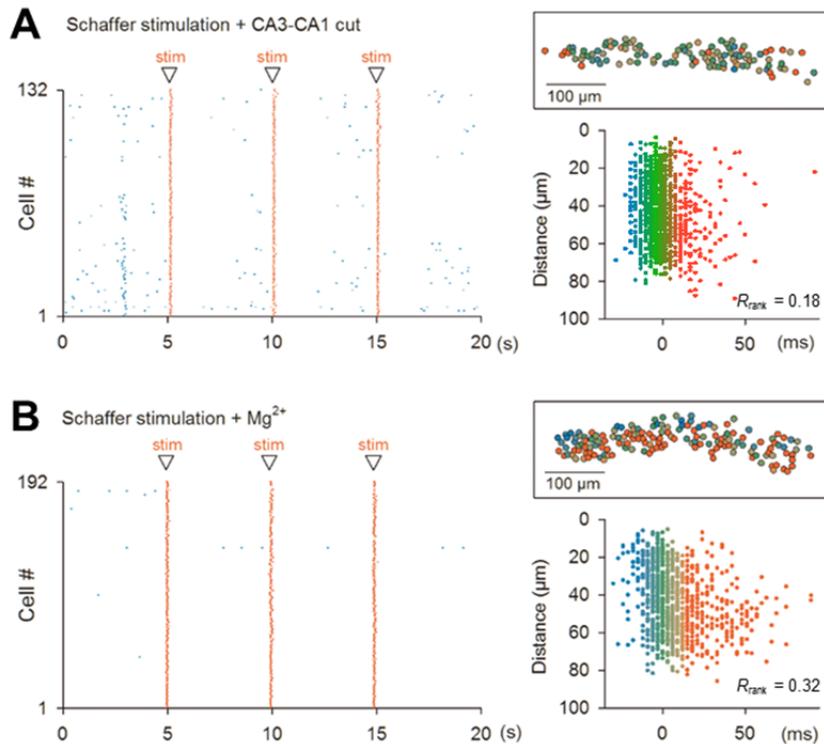


図5 電気刺激誘発同期イベントでは層状の活動パターンは消失する

(A) CA3-CA1を切断した脱抑制スライス標本において、シャッフアー側枝の電気刺激によりCA1細胞を活性化させた。左のラスタープロットは活動パターンの代表例である。赤色の点が誘発された活動を表す。活動タイミングの細胞マップは右上の挿入図に示した。右下の散布図は8スライス標本から記録された1198細胞の結果である ( $R_{\text{rank}} = 0.18$ ,  $P = 1.0 \times 10^{-9}$ )。相関係数 ( $R_{\text{rank}} = 0.18$ ) は、自発的な同期活動の相関係数 (図4C,  $R_{\text{rank}} = 0.61$ ) と比較して有意に低い値であった ( $Z = 13.5$ ,  $P = 8.4 \times 10^{-42}$ , Z-test for two correlation coefficients)。

(B) 未切断スライス標本において、1 mM Mg<sup>2+</sup>を含む条件でbicuculline (10 μM)を処置し、Aと同様に電気刺激を実施し活動パターンを解析した ( $R_{\text{rank}} = 0.32$ ,  $P = 6.9 \times 10^{-23}$ ,  $n = 926$  neurons from 6 slices)。相関係数 ( $R_{\text{rank}} = 0.32$ ) は、CA3-CA1切断スライスにおける相関係数 ( $R_{\text{rank}} = 0.18$ ) と比較して有意に高い値であった ( $Z = 3.42$ ,  $P = 6.2 \times 10^{-4}$ , Z-test for two correlation coefficients)。

