

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

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 本田, 和正, 佐竹, 舞香, 陸, 衛洲 メールアドレス: 所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/45

[研究論文]

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

本田 和正・佐竹 舞香・陸 衛 州

要 約

未経産雌ラットにおいて、視索上核あるいは室傍核の神経分泌細胞への同側室傍核あるいは視索上核からのシナプス入力の有無を解析した。合計40匹の未経産雌ラットにおいて、下垂体後葉の電気刺激に対して逆行性興奮応答を示す下垂体後葉ホルモン分泌細胞が室傍核から75個、視索上核から124個記録された。室傍核の75個のうち50個がオキシトシン細胞で25個がバゾプレッシン細胞に分類された。視索上核の124個のうち57個がオキシトシン細胞に、67個がバゾプレッシン細胞に分類された。これらの細胞において同側室傍核あるいは視索上核への電気刺激に対する応答を解析したところ、逆行性興奮応答を示す細胞は認められず、順行性応答のみが観察された。室傍核および視索上核のオキシトシン細胞はバゾプレッシン細胞に比べて同側視索上核あるいは室傍核への電気刺激に対して順行性興奮応答を示す細胞の割合が高い傾向が認められた。また、同側室傍核または視索上核への連続電気刺激中の発火頻度はオキシトシン細胞で増加する傾向が認められた。以上の結果から室傍核および視索上核のオキシトシン細胞は同側の視索上核あるいは室傍核から主に興奮性シナプス入力を受けている可能性が示唆された。

キーワード：ラット、射乳反射、バースト発射、オキシトシン細胞、興奮性シナプス連絡

受付日 2018.10.31
受理日 2018.12.12
所 属 看護福祉学部

緒 言

視床下部の室傍核 (PVN) および視索上核 (SON) には下垂体後葉の毛細血管に軸索終末を送り、全身血中にバゾプレッシン (VAP) あるいはオキシトシン (OT) を分泌する神経分泌細胞が存在する。これらの細胞は下垂体後葉への電気刺激に対して逆行性興奮応答を示すので、電気生理的手法によって容易に同定することが可能である。

授乳期のラットでは仔ラットによる吸乳刺激が持続的に母ラットの乳首に加えられているにもかかわらず、血中OT濃度は数分毎に間欠的に上昇するため射乳も間欠的に起こる¹⁾。OT細胞の発火頻度は射乳が起こる10~20秒前に急激に上昇(バースト発射)し、射乳反射時には視床下部の左右の視索上核と室傍核にあるほとんど全てのOT細胞が同期してバースト発射を起こしていることが知られている¹⁾。

先行研究により、左右の視床下部に位置するOT細胞間に興奮性神経連絡が存在する可能性が示唆されており、これらの神経連絡が射乳反射時のOT細胞のバースト発射同期化に関与している可能性が示された^{2,3)}。しかし、同側視床下部の神経連絡の有無については未だ検討されていない。そこで本研究ではSONから同側PVN神経分泌細胞へのシナプス入力の有無およびPVNから同側SON神経分泌細胞へのシナプス入力の有無を解析し、バースト発射同期化との関連性を検討した。

材料と方法

1. 動物および手術

本研究における動物実験は「福井県立大学動物実験取扱規程」に従って実施した。体重が205~270gの未経産の雌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℃に調節した環境で飼育した。また、性周期を把握するために綿棒法で膈垢を採取し、顕微鏡下で観察記録した。実験当日、ウレタン麻醉下(1.1g/kg 体重 腹腔内投与)で、右心房内にカニューレを留置⁴⁾し、脳定位固定装置に固定後、手術部位には局所麻酔剤(塩酸リドカイン注射液[藤沢薬品工業株式会社、キシロカイン])を投与した。頭蓋骨に刺激および記録電極刺入用の穴をあけた。下垂体後葉およびSONまたはPVNに双極刺激電極を留置し、歯科用セメントで頭蓋に固定した。各刺激電極の刺入部位は Paxions & Watsonの脳地図⁵⁾を基に決定した。PVNまたはSONに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。下垂体後葉の電気刺激に対して逆行性興奮応答を示す下垂体後葉ホルモン分泌細胞を探した。これらの細胞のうち、連続的発火パターンを示したものをOT細胞とし、phasicな発火パターンを示したものをVAP細胞に分類した⁶⁾。記録した細胞の同側SONまたはPVNへの電気刺激に対する応答を刺激前後時間ヒストグラム(peristimulus time histogram:PSTH)で解析した。電気刺激の条件は電流値:1mA、刺激頻度:0.5Hz、刺激回数:100

