

学 位 論 文 題 名

Behavioral and Physiological Study
of Modulatory Mechanism for Feeding Response
in the Pond Snail, *Lymnaea stagnalis*

(ヨーロッパモノアラガイの咀嚼応答の変調機構に関する
行動学的・生理学的研究)

学位論文内容の要旨

淡水産の軟体動物腹足類ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) は、神経系が比較的単純であり、さまざまな行動に対応する異なる神経回路が明らかにされている。しかも複雑な連合学習なども可能であるため、脳の高次機能の神経機構を解明するための格好の研究材料である。これまでに、特に咀嚼の神経回路について多くの知見が得られており、味覚刺激を利用した学習実験などが盛んである。そこで本研究では、モノアラガイを用いて、味覚刺激を用いた高次の連合学習の行動実験を行なうとともに、咀嚼応答の変調機構について、行動学的・生理学的研究を行なった。

第1章では古典的条件づけより高次の連合学習であるオペラント条件づけが、モノアラガイにおいて成立することを示した。オペラント条件づけは動物の自発的行動と外部刺激とを組み合わせることで行なう連合学習である。本章ではモノアラガイの容器の外への自発的な逃避行動と、負の強化子である忌避性味覚物質の塩化カリウム (KCl) 溶液刺激とを組み合わせることによって成立させた。自発的行動としての容器からの逃避行動を評価するために、逃避回数の頻度と最初の逃避行動を起こすまでの時間 (逃避行動の遅れ) とを計測し、それらを実験群とコントロール群とで比較した。また、このオペラント条件づけを集中学習と分散学習の二つの学習形態について行ない、それぞれの学習形態が行動におよぼす影響の違いを調べた。その結果、学習効果は主に逃避行動の遅れにおいて顕著に表れた。学習の前後で逃避行動の遅れを比較したところ、集中学習後は逃避行動の遅れが有意に増大した。分散学習では学習1日目から逃避行動の遅れが有意に増大し、2日目にはさらに大きな学習効果が見られた。それに対し、逃避回数を実験群とコントロール群との間で比較すると、集中学習後、分散学習後のいずれにおいても有意な差が見られなかった。以上の結果から、今回のオペラント条件づけによる逃避行動の負の強化は、逃避回数よりも逃避行動の遅れで顕著に表れていることが明らかになった。今回、負の強化子として用いた忌避性味覚物質のKCl溶液は、モノアラガイの古典的条件づけの一つである味覚嫌悪学習でも用いられている。すなわち、本章の結果はオペラント条件づけの神経機構だけでなく、古典的条件づけとオペラント条件づけとの関係を調べる際の手助けとなり、さらには咀嚼応答の変調機構の基礎となる行動学的知見を与えた。

第2章では、生体内での情報伝達物質として注目されている一酸化窒素（NO）がモノアラガイの咀嚼の神経回路で発生するか否かを調べた。NOは気体で拡散性であり、cGMP経路を介してさまざまな生理反応に関わっている。これまでの薬理学的実験からモノアラガイでは咀嚼に関わる神経回路で、NOが情報伝達物質として働くことが示唆されている。しかし、咀嚼に伴って発生するNOを測定した例は今までに無かった。そこで本章では、咀嚼を引き起こす嗜好性味覚刺激のショ糖をモノアラガイの唇に与え、咀嚼を司る口球神経節内で発生すると予想されるNOの測定を試みた。中枢神経系と化学（味覚）受容器である唇および触角から成るsemi-intact標本を作成し、NO電極を用いて口球神経節全体でのNOを測定した。その結果、咀嚼行動を引き起こす嗜好性味覚刺激のショ糖を唇に与えることによって、口球神経節でNO濃度のリズム性の上昇が測定された。このNO濃度上昇はNOスカベンジャーやNO合成酵素の阻害剤によって消失した。次に、同様のsemi-intact標本を用いて、NO合成酵素を含有する運動ニューロンB2細胞の細胞内記録を行なった。唇へのショ糖刺激により、B2細胞でリズム性の電気的応答が記録された。このリズム性応答は咀嚼リズムと一致するものであり、リズム性のNO濃度上昇と時間的に一致し、刺激-応答の潜時も口球神経節でのNO発生の潜時と同じであった。さらにはB2細胞を破壊することによって、口球神経節でのNO濃度上昇が消失した。これらの結果より、モノアラガイ中枢神経系のsemi-intact標本で、咀嚼に伴って実際にNOが放出されることが示された。またNOの拡散係数やその安定性を考えると、一度放出されたNOはモノアラガイの神経節中に十分に拡散できることも分かった。したがって、NOが咀嚼パターンの形成とともに産生され、修飾的にこの咀嚼の神経回路に働きかけている可能性が示唆された。

