実験技術

迷走神経活動の測定法

北村 明彦, 畝山 寿之

要約：自律神経を構成する交感神経と副交感神経は、一般的に脳から末梢臓器へ情報伝達を行う遠心路としての機能がよく知られているが、これらの自律神経束には求心性神経線維も含まれている。特に、迷走神経束はその70%以上が求心性であり、内臓感覚神経として機能していることが知られている。求心路の働きにより各臓器の状態がモニターされ、自律神経反射によって生体恒常性が維持されている。我々はこれまで、消化管での栄養素受容を求心性迷走神経の活動を指標として評価を行うとともに、その自律神経反射について検討を行ってきた。迷走神経活動測定にはいくつかの方法があり、研究の対象によって評価法を選ぶ必要がある。本稿では、腹部迷走神経が担う栄養素情報の解析に有効な求心性迷走神経線維からの神経活動記録法と、その薬理特性を検討するのに有効な迷走神経下神経節単離ニューロンからの神経活動記録法について紹介する。

1. はじめに

自律神経系は交感神経系と副交感神経系から構成される神経系で、それぞれ身体の内臓を二重支配することによって相反的に各臓器機能を調節している。自律神経の作用には自律神経反射に代表される循環調節、消化機能調節、そして代謝調節作用が知られており、これらの作用は自律神経遠心路により心臓、血管、消化管、肝臓、脾臓、脂肪組織等の活動を制御することによって営まれている。自律神経の異常は狭心症、胃・十二指腸潰瘍、肥満、糖尿病、メタボリックシンドローム等に深く関与している。自律神経の全身機能調節は各臓器の状態に依存しており、その情報を伝達する経路として自律神経求心路が重要な働きを担っている。求心路神経線維は副交感神経（迷走神経）束の約75~90%、交感神経束の約50%を占めており、末梢

性の自律神経反射に関わる情報だけでなく、中枢性の情報（満足感や嗜好形成などの摂食行動調節）にも関与することが最近の研究で明らかにされている。

本稿では、生体内の恒常性維持に大きな役割を担っている自律神経、特に求心性迷走神経が担う神経情報の解析に焦点を当てる。迷走神経活動記録法には大きく *in vivo* 系と *in vitro* 系の測定法があり、それぞれ長所短所がある。これまで筆者らは *in vivo* 系迷走神経記録法を用いて迷走神経の研究を行ってきたので、その手法の詳細について説明するとともに、迷走神経の特性を検討するのに有用な、迷走神経の細胞体である迷走神経下神経節（nodose ganglion : NG）単離ニューロンを用いる *in vitro* 系測定法についても紹介する。

2. *In vivo* 系迷走神経記録法

In vivo 系求心性迷走神経記録法には、迷走神経線維から細胞外記録法によって活動を得る方法と、迷走神経の細胞体である NG から記録を得る方法がある。迷走神経線維から活動を得る方法は、標的臓器を支配している迷走神経の活動を容易に得ることができ、求心性活動だけでなく遠心性活動についても、方法によっては求心性と遠心性の両方同時に得ることも可能である。本稿では、筆者が携わっているマルチユニットとシングルユニット神経応答記録法について紹介する。

1) マルチユニット神経線維応答記録法

迷走神経線維記録法としては容易な細胞外記録法であり、各臓器を支配する求心性迷走神経のみならず、遠心性神経線維や交感神経を含めた自律神経応答評価として広く利用されている(1)。我々はこれまでラットを用いて、主に胃・腸での栄養素受容について求心性迷走神経の活動を指標に評価するとともに(2-4)、神経の特性についても検討してきたので(5-7) その手法について紹介する。

キーワード：迷走神経、迷走神経下神経節、マルチユニット、シングルユニット、 Ca^{2+} イメージング
味の素株式会社 イノベーション研究所（〒210-8681 川崎市川崎区鈴木町 1-1）

E-mail: akihiko_kitamura@ajinomoto.com 原稿受領日：2015年3月11日、依頼原稿

Title: Measurement method of vagal afferent and efferent activity Author: Akihiko Kitamura, Hisayuki Uneyama

図1 腹腔内求心性迷走神経記録の概要

遠心性迷走神経や交感神経を記録する場合も同様の記録セットで対応できる。注意点として、長時間記録を行う場合、気管内の粘液分泌によって窒息してしまう可能性があるため気管切開は必須である。また、腹腔を露出させたままにすると臓器が乾燥してダメージを受けてしまうので、ガーゼにミネラルオイル等を含ませて臓器を覆うことで、ダメージを抑えることができる。

