

睡眠中および記憶課題遂行中の海馬の神経活動に対するマグネシウム欠乏の影響

松本 信圭^{1,2}

¹ 東京大学大学院薬学系研究科, ² 東京大学 Beyond AI 研究推進機構

概要

本研究の目的は、主要ミネラルの一つであるマグネシウムの欠乏が、記憶学習に重要な脳部位である海馬の神経活動に与える影響を解明することである。海馬の局所場電位は、睡眠や記憶・学習と密接に関連しているため、睡眠中や行動中の局所場電位の解析を軸にして、マグネシウムが神経活動に与える影響を精査する。

本研究では、ラットおよびマウスに対し、低マグネシウム食(Mg 極低量)または対照標準食を2週間投与した。イソフルラン麻酔下で動物には、心電図と筋電図を記録するための電極を留置し、さらに、局所場電位を記録するための電極を内側前頭前皮質および背側海馬に留置した。さらに血糖値センサーを外科的に埋め込み記録をおこなった。また、新奇物体認識課題を実施し、課題遂行中および睡眠中の各種生体信号を記録し、解析した。筋電図や局所場電位に基づき動物の行動状態(活動, 安静, ノンレム睡眠, レム睡眠)を分類し、各状態における局所場電位の周波数解析や、海馬と内側前頭前皮質における局所場電位の相互相関解析をおこなった。

低マグネシウム食群(低 Mg 群)では対照群と比較して血糖値が有意に低下した。新奇物体認識試験では、低 Mg 群の記憶成績(弁別比)が低下傾向にあった。ホームケージでは、暗期(主に活動期)の海馬および内側前頭前皮質の局所場電位には両群間で有意差は認められなかった。一方、明期(主に睡眠期を含む)の解析では、覚醒状態における海馬の局所場電位の低ガンマ波の強度が低 Mg 群で高い傾向を示した。また、心電図の解析から心拍数や自律神経活動の指標である LF/HF を算出し、低 Mg 群で変化の可能性が示唆された。

血糖値の低下は、マグネシウム欠乏による膵臓 β 細胞の NMDA 受容体機能変化を介した Ca イオン流入増大とインスリン分泌亢進が原因と推察された。記憶成績の低下は、課題遂行中の海馬の局所場電位の変化と関連すると考えられる。ホームケージでの暗期の局所場電位に変化が見られなかったことは、活動時などの生理的条件下では影響が顕著でない可能性を示唆している。一方、ホームケージでの明期の覚醒状態、特に睡眠前後の海馬活動の変化は、睡眠に関連する脳機能にマグネシウム欠乏が影響し、認知機能低下の一因となる可能性を示唆している。今後は、睡眠や覚醒の各ステージでの局所場電位のパターンの詳細な解析や、確率モデルを用いた脳状態遷移の評価を通じて、マグネシウムが神経活動に与える影響を数理科学的に解明していく。

1. 研究目的

海馬は動物の記憶、学習に重要な脳部位であり、これらの機能を支えるのは海馬を構成する神経細胞の活動である¹⁾。海馬では、これらの個々の神経細胞の活動が集合となり、脳波(以降「局所場電位」)を生み出す²⁾。局所場電位は、ヒト、サル、コウモリ、ラット、マウスなどで観察され、様々な脳機能と関連することが知られている³⁾。

特に海馬で観察される局所場電位のうち、周波数が130~250 Hz のリップルは、記憶の固定化に重要とされている^{4,7)}。

記憶の中でも、本申請研究では空間作業記憶と空間参照記憶に着目する。空間を把握する能力である空間認知の中でも、空間作業記憶は例えば自身が訪れた場所を一時的に脳に蓄えている記憶である。また、空間参

照記憶はその時の行動全体を通して自身がどこを訪れどこを訪れていないかを長期的に蓄える記憶である。空間作業記憶と空間参照記憶はいずれも海馬が責任脳領域と考えられている。

また、記憶の固定化は主に睡眠中におこなわれる。睡眠時の海馬では、上記のリップルが断続的に発生し、これらの脳波が記憶の固定化に重要であることが明らかにされている。さらに、個々の神経細胞が睡眠中に適切なタイミングで発火すること(「再生現象」)も記憶の固定化には重要である⁸⁾。睡眠時のこのような海馬の神経活動は、脳内の神経物質や外部から摂取し暴露された化学物質によってさまざまな調節を受ける。そのような化学物質の中でも、本申請研究では、ミネラルのひとつであるマグネシウムに注目する。

