

嗅球初代培養ニューロン間シナプス伝達に
対するオキシトシンの作用

山口大学大学院連合獣医学研究科

獣医学専攻

2001年3月

大迫洋治

目次

謝辞	4
基礎となる論文一覧	5
第1章 総合緒言	
1-1 緒言	7
1-2 2つの嗅覚系	10
1-3 嗅球と母性行動	11
1-4 嗅球の神経回路	14
1-5 本研究の目的	16
1-6 第1章の図	17
第2章 嗅球の初代培養	
2-1 緒言	23
2-2 材料と方法	24
2-3 結果	30
2-4 考察	31
2-5 小括	33
2-6 第2章の図	34
第3章 嗅球ニューロン間シナプス伝達に対するオキシトシンの作用 (1) -GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果-	
3-1 緒言	41
3-2 材料と方法	43
3-3 結果	44

3-4	考察	48
3-5	小括	51
3-6	第3章の図	52
第4章	嗅球ニューロン間シナプス伝達に対するオキシトシンの作用 (2) ーグルタミン酸作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果ー	
4-1	緒言	74
4-2	材料と方法	75
4-3	結果	76
4-4	考察	79
4-5	小括	81
4-6	第4章の図	82
第5章	総合考察	
5-1	結果要約	96
5-2	総合考察	98
5-3	総括	100
	引用文献	101

謝辞

本研究の遂行と本論文の執筆にあたり終始ご指導ご鞭撻を賜りました高知医科大学医学部第一生理学教室柁秀人教授に心より感謝申し上げます。また実験の遂行にあたり懇切丁寧なご指導を頂きました岡達三教授に謹んで感謝の意を表します。

また、第 2 章の研究の遂行にあたり、ご指導頂きました理化学研究所脳科学総合研究センター細胞培養技術開発チーム小川正晴チームリーダーならびに財団法人東京都神経科学総合研究所神経生化学研究部門村本和世博士に感謝の意を表します。

最後に、第 3 章、第 4 章の研究遂行にあたりご指導賜りました高知医科大学医学部第一生理学教室谷口陸男博士ならびにショーシン EM 株式会社科学機器部乙部一博様に感謝申し上げます。

基礎となる論文一覧

第2章 嗅球の初代培養

Yoji Osako, Tomoko Otsuka, Mutsuo Taniguchi, Tatsuzo Oka, Hideto Kaba

Oxytocin depresses spontaneous γ -aminobutric acid-ergic inhibitory postsynaptic currents in cultured mitral cells of the rat olfactory bulb by a presynaptic mechanism.

Neuroscience Letters 289: 25-28, 2000

Yoji Osako, Tomoko Otsuka, Mutsuo Taniguchi, Tatsuzo Oka, Hideto Kaba

Oxytocin enhances presynaptic and postsynaptic glutamatergic transmission between rat olfactory bulb neurones in culture.

Neuroscience Letters ~~(in press)~~
299: 65-68, 2001

第3章 嗅球ニューロン間シナプス伝達に対するオキシトシンの作用 (1)

—GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果—

Yoji Osako, Tomoko Otsuka, Mutsuo Taniguchi, Tatsuzo Oka, Hideto Kaba

Oxytocin depresses spontaneous γ -aminobutric acid-ergic inhibitory postsynaptic currents in cultured mitral cells of the rat olfactory bulb by a presynaptic mechanism.

Neuroscience Letters 289: 25-28, 2000

第4章 嗅球ニューロン間シナプス伝達に対するオキシトシンの作用 (2)

—グルタミン酸作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果—

Yoji Osako, Tomoko Otsuka, Mutsuo Taniguchi, Tatsuzo Oka, Hideto Kaba

Oxytocin enhances presynaptic and postsynaptic glutamatergic transmission between rat olfactory bulb neurones in culture.

Neuroscience Letters 299: 65-68, 2001

第一章

総合緒言

1-1 緒言

我々も含め動物にとって、自己の生活環境の変化を的確に検知し、それに適応することは生存していく上で必須である。そのため、動物は感覚器を駆使しその情報の獲得に努める。また、仲間同士のコミュニケーションにも感覚器が使われる。多くの動物では、とりわけ嗅覚がこれらの役割を担っており、視覚や嗅覚に頼って生活している我々の想像をはるかに越える豊かな匂いの中で生活しているらしい。例えば、マウスは嗅覚により個体識別ができるという。つまり、匂いにも個性があるというのだ。1983年、山崎らにより、この匂いの個性を決定しているのは Major Histocompatibility Complex (MHC) であるという報告がなされた。MHC とは、免疫的自己・非自己を決めている一群の糖タンパク質で、一卵性双生児以外に完全に一致する者はほとんどいないという程、ヒトごとに違っているタンパク質群である。この MHC が違う以外は完全に同じ遺伝子組成をもつコンジェニックマウスを観察すると、同じ MHC 組成を持つ雄と雌の間では交尾が起りにくかったのである。すなわち、雄と雌は互いに、自分の MHC と異なるパートナーを選別して交尾しているのである。このことにより、産まれてくる仔は、その MHC の多様性から免疫反応が強化されるし、さらには近親交配による弱体化からも逃れられる。これはマウスにとって非常に生存価値の高い行動と成り得るというのだ。では、どのようにしてマウスは MHC の識別を行っているのかというと、それは相手の匂いであるらしく、口渴ラットに水をおとりに匂い弁別学習をさせると、MHC の異なる個体（あるいは尿）の匂いをしっかり識別できたという。このように、動物はその

長けた嗅覚を用いて、極めて精巧に匂いの識別を行っているわけだが、さらに驚くことに、その匂いを記憶することもできるらしい。雌マウスを交尾後 24 時間以内に交尾相手の雄から引き離し、別の雄と同居させる（またはその尿の匂いを嗅がせる）と妊娠（着床）が阻止される現象が知られている。ブルース効果である（Bruce, 1959）。もちろん、交尾相手の雄（尿）ではみられない。というのも、雌マウスが交尾相手の雄の匂いを記憶しているからである（図 1-1）。

1959 年、Karlson と Lüscher は「個体から体外に出され、同種他個体によって受容されると、特異的な反応を引き起こす物質」を“フェロモン”と呼ぶことを提唱した。のちに効果の面から、中枢神経系に働いて直接に行動を変化させるリリーサーフェロモンと、神経内分泌系を介して生理的変化を誘起するプライマーフェロモンの二つに大別され用いられるようになった。Butenandt が雌ガから分泌される雄ガの誘引物質としてボンビコールを単離・同定してから、現在では微生物から哺乳動物に至るまでフェロモン効果が報告されている。

では、この動物達の一種神秘的とも思われるフェロモンの世界は、視覚動物といわれるヒトには無縁の世界なのだろうか。現在までヒトのフェロモンの話は湧いては消えていたが、やはりヒトにもフェロモンによるコミュニケーションがあるらしいことが、シカゴ大学の Stern と McClitock (1998) によって報告された。それは「寄宿舍効果」という現象で、女子寮で共同生活をしている女性の月経周期が一致してくるといふ。排卵日の女性の腋下分泌物（フェロモン）は排卵を遅らせ、卵胞期の女性の腋下分泌物は排卵時期を早める効果がみられた。月経周期の異なる女性が互いにこの効果を発揮すれば、2人の月経周

期はやがて同期するのである。多くの脊椎動物において、プライマーフェロモンは鼻中隔腹縁に存在している鋤鼻器（ヤコブソン器）という専用の器官で受容されるが、ヒトでは胎児期以降退行していくと思われていた。しかし、近年、大人になっても存在し続けていることも示されている（高見、1996）。どうやらヒトにも、動物達と同じようなフェロモンによる「第6感」が残存している可能性があるようである。

嗅覚は5感の中でも大脳新皮質をバイパスして海馬や扁桃体に達する唯一の感覚であり、記憶や情動をも直接動員する。このように、下等動物の原始的な行動から高等動物の心理的側面に至る幅広い領域で、嗅覚は重要な役割を担っている。

1-2 2つの嗅覚系

多くの哺乳類は、この重要な嗅覚情報を二つの主要な処理系により処理している。主嗅覚系と鋤鼻嗅覚系である (Meredith, 1983)。主嗅覚系では、鼻腔背側部の粘膜に存在する嗅上皮で受容された匂い情報が、主嗅球で最初に中継され、その後、前梨状皮質、視床背内側核などを経て、眼窩前頭皮質へ送られる (Meredith, 1983)。一方、鋤鼻嗅覚系では、鋤鼻器の嗅上皮で匂いが受容され、副嗅球で最初に中継され、扁桃体を経て視床下部へ送られる (Scalia & Winans, 1975; Keverne & Winans, 1981; Meredith, 1983) (図 1-2)。鋤鼻器とは、1811年に Jacobson により報告された器官で、多くの哺乳類では鋤鼻軟骨に包囲された葉巻形の細管で、発生の途中で鼻腔から下方へ分離独立し鼻中隔腹縁に存在する。開口部は鼻腔に開口するもの (Vaccarezza et al., 1981) や切歯管と合流して口腔と鼻腔の両方に開口するもの (Adams et al., 1984; Wada et al., 1991) など動物種により異なる。二つの処理系は、このように解剖学的形態もさることながら、機能的にも分担しており (Keverne, 1983)、プライマーフェロモンは鋤鼻嗅覚系により、リリーサーフェロモンのほとんどは主嗅覚系で処理される。主なプライマー効果とリリーサー効果を図 1-3 にまとめた。

1-3 嗅球と母性行動

母性行動とは、母親が自分の子供の正常な発達と生存を確実にするために行う行動と定義されうる。母性行動のパターンは、その新生仔の成熟度により異なるため、種属特有性がみられる (Gubernick et al., 1981; Rheingold et al., 1963; Rosenblatt et al., 1985)。ラットなどの新生仔は、活発に動くことも体温調節もできないほど未熟である。そのため、母親はあらかじめ目立たない場所に巣をつくり、出産後、そこに子どもをかくまう。巣の中では子どもの上に覆いかぶさり、自分の体温を分け与えると同時に乳汁を飲ませる。排尿・排便を刺激するため子どもを舐め、さらに子どもの尿を飲むことで、授乳による水分の損失を補っている (Baverstock et al., 1975; Friedman et al., 1981; Gubernick et al., 1985)。巣が壊れたり、子どもが巣から離れると、新しい巣をつくり、子どもを回収する。さらに巣に侵入者が近づくと、攻撃して子どもを守ろうとする。一方、ヒツジの新生仔は、感覚器が発達しており、体温も維持でき、歩くこともできるので、出生後すぐに母親についてまわれる (Hersher et al., 1963)。したがって母親の行動は、授乳と危険の回避くらいである。いずれにしても母性行動が種の保存という意味において、非常に重要であることは間違いない。では、どのようなメカニズムで分娩後の母性行動は発現するのだろうか。上述のように、その行動パターンには幾らかの違いはあるものの、母性行動の発現における基本的神経機構は、種間において非常に共通しうると思われる。なぜなら、妊娠中や分娩期の内分泌変化は、種間で非常に良く似ているからである。

母性行動の発現に関与するホルモンとしてエストロジェン、プロジェステロン、プロラクチンなどが古くから注目されてきた。これらのホルモンを投与すると、母性行動開始までの潜時が短縮されることがラット (Moltz et al., 1970; Siegel et al., 1975; Bridges, 1984)、ウサギ (Zarrow et al., 1963)、ヒツジ (Le Neindre et al., 1979) などで報じられている。とはいえものの、これらのホルモン投与では分娩を完了した動物のように迅速に母性行動を起こさなかった。そういう中で、脳内オキシトシンが母性行動を速やかに開始させることが Pederson と Prange (1979) により報告された。処女雌ラットの脳室内にオキシトシンを投与すると、1 時間以内に完全な母性行動が誘起されたというものだ。さらに、オキシトシン抗体やオキシトシンアンタゴニストを脳室内に投与すると、母性行動開始までの潜時が延長することも報告された (Fahrbach et al., 1985; Pedersen et al., 1985; van Leengoed et al., 1987)。このようなラットの母性行動におけるオキシトシンの効果は、マウスやヒツジなどにも認められている。一体、オキシトシンは脳のどこに作用して、このように母性行動を速やかに開始させるのだろうか。

実は、処女雌ラットは仔ラットの匂いに対して恐怖感を抱くらしく、これに対して忌避反応を示すことが知られている (Wiesner et al., 1933; Moltz et al., 1966; Moltz et al., 1967)。ということは、分娩を完了した雌ラットは速やかに母性行動を開始するために、仔ラットの匂いに対する忌避反応に打ち勝たないといけない (Rosenblatt, 1967; Fleming & Rosenblatt, 1974)。嗅上皮を破壊すると母性行動が促進される (Fleming & Rosenblatt, 1974)、分娩時の産道刺激により嗅球内

のオキシトシンの増加が観察されること（Kendrick et al., 1988）なども考え合わせると、分娩をきっかけに分泌されたオキシトシンが、嗅覚情報処理過程に何らかの変化を与えることが推測され、その作用部位として嗅球が考えられる。

さらに母ヒツジにおいては、自分の仔ヒツジを認識・記憶し、我が仔のみに授乳を行う。仔ヒツジは 2~4 週齢くらいにならないと母親を認識できないので、自分の母親以外のヒツジにも近付き吸乳しようとする。しかし、母ヒツジは我が仔のみを受け入れ、他の仔ヒツジを拒絶する。母ヒツジの嗅球を除去したり、嗅上皮を破壊することで、匂いを嗅げなくすると、我が仔に対する選択性が失われ、この拒絶行動は消失する。仔ヒツジの毛や皮膚の匂い情報が主嗅覚系で処理されることが、この拒絶行動の誘起に必要であるという。1992 年に、Kendrick らは分娩刺激による嗅球内情報処理の変化が、仔ヒツジの認識・記憶に関わることを示した。

このように多くの動物において、母性行動の発現やその維持に、嗅覚（嗅球）が深く関係しているのである。

1-4 嗅球の神経回路

嗅球はその構造から6層に分けられる (Maulton & Tucker, 1964; 図 1-4)。嗅細胞の軸索は、篩骨を貫通し頭蓋にはいり嗅球に達する。嗅球の表層では、嗅神経の軸索が矢状方向に吻側から尾側の方向へ互いに平行に走っている (嗅神経層)。これらの軸索は、嗅神経層では他の神経とシナプスを形成することなく、糸球体と呼ばれる球状の線維叢に終わり、そこで僧帽細胞、房飾細胞の主樹状突起とシナプスを形成する (糸球体層)。糸球体は小型の糸球体周辺細胞に取り囲まれており、糸球体周辺細胞は糸球体間を連絡するように、僧帽細胞の主樹状突起とシナプス結合している (図 1-5A)。糸球体層のさらに深層には房飾細胞があり、その大きさと位置から3種類 (外房飾細胞、中房飾細胞、内房飾細胞) に分類される (外叢状層)。それぞれの機能分化は不明であるが、その軸索投射部位は明らかに異なる。さらに、外叢状層の大きな特徴に、僧帽／房飾細胞の副樹状突起と顆粒細胞の樹状突起間に形成される相反性シナプスがある (Mori, 1987) (図 1-5A)。匂い受容に続いて興奮した僧帽細胞は、グルタミン酸を放出して顆粒細胞を興奮させる。その興奮した顆粒細胞は γ -aminobutyric acid (GABA) を放出して僧帽細胞を抑制する。すなわち負のフィードバック回路が形成されている (図 1-5B)。嗅球の主細胞である僧帽細胞は、同心円状に整列し、薄い層を形成している (僧帽細胞層)。僧帽／房飾細胞の軸索と顆粒細胞の樹状突起で内叢状層が形成される。顆粒細胞は小型で、網膜のアマクリン細胞と同様、軸索を持たない。この顆粒細胞は、層配列をしており中心管までの厚い層を形成し (顆粒細胞層)、多数の遠心性入力が見られる。

さらに、この顆粒細胞は生後も側脳室の側壁で新生し、中心管に沿って嗅球へ移動することが、Altman (1989) により報告されている。

副嗅球は嗅球と似た層構造を有しているが、その詳細は嗅球とは異なる。鋤鼻神経は篩板をこえて頭蓋へ入ると、左右の嗅球の間を後方へ向かって走り、副嗅球のところで直角に曲がり外側に向かって走り副嗅球の最上層を形成する（鋤鼻神経層）。嗅神経と同様、鋤鼻神経は糸球体で終わり僧帽細胞の主樹状突起とシナプス結合する。糸球体は、糸球体周辺細胞が少ないためその輪郭は不明瞭で、規則正しく配列しておらず大きさも大小様々である。僧帽細胞の配列は見られず、僧帽細胞層は嗅球のようにはっきりしない。さらに、嗅球では顆粒細胞層の下に外側嗅索の走行が観察されるが、副嗅球では顆粒細胞層の上に見られる。

1-5 本研究の目的

前述したように、マウス、ラット、ヒツジなど多くの動物において、嗅覚系が母性行動の発現に深く関与していることが報告されている。なかでも、ラットの母性行動に関しては、その行動学的、電気生理学的研究が進んでおり、オキシトシンが嗅球内ニューロンに作用し嗅覚情報処理機構を修飾することが強く示唆されている。しかしその詳細は不明である。そこで本研究では、ラット嗅球の初代培養ニューロンにパッチクランプ法を用いて、オキシトシンの嗅球内ニューロンに対する作用を解析し検討する。

培養系は、細胞構築が単純な故に、多くの実験操作が容易であり、かつ実験条件の厳密な制御を可能にする。このような利点を生かし、大脳皮質や小脳などにおいて、その機能解析に多大な貢献をもたらしてきた。そこで、まず第 2 章において、なるべく生体内の特徴を維持した、ラット嗅球の初代培養ニューロンの獲得を試みた。

僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起は双方向性シナプスを形成し（図 1-5）、大きな特徴でもあり、解析を困難にしている要因のひとつでもある。そこで第 3 章では、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を遮断し、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの作用を検討した。

続く第 4 章では、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達を遮断し、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果を検討した。

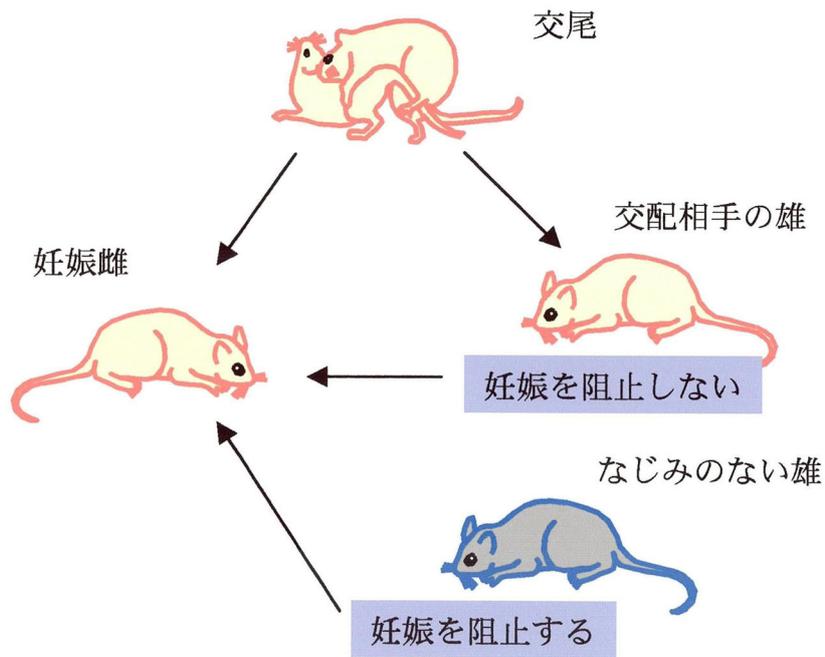


図1-1 ブルース効果の模式図。雌マウスを交尾後24時間以内に交尾相手の雄から引き離し、なじみのない雄（尿）と一緒にしておくと妊娠が阻止される。交尾相手の尿では阻止されない。これは、交尾刺激を契機として雌マウスが交尾相手の尿中フェロモンを記憶するからである。

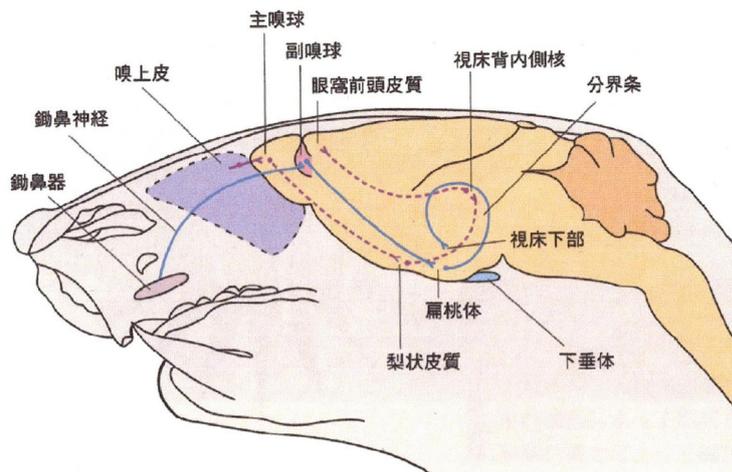


図1-2 主嗅覚系と鋤鼻系の神経経路図。主嗅覚系では鼻腔粘膜の嗅上皮で匂いが受容され、最初に主嗅球で中継されたあと、梨状皮質、視床背内側核などを経て眼窩前頭皮質へ送られる（紫破線）。鋤鼻嗅覚系では鋤鼻器で受容された匂いは、副嗅球を経て、扁桃体内側核に至り、さらに視床下部へ送られる（青実線）。

（梶 秀人：細胞工学（1998）17：1284-1294より転載）

リ リ ー サ ー 効 果	雄の誘引	雌ガから分泌される物質は雄ガを誘引する。 雌ハムスターが分泌するHVFは雄を誘引し、雄の性行動を促進する。
	雌の誘引	雄ブタの唾液に含まれる物質は、発情雌ブタを誘引し、ロードーシスを引き起こす。
	母と仔の絆	母ヒツジは我が仔の匂いを記憶し他の仔を拒絶する。 新生仔ラットは生後間もない時期に母ラットの乳首の匂いに対する条件付けが成立する。
プ ラ イ マ ー 効 果	Vandenbergh 効果	雄マウスの尿の匂いは幼若雌マウスの性成熟を早める。
	Whitten 効果	雄マウスの尿の匂いは、雌マウスだけの群居生活で非発情状態にある成熟雌マウスに発情を誘起する。
	Bruce 効果	交尾相手以外の雄マウスの尿の匂いが着床を阻害する。
	Lee-Boot 効果	雌マウスの尿の匂いは雌マウスの性成熟を遅らせたり、発情を抑制したりする。

図1-3 主なリリーサー効果とプライマー効果。リリーサー効果には、異性を誘引する効果、母と仔の絆を形成する効果などがあり、プライマー効果には、生殖活動に関係する効果がある。