(1) 必要器具

増幅器、A/Dコンバーター（解析ソフト付）、PC、オシロスコープ、電極（プラチナ等）、体温コントローラー、シリンジポンプ。その他、ピンセットやハサミなどの手術器具。あれば望ましいもの：血圧計、腸管内圧カテーテル測定システム、ペンレコーダー、スピーカー（神経活動を判断するのに便利）。

(2) 方法

記録概要を図1に示す。実験前日より絶食した雄性ラット（体重250～330g）を使用し、ウレタン麻酔下（1.0～1.2g/kg、腹腔内投与）で気管切開し、頸動脈に血圧モニター用のカニューレーションを行い、左大腿静脈に薬物投与用のカニューレーションを行う。その後開腹し、実体顕微鏡下で迷走神経を露出させ（胃枝、腹腔枝等、図2、3A）、切断端末梢側をプラチナ電極に

図2 内臓を支配する迷走神経の解剖図

腹側から見た迷走神経を模式的に表している。腹側迷走神経幹には肝臓枝、腹側胃枝、副腹腔枝が含まれる。一方、背側迷走神経幹には背側胃枝、腹腔枝、肝臓枝が含まれる。

図3 神経分離と記録のセッティング

(A) 求心性迷走神経胃枝を測定する場合、迷走神経胃枝を切断して末梢端を記録電極セットする。その際、神経は被膜に覆われているため、被膜をピンセット針等で剥離し、神経を1つの電極に、被膜等の結合組織をアースとしてもう一方の電極にセットする。その後、神経の乾燥防止や絶縁のためワセリン・ミネラルオイル混合液で覆う。(B) 求心性・遠心性同時記録。神経枝を全て切断せず、末梢・中枢側のそれぞれから少数の神経線維を電極にセットして記録を行う。

セットする(遠心性の応答を評価したい場合は切断端中枢側を電極セットする。求心性・遠心性同時記録を行いたい場合は図3Bのようにそれぞれの神経末端を電極にセットする)。シグナルを10000倍に増幅して、Bandpass Filterは150~1000 Hzとして求心性神経活動を記録する。神経活動はA/DコンバーターPowerLab (ADInstruments)を介して、ソフトウェアLabChartでデータを取り込んだ(他のA/Dコンバーターでも問題はない)。サンプリングレートは10 kHzとした。神経束電位は1秒間毎の積分スパイク数(spikes/s)に変換して解析に用いた。栄養素の胃内、腸管内投与を行う場合、それぞれの臓器に投与用と排出用のカテーテルチューブを挿入し結紮、栄養素を注入する。門脈内投与による応答を検討したい場合は、門脈にカテーテルを刺入して瞬間接着剤で固定する。神経線維の分離法ならびに脂肪組織を支配する交感神経枝(褐色脂肪支配神経, 白色脂肪支配神経)の導出について、新潟大学名誉教授の新島旭先生が詳細に紹介した日本語記事があるので、興味がある方には一読を勧める(8)。

(3) 結果

①胃におけるアミノ酸受容の検討(アミノ酸胃内投与による求心性迷走神経胃枝の応答)

腸管では様々な栄養素(糖, アミノ酸, 脂質等)が受容・吸収され、求心性迷走神経を活性化させること

が知られているが(9), 胃では伸展等の機械受容しか行われず, アミノ酸受容の詳細な検討はなされていなかった。そこで, 20種類のアミノ酸をそれぞれ胃内に投与して検討を行った結果, グルタミン酸が求心性迷走神経胃枝を活性化することが明らかとなり(図4A), そのメカニズムにNO産生とセロトニン(5-HT)分泌, そして迷走神経上の5-HT₃受容体の活性化が関与していることが示された(3)。

②求心性迷走神経胃枝・腹腔枝における5-HT応答特性

胃枝と腹腔枝の5-HT静脈内投与による応答には違いが見られる(図4B)。薬理学的に応答を検討した結果, 胃枝の応答は5-HT₃受容体が関与しており(5), 腹腔枝の応答には5-HT₃受容体と5-HT_{2A}受容体が関与していることが示唆された(7)。また, 筆者はマウスでの求心性迷走腹腔枝の5-HT応答記録にも成功し, ラットと同じような応答パターンを示すことを確認している(未発表)。