マグネシウムは、いわゆる「塩」や「ミネラル」の成分のひとつであり、ネズミ(マウス)を対象とした試験により、海馬依存の記憶成績が低下することが知られている⁹⁾。この先行研究では、海馬依存の記憶成績を定量しているものの、そのメカニズムは明らかになっていない。言い換えると、記憶成績の変化とマグネシウムの摂取とを橋渡しする生理学的機序は未解明である。申請者はこのメカニズムとして、課題遂行中ならびに睡眠中の神経活動を考えている。

本研究では、睡眠中および記憶課題遂行中の海馬の神経活動に対する低マグネシウム食の影響の解明を目指す。本研究の目的は、睡眠中および記憶課題遂行中の海馬の神経活動に対する低マグネシウム食の影響の解明である。

2. 研究方法

2.1 実験動物

動物実験は、東京大学動物実験倫理委員会の承認(承認番号:P4-14)を得て、かつ東京大学の実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施した。

7週齢の雄性 Wistar ラットおよび C57BL6J マウスは、温度(22±1°C)および湿度(55±5%)が管理された条件下で個別に飼育し、12時間ごとの明暗サイクル(午前7時から午後7時まで消灯)で維持した。餌と水は自由に摂取させた。餌は、低マグネシウム飼料(日本クレア, 日本)(マグネシウム含有量=0.0027%)および対照(標準)低マグネシウム飼

料(日本クレア, 日本)(マグネシウム含有量=0.08%)を使用した。

2.2 手術

動物には2~3%のイソフルランガスで全身麻酔を導入し、手術中は動物の状態を注意深く観察しながら1~2%のイソフルランガスで麻酔を維持した。ラットの眼の乾燥を防ぐために動物用眼軟膏を塗布した。切開を行う際には常に皮膚を70%エタノールで消毒した。

完全な麻酔状態が確認された後、ラットをヒーティングパッドの上に仰向けに置き、手術用ハサミを用いて頭皮を除去した。次にラットを仰向けにし、心電図(ECG)を記録するために1本のワイヤー電極(AS633, クーナーワイヤー社, カリフォルニア州, 米国)を大胸筋に取り付けた¹⁰⁾。その後、電極を皮下に通し、頭皮の切開部から体外に出した。次いで、ラットを反転させて腹臥位(うつ伏せの状態)にし、定位脳手術装置(SR-6R-HT, ナリシゲ製作所, 日本)に固定した。

高速デンタルドリル(SD-102, ナリシゲ製作所)を用いて、直径約1.0 mm 窓を頭蓋骨に開けた。セメント固定用のアンカーとして3本のステンレス製ネジを右側に埋め込み、さらに2本のステンレス製ネジを小脳上部の骨にアース電極および参照電極として埋め込んだ。後者の2本のネジにはワイヤー電極(AS633, クーナーワイヤー社)を取り付けた。局所場電位(LFP)を記録するために、ニクロム線(762000, A-M システムズ社, 米国)を、前頭前皮質および背側海馬に定位脳的に片側(左側)へ埋め込んだ。その後、別のワイヤー電極(AS633, クーナーワイヤー社)を僧帽筋に筋電図(EMG)記録用に埋め込んだ。全ての電極はデンタルセメントを用いて頭蓋骨に固定した。記録インターフェースアセンブリは、電氣的インターフェースボード(EIB)(EIB-36-PTB, ニューラリンクス社, 米国)および3Dプリンターでカスタムメイドしたシェルとコアボディで構成した。EIBにはワイヤー電極と接続するための金属穴がある。個々の穴は、アタッチメントピンを用いて絶縁ワイヤー(約5 cm)の一端と導通接続され、もう一端は対応する個々の電極にはんだ付けされた。ECG および EMG を記録するための各ワイヤー電極では、ワイヤー先端の絶縁を除去し、もう一端を他の電極と同じアセンブリに接続した。EIBはネジを用いてシェルおよびボディコアに固定し、シェルおよびボディコアはデンタルセメントを用いて頭蓋骨に固定した。

次に、ワイヤレス血糖モニタリング装置 Medtronic Guardian™ 4 Smart CGM システム(メドトロニック社, 米国)を用いてラットの血糖値を測定した。この装置は、酵素(グルコースオキシダーゼ)でコーティングされた電極を用いて血糖値を測定するものである。後肢の皮膚を小さく切除した。その後、皮膚を剥離し、Guardian™ 4 Smart CGM システムの電極を大腿筋に配置して挿入した。配置後、装置を周囲の筋肉に縫合した。その後、剥離した皮膚を縫合し、装置全体が皮下に位置するようにした。

全ての外科手術が完了した後、ラットの体重に基づき、適切な用量の抗生物質セファゾリンを筋肉内投与し、非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)メロキシカムを皮下投与した。

