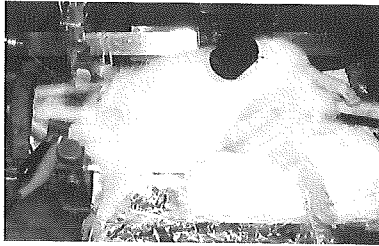


A



B

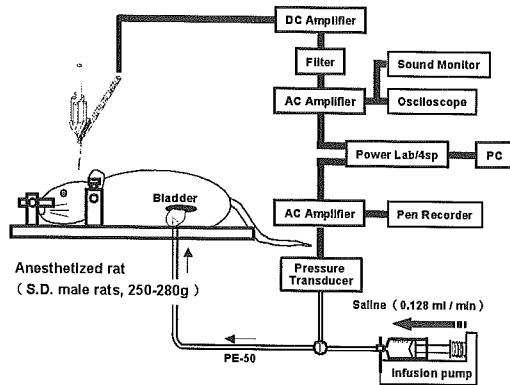
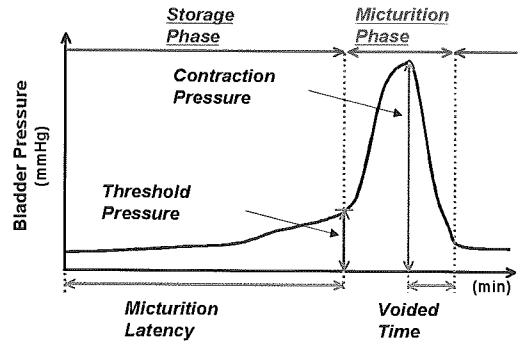


Fig. 4 Simultaneous recording of cystometrogram and single unit activity of brain neurons.

A: Fixation of rat in a stereotaxic puncture apparatus for unit recording. B: Schematic diagram for recording of unit activities and bladder pressure in anesthetized rats. Saline warmed at 37°C was infused into the bladder at a rate of 0.128 ml / min.



Parameters	
Micturition Latency	Latency until the pressure reach threshold for micturition after the beginning of saline injection
Contraction Pressure	Maximum bladder pressure during micturition
Threshold Pressure	Bladder pressure immediately prior to micturition
Micturition phase	The phase until the bladder pressure returns to basal level after it has reached to the threshold
Storage Phase	The phase until the bladder pressure reaches to the threshold after micturition has terminated

Fig. 5 Cystometric parameters for micturition reflex.

### 第3章 排尿反射関連ニューロンの特性および分布に関する研究

#### 第1節 本章の目的

第1章でも述べたように、PAG はこれまでの研究<sup>31-43)</sup>により上位排尿中枢として最近注目されているが、その領域における排尿反射関連ニューロンの詳細な分布や化学物質に対する感受性は不明である。そこで本章では、まず、排尿反射と関連したニューロンが PAG に存在しているのか、存在するとしたらどのような電気生理学的特性を示すのか？またこれらはどこに分布しているのかを調べるために、排尿反射と単一神経活動を同時に記録し、その関係を詳細に検討した。

#### 第2節 実験成績

##### 第1項 中脳水道中心灰白質 (PAG) における排尿反射関連ニューロンの探索

###### 1) PAG における単一ニューロン発火と排尿反射

膀胱内圧の変化を指標に排尿反射に関連するニューロンの発火を記録することを試みた。その結果、Bregma から尾側に 7300~8800 $\mu$ m の PAG 領域において 261 例の安定した発火が記録された。Fig.5 に示すように排尿反射を蓄尿期と排尿期に分けると、排尿期に発火が増加するニューロン (Fig.6) が 33 例、排尿期に発火が減少するニューロン (Fig.7) が 18 例、排尿反射に先行して蓄尿期に発火が増加するニューロン (Fig.8) が 6 例であった。また、排尿反射と明確な関係が見られなかったニューロン (Fig.9) が 213 例あった。ここでは、それぞれのニューロンを Type I、Type II、Type III、Type IV とした。

発火パターンをさらに詳しくみると、Type I は、排尿期に発火頻度が漸減するもの (Type Ia)、漸増するもの (Type Ib) と、持続的に発火するもの (Type Ic) の 3 種類に細分類された (Fig. 10)。

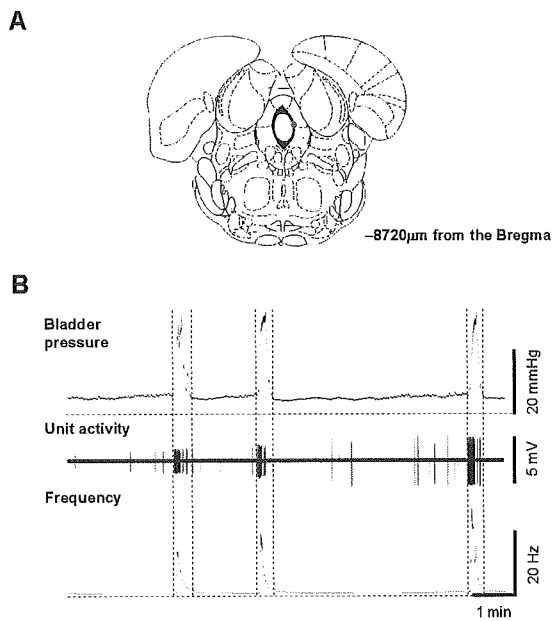


Fig. 6 Typical recording of Type I neuron.

A: The red dot shows recording site of single unit activity of Type I neuron.  
 B: Presentative recording in Type I neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

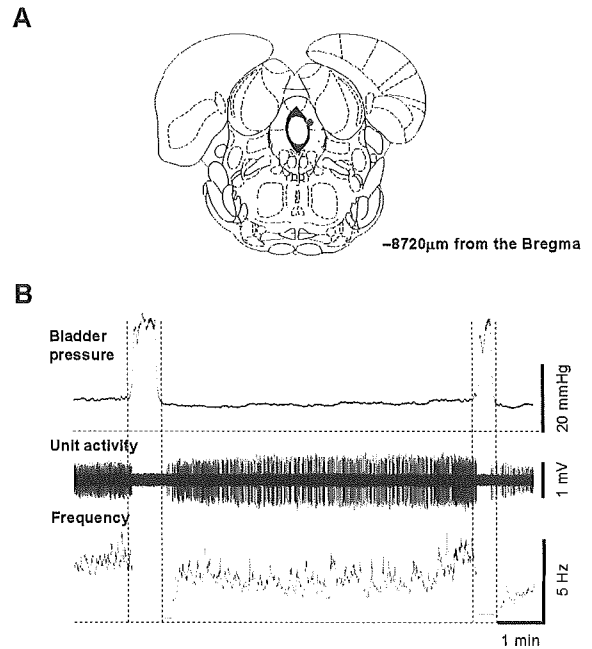


Fig. 7 Typical recording of Type II neuron.

A: The blue dot shows recording site of single unit activity of Type II neuron.  
 B: Presentative recording in Type II neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

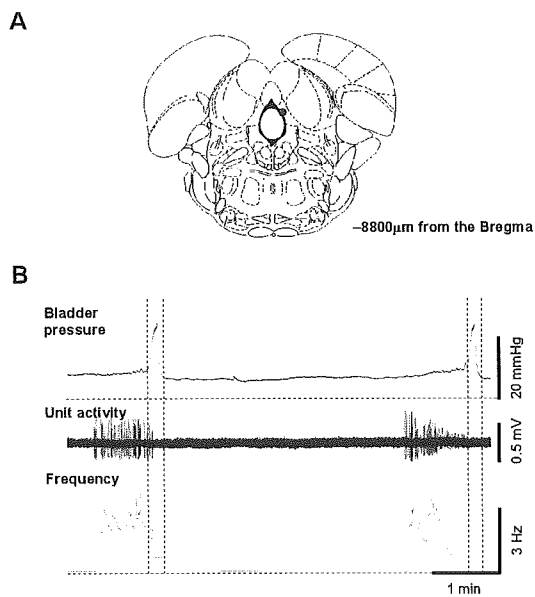


Fig. 8 Typical recording of Type III neuron.

A: The pink dot shows recording site of single unit activity of Type III neuron.  
 B: Presentative recording in Type III neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

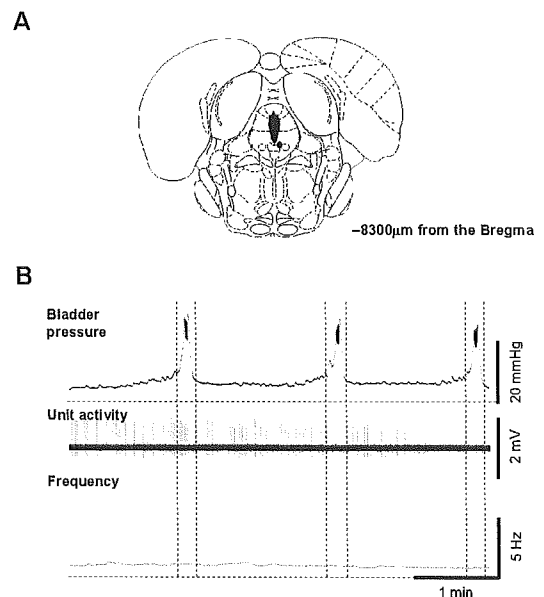


Fig. 9 Typical recording of Type IV neuron.

