

小型魚類の宇宙実験をより有意義なものにするための電気生理学的手法の開発

藤田保健衛生大学 高林 彰、岩田 香織、宮地 栄一

Development of electro physiological technique for space experiment of small fish

Akira Takabayashi, Kaori Iwata and Ei-ich Miyachi

School of Health Sciences, Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutukakecho. Toyoake, Aichi 470-1192

E-Mail: takaba@fujita-hu.ac.jp

Abstract: Function of cerebellum for light stimulation was analyzed by recording neuronal activity from valvula cerebelli in fish. Responses were obtained usually for contra-lateral eye stimulation. Response pattern were transient ON-OFF and sustained ON response. Furthermore, we tried to record spike activity from small fish "MEDAKA". However, we could not obtain clear response because of difficulty to manipulate a small fish. It was suggested to develop fish holding device.

Key words: fish, electro physiology, cerebellum

【はじめに】

これまでに、微小重力への順応や地上帰還時の再順応について魚を用いた実験が多く行われてきた。初期には小型の魚を用いた行動観察実験が多く^{1, 2)}、生命維持装置の開発によって大型の魚が使用可能になるとコイの小脳脳波活動と背光反応行動の変化観察³⁾やガマアンコウを用いた前庭神経活動の記録⁴⁾など電気生理学の実験も可能となってきた。電気生理学の実験は、宇宙での行動観察の結果を解釈する上で重要な知見を与えてくれる。この観点から、視覚、前庭感覚あるいは小脳の神経活動の解析が重要と考えられる。

魚は、一般に視覚入力による背光性と重力検出器による向重力性により、身体平衡を保っている。その内の視覚入力による背光性は、両眼に入ってくる輝度の左右差により、引き起こされると考えられる。この背光反応の統合中枢を探る目的で、脳各部の破壊による影響が調べられたところ、視葉前域や小脳弁部を吸引除去した個体では、この反応が消失することが明らかにされている⁵⁾。このことから、背光反応を駆動するのに必要な視覚情報の経路を知るためには、小脳の機能を理解することが重要であると考えられた。今回は、金魚小脳弁部の細胞から光刺激に対する電気活動を記録し、小脳弁部におけるスパイク放電と光刺激の関係を解析することによって、背光反応における小脳の機能を検討することを目的として実験を行った。この結果をもとにして、さらに小型であるメダカの電気生理学の実験の可能性について検討した。

【方法】

実験では、体長 12 ~ 15 cm、体重 40 ~ 60 g の金

魚を計 27 匹使用した。スパイク放電を記録するため、3 mol の酢酸カリウム溶液の入ったガラス微小電極を使用した。ガラス微小電極は、外径 1.5 mm、内径 0.87 mm、壁の厚さ 0.2 mm、長さ 100 mm のガラス管を用い、電極作製器で作製した。ガラス微小電極の抵抗は、20 ~ 120 M Ω となるようなものを使用した。

金魚を専用固定器に固定し、金魚の生命維持を計るために金魚の口に水を流し続けた。金魚の頭蓋骨を開け、電極を小脳弁部にマニピュレーターを使って刺入した。記録時の雑音を減少させるために魚の固定器および電極をアルミホイルでシールドした台の中に置き、実験を行った。小脳弁部細胞からの反応は、前置増幅器、主増幅器、ハムフィルターを通してからデータレコーダーに記録した。同時に、光刺激もデータレコーダーに記録した。反応はオシロスコープで観察すると共に、スピーカーによる音からも細胞の応答かどうかを判断した。

左右の光刺激は緑の LED によって行った。両眼同時刺激の時の点灯間隔は、3.6 秒とし光刺激の持続時間を 1.2 秒とした。両眼の交互刺激の時は、右眼の光刺激持続時間が 1.2 秒、左眼の光刺激持続時間は 1.3 秒で、両者の間隔は 3.0 秒とし、これを 7.4 秒間隔で繰り返した。

データレコーダーのテープに記録したデータは、実験終了後 A / D 変換によってコンピューターに取り込み解析した。サンプリング周波数は、10 kHz とし、100 秒の連続データのファイルを作成した。光刺激対応する反応を解析するため、光刺激の前後 2 秒間 (2 万点) を切り出して、ラスタ表示とヒストグラムを求めた。ヒストグラムの bin width は 20 msec とした。