術後、尾静脈から1日1回採血し、「実験動物用血糖測定器 おしえて!グル子(試験研究用)」(フォラケア・ジャパン, 日本)装置を用いて血糖値を測定した。その後、グルコース値をキャリブレーションのために装置に入力し、術後数日間にわたり血糖値を連続的に記録した。

2.3 行動試験

新奇物体認識課題の手順はこれまでに発表した論文に準拠した¹¹⁻¹³。47 行動課題は、幅 30 cm, 奥行き 30 cm, 高さ 30 cm の正方形のオープンフィールドで行った。オープンフィールドの壁と床は、黒く塗装された半透明の波形プラスチックで作製した。4 つの内壁はそれぞれ、マウスがフィールド内での方位を認識できるように、緑, 赤, 黄色のテープで部分的に独立して着色した。この試験で使用した 8 種類の物体は、[2 色:オレンジ, 白]×[4 形状:円錐形, ピラミッド形, ドーム形, 雪だるま形]で構成されている。ウェブカメラ(MCM-303, Gazo, 日本)を装置の上に設置し、60 fps で動物の行動をモニターした。カメラのストロボ信号は、カスタムメイドのアプリケーションを用いて電気生理学的信号と同期させるために、データ収集システム(CerePlex Direct, Blackrock Neurotech 社, 米国)に送信した。

マウスには1日10分間オープンフィールド(内部に物体なし)を自由に探索させ、3日間オープンフィールドに順化させた。十分な馴化の後、訓練セッションとテストセッションを含む新奇物体認識テストを行った。マウスは記録ケーブルを介してデータ収集システム(CerePlex Direct)に繋いだ。訓練セッションでは、2つの同一の物体をオープンフィールドの4つの区画のうち2つに配置した。マウスにオープンフィールドを10分間自由に探索させ、その後ホームケ-

ジに戻した。2つの物体のうち1つを同じ場所に別の新奇物体と交換し、訓練セッションから1時間後、マウスにフィールドを10分間自由に探索させた。各セッションで使用する物体は無作為選択によって事前に決定し、その配置はマウス間でランダム化したため、特定の場所や物体に対する嗜好が行動成績に影響を与える可能性は排除した。

2.4 電気生理学的記録

記録インターフェースアセンブリのEIBをデジタルヘッドステージ(CerePlex μ , ブラックロックニューロテック社)に接続した。デジタル化された信号は増幅され、インターフェースケーブルを介してデータ収集装置(CerePlex Direct)に転送された。電気生理学的信号は2kHzのサンプリングレートでデジタル化された。LFP, ECG, およびEMGは、暗期, 明期, および行動課題中に記録した。

2.5 組織学

記録終了後、動物を麻酔し、続いて0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(PBS;pH 7.4)および0.01M PBSに溶解した4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて経心的に灌流し、断頭した¹⁴⁻¹⁶。脳を4%PFAに一晩浸漬して後固定し、その後、ビブラトームを用いて厚さ100 μ mで冠状断に薄切した。連続切片をスライドガラスにマウントし、クレシルバイオレット染色処理を施した¹⁷⁻²⁰。クレシルバイオレット染色では、切片を水, エタノール, キシレンで洗浄し、クレシルバイオレットで対比染色した後、封入した。全電極の位置は、組織標本中の刺入痕を確認することによって特定した。電極の位置が標的脳領域外であった場合、データはその後の解析から除外した。クレシルバイオレット染色像は、位相差顕微鏡(BZ-X710, キーエンス, 日本)を用いて取得した。

2.6 データ解析

すべてのデータ解析は、カスタムメイドのMATLABスクリプト(MathWorks 社, 米国)を用いて行った。本文中のデータは、平均値±標準偏差で記載する。特に指定がない限り、有意水準は0.05に設定し、両側検定に基づいて $p < 0.05$ の場合に帰無仮説を統計的に棄却した。

暗期に記録されたフィルター処理済みの筋電図(EMG)データに基づき、筋活動期(運動)と非活動期(安静)を分類する方法を採用した。分類プロセスは、フィルター処理されたEMG信号の二乗平均平方根(RMS)値を用いて行った。最初のステップでは、ベースラインのEMG活動を計算した。ベースラインの平均値は、RMS値の10パー

