

[研究論文]

オキシトシン細胞間の興奮性神経連絡の活性化は射乳に先行する オキシトシン細胞のバースト発射発現を促進する

本田 和正、奥野 瑞生、小野山 梓、大川 洋子

要 約

射乳反射時には、視床下部内の4つの離れた部位に存在する神経核(左右の視索上核と室傍核)のオキシトシン細胞が同期してバースト発射を起こしているが、バースト発射およびその同期がどのような機構で起こっているのかは不明である。4つの離れた神経核のオキシトシン細胞間に存在することが示唆されている興奮性神経連絡がオキシトシン細胞の同期したバースト発射の発現に関与しているかどうかを明らかにする為に、授乳期ラットの下垂体後葉に電気刺激を加えてオキシトシン細胞間の興奮性神経連絡を活性化し、視索上核および室傍核のオキシトシン細胞のバースト発射を計測した。視索上核および室傍核の両方のオキシトシン細胞において、バースト発射の平均および最短間隔はともに下垂体後葉への電気刺激によって有意に短縮した。バースト発射の頻度、総発火数、ピーク発火頻度、持続時間は、視索上核および室傍核の両方のオキシトシン細胞において、刺激後に増加する傾向を示した。以上の結果から、下垂体後葉の電気刺激によるオキシトシン細胞間の興奮性神経連絡の活性化がバースト発射発生を促進するとともに個々のバースト発射の大きさを増強していることが示唆された。

キーワード：ラット、射乳反射、神経連絡、バースト発射、オキシトシン細胞

受付日 2019.4.10
受理日 2019.6.20
所 属 看護福祉学部

緒 言

授乳期のラットでは仔ラットによる吸乳刺激が乳首に持続的に加えられているにもかかわらず、オキシトシン (oxytocin; OT) 細胞は間欠的に興奮して急激な発火頻度の上昇を4つの神経核において同期して起こすことが知られている¹⁾。この急激な発火頻度の上昇をバースト発射と呼んでいる。OT細胞のバースト発射が4つの神経核で同期して起こることによって、OTが下垂体後葉の終末から全身血中に間欠的に放出されて、乳腺の筋上皮を収縮させて、射乳が間欠的に起こる。しかし、バースト発射がどのような機構で間欠的に発現し、更に4つの神経核のOT細胞が同期してバースト発射を発現する機構は不明である。我々は左右の視床下部および同側視床下部のOT細胞間に興奮性神経連絡が存在することを明らかにし、この興奮性神経連絡がバースト発射の同期に関与している可能性を示唆した^{2,5)}。本研究では、下垂体後葉の持続的電気刺激によって4つの神経核のOT細胞を逆行性に興奮させることでOT細胞間の興奮性神経連絡を活性化して、視索上核 (supraoptic nucleus; SON) および室傍核 (paraventricular nucleus; PVN) のOT細胞のバースト発射発現に対する影響を検討した (図1)。

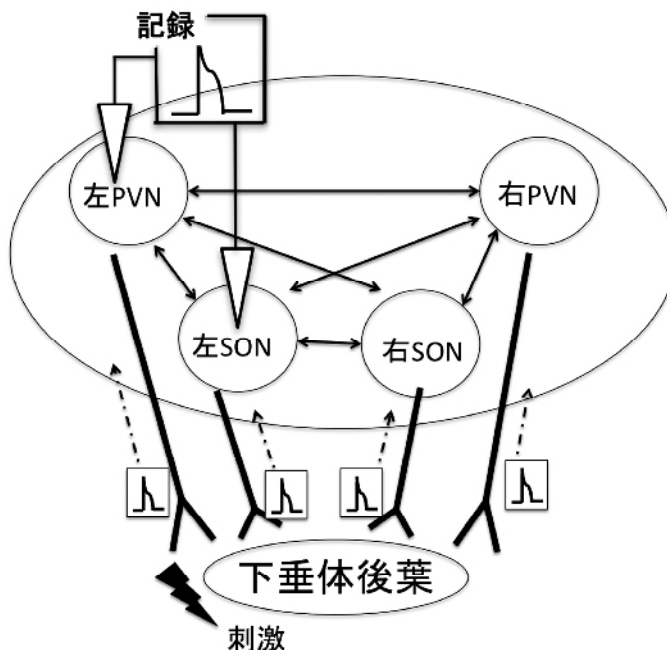


図 1 本研究の概略

下垂体後葉を電気刺激することによって4つの神経核 (左右 PVN および SON) にある OT 細胞を逆行性に興奮させる。これにより、先行研究で明らかにされた4つの神経核間の興奮性神経連絡を活性化させて PVN または SON の OT 細胞のバースト発射発現に及ぼす効果を検討する。

