

2016 年度

東洋大学審査学位論文

低酸素換気応答におけるアストロサイトの役割

理工学研究科生体医工学専攻博士後期課程

学籍番号 46B0140001 氏名 福士勇人

# 目次

要旨	1
1. はじめに	4
2. 呼吸調節機構の概要	5
3. 低酸素換気応答機構	8
3.1 末梢化学受容器における低酸素感知機構	8
3.2 呼吸中枢ニューロンの低酸素応答	11
4. アストロサイトについて	14
4.1 グリア細胞	14
4.2 脳機能発現におけるアストロサイトの役割	14
4.3 呼吸調節機構におけるアストロサイトの役割	18
4.4 低酸素換気応答におけるアストロサイトの役割	21
4.4.1 アストロサイトの低酸素応答について	21
4.4.2 低酸素負荷によるアストロサイトの神経炎症の惹起	22
4.4.3 低酸素換気応答におけるアストロサイトの関与	22
5. 低酸素負荷時の大脳皮質機能と換気応答に関する実験	25
5.1 背景と目的	25
5.2 対象と方法	26
5.2.1 対象	26
5.2.2 脳波計測	27
5.2.3 呼吸計測	28
5.2.4 Whole body plethysmography の実験プロトコル	32
5.2.5 免疫組織化学	34
5.2.6 データ解析	34

5.3 結果	35
5.4 考察	41
5.5 補足	45
5.5.1 背景および目的	45
5.5.2 方法および実験プロトコル	46
5.5.3 データ解析	47
5.5.4 結果	47
5.5.5 結論	49
6. 低酸素負荷時のけいれん発生と換気抑制に関する実験	51
6.1 背景と目的	51
6.2 対象と方法	51
6.2.1 対象	51
6.2.2 脳波計測	52
6.2.3 呼吸計測	52
6.2.4 実験プロトコル	53
6.2.5 データ解析	54
6.3 結果	54
6.3.1 低酸素への換気と脳波の応答	54
6.3.2 低酸素負荷からけいれん発生までの時間	58
6.4 考察	59
7. おわりに	63
謝辞	66
文献	67

## 要旨

体内酸素レベルの恒常性維持は、生体の生命維持に不可欠であるが、これには呼吸調節機構、特に低酸素負荷時の呼吸応答が重要な役割を果たしている。低酸素負荷時の呼吸応答の機序は、従来、末梢化学受容器、およびそこからの入力を受ける延髄など下位脳幹内にある呼吸ニューロンネットワークを中心に考えられてきた。

生体が低酸素状態におかれると、頸動脈小体などの末梢化学受容器がその情報を感知し、延髄呼吸神経回路を興奮させるとともに、その情報が投射された高位脳が呼吸困難感を知覚し、視床下部から延髄呼吸神経機構へ投射する下行性の呼吸促進神経ドライブ (central command) を増強させ、呼吸が増強される。しかし、急激に強い低酸素状態におかれた場合は、このような呼吸調節がなされず、呼吸はむしろ抑制されてしまう。この反応は、低酸素換気抑制と呼ばれている。また、低酸素を負荷されると、けいれんが惹起され、けいれんに続いて強い換気抑制、呼吸停止が起こることがある。临床上、この低酸素換気抑制は重要な意味を持ち、健常人でも事故などで突然強い低酸素に曝された場合には、意識レベルの低下とともに呼吸困難感を知覚する間もなく、あるいは、それまで知覚していた呼吸困難感が減弱し、呼吸が抑制されてしまう。そして、この呼吸抑制のために低酸素状態がさらに悪化し、意識消失を起し、直ちに治療を受けないと死に至ることさえある。

低酸素換気抑制の出現機序については、いくつかの仮説が提唱されているが、未だ解明されていない。その仮説のひとつに、低酸素換気抑制は、呼吸に対して抑制的に働く大脳皮質が低酸素により刺激された結果生じるというものがある。この仮説は、大脳皮質領域の神経活動が呼吸を抑制すること、大脳皮質を剥離除去したネコでは低酸素に対する呼吸増強応答が促進することに拠っている。しかし、低酸素が大脳皮質を興奮させる直接的証拠がない点で、この説は根拠を欠いている。他にも低酸素換気抑制の出現機序として、(1) 脳血流増加に伴う脳組織 pH のアルカリ側へのシフト、(2) 脳内神経伝達・調節物質の合成、分泌、代謝の変化—特に、GABA、アデノシン、内因性オピオイドなどの呼吸抑制性物質の増加、(3) 酸素欠乏による呼吸ニューロンの直接代謝障害など

が示されているが、いずれも動物実験など実証による強い証拠を得るには至っておらず、低酸素換気抑制時に高位脳が果たす役割、特に大脳皮質が果たす機能的役割は不明なままである。

近年、従来は脳機能発現に直接関与しないと考えられていたグリア細胞が、神経細胞（ニューロン）と積極的な情報交換を行いつつ、ニューロンとは異なる仕組みで多様な脳機能発現に関与していることが明らかにされてきている。グリア細胞のなかでも、特にアストロサイトは、広範囲調節の機能を持ち、呼吸調節機構においても吸索性ニューロンと機能的に結合するなど重要な役割を担っていることが証明されてきている。また、アストロサイトが低酸素換気応答において低酸素センサー細胞として関与していることも示唆されている。

筆者は、アストロサイトが低酸素負荷時の大脳皮質機能と脳幹部呼吸中枢機能の維持に重要な役割を果たしているとの仮説の下、動物実験によりその妥当性を検証した。具体的には、無麻酔で意識のあるマウスを用い、アストロサイト活性化阻害剤であるアルンジン酸（arundic acid）の投与前、低用量投与後、高用量投与後の各条件下における低酸素負荷時の脳波と呼吸流量の応答を記録した。脳波はマウスの頭部に埋め込んだ微小電極により計測し、呼吸流量は whole body plethysmography により非侵襲的に計測した。解析に際しては、脳波から大脳皮質活動の度合を示すガンマ波帯域のパワーを評価するとともに、呼吸流量から分時換気量などの換気パラメーターを計算し、検討した。加えて、アストロサイトが低酸素負荷により賦活化され、発作的なけいれんの発生に関連する可能性が示されているため、arundic acid の低酸素負荷時のけいれんと換気抑制に対する効果も検討した。

酸素濃度 6%の強い低酸素負荷をかけられたマウスは、一過性の呼吸増強の後、呼吸抑制を示したが、強い低酸素負荷による呼吸抑制出現時には、高位脳活動が低下していることが示唆された。強い低酸素を負荷されると、大脳皮質機能が抑制され、覚醒度が低下し、視床下部から脳幹部へ投射する central command が減弱され、低酸素換気抑制が引き起こされると考えられる。また、アストロサイト活性化阻害剤がこの呼吸抑制を増強させたことから、アストロサイトが低酸素により活性化し、強い低酸素負荷時に、呼吸増強に続いて起こ

る呼吸抑制に拮抗的に働いていることが示唆された。一方、強い低酸素負荷時に前脳部のアストロサイトが活性化されるが、これがけいれん発生とその後の呼吸抑制を促進する可能性が示唆された。

以上の結果から、強い低酸素負荷時に脳内アストロサイトは活性化され、脳幹部では呼吸増強性に作用するのに対し、前脳部では逆にけいれんを発生させ、呼吸抑制性に作用すると考えられる。低酸素負荷時の最終的な呼吸出力は、拮抗し合うこれら二つの機構の活性化度のバランスにより決定されることが示唆された。

## 1. はじめに

体内の酸素分圧レベルの恒常性を維持することは、ヒトをはじめ酸素呼吸を行う生体の生命維持に不可欠である。そして、動脈血酸素分圧レベルの恒常性の維持には、呼吸による調節、特に生体が低酸素状態になった時の呼吸増強応答が重要な役割を果たしている。

低酸素負荷時の換気応答の機序は、従来、延髄を中心とする下位脳幹内にある呼吸ニューロンネットワークによる調節を中心に考えられていた。低酸素状態になると、動脈血中の酸素分圧が低下し、これを頸動脈小体などの末梢化学受容器が感知する。すると末梢化学受容器からの求心性インパルスが増加し、その情報が延髄背側部の孤束核を介して下位脳幹内の呼吸ニューロンネットワークの活動を増強させ、横隔神経などの呼吸器関連の遠心性運動神経出力を増加させ、換気量が増加する。

一方、最近の研究から、従来は脳の構造と機能の維持のために働き、脳機能を発現する神経情報の伝達・統合には直接関与しないと考えられてきたグリア細胞が、ニューロンと積極的な情報交換を行いつつ、ニューロンとは異なる仕組みで脳機能発現に寄与していることが明らかにされてきている。グリア細胞のなかでも特にアストロサイトは、広範囲調節の機能を有し、呼吸調節機構においても吸息性ニューロンと機能的に結合するなど重要な役割を担っている可能性が示されている。しかし、未だ不明な点も多く、特に大脳皮質などの高位脳が、下位脳幹の呼吸ニューロンネットワークの呼吸リズム形成にどのように関与し、その関与においてアストロサイトがどのような役割を果たしているかについてはほとんど明らかになっていない。

そこで本論文では、近年、注目を集めるアストロサイトが呼吸調節において果たす役割を明らかにするために、低酸素負荷時の換気応答に焦点を当て、呼吸調節におけるアストロサイトの役割に関する最近の報告と自ら行った実験から論述する。

なお、本論文では、低酸素換気応答が出現する酸素濃度 14%未満を低酸素とし、低酸素換気抑制が出現しうる酸素濃度 10%未満を強い低酸素とする。

## 2. 呼吸調節機構の概要

ヒトは覚醒時も睡眠中も常に呼吸をして、体内の酸素レベル、二酸化炭素レベルの恒常性を維持している。この自律的な呼吸活動は延髄を中心とする下位脳幹部で形成され、motor command として延髄の疑核や頸髄第3～第5髄節の横隔神経核などの呼吸運動ニューロンに伝達され、迷走神経、横隔神経などの運動神経線維を介して上気道開大筋、および横隔膜などの呼吸筋に伝わる。これらの指令で実現される換気の状態は、肺および気道にある末梢の機械受容器で感知されるとともに、ガス交換の結果としての血液ガスの状態が大動脈弓や頸動脈洞にある末梢化学受容器および主に延髄にある中枢化学受容器で感知される。これらの受容器からの情報は、脳幹部の呼吸ネットワークに送られ、換気状態や血液ガス状態に応じて呼吸出力が最適化されるように、フィードバック制御が行われている。自律的な呼吸活動を形成・維持する呼吸ネットワークが存在する下位脳幹内の領域を呼吸中枢と呼ぶ。下位脳幹内の多くの場所に呼吸中枢を構成するニューロン群が存在することが知られているが、延髄腹外側部の網様体に存在する pre-Bötzinger complex は、呼吸リズム形成において特に重要な働きをしている。呼吸中枢は、延髄腹側で左右対称に pre-Bötzinger complex を含んで縦方向に分布する延髄腹側呼吸ニューロン群 (VRG ; ventral respiratory group), 延髄背側で左右対称に孤束核を中心として縦方向に分布する延髄背側呼吸ニューロン群 (DRG ; dorsal respiratory group), 橋の吻外側部に位置する結合腕傍核 (parabrachial nucleus) および Kölliker-Fuse nucleus よりなる橋呼吸ニューロン群 (PRG ; pontine respiratory group) などにより構成され、それらは左右に、そして縦方向に相互に結合して大規模な呼吸ニューロンネットワークを形成している (Ezure 1990 ; Feldman and Del Negro 2006 ; 岡田 2009) (図 1).



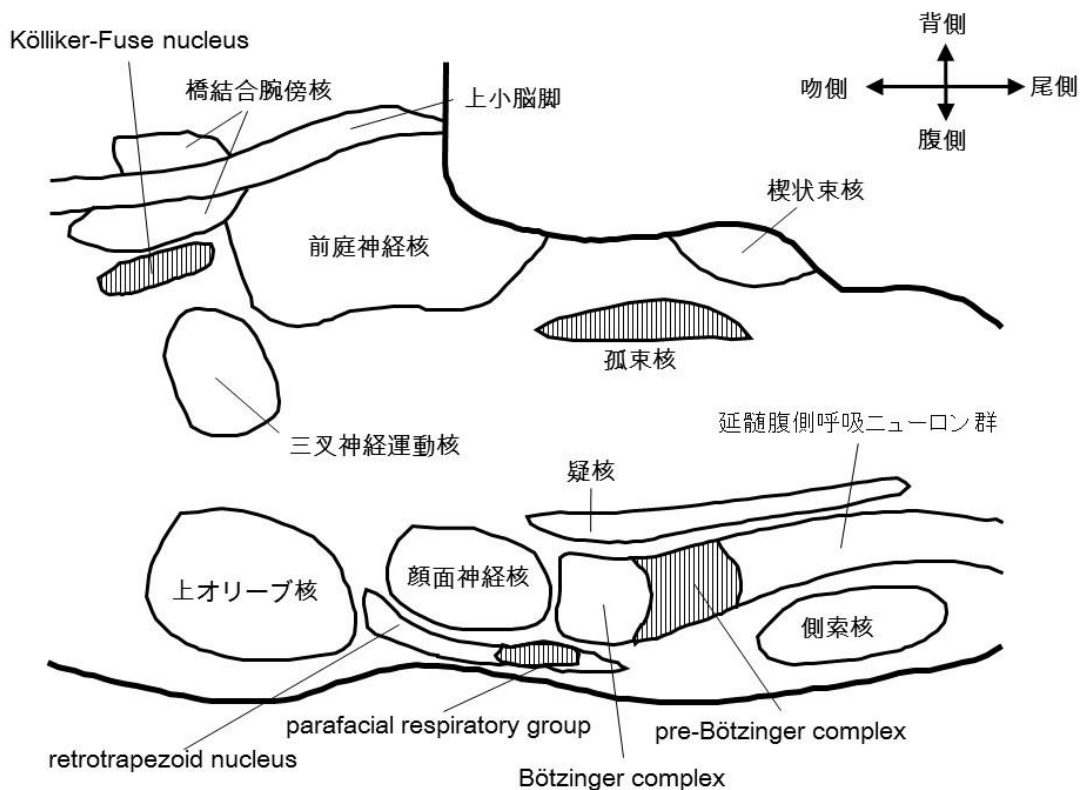


図1 脳幹内における呼吸ニューロン群の分布 (矢状面)

延髄内には、延髄腹側呼吸ニューロン群と延髄背側呼吸ニューロン群の2つの主要な呼吸ニューロングループがある。延髄腹側呼吸ニューロン群は pre-Bötzing complex や Bötzing complex など構成される。延髄背側呼吸ニューロン群は、孤束核を中心として左右対称に縦方向に分布する吸息性ニューロンの集合である。橋の吻外側部に位置する結合腕傍核 (parabrachial nucleus), Kölliker-Fuse nucleus 領域は自発的な吸息神経活動のオフスイッチ機構として重要である。後台形核 (RTN; retrotrapezoid nucleus), 傍顔面神経呼吸ニューロン群 (parafacial respiratory group)。

胸部の呼吸筋である肋間筋にある筋紡錘は、筋の伸展などの機械的刺激を受容する。筋紡錘からの情報は肋間神経の求心性神経線維を介して脊髄後角へ入り、神経反射によりその筋の収縮を制御することで、呼吸調節を行っている。また、肺および気道にある受容器には、遅順応型肺伸展受容器、速順応型侵害受容器、無髄のC線維などのサブタイプがあり、これらの機械受容器で感知された情報は迷走神経を介して延髄に伝達され、呼吸ニューロンネットワークの機能を修飾する。橋呼吸ニューロン群を含む橋より高位の脳は、呼吸パターンとリズムを修飾するが、呼吸パターンとリズムの形成に必須の機能を果たして

いるわけではない。また、大脳辺縁系や視床下部外側部は運動、情動、ストレス時の呼吸機能増強に関与し、大脳皮質は呼吸パターン形成機構に影響を及ぼしている（図2）。

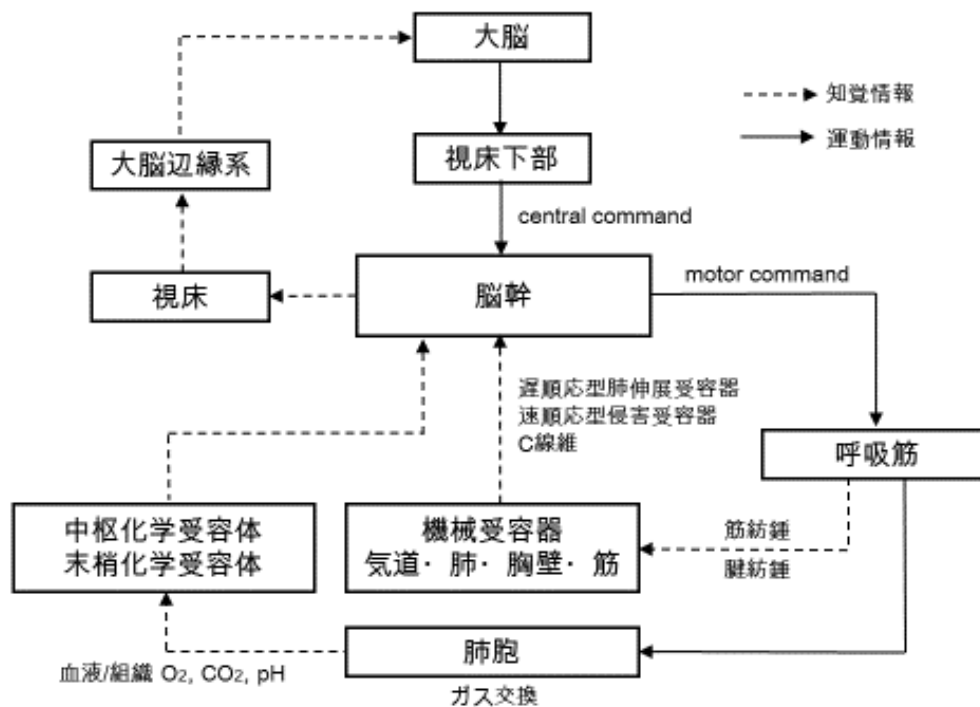


図2 呼吸調節機構の概要

下位脳幹内で形成される呼吸神経出力 motor command は、上気道の開存性を規定し、横隔膜などの呼吸筋を駆動する。呼吸筋にある筋紡錘が受容した情報は、求心性神経線維を介して脊髄後角へ入り、神経反射により呼吸筋の収縮を制御する。肺および気道にある受容器が感知した情報は、迷走神経を介して延髄に伝達され、呼吸神経機構を修飾する。橋より高位の脳は、呼吸パターンとリズムを修飾するが、呼吸パターンとリズムの形成に必須の機能を果たしているわけではない。

### 3. 低酸素換気応答機構

#### 3.1 末梢化学受容器における低酸素感知機構

低酸素は、動脈血酸素分圧レベルの変化をモニターする末梢化学受容器で感知される。内頸動脈と外頸動脈の分岐部にある頸動脈小体は、代表的な末梢化学受容器で、低酸素状態になってから数秒以内には低酸素状態であることを感知する。頸動脈小体は舌咽神経枝である頸動脈洞神経の支配を受けている。頸動脈洞神経は、動脈血酸素分圧が正常のときは低活動であるが、動脈血酸素分圧が 60mmHg 以下に低下すると、急激に信号出力を上げる。

頸動脈小体は、Type I cell (glomus cell) と Type II cell (sustentacular cell) の集塊であり、Type I cell と Type II cell の比はおおよそ 4:1 である (McDonald 1981)。このうち Type I cell は低酸素を感知するが、その機序については、低酸素により細胞膜のカリウムチャンネルが抑制されて細胞膜の脱分極が起こり、カルシウム依存性に興奮性神経伝達物質が遊離され、この遊離した神経伝達物質が近接する頸動脈洞神経終末を興奮させ、求心性の信号伝達を増やすというモデルが考えられている。Type I cell と Type II cell は近接する感覚神経終末と協調して sensory unit を構成する (Kumar and Prabhakar 2012) (図 3)。

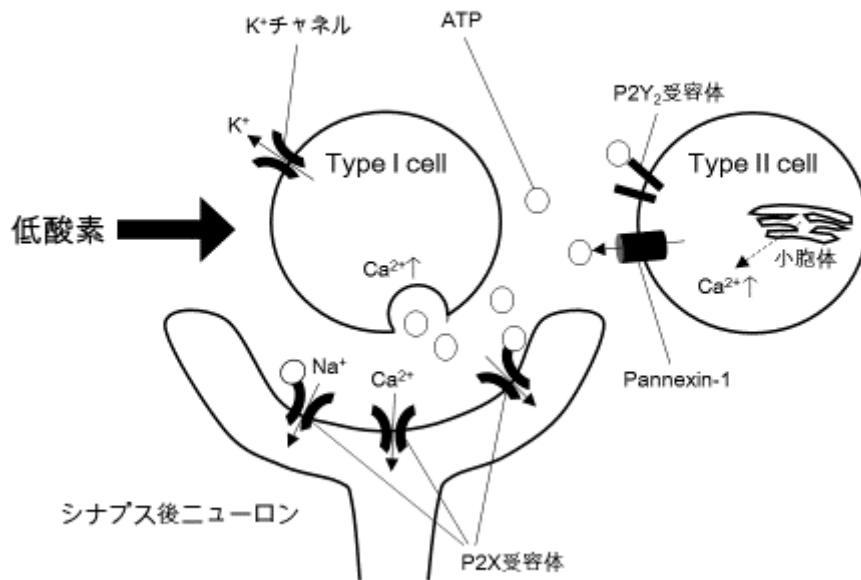


図3 頸動脈小体の cell タイプ

Type I cell の細胞膜には低酸素を感受する多様なカリウムチャンネルがある。Type I cell の選択的カリウムチャンネルが低酸素により閉鎖され、脱分極すると ATP を遊離する。ATP はシナプス後ニューロンの ATP 受容体である P2X<sub>2/3</sub> 受容体を介して求心性終末を興奮させるとともに、Type II cell の ATP 受容体 P2Y<sub>2</sub> 受容体を活性させ、カルシウムイオンを遊離させる。

1980 年頃までは、Type I cell が低酸素により単に脱分極することが知られていたが、その後の研究から Type I cell の細胞膜では、選択的カリウムチャンネルの閉鎖により起こされる脱分極が低酸素負荷時の情報伝達に重要であることが明らかになってきた。Type I cell で低酸素を感受するカリウムチャンネルとして、K<sub>v</sub>、K<sub>Ca</sub>、TASK 様チャンネルが同定されてきた (Weir ら 2005)。TASK 様チャンネルは、Type I cell の静止膜電位 (-60mV 以下) で活性であり、低酸素により抑制され、急激な細胞膜脱分極を起こす。また、K<sub>Ca</sub> チャンネル、K<sub>v</sub> チャンネルは静止膜電位の調節に関与する (Weir ら 2005)。

カリウムチャンネルは、α サブユニットや β サブユニットで構成され、リン酸化状態に応じて多様に機能する。低酸素で抑制されるカリウムチャンネルには多様性があり、種や発達段階によって重要なサブタイプが異なるため、現在も

Type I cell の脱分極を起こすチャネルのサブタイプの特特定を旨した研究が続けられている (Buckler 2007 ; López-López and Pérez-García 2007 ; Peers and Wyatt 2007 ; López-Barneo ら 2016).

