

## 延髄呼吸性ニューロン群の中樞性化学刺激に対する応答様式

—— ラット延髄薄切標本での pre-Bötzinger complex ニューロンの  
律動的バーストに及ぼす CO<sub>2</sub>, pH 変化の効果 ——

渡 邊 昭 彦

札幌医科大学医学部生理学第2講座 (主任 青木 藩 教授)

## Responses to Central Chemostimuli of the Medullary Respiratory Neurons

—— Effects of CO<sub>2</sub> and pH Changes on the Rhythmic Bursts  
of the pre-Bötzinger Complex Neurons in Rat Medullary Slice Preparations ——

Akihiko WATANABE

*Department of Physiology (Section 2), Sapporo Medical University School of Medicine  
(Chief: Prof. M. AOKI)*

**ABSTRACT** In *in vitro* rat brainstem-spinal cord preparations, the pre-Bötzinger complex (pre-BötC) has been assumed to be the kernel for spontaneous respiratory rhythm generation and to induce inspiratory motor discharges in the hypoglossal nucleus (XII) neurons and the phrenic motoneurons. The present study was undertaken to clarify the following two points: 1) whether or not the pre-BötC neurons within the ventral respiratory group in the medulla exhibit central chemosensitive responses to CO<sub>2</sub> and pH changes; and 2) which is the primary chemosensory stimulus, CO<sub>2</sub> or pH, if they do indeed exhibit chemosensitivities. The author examined electrophysiologically the responses of the pre-BötC neurons to CO<sub>2</sub> and pH changes in transverse medullary slices (~900 μm thick) of neonatal rat (1-5 days old).

Synchronized spontaneous respiratory bursts (0.07~0.2 Hz) in the pre-BötC and the XII neurons were recorded simultaneously with extracellular glass microelectrodes. The responses to CO<sub>2</sub> and pH were examined in four different groups: Group 1 (10% CO<sub>2</sub>, pH 7.1; n=9), Group 2 (10% CO<sub>2</sub>, pH 7.4; n=5), Group 3 (5% CO<sub>2</sub>, pH 7.1; n=8), and Group 4 (5% CO<sub>2</sub>, pH 7.7; n=10). All slices were subjected to various chemical stimuli for 5 minutes. During recordings, slices were continuously superfused (3-4 ml/min) with mock cerebrospinal fluid with elevated extracellular K<sup>+</sup> concentration (10 mM) equilibrated with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> at 26-29°C.

The pre-BötC neurons were observed to respond in parallel with the XII neurons to various chemical stimuli. Groups 1 and 3 produced a significant increase (Group 1: 40±9.1%, mean ± SE, Group 3: 53±8.1%) in the burst frequency of pre-BötC neurons about 3 minutes after the onset of stimuli. Group 2, the normal pH range, however, produced no significant effects on the rhythmic bursts of the pre-BötC neurons. Group 4 showed a significant decrease (20±4.2%). There were no significant changes in the burst duration, intraburst spike frequency and amplitude of the bursts of the pre-BötC neurons in the above conditions.

The present data demonstrate that pre-BötC neurons respond to changes of CO<sub>2</sub> and/or pH in transverse medullary slices. The extracellular H<sup>+</sup> in particular seems to be the primary chemosensory stimulus in determining the burst frequency. These findings suggest that central chemosensitive neuronal components modulating respiratory rhythm are located at the pre-BötC region and the spontaneous rhythmic activity of the pre-BötC neurons reflects eupneic respiratory activity.

(Received December 17, 1997 and accepted January 7, 1998)

**Key words:** Transverse medullary slice, Pre-Bötzinger complex, Central chemosensitivity, Neonatal rat.

## 1 緒 言

哺乳動物の呼吸運動は、いわゆる脳幹の呼吸中枢を形成する神経回路を基盤とし、そこで形成された呼吸性ニューロンの律動的リズムが脊髄前角の呼吸筋支配運動ニューロンを経て、呼吸筋へ伝達されるものと考えられてきた<sup>1)</sup>。しかし最近では、上部頸髄を含む、より広範な神経回路網が想定されている<sup>2)</sup>。この呼吸性ニューロンは橋-延髄から上部頸髄にかけて広く分布するが、中でも延髄呼吸中枢を形成するニューロン群は、背側呼吸ニューロン群 (dorsal respiratory group; DRG) と腹側呼吸ニューロン群 (ventral respiratory group; VRG) とに大別されている。更に、VRG は吻側から尾側に向かって、構成するニューロンタイプにより、Bötzinger complex (BÖT), rostral VRG (rVRG), caudal VRG (cVRG) に区分されている<sup>3)</sup>。ところが近年になって、Smith *et al.*<sup>4)</sup> が新生ラットの摘出脳幹脊髄標本と延髄スライス標本を用いて、rVRG の吻側端で BÖT に隣接する部位に呼吸リズムのオシレーター様の性質を持つニューロン群が存在することを報告し、この部位を新たに pre-Bötzinger complex (pre-BötC) と名付けた。

これまで呼吸リズム形成機構については、ネットワーク説とペースメーカー説に大きく分類されていた。しかし両者は全く別個の概念ではなく、最近ではペースメーカーが回路網の一部を形成しているというハイブリッドモデルが示され、pre-BötC 内ニューロン群が呼吸リズム発現のための神経回路の中核 (kernel) を成すという作業仮説が提唱されている<sup>5,6)</sup>。これに対し、このニューロン群が形成するリズムに関しては、*in vitro* の非生理的な条件下でのリズムであり、*in vivo* で低酸素暴露時に出現する gasping (あえぎ呼吸) リズムに類似した異常パターンで、正常な呼吸リズムを反映したものではないとの批判がある<sup>7)</sup>。正常な呼吸リズムでは、横隔神経のバースト (群発射) を積分した波形が漸増漸減のいわゆるベル型を示すのに対し、この gasping リズムでは、急速に立ち上がりゆっくり低下する型に変化すること、また、そのバースト頻度は変化しえても、パターンは変化しないことが特徴とされている<sup>7)</sup>。