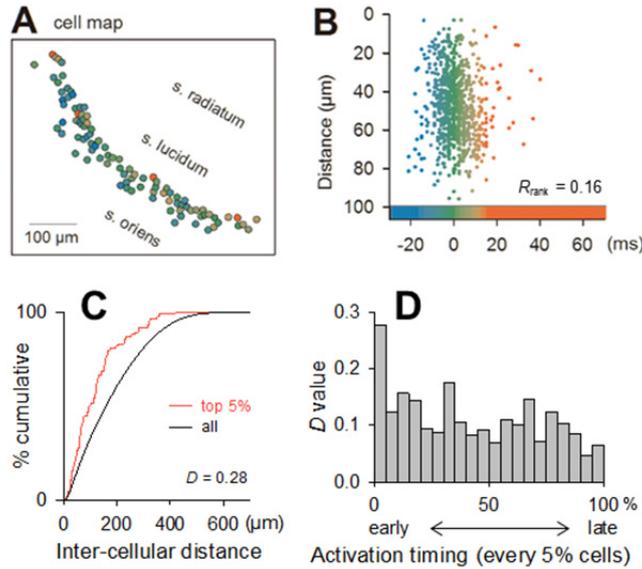


図6 CA3錐体細胞層には同期活動が開始するhot spotが存在する

- (A) 脱抑制スライス標本CA3領域において同期活動を記録し、個々の細胞の活動タイミングを疑似カラーで表した。
- (B) 8スライス標本から記録した808細胞の結果 ( $R_{\text{rank}} = 0.16$ ,  $P = 7.8 \times 10^{-6}$ )。相関係数 ( $R_{\text{rank}} = 0.16$ ) は、CA1領域における相関係数 ( $R_{\text{rank}} = 0.61$ ) 比較して有意に低い値であった ( $Z = 12.48$ ,  $P = 9.7 \times 10^{-36}$ , Z-test for two correlation coefficients)。
- (C) 全細胞群 (all)、および同期イベントにおいて活動タイミングが早かった上位5%の細胞群 (top 5%) について、細胞ペアの全ての細胞間距離を算出し累積分布を示した。早く活動した細胞はお互い近い距離に存在した(5% vs. all,  $D = 0.28$ ,  $P = 4.6 \times 10^{-6}$ ; Kolmogorov-Smirnov test)。
- (D) 活動タイミングの順位に従い細胞群を5%ずつに分け、Kolmogorov-Smirnov test のD値をそれぞれプロットした。最も早く活動した細胞群のみが空間的にクラスターを形成していることが示された。

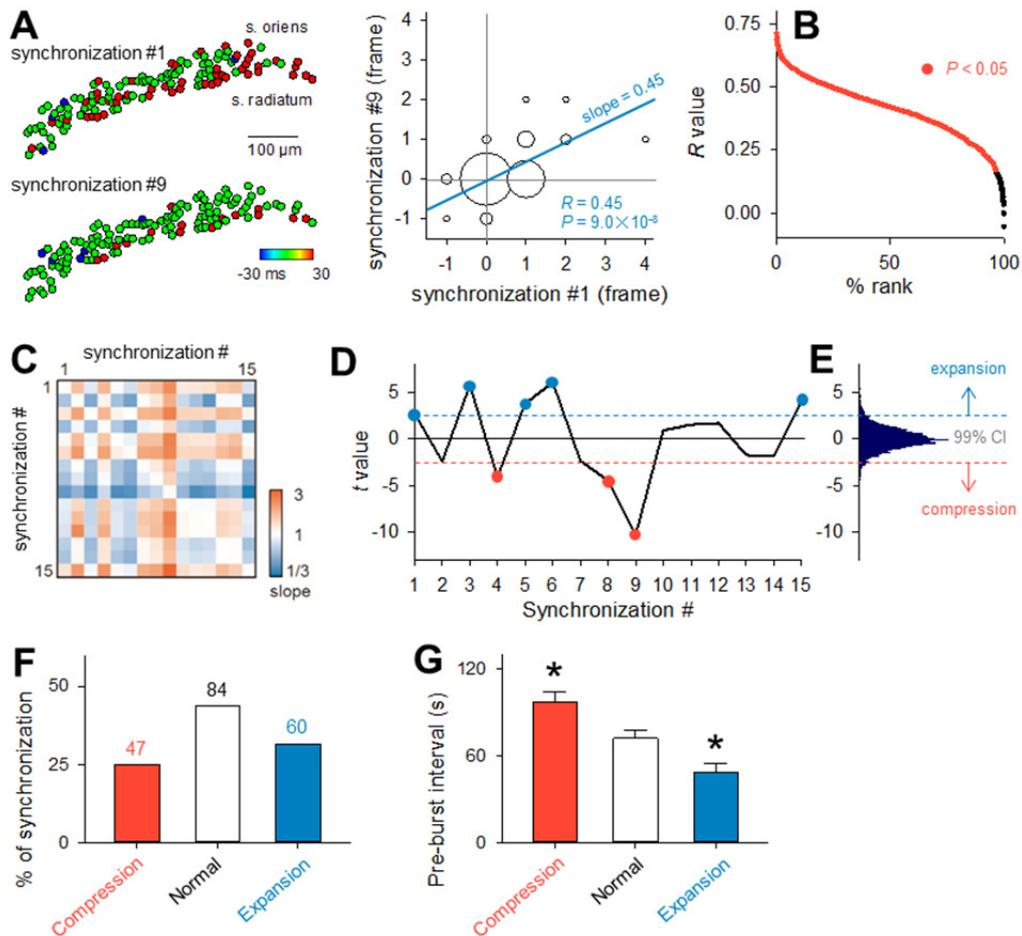


図7 同期活動の層状の活動伝播速度には時間的ゆらぎが存在する

- (A) 代表スライス標本で記録された同期活動の2回分（イベント#1と#9） について、個々の細胞の活動タイミングを細胞マップ（左）およびペアワイズ相関（右）で比較した。相関係数は0.45であった ( $P = 9.0 \times 10^{-8}$ )。相関プロットにおける直交回帰直線の傾き（青線）は0.45であった。これはイベント#9はイベント#1より活動伝播速度が早いことを意味する。円の大きさは細胞数を表す。
- (B) 10スライス標本から記録された193回の同期イベントの全ての組み合わせである、2064ペアの相関係数 $R$ の分布。赤い点はイベントペアが有意に相関することを示している。
- (C) Aと同じスライス標本で記録された15回の同期イベントの全ての組み合わせについて、直交回帰直線を算出し、その傾きを疑似カラーで表示した。
- (D) 同じスライス標本について、Cで示した全ての傾きの分布から、それぞれの同期イベン

