

17. マウスのヘアドライヤーモデルによる熱性けいれん誘発後の遺伝子解析

生理学 (生体情報)

金子堅太郎, 加藤永子, 福島央之, 前川正夫, 堀 雄一

【目的】熱性けいれんは乳幼児にみられる最も多いタイプのけいれんである。臨床では良性疾患とされるが、長期的予後として側頭葉てんかんと関連性が指摘されている。そこで我々は、熱性けいれんが、側頭葉てんかんの病理像と結びつく長期的な影響を及ぼすか検討した。

【方法】実験にはICRマウスを用いた。熱性けいれんはヘアドライヤー法により惹起した。生後14日のマウスを3リットルのビーカー内に置き、直腸温をモニターした。ヘアドライヤーの温風で体温を毎分2℃ずつ上昇させ、41~43℃に維持し熱性けいれんを誘発した。その8時間、24時間、3週間後にケタミン・キシラジン麻酔下に海馬を摘出し、mRNAを抽出した。その後、real time RT-PCRを行い、比較Ct法によりSyntaxin 1Aの発現レベルを解析した。また、6週間後にTimm染色で苔状線維の異常発芽を評価した。

【結果】熱性けいれん群のSyntaxin1A発現レベルは非熱性けいれん群に比べて、8時間後 $79 \pm 3.4\%$ 、3週間後では $86 \pm 2.8\%$ と有意に減少を示した。また、熱性けいれん群において苔状線維の異常発芽が多い傾向が認められた。

【考察】培養神経細胞において、Syntaxin1Aノックダウンによる神経突起の発芽、伸長の増強が報告されている。本研究で観察された熱性けいれんによるSyntaxin1A発現の減少が、側頭葉てんかん患者に認める苔状線維の異常発芽という病理像を惹起する可能性が推察される。

【結論】本研究で明らかにした遺伝子変化が海馬ニューロンの興奮性を惹起するか電気生理学的手法によって検討する予定である。

18. 脊髄におけるシナプス伝達の視覚化 Brain Visionを用いた膜電位イメージング

¹⁾ 麻酔科学, ²⁾ 生理学 (生体情報)

沼田祐貴¹⁾, 金子堅太郎²⁾, 高薄敏史¹⁾, 山口重樹¹⁾, 濱口眞輔¹⁾, 堀 雄一²⁾

【目的】膜電位感受性色素は、膜電位の変化を蛍光強度に変換する。脊髄後角における痛覚受容ニューロンの活動を観察するため、マウス脊髄スライスにこの色素を負荷し、蛍光強度変化を高速イメージングシステムにより視覚的に捉え、神経細胞活動を観察するシステムを企画した。

【方法】4週齢のICRマウスの脊髄を摘出し、厚さ0.45 mmのスライスを作製した。フィルター上にスライスを載せ、30分間静置し固定した。膜電位感受性色素(di-4-ANEPPS)を滴下し、20分間染色後、余分な色素を洗い流し、遮光して30分間静置する。人工脳脊髄液を灌流したチェンバーにスライスが張り付いたフィルターを設置し、落射蛍光顕微鏡とCCDカメラ(MiCAM2)を用いて高速蛍光測定を行った。

【結果】後根流入部位を電気刺激し、蛍光強度変化が刺激部周辺から広がることが観察された。

脊髄後角において、GABA灌流投与による過分極、及び、NMDA灌流投与による脱分極が、それぞれ膜電位イメージングにより観察された。

【考察】膜電位イメージングシステムは膜電位を蛍光強度に変換し、観察するシステムである。本システムを用いた海馬の神経活動を観察した論文は数多く報告されているが、脊髄に関するものは比較的少ない。

我々は、脊髄において、電気刺激や薬液投与による神経活動の変化が観察可能なシステムを確立した。

【結論】膜電位イメージングによりマウス脊髄における神経活動を蛍光強度の変化として観察・測定することができた。

今後、本システムを活用し、末梢神経結紮による痛覚過敏の発症機序の解明をしていきたい。