

ラット体性感覚野パレル皮質の構造と機能
ーモジュール構造、受容野、脳内地図ー

version 1.3

担当：藤田一郎、田村 弘 (脳科学講座・認知脳科学研究室)

目次

A. 実習の目的と概要

1. 目的
2. 進め方と予定
3. 評価

B. パレル皮質、細胞外記録とは？(まず、理論武装だ！)

1. 体性感覚
2. ラットのパレル野
3. 神経活動の細胞外記録

C. ヒゲと脳の観察(動物をよく見よう)

1. ヒゲの観察
2. 脳の外形観察

D. 単一神経細胞活動記録(いよいよ、脳の中を探る)

1. 手術

2. 細胞活動の記録

3. ラットの灌流固定

E. パレル皮質組織標本の観察(構造を把握する)

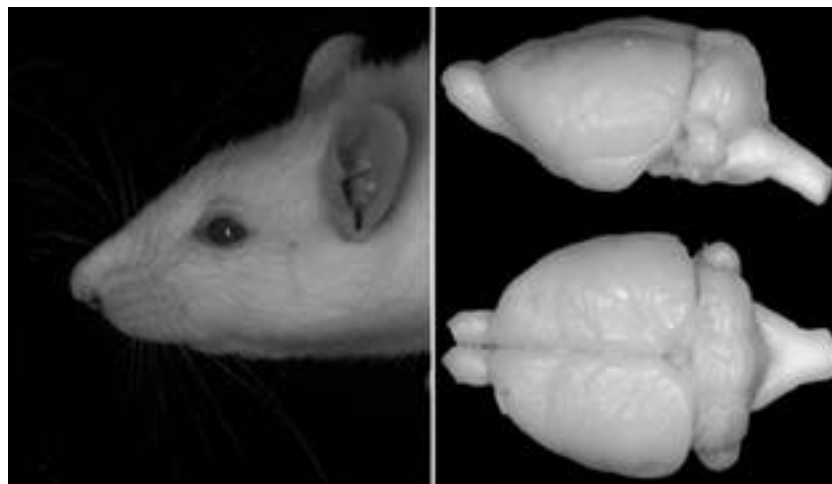
1. ニッスル標本
2. チトクローム酸化酵素組織化学標本

F. 設問(脳について頭をひねる)

G. 補足資料(この実習を受けたからには...)

1. 動物実験の心構え
2. 実験ノートの取り方
3. 研究発表の仕方
4. 英語、統計学、今回の実習

H. 参考文献



A. 実習の目的と概要

1. 目的

脳は複雑である。この宇宙で最も複雑な構造物であると言う人さえいる。哺乳類の大脳皮質のゴルジ染色標本を見れば、神経解剖学の巨人 Ramón y Cajal が、今世紀初頭についたため息と同じため息をつくことができる。しかし、一見、いかに複雑でカオティックに見えても、脳は、無秩序ではない。事実、脳の中には、見事なまでに規則的な単位構造（モジュール構造）が存在する。それらは、脳の構造と機能のルールを探る上での、貴重な手がかりである。

脳の感覚神経細胞は、外界空間内の特定の範囲（その細胞の受容野と呼ぶ）から来た、特定の刺激に反応する性質（刺激選択性）を持つ。多くの場合、似た受容野や刺激選択性を持つ細胞が集まり、モジュール構造を形成し、モジュール構造の配置は、入力を供給する感覚受容体の感覚上皮の中での位相幾何学的な位置関係を保存している。このような情報の脳内表現を感覚情報の投射性地図（projectional brain map）と呼ぶ。

本実習では、そのような脳内地図表現の例として、ラットの大脳皮質体性感覚野における体部位地図をとりあげる。ラットやマウスなどの齧歯類の体性感覚野には、顔面に生える太いヒゲ（洞毛、mystacial vibrissae）のそれぞれからの情報を処理するパレル（樽構造、barrel）と呼ばれるモジュール構造が存在する。パレルに含まれる神経細胞を実験の対象とする。まず、ラットのヒゲと脳の観察（ラット、ネコ、サル）を行い、続いて、パレルの神経細胞の感覚反応を調べ、さらにパレルとその構成神経細胞を顕微鏡で観察する。

[主目的] 「神経細胞の電気活動」および「生体組織としての脳」を実感するとともに、「モジュール構造」、「受容野」、「脳内地図」という3つの概念を検討する。神経細胞活動の細胞外記録法を経験する。

[副次学習項目] 統計学の基礎講義とソフトウェア（Statview）を使っての解析、顕微鏡使用法とスケッチの仕方、動物実験の心構え、動物の手術・心臓灌流固定法、レポートの書き方、発表の仕方。

2. 進め方と予定

1. 本実習は、ガイダンス、デモンストレーション、実験、レポート提出、研究発表からなる。
2. 学生はA、B 2グループ（各3人）に分かれて、実験を行う。
3. 各人が、この実習マニュアル中の全ての課題および設問に答える実習レポートを提出する。×切は、実習終了週の2週間後の月曜日。×切後は、受け付けない。
4. 全グループの実習が終了した後、12月21日（月）に、グループ代表による実習成果発表会を行う。
5. 実習日は、夜遅くなる可能性があるため、アルバイト、デートなどの予定を入れないようにすること。

	グループA	グループB
実習開始前週	実習マニュアルの配布と熟読	
第1週 1日目	全体ガイダンス、統計学の基礎講義、ヒゲの観察、ラット脳の外形観察	
2日目	手術・電気生理・灌流固定のデモ	
第2週 1日目	単一細胞活動記録（I、マッピング）	ネコ、サル脳およびラット組織標本の観察（I）
2日目	単一細胞活動記録（II、2発刺激）	ネコ、サル脳およびラット組織標本の観察（II）
第3週 1日目	ネコ、サル脳およびラット組織標本の観察（I）	単一細胞活動記録（I、マッピング）
2日目	ネコ、サル脳およびラット組織標本の観察（II）	単一細胞活動記録（II、2発刺激）

第4週 1日目	組織標本のスケッチとデータ解析
2日目	組織標本のスケッチとデータ解析

3. 評価

A-Dの4段階評価とする。評価は、レポート提出、実習中の態度、結果発表の3点をもとに行う。届け出のない、欠席、遅刻、早退は、減点する。Dを得た場合には、この実習項目のみならず、「生物工学実験B」の単位を失う。レポートは、与えられた課題と設問すべてに答えているか、正しい日本語と形式でレポートが書かれているか、期限内に提出したかにより、評価する。レポートは、後日、コメントとともに返却する。

B. バレル皮質、細胞外記録とは？

以下の基本的事項を理解した上で、実験にのぞむ。

1. 体性感覚

a. 体性感覚には4つのサブモダリティーがある。

自分の手足を動かし、まわりの物体に触ってみたりすると、体の表面や深部から得られる体性感覚には次の4種類の感覚種があることがわかるだろう。それぞれ固有の感覚受容器がある。

体性感覚サブモダリティー	機能	感覚受容器
触感覚 (touch)	物体の大きさ、手触り感、形を知る	パチーニ小体
自己受容器感覚 (proprioception)	自身の四肢や指の位置と動きを知る	筋紡錘、腱紡錘
痛覚 (nociception)	自身の体の損傷を知る (痛みとして)	痛覚受容器
温度感覚 (temperature sense)	暖かさ、冷たさを知る	温感覚受容器、冷感覚受容器