この様に、pre-BötC 内ニューロンの律動的な自発性

バーストに関しては、未解明な点も残されているが、延髄内の呼吸リズム形成機構にかかわるニューロン回路の特性を解析するためには、*in vitro* の標本の方が利点が多い<sup>8-10)</sup>。とりわけ延髄スライス標本は末梢からの求心性入力の影響を完全に除外でき、摘出脳幹脊髄標本に比較しても関与する神経回路が限定されているという利点を有する<sup>9)</sup>。特に呼吸性ニューロンの化学感受性を検索する場合には、末梢化学受容器の影響を全く受けない状態で、しかも *in vivo* 実験での麻酔薬等の影響も除外でき、純粋に中枢性化学感受性 (CO<sub>2</sub>, pH) についてのみ検討できるため、非常に優れたモデルといえる。ところが、今までの化学刺激に対する呼吸中枢神経機構の電気生理学的応答様式を調べた報告は、もっぱら摘出脳幹脊髄標本を用い、呼吸性の出力である横隔神経や舌下神経の活動を記録したものであった<sup>11,12)</sup>。呼吸性ニューロンも含めて検討したものは、やはり摘出脳幹脊髄標本を用いた Kawai *et al.*<sup>13)</sup> の報告のみで、延髄スライス標本を用いて pre-BötC 内ニューロンについて中枢性化学感受性を検討したものは、未だみあたらない。

そこで著者は、今回、限定された神経回路しか持たない延髄スライス標本において、(1) pre-BötC 内ニューロンは中枢性化学感受性を示すのか、(2) もし感受性を示す場合、CO<sub>2</sub>, pH のどちらに依存した応答を示すのか、について明らかにすることを目的とした。もし、この限定された条件下で、pre-BötC 内ニューロンが化学感受性を示せば、このニューロンは化学刺激で調節される性質を有することになり、pre-BötC 内ニューロンが形成する自発性リズムは低酸素暴露時の異常な gasping リズムというよりも、正常な呼吸性リズムを反映したものであると推察されうる。この仮説を検証するため、本報では、厚さ約 900 μm の新生ラット延髄スライス標本 (生後 1-5 日目) を用い、pre-BötC 内ニューロンの律動的自発性バーストと、その入力を受けて同期発火する舌下神経核 (XII) 運動ニューロンの自発性バーストを呼吸性出力の指標<sup>14)</sup> として同時細胞外記録し、中枢性化学刺激が及ぼす効果について電気生理学的に検討した。

本研究の成績の一部は、既に抄録として発表済みである<sup>15)</sup>。

## 2 実験方法

### 2.1 標本作製

実験動物として、生後1-5日目のWistar系新生ラット32匹(体重5-14g)を用いた。ハロセン麻酔下に胸髄レベルで切断後、すばやく前頭骨と頭頂骨の間で前頭部を除去し、95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合ガスで飽和(酸素化)した氷冷標準人工脳脊髄液(ACSF) [組成(mM): NaCl 123, KCl 3.5, MgSO<sub>4</sub> 1.3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.64, CaCl<sub>2</sub> 2.4, NaHCO<sub>3</sub> 20, Glucose 30, pH: 7.4] 内で慎重に脳幹脊髄を摘出した。次いで、摘出した標本を手動的に吻側はobexより約700 μm、尾側はobex直下で横切断し、厚さ約900 μmのスライス標本作製した(Fig. 1, 上段)。標本作製には約15分を要した。

スライスは、pre-BötCとXIIニューロンの両方を含んでいる必要があるため、1匹のラットから1枚作製した。得られたスライスは、直ちに、酸素化した26~29°Cの測定用ACSFを3~4 ml/minで灌流した浸水型の実験槽内(容量1.8 ml)に移した。測定用ACSFは、pre-BötC内ニューロンから長時間安定した自発性のバーストを記録できるようにするため<sup>4)</sup>、標準ACSF中のK<sup>+</sup>濃度を調節したものを使用した[KCl 10 mM]。この状態で30分以上浸漬させた後、記録を開始した。

### 2.2 記録方法とデータ解析

スライス標本は、尾側面をガラス面に張り付け、実験槽内に固定した。記録電極には、Fast Green FCFで飽和した2MのNaClを充填した微小ガラス電極(抵抗1-5 MΩ)を用いた。本スライス標本では、XIIニューロンの吸息性バーストを呼吸活動の指標として用いた。そのため、まず初めに水圧式マイクロマニピュレーター(MO-8, ナリシゲ)を用いてXII内に電極を刺入し、律動的に発火を繰り返す自発性のバーストを細胞外記録した。次いで、三次元水圧式マイクロマニピュレーター(WR-90, ナリシゲ)を用いて延髄腹外側部の疑核周辺に刺入し、XIIニューロンと同期して発火する律動性バーストを記録した(Fig. 1, 下段)。記録されたバーストは、前置増幅器(JB-101J, 日本光電)で増幅後、オシロスコープ(VC-10, 日本光電)上で観察し、チャートレコーダー(RT 3300, 日本電気三栄)上に描記した。また、同時にデータレコーダー(RD-101T, TEAC)で記録し、off-line解析した。

解析項目は、バースト頻度、振幅、バースト幅、バースト内スパイク頻度の4項目とした(Fig. 2)。バーストの頻度、振幅については、積分器(積分ユニット1322, 日本電気三栄, 全波整流; 減衰時定数0.1秒)にて

バーストを積分した波形を用いて計測した。バースト頻度は、cycle lengthを計測後、その逆数をとって算出した。振幅については、基線から波形の頂点までを計測した。また、バースト内のパラメータとしてバースト幅、バースト内スパイク数の2項目を市販のIBM computer用ソフトウェア(Brain Wave, Discovery Ver. 3.2)を用いて計測した。バースト内スパイク頻度は、スパイク数をバースト幅で割ることにより算出した。得られたデータは全て、連続した5バーストを抽出し平均化した値とした。そして、各項目ごとに対照値(100%)と比較し、その変化の割合をまとめた。

### 2.3 化学的刺激

ACSF中で10分以上安定してバーストが記録されたものを対象とし、この間の記録を対照群とした。化学刺激として10% CO<sub>2</sub>、各種pHを用い、それぞれについてpre-BötC内呼吸性ニューロンの応答様式を検討した。実験槽内の酸素分圧、炭酸ガス分圧、pHはそれ

