



Anaerobic glycolysis is crucial for the maintenance of neural activity in guinea pig hippocampal slices

山根, 京子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2205

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002205>

※ 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。



【74】

氏 名・(本 籍) 山根 京子 (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1312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12年12月31日

【学位論文題目】

Anaerobic glycolysis is crucial for the maintenance of neural activity in guinea pig hippocampal slices

(糖の嫌氣的代謝はモルモット海馬切片における神経活動の維持に必須である)

審 査 委 員

主査 教授 横野 浩一

教授 真鍋 俊也 教授 上野 易弘

論文内容の要旨

[緒言]

神経活動の維持には酸素とグルコースの存在が必須であり、グルコースは ATP 産生のためのエネルギー基質として重要と考えられてきた。しかし、我々は脳切片を用いた研究で神経活動の維持にはグルコースの嫌氣的代謝が特異的に重要な役割を呈していることを報告してきた。すなわちグルコースをその中間代謝物質である乳酸やビルビン酸で置換した場合、切片の高エネルギーリン酸である ATP, クレアチンリン酸 (CrP) レベルは維持されても神経活動は維持されないことを明らかにしてきた。本研究においては糖の嫌氣的代謝に注目しグルコースをマンノース、果糖などの他の糖で置換した時の神経活動維持と高エネルギーリン酸との相関を追求した。さらに嫌氣的代謝が神経活動維持にどのように関わっているかを知るために、様々な糖の嫌氣的代謝速度と神経活動維持との相関について追求した。

[方法]

モルモット (250~350g) から脳を摘出し、厚さ 300~400 μm の海馬切片を作成した。切片作成時間は脳摘出後 1 分以内であった。各切片は 95%O₂, 5%CO₂ で飽和したグルコース 10mM を含む標準液 (リングル液) で 20 分間ブレイクベートをした。海馬における神経機能の指標としては貫通線維を電気刺激し、歯状回顆粒細胞層で誘発される場のシナプス後電位 (population spikes, PS) を記録した。切片はグルコースの代わりにマンノース、果糖、乳酸、ビルビン酸、無グルコースを含む各還流液を還流させ、PS を記録するとともに各切片の ATP, CrP を測定した。グルコース、マンノース、果糖などの糖の嫌氣的代謝速度は完全無酸素下にした時の乳酸の産生量を測定することによって決定した。

[結果]

- (1) 無グルコースおよびグルコースをマンノース、果糖、ビルビン酸、乳酸で置換した時の切片の PS と ATP, CrP レベルとの相関

標準液からグルコースを完全除去した場合、PS は 30 分以内に消失したが、その時点で ATP, CrP は元の 65%までに減少した。グルコースをマンノース、果糖で置換した場合、PS は一過性に減少したが続く 30 分以内に元のレベルの 90%まで回復した。切片の ATP, CrP 濃度は 100%に維持されたままであ

った。またグルコースを乳酸で置換した場合、PS は 30 分以内で完全に消失したがその後 70 分で元の 50% まで回復した。この場合にも切片に含まれる ATP, CrP 濃度は減少することなく 100% 維持されたままであった。

(2) グルコース、マンノース、果糖の嫌氣的代謝の速度

グルコース、マンノース、果糖の嫌氣的代謝速度を知るために完全無酸素下に産生される乳酸量を測定した。嫌氣的代謝速度はグルコースが一番速く (420mmol/kg protein/30min)、次いでマンノース、果糖であった。この順序はこれらの糖を基質にして PS が消失して行く経過と一致しており、嫌氣的代謝速度の速さが神経機能維持に関与している可能性が示された。

(3) 海馬切片作成法の違いによる乳酸置換時の PS と ATP, CrP の変化

グルコースを他の糖中間代謝物質で置換した場合 PS が一過性に低下、消失した後に回復した我々の研究結果は、Schurr らの乳酸はグルコースと同様、神経機能は好氣的代謝でも維持され、乳酸に置換した時に PS が消失せずに維持されるという報告とは大きく異なっていた。実験操作の上で我々の用いた海馬切片は脳摘出後 1 分以内に作成されたものであり、Schurr らの切片はピプラトームあるいはチョッパーを使って 10~20 分かかって作成されたものであった点で大きな差異があった。そこで我々は切片の作成方法の違いに着目した。我々の切片は切片作成中完全虚血の状態にさらされる時間は極めて短い、彼等の切片作成には 10~20 分間、虚血の状態に曝されていることが考えられた。彼らの切片作成にかかる時間を考慮して 20 分かけて切片を作成し、その海馬切片を用いてグルコースを乳酸に置換したところ一過性に 85% まで PS は減少したが完全消失はしなかった。これは先に述べた我々の方法による切片を乳酸で置換した時の結果とは異なっていた。次に我々の方法で作成した海馬切片を使って乳酸を 100 分還流させるとすでに述べたように PS は完全に消失しその後回復してきた。その後グルコースを含む標準液に還流させ、再度乳酸のみの還流液で置換し還流させると PS は消失することなく維持されていた。

[考察]

本研究では嫌氣的代謝速度は神経活動維持に関与しており、生理的条件下の海馬切片において神経活動の神経機能維持にはグルコースの嫌氣的代謝が必須であることが示された。またグルコースを乳酸で置換した場合一過性に PS が消失し回復して来る現象について脳組織が一過性に無グルコースや虚血に暴露