b. 体性感覚の中樞経路では、感覚受容細胞から大脳皮質まで、3回シナプスを乗り換える。

- ・手足などからの感覚情報は次の経路を経て、大脳にいたる。

脊髄の後根神経節細胞 → 延髄の薄束核と楔状束核 → 視床後腹側核 → 大脳皮質 1次体性感覚野

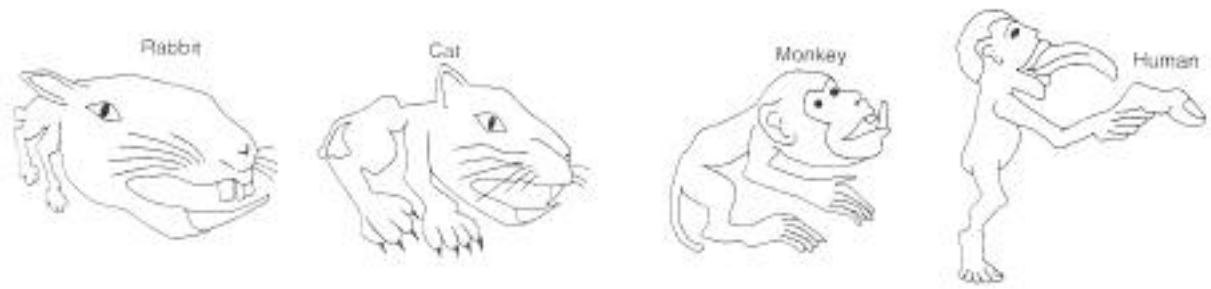
- ・ヒゲからの感覚情報は次の経路を経て、大脳にいたる。

三叉神経の神経節細胞 → 三叉神経核 → 視床の腹後内側核 → 大脳皮質 1次体性感覚野

設問 B-1-b 視覚、聴覚、嗅覚、味覚においては、何回シナプスを介して、大脳皮質に情報が伝わるか。最短の経路図を描き、答えよ。

c. 体性感覚野には、体表面を再現する地図がある。

脳の体性感覚野の細胞ひとつひとつが、体のどの部分への触覚刺激に反応するかを調べ、その配列を描くと、脳における体部位再現の様子を知ることができる。下にウサギ、ネコ、サル、ヒトの体部位再現の様子を示す。

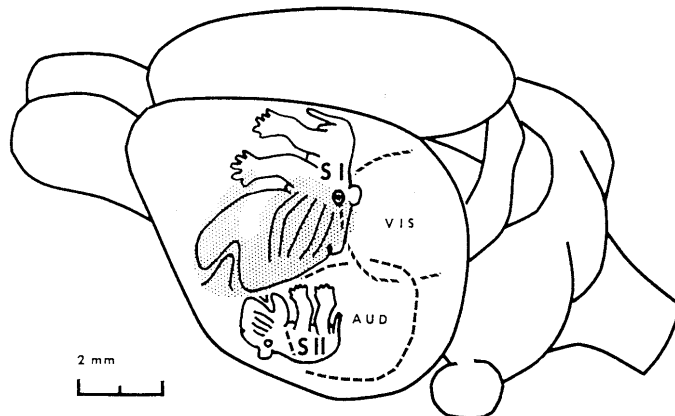


ウサギ、ネコ、サル、ヒト脳における体部位表現 Kandel, E., et al. Essentials of Neural Science and Behavior. より

設問 B-1-c 前図を見て、体部位再現の様式にはどのような特徴があるかを述べよ。

2. ラットのバレル野

a. 齧歯類などの体性感覚野は、通常組織学的手法（ニッスル染色）や様々な組織化学的手法（チトクローム酸化酵素 cytochrome oxidase、コハク酸脱水素酵素 succinate dehydrogenase）によって、可視化することができる（Riddle et al., 1993）。体性感覚野の一部 posteromedial barrel subfield（PMBSF）の4層に、100から400ミクロンの直径の樽型の領域に細胞が集まったバレル構造が見いだされる。個々のバレルに含まれる細胞は、そのバレルのある半球とは反対側のほおにあるごく少数のヒゲへの触覚刺激に反応する。



マウス脳における体部位表現

Woolsey & Van der Loos (1970) Brain Res., 17: 205-242. Fig. 13より

b. バレル構造はラット以外の動物にも存在する。

バレル構造は、ラット、マウス、ハムスター、チンチラ、モルモット、リス、ヤマアラシなど多くの齧歯類に見られるが、ビーバーやカピバラには見つからない。一方、有袋類のポッサムにも見いだされる（Woolsey et al., 1975）。

c. 大脳皮質下の中継核においても、バレル様構造がある。

バレル様構造は、バレル野へ情報を伝えている中継核にも存在し、それらは、三叉神経核では バレレット (barrelettes)、視床ではバレルロイド (barrelloids) と呼ばれる。

3. 神経活動の細胞外記録

(1) 細胞外記録法とは何か？

a. 電気活動を記録する3つの方法

単一の神経細胞に発生する電気的活動を記録する方法は大きく3つに分けられる。

細胞内記録法 細胞内にガラス微小電極を刺入し、膜電位(細胞内外の電位の差)の変化もしくは膜を横切る電流を記録する。細胞膜を横切るイオン電流の性質を調べたり、シナプス後電位と呼ばれるゆっくりとした膜電位変化(通常は、数msから数10ms、時に数秒の)を調べるのに用いる。

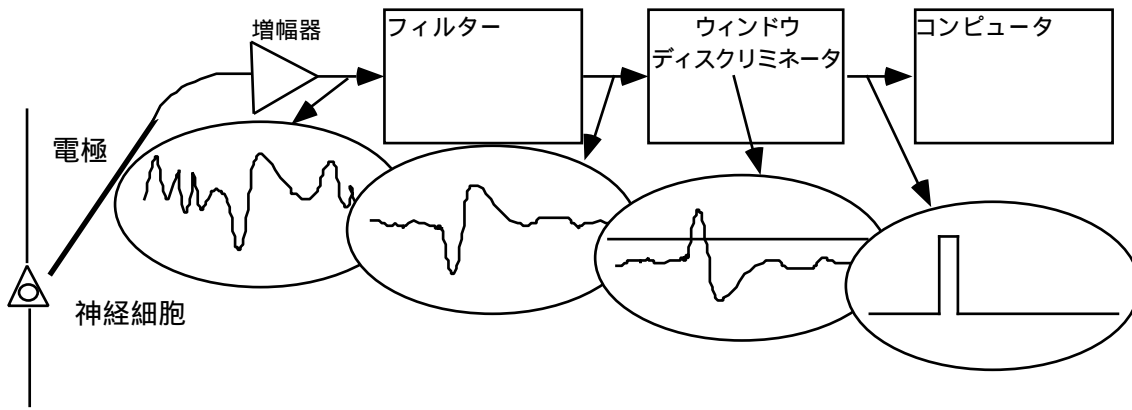
パッチ電極記録法 先端径のやや大きめ(1 μ m程度)のガラス電極先端を、神経細胞膜に密着させ、密着(パッチ)部分に存在するイオンチャネルを通過する電流を測定するか、もしくは、パッチ部分を破ることにより、細胞内膜電位もしくは細胞膜全体を横切る電流を記録する方法である。

細胞外記録法 細胞の外側の近傍(数10 μ m)に電極先端を置き、活動電位(通常、1ms程度の時間幅)を記録する。活動電位は、一つの神経細胞へのシナプス入力を統合した結果の出力であり、その発生時系列により、次の細胞への情報が運ばれている。従って、活動電位をモニターできれば、問題としている神経細胞の伝えている情報についての洞察が得られる。この目的のためには、細胞内記録やパッチ記録など、長時間記録が難しく、また、細胞を傷つける方法をとる必要はない。細胞の外に置いた電極により、細胞の活動に伴い生じる電流を検知すれば良い。また、細胞外記録は、次項で述べるように、金属電極で行うことができる。金属電極はガラス電極に比べ、強度があるので、硬膜を取り外す必要はないし、また、行動中の動物にも適用できる。

b. 細胞外記録法の概略

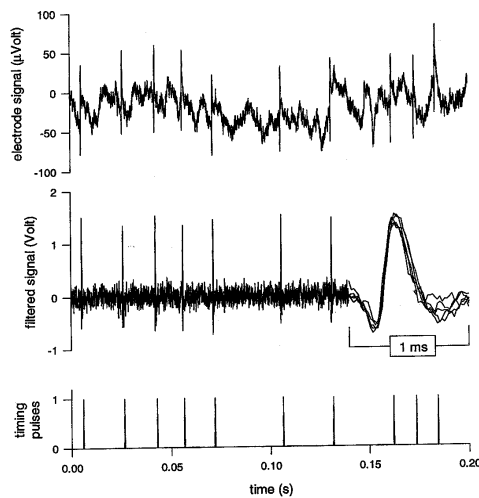
細胞外記録には、おもに金属電極が使われる。この実習ではタングステン電極を用いる、直径200 μ mのタングステン線の先端を電解研磨し、先端5 μ mを除いて絶縁材料で電気的に絶縁してある。この電極はおよそ2Mオームの抵抗を持つ。通常、細胞外記録される活動電位は非常に小さい(100 μ V程度)なので増幅しなければならない。記録には、電気的なノイズが混入するが、1)抵抗の低い電極を用いる、2)ノイズの少ない増幅器を使う、3)適切なシールド(記録電極や動物を金属網やアルミホイルでおおい、照明灯や計測機器からの電磁波を遮断する)やグラウンド(計測機器、動物などをアースにつなぐ)を行う、4)増幅器からの出力をハイパス(500Hz)およびローパス(3kHz)フィルターを通過させることで、目的とする活動電位とは異なる周波数帯域のノイズを取り除くことにより、ノイズを軽減する。