第3章では、第2章で示されたB2細胞から発生するNOが、咀嚼リズムの変調に果たす役割について調べた。まず、NO電極を用いて無刺激のモノアラガイの口球神経節から発生するNOを測定した。NO電極を口球神経節上に置き、NOスカベンジャーを投与したところ、わずかではあるがNO濃度の低下が測定された。このことから、味覚刺激の入力が無くとも、口球神経節からは一定のNOが定常的に発生していることが示された。次に、モノアラガイのsemi-intact標本を用いて、口球神経節内の咀嚼の運動ニューロン（B3細胞）から細胞内記録を行ない、咀嚼リズムの頻度を記録した。その結果、B2細胞を破壊した個体では、B3細胞の自発的咀嚼リズムの頻度が上昇した。B2細胞に隣接し、咀嚼パターンの形成をになう介在ニューロンへcGMPを細胞内注入したところ、B3細胞での自発的な咀嚼リズムの頻度が低下した。これらのことから、B2細胞から発生するNOがcGMP代謝経路を介して咀嚼リズムを抑制する働きがあることが予想された。そこで、口球神経節に限定してNOスカベンジャーもしくはNO合成酵素阻害剤を投与してみた。その結果、いづれにおいても自発的な咀嚼リズムの頻度が上昇した。同様に、嗜好性味覚刺激であるショ糖刺激を与えた際も、NOスカベンジャーやNO合成酵素阻害剤存在下では咀嚼リズムの頻度が上昇した。これらのことより、basal levelの低濃度のNOは、過剰な咀嚼応答を抑制することによって自発的な咀嚼リズムが正確に刻まれるように調節している。そして、嗜好性味覚刺激によって咀嚼リズム形成のニューロン群が活性化された後にNO産生運動ニューロン（B2細胞）から放出される高濃度のNOは、咀嚼リズムを抑制し、反回性抑制因子として働くことが示唆された。これは、NOが脳内のリズム形成に対して抑制因子として機能することを初めて示した直接的な証拠である。

以上の研究結果は、軟体動物腹足類のみならず多くの動物における咀嚼の変調機構に対して重要な知見を与え、その神経メカニズムの解明に大きく貢献するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浦 野 明 央
副 査 教 授 小 池 達 郎
副 査 教 授 高 畑 雅 一
副 査 助 教 授 伊 藤 悦 朗

学 位 論 文 題 名

Behavioral and Physiological Study of Modulatory Mechanism for Feeding Response in the Pond Snail, *Lymnaea stagnalis*

(ヨーロッパモノアラガイの咀嚼応答の変調機構に関する
行動学的・生理学的研究)

淡水産の軟体動物腹足類ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) は、神経系が比較的単純であり、さまざまな行動に対応する異なる神経回路が明らかにされている。しかも複雑な連合学習なども可能であるため、脳の高次機能の神経機構を解明するための格好の研究材料である。これまでに、特に咀嚼の神経回路について多くの知見が得られており、味覚刺激を利用した学習実験などが盛んである。そこで本研究では、モノアラガイを用いて、味覚刺激を用いた高次の連合学習の行動実験を行なうとともに、咀嚼の調節機構について、行動学的・生理学的研究を行なった。

