

機関番号：21601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21500307

研究課題名 (和文) 覚醒状態及び覚醒系ニューロンに対して睡眠中枢が果たす生理的役割の解明

研究課題名 (英文) Physiological roles of the preoptic sleep-center on wakefulness and wake-related neurons

研究代表者

香山雪彦 (KAYAMA YUKIHIKO)

福島県立医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：30035224

研究成果の概要 (和文)：

無麻酔のラットを用い、睡眠の中核とされる視索前野を電気刺激した際の覚醒系ニューロン群の活動及び睡眠・覚醒状態の変化を解析した。視索前野腹外側部の刺激によって脳波に大振幅徐波と筋電図活動の持続的抑制が見られた。視床下部後部のニューロン活動は、視索前野刺激により抑制されたが刺激による脳波の徐派化とは必ずしも相関しておらず、逆に興奮するものも存在した。脳幹の覚醒ニューロンでも興奮、抑制の両方が見られた。これらの結果は、視索前野の睡眠系及び覚醒系ニューロンが刺激され脳波の徐派化を伴った覚醒系の賦活という解離状態が現れたものと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Electrical stimulation in the preoptic area, hypothesized to be a sleep-center, caused sustained suppression in EMG, synchronization in EEG and changes in firing rate of wake-related neurons in the posterior hypothalamus and brainstem.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22 年度	700,000	210,000	910,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：睡眠・覚醒、単一ニューロン活動、視床下部、電気刺激、無麻酔

1. 研究開始当初の背景

20 世紀始めの *Economo* による嗜眠性脳炎患者の解剖学的研究に始まる睡眠・覚醒の神経

科学は、*Moruzzi* と *Magoun* による上行性網様体賦活系という概念の提唱によって大きく前進した。これは、種々の感覚入力を受けると脳幹網様体の興奮が視床を介して大脳全

体を興奮させることで覚醒状態が維持されるとする考えで、当時広く受け入れられたが、その後に発見されたレム(REM)睡眠(または逆説睡眠;paradoxical sleep, PS)の状態でも大脳皮質が活性化していることを説明できない等、問題点も多く指摘され、具体的なニューロン群も不明であった。1970~80年代には青斑核(LC)のノルアドレナリン(NA)ニューロン、背側縫線核(DR)のセロトニン(5HT)ニューロンなどのモノアミンニューロンや、外背側被蓋核(LDT)および脚橋被蓋核(PPT)のアセチルコリン(ACh)ニューロンが解剖学的に同定され、それらが頻回に分岐する軸索で脳の広い範囲に投射する汎性投射系ニューロンであることが明らかになった。我々は、こうした脳幹の汎性投射系が睡眠・覚醒のような脳全体の活動状態を一斉にコントロールするシステムとして働くと考え、これらの単一ニューロン活動を無麻酔動物で記録することを中心に、一連の研究を行ってきた。その結果、NAニューロンは覚醒時に活動して睡眠時に停止し、その投射先である視床中継核のニューロンには興奮性に働くことが分かり、上行性網様体賦活系の正体の一つと考えられた。5HTニューロンも覚醒時に活動するが、上位脳に対しては抑制的に作用していた。AChニューロンは、PS時に特異的に、しかも先行して活動するものと、覚醒時とPS時の両方で活動するものがあった。これら3群の汎性投射ニューロンについては、体性感覚などの感覚刺激に対する反応性や、各群の起始核を電気刺激した時の視床のニューロン活動に対する影響も調べ、各群は強度や持続性の点で異なるかたちで覚醒の発現に関与していることを示した。さらに、記録中の単一ニューロンに種々の薬物を電気泳動的に投与し、各ニューロン群間の相互作用を明らかにした。