A: The black dot shows recording site of single unit activity of Type IV neuron.  
 B: Presentative recording in Type IV neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

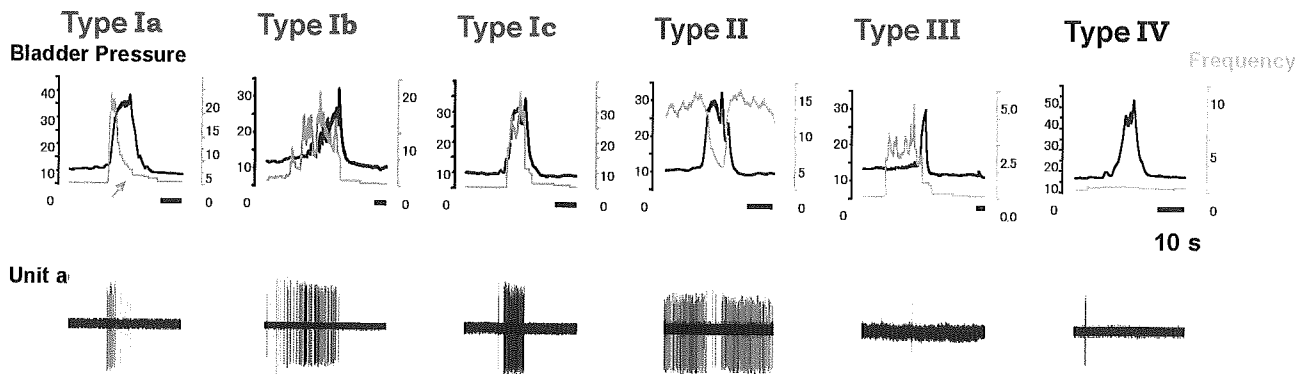
## 2) 膀胱内圧と発火頻度の相互相関分析

膀胱内圧と発火頻度との相関性を詳しく調べるために、膀胱内圧を基準に発火頻度を  $\tau$  時間だけずらして相互相関を検討した。最大相関係数およびそのときのずらし量  $\tau$  を求めた (Fig.11~16) ところ、Type Ia、Ib、Ic、III では高い正の相関 ( $r=0.682 \pm 0.067$ )、Type II では高い負の相関 ( $r=-0.730 \pm 0.052$ ) が見られた。さらに、Type Ia では  $\tau = -3.07 \pm 0.78$  (秒) であり、膀胱内圧を平均 -3 秒シフトさせた位相で最大相関係数が得られることが示された。つまり、発火頻度の上昇が平均 3 秒、膀胱内圧の上昇に先立つ

ことがわかった (Fig.10)。Type Ib、Type II および Type III についても位相のずれを見ると、それぞれ4.78 秒、 $1.24 \pm 0.69$  秒と  $50.8 \pm 22.3$  秒であった。Type Ic については、膀胱内圧の上昇に先立って発火が減少する場合 ( $-3.08 \pm 1.18$  秒、 $n=11$ ) と、遅れて減少する場合 ( $2.67 \pm 2.10$  秒、 $n=4$ ) があつた。

## 第2項 排尿反射関連ニューロンの分布

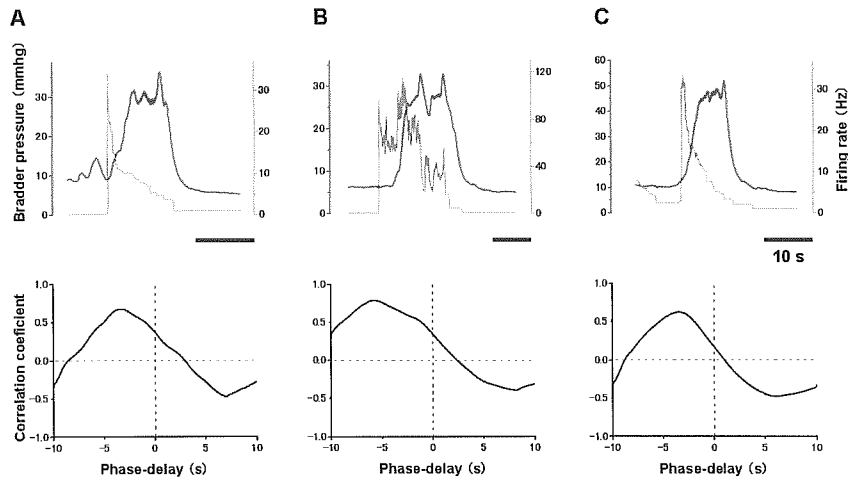
PAG とその周辺における Type Ia (14 例)、Type Ib (1 例)、Type Ic (18 例)、Type II (18 例)、Type III (6 例) および Type IV (213 例) ニューロンの分布を吻尾側軸に沿って数値化したグラフを Fig.17 に示す。記録数が少ない Bregma から尾側に  $6800 \sim 7300\mu\text{m}$  ( $-6800 \sim -7300$ ) の領域を除いて分布率 (Fig.17B) を見ると、Type Ia、Ic および II は  $7600 \sim 8800 \mu\text{m}$  広く分布したが、Type Ia は  $7800 \mu\text{m}$  付近に、Type Ic は  $8300 \mu\text{m}$  付近に多い傾向を示した。また、Type II は  $7640 \mu\text{m}$  に多く尾側ほど存在確率が減少した。一方、Type III は吻側にはほとんど存在せず、 $8730 \mu\text{m}$  付近に多かつた。Type IV は  $7300 \sim 9160 \mu\text{m}$  の領域で約 80%前後を占めた。この領域で記録されたニューロンの約 21 %が排尿反射関連ニューロンであつた。また、Type I、II および III が約 11 : 3 : 1 の割合で確認された。この中でも多くの排尿反射関連ニューロンが記録された Bregma から尾側に  $7640 \sim 8800\mu\text{m}$  の領域における分布を Paxinos and Watson の脳地図上にプロットしたのが、Fig.18~23 である。Type Ia は外側 PAG に多く分布することがわかる。これに対し、Type Ic は  $8000\mu\text{m}$  では腹外側に多く、それより尾側では、外側 PAG またはその近傍に多く分布していた。Type II は背外側 PAG 近傍に多く分布していた。Type III は外側 PAG に多く見られた。



**Fig. 10** Classification of neuronal firing in PAG

Type Ia: decremting firing in the micturition phase. TypeIb: augmenting firing in the micturition phase. Type Ic: constant firing in the micturition phase. Type II : constant firing in the storage phase. Type III : no-relative firing against micturition or storage.

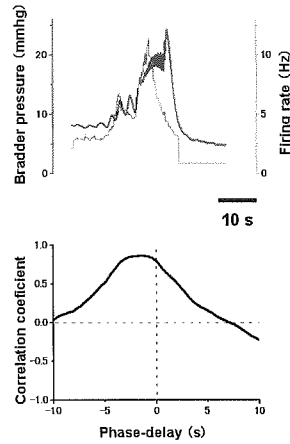
### Type Ia



**Fig. 11** Cross-correlation analysis between bladder pressure and firing rate of Type Ia neuron.

A to C: Three examples recorded in different neurons. Traces shown in upper graphs were analysed and the results were shown in lower graphs.

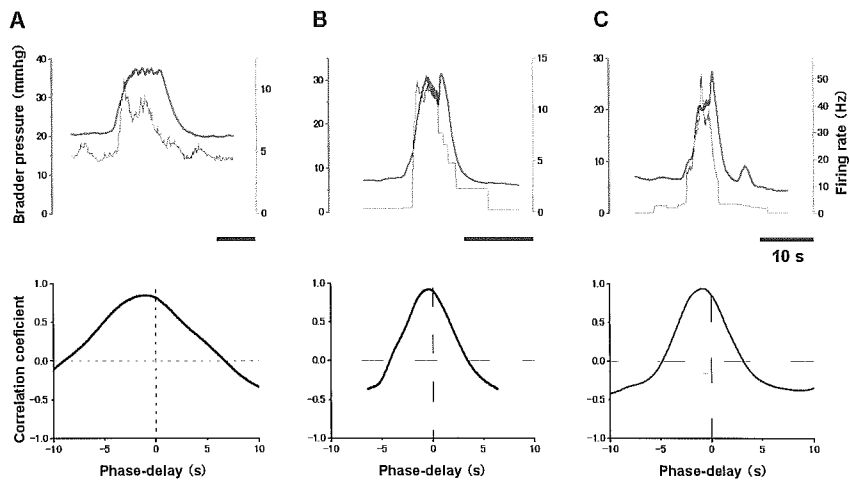
### Type Ib



**Fig. 12** Cross-correlation analysis between bladder pressure and firing rate of Type Ib neuron.

Traces shown in upper graphs were analysed and the results were shown in lower graphs.

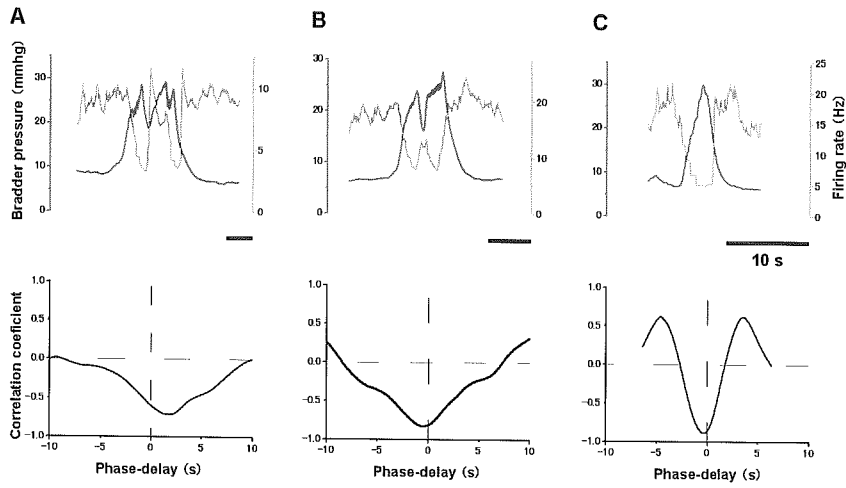
### Type Ic



**Fig. 13** Cross-correlation analysis between bladder pressure and firing rate of Type Ic neuron.

A to C: Three examples recorded in different. Traces shown in upper graphs were analysed and the results were shown in lower graphs.

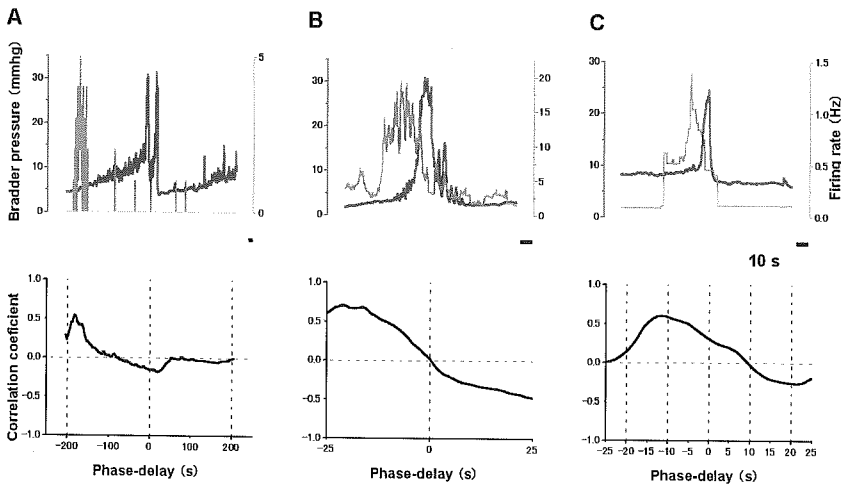
## Type II



**Fig. 14** Cross-correlation analysis between bladder pressure and firing rate of Type II neuron.

A to C: Three examples recorded in different neurons. Traces shown in upper graphs were analysed and the results were shown in lower graphs.