カルシウムチャネルは通常、低酸素によって直接には活性化されず、神経伝達物質分泌の「ブレーキ」として働いている (Montoro ら 1996). しかし、低酸素刺激が強くなった場合にはカリウムチャネルが抑制され、その結果としての細胞の脱分極によりカルシウムチャネルの脱抑制が起き、細胞内カルシウムイオン濃度が急増し、シナプス間隙への伝達物質の遊離が引き起こされると考えられている (Montoro ら 1996).

頸動脈小体を構成するもう一つの細胞種である Type II cell は、Type I cell に特徴的な有芯小胞を持たず、より平らで、腎臓のような形をし、緻密核染色質を持つ以外に顕微鏡下で特に見分けられるような特徴を持っていない. Type II cell の突起は Type I cell を完全に包んでいないため、Type I cell が直接、他の Type I cell, 神経終末, 毛細血管にアクセスできる形態になっている. さらに Type II cell は、Type I cell よりも興奮性が低いという特徴がある. また、Type II cell は細胞膜上に adenosine triphosphate (ATP) 受容体サブタイプである P2Y<sub>2</sub> 受容体 (G-タンパク質共役型プリン受容体) を有し、低酸素負荷時に Type I cell から遊離された ATP に応答する. Type II cell の P2Y<sub>2</sub> 受容体の活性化は、カルシウムイオンを遊離させる. Type II cell は頸動脈小体での情報伝達において、パラクライン的に関与し、他種の細胞と協調して化学受容体機能の発現や呼吸ニューロン活動の可塑性に関与している、すなわち、Type II cell は頸動脈小体でグリア細胞のような役割を持つと考えられている (Kumar and Prabhakar 2012 ; Nurse ら 2014) (図 3).

頸動脈小体以外の末梢化学受容器には、大動脈弓にある大動脈小体などがある. 大動脈小体は迷走神経を介して、動脈血酸素分圧レベル低下、pH 低下などの情報を孤束核に伝えるが、それらの役割は頸動脈小体に比較すると、かなり小さいものである.

### 3.2 呼吸中枢ニューロンの低酸素応答

呼吸中枢内のニューロン自身も低酸素感受性を有しており、視床下部、橋、延髄のニューロンは低酸素を感受し、換気応答に影響を及ぼす (Dawes ら 1983; Horn and Waldrop 1997; Koos ら 1998; Solomon ら 2000; Sun and Reis 1994; Neubauer and Sunderram 2004). 末梢化学受容器を摘出した状態、あるいは末梢化学受容器からの求心性入力を遮断した状態では、低酸素負荷時の換気増強反応が低下するが、覚醒状態にあるヒトや動物では、末梢化学受容器からの求心性入力が完全に遮断されていても低酸素に対して換気増強反応が認められることがある (Moyer and Beecher 1942; Davenport 1947; Miller and Tenney 1975; Martin-Body ら 1986; Gallman and Millhorn 1988; Neubauer ら 1990). 視床下部尾側部と延髄の孤束核 (NTS; nucleus tractus solitarius), C1 交感神経刺激性領域, pre-Bötzinger complex, 後台形核 (RTN; retrotrapezoid nucleus) /傍顔面神経呼吸ニューロン群 (parafacial respiratory group) 周辺に低酸素を感受する領域がある (Ross ら 1984; Dillon and Waldrop 1992; Sun ら 1992; Dillon and Waldrop 1993; Mitra ら 1993; Sun and Reis 1994; Horn and Waldrop 1997; Horn and Waldrop 1998; Neubauer and Sunderram 2004). Horn and Waldrop は、視床下部尾側部のニューロンが、末梢化学受容器からの入力や脳他の領域からの入力がなくとも低酸素を感受すること、低酸素負荷時にはアミノ酸神経伝達の増強により、呼吸ニューロンネットワークを興奮させることを示した (Horn and Waldrop 1997) (図 4). すなわち、これらの領域は低酸素負荷時に興奮し、末梢化学受容器とは独立して呼吸を増強させるよう働くと考えられている. 低酸素で一部の呼吸ニューロンが興奮することについての細胞レベルでの機序は不明であるが、最近 transient receptor potential (TRP) チャネルの一種である TRPA1 チャネルが低酸素感受のセンサーとして働いているのではないかと注目されている (Takahashi ら 2011; Pokorski ら 2014).

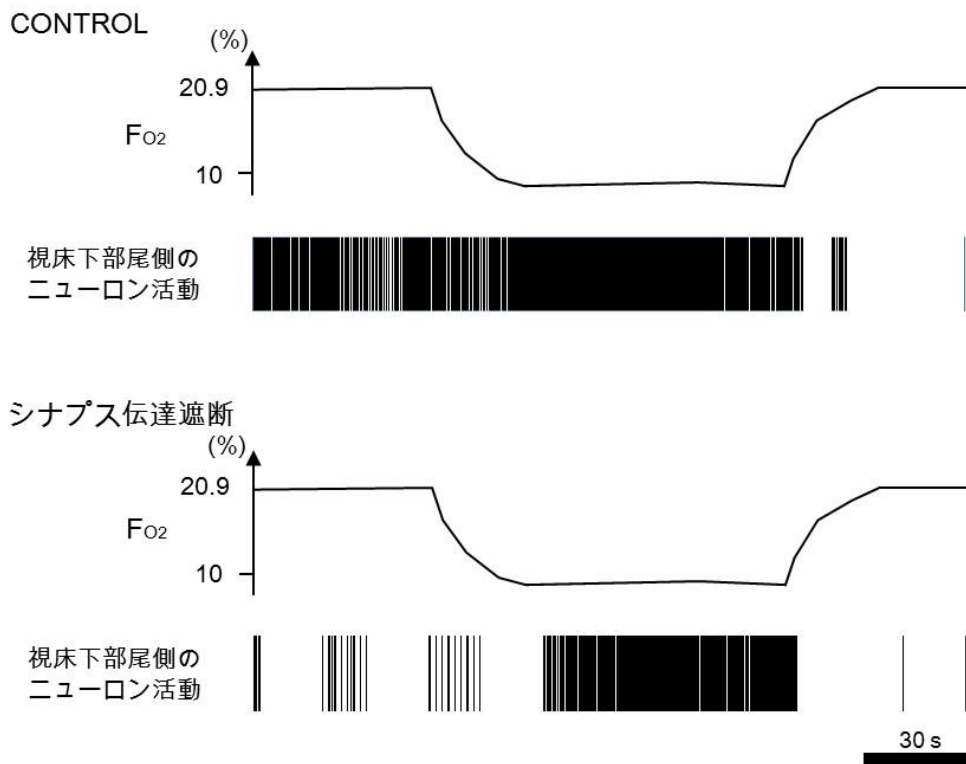


図4 ニューロンの内因性低酸素興奮性

In vitro 標本を用いた実験において、視床下部尾側部のニューロンが酸素濃度 10% の低酸素を負荷したときの反応。上段がコントロール，下段がシナプス伝達遮断時の反応である。視床下部尾側部のニューロンは，シナプス伝達を介さない内因性の低酸素興奮性を有する。Horn and Waldrop (1997)より改変。

橋および中脳の活性化は呼吸を抑制することが報告されている (Okada ら 1998)。低酸素負荷時には，青斑核に近接する橋背側エリアや Kölliker-Fuse nucleus に近接する傍小脳脚核の腹側部が低酸素を感受し，呼吸抑制的に働く。持続的低酸素負荷時には，胎児，新生児，成人で応答のパターンと程度に差はあるが，呼吸抑制が出現する。

なお，中脳の赤核付近や視床の東傍核のニューロンが低酸素で興奮することを示唆する報告があるが，これらの領域が真に直接酸素を感受しているかは確認のための更なる研究を要すると考えられる (Neubauer and Sunderram 2004)。

2 章および 3 章で述べてきた通り，これまで呼吸調節および低酸素換気応答

については、ニューロンを中心に研究が行われてきた。しかし、近年の研究から、従来は脳機能発現には直接関与しないと考えられていたグリア細胞、なかでも特にアストロサイトがニューロンと積極的な情報交換を行いつつ、ニューロンとは異なる仕組みで脳機能発現に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた (Parri ら 2001 ; Angulo ら 2004 ; Fellin ら 2004 ; Tian ら 2005 ; Halassa and Haydon 2010 ; Parpura ら 2012 ; Pérez-Alvarez and Araque 2013)。アストロサイトは広範囲調節の機能を有しており、呼吸調節への関与も示唆されている。

次章ではグリア細胞、中でも特にアストロサイトが低酸素換気応答において果たす役割について、最近の知見を述べる。



## 4. アストロサイトについて

### 4.1 グリア細胞

グリア細胞は、1856年に Virchow によって発見され、1873年に鍍銀法を発明した Golgi により、ニューロンとは別種の細胞であることが確立された。Golgi はグリア細胞の突起が血管壁に付着していることを発見し、この細胞が血管から栄養物を摂取し、それをニューロンに与える役割を持つと考えた。1891年に Lenhossek は、星状に突起を伸ばすグリア細胞を観察し、星状膠細胞（アストロサイト）と命名した。グリア細胞は、脳や脊髄などの中枢神経系にニューロンの約 10 倍存在し、存在部位や形態、およびその機能に非常に多様性を持つ細胞である。脳内のグリア細胞は、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアの 3 種に大別される。このうち、アストロサイトは *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) 陽性で、ニューロンとは異なり、膜電位が深く、膜抵抗が低いことが特徴である。すなわち、ニューロンの膜電位が  $-60\text{mV}$  程度であるのに対して、アストロサイトの膜電位は  $-80\text{mV}$  程度とより負であることが多い。正常脳におけるアストロサイトは、主に灰白質に存在する形質性星状膠細胞と、主に白質に存在する線維性星状膠細胞の 2 種に大別される。この他にも脳の各所に異なる種類のアストロサイトが存在する。

### 4.2 脳機能発現におけるアストロサイトの役割

アストロサイトは、脳のあらゆる部位に存在し、ニューロンを構造的に支持し、血流を調節し、栄養をニューロンに供給するとともに、ニューロン活動で放出された神経伝達物質やイオンなどを取り込み、ニューロンの細胞内外の環境を整える役割を有している。従って、アストロサイトは従来、栄養供給などニューロン周囲の環境を整え、補佐する「寡黙なパートナー」として捉えられてきた。これは、ニューロンの電気活動が捉えやすかったのに対し、グリア細胞は膜電位が安定的で、電気活動をほとんど示さなかったことが一因だったと考えられる。しかし、Cornel-Bell らが、培養アストロサイトをグルタミン酸で刺激すると細胞内カルシウムレベルが上昇し、それが周囲のアストロサイトに

伝わることを発見すると、状況が一変した (Cornell-Bell ら 1990 ; Cornell-Bell and Finkbeiner 1991).

アストロサイトは、イオンチャネル型の ATP 受容体 P2X 受容体と G-タンパク質共役型の ATP 受容体 P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> 受容体とその細胞膜表面に発現し、ATP に対する感受性が高い。アストロサイトが、ATP 以外にもグルタミン酸、GABA、ノルアドレナリン、セロトニン、アセチルコリン、ドーパミン、ヒスタミン、サブスタンス P などニューロンと共通する神経伝達物質に対する受容体を持つことや (Porter and McCarthy 1996 ; Verkhratsky ら 1998; Elhussseiny ら 1999 ; Volterra and Meldolesi 2005; Verkhratsky ら 2009 ; Holmström ら 2013 ; Marina ら 2015), ニューロンからの神経伝達物質がアストロサイトの受容体を賦活化すること、そして、アストロサイト自身がグルタミン酸、D-セリンなどのアミノ酸、ATP などのヌクレオチド、脳由来神経栄養因子 (BDNF ; brain-derived neurotrophic factor) などの成長因子、サイトカインやプロスタグランジン、その他の情報伝達物質を遊離することが明らかにされてきた (Pasti ら 1995 ; Porter and MacCarthy 1996 ; Caravagna ら 2013). そして、シナプスは、シナプス前ニューロンとシナプス後ニューロンと周辺のアストロサイトを含んだ 3 要素から構成されるという三者間シナプス (tripartite synapse) という概念が提唱されるようになった (Araque ら 1999 ; Agulhon ら 2008) (図 5, 図 6). ニューロンとアストロサイトの間で様々な情報伝達が行われていることが明らかになると、アストロサイトが多様な脳機能発現において重要な役割を果たしていると考えられるようになった (Halassa ら 2007 ; Perea ら 2009).

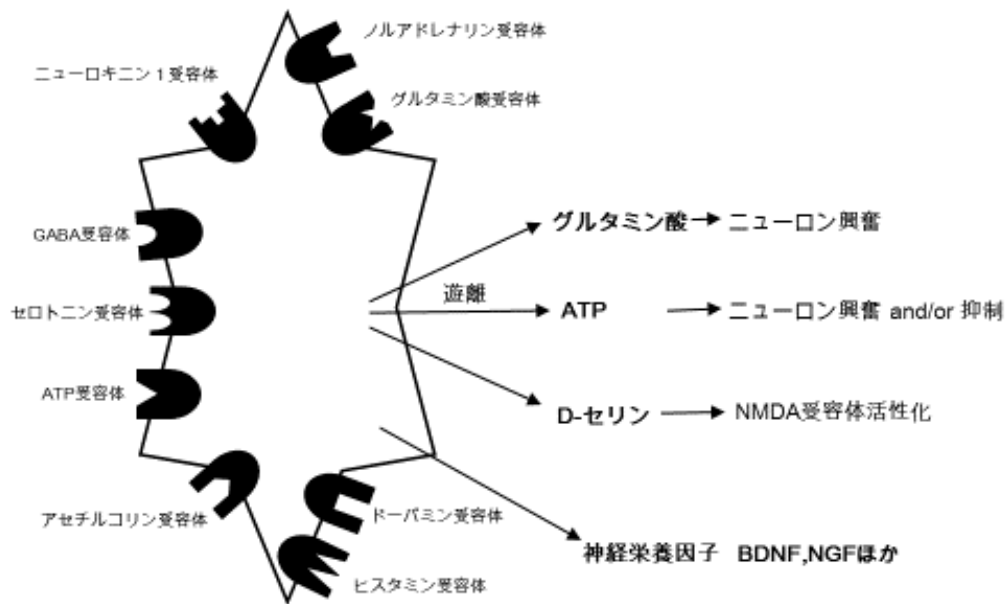


図5 アストロサイトに発現する受容体とアストロサイトからの伝達物質分泌

アストロサイトは、ATP、グルタミン酸、GABA、ノルアドレナリン、セロトニン、アセチルコリン、ドーパミン、ヒスタミン、サブスタンス P などニューロンと共通する神経伝達物質に対する受容体を持つ。また、アストロサイトはグルタミン酸、ATP、D-セリンなどの伝達物質（グリオトランスミッター）を遊離する。なお、ATP はニューロンを興奮させる場合と抑制させる場合がある。

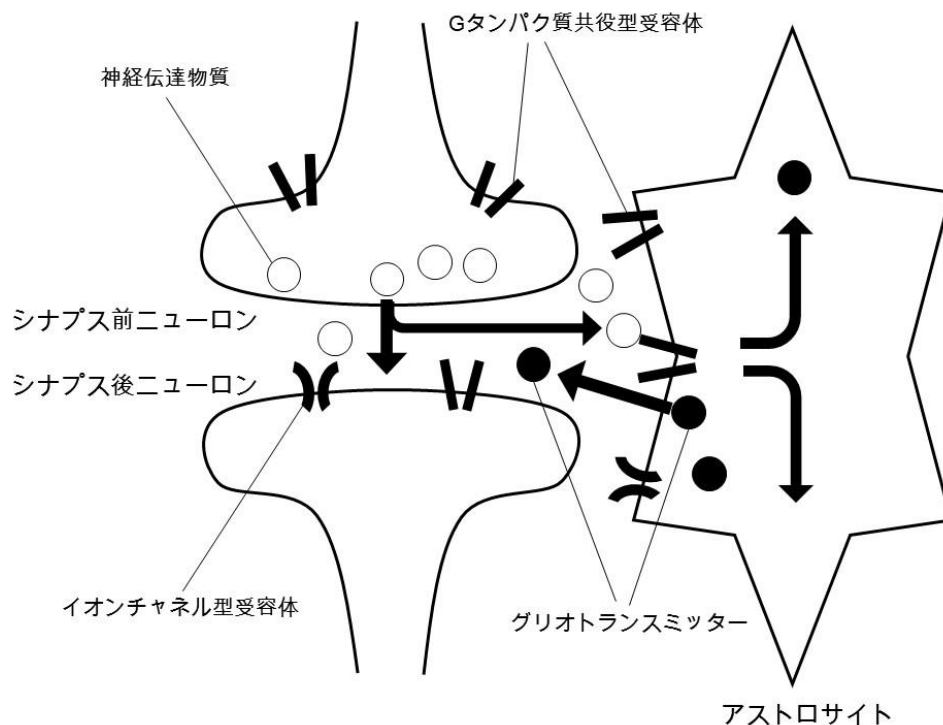


図6 Tripartite synapse (三者間シナプス)

アストロサイトは、シナプス前ニューロンの軸索終末から放出される様々な神経伝達物質に対する受容体を持つ。一方で、アストロサイトはグリオトランスミッターを放出し、ニューロンに情報を伝達する。これらの構造的・機能的関係に基づき、シナプスは、シナプス前ニューロンとシナプス後ニューロンとアストロサイトの三者から構成されるという「tripartite synapse」説が提唱されるようになった。

アストロサイトは血管終末で微小血管に接している。三者間シナプスでアストロサイトにニューロン活動が伝わり、アストロサイトの細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると、アラキドン酸カスケードが活性化され、血管終末から放出されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> などの物質により微小血管径が調節される。また、アストロサイトの血管終末には、アストロサイト間のギャップ結合や P2Y 受容体が豊富にある。三者間シナプスで生じたカルシウムイオン波は、これらを介して隣接する血管終末に伝わるため、カルシウムイオン波は血管終末を通じて、広い範囲の微小血管径に影響すると考えられている。そして、シナプス後ニューロンに興奮が伝わると、nNOS (neuronal nitric oxide synthase) 由来の一酸化窒素が血管拡張性に働く。ニューロンとアストロサイトおよび微小血管の関係は、図7のように考えられている (Peppiatt and Attwell 2004)。

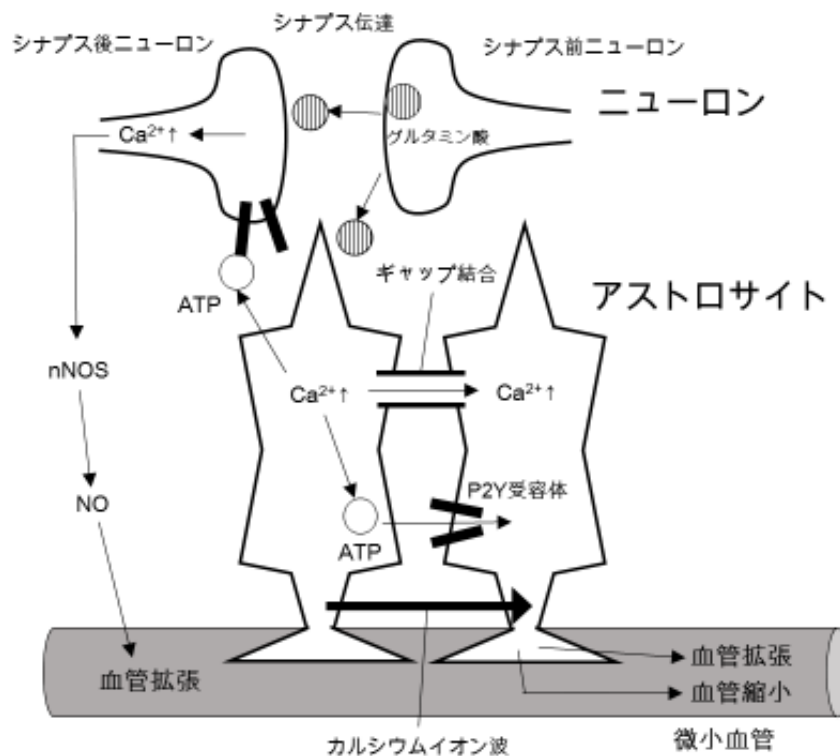


図7 ニューロンとアストロサイトおよび微小血管の関係

三者間シナプスで、ニューロン活動がアストロサイトに伝わると、アストロサイトの細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、アラキドン酸などを放出し、微小血管径を調節する。三者間シナプスで生じたカルシウムイオン波は、アストロサイト間のギャップ結合および P2Y 受容体を介して隣接する血管終末に伝わり、広範囲の微小血管調節に影響する。また、三者間シナプス等によりシナプス後ニューロンに興奮が伝わると、nNOS 由来の一酸化窒素が血管拡張性に働く。

#### 4.3 呼吸調節機構におけるアストロサイトの役割

Hülsmann は、グリア毒であるフルオロ酢酸を用いた *in vitro* 実験で、グリア細胞の代謝を阻害すると、延髄呼吸ネットワークのリズム活性が減弱することを示し、グリア細胞が呼吸リズム形成に関与していることを報告した (Hülsmann ら 2000)。アストロサイトは、呼吸ニューロン活動の維持のため、細胞外のグルタミン酸からグルタミンを合成し、エキソサイトーシスを介してこれをニューロンに供給する。アストロサイトからニューロンへのグルタミン供給がなくなると、呼吸ネットワーク活性は減退する (Hülsmann ら 2000)。

ATP は細胞内では主なエネルギー源であるが、細胞外では呼吸調節因子とし

て重要な役割を果たしている (Lorier ら 2008 ; Funk 2010 ; Moraes ら 2011). Lorier らは, 呼吸リズムを形成する延髄スライスを用いた実験により pre-Bötzinger complex のニューロンが ATP を感受するとともに, ATP が P2Y<sub>1</sub> 受容体を介して pre-Bötzinger complex の多くの吸息性ニューロンを興奮させ, 呼吸数を増加させることを報告した (Lorier ら 2008).

一方, この ATP による pre-Bötzinger complex の呼吸数増加は, フルオロ酢酸などグリア毒の投与により抑えられる (Huxtable ら 2010). そして, pre-Bötzinger complex のアストロサイトは, 細胞内カルシウムイオンの増加を伴う P2Y<sub>1</sub> 受容体刺激に反応する (Huxtable ら 2010). これらの観察結果から, pre-Bötzinger complex の ATP による呼吸調節には, ニューロンだけではなくアストロサイトも関与していると考えられる.

アストロサイトとニューロンによる呼吸調節に関しては, 神経伝達物質に加えて BDNF も関与していると考えられている. pre-Bötzinger complex および RTN/傍顔面神経ニューロン群における BDNF 発現など, 脳幹部の呼吸グループ内で, BDNF とその主な受容体である脳由来神経栄養因子受容体 (TrkB ; tyrosine protein kinase B) の発現が報告されている (Liu and Wong-Riley 2013). また, BDNF 阻害剤や TrkB 阻害剤による抑制性呼吸ニューロンの抑制が, 呼吸ドライブを増強することや (Bouvier ら 2008), BDNF が Kölliker-Fuse nucleus の抑制性ニューロンの活動を減弱させること (Kron ら 2007) も報告されている (図 8). これら様々な in vivo 実験と in vitro 実験から, BDNF の作用がニューロンだけでなくアストロサイトでも起こり, BDNF はニューロンとアストロサイトのやりとりを調整して呼吸リズムの安定的な形成・維持に関与していると予想されている.