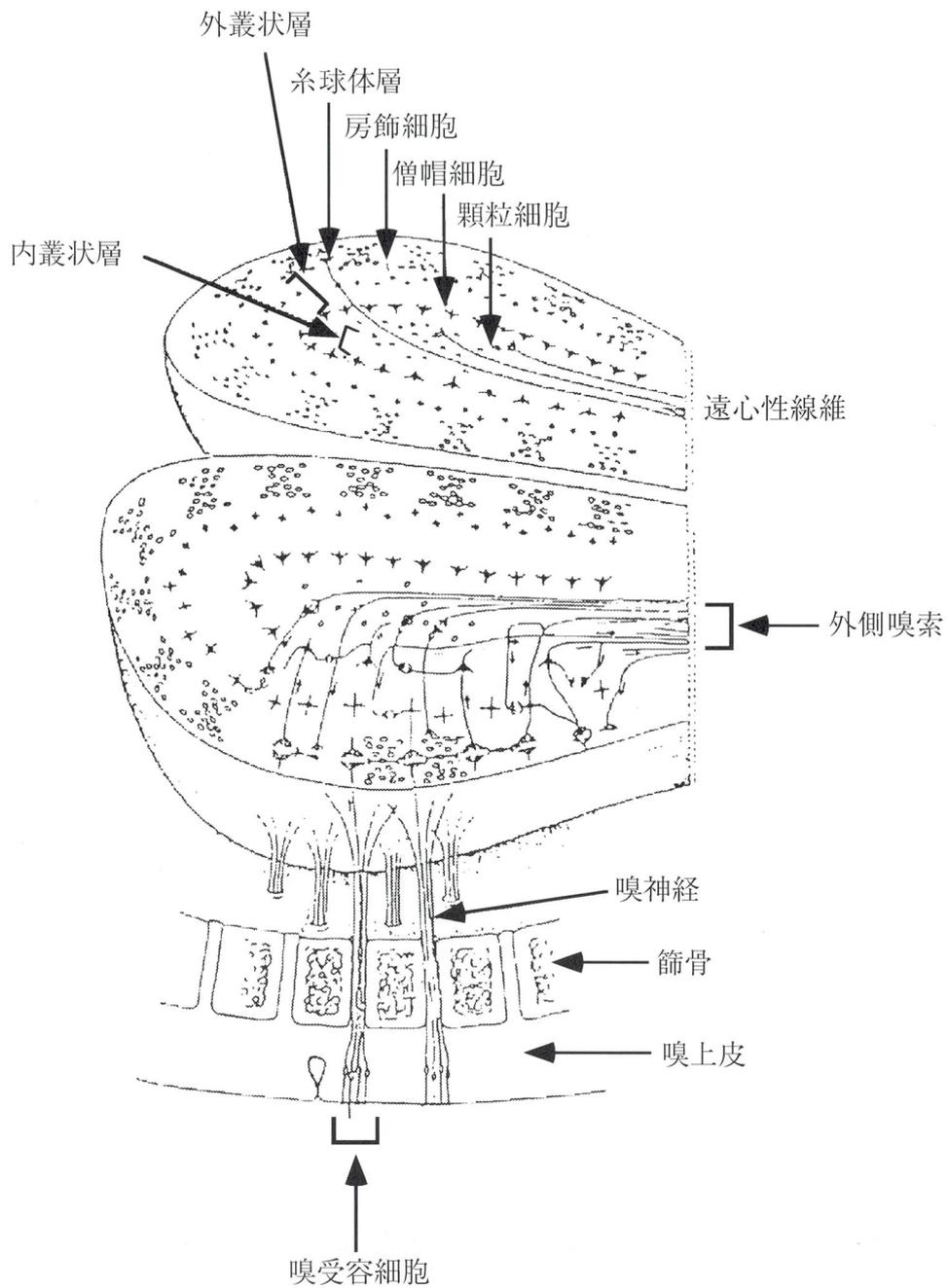


図1-4 ウサギ嗅球断面図。嗅球はその形態的特徴から6層に分けられる。表層から深層に向かって、嗅神経線維層、糸球体層、外叢状層、僧帽細胞層、内叢状層、顆粒細胞層である。(Maultion & Tucker: Ann. N. Y. Acad. Sci., 16, 380-428, 1964を一部改変)

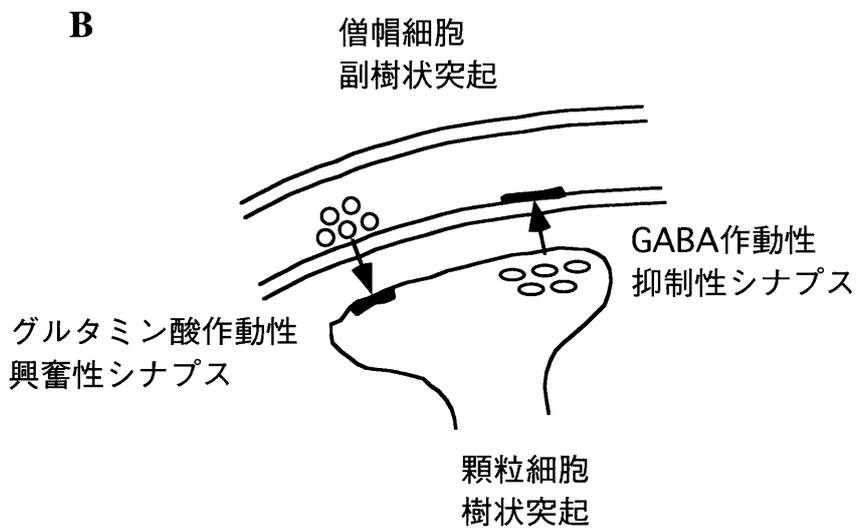
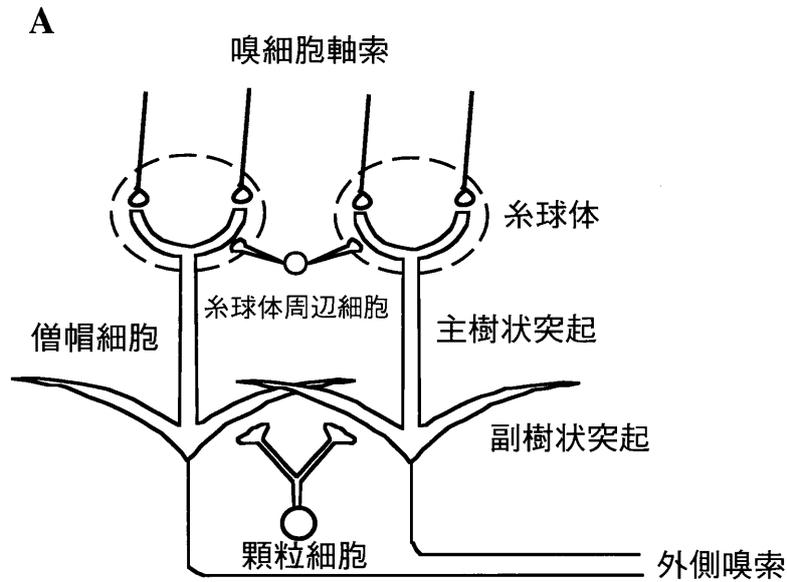


図1-5 僧帽細胞と顆粒細胞による嗅球内神経回路。顆粒細胞は樹状突起を外叢状層まで伸ばし、僧帽細胞の副樹状突起と樹状樹状突起間シナプスを形成する。このシナプスは双方向性で、僧帽細胞から顆粒細胞へ向かうグルタミン酸作動性興奮性シナプスと、顆粒細胞から僧帽細胞へ向かうGABA作動性抑制性シナプスが隣接して形成される。この樹状樹状突起間シナプスを介して僧帽細胞は側方抑制を受け、匂い分子に対する反応特異性が高められている。

第二章

嗅球の初代培養

2-1 緒言

母性行動を誘起するオキシトシンの作用部位は嗅球であることは第一章で述べた。嗅球では、数種類のニューロンが整然と配列し層状構造を形成し、それらが構築する神経回路網も比較的単純である（第 1 章 図 1-4）。しかし、嗅球はその構造がシンプルで、比較的他の脳部位から独立しているとはいえ、特定脳領域から遠心性線維の入力が豊富に認められるのも事実である。さらに、僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起間シナプスが、海馬や小脳などに見られる一方方向性シナプスと異なり、双方向性シナプスを形成しているのも大きな特徴の一つであり、このことが解析を困難にしている要因の一つでもある。このような理由から、オキシトシンのさらなる作用機序を解析するにあたって、なるべく少数のニューロンから成る神経回路上での解析が必要であり、細胞構築を単純化した *in vitro* 実験モデル系が有効だと思われる。特に、初代培養系では、単一細胞における電気生理学的・薬理的アプローチが容易であり、かつ実験条件を厳格に制御できるため、個々の細胞の全体的な機能から、チャネルやレセプターのレベルまでの解析が可能になる。そこで、なるべく生体内の電気生理的性質を保持した、初代培養嗅球内ニューロンの獲得に努めた。

2-2 材料と方法

2-2-1 嗅球の初代培養

嗅球を Wister ST ラットの胎仔から取り出し、以下の 1) ~20) の手順に従い培養を行った。

- 1) 妊娠 20~21 日齢のラットを、エーテルにより麻酔する^①。
- 2) 70%エタノールを染み込ませたキムタオルを敷いたバットの上に、妊娠ラットをのせる。
- 3) 妊娠ラットの腹部に 70%エタノールをよく噴霧してから、大ハサミと大ピンセットを用いて腹部の皮膚を切開し、大きく広げる^②。
- 4) 腹膜を 70%エタノールでよく噴霧してから、Mosquito と Metzenbaum で腹膜を切開し子宮を露出させる。
- 5) 子宮を摘出し、90 mm ペトリディッシュに満たした作業液 [50%培養液+50% PBS (-)] に浸ける。
- 6) 小ハサミを用いて子宮壁を切開し、胎仔を取り出す。
- 7) 胎仔を断頭して、スプリングハサミを用いて頭皮、頭蓋骨を剥離し、先曲がりの精密ピンセットで脳全体を取り出す^③。
取り出した脳は 90 mm ペトリディッシュに満たした作業液に浸ける。このとき、ペトリディッシュはバットの中に敷いた保冷剤の上で冷やす^④。
- 8) 作業液に浸けておいた脳を、別の 90 mm ペトリディッシュの上に裏返して置き、大脳側から嗅球へ向かって髄膜を直の鉤付き精密ピンセットでゆっ

くり剥離していく^⑤。

- 9) 脳を表にして大脳側から嗅球へ向かって9)と同様にして髄膜を剥離する^⑥。
- 10) 大脳から嗅球を分離し、保冷剤の上の、作業液で満たした35 mm ペトリディッシュの中へ嗅球を浸す。
- 11) 作業液ごと嗅球を遠沈管へ移し、しばらく静置する。
- 12) 組織が沈んだら上清を捨て、0.01%DNase I 入りパパイン消化液 (4 ml) 中で34℃で20分間インキュベートする^⑦。
- 13) 培養液 (5 ml) で3回洗い、0.01%DNase I 入り培養液 (2 ml) に浸す^⑧。
- 14) パスツールピペットで嗅球片を出し入れし、細胞を単離する^⑨。
- 15) 1000g で5分間遠心して細胞を集める。
- 16) 上清を捨て、培養液 (1 ml) を加え、パスツールピペットで軽く攪拌する。
- 17) 細胞浮遊液の一部を採取し、血球計算盤で細胞数を数える^⑩。
- 18) 5×10^5 cells/cm² (1×10^6 cells/ml) となるように培養液で希釈しカバーガラス入りディッシュに播く^⑪。
- 19) 37℃、5%CO₂、飽和水蒸気のインキュベーターで維持し、1週間に1回半量ずつ培養液を交換する。

●プロトコールの注意点

- ①妊娠18日齢の胎仔ラットの嗅球を培養すると、僧帽細胞リッチな培養ができ、胎生末期から出生直後の仔ラットでは顆粒細胞の含有率が上がる。
- ②70%エタノール噴霧の主な目的は切開の際に毛が飛んで汚染しないようにす

ることであり、皮膚を大きく切開することがコンタミを防ぐ。

- ③脳底に先曲がりピンセットの先端を入れ脳神経束を切断し、さらに嗅球へ投射している嗅神経束も切断してから、脳全体をすくうように取り出す。
- ④氷冷だと、溶けた氷の水分によるコンタミが起りやすいので保冷剤を使用した。
- ⑤嗅球の半分位まで剥離する。それ以上剥離すると嗅球が分離してしまう。
- ⑥鉤に髄膜を引っ掛け、後頭側から剥いでいく。なるべく1枚の膜として剥離することが重要。また嗅球の部分はひっかかりやすいので、嗅球が脳から分離しないように慎重に行う。
- ⑦DNaseを加えないと、壊れた細胞などからDNAがでてからみつき、後で酵素を取り除くときに苦労する。37℃以上だと神経細胞が障害を受ける可能性がある。
- ⑧血清入りの培養液でよく洗い、酵素を不活化する。
- ⑨パスツールピペットの先端を火であぶり、先端の大きいものと小さいものを2種類用意しておく。始めに先端内径の大きいピペットを用い、嗅球片が小さくなったら内径の小さいピペットを用いる。あまりピペッティングをやり過ぎると、細胞収量は上がるが、生きた細胞の割合が減る。
- ⑩トリパングルーを用いて、生細胞と死細胞の区別を行う。
- ⑪1 ウェルが底面積 2 cm^2 、容量 1 ml の4穴ディッシュに、それぞれ $\phi 13\text{ mm}$ のカバーガラスを入れその上に細胞を播く。カバーガラスは超音波洗浄器でよく洗浄し、乾熱滅菌した後、0.2%ポリエチレンイミン溶液でコートする。

●試薬の調製

・ パパイン消化液

L-塩酸システイン	20 mg
BSA (bovine serum albumin)	20 mg
グルコース	500 mg
PBS (-) (リン酸緩衝食塩水)	100 ml

上記の溶液を 4 ml ずつ分注し、-20℃で保存しておく。使用する直前に、1 unit / ml となるようにパパインを加える (パパインは自己消化が激しいため)。

・ 培養液

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	450 ml
(High glucose、炭酸水素ナトリウム 3.7 g 含有)	
ペニシリン G	25000 units
ストレプトマイシン	25 mg
ピルビン酸	55 mg
アスコルビン酸	50 mg
Newborn calf serum (NCS ; Heat inactivated)	25 ml
Horse serum (HS ; Heat inactivated)	25 ml

上記の溶液を CO₂ で pH 調節を行い、濾過滅菌する。

・ 1% ポリエチレンイミン液

四ホウ酸ナトリウム十水和物 (ほう砂)	2.86 g
ポリエチレンイミン	0.5 g
MilliQ 水	50 ml

濾過滅菌して保存する。使用時、5 倍に希釈してカバーガラスをコートする。

2-2-2 細胞の同定 (免疫組織化学的染色)

免疫組織化学的染色をもとに、形態により僧帽細胞と顆粒細胞の同定を行った。免疫組織化学的染色は、3 週間以上培養した細胞に MAP2 (microtubule-associated protein 2; 神経細胞、特に樹状突起に存在する MW280K の蛋白質) 抗体と GAD (glutamate decarboxylase; グルタミン酸脱炭酸酵素) 抗体による 2 重染色を、ABC 法 (avidin-biotinylated peroxidase complex method) で行った。

- 2 PBS で 3 回洗う。
- 3 4%パラホルムアルデヒド in PB (リン酸緩衝液) で固定する (室温で 10 分)。
- 4 PBS で 3 回洗う。
- 5 下記の溶液を入れ、-20℃で 5 分間放置する。
90%メタノール
5%酢酸
5%PBS
- 6 10%Block ase in PBS で処理する (室温で 15 分)。
- 7 10%Block ase in PBS で 1000 倍希釈した抗 MAP2 抗体 (マウス IgG) を入れる (室温で 1 時間)。
- 8 PBS で 1 回洗う。

9 下記の BSS (basal saline solution) で 3 回洗う。

NaCl	7.6 g/1
KCl	0.4 g/1
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.26 g/1
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.16 g/1
グルコース	0.99 g/1
HEPES	4.77 g/1

NaOH で pH 7.4 に調整する。

10 PBS で 1 回洗う。

10) 10%Block ase in PBS で 1000 倍希釈した抗 GAD 抗体 (ラビット IgG) を入れる (4℃で 1 晩)。

11) 7) ~9) を繰り返す。

12) 標識化二次抗体 [ビオチン化抗マウス IgG TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate) 、ビオチン化抗ラビット IgG FITC (fluorescein-5-isothiocyanate-conjugated)] で反応させる (室温 1 時間)。

13) PBS で 1 回、BSS で 5 回洗う。

14) Perma fluor で封入する。

15) 蛍光顕微鏡で観察する。

2-3 結果

播いて 24 時間以内には、細胞から突起が伸張し始めているのが観察される (図 2-1)。まず、大きく扁平な細胞が 1 週間以内にカバーガラス一面に広がる。2 週間程で、細胞の突起が網の目のように張り巡らされ、細胞体の大きいものと小さいものの 2 種類の細胞が見られるようになる (図 2-2)。18 日以降の細胞では、シナプスが形成されるようになる (第 3 章)。そこで、3 週間以上培養した細胞に免疫組織化学的染色を行い、その染色結果をもとに細胞の同定を試みた。神経細胞に特異的に存在する MW280K の蛋白質の抗体である MAP2 抗体と、グルタミン酸脱炭酸酵素の抗体である GAD 抗体による 2 重染色を行った。大きい細胞も小さい細胞も、そのほとんどがローダミン (赤い蛍光色素) で標識した MAP2 抗体で染色された (図 2-3)。同一細胞群をさらに、FITC (緑の蛍光色素) で標識した GAD 抗体で染色すると、そのうち小さい細胞 (<10 μm) のみが染まった (図 2-4)。この 2 つの染色像を重ね合わせると、細胞体が比較的大きく、多極性の太い樹状突起を有する細胞は MAP2 抗体には陽性、GAD 抗体には陰性を示し、細胞体が比較的小さく双極性の細い樹状突起を有する細胞は MAP2 抗体にも GAD 抗体にも陽性を示すことが分かった (図 2-5)。このような染色像は、カバーガラス全体に一様に観察された。これらの染色結果から、大きな細胞体 (>15 μm) と多極性樹状突起を有する細胞が僧帽細胞で、小さな丸い細胞体 (<10 μm) と双極性樹状突起を有する細胞が顆粒細胞であることが示唆された。この僧帽細胞と顆粒細胞の免疫組織化学的・形態的特徴は Trombley & Westbrook (1990) の報告とも一致する。

2-4 考察

今回の細胞の同定において、顆粒細胞のマーカーとして GAD 抗体を用いた。GAD 抗体は、GABA 作動性ニューロンに特異的なマーカーであり (Neale et al., 1983)、嗅球内の GABA 作動性介在ニューロンも免疫反応を示すことが報告されている (Mori, 1987)。本研究の嗅球の初代培養系においては、2~3 週間以上培養しないと GAD 抗体に十分反応しなかった。このことから、この培養条件下では、顆粒細胞の成熟に少なくとも 2~3 週間の培養が必要だと思われる。Blakely (1987) は、N-acetylaspartylglutamate (NAAG) 抗体が主に嗅球の僧帽細胞に免疫反応を示すことを報告しており、Trombley & Westbrook (1990) は、嗅球の初代培養において僧帽細胞のマーカーとして NAAG 抗体を使用しているが、本研究においては入手できなかった。本培養において、より正確な細胞の同定を行うにあたり、やはり僧帽細胞に特異的なマーカーが必要だと思われる。NAAG 抗体以外の僧帽細胞に特異的なマーカーは報告されていなかったが、最近、中枢神経に特異的な POU (Pt-1, Oct-1, Oct-2 and unc-86) ドメイン転写因子の一つである Brain-2 が、胎仔期 (あるいは新生仔) の嗅球の僧帽細胞に特異的に発現することが報告された (Hagino-Yamagishi et al., 1999)。この Brain-2 抗体が僧帽細胞のマーカーとして用いることができるか興味深いところである。3 週間以上培養したニューロンのうち、GAD 抗体に陰性を示す小さな双極性細胞 (図 2-5、*)、GAD 抗体に陽性を示す大きな多極性細胞がまれに観察されたが、これらの細胞については本研究では同定できなかった。さらに、いくつかの異なるロットの NCS (HS のロットは同じ) で同様に培養を行ってみたが、

ニューロンがほとんど生存しなかった(図 2-6)。一方、異なるロットの HS (NCS のロットは同じ) で同様に培養しても、培養ニューロンの状態に大きな変化はみられなかった。これらのことから、嗅球の初代培養ニューロンにおいても、他の脳領域と同様、牛血清に対する依存度が高いと思われる。血清の成分は変性しやすく、特にニューロンの初代培養においては、培養状態が大きく左右される。そこで、より安定した培養を行えるように、小脳の初代培養で確立されている無血清の完全合成培地 (Hirano et al., 1986) で本培養を試みた。培養細胞は 3 週間以上維持できるが、細胞突起を有する細胞の中に、MAP2 に陰性を示す細胞が多数観察された。さらに、これらのニューロン様細胞に電氣的刺激を与えても、活動電位を発生しなかった。よって嗅球の初代培養において、上述の無血清培地では、ニューロン様細胞が多数含まれ、パッチクランプなどの電気生理実験には適さないことが示唆された。

2-5 小括

本研究における嗅球初代培養系では、2 週間以上培養すると、主に形態的に異なる 2 種類の細胞が存在するようになる。神経細胞に特異的なマーカーである MAP2 抗体と GABA 作動性ニューロンに特異的なマーカーである GAD 抗体を用いて、これらの細胞の同定を試みた。その結果、大・小 2 種類の細胞とも神経細胞であることが確認され、そのうち、双極性の細い樹状突起を有する小さい ($<10\ \mu\text{m}$) 細胞は、顆粒細胞であることが示唆された。Trombley & Westbrook (1990) の報告による嗅球初代培養ニューロンの形態的特徴から、多極性の太い樹状突起を有する大きい ($>15\ \mu\text{m}$) 細胞は僧帽細胞であることが推測された。これらの僧帽細胞と顆粒細胞の形態的特徴は、生体内で報告されているそれと一致する。したがって、本研究における嗅球の初代培養系においても、嗅球内ニューロンは 3 週間以上生存し、それらは、主に僧帽細胞と顆粒細胞であることが示唆された。さらに、これらの培養細胞は、その大きさや樹状突起の様子から同定可能であり、生体内における形態的特徴を比較的反映していると思われる。

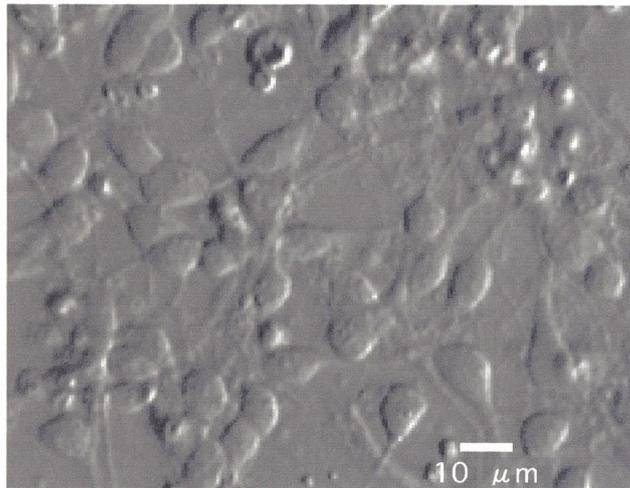


図2-1 播いて19時間後の培養ニューロンの明視野像。5~15 μm の細胞が散在し、突起が伸張し始めているのが観察される。この時点では、まだ細胞の大きさに顕著な違いは見られない。

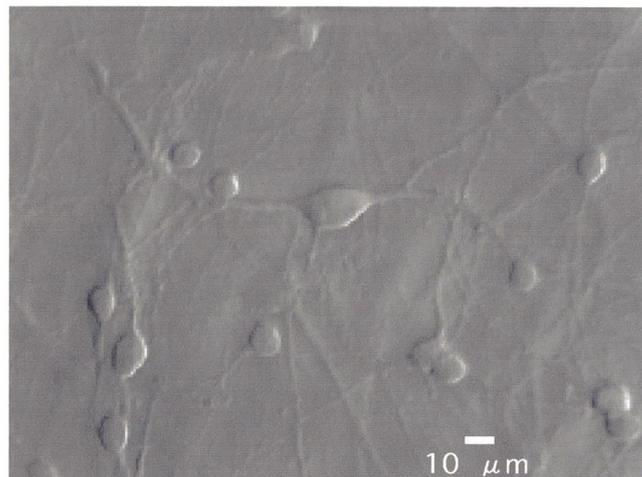


図2-2 播いて25日後の培養細胞の様子。主に大・小2種類の細胞があり、細胞突起が張り巡らされている様子が観察される。最下層には扁平な細胞が敷きつめている。

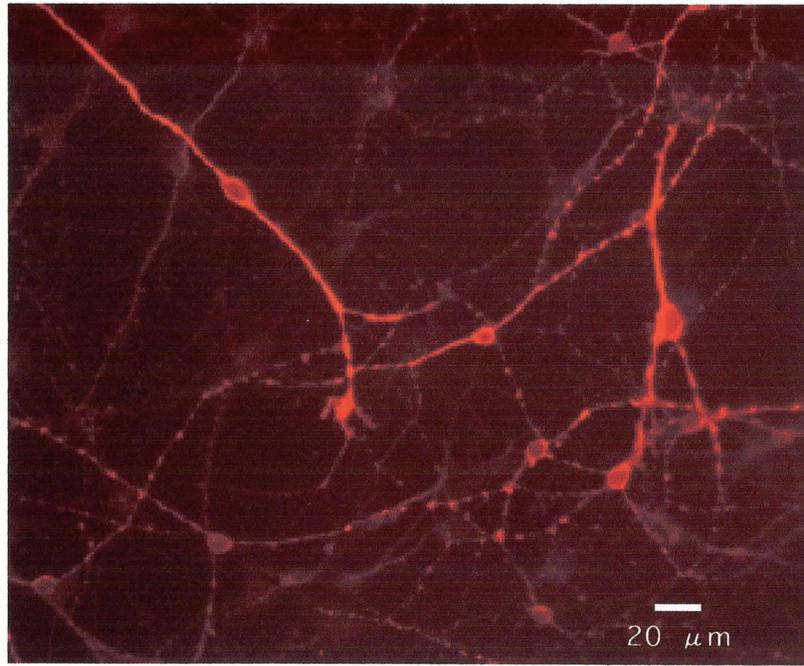


図2-3 培養細胞（26日）のMAP2抗体による染色像。大・小2種類の細胞とも、そのほとんどがMAP2抗体に陽性であったことから、これらの細胞は神経細胞であることが示唆された。