また、最近になって我々は、Economioの研究以来、覚醒中枢があるとされている後部視床下部においても、ヒスタミン(HA)ニューロン、オレキシン(Ox)ニューロンの単一ニューロン活動を記録し、それらが覚醒時特異的であること、活動の開始はOxニューロンが脳波変化に先行し、HAニューロンは常に遅れること等を示した。一方、睡眠中枢としては、前部視床下部、中でも上述の脳幹や後部視床下部の覚醒系に対して濃密に投射することから、腹外側視索前野(VLPO)のGABAニューロンが特に注目されているが、その生理学的な根拠としては、破壊実験やFosタンパクを用いた間接的な発火活動の評価が主なものである。我々はこの部位においても単一ニューロン活動の記録を行い、確かに睡眠時に特異的に活動するニューロンを多数記録したが、その分布範囲は必ずしもVLPOに限られないことや、覚醒時に最も活

発になるニューロンも存在することが明らかになった(論文を投稿中)。こうしたことから、VLPO及びその周辺領域がどのような形で上述の各覚醒系と相互作用しているかは不明な点が多い。特にin vivoでの生理学的な知見は乏しい。

2. 研究の目的

睡眠・覚醒を繰り返す無麻酔の動物で、脳幹及び後部視床下部において上述の覚醒系ニューロン群を単一ユニット記録し、同時にVLPO及びその周辺を電気刺激することで、1) 覚醒時にVLPOとその周辺を電気刺激することで、脳波、筋電図から判断される睡眠・覚醒状態がどのように変化するか。2) VLPO刺激は脳幹及び視床下部の覚醒系ニューロン群の活動に対しては、どのような効果を持つか。などの点を明らかにする。

3. 研究の方法

外科処置により頭部に小型プレートを固定し、これを利用してラットを無麻酔の状態で脳定位装置に固定した(図1)。この状態で睡眠・覚醒サイクルを発現するようになったラットにおいて、脳波、筋電図とともに脳幹のLC、DR、LDT/PPT、後部視床下部などで単一ユニット記録した。同時に視索前野(VLPOとその周辺)をシステムティックに電気刺激(詳細下記)していき、動物の睡眠・覚醒状態、記録中の各ニューロンの活動にどのような変化が現れるか観察した。全ての記録はSpike2システム(Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK)を介してコンピュータに取り込んだ。

A. 半慢性実験用手術

ラットにネンプター麻酔を施し、脳波記録用ネジ電極を頭骨に、筋電図記録用ワイヤー電極を頸部の筋肉にそれぞれ埋め込む。電極からの導線をコネクタにつなげ、頭部固定用のU字型プレートと一体化する。手術後1週間の回復期間をおいた後、U字型プレートを脳定位装置に固定することで、動物を無痛的に脳定位装置に固定する。これを数日間繰り返して、動物をこの状況に慣れさせると、頭部を固定したままで睡眠・覚醒サイクルを発現するようになる。

B. 単一ユニット活動記録法

ガラス管に熱をかけて引き、色素(Pontamine Sky Blue)を溶かした酢酸を充填して微小電極を作成する。局所麻酔した動物の頭骨に穴を開け、電動油圧マニピュレータを用いて微小電極を脳幹もしくは後部視床下部に電極を刺入する。電極をわずかずつ進

めてニューロンを探索し、ニューロンが見つかったら、活動電位の波形、発火パターンなどから目的のニューロンであることを確認した後、脳波、筋電図とともに睡眠・覚醒サイクル中の活動を記録する。ユニット記録終了後、記録電極中の色素を電気泳動によって流出し、マークする。実験が全て終了したら、脳を4%パラホルムアルデヒドで灌流・固定し、各種の免疫組織法によりニューロン活動を記録した部位を確認する。