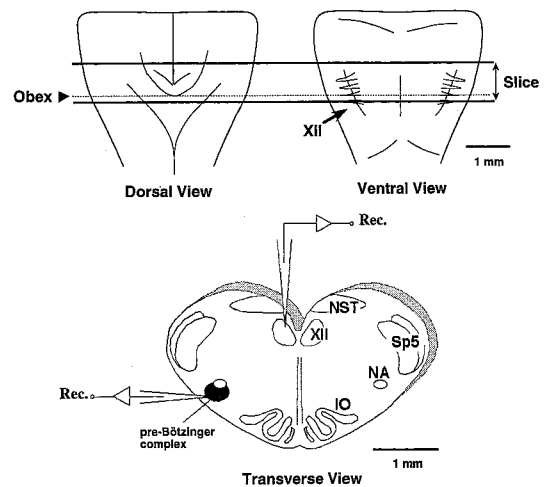
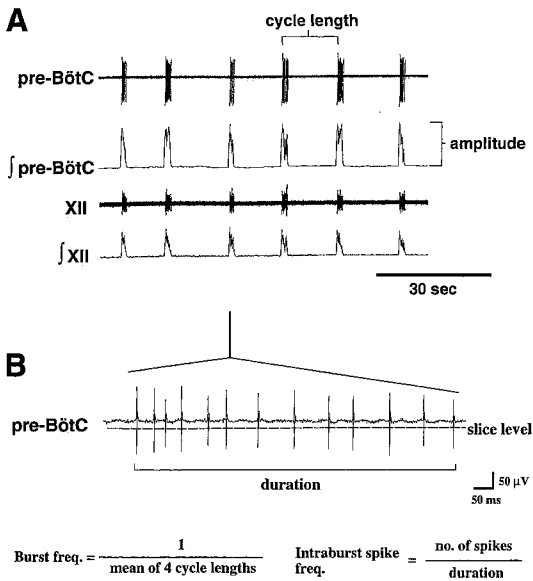


Fig. 1 Schematic drawing of the transverse medullary slice (~900 μm thick) containing the pre-Bötzing complex (pre-BötC) obtained from a neonatal rat (1-5 days old). Recordings were made using extracellular glass microelectrodes from the pre-BötC and hypoglossal nucleus (XII) motoneuron. During electrophysiological recordings, slices were continuously superfused (3-4 ml/min) with mock cerebrospinal fluid with elevated extracellular K<sup>+</sup> concentration (10 mM) equilibrated with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> at 26-29°C. Shaded area indicates schematically the location of the pre-BötC. Abbreviations of anatomical structures: NA, nucleus ambiguus; NST, nucleus of the tractus solitarius; Sp5, spinal trigeminal nucleus; IO, inferior olive; XII, hypoglossal nucleus.



**Fig. 2** Representative recording and data analysis. A: an example of synchronized respiratory burst activities in pre-BötC inspiratory neurons and XII motoneurons. Lower trace of each record shows the integrated activities of the pre-BötC and XII neurons. B: an example of intraburst spike activities in a single burst from pre-BötC shown in a faster time scale. A quantitative analysis was carried out to measure cycle length (burst frequency) and amplitude. Average values were evaluated by averaging the percentage change values obtained from 5 consecutive bursts per slice.

それ、血液ガス分析装置 (ABL-30, Radiometer 社)、pH メーター (F-13, HORIBA) を用いて計測した。

### 2・3・1 10% CO<sub>2</sub> 負荷に対する応答

90% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 混合ガスで飽和した ACSF (Pco<sub>2</sub> 65-70 mmHg, pH 7.1-7.15) を用いた。上記のように CO<sub>2</sub> を負荷した場合、それに伴って溶液の pH も自然に変化する。そこで、ACSF 中のリン酸と重炭酸の濃度を調節することにより pH の値を変化させ、同一条件で pH だけを 7.4 と正常にした群も設定した。一回の負荷時間は 5 分間とし、充分回復した後、同様の操作を 2 回繰り返して応答の再現性も検討した。

化学刺激の負荷時間に関しては、5~10 分間程度の報告が多く<sup>16,17)</sup>、予備実験にても 5 分間の負荷時間で十分な応答が得られ、比較検討に十分なデータが採取可能であった。

### 2・3・2 pH 変化に対する応答

95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスで飽和した ACSF (Pco<sub>2</sub> 35-40 mmHg) の pH の値を上記と同様、リン酸と重炭

酸の濃度を調節することにより変化させた。pH を下げた場合 (アシドーシス) だけでなく、上げた場合 (アルカローシス) についても検討した。負荷時間は 5 分間とし、同様な操作を 2 回繰り返した。実験槽内の pH は、記録開始前と終了時に計測したが、変化量は 0.05 以内であった。

### 2・4 ニューロン活動記録部位の組織学的同定

細胞外記録を行ったニューロンの部位を同定するため、記録終了後に、ガラス管記録電極に 20 μA の負電流を 20~30 分間通電し Fast Green FCF を電気泳動的に流出させマーキングした。固定液には 1% paraformaldehyde, 0.25% glutaraldehyde, 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) の混合液を用いた。24 時間の固定後、20% 蔗糖加磷酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) 中に保存し、後日、マイクロームで厚さ 50 μm の連続凍結組織切片を作製した。記録部位の観察は、トルイジンブルーまたはニュートラルレッド染色後、明視野顕微鏡下に観察し同定した。

### 2・5 統計処理

得られた測定値は、平均値及び標準誤差 (mean ± SE) で表示した。有意差検定には Student's *t*-test, Welch's *t*-test (unpaired) を用い、危険率 P < 0.05 の場合を有意差ありとした。

## 3 成 績

*In vitro* での呼吸性ニューロンのバースト頻度は温度条件に依存して変化し、持続性 (tonic) 発射も温度上昇とともに増加することが報告されている<sup>18)</sup>。しかし、本実験における 26~29°C の温度条件では、安定したバーストが得られ、持続性発射成分の混入はほとんど無かった。また、本実験に先立つ予備実験においては、30°C を越えてくると持続性発射が著明となり律動的な呼吸性ニューロンのバーストを判別する事が困難となった。本実験条件下では自発性のバーストを最大 5 時間まで記録できた。

負荷開始前の記録を対照群 (n=32) としたが、このときのバースト頻度は、4~12 バースト/分 (0.07~0.2 Hz) であった。この値は、過去の報告<sup>9)</sup>とも、ほぼ一致している。また、積分したバーストの波形は、pre-BötC と XII ニューロンのどちらも急速に立ち上がり、徐々に低下するパターンであった (Fig. 2)。

実験は、CO<sub>2</sub> と pH の値により、Group 1: 10% CO<sub>2</sub> 群 (pH 7.15) (n=9), Group 2: 10% CO<sub>2</sub>, pH 7.4 群 (n=5), Group 3: pH 7.1-7.15 群 (5% CO<sub>2</sub>) (n=8), Group 4: pH 7.7 群 (5% CO<sub>2</sub>) (n=