回である。刺激後の任意の25msの間で活動電位数の平均値が刺激前の平均値より100%以上変化した場合を応答ありとした。また、OT細胞およびVAP細胞において同側SONまたはPVNに1mAで10Hz、5Hzおよび2Hzの刺激頻度の電気刺激を100秒間与え、発火頻度の変化を解析した。記録に用いたガラス微小電極の先端径は約1 μ m、電極抵抗は20~35M Ω 、電極液はポントアミンスカイブルーを0.5M酢酸ナトリウム溶液に0.5%の濃度で溶解して用いた。

実験終了後SONまたはPVNの刺激電極から1mAの直流電流を5秒間通電し、刺激部位を破壊した。PVNまたはSONの記録電極から陰性直流電流（5~10 μ A）を5~10分間通電し、ポントアミンスカイブルーを沈着させた。ウレタンの静脈内投与による心停止後に開胸して、左心室から1%フェリシアン化カリウム溶液および1%フェロシアン化カリウム溶液の1:1混合溶液200mlを還流し、直流通電部位に沈着した鉄を着色した。その後10%ホルムアルデヒド溶液300mlで還流固定した。脳を採取し、10%ホルムアルデヒド溶液に数日浸漬後、30%シュクロース溶液に数日間浸漬した。厚さ50 μ mの凍結連続切片を作成し、ニュートラルレッドで染色した。封入乾燥後鏡検し、刺激部位と記録部位を確認した。OT細胞およびVAP細胞のPSTHによる解析結果は χ^2 検定、電気刺激前と刺激中の発火頻度の比較は対応のあるt検定によって有意水準5%で各々検定した。

結 果

1. PVN 神経分泌細胞への同側 SON からのシナプス入力の有無の検討

合計12匹の未経産雌ラット（発情前期:1匹、発情期:3匹、発情後期:3匹、発情休止期:5匹）から下垂体後葉の電気刺激に対して、逆行性興奮応答を示す75個の下垂体後葉ホルモン分泌細胞がPVNから記録された。そのうち連続的発火パターンを示した50個をOT細胞、phasicな発火パターンを示した25個をVAP細胞に分類した⁶⁾。性周期のステージによる実験結果への影響は認められなかった。

1) PSTH による解析結果

SONへの電気刺激に対して逆行性興奮応答を示すニューロンはなく、順行性応答のみが観察された。SONを1mAで刺激した結果、OT細胞では50例中34例が順行性興奮応答（OD+）、8例が順行性抑制応答（OD-）、8例が無反応（UN）であった（図1左列）。VAP細胞では25例中3例がOD+、10例がOD-、1例が順行性抑制性応答に続く興奮性応答（OD-+）、11例がUNであった（図1右列）。OD+を示したOT細胞の割合はVAP細胞よりも高い傾向が認められたが、統計的に有意ではなかった（表1）。