現在, 呼吸リズム形成に pre-Bötzinger complex のグリア細胞が関与しているか, 研究が進められているが, Okada らは, pre-Bötzinger complex 内でアストロサイトが吸息性ニューロンよりも約 1 秒先行して吸息性活動を示すことを報告し, アストロサイトが吸息性ニューロンの活動電位発生に積極的に関与している可能性を示唆した (Okada ら 2012).

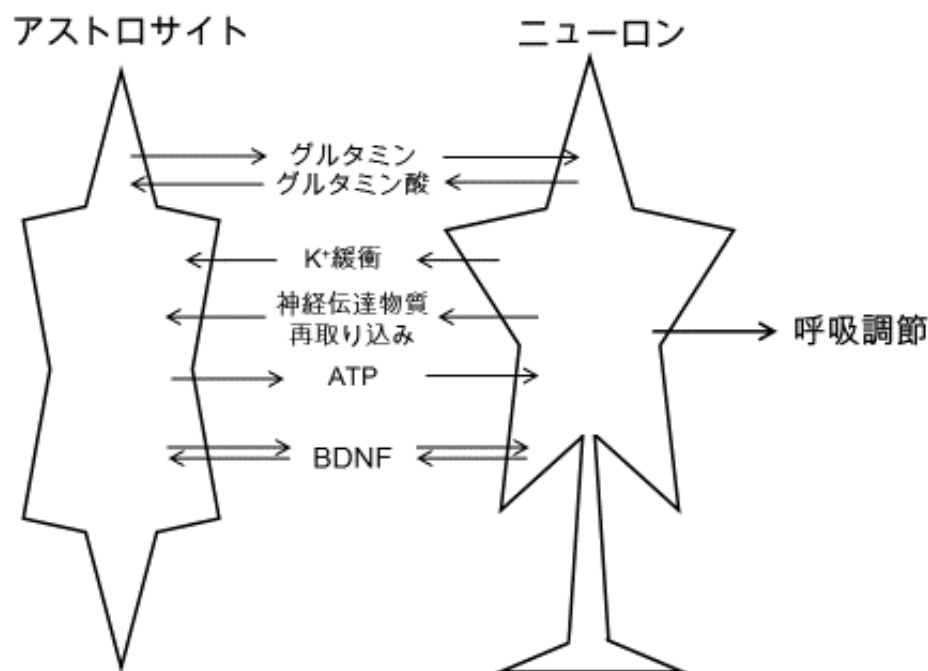


図 8 呼吸調節におけるニューロンとアストロサイトの協調

アストロサイトは、ニューロンに栄養を供給するとともに、ニューロンから放出された神経伝達物質を取り込み、ニューロンの細胞内外の環境を整える役割を持つ。ニューロンとアストロサイトは神経伝達物質のやり取りによって呼吸調節に関与している。同様に BDNF のやり取りも呼吸調節に関与しているという説があるが、まだ証明はされていない。

動脈血二酸化炭素分圧上昇と pH 低下は中枢および末梢化学受容器で感知され、呼吸数、一回換気量がそれぞれ至適レベルになるよう調節されている。中枢化学受容機構の存在部位としては、延髄腹側表層部、特に脳底動脈の両側の淡蒼縫線核表層部、傍錐体表層部、RTN が重要視されている。さらに、縫線核深部、孤束核、青斑核も関与している (Feldman ら 2003 ; Okada ら 2009 ; Ballanyi ら 2010 ; Guyenet ら 2010 ; Nattie and Li 2012 ; Guyenet ら 2013 ; Funk ら 2015)。延髄腹側表層部の中枢化学受容器から呼吸ニューロン群への情報伝達に際して働いている神経伝達物質については、グルタミン酸、セロトニン、ATP などの説があるが、現在論争中である (Richerson 2004 ; Gourine ら 2005a ; Guyenet ら 2008)。Guyenet らは、RTN が延髄腹側呼吸ニューロン群、特に pre-Bötzinger

complex における呼吸ネットワークに投射する前に、他の化学受容感知領域からの入力を集積するセンターとして働いている可能性を示した (Guyenet ら 2010).

このように、アストロサイトが中枢の化学受容に関与している可能性が示されたが (Gourine ら 2010 ; Marina ら 2013), 全身への二酸化炭素負荷は、血中 pH と脳内の pH を低下させ、呼吸リズム形成領域に近接する脳幹の化学受容領域内で急激な ATP の遊離を引き起こす (Gourine ら 2005a,b ; 2010). この二酸化炭素負荷時の ATP の遊離は、末梢化学受容情報とは独立して起こり (Gourine ら 2005b), 遊離された ATP が何らかの機能を持っていることが示唆されている. 腹側脳幹部のアストロサイトは、大脳皮質のアストロサイトと異なり、脳内の酸性化に反応して細胞内カルシウムイオンの上昇と ATP を含む vesicular compartment のエキソサイトシスを促進することから (Kasymov ら 2013), 遊離された ATP は化学感受性アストロサイトの興奮を近接するアストロサイトに伝え、延髄腹側呼吸ニューロン群のニューロンを活性化し、呼吸を増加させると考えられている (Gourine ら 2010).

#### 4.4 低酸素換気応答におけるアストロサイトの役割

##### 4.4.1 アストロサイトの低酸素応答について

脳幹のアストロサイトは、酸素分圧の低下に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の上昇から脳の酸素レベルの変化を感受する (Marina ら 2016). この酸素分圧の低下はミトコンドリアでの呼吸を抑制し、ミトコンドリアの脱分極、遊離基産生、脂質過酸化、細胞内カルシウムイオンの遊離を惹起する (Angelova ら 2015). アストロサイトはミトコンドリアの酸素消費量で低酸素を感知する. 低酸素によるアストロサイトの細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は、ATP を含む vesicular compartment の融合を惹起する (Angelova ら 2015). しかしながら、アストロサイトが低酸素負荷時に脳幹で ATP を遊離させる機序は不明である. これら最近の実験的研究によりアストロサイト自体が、低酸素を感知するセンサー細胞として働いている可能性が示唆されている (Tadmouri ら 2014 ;



Angelova ら 2015 ; Pokorski ら 2016).

#### 4.4.2 低酸素負荷によるアストロサイトの神経炎症の惹起

低酸素負荷時には、IL-1 $\beta$ , IL-8 その他の炎症性メディエータが増加するが、このときアストロサイトはケモカインを遊離する (Stanimirovic ら 2001 ; Zhang ら 1999). ヒト胎児のアストロサイトは、低酸素負荷時に多くの炎症性メディエータの合成に必要な転写因子である NF- $\kappa$ B の発現を上昇させるが (Stanimirovic ら 2001), 低酸素負荷時に、NF- $\kappa$ B はアストロサイトの IL-1 $\beta$  と IL-8 の発現を増強させ、IL-1 $\beta$  はオートクライン的に NF- $\kappa$ B を活性化させる (Stanimirovic ら 2001). これらの炎症反応は、低酸素負荷後の脳の修復に貢献するが、低酸素負荷時にサイトカインがニューロンにどう影響するかは不明である.

#### 4.4.3 低酸素換気応答におけるアストロサイトの関与

Gourine らは、麻酔下で人工呼吸管理下におかれたラットの末梢での化学受容を遮断した実験で、全身性低酸素負荷時に呼吸リズム形成と呼吸パターン形成を司る脳幹領域で ATP が遊離されること、同領域で ATP 受容体を阻害すると低酸素呼吸抑制が出現することを示した. さらに、スライス標本を用いた実験で、低酸素負荷時の ATP 遊離が、延髄腹側表層部で起こることを示した (Gourine ら 2005b). これらの実験結果は、呼吸ネットワーク内における ATP の遊離が、低酸素負荷時の呼吸維持に寄与することを示している (図 9).

低酸素負荷時に延髄吻側腹外側野から ATP と乳酸が遊離されるが (Gourine ら 2005b ; Karagiannis ら 2016), この延髄での ATP 遊離は、低酸素負荷時の呼吸抑制を穏やかにする (Gourine ら 2005b). そして、ATP 受容体の P2X<sub>2</sub> 受容体サブユニットが欠損したマウスでは、低酸素換気抑制が大きくなる (Rong ら 2003 ; Erlichman 2010).

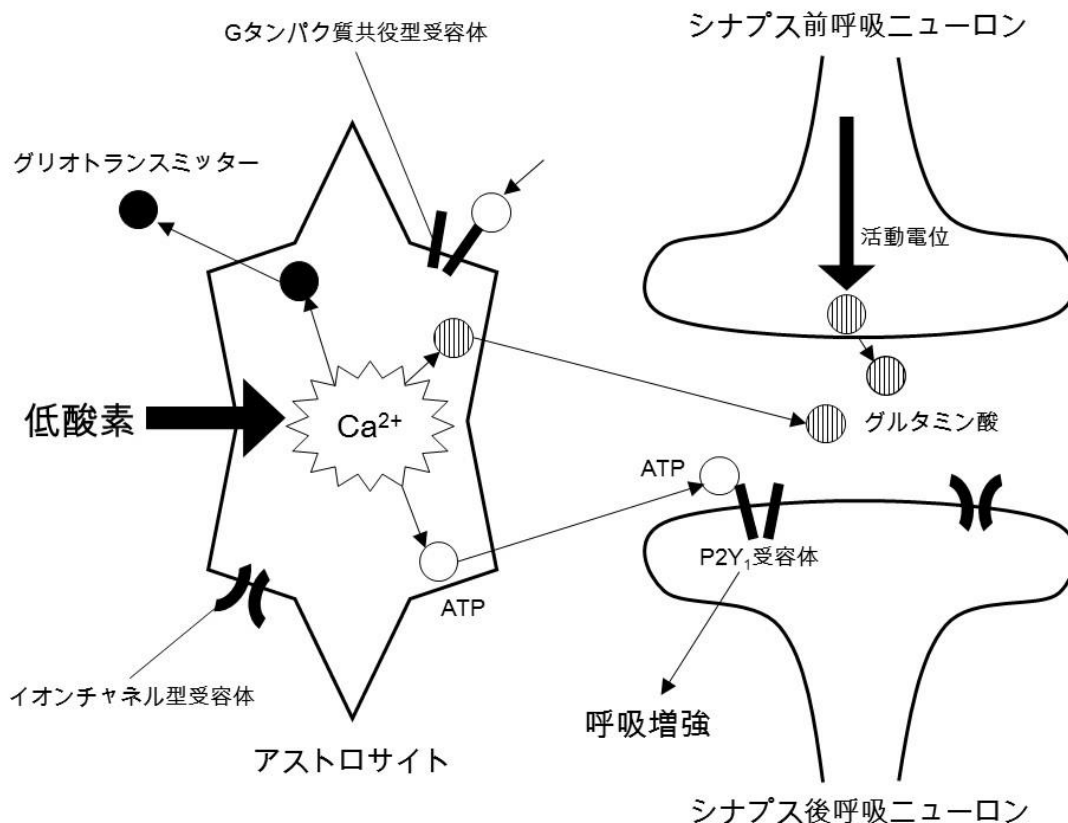


図9 アストロサイトとニューロンの低酸素感受と低酸素応答機構

下位脳幹部のアストロサイトは、低酸素状態になると、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇からこれを感じ、ATPなどのグリオトランスミッターを遊離させる。遊離されたATPはP2Y<sub>1</sub>受容体に作用し、呼吸ニューロンを興奮させ、呼吸増強性に働く。ニューロンとアストロサイトは、三者間シナプスにより相互に様々な神経伝達物質をやり取りしつつ、呼吸調節に関与している。

長時間の低酸素負荷や短時間でも強い低酸素負荷は脳機能を抑制するが、アストロサイトは低酸素負荷時にニューロンに対して保護的な機能を果たし、呼吸の恒常性を維持しようとする。筆者は、アストロサイトの活性化阻害剤 arundic acid の投与前後で、強い低酸素負荷時の脳波と呼吸の応答を非麻酔下のマウスで非侵襲的に計測・比較する実験を行い、アストロサイトが強い低酸素負荷時の大脳皮質機能維持および呼吸出力維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。低酸素負荷時のATPの遊離と呼吸増強は、末梢化学受容体の関与がなくても見られる (Angelova ら 2015)。このことは、アストロサイトが低酸素換気応答に直接的に関与している可能性を示唆している。

アストロサイトは、特に穏やかな低酸素負荷時にはニューロンを保護する機能を発揮するが (Heurteaux ら 1995), 予め穏やかな低酸素を負荷しておいた時にニューロンが保護される hypoxic preconditioning と呼ばれる現象に、この機序が関与している可能性がある。

## 5. 低酸素負荷時の大脳皮質機能と換気応答に関する実験

### 5.1 背景と目的

上述の通り、ヒトは低酸素状態になると、頸動脈小体、大動脈小体などの末梢化学受容器がその情報を感知し、延髄呼吸神経回路を興奮させるとともに、その情報が投射された高位脳が呼吸困難感を知覚し、視床下部から延髄呼吸神経機構へ投射する下行性の神経促進ドライブ（central command）を増強させ、呼吸出力を増加させる（Eldridge1994；岡田 and 梅田 2013）。しかし、急激に強い低酸素状態になった場合には、このような呼吸調節がなされず、呼吸出力はむしろ抑制されてしまう。この反応は、低酸素換気抑制と呼ばれている（Neubauer ら 1990；Hayashi and Fukuda 2000）。

临床上、この低酸素換気抑制は重要な意味を持ち、健常人でも事故などで突然強い低酸素に曝された場合や、気管支喘息患者が重度の喘息発作で急に強い低酸素血症となった場合などには、意識レベルの低下とともに呼吸困難感を知覚する間もなく、あるいは、それまで知覚していた呼吸困難感さえも減弱し、呼吸が抑制されてしまう（Kikuchi ら 1994）。そして、この呼吸抑制は低酸素状態をさらに悪化させ、意識消失を起し、直ちに治療を受けないと死に至ることさえある。健常人では 10%以下の低酸素を吸入すると低酸素換気抑制が起こる危険があり、8%以下の低酸素吸入は、昏睡から死に至る可能性がある。

低酸素換気抑制の出現機序については、これまでいくつかの仮説が提唱されてきたが、未だ解明されていない。その仮説の一つに、低酸素換気抑制は呼吸に対し抑制的に働く大脳皮質が低酸素により刺激された結果生じるというものがある。この仮説は、大脳皮質領域の神経活動が呼吸を抑制すること、大脳皮質を剥離したネコでは低酸素に対する呼吸増強応答が促進することに拠っている（Tenney and Ou 1977）。しかし、低酸素が大脳皮質を興奮させる直接的証拠がない点で、この説は有力なものとはなりえない。低酸素換気抑制の出現機序として他に、（1）脳血流増加に伴う脳組織 pH のアルカリ側へのシフト、（2）脳内神経伝達・調節物質の合成、分泌、代謝の変化—特に、GABA、アデノシン、内因性オピオイドなどの呼吸抑制性物質の増加、（3）酸素欠乏による呼吸ニューロンの直接代謝障害などが想定されているが、動物実験などで大脳皮質

の活動と低酸素換気抑制との因果関係を示す有力な結果を得るには至っておらず (Neubauer ら 1990 ; Hayashi and Fukuda 2000), 低酸素換気抑制反応の出現時に高位脳が果たす役割, 特に大脳皮質が果たす機能的役割は不明なままである.

既述の通り, 従来は脳機能発現には直接関与しないと考えられていたグリア細胞が, 近年の研究からニューロンと積極的な情報交換を行いつつ, ニューロンとは異なる仕組みで脳機能発現に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている (Parri ら 2001 ; Angulo ら 2004 ; Fellin ら 2004 ; Tian ら 2005 ; Halassa and Haydon 2010 ; Parpura ら 2012 ; Pérez-Alvarez and Araque 2013). グリア細胞の中でも, 特にアストロサイトは広範囲調節の機能を有しており, 呼吸調節機構においても pre-Bötzinger complex 内で吸息性ニューロンより 1~2 秒先行して吸息性活動を示すとともに, 吸息性ニューロンの活動発生に関与していることが示唆されている (Okada ら 2012).

そこで筆者は, アストロサイトが低酸素負荷時の大脳皮質機能維持と呼吸機能維持に役割を果たしているとの仮説をたて, これを検証する実験を行った. 具体的には, 生体に急激に強い低酸素負荷をかけると, 大脳皮質機能が抑えられ, 覚醒度が低下し, 大脳皮質によって賦活化されている視床下部の活動が抑制され, その結果, 低酸素換気抑制が起こるという機序を考えた. 無麻酔で意識のあるマウスを対象に, 薬理学的手法を用いてアストロサイトの活性化を阻害する前後での, 低酸素負荷に対する大脳皮質活動と呼吸出力の応答を計測し, 解析した.

## 5.2 対象と方法

### 5.2.1 対象

本研究におけるすべての動物実験は, 村山医療センターの動物実験委員会の承認を得た後 (村山医療センター動物実験委員会実験承認番号 : 12-2), 日本生理学会の生理学領域における動物実験に関する基本的指針を遵守し, 実施した.

実験には正常に覚醒し, 呼吸するオスの C57BL/6 マウス (6~12 週齢, 16 例) を用いた. 16 例のうち 2 例は, 組織化学実験に用いた. 実験に用いるマウスは,

個別のケージで飼育し、摂氏 23~24 度、湿度 50~60%、12 時間ごとの明暗周期で、十分な食物と水を与えつつ飼育した。マウスの換気パラメーターを非侵襲的に計測しうる whole body plethysmography 法により、低酸素を負荷したマウスの換気パラメーターと脳波を同時に計測し、低酸素負荷時の大脳皮質の機能変化と換気応答との関係を解析した。

## 5.2.2 脳波計測

マウスの前脳部の機能的な状態をモニターするため、脳波を記録した。脳波電極をマウス頭蓋骨上に埋め込む手術は、イソフルラン吸入で麻酔を導入後、ペントバルビタール腹腔内注射による全身麻酔を施し、皮膚切開やピンチングに反応する際にはキシロカインによる局所麻酔を行った。頭皮切開後、リード線を巻き付けた 3 本の微小ネジを頭蓋骨上の図 10 で示す位置に埋め込んだ。3 本のうち 2 本は bregma の後方 2.5 mm かつ正中線から側方 2.5 mm の箇所記録電極として、1 本は正中線上、bregma から前方 4.5 mm の箇所に接地電極として埋め込んだ (図 10 参照)。電極埋め込み後は、実験時に使う頭部固定用ネジとともに、頭部を歯科用レジンで固定した。開頭手術の負担が結果に影響しないよう、マウスは術後 1 週間以上通常飼育し、回復させてから実験に用いた。

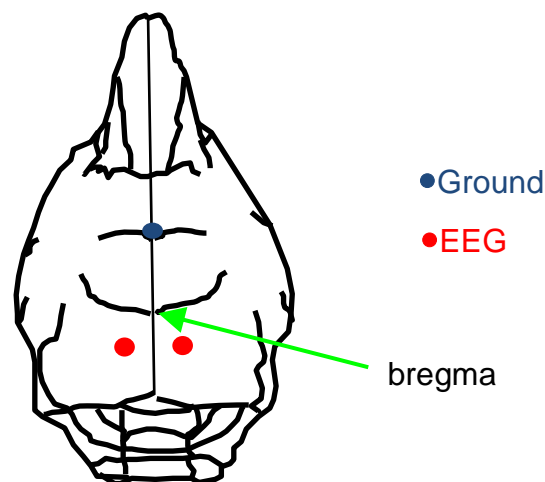


図 10 電極の位置

リード線を巻き付けた 3 本の微小ネジを頭蓋骨上の丸印の位置に埋め込んだ。うち 2 本は bregma の後方 2.5 mm で正中線から 2.5 mm の箇所に記録電極とし、1 本は正中線上、bregma の前方 4.5 mm の箇所に接地電極として埋め込んだ。

脳波信号は、増幅器（JB-101J および AB-651J ;いずれも 日本光電社製）で増幅し、0.08~100Hz の帯域でフィルターにかけた後、高速フーリエ変換により、ガンマ波帯域（55~95Hz）のパワーを算出した。ガンマ波帯域のパワーは、覚醒度および大脳皮質機能の発現度合を示す指標となる（Bosman ら 2014 ; Ishibashi ら 2015）。

### 5.2.3 呼吸計測

呼吸応答は、whole body plethysmograph（PLY 310 ; EMMS 社製）を用いて計測した。Whole body plethysmograph はマウスを入れる recording chamber と reference chamber で構成され、これら二つの chamber の圧差からマウスの呼吸を計測する機器である（Oyamada ら 2008; Pokorski ら 2014）。Whole body plethysmograph には、マウスの呼吸を非侵襲的に計測できるという特徴がある（図 11）。呼吸流量の計測は、whole body plethysmograph を 20×20×20 cm のアクリルボックスの中に置き、常に摂氏 25 度の下、recording chamber 内の空気をサッキングマシンで吸気しつつ行った。計測の前には、マウスを recording chamber 内に入れ、頭部を固定した後、十分に馴化の時間をとってから計測を行った。呼吸流量を計測するための、recording chamber と reference chamber の圧差を、トランスデューサー（TPF100 ; EMMS 社製）で計測し、これを増幅器（AIU060 ; Information & Display Systems 社製）で増幅し、0.1~20Hz のバンドパスフィルターをかけた。

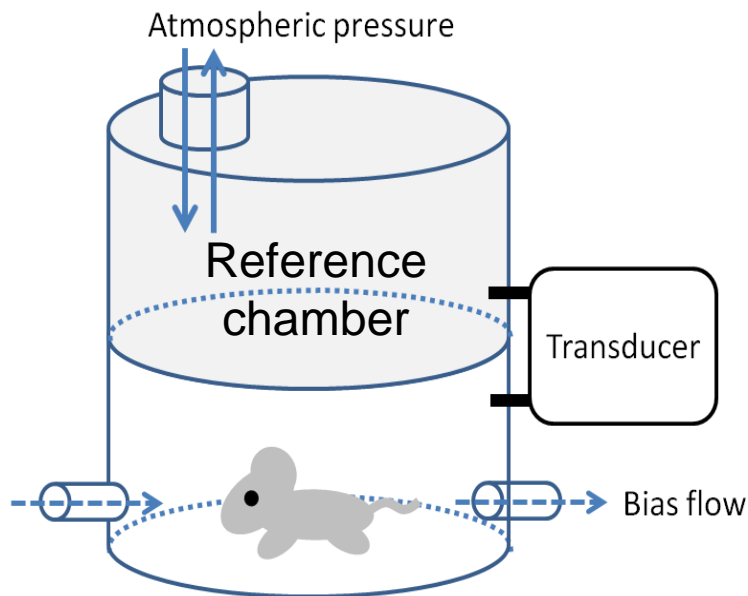


図 11 Whole body plethysmography

Recording chamber と reference chamber の圧差を Transducer で計測し，マウスの呼吸を非侵襲的に計測する．

呼吸パラメーターは図 12 で示す方法で算出した．呼吸流量の信号から各呼吸サイクルの体重あたり一回換気量を算出し，これらの平均値を解析対象時間における体重あたり一回換気量 ( $V_T$  ; tidal volume ; [ $\mu\text{L}/\text{weight (gram)}$ ]) として算出した．さらに，呼吸流量の波形から呼吸数 (RR ; Respiratory rate ; [breath/min]) を数え， $V_T$  と RR の積で体重あたり分時換気量 ( $\dot{V}_E$  ; Minute ventilation ; [ $\text{mL}/\text{g}/\text{min}$ ]) を算出した (図 12)．