10) の4群に分類して行った。

### 3.1 CO<sub>2</sub> 負荷に対する応答

#### 3.1.1 10% CO<sub>2</sub> (pH 7.1-7.15) 負荷に対する応答 (Group 1)

Pre-BötC と XII ニューロンの CO<sub>2</sub> 負荷に対する応答の代表的経過例をみると (Fig. 3A), 5分間の負荷に対して, 一部 tonic な発射の混入も認められるが, pre-BötC と XII ニューロンの同期した関係は乱れることなく, 1:1 で対応していた。この関係は, 以後の実験でも同様であった (not shown) ため, 以下に提示するデータは, 全て pre-BötC 内ニューロンの活動を計測したものとした。

バースト頻度は, 10% CO<sub>2</sub> 負荷に対して増加し, 負荷開始後 2~3 分で反応のピークを示した。負荷終了後は徐々に減少し 6~7 分で対照値の状態にまで回復した (Fig. 3A<sub>2</sub>)。反応の再現性を確認するため同様な操作を 2 回繰り返し施行した (Fig. 3B)。10% CO<sub>2</sub> 負荷によりバースト頻度は 1 分後より徐々に増加し, 3 分後には対照値の 40±9.1% にまで増加した。1 回目・2 回目ともに非常によく一致した経過を示し, 再現性のある反応であった。

#### 3.1.2 10% CO<sub>2</sub>, pH 7.4 負荷に対する応答 (Group 2)

1 回目・2 回目の負荷中のバースト頻度の経時的変化をみると, 2 分後に一部有意に減少 (13.3±4.4%) しているところもあるが, 全体的にみるとほとんど対照値のままであった (Fig. 4A)。5 分間の負荷に対して, 10% CO<sub>2</sub> を単独に負荷した前群と異なり, pH を 7.4 に保つとバースト頻度はほとんど変化しなかった。1 回目・2 回目ともに非常によく一致した経過を示し, 再現性のある反応であった。

### 3.2 pH 変化に対する応答

#### 3.2.1 pH 7.1-7.15 (5% CO<sub>2</sub>) 負荷に対する応答 (Group 3)

CO<sub>2</sub> 濃度を 5% (Pco<sub>2</sub> 34-40 mmHg) に保ち, pH だけを強制的に下げた場合, 反応の経過は Group 1 と同様であった (Fig. 4B)。1 回目・2 回目の負荷中のバースト頻度の経時的変化は, Group 1 の場合より反応性が大きかった。バースト頻度は 1 分後より徐々に増加し, 3 分後には対照値の 53±8.1% にまで増加した。この場合も, Group 1 同様に, 再現性のある反応であった。

#### 3.2.2 pH 7.7 (5% CO<sub>2</sub>) 負荷に対する応答 (Group 4)

反応の経過を見ると (Fig. 4C), pH を下げた Group

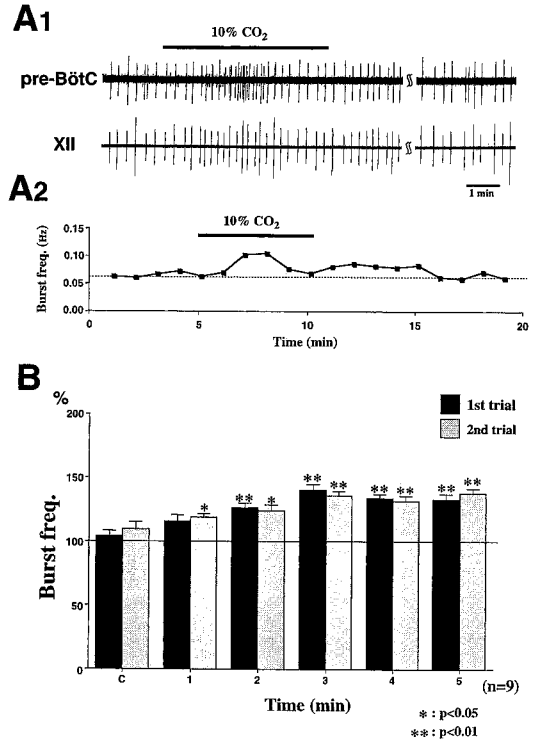


Fig. 3 Changes in burst frequency of the group data in Group 1. A<sub>1</sub>: a representative record of a pre-BötC neuron. Respiratory rhythmic burst activities were simultaneously recorded from the pre-BötC and a XII neuron during this experiment. A<sub>2</sub>: time course of the burst frequency in the pre-BötC neuron. B: time course of changes in burst frequency in Group 1 (n=9). Graph shows the percentage changes from the control value. Asterisks show statistically significant differences from the control values using Student's *t*-test or Welch's *t*-test (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01).

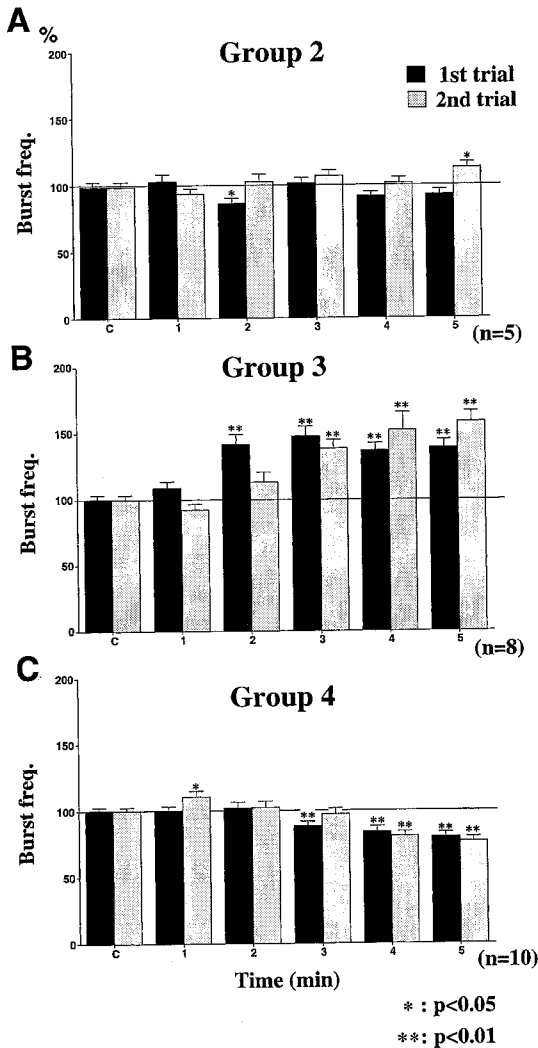
3の場合とは逆で, バースト頻度は減少した。負荷開始後 3分以上経過すると有意に減少し, 最終的には対照値の 20±4.2% にまで減少した。1 回目・2 回目ともによく一致した経過を示し, 再現性のある反応であった。