第1章では古典的条件づけより高次の連合学習であるオペラント条件づけが、モノアラガイにおいて成立することを示した。本章では容器の外への自発的な逃避行動と、負の強化子である忌避性味覚物質の塩化カリウム (KCl) 溶液刺激とを組み合わせることによって条件づけを成立させた。また、集中学習と分散学習の二つの学習形態が行動におよぼす影響の違いも調べた。今回、負の強化子として用いた忌避性味覚物質のKCl溶液刺激は、モノアラガイの古典的条件づけの一つである味覚嫌悪学習でも用いられている。すなわち、本章の結果はオペラント条件づけの神経機構だけでなく、古典的条件づけとオペラント条件づけとの関係を調べる際の手助けとなり、さらには咀嚼応答の変調機構の基礎となる行動学的知見を与えた。

第2章では、生体内での情報伝達物質として注目されている一酸化窒素 (NO) がモノアラガイの咀嚼の神経回路で発生するか否かを調べた。これまでの薬理学的実験から、モノアラガイ

では咀嚼に関わる神経回路で、NOが情報伝達物質として働くことが示唆されている。しかし、咀嚼に伴って発生するNOを測定した例は今までに無かった。そこで本章では、咀嚼を引き起こすショ糖刺激をモノアラガイの唇に与え、咀嚼を司る口球神経節内で発生するNOの測定を試みた。中枢神経系と化学（味覚）受容器である唇および触角から成るsemi-intact標本を作成し、NO電極を用いて口球神経節全体でのNOを測定した。その結果、咀嚼行動を引き起こすショ糖を唇に与えることによって、口球神経節でNO濃度の上昇が測定された。このNO濃度上昇はNOスカベンジャーやNO合成酵素阻害剤によって消失した。また、ショ糖刺激によって引き起こされるリズム性のNO濃度上昇は、同じくショ糖刺激によって引き起こされるNO産生運動ニューロン（B2細胞）での咀嚼リズムと、時間的に一致した。さらに、B2細胞を破壊した個体ではNO濃度上昇は見られなかった。これらのことから、モノアラガイ中枢神経系で、咀嚼に伴って実際にNOが放出されることが示された。

第3章では、第2章で示されたB2細胞から発生するNOが、咀嚼リズムの変調に果たす役割について調べた。まず、NO電極を用いて無刺激のモノアラガイの口球神経節から発生するNOを測定したところ、味覚刺激の入力が無くても口球神経節からは一定のNOが定常的に発生していることが示された。次に、モノアラガイのsemi-intact標本を用いて、口球神経節内の咀嚼の運動ニューロン（B3細胞）から咀嚼リズムの頻度を記録した。その結果、B2細胞を破壊した個体ではB3細胞の自発的な咀嚼リズムの頻度が上昇した。B2細胞に隣接し、咀嚼パターンの形成を介するニューロンへcGMPを細胞内注入したところ、B3細胞での自発的な咀嚼リズムの頻度が低下した。これらのことから、B2細胞から発生するNOがcGMP代謝経路を介して咀嚼リズムを抑制する働きがあることが予想された。そこで、口球神経節に限定してNOスカベンジャーもしくはNO合成酵素阻害剤を投与してみた。その結果、自発的な咀嚼リズムの頻度や、ショ糖刺激時の咀嚼リズムの頻度が上昇した。これらのことより、basal levelの低濃度のNOは、過剰な咀嚼応答を抑制することによって自発的咀嚼リズムが正確に刻まれるように調節しており、嗜好性味覚刺激によって咀嚼リズム形成のニューロン群が活性化された後にNO産生運動ニューロン（B2細胞）から放出される高濃度のNOは、咀嚼リズムを抑制し、反回性抑制因子として働くことが示唆された。これは、NOが脳内のリズム形成に対して抑制因子として機能することを初めて示した直接的な証拠である。

これを要するに、著者は、軟体動物腹足類において咀嚼の神経調節機構についての新知見を得たものであり、これらの結果は、軟体動物腹足類のみならず多くの動物における神経機構の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。