材料と方法

本研究は「福井県立大学動物実験取扱規程」に従って実施した。動物は雌の未經産ウイスターラットを用い、12 時間照明・12 時間暗黒（6 時から18 時まで点灯）の明暗周期下で室温を24 °Cに調節した環境で飼育した。性周期を把握するために綿棒法で陰垢を採取し、発情前期の夕方に雄ラットと同居させて交配した。実験には分娩後7～12日目、体重340～420gの授乳期ラットを用いた。実験前日の夕方に母ラットと仔ラットを分離した。実験当日、ウレタン麻醉下（1.1～1.5g/kg体重、腹腔内投与）で、右心房内にカニユーレを留置し、乳管に乳腺内圧測定用カニユーレを挿入した。脳定位固定装置に固定後、頭蓋骨に刺激および記録電極刺入用の穴をあけ、下垂体後葉には刺激電極を留置した。各電極の座標は Paxions & Watson のラット脳地図⁶⁾を参考に決定した。刺激電極は歯科用セメントとステンレス製ビスで頭蓋に固定した。手術終了後、鎮痛剤（ザイラジン [バイエル薬品株式会社、セラクターズ]）を0.15ml/kg 皮下注射した。また、実験中はラットの直腸温をモニターし、ヒートパッドで37°Cに保持した。8～11匹の仔ラットを母ラットに吸乳させ、左側PVNあるいはSONに記録用ガラス微小電極を刺入し、単一ニューロンの細胞外記録を実施した。ガラス微小電極の先端径は約1 μ m、電極抵抗は約30M Ω とし、電極液は2%ポンタミンスカイブルーを0.5M酢酸ナトリウム溶液に溶解して用いた。下垂体後葉の電気刺激に対する逆行性興奮応答の有無により下垂体後葉ホルモン分泌細胞を識別した。これらの細胞のうち、射乳に先立ってバースト発射を起こさなかった細胞をバゾプレッシン細胞、バースト発射を起こした細胞をOT細胞に分類した。OT細胞の記録時に下垂体後葉に電気刺激（1mA、50Hz、400～800回）を与え、その前後15分間の射乳反射をOT細胞の発火頻度と乳腺内圧測定によって観察した。バースト発射の平均間隔、最小間隔、頻度、総発火数、ピーク発火頻度、持続時間を計測し、下垂体後葉への電気刺激によるバースト発射への影響を分析した。統計的有意性は「対応のある *t* 検定」によって、有意水準5%で各々検定した。

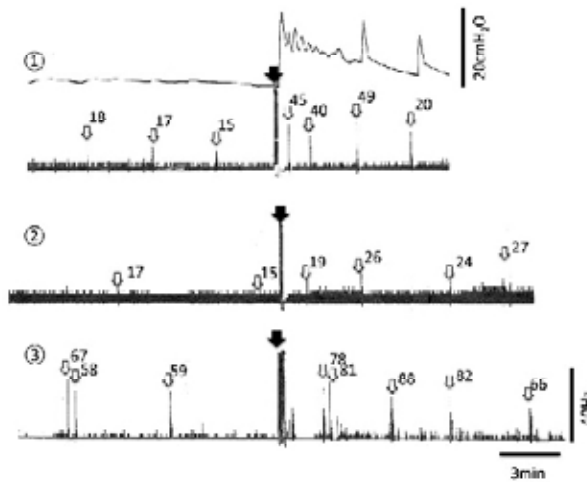


図 2 下垂体後葉への電気刺激前後における PVN の OT 細胞の発火頻度の計測例

8 から 11 匹の仔ラットによる吸乳刺激を母ラットに与えながら、黒矢印で下垂体後葉に電気刺激 (①、②:1mA、50Hz、400 回、③:1mA、50Hz、800 回) を与えた。白矢印はバースト発射が起きたことを示す。白矢印の右上の数値はバースト発射時の総発火数を示す。また①では同時計測した乳腺内圧の変化も示す。

