

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	間宮 敬子
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Effects of pedunculo pontine nucleus (PPN) stimulation on medioventral medulla (MED) neurons <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> 標本における脚橋被蓋核～延髄網様体投射の評価)</p> <p>共著者名 ; R.D.Skinner and E. Garcia-Rill</p> <p>未公表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>脚橋被蓋核 (Pedunculo pontine tegmental nucleus ; PPN) はコリン作動性ニューロンと非コリン作動性ニューロンから構成される. この核からの上行性投射は網様体賦活系の一部として意識レベルの維持や睡眠・覚醒の制御に, また, 下行性投射は驚愕反応や歩行運動の発現に関与すると考えられている.¹⁾</p> <p>神経解剖学的な研究により, PPN からの下行性投射は, 橋網様体や延髄網様体を經由して脊髄に至ることが明らかにされている. 我々は, ネコやラットを用いた神経生理学的研究により, PPN からのコリン作動性の下行性投射が, 尾側橋網様核 (Caudal pontine reticular formation) 細胞の持続的発射活動を介して歩行運動を誘発する可能性を示した.²⁾ しかしながら, PPN からの延髄網様体への下行性投射がどのような機能的役割を持つのかについては未だ解明されていない.</p> <p>そこで本研究では, ラットの <i>in vitro</i> slice 標本において電気生理学的手法を用い, PPN からの延髄網様体ニューロンへのコリン作動性投射の存在の有無, および延髄網様体ニューロンに対するムスカリン受容体の役割について検索した.</p> <p>対象と方法</p> <p>実験には, 生後 12-21 日の Sprague-Dawley ラット (N=77, BW=10-50 g) を用いた. ケタミン麻酔 (70mg/kg) 下にて断頭後, 人工髄液内中においてビブラトームを用いて, 500 μm の脳スライス標本を作製した. 脳スライスには PPN と延髄網様体が含まれる様に切断法を工夫した. 脳スライスを記録 Chamber に移し, 酸素化 (95 %O₂, 5 %CO₂) した人工髄液を 1 分間 2 ml の速度で灌流した.</p> <p>3M の K-acetate と神経標識物質である 1 %の biocytin を満たした微小ガラス電極を用いて, 内側の延髄網様体細胞から細胞内活動を導出・記録した. また, PPN に金属刺激電極を置き, 刺激強度 100~500 μA, 持続 0.2~0.5 ms, 周波数 10~90 Hz の刺激を一秒間加え, 延髄網様体細胞の活動動態の変化を解析した. 記録終了後, 記録電極から biocytin を細胞内に注入した.</p> <p>また, PPN の電気刺激で延髄網様体ニューロンに誘発される興奮性変化がコリン作動性投射により誘発されるものであるか否かを検証するため, ムスカリン性コリン作動性物質であるカルバコール</p>			

(5 μ M) や、その拮抗薬であるスコポラミン (30 μ M) を灌流液中に投与した。さらに、PPN 刺激の効果がシナプス伝達により誘発されたものか否かを検索するためナトリウムチャンネルブロッカーであるテトロドトキシン (0.3 μ M) を灌流液中に投与した。

実験終了後、脳スライスを固定し、NADPH-diaphorase 染色を施して PPN のコリン作動性細胞を標識した。また、Nickel-DAB 染色を施し、biocytin を注入した延髄網様体ニューロンを染色・標識した。

成 績

81 個の延髄網様体ニューロンから安定した細胞内活動を記録した。PPN の電気刺激により、40 個 (49%) に持続的な興奮性発射活動 (Prolonged response; PR) が誘発されたが、41 個 (51%) には、これが誘発されなかった (Non-prolonged response; NPR)。

1. PR ニューロンと NPR ニューロンにおける電気生理学的膜特性の比較

PR ニューロンは NPR ニューロンに比べて活動電位の持続時間が短く (各々 1.2 ± 0.5 ms vs. 1.5 ± 0.6 ms, $P < 0.05$)、後過分極電位の振幅 (各々 15 ± 3 mV vs. 12 ± 4 mV, $P < 0.01$) や持続時間 (各々 153 ± 50 ms vs. 126 ± 47 ms, $P < 0.05$) は有意に大きかった。しかし、両者間において静止膜電位、活動電位、発射活動の閾値電位、膜抵抗には有意差がなかった。