トの*t*値を算出した。赤および青の点は、同期イベントの活動伝播速度が平均速度に比べて有意に速い（縮小）、遅い（拡大）ことを表す。

- (E) 傾きの1%有意水準は、Cのマトリクスの傾きをランダムにシャッフルすることで作成した、1000サロゲートで推定されるchance distributionで決定した。CI, confidence interval.
- (F) 10スライス標本から記録された191回の同期イベントを縮小、標準、拡大に分類した。
- (G) 或るイベントと、その直前のイベントとの間隔 (mean ± SEM)。長い休止期間の後に発生したイベントの伝播速度は速いことが示された (\**P* < 0.05 versus normal, Dunnett's test after one-way ANOVA)。

## 【参考文献】

1. Amaral, D. & Lavenex, P. (2007) Hippocampal neuroanatomy. In Andersen P, M.R., Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (ed) *The hippocampus book*. Oxford University Press, Oxford ; New York, pp. 37-114.
2. Baimbridge, K.G., Peet, M.J., McLennan, H. & Church, J. (1991) Bursting response to current-evoked depolarization in rat CA1 pyramidal neurons is correlated with lucifer yellow dye coupling but not with the presence of calbindin-D28k. *Synapse*, **7**, 269-277.
3. de Lavilleon, G., Lacroix, M.M., Rondi-Reig, L. & Benchenane, K. (2015) Explicit memory creation during sleep demonstrates a causal role of place cells in navigation. *Nat Neurosci*, **18**, 493-495.
4. Diba, K. & Buzsaki, G. (2007) Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples. *Nat Neurosci*, **10**, 1241-1242.
5. Dragoi, G. & Tonegawa, S. (2011) Preplay of future place cell sequences by hippocampal cellular assemblies. *Nature*, **469**, 397-401.
6. Druckmann, S., Feng, L., Lee, B., Yook, C., Zhao, T., Magee, J.C. & Kim, J. (2014) Structured synaptic connectivity between hippocampal regions. *Neuron*, **81**, 629-640.
7. Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsaki, G. & Zugaro, M.B. (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci*, **12**, 1222-1223.

8. Graves, A.R., Moore, S.J., Bloss, E.B., Mensh, B.D., Kath, W.L. & Spruston, N. (2012) Hippocampal pyramidal neurons comprise two distinct cell types that are countermodulated by metabotropic receptors. *Neuron*, **76**, 776-789.
9. Hopfield, J.J. (1982) Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 2554-2558.
10. Ishizuka, N., Weber, J. & Amaral, D.G. (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*, **295**, 580-623.
11. Kendall, M.G., Stuart, A., Ord, J.K., Arnold, S.F. & O'Hagan, A. (1994) *Kendall's advanced theory of statistics*. Halsted Press, New York.
12. Lee, A.K. & Wilson, M.A. (2002) Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron*, **36**, 1183-1194.
13. Li, X.G., Somogyi, P., Ylinen, A. & Buzsaki, G. (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol*, **339**, 181-208.
14. Liao, D., Hessler, N.A. & Malinow, R. (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*, **375**, 400-404.
15. Mizuseki, K., Diba, K., Pastalkova, E. & Buzsaki, G. (2011) Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat Neurosci*, **14**, 1174-1181.
16. Nakashiba, T., Buhl, D.L., McHugh, T.J. & Tonegawa, S. (2009) Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. *Neuron*, **62**, 781-787.