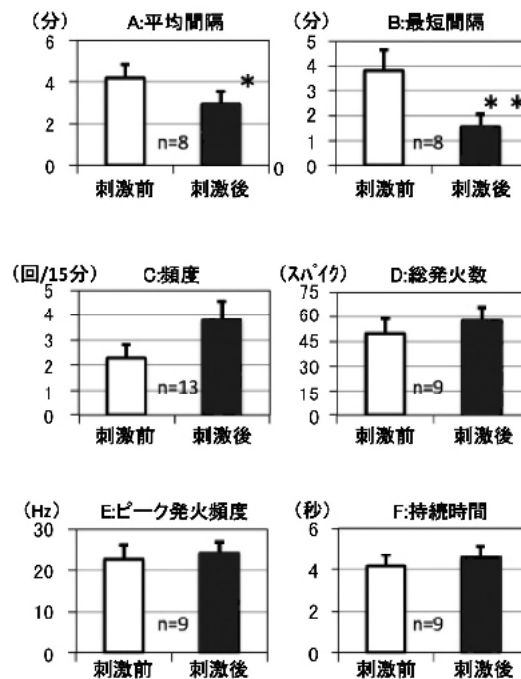


図 3 下垂体後葉への電気刺激の前後各 15 分間における PVN の OT 細胞のバースト発射の平均間隔 (A)、最短間隔 (B)、頻度 (C)、総発火数 (D)、ピーク発火頻度 (E)、持続時間 (F)

n は例数を示す。バースト発射の平均間隔と最短間隔は刺激後有意に短縮した (対応のある t 検定、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。

結 果

1. 下垂体後葉への電気刺激が OT 細胞のバースト発射の平均間隔に及ぼす影響

PVNのOT細胞において、電気刺激を与える前後15分間のバースト発射の平均間隔（分）を測定した結果、刺激前が 4.2 ± 0.7 分（平均値 \pm 標準誤差）、刺激後は 2.9 ± 0.6 分であり、刺激によってバースト発射の平均間隔が有意（ $p < 0.05$ ）に短縮した（図2、3）。SONのOT細胞においても電気刺激を与える前後15分間のバースト発射の平均間隔を測定した結果、刺激前は 4.2 ± 0.4 分、刺激後は 2.3 ± 0.5 分であり、統計的に有意（ $p < 0.05$ ）な短縮が認められた（図4、5）。

2. 下垂体後葉への電気刺激がバースト発射の最短間隔に及ぼす影響

PVNのOT細胞において、下垂体後葉に電気刺激を与える前後15分間のバースト発射の最短間隔（分）を測定した結果、刺激前が 3.8 ± 0.8 分（平均値 \pm 標準誤差）、刺激後が 1.6 ± 0.5 分であり、刺激によって、バースト発射の最短間隔が有意（ $p < 0.01$ ）に短縮した（図2、3）。SONのOT細胞における下垂体後葉への電気刺激前後15分間におけるバースト発射の最短間隔は、刺激前が 3.6 ± 0.4 分、刺激後が 0.6 ± 0.2 分であり、電気刺激によって統計的に有意（ $p < 0.01$ ）な短縮が認められた（図4、5）。

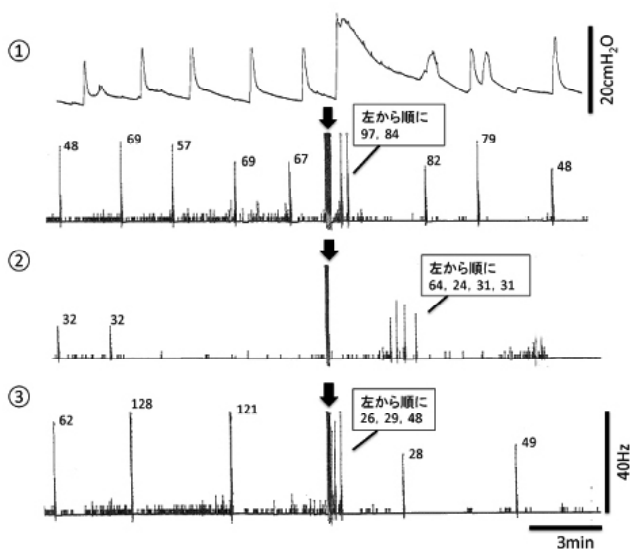


図4 下垂体後葉への電気刺激の前後における SON の OT 細胞の発火頻度の計測例

8 から 11 匹の仔ラットによる吸乳刺激を母ラットに与えながら、黒矢印で下垂体後葉に電気刺激（1mA, 50Hz, 800 回）を与えた。各バースト発射の右上の数値はバースト発射時の総発火数を示す。また、①では同時計測した乳腺内圧の変化も示す。