### 3.3 中樞性化学刺激に対する応答のまとめ

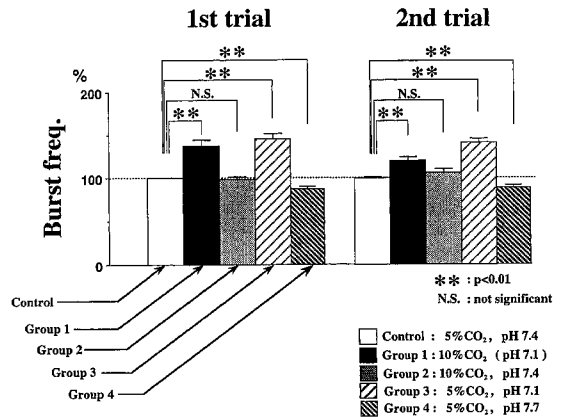
これまでの結果から, 各群での反応性のピークは 3 分前後であることから, 2~4 分の間で反応のピーク時の測定値を抽出し, 各群間で比較検討した (Fig. 5)。バースト頻度は CO<sub>2</sub> レベルを 5% から 10% に変化させたとき, 有意に増加した。そしてこの増加は, pH を正常域に保つと消失した。また, pH を下げた Group 3 においては, Group 1 と非常によく一致した結果を示し, かつ反応性も大きかった。更に, Group 3 とは逆に pH を

上げた Group 4 においては、バースト頻度が有意に減少しており、バースト頻度は pH の値に依存して変化した。

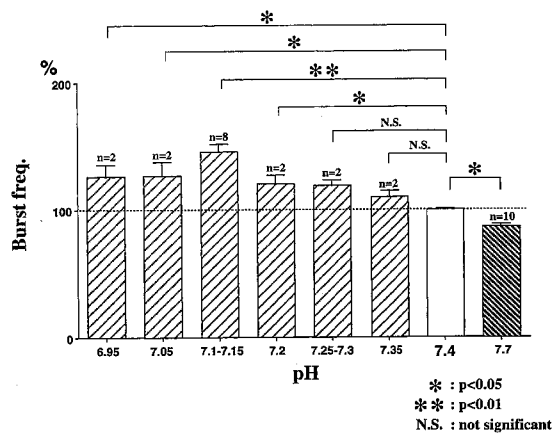
そこで、少数例 (n=2) ではあるが、この可能性を検討するため Group 3, 4 も含め pH を様々に変化させたときのバースト頻度についても実験した (Fig. 6)。バースト頻度は、pH を下げ始めると pH に依存して徐々に増加していき、pH 7.2 以下で有意差が得られた。この



**Fig. 4** Changes in burst frequency of the group data in Group 2, Group 3 and Group 4. A, B and C: time course of changes in burst frequency in each group. Graphs show the percentage changes from the control value. Asterisks show statistically significant differences from the control values using Student's *t*-test or Welch's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 5** Changes in burst frequency of the group data in the four groups. Graph shows the percentage changes from the control value. Average values were obtained from 5 consecutive bursts per slice before (control) and during maximal increase or maximal decrease of the burst frequency under each condition. Groups 1 and 3 demonstrate significant increase (Group 1: 40%, Group 3: 53%), whereas Group 2, the normal pH range, produced no significant effects on the rhythmic bursts of the preBötC neurons. Group 4 shows a significant decrease (20%). Asterisks show statistically significant differences from the control values using Student's *t*-test or Welch's *t*-test (\*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 6** Effects of various pH changes. Average values were obtained from 5 consecutive bursts per slice before (pH 7.4) and during maximal increase or maximal decrease of the burst frequency under each pH value condition. Note that changes in burst frequency of the respiratory neurons in the pre-BötC are dependent on protons. Asterisks show statistically significant differences from the control values using Student's *t*-test or Welch's *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

バースト頻度の増加は、pH 7.15-7.1 でピークに達し、以後有意差はあるが pH を 7.0 以下に下げても反応性が更に増大することはなかった。

最後に、バースト幅、バースト内スパイク頻度、振幅について 4 群間で比較した (Fig. 7)。測定値は、CO<sub>2</sub>・pH を変化させたときの反応性のピーク時を抽出し、比較している。対照値と比較し、CO<sub>2</sub>・pH を変化させても有意な変化は認められなかった。

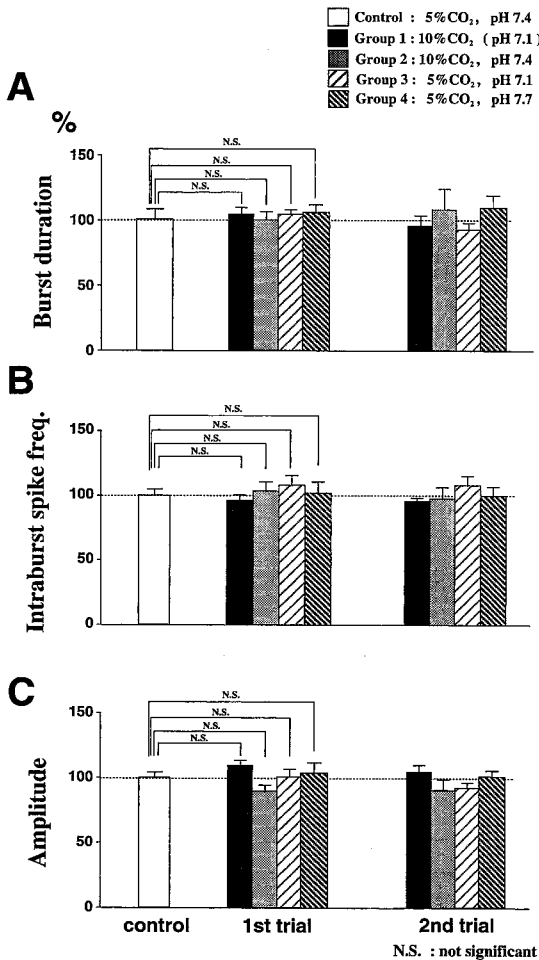


Fig. 7 Changes in burst duration (A), intraburst spike frequency (B) and amplitude (C) of the group data in the four groups. Graphs show the percentage changes from the control value. Average values were obtained from 5 consecutive bursts per slice before (control) and during maximal increase or maximal decrease of the burst frequency under each condition. There were no significant changes in the burst duration, intraburst spike frequency and amplitude of the bursts of the preBötC.