増幅された電位変化は1)オシロスコープ、2)ウインドウディスクリミネーター、3)スピーカーに送られる。オシロスコープは電位変化を目で観察するために、スピーカーは電位変化を耳で聞くために用いる。ウインドウディスクリミネーターは記録された電位変化から活動電位を、振幅をもとにして検出するのに用いる。検出された活動電位はウインドウディスクリミネータのTTL出力(通常は0V、活動電位を検出すると5Vを出力)を駆動する。TTL出力はコンピュータに1msecの分解能で取り込まれる。



入力信号の増幅 ノイズの除去 活動電位の単離 パルス化とカウント

細胞外記録法のシステム概念図

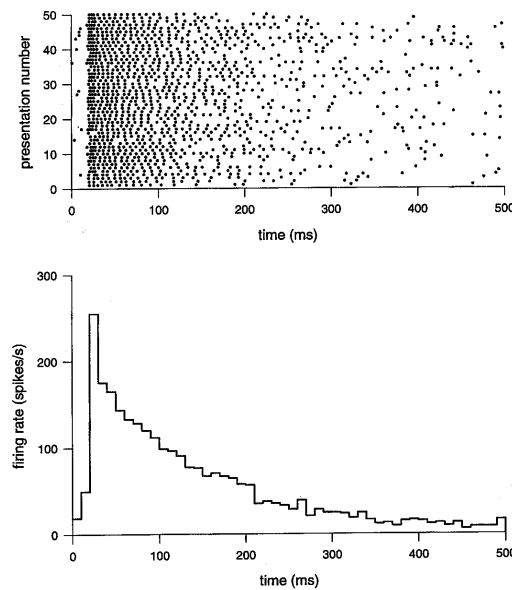


細胞外記録の実際例 上段 生の記録。中段 フィルター後の記録。中段右 時間を引き延ばしてしめした活動電位5個の重ね書き。下段 ウィンドウディスクリミネーターの出力パルス列。

Rieke et al. (1997) *Spikes-Exploring the Neural Code* より

c. 細胞外記録データの解析法

細胞外記録により記録された活動電位の大きさ、形、極性は、多くの場合、データとしての意味を持たないことが多い(注)。その理由は、細胞外活動電位の大きさ、極性、形は、電極と神経細胞との相対位置関係により、変化するからである。したがって、細胞外活動電位を記録した際に、解析の対象となるものは、活動電位の発生の時間経過である。活動電位の発生時系列の表記法として、本実習では、ラスターヒストグラムとペリスティミュラスヒストグラム(通常、PSTHと呼ぶ)を用いる。ラスターヒストグラムは、1個の活動電位の生起をひとつのドットで示し、横軸は時間、縦軸は、くりかえして行った計測を示している。くりかえし計測における活動電位の発生時間経過の再現性を知るのに役立つ。一方、PSTHは、各計測を平均加算して、活動電位の発生頻度の時間経過を示している。実例を図に示す。



ラスターストグラムとPSTHの実例

Rieke et al. (1997) *Spikes-Exploring the Neural Code* より

(注) 活動電位の形により、記録している細胞が同定できたり、記録している細胞への入力を同定できたりする場合があります。例えば、小脳プルキンエ細胞では、単純スパイクと複雑スパイクと呼ばれる2種類の活動電位が記録できる。単純スパイクは平行線維からの入力により生じ、複雑スパイクは登上線維からの入力により生じる。

C. ヒゲと脳の観察

1. ヒゲの分布

ラット (*Rattus rattus**, Wistar SD系統)の顔のスケッチを行い、ヒゲの形態学的解析をする。先の開いたスリッパにラットの頭をつっこませると観察が容易であるかも知れない(D-1-b-1、麻酔の項を参照)。もしも、ラットが動き、ヒゲの観察が容易でない場合は、ラットの顔面の皮膚をはいだ標本が準備されているので、それを用いて観察を行う。

(* 生物の種名は、その属と種名の併記で示す二命名法で記す。一語目が属を表し大文字で始まり、二語目が種を表し小文字で始まる。ラテン語またはギリシア語、もしくはその他の言語をラテン語化して用いる。イタリック体(斜体)で書かなくてはならない。これらは厳格なルールとして守らなくてはならないので、公表論文を書くときはもちろん、レポート、卒論、修論、D論を書く際にも気を配るように。)

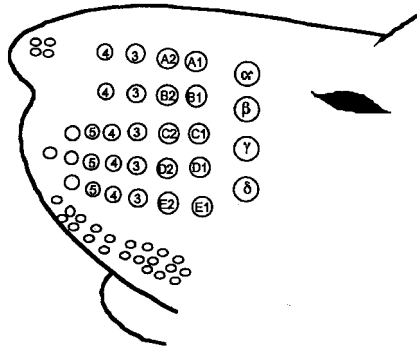
準備するもの

ノギス

解剖顕微鏡

スリッパ

課題 C-1-a ヒゲの配列と本数を記載する。各穴に、何本のヒゲが生えているか。ヒゲには、下図のような番号の付け方がなされている。番号のついていないヒゲについても、記載せよ。



左顔面のヒゲ（ヒゲの番号の付け方）

Dorfl, J. (1982) J. Anat., 135: 147-154.より改変（生命工学研究所、鈴木慎也氏提供）

2. ヒゲの動き

ケージ内にいる時、および、新しい環境にラットを移した時の、ラットの行動を観察し、ヒゲの動きを観察する。

準備するもの

ラットを自由行動させるための容器（たらい、水槽、段ボール箱など）

- 課題 C-2-a ヒゲを動かす行動は、どのような時に盛んで、どのような時に盛んでないか。
- C-2-b どのヒゲが最もよく動き、もっとも物体と接触するか。
- C-2-c どのヒゲとどのヒゲと一緒に動き、どれとどれとが独自に動くか。
- C-2-d ヒゲは、まわりの物体に対して、どのように接触するか。
- C-2-e 活動的に探索している時とそうでない時とでは、ヒゲの動きや位置はどう異なるか。
- C-2-f 顔の片側のヒゲを触ると、反対側のヒゲはどのような動きを示すか。
- C-2-g その他、ヒゲの使い方について、気づいたことをすべて記せ。

3. 脳の外形観察

ホルマリン固定したラット脳（教官が準備しておく）の外形観察を行う。また、比較のために、ニホンザルおよびネコの脳のホルマリン固定標本の外形観察も行う。

準備するもの

ラット脳アトラス

ケント紙

2H - 4Hの鉛筆

スケッチの描き方

- (1) 輪郭は1本線で描け。絵画のデッサン風に一つの輪郭に対して何本もの線を使わない。
- (2) 陰影をつける必要はない。

- (3) スケッチは、観察者の「解釈」であり、写真の代替品ではない。スケッチで記録しておきたい事は何か、人に示したいことは何かをよく考えよ。「印象派的」もしくは「墨絵的」スケッチはなんら意味を持たない。
- (4) 見えていないものは描けない、描けていないものは見えていない。スケッチを見れば、その人の理解度がすべてわかることを忘れるな。
- (5) 縮尺を示すスケール、描いた対象に関する情報、日時を、全てのスケッチに附記せよ。

課題 C-3-a ラットの脳の外形スケッチ（背面図、側面図、腹面図）を行い、外側から見て同定できる脳部位の名前を、スケッチに日本語と英語で書き込む。

C-3-b サルの脳の側面図のスケッチを行い、外側から見て同定できる脳溝の名前を、スケッチに日本語と英語で書き込む。

C-3-a ネコの脳の側面図のスケッチを行い、外側から見て同定できる脳溝の名前を、スケッチに日本語と英語で書き込む。

D. バレル皮質単一神経細胞からの活動記録

いよいよ、単一神経細胞の活動電位の細胞外記録を行う。このためには、まず、ラットに適切な麻酔をほどこし、脳定位固定装置にとりつけて頭部を固定し、頭皮と頭骨を開けて、電極の刺入を可能にする。続いて、電極ホルダーで保持した電極を、油圧マニピュレータを用いて、ゆっくりと、脳内へ進めていき、単一神経細胞の活動電位を記録する。以下、その手順を示す。

