

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2006 年 3 月 8 日

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者名：時 海波



指導責任者名：小宗 静男 職名：教授

所属機関名：九州大学医学系学府耳鼻咽喉科教室
〒812-8582

所在地：福岡市東区馬出3-1-1

電話：092-642-5668 内線：

1. 助成金額：600,000 円

2. 研究テーマ

音情報入力と聴覚回路形成機序との関連の解明

3. 成果の概要（100字程度）

正常ラットの聴覚発生時期は、外側上オリーブ核(LSO)神経細胞におけるGABAからグリシンへのスイッチングの時期と重る。本研究は聴覚発生前（生後6日齢）ラット側頭骨内の蝸牛を破壊する。生後13-15日齢で、パッチクランプ法を用い、LSO細胞へ入力する抑制性シナプス後膜電流の種類を調べ、神経伝達物質放出のスイッチング現象は正常時期より遅れることを判明した。音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 ・ (有) (学会名・演題)

第15回日本耳科学学会

外側上オリーブ核でのビリルビンによる神経伝達物質放出効率増加の機序

(2) 発表した論文 (無) ・ 有 (雑誌名・題名)
無

音情報入力と聴覚回路形成との関連の解明

研究者氏名	時 海波
中国所属機関	南京医科大学附属病院耳鼻咽喉科
日本研究機関	九州大学医学部耳鼻咽喉科
指導責任者	教授 小宗静男
共同研究者	賀数 康弘, 柴田修明

要旨

発達期における各種感覚入力によって関連する中枢神経回路が改変されるとの多くの報告がある。幼若期ラットの脳幹の橋に位置する下側上オリーブ核 (LSO) 細胞はγアミノ酪酸 (GABA) を受けており、成熟に伴ってグリシン性入力へとスイッチする。さらに興味深いことに正常ラットの聴覚発生時期は生後11-12日齢であり、LSO 神経細胞におけるGABAからグリシンへのスイッチングの時期と重なる。外界からの情報入力は聴神経回路網の発達形成に深く関与し、このスイッチングの現象の引き金となっている可能性が高いと思われる。本研究は聴覚発生前（生後6日齢）ラット側頭骨内の蝸牛を開放し、リンパ液を枯渇させ、内耳を破壊する。生後13-15日で、Whole-Cell Patch Clamp 法を用い、LSO 細胞へ入力する抑制性シナプス後膜電流の種類を調べ、シナプス伝達のGABAからグリシンへのスイッチング変化に対する音入力による制御を検討した。これらの結果から音刺激が受けなければ、LSO 神経細胞の発達におけるGABAからグリシンへのスイッチング現象は正常時期より遅れることを判明した。抑制性神経伝達の発達変化に対して、同時期の入力回路活動が重要であり、音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。

Key Words 聴覚回路、音入力、発達、Whole-Cell Patch Clamp、シナプス後膜電流

緒言：

発達期における各種感覚入力によって関連する中枢神経回路が改変されるとの多くの報告がある (Rittenhouse et al.、1999; Di Cristo et al.、2001)。また抑制性回路に関しても感覚入力の遮断によって正常発達が阻害されることが近年報告され始めた。抑制性神経伝達の発達に関しては近年、多くの新知見があり、例えば視覚や聴覚のシステムでは感覚入力遮断は抑制性神経回路機能の正常発達を阻害する (Kapfer et al.、2002)。

外側上オリーブ核 (LSO) は左右耳からの音入力と同じ細胞に統合される最初の聴覚中枢であり、左右の耳に入力する音の強度差を検出している (Koyano et al.、1996)。幼若期ラット LSO 細胞はγアミノ酪酸 (GABA) を受けており、成熟に伴ってグリシン性入力へとスイッチする。このスイッチングの時期は正常ラットの聴覚発生時期と重なる。ラットやスナネズミが聴覚獲得するこの時期の前後に LSO において多くの形態および機能変化がおこる。生後2週間に、LSO では大規模なシナプスの再構築が形態と機能両方の変化として起こる。一方、生後1週目での蝸牛破壊は抑制性シナプスにおける軸索と樹状突起の形態的再編成を阻害する (Sanes et al.、1992)。幼若スナネズミにおける対側蝸牛破壊は生体におけるストリキニーネ慢性投与と同様に、抑制性入力シナプスおよび LSO 樹状突起の形態の正常発達を阻害する (Sanes et al.、1992)。本研究で聴覚回路形成過程への音情報