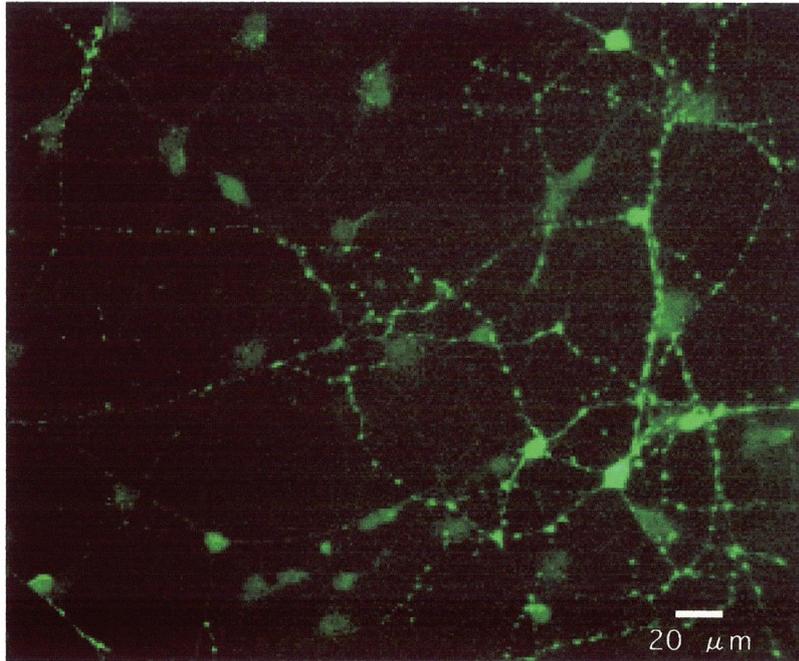


図2-4 図2-3と同一細胞群におけるGAD抗体による染色像。主に小さい細胞 ($10 < \mu\text{m}$) が強く染まっており、これらの細胞はGABA作動性ニューロンであることが示唆された。

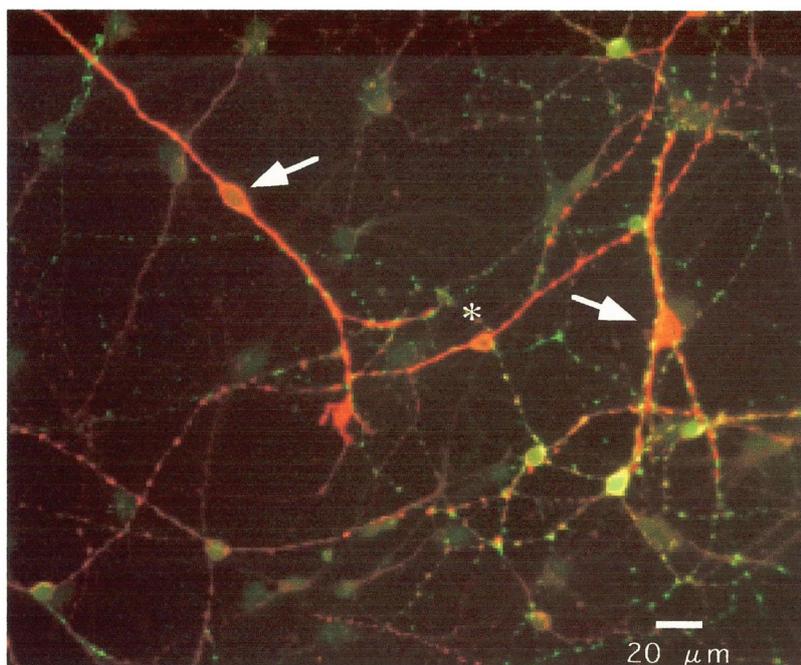


図2-5 MAP2染色像（図2-3）とGAD抗体染色像（図2-4）を重ね合わせたもの。この2重染色像から、細胞体が大きく（ $>15 \mu\text{m}$ ）多極性の太い樹状突起を有する細胞細胞は僧帽細胞（矢印）、細胞体が小さく（ $<10 \mu\text{m}$ ）細い双極性の樹状突起を有する細胞は顆粒細胞であることが示唆された。まれに、GAD抗体に陰性を示す小さな双極性細胞（*）が観察された。

僧帽細胞；MAP2抗体陽性、GAD抗体陰性
顆粒細胞；MAP2抗体陽性、GAD抗体陽性

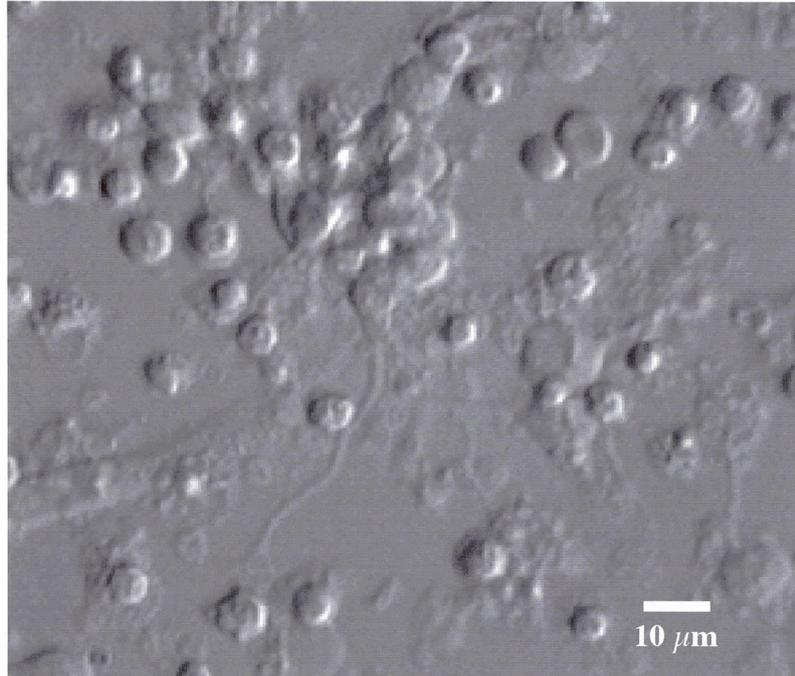


図2-6 異なるロットのNCSで同様にして播いた、12時間後の培養細胞の明視野像。細胞の表面が汚く、細胞体も小さい。細胞突起の伸張もほとんどみられず、細胞の凝集が観察される。いくつかの異なるロットのNCSでも培養してみたが、同様な細胞像が観察された。

第三章

嗅球ニューロン間シナプス伝達に対する

オキシトシンの作用 (1)

—GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果—

3-1 緒言

視床下部の室傍核や視索上核の大細胞性ニューロンで合成され、下垂体後葉から血中へ分泌されたオキシトシンが、乳汁の射出や子宮収縮を促すホルモンとして働くことは古くから良く知られている。一方、ここ 20 年間で、オキシトシンは室傍核の小細胞性ニューロンでも合成され、海馬、脊髄、脳幹など種々の神経回路に、神経伝達物質や神経修飾物質として働き (Raggenbass et al., 1998)、多種多様な行動の調節、引いては記憶や学習といった脳の高次機能にまで関与していることが明らかになってきている (Engelmann et al., 1996)。

母性行動もその一つで、脳内オキシトシンが母性行動を速やかに誘発することがいろいろな動物で報告され、我々はその作用部位として嗅球に注目してきた (第 1 章)。ウレタン麻酔下の雌ラットを用いて、室傍核を電氣的に刺激 (100 Hz、10~30 発) すると、長潜時 (2~150 秒) で嗅球の僧帽細胞における単一ニューロン活動が抑制され、顆粒細胞の単一ニューロン活動は上昇した (Yu et al., 1996a)。この現象は、室傍核から嗅球への遠心性線維の切断や遮断により消失しなかった。また、分娩時のラットの嗅球へオキシトシンアンタゴニストを注入すると、母性行動が著しく抑制され、エストロジェン前処置卵巣摘出処女雌ラットの嗅球へオキシトシンアゴニストを注入すると、注入後 2 時間以内にその半数において完全な母性行動が誘発された (Yu et al., 1996b)。このような電気生理学的、行動学的研究結果から、分娩時の産道刺激により、室傍核から脳室に放出されたオキシトシンが嗅球へ達し、嗅球内ニューロンに作用することで母性行動が発現することが証明された (図 3-1)。すなわち、オキシト

シンが匂い信号を、嗅球レベルで抑制（嗅球内唯一の出力細胞である僧帽細胞を抑制）することで、仔ラットの匂いに対する忌避反応に打ち勝ち母性行動が速やかに開始されるというわけである（図 3-2）。その際、オキシトシンの標的は僧帽細胞なのか顆粒細胞なのか、あるいは両者なのか、現在のところ不明である。そこで本研究では、ラット嗅球の初代培養ニューロンにパッチクランプ法を用いて、僧帽細胞-顆粒細胞間シナプス伝達に対するオキシトシンの効果を検討するとともに、その作用部位を明らかにする。オキシトシンの中枢ニューロンに対する直接作用は主として興奮性である（Dreifuss et al., 1992）とか、モルモット嗅球の顆粒細胞層にオキシトシンが特異的に結合する（Tribollet et al., 1992）などの知見を考慮すると、オキシトシンは顆粒細胞を興奮させ、続いて顆粒細胞と僧帽細胞間の抑制性樹状突起間シナプスを介して僧帽細胞を間接的に抑制することが推察される。そこで、まず顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果を検討した（図 3-3）。

3-2 材料と方法

3 週間以上培養したラット嗅球初代培養ニューロン（第 2 章）に、パッチクランプ法（Hamill et al., 1981）を用いて全細胞記録を行った。倒立型顕微鏡（ホフマン仕様）のステージ上のチャンバーに、培養ニューロンが付着しているカバーガラスを移し、バス液（図 3-4）をペリスタポンプにより、1.0 ml/min の流速で灌流しながら記録を行った。パッチ電極は、硬質ガラス（borosilicate）のフィラメント入り毛細管（外径 1.5 mm、内径 0.84 mm、長さ 102 mm）を水平プラーを用いて 5 段引きで作製し、リングル液充填時の電気抵抗が 4~7 M Ω のものを使用した。パッチ電極内液（図 3-4）は、デイスポーザブルの 1 ml 注射筒にシリンジフィルター（0.2 μ m）を装着したもので濾過し、ポリエチレン細管を用いて電極尾部より back-fill して充填した。パッチ電極を、パッチクランプアンプ（EPC9/2）に接続しているヘッドステージの電極ホルダーに装着して、陽圧を与えながら標的細胞にアクセスした。2 ms の矩形波パルスを与え、それに対する電流応答をモニターしながら、標的細胞の膜とパッチ電極との間にギガ・シール（1G Ω 以上）を形成し、その後、陰圧をかけてパッチ膜を破り、電圧固定下で記録した。記録は全て室温下（22-24 $^{\circ}$ C）で行い、記録した膜電流は、ベッセル特性の低周波通過型フィルターにより高周波成分を除去した。添加・投与する薬液は、使用濃度の 200 倍濃度で凍結保存しておき、使用する直前に細胞外液で使用濃度に希釈し、機械型小型マニピュレーターにより標的細胞に近付けたポリエチレン細管（直径約 200 μ m）を通して投与した。

なお、僧帽細胞と顆粒細胞の同定は、免疫組織学的染色をもとに（第 2 章）、主に形態（細胞体の大きさや樹状突起の様子）により行った。

3-3 結果

標準バス液にグルタミン酸受容体に特異的なアンタゴニストである 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX ; 20 μ M) と DL-2-Amino-5-phosphonovaleric acid (AP5 ; 20 μ M) を添加した状態で、18 日以上培養した僧帽細胞の膜電位を -60 mV に固定すると、顆粒細胞の自発発火由来のシナプス電流が記録される。このシナプス電流は、 γ -aminobutyric acid_A (GABA_A) 受容体に特異的なアンタゴニストである bicuculline methiodide (BMI ; 10 μ M) でほぼ完全にブロックされる (図 3-5)。このことから、僧帽細胞で記録されるシナプス電流は、主に GABA_A 受容体を介した spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) であることが示唆された。標準バス液に BMI (10 μ M) を添加した状態で、同様に 18 日以上培養した顆粒細胞の膜電位を -60 mV に固定すると、僧帽細胞の自発発火由来のシナプス電流が記録される。この顆粒細胞で記録されるシナプス電流は、CNQX (20 μ M) でほぼ完全にブロックされることから、グルタミン酸受容体を介した spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) であることが示唆された (図 3-6)。これらの結果から、本研究の初代培養下においても、比較的生体内と同様なシナプスが形成されていることが伺える。

そこで、まず顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果を検討した。本培養下においても、生体内と同様、僧帽細胞と顆粒細胞に樹状突起間相反性シナプスが形成されている可能性があるので、標準バス液に CNQX (20 μ M) と AP5 (20 μ M) を添加することにより sIPSCs を分離した。このような条件下で、3 週間~4 週間培養した僧帽細胞から記録

される sIPSCs は、オキシトシン (100 nM) によりその頻度が減少した。一方、sIPSCs の振幅には変化がみられなかった。 (n = 7 ; 図 3-7) 。この sIPSCs の振幅の分布をヒストグラムで表すと、コントロールとオキシトシン投与中において、やはりその分布に違いはみられなかった (図 3-8) 。Cumulative probability の分布においても、オキシトシン投与中における sIPSCs の事象間隔は、コントロールのそれと有意に異なったが (p < 0.01, Kolmogorov-Smirnov 検定) 、振幅には有意な違いは検出されなかった (図 3-9) 。同様に記録した 7 個の僧帽細胞においても、図 3-10 に示したように、オキシトシン投与により sIPSCs の平均頻度はコントロールの $44.5 \pm 9.8\%$ と有意に減少したが (p < 0.05, paired t 検定) 、平均振幅には著明な変化はみられなかった (コントロール比、 $84.7 \pm 11.6\%$) 。以上の結果から、オキシトシンは僧帽細胞で記録される sIPSCs を抑制し、その抑制効果は主にシナプス前部 (恐らく顆粒細胞) からの GABA の放出を抑えることにより生じることが示唆された。

この sIPSCs に対するオキシトシンの抑制効果は、オキシトシン受容体に特異的なアゴニストである [Thr⁴, Gly⁷] -OT (100 nM) 投与でも同様に観察された (図 3-11) 。6 個の僧帽細胞について、[Thr⁴, Gly⁷] -OT により sIPSCs の平均頻度は、コントロールに比べ $48.9 \pm 5.5\%$ に有意に減少したが (p < 0.05, paired t 検定) 、平均振幅にはそのような変化はみられなかった (コントロール、 87 ± 13 pA ; [Thr⁴, Gly⁷] -OT、 103 ± 18 pA) 。さらに OT の抑制効果は、オキシトシン受容体に特異的なアンタゴニストである desGly-NH₂⁹, d(CH₂)₅-[Thy(Me)², Thr⁴] -ornithine vasotocin (desOVT ; 100 nM) との共投与により消失した (平均振幅コントロール比、 $106 \pm 8.0\%$; n = 5 ; 図 3-12) 。これらの結果から、sIPSCs

に対するオキシトシンの効果は、オキシトシン受容体を介して生じることが示唆された。

次に顆粒細胞におけるオキシトシンの作用部位を検討するために、miniature IPSCs (mIPSCs) を測定した。mIPSCs とはテトロドトキシン (TTX; 電位依存性 Na⁺チャネル阻害薬) の存在下で記録される、シナプス前終末からのシナプス顆粒の自発的な放出である。TTX 存在下では、僧帽細胞に-100 mV から+100 mV の脱分極性刺激を段階的に与えても、Na⁺電流は流れない (図 3-13A)。このような条件で僧帽細胞の膜電位を-60 mV に固定すると、顆粒細胞の mIPSCs が記録され、OT 投与により可逆的に減少する (図 3-13B; n = 7)。このとき、コントロールと OT 投与中において、mIPSCs の振幅の分布に大きな変化はみられないもののその頻度は減少した (図 3-14)。また、コントロールあるいは OT 投与中においても 100 pA より大きい mIPSCs は観察されなかった (図 3-14)。Cumulative probability においても、OT により mIPSCs の事象間隔が有意に長くなっていることが分かる (p < 0.01, Kolmogorov-Smirnov test; 図 3-15)。7 個の僧帽細胞で同様な変化が観察され、OT 投与中における mIPSCs の平均頻度は、コントロールに比べ有意に減少し (コントロール比、39.5 ± 10.4%; p < 0.05, paired t-test; 図 3-16)、平均振幅には有意な差はみられなかった (コントロール比、93.9 ± 5.9%; 図 3-16)。このような mIPSCs に対する OT の効果は、OT 受容体に特異的なアゴニストである [Thr⁴, Gly⁷] -OT (100 nM) 投与でも再現された (図 3-17)。[Thr⁴, Gly⁷] -OT により sIPSCs の平均頻度は、コントロールに比べ有意に減少したが、平均振幅には変化はみられなかった (平均頻度のコントロール比、54 ± 8.5%; 平均振幅のコントロール比、97.8 ± 4.5%; p < 0.05, paired

t 検定)。以上の結果から、僧帽細胞で記録される mIPSCs も、sIPSCs と同様にオキシトシンにより抑制され、その効果は、オキシトシンがシナプス前終末に作用し、トランスミッターの放出 (GABA の放出) を抑えることにより発現することが示唆された。

オキシトシンのシナプス後部への作用を評価するために、GABA_A 受容体に対するオキシトシンの効果を検討してみた。僧帽細胞の膜電位を -60 mV に固定し、細胞外から GABA (100 μM) を投与すると脱分極性の内向き電流が生じる。図 3-18 に示すように、この内向き電流は一過性電流とそれに続く持続性電流から成るが、これらの電流の発生途中にオキシトシン (100 nM) を共投与しても、一過性・持続性電流とも顕著な変化はみられなかった (n = 12)。このことから、やはりシナプス後部 (少なくとも GABA_A 受容体) に対する OT の効果は少ないと思われる。

僧帽細胞と顆粒細胞への直接的な作用を評価する目的にさらに、それぞれの細胞における電位依存性 Na⁺電流と K⁺電流に対する OT の効果を検討した。僧帽細胞、顆粒細胞の膜電位を、-100 mV から +80 mV へ脱分極させていくと、電位依存性の Na⁺チャネル由来の内向き電流と電位依存性の K⁺チャネル由来の外向き電流が生じる。オキシトシン (100 nM) を投与しても、これらのイオン電流に明らかな変化はみられなかった (図 3-19、3-20)。

3-4 考察

本研究における嗅球の初代培養ニューロンでは、2 週間ほど培養すると、その細胞体の大きさや樹状突起の様子から細胞の同定が可能となり、僧帽細胞と顆粒細胞から電位依存性のイオン電流も記録でき、さらには活動電位を誘発できる。しかし、シナプス電流を記録するには、3 週間近く培養する必要がある、このことは、免疫組織化学的染色において、顆粒細胞が GAD 抗体に反応するのに、3 週間以上培養が必要であることと一致する（第 2 章）。小脳の初代培養ニューロンにおいて、その形態的な分化とシナプスの形成に 3 週間から 4 週間で要することが報告されているが（Hirano et al., 1986）、本研究の嗅球の初代培養系においても、培養細胞間のシナプスの形成には、少なくとも 3 週間以上培養する必要があると思われる。僧帽細胞で記録される sIPSCs と mIPSCs において、100 pA 以上の mIPSCs は記録されなかったことから、100 pA 以上の sIPSCs は顆粒細胞の活動電位に依存したシナプス電流であると思われる（図 3-8、図 3-14）。図 3-8 でみられるように、オキシトシン投与中では、100 pA 以上の sIPSCs がコントロールのそれに比べて 55%に減少している。しかし、顆粒細胞の電位依存性 Na⁺電流や K⁺電流にオキシトシンが影響しないこと（図 3-19）、mIPSCs

においても sIPSCs と同様にオキシトシンによる抑制効果がみられること（図 3-14）などを考慮すると、顆粒細胞における活動電位の発生や伝播をオキシトシンが抑制するというよりは、オキシトシンが顆粒細胞のシナプス終末あるいはその周辺に作用して、顆粒細胞からの GABA の放出を抑制することにより、シナプス電流が減少すると考えられる。どのようなメカニズムで、顆粒細胞からの GABA の放出が抑制されるのかは、本研究では明らかにできなかったが、顆粒細胞における、電位依存性 Na⁺電流や K⁺電流以外のイオン電流に対してオキシトシンが作用するとの可能性が考えられる。特に電位依存性 Ca²⁺チャンネルなどは、ニューロンからの神経伝達物質の放出に深く関与していることが知られている（Takahashi T & Momiyama A, 1993；Wheeler DB et al., 1994）。

in vivo における電気生理学的研究において、室傍核ニューロンの電気刺激あるいはオキシトシンの嗅球内投与により、僧帽細胞の単一ニューロン活動が抑制されたことは前述したが、本研究の結果と符合しない。すなわち、本研究では、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達が、オキシトシンにより抑制されることを明らかにしたわけだが、この現象は結果的に僧帽細胞の脱抑制（GABA 抑制からの解放）につながり、引いては僧帽細胞の興奮に至る。したがって、顆粒細胞からの GABA 作動性シナプス伝達以外にも、僧帽細胞の

興奮を調節するオキシトシンの作用が存在している可能性が考えられる。その可能性として、嗅球内の僧帽細胞と顆粒細胞は双方向性樹状突起間シナプスを形成していることから（第 1 章）、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を介して、オキシトシンが僧帽細胞の興奮を調節することが考えられる。この可能性に関しては、続く第 4 章で言及する。

3-5 小括

本研究におけるラット嗅球の初代培養ニューロンは、3週間以上培養すると、細胞体の大きさや樹状突起の様子から僧帽細胞と顆粒細胞に同定でき、それら細胞間にシナプスが形成される。僧帽細胞には GABA_A 受容体を介した抑制性シナプスの入力、顆粒細胞にはグルタミン酸受容体を介した興奮性シナプスの入力が見られた。これらの形態的・電気生理的特徴は、生体内における僧帽細胞と顆粒細胞の特徴と一致しており、本研究の培養系において、生体内と同様な神経回路が再現されていると思われる。このような初代培養ニューロンに、パッチクランプ法を用いて解析した結果、オキシトシン (100 nM) により、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達が抑制されることを明らかにした。(1) 僧帽細胞で記録される sIPSCs と同様に mIPSCs も抑制されたこと、(2) sIPSCs、mIPSCs とも、その振幅は変化せずに、頻度のみが減少したこと、(3) 同様の現象は、オキシトシン受容体に特異的なアゴニストで再現され、アンタゴニストで消失したこと、(4) 僧帽細胞に GABA を投与して生じたイオン電流にはオキシトシン (100 nM) が効果を及ぼさなかったことなどから、GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの抑制効果は、シナプス前終末にオキシトシンが作用し、GABA の放出を抑制することにより生じることが示唆された。