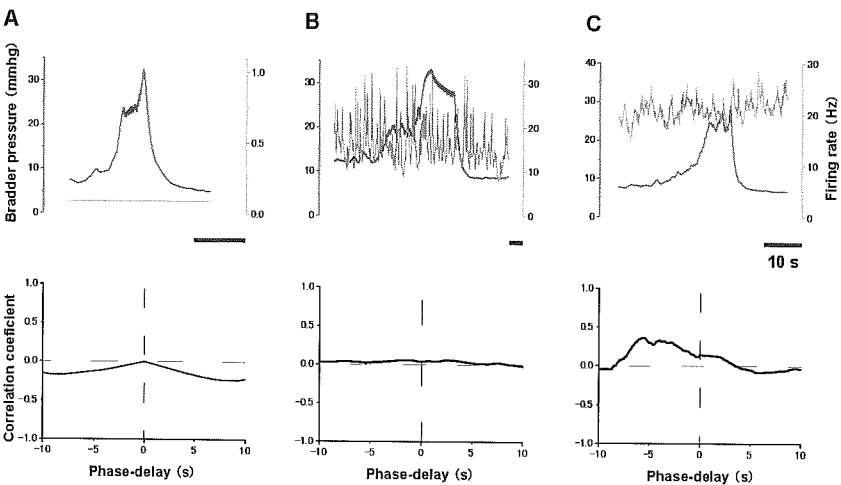
## Type III



**Fig. 15** Cross-correlation analysis between bladder pressure and firing rate of Type III neuron.

A to C: Three examples recorded in different neurons. Traces shown in upper graphs were analysed and the results were shown in lower graphs.

## Type IV



**Fig. 16** Cross-correlation analysis between bladder pressure and firing rate of Type IV neuron.

A to C: Three examples recorded in different neurons. Traces shown in upper graphs were analysed and the results were shown in lower graphs.

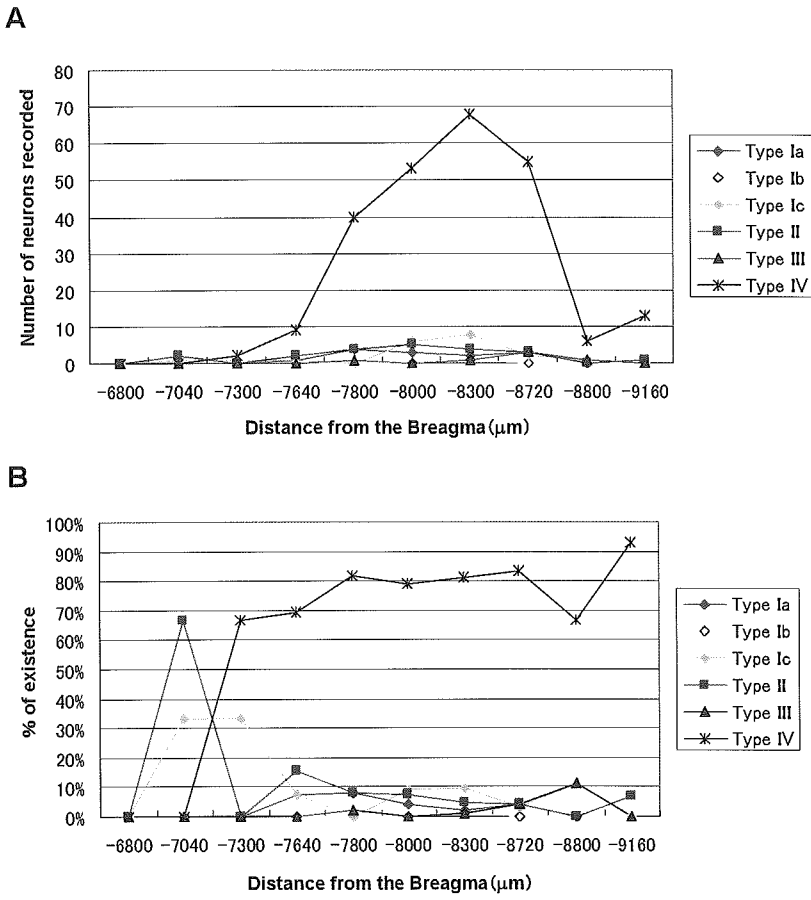


Fig.17 Number and the percentage of existence of each type neuron in PAG along rostrocaudal axis.

### Type Ia

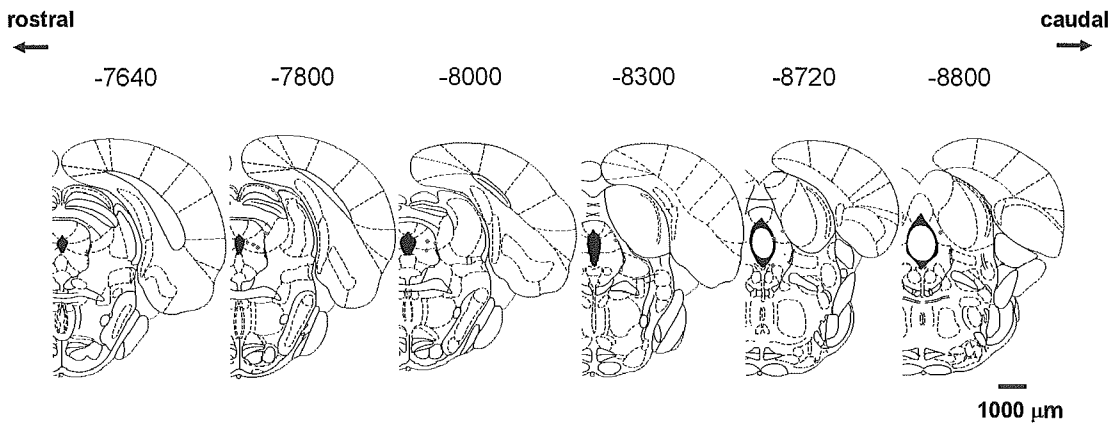


Fig. 18 Location of Type Ia neurons in coronal sections around the PAG.

Numbers shown upper the maps indicate the distance from the Bregma in micrometers. Outline were adapted from Paxinos and Watson.

### Type Ib

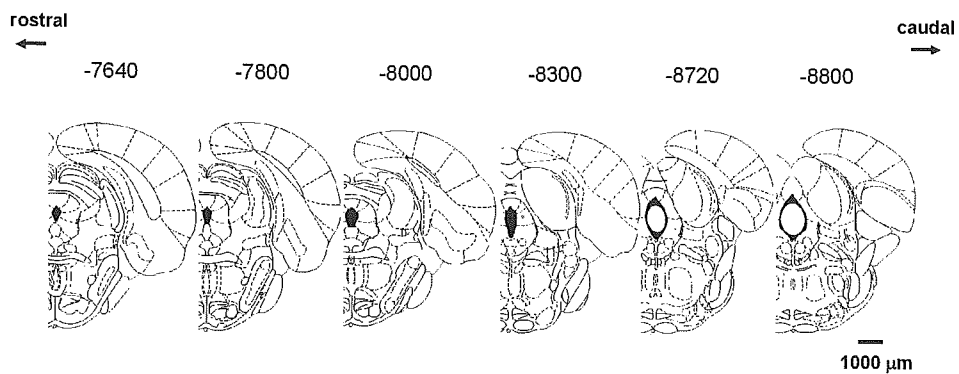


Fig. 19 Location of Type Ib neuron in coronal sections around the PAG.

Numbers shown upper the maps indicate the distance from the Bregma in micrometers. Outline were adapted from Paxinos and Watoson.

### Type Ic

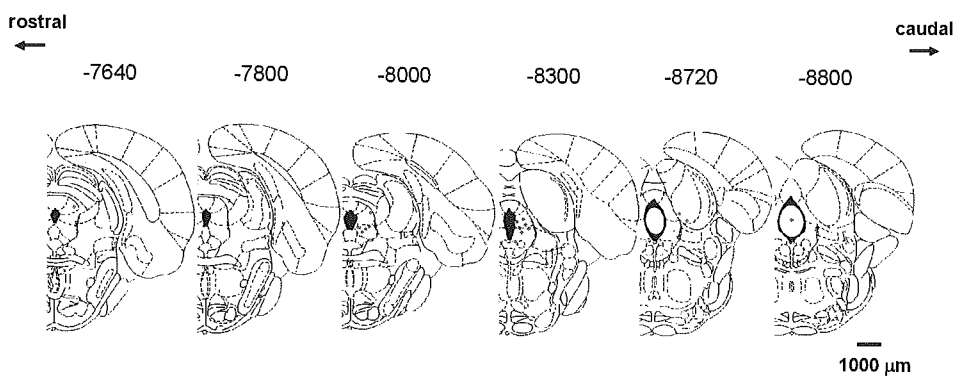


Fig. 20 Location of Type Ic neurons in coronal sections around the PAG.

Numbers shown upper the maps indicate the distance from the Bregma in micrometers. Outline were adapted from Paxinos and Watoson.

### Type II

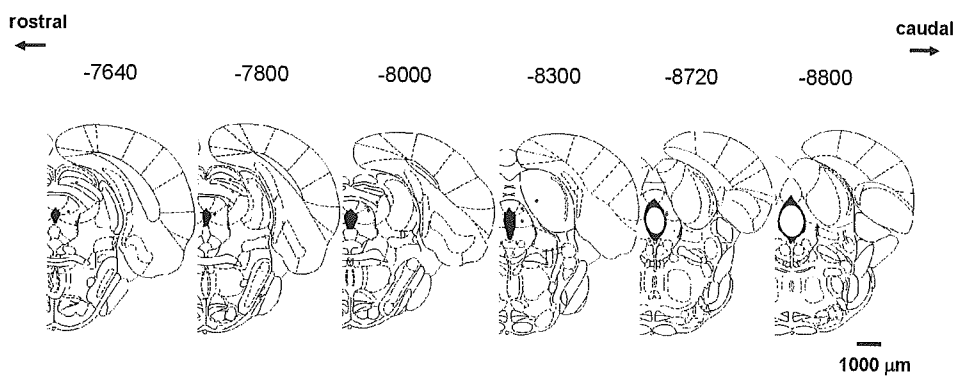


Fig. 21 Location of Type II neurons in coronal sections around the PAG.

Numbers shown upper the maps indicate the distance from the Bregma in micrometers. Outline were adapted from Paxinos and Watoson.