入力の影響を解明するため、ラットの LSO 神経細胞で音刺激の有無によりシナプス伝達の GABA からグリシンへのスイッチング現象を検討した。

対象と方法：

内耳破壊

SDラットで生後 6 日齢に両側の内耳破壊を行った。ラットはジエチルエーテルにて麻酔し、耳介後部を切開した。手術顕微鏡下に中耳腔を開放し蝸牛の骨壁を同定した。蝸牛は耳科手術用針を用いて注意深く破壊した。一方、対照モデルは耳介後部切開のみのラットを用いた。創部を縫合した後、動物は完全に麻酔から覚めるまで温熱板の上で加温し、その後ケージに戻して 15 日齢まで飼育した (図 1)。

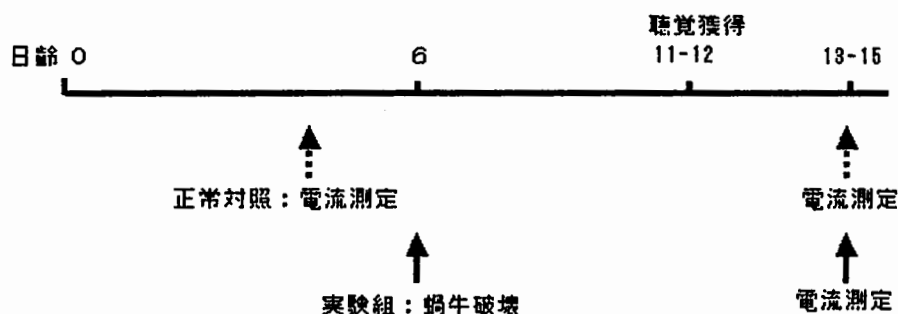


図 1 内耳破壊動物による実験。

LSO 神経細胞の脳薄切片および急性単離標本の作製

中枢神経細胞の急性単離は以前の記述のとおり行った (Nabekura et al., 1996)。ラットをエーテル麻酔下に断頭し、脳を摘出して氷温の人工脳脊髄液 (ACSF 液：後述) で冷却した。ビブラトーム (VT1000, Leica, Germany) を用いて脳薄切片 (厚さ 400 マイクロメートル) を作製した。脳薄切片は ACSF 液にて室温で 1 時間静置後、培養用プラスチック皿に移した。先端を細らせたガラス電極を顕微鏡下で LSO 核表面上に接触させ、水平振動を加え、機械的に細胞を単離した。単離した LSO 細胞は 10 分ほどでプラスチック皿の底部に付着し、その後直ちに電気生理学の実験に使用した。

溶液

脳薄切片作成と電流記録に以下の組成の外液を用いた。ACSF 液 (mM：脳薄切片用)、NaCl 124、KCl 5、 KH_2PO_4 1.2、 MgSO_4 1.3、 CaCl_2 2.4、glucose 10、 NaHCO_3 24、pH 7.45、95% O_2 -5% CO_2 で飽和。電流記録には標準外液 (mM)、NaCl 150、KCl 5、 MgCl_2 1、 CaCl_2 2、glucose 10、HEPES 10、Tris-base にて pH 7.4 に調整したものに 3×10^{-7} M tetrodotoxin (TTX) と 10^{-5} M LaCl_3 を加えて用いた。ホールセルパッチ記録法の記録電極内液の組成 (mM) は CsCl 92、Cs methanesulfonate 50、TEA-Cl 5、EGTA 2、ATP-Mg 4、HEPES Tris-base にて pH 7.4 に調整した。

