



The effects of lactate and β -hydroxybutyrate on the energy metabolism and neural activity of hippocampal slices from adult and immature rat

和田, 浩

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1731

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001731>

※ 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）	和田 浩（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1128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10年3月31日
学位論文題目	The effects of lactate and β -hydroxybutyrate on the energy metabolism and neural activity of hippocampal slices from adult and immature rat (成熟及び未熟ラット脳海馬切片のエネルギー代謝と神経活動に対する乳酸及び β ヒドロキシ酪酸の効果)
審査委員	主査 教授 岡田 安弘 教授 中村 肇 教授 岡村 均

論文内容の要旨

1. はじめに

酸素とグルコースの存在は、脳組織のエネルギー代謝及び神経活動の維持に必須であることはよく知られている。酸素またはグルコース欠如に対する抵抗性は、動物脳の成熟度により異なり、幼若動物の脳は成熟動物の脳に比較して虚血（無酸素、無グルコース）に対する抵抗性が高い。

一方、グルコース非存在下の条件に対する抵抗性は未熟なラットでより大きいことを我々は既に報告しているが、今回我々は発達期脳及び成熟脳の神経機能に対するグルコース及びその代謝物質の作用を明らかにする目的で、様々な日齢のラットの脳海馬切片を用い、酸素存在下に、グルコース除去及びグルコースを乳酸または β ヒドロキシ酪酸（以下 β HB）で置換した状態において、切片のエネルギーレベルとシナプス伝達を指標とした神経活動の変化を経時的に観察し、これらの物質がグルコースに代謝できるかどうかを検討した。

2. 方法

I.] 海馬切片の作製：日齢4, 7, 10, 13, 16の未熟ラット及び日齢約120の成熟ラットから脳を摘出後、厚さ300ないし400 μ mの海馬切片を作製した。持続的に酸素が供給された標準リンゲル液（グルコース10mMを含む）に切片を入れ、30分の前インキュベーションの後実験を開始した。実験はすべて37°C下で実施した。

II.] 神経活動の記録：各切片をメジウム 1) グルコース除去リンゲル液、メジウム 2) グルコースを乳酸（5mM）に置換したリンゲル液、またはメジウム 3) グルコースを β HB（10mM）に置換したリンゲル液（何れも充分量の酸素を投与）を還流させたチャンバーにセットした。メジウム還流速度は4 ml/分とした。神経活動の指標として歯状回の苔状線維を刺激し、CA3野の錐体細胞層で記録される集合電位（以下PS）の変化を60分間測定した。その後還流液を標準リンゲル液に置換し、30分間PSの変化を観察した。

III.] 生化学的解析：各切片の高エネルギーリン酸の変化を調べるため、海馬切片をII.]と同様に

変化させた還流液中に置き、30分後及び60分後の切片のATPとクレアチンリン酸（以下CrP）濃度を測定した。ATP及びCrP濃度は、NADPHの産生量から酵素的方法及び蛍光法により測定されたATP、CrP量を切片の蛋白量で除して求めた。

3. 結 果

a.) グルコース除去

ATP及びCrP濃度で評価される各海馬切片のエネルギーレベルは、未熟脳ではグルコース除去後60分まで殆ど変化しなかったのに対し、成熟脳では徐々に減少し、60分では初期値の55%まで低下した。一方神経活動の指標としてのPSはいずれも30分以内の短時間で消失し、その消失までの時間は成熟度に伴い短くなった。60分間のグルコース除去後標準液を再灌流しても、成熟脳では電位の回復は認められなかった。また生後4日の未熟ラットの海馬切片ではATPレベルの低下が顕著でないにもかかわらず、PSは消失していた。