センタイル未満に該当するフィルター処理済み EMG データの平均として決定した。RMS 値の標準偏差(SD)も算出した。活動期と安静期を区別するため、SD にスケーリングファクターを適用し、スケーリングされた SD をベースライン平均値に加えることで閾値を設定した。この閾値が運動と安静の境界を決定した。スケーリングファクターは被験体ごとに個別に設定した。次に、算出された閾値を用いて RMS 値を計算することにより、二値分類を行った。RMS が閾値を超えた時点活動を活動期(運動)とし、閾値未満の時点非活動期(安静)として分類した。得られた二値ラベルは、分類に使用した時間窓に対応する 5 秒間のセグメントを用いて分類を平滑化するためにさらに処理した。分類された活動および安静のタイミングは、同時に記録された脳波データの解析に用いられ、活動期および安静期はこのタイミングに基づいて異なる状態に分類された。

特に明条件で記録されたデータについては、EMG、海馬(HPC)のシータ波パワー、および内側前頭前皮質(mPFC)のデルタ波パワーを含む各信号に対してエポックベースの解析を行った。データは事前に定義されたウィンドウ長に基づいてエポックに分割され、各エポックはサンプリングレートに応じた特定のサンプル数を含んでいた。総エポック数は、総サンプルサイズをエポックあたりのサンプル数で割ることによって決定した。

これらの閾値を設定するため、ノイズ除去を目的として上位 0.5%の値(99.5 パーセンタイルに基づく)を除外した後、EMG の RMS を計算した。内側前頭前皮質(mPFC)におけるデルタ波パワーは 1~4 Hz 帯域のバンドパワーを用いて算出し、睡眠状態を効果的に分類するために EMG とデルタ波パワーの両方に閾値を設定した。EMG の RMS、シータ波パワー、およびデルタ波パワーを組み合わせることで分類プロセスを精密化し、各エポックを覚醒、ノンレム睡眠(NREM)、またはレム睡眠(REM)の 3 つの状態のいずれかに割り当てた。

分類には、EMG の RMS に基づくロジックを用いて覚醒、REM 睡眠、NREM 睡眠状態を識別した^{21, 22)}。具体的には、EMG の RMS 値が事前に定義された高い閾値を超えるエポックは覚醒と分類し、低い閾値を下回るエポックは mPFC のデルタ波パワーに基づいてさらに REM 睡眠または NREM 睡眠に分類した。NREM 睡眠と REM 睡眠を区別するためにデルタ波パワーの閾値を設定し、より高いデル

タ波パワーが NREM 睡眠を示した。EMG の RMS 値が高い閾値と低い閾値の間であった場合、海馬(HPC)のシータ波パワーを比較することによって追加の分類を支援し、より高いシータ波パワーは覚醒状態を、より低いシータ波パワーは REM 睡眠を示唆した。

ECG データは、心調律を計算し、自律神経系の活動指標である低周波(LF)成分と高周波(HF)成分の比(LF/HF 比)を評価するために処理された。最初に、2 つの ECG チャンネルから生の ECG データを取得し、10~100 Hz の周波数範囲を持つ 3 次バンドパスフィルターを用いて処理した。フィルター処理は butter 関数を用いて行い、フィルター処理された ECG 信号に filtfilt 関数を適用してゼロ位相フィルタリングを行った。次に、49~51 Hz の周波数範囲を持つノッチフィルターを適用して電源ラインノイズを除去した。両方のフィルター処理ステップを連続して行い、クリーンな ECG 信号を確保した。心拍数の計算は、まずノッチフィルター処理された ECG 信号の RMS を計算することによって行なった。RMS 値の 5 パーセンタイル未満の値は潜在的なエラーとして識別し、解析から除外した。残りの有効な ECG 信号を用いて、最小ピーク間隔 100 サンプル、最小ピーク高さ閾値 100 で R 波ピークを検出することにより心拍数を計算した。心拍数は単位時間あたりの検出ピーク数として計算し、RR 間隔は連続するピーク間の時間差として算出した。周波数領域特性を評価するため、高速フーリエ変換(FFT)を用いて RR 間隔を解析し、パワースペクトル密度(Sxx)を得た。スペクトルから LF(0.04~1 Hz)および HF(1~3 Hz)成分を抽出し、これらの周波数帯域の曲線下面積(AUC)を数値積分により計算した。LF/HF 比は、LF 帯域の AUC と HF 帯域の AUC の比として算出し、自律神経系のバランスの指標とした。この方法は、ECG 信号からの心拍数および自律神経系活動の正確な解析を可能にした。

各局所場電位(LFP)は、位相情報を保持しつつ電源ラインノイズを除去するために、3 次バターワースフィルターを用いてノッチフィルター処理(49~51 Hz)された。周波数領域解析は、FFT ベースの手法を用いて行なった。パワースペクトル密度と対応する周波数軸を計算し、事前に定義された 6 つの帯域(デルタ(1~4 Hz)、シータ(4~12 Hz)、ベータ(18~25 Hz)、ローガンマ(25~50 Hz)、ハイガンマ(50~80 Hz)、およびリップル(100~200 Hz))内で曲線下