### Type III

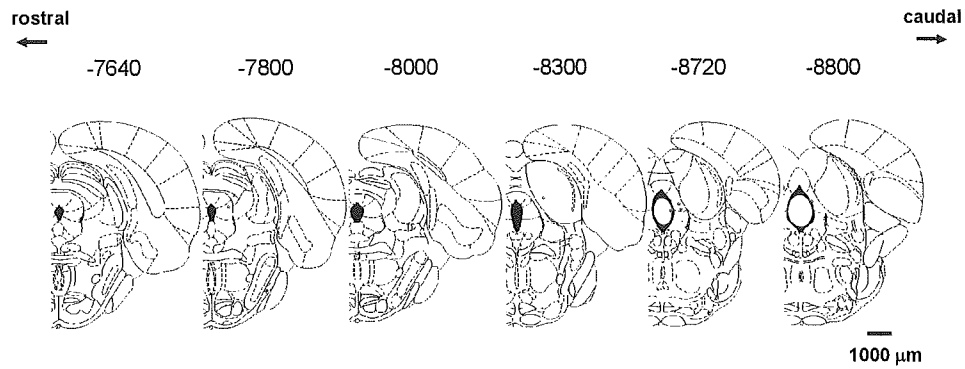


Fig. 22 Location of Type III neurons in coronal sections around the PAG.

Numbers shown upper the maps indicate the distance from the Bregma in micrometers. Outline were adapted from Paxinos and Watson.

### Type IV

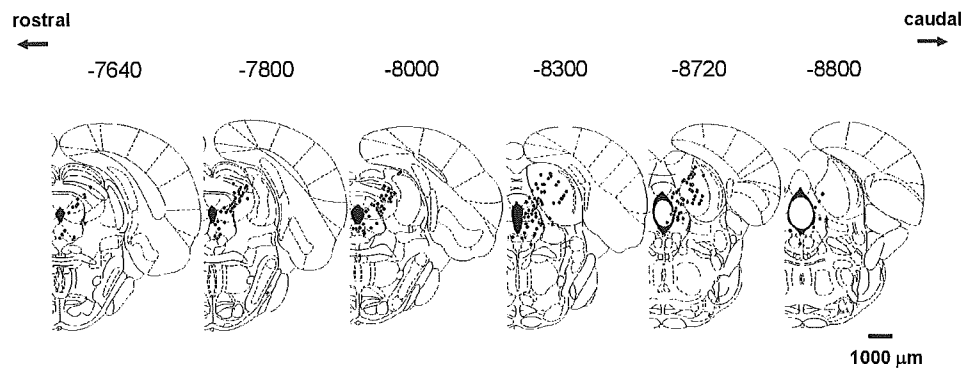


Fig. 23 Location of Type IV neurons in coronal sections around the PAG.

Numbers shown upper the maps indicate the distance from the Bregma in micrometers. Outline were adapted from Paxinos and Watson.

Table.2 Firing patterns of micturition-related neurons in the PAG.

	n	Decrementing (a)	Augmenting (b)	Constant (c)
Type I	33	14 (25%)	1 (2%)	18 (32%)
Type II	18	0 (0%)	0 (0%)	18 (32%)
Type III	6	0 (0%)	0 (0%)	6 (11%)



本章において、排尿反射と同期した5種類の排尿反射関連ニューロンがPAGと四丘体に存在することが明らかとなった。また、Type I、Type IIおよびType IIIの存在比は11:3:1であった。このことは、PAGが単に腰仙髄からの求心性入力を受け、その情報をパーリントン核に伝えるだけのリレー領域ではないことを示唆する。ところでこれまでの報告では、膀胱内圧が排尿の閾値圧になる直前、つまり、蓄尿から排尿へとスイッチするときのみ発火するニューロンが中脳橋被蓋領域において、また、蓄尿期の最初と最後に二相性に発火するニューロンがパーリントン核の周囲と黒質およびVTA領域で記録されている<sup>13, 21)</sup>。PAGにおいてはそのような発火は見られなかった。

LiuらはネコのPAG領域において、今回のType Ia~cとType IIに相当するニューロンの存在を報告している<sup>15)</sup>。彼らの結果では、Type Ia、Ib、IcおよびIIに相当するニューロンの割合は6%、3%、33%、57%であったと報告している。今回の結果は25%、2%、32%、32%であり（Table.2）Liuらの結果と比べるとType IIが少なく、Type Iaが多かった。このような違いの一つは種差が考えられる。しかし、Liuらの報告はほとんどがPAG外での記録に基づいている。このことがむしろ原因であると考えられる。Type IとType IIに相当するニューロンはパーリントン核とその周囲においても記録されている。この領域では、Type Iに相当するニューロンの大部分がパーリントン核内に存在し、脊髄に投射するニューロンであるのに対し、Type IIの大部分はパーリントン核の外側にあり、脊髄には投射していないと報告されている<sup>19)</sup>。このことを考え合わせると、Liuらの報告に比べ、今回Type IIが少なかったことは、記録部位の違いに起因しており、Type IがPAG内に多いことを示しているように思える。また、Type IIが介在ニューロンとして、PAG内外でPAGからパーリントン核やD領域へ投射するニューロンの発火を抑制する役割を持つのかもしれない。蓄尿中枢であるL領域においては、78%がType IIニューロンに相当するニューロンと報告がされている<sup>12)</sup>ことは興味深い。今回の相互相関分析の結果から、Type IIニューロンは、膀胱内圧の上昇に $1.24 \pm 0.69$ 秒遅れて発火が減少した。このことは、膀胱収縮の結果、Type IIニューロンの神経発火が抑制されたことを示唆する。PAGのそれぞれのTypeのニューロンがどのような役割を持つかは、今後さらに検討が必要であろう。

ところで、PAGとその周囲の領域における排尿反射関連ニューロンの分布については、先のLiuらの報告がある。しかし、先に述べたように彼らの報告はほとんどがPAG外での記録に基づいており、PAGにおける排尿反射関連ニューロンの分布は全く不明であった。本研究は、排尿反射関連ニューロンが尾側のPAGに多く分布することを明らかにした。また、Type Iが外側および腹外側PAGに多く分布するのに対し、Type IIが背外側PAG付近に多く確認され、Type IIIはBregmaから尾側に $8720\mu\text{m}$ の領域に多いなど、Typeにより異なる分布をすることも明らかとなった。これらの各領域における神経投射について考察すると、Type Ia、Type Ic、Type II、Type IIIが多く確認された尾側の外側PAGは、腰仙髄から求心性神経が入力する部位<sup>3, 32, 44)</sup>と一致していた。Type IIが多く分布した背外側PAGは腰仙髄からの投射が少なく<sup>9)</sup>、PMCへの出力はほとんど確認されていない<sup>44)</sup>。また、他のPAG領域と違い、辺縁系（扁桃体、分界条、脳幹、脊髄）からの求心性入力に乏しく<sup>45-49)</sup>、一部の領域（尾側の内側前頭葉、視床下部腹内側核、楔状核）からの入力を受けるのみである<sup>38, 50-55)</sup>。また、Type Icが多く見られた尾側の腹外側PAGは、パーリントン核やD領域への投射が確認されている部位である<sup>6, 31)</sup>。パーリントン核内では、今回の分類のType Icに相当するニューロンが多く、それが仙髄に投射していると報告されている。また、尾側の腹外側PAGにグルタミン酸を投与すると排尿反射が誘発されるとの報告もある<sup>9)</sup>。さらに、今回の相互相関解析の結果は、Type Icニューロンの大部分は、発火が膀胱内圧の上昇に約3秒先立つことを示している。このことは、Type Icニューロンの興奮が膀胱収縮の結果ではない可能性を示す。これらのことを考え合わせると、Type Icが排尿反射の出力ニューロンとして機能しているかもしれない。

いずれにせよ、古典的排尿中枢であるパーリントン核では大部分がType Iに相当するニューロンであり、蓄尿中枢であるL領域では大部分がType IIに相当するニューロンであるとの報告<sup>12)</sup>と比べると、今回、比較的広い範囲でType IcとType IIがほぼ同数記録されたことは興味深い。このことはPAGが排尿反射の調節に重要な役割を演じていることを示唆するように思える。Type Iaニューロンは、相互相関解析から神経発火が膀胱内圧の上昇より平均3秒先立つことが示された。このことは、Type Iaニューロンの発火も膀胱内圧の上昇の結果起こるものではないことを示唆する。膀胱内圧の上昇後に発火が減少することも考慮するとType Ia

ニューロンは蓄尿から排尿へのスイッチに関わっているかもしれない。今後さらに、各ニューロンの役割の解明が期待される。Type IIIについても、膀胱内圧の上昇に先立って発火するが、Type Ia に比べると平均約 50 秒先立っており、蓄尿から排尿へのスイッチに関わるるとは言いがたい。Type III の意義については全く不明である。

## 第 4 章 PAG ニューロンのグルタミン酸およびグリシン応答能

### 第 1 節 本章の目的

第 3 章において、排尿反射関連ニューロンの電気生理学的特性とその分布を明らかにした。しかし、これらのニューロンがどのような化学物質感受性を示すかは全く不明である。近年、尾側の腹外側 PAG にグルタミン酸を投与すると排尿反射が惹起されることが報告<sup>5,36)</sup>されている。一方、当研究室では、Bregma から尾側に 8300 ~ 8800  $\mu\text{m}$  の腹外側 PAG にグリシンを微量注入すると、最大膀胱内圧の上昇、排尿閾値の低下、排尿潜時の短縮、膀胱コンプライアンスの増加、排尿流速の増加と尿道抵抗の低下が起こり、排尿反射が促進する<sup>7)</sup>ことを見出している。しかし、これまでの方法では、いかなるニューロンにグルタミン酸やグリシンが作用したのかは全く不明である。また、微量投与方法ではあってもこれまでに用いられてきた方法は複数のニューロン群に作用が及ぶ方法であった。そこで、本章では、神経伝達物質の遊離量とも類似できるほど極微量を単一神経に投与できるマイクロイオントフォレシス法を、単一神経活動記録法と組み合わせて排尿反射関連ニューロンのグルタミン酸、グリシンおよびストリキニーネに対する感受性を検討した。

### 第 2 節 実験成績

Bregma から尾側に 7300~8800 $\mu\text{m}$  の PAG とその周辺領域において、安定した活動電位の発火と排尿反射が記録されていることを確認した後、上述した感受性を検討した。マルチバレル内のアミノ酸およびストリキニーネは通常 20 nA の電流で 10 秒間投与し、次の投与まで少なくとも 30 秒の間隔を空けた。発火頻度の増減が見られた場合、生理食塩水を詰めたバレルに薬物投与に用いたのと同じ電流を流し、発火頻度の変化が電流効果によるものではないことを確かめた (Fig.24~26)。