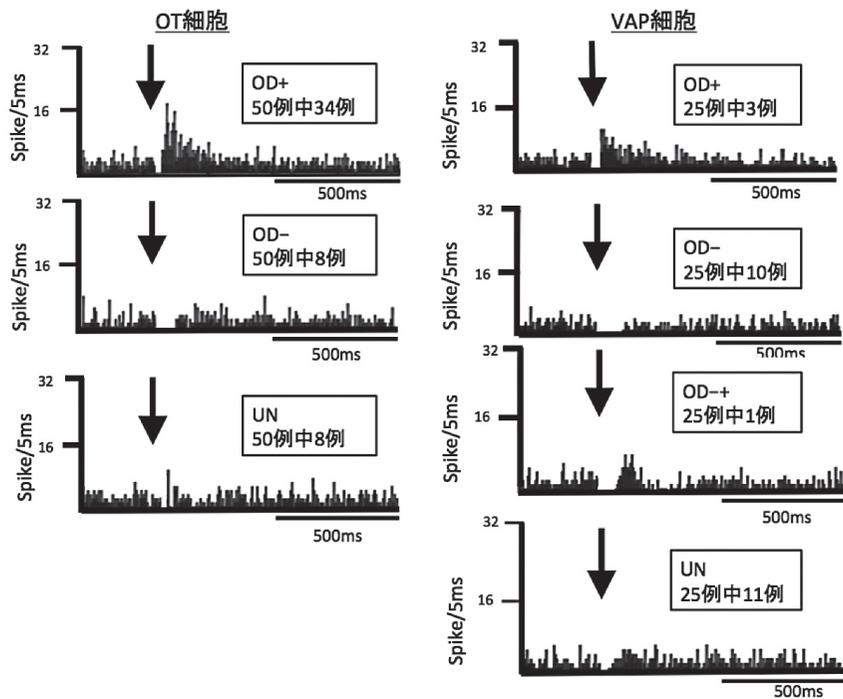


図 1 SON への電気刺激に対する同側 PVN の OT および VAP 細胞の応答を PSTH で解析した結果の例。各矢印は SON を 1mA, 0.5Hz で電気刺激した位置を示す。OD+：順行性興奮応答、OD-：順行性抑制性応答、OD-+：順行性抑制性応答に続く興奮性応答、UN：無反応。

表 1 SON への電気刺激に対する同側 PVN の OT 細胞および VAP 細胞の応答

細胞のタイプ	反応のタイプ			
	OD+	OD-	OD-+	UN
OT (N=50)	34 (68%)	8 (16%)	0 (0%)	8 (16%)
VAP (N=25)	3 (8%)	10 (44%)	1 (4%)	11 (44%)

Nは各細胞の合計数を表す。各カラムの数値は各タイプの応答を示した細胞数を示す。括弧内の数値は各細胞の合計数に対する割合を示す。

2) 発火頻度による解析結果

刺激頻度10Hz、5Hzおよび2Hz、電流値1mAでSONを100秒間電気刺激し、同側PVNのOT細胞およびVAP細胞の発火頻度の変化を解析した。OT細胞では10Hzおよび5Hzの電気刺激中に発火頻度が増加する傾向を示し、刺激後は刺激前の発火頻度に戻った(図2、3左)。VAP細胞では10Hzおよび5Hzでの電気刺激中に発火頻度が減少する傾向が認められたが、有意な減少ではなかった(図2、3右)。