(A) Simultaneous

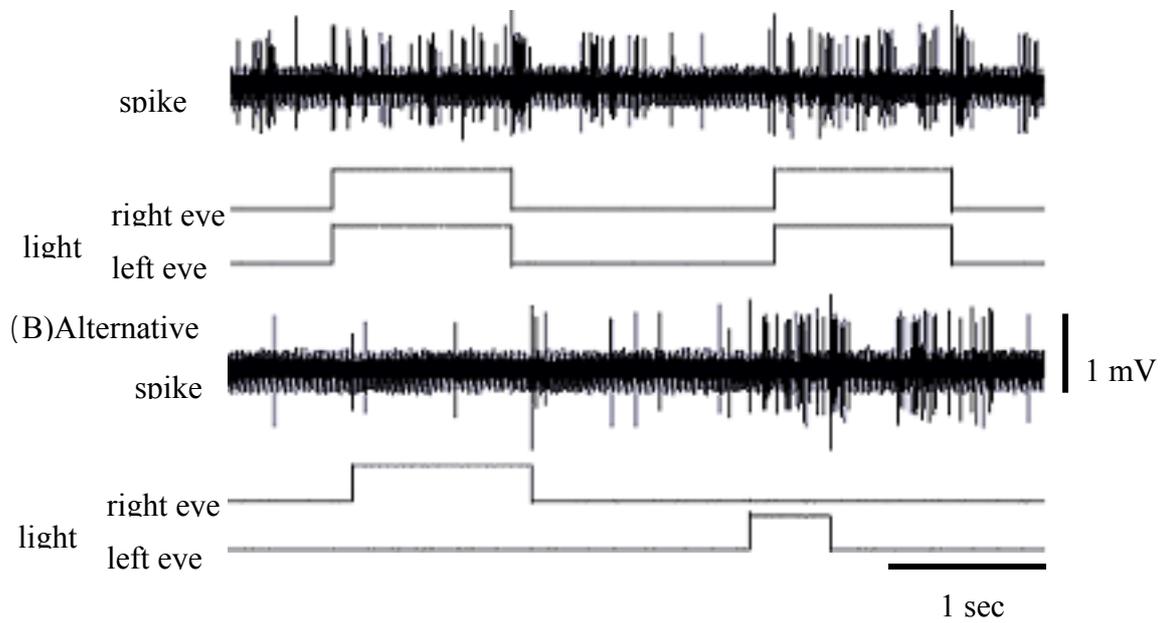


Fig. 1 Spike activity obtained from valvula cerebelli of goldfish. Spike responses were obtained for simultaneous (A) and alternative (B) light simulation to right and left eye.