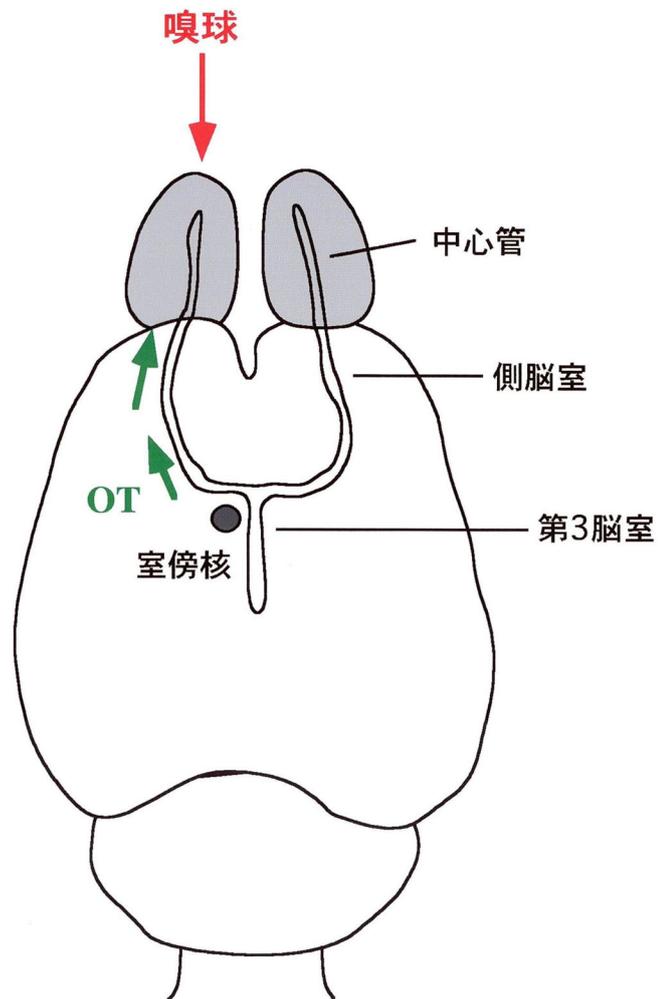


図3-1 室傍核から嗅球へのオキシトシンの経路図。分娩時の産道刺激により室傍核オキシトシンニューロンからオキシトシン (OT) が脳室へ放出され、このオキシトシンは中心管を通過して嗅球へ達する。

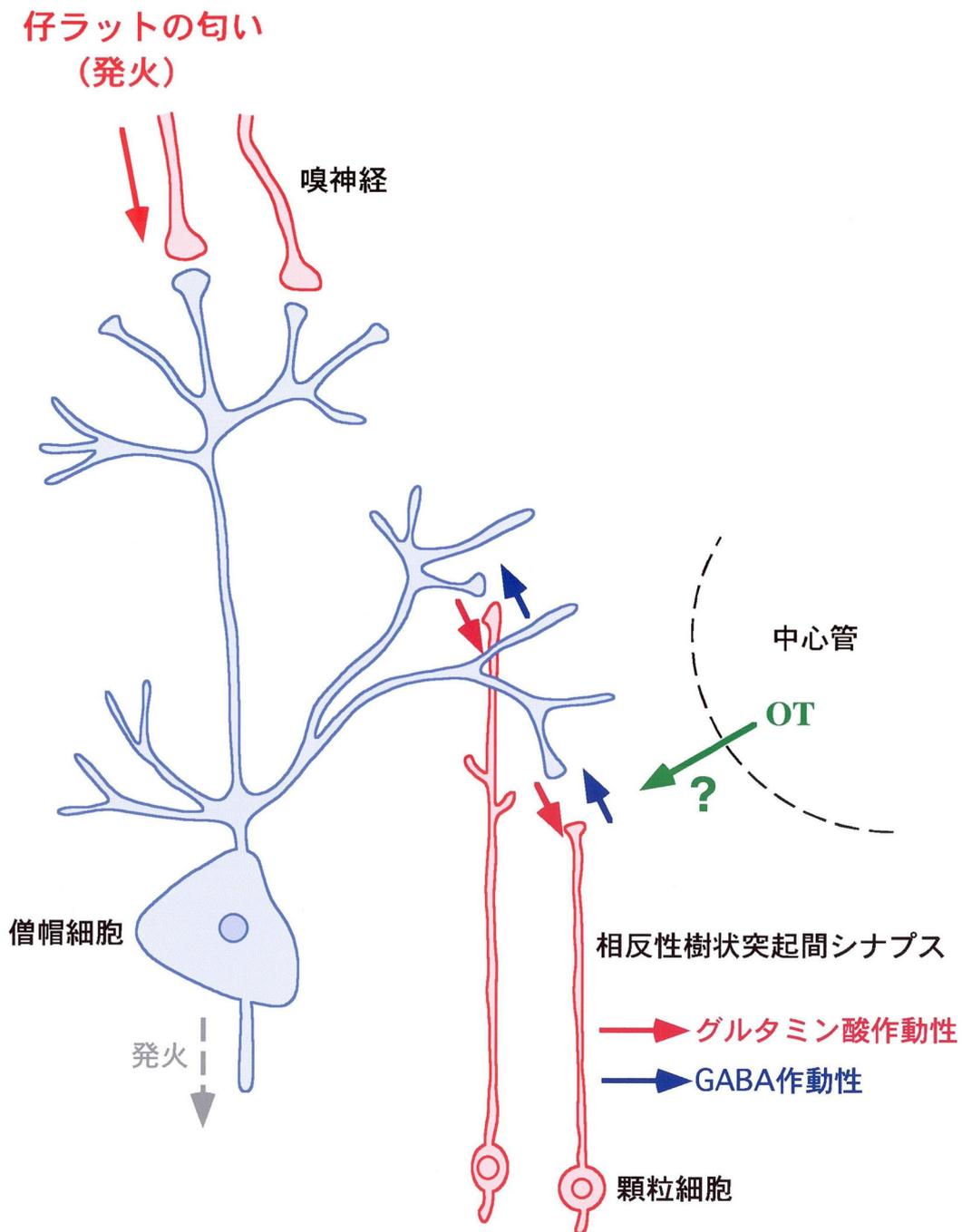


図3-2 嗅球内神経回路におけるオキシトシン (OT) の作用 (仮説)。嗅球に達したOTが、嗅球内ニューロンに作用して、仔ラットの匂い信号を抑制することによって母性行動が発現すると考えられる。

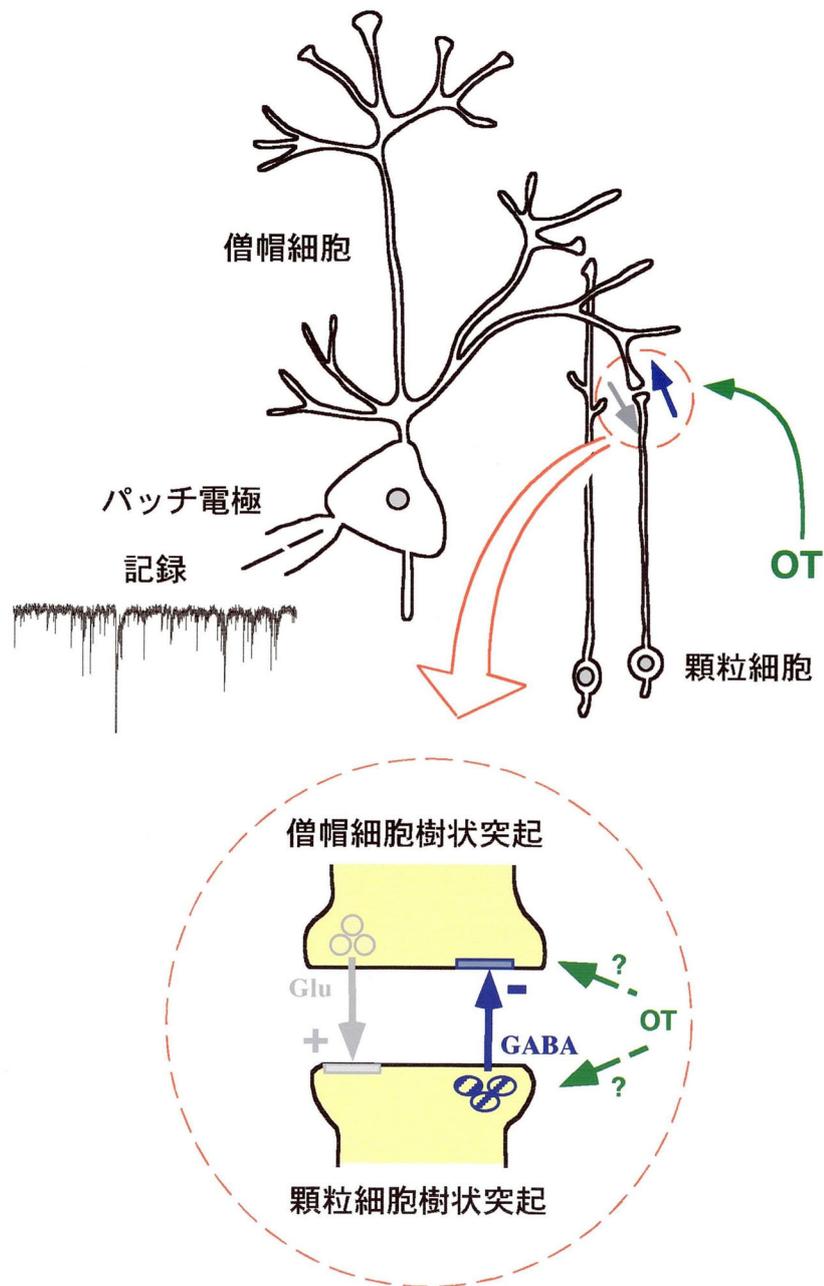


図3-3 GABA作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果の解析。僧帽細胞と顆粒細胞の間には、相反性樹状突起間シナプスが形成されている（ ）。そのうち、顆粒細胞から僧帽細胞への抑制性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果を、パッチクランプ法により解析した。その際、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達を遮断した状態で（ \blackrightarrow ）、僧帽細胞の膜電位を固定した。

● バス液組成 (標準)

NaCl	162.5 mM
KCl	2.5 mM
CaCl ₂	2.0 mM
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
MgCl ₂	1 mM

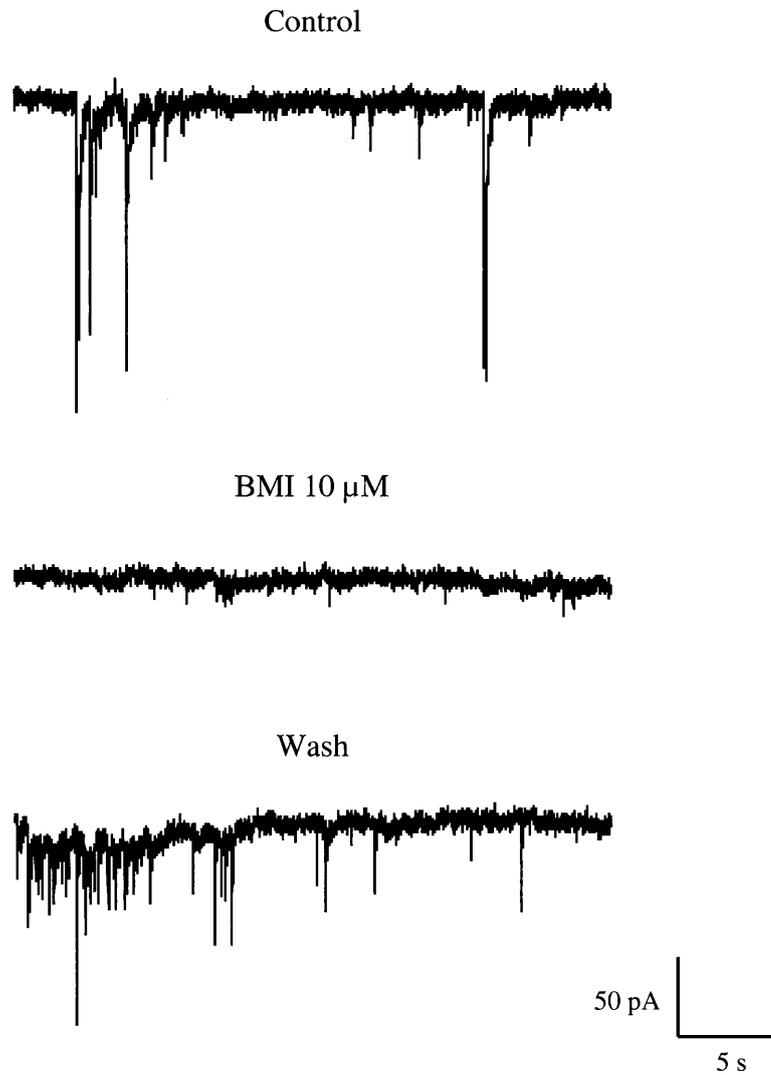
pH 7.3 (NaOH による調整)、浸透圧 325 mOsm (スクロースによる調整)

● パッチ電極内液組成

KCl	150 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
Mg-ATP	4 mM
Na-GTP	0.5 mM
EGTA	1.1 mM

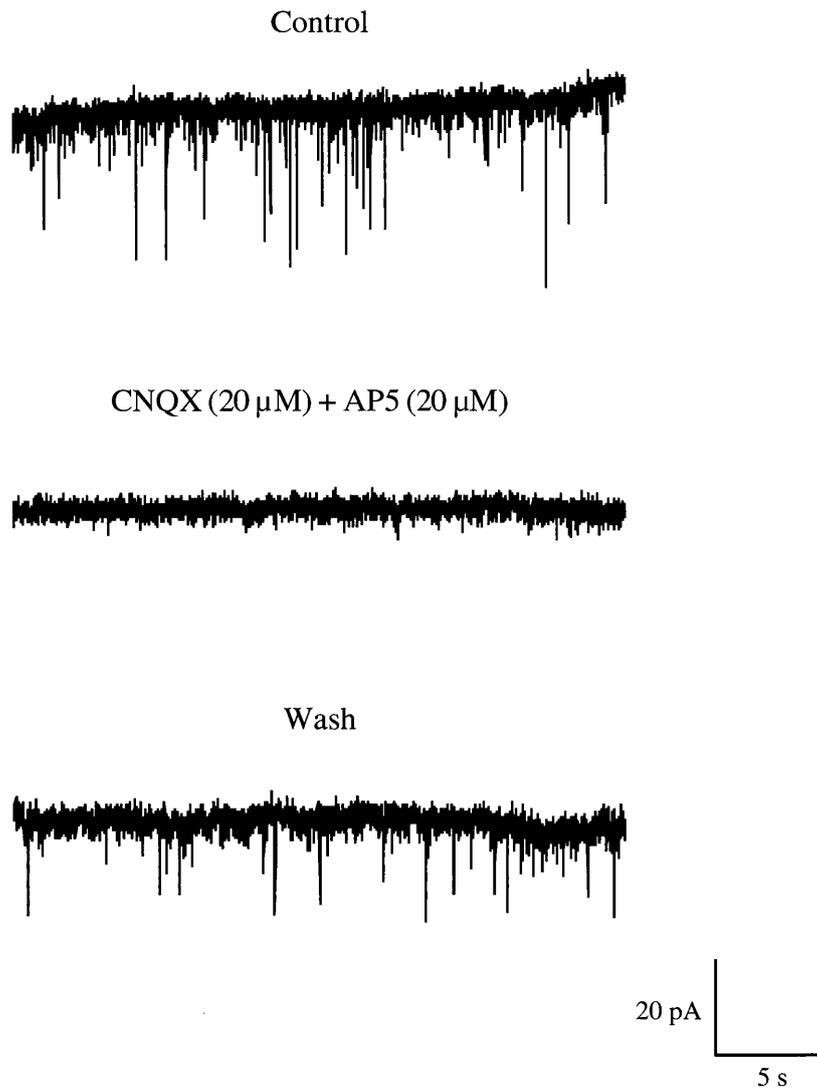
pH 7.2 (KOH による調整)、浸透圧 310 mOsm (マンニトールによる調整)

図 3-4 全細胞記録時に使用した、バス液とパッチ電極の組成。



バス液：標準 + CNQX (20 μ M) + AP5 (20 μ M)
パッチ電極内液：標準

図3-5 僧帽細胞で記録される、顆粒細胞の自発発火由来のシナプス電流のトレース。僧帽細胞の膜電位を-60 mVに固定すると、顆粒細胞の自発発火由来のシナプス電流が記録される。この電流は、GABA_A受容体の特異的なアンタゴニストであるBMIで、可逆的にほぼ完全にブロックされる。



バス液：標準 + BMI (20 μ M)
 パッチ電極内液：標準

図3-6 顆粒細胞で記録される、僧帽細胞の自発発火由来のシナプス電流のトレース。顆粒細胞の膜電位を-60 mVに固定すると、僧帽細胞の自発発火由来のシナプス電流が記録される。この電流は、グルタミン酸受容体に特異的なアンタゴニストであるCNQXとAP5で可逆的にほぼ完全にブロックされる。

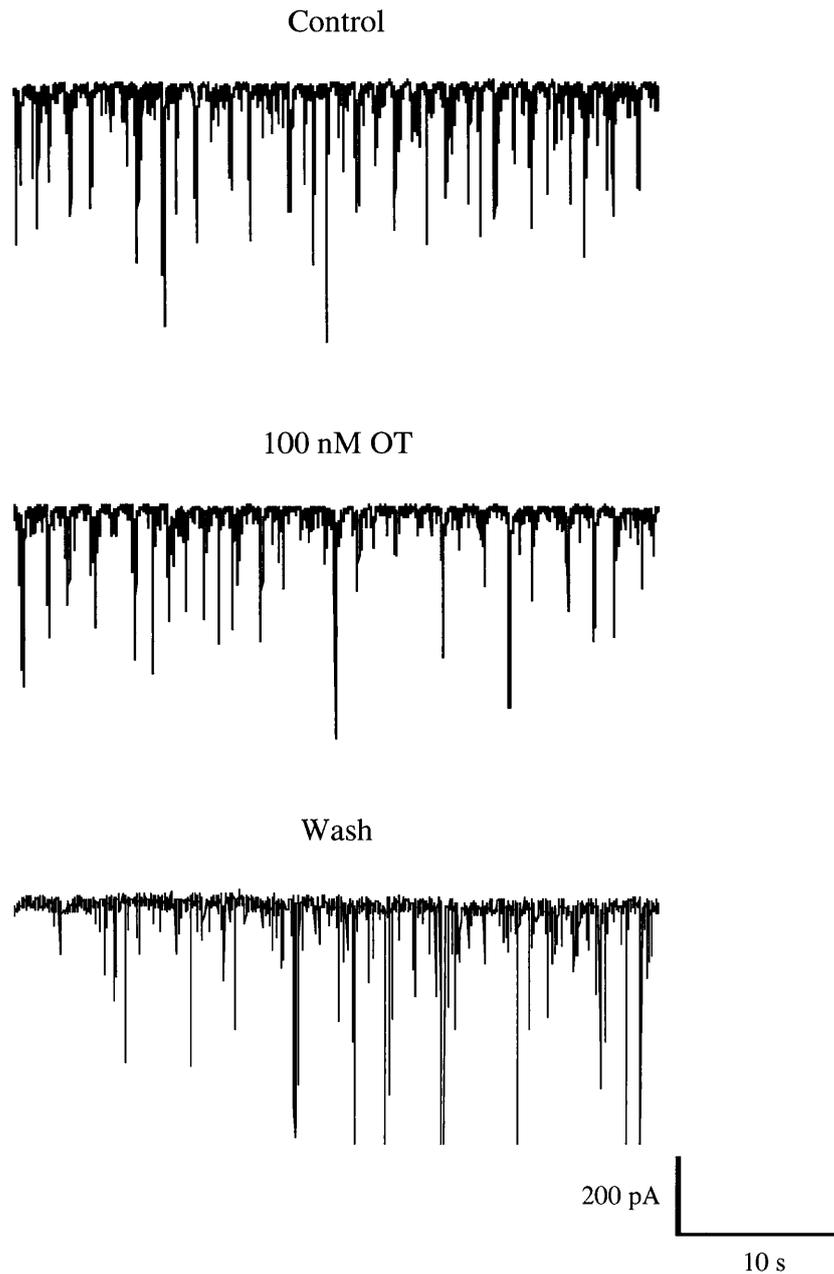


図3-7 僧帽細胞で記録されるsIPSCsに対するオキシトシン (OT) の効果。僧帽細胞の膜電位を -60 mVに固定すると、顆粒細胞由来のsIPSCsが記録される (Control)。このsIPSCsは、OTにより可逆的に減少する (100 nM OT、Wash)。

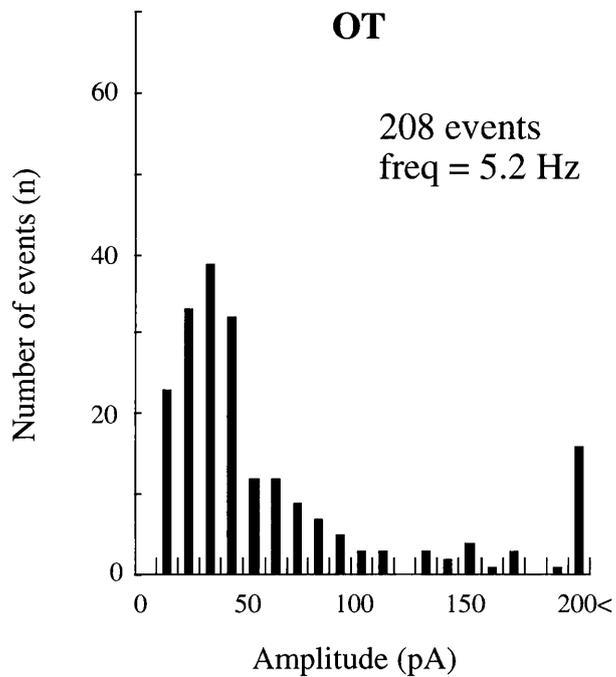
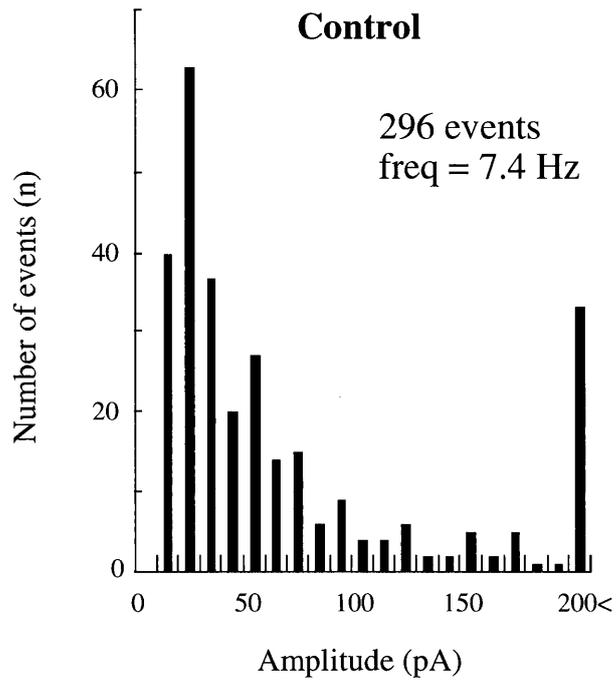


図3-8 コントロールとオキシトシン投与中（OT）におけるsIPSCsの振幅分布。図3-7のControlとOTにおけるシナプス電流の振幅について、大きさ別にその分布をヒストグラムで表した。OTでは頻度は減少しているが、分布状態に大きな変化はみられなかった。

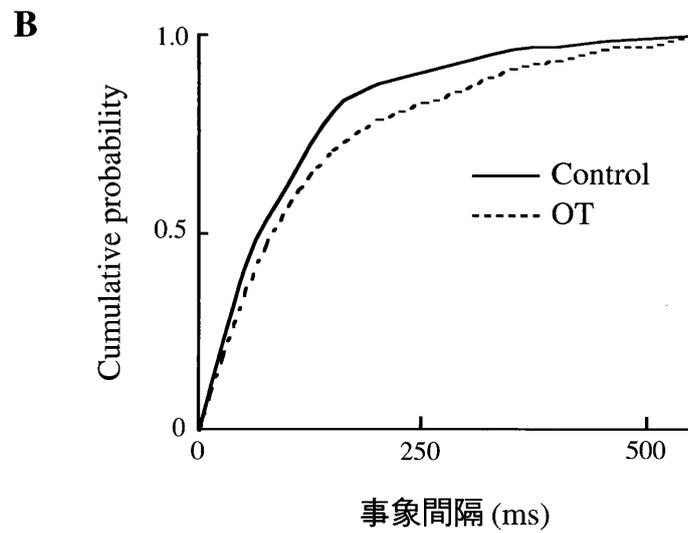
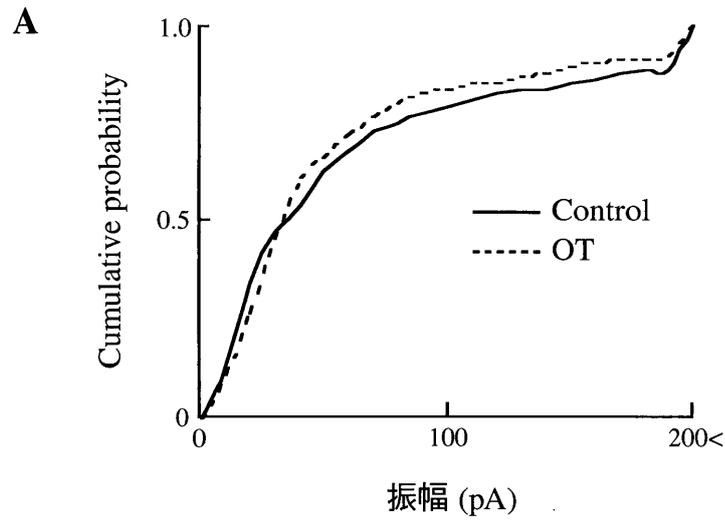