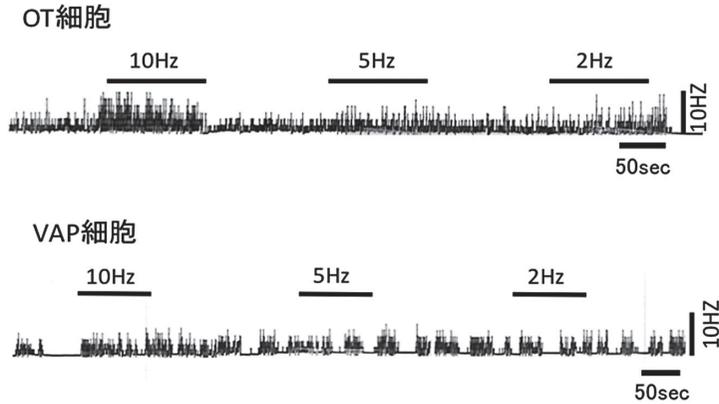


図2 SONを3種類の刺激頻度(10Hz,5Hz,2Hz)で電気刺激した時の同側PVNのOT細胞およびVAP細胞のレートメーター記録

OT細胞では電気刺激により発火頻度の増加が認められ、刺激頻度が高いほど発火頻度は増加した。VAP細胞では反応に一貫性が認められなかった。

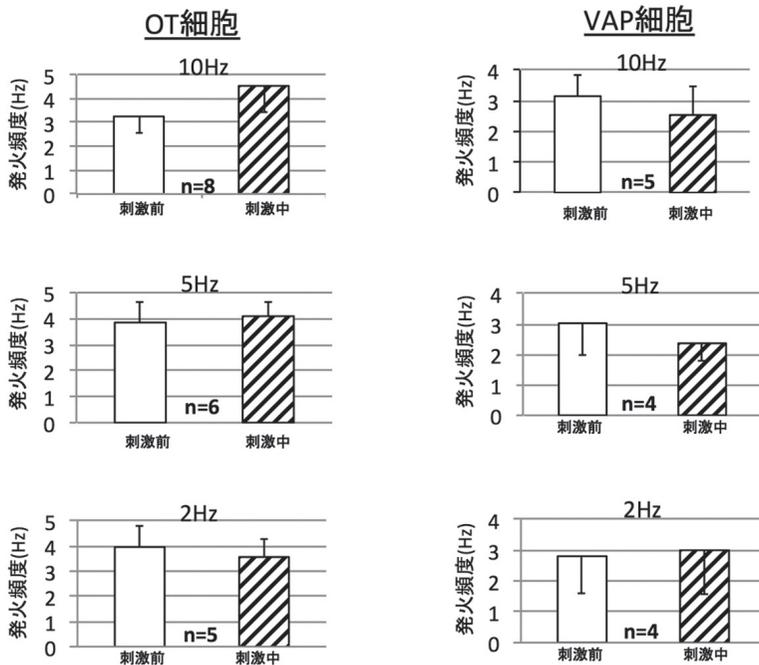


図3 SONへの電気刺激に対する同側PVNのOT細胞およびVAP細胞の応答

nは例数、各グラフ上の数(Hz)は刺激頻度を示す。OT細胞では統計的には有意ではなかったが、5Hzおよび10Hzでの刺激中の発火頻度が増加する傾向が認められた。

3) 刺激電極および記録電極の刺入部位

実験後脳組織切片を作成し、Paxions & Watsonの脳地図⁵⁾に刺激部位および記録部位をマークした。12個体の実験において刺激電極および記録電極は各々SONおよびPVNに位置していた(図4)。

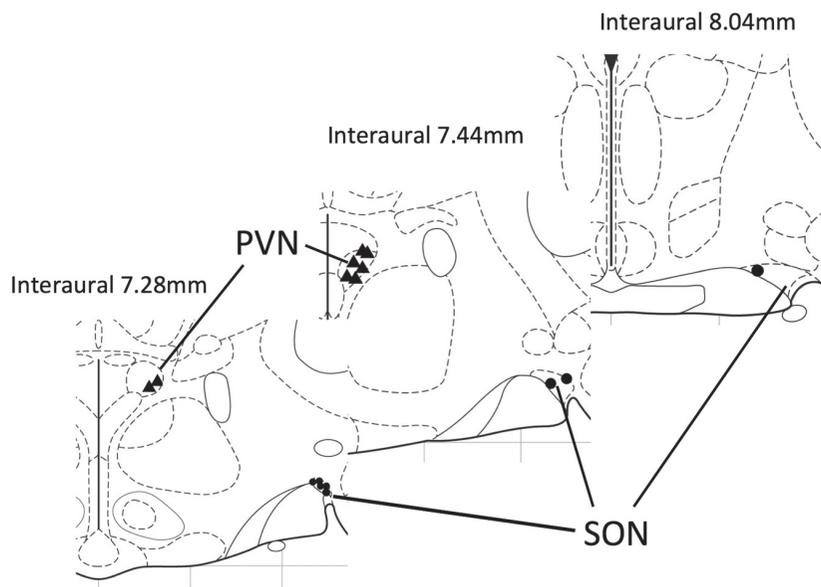


図4 刺激部位 (● : SON) および記録部位 (▲ : PVN)

2. SON 神経分泌細胞への同側 PVN からのシナプス入力の有無の検討

25匹の未経産雌ラット(発情期:10匹、発情前期、発情後期および発情休止期:各々5匹)から下垂体後葉の電気刺激に対して逆行性興奮応答を示す124個の下垂体後葉ホルモン分泌細胞が記録された。これらの細胞のうち、連続的発火パターンを示した57個をOT細胞、phasicな発火パターンを示した67個をVAP細胞に分類した⁶⁾。性周期のステージによる実験結果への影響は認められなかった。

1) PSTH による解析

PVNへの電気刺激に対して逆行性興奮応答を示すニューロンはなく、順行性応答のみが記録された。PVNを1mAで刺激した結果、OT細胞では57例中46例がOD+、3例がOD-、2例がOD-+、6例がUNであった(図5左列、表2上段)。VAP細胞では67例中16例がOD+、19例がOD-、11例がOD-+、21例がUNであった(図5右列、表2下段)。OD+を示したOT細胞の割合はVAP細胞よりも有意に高かった(χ^2 検定 $P < 0.01$)。