b.) グルコースを乳酸で置換した場合

酸素の存在下においては、グルコースの中間代謝物質である乳酸は好氣的代謝を介してATP産生を容易に行うと考えられる。本実験系においてグルコースを乳酸に置換することにより、未熟脳、成熟脳何れの場合にも各切片に含有されるATP及びCrPのレベルは高値を維持しており、成熟ラット脳でも置換後60分の値は初期値の90%以上であった。しかしこのように切片のエネルギーレベルが高く維持されているにもかかわらず成熟脳においては神経伝達を示すPSはグルコース除去と同様の時間経過で20分以内に消失した。一方生後4日未熟脳においては置換60分でもPSの振幅は高く維持されていた。

c.) グルコースを β ヒドロキシ酪酸で置換した場合

グルコースをケトン体の代表的な物質である β HBに置換した場合、乳酸による置換の場合と同様未熟脳、成熟脳ともに切片のATP、CrP濃度は高く維持されていた。この場合も生後4日の未熟脳において置換後60分でもPSの振幅は高く維持されていたが、生後7日、10日の脳ではPSは早期に減退し、成熟脳では20分以内に消失した。

以上の結果より、成熟脳では切片のATPが高値に保たれているにもかかわらずPSが消失するが、生後4日の未熟脳では、置換60分の経過の後でも、ATP及びCrP濃度の維持とともにPS振幅も初期のレベルを維持することが明らかとなった。

4. 考 察

本研究も含めて、我々の脳切片を用いたエネルギー代謝と神経活動についてのこれまでの研究から
1) 酸素とグルコースを除去した場合（虚血）、ATPレベルの減少、消失経過よりもPSの消失までの時間がより短いこと 2) グルコースをその中間代謝物質などの他の基質で置換してもPSが維持できないことから、神経活動の維持にはグルコースが必須であること 3) 未熟な動物（ラット）はグルコース除去に対する抵抗性がより高いことなどの結論が導かれてきた。

グルコースの乳酸による置換では、集合電位だけでなく細胞内記録によっても同様の結果が得られている。今回の結果から、生後4日の未熟ラットの脳においては、乳酸や β HBが、エネルギーレベルだけでなく神経活動の維持にも関与し得ることが示された。一方、今回の実験では海馬CA3流域よりPSを記録したが、歯状回における報告では、乳酸による置換で成熟ラットでもPSが維持されることが明らかにされており、脳の各部位におけるエネルギーレベルと神経活動の関係については更に検

討が必要であると考えられる。

グルコースが神経活動の維持に対しどのように作用しているかは未だ明らかではないが、未熟なラットでは好氣的代謝により産生されたATP がコンパートメントと、嫌氣的代謝により産生されたATP コンパートメントの両者が、神経活動の維持を担っている可能性が推測される。一方成熟脳ではこの両者が分化、独立して機能するようになり、好氣的代謝によるATP は細胞の生命維持に利用されるが、神経伝達機能のためのエネルギーとしては用いられなくなる可能性が考えられる。

以上総括して、成熟脳の切片においてはその代謝面からみて、酸素を介しての酸化的磷酸化によるエネルギー産生が主体であるにもかかわらず、神経活動の維持にはグルコースの存在が必須であり、乳酸、 β HB等の他の中間代謝物質ではグルコースに置換できないのに対し、生後4日という未熟なラットの脳切片では、グルコースを乳酸等のグルコース中間代謝物質で置換しても神経機能が維持されることが明らかとなり、発達の初期の段階では、嫌氣的代謝が主体であるにもかかわらず、機能的には好氣的代謝によって合成されるATP でも代償し得る可能性があることが推察された。

5. 結 論

グルコースや乳酸や β HBで置換した場合、ラット未熟脳海馬切片においても成熟脳切片においてもエネルギーレベルを維持することができるが、神経機能（シナプス伝達）の面では成熟脳では維持できないことが明らかとなった。即ち乳酸や β HBは生後4日という未熟脳では神経機能を維持できるが、生後7日以降の脳切片では維持できず、グルコースの存在が必須であることが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