1. 手術

a. 準備するもの

道具	脳定位固定装置 ピンセット（大、小） ハサミ（大、小） メス エイヒ 注射器（1ml、10ml） 注射針（25G、27G） デンタルドリル カメラ用ブラウアー 油性マジック（名前ペンとよばれる細いもの） 軍手
消耗品	綿棒 止血綿 キムワイブ 生理的食塩水 25%ウレタン

ネンブタール
キシロカインゼリー
キシロカイン液

b. 麻酔

ラットの麻酔方法には、以下の2つの方法がある。方法1では、1注入で12時間持続する安定した麻酔が得られるが、実験後のラットの回復はない。方法2では、ラットは実験後、回復するものの、1回の注入による持続時間が短く、また、麻酔薬の追注によりラットが死亡する可能性がかなりある。本実習では、方法1を用いる。

方法1 25%ウレタン 0.6ml / 100gBW 腹腔内注入
(カルバミン酸メチルを生理的食塩水に溶かす)

方法2 ネンブタール 0.16-0.2 ml / 200gBW 腹腔内注入。15 - 30分で効く。
追注は、0.05-0.1ml / hr / 200gBWで行う。

1. ラットの体重を測り、上記方法1に従って、麻酔薬を腹腔内注入する。ラットの目前にスリッパを置くとラットは頭をつっこみ静かになるので、しっぽをつまみあげ、腹腔に針を刺す(下図)。1mlツベルクリン注射器を用いる。腹に注射針を刺した後、一度引いてみて空気が入ることを見て、針先が腹腔に入っていることを確認してから注入する。血が逆流するようならば、刺し直す。
2. 麻酔薬注入時刻を記録すること。
3. 麻酔が効くまで待つ。
4. 目の色があずき色になったら、麻酔が深すぎる兆候である。この場合、手の打ちようはない。



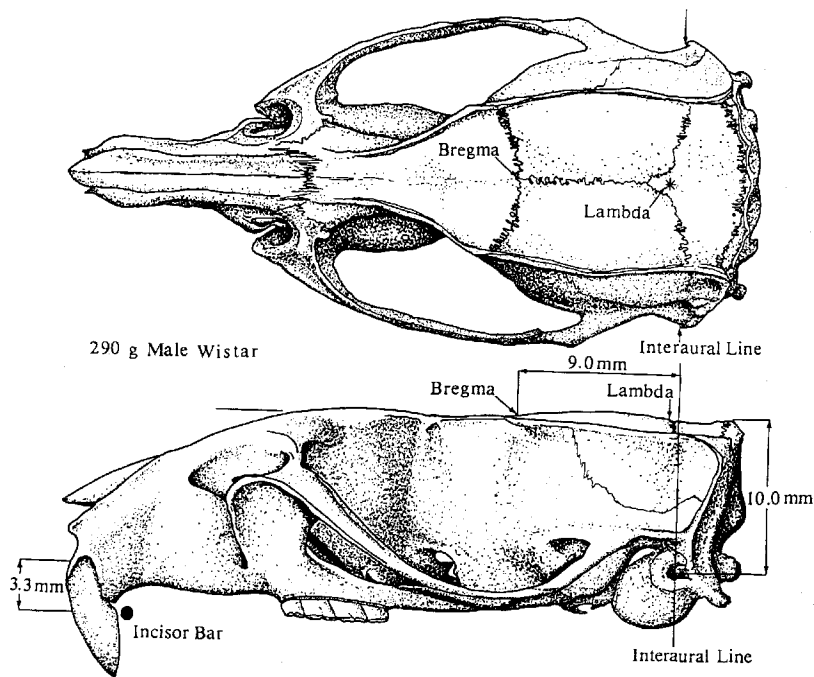
ラットへの腹腔内注入の仕方

c. 脳定位固定装置へのとりつけ

1. 綿棒を使って、キシロカインゼリーを外耳につける。この時、いやがるようであれば、麻酔が浅い。もう少し待つか、追注する。

2. イヤーバー (ear bar)、incisor barをとりつける。

- ・片方の耳にバーを入れて、ぐりぐりしても上下左右に動かないポイントを探す。
- ・もう一方のバーを入れて、頭がぐらぐらしないことを確認する。
- ・間違った場所にイヤーバーを入れないようにする。違う場所に入っているときは、頭を上か下かに動かすと、ぬける。
- ・incisor barをはめる。イヤーバーが正しい位置に入っていれば、incisor barをはめた時に、頭がしっかりと固定される。正しく入っていないと、頭がのびるように動く。また、イヤーバーの位置は、骨縫合のラムダ (lambda) の位置に一致する。
- ・目の下をもって、頭をゆらして、しっかり固定されていれば、OK。

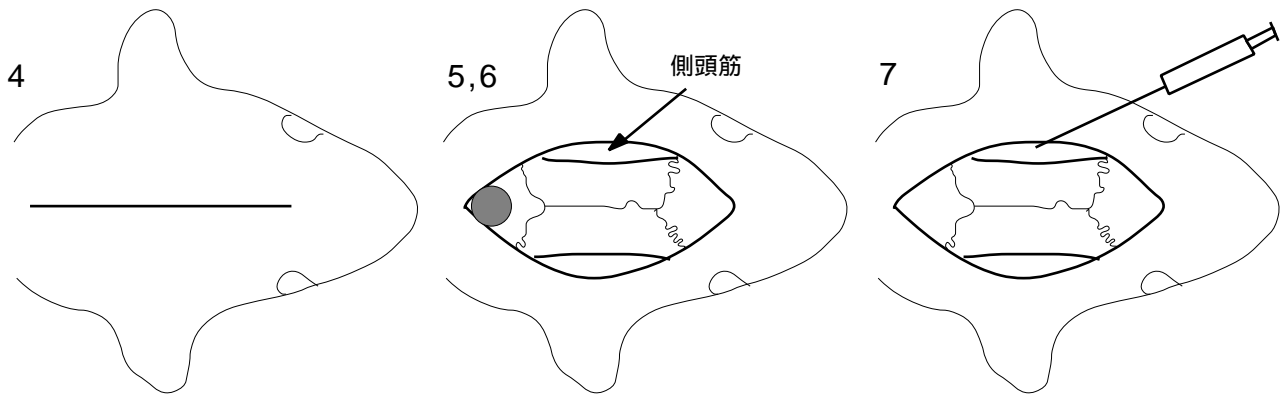


ラットの頭骨

Paxinos, G., Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press より

d. 手術

1. 頭部の毛を水でぬらした後、小ハサミで刈る。
2. イソジンで頭皮を消毒する。
3. キシロカイン液 (2%リドカイン) を頭皮下に注射する。
4. メスで頭皮を切る。回復させないのであれば、ハサミで、カップの頭のように、ざっくりと切って良い。
5. エイヒと綿棒で、骨の上をきれいにする。必要であれば、結合組織を切除する。lambdaより後ろ (小脳から脊髄の上、図中斜線部) は出血しやすいのでいじらない。
6. 頭骨が露出したところで、bregmaとlambdaを結ぶ線が水平になっているかをチェックして脳定位固定装置への固定状態を確認する。
7. 側頭筋に、キシロカイン液を少量注入して、局所麻酔する。