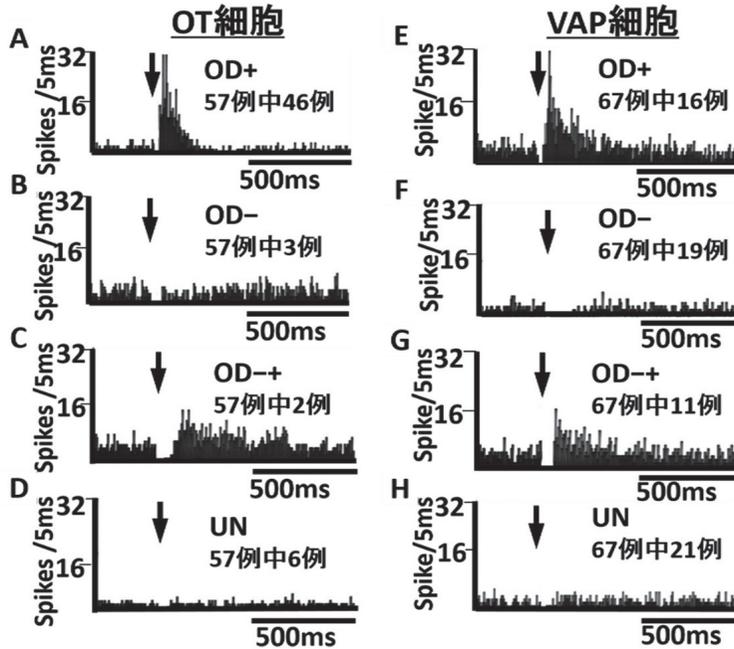


図5 図5 PVN への電気刺激に対する同側 SON の OT 細胞および VAP 細胞の応答を PSTH で解析した結果の例
 各矢印は SON を 1mA で電気刺激した位置を示す。OD+：順行性興奮応答、OD-：順行性抑制性応答、OD-+：順行性抑制性応答に続く興奮性応答、UN：無反応。

表2 PVN への電気刺激に対する同側 SON の OT 細胞と VAP 細胞の応答

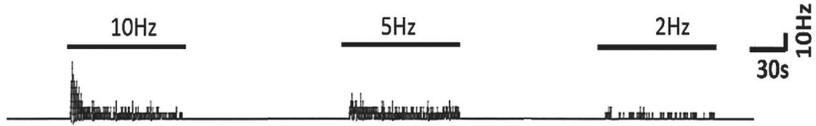
細胞の種類	反応のタイプ			
	OD+	OD-	OD-+	UN
OT細胞 N=57	46(80.7%)	3(5.26%)	2(3.51%)	6(10.5%)
VAP細胞 N=67	16(23.9%)	19(28.4%)	11(16.4%)	21(31.3%)

各カラムの数字は細胞数を示す。括弧内はパーセンテージを示す。
 OD+を示した OT 細胞の割合は VAP 細胞よりも有意に高かった (χ^2 検定 $P < 0.01$)。

2) 発火頻度による解析

刺激頻度10Hz、5Hzおよび2Hz、電流値1mAでPVNを100秒間電気刺激し、同側SONのOT細胞およびVAP細胞の発火頻度の変化を解析した。OT細胞では電気刺激中に発火頻度が増加した。また、刺激頻度が高いほど、発火頻度の変化が大きくなる傾向が見られた。VAP細胞では電気刺激に対して、一貫した方向の反応が認められなかった(図6、7)。

OT細胞



VAP細胞

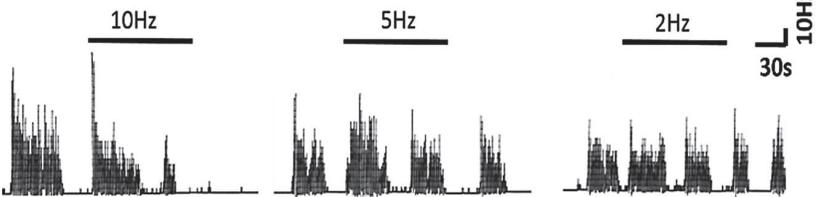


図 6 PVN へ 3 種類の刺激頻度 (10Hz、5Hz、2Hz) で電気刺激を与えた時の同側 SON の OT 細胞および VAP 細胞のレートメーター記録

OT 細胞では電気刺激中に発火頻度が増えた。また、刺激頻度が高い程、発火頻度の変化が大きくなる傾向が見られた。VAP 細胞では電気刺激に対して、一貫した方向の反応が認められなかった。

