



Effect of mannose, fructose and lactate on the preservation of synaptic potentials in hippocampal slices

齋藤, 実

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1305

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001305>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	齋 藤 実 ^{さいとうみのる}	（徳島県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第913号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成6年3月31日	
学位論文題目	Effect of mannose, fructose and lactate on the preservation of synaptic potentials in hippocampal slices （海馬切片のシナプス電位保持におけるマンノース、果糖、乳酸の効果）	
審査委員	主査 教授 岡田 安弘	
	教授 玉木 紀彦	教授 西塚 泰美

論文内容の要旨

はじめに

中枢神経における神経活動の維持にはグルコースと酸素の存在が必須である。これまでに脳切片を用いた研究ではATPなどの高エネルギーリン酸の保持に対してグルコース以外の糖や乳酸などの中間代謝物質がその基質となることが報告されている。しかし脳組織の高エネルギーリン酸レベルがある程度維持されても神経活動が維持されないことも報告されている。本研究においては海馬切片を用いグルコース以外の糖および乳酸を基質として切片のATP、クレアチンリン酸（CrP）などの高エネルギーリン酸レベルを測定するとともに切片から記録されるシナプス電位を指標として、グルコース以外の糖や乳酸の脳組織エネルギー代謝と神経活動の保持に対する効果について検討した。

方 法

体重200～300 gのモルモットを使用した。断頭後ただちに海馬を摘出し、約300～400 μ mの海馬切片を作成した。10mMグルコースを含む標準灌流液（NaCl：125、KCl：5、KH₂PO₄：1.24、MgSO₄：1.3、CaCl₂：2、NaHCO₃：26mM）を95%O₂－5%CO₂で飽和させ（灌流液pHは7.4）各切片を約20分間前イングベートした。海馬切片を測定用チャンバー内に移して、標準液を8 ml/minの速度で灌流しながら電位を記録した。本実験では温度は全て37度下で行なった。双極電極を用いて貫通線維を0.2 Hzの矩形波（巾0.1 ms）で刺激し（刺激装置：日本光電3101）、記録用ガラス電極（抵抗：1～5 M Ω ）を通して顆粒細胞層に誘発される順行性電位を集合電位（population spikes：PS）として記録した。また苔状線維を双極電極を用いて刺激して得られる逆行性電位（antidromic response：AR）も同時に同じ記録電極から記録した。刺激の強度はいずれも最大刺激で得られる電位の最大振幅の70%になる強さに固定した。標準液で20分間灌流し電位が安定した後に標準灌流液をグルコースの代わりに5 mMの乳酸、10mMのマンノース、または10mMの果糖を含んだ灌流液でそれぞれ置換し、PSの変化を記録した。各灌流液は95%O₂－5%CO₂で飽和させ、pHを7.4とした。一方各切片をグルコース、マンノース、果糖、乳酸を含む

灌流液で0、10、30、60、90分間インキュベーションした時の各切片のATP、CrP濃度を測定した。ATP、CrPは切片を1mMEDTAを含む0.5M過塩素酸で処理、ホモジナイズした後2MKHCO₃で中和した抽出液から測定した。測定にはATP、CrPから酵素的に産生されるNADPHを蛍光光度計を用いて微量定量した。切片の蛋白量はLowryの方法によって測定した。

結 果

(1) グルコースを灌流液から除去したときの電位変化

灌流液からグルコースを除去した場合、PSの振幅は7～10分で減少しはじめ40分で消失した。90分間灌流液からグルコースを除去した後に再び灌流液にグルコースを加えると、30分後にはPSは最初の30%まで回復した。一方ARは灌流液からグルコースを除去している間も最初の80%以上に維持されており、90分後に再びグルコースを加えるとほぼ完全に回復した。

(2) 灌流液のグルコースを乳酸、果糖、マンノースで置換したときの電位変化

グルコースの代わりに5mMの乳酸を含んだ灌流液で置換すると、PSはグルコース除去時に観察されたように20～30分で消失する。しかし30～40分後には一旦完全に消失していたPSがその振幅を徐々に増大しはじめ、90分後にはPSの振幅がもとの70%までに回復した。ARの振幅は乳酸置換後40分で一旦もとの70%まで低下するが、90分後にはもとの90%まで電位は回復した。グルコースの代わりに10mM果糖を含んだ灌流液で置換した場合もPSは同じ経過で消失し、その後回復した。一方グルコースの代わりに10mMのマンノースを含んだ灌流液で置換した場合は、PSの減少はより緩徐であり、20分後にもとの振幅の40～50%まで低下するが90分後には一旦消失したPS振幅はもとの90%までに回復した。この場合AR振幅は85%以上に維持されていた。

(3) グルコース除去時、およびグリコースを乳酸、果糖、マンノースで置換時の海馬切片のATP、CrP濃度

海馬切片をグルコースを含まない灌流液でインキュベートしたときのATP、CrPの値は90分後にはもとの40%まで低下し、標準灌流液の場合と比べて有意に低値を示した。グルコースの代わりに灌流液に各々5mM乳酸、10mM果糖、または10mMマンノースで置換するといずれの場合もATP、CrP値はもとの濃度に比して変化は認められなかった。