酸素とグルコースの存在は、脳組織のエネルギー代謝及び神経活動の維持に必須であるが、無（低）酸素または無（低）グルコースに対する抵抗性は動物脳の成熟度により異なり、幼若動物の脳は成熟動物の脳に比較して虚血（無酸素、無グルコース）に対する抵抗性が高い。本研究において申請者等は、発達期脳及び成熟脳の神経機能に対するグルコース及びその代謝物質の役割を明らかにする目的で、様々な日齢のラットの脳から海馬切片を作製し、酸素存在下に、グルコース除去及びグルコースを乳酸または β ヒドロキシ酪酸（以下 β HB）で置換した状態において、切片のエネルギーレベルと切片でのシナプス伝達を指標とした神経活動の変化を経時的に観察し、これらの物質がグルコースに代償できるかどうかを検討した。

まず日齢4, 7, 10, 13, 16の未熟ラット及び日齢約120の成熟ラットから脳を摘出し海馬切片を作成した。酸素で飽和されたグルコース（10mM）を含む標準リングル液に切片を入れ、30分の前インキュベーションの後実験を開始した。実験はすべて37℃下で実施した。次に、充分量の酸素投与下に、各切片をグルコース除去リングル液、グルコースを乳酸に置換したリングル液、またはグルコースをケトン体の代表的な物質である β HBに置換したリングル液を還流されたチャンバーにセットした。神経活動の指標として歯状回の苔状線維を刺激し、CA3野の錐体細胞層で記録される集合電位（population spike, 以下PSと略す）の変化を60分間測定した。その後還流液を標準リングル液に置換し、30分間PSの変化を観察した。一方、各切片の高エネルギーリン酸の変化を調べるため、海馬切片を同様に処理した還流液中に置き、30分後及び60分後の切片のATP とクレアチンリン酸（creatine phosphate, 以下CrP）濃度を測定した。

その結果、まず還流液からグルコースを除去した場合、各海馬切片のエネルギーレベルは未熟脳で

はグルコース除去後60分まで殆ど変化しなかったのに対し、成熟脳では徐々に減少し60分では初期値の55%まで低下した。一方PSは何れも30分以内に消失し、その消失までの時間は成熟に伴い短縮された。60分間のグルコース除去後標準液を再灌流しても、成熟脳では電位の回復は認められなかった。また生後4日の未熟ラットの海馬切片ではATPレベルの低下が顕著でないにもかかわらずPSは消失した。

次にグルコースを乳酸(5mM)で置換した場合、未熟脳、成熟脳何れの場合にも各切片のATP及びCrPのレベルは低下せず、成熟ラット脳でも置換後60分で初期値の90%以上と高値を維持していた。しかし成熟脳ではPSはグルコース除去と同様の時間経過で20分以内に消失した。一方生後4日の未熟脳では置換後60分でもPSの振幅は高く維持されていた。さらにグルコースを β HB(10mM)で置換した場合も乳酸で置換した場合と同様の結果が得られた。

以上の結果より、成熟脳では切片のATPが高値に保たれているにもかかわらずPSが消失するが、生後4日の未熟脳では、置換60分の経過の後でもATP及びCrP濃度の維持とともにPS振幅も初期のレベルを維持することが明らかとなり、未熟脳では乳酸や β HBがエネルギーレベルだけでなく神経活動の維持にも関与し得ることが示された。

グルコースの神経活動維持に対する作用の詳細は未だ明らかではないが、成熟ラットでは好氣的代謝により産生されたATPコンパートメントと嫌氣的代謝により産生されたその両者が、神経活動の維持を担っているのに対し、成熟脳ではこの両者が分化、独立して機能するようになり、神経伝達機能のためには嫌氣的解糖により産生されるエネルギーが利用される可能性が示された。

本研究は神経機能の維持に必須であると考えられているグルコースについて、ラット発達期脳および成熟脳の海馬切片を用い、グルコースとその中間代謝物質および他の糖を与えた時のエネルギー代謝と神経機能との相関を追求したものであるが、従来ほとんど行われなかった神経機能維持に対するグルコースそのものの神経機能に対する役割の解明に重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。