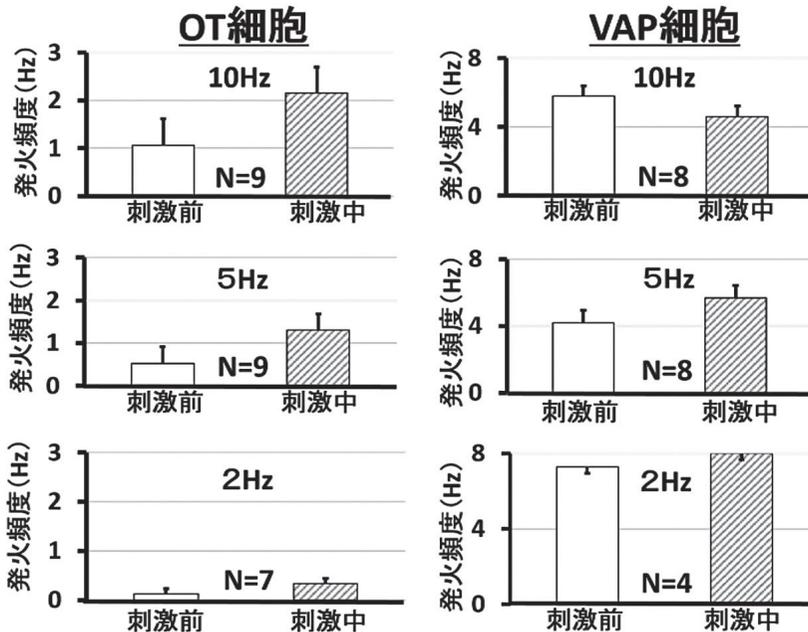


図 7 PVN への電気刺激前および刺激中の同側 SON の OT 細胞と VAP 細胞の平均発火頻度 (Mean ± s.e.) N は例数を示す。各グラフの上の数値 (Hz) は PVN への電気刺激の頻度を示す。OT 細胞では各刺激頻度で発火頻度が増加する傾向が見られたが統計的に有意ではなかった。VAP 細胞では電気刺激に対して、一貫した方向の発火頻度の変化が認められなかった。

3) 刺激電極および記録電極の刺入部位

実験後脳組織切片を作成し、Paxions & Watsonの脳地図⁵⁾ に刺激部位および記録部位をマークした。全ての実験において刺激電極および記録電極は各々PVNおよびSONに位置していた(図8)。

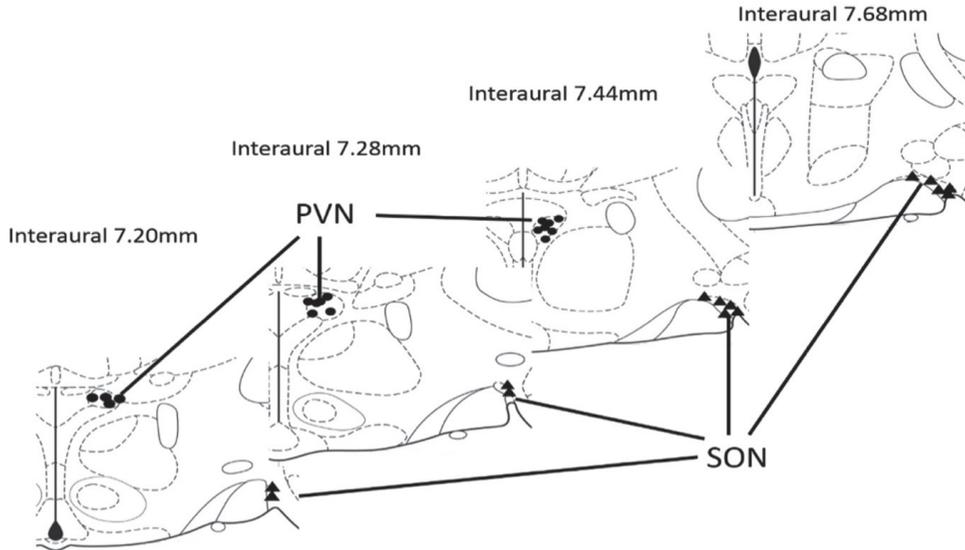


図8 刺激部位 (●: PVN) および記録部位 (▲: SON)