### 3・4 ニューロン活動記録部位の組織学的同定

記録終了後、連続凍結組織切片を作製した (Fig. 8)。ニューロン活動記録部位は、吻側表面より 200~300  $\mu\text{m}$  の深さに延髄腹外側部疑核の腹側周囲に集中していた。黒丸ドットで示した記録部位は、pre-BötC、即ち obex より吻側側にほぼ 300~600  $\mu\text{m}$  の部位<sup>4)</sup>と一致していた。

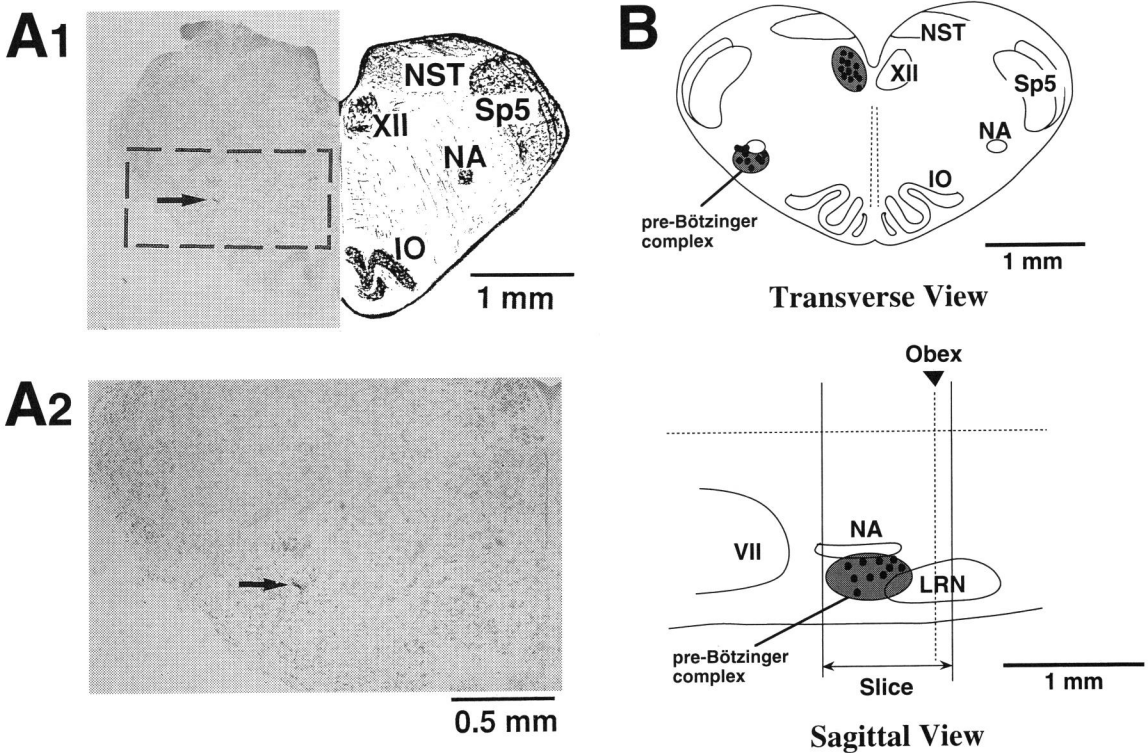
## 4 考 察

### 4・1 延髄スライス標本の問題点

本研究で用いたスライス標本で、まず問題となる点は新生ラットを用いたことである。呼吸の神経回路の発達を考えると、マウスでは生後 1 週目以降に有意な変化が起こると報告されており<sup>19)</sup>、生後 7 日目と 8 日目は一つの大きな区切りとなりうる。従って、実験としては 8 日目より成熟したラットの方がより適していると考えられるが、今のところ長時間安定して記録できるのは 0~7 日目までの新生ラットの場合だけである。これには、脳幹スライス標本にした場合、新生動物の方が成熟動物よりも 20% 以上も代謝率が低いことも関与している<sup>20)</sup>。次に温度条件であるが、摘出標本灌流モデルでは、生体と異なり物質交換が全て拡散により行われる。そのために、温度を下げて組織での代謝を抑制し、かつ酸素溶解度を高めたほうが内部環境の維持に有利となる<sup>21,22)</sup>。従って、通常脳幹スライス実験では、温度条件は 27°C 前後に設定されている<sup>5)</sup>。本研究において、対照値のバースト頻度が 4~12 回/分と少ない理由の一つは、この温度条件にも起因している。

### 4・2 中枢性化学感受性

生体においては、動脈血中 Pco<sub>2</sub> が 35~60 mmHg の間で著明な肺胞換気の変化が認められる<sup>23)</sup>。そのため本研究では、応答が明確に得られるように 5% CO<sub>2</sub> (Pco<sub>2</sub> 35-40 mmHg) に対して 10% CO<sub>2</sub> (Pco<sub>2</sub> 65-70 mmHg) を選択した。また、pH に関しては、細胞が機能しうる生理的な pH の範囲は、ほぼ 6.8~7.8 の間であるとの報告もあり<sup>24)</sup>、今回の実験における pH の検討範囲は充分なものであったと考えられる。しかし、拡散により物質交換が行われるスライス標本においては、組織内で O<sub>2</sub> や pH の濃度勾配ができてしまうことを考慮する必要がある<sup>25)</sup>。Voipio, Ballanyi<sup>12)</sup> は摘出脳幹脊髄標本で CO<sub>2</sub>-H<sup>+</sup> 感受性微小電極を用いて組織内の CO<sub>2</sub>, pH を実測した。この報告を基に考えると、本実験での pre-BötC 内ニューロンの記録部位は吻側表面より 200~300  $\mu\text{m}$  の深さに集中しており、灌流液の pH が 7.4 のとき、記録部位での pH は 7.1 前後であると予想



**Fig. 8** Photomicrographs of Fast Green FCF-dyed sites in transverse medullary slices and schematic drawing of the location in dyed spots. A<sub>1</sub>: obex +400  $\mu$ m. Dyed site is shown by the arrow. A<sub>2</sub>: higher magnification of the rectangular area. Dyed site is shown by the arrow. B: recording sites are in accord with previous studies<sup>4)</sup>. Shaded area indicates schematically the location of the pre-BötC. Abbreviations of anatomical structures: LRN, lateral reticular nucleus; NA, nucleus ambiguus; NST, nucleus of the tractus solitarius; Sp5, spinal trigeminal nucleus; IO, inferior olive; XII, hypoglossal nucleus.