(4) 消化管支配迷走神経記録の留意点

In vivo系での消化管支配求心性迷走神経のマルチユニット記録には様々な要因(体温, 血圧, 腸管の伸展・収縮等)が影響を与えるため, 体温コントローラーを用いて体温を維持することはもちろんのこと, 血圧計や可能であれば胃・腸管内に圧センサーを挿入して内圧を同時記録するなど, 多くの情報を得て解析することが求心性迷走神経活動の正しい評価につながる。

図4 求心性迷走神経記録によるスパイクヒストグラム例

(A) 上段: 胃内にグルタミン酸を投与(150 mM, 2 ml)すると求心性迷走神経胃枝の活動が徐々に上昇する。グルタミン酸投与直後の活動上昇は, グルタミン酸による影響ではなく, 胃の伸展受容の影響である。下段: 求心性迷走神経胃枝はグルタミン酸の濃度依存的に活動が上昇する。グラフは投与20分後の神経活動を示している。5-HT(10 µg/kg)は静脈内投与直後の活動を示している。(文献3より転用)(B) 5-HTに対する求心性迷走神経胃枝と腹腔枝の応答の違い。胃枝(上段)は5-HT投与直後に一過的な活動上昇が見られるが, その後すぐにベースラインに戻る。一方腹腔枝(下段)は, 一過的な活動上昇の後に持続的な活動が見られ, ゆっくりとベースラインに戻る。

2) シングルユニット神経線維応答記録法

消化管を支配している求心性迷走神経には、機械受容線維や化学受容線維などいくつかの種類があるが(9)、マルチユニットの活動評価は神経スパイク数で評価するため、応答特性の異なる神経線維の活動を同一評価してしまうことや、スパイク波形が小さいものは評価できない可能性がある(図5)。これらの問題点を解決し、より詳細な情報を得るためにシングルユニット神経活動評価は有用な方法である。ここでは、共同研究者である米国カリフォルニア州立大学ロサンゼルス校 CURE: 消化器病研究センターの D. Adelson 博士と共にを行ったシングルユニット記録法について簡単に紹介する。

基本的な記録概要はマルチユニット記録法と同じであるが、得られたスパイク波形をソーティング(分類)して単一波形(シングルユニット)にする必要がある。ソーティングを行うには、ソーティングに適した機器や解析ソフトウェアを使用するのが便利である。我々は Spike2 (Cambridge Electronic Design 社) を用いたが、MAP system (Plexon 社) など複数の会社から記録システムが販売されている。これらの機器は、中枢

図5 マルチユニット記録のデメリット

大きさの異なるスパイクが同一にカウントしてしまう。また、破線の高さでスパイクカウント閾値を設定すると、矢印で示された小さなスパイクは評価から漏れることになる。

神経のユニットレコーディングに広く使用されており、ユーザーは多い。この記録解析機器とソフトウェアを用いてソーティングを行うと図6Aのように、マルチユニットで記録された波形をシングルユニットに分離することができる。図6A下段に示されたシングルユニットは求心性迷走神経胃枝から得られたもので、図6Bに示すように cholecystokinin (CCK) に応答し、5-HT にはあまり応答しないことが示された。このほか求心性腸間膜迷走神経は、5-HT、CCK ともに応答が見られるが、シングルユニットで解析すると、5-HT のみ、CCK のみにそれぞれ応答する線維が存在することが報告されている(10)。

3. In vitro 系迷走神経記録法(単一 NG ニューロン記録法)

消化管や門脈に栄養素を投与して、その臓器を支配している求心性迷走神経応答の評価を得るには迷走神経線維を記録する必要がある。しかし、その神経細胞の薬理特性を同定するのにこの方法では投与試薬が神経線維に直接作用しているのか、間接的に作用しているのか判断するのは難しい。単離した単一 NG ニューロンを用いた実験系では、投与試薬と細胞との作用を直接検証できるため、薬理特性を同定するに有用な方法である。しかし、NG ニューロンをただ単離しただけでは、どの臓器を支配しているのか不明であるため、最近では予め調べたい臓器を支配している迷走神経線維を逆行性トレーサー (DiI 色素) で染色し、記録時に DiI 陽性単一 NG ニューロンを評価するという手法によってこの問題を解決している。ただし、この単一 NG ニューロン記録法では細胞体しか評価できないため、投与試薬が神経終末に作用しているかどうかを検証できるわけではないということは留意すべきである。

A マルチユニットの波形

B

図6 求心性迷走神経胃枝のシングルユニットとその特性の一例

(A) 上段: マルチユニットであるため、記録直後は複数のスパイク波形が入り混じっている。下段: 最終的にソーティングされたシングルユニット。(B) A の下段で示されたシングルユニットの応答特性。この神経線維は CCK に対して大きく応答するが、5-HT に対してはそれほど大きな応答を示さなかった。

1) 電気生理学的手法

パッチクランプ法を用いて評価する方法であるため, 細胞膜電位変化を直接評価することができ, 電極内液に nystatin, amphotericin B や gramicidin を使用すれば穿孔パッチを行うことができるため, 投与試薬による興奮・抑制作用やそれに関わる内向き整流電位等を詳細に検討できる(11-13).