#### 第 1 項 グルタミン酸応答能

検討した 53 例のうち 37 例 (69.8%) はグルタミン酸投与の直後から発火頻度が増加し、投与終了と共に発火頻度は元に戻った (Fig.24)。発火頻度の増加は、Type I、Type II および Type IV ニューロンで見られた (Table.3)。これらのニューロンは、上丘、下丘、外側 PAG、腹外側 PAG に広く分布していた (Table.4、Fig.27)。いずれの場合も、グルタミン酸は排尿反射には影響を与えなかった。残りの 16 例においては、グルタミン酸に対して応答を示さなかった。そのほとんどは Type IV であった (15 例:Table.3)。

#### 第 2 項 グリシン応答能

検討した 69 例のうち 60 例 (87.0%) はグリシン投与の直後から発火頻度が減少し、投与終了と共に発火頻度は元に戻った (Fig.25)。発火頻度の減少は、Type I、Type II、Type III および Type IV ニューロンで見られた (Table.3)。これらのニューロンは、上丘、下丘、外側 PAG に広く分布していた (Table.4、Fig.27)。このうち、61 例においては排尿反射に影響を与えなかった。しかし、1 例においてはグリシン投与により発火頻度が減少するとともに排尿反射が抑制された (Fig.28)。このニューロンは、発火頻度の上昇直後に膀胱内圧が上昇する Type Ia ニューロンであった。発火頻度が急に増加しはじめ、膀胱内圧が少し上昇したとき (Fig.28 に赤色の矢印で示す) にグリシンを投与すると、発火頻度の減少と膀胱内圧上昇の抑制が観察された。通電を終了する

と、ただちに発火頻度が急上昇し、排尿反射が惹起された。残りの 9 例においては、グリシンに対して応答を示さなかった。応答しなかったニューロンのほとんどは Type IV であった (8 例 : Table.3)。

### 第 3 項 ストリキニーネ応答能

検討した 26 例のうち 17 例 (65.4%) はストリキニーネ投与の直後から発火頻度が増加し、投与終了後約 60 秒間は効果が持続した (Fig.26)。発火頻度の増加は、Type I、Type II および Type IV ニューロンで見られた (Table.3)。これらのニューロンは、上丘、下丘、外側 PAG に広く分布していた (Table.4、Fig.27)。いずれの場合もストリキニーネは排尿反射に影響を与えなかった。残りの 9 例においては、ストリキニーネに対して応答を示さず、そのすべてが Type IV であった (9 例 : Table.3)。

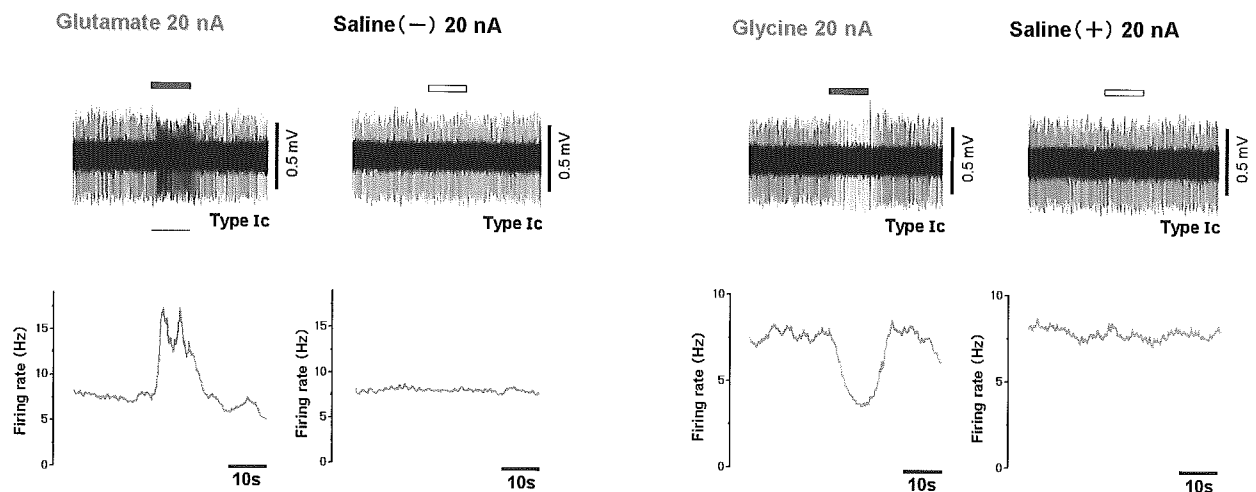


Fig. 24 Neuronal responses to microiontophoretic applications of glutamate.

Unit activity was recorded from Type Ic neuron. Glutamate and saline were applied during the period indicated by bars above the voltage traces. Note that saline applied at negative charge did not affect unit activity. Recordings were obtained from the same neuron in vIPAG at 8300 $\mu$ m from the Bregma.

Fig. 25 Neuronal responses to microiontophoretic applications of glycine.

Recording was obtained from the neuron shown in Fig.21. Note that saline applied at positive charge did not affect unit activity.

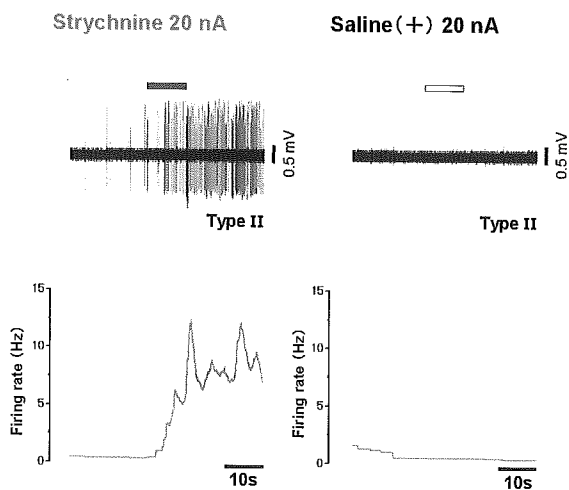


Fig. 26 Neuronal responses to microiontophoretic applications of strychnine.

Unit activity was recorded from Type II neuron in vIPAG at 8300 $\mu$ m from the Bregma. Note that strychnine but not saline excited the neuron and the affect of strychnine remained after termination of application.

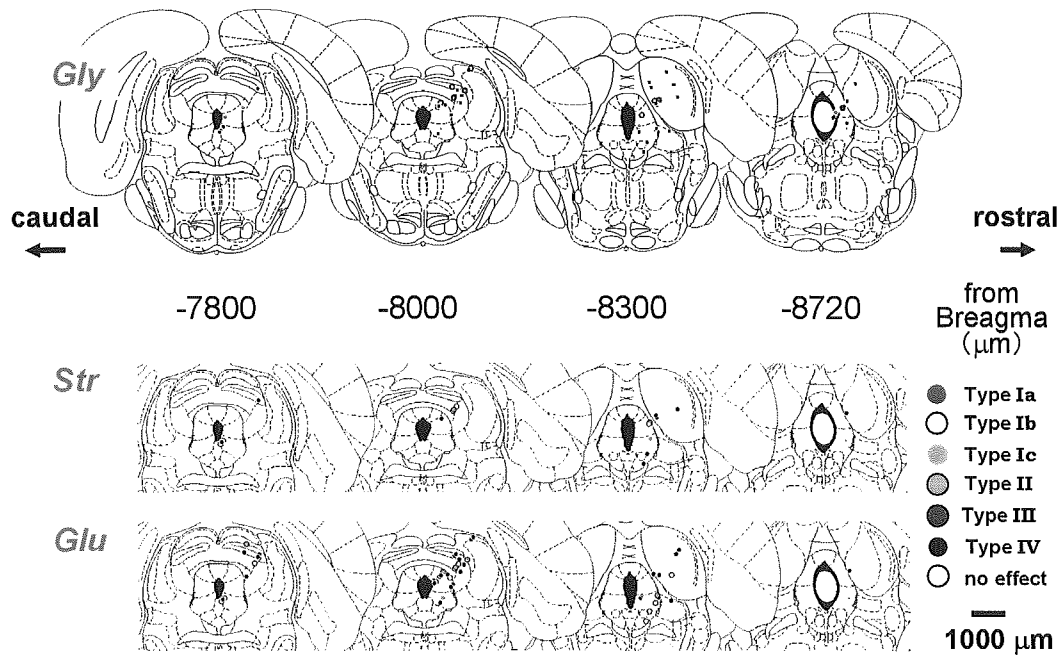
Table.3 Summary of neuronal responses to microiontophoretic applications of glutamate (Glu), glycine (Gly) and strychnine (Str) in each type of neuron.

		n	Augmented	Inhibited	No responded
Glu	Type I	3	2	0	1
	Type II	6	6	0	0
	Type III	0	0	0	0
	Type IV	44	29	0	15
Gly	Type I	9	0	8	1
	Type II	7	0	7	0
	Type III	2	0	2	0
	Type IV	51	0	43	8
Str	Type I	1	1	0	0
	Type II	4	4	0	0
	Type III	0	0	0	0
	Type IV	21	12	0	9

**Table.4** Distribution of neurons responded to microiontophoretically applied glutamate (Glu), glycine (Gly) or strychnine (Str).

		n	Increased	Decreased	No responded
Glu	dlPAG	1	0	0	1
	lPAG	9	6	0	3
	vlPAG	12	7	0	5
	out of PAG	31	24	0	7
Gly	dlPAG	1	0	0	1
	lPAG	11	0	10	1
	vlPAG	12	0	12	0
	out of PAG	43	0	36	7
Str	dlPAG	0	0	0	0
	lPAG	4	2	0	2
	vlPAG	5	3	0	2
	out of PAG	17	12	0	5

dl: dorsolateral, l: lateral, vl: ventolateral.



**Fig. 27** Location of neurons responded to iontophoretically applied glutamate (Glu), glycine (Gly) or strychnine (Str) on coronal sections around the PAG.

Numbers indicate the distance from the Bregma in micrometers. Color of circle indicates the type of neuron recorded. Outline were adapted from Paxinos and Watson.

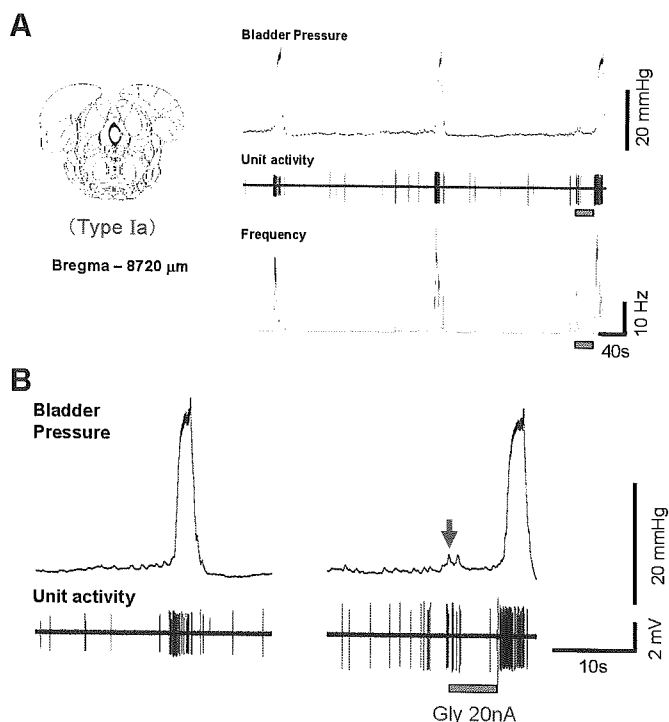


Fig. 28. Effects of iontophoretic application of glycine on the unit activity in PAG and the cystometrogram in an anesthetized rat.