17. Nakashiba, T., Young, J.Z., McHugh, T.J., Buhl, D.L. & Tonegawa, S. (2008) Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science*, **319**, 1260-1264.
18. Sasaki, T., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2012) Heterogeneity and independency of unitary synaptic outputs from hippocampal CA3 pyramidal cells. *J Physiol*, **590**, 4869-4880.
19. Sasaki, T., Takahashi, N., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2008) Fast and accurate detection of action potentials from somatic calcium fluctuations. *J Neurophysiol*, **100**, 1668-1676.
20. Scheffer-Teixeira, R., Belchior, H., Caixeta, F.V., Souza, B.C., Ribeiro, S. & Tort, A.B. (2012) Theta phase modulates multiple layer-specific oscillations in the CA1 region. *Cereb Cortex*, **22**, 2404-2414.
21. Schmidt, H. (2012) Three functional facets of calbindin D-28k. *Frontiers in molecular neuroscience*, **5**, 25.
22. Slomianka, L. (1992) Neurons of origin of zinc-containing pathways and the distribution of zinc-containing boutons in the hippocampal region of the rat. *Neuroscience*, **48**, 325-352.
23. Slomianka, L., Amrein, I., Knuesel, I., Sorensen, J.C. & Wolfer, D.P. (2011) Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination. *Brain Struct Funct*, **216**, 301-317.
24. Sorensen, J.C., Tonder, N. & Slomianka, L. (1993) Zinc-positive afferents to the rat septum originate from distinct subpopulations of zinc-containing neurons in the hippocampal areas and layers. A combined fluoro-gold tracing and histochemical study. *Anatomy and embryology*, **188**, 107-115.

25. Spruston, N. & Johnston, D. (1992) Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **67**, 508-529.
26. Staley, K.J., Longacher, M., Bains, J.S. & Yee, A. (1998) Presynaptic modulation of CA3 network activity. *Nat Neurosci*, **1**, 201-209.
27. Ueno, S., Tsukamoto, M., Hirano, T., Kikuchi, K., Yamada, M.K., Nishiyama, N., Nagano, T., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2002) Mossy fiber Zn<sup>2+</sup> spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J Cell Biol*, **158**, 215-220.

**【略語】**

4-AP, 4-aminopyridine

aCSF, artificial cerebrospinal fluid

AUC, area under the curve

fMCI, functional multineuron  $\text{Ca}^{2+}$  imaging

GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid

OGB-1, Oregon Green 488 BAPTA-1AM

SLE, seizure-like event

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷裕二 教授に心よりお礼申し上げます。先生とのディスカッションから多くの刺激を受け、また先生の研究者としての姿勢を肌で感じ、今までの研究に対する見方が大きく変わりました。先生はいつも瞬時に研究の本質を見極め、解決方法や研究アイデアを提示してくださいました。先生の議論のスピードに付いていけず、私は内容を理解するのに時間がかかりましたが、未熟な私に対して温かく、ご丁寧にご指導くださったこと、大変感謝しております。本研究を通して学んだことを今後も活かしていきたいと思えます。本当にありがとうございました。

本研究を行うにあたり、具体的な内容を議論し、実験から解析に至るまで、常に有益なご指導、ご助言を賜りました塩野義製薬株式会社 小川公一 氏に心よりお礼申し上げます。入社当時イメージングも電気生理も理解していなかった私に、手取り足取り直接実験を教えてくださいましたこと、日々の研究内容の議論、プレゼンテーション資料の作成に至るまで全てにおいてお世話になり、本当にありがとうございました。小川さんのご指導がなければ、本研究を進めることはできませんでした。

本研究を行うにあたり、具体的な内容を議論し、実験から解析に至るまで、常に有益なご指導、ご助言を賜りました塩野義製薬株式会社 高須景子 氏に心よりお礼申し上げます。電気生理やスライス標本作製など様々な実験手技を教えてくださいただただでなく、トレーナーとして研究から会社の業務全般に至るまでいつもサポートしていただきありがとうございました。実験に行き詰ったとき高須さんに相談すると、私では考えが及ばなかった解決の糸口を教えてくださいました。

本研究の解析を様々な面からサポートしていただきました塩野義製薬株式会社 高原雄史

氏に心よりお礼申し上げます。高原君が入社するまでは牛歩だった解析が、高原君のおかげで一気に進むようになりました。私が実験と解析で追われているとき遅い時間まで残って解析を助けてくれたり、私の体調まで気遣ってくれたり、優しく有能な後輩と一緒に研究を進められて感謝しています。

グループミーティングをはじめとする多くの場において、本研究やキャリア形成に対する有益なご助言を賜りました塩野義製薬株式会社 阪口岳 氏に心よりお礼申し上げます。阪口さんからは研究者、社会人としての心構えなど多くのことを教えていただきました。いつも私の成長を考えて本音で熱く議論・ご指導してくださったこと、本当に感謝しております。

グループミーティングをはじめとする多くの場において、本研究に対する有益なご助言を賜りました塩野義製薬株式会社 長谷川稔 氏に心よりお礼申し上げます。分野外の研究者にもわかりやすく伝えることの重要性を教えていただき、客観的な視点から研究を見つめ直すことができました。また、実験や業務が過密になったときはさりげなく声をかけてくださり、精神的にも支えていただきありがとうございました。

遠くからいつも温かく見守ってくれた両親、そして要領が悪く仕事と家事の両立に苦労していた私を常に理解し全面的に支えてくれた夫に心よりお礼申し上げます。