図3-9 コントロールとオキシトシン投与中 (OT) のsIPSCsの振幅 (A) と事象間隔 (B) の積算分布。図3-7のControlとOTのsIPSCsにおける、振幅と事象間隔の積算分布をプロットした。事象間隔の分布においてのみ、OTのそれはコントロールに比べ有意に変化した ($p < 0.01$, Kolmogorov-Smirnov検定)。

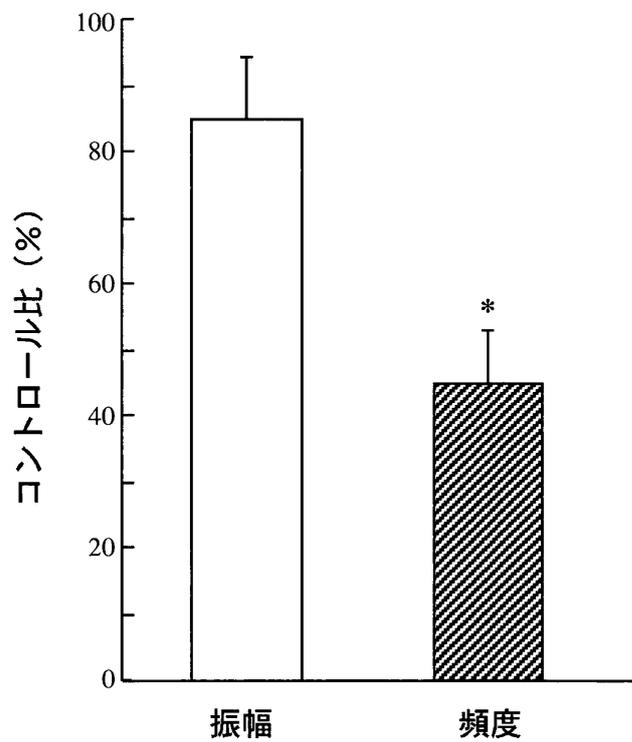


図3-10 オキシトシン投与中（OT）におけるsIPSCsの平均振幅と平均頻度のコントロール比。7個の僧帽細胞で記録された OTのsIPSCsについて、平均振幅と平均頻度のコントロール比をヒストグラムで表した。平均頻度のコントロール比についてのみ有意差が検出された（* $p < 0.05$ 、paired t 検定）。

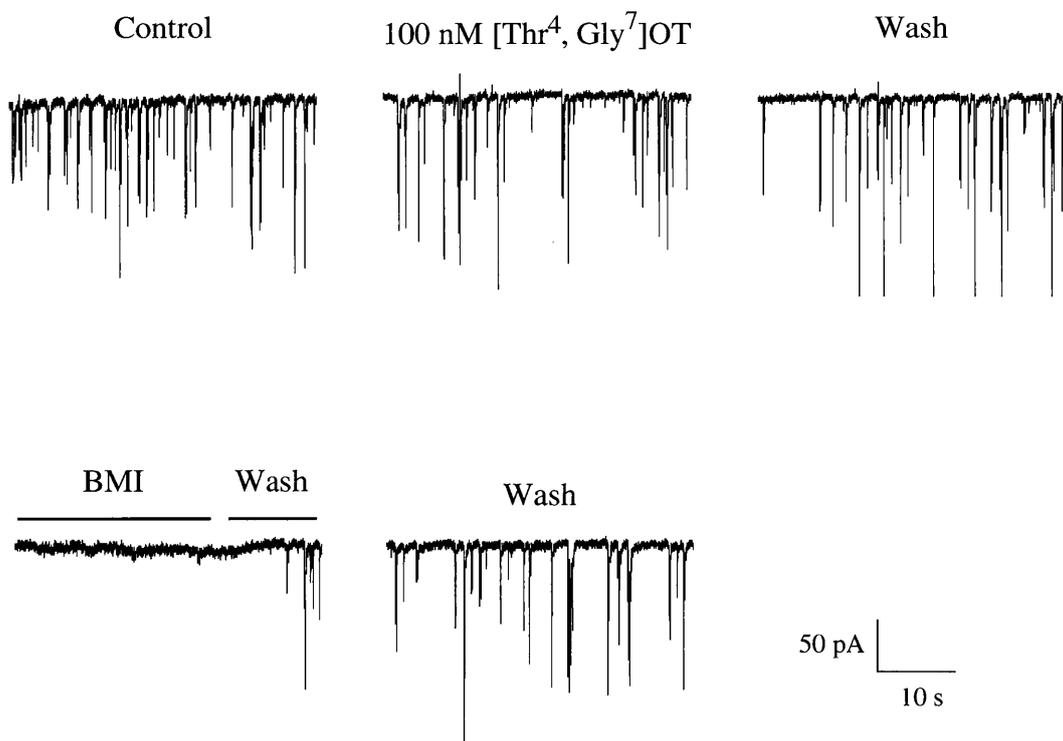


図3-11 オキシトシン受容体のアゴニストの投与によるsIPSCsの変化。オキシトシン受容体に特異的なアゴニストである[Thr⁴, Gly⁷]OTは、オキシトシンの効果と同様、sIPSCsを可逆的に減少する。sIPSCsはBMIでほぼ完全にブロックされる。

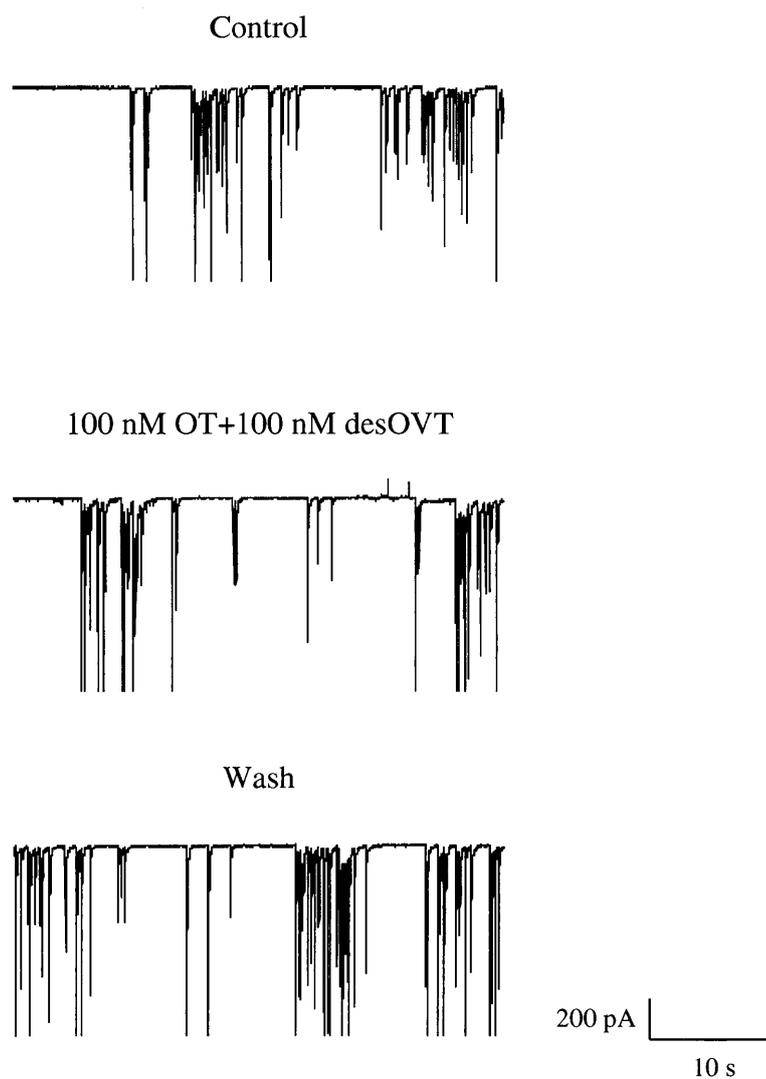
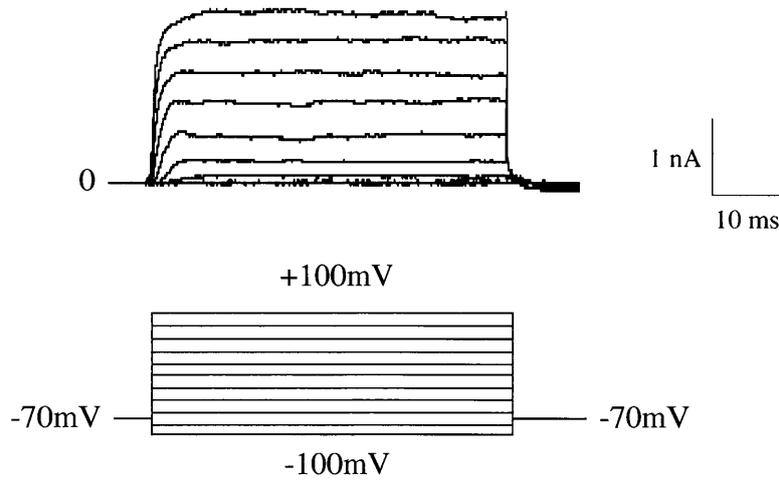
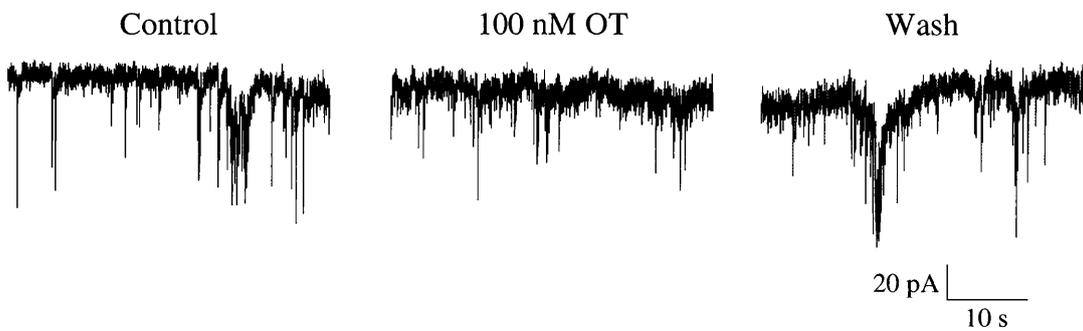


図3-12 オキシトシンとオキシトシン受容体アンタゴニストとの共投与によるsIPSCsの変化。オキシトシンをオキシトシン受容体に特異的なアンタゴニストであるdesOVTと共投与しても、僧帽細胞から記録されるsIPSCsに変化はみられなかった。

A



B



バス液：標準 + CNQX (20 μ M) + AP5 (20 μ M) + TTX (2 μ M)
パッチ電極内液：標準

図3-13 僧帽細胞で記録されるmIPSCsに対するオキシトシンの効果。TTXにより電位依存性Na⁺チャネルはほぼ完全にブロックされる (A)。TTX存在下においても、僧帽細胞で記録されるシナプス電流はオキシトシン投与により減少する (B)。

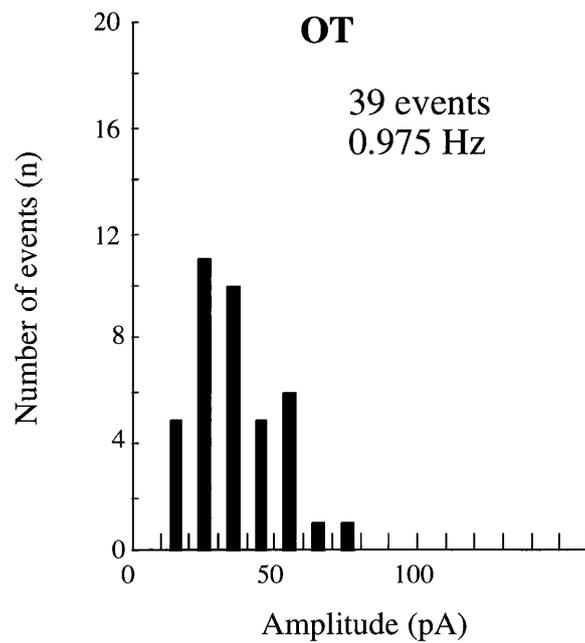
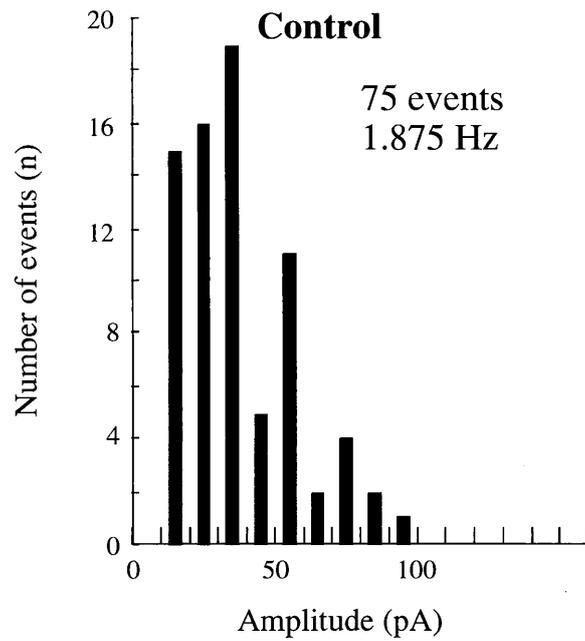


図3-14 コントロールとオキシトシン投与中（OT）における mIPSCs の振幅分布。図3-13BのControlとOTのmIPSCsについて、振幅別にその分布をヒストグラムで表した。OTのmIPSCsはコントロールに比べ頻度は減少したが、振幅の分布に変化はみられなかった。

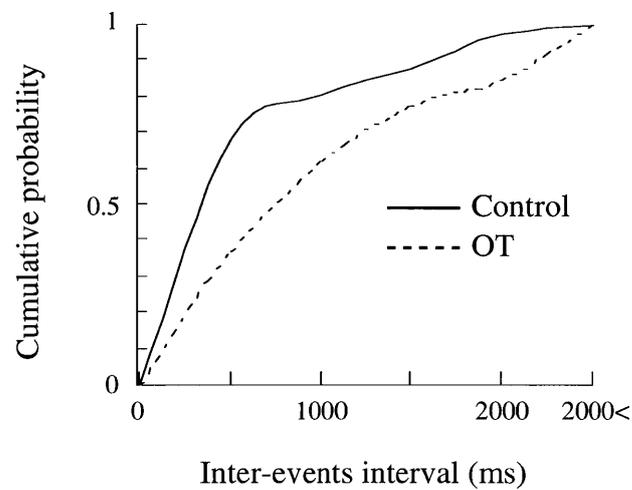
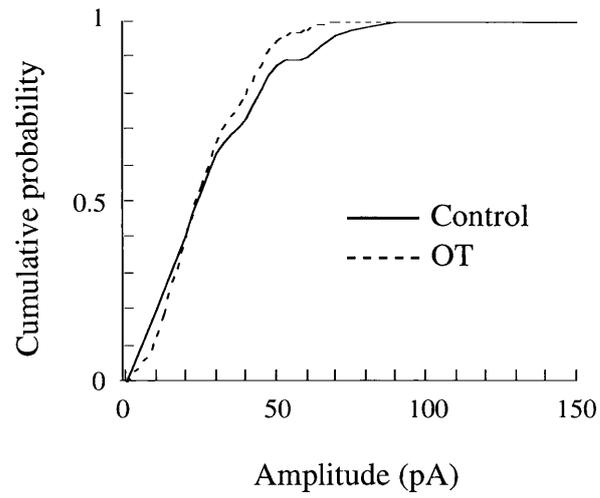


図3-15 コントロールとオキシトシン投与中 (OT) におけるmIPSCsの振幅と事象間隔の積算分布。図3-14のControlとOTのmIPSCsについて、振幅と事象間隔の積算分布をプロットした。事象間隔の分布においてのみ、OTのそれはコントロールに比べ、有意に変化した ($p < 0.01$ 、Kolmogorov-Smirnov検定)。

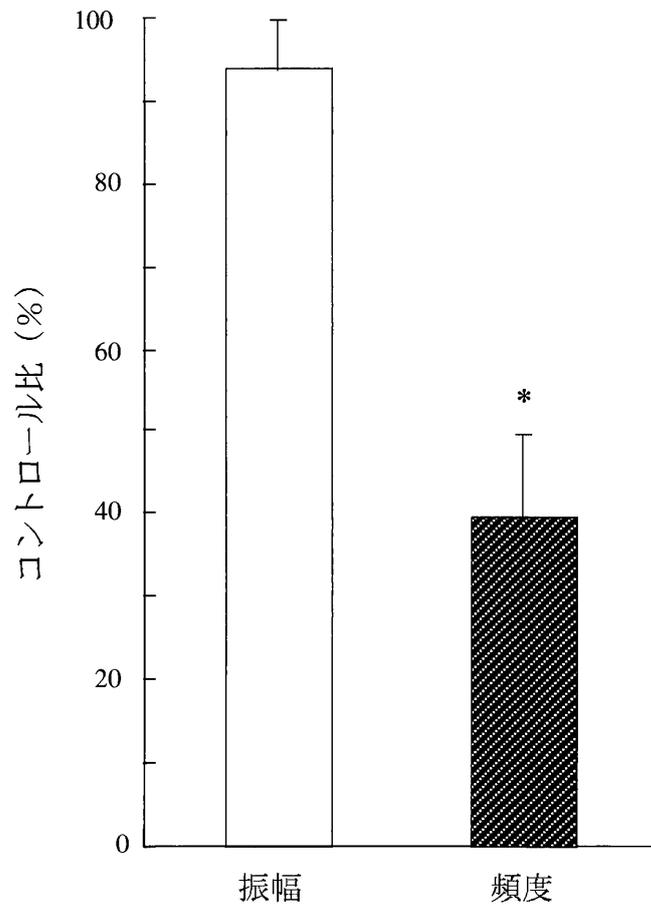
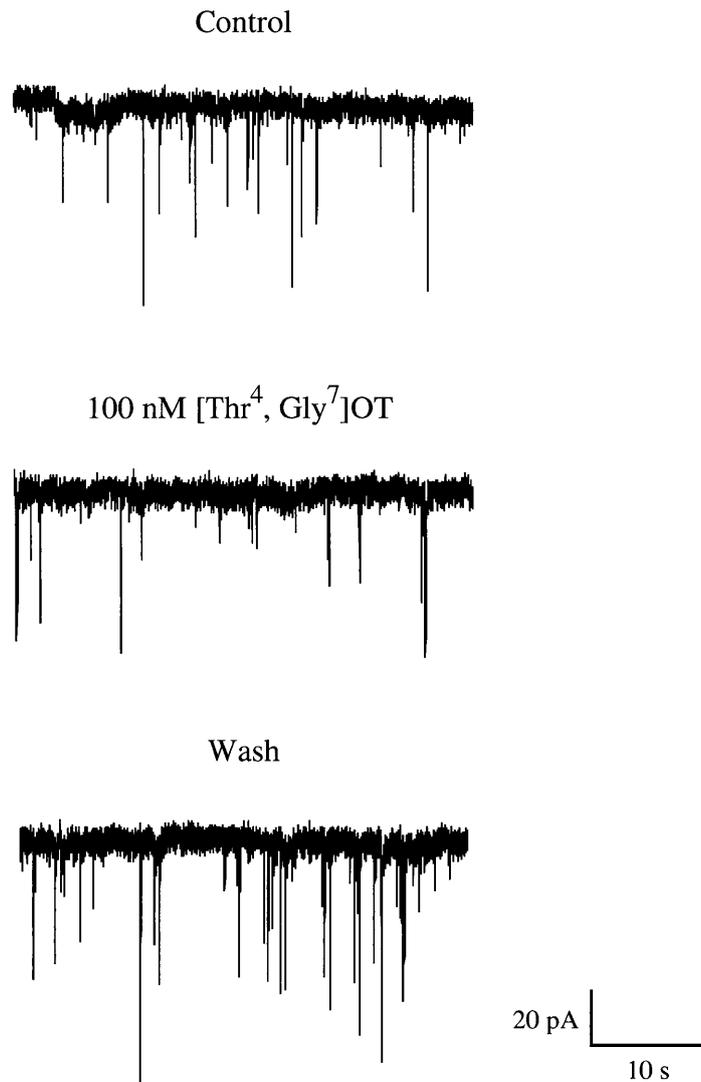


図3-16 僧帽細胞で記録されたオキシトシン投与中（OT）におけるmIPSCsの平均振幅と平均頻度のコントロール比。7個の僧帽細胞で記録されたOTのmIPSCsについて、その平均振幅と平均頻度のコントロール比をヒストグラムで表した。平均頻度のコントロール比のみ有意差が検出された（* $p < 0.05$ 、paired t 検定）。



バス液：標準 + CNQX (20 μM) + AP5 (20 μM) + TTX (2 μM)
 パッチ電極内液：標準

図3-17 僧帽細胞で記録されるmIPSCsに対する、オキシトシン受容体アゴニストの効果。オキシトシン受容体に特異的なアゴニストである [Thr⁴, Gly⁷]OTは、OTの効果と同様、mIPSCsを可逆的に減少する。

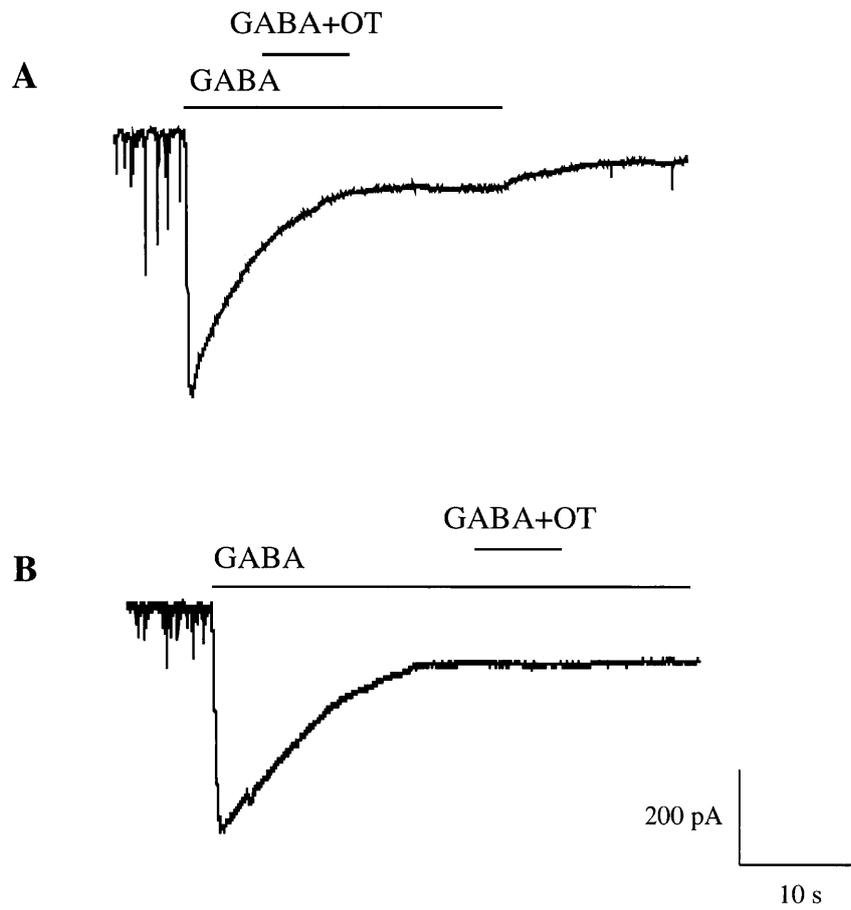


図3-18 僧帽細胞で記録される、GABA_A受容体を介した内向き電流に対するオキシトシンの効果。100 μ MのGABAを僧帽細胞に投与すると、脱分極性の内向き電流が生じる。100 nMのオキシトシンを共投与しても、一過性電流 (A)、持続性電流 (B) とも明らかな変化はみられなかった。