面積を積分した。比較のため、得られたバンドパワー値はデルタ帯域のパワーで正規化した。

4つの海馬(HPC)チャンネルと4つの前頭前皮質(PFC)チャンネルからのLFP(局所電場電位)間で相互相関分析を行った^{23, 24)}。各HPC-PFCペアについて、最大相関係数とその時間遅延を記録した。解析は記録全体に対して行うとともに、EMG(筋電図)ベースの分類によって特定された「行動中」および「不動時」のエポックそれぞれに対しても別途行った。これにより、異なる行動状態におけるHPC-PFC間の結合強度と時間的整合性を定量化することができた。

3. 研究結果

Wistarラットに対し、Control食(Mgあり)または低Mg食(Mgなし)を2週間与え、2週間後に電気生理記録のオペ、ならびに血糖値センサーの埋め込みオペを同時実施した。電気生理記録のオペでは、EMG(僧帽筋)、ECG(心臓付近の胸筋)、海馬(左側)、mPFC(左側)に電極を留置した。センサーの埋め込みオペでは、血糖値センサー(Medtronic製GuardianTM 4 Smart CGM System)を右大臀筋～大腿筋に背側から電極を刺すように埋め込んだ。血糖値センサーはBluetoothを用いてSmartphoneに無線接続されており、センサーの酵素量により最長で7日間連続して記録できるが、ほとんどの場合本体の充電切れによりそれ以前に記録が終了した。オペから1週間後、暗期(dark条件)と明期(light条件)に各3時間(あるいはそれ以上)ずつ、電気生理的記録を行った。記録後は、灌流固定し脳を保存した。灌流固定での開胸時に、右心房付近から採血を行い、冷凍保存した。保存した血液を用いて、今後血中Mg濃度を定量する予定である(図1)。

暗条件下でのデータに対しては、EMGを用いてbehaving/immobile-stateに分類することにより、通常の解析に加えて各stateでの解析を行った。各stateの分類方法は、先行研究に倣い、20～200 HzでバンドパスフィルタしたEMGを、5秒ごとにRMS値を計算し、下部10%未満の値の平均値をベースラインとしてベースライン+定数×SDを閾値として分類した。EMG電極の装着位置や電

極先端の状態によって、定数部分は個体ごとに適宜変更した。ECGについては、心拍数とLF/HF値を算出した。LFPについては、各周波数帯域powerをdelta power(有意差なし)により正規化した値を解析に用いた。また、LFPの海馬-mPFC間相互相関係数についても算出した。

明条件下では、dark条件とは異なりラットが睡眠するため、先行研究に倣い睡眠状態に基づいてawake/non-REM/REM-stateに分類した^{25, 26)}。各stateの分類方法は、先行研究に倣い、20～100 HzでバンドパスフィルタしたEMGを、10秒ごとにRMS値を計算し、上部0.5%の値をnoiseとして破棄し、残った下部99.5%の値の平均値をベースラインとして平均+定数×SDを閾値として分類した。下部99.5%の平均値をベースラインとして平均×1.5(EMG高閾値)、平均(EMG低閾値)、さらに、mPFCの全delta-power×0.3(mPFC-delta閾値)の計3つの閾値を設定して分類した。EMG高閾値を超えた場合はawakeに、EMG低閾値を下回った場合は、さらにmPFC-delta閾値との比較により、高い場合はnon-REM、低い場合はREMに分類された。EMGの2つの閾値の中間の場合は、補助的に海馬のtheta-powerの中央値との比較により、高い場合はawakeに、低い場合はREMに分類された。

上記のstateの分類を除いては、dark条件と同様の解析を行った。すなわち、ECGについては、心拍数とLF/HF値を算出した。LFPについては、各周波数帯域powerをdelta-power(有意差なし)により正規化した値を解析に用いた。また、海馬-mPFCのLFPの相互相関係数についても算出した。

新奇物体認識試験においては、弁別比(新奇物体と既存物体の探索時間の差を総探索時間で割った値)を記憶成績の指標とした。Mg欠乏群はコントロール群に比べ、記憶成績(弁別比)が低下する傾向にあった。この時の神経活動については、特に海馬のシータ波やガンマ波を中心に解析を進めている。