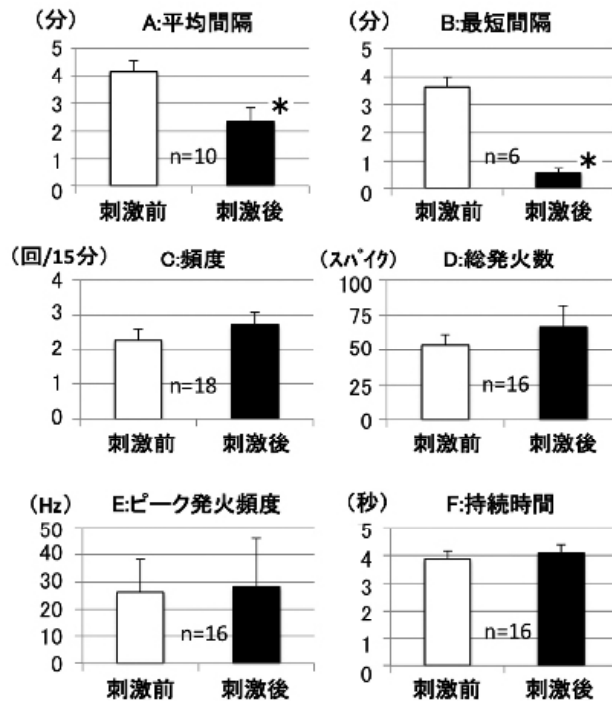


図 5 下垂体後葉への電気刺激前後各 15 分間における SON の OT 細胞のバースト発射の平均間隔 (A)、最短間隔 (B)、頻度 (C)、総発火数 (D)、ピーク発火頻度 (E)、持続時間 (F)
n は例数を表す。バースト発射の平均間隔と最短間隔は刺激後有意に短縮した (対応のある *t* 検定、* : $p < 0.01$)。

3. 下垂体後葉への電気刺激がバースト発射の頻度に及ぼす影響

PVNのOT細胞において、電気刺激を与える前のバースト発射の発現頻度は 2.3 ± 0.5 回/15分間 (平均値 \pm 標準誤差) であり、刺激後は 3.8 ± 0.8 回/15分間となり、頻度が増加する傾向が認められたが統計的に有意な変化ではなかった (図2、3)。SONのOT細胞において、電気刺激を与える前のバースト発射の発現頻度は 2.3 ± 0.3 回/15分間であり、刺激後は 2.7 ± 0.4 回/15分間となり、頻度が増加する傾向が認められたがPVNと同様に統計的に有意な変化ではなかった (図4、5)。

4. 下垂体後葉への電気刺激がバースト発射の総発火数に及ぼす影響

PVNのOT細胞において、電気刺激前のバースト発射の総発火数は 49.7 ± 9.0 スパイク (平均値 \pm 標準誤差) であり、刺激後は 57.7 ± 8.2 スパイクとなり、刺激後に総発火数が増加する傾向が認められたが、統計的に有意な増加ではなかった (図3)。SONのOT細胞において、電気刺激前のバースト発射の総発火数は 53.7 ± 7.3 スパイクであり、刺激後は 66.8 ± 15.0 スパイクに増

加する傾向が認められたが、統計的に有意ではなかった（図5）。

5. 下垂体後葉への電気刺激がバースト発射のピーク発火頻度に及ぼす影響

PVNのOT細胞において、電気刺激前のバースト発射のピーク発火頻度は $22.6 \pm 3.7\text{Hz}$ （平均値 \pm 標準誤差）であり、刺激後は $24.4 \pm 2.6\text{Hz}$ であった。SONのOT細胞において、電気刺激前のバースト発射のピーク発火頻度は $26.4 \pm 3.0\text{Hz}$ であり、刺激後は $28.3 \pm 4.4\text{Hz}$ であった。PVNとSONの両方のOT細胞で刺激によってピーク発火頻度が上昇する傾向が認められたが、統計的に有意な上昇ではなかった（図3、5）。

6. 下垂体後葉への電気刺激がバースト発射の持続時間に及ぼす影響

PVNのOT細胞において、電気刺激前のバースト発射の持続時間は 4.2 ± 0.5 秒（平均値 \pm 標準誤差）であり、刺激後は 4.6 ± 0.6 秒であった。SONのOT細胞において、電気刺激前のバースト発射の持続時間は 3.9 ± 0.3 秒であり、刺激後は 4.1 ± 0.3 秒であった。PVNおよびSONの両方のOT細胞で刺激によって持続時間が延長する傾向がみとめられたが、有意な変化ではなかった（図3、5）。