電気生理学的測定

すべての電気生理学的記録は Whole-Cell Patch Clamp 記録法にて行った。電流の測定にはパッチクランプ用アンプ (CEZ-2300, Nihon kohden, Japan) を用い、1kHz 以下の電気信号のみをオシロスコープ、ペンレコーダーとデジタルテープレコーダーで記録した。記録用電極は外径 1.5mm のガラス管 (G-1.5, ナリシゲ, Japan) から微小電極作製機 (PB-7, ナリシゲ, Japan) で作製した。電極抵抗は 4 - 8M Ω を使用した。各薬物を含む標準外液の投与には Y チューブ法を使用した。本方法により 1 個のニューロン周囲の細

胞外液を20ミリ秒以内に新しい細胞外液と完全に置換した (Nabekura et al. 1993)。

結果：

LSO 神経細胞で記録できたシナプス後膜電流の属性

Whole-Cell Patch Clamp 電氣的記録を行った。この方法を用いると、異なる膜電位において電流の大きさを測定し、応答の平衡電位が Cl^- の平衡電位 (E_{Cl}) とほぼ一致することを確認した (右図)。

GABA受容体の blocker である

bicuculline とグリシン受容体である strychnine を細胞へかけてみると、電流が全消失した。これらの結果から記録できた電流はGABAとグリシン受容体を介した抑制性シナプス後膜電流であることを判明した。

蝸牛破壊におけるスイッチング現象の延滞

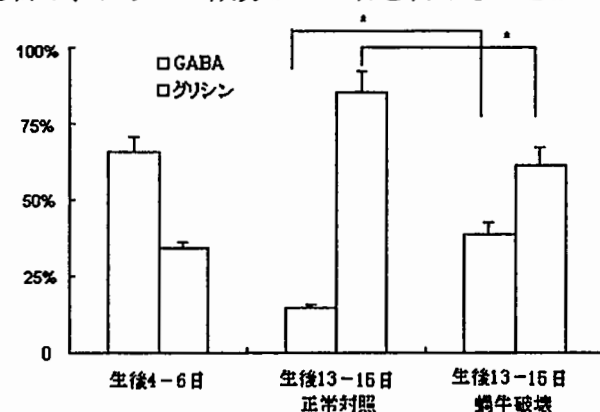
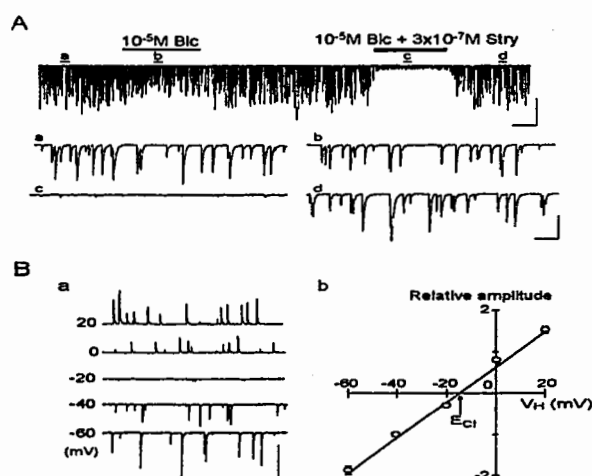
生後 4-6 日齢と 13-15 日齢のラットから急性単離した LSO 細胞に適用し、各細胞においてGABAとグリシン成分の割合を調べることににより、生後 4-6 日齢の LSO 神経細胞ではGABA成分が平均で65.7%を占め、グリシン成分が34.8%を占めることがわかった ($n=5$)。

13-15 日齢では、GABA成分が平均で14.9%を占め、グリシン成分が84.5%を占めることがわかった ($n=7$) (右図)。

一方、6 日齢で蝸牛を破壊し、13-15 日齢まで飼育したラットから単離した LSO 細胞においてGABAとグリシン成分の割合を調べることににより、GABA成分が平均で38.7%を占め、グリシン成分が61.3%を占めることがわかった ($n=9$)。これらの結果から、音刺激が缺如におけるラット LSO 神経細胞においてGABAからグリシンへのスイッチング現象は延滞されることがわかった。