- A: Red dot in the brainstem map shows recording site of single unit activity. Right traces indicate simultaneous recording of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency.
- B: Glycine was applied for the period indicated by blue bar. As indicated by red arrow, glycine decrease the micturition reflex together with the action potential firing in this Type Ia neuron. Note that the firing was rapidly increased after termination of glycine application and bladder pressure was increased immediately.

により constant な抑制を受けていることが示唆された。

本研究においては、化学物質の作用の投与電流依存性については検討しなかった。しかし、今回実験に用いた化学物質の濃度などの実験条件は、これまでに大脳皮質や海馬ニューロンに対して用いられてきたものとほぼ同じである。大脳皮質などにおいては、グルタミン酸およびグリシンに対する応答がマルチバレルに流す電流量に依存して強くなり、20 nA でほぼ最大の反応を示している<sup>57, 58)</sup>。また、ストリキニーネについても5 - 20 nA でグリシンの抑制作用に拮抗している<sup>57)</sup>。このようなことから、今回の実験条件下においても、各物質は最大応答に近い反応を起こし得たと考えられる。今回、Type III ニューロンの中に、グルタミン酸、グリシンやストリキニーネに感受性を示さないニューロンが多くみられた。この中には、どの物質に対しても反応しなかった例は含まれていない。ある物質に感受性を示さなかった場合、定電流装置のレベルメーターにて電流が流れていることは確認した。グルタミン酸などに感受性を示さなかったニューロンの分布をみると、PAG とその周囲で広範に散在していた。今のところ、グルタミン酸やグリシンに感受性が無いニューロンが Type IV ニューロンに多かったことの意義は不明である。PAG は排尿反射以外にも痛覚、情動、生殖、呼吸、体温、血圧など多くの機能に関わっている。このため、Type IV ニューロンはこれらの機能と関わり、排尿反射関連ニューロンとは異なる化学物質感受性を持つのかもしれない。今後例数を増やし、排尿反射関連ニューロンと Type IV ニューロンの薬物感受性の違いを明確にする必要があるだろう。

ところで、投与したグルタミン酸、グリシンおよびストリキニーネは、ほとんどの場合、発火頻度に影響を与えても排尿反射には影響を与えなかった。マイクロイオントフォレシス法は *in vivo* において、単一ニューロンもしくは、ごく限られたニューロンにのみ薬物を投与できる方法である。排尿反射がたった1個のニューロンによりコントロールされるとは思いにくい。よって、今回の結果は、排尿反射が PAG 内の神経回路によりコントロールされていること、また、同じ機能を持つニューロンが複数あり排尿反射の安定性が保たれていることを示唆するようと思える。しかし、たった1例ではあるが、グリシンが発火頻度を抑制すると共に排尿反射も抑制した。このことは、注目に値する。

本研究から、グルタミン酸とストリキニーネは PAG ニューロンを興奮させ、グリシンは抑制することが明らかとなった。まだ、検討例は少なく、明確には言えないが、少なくとも今回の結果からは、グリシンが PAG ニューロンを興奮させることはないように思われる。これまで、PAG やパーリントン核などにグルタミン酸やグリシンなどを投与して排尿反射が促進されたとの報告<sup>5, 7, 86)</sup>や、 $Co^{2+}$ の投与が排尿反射を抑制したとの報告<sup>56)</sup>。しかし、PAG を含め排尿反射にいかなる神経伝達物質が関わっているかについては、ほとんどわかっていなかった。本研究で用いたマイクロイオントフォレシス法は、単一ニューロンに神経伝達物質の遊離量と同程度の極微量を投与できる方法で、これまでに *in vivo* において神経伝達物質の生理・薬理学的同定にも用いられてきた。本研究は、グルタミン酸とグリシンが排尿反射の神経伝達物質として働いていることを示唆する。特に、グリシンについては、蓄尿期に投与したストリキニーネが Type Ic および Type II ニューロンを興奮させたことから、これらのニューロンが少なくとも蓄尿期にグリシン

このときの実験条件を再度確認してみると、グリシンの濃度、通電量、通電時間、バレルの電気抵抗は他の例と同じである。この例だけバレルの抵抗が下がったとも思えない。というのは、このマルチバレルにはグルタミン酸とストリキニーネも充填していた。しかし、蓄尿期の発火頻度はかなり低い。このことはバレルからグルタミン酸などが漏れ出たはなかったことを示す。よって、この例だけグリシンが多量にかつ広範囲に投与されたとは思えない。グリシンで排尿反射も抑制されたニューロンは Type Ia ニューロンであり、おそらく、蓄尿から排尿への切り替えにかかわるニューロンと思われる。その存在部位を見ると、外側 PAG で腹外側 PAG に近い部位であり、かつ中脳水道のすぐ近くである。この部位は仙髄の外側部から投射を受けることが報告<sup>3)</sup>されており、蓄尿情報の入力部と考えられる。このような重要な部位でグリシンが、スイッチングニューロンと思われる単一ニューロンの活動と同時に排尿反射を抑制したことは興味深い。

呼吸反射調節においては、Bötzinger Complex から後疑核までの吻尾側に長い腹側脳幹領域のニューロンが神経回路を成しているが、その中で特に重要なニューロンがある。それは、PreBötzinger Complex に存在する抑制性ニューロンである。このニューロンが興奮している限り呼吸であり、このニューロンの抑制により吸息に切り替わるという。今回、グリシンにより単一ニューロン発火と排尿反射が同時に抑制されたニューロンは、このような特別な役割を持つニューロンかもしれない。今後さらにこの部位に同様なニューロンが集まっているのか、そのニューロンはどこから投射を受け、どこに投射するのかなどさらに検討し、その役割を明らかにする必要がある。

## 第5章 総括

本研究では、排尿反射の中枢機序を明らかにする一環として、最近排尿反射中枢として注目されつつある PAG に着目し、排尿反射ニューロンの探索を行った。さらに、その電気生理学的、薬理学的特性と PAG 内の分布を明らかにした。以下に概略を示す。

- 1) Bregma から尾側に 7300~8800 $\mu\text{m}$  の PAG 領域において、排尿期に活動電位の発火が増加する Type I (33 例)、逆に減少する Type II (18 例)、蓄尿期に排尿反射に先行して発火が増加する Type III (6 例) および排尿反射との相関が明らかでない Type IV (213 例) の 4 種類の活動が記録された。Type I は排尿期に発火が漸増する Type Ia、漸減する Type Ib と constant に発火する Type Ic に細分類された。また、Type II は、膀胱内圧の上昇に先立って発火が減少するタイプと、膀胱内圧の上昇後に発火が減少するタイプの 2 種類があることが示唆された。
- 2) Type I は Bregma から尾側に 7640~8800 $\mu\text{m}$  の領域の外側および腹外側 PAG に、また Type II は同領域の外側 PAG、背外側 PAG および四丘体に多く分布した。
- 3) これらのうち 37 例においては、グルタミン酸が神経発火を増加させ (Type I : 2 例、Type II : 6 例、Type III : 0 例、Type IV : 29 例)、60 例においては、グリシンが神経発火を抑制した (Type I : 8 例、Type II : 7 例、Type III : 2 例、Type IV : 43 例)。また、16 例ではストリキニーネが神経発火を増加させた (Type I : 1 例、Type II : 4 例、Type III : 0 例、Type IV : 12 例)。
- 4) PAG およびその周辺領域へのグルタミン酸、グリシンおよびストリキニーネの極微量投与は、ほとんどの場合ニューロンの発火頻度を変化させても排尿反射には影響を与えなかった。しかし、1 例ではあるが、グリシンの極微量投与により神経放電が抑制されると共に排尿反射が抑制された。

古典的橋排尿中枢であるバーリントン核では Type I に相当するニューロンが、蓄尿中枢である L 領域では Type II に相当するニューロンが多いとの報告と比較すると、PAG において Type I、Type II と Type III が 11 : 3 : 1 の割合で記録されたことは注目に値する。もし仮に、PAG が膀胱からの求心性入力を受け、バーリントン核などの排尿中枢に情報を伝達するだけであるならば、今回得られたような複数の発火パターンは観察されず、ある種の発火パターンを示すニューロンに偏って分布を示したに違いない。排尿反射調節に関わることが知られている前頭葉、視索前野、視床、視床下核、黒質緻密層、腹外側被蓋などと PAG を結ぶ神経結合の存在が明らかにされている<sup>31, 34, 38)</sup>ことなどを合わせて考えると、今回の結果は PAG が排尿反射の調節中枢として働いていることを示唆すると考えられる。

また本研究から、グルタミン酸とグリシンが PAG において排尿反射の神経伝達物質として働いている可能性が示唆された。特に、

グリシンに関しては、ストリキニーネの結果から、Type Ic および Type II ニューロンの蓄尿期に抑制性伝達物質として働いている可能性が示唆された。さらに、PAG への化学物質の極微量投与により、ほとんどの場合、排尿反射が影響を受けなかったことは、排尿反射が複数のニューロン群からなる神経回路によりコントロールされており、単一のニューロンの発火が変化しても排尿反射に影響しないことを示唆している。しかし、たった一例ではあったが、グリシンの極微量投与が単一ニューロン発火を抑制するとともに排尿反射を抑制したことは、排尿反射のリズム全体を司る重要な排尿反射ニューロンが PAG に存在することを示唆する。今後このニューロンの特性をさらに詳しく検討するとともに、排尿反射（関連）ニューロン発火が記録された部位にマルチパレルから神経トレーサーを注入するなどして、各ニューロンがどのような神経回路を形成するか明らかにする必要がある。