される。この拡散の影響を最小限にするためには、より薄いスライス標本を作製する必要があるものと考えられる。

中枢性化学感受性については、解剖学的・組織学的に担当細胞あるいは受容器が完全に同定されているわけではなく<sup>5,26)</sup>、その受容野についても意見が分かれている<sup>16,17)</sup>。また、脳幹における中枢性化学感受性については、H<sup>+</sup>に依存しているという学説が広く受け入れられ、CO<sub>2</sub>の効果はH<sup>+</sup>生成を介して及ぼされる間接的作用と理解されてきたが<sup>27,28)</sup>、この点に関しては、最近では細胞外H<sup>+</sup>に依存しないCO<sub>2</sub>の直接的効果が報告されており<sup>16,26)</sup>、未だに決着がつかない。本実験では、10% CO<sub>2</sub> 負荷に対して、バースト頻度の増加が認められ、本スライス標本においても pre-BötC 内呼吸性ニューロンは、CO<sub>2</sub> 負荷に対して応答することが観察された。これらの応答に関しては、2回の負荷に対して

同様な反応が得られ、再現性のある応答であった。しかも、本スライス標本での中枢性化学感受性は、pHの変化即ち細胞外H<sup>+</sup>濃度の変化に基づいた作用であった(Fig. 5 参照)。この結果は、最近の摘出脳幹脊髄標本を用いた報告とも一致している<sup>12)</sup>。また、CO<sub>2</sub>の効果に関しては、間接的効果が主であることが示唆された。しかし、本実験においては灌流液の濃度を変化させているだけで、組織内や細胞内のPco<sub>2</sub>、pHを実測しているわけではないので、今回の結果はCO<sub>2</sub>の直接的効果を直ちに否定しているものではない。

また、呼吸性ニューロンのバースト活動がpHに依存して変化するだけでなく、アシドーシスに対する反応性にはピークが存在し、ある限界を超えると換気応答が逆に抑制される可能性が示唆された(Fig. 6 参照)。しかし、この点に関しては、実験例数を増やし、更に検討していく必要があると考えている。



### 4.3 pre-Bötzinger complex neuron の化学感受機序

脳脊髄液中の pH の変化に対して換気応答が認められる領域が延髄腹外側 (ventrolateral medulla, VLM) 表面に存在することは既に知られており、ネコではこの受容野が少なくとも三つの部位 (rostral, intermediate, and caudal areas) で同定されている<sup>27,28)</sup>。本研究では、厚さ約 900  $\mu\text{m}$  の延髄スライス標本を用いたが、本スライス標本においても、この caudal area の受容野が一部含まれていることになる。また、近年、化学感受性について、いわゆる従来中枢性化学受容野と考えられていた VLM 表面以外にも広く延髄内に存在することが報告されており<sup>29)</sup>。最近の見解では、pre-BötC 領域を含む VLM 内に存在する呼吸性ニューロンにも化学感受性があるものが存在し、腹外側部表面に樹状突起を伸ばしているものまであることが示されている<sup>13)</sup>。従って、本研究において、pre-BötC 内呼吸性ニューロンが、CO<sub>2</sub>、pH の変化に対して、何らかの換気応答を示すであろう事は予測可能なことであつた。

実際の実験結果では、本スライス標本でも pre-BötC 内呼吸性ニューロンが中枢性化学感受性を示し、細胞外 H<sup>+</sup> に依存してそのリズムが調節を受けることが示された。この結果は、呼吸リズムを修飾する構造が pre-BötC を含む延髄レベルに存在することを直接的に示すものである。更に、スライス標本という非常に限定された神経回路しかない条件下で、pre-BötC 内ニューロンに化学感受性が認められたということは、このニューロンが化学調節を受ける性質を保有していることを示すもので、pre-BötC 内ニューロンが形成する自発性のバーストリズムは低酸素暴露時の gasping リズムというよりも、むしろ正常な呼吸性リズムを反映していると考えられる。

また、本実験においては、バースト内のパラメーターは有意な変化を示さなかった (Fig. 7)。この結果は、摘出脳幹脊髄標本での XII 神経根を記録した報告とも一致している<sup>17)</sup>。このことは、中枢性化学刺激に対し、pre-BötC 内呼吸性ニューロンはバーストのパターンを変化させることなくリズムのみを変化させるという形で応答したことを示している。即ち、新生ラットから作製した本延髄スライス標本においては、化学刺激がパターンジェネレーター細胞に影響することなしに、リズム形成機構に関与する神経回路だけに影響を与えることを示唆するものである。

しかしながら、今回の検討では、化学刺激に対する pre-BötC 内呼吸性ニューロンの応答が、いわゆる

chemoreceptor を介して起こるものなのか、呼吸性ニューロン自身による直接的応答なのかについては不明である。この点に関しては、細胞内記録やパッチクランプ法を用いるなど、pre-BötC 内ニューロンの性質そのものを更に解析していく必要があると考えられる。また、スライス標本における pre-BötC 内ニューロンの自発性リズムが、正常な呼吸性リズムなのか gasping リズムを反映したものなのかの問題を更に解明していくためには、新生動物だけではなく、より成熟した動物を用いての実験を行う必要もあると考えられる。

## 5 要 約

厚さ約 900  $\mu\text{m}$  の新生ラット延髄スライス標本 (生後 1-5 日目) を用い、延髄呼吸性ニューロン群に属する pre-Bötzinger complex (pre-BötC) 内ニューロンの律動的な自発性バースト (群発射) と、その入力を受けて同期発火する舌下神経核 (XII) 運動ニューロンの自発性バーストを同時細胞外記録し、中枢性化学刺激である CO<sub>2</sub>、pH を変化させたときの応答様式を電気生理学的手法で検討し、以下の成績を得た。