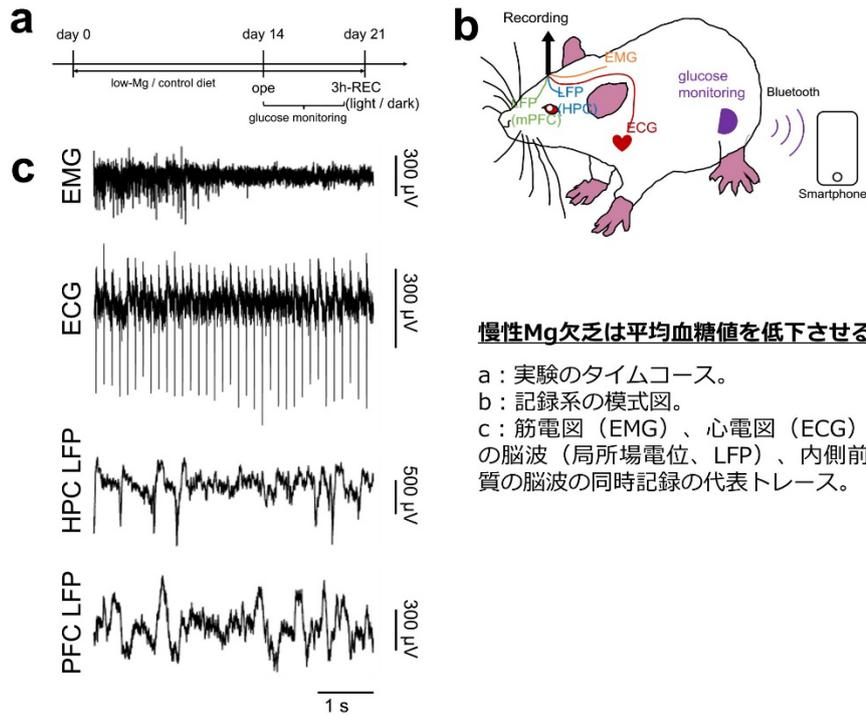


図 1. 慢性 Mg 欠乏は平均血糖値を低下させる

4. 考察

図 1 では、群ごとに、全ての血糖値記録を合算して統計検定を行ったところ有意な差が認められた。そこで、個体ごとに確率密度分布を作成したところ、確かに分布が左側にシフトしていることを確認できた。実際、w/o Mg 群において、血糖値の平均値は有意に低下していた。この結果は、 β cell に発現する NMDA 受容体をブロックする Mg イオンがなくなることで、細胞内に Ca イオンが流入しやすくなり、細胞の興奮性が上がり、インスリン分泌量が増える、という先行研究と一致した原理により解釈することが可能である²⁷⁾。また、このインスリン分泌量のベースラインの変化に伴い、全身での糖代謝に関するホルモンのバランスが崩れ、血糖値の変動が頻発する可能性を考えていたが、その指標となる標準偏差(SD)や変動係数(CV)には有意な差は認められなかった。このことから、インスリンレベルの低下は、糖代謝関連ホルモンの新たな平衡点を作り出していることが示唆される。

海馬と mPFC の LFP について、dark 条件下で有意な変化が見られなかったことから、活動時や静止時などの生理的条件に近い状態においては、慢性 Mg 欠乏は海馬や mPFC の活動に影響を与えないことが示唆された。

慢性 Mg 欠乏は平均血糖値を低下させる

a : 実験のタイムコース。

b : 記録系の模式図。

c : 筋電図 (EMG)、心電図 (ECG)、海馬の脳波 (局所場電位、LFP)、内側前頭前皮質の脳波の同時記録の代表トレース。

先行研究において、慢性 Mg 欠乏は記憶学習に悪影響をもたらすことが示されているので、今回の記録条件ではとらえられなかったが、記憶学習時には脳波が変化する可能性がある。

ECG について、light 条件では dark 条件と同様の結果が得られた。海馬と mPFC の LFP については、解析前には、先行研究で、Mg の記憶の固定過程での関与が示されていたため、睡眠中 (non-REM または REM) での周波数帯域 power に変化を引き起こすことが予想されたが、予想外に、awake-state 中の海馬 LFP において変化が生じた。有意な変化が観察されたのは low-gamma, ripple の帯域のみであるが、awake-state 中の海馬 LFP ではどの周波数帯域でも全体的に power が高い傾向が見られた。しかし、暗条件では変化が見られなかったことから、覚醒中であっても、睡眠の直前直後において活性化する脳機能に Mg 欠乏が影響していることが示唆される。海馬に関しては、睡眠中に記憶を整理し、長期記憶へと転送する準備段階に入っていると予想されるため、本実験で見られた変化が先行研究において報告されている認知機能の低下に寄与している可