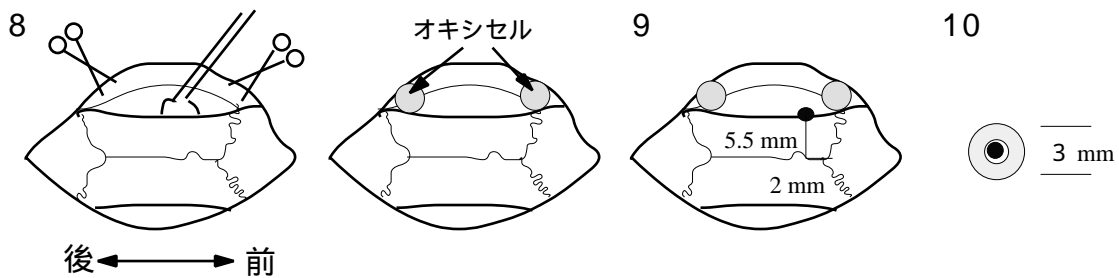
8．側頭筋をエイヒで骨からはがして、ハサミ等で切りとる。

- ・側頭前方は、眼筋があって出血しやすいので止血綿（オキシセル）をつめておく。
- ・前頭部分には、こよりをはさみこんで、頭皮を広げておく。

9．bregmaより、後方2 mm、側方5.5 mmの位置に、油性マジック（細）でしるしをつける。

このあたりが、バレル野のD1, 2, E1, 2近辺である。頭骨が側頭葉に向かい、落ち込んでいく稜線の上あたりである（図参照）。

10．マークのまわりの骨をドーナツ状にデンタルドリルで削る。カメラ用ブローアードで骨粉を吹き飛ばす。



11．削っている部分の下の硬膜の血管が透けて見え、中央の骨の「島」がぐらぐら動き出したら、ドリルによる操作は止め、ピンセットで薄い骨を切っていく、中の骨の島をはずす。

2．細胞活動の記録

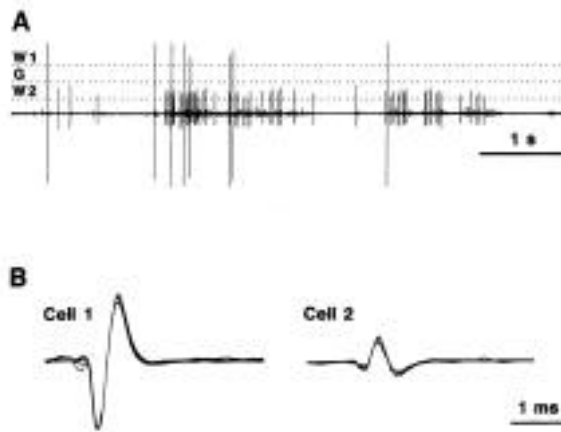
a．準備するもの

道具	前置増幅器	(当日説明「増幅器の原理は?」)
	主増幅器	
	アナログオシロスコープ	(当日説明「オシロスコープの原理は?」)
	デジタルオシロスコープ	
	ウインドウディスクリミネータ	
	電気刺激装置	(当日説明「電気刺激装置とは?」)
	スピーカー	
	ヒゲ刺激装置	
	コンピュータ	

油圧マニプレータ
マニプレータ
電極ホルダー
タングステン電極
ワニ口クリップ
OHP用紙
メモ用紙
名前ペン

b. 電極の刺入

1. 電極を電極ホルダーに取り付ける。この際、電極の先端を他のものにぶつけないようにする。また電極の後端をワニ口クリップではさめるようにしておく。
2. 電極ホルダーを油圧マニピュレータに取り付ける。電極の後端を赤いワニ口クリップ（前置増幅器の+に接続）ではさむ。黒のワニ口クリップ（前置増幅器のEに接続）と、白のワニ口クリップ（前置増幅器の-に接続）は脳定位固定装置に接続する。
3. 電極を、脳表面の血管を避けるようにして、硬膜をつらぬき、脳に刺入する。
 - ・このためには、事前に注射器から生理食塩水をかけて、脳表面を洗っておく。
 - ・マニピュレータを操作して電極を刺入する脳表面にもってくる。
 - ・脳表面の血管の走行をスケッチし、血管走行のどこに電極を刺入したか記録する。
4. 前置増幅器のスイッチをmeasureにする。
 - ・オシロスコープの基線が変化するのを確認する。ノイズレベルはおよそ20 μ V程度になる（増幅器の感度が1.0の時はオシロスコープの上で20mV程度になる）。
5. 電極をゆっくり進めると、電極先端が脳表面を刺入した瞬間にノイズレベルが変化する。このときのマニピュレータの読みを記録する。硬膜を通して電極を刺入しているので、脳組織が押し込まれている可能性があるため、この状態でしばらく（15分ぐらい）待ち、電極と脳組織の位置関係が安定するのを待つ。
6. ゆっくりと電極を進め、電極が、偶然、細胞の近くに来ると活動電位が記録される。電極を進めるときは、絶えず目盛を確認し、進めた距離を把握しておくことが重要である。
7. ノイズレベルの3倍以上の振幅をもった活動電位が得られたら、ウインドーディスクリミネータを用いて、活動電位の検出を試みる。
8. ウインドーディスクリミネータのレベルつまみをゆっくり動かすとオシロスコープ上に水平に走る線が一緒に動く。この線をノイズレベルより十分大きく、活動電位のピークよりすこし低いところに設定する。この水平線をこえた電位変化が活動電位として検出される（図）。活動電位は、多くの場合、最初に負の方向に振れた後、正の方向に振れる（必ずしもこの限りではない、電極の先端が細胞に近づくとき最初に正の方向に振れるようになる）。最初の負の方向の振れを検出するにはウインドーディスクリミネータの反転スイッチをinvにする。こうすることで入力波形は反転され、最初の負の方向の振れが検出できるようになる。



活動電位を遅い掃引スピードでモニターし、ウインドウディスクリミネータで分離する (A)。それぞれ、分離された活動電位を、速い掃引スピードでモニターし、波形を観察する。

課題 D-2-b 記録できた活動電位の形をOHP用紙を用いてトレースせよ。極性を記せ。増幅倍率から換算して、振幅を求めよ。(オシロスコープの storage ボタンを押すと、観察が容易)。最低でも3個の細胞についてデータを集めよ。

c. 手によるヒゲの刺激 (細胞反応の定性的解析)

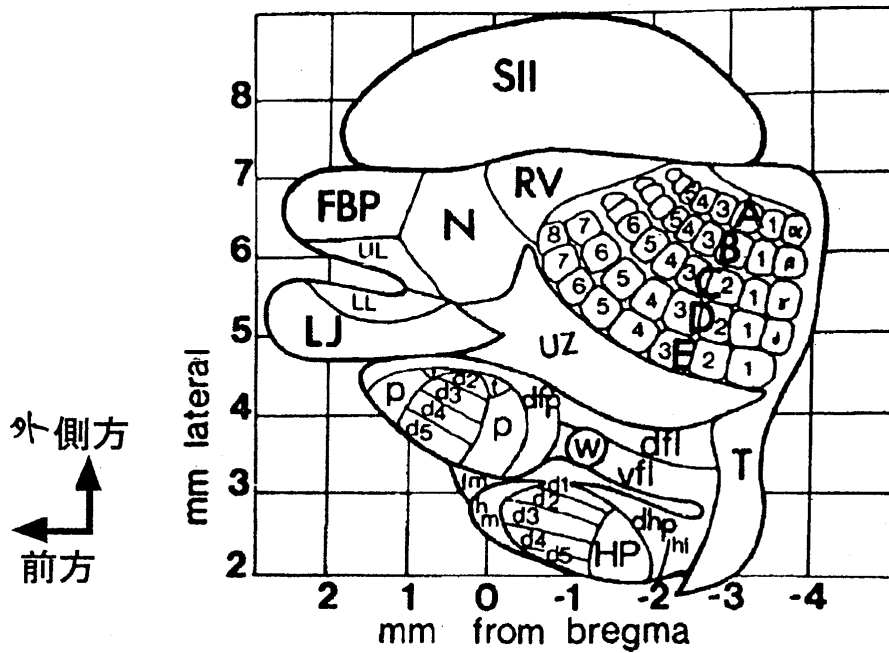
1. 綿棒で、いろいろなヒゲをさわって見る。ヒゲ刺激にともなって活動電位が発生するかどうかを、スピーカーによる音を聞きながら確認する。

課題 D-2-c 綿棒でヒゲを刺激して、記録中の細胞が、どのヒゲに対する刺激に応じるかを調べよ?