2) Ca^{2+} イメージング法

単一 NG ニューロンの活動についてカルシウム指示薬 (Fura-2 AM 等) を用いて内在性カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を評価する方法である. パッチクランプ法ほど詳細に検討することはできないが, 一度に多くの細胞を評価できるとともに, パッチクランプ法のような熟練した技術を要さずに行えるという利点がある. 本手法により, 消化管ホルモンである glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (14), CCK (15, 16), nesfatin-1 (17) や peptide YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆) (18) の求心性迷走神経への直接作用が明らかとなっている.

4. むすび

本稿で紹介した迷走神経の測定法は, それぞれ一長一短があるため, 一つの手法だけで迷走神経のすべての機能を明らかにすることは難しい. それぞれの手法を相補的に用いることや, これらの手法のほかに行動学等を組み合わせることで, 迷走神経の生体での役割が明らかにできるものと考え. 今後, さらなる迷走神経の機能と役割が明らかになることが期待される.

謝辞: 迷走神経記録法の基礎と自律神経の解剖学を教えて下さった新潟大学名誉教授である新島旭先生, シングルユニット記録法についてご指導いただいた米国カリフォルニア州立大学ロサンゼルス校 CURE: 消化器病研究センターの David W. Adelson 博士の両先生に深く感謝申し上げます.

著者の利益相反: 北村明彦, 畝山寿之 (味の素株式会社).

文 献

- 1) Kitamura A, et al. Biol Pharm Bull. 2010;33:1778-1782.
- 2) Nijima A, et al. Chem Senses. 2005;30 Suppl 1:i178-i179.
- 3) Uneyama H, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006;291:G1163-G1170.
- 4) Kitamura A, et al. J Physiol Sci. 2011;61:65-71.
- 5) Uneyama H, et al. Life Sci. 2002;72:415-423.
- 6) 北村明彦, 他. 日味と匂会誌. 2009;16:369-372.
- 7) 北村明彦, 他. 日味と匂会誌. 2010;17:273-276.
- 8) 新島旭. アディポサイエンス. 2006;3.2:220-224.
- 9) Berthoud HR. Neurogastroenterol Motil. 2008;20 Suppl 1:64-72.
- 10) Hillsley K, et al. Neurosci Lett. 1998;255:63-66.
- 11) Eto K, et al. J Pharmacol Sci. 2006;102:343-346.
- 12) Chuaychoo B, et al. J Physiol. 2006;575:481-490.
- 13) Gaisano GG, et al. Neurogastroenterol Motil. 2010;22:470-479.
- 14) Kakei M, et al. Auton Neurosci. 2002;102:39-44.
- 15) Simasko SM, et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002;283:R1303-R1313.
- 16) Lankisch TO, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002;282:G1002-G1008.
- 17) Iwasaki Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2009;390:958-962.
- 18) Iwasaki Y, et al. Neuropeptides. 2013;47:19-23.

著者プロフィール

北村 明彦 (きたむら あきひこ)

味の素株式会社 イノベーション研究所 フロンティア研究所 食品感覚受容研究グループ, 研究員, 博士 (医学).

◇ 2004 年大阪大学大学院医学系研究科にて博士 (医学) 号取得. 同年信州大学医学部・助教, 同年より自然科学研究機構生理学研究所にて博士研究員, '07 年より味の素株式会社ライフサイエンス研究所, 研究員を経て, '10 年より現職. この間, '09 年米国カリフォルニア州立大学ロサンゼルス校 CURE: 消化管病研究センターにて客員研究員, '11~'13 年米国モネル化学感覚センターにて客員研究員, '14 年より東京慈恵会医科大学にて訪問研究員. また, '14 年鳥取大学医学部非常勤講師.

畝山 寿之 (うねやま ひさゆき)

味の素株式会社 イノベーション研究所 フロンティア研究所 食品感覚受容研究グループ, 主席研究員, 博士 (医学).

◇ 1989 年東北大学大学院製薬科学系研究科博士課程 (前期) 修了. 同年味の素株式会社入社. 現在に至る.