考察：

LSO は同側耳からの音入力を同側蝸牛神経核より直接グルタミン酸作動性入力として受け、同側耳から対側蝸牛神経核—台形体内側核 (MNTB) を介して GABA/ グリシン作動性入力を受けている (Kotak et al., 1998)。この構築によって、LSO 細胞は左右耳からの音入力と同じ細胞に統合される最初の聴覚中枢であり、左右の耳に入力する音の強度差を検出している (Sanes et al., 1992; Koyano et al., 1996)。LSO は γ アミノ酪酸 (GABA) を受けており、成熟に伴ってグリシン性入力へとスイッチする。さらに興味深いことに正常ラットの聴覚発生時期は生後11-12日齢であり、LSO 神経細胞におけるGABAからグリシンへのスイッチングの時期と重る。このスイッチングの現象の引き金となっている可能性が高



いと思われる。

生後1週目における蝸牛破壊はLSO神経細胞自体と抑制性入力線維の形態学的変化をもたらす (Sanes et al., 1992)。幼若スナネズミにおける対側蝸牛破壊は生体におけるストリキニーネ慢性投与と同様に、抑制性入力シナプスおよびLSO樹状突起の形態の正常発達を阻害する。また、LSO細胞はクロライドイオン濃度調節機構の聴覚入力依存性発達変化する。同側・対側両方からの音入力にLSOの調節機構の成熟に重要であり、LSO神経細胞を興奮させるという共通の能力を反映していることがもっとも考えられる。

本研究は聴覚発生前(生後6日齢)ラット側頭骨内の蝸牛を開放し、内耳を破壊する。今回の結果から音刺激が受けなければ、LSO神経細胞の発達におけるGABAからグリシンへのスイッチング現象は正常時期より遅れることを判明した。抑制性神経伝達の発達変化に対して、同時期の入力回路活動が重要であり、音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。本研究ではLSOでの一つの決定的な生理的変化、すなわちGABAからグリシンへのスイッチング現象が聴覚入力に依存していることを示した。このスイッチングは聴覚発達に必要であることを示した。外界からの情報入力は聴神経回路網の発達形成に深く関与し、抑制性神経伝達の発達変化に対して、同時期の入力回路活動が重要であり、音刺激が聴覚回路の成熟に重要であることが示唆された。

参考文献：

- 1 Rittenhouse, C.D., Shouval, H.Z., Paradiso, M.A. and Bear, M.F., 1999. Monocular deprivation induces homosynaptic long-term depression in visual cortex. *Nature*. 397, 347-350.
- 2 Di Cristo, G., Berardi, N., Cancedda, L., Pizzorusso, T., Putignano, E., Ratto, G.M. and Maffei, L., 2001. Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science*. 292, 2337-2340.
- 3 Kapfer, C., Seidl, A.H., Schweizer, H. and Grothe, B., 2002. Experience-dependent refinement of inhibitory inputs to auditory coincidence-detector neurons. *Nat Neurosci*. 5, 247-253.
- 4 Koyano, K. and Ohmori, H., 1996. Cellular approach to auditory signal transmission. *Jpn J Physiol*. 46, 289-310.
- 5 Sanes, D.H., Markowitz, S., Bernstein, J. and Wardlow, J., 1992. The influence of inhibitory afferents on the development of postsynaptic dendritic arbors. *J Comp Neurol*. 321, 637-644.
- 6 Nabekura, J., Omura, T. and Akaike, N., 1996. Alpha 2 adrenoceptor potentiates glycine receptor-mediated taurine response through protein kinase A in rat substantia nigra neurons. *J Neurophysiol*. 76, 2447-2454.
- 7 Kotak, V.C., Korada, S., Schwartz, I.R. and Sanes, D.H., 1998. A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci*. 18, 4646-4655.

注：本研究は、2005年10月20-22日「第15回日本耳科学学会総会」にて口演発表した。

作成日：2006年3月9日

対照ラット



蝸牛が破壊したラット

単離LSO神経細胞