- D-2-c-1 反対側のヒゲと同側のひげのどちらに応じるか?
- D-2-c-2 1本のヒゲに対する刺激にのみ応答するのか?
- D-2-c-3 それとも複数本のヒゲへの刺激に応じるか?
- D-2-c-4 複数のヒゲに応じる場合には、それらのヒゲはどのような位置関係にあるか?
- D-2-c-5 どのような刺激が反応を引き起こすのに最も有効か?
- D-2-c-6 神経活動の記録部位を、脳表面の血管図に示せ。

2. どのヒゲにも応答していないときは、体のいろいろな部分を綿棒で触ってみて、どの部分への刺激で応答するかを調べる。その後、マニピュレーターをゆっくりと反対方向に動かして、電極を脳から抜く。体部位再現地図 (下図) を基にして新たな電極刺入部位を決定する。

- ・例えば、後肢に反応していたのであれば、新たに刺入するところは、側方に3mm動かす、口に反応していたのであれば、後方に3mm動かす。上の電極の刺入からを繰り返す。うまくいけば一回でヒゲの領域にあたるが、2回、3回とやり直すことも普通である。



ラット脳の体部位表現

SII: 第2次体性感覚野、RV: N: 鼻、FBP: UL: 上唇、LL: 下唇、LJ: 下顎、P: 前足のひら、HP: 後ろ足のひら、T: 尾
 Kolb, B., Tees, R.S. (eds) (1990) The Cerebral Cortex of the Rat. MIT Press, Fig.14.3 (p.349) より

d . 刺激装置によるヒゲ刺激とコンピュータによるデータ収集

- 1 . 最も強く活動を誘発するヒゲにヒゲ刺激装置を慎重に近づける。この際、ヒゲ刺激装置を電極、ラット、脳定位固定装置などにぶつけないよう注意する。電気刺激装置の出力つまみを0にする。電気刺激装置の電源を入れる。startボタンを押す。出力を徐々に上げる。ヒゲ刺激装置が動くのを確認する。
- 2 . ヒゲ刺激にともない活動電位が発生するのを確認する。
- 3 . 活動電位記録用のプログラムが起動してデータ収集を開始するために、コンピュータにRATと入力する。活動電位発生にともない画面上に青い点が一つ打たれる。たての白い線はヒゲ刺激の始まりと終りを各々示す。100回のヒゲ刺激を行ったのち緑色のヒストグラムが作成され、次に印刷される。

課題 D-2-d 最低でも3個の神経細胞記録をとり、ラスターストグラムとPSTHを作成せよ。それぞれの記録について、記録部位の脳表面からの深さ、および一つの細胞からの記録(シングルユニット)か複数の細胞からの活動の混合(マルチユニット)かを明記し、以下の設問に答えよ(注)。

D-2-d-1 反応の時間パターンにはどのようなタイプがあるか(例えば、ヒゲのステップ状の動きの最初にだけ反応する、最初と後の動きの両方に反応する、持続的に反応するetc)。反応の有無は、統計学的検定を用いて判定せよ。その際用いた検定法を選んだ理由を述べよ。

D-2-d-2 反応の立ち上がり遅延時間(刺激開始から最初の活動電位が生じるまでの時間)を測定せよ。

D-2-d-3 2発刺激により、2発目の刺激に対する反応はどう変化するか。2つの刺激の間の時間間隔を様々に変えてみて、検討せよ。当然、統計学的検定を行って検討すること。

D-2-d-4 時間に余裕があれば、電極を抜き、電極位置を水平方向にわずかにずらしてから、再度、記

録を試みよ。これにより、脳表面に、ヒゲのmapができていることを確認せよ。

(注) 例えば、反応が刺激開始後、持続的に続くような場合、1個の細胞の記録(シングルユニットレコーディング)であれば、その記録している細胞が持続性の反応をしていると言えるが、もしも、複数の細胞からの記録(マルチプルユニットレコーディング)であれば、反応が持続的なのか、それとも、個々の細胞の反応は一過性だがその反応遅延時間がずれているために、全体として、持続性反応に見えるのかという問題が出てくる。同様に、受容野の解釈も、マルチ記録では、注意を要する。例えば、2本のヒゲに反応するような記録がとれた場合、マルチユニットレコーディングの場合には、個々の細胞が2本のヒゲに反応しているのか、それとも、異なるヒゲ1本ずつに反応する細胞が混じっているのかの2つの可能性がある。

設問 **D-2-d-1** 反応の立ち上がり遅延時間の間に起きているできごとを順序立てて説明せよ。

D-2-d-2 D-2-d-(3)の実験から、パレル細胞における情報処理について考察せよ。

3. ラットの灌流固定

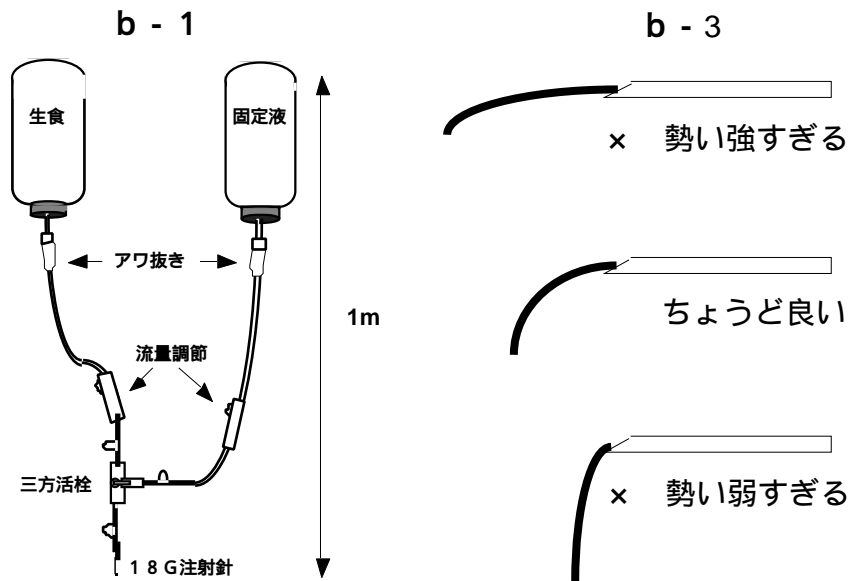
通常、電気生理学的実験の終了後、記録電極先端から電流を流し、組織に微小な破壊(直径、数10 μ m程度)を作成し、その後、脳の組織学的標本を作り神経細胞の記録部位を確認する。本実習では、時間の制約から、この過程は省略するが、実験に用いたラットを灌流することにより、固定した脳を摘出する。ここでは、心臓から、固定液を脳へ灌流して固定する方法(transcardial perfusion)を用いる。

a. 用意する物

- 固定液(10%ホルマリン=4%ホルムアルデヒド溶液、氷で冷やしておく)
- 生理食塩水(0.9%NaCl)
- 固定液用点滴セット(手作り)
- 解剖セット(手術用ハサミ1本・中鉗子2本・ピンセット中1本)
- 解剖台(コルク板または発泡スチロール板)
- 注射器(1mlツベルクリン筒)
- 18G(ゲージ)注射針
- 麻酔薬(ネンプタール)
- スリッパ(ラットを入れるとおとなしくなる)

b. セットアップ

1. 点滴容器(2個)を、解剖台から約1メートルの高さにつり下げる。
2. 点滴容器のそれぞれのチューブと、18Gの注射針を、三方活栓につなげる。
3. 容器に固定液、生理食塩水(共に約200ml)を入れる。まず固定液を流し流量を確認する。
 - ・解剖台の高さで針を横にしたとき、液が45度で流れ落ちるようにする。
 - ・生理食塩水でも同じ様に確認し、針の先まで通しておく。
 - ・脳の保存用に、固定液を必要量残しておく。