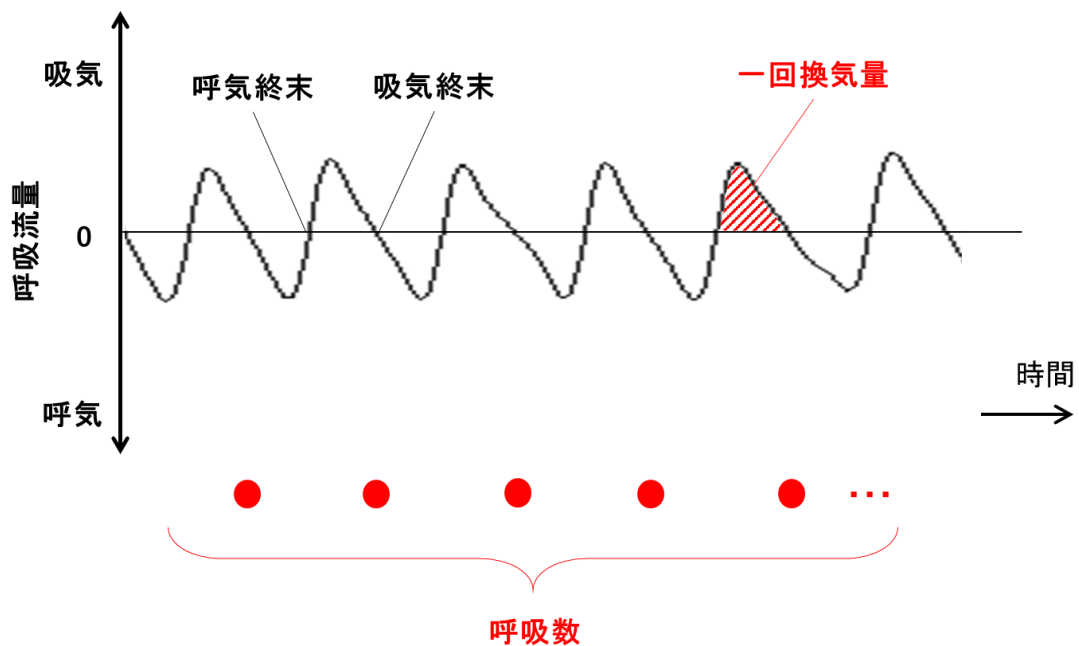


図 12 呼吸パラメーターの算出方法

ある時間帯における呼吸流量（上方が吸気）を黒色で示した．各呼吸サイクルの一回換気量を赤色を付した面積から算出し，解析対象時間におけるこれらの平均値を体重あたり一回換気量 ( $V_T$ ; tidal volume; [ $\mu\text{L}/\text{weight (gram)}$ ]) として算出した．呼吸数 (RR; Respiratory rate; [breath/min]) は吸気終末時点の数から算出し，分時換気量 ( $V_E$ ; Minute ventilation; [ $\text{mL}/\text{g}/\text{min}$ ]) は  $V_T$  と RR の積で算出した．

Chamber 内の酸素濃度は，酸素濃度計 (Respina IH 26; 三栄測器社製) でモニターし，アクリルボックス内に流入させる窒素と空気の量でこれをコントロールした．換気パラメーターと脳波信号と chamber 内の酸素濃度は A/D コンバータ (PowerLab4/26; ADInstruments 社製) および計測ソフトウェア (LabChart7 software; ADInstruments 社製) を用い，サンプリング周波数 400Hz で同時計測した (図 13, 14)．

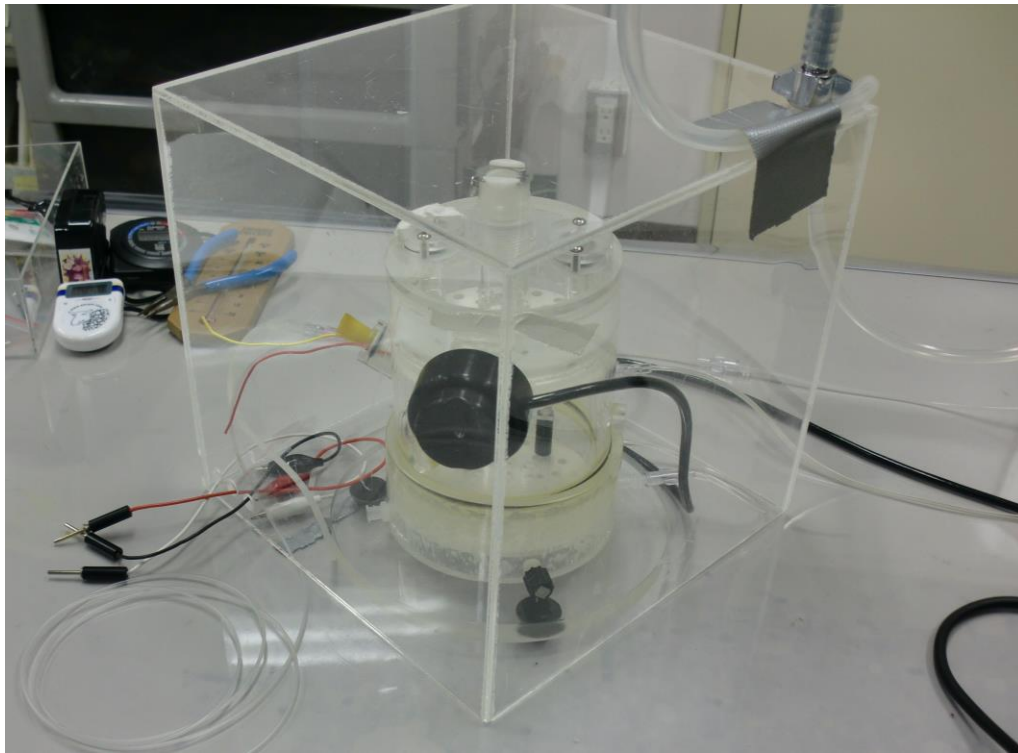


図 13 Chamber 周囲の状況

アクリルボックス内に chamber を置き，アクリルボックス内に流入させる窒素と空気の量で酸素濃度を調節した。



図 14 計測風景

計測システムの全体像を示す。

## 5.2.4 Whole body plethysmography の実験プロトコル

酸素濃度 6%の強い低酸素負荷をかける実験を、アストロサイトの活性化阻害剤である arundic acid の投与前, 低用量投与下, 高用量投与下でそれぞれ行った (Asano ら 2005a, 2005b; Mori ら 2004; Tateishi ら 2002; Wajima ら 2013; Yamamura ら 2013; Yanagisawa ら 2015). まず, arundic acid の溶媒である dimethyl sulfoxide (以下 DMSO) をマウスの腹腔内に注射し, 注射後, マウスを chamber 内に入れ, 通常酸素濃度下 (20.9%) で 40 分間から 60 分間 chamber に馴化させた. 馴化させる間もマウスの呼吸と脳波をモニターし, 呼吸が落ち着いたので確認してから, 計測を開始した. 計測開始後 3 分間, 通常酸素濃度下においた後, アクリルボックス内に流入させる窒素量を調節し, マウスに 6%の低酸素負荷をかけた. マウスへの 6%の低酸素負荷は, 顕著な呼吸抑制が出現してから 10 秒後まで続け, 呼吸抑制が出現して 10 秒後にはすぐにアクリルボックス内に空気を流入させ, 速やかに通常酸素濃度 (20.9%) に戻した. 通常酸素濃度に戻した後は, そのまま通常酸素濃度下で, 10 分間計測を行った. マウスに 6%の低酸素負荷をかけてから 20 分間, 顕著な呼吸抑制が出現しなかった場合は実験を中止し, 当該マウスは解析から除外した. アストロサイトの活性化阻害剤である arundic acid の投与は, 動物愛護の観点から使用する動物数を最小限にするため加算的に行い, まず (1) arundic acid の溶媒である DMSO のみ体重 1kg あたり 0.47mL, 続いて (2) arundic acid 体重 1kg あたり 100mg, さらに (3) arundic acid 体重 1kg あたり 200mg (合計 300mg) をそれぞれ投与した. (2) および (3) の投与に際しては, arundic acid を DMSO および生理食塩水に arundic acid : DMSO : 生理食塩水 = 1 : 4 : 5 の割合で溶かした溶液を腹腔内に投与した. 3 段階の arundic acid 投与量下でそれぞれ低酸素曝露負荷を行ったが, 各低酸素負荷は, それぞれ 60 分間の間隔をおいて行った. 最初の DMSO 注射後は, マウスの chamber への馴化のため, その後の arundic acid 投与後は, その前の低酸素負荷の影響を排除するため, それぞれ 60 分間の間隔を取った (図 15). Arundic acid は小野薬品工業株式会社 (大阪市) より提供を受けた.

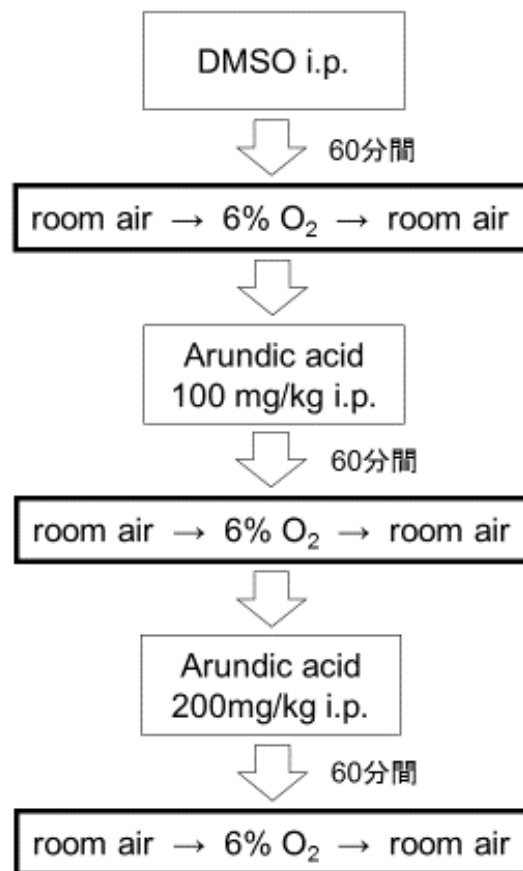


図 15 プロトコル

DMSO のみの投与時， arundic acid 低用量投与時， arundic acid 高用量投与時の低酸素負荷実験は，それぞれ 60 分間の間隔をおいて行った。

DMSO のマウスへの投与は総量が一定以上になると脳機能に影響を与えるという報告があるが (Hülsmann ら 1999; Jacob and de la Torre, 2009)，今回の実験でマウスに投与した DMSO 総量は，マウスの体重 1kg あたり 2.0g 以内であった。この用量は脳機能に影響を与える可能性があると言われる体重 1kg あたり 3.5g を超えない量であった (Takeda ら 2016)。なお，本実験と同じタイミングで，arundic acid を含まない DMSO のみの投与を本実験と同様に行うシャムテストを 1 例実施した。

### 5.2.5 免疫組織化学

Arundic acid の前投与が、アストロサイトの活性化を抑制することを組織学的に証明するため、arundic acid を投与されたマウスと投与されていないマウスで、強い低酸素負荷時の神経興奮マーカー、c-Fos タンパク質の発現を比較した。まず、arundic acid を投与しないマウスには、arundic acid の溶媒である DMSO を体重 1kg あたり 0.47mL 投与し、通常酸素濃度下で、60 分間 whole body plethysmography の chamber に馴化させ、酸素濃度 7% の低酸素負荷を 40 分間かけた。酸素濃度の調整は、他の低酸素負荷実験と同様、アクリルボックスに流入させる窒素と空気の量で行った。低酸素負荷時の酸素濃度を 6% でなく 7% にしたのは、6% では 40 分間の低酸素負荷の間、安定した生存性を維持することが難しいと考えたためである (Miyake ら 2007)。

マウスに 7% の低酸素負荷後、ジエチルエーテルで深麻酔をし、生理食塩水と 10% のホルマリンで経心臓的に全身を灌流した。その後、マウスの脳を摘出し、一晩固定した後、20% のスクロースに浸し、視床下部を含む領域を冷凍ミクロトームによって薄切し、25 $\mu$ m 厚の切片を作成した。その切片について、呼吸調節の重要領域である視床下部背内側核における c-Fos 発現を解析するため (Dampney ら 2008 ; Horiuchi ら 2009)、一次抗体としてヤギ抗 c-Fos 抗体 (sc-52-G, 500 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology 製)、二次抗体としてビオチン化ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (500 倍希釈, Jackson ImmunoResearch Laboratories 製)、標識酵素として Elite ABC kit (1000 倍希釈, Vector)、発色基質としてニッケルアンモニウム (0.075%) を加えたジアミノベンチジン (0.016%) を用いた免疫組織化学により c-Fos 陽性細胞を検出した。視床下部背内側核はニッスル染色により同定した。(Yokota ら 2015)。

### 5.2.6 データ解析

データ解析に際し、マウスがスニッフing、グルーミング、リッキングなどをみせていた時間は解析から除外した。 $V_T$ , RR,  $\dot{V}_E$  とガンマ波帯域の脳波パワーについて、3 分類 (arundic acid 投与量 : 無 VS 低用量 VS 高用量)  $\times$  2 分

類（酸素濃度：20.9% VS 6%）の二元配置分散分析を行った。球面性の仮定が成立していない場合は、Greenhouse-Geisser's のイプシロンを用いた自由度補正を行った。主効果または交互作用に有意差がある場合は、*post-hoc test* として Bonferroni の補正を行った。解析は MATLAB 2015a (MathWorks 社製) を用いて行い、統計検定は SPSS 15.0 (IBM 社製) を用いて、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。以下、データを平均±標準誤差で表記する。

### 5.3 結果

実験は、16 例のマウスを対象に行った。データ解析に際しては、DMSO のみ投与時、すなわち arundic acid 投与前の低酸素負荷時に 20 分間、顕著な呼吸抑制が出現しなかった 2 例、および arundic acid 低用量投与下での低酸素負荷時に顕著な呼吸抑制の出現しなかった 4 例を除外した。対象とした 10 例のマウスすべてで、6%の低酸素負荷時に一過性に呼吸が増強され、その後、呼吸抑制が出現していた。呼吸抑制は脳波の抑制とほぼ同時に出現していた（**図 16A** の矢印の箇所）。低酸素負荷開始から呼吸抑制出現までの時間（秒）は、DMSO のみ投与時、arundic acid 低用量投与時、arundic acid 高用量投与時で、それぞれ  $412.9 \pm 56.3$ ,  $443.6 \pm 91.5$ ,  $535.7 \pm 86.2$  であった。これらの出現時間に有意差はなかった。Arundic acid 投与前、低用量投与時、高用量投与下における通常酸素濃度時、および強い低酸素時の呼吸流量と脳波記録の一例を **図 16B** に示す。通常酸素濃度下では、呼吸にも脳波にも arundic acid 投与による影響はみられなかった。一方、強い低酸素負荷による呼吸抑制出現時には、換気量とともにガンマ波帯域の脳波パワーも顕著に抑制されていた。この低酸素換気抑制における呼吸の抑制とガンマ波帯域の脳波パワーの抑制は、arundic acid の投与量に応じて大きくなっていった。それぞれの酸素濃度と arundic acid 投与量における呼吸パラメーターと脳波のガンマ波帯域のパワーを **表 1** に示す。低酸素換気抑制の出現時に、RR は arundic acid に用量依存的に減少していたが、 $V_T$  は減少していなかった。 $\dot{V}_E$  について二元配置分散分析を行った結果、酸素濃度に主効果があったが ( $F(1, 9) = 35.329, p < 0.01$ )、arundic acid 投与量に主効果はみられなかった ( $F(2, 18) = 3.281, p = 0.061$ )。Arundic acid 投与量と酸素濃度の交互作用には有意

差があった ( $F(1.218, 10.963) = 8.275, p < 0.01$ ). 交互作用に有意差があったことから, *post-hoc test* により「arundic acid 投与前の酸素濃度 6%」と「arundic acid 低用量時の酸素濃度 6%」と「arundic acid 高用量時の酸素濃度 6%」の  $\dot{V}_E$  を比較したところ, 酸素濃度 6%における  $\dot{V}_E$  の値に arundic acid 無投与時と低用量投与時, および無投与時と高用量投与時でそれぞれ有意差があった (図 17).

脳波のガンマ波帯域パワーについても同様に二元配置分散分析を行ったところ, arundic acid 投与量にも ( $F(1.191, 10.718) = 4.847, p < 0.05$ ), 酸素濃度にも主効果があり ( $F(1, 9) = 62.354, p < 0.01$ ), arundic acid 投与量と酸素濃度の交互作用にも有意差があった ( $F(2, 18) = 10.267, p < 0.01$ ). 交互作用に有意差があったことから *post-hoc test* により「arundic acid 投与前の酸素濃度 6%」と「arundic acid 低用量時の酸素濃度 6%」と「arundic acid 高用量時の酸素濃度 6%」のガンマ波帯域パワーを比較したところ, 酸素濃度 6%におけるガンマ波帯域パワーに arundic acid 無投与時と低用量投与時, および無投与時と高用量投与時でそれぞれ有意差があった (図 17).

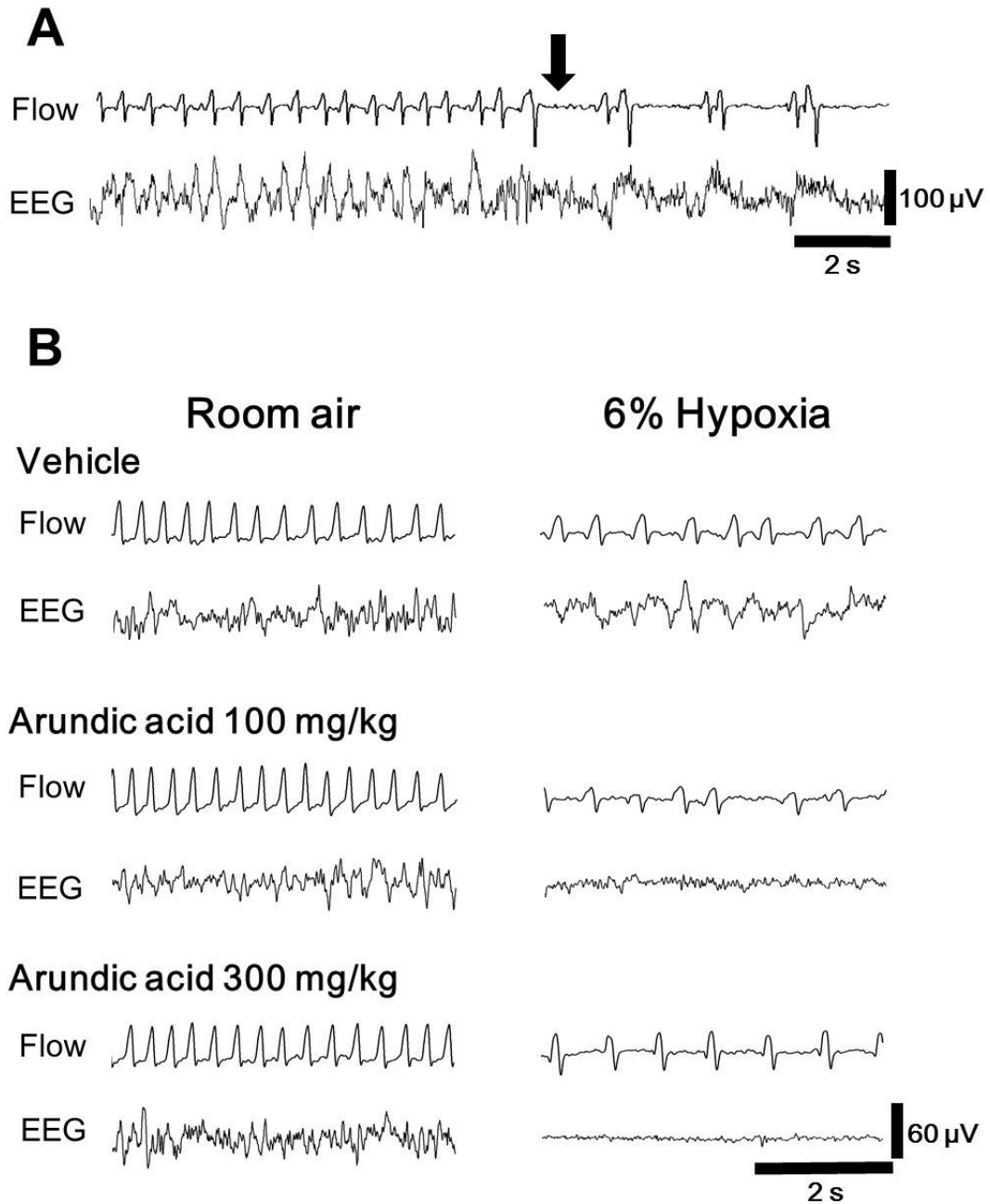


図 16 呼吸流量と脳波の信号

呼吸流量の吸気を上向きで示す。A は低酸素換気抑制出現前後の呼吸流量および脳波 (arundic acid 投与前)。低酸素負荷により、呼吸が一過性に増強された後、呼吸抑制が出現した。矢印の時点を呼吸抑制出現時点とした。B は arundic acid 投与前、低用量投与前、高用量投与前における通常の酸素濃度下および強い低酸素下での呼吸流量と脳波信号の一例である。



	V <sub>T</sub> [ $\mu$ L/g]			RR [breath/min]			
	Vehicle	low AA	high AA	Vehicle	low AA	high AA	
Room Air	9.54 $\pm$ 0.65	8.54 $\pm$ 0.70	9.00 $\pm$ 0.93	Room Air	136.4 $\pm$ 7.2	145.2 $\pm$ 11.5	160.8 $\pm$ 6.1
6% O <sub>2</sub>	8.67 $\pm$ 1.55	8.29 $\pm$ 1.34	9.40 $\pm$ 1.41	6% O <sub>2</sub>	92.4 $\pm$ 11.5	62.2 $\pm$ 5.0*	46.8 $\pm$ 3.3*

	V <sub>E</sub> [mL/g/min]			EEG power [ $\mu$ V <sup>2</sup> /Hz]			
	Vehicle	low AA	high AA	Vehicle	low AA	high AA	
Room Air	1.28 $\pm$ 0.08	1.22 $\pm$ 0.13	1.43 $\pm$ 0.14	Room Air	11.36 $\pm$ 1.74	10.47 $\pm$ 1.66	11.78 $\pm$ 1.51
6% O <sub>2</sub>	0.71 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.07*	0.42 $\pm$ 0.06*	6% O <sub>2</sub>	5.12 $\pm$ 1.11	2.90 $\pm$ 0.77*	0.61 $\pm$ 0.17*

表 1 呼吸パラメーターと脳波パワー

arundic acid 投与前, 低用量投与下, 高用量投与下における通常の酸素濃度下および 6% の低酸素下での呼吸パラメーターと脳波のガンマ波帯域のパワーを平均 $\pm$ 標準誤差で示した. V<sub>T</sub>: 一回換気量, RR: 呼吸数, V<sub>E</sub>: 分時換気量, EEG power: 6% の低酸素負荷で呼吸抑制出現時の, ガンマ波帯域のパワーを示す.