されることによってエネルギー利用が嫌氣的代謝から好氣的代謝へ転換される機序が存在する可能性を強く示唆している。この機序により Schurr らの作成方法による切片では乳酸でも PS 維持に利用され、PS が消失することなく維持されていた。すなわち従来の作成法による切片では PS は既に好氣的代謝に転換された後の PS を測定していたものと考えられる。

最近での PET による研究や *invivo* の研究においてグルコース代謝や乳酸産生の測定で、神経活動時にはグルコースの好氣的代謝よりも嫌氣的代謝が主であるという報告がなされている。これらの報告は我々の研究結果と一致し、生理的条件下においては神経機能維持にはグルコースの嫌氣的代謝そのもの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			
受付番号	甲 第1315号	氏 名	山根 京子
論文題目	糖の嫌氣的代謝はモルモット海馬切片における 神経活動の維持に必須である Anaerobic glycolysis is crucial for the maintenance of neural activity in guinea pig hippocampal slices		
審査委員	主 査 横 野 浩一 副 査 真 鍋 俊也 副 査 上 野 易弘		
審査終了日	平成 / 2 年 11 月 29 日		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

神経活動の維持には酸素とグルコースの存在が必須であり、グルコースはATP産生のためのエネルギー基質として重要と考えられてきた。しかし、我々は脳切片を用いた研究でグルコースをその中間代謝物質である乳酸やピルビン酸で置換した場合、切片の高エネルギーリン酸であるATP、クレアチンリン酸（CrP）レベルは維持されても神経活動は維持されないことを明らかにしてきた。本研究においては糖の嫌氣的代謝に注目しグルコースをマンノース、果糖などの他の糖で置換した時の神経活動維持と高エネルギーリン酸との相関を追求し、さらに嫌氣的代謝が神経活動維持にどのように関わっているかを知るために、様々な糖の嫌氣的代謝速度と神経活動維持との相関について追求した。

研究の方法として、モルモット（250～350g）から脳を摘出し、厚さ300～400 μm の海馬切片を作成した。切片作成時間は脳摘出後1分以内であった。各切片は95%O₂, 5%CO₂で飽和したグルコース10mMを含む標準液（リングル液）で20分間ブレイクベートをした。海馬における神経機能の指標としては貫通線維を電気刺激し、歯状回顆粒細胞層で誘発される場のシナプス後電位（population spikes, PS）を記録した。切片はグルコースの代わりにマンノース、果糖、乳酸、ピルビン酸、無グルコースを含む各還流液を還流させ、PSを記録するとともに各切片のATP, CrPを測定した。無グルコースの実験では還流液からグルコースを完全に除去した。グルコース、マンノース、果糖などの糖の嫌氣的代謝速度は完全無酸素下にした時の乳酸の産生量を測定することによって決定した。

標準液からグルコースを完全除去した場合、PSは30分以内に消失したが、その時点でATP, CrPは元の65%までに減少した。グルコースをマンノース、果糖で置換した場合、PSは一過性に減少したが、続く30分以内に元のレベルの90%まで回復した。切片のATP, CrP濃度は100%に維持されたままであった。またグルコースを乳酸で置換した場合、PSは30分以内に完全に消失したがその後70分で元の50%まで回復した。この場合にも切片に含まれるATP, CrP濃度は減少することなく100%維持されたままであった。

グルコース、マンノース、果糖の嫌氣的代謝速度を知るために完全無酸素下に産生される乳酸量を測定した。嫌氣的代謝速度はグルコースを基質とした場合が一番速く ($420\text{mmol/kg protein/30min}$)、次いでマンノース、果糖であった。この順序はこれらの糖の存在下にPSが維持、消失して行く経過と一致しており、嫌氣的代謝速度の速さが神経機能維持に関与している可能性が示された。

グルコースを他の糖中間代謝物質で置換した場合、PSが一過性に低下、消失した後に再び回復するという我々の研究結果は、Schurrらの乳酸がグルコースと同様、神経機能は好氣的代謝でも維持され、グルコースを乳酸に置換した時にPSが消失せずに維持されるという報告とは大きく異なっていた。実験操作の上で我々の用いた海馬切片は脳摘出後1分以内に作成されたものであり、Schurrらの切片はピブラトームあるいはチョッパーを使って10~20分かかって作成されたものであった点で大きな差異があった。そこで我々は切片の作成方法の違いに着目した。我々の切片は切片作成中完全虚血の状態にさらされる時間は極めて短いが、彼等の切片作成には10~20分間、虚血の状態に曝されていることが考えられた。彼らの切片作成にかかる時間を考慮して20分かけて切片を作成し、その海馬切片を用いてグルコースを乳酸に置換したところ一過性に85%までPSは減少したが完全消失はしなかった。次に我々の方法で作成した海馬切片を使って乳酸を100分還流させると、すでに述べたようにPSは完全に消失し、その後回復してきた。その後グルコースを含む標準液に還流させ、再度乳酸のみの還流液で置換し、還流させるとPSは消失することはなく維持されていた。

本研究では嫌氣的代謝速度は神経機能維持に関与しており、生理的条件下の海馬切片において神経機能維持にはグルコースの嫌氣的代謝が必須であることが示された。またグルコースを乳酸で置換した場合一過性にPSが消失し、回復して来る現象について脳組織が一過性に無グルコースや虚血に暴露されることによってエネルギー利用が嫌氣的代謝から好氣的代謝へ転換される機序が存在する可能性を強く示唆している。

本研究は生理的条件下における神経機能維持についてグルコースの嫌氣的代謝が特異的に重要であることを示したものであり、神経機能に対するエネルギー代謝、特に嫌氣的代謝の役割について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。よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。