能性がある。デフォルトモードネットワークとの関連も視野に入れ今後の解析を行っていく。

5. 今後の課題

助成期間においては、予想外のトラブルのシューティングや条件検討などに時間を割いてしまったが、その反面、良い条件での記録が可能となった。睡眠と覚醒の各ステージにおける脳波のパターンをさらに詳細に調べ、それぞれのステージにおける脳状態を精査していきたい。また、隠れマルコフモデルなどの確率モデルを用いて、直前の状態がどのように直後の状態を規定しているのかを推定し、物体探索前と物体探索中の脳状態の因果関係を評価する。もしその因果律が評価できた場合には、コントロール群と Mg 欠乏群とで比較をおこない、Mg が神経活動レベルでどのような影響を与えているかを、数理科学的に評価していきたい。

これらの解析が終わり次第、投稿論文として発表する準備を進めていく。

6. 文献

- 1) Matsumoto N, Kitanishi T, Mizuseki K. The subiculum: unique hippocampal hub and more. *Neurosci. Res.*, **143**, 1–12 (2019).
- 2) Matsumoto N, Okamoto K, Takagi Y, Ikegaya Y. 3-Hz subthreshold oscillations of CA2 neurons in vivo. *Hippocampus*, **26**, 1570–1578 (2016).
- 3) Adey WR. Neurophysiological correlates of information transaction and storage in brain tissue. *Progress in physiological psychology*. (Stellar E, Sprague JM ed.), Academic Press, New York, pp.3–43 (1966).
- 4) Ikegaya Y, Matsumoto N. Spikes in the sleeping brain. *Science*, **366**, 306–307 (2019).
- 5) Okada R, Ikegaya Y, Matsumoto N. Short-term preexposure to novel enriched environment augments hippocampal ripples in urethane-anesthetized mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **47**, 1021–1027 (2024).
- 6) Buzsáki G. Hippocampal sharp wave-ripple: a cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus*, **25**, 1073–1188 (2015).
- 7) Noguchi A, Huszár R, Morikawa S, Buzsáki G, Ikegaya Y. Inhibition allocates spikes during hippocampal ripples. *Nat. Commun.*, **13**, 1280 (2022).
- 8) Skaggs WE, McNaughton BL. Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience. *Science*, **271**, 1870–1873 (1996).
- 9) Serita T, Miyahara M, Tanimizu T, Takahashi S, Oishi S, Nagayoshi T, Tsuji R, Inoue H, Uehara M, Kida S. Dietary magnesium deficiency impairs hippocampus-dependent memories without changes in the spine density and morphology of hippocampal neurons in mice. *Brain Res. Bull.*, **144**, 149–157 (2019).
- 10) Okada S, Igata H, Sakaguchi T, Sasaki T, Ikegaya Y. A new device for the simultaneous recording of cerebral, cardiac, and muscular electrical activity in freely moving rodents. *J. Pharmacol. Sci.*, **132**, 105–108 (2016).
- 11) Kudara M, Kato-Ishikura E, Ikegaya Y, Matsumoto N. Ramelteon administration enhances novel object recognition and spatial working memory in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **152**, 128–135 (2023).
- 12) Takeda K, Watanabe K, Iijima S, Nagahiro T, Suzuki H, Izumo K, Ikegaya Y, Matsumoto N. Ramelteon coordinates theta and gamma oscillations in the hippocampus for novel object recognition memory in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **158**, 121–130 (2025).
- 13) Iijima S, Takeda K, Nagahiro T, Watanabe K, Ikegaya Y, Matsumoto N. Acute curcumin administration enhances delta oscillations in the hippocampus underlying object memory improvement. *J. Pharmacol. Sci.*, **158**, 95–102 (2025).
- 14) Liu J, Kashima T, Morikawa S, Noguchi A, Ikegaya Y, Matsumoto N. Molecular characterization of superficial layers of the presubiculum during development. *Front. Neuroanat.*, **15**, 662724 (2021).
- 15) Takeuchi Y, Yamashiro K, Noguchi A, Liu J, Mitsui S, Ikegaya Y, Matsumoto N. Machine learning-based segmentation of the rodent hippocampal CA2 area from Nissl-stained sections. *Front. Neuroanat.*, **17**, 1172512 (2023).
- 16) Matsumoto N, Miyano M, Abe T, Kashima T, Kato-Ishikura E, Inoue K-I, Liu J, Kiyonari H, Takeuchi H, Ikegaya Y. Generation of dopamine transporter (DAT)-