\*は有意水準 0.05 で有意差あり, Bonferroni の補正を行った. Low AA は arundic acid 100mg/kg, high AA は arundic acid 200mg/kg (累計 300mg/kg) の投与を示す.

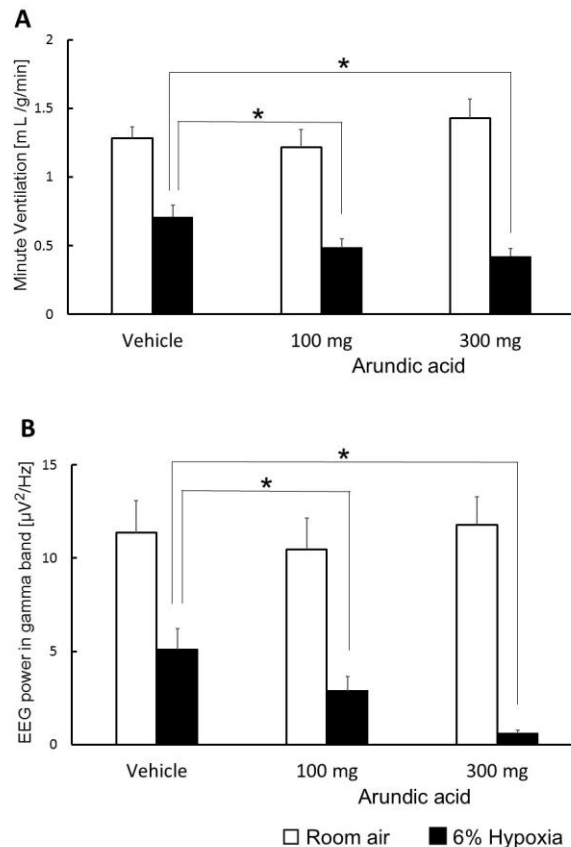


図 17 各 arundic acid 投与量における分時換気量と脳波ガンマ帯域のパワー

arundic acid 投与前より, arundic acid 低用量投与下, および arundic acid 高用量投与下の分時換気量および脳波のガンマ波帯域のパワーが有意な低下を示した.

また、arundic acid を投与されなかったマウスに比べ、前投与されたマウスの低酸素負荷後の視床下部における神経興奮マーカーの c-Fos タンパク発現は、投与されなかった場合に比較して、ストレス時の呼吸反応を制御する視床下部背内側野で明らかに減少した (図 18C~F)。すなわち、低酸素換気抑制に大脳皮質機能の減弱に基づく視床下部背内側野の興奮性の低下が起こっていた。

シャムテストでの各 DMSO 投与量下における通常の酸素濃度下および強い低酸素下での  $\dot{V}_E$  およびガンマ波帯域の脳波パワーは表 2 の通りであった。

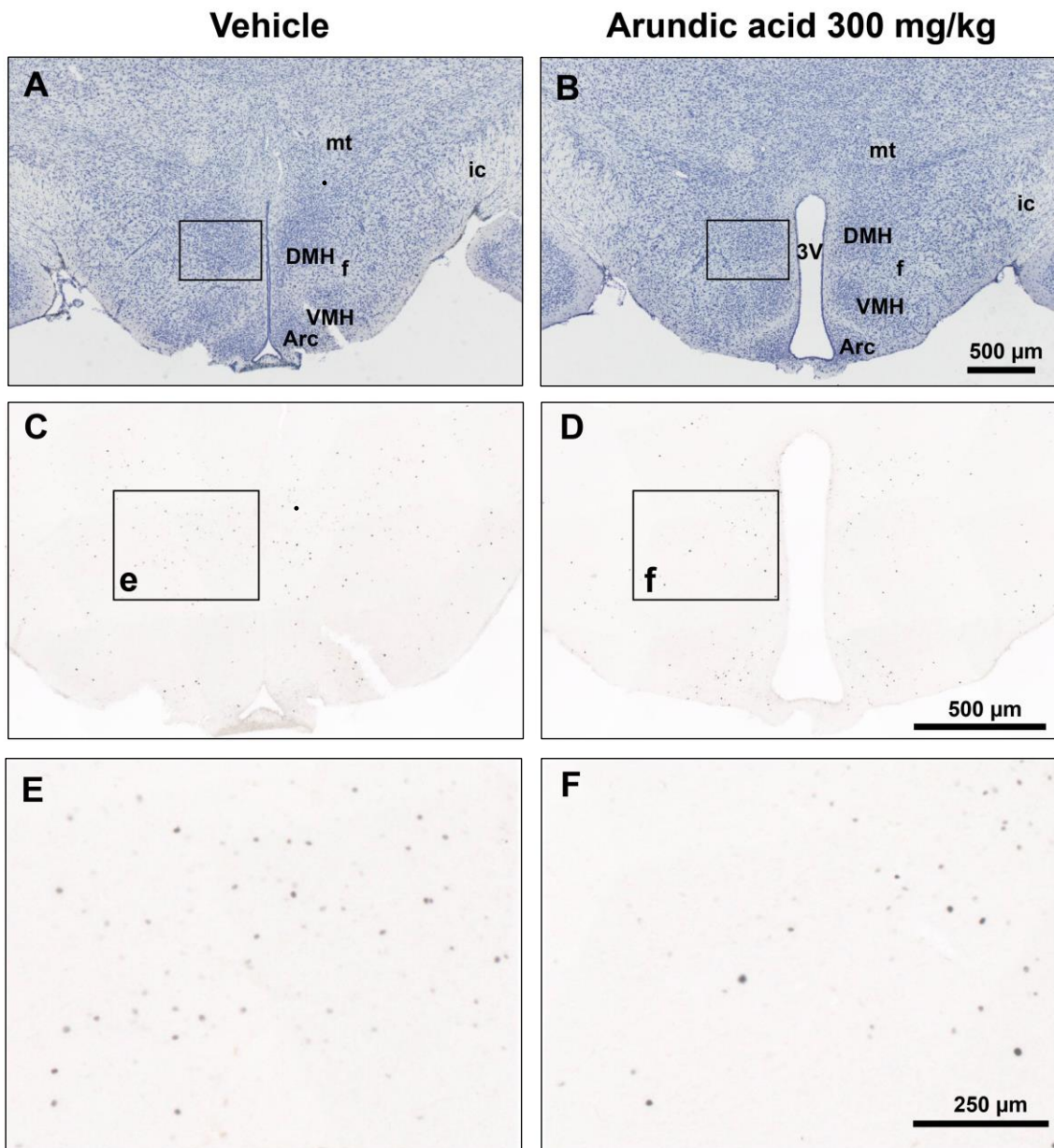


図 18 低酸素負荷時のマウスの視床下部背内側核の c-Fos 発現

左は arundic acid 投与前に，右は arundic acid 投与後に低酸素を負荷したマウスの視床下部背内側核周辺の管状断面標本の典型例．A と B はニッスル染色写真を示し，それぞれの枠は視床下部背内側核周辺を示す．C と D は c-Fos 染色写真で，E と F は C と D の枠内 e と f（視床下部背内側核周辺）を拡大したものを示す．Arundic acid 投与前は，多くの c-Fos 陽性細胞が観察されたが（C, E），arundic acid 投与後の c-Fos 発現は抑制されていた（D, F）．3V；第三脳室，Arc；弓状核，fx；脳弓，ic；内包，mt；乳頭体視床束，VMH；視床下部腹内側核

$\dot{V}_E$ への DMSO の影響 [mL/g/min]		
	Rom Air	6% O <sub>2</sub>
DMSO[0.5mg/g]	1.47	0.77
DMSO[1.0mg/g]	1.41	0.89
DMSO[2.0mg/g]	1.46	0.91

脳波のガンマ波帯域パワーへの DMSO の影響 [ $\mu V^2/Hz$ ]		
	Rom Air	6% O <sub>2</sub>
DMSO[0.5mg/g]	8.77	5.19
DMSO[1.0mg/g]	8.90	5.22
DMSO[2.0mg/g]	9.30	4.97

表 2 シヤムテストの結果

本実験と同様のタイミングおよび DMSO 投与量で DMSO を投与したシヤム実験における各 DMSO 投与下の通常の酸素濃度下および 6% の低酸素下での  $V_E$  : 分時換気量, および脳波ガンマ波帯域のパワーを示す.

#### 5.4 考察

呼吸出力は, 主に脳幹によって調節されるが, 高位脳も呼吸調節に関与している (Fink ら 1962 ; Horn and Waldrop 1998). 従来は, 生体が低酸素状態におかれると, 急激で強い低酸素でなければ, 頸動脈小体など末梢化学受容器がこれを感じ, 換気量が増加すると考えられていた. すなわち, 末梢化学受容器からの情報が, 下位脳幹内の呼吸ニューロンネットワークの活動を増強し, 呼吸ニューロン出力が増強し, 換気量が増加するという機序が考えられていた. そして一方で, 末梢化学受容器からの情報が脳皮質に伝わると, 脳皮質が呼吸困難感を知覚し, 視床下部から延髄呼吸神経機構へ投射する下行性の神経促進ドライブ (central command) を増強させ, 呼吸出力を増強させると考えられてきた. 呼吸抑制は, この脳皮質による呼吸増強反応が働かないときに出現すると考えられてきた (Neubauer ら 1990). この仮説は, Fink らの脳皮質領

域の活性化が視床下部を抑制し、呼吸を減弱させるという報告 (Fink ら 1962) と大脳皮質を剥離したネコでは、低酸素に対する呼吸増強応答が促進するという報告に基づいている (Tenney and Ou 1977). 本実験では、急激で強い低酸素負荷時に呼吸抑制と大脳皮質機能を示す脳波の抑制が同時に起こっていた. ガンマ波帯域の脳波の抑制は、覚醒度と大脳皮質機能が低下していることを意味する (Llinás ら 1998 ; Ruiz-Mejias ら 2011 ; Skinner ら 2000 ; Sohal 2012). Tenney and Ou によれば、大脳皮質の剥離は視床下部を脱抑制させ、低酸素負荷時の呼吸を増強させるが (Tenney and Ou 1977), 本実験の結果は、強い低酸素が覚醒を低下させるとき、大脳皮質機能だけでなく、視床下部を含む高位脳全体の機能が低下する可能性を示す. 視床下部から延髄呼吸神経機構に投射する下行性の神経促進ドライブ (central command) の減弱は、呼吸を抑制させる可能性がある.

既述の通り、近年、アストロサイトの有する多様な機能が明らかにされてきているが、アストロサイトが覚醒と大脳皮質機能の維持の役割を持つという報告がある (Lee ら 2014 ; Pereira and Furlan 2009 ; Robertson 2013 ; Thrane ら 2012). 本実験では、アストロサイトの活性化阻害剤 arundic acid を用いて、強い低酸素負荷時に、アストロサイトが大脳皮質機能の維持と呼吸調節機能の維持に関与しているかを検証した. Arundic Acid は、アストロサイトに特異的な線維性タンパクであり、重合して中間径フィラメントとなる Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の産生と S100 タンパク質合成を抑制し、グリア細胞のグルタミン酸トランスポーターである glutamate aspartate transporter (GLAST) の発現を増加させ、グルタミン酸受容体に拮抗するキヌレン酸を遊離させる (Asano ら 2005a, 2005b ; Mori ら 2004 ; Tateishi ら 2002 ; Wajima ら 2013 ; Yamamura ら 2013 ; Yanagisawa 2015). 本実験でマウスへの DMSO 投与総量は、マウスの体重 1kg あたり 2.0g 以内で、脳機能に影響を与えない量を使用した (Takeda ら 2016). なお、予備実験として、arundic acid を投与せず、DMSO のみを本実験と同量、同じタイミングで投与するシャムテストを 1 例実施した. その結果、DMSO 投与前後で計測パラメーターに差異を認めず、DMSO 自体はこの用量では脳機能や呼吸機能に影響を与えなかった.

低酸素負荷による視床下部背内側核の c-Fos タンパクの発現は, arundic acid の投与により抑制された. 視床下部背内側核は下位脳幹の呼吸ネットワークをドライブさせる central command が通るエリアである (Dampney ら 2008 ; Horiuchi 2009). 本実験では, arundic acid が視床下部背内側核の c-Fos タンパク発現を減少させることを示したが, 低酸素で興奮あるいは抑制される細胞タイプを特定するために, ニューロンの特異的マーカーである NeuN とアストロサイトの特異的マーカーである GFAP による c-Fos の二重免疫染色などを実施することで, 今後さらに詳細な検討を行う必要がある (Aoyama ら 2011). 本実験結果は, arundic acid 投与が, 低酸素換気抑制時のガンマ波帯域の脳波パワーを低下させ, 呼吸抑制を増強することを示したが, このことは, アストロサイトが低酸素負荷時における大脳皮質機能の維持, および呼吸の維持・増強の役割を持つ可能性を示唆するものである.

近年のグリア細胞に関する多くの知見によれば, アストロサイトが高位脳と脳幹における情報伝達プロセスに影響を与えることから, ニューロン (神経細胞) のみならず, アストロサイトも呼吸調節の重要なプレイヤーと考えられている (Hülsmann ら 2000 ; Young ら 2005 ; Huxtable ら 2009, 2010 ; Erlichman ら 2010 ; Gourine ら 2010 ; Okada ら 2012 ; Funk ら 2015 ; Oku ら 2016). さらに, 最近, 脳幹部のアストロサイトが直接的に低酸素換気応答に関与していると唱える者もいる (Angelova ら 2015; Tadmouri ら 2014). 本実験では, 低酸素換気抑制が arundic acid 投与量に応じて増強したため (図 17, 表 1), アストロサイトは急激かつ強い低酸素負荷による換気抑制に対して拮抗的に働いていると考えられる.

これまで, てんかんやパーキンソン病など, 様々な病態の動物モデルでアストロサイトの活性化が認められてきたため, アストロサイトの活性化阻害剤の arundic acid は効果的にてんかん発作を抑えることや, 神経保護的な作用を持つことが明らかになっている (Kato ら 2003; Yamamura ら 2013). 従って, arundic acid は疾患を発症している状態において, 薬効を発揮する可能性がある. 本実験で, arundic acid の前投与が急激かつ強い低酸素負荷時の呼吸出力の低下や大脳皮質機能低下を増強していたことを考えると, arundic acid が強い低酸素負荷

時に呼吸機能維持の方向に働かない可能性がある。しかし、arundic acid が、病気が発症しているときのアストログリオシスとアストロサイトの過剰な興奮を抑制することと、強い低酸素負荷時に呼吸出力や大脳皮質機能を低下させたことは、対立するものではない。本実験で使用したマウスのような健常な動物に対して arundic acid がアストロサイトの生理学的反応を抑制することは、動物にとって必ずしも有利に作用するとは限らないと考える。

低酸素換気抑制は、重度の喘息発作で急に強い低酸素血症となった場合などにみられることがある (Kikuchi ら 1994)。本実験で得た知見は、アストロサイトの機能を活性化することによって、低酸素換気抑制を防ぐ薬剤の開発に貢献する可能性がある。また、アストロサイトは、従来のニューロンのみならず焦点を当てた研究からは解明できなかった乳幼児突然死症候群、過換気症候群、睡眠時無呼吸症候群などの病態に深く関与している可能性も考えられる。呼吸調節におけるアストロサイトの役割について知見を得ることは、これらの疾患の病態解明や治療・介入方法の確立に寄与すると期待される。

本実験から、アストロサイトが急激で強い低酸素負荷時の大脳皮質機能維持と呼吸機能維持の役割を果たしていることが示唆された。低酸素換気抑制は強い低酸素負荷により大脳皮質機能が抑えられ、覚醒度が低下し、大脳皮質によって賦活化されている視床下部の活動が抑制される結果起こるが、アストロサイトが大脳皮質機能維持の役割を果たすことで、呼吸抑制に拮抗的に働いている可能性が考えられた (図 19)。

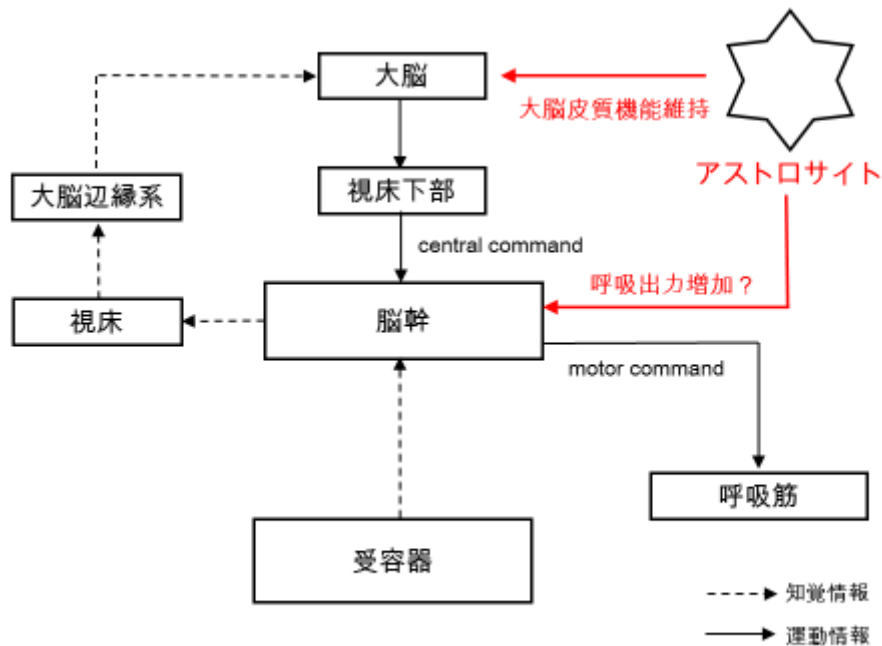


図 19 本実験で得られた知見

低酸素換気抑制は強い低酸素負荷により大脳皮質機能が抑えられ、覚醒度が低下し、大脳皮質によって賦活化されている視床下部の活動が抑制される結果起こる可能性がある。アストロサイトは強い低酸素負荷時の大脳皮質機能維持の役割を果たすことで、呼吸抑制に拮抗的に働いている可能性がある。

## 5.5 補足

大脳皮質機能・覚醒度と呼吸の関係について、追加実験を補足的に行った。

### 5.5.1 背景および目的

突発性睡眠、居眠り病とも呼ばれるナルコレプシーに対する治療薬 modafinil は覚醒度を上昇させる効果を持つ。この modafinil 投与による覚醒度増強が呼吸に影響を与えるかを検証した。具体的には、5.1 から 5.4 とほぼ同様の機器を用い、無麻酔で覚醒下のマウスを対象に、modafinil 投与量ごとの、通常酸素濃度下、高二酸化炭素下、低酸素下の脳波と呼吸応答を計測し、検証した。



## 5.5.2 方法および実験プロトコル

本実験におけるすべての動物実験は、村山医療センター動物実験委員会の承認を得た後、「実験動物の管理と使用に関する指針 第 8 版」および日本生理学会の生理学領域における動物実験に関する基本的指針を遵守し、実施した。

実験には正常に覚醒し、呼吸するオスの C57BL/6 マウス (16.5±0.6 週齢, 9 例) を用いた。実験に用いたマウスは、5.2.1 と同様に飼育した。脳波計測、呼吸計測および呼吸パラメーターの計算も 5.2.2 および 5.2.3 と同様に行った (図 12)。

Modafinil の投与前と投与後の各計測パラメーターを比較した。まず、DMSO をマウスの腹腔内に注射した後、マウスを chamber 内に入れ、通常酸素濃度下 (20.9%) で 50 分間、chamber に馴化させた。計測はマウスの呼吸が落ち着いたのを確認してから開始した。計測開始から 10 分間、通常酸素濃度下において後、アクリルボックス内に流入させる酸素濃度 100% のガス、「酸素濃度 95% + 二酸化炭素濃度 5%」のガス、空気および窒素の量を調節し、酸素濃度 100% 下に 5 分間、続けて「酸素濃度 95% + 二酸化炭素濃度 5%」下に 5 分間、さらに続けて酸素濃度 100% 下に 5 分間、通常酸素濃度に 5 分間、酸素濃度 10% 下に 5 分間、通常酸素濃度に 20 分間曝した (図 20)。Modafinil の投与は、動物愛護の観点から使用する動物数を最小限にするため加算的に行い、まず (1) modafinil の溶媒である DMSO のみ体重 1kg あたり 0.5mL、続いて (2) modafinil 体重 1kg あたり 100mg、さらに (3) modafinil 体重 1kg あたり 100mg (合計 200mg) をそれぞれ投与した。(2) および (3) の投与に際しては、modafinil を DMSO に溶かした溶液を腹腔内に投与した。3 段階の modafinil 投与量下でそれぞれ上記のガス負荷を行ったが、各試行は、それぞれ 60 分間の間隔をおいて行った。本実験でマウスに投与した DMSO 総量は、マウスの体重 1kg あたり 1.7g 以内で、脳機能に影響を与える可能性があると考えられる体重 1kg あたり 3.5g を超えない量であった (Takeda ら 2016)。

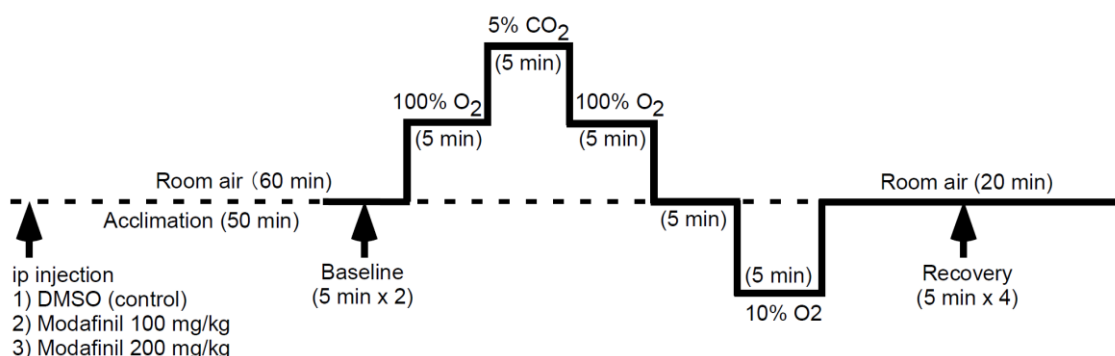


図 20 追加実験のプロトコル

計測開始から 10 分間、通常の酸素濃度下においた後、アクリルボックス内に流入させる酸素濃度 100% のガス、「酸素濃度 95% + 二酸化炭素濃度 5%」のガス、空気および窒素の量を調節し、酸素濃度 100% 下に 5 分間、「酸素濃度 95% + 二酸化炭素濃度 5%」下に 5 分間、酸素濃度 100% 下に 5 分間、通常の酸素濃度に 5 分間、酸素濃度 10% 下に 5 分間、通常の酸素濃度に 20 分間、それぞれ連続で曝した。これらを 3 段階の modafinil 投与下で行った。

### 5.5.3 データ解析

データ解析に際し、マウスがスニッフィング、グルーミング、リッキングなどの行動をみせていた時間は解析から除外した。VT, RR, VE について、3 分類 (modafinil 投与量：無 VS 低用量 VS 高用量) × 4 分類 (room air VS 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub> VS 10% O<sub>2</sub> VS room air) の二元配置分散分析を行った。球面性の仮定が成立していない場合は、Greenhouse-Geisser's のイプシロンを用いた自由度補正を行った。主効果または交互作用に有意差がある場合は、*post-hoc test* として Bonferroni の補正を行った。解析は MATLAB 2015a (MathWorks 社製) を用いて行い、統計検定は SPSS 15.0 (IBM 社製) を用いて、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 5.5.4 結果

9 例のマウスを対象に実験を行ったが、データ解析に際しては、modafinil を

高用量投与後に死亡した 1 例を除外した.