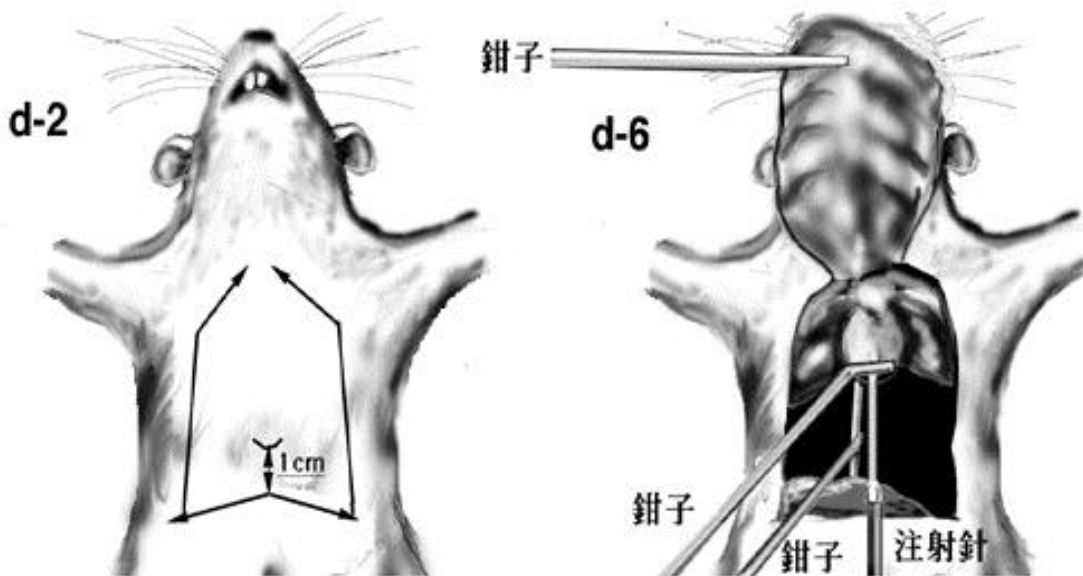


c . 麻酔

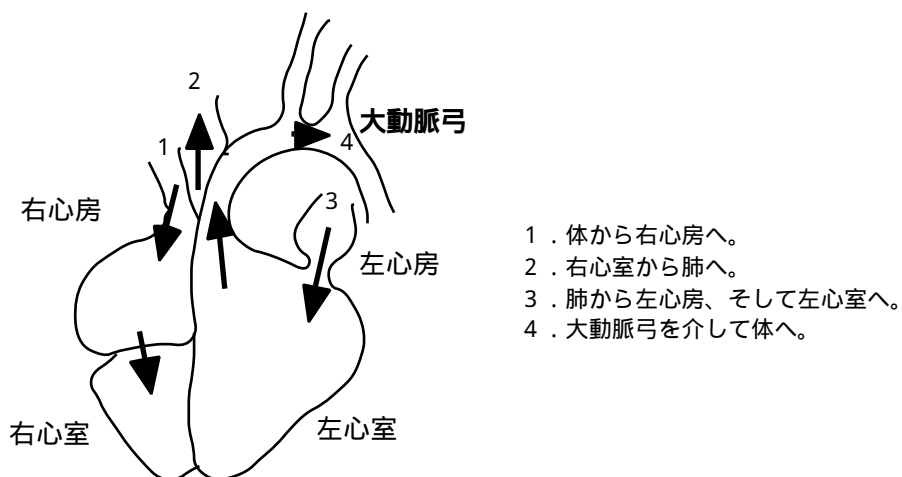
- 1 . ネブタールを腹腔内注入する。(1ml/kg B.W.)

d . 灌流

- 1 . 解剖台に仰向けに寝かせ、手足をピン (ディスポの注射針) で固定する。
- 2 . 肋骨の下1cmあたりを横切開し、横隔膜を肋骨沿いに切開する (図d-2) 。
- 3 . 胸骨を持ち上げ内蔵を傷つけないように肋骨を切り、心臓が露出した後、胸骨を鉗子ではさんで翻転する。
- 4 . 下行大動脈 (下半身に流れる血管) を、鉗子を用いて血流を止める。
- 5 . 囲心嚢をハサミとピンセットで取り除いた後、注射針を左心室に差し込み、生理食塩水を流し始める。
- 6 . 右心房に切れ目を入れ、放血する。5,6の操作により脳の中の血液を洗い流す。血液が抜けたことの見方は、目の色が赤から透明に変化すること、右心房から流出する液が血の色を失い生理的食塩水が戻ってくること、鼻頭、肉球の色が白くなることである (図d-6) 。
- 7 . 血液が抜けたら、生理食塩水を止め固定液を流す。固定されると、口や顎の筋肉が堅くなる。



ラットの灌流の仕方（原画：辻村謙司、生物工学科4年生）



心臓の構造の模式図

e. 脳の摘出

1. ラットを解剖台からはずして、背側から頭蓋骨の位置を確認した後、頭部を切断する。
2. 正中線に沿って頭皮にハサミを入れ、結合組織も切りながら、両側に皮膚を広げる。
3. 骨鉗子を用いて、脳を傷つけないように注意しながら、頭蓋骨を除去する。嗅球、小脳片葉は傷つけやすいので、特に注意する。
4. 硬膜を剥がす。小脳と大脳間の硬膜（小脳テント）は堅いので、無理に引きちぎると脳を傷つけてしまう。
5. 視神経、三叉神経などを切断し、脳を摘出する。
6. 固定液につけて保存する。

7. ラットの死体、血液の付着した綿などは、黒ビニール袋に入れ、しっかりと口を結び、指導教官に手渡す。

この袋は、フリーザーに保管の後、専門の業者もしくは学内における動物遺体処理場によって焼却される。

E. パレル皮質組織標本の観察

ラットのパレル皮質のニッスル標本、チトクローム酸化酵素組織化学標本、アセチルコリンエステラーゼ組織化学標本を、顕微鏡を用いて観察する。光学顕微鏡の正しい使用方法については、当日、ガイダンスする。

ニッスル染色

神経細胞やグリア細胞中の粗面小胞体リボゾームを染色することにより、神経細胞やグリア細胞の分布を調べる染色法。クレシルパイオレットやチオニンなどの染色剤を用いる。細胞体のみ（および樹上突起の基部がわずかに）が染色され、個々の神経細胞の形態の全貌を知ることはできないが、細胞体の分布を知ることによって、脳組織の基本的構築を知ることができる。

チトクローム酸化酵素組織化学

チトクローム c（ミトコンドリアで ATP 生成を担う電子伝達系の一部を担うヘムタンパク質）の酸化酵素の活性を組織切片で調べる方法。この酵素の活性は、細胞により異なっており、この手法を適用することで、脳の中の様々な場所で、ニッスル染色ではうかがい知ることのできない構造を可視化することができる。有名なものは、サルの大脳皮質の C O プロブや二次視覚野のストライプ構造である。パレル構造は、ニッスル染色でも見ることができるが、チトクローム酸化酵素組織化学を適用した方が見やすい。

1. ニッスル標本

課題 E-1-a 哺乳類の大脳新皮質は、6層の層構造を持つ。パレル野の前額断切片を観察し、各層の特徴（細胞の大きさ、形、並び方、密度、その他気づいたこと）を記載せよ。

2. チトクローム酸化酵素組織化学標本

課題 E-2-a チトクローム酸化酵素組織化学を施した、大脳皮質表面に平行に作成した切片を観察し、パレル構造をスケッチせよ。

E-2-b ニッスル染色を施した、大脳皮質表面に平行に作成した切片を観察し、パレル構造について気づいた事を記せ。

F. 設問

次の設問に答えよ。

- (1) 表紙の写真にはおかしなところが1カ所ある。それは、どこか。
- (2) ラットのヒゲの動きを定量的に解析するためには、どのような方法を用いたら良いか、アイデアを述べよ。
- (3) ラットがヒゲを用いて、外界に関するどのような情報を得ているのかを調べるための実験を考案せよ。
- (4) それぞれのヒゲの情報を取り扱うパレル構造が、脳の中でヒゲの配列を保存して配置されていることには、どのような利点があるだろうか。パレルの配置が、ヒゲの配列と対応していなかった場合と比較して議論せよ。

- (5) 投射性地図は、網膜、内耳、体表などの感覚上皮から軸索を脳にのばす際に、上皮の上で近隣の細胞が脳の中の近隣位置へ投射した結果生じただけの発生上の副産物かも知れず、この場合、情報処理において、なんらの利点を有するものではないという議論も成り立つ。脳の中で、情報が地図表現されていることに機能的意義があるという主張には証拠があるだろうか。あるとすれば、それは何か。どうすれば、このことを実験的に、または、理論的に、示すことができるだろうか。これらの問題について、参考文献の Konishi (1986), Nelson and Bower (1990) は、どう議論しているか。また、諸君はどう考えるか。
- (6) 神経細胞 1 個 1 個の活動を記録し解析することは、脳の機能を理解する上で、どのように役立つのだろうか。その意義、および、限界を考察せよ。限界が特定できたならば、それを克服するにはどうすれば良いのかを論ぜよ。
- (7) 本実習に参加しての感想を述べよ。特に、こうして欲しいという要望や、このようなこともやりたい・こんな実験ができるのではないかという提言、こんな疑問が残ったという意見を聞かせて欲しい。