- mCherry knock-in rats by CRISPR-Cas9 genome editing. *Biol. Pharm. Bull.*, **47**, 394–398 (2024).
- 17) Kudara M, Matsumoto N, Kuga N, Yamashiro K, Yoshimoto A, Ikegaya Y, Sasaki T. An open-source application to identify the three-dimensional locations of electrodes implanted into the rat brain from computed tomography images. *Neurosci. Res.*, **193**, 20–27 (2023).
- 18) Yoshimoto A, Shibata Y, Kudara M, Ikegaya Y, Matsumoto N. Enhancement of motor cortical gamma oscillations and sniffing activity by medial forebrain bundle stimulation precedes locomotion. *eNeuro*, **9**, ENEURO.0521-21.2022 (2022).
- 19) Shibata Y, Yoshimoto A, Yamashiro K, Ikegaya Y, Matsumoto N. Delayed reinforcement hinders subsequent extinction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **591**, 20–25 (2022).
- 20) Kawamura M, Yoshimoto A, Ikegaya Y, Matsumoto N. Low atmospheric oxygen attenuates alpha oscillations in the primary motor cortex of awake rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **47**, 462–468 (2024).
- 21) Mizuseki K, Diba K, Pastalkova E, Buzsáki G. Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat. Neurosci.*, **14**, 1174–1181 (2011).
- 22) Miyawaki H, Mizuseki K. De novo inter-regional coactivations of preconfigured local ensembles support memory. *Nat. Commun.*, **13**, 1272 (2022).
- 23) Konno D, Nishimoto S, Suzuki T, Ikegaya Y, Matsumoto N. Multiple states in ongoing neural activity in the rat visual cortex. *PLoS One*, **16**, e0256791 (2021).
- 24) Ogasawara J, Matsumoto N, Takeuchi Y, Yamashiro K, Yasui M, Ikegaya Y. Lengthened circadian rhythms in mice with self-controlled ambient light intensity. *Sci. Rep.*, **14**, 7778 (2024).
- 25) Yoshimoto A, Yamashiro K, Suzuki T, Ikegaya Y, Matsumoto N. Ramelteon modulates gamma oscillations in the rat primary motor cortex during non-REM sleep. *J. Pharmacol. Sci.*, **145**, 97–104 (2021).
- 26) Yoshimoto A, Yamashiro K, Ikegaya Y, Matsumoto N. Acute ramelteon treatment maintains the cardiac rhythms of rats during non-REM sleep. *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 789–797 (2021).
- 27) Šterk M, Križančić Bombek L, Skelin Klemen M, Slak Rupnik M, Marhl M, Stožer A, Gosak M. NMDA receptor inhibition increases, synchronizes, and stabilizes the collective pancreatic beta cell activity: Insights through multilayer network analysis. *PLoS Comput. Biol.*, **17**, e1009002 (2021).

Elucidating the Influence of Magnesium Deficiency on the Hippocampal Neural Activity

Nobuyoshi Matsumoto^{1,2}

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,

² Institute for AI and Beyond, The University of Tokyo

Summary

This study is aimed at elucidating the effects of magnesium deficiency on neural activity in the hippocampus, a brain region crucial for memory and learning. As local field potentials (LFPs) in the hippocampus are closely related to sleep, memory, and learning, this study focuses on the analysis of LFPs during sleep and behavior to scrutinize the impact of magnesium on neural activity.

In this study, rats and mice were fed a low-magnesium diet (extremely low Mg content) or a standard control diet for two weeks. Electrodes were implanted to record electrocardiograms (ECG) and electromyograms (EMG). Furthermore, electrodes for recording LFPs were implanted in the medial prefrontal cortex (mPFC) and dorsal hippocampus. A novel object recognition task was conducted, and various biosignals were recorded and analyzed during task performance and sleep. Animal behavioral states were classified based on EMG and LFP data. Frequency analysis of LFPs in each state and cross-correlation analysis of LFPs between the hippocampus and mPFC were performed.

In the novel object recognition task, the low-magnesium diet group (MgD group) was likely to exhibit impaired memory performance.

In a home cage, no significant differences were observed in LFPs from the hippocampus and mPFC between the two groups during the dark phase. However, analysis of the light phase revealed a trend towards increased low-gamma power in hippocampal LFPs during the awake state in the MgD group. Furthermore, ECG analysis, including heart rate and the LF/HF ratio (an indicator of autonomic nervous system activity), suggested potential alterations in the MgD group.

The impaired memory performance is thought to be associated with alterations in hippocampal LFPs during task execution. The absence of LFP changes during the dark phase in a home cage suggests that the effects of magnesium deficiency may not be prominent under physiological conditions such as active states. On the other hand, changes in hippocampal activity during the awake state in the light phase in a home cage, particularly around sleep periods, suggest that magnesium deficiency may affect sleep-related brain functions, contributing to cognitive decline.