脳波信号は modafinil 投与後, 振幅が小さくなり, より高い帯域を示すようになっていた. 安静時の呼吸流量は, modafinil 投与後の覚醒度上昇に従い, より不規則になっていた (図 21). modafinil 投与前後で  $V_T$ ,  $RR$ ,  $\dot{V}_E$  に有意差はなかった (図 22).

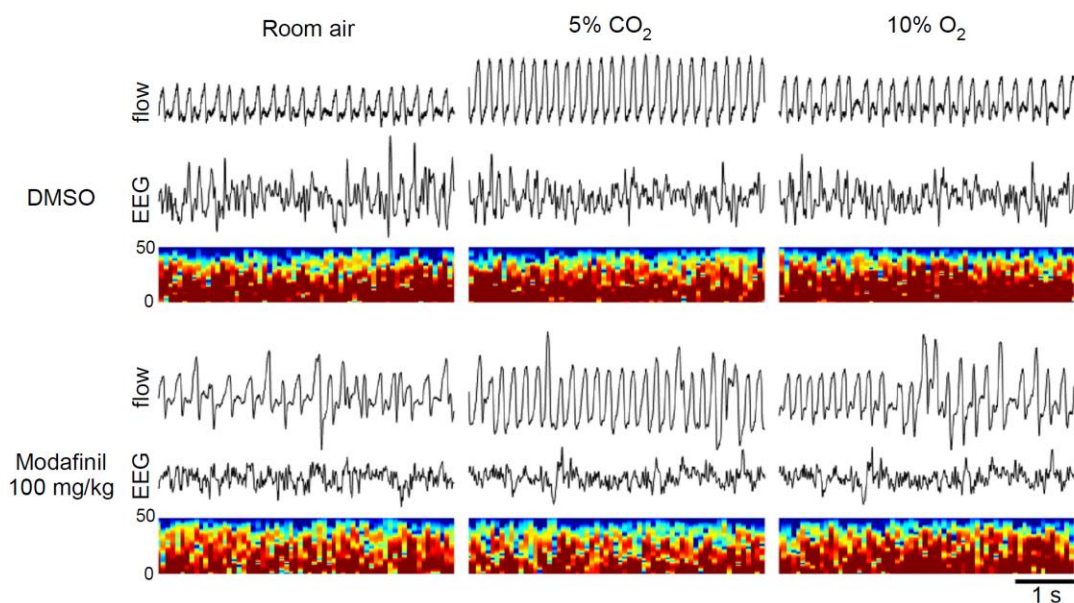


図 21 呼吸流量と脳波信号とパワースペクトログラム

呼吸流量の吸気を上向きで示す. 代表的なマウスの modafinil 投与前, 低用量投与下, 高用量投与下の room air 時, 高二酸化炭素負荷時, 低酸素負荷時の呼吸流量, 脳波およびパワースペクトログラムを示す.

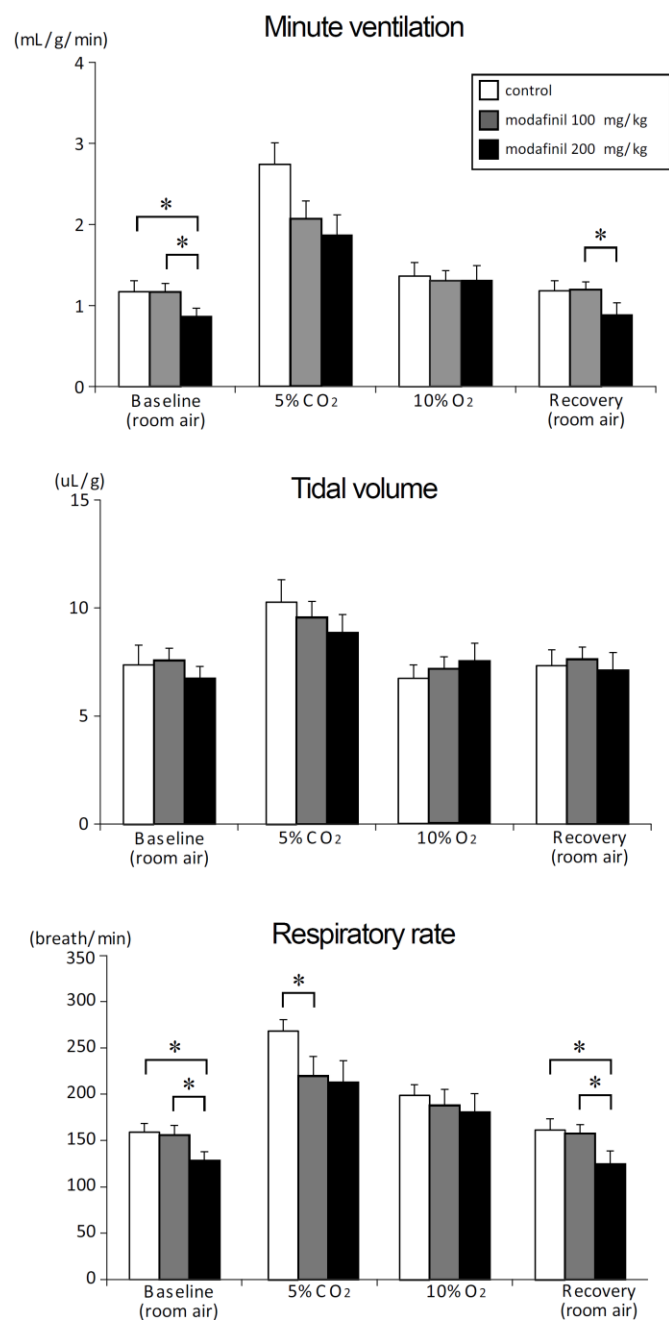


図 22 各 3 段階の modafinil 投与下および呼吸流量の吸気を上向きで示す。代表 modafinil 投与前, 低用量投与下, 高用量投与下における room air, 5% 二酸化炭素, 10% 低酸素, room air (リカバリー) 下での  $V_T$ ,  $RR$ ,  $V_E$  を示す。

### 5.5.5 結論

本追加実験では, modafinil による覚醒度増強, すなわち大脳皮質機能の促進は, 安静時の呼吸を増大させず, 高二酸化炭素負荷や低酸素負荷時の換気応答

に影響を及ぼさなかった。その原因としては、modafinil は大脳皮質機能を促進しても呼吸増強機能を有する視床下部機能は促進しないことによる可能性が考えられたが、その確認のためには、modafinil が大脳皮質と視床下部の機能に及ぼす効果を分離して評価する実験が必要と考えられた。

## 6. 低酸素負荷時のけいれん発生と換気抑制に関する実験

### 6.1 背景と目的

強い低酸素状態は、けいれんを引き起こす (Miyake ら 2007 ; Gillam-Krakauer and Carter 2012). 一方で、けいれんは、けいれん発作後の呼吸抑制を引き起こす。けいれん由来の呼吸抑制は、更なる低酸素状態やけいれん増悪を起し、呼吸停止に起因する突然死さえ導きうる (So ら 2000; So 2008; Sowers ら 2013). この悪循環は、てんかん患者にとって深刻な脅威である。しかし、低酸素がけいれんを引き起こす機序や、けいれんが呼吸抑制を引き起こす機序は不明なままである。既述の通り、近年の研究から、アストロサイトがニューロンと積極的な情報交換を行いつつ、ニューロンとは異なる仕組みで脳機能発現に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている (Parri ら 2001 ; Angulo ら 2004 ; Fellin ら 2004 ; Tian ら 2005 ; Halassa and Haydon 2010 ; Parpura ら 2012 ; Pérez-Alvarez and Araque 2013). そして、アストロサイトは、てんかんをはじめ、様々な神経疾患におけるニューロンネットワークの異常興奮に密接に関与していることが提唱されている (Wetherington ら 2008 ; Gómez-Gonzalo ら 2010 ; Coulter and Steinhäuser 2015) .

そこで筆者は、アストロサイトが低酸素由来のけいれんの発生・進展、およびそれに伴う呼吸抑制に重要な役割を果たしているとの仮説を検証することを目的とし、無麻酔で覚醒下のマウスを対象に、薬理学的手法を用いてアストロサイトの活性化を阻害する前後での、強い低酸素負荷時のけいれん発生状況と呼吸出力応答を解析した。

### 6.2 対象と方法

#### 6.2.1 対象

本実験におけるすべての動物実験は、村山医療センターの動物実験委員会の承認を得た後、「実験動物の管理と使用に関する指針 第 8 版」および日本生理学会の生理学領域における動物実験に関する基本的指針を遵守し、実施した。

実験には正常に覚醒し、低酸素負荷時にけいれんを起こしたオスの C57BL/6

マウス（8～13 週齢，18 例）を用いた．実験に用いたマウスは，個別のケージで飼い，摂氏 23～24 度，湿度 50～60%，12 時間ごとの明暗周期で，十分な食物と水を与えつつ飼育した．

### 6.2.2 脳波計測

マウスの前脳部の機能的な状態をモニターするため，脳波を記録した．脳波電極をマウス頭蓋骨上に埋め込む手術は，**5.2.2** と同様に行い，電極に用いる微小ネジ 3 本も **5.2.2** と同様に **図 10** で示す位置に埋め込んだ．3 本のうち 2 本は記録電極として bregma の後方 2.5 mm かつ正中線から側方 2.5 mm の箇所に，1 本は接地電極として正中線上，bregma から前方 4.5 mm の箇所にそれぞれ埋め込んだ（**図 10** 参照）．電極埋め込み後，頭部を歯科用レジンで固定した．開頭手術の負担が結果に影響しないよう，マウスは術後 1 週間以上通常飼育し，回復させてから実験に用いた．

脳波信号は，増幅器（JB-101J および AB-651J；いずれも 日本光電社製）で増幅し，0.08～49Hz の帯域でフィルターにかけた後，高速フーリエ変換によるスペクトル解析を行った．

### 6.2.3 呼吸計測

呼吸応答も，**5.2.3** と同様，whole body plethysmograph（PLY 310；EMMS 社製）を用いて計測した（**図 11**）．計測は，whole body plethysmograph を 20×20×20 cm のアクリルボックスの中に置き，摂氏 25 度を維持し，chamber 内の空気をサッキングマシンで吸気しながら行った．計測開始前に，マウスを recording chamber 内に入れ，頭部を固定した後，十分に馴化の時間をとってから計測を行った．呼吸流量の計測および呼吸パラメーターの計算も **5.2.3** と同様の方法で行った．すなわち，呼吸パラメーターについては，呼吸流量の信号から各呼吸サイクルの体重あたり一回換気量を算出し，これらの平均値を解析対象時間における体重あたり一回換気量（ $V_T$ ；tidal volume；[ $\mu\text{L}/\text{weight (gram)}$ ]) として算出した．さらに，呼吸流量の波形から呼吸数（RR；Respiratory rate；[breath/min]）を数

え、 $V_T$  と RR の積で体重あたり分時換気量 ( $\dot{V}_E$  ; Minute ventilation ; [mL/g/min]) を算出した (図 12).

#### 6.2.4 実験プロトコル

アストロサイトの活性化阻害剤である arundic acid の投与前と投与後の各計測パラメーターを比較した (Asano ら 2005a, 2005b ; Mori e ら 2004 ; Tateishi ら 2002 ; Wajima ら 2013 ; Yamamura ら 2013 ; Yanagisawa ら 2015). まず, DMSO をマウスの腹腔内に注射した後, マウスを chamber 内に入れ, 通常酸素濃度下 (20.9%) で 40 分間から 60 分間, chamber に馴化させた. 計測は, マウスの呼吸が落ち着いたのを確認してから開始した. 計測開始から 3 分間, 通常酸素濃度下においた後, アクリルボックス内に流入させる窒素量を調節し, マウスに酸素濃度 6% の低酸素負荷をかけた. マウスへの低酸素負荷は, 顕著な呼吸抑制が出現した 10 秒後まで行い, 呼吸抑制出現 10 秒後からアクリルボックス内に空気を流入させ, 速やかに通常酸素濃度 (20.9%) に戻した. 通常酸素濃度に戻した後は, そのままさらに 10 分間計測を行った. この最初の低酸素負荷に生き残ったマウスに arundic acid (100mg/kg) を腹腔内注射し, 注射後, 通常酸素濃度下に 60 分間以上おき, 十分に回復させた後に 2 回目の低酸素負荷実験を行った. 2 回目の 6% の低酸素負荷では, 顕著な呼吸抑制が出現するまで低酸素負荷を続行した. 2 回目の低酸素負荷実験では, けいれんが惹起された後, 呼吸が停止するまで低酸素負荷をかけた. 薬物は, (1) DMSO のみ体重 1kg あたり 0.47mL, (2) arundic acid 体重 1kg あたり 100mg をそれぞれ投与した. Arundic acid の投与に際しては, arundic acid を DMSO および生理食塩水に arundic acid : DMSO : 生理食塩水 = 1 : 4 : 5 の割合で溶かした溶液を腹腔内に投与した. DMSO のマウスへの投与は総量が一定以上になると脳機能に影響を与えるという報告があるが (Hülsmann ら 1999; Jacob and de la Torre, 2009), 本実験でマウスに投与した DMSO 総量は, マウスの体重 1kg あたり 1.0g 以内で, 脳機能に影響を与える可能性があるとされる体重 1kg あたり 3.5g を超えない量であった (Takeda ら 2016). けいれん発生時点は, 肉眼観察と呼吸流量と脳波信号の異常波形で確認した. 呼吸停止は, 呼吸流量の信号がフラットにな



った時点と定義した。低酸素負荷時の呼吸パラメーターは、酸素濃度が 6% に到達してから 10 秒間のデータを採用し、解析した。

### 6.2.5 データ解析

データ解析に際し、マウスがスニッフィング、グルーミング、リッキングなどの行動をとり、正常で安静な呼吸パターンが見られなかった時間は解析から除外した。けいれんによるアーチファクトが呼吸流量に混入してしまうため、けいれんの繰り返し発生後の時間帯の呼吸パラメーターは解析から除外した。

Arundic acid 投与前に 6% の低酸素負荷で死亡した群と投与後に 6% の低酸素負荷で死亡した群の生存率を一般化 Wilcoxon 検定で検証した。また、arundic acid 投与前に死亡した群と投与後に死亡した群のけいれん発生までの時間および呼吸パラメーター ( $V_T$ : 一回換気量,  $RR$ : 呼吸数,  $\dot{V}_E$ : 分時換気量) をマンホイットニーの U 検定で解析した。さらに、arundic acid 投与後の 6% 低酸素負荷で死亡したマウス 7 例の、DMSO のみ投与時 (arundic acid 投与前) および同マウスの arundic acid 投与時のけいれん発生までの時間は Wilcoxon の符号順位検定で解析した。各群の各パラメーターに Shapiro-Wilk 検定を行ったところ、A 群の低酸素負荷から死亡までの時間や B 群の低酸素負荷時の  $RR$  などのデータに正規性が認められなかったため、データの表示および統計はデータが正規性を満たさない場合の方法に拠った。統計検定は MATLAB 2016a (MathWorks 社製) を用いて行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 6.3 結果

### 6.3.1 低酸素への換気と脳波の応答

全ての試行において、強い低酸素負荷により、けいれんに引き続き呼吸抑制が出現した。全 18 匹のうち 11 例のマウス (以下 A 群) は、arundic acid 投与前の低酸素負荷中あるいは負荷後に、けいれんに引き続き不可逆的な呼吸停止を起こした。Arundic acid 投与後に低酸素負荷でけいれんに続き不可逆的な呼吸停

止を起こした7例のマウス（以下B群）では、A群と比べて、けいれん発生や呼吸抑制の出現が遅くなっていた。Arundic acid投与前に死亡したA群と arundic acid投与後に死亡したB群の生存率を示す（図23）。

低酸素負荷開始から呼吸停止までの時間を比較すると、A群はB群よりも有意に短かった ( $p < 0.005$ )。A群の通常の酸素濃度下での  $V_T$ , RR,  $\dot{V}_E$  の中央値は  $7.83 \mu\text{L/g}$ , 150 breaths/min,  $1.24 \text{ mL/g/min}$  で、低酸素負荷開始後10秒間での  $V_T$ , RR,  $\dot{V}_E$  の中央値はそれぞれ  $8.07 \mu\text{L/g}$ , 234 breaths/min,  $1.92 \text{ mL/g/min}$  であった（表3）。

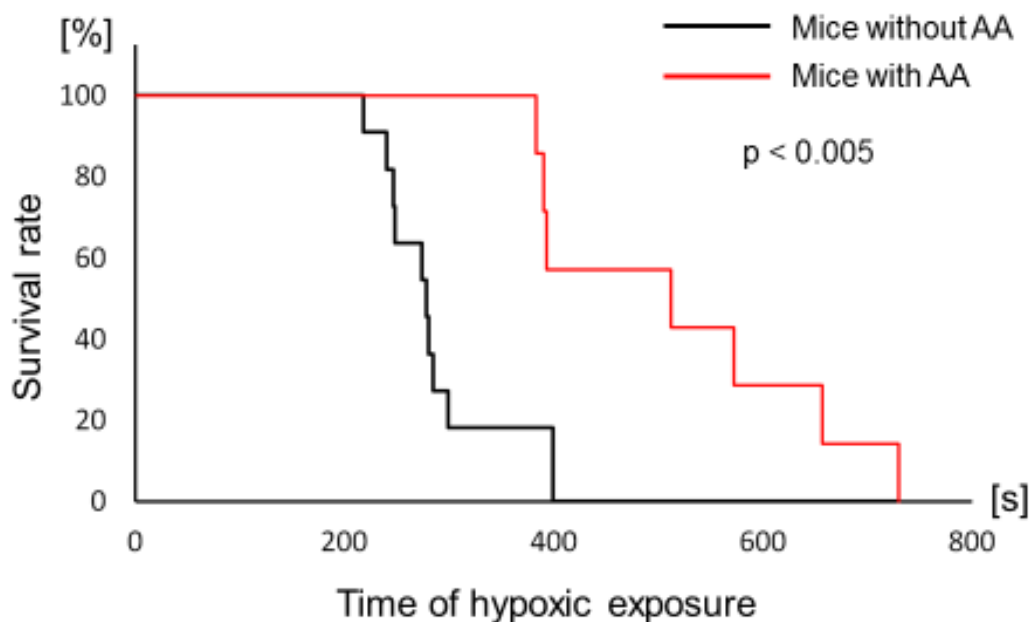


図23 低酸素負荷開始から呼吸停止までの時間による arundic acid 投与前群（非投与群）と投与後群（投与群）の Kaplan-Meier 曲線

Arundic acid 投与前群（A群； $n=11$ ）， arundic acid 投与後群（B群； $n=7$ ）の生存率を Kaplan-Meier 曲線で示す。生存率は、低酸素負荷開始から呼吸停止までの時間で評価した。Arundic acid 投与により、低酸素負荷開始から呼吸停止までの時間は有意に延長された。AA： arundic acid

	Room Air			Hypoxia		
	$V_T$ [ $\mu\text{L/g}$ ]	RR [breath/min]	$\dot{V}_E$ [mL/g/min]	$V_T$ [ $\mu\text{L/g}$ ]	RR [breath/min]	$\dot{V}_E$ [mL/g/min]
Without AA	7.83 (7.39-9.15)	150 (135-165)	1.24 (1.06-1.29)	8.07 (7.78-8.19)	234 (221-243)	1.92 (1.84-1.97)
With AA before AA	7.40 (6.98-7.53)	174 (147-195)	1.21 (1.16-1.37)	7.54 (7.28-7.68)	255 (240-262)	1.86 (1.86-2.03)

表3 A群とB群の arundic acid 投与前の試行における通常の酸素濃度 (20.9%) 下と6%の低酸素下における呼吸パラメーター

Arundic acid 投与後の低酸素負荷で死亡した群 (B群; n=7) の arundic acid 投与前の低酸素負荷試行における呼吸パラメーターと arundic acid 投与前の低酸素負荷で死亡した群 (A群; n=11) の呼吸パラメーターを中央値 (四分位範囲) で示す. AA: arundic acid

呼吸停止したマウスはすべて、急激で強い低酸素負荷後、けいれんが発生し、呼吸が抑制され、呼吸停止に至るといった経過を辿っていた。酸素濃度、呼吸流量、脳波、脳波スペクトログラムを用いて、**図 24** に当該経過の代表例を示す。B群の arundic acid 投与前の試行における通常の酸素濃度下での  $V_T$ , RR,  $\dot{V}_E$  の中央値は 7.40  $\mu\text{L/g}$ , 174 breaths/min, 1.21 mL/g/min で、低酸素負荷開始後 10 秒間での  $V_T$ , RR,  $\dot{V}_E$  の中央値はそれぞれ 7.54  $\mu\text{L/g}$ , 255 breaths/min, 1.86 mL/g/min であった (**表 3**)。Arundic acid は通常の酸素濃度下では呼吸にも脳波にも影響を与えていなかった。6%の低酸素負荷は、arundic acid 投与前においても投与後においても、けいれんを突然誘発し、けいれん後に呼吸抑制と脳波の抑制が見られた。けいれん発生時には、棘波などけいれん特有の脳波形が観察された。けいれん発生後の脳波の抑制は、本実験におけるすべてのマウスで見られた。呼吸停止の直前にはあえぎ呼吸・ギヤスピングが現れ、呼吸が消失する前に脳波がフラットになっていた。通常の酸素濃度下での呼吸流量と脳波 (けいれん発生時でない正常呼吸のもの)、低酸素負荷時のけいれん発生前後の呼吸流量と脳波、呼吸停止前後の呼吸流量と脳波の代表例をそれぞれ**図 25** で示す。この例は arundic acid 投与前の試行時のものである。

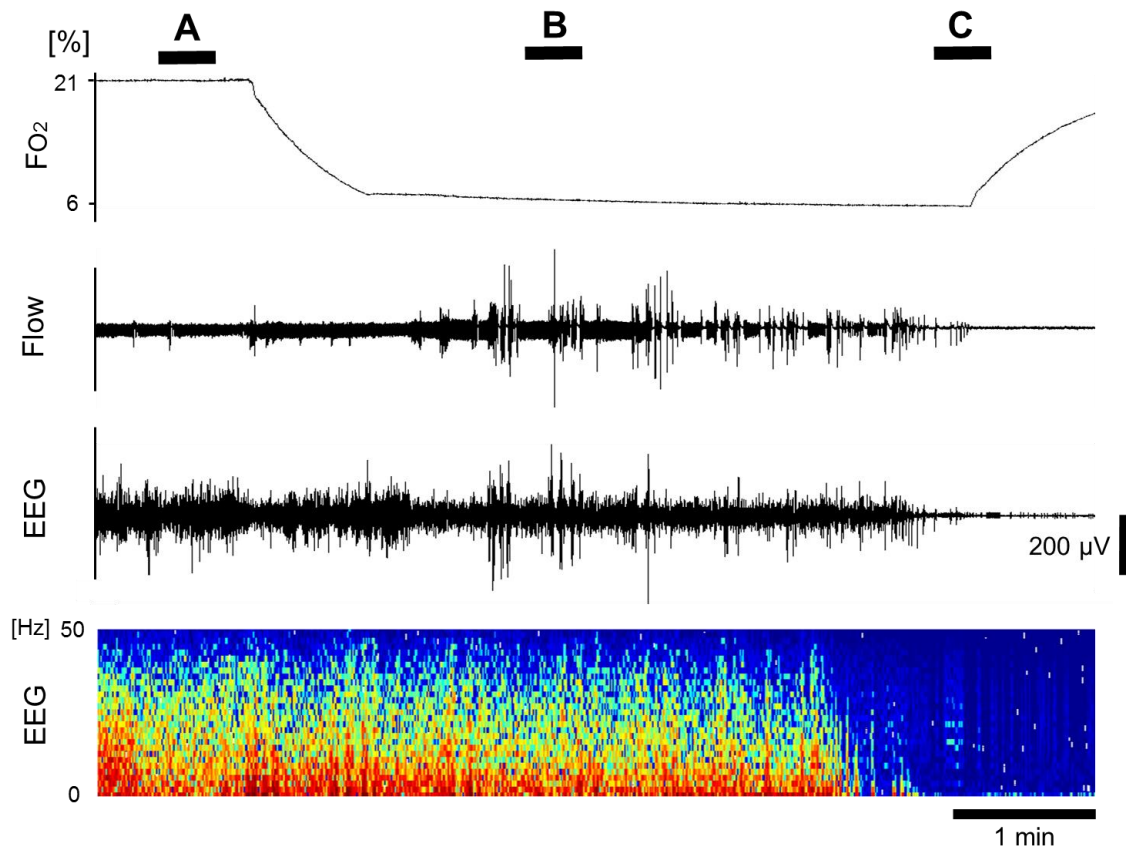


図 24 低酸素負荷実験の各パラメーターの経過 (代表例)

低酸素負荷実験における Arundic acid 投与前のマウスの各パラメーターの変化の代表例. 上から, chamber 内酸素濃度, 呼吸流量 (上方が吸気), 脳波生信号, 脳波スペクトログラムを示す. 本図の A, B, C は図 19 A, B, C のそれぞれの時間帯 (通常の酸素濃度下での正常呼吸相, けいれん発生前後, 呼吸停止前後) に対応している.