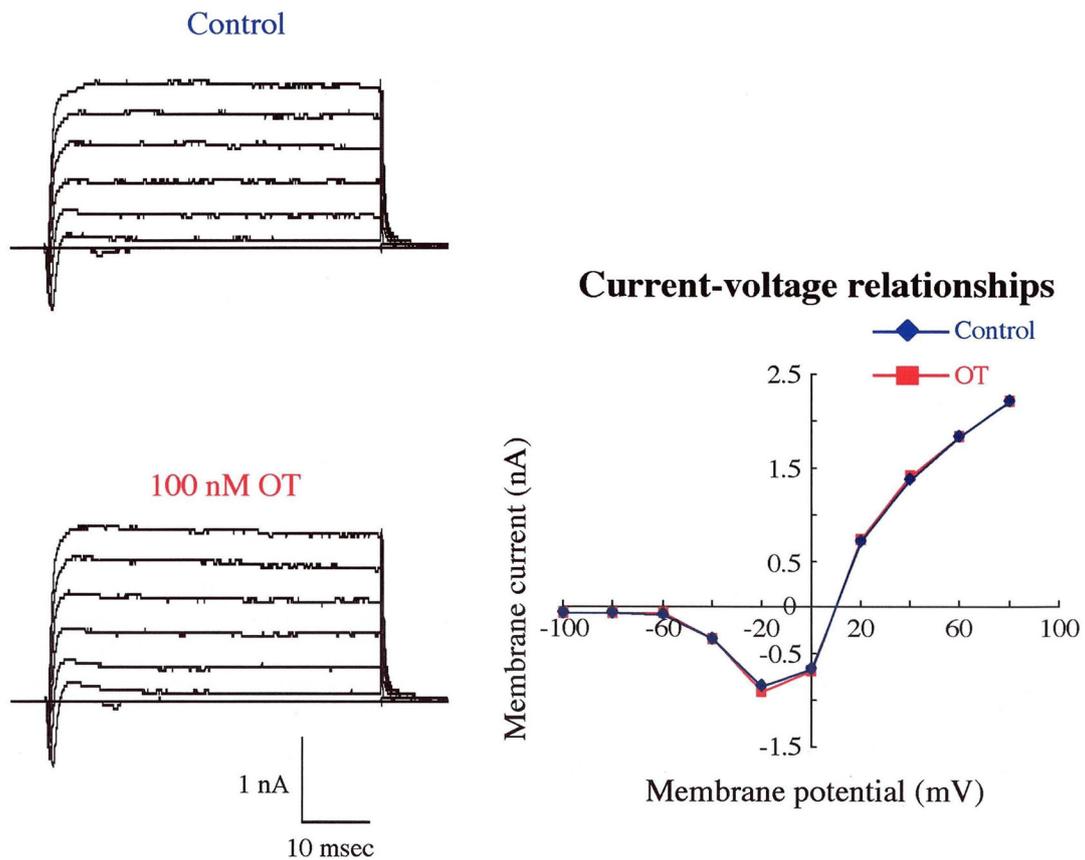


図3-19 顆粒細胞に生じるイオン電流に対するオキシトシン (OT) の効果。顆粒細胞膜を、-100 mVから+80 mVに脱分極させていくと、電位依存性のNa⁺チャネル由来の内向き電流と電位依存性のK⁺チャネル由来の外向き電流が生じる。オキシトシンを投与しても、これらの電流に明らかな変化はみられなかった。

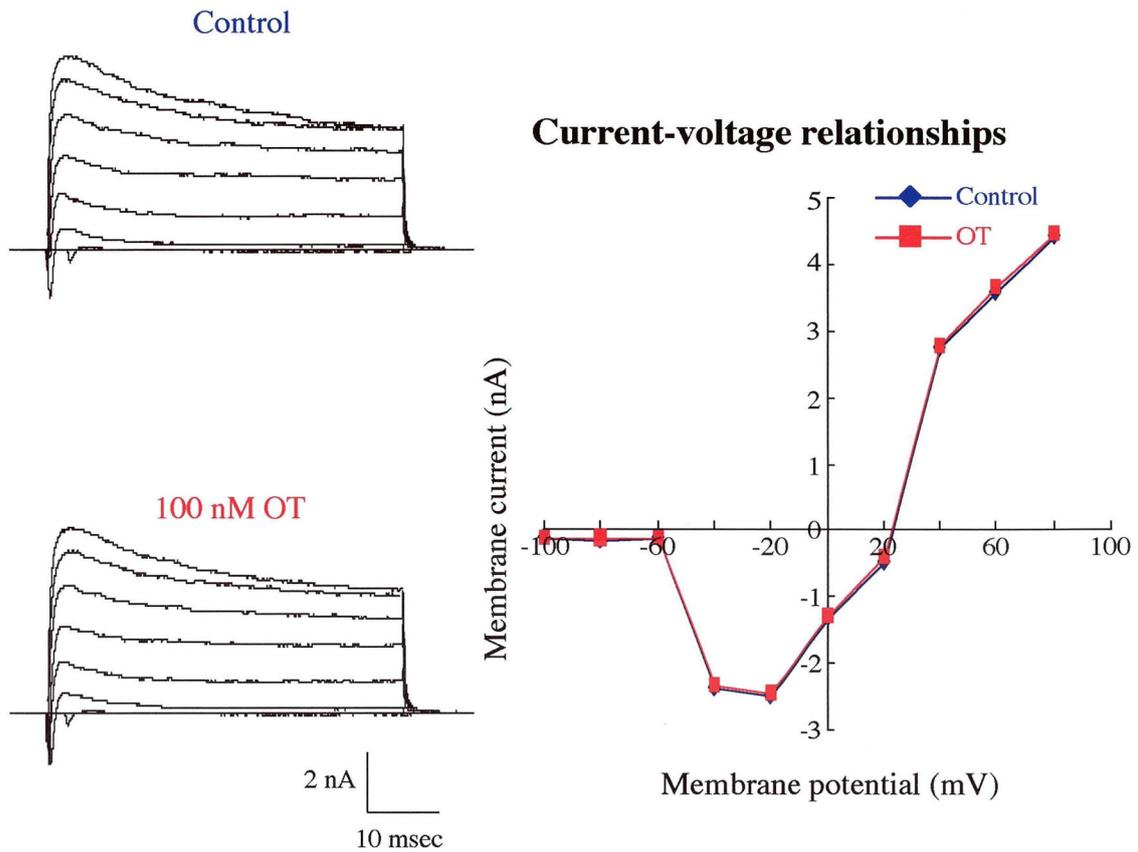


図3-20 僧帽細胞に生じるイオン電流に対するオキシトシンの効果。僧帽細胞膜を、-100 mVから+80 mVに脱分極させていくと、電位依存性のNa⁺チャンネル由来の内向き電流と電位依存性のK⁺チャンネル由来の外向き電流が生じる。オキシトシンを投与しても、これらのイオン電流に明らかな変化はみられなかった。

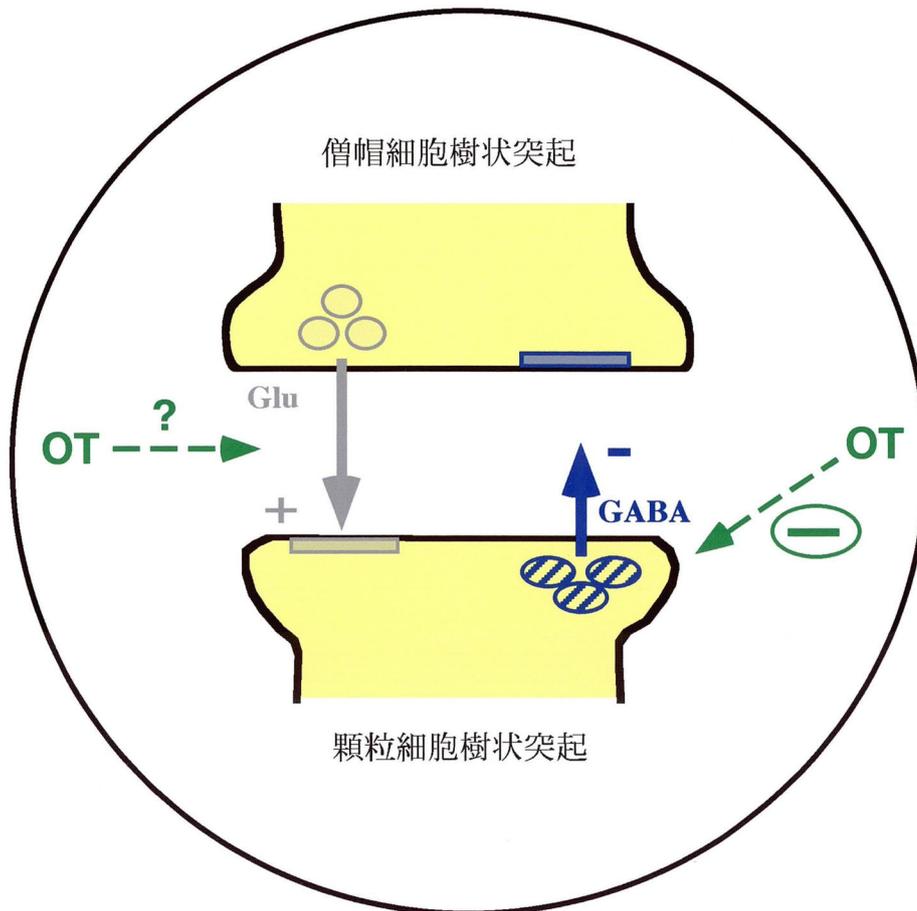


図3-21 顆粒細胞から僧帽細胞への抑制性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果。オキシトシン (OT) は、顆粒細胞からのGABAの放出を抑えることにより、顆粒細胞から僧帽細胞へのGABA作動性シナプス伝達を抑制する。

第四章

嗅球ニューロン間シナプス伝達に対する

オキシトシンの作用 (2)

—グルタミン酸作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果—

4-1 緒言

これまでの電気生理学的・行動学的研究から、分娩時の産道刺激により、視床下部室傍核小細胞性ニューロンから脳室へ放出されたオキシトシンが、嗅球レベルで仔ラットの匂い信号を抑制し、引いては母性行動の速やかな発現へと導くことが示唆されている（第3章 図3-2；Yu et al., 1996a；Yu et al., 1996b）。しかし、嗅球内におけるオキシトシンの作用の詳細は不明であった。そこで、ラット嗅球の初代培養ニューロンにパッチクランプ法を用いて解析した結果、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達が、オキシトシン（100 nM）により抑制されることが明らかになった（第3章 図3-21）。僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起は、嗅球の外叢状層で相反性シナプスを形成しており（第1章）、第3章の考察に述べたような理由から、分娩時の産道刺激を引き金に、室傍核から放出されたオキシトシンが、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を介して間接的に僧帽細胞の興奮を調節し、さらには仔ラットの匂い信号を制御している可能性が示唆される。そこで、顆粒細胞で記録されるグルタミン酸作動性シナプス電流に対するオキシトシンの効果を検討した。

4-2 材料と方法

3 週間以上培養したラット嗅球の初代培養ニューロン（第 2 章）に、パッチクランプ法を用いて解析した。ホールセル記録を倒立顕微鏡（ホフマン仕様）下で行い、ステージ上のチャンバーは、1.0 ml/min の流速でバス液を灌流した。パッチ電極は、硬質ガラス（borosilicate）の毛細管（外径 1.5 mm、内径 0.84 mm、長さ 102 mm）から作製し、シリンジフィルター（0.2 μ m）で濾過したパッチ電極内液を充填した。僧帽細胞のパッチ電極には、電極内液充填時の電気抵抗が 4~6 M Ω のものを、顆粒細胞には 6~9 M Ω のものを使用した。それぞれの細胞のパッチ膜とパッチ電極との間にギガ・シール（1G Ω 以上）を形成し、電圧固定下で記録した。すべての膜電流は、ベッセル特性の低周波通過型フィルターを通して記録した。添加・投与する薬液は、使用濃度の 200 倍濃度で凍結保存しておいたものを、直前に細胞外液で希釈し、機械型小型マニピュレーターで標的細胞に近付けたポリエチレン細管（直径約 200 μ m）を通して投与した。

僧帽細胞と顆粒細胞の同定は、免疫組織学的染色をもとに（第 2 章）、主にその形態（細胞体の大きさや樹状突起の様子）により行った。

なお、記録に用いたバス液とパッチ電極内液の組成は図 4-1 に記した。

4-3 結果

僧帽細胞で記録された GABA 作動性 Pisces が、BMI (10 μ M) でほぼ完全に消失した (第 3 章 図 3-5)。よって、バス液に BMI (10 μ M) を添加し、GABA 作動性 Pisces を遮断した状態で全ての EPSCs を記録した (図 4-2)。このようにして、顆粒細胞の膜電位を -60 mV に固定し記録される sEPSCs は、オキシトシン (100 nM) により可逆的に増大した ($n = 11$; 図 4-3)。さらに、全ての記録において、グルタミン酸受容体に特異的なアンタゴニストである CNQX と AP5 を投与し、これらの sEPSCs が完全に消失することを確認した。このときの sEPSCs の振幅の分布をヒストグラムで表すと、オキシトシン投与により右方向へ (振幅の大きい方向へ) シフトしているのが分かる。一方、sEPSCs の事象間隔の分布を同様に表すと、オキシトシン投与により左方向へ (間隔の短い方向へ) シフトしているのが分かる (図 4-4)。これらの変化は、振幅と事象間隔の積算分布の解析において、いずれも有意であった (図 4-5; 振幅、 $p < 0.01$; 事象間隔、 $p \ll 0.001$ 、Kolmogorov-Smirnov 検定)。11 個の顆粒細胞で記録された sEPSCs の平均振幅と平均頻度は、両方ともオキシトシン投与により有意に増加していた (図 4-6; 平均振幅のコントロール比、 $128.9 \pm 7.2\%$ 、 $p < 0.01$; 平均頻度のコントロール比、 $276.1 \pm 40.6\%$ 、 $p \ll 0.001$; paired t 検定)。このような sEPSCs に対するオキシトシンの増強効果は、オキシトシン受容体に特異的なアンタゴニストである desOVT (100 nM) と共投与すると観察されなかった (図 4-7; $n = 6$)。全ての記録した細胞において、図 4-8 に示すように、オキシトシンとアンタゴニストの共投与中の sEPSCs について、その振幅と事

象間隔の積算分布は、コントロールとほぼ一致した。

オキシトシンにより、顆粒細胞で記録される sEPSCs の頻度が増加するということは、オキシトシンがシナプス前部に作用し、僧帽細胞からの神経伝達物質の開口確率を高めることを示唆する。よって、オキシトシンがシナプス前部からのグルタミン酸の放出を、どのようにして増加させるのか、その作用機序の解明を試みた。神経伝達物質の放出には、シナプス終末における Ca^{2+} 濃度の上昇が必要であり、電位依存性の Ca^{2+} チャネルはその一端を担うことが知られている。そこで、僧帽細胞に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャネルに対するオキシトシンの効果を検討した。僧帽細胞の膜に -60 mV から 0 mV の脱分極性刺激 (50 ms) を与えると、持続性の内向き電流が生じる (図 4-9A)。この電流は -40 mV あたりから活性化し、 0 mV で最大になり、 $+50 \text{ mV}$ くらいで逆転する (図 4-9C)。さらに電位依存性 Ca^{2+} チャネルブロッカーである Cd^{2+} ($100 \mu\text{M}$) ではほぼ完全に消失する (図 4-9A)。このような特徴から、この電流は高電位活性型 (HVA) チャネル由来の Ca^{2+} 電流であることが示唆される。オキシトシン (100 nM) を投与しても、この HVA- Ca^{2+} チャネルの電流に、明らかな変化はみられなかった ($n = 8$, 図 4-9B、9C)。したがって、僧帽細胞における HVA- Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入に対して、オキシトシンは影響を及ぼさないことが示された。

さらに本研究において、オキシトシンは顆粒細胞で記録される sEPSCs の振幅も増大しており、このことはオキシトシンがシナプス前部以外にも作用して、シナプス伝達を増強している可能性を示唆している。そこで、オキシトシンのシナプス後部への作用として、顆粒細胞に存在するグルタミン酸受容体に対するオキシトシンの効果を検討した。顆粒細胞に、膜電位 -60 mV 固定下でグルタ

ミン酸 (50 μM) を細胞外から投与すると、脱分極性の内向きイオン電流が生じる。このイオン電流は、NMDA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストである AP5 により完全に消失しないことから、この内向き電流は NMDA 型グルタミン酸受容体と non-NMDA 型グルタミン酸受容体からの混合イオン電流と思われる (図 4-10)。グルタミン酸投与により生じるイオン電流は、オキシトシン (100 nM) により増加し (図 4-11B)、5 個の顆粒細胞における平均振幅のコントロール比は $203.2 \pm 54.7\%$ であった (図 4-12 $**p < 0.01$ 、paired t 検定)。この増加は、desOVT (100 nM) をさらに共投与すると消失した (図 4-11C、4-12; desOVT コントロール比、 $127.6 \pm 47.1\%$; NS、 $p = 0.13$ 、paired t 検定)。これらの結果より、オキシトシンは顆粒細胞のグルタミン酸に対する反応性を高めることが示唆される。

以上の結果をまとめると、オキシトシンは、シナプス前部からのグルタミン酸の開口確率を増大させると同時に、シナプス後部のグルタミン酸に対する反応性を高めることにより、顆粒細胞で記録されるグルタミン酸作動性 sEPSCs を増大させることが明らかになった。

4-4 考察

本研究において、オキシトシンがシナプス前部（僧帽細胞）からのグルタミン酸の開口確率を上昇することが示唆された。神経伝達物質の放出に電位依存性の HVA-Ca²⁺チャンネルが重要な役割を担うことが知られている。電位依存性の Ca²⁺チャンネルは、活性化するのに必要な電位の大きさから、高電位活性型（HVA）と低電位活性型（LVA）の 2 群に分類され、多くの神経細胞が HVA と LVA の両方を有する。しかし、Ca²⁺の流入の主役は HVA で、LVA は主として興奮性の調節に関与すると考えられている（Takahashi T & Momiyama A, 1993 ; Wheeler DB et al., 1994）。オキシトシンが、脊髄背角の培養ニューロンで記録される mEPSCs の頻度を増加させ、その効果は細胞外の Ca²⁺濃度に依存することも報告されている（Jo YH et al., 1998）。そこで、オキシトシンのシナプス前部への作用として、僧帽細胞の HVA-Ca²⁺チャンネル電流に対するオキシトシンの効果を検討したが、変化はみられなかった。よって、オキシトシンは、僧帽細胞における Ca²⁺流入以降の細胞内カスケードを修飾するとの可能性が考えられる。あるいは、視索上核の単離ニューロンで観察されているように、オキシトシンが細胞内ストア（小胞体など）からの Ca²⁺の遊離を促進することで、細胞内の Ca²⁺濃度を上昇させているとの可能性も考えられる（Lambert RC et al., 1994）。僧帽細胞におけるこれらの可能性については、さらなる研究が必要と思われる。

さらに本研究では、オキシトシンが sEPSCs の振幅も増大させるが、それは顆粒細胞のグルタミン酸に対する反応性を高めることにより生じることを示唆

している。シナプス電流が増大するときに考えられる、その他のメカニズムとして、多シナプスからのシナプス顆粒の放出によるシナプス電流の加算と、単一シナプスからの異なるシナプス顆粒が、ほぼ同時に放出されたことによるシナプス電流の加算が考えられる。図 4-4 で、振幅や電流間隔の多峰性の分布がみられないことから、前者の可能性は少ないように思われる。残る可能性については、本研究では検討することができなかった。

in vivo における電気生理学的研究で、室傍核の電気刺激あるいはオキシトシンの嗅球内投与により、僧帽細胞の単一ニューロン活動が抑制された。本研究において、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達が、オキシトシンにより増大することが明らかになったが、このオキシトシンによる顆粒細胞での sEPSCs の増大が、僧帽細胞との間に形成されている相反性樹状突起間シナプスを介して、間接的に僧帽細胞を抑制すれば、上述の in vivo における電気生理の結果を説明できる。すなわち、オキシトシンが僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を増大させることで、顆粒細胞を興奮させ、その顆粒細胞の興奮は、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達を増大させ、結果的に僧帽細胞が抑制されるというわけである。

さらに、本結果から、オキシトシンがグルタミン酸作動性シナプス伝達を増大させる際、僧帽細胞にも顆粒細胞にも作用することが示唆されたが、オキシトシン受容体 mRNA の発現に関する研究で、僧帽細胞層にも顆粒細胞層にも発現を示しているという報告と一致するものである (Vaccari C et al., 1998 ; Yoshimura R et al., 1993) 。

4-5 小括

本研究において、ラット嗅球の初代培養ニューロンにおいて、顆粒細胞から記録されるグルタミン酸作動性 sEPSCs は、オキシトシンにより増大した。そのオキシトシンの作用として、僧帽細胞からのグルタミン酸の放出確率を増大すると同時に、顆粒細胞におけるグルタミン酸に対する反応性を高めることが示唆された (図 4-13)。

母親ラットは、仔ラットの匂いに対する忌避反応に打ち勝って母性行動を開始する。それは、分娩時の産道刺激により室傍核から脳室へ放出されたオキシトシンが、仔ラットの匂い信号を嗅球で抑制するからと考えられてきた。本研究の結果は、オキシトシンが僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を増大することで、相反性樹状突起間シナプスを介して、間接的に僧帽細胞を抑制し得ることを示唆するものである。そして、嗅球内の唯一の出力細胞である僧帽細胞の抑制は、仔ラットの匂い信号の抑制、引いては母性行動の開始へと導くと考えられる。

●バス液組成【標準】

NaCl	162.5 mM
KCl	2.5 mM
CaCl ₂ (BaCl ₂)	2.0 mM (10 mM)
HEPES	10 mM
Glucose	10 mM
MgCl ₂	1 mM

pH 7.3 (NaOH による調整)、浸透圧 325 mOsm (スクロースによる調整)

●パッチ電極内液組成

KCl (CsCl)	145 mM
MgCl ₂	2 mM
HEPES	10 mM
Na ₂ -ATP	4 mM
Na ₂ -GTP	0.5 mM
EGTA	1.1 mM

pH 7.2 (KOH による調整)、浸透圧 310 mOsm (マンニトールによる調整)

図 4-1 全細胞記録時に使用した、バス液とパッチ電極の組成。Ca²⁺電流を測定するときは、バス液の Ca²⁺を Ba²⁺に、パッチ電極内液の K⁺を Cs⁺に置換した。