1) 各種化学刺激に対し、pre-BötC と XII 内ニューロンは同期した関係を乱すことなく反応した。バースト頻度は CO<sub>2</sub> レベルを 5% から 10% に変化させた場合、40% の有意な増加を示した。しかし、この換気応答は、pH を正常域に保つと消失した。

2) CO<sub>2</sub> レベルを 5% に保ち pH を下げてアシドーシスとした場合は、バースト頻度が (1) と同様に有意に増加 (53%) した。逆に pH を上げてアルカローシスとした場合には、バースト頻度が有意に減少 (20%) した。また、これらの応答様式は、全て再現性のある反応であつた。以上の結果より、pre-BötC 内呼吸性ニューロンは、pH に依存してそのバースト頻度を変化させることが示された。

3) 応答のピーク時と比較したバースト幅、バースト内スパイク数、振幅については、有意な変化は認められなかった。つまり、中枢性化学刺激に対し pre-BötC 内呼吸性ニューロンは、バーストのパターンを変化させることなくリズムのみを変化させた。

本実験では、延髄スライス標本においても、pre-BötC 内呼吸性ニューロンは、*in vivo* や摘出脳幹脊髄標本での報告と同様な中枢性化学感受性を示し、この感受性は細胞外 H<sup>+</sup> に依存していることが観察された。以上の成績より、呼吸リズムを修飾する構造は pre-BötC を含む延髄レベルにも確かに存在し、延髄横断スライス標本において pre-BötC 内ニューロンが形成する自発性の

バーストリズムは、正常な呼吸性リズムを反映したものであると推測される。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました本学生理学第2講座、青木 藩教授に深謝いたします。また、貴重な御助言を賜りました麻酔学講座、並木昭義教授に深謝いたします。最後に、本研究の遂行に際し御助言、御協力いただいた藤戸 裕助教授はじめ教室員各位に深謝いたします。

#### 参 考 文 献

- Euler C von. Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. In: Fishman AP, Cherniack NS, Widdicombe JG, Geiger SR, editors. *Handbook of Physiology: the respiratory system*. Bethesda, Maryland, American Physiol Soc, 1986, Section 3, Vol II: 1-67.
- 青木 藩. 哺乳動物における上部頸髄の呼吸性ニューロン群の機能的構成. *日本生理学会誌* 1993, 55: 141-152.
- 江連和久. 延髄呼吸性ニューロン群の分類. *神経進歩* 1994, 38: 353-364.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 1991, 254: 726-729.
- Feldman JL, Smith JC. Neural control of respiratory pattern in mammals: an overview. In: Dempsey JA, Pack AI, editors. *Regulation of breathing*. 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 1995, 39-69.
- Ramirez JM, Richter DW. The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6: 817-825.
- St. John WM. Medullary regions for neurogenesis of gasping: no eud vital or no euds vitals? *J Appl Physiol* 1996, 81: 1865-1877.
- Onimaru H, Homma I. Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res* 1987, 403: 380-384.
- McLean HA, Remmers JE. Respiratory motor output of the sectioned medulla of the neonatal rat. *Respir Physiol* 1994, 96: 49-60.
- Völker A, Ballanyi K, Richter DW. Anoxic disturbance of the isolated respiratory network of neonatal rats. *Exp Brain Res* 1995, 103: 9-19.
- Harada Y, Wang YZ, Kuno M. Central chemosensitivity to H<sup>+</sup> and CO<sub>2</sub> in the rat respiratory center in vitro. *Brain Res* 1985, 333: 336-339.
- Voipio J, Ballanyi K. Interstitial PCO<sub>2</sub> and pH, and their role as chemostimulants in the isolated respiratory network of neonatal rats. *J Physiol (London)* 1997, 499: 527-542.
- Kawai A, Ballantyne D, Mückenhoff K, Scheid P. Chemosensitive medullary neurones in the brainstem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol (London)* 1996, 492: 277-292.
- Smith JC, Greer JJ, Liu GS, Feldman JL. Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J Neurophysiol* 1990, 64: 1149-1169.
- Watanabe A, Aoki M. Responses of the pre-Bötzinger complex and hypoglossal nucleus neurons in neonatal rat medullary slices to CO<sub>2</sub> and pH (abstract). *Jpn J Physiol* 1996, 46 (Suppl): S59.
- Morin-Surun MP, Boudinot E, Schafer T, Denavit-Saubie M. Localization of chemosensitive structures in the isolated brainstem of adult guinea-pig. *J Physiol (London)* 1995, 485: 203-212.
- Richerson GB. Response to CO<sub>2</sub> of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. *J Neurophysiol* 1995, 73: 933-944.
- Paton JFR, Ramirez JM, Richter DW. Functionally intact in vitro preparation generating respiratory activity in neonatal and mature mammals. *Pflugers Arch* 428: 250-260, 1994.
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Richter DW. Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J Physiol (London)* 1996, 491: 799-812.
- Ballanyi K, Völlker A, Richter DW. Functional relevance of anaerobic metabolism in the isolated respiratory network of newborn rats. *Pflugers Arch* 1996, 432: 741-748.
- Llinas RR. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 1988, 242: 1654-1664.
- Nishizaki T, Yamauchi R, Tanimoto M, Okada Y. Effects of temperature on the oxygen consumption in thin slices from different brain

- regions. *Neurosci Lett* 1988, 86: 301-305.
23. Guyton AC. *Basic Neuroscience: anatomy & physiology*. 2nd ed. Philadelphia, Saunders, 1991.
24. Marini JJ, Wheeler AP. *Critical care medicine: the essentials*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1989.
25. Ramirez JM, Quellmalz UJ, Wilken B. Developmental changes in the hypoxic response of the hypoglossus respiratory motor output in vitro. *J Neurophysiol* 1997, 78: 383-392.
26. Neubauer JA, Gonsalves SF, Chou W, Geller HM, Edelman NH. Chemosensitivity of medullary neurons in explant tissue cultures. *Neuroscience* 1991, 45: 701-708.
27. Loeschcke HH. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol (London)* 1982, 332: 1-24.
28. Millhorn DE, Eldridge FL. Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems. *J Appl Physiol* 1986, 61: 1249-63.
29. Coates EL, Li A, Nattie EE. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 1993, 75: 5-14.

---

別刷請求先:

(〒060-8556) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学医学部生理学第2講座 渡邊昭彦