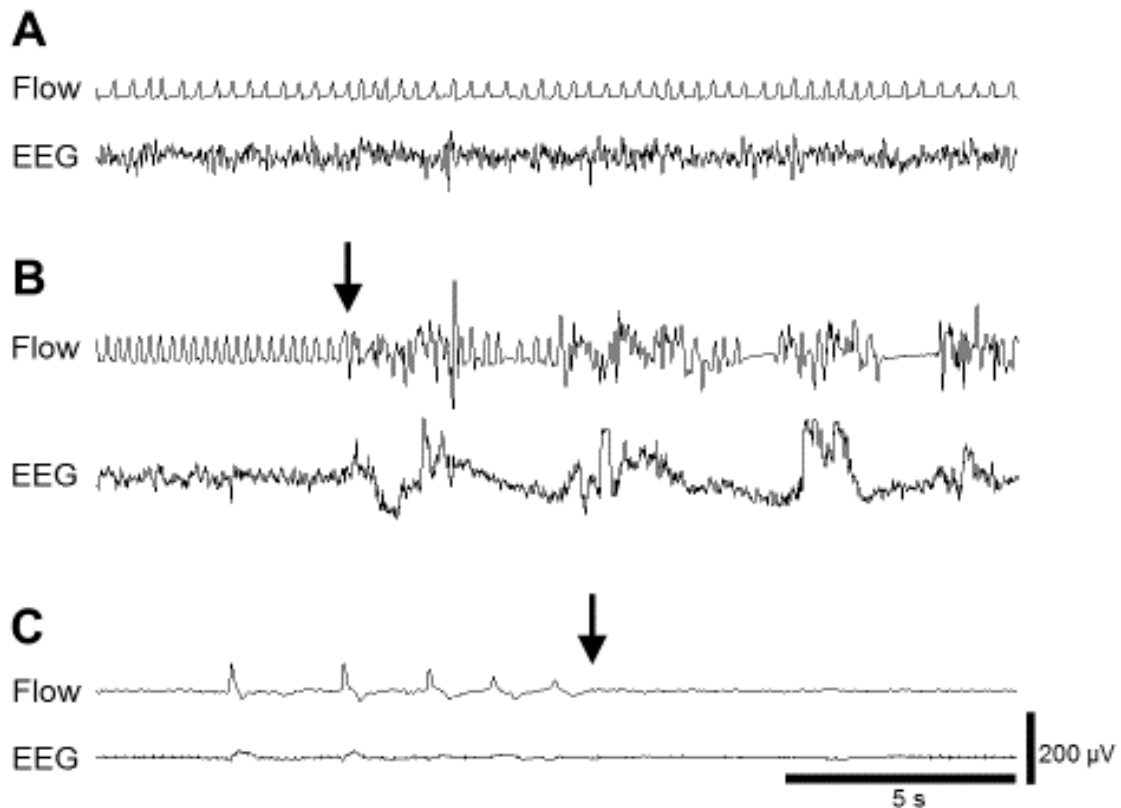


図 25 通常の酸素濃度下での正常呼吸相および低酸素負荷時のけいれん発生前後、呼吸停止前後の呼吸流量と脳波

図 24 の A, B, C の各時間帯における呼吸流量信号（上方が吸気）および脳波生信号。A は通常の酸素濃度下での正常呼吸相，B はけいれん発生前後，C は呼吸停止前後の時間帯。B の矢印はけいれん発生時点，C の矢印は呼吸停止＝死亡時点を示す。C の呼吸停止直前にはギヤスピングが観察され，呼吸が消失する前には既に脳波がフラットになっていた。

### 6.3.2 低酸素負荷からけいれん発生までの時間

低酸素負荷後の生存時間の違いに関して，もともと低酸素への耐性が強いマウスの場合に生存時間がより長くなった可能性も考えられるため，A 群と B 群の DMSO のみ投与を行った時のけいれん発生までの時間を比較した。その結果，両群の低酸素負荷開始からけいれん発生までの時間に差は認められなかった（図 26）。よって，本実験で使用したマウスの低酸素への耐性は同等レベルであることが示された。しかし，B 群のマウスにおいては，同一個体での比較で，arundic acid 投与後のほうが投与前よりもけいれん発生が有意に遅くなっていた（図 26）。このことは，arundic acid がけいれん発生と呼吸停止を遅らせて

いた可能性を示唆した。

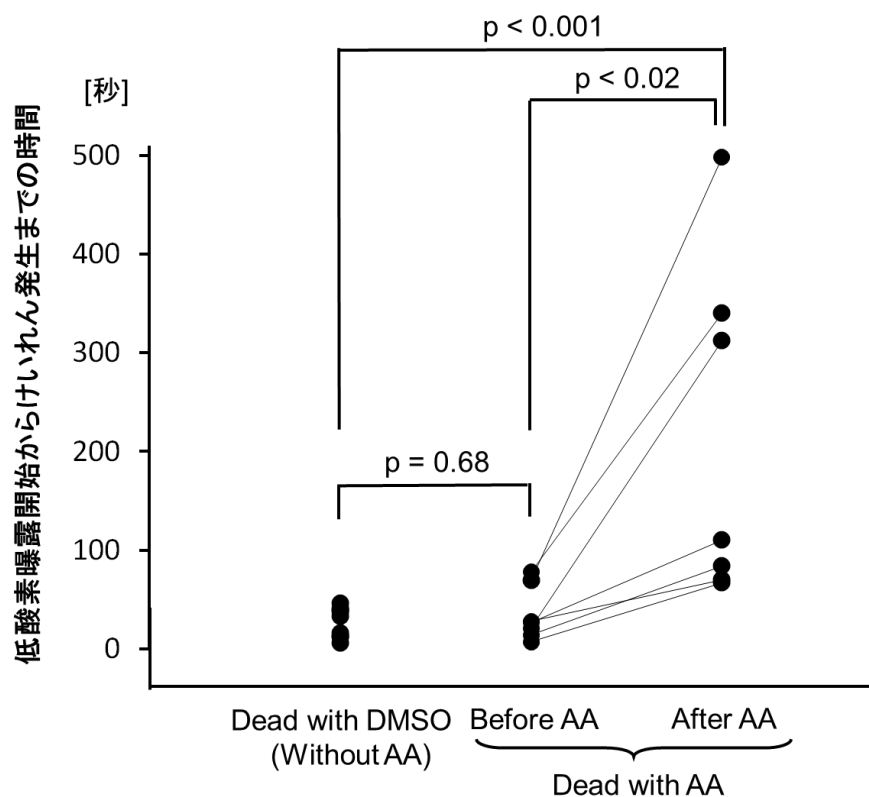


図 26 低酸素負荷開始からけいれん発生までの時間

低酸素負荷開始からけいれん発生までの時間を比較した。A 群 (Dead with DMSO) と B 群 (Dead with AA) の DMSO のみ投与下での比較では差はなかった (マンホイットニーの U 検定)。B 群のマウスの arundic acid 投与前 (Before AA) と投与後 (After AA) の比較では、arundic acid 投与後のほうが投与前よりも、けいれん発生までの時間が有意に延長していた (Wilcoxon の符号順位検定)。

#### 6.4 考察

既述の通り、強い低酸素負荷はけいれんを引き起こすという報告があるが (Miyake ら 2007 ; Gillam-Krakauer and Carter 2012), 本実験においても低酸素負荷により、けいれんの発生が観察された。けいれんは、ニューロンの過剰な興奮とニューロンネットワーク活動の過剰な同調を特徴とする。脳機能の興奮と抑制のバランスが、過剰な興奮、抑制の減退、あるいはその両方などにより崩されることがけいれんの原因となると考えられている (Stafstrom 2006)。

低酸素負荷により前脳部のアストロサイトが興奮するが (Leichsenring ら 2013), このアストロサイトの異常がけいれんの原因であると考えられる研究者もいる (Crunelli ら 2015). 本実験では, アストロサイト活性化阻害剤 arundic acid の投与が, 強い低酸素負荷によるけいれん発生とそれに引き続く呼吸停止を遅らせていた. 既述の通り, arundic acid はアストロサイトの機能を抑制する作用を持つ. 現時点では arundic acid の作用機序は完全に解明されていないが, arundic acid は S100b タンパク質合成を抑制することで, アストロサイトの活性化を阻害する (Asano ら 2005a, 2005b; Mori e ら 2004; Tateishi ら 2002; Wajima ら 2013; Yamamura ら 2013; Yanagisawa ら 2015). 本実験の結果も, 強い低酸素によるアストロサイトの活性化が, けいれんの発生と進展に関係していることを示すと考えられる.

既に述べたように, 動脈血の低酸素状態は, 頸動脈小体などの末梢化学受容器で感知され, 換気量を増加させるが (Izumizaki ら 2004; Kumar and Prabhakar 2012; Prabhakar 2013), 末梢の受容器である頸動脈小体ばかりでなく, 脳幹部のアストロサイトも脳の低酸素状態を感知し, 低酸素状態の改善のために呼吸増強に寄与することを示唆する研究も少なからず報告されている (Kasymov ら 2013; Tadmouri ら 2014; Angelova ら 2015; Funk ら 2015; Marina ら 2016). 他方, 強い低酸素は, 脳幹部の呼吸ニューロンネットワークを直接的に抑制し, 換気量を減少させ, 低酸素状態を悪化させるという報告も存在する (So 2008; Blum ら 2000). このように, 低酸素状態の悪化は, 脳幹部の呼吸ニューロンネットワークを含めた脳機能全体を抑制し, そのことが呼吸を更に抑制させる. この呼吸抑制が更なる呼吸抑制を招くという悪循環は, 最悪の場合, 生体を死に至しめるという結果をもたらす可能性がある (Neubauer ら 1990; Kikuchi ら 1994; Hayashi and Fukuda 2000). 第 5 章の実験結果と近年のアストロサイトの呼吸調節機能に関する報告を総合すると, 強い低酸素負荷は, 前脳部のアストロサイトを活性化し, これがけいれんの発生とその後の呼吸抑制に関係している可能性が考えられる. 一方, 既に示したように, 生体への急激で強い低酸素負荷により, アストロサイトは呼吸増強の方向に働く. 今回の実験とこれまでの報告から得られた結果を総合すると, 低酸素時のアストロサイトの呼吸制御

機序に対する働きは反対の効果を持っているように見えるが、アストロサイトの活性化が強い低酸素状況に対して打ち勝てるかどうかで、低酸素負荷時の呼吸応答が変化するものと考えられる。これらの予想される機序を図 27 に示した。

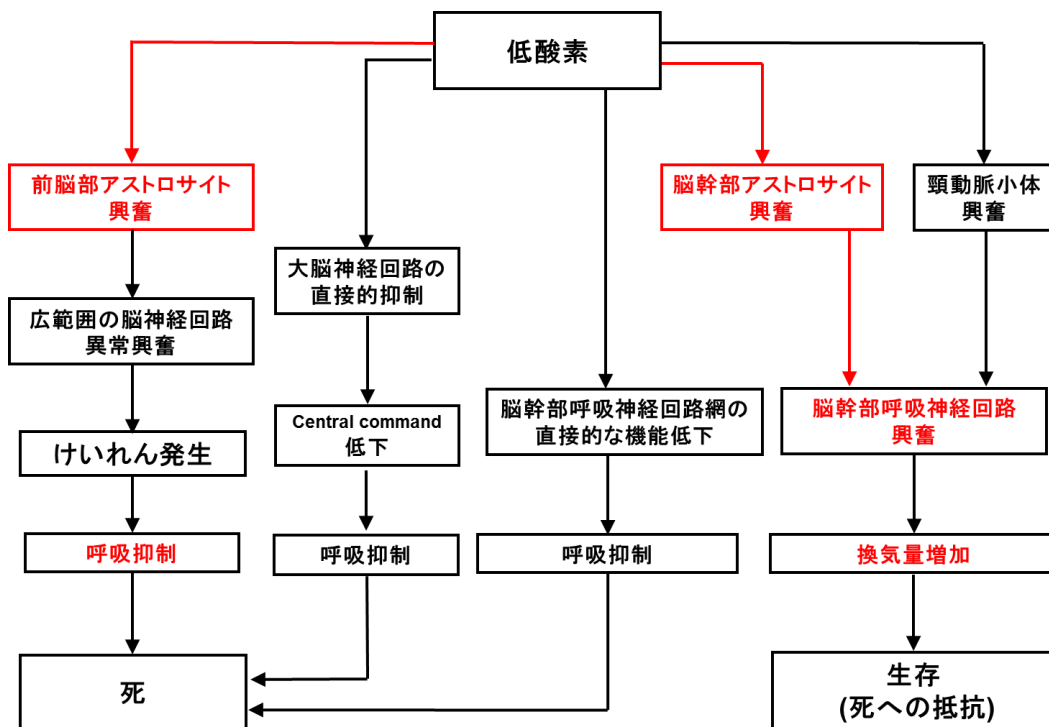


図 27 低酸素換気応答と生存/死への過程

強い低酸素負荷時の換気応答と死への過程，あるいは死への過程の反対にある生存への過程を示す。

本実験の方法論上の問題点として，生体が低酸素負荷を経験したことで，低酸素への耐性が高まったため，低酸素負荷時の生存時間が長くなった可能性が考えられる。しかしながら，A 群と B 群の arundic acid 投与前の低酸素負荷を行った際のそれぞれの計測パラメーターを比較したところ（表 3，図 26），両群間に差はなかったため，そのようなバイアスがかかった可能性はないと考える。

てんかん患者の突然死（SUDEP；Sudden unexpected death in epilepsy）は，「良好な状況にあるてんかん患者に起きる，突然の，予期せぬ，外傷や溺水が原因ではない死」と定義されている（Nashef 1997）。SUDEP は，てんかん患者にと



って深刻な脅威であるが、その病態・機序は完全には明らかになっていない。けいれん発作は強く呼吸を抑制し、呼吸停止や突然死の原因になるという報告がある (So ら 2000; So 2008; Sowers ら 2013; Massey ら 2014; Dlouhy ら 2016; Zeng ら 2015)。これらの報告と本実験の結果を併せて考察すると、アストロサイトの興奮は、けいれん発生とけいれんによる呼吸抑制の原因となり、SUDEPの病態の一因になると考えられる。従って、arundic acid やその他のアストロサイトの抑制薬は、抗けいれん薬として、SUDEPの高リスク患者の予防薬に有効である可能性が考えられる (Crunelli ら 2015; Yang and Sun 2008)。この点については、今後の実験や臨床的な検討が望まれる。

## 7. おわりに

体内の酸素分圧レベルの恒常性を維持することは、生体の生命維持に不可欠である。そして、動脈血酸素分圧レベルの恒常性の維持には呼吸による調節、特に低酸素時の呼吸応答が重要な役割を果たしている。低酸素時の呼吸応答の機序は、従来、延髄を中心とする下位脳幹内にある呼吸ニューロンネットワークを中心に考えられてきた。生体が低酸素状態におかれると、頸動脈小体などの末梢化学受容器がこれを感知し、その情報が下位脳幹内の呼吸ニューロンネットワークの活動を増強させ、呼吸が増強される。また、生体が低酸素状態におかれると、その情報が投射された高位脳が呼吸困難感を知覚し、視床下部から脳幹へ投射する **central command** を増強させ、呼吸が増強される。

一方、従来は脳の構造と機能の維持のために働き、脳機能を発現する神経情報の伝達・統合には直接関与しないと考えられてきたグリア細胞が、ニューロンと積極的な情報交換を行いつつ、ニューロンとは異なる仕組みで脳機能発現に寄与していることが、近年、明らかにされてきている。グリア細胞のなかでもアストロサイトは、広範囲調節の機能を有し、呼吸調節機構においても重要な役割を果たしている可能性が報告されている。しかし、呼吸調節におけるアストロサイトの役割については不明点も多く、特に大脳などの高位脳が下位脳幹の呼吸ニューロンネットワークの呼吸リズム形成にどのように関与し、その関与においてアストロサイトがどのような役割を果たしているかについては、ほとんど明らかになっていない。

そこで、筆者はアストロサイトが低酸素負荷時の大脳皮質機能と脳幹部呼吸中枢機能の維持に役割を果たしているという仮説の下、検証を行った。実験には無麻酔で覚醒下のマウスを用い、アストロサイト活性化阻害剤 **arundic acid** の投与前、低用量投与後、高用量投与後の各条件下における低酸素負荷時の脳波と呼吸流量の応答を記録した。脳波はマウスの頭部に埋め込んだ微小電極により計測し、呼吸流量は **whole body plethysmography** により非侵襲的に計測した。計測した脳波から大脳皮質活動の度合を示すガンマ波帯域のパワーを評価するとともに、呼吸流量から分時換気量などの換気パラメーターを計算し、検討した。酸素濃度 6% の強い低酸素負荷をかけられたマウスは、一過性の呼吸増強の

後、呼吸抑制を示したが、強い低酸素負荷による呼吸抑制出現時には、高位脳活動が低下していることが示唆された。強い低酸素を負荷されると、大脳皮質機能が抑制され、覚醒度が低下し、視床下部から脳幹部へ投射する **central command** が減弱され、低酸素換気抑制が引き起こされると考察した。さらに、**arundic acid** がこの呼吸抑制を増強させたことから、アストロサイトが低酸素により活性化し、強い低酸素負荷時に呼吸増強に続いて起こる呼吸抑制に拮抗的に働いていると考察した。

また、近年、アストロサイトが低酸素負荷により賦活化され、発作的なけいれんの発生に関与している可能性が報告されている。そこで、筆者はアストロサイトが低酸素由来のけいれんの発生・進展、およびそれに伴う呼吸抑制に関与しているという仮説の下、検証を行った。実験には、無麻酔で覚醒下のマウスを用い、**arundic acid** 投与前後での強い低酸素負荷時のけいれん発生状況と呼吸出力応答を計測し、解析した。この実験では、**arundic acid** の投与が、強い低酸素負荷によるけいれん発生とそれに続いて起こる呼吸停止を遅らせていた。強い低酸素負荷時に前脳部のアストロサイトが活性化され、これがけいれん発生とその後の呼吸抑制を促進するという機序が示唆された。強い低酸素負荷時に脳内アストロサイトが活性化され、脳幹部では呼吸増強性に作用し、前脳部では逆にけいれんを発生させ、呼吸抑制性に作用すると考察した。そして、低酸素負荷時の最終的な呼吸出力は、拮抗し合うこれら二つの機構の活性化度のバランスにより決定されると考察した (図 27)。

これらの実験と近年の報告から、強い低酸素負荷時には大脳皮質機能が抑制され、覚醒度が低下し、視床下部から脳幹へ投射する **central command** が減弱し、低酸素換気抑制が引き起こされるが、脳幹部のアストロサイトは低酸素により活性化し、呼吸抑制に対し拮抗的に働いていると考察した。一方、強い低酸素状態になると前脳部のアストロサイトが活性化されるが、これがけいれん発生とその後の呼吸抑制を促進しようと考察した。本論文における実験では **arundic acid** を全身性に投与したため、**arundic acid** が脳幹部のアストロサイトと前脳部のアストロサイトの両方に作用した可能性が考えられる。今後は、脳幹部のアストロサイトの働きと前脳部のアストロサイトの働きを区別するために、例え

ばアストロサイトの阻害薬を局所に投与して検討するなどの方法で、脳内各部位のアストロサイトの機能や作用機序を詳細に検討していく必要があると考えている。さらに、アストロサイトの細胞内カルシウムイオン濃度を画像で解析するカルシウムイメージング法を用いることにより、脳内各部位のアストロサイトの活動状況を捕捉し、検討していきたいと考えている。

本研究は、低酸素負荷時の換気応答におけるアストロサイトの役割を明らかにし、中枢性呼吸調節機構におけるアストロサイトの役割についての理解を深めるものと言える。さらに、本研究はニューロンのみを焦点を当てた従来の研究では解明できておらず、アストロサイトの関与が指摘されている乳幼児突然死症候群、過換気症候群、睡眠時無呼吸症候群、てんかん患者の呼吸抑制・突然死など呼吸調節異常を呈する各種疾患の病態の理解に貢献するとともに (Rodriguez ら 1982 ; Takashima and Becker 1985 ; da Silva ら 2008), これらの疾患に対する新しい治療法の開発において基礎的知見を提供するものと期待される。

## 謝辞

本研究は、筆者が東洋大学大学院理工学研究科生体医工学専攻博士後期課程在学中に、同大学理工学部堀内城司教授の指導のもとに行ったものである。

3年間にわたりご指導いただきました堀内城司教授に改めて感謝申し上げます。また、副査を引き受けてくださいました寺田信幸教授と加藤和則教授に感謝申し上げます。

さらに、本実験計画策定から投稿論文の受理に至るまで、すべての局面でサポートしてくださった村山医療センター・岡田泰昌先生に深謝申し上げます。本研究遂行にあたっては、藤田保健衛生大学・武田湖太郎先生、Opole Medical School・Mieczyslaw Pokorski先生、島根大学・横田茂文先生、徳島大学・佐藤裕先生、山梨大学・長谷部洋平先生より多大なるサポートをいただきました。先生方のご助力・ご指導に感謝申し上げます。

最後になりましたが、東洋大学理工学部ニューロサイエンス研究室・堀内崇利氏、長岡祐也氏、高橋知幸氏には日頃より多くのサポートをいただきました。改めて感謝申し上げます。

## 文献

- Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 2008; 59(6): 932-946.
- Angelova PR, Kasymov V, Christie I, Sheikhabaei S, Turovsky E, Marina N, Korsak A, Zwicker J, Teschemacher AG, Ackland GL, Funk GD, Kasparov S, Abramov AY, Gourine AV. Functional oxygen sensitivity of astrocytes. *J Neurosci* 2015; 35: 10460-10473.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 2004; 24: 6920-6927.
- Aoyama R, Okada Y, Yokota S, Yasui Y, Fukuda K, Shinozaki Y, Yoshida H, Nakamura M, Chiba K, Yasui Y, Kato F, Toyama Y. Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. *Pain* 2011; 152: 2085-2097.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999; 22: 208-215.
- Asano T, Mori T, Shimoda T, Shinagawa R, Satoh S, Yada N, Katsumata S, Matsuda S, Kagamiishi Y, Tateishi N. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005a; 4: 127-142.
- Asano T, Tateishi N, Mori T. Possible detrimental role of astrocytic activation during the subacute phase of permanent regional cerebral ischemia in the rat, in: Aschner, M., Costa, L.G. (Eds). *The Role of Glia in Neurotoxicity*. Second Edition. CRC Press Boca Raton: 2005b. pp. 279-298.
- Ballanyi K, Panaitescu B, Ruangkittisakul A. Control of breathing by "nerve glue". *Sci Signal* 2010. 3(147): pe41.