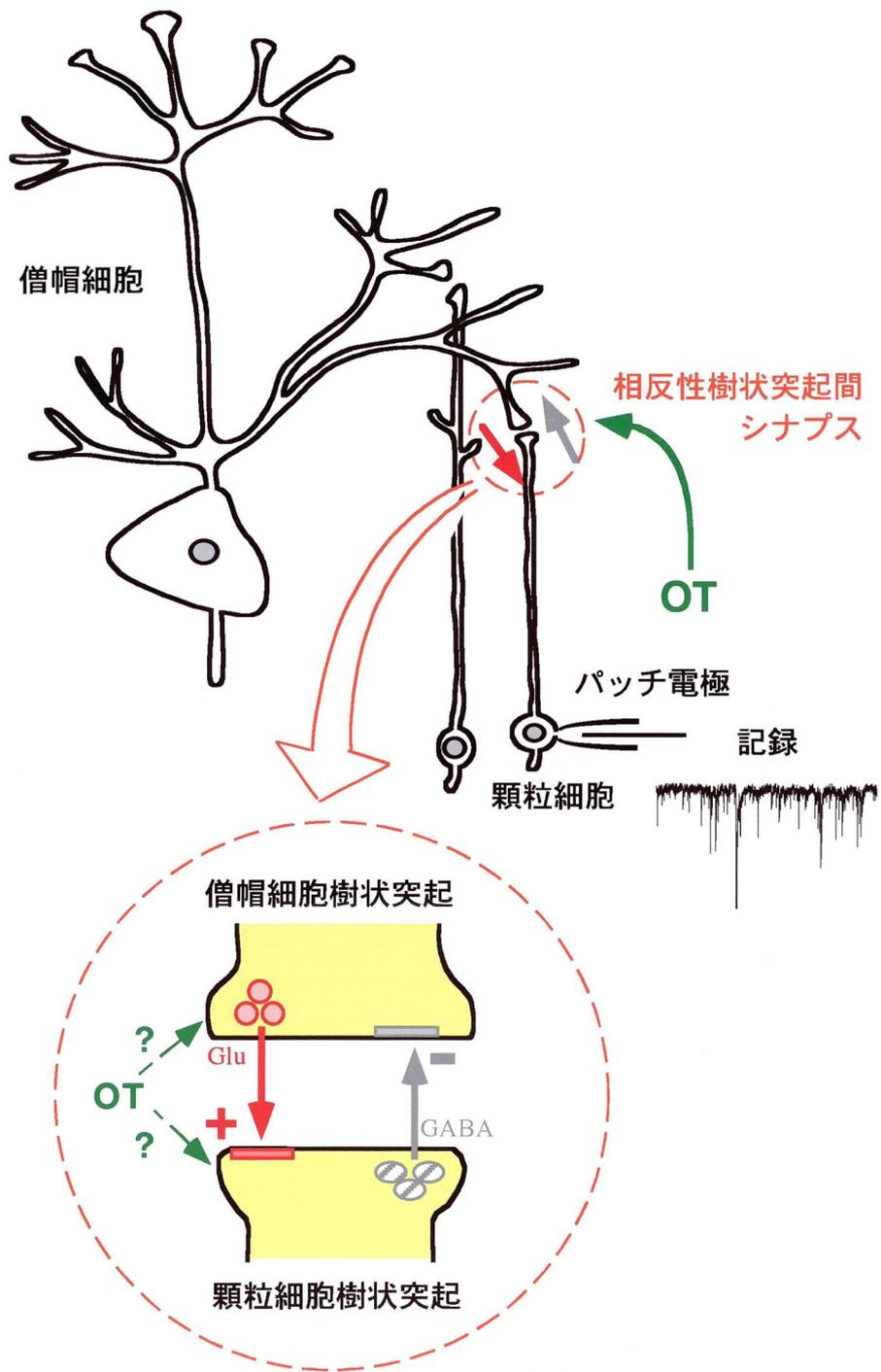


図4-2 グルタミン酸作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果の解析。僧帽細胞と顆粒細胞の間には、相反性樹状突起間シナプスが形成されている（ \circ ）。そのうち、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果を、パッチクランプ法により解析した。その際、顆粒細胞から僧帽細胞への抑制性シナプス伝達を遮断した状態で（ \leftarrow ）、顆粒細胞の膜電位を固定した。

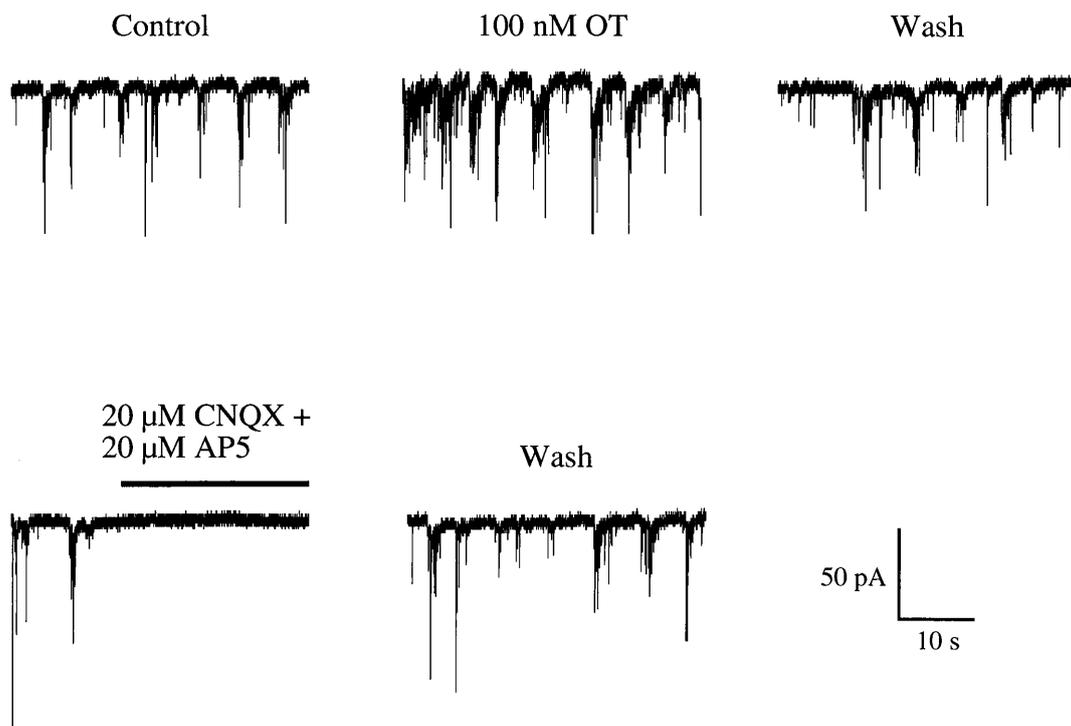


図4-3 顆粒細胞で記録されるsEPSCsに対するオキシトシン (OT)の効果。顆粒細胞の膜電位を-60 mVに固定して記録されるシナプス電流は、OTにより可逆的に増大する。このシナプス電流は、グルタミン酸受容体に特異的なアンタゴニストであるCNQXとAP5を投与すると完全に消失することから、グルタミン酸作動性sEPSCsであることが示唆される。

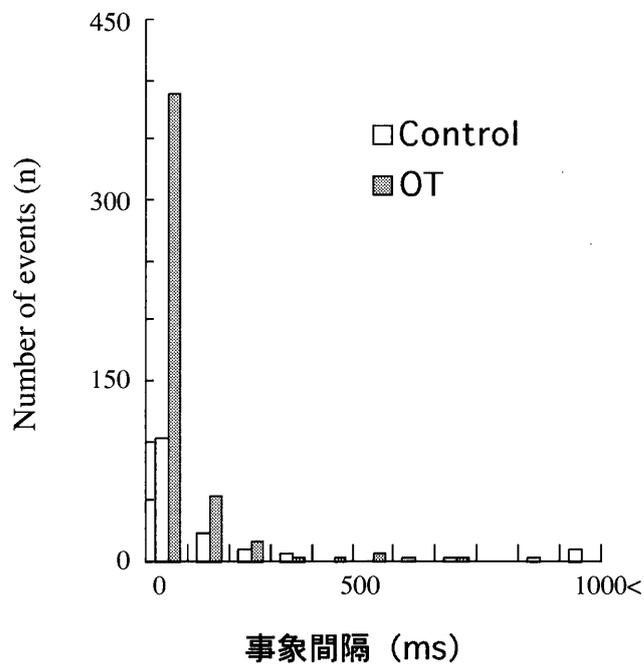
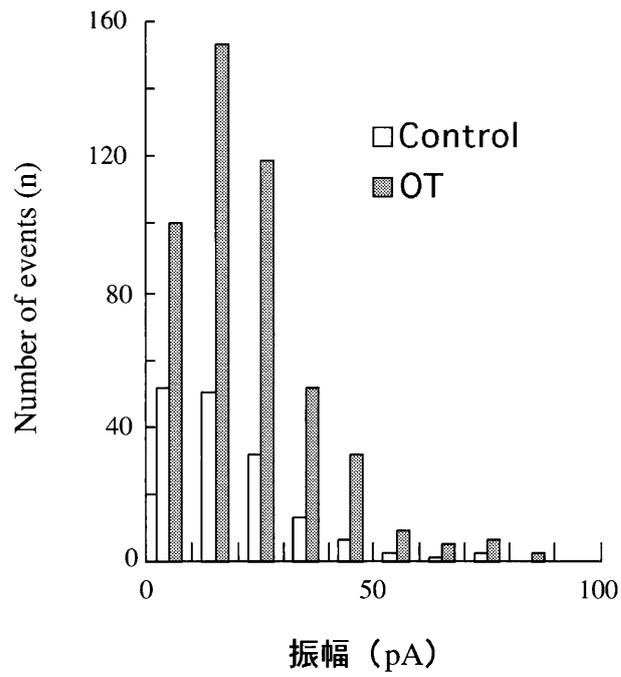


図4-4 コントロールとオキシトシン投与時（OT）のsEPSCsの振幅と事象間隔の分布。図4-3のコントロールとOTにおける、sEPSCsの振幅と事象間隔の分布をヒストグラムで表した。OTの振幅と事象間隔の分布は、それぞれ右方向、左方向へシフトしている。

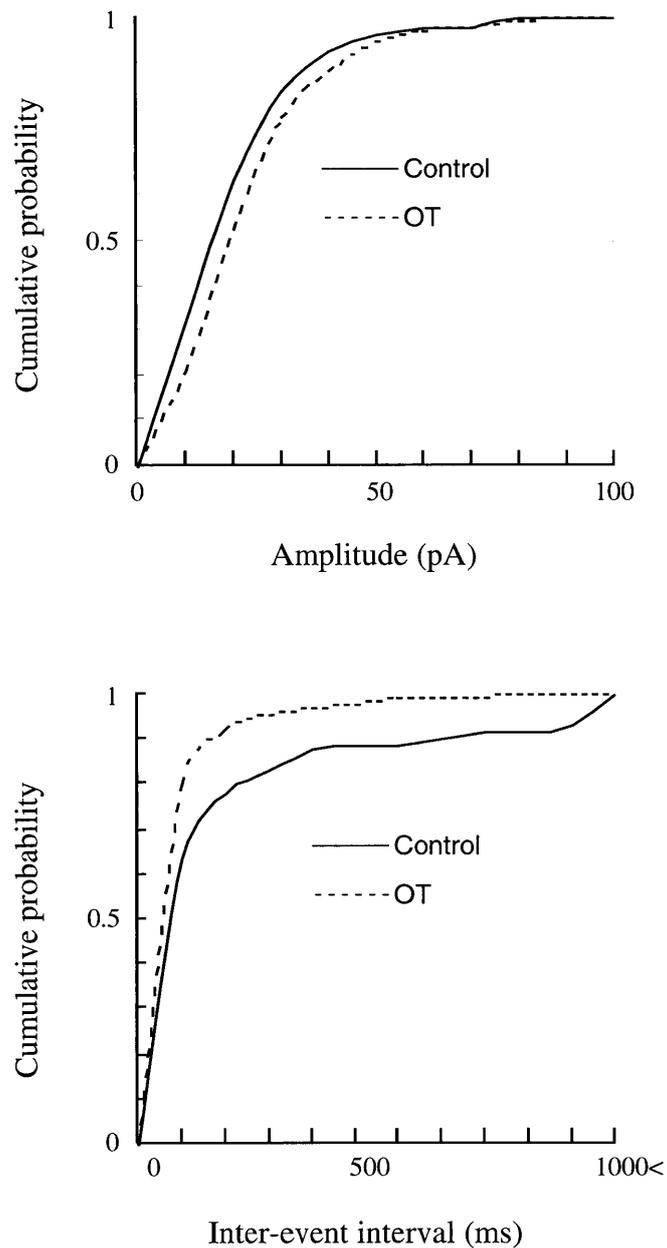


図4-5 コントロールとオキシトシン投与時（OT）における、sEPSCsの振幅と事象間隔の積算分布。図4-3のControlとOTのsEPSCsについて、その振幅と事象間隔の積算分布をプロットした。OTのsEPSCsの振幅と事象間隔は、コントロールに比べ、それぞれ右方向（ $p < 0.01$ ）、左方向（ $p \ll 0.001$ ）へ有意に変化した（Kolmogorov-Smirnov検定）。

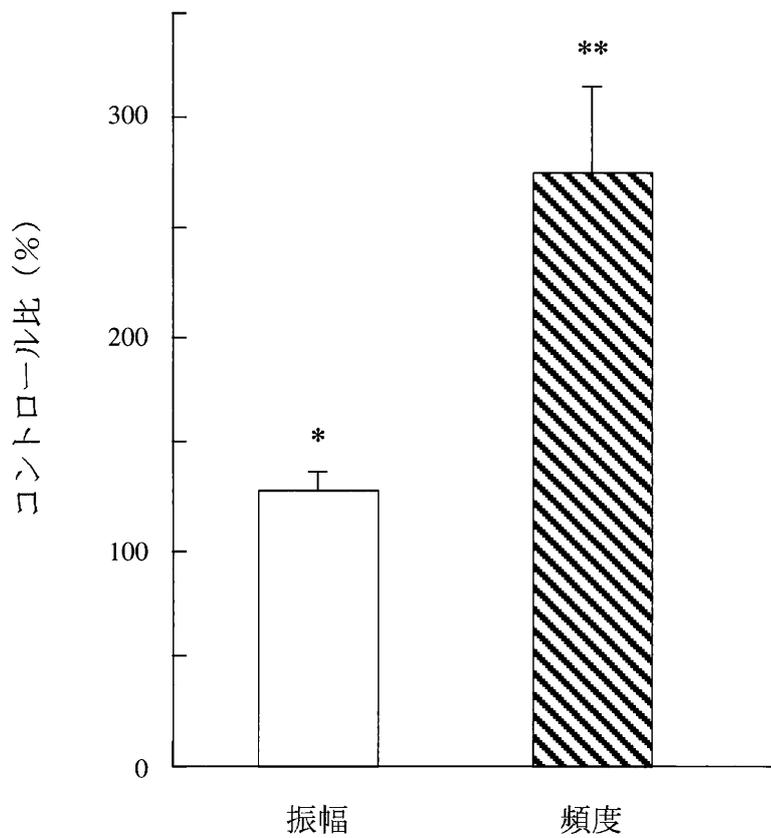


図4-6 オキシトシン投与時 (OT) ^{顆粒}における sEPSCs の平均振幅と平均頻度のコントロール比。11個の ~~増幅~~ 細胞で記録された OT の sEPSCs の、平均振幅と平均頻度のコントロール比をヒストグラムで表した。平均振幅 (* $p < 0.01$)、平均頻度 (** $p << 0.001$) のいずれについても、そのコントロール比は有意に増加した (paired t検定)。

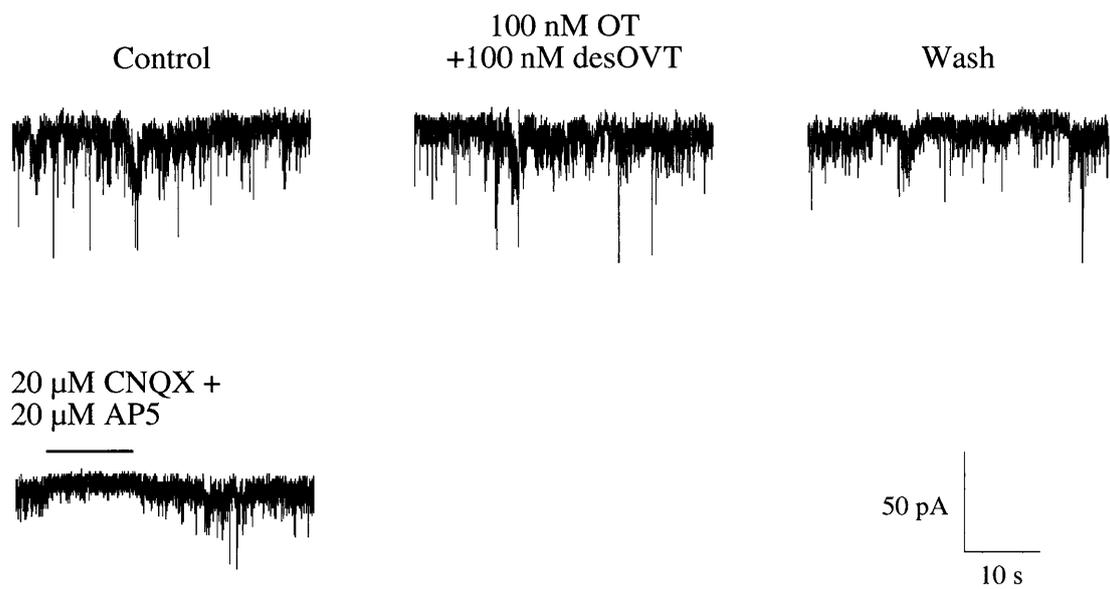


図4-7 sEPSCsにおけるオキシトシン (OT)とOT受容体に特異的なアンタゴニストとの共投与の効果。OTをOT受容体に特異的なアンタゴニストであるdesOVTと共投与すると、sEPSCsに対する増強効果は消失した。

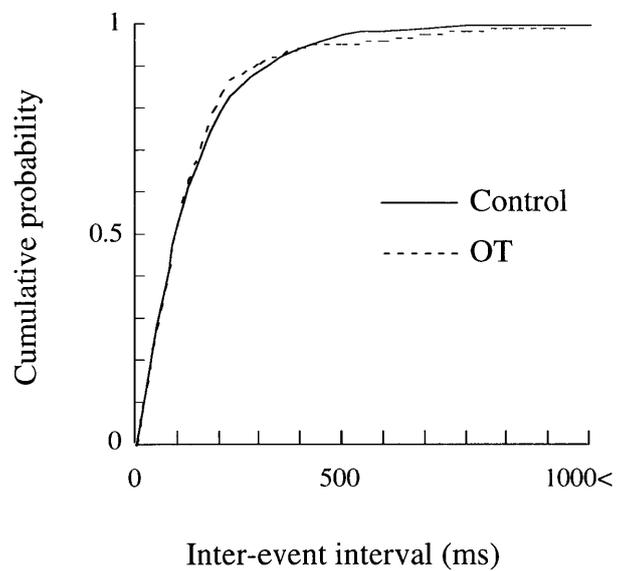
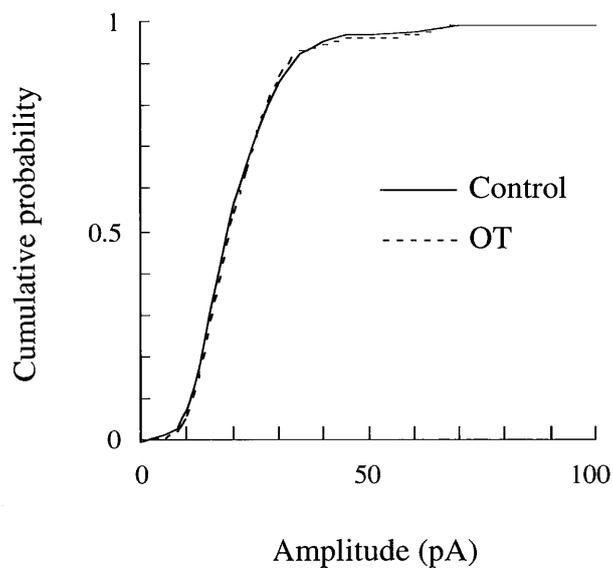


図4-8 オキシトシン (OT) とOTアンタゴニストを共投与したときの sEPSCs の振幅と事象間隔の積算分布。図4-7のControlとOTのsEPSCsについて、その振幅と事象間隔の積算分布をプロットした。OTの振幅と事象間隔のいずれについても、その分布はコントロールの分布と一致した。

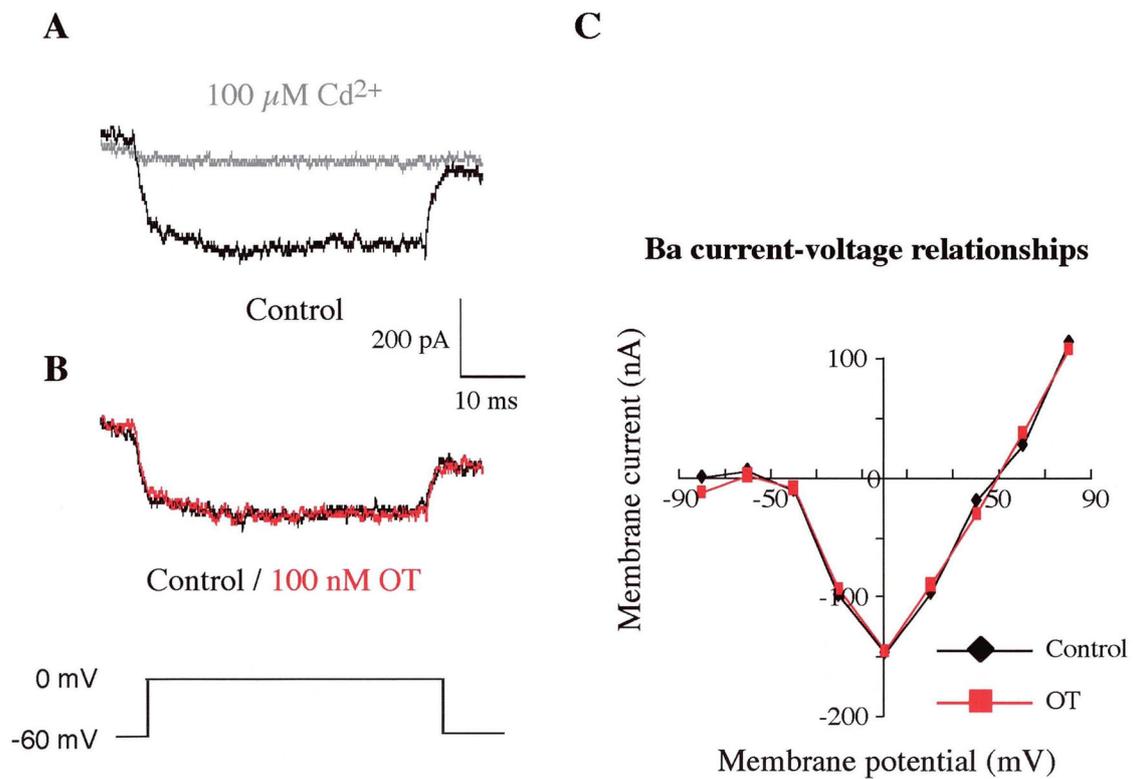


図4-9 顆粒細胞の電位依存性 Ca^{2+} 電流に対するオキシトシン (OT) の効果。顆粒細胞に -60 mVから 0 mVへの脱分極刺激 (50 ms) を与えると、持続性の内向き電流が生じる。OT存在下でも内向き電流に変化はみられない (B)。また、この電流は Cd^{2+} でほぼ完全に消失する (A)。さらに、この内向き電流の膜電位依存性にも、OTによる目立った変化はみられない (C)。

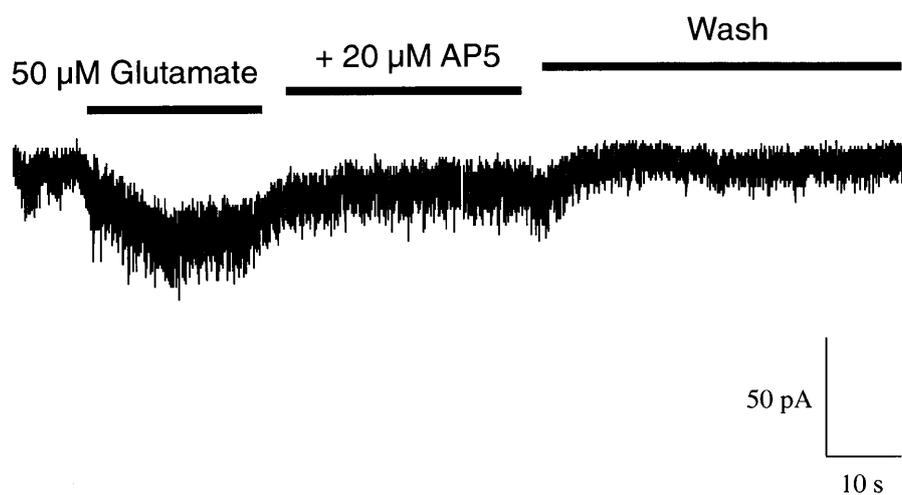


図4-10 顆粒細胞にグルタミン酸を投与して生じたイオン電流。顆粒細胞の膜電位を-60 mVに固定し、グルタミン酸を投与すると脱分極性の内向き電流が生じる。NMDA型グルタミン酸受容体のアンタゴニストであるAP5により完全に消失しないことから、この内向き電流はNMDA型グルタミン酸受容体とnon-NMDA型グルタミン酸受容体からの混合イオン電流と思われる。