2. PPN への電気刺激の頻度と PR ニューロンの活動パターン

PPN に 10~90Hz の電気刺激を加えた。PR ニューロンには持続的な脱分極電位が誘発されたが、持続時間、脱分極の振幅ともに、60Hz の刺激を加えた場合に最も大きな値を示した。

3. PR ニューロンと NPR ニューロンの形態的特徴

Biocytin で標識できた PR ニューロン ($n=17$) と NPR ニューロン ($n=19$) の細胞体の表面積を計測した。前者は $568.4 \pm 44 \mu\text{m}^2$ 、後者は $386.5 \pm 32 \mu\text{m}^2$ であり、有意に PR ニューロンのサイズは大きいことが分かった。しかし、日齢によるニューロンサイズの相違は認められなかった。

4. 薬理学的検討

カルバコールを灌流すると全ての PR ニューロンに持続的脱分極が誘発された。しかし、スコポラミンの灌流により、カルバコールによる脱分極も、PPN 刺激による脱分極も誘発されなかった。テトロドトキシンを灌流すると PPN 刺激による PR ニューロンに脱分極は誘発されなかった。一方、テトロドトキシン灌流後にカルバコールを灌流すると、77 % (10/13) の PR ニューロンで脱分極が誘発された。21 個の NPR ニューロンではカルバコールの灌流により 5 % (1/21) で脱分極が、38 % (8/21) で過分極が誘発された。また、PR ニューロンで PPN 刺激前後の膜抵抗、カルバコール投与前後の膜抵抗はそれぞれ有意に低下した。

5. 延髄網様体ニューロンと日齢による電気生理学的な膜特性

生後 12~15 日のラットと 16~21 日のラットで、延髄網様体ニューロンの電気生理学的な膜特性に相違があるか否かを検討した。上記 2 種類のニューロン群の各々において、日齢による相違を認めなかった。

考 察

我々の結果では PPN を刺激した際に約半分の延髄網様体ニューロンで持続的脱分極を誘発した。これはこれまでに発表された *in vivo* の研究結果と同様であり、我々が用いた *in vitro* の実験系においても、*in vivo* における神経系の機能解析が可能であることが明らかとなった。

PPN の刺激頻度と延髄網様体ニューロンの発射活動との間には刺激周波数に対する依存性が観察された。最適な PPN 刺激の頻度は 60Hz であり、延髄網様体ニューロンの発射頻度は 5.1Hz であった。これら PPN への刺激頻度や延髄網様体ニューロンの発射頻度は、これまでの研究での、*in vivo* 標本において歩行運動を誘発するパラメータとほぼ同様の値であった。³⁾

PPN を刺激した際の延髄網様体ニューロンの持続脱分極は膜電位 -45~-65mV で誘発されることから、電位依存性の反応と考えられた。また、持続脱分極はムスカリン性拮抗薬であるスコポラミンで抑制され、ムスカリン性作動薬であるカルバコールで PR 細胞が脱分極されたことから、ムスカリン性受容体が持続脱分極を誘発するのに関与していると考えられた。

これらの結果より、また、これまでの研究の結果をふまえると、コリン作動性の PPN 細胞から我々が記録した延髄網様体の腹内側領域への投射は歩行運動や歩行運動に随伴する筋緊張の制御に関係すると考えられた。

一方、本方法を用いることで、神経系の生後発達と神経細胞の機能との機能連関を評価することができる。ラットにおける生後発達の臨界期（開眼、開耳など生後発達が大きく変わる時期）は日齢 15 日前後である。我々は生後 15 日前後で延髄網様体ニューロンに変化がある可能性を考慮したが、電気生理学的にも組織学的にも有意な差はみられなかった。この結果より、生後 12 日で延髄網様体ニューロンは電気生理学的に成熟したレベルになっている可能性が示唆された。