G. 補足資料

本実習を通して、実験の内容以外に以下のことがらを理解し、今後の勉強に役立てて欲しい。

1. 動物実験の心構え

動物実験は、人類にとって必要な活動である

動物実験は、人類の福祉の向上にとって、かけがいのない情報を与えてくれる。科学的研究や学生の教育のために、動物実験を行うことの法的根拠は、「動物の保護及び管理に関する法律（昭和 48 年 10 月 1 日施行、法律第 105 号）」（通称、動管法）の第 11 条である。

動物の命とひきかえに実験を行っていることを肝に銘じる

充分な準備をして実験にのぞみ、実験の成功を目指して全力を尽くす。失敗した実験からも、必ず、何らかの知見、教訓、試料を得るように努める。最小限の動物で最大限の成果を得るように実験を計画する。

動物に無用の苦痛を与えてはいけない

適切な麻酔、無菌操作、術後管理を行い、動物に無用の苦痛を与えないように努める。実験が終了し、回復の望みのない動物は、速やかに、安楽殺に処する。

人獣間感染を防ぐ。

実験動物の病原体管理グレードを把握して実験する。動物から、病原体の感染を受けないように、グローブの装着、手の消毒に留意する。血液の付着したガーゼ、綿球などは、生活ゴミとは別途処理を行うので、可燃物ゴミ箱へ入れてはならない。

2. 実験ノートの取り方

ノートには日付をつける

記録には必ず日付けをつける。ノートは、順序がバラバラにならないように、綴じ込みのノートが望ましい（ルーズ

リーフではなく)。

実験の成功、失敗が、たどれるようなノートを書く

計測値、計算、使用した動物(種名、サイズ、雌雄など)や薬品(会社、等級、ロット番号)の情報をもれなく記す。

10年後の自分が見て理解できるノートを書く

意味のある情報を、読める字で書かなくてはならない。意味のない情報とは、例えば、「ヒゲの長さをできるだけ正確に測った。」というような表現である。書かならば、「ヒゲの長さをノギスを用いて測った。」というように具体的に書く。もちろん、これでも、不十分な場合が多いだろう。特別にいい字で書く必要はないが、10年後に見て、理解できる書き方になっていなくてはならない。すなわち、実験ノートは単なるメモではない。

3. 研究発表および討論の仕方

明確な言葉使いによって初めて、論理的な思考ができる

明快な言葉使いをすることは、誰のためでもない自分のためである。明快にものごとを語ることで初めて、論理的な思考や建設的な議論ができる。論理は、一語一語の正確さに依存していることを忘れるな。この能力は、科学を行う者に、毎日、そして、一生、要求される。一言の不正確な言葉使いに、話者の思考・信条・性格のあやうさが現れることを考えれば、これは科学者だけの問題ではない。

自分が発表している時間は、他人の時間を使っている

20人の聴衆の前で、15分間、質の悪い発表をすれば、5時間の他人の時間を奪っていることになる。

発表能力は一生かけて磨く

発表能力は、意識的に研鑽を積む者のみが上達する。発表能力には限界はなく、より高い目標にむかって一生、努力する。秀でた発表は自分にもまわりにも幸せをもたらす、この努力は大きく報われる。

質問をしよう、議論をしよう

講義、実習、セミナーでは、活発に質問をしよう。このような場では、普通の質問と良い質問の2つしかなく、してはならない質問、悪い質問というものはない。質問は、本人はもちろん仲間のためにもなるし、さらに、教師を育てる。質問をすることは、教師や講師に対する最大のおもてなしでもある。遠い将来、自分が質問したことだけを覚えているということもありうる。質問をするにも訓練が必要であり、若い時から、意識して取り組まなくてはいけない。

4. 英語、統計学、今回の実習

英語で勉強しよう

欧米だけでなく、アジア、アフリカなど、世界中のほとんどの国で、大学生は、英語で自分の専門を学んでいる。英語で自分の研究を語り、他の人の研究を理解することは、科学を行うことの一部である。ただし、自国語で科学を語ることが、文化のidentityにとって大事であることも理解しておこう。

統計学の知識は必須である

自分の知りたいことを調べるために、どういう実験を立案し、どのようなデータをとるか。得られたデータから何が、どの程度の確かさで、結論できるか。これらのことを考える上で、統計学の十分な知識は欠かせない。

今回の実習では様々なことを学んで欲しい

今回の実習では、参加者全員が身につけなくてはならないこと（動物実験のあり方、レポート・発表のしかた）、研究者を志望するもの全てが身につけなくてはならないこと（スケッチの仕方、統計学の基礎、顕微鏡の使い方）、生物を用いた研究や脳の研究をしたいと思っている者が特に身につけなくてはならないこと（脳の構造、電気生理学実験の実際、様々な手技、実習でとりあげた3つの概念）といくつかのレベルを含んでいる。目標に合わせ、必要な知識を身につけること。

5. 参考文献（印は、必ず読むこと）

- Chapin, J.K., Lin, C-S. (1990) The somatic sensory cortex of the rat. In Kolb, B., Tees, R.S. (eds) *The Cerebral Cortex of the Rat*. MIT Press.
- Dorfl, J. (1982) The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *J. Anat.*, 135: 147-154.
- Konishi, M. (1986) Centrally synthesized maps of sensory space. *Trends Neurosci.*, 9: 163-168.
- Krubitzer, L. (1995) The organization of neocortex in mammals: are species differences really so different? *Trends Neurosci.*, 18: 408-417.
- Nelson, M.E., Bower, J.M. (1990) Brain maps and parallel computers. *Trends Neurosci.*, 13: 403-408.
- Paxinos, G., Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd Ed. Academic Press, San Diego.
- Riddle, D.R., Gutierrez, G., Zheng, D., White, L.E., Richards, A., Purves, D. (1993) Differential metabolic and electrical activity in the somatic sensory cortex of juvenile and adult rats. *J. Neurosci.*, 13: 4193-4213.
- Simmons, D.J. (1995) Neuronal integration in the somatosensory whisker/barrel cortex. In: *Cerebral Cortex* (E.G. Jones and I.T. Diamond eds.), pp. 263-297, Plenum Press, New York.
- Woolsey, T.A., Van der Loos, H. (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex-The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.*, 17: 205-242.
- Woolsey, T.A., Welker, C., Schwartz, R.H. (1975) Comparative anatomical studies of the Sml face cortex with special reference to the occurrence of "barrels" in layer IV. *J. Comp. Neurol.*, 164: 79-94.
- 「脳21」第1巻第3号 特集「脳におけるモジュール構造」（金芳堂、1998年10月1日発行）
木下是雄 「理科系の作文技術」中公新書、中央公論社。
柳田充弘 「生命科学者になるための10か条」羊土社

あなた達の実習担当者は、どんな人たちでしょう

藤田一郎（1956年11月9日生まれ） 東京大学理学部、岡崎国立共同研究機構生理学研究所、カリフォルニア工科大学、理化学研究所、大阪大学医学部を経て、1998年4月より、基礎工学部に着任。サカナの嗅覚、フクロウの聴覚、サルの性行動、ヒメマスの求愛・産卵行動などの神経メカニズムの研究のあと、この10年は、サルを用いて視覚認識のメカニズムを研究している。	田村 弘（1965年1月21日生まれ） 広島大学理学部、大阪大学医学部、理化学研究所、生命工学工業技術研究所を経て、1998年7月より、基礎工学部に着任。ネコ大脳皮質視覚野の発達に伴う可塑的变化の研究、ネコおよびサル大脳皮質における視覚情報処理を研究している。
---	---

作成者： 藤田一郎、田村 弘（大阪大学大学院基礎工学研究科）

作成協力： 辻村謙司、渡辺雅之、村山雄亮

作成日： 1998年8月初版、1998年10月2版、1999年3月3版

このテキストは、大阪大学基礎工学部生物工学分野の3年生の実習用として準備したものです。皆さんからのコメントや質問をいただき、内容を向上させていきたいと思えます。下記あて、ご意見をお寄せいただければ幸いです。また、この実習テキストは、私たちのホームページにも掲載されています。

藤田一郎 〒560-8531 豊中市待兼山1-3 大阪大学大学院基礎工学研究科脳科学講座

F A X (06) 6857-5421

電子メール ifujita@bpe.es.osaka-u.ac.jp

ホームページ <http://www2.bpe.es.osaka-u.ac.jp/Fujita-labo/web/index.html>