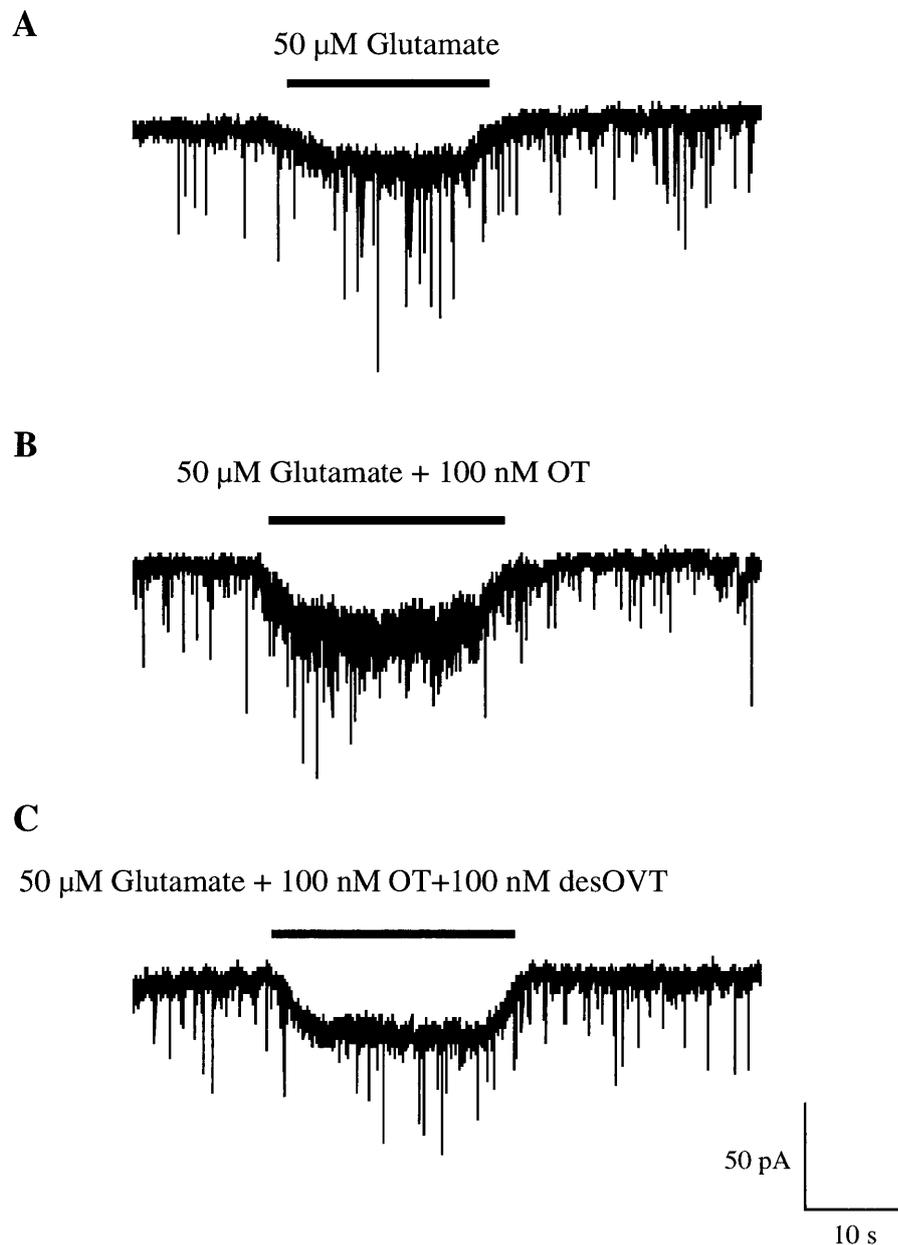


図4-11 グルタミン酸受容体介在性イオン電流に対するオキシトシン (OT) の効果。顆粒細胞の膜電位を-60 mVに固定し、グルタミン酸を投与すると脱分極性の内向き電流が生じる (A)。この内向き電流は、OTにより増大する (B)。OTをOT受容体に特異的なアンタゴニストであるdesOVTと共投与すると、内向き電流の増大はみられなかった (C)。

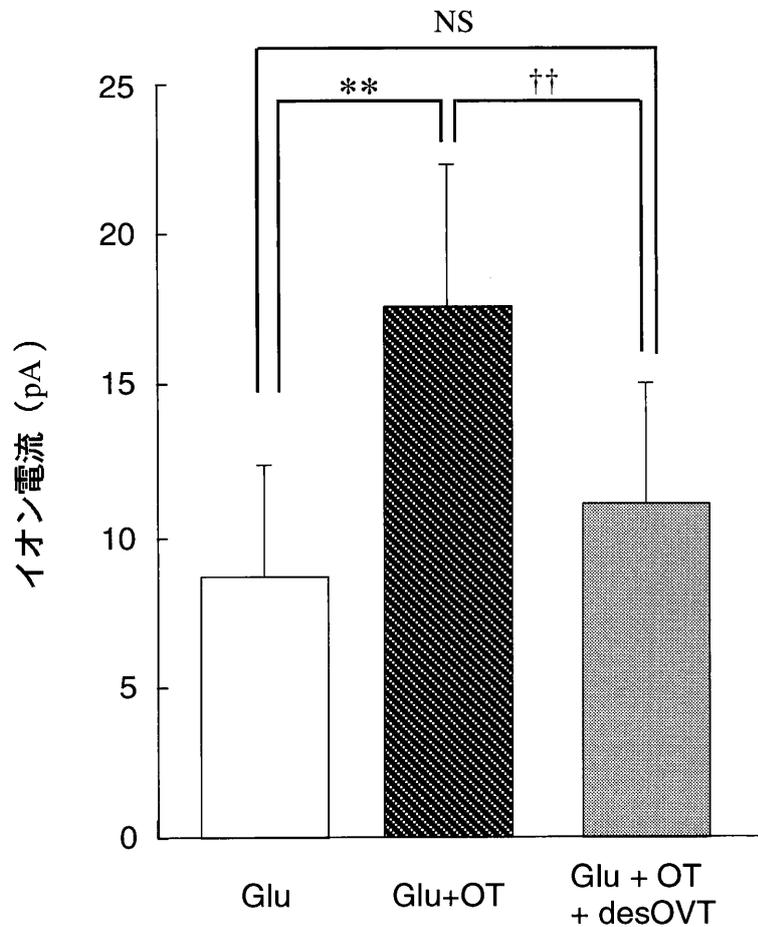


図4-12 顆粒細胞にグルタミン酸 (Glu) を投与して生じた平均イオン電流に対するオキシトシン (OT) の効果。5個の顆粒細胞において、図4-11の様にして記録したA、B、Cの内向き電流の平均振幅をヒストグラムで表した。Gluによる平均イオン電流はOTにより有意に増加し (** $p < 0.01$)、この増加はOTアンタゴニストdesOVTにより消失した (NS, $p = 0.13$, Glu+OT+desOVT vs Glu; †† $p < 0.01$, Glu+OT vs Glu+OT+desOVT, paired t検定)。

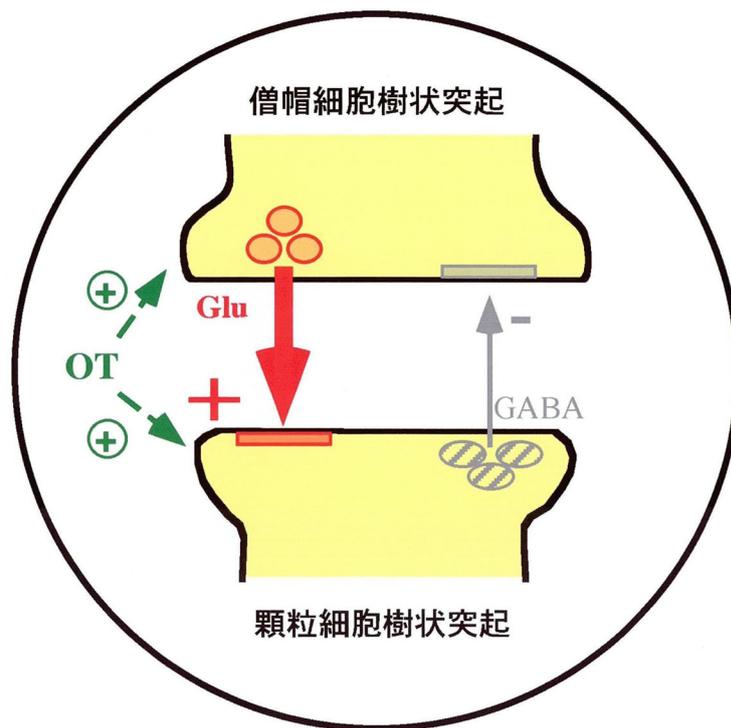


図4-13 グルタミン酸作動性シナプス伝達に対するオキシトシン (OT) の効果。OTは僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を増大する。それは、僧帽細胞からのグルタミン酸の放出確率を増大させると同時に、顆粒細胞のグルタミン酸受容体のグルタミン酸に対する反応性を高めることによる。

第五章

総合考察

5-1 結果要約

嗅球内ニューロンに対するオキシトシンの作用を解析するにあたり、なるべく単純化した神経回路上での解析が必要と思われた。そこで、第 2 章ではラット嗅球の初代培養を試みた。3 週間以上培養した細胞において、主に大・小 2 種類の細胞が観察され、免疫組織化学的染色の結果をもとに、双極性の細い樹状突起を有する小さい ($< 10 \mu\text{m}$) 細胞は顆粒細胞、多極性の太い樹状突起を有する大きい ($> 15 \mu\text{m}$) 細胞は僧帽細胞であることが示唆された。これらは生体内における僧帽細胞と顆粒細胞の形態的特徴とも一致している。さらに、第 3 章において、それぞれの細胞でパッチクランプ法による全細胞記録を行うと、顆粒細胞にはグルタミン酸作動性興奮性シナプスの入力、僧帽細胞には GABA 作動性抑制性シナプスの入力が見られた。以上のことから、本研究における嗅球の初代培養系においても、比較的体内と同様な神経回路が再構築されていることが示唆された。

僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起間シナプスは相反性であり、このことはオキシトシンの作用の解析を困難にする。そこで、初代培養系の利点を生かし、薬理学的手法を用いて、相反性シナプス伝達を一方向ずつに単離して解析を行った。まず第 3 章において、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの作用を解析した。灌流液中にグルタミン酸受容体のアンタゴニストである CNQX ($20 \mu\text{M}$) と AP5 ($20 \mu\text{M}$) の存在下で、僧帽細胞の膜電位を -60 mV に固定すると、顆粒細胞由来の sIPSCs が記録できる。この sIPSCs はオキシトシンで振幅は変化せずにその頻度のみが可逆的に減少した。

このオキシトシンの sIPSCs に対する効果は、オキシトシン受容体のアゴニストで再現され、アンタゴニストで消失した。同様の現象は、灌流液中にテトロドトキシン存在下でも観察された。また、僧帽細胞と顆粒細胞で記録される電位依存性 Na^+ 電流、 K^+ 電流はオキシトシンにより変化せず、顆粒細胞に生じる GABA 誘発電流にもオキシトシンは効果を示さなかった。これらのことより、オキシトシンは、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達に対し抑制効果を示し、その効果は、オキシトシンがシナプス付近に作用し、顆粒細胞からの GABA の開口確率を低下させることにより発現することが示唆された。

第 4 章においては、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達に対するオキシトシンの効果を検討した。灌流液中に GABA 受容体に特異的なアンタゴニストである BMI 存在下で、顆粒細胞の膜電位を -60 mV に固定すると僧帽細胞由来の sEPSCs が記録される。オキシトシンは、この sEPSCs の振幅も頻度も有意に増加し、この効果はオキシトシンアンタゴニストにより消失した。そこで、シナプス前部への作用として、僧帽細胞における高電位活性化 Ca^{2+} チャンネル電流に対するオキシトシンの効果を検討したが、変化はみられなかった。シナプス後部への作用としては、オキシトシンは、顆粒細胞におけるグルタミン酸誘発電流を有意に増大し、この変化はオキシトシンアンタゴニストにより消失した。これらのことから、オキシトシンは、僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を増大し、その作用は僧帽細胞からのグルタミン酸の開口確率を高めると同時に、顆粒細胞のグルタミン酸に対する反応性も増大することによることが示唆された。

5-2 総合考察

本研究から、オキシトシンが僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を増強することが明らかとなった。このオキシトシンによるグルタミン酸作動性シナプス伝達の増強が、僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起間に形成されている相反性シナプスを介して間接的に僧帽細胞の興奮を抑制すれば、オキシトシンにより僧帽細胞の単一ニューロン活動が抑制された *in vivo* の電気生理学的実験の結果と一致する。さらに、本研究において、オキシトシンはグルタミン酸作動性シナプス伝達を増強すると同時に、顆粒細胞からの GABA の放出を抑制することにより、顆粒細胞から僧帽細胞への GABA 作動性シナプス伝達を抑制することが示唆された。もし、この GABA 作動性シナプス伝達に対する抑制効果が微弱であれば、オキシトシンによるグルタミン酸作動性シナプス伝達の増強により、相反性樹状突起間シナプスを介して僧帽細胞が抑制され、引いては嗅覚情報（仔ラットのフェロモン信号）の圧縮が生じる。あるいは、もし、オキシトシンによる GABA 作動性シナプス伝達に対する抑制効果が強ければ、僧帽細胞は GABA による抑制から解放（脱抑制）されより興奮し、一方、オキシトシンのグルタミン酸作動性シナプス伝達に対する増強効果により、顆粒細胞も興奮する。すなわち、僧帽細胞も顆粒細胞も興奮することになり、両細胞間シナプスに可塑的な変化が生じ、引いては顆粒細胞から僧帽細胞への抑制が増大することが考えられる。

本研究において、嗅球の初代培養ニューロンを用いて解析を行った。培養系は生体内の神経回路を単純化することにより、特定の細胞やシナプスの詳細な

解析を可能にするなどの利点を有している。一方欠点もある。生体内においては、僧帽細胞と顆粒細胞の間には相互に作用し合い、かつ作用に関して一方が興奮性で他方が抑制性という相反性相互シナプスが形成されているが、培養系においても相反性相互シナプスが形成されているのか現在のところ不明である。さらには、嗅球内情報処理には嗅球外からの嗅球への投射、すなわち遠心性投射が重要な役割を演じている。オキシトシンは、この遠心性線維の作用を修飾することによって嗅球内情報処理を変化させる可能性がある。例えば、雄ラットにおいて、オキシトシンが嗅覚系に働いて個体識別能（の保持）を高めることが知られている（Sawyer et al., 1984 ; Dantzer et al., 1990）。最近、この効果は、オキシトシンが嗅球のノルアドレナリンの放出を促進し、そのノルアドレナリンが α 受容体を活性化することで発現することにより発現するとの知見が報じられている（Dluzen et al., 2000）。母性行動の発現に関するオキシトシンの嗅球内作用においても、このようなメカニズムが介在している可能性がある。

5-3 総括

母性行動は我が仔の生存・発育に関わる事象であり、種の保存に直結している。多くの動物において、この極めて生物価の高い行動の制御を、フェロモンによるケミカルコミュニケーションが行っている。この母性行動の発現に関わるフェロモンはリリーサーフェロモン的一种であり、主嗅覚系により情報処理される。嗅球は主嗅覚系の最初の中継所であるが、単にフェロモン情報の中継所としてだけではなく、情報の先鋭化や可塑的な変化などを通じて、フェロモン情報の出力を絶妙に調節していることが示唆されている。

近年、オキシトシンは雌個体における子宮平滑筋の収縮や射乳反射などを引き起こすホルモンとしての作用の他に、中枢神経系で神経伝達物質や神経修飾物質として働き、引いては記憶や学習行動に直接あるいは間接的に影響を与えている可能性が示唆されている。母性行動においても、分娩を機に脳室へ放出されたオキシトシンが、嗅球内ニューロン間シナプス伝達を修飾することで、分娩後の母親のその速やかな発現を可能にする。本研究において、オキシトシンのその修飾効果の解析を、初代培養ニューロンとパッチクランプ法を用いることによりシナプスレベルで行うことができた。

引用文献

- Adams DR & Wiekamp MD (1984) The canine vomeronasal organ. *J. Anat.*, 138: 771-787.
- Altman J (1989) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 137; 433-457.
- Baverstock P & Green B (1975) Water recycling in lactation. *Science*, 187: 657-658.
- Beauchamp GK, Yamazaki K & Boyse EA (1985) The chemosensory recognition of genetic individuality. *Sci. Am.*, 253: 86-92.
- Blakely RD, Ory-Lavollee L, Grzanna R, Koller KJ & Coyle JT (1987) Selective immunocytochemical staining of mitral/tufted cells in rat olfactory bulb with affinity purified antibodies against N-acetyl-aspartyl-glutamate. *Brain Res.* 402; 373-378.
- Bridges RS (1984) A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Neuroendocrinology.*, 114: 930-940.
- Bruce HM (1959) An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*, 184: 105.
- Dantzer R, Tazi A & Bluthé RM (1990) Cerebral lateralization of olfactory-mediated affective processes in rats. *Behav. Brain Res.*, 40; 53-60.
- Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Ebner K & Landgraf R (2000) Oxytocin induces preservation of social recognition in male rats by activating alpha-adrenoceptors of the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.*, 12; 760-766.
- Dreifuss JJ, Dubois-Dauphin M, Widmer H & Raggenbass M (1992) Electrophysiology of oxytocin actions on central neurons. In: *Oxytocin in maternal, Sexual and Social Behaviors*, Pedersen CA, Caldwell JD, Jirikowski GF & Insel TR (eds.), Ann. N. Y. Acad. Sci., 652; 46-57.
- Engelmann M, Wotjak CT, Neumann I, Ludwig M & Landgraf R (1996) Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20; 341-358.
- Fahrbach SE, Morrell JI & Pfaff DW. (1985) Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology.*, 40: 526-532.

- Fleming AS & Rosenblatt JS. (1974) Olfactory regulation of maternal behavior in rats. II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 86: 233-246.
- Friedman MI, Bruno JP & Albert JR (1981) Physiological and behavioral consequences in rats of water recycling during lactation. *J. Comp. Physiol.*, 95: 26-35.
- Gubernick DJ & Klopfer PH (eds.) (1981) Parental care in mammals. Plenum Press, New York.
- Gubernick DJ & Alberts JR (1985) Maternal licking by virgin and lactating rats: Water transfer from pups. *Physiol. Behav.*, 34: 501-506.
- Hagino-Yamagishi K, Minamikawa-Tachino R, Ichikawa M & Yazaki K (1999) Expression of Brain-2 in the developing olfactory bulb. *Brain Res.*, 113: 133-137.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 391; 85-100.
- Hersher L, Richmond JB & Moore AU (1963) Maternal behavior in sheep and goats. In: *Maternal behavior in mammals*, Rheingold HL (ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 203-232.
- Hirano T, Kubo Y & Wu MM (1986) Cerebellar granule cells in culture: Monosynaptic connections with Purkinje cells and ionic currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83; 4957-4961.
- Jacobson L (1811) Description anatomique d'un organe observe dans les mammiferes. *Ann. Mus. D'Hist. Nat. Paris*, 18: 412-424.
- Jo YH, Stoeckel ME, Freund-Mercier MJ & Schlichter R (1998) Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *J. Neurosci.* 18; 2377-2386.
- Karlson P & Lüscher M (1959) 'Pheromones' : a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183: 55-56.
- Kendrick KM, Keverne EB, Chapman C & Baldwin BA (1988) Intracranial dialysis measurement of oxytocin, monoamine and uric acid release from the olfactory bulb and substantia nigra of sheep during parturition, suckling, separation from lambs and eating. *Brain Res.* 439: 1-10.
- Keverne EB (1983) Pheromonal influences on the endocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci.*, 6: 381-384.

- Kevetter GA & Winans SS (1981) Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *J. Comp. Neurol.*, 197: 81-98.
- Lambert RC, Dayanithi G, Moos FC & Richard P (1994) A rise in the intracellular Ca^{2+} concentration of isolated rat supraoptic cells in response to oxytocin. *J. Physiol.* 478 ; 275-287.
- Le Neindre P, Poindron P & Delouis C. (1979) Hormonal induction of maternal behavior in non-pregnant ewes. *Physiol. Behav.*, 22: 731-734.
- Meredith M (1983) Sensory physiology of pheromone communication. In: Pheromones and reproduction in mammals. Vandenberg JG (ed.) Academic Press, New York, pp. 199-252.
- Moltz H, Robbins D & Parks M (1966) Caesarean delivery and maternal behavior of primiparous and multiparous rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 61: 455-460.
- Moltz H, Geller D & Levin R (1967) Maternal behavior in the totally mammectomized rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 64: 225-229.
- Moltz H, Lubin M, Leon M & Numan M (1970) Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat. *Physiol. Behav.*, 5: 1373-1377.
- Mori K (1987) Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog. Neurobiol.* 29; 275-320.
- Moulton DG & Tucker D (1964) Electrophysiology of the olfactory system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 116; 380-428.
- Neale EA, Oertel WH, Bowers LM & Weise VK (1983) Glutamate decarboxylase immunoreactivity and 3H -GABA accumulation within the same neurons in dissociated cell cultures of cerebral cortex. *J. Neurosci.* 3; 376-382.
- Pedersen CA & Prange AJ Jr. (1979) Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 76: 6661-6665.
- Pedersen CA, Caldwell JD, Johnson MF, Fort SA & Prange AJ Jr. (1985) Oxytocin antiserum delays onset of ovarian steroid-induced maternal behavior. *Neuropeptides.*, 6: 175-182.
- Raggenbass S, Alberi S, Zaninetti M, Pierson P & Dreifuss JJ (1998) Vasopressin and oxytocin action in the brain: Cellular neurophysiological studies. *Prog. Brain Res.*, 119; 263-273.

- Rheingold HL (ed.) (1963) Maternal behavior in mammals. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Rosenblatt JS (1967) Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science*, 156: 1512-1514.
- Rosenblatt JS, Mayer AD & Siegel HI (1985) Maternal behavior among the nonprimate mammals. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol. 7, Reproduction, Adler N, Praff D, & Goy RW (eds.), Plenum Press, New York, pp. 229-298.
- Sawyer TF, Hengehold AK & Perez WA (1984) Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. *Behav. Neurosci.*, 98; 908-913.
- Scalia F & Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.*, 161: 31-55.
- Siegel HI, & Rosenblatt JS. (1975) Estrogen-induced maternal behavior in hysterectomized-overiectomized virgin rats. *Physiol. Behav.*, 14: 465-471.
- Stern K & McClintock MK (1998) Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature*, 392: 177-179.
- Takahashi T & Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*, 366; 156-158.
- 高見 茂 (1996) ヒトに鋤鼻感覚系はあるのか？蛋白質核酸酵素、41: 2093-2100.
- Tribollet E, Barberis C, Dubois-Dauphin M & Dreifuss JJ (1992) Localization and characterization of binding sites for vasopressin and oxytocin in the brain of the guinea pig. *Brain Res.*, 589; 15-23.
- Trombrey PQ & Westbrook GL (1990) Excitatory synaptic transmission in cultures of rat olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 64; 598-606.
- Vaccarezza OL, Sepich LN & Tramezzani JH (1981) The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.*, 132: 167-185.
- Vaccari C, Lolait SJ & Ostrowski NL (1998) Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology*, 139; 5015-5033.
- van Leengoed E, Kerker E & Swanson HH. (1987) Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J. Endocrinol.*, 112: 275-282.
- Wada A, Kogure N, Mizoguchi S, kimura J, Tsukise A & Okano M (1991) Topographic anatomical study of the feline vomeronasal organ. *Bull. Coll. Agr. & Vet. Med.*

Nihon Univ., 48: 89-97.

Wheeler DB, Randall A & Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science*, 264; 107-111.

Wiesner BP & Sheard NM (1933) *Maternal Behaviour in the rat*. Oliver and Boyd, Edinburgh.

Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O & Tohyama M (1993) Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology*, 133; 1239-1246.

Yu GZ, Kaba H, Okutani F, Takahashi S, Higuchi T & Seto K (1996a) The action of oxytocin originating in the hypothalamic paraventricular nucleus on mitral and granule cells in the rat main olfactory bulb. *Neuroscience.*, 72; 1073-1082.

Yu GZ, Kaba H, Okutani F, Takahashi S & Higuchi T (1996b) The olfactory bulb: a critical site of action for oxytocin in the induction of maternal behaviour in the rat. *Neuroscience.*, 72; 1083-1088.