考 察

我々の以前の研究²⁵⁾により、左右の視床下部および同側の視床下部のOT細胞間に興奮性神経連絡が存在し、これらの神経連絡がOT細胞のバースト発射の同期化に関与していることが示唆された。本研究では、下垂体後葉に高頻度の電気刺激を与えて4つの神経核にあるOT細胞を逆行性に興奮させ、離れた神経核のOT細胞間の興奮性神経連絡を活性化することを試み、その効果を射乳反射時のOT細胞のバースト発射に対する影響で検討した。その結果、バースト発射の頻度と大きさが促進されることが明らかとなった。本研究はNegoroら⁷⁾の室傍核OT細胞における報告を確認すると同時に視索上核OT細胞においても同様の応答が起こることを明らかにしたものである。

仔ラットによる吸乳刺激が持続的であるにもかかわらず、OT細胞がなぜ間欠的なバースト発射を起こすのかは現在のところ不明である。しかし、バースト発射が全てのOT細胞において同期して起こるためには、吸乳刺激の情報がバースト状に同期して全てのOT細胞に送られるか、あるいは、一部のOT細胞が何らかの方法でバースト発射を起こし、その情報が他の全てのOT細胞に送られるかのいずれかであろうと推測される。現在のところ前者に関して、我々はOT細胞に吸乳刺激の情報が視床下部の背内側核の細胞からバースト状に送られている可能性を以前に示唆した⁸⁻¹⁰⁾。すなわち、背内側核から視索上核に同側性または対側性あるいは両側性に投射する細胞の一部でOT細胞と同様のバースト発射が起こることが明らかになったが、

このようなタイプのニューロンの数は多くないので、全てのOT細胞に吸乳刺激の情報がバースト状に送られているという証拠はまだ得られていない。我々の以前の研究^{2,5)}や本研究で想定している離れた神経核のOT細胞間の興奮性神経連絡は後者の可能性を強く支持している。

OT細胞間の興奮性神経連絡はOT作動性シナプスによって仲介されていると推定される。我々は以前にOT受容体阻害剤の脳室内投与が射乳の発生頻度や大きさを減弱させることを報告したが¹¹⁾、本研究結果がOT細胞間の興奮性神経連絡の活性化を介して得られているという直接的な証拠はない。脳室内にOT受容体阻害剤を注入した動物において、下垂体後葉への電気刺激がバースト発射に対する影響を検討することにより、この疑問を解決できるかもしれない。

引用文献

- 1) Wakerley JB, Clark G, Summerlee AJS: Milk Ejection and Its Control. In “The Physiology of Reproduction, Second edition. Edited by Knobil E, Neil JD” 1994 1131-1177 Raven Press, New York.
- 2) Honda K, Sudo A, Ikeda K: Oxytocin Cells in the Supraoptic Nucleus Receive Excitatory Synaptic Inputs from the Contralateral Supraoptic and Paraventricular Nuclei in the Lactating Rat. *J. Reprod. Development* 2013 59 569-574.
- 3) Honda K, Zhang W, Tomiyama K: Oxytocin cells in the Paraventricular Nucleus Receive Excitatory Synaptic Inputs from the Contralateral Paraventricular and Supraoptic Nuclei in Lactating Rats. *Neuroscience Letters* 2014 572 44 – 47.
- 4) 本田和正、小森千聖 未経産雌ラットおよび雄ラット視索上核オキシトシン細胞は対側視索上核から興奮性入力を受ける 日本畜産学会報 2016 87 227-233.
- 5) 本田和正、佐竹舞香、陸衛州 未経産雌ラットにおける同側視床下部の視索上核と室傍核間のシナプス連絡の解析 福井県立大学論集 2019 51 15-25
- 6) Paxinos G, Watson C : The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 5th edition. 2005 Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- 7) Negoro H, Uchide K, Honda K, Higuchi T: Facilitatory effect of antidromic stimulation on milk ejection-related activation of oxytocin neurones during suckling in the rat. *Neurosci Lett* 1985 59 21-25.
- 8) Honda K, Higuchi T: Oxytocin neurons in the supraoptic nucleus receive excitatory inputs from the bilateral dorsomedial hypothalamic nuclei. *Brain Res Bull* 2007 74 237-242.
- 9) Honda K, Higuchi T: Effects of Unilateral Electrolytic Lesion of the Dorsomedial Nucleus of the Hypothalamus on Milk-ejection Reflex in the Rat. *J Reprod and Develop* 2010 56 1-5.
- 10) Honda K, Higuchi T: Electrical Activities of Neurones in the Dorsomedial Hypothalamic Nucleus Projecting to the Supraoptic Nucleus During Milk-ejection Reflex in the Rat. *J Reprod and Develop* 2010 56 336-340.
- 11) 本田和正、長尾明典、松田真由子 中枢性オキシトシンが授乳期ラットの射乳反射に果たす役割の検討 日本畜産学会報 2018 89 13-17.