考 察

本研究では、授乳期ラットの代わりに未経産雌ラットを用いた。未経産雌ラットにおいてもOT細胞が対側視床下部の神経核から興奮性シナプス入力を受けていることが明らかにされており、授乳期に特異的に起こる射乳反射時のOT細胞の同期したバースト発射発現の基盤となる神経連絡が授乳期にむけて特異的に形成されるのではないという先行研究⁴⁾の結果が本研究においても確認された。

左右視床下部に分布するOT細胞間で興奮性神経連絡があることが先行研究で示唆されていた^{2,3)}が、同側のSONとPVN間の神経連絡については検討されておらず不明であった。本研究において、SONへの電気刺激に対して同側PVNのOT細胞およびVAP細胞で順行性の応答が認められた。また、PVNへの電気刺激に対して同側SONのOT細胞およびVAP細胞で順行性の応答が認められた。このことにより同側のSONとPVN間に双方向性のシナプス連絡が存在することが示唆された(図9)。

全ての結果が統計的に有意とは限らなかったが、PSTHによる解析結果をOT細胞とVAP細胞で比較すると、OT細胞はVAP細胞に比べOD+を示す割合が高い傾向が認められた。この結果は、VAP細胞に比べてより多くのPVNまたはSONのOT細胞が同側のSONまたはPVNから興奮性入力を受けていることを示唆している。これらの興奮性神経連絡が同側の離れた神経核に分布するOT細胞の一方が興奮したときに他方のOT細胞も興奮する機会が高まることに貢献していると考えられる。

したがって、射乳反射時のバースト発射の同期化にもこれらの興奮性神経連絡が貢献している可能性が十分に考えられる。また発火頻度の解析においても同様に、SONまたはPVNのOT細胞では同側PVNまたはSONへの電気刺激で発火頻度が増加する傾向が認められたのに対し、VAP細胞では刺激強度により反応が異なり明らかな傾向は認められなかった。この結果は、OT細胞がVAP細胞に比べ、同側の離れた神経核からより強い興奮性入力を受けていることを示唆しており、PSTHの結果と同様に、射乳反射時のバースト発射の同期化にこれらの興奮性神経連絡が貢献していると考えられる。

本研究結果により同側視床下部のSONとPVN間に興奮性シナプスが存在していることが示された(図9)。また、OT細胞はVAP細胞と比較して、電気刺激に対してより強い興奮性応答を示したことから、先行研究^{2,3)}の結果とあわせて視床下部の4つの全ての神経核(両側のPVNとSON)のOT細胞間に興奮性神経連絡が存在することが明らかであり、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可能性が強く示唆される。しかしながら、本研究結果は離れた神経核に分布するOT細胞間の興奮性神経連絡が射乳反射時のバースト発射発現に関与していることを直接証明しているわけではない。下垂体後葉を電気刺激することで逆行性に4つの神経核に分布するOT細胞を興奮させれば本研究や先行研究^{2,3)}で発見されたOT細胞間の興奮性神経連絡を活性化できると考えられるので、授乳ラットにおいて下垂体後葉への電気刺激が射乳反射時のバースト発射発現に与える影響を観察することが大変興味深いと考える。

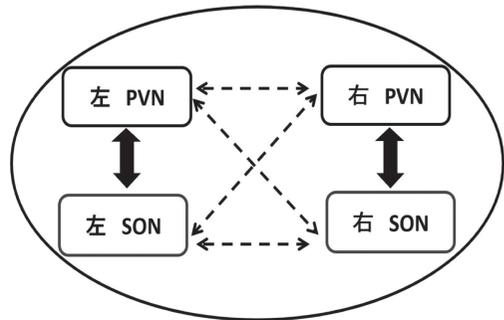


図9 本研究で明らかとなった神経連絡
同側 PVN と SON 間に双方向性のシナプス連絡
があることが明らかとなった (太矢印)。

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) Paxinos G, Watson C : *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th edition. 2005 Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- 6) Richardson CM, Wakerley JB: Supraoptic Oxytocin and Vasopressin Neurones Show Differential Sensitivity to the Neurosteroid Pregnenolone Sulphate. *J. Neuroendocrinol.* 1998. 10. 829-837.