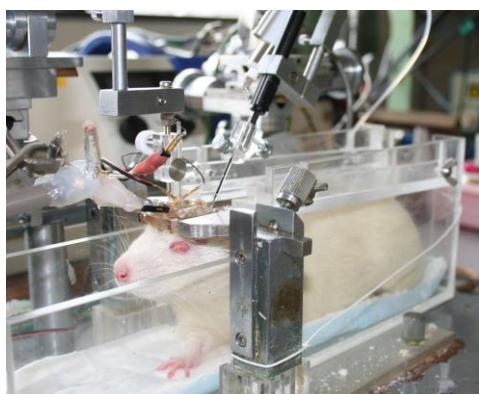


図1 脳固定装置の中にあるラット
無麻酔で頭部のみが固定された状態で睡眠・覚醒を繰り返す。

4. 研究成果

睡眠中あるいは覚醒中に脳幹及び後部視床下部の覚醒系ニューロン活動を単一ユニット記録しながら、視索前野 (VLPOとその周辺) を電気刺激し、動物の睡眠・覚醒状態、大脳皮質脳波、筋電図とともに記録中の各ニューロン活動にどのような変化が現れるか観察した。まず刺激効果をマッピングしたところ、VLPOを中心とした腹外側部の刺激によって脳波に大振幅徐波が現れた (図2)。この時持続的な筋電図活動は抑制されていたが、相動的な活動は増加し、刺激後のこの状態が徐波睡眠であるとは言えなかった。視床下部後部のニューロン活動は、視索前野刺激により抑制された。但し、刺激による脳波の徐派化とは必ずしも相関しておらず、逆に興奮するものも存在した (図3上段)。脳幹の覚醒ニューロンでも興奮、抑制の両方が見られた (図3下段)。これらの結果は、先に我々が明らかにしたようにVLPO領域には睡眠系ニューロンだけでなく覚醒系ニューロンも存在しているため、それらが刺激された結果として脳波の徐派化を伴った覚醒系の賦活という解離状態が現れたと考えられる。

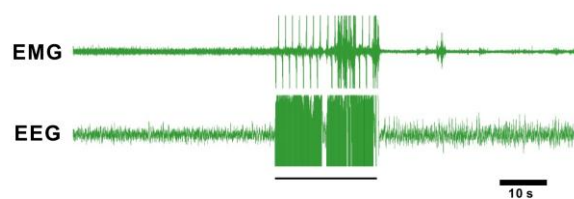


図2 視索前野腹外側部を電気刺激 (200uA, 1ms, 100Hz, 20回, 黒色線部) した時の筋電図 (EMG)、脳波 (EEG) の変化
筋電活動は持続的に抑制され、脳波は徐波化している。

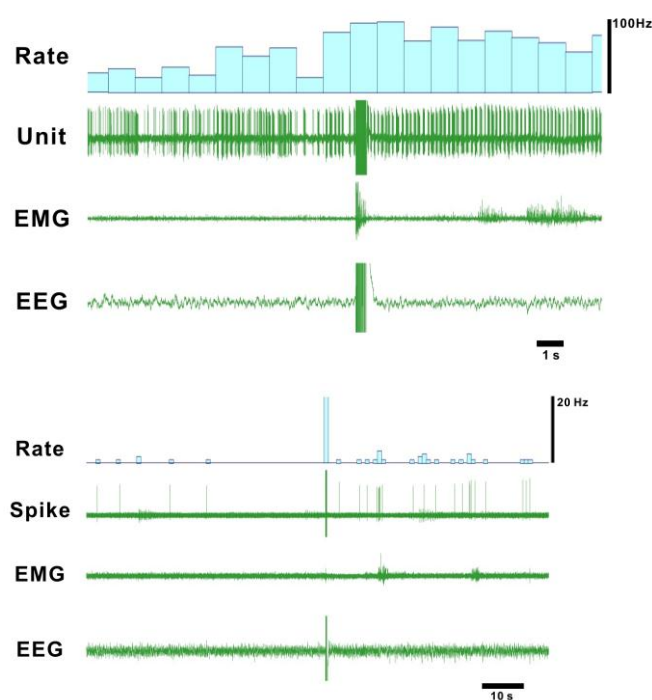


図3 ユニット活動記録の例
上段：視床下部後部ニューロンの興奮性反応
下段：LDT/PPTのアセチルコリンニューロンの興奮性反応

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
香山雪彦 (KAYAMA YUKIHIKO)
福島県立医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：30035224

(2) 研究分担者

高橋和巳 (TAKAHASHI KAZUMI)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90325952

(3) 連携研究者

小山純正 (KOYAMA YOSHIMASA)
福島大学・共生システム理工学類・教授
研究者番号：80183812