- Bosman CA, Lansink CS, Pennartz CM. Functions of gamma-band synchronization in cognition: from single circuits to functional diversity across cortical and subcortical systems. *Eur J Neurosci* 2014; 39: 1982-1999.
- Bouvier J, Autran S, Dehorter N, Katz DM, Champagnat J, Fortin G, Thoby-Brisson M. Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBötzing complex in vitro. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 510-520.
- Blum AS, Ives JR, Goldberger AL, Al-Aweel IC, Krishnamurthy KB, Drislane FW, Schomer DL. Oxygen desaturations triggered by partial seizures: implications for cardiopulmonary instability in epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41: 536-541.
- Buckler KJ. TASK-like potassium channels and oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 157: 55-64.
- Caravagna C, Soliz J, Seaborn T. Brain-derived neurotrophic factor interacts with astrocytes and neurons to control respiration. *Eur J Neurosci* 2013; 38: 3261-3269.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 1990; 247: 470-473.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM.  $Ca^{2+}$  waves in astrocytes. *Cell Calcium* 1991; 12: 185-204.
- Coulter DA, Steinhäuser C. Role of astrocytes in epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5: a022434.
- Crunelli V, Carmignoto G, Steinhäuser C. Novel astrocyte targets: new avenues for the therapeutic treatment of epilepsy. *Neuroscientist* 2015; 21: 62-83.
- Dampney RA, Horiuchi J, McDowall LM. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Auton Neurosci* 2008; 142: 3-10.
- Davenport HW, Brewer G, Chambers AH, Goldschmidt S. The respiratory responses to anoxemia of unanesthetized dogs with chronically denervated aortic and carotid

- chemoreceptors and their causes. *Am J Physiol* 1947; 148: 406-416.
- Dawes GS, Gardner WN, Johnston BM, Walker DW. Breathing in fetal lambs: the effect of brain stem section. *J Physiol* 1983; 335: 535-553.
- da Silva LG, Mottin CC, Souza DO, Portela LV, Braga CW, Vargas CB, Padoin AV, Martinez D, Dias RD. Serum S100B but not NSE levels are increased in morbidly obese individuals affected by obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Obes Surg* 2008; 18: 993-999.
- Dillon GH, Waldrop TG. In vitro responses of caudal hypothalamic neurons to hypoxia and hypercapnia. *Neuroscience* 1992; 51: 941-950.
- Dillon GH, Waldrop TG. Responses of feline caudal hypothalamic cardiorespiratory neurons to hypoxia and hypercapnia. *Exp Brain Res* 1993; 96: 260-272.
- Dlouhy BJ, Gehlbach BK, Richerson GB. Sudden unexpected death in epilepsy: basic mechanisms and clinical implications for prevention. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87: 402-413.
- Eldridge FL. Central integration of mechanisms in exercise hyperpnea. *Med Sci Sports Exerc* 1994; 26: 319-327.
- Elhusseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirović DB, Hamel E. Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 794-802.
- Erlichman JS, Leiter JC, Gourine AV. ATP, glia and central respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 173: 305-311.
- Ezure K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol* 1990; 35: 429-450.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 239-266.



- Feldman JL, Del Negro CA. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 232-242.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 2004; 43: 729-743.
- Fink BR, Katz R, Beinhold H, Schoolman A. Suprapontine mechanisms in regulation of respiration. *Am J Physiol* 1962; 202: 217-220.
- Funk GD. The 'connexin' between astrocytes, ATP and central respiratory chemoreception. *J Physiol* 2010; 588: 4335-4337.
- Funk GD, Rajani V, Alvares TS, Revill AL, Zhang Y, Chu NY, Biancardi V, Linhares-Taxini C, Katzell A, Reklow R. Neuroglia and their roles in central respiratory control; an overview. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2015; 186: 83-95.
- Gallman EA, Millhorn DE. Two long-lasting central respiratory responses following acute hypoxia in glomectomized cats. *J Physiol* 1988; 395: 333-347.
- Gillam-Krakauer M, Carter BS. Neonatal hypoxia and seizures. *Pediatr Rev* 2012; 33: 387-396.
- Gómez-Gonzalo M, Losi G, Chiavegato A, Zonta M, Cammarota M, Brondi M, Vetri F, Uva L, Pozzan T, de Curtis M, Ratto GM, Carmignoto G. An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000352.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* 2005a; 436(7047): 108-111.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *J Neurosci* 2005b; 25: 1211-1218.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG,

- Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 2010; 329: 571-575.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol* 2008; 586: 2043-2048.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol* 2010; 518: 3883-3906.
- Guyenet PG, Abbott SB, Stornetta RL. The respiratory chemoreception conundrum: light at the end of the tunnel? *Brain Res* 2013; 1511: 126-137.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 2007; 27: 6473-6477.
- Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 335-355.
- Hayashi F, Fukuda Y. Neuronal mechanisms mediating the integration of respiratory responses to hypoxia. *Jpn J Physiol* 2000; 50: 15-24.
- Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4666-4670.
- Holmström KM, Marina N, Baev AY, Wood NW, Gourine AV, Abramov AY. Signalling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain. *Nat Commun* 2013; 4: 1362.
- Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RA. Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. *J Physiol* 2009; 587: 5149-5162.
- Horn EM, Waldrop TG. Oxygen-sensing neurons in the caudal hypothalamus and their role in cardiorespiratory control. *Respir Physiol* 1997; 110: 219-228.
- Horn EM, Waldrop TG. Suprapontine control of respiration. *Respir Physiol* 1998; 114:

201-211.

Hülsmann S, Greiner C, Kohling R, Wolfer J, Moskopp D, Riemann B, Lucke A, Wassmann H, Speckmann EJ. Dimethyl sulfoxide increases latency of anoxic terminal negativity in hippocampal slices of guinea pig in vitro. *Neurosci Lett* 1999; 261: 1-4.

Hülsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW. Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 856-862.

Huxtable AG, Zwicker JD, Poon BY, Pagliardini S, Vrouwe SQ, Greer JJ, Funk GD. Tripartite purinergic modulation of central respiratory networks during perinatal development: the influence of ATP, ectonucleotidases, and ATP metabolites. *J Neurosci* 2009; 29: 14713-14725.

Huxtable AG, Zwicker JD, Alvares TS, Ruangkittisakul A, Fang X, Hahn LB, Posse de Chaves E, Baker GB, Ballanyi K, Funk GD. Glia contribute to the purinergic modulation of inspiratory rhythm-generating networks. *J Neurosci* 2010; 30: 3947-3958.

Ishibashi M, Gumenchuk I, Kang B, Steger C, Lynn E, Molina NE, Eisenberg LM, Leonard CS. Orexin receptor activation generates gamma band input to cholinergic and serotonergic arousal system neurons and drives an intrinsic  $Ca^{2+}$ -dependent resonance in LDT and PPT cholinergic neurons. *Front Neurol* 2015; 6: 120.

Izumizaki M, Pokorski M, Homma I. Role of the carotid bodies in chemosensory ventilatory responses in the anesthetized mouse. *J Appl Physiol (1985)* 2004; 97: 1401-1407.

Jacob SW, de la Torre JC. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacol. Rep* 2009; 61: 225-235.

Karagiannis A, Sylantyev S, Hadjihambi A, Hosford PS, Kasparov S, Gourine AV. Hemichannel-mediated release of lactate. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016; 36:

1202-1211.

- Kasymov V, Larina O, Castaldo C, Marina N, Patrushev M, Kasparov S, Gourine AV. Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. *J Neurosci* 2013; 33: 435-441.
- Kato H, Araki T, Imai Y, Takahashi A, Itoyama Y. Protection of dopaminergic neurons with a novel astrocyte modulating agent (R)-(-)-2-propyloctanoic acid (ONO-2506) in an MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2003; 208: 9-15.
- Kikuchi Y, Okabe S, Tamura G, Hida W, Homma M, Shirato K, Takishima T. Chemosensitivity and perception of dyspnea in patients with a history of near-fatal asthma. *N Engl J Med* 1994; 330: 1329-1334.
- Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol* 2012; 2: 141-219.
- Koos BJ, Chau A, Matsuura M, Punla O, Kruger L. Thalamic locus mediates hypoxic inhibition of breathing in fetal sheep. *J Neurophysiol* 1998; 79: 2383-2393.
- Kron M, Zhang W, Dutschmann M. Developmental changes in the BDNF-induced modulation of inhibitory synaptic transmission in the Kölliker-Fuse nucleus of rat. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 3449-3457.
- Lee HS, Ghetti A, Pinto-Duarte A, Wang X, Dziewczapolski G, Galimi F, Huitron-Resendiz S, Piña-Crespo JC, Roberts AJ, Verma IM, Sejnowski TJ, Heinemann SF. Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 3343-3352.
- Leichsenring A, Riedel T, Qin Y, Rubini P, Illes P. Anoxic depolarization of hippocampal astrocytes: possible modulation by P2X7 receptors. *Neurochem Int* 2013; 62: 15-22.
- Llinás R, Ribary U, Contreras D, Pedroarena C. The neuronal basis for consciousness.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1998; 353: 1841-1849.

Liu Q, Wong-Riley MT. Postnatal development of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine protein kinase B (TrkB) receptor immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 2013; 521: 109-129.

López-López JR, Pérez-García MT. Oxygen sensitive Kv channels in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 157: 65-74.

López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, González-Rodríguez P, Fernández-Agüera MC, Macías D, Pardal R, Gao L. Oxygen-sensing by arterial chemoreceptors: Mechanisms and medical translation. *Mol Aspects Med* 2016; 47-48: 90-108.

Lorier AR, Lipski J, Housley GD, Greer JJ, Funk GD. ATP sensitivity of preBötzinger complex neurones in neonatal rat in vitro: mechanism underlying a P2 receptor-mediated increase in inspiratory frequency. *J Physiol* 2008; 586: 1429-1446.

Marina N, Tang F, Figueiredo M, Mastitskaya S, Kasimov V, Mohamed-Ali V, Roloff E, Teschemacher AG, Gourine AV, Kasparov S. Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* 2013; 108: 317.

Marina N, Ang R, Machhada A, Kasymov V, Karagiannis A, Hosford PS, Mosienko V, Teschemacher AG, Vihko P, Paton JF, Kasparov S, Gourine AV. Brainstem hypoxia contributes to the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 2015; 65: 775-783.

Marina N, Teschemacher AG, Kasparov S, Gourine AV. Glia, sympathetic activity and cardiovascular disease. *Exp Physiol* 2016; 101: 565-576.

Martin-Body RL, Robson GJ, Sinclair JD. Restoration of hypoxic respiratory responses in the awake rat after carotid body denervation by sinus nerve section. *J Physiol* 1986; 380: 61-73.

- Massey CA, Sowers LP, Dlouhy BJ, Richerson GB. Mechanisms of sudden unexpected death in epilepsy: the pathway to prevention. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 271-282.
- McDonald DM. Peripheral chemoreceptors: structure-function relationships of the carotid body. In: *Regulation of Breathing. Lung Biol. Health Dis. Vol. 17.* Hornbein TF (ed.), Marcel Dekker: New York: 1981. pp. 105-320.
- Miller MJ, Tenney SM. Hypoxia-induced tachypnea in carotid-deafferented cats. *Respir Physiol* 1975; 23: 31-39.
- Mitra J, Dev NB, Trivedi R, Amini S, Ernsberger P, Cherniack NS. Intramedullary sodium cyanide injection on respiratory and vasomotor responses in cats. *Respir Physiol* 1993; 93: 71-82.
- Miyake A, Yamada K, Kosaka T, Miki T, Seino S, Inagaki N. Disruption of Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels impairs maintenance of hypoxic gasping in mice. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 2349-2363.
- Montoro RJ, Ureña J, Fernández-Chacón R, Alvarez de Toledo G, López-Barneo J. Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *J Gen Physiol* 1996; 107: 133-143.
- Moraes DJ, Bonagamba LG, Zoccal DB, Machado BH. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300: R1476-R1486.
- Mori T, Tateishi N, Kagamiishi Y, Shimoda T, Satoh S, Ono S, Katsube N, Asano T. Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506. *Neurochem Int* 2004; 45: 381-387.
- Moyer CA, Beecher HK. Central stimulation of respiration during hypoxia. *Am J Physiol* 1942; 136: 13-21.
- Nashef L. Sudden unexpected death in epilepsy: terminology and definitions. *Epilepsia*

1997; 38(11 Suppl): S6-S8.

Nattie E, Li A. Central chemoreceptors: locations and functions. *Compr Physiol* 2012; 2; 221-254.

Nurse CA. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. *J Physiol* 2014; 592: 3419-3426.

Neubauer JA, Melton JE, Edelman NH. Modulation of respiration during brain hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 1990; 68: 441-451.

Neubauer JA, Sunderram J. Oxygen-sensing neurons in the central nervous system *J Appl Physiol* (1985) 2004; 96: 367-374.

Okada Y, Kawai A, Mückenhoff K, Scheid P. Role of the pons in hypoxic respiratory depression in the neonatal rat. *Respir Physiol* 1998; 111: 55-63.

Okada Y, Kuwana S, Chen Z, Ishiguro M, Oku Y. The central respiratory chemoreceptor: Where is it located? *Adv Exp Med Biol* 2009; 648: 377-385.

岡田 泰昌. 呼吸中枢 慶應医学 2009; 85: 159-168.

岡田 泰昌, 梅田 啓. 各種病態における呼吸困難感の出現・知覚機序とその対策. *呼吸と循環* 2013; 61: 444-454.

Okada Y, Sasaki T, Oku Y, Takahashi N, Seki M, Ujita S, Tanaka KF, Matsuki N, Ikegaya Y. Preinspiratory calcium rise in putative pre-Bötzinger complex astrocytes. *J Physiol* 2012; 590: 4933-4944.

Oku Y, Fresemann J, Miwakeichi F, Hülsmann S. Respiratory calcium fluctuations in low-frequency oscillating astrocytes in the pre-Bötzinger complex. *Respir Physiol Neurobiol* 2016; 226: 11-17.

Oyamada Y, Murai M, Harada N, Ishizaka A, Okada Y. Age-dependent involvement of ATP-sensitive potassium channel Kir6.2 in hypoxic ventilatory depression of mouse. *Resp Physiol Neurobiol* 2008; 162: 80-84.

Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliek SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF Jr,

- Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 2012; 121: 4-27.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 2001; 4: 803-812.
- Pasti L, Pozzan T, Carmignoto G. Long-lasting changes of calcium oscillations in astrocytes. A new form of glutamate-mediated plasticity. *J Biol Chem* 1995; 270: 15203-15210.
- Peers C, Wyatt CN. The role of maxiK channels in carotid body chemotransduction. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 157: 75-82.
- Peppiatt C, Attwell D. Feeding the brain. *Nature* 2004; 431: 137-8.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 2009; 32: 421-431.
- Pereira A Jr, Furlan FA. On the role of synchrony for neuron-astrocyte interactions and perceptual conscious processing. *J Biol Phys* 2009; 35: 465-480.
- Pérez-Alvarez A, Araque A. Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses. *Curr Drug Targets* 2013; 14: 1220-1224.
- Porter JT, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 1996; 16: 5073-5081.
- Pokorski M, Takeda K, Okada Y. Oxygen sensing mechanisms: A physiological penumbra. *Adv Exp Med Biol* 2016; 952: 1-8.
- Pokorski M, Takeda K, Sato Y, Okada Y. The hypoxic ventilatory response and TRPA1 antagonism in conscious mice. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; 210: 928-938.
- Porter JT, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 1996; 16: 5073-5081.
- Prabhakar NR. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J Physiol* 2013; 591: 2245-2257.



- Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 449-461.
- Robertson JM. Astrocyte domains and the three-dimensional and seamless expression of consciousness and explicit memories. *Med Hypotheses* 2013; 81: 1017-1024.
- Rodriguez M, Baele PL, Marsh HM, Okazaki H. Central neurogenic hyperventilation in an awake patient with brainstem astrocytoma. *Ann Neurol* 1982; 11: 625-628.
- Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM, Burnstock G. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci* 2003; 23: 11315-11321.
- Ross CA, Ruggiero DA, Joh TH, Park DH, Reis DJ. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *J Comp Neurol* 1984; 228: 168-185.
- Ruiz-Mejias M, Ciria-Suarez L, Mattia M, Sanchez-Vives MV. Slow and fast rhythms generated in the cerebral cortex of the anesthetized mouse. *J. Neurophysiol* 2011; 106: 2910-2921.
- Skinner JE, Molnar M, Kowalik ZJ. The role of the thalamic reticular neurons in alpha- and gamma-oscillations in neocortex: a mechanism for selective perception and stimulus binding. *Acta Neurobiol Exp* 2000; 60: 123-142.
- So EL, Sam MC, Lagerlund TL. Postictal central apnea as a cause of SUDEP: evidence from near-SUDEP incident. *Epilepsia* 2000; 41: 1494-1497.
- So EL. What is known about the mechanisms underlying SUDEP? *Epilepsia* 2008; 49: 93-98.
- Sohal VS. Insights into cortical oscillations arising from optogenetic studies. *Biol Psychiatry* 2012; 71: 1039-1045.
- Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA. Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* 2000; 83: 2854-2868.

- Sowers LP, Massey CA, Gehlbach BK, Granner MA, Richerson GB. Sudden unexpected death in epilepsy: fatal post-ictal respiratory and arousal mechanisms. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 189: 315-323.
- Stafstrom CE. Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 983-1004
- Stanimirovic D, Zhang W, Howlett C, Lemieux P, Smith C. Inflammatory gene transcription in human astrocytes exposed to hypoxia: roles of the nuclear factor-kappaB and autocrine stimulation. *J Neuroimmunol* 2001; 119: 365-376.
- Sun MK, Jeske IT, Reis DJ. Cyanide excites medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am J Physiol* 1992; 262: R182-R189.
- Sun MK, Reis DJ. Hypoxia selectively excites vasomotor neurons of rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol* 1994; 266: R245-R256.
- Tadmouri A, Champagnat J, Morin-Surun MP. Activation of microglia and astrocytes in the nucleus tractus solitaries during ventilatory acclimatization to 10% hypoxia in unanesthetized mice. *J Neurosci Res* 2014; 92: 627-633.
- Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>. *Nat Chem Biol* 2011; 7: 701-711.
- Takashima and Becker. Developmental abnormalities of medullary "respiratory centers" in sudden infant death syndrome. *Exp Neurol* 1985; 90: 580-587.
- Takeda K, Pokorski M, Sato Y, Oyamada Y, Okada Y. Respiratory Toxicity of Dimethyl Sulfoxide. *Adv Exp Med Biol* 2016; 885: 89-96.
- Tateishi N, Mori T, Kagamiishi Y, Satoh S, Katsube N, Morikawa E, Morimoto T, Matsui T, Asano T. Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part II: suppression of astrocytic activation by a novel agent (R)-(-)-2-propyloctanoic acid (ONO-2506) leads to mitigation of delayed infarct expansion and early improvement of neurologic deficits. *J Cereb Blood Flow*

Metab 2002; 22: 723-734.

Tenney SM, Ou LC. Ventilatory response of decorticate and decerebrate cats to hypoxia and CO<sub>2</sub>. *Respir Physiol* 1977; 29: 81-92.

Thrane AS, Rangroo Thrane V, Zeppenfeld D, Lou N, Xu Q, Nagelhus EA, Nedergaard M. General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 18974-18979.

Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* 2005; 11: 973-81.

Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 1998; 78: 99-141.

Verkhratsky A, Krishtal OA, Burnstock G. Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* 2009; 39: 190-208.

Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 626-640.

Wajima D, Nakagawa I, Nakase H, Yonezawa T. Neuroprotective effect of suppression of astrocytic activation by arundic acid on brain injuries in rats with acute subdural hematomas. *Brain Res* 2013; 1519: 127-135.

Weir EK, López-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med* 2005; 353: 2042-2055.

Wetherington J, Serrano G, Dingledine R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 2008; 58: 168-178.

Yamamura S, Hoshikawa M, Dai K, Saito H, Suzuki N, Niwa O, Okada M. ONO-2506 inhibits spike-wave discharges in a genetic animal model without affecting traditional convulsive tests via gliotransmission regulation. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 1088-1100.

- Yanagisawa M, Aida T, Takeda T, Namekata K, Harada T, Shinagawa R, Tanaka K. Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter expression in a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1693.
- Yang L, Sun R. ONO-2506 may both prevent and treat epilepsy. *Med Hypotheses* 2008; 71: 465-466.
- Yokota S, Kaur S, VanderHorst VG, Saper CB, Chamberlin NL. Respiratory-related outputs of glutamatergic, hypercapnia-responsive parabrachial neurons in mice. *J Comp Neurol* 2015; 523: 907-920.
- Young JK, Dreshaj IA, Wilson CG, Martin RJ, Zaidi SI, Haxhiu MA. An astrocyte toxin influences the pattern of breathing and the ventilatory response to hypercapnia in neonatal rats. *Respir Physiol Neurobiol* 2005; 147: 19-30.
- Zeng C, Long X, Cotten JF, Forman SA, Solt K, Faingold CL, Feng HJ. Fluoxetine prevents respiratory arrest without enhancing ventilation in DBA/1 mice. *Epilepsy Behav* 2015; 45: 1-7.
- Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101: 148-160.