#### 参考文献

1. Homma Y., Kakizaki H., Gotoh M., Takei M., Yamanishi T., Hayashi K., Epidemiologic survey on lower urinary tract symptoms in Japan. *NBS*, 14, 266-277 (2003)
2. 後藤 百石, 有尿失禁者の家族介護者における介護負担度の検討, 名古屋大学, 第 12 回日本排尿機能学会 (2005)
3. Klop E.M., Mouton L.J., Kuipers R., Holstege G., Neurons in the lateral sacral cord of the cat project to periaqueductal grey, but not to thalamus. *Eur J Neurosci*, 21, 2159-2166 (2005)
4. Chancellor M.B., Yoshimura N., Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. *In Campbell's Urology (Eighth edition)*, Vol 2, Part V, 831-886 (2002)
5. Matsuura S., Downie J.W., Allen G.V., Micturition evoked by glutamate microinjection in the ventrolateral periaqueductal gray is mediated through Barrington's nucleus in the rat. *Neuroscience*, 101, 1053-1061 (2000)
6. Ding Y.Q., Wang D., Nie H., Guan Z.L., Lu B.Z., Li J.S., Direct projections from the periaqueductal gray to pontine micturition center neurons projecting to the lumbosacral cord segments: an electron microscopic study in the rat. *Neurosci Lett*, 242, 97-100-430 (1998)
7. 岡部 祐一, 排尿反射の中枢内神経伝達に関する研究, 熊本大学大学院薬学研究科修士論文 (2003)
8. Holstege G., Bandler R., Saper C.B., The emotional motor system. *Prog Brain Res*, 107, 3-6 (1996)
9. Reichling D.B., Kwiat G.C., Basbaum A.I., Anatomy, physiology and pharmacology of the periaqueductal gray contribution to antinociceptive controls. *Prog Brain Res*, 77, 31-46 (1988)
10. Bandler R., Carrive P., Zhang S.P., Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Prog Brain Res*, 87, 269-305 (1991)
11. Holstege G., The emotional motor system in relation to the supraspinal control of micturition and mating behavior. *Behav Brain Res*, 92, 103-109 (1998)
12. Sakakibara R., Nakazawa K., Shiba K., Nakajima Y., Uchiyama T., Yoshiyama M., Yamanishi T., Hattori T., Firing patterns of micturition-related neurons in the pontine storage centre in cats. *Auton Neurosci*, 99, 24-30 (2002)
13. Sakakibara R., Nakazawa K., Uchiyama T., Yoshiyama M., Yamanishi T., Hattori T., Micturition-related electrophysiological properties in the substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area in cats. *Auton Neurosci*, 102, 30-38 (2002)
14. Sakakibara R., Nakazawa K., Uchiyama T., Yoshiyama M., Yamanishi T., Hattori T., Effects of subthalamic nucleus stimulation on the micturition reflex in cats. *Neuroscience*, 120, 871-875 (2003)
15. Liu Z., Sakakibara R., Nakazawa K., Uchiyama T., Yamamoto T., Ito T., Hattori T., Micturition-related neuronal firing in the periaqueductal gray area in cats. *Neuroscience*, 126, 1075-1082 (2004)
16. Sasaki M., Bladder contractility-related neurons in Barrington's nucleus: axonal projections to the spinal cord in the

- cat. *J Comp Neurol*, 449, 355-363 (2002)
17. Sasaki M., Feed-forward and feedback regulation of bladder contractility by Barrington's nucleus in cats. *J Physiol*, 557, 287-305 (2004)
  18. Sasaki M., Role of Barrington's nucleus in micturition. *J Comp Neurol*, 493, 21-26 (2005)
  19. Sasaki M., Properties of Barrington's neurones in cats: units that fire inversely with micturition contraction. *Brain Res*, 1033, 41-50 (2005)
  20. Koyama Y., Imada N., Kawauchi A., Kayama Y., Firing of putative cholinergic neurons and micturition center neurons in the rat laterodorsal tegmentum during distention and contraction of urinary bladder. *Brain Res*, 840, 45-55 (1999)
  21. Tanaka Y., Koyama Y., Kayama Y., Kawauchi A., Ukimura O., Miki T., Firing of micturition center neurons in the rat mesopontine tegmentum during urinary bladder contraction. *Brain Res*, 965, 146-154 (2003)
  22. Sugaya K., Ogawa Y., Hatano T., Nishijima S., Matsuyama K., Mori S., Ascending and descending brainstem neuronal activity during cystometry in decerebrate cats. *NeuroUrol Urodyn*, 22, 343-350 (2003)
  23. Oomura Y., Ono T., Sugimori M., Nakamura T., Effects of cyproheptadine on the feeding and satiety centers in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 1, 449-459 (1973)
  24. Oomura Y., Sugimori M., Nakamura T., Yamada Y., Contribution of electrophysiological techniques to the understanding of central control systems. *Neuronal Integration of Physiological Mechanisms and Behaviour*, 325-335 (1975)
  25. Krnjevic K., Laverty R., Sharman D.F., Ionophoretic release of adrenaline, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine from micropipettes. *Br J Pharmacol Chemother*, 20, 491-496 (1963)
  26. Bradley P.B., Candy J.M., Ionophoretic release of acetylcholine, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and D-lysergic acid diethylamide from micropipettes. *Br J Pharmacol*, 40, 194-201 (1970)
  27. Obata K., Takeda K., Shinozaki H., Electrophoretic release of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid from micropipettes. *Neuropharmacology*, 9, 191-194 (1970)
  28. Clarke G., Hill R.G., Simmonds M.A., Microiontophoretic release of drugs from micropipettes: use of <sup>24</sup>Na as a model. *Br J Pharmacol*, 48, 156-161 (1973)
  29. Zieglgansberger W., Sothmann G., Herz A., Ionophoretic release of substances from micropipettes in vitro. *Neuropharmacology*, 13, 417-422 (1974)
  30. Sasa M., Igarashi S., Fujiwara H., Inagaki C., Comparison between fluorimetric and radiochemical assays of iontophoretically released noradrenaline from a seven-barrel micropipette. *Jpn J Pharmacol*, 28, 639-642 (1986)
  31. Blok B.F., Holstege G., Direct projections from the periaqueductal gray to the pontine micturition center (M-region). An anterograde and retrograde tracing study in the cat. *Neurosci Lett*, 166, 93-96 (1994)
  32. Blok B.F., De Weerd H., Holstege G., Ultrastructural evidence for a paucity of projections from the lumbosacral cord to the pontine micturition center or M-region in the cat: a new concept for the organization of the micturition reflex with the periaqueductal gray as central relay. *J Comp Neurol*, 380, 300-309 (1995)
  33. Valentino R.J., Miselis R.R., Pavcovich L.A., Pontine regulation of pelvic viscera: pharmacological target for pelvic visceral dysfunctions. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 253-260 (1999)
  34. Valentino R.J., Pavcovich L.A., Hirata H., Evidence for corticotropin-releasing hormone projections from Barrington's nucleus to the periaqueductal gray and dorsal motor nucleus of the vagus in the rat. *J Comp Neurol*, 363, 402-422 (1995)



35. Taniguchi N., Miyata M., Yachiku S., Kaneko S., Yamaguchi S., Numata A., A study of micturition inducing sites in the periaqueductal gray of the mesencephalon. *J Urol*, 168, 1626-1631 (2002)
36. Nour S., Svarer C., Kristensen J.K., Paulson O.B., Law I., Cerebral activation during micturition in normal men. *Brain*, 123 ( Pt 4), 781-789 (2000)
37. Matsuura S., Kakizaki H., Mitsui T., Shiga T., Tamaki N., Koyanagi T., Human brain region response to distention or cold stimulation of the bladder: a positron emission tomography study. *J Urol*, 168, 2035-2039 (2002)
38. Floyd N.S., Price J.L., Ferry A.T., Keay K.A., Bandler R., Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol*, 422, 556-578 (2000)
39. Ding Y.Q., Zheng H.X., Gong L.W., Lu Y., Zhao H., Qin B.Z., Direct projections from the lumbosacral spinal cord to Barrington's nucleus in the rat: a special reference to micturition reflex. *J Comp Neurol*, 389, 149-160 (1997)
40. Blok B.F., Holstege G., The pontine micturition center in rat receives direct lumbosacral input. An ultrastructural study. *Neurosci Lett*, 282, 29-32 (2000)
41. Blok B.F., Sturms L.M., Holstege G., Brain activation during micturition in women. *Brain*, 121 ( Pt 11), 2033-2042 (1998)
42. Blok B.F., Willemsen A.T., Holstege G., A PET study on brain control of micturition in humans. *Brain*, 120 ( Pt 1), 111-121 (1997)
43. Athwal B.S., Berkley K.J., Hussain I., Brennan A., Craggs M., Sakakibara R., Frackowiak R.S., Fowler C.J., Brain responses to changes in bladder volume and urge to void in healthy men. *Brain*, 124, 369-377 (2001)
44. Kuipers R., Mouton L.J., Holstege G., Afferent projections to the pontine micturition center in the cat. *J Comp Neurol*, 494, 36-53 (2005)
45. Holstege G., Meiners L., Tan K., Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res*, 58, 379-391 (1985)
46. Hopkins D.A., Holstege G., Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res*, 32, 529-547 (1978)
47. Iling R.B., Graybiel A.M., Complementary and non-matching afferent compartments in the cat's superior colliculus: innervation of the acetylcholinesterase-poor domain of the intermediate gray layer. *Neuroscience*, 18, 373-394 (1986)
48. Mouton L.J., Holstege G., Segmental and laminar organization of the spinal neurons projecting to the periaqueductal gray (PAG) in the cat suggests the existence of at least five separate clusters of spino-PAG neurons. *J Comp Neurol*, 428, 389-410 (2000)
49. Wiberg M., Blomqvist A., The spinomesencephalic tract in the cat: its cells of origin and termination pattern as demonstrated by the intraaxonal transport method. *Brain Res*, 291, 1-18 (1984)
50. An X., Bandler R., Ongur D., Price J.L., Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 401, 455-479 (1998)
51. Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W., Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, 348, 41-79 (1994)
52. Freedman L.J., Insel T.R., Smith Y., Subcortical projections of area 25 (subgenual cortex) of the macaque monkey. *J Comp Neurol*, 421, 172-188 (2000)
53. Hardy S.G., Leichnetz G.R., Cortical projections to the periaqueductal gray in the monkey: a retrograde and orthograde horseradish peroxidase study. *Neurosci Lett*, 22, 97-101 (1981)
54. Redgrave P., Dean P., Mitchell I.J., Odekunle A., Clark A., The projection from superior colliculus to cuneiform area