(4) グルコース・乳酸共存灌流液からグルコースのみを除去したときの電位変化

上述のように灌流液のグルコースを乳酸に置換した場合、PSは一旦消失して回復する経過をとるが、もしグルコースと乳酸を同時に作用させた後にグルコースを除去した場合にはこの一過性のPSの消失がみられるかどうかを検討した。10mMのグルコースと5mMの乳酸を同時に含んでいる灌流液内でPSを20分以上安定させた後に灌流液からグルコースのみを除去した。この場合もグルコースを乳酸で置換した場合と同様の時間経過でPSの振幅は低下、消失した。しかしPS消失してから10分後にPSは回復しはじめ90分後にはもとの60%まで回復した。またグルコースと乳酸存在下および、乳酸で置換後の切片のATP、CrP濃度には変化はみられなかった。

考 察

神経活動の維持にはグルコースと酸素が必須であり、特にグルコースが存在しない条件ではグルコースの代わりに他の糖や中間代謝物質によりATPなどの高エネルギーリン酸が保たれても神経活動は維持できないと考えられている。しかし海馬切片を用いた本研究におけるように神経活動の消失後の長期にわたる観察の結果、1)～3)に示したように灌流液のグルコースを乳酸、果糖に置換する

と、P Sは20～30分で消失したが、P Sが消失した後10分～20分経過した後にグルコースが存在しなくても、乳酸、果糖が存在すればP Sが回復した。この時切片のA T P、C r P濃度は乳酸、果糖で置換する前と変わらずもとの値に維持されていた。またマンノースで置換した場合はP Sの減少は緩徐であったが、同様なP Sの回復が観察された。

乳酸、果糖、マンノースで置換後A T P、C r Pのレベルが置換前と同じ濃度に維持されることからこれらの糖・中間代謝物質が高エネルギーリン酸産生の基質になっていることは確かであるが、しかし産生されたA T Pがシナプス伝達に利用されるのに一定の時間が要するとすれば、灌流液のグルコースを乳酸に置換する前にグルコースと乳酸を共存させグルコースのみを除去すれば一過性のP Sの消失がみられない可能性があると考えられる。しかし結果 4)に示したように、灌流液にあらかじめ乳酸が含まれていてもP Sの経時的変化は結果 2)に示したものと同じであった。この結果は、グルコースによる嫌氣的代謝が一旦遮断されてはじめて乳酸や他の糖から産生されたエネルギーがシナプス電位維持に利用されることを示している。

乳酸、果糖、マンノースから産生されたA T Pがどのようにしてシナプス電位維持に利用されるかの本態は今後なお研究を要するが、本研究の海馬切片を用いた研究結果から一過性の電位消失時期はあってもこれらの糖・中間代謝物質はエネルギー代謝と神経活動の維持の両面に対してグルコースに置換しうるものがあきらかになった。

論文審査の結果の要旨

神経活動の維持にはそのエネルギー源としてのグルコースの存在が必須であることはよく知られている。しかし神経活動の維持に関してグルコース以外の糖やグルコースの中間代謝物質がグルコースに置換し得るかどうかの系統的な研究はなされていない。本研究においては海馬の切片を用い、それから記録される神経活動（シナプス電位）と切片に含まれるA T P、クレアチンリン酸（C r P）などの高エネルギーリン酸レベルを指標として、灌流液のグルコースをマンノース、果糖、乳酸で置換した時の効果について検討した。

方法としてはモルモット海馬切片の貫通線維を電気刺激し、歯状回顆粒細胞層からシナプス電位（集合電位、population spike, P S）を記録し、灌流液に含まれる10mMグルコースを10mMマンノース、10mM果糖又は5mM乳酸で置換後、90分間シナプス電位の変化を追跡するとともに、置換後0分、10分、30分、90分の時点での切片に含まれるA T P及びC r Pを定量し、神経活動とエネルギーレベルとの相関を追求した。神経活動すなわちシナプス電位の維持の面からみると、グルコースを除去した灌流液ではP Sは30～40分で消失し、再びグルコースを加えると徐々に回復した。グルコースの代りに果糖、乳酸で置換した場合30分でP Sは一旦消失するが、30～40分後には一旦完全に消失していたP Sがその振幅を増大しはじめ、90分ではもとの70%にまで回復した。マンノースで置換した場合にも同様の変化が認められたが、P Sの消失の時間がより緩徐で回復も良かった。

一方、切片のA T P、C r Pについては灌流液からグルコースを除去した場合A T P、C r Pは徐々に減少しはじめ、90分でもとの40%に減少した。しかし興味あることには、グルコースの代りにマンノース、果糖、乳酸で置換した場合切片のA T P、C r Pは減少せず、もとの濃度のままに維持されていた。これらの事実は脳組織におけるA T P、C r Pの産生にはマンノース、果糖、乳酸はその基質になり得るが、シナプス電位の維持についてはそれから産生されたA T Pが利用されるには一定の時間が必要であることを示している。その現象の本態についてはさらなる研究を要するが、海馬

切片を用いた本研究成果は従来行なわれなかった神経活動の維持とエネルギー代謝との相関を明らかにする上に重要な知見を得たものとして価値ある集積である。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。