結 論

1. PPN から延髄網様体ニューロンへの下行性の投射経路では PPN 領域の刺激により、約半分のニューロンが興奮し持続脱分極した。持続脱分極した細胞はしなかった細胞にくらべ、組織学的に細胞体は有意に大きかった。
2. 持続脱分極を誘発する PPN の最適の刺激頻度は 60Hz であり、延髄網様体細胞の興奮は電位依存性で、ムスカリン性受容体が関わっていると考えられた。

学 位 論 文 の 要 旨

引 用 文 献

1. Reese NB, Garcia-Rill E, Skinner RD. The pedunculo-pontine nucleus-auditory input, arousal and pathophysiology. *Prog Neurobiol* 47:105-133, 1995.
2. Homma Y, Skinner RD, Garcia-Rill E. Effects of pedunculo-pontine nucleus (PPN) stimulation on caudal pontine reticular formation (PnC) neuron in vitro. *J. Neurophysiol* 87:3033-3047, 2002
3. Kinjo N, Atsuta Y, Webber M, Kyle R, Skinner RD, Garcia-Rill E. Medioventral Medulla-Induced Locomotion. *Brain Research Bulletin* 24:509-516

参 考 論 文

1. Hao Shuanglin, Takahata Osamu, Mamiya Keiko, Iwasaki Hiroshi
Nifedipine potentiates the antinociceptive effect of endomorphine microinjected into the periaqueductal gray in rats. *Anesthesia and Analgesia* 2003 April 96(4) 1065-71
2. Hao Shuanglin, Mamiya Keiko, Takahata Osamu, Iwasaki Hiroshi, Mata Marina, Fink J. David. Sevoflurane suppresses noxious stimulus-evoked expression c-Fos-like immunoreactivity in the rat spinal cord via activation endogenous opioid systems. *Life Science* 2002 June 21;71(5) 571-580
3. Kenki Murayama, Keiko Mamiya, Koji Nozaki, Kouichi Sakurai, Osamu Takahata, Hiroshi Iwasaki. Cesarean section in a patient with syringomyelia. *Canadian Journal of Anesthesia* 2001 May;48(5) 474-477

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	間 宮 敬 子
<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> <u>審査委員長 吉 田 成 孝 ㊞</u> </div> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> <u>審査委員 高草木 薫 ㊞</u> </div> <div style="text-align: right;"> <u>審査委員 岩 崎 寛 ㊞</u> </div>			
学 位 論 文 題 目			
<p>Effects of pedunculo pontine nucleus (PPN) stimulation on medioventral medulla (MED) neurons in vitro</p> <p>(in vitro 標本における脚橋被蓋核～延髄網様体投射の評価)</p>			
<p>本論文はラットにおける脚橋被蓋核(PPN)からの投射軸索の延髄網様体ニューロンに対する作用を電気生理学的に検討したものである。</p> <p>本論文で用いられている手法は以下の通りである。脳のスライス標本の作製と人工髄液中での細胞内ガラス電極を用いた細胞内活動電位の記録と biocytin 注入、金属刺激電極による刺激、コリン作動性および拮抗性薬剤とチャンネルブロッカーの投与、電気生理実験に使用したスライスの免疫組織化学的染色と形態学的な検討。いずれも確立された手法であり、適切に実験は行われている。</p>			

従来、PPN から上行性に投射する線維の投射先のニューロンに対する作用は知られていたが延髄網様体ニューロンに対するものは本研究で始めて明らかとなった。主な新たな知見は以下の通りである。延髄網様体ニューロン中の半数のニューロンが持続的な興奮発射活動を示すこと。特に、60 Hz での刺激により最も大きな脱分極を起こすこと、持続的な興奮発射活動を示すニューロンの細胞体はこれを示さないものよりも有意に大きな投射型の細胞であること、持続的な興奮発射活動はアセチルコリン作動性受容体を介してのものである事。

本論文により明らかとなった PPN からの下行性投射は歩行運動や歩行時の筋緊張の制御に関連していると考えられる。今回の知見はパーキンソン病などの歩行の異常を伴う疾患の理解に新たな視点を与えるもので重要な医学的な意義を認める。

本論文は十分な考察もなされて、適切に構成されている。

さらに、論文提出者に対して本論文および関連領域に関する試問に対し適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。

以上より、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判断した。