- in the rat. I. Anatomical studies. *Exp Brain Res*, 72, 611-625 (1988)
55. Roeling T.A., Veening J.G., Kruk M.R., Peters J.P., Vermelis M.E., Nieuwenhuys R., Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat. *Neuroscience*, 59, 1001-1024 (1994)
56. Matsuura S., Allen G.V., Downie J.W., Volume-evoked micturition reflex is mediated by the ventrolateral periaqueductal gray in anesthetized rats. *Am J Physiol*, 275, R2049-2055 (1998)
57. 橋本 忠俊, ピペコリン酸の生理的役割に関する基礎的研究: ラット脳単一神経活動, 熊本大学大学院薬学研究科修士論文.(1980)
58. 開作 淳, 中枢単一ニューロンに対する Piperidine の作用についての神経生理学的研究, 熊本大学大学院薬学研究科修士論文.(1979)

(本内容は、投稿論文として準備中である)

## 要旨

GIRK チャネルは、中枢神経系に広く分布し、神経伝達の調節を介して様々な生理機能と関わっていると考えられる。近年、当研究室では、作用機序が解明されていない中枢性鎮咳薬の研究に端を発し、調べたすべての中枢性鎮咳薬がセロトニン誘発 GIRK チャネル活性化電流を抑制することを見出した。その中で最も強い活性を示したクロベラスチンは、脳梗塞後の排尿障害も改善することを各種実験動物モデルで明らかにした。このように、GIRK チャネルの抑制剤が排尿障害治療薬ともなる可能性があるが、GIRK チャネルの鎮咳作用や排尿障害改善作用との関連については、不明な点が多く残されている。クロベラスチンの GIRK チャネル抑制メカニズムについても明らかにされていない。現在、有効な GIRK チャネルブロッカーは、ハチ毒でペプチドのテルチアピンしかなく、そのテルチアピンも他の  $K_{ir}$  チャネルを抑制するなど、真に選択的な GIRK チャネルブロッカーとは言えない。このようなことから、GIRK チャネルの役割の解明、GIRK チャネルをターゲットにした医薬品の開発の上で、選択的かつ活性の強い GIRK チャネルブロッカーの開発が望まれる。

本研究においては、選択的 GIRK チャネルブロッカーの開発も視野に、クロベラスチンの GIRK チャネル抑制メカニズムを明確にすることを目的として、以下の実験を行った。第一に、 $5\text{-HT}_{1A}$  受容体アゴニストである  $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$  のラット縫線核急性単離ニューロンに対する作用を outside-out パッチクランプ法によりシングルチャネルレベルで解析した。また、 $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$  誘発電流に対する  $5\text{-HT}_{1A}$  受容体アンタゴニストのスビペロン、 $K^+$ チャネルブロッカーの  $\text{Ba}^{2+}$ 、GIRK チャネルブロッカーのテルチアピンの作用を検討した。これにより、本実験で得られた電流が GIRK 電流であることを確認した。第二に、クロベラスチンの単一 GIRK チャネルに対する作用を検討し、スビペロン、 $\text{Ba}^{2+}$ 、及びテルチアピンの作用と比較した。以下に成績を示す。

### 1) 急性単離縫線核ニューロンにおける $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$ 誘発シングルチャネル電流の解析

ラット縫線核急性単離ニューロンにおいて、 $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$  ( $3\times 10^{-9}$  M) は 22.7 pS のチャネルの開確率を増加させた。スビペロン ( $10^{-7}$  M)、 $\text{Ba}^{2+}$  ( $3\times 10^{-6}$  M)、テルチアピン ( $3\times 10^{-7}$  M) はいずれもこのシングルチャネル電流を抑制した。このことからこの電流が  $5\text{-HT}_{1A}$  受容体を介する GIRK チャネル電流であることが示唆された。

### 2) クロベラスチンの $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$ 誘発シングルチャネル電流に対する作用

細胞外から投与したクロベラスチン ( $10^{-6}$  M) は、 $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$  存在下のシングルチャネル電流のコンダクタンスに影響することなく、平均開時間を短縮し、長い成分の平均閉時間を延長した。その抑制様式は、開時間を変えずに閉時間を延長したスビペロン、開時間と閉時間に有意な影響を与えなかった  $\text{Ba}^{2+}$ 、および2つの開時間成分の存在比を変えたテルチアピンとは異なることが明らかとなった。さらに細胞内から作用させたクロベラスチンも  $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$  による単一 GIRK チャネル電流の開確率の増加を強く抑制した。

本研究は、クロベラスチンの GIRK チャネル抑制作用が、オープンチャネルブロックによるものではない可能性、ならびに、 $G_{\beta\gamma}$  サブユニットと GIRK チャネルとの相互作用の阻害によるものでもない可能性を示唆する。また、クロベラスチンは細胞膜を透過して細胞内側から GIRK チャネルを抑制する可能性が示唆される。本知見は、より選択的な GIRK チャネルブロッカーの開発、ひいては GIRK チャネルをターゲットとした新規医薬品開発の上で重要な基礎知見を与えるものと考えられる。

## 第1章 緒論

内向き整流性カリウム( $K_{ir}$ )チャネルは、膜電位非依存性のイオンチャネルで、静止膜電位の形成に重要なイオンチャネルである。この  $K_{ir}$ チャネルは、4つのサブユニット分子からなり、各々のサブユニット分子は、2つの膜貫通領域とそれに挟まれイオン選択

を行うポア領域、N末端及びC末端の細胞内領域から成る共通した構造をとる<sup>2)</sup>(Fig. 1.1)。また、Kirチャネルは共通して、膜リン脂質であるPIP<sub>2</sub>による調節を受ける。つまり、Kirチャネルの開口には細胞内ドメインの塩基性アミノ酸アルギニンと結合したPIP<sub>2</sub>が必要であり、PIP<sub>2</sub>の枯渇はチャネルの閉口を起こすと考えられている<sup>3, 4, 5)</sup>。

これらKirファミリーの中でG蛋白質共役型内向き整流性カリウム(GIRK)チャネルは、G蛋白質共役型受容体の刺激によって活性化されるG蛋白質のβγサブユニット(G<sub>βγ</sub>)により、直接活性化される。これにより神経伝達物質やホルモンに依存して細胞が過興奮し、興奮が抑制される。G<sub>βγ</sub>はチャネルのゲート機構を変えずに、開口できるチャネルの数を増加させると報告されている<sup>6)</sup>。

ところで、近年本研究室においては、非麻薬性中枢性鎮咳薬の作用メカニズム解明の過程で、これらが5-HT<sub>1A</sub>受容体誘発GIRKチャネル活性化電流を抑制する事を明らかにした。これをきっかけに、本研究室の研究により、中枢性鎮咳薬の中で最も強いGIRKチャネル活性化電流抑制作用をもつクロベラスチンが、脳梗塞後の排尿障害を改善することが実験動物レベルで明らかになった。しかし、鎮咳作用や排尿障害の改善作用にGIRKチャネルがかかわるかは不明な点が多い。現在のところ特異的かつ選択的GIRKチャネルブロッカーは存在しない。GIRKチャネルブロッカーと言われるテルチアピンも、ROMK1チャネルなど他のKirチャネルを強く抑制する。また、テルチアピンは21個のアミノ酸からなるペプチドであり、GIRKチャネルの抑制剤としてin vivoで用いることには問題がある。このようなことから、低分子の特異的GIRKチャネルブロッカーの開発が薬理学ツールとしても、新規医薬品としても求められる。

クロベラスチンは、GIRKチャネルを抑制することが報告されているいくつかの医薬品や薬物の中で最も強い作用をもつ。このようなことから、クロベラスチンによるGIRKチャネルの抑制メカニズムを知ることは、有用な基礎知見を提供すると考えられる。これまでの本研究室での検討では、クロベラスチンがGIRKチャネルの細胞内ドメインに作用してPIP<sub>2</sub>とGIRKチャネルとの相互作用を抑制する可能性が考えられる。しかし、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。そこで本研究では、一分子のイオンチャネルの機能を直接電流としてリアルタイムに精度良く測定できる細胞膜パッチクランプ法により、シングルチャネルレベルでクロベラスチンのGIRKチャネル抑制メカニズムを検討した。

本論文の第3章では、ラット縫線核急性単離ニューロンにおける8-OH-DPAT誘発シングルGIRKチャネル電流の電気生理学的・薬理学的特性について記述し、第4章では、8-OH-DPAT誘発シングルGIRKチャネル電流に対するクロベラスチンの作用について記述した。本論文はこれに総括と結論(第5章)を加えてまとめたものである。

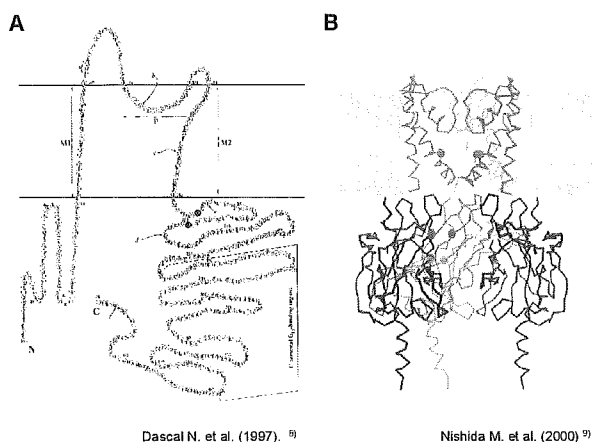


Fig. 1.1. Schematic drawing of GIRK channel.

A: Primary structural view of amino acid sequence involved in GIRK1 channel. In red, arginine 191 and arginine 219 were found to interact with PIP<sub>2</sub>. B: Stereo view of the GIRK channel model. The transmembrane pore of the Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> (MthK) channel from *Methanobacterium autotrophicum* (red and yellow) was docked by matching the 4-fold axis with that of the cytoplasmic pore of the GIRK channel (blue and green) and bring the C-terminal end of the inner helix close to the N terminus of the cytoplasmic pore's C-terminal fragment (dashed lines).

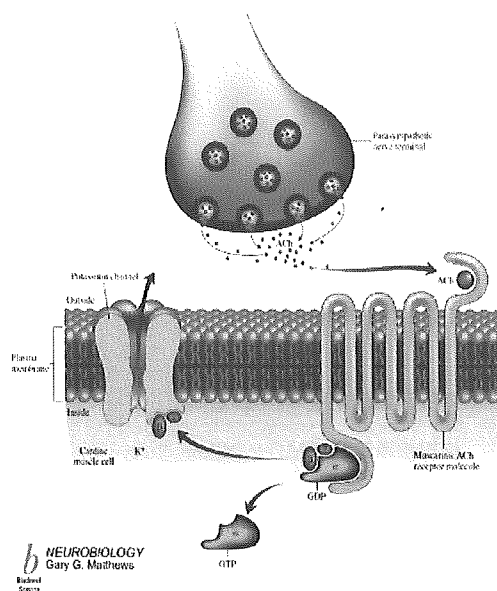


Fig. 1.2. Functional model for G protein activation of GIRK channel.