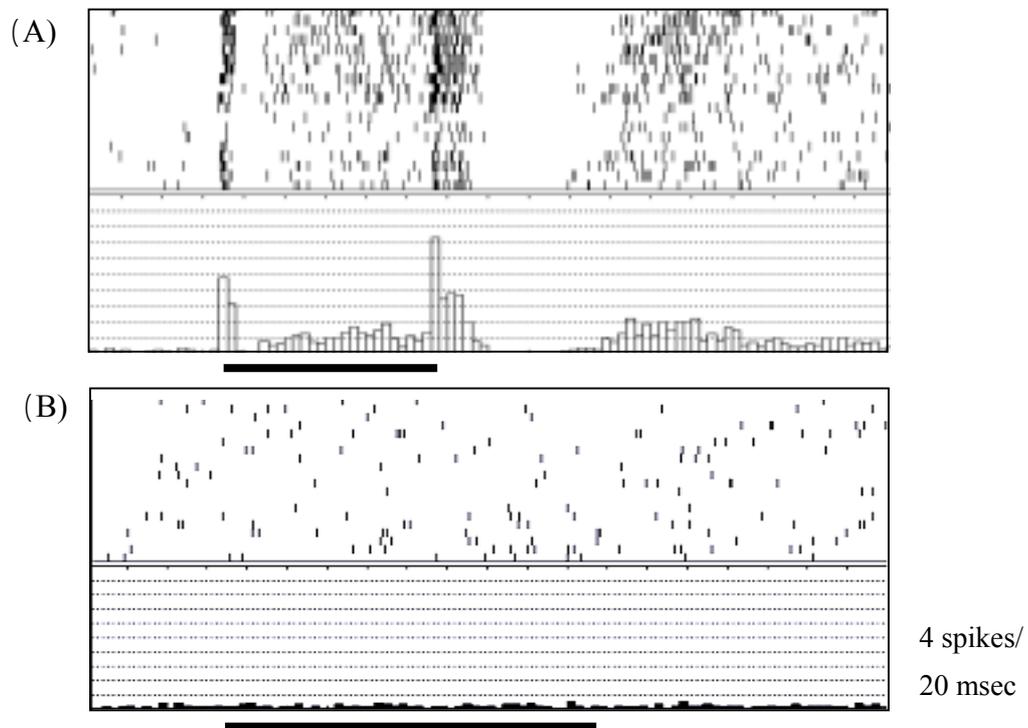


Fig. 2 Representation of spike response by raster (upper) and histogram (lower). Responses for contra-lateral light stimulation (A) and for ipsi-lateral light stimulation (B). Thick bar indicate light stimulation.

【結果と考察】

同時刺激および同側、対側刺激すべてにおいて、光のON、OFF刺激に関係なく常時、スパイク放電が出ていた光に反応しない細胞が14例、光刺激に反応した細胞は7例であった。光反応は刺激のONとOFF反応するもの(5例)、光照射中持続的放電を示すもの(2例)が確認された。

左小脳弁部後方の細胞からのスパイク放電記録の例をFig.1に示す。この反応をラスタ表示(Fig.2(A))とヒストグラム(Fig.2(B))で示した。左右の眼に対する同時光刺激に対応してONとOFFで反応を示したが、交互光刺激の結果からは、右眼刺激に対して反応していることが明らかとなった。つまり、左小脳弁部の細胞からの記録であることから対側刺激で反応しており、同側刺激では反応しないことになる。また、この反応の直後に抑制が観察された。

同時刺激、対側刺激および同側刺激に対する反応が同じ発火パターンを示した例で、パターンは同じにもかかわらず、反応の発火頻度は同時刺激で最も多く、ついで対側刺激、同側刺激の順で発火頻度は減少した。これは、同時刺激においては、対側刺激による反応が主であるのに加えて、同側刺激が発火に加算的に働くことを示唆していた。一方、同時刺激、対側刺激および同側刺激に対する反応が同じ抑制パターンを示した例では、同時刺激に対する反応が、対側刺激によるというよりは同側刺激による影響が大きいと考えられ、同側、対側刺激が同時刺激の抑制の大きさを強めているからと考えられた。

今回の実験結果により、小脳弁部で神経活動が記録された細胞で、光に反応する細胞が、光に反応しない細胞よりも少なかったことから、小脳弁部は視覚の情報を主に処理している中枢でないと考えられる。又、光に反応する細胞のうち、ほとんどが対側刺激に依存していたが、それは金魚の視神経は完全交叉であることが主な理由として考えられた。

今回は中型の魚である金魚を用いて実験を行ったが、さらに小型であるメダカを用いて同様の実験を試みた。実験方法は金魚と同様であるが、魚の固定方法は、給水パイプ、固定具のサイズ等はメダカに合わせた。電極が刺入可能な範囲は狭くなるが、直接電極が刺入される部分は微小なため反応を記録することは可能と考えられた。魚のサイズの問題は、扱いが困難であることと同時に、魚に対する損傷の問題が大きいことが明らかになった。結果的には、実験中の魚の生命維持が困難であり、神経活動の記録はできなかった。

また、メダカには前庭機能が異常な突然変異種が

知られており、この魚の前庭神経活動と小脳電気活動を解析しメダカの宇宙実験に向けての基礎データを蓄積する必要がある。

【文献】

- 1) Von Baumgarten, R.J. et al. Effects of prolonged weightlessness on the swimming pattern of fish aboard Skylab 3. *Aviat. Space Environ. Med.*, 46 (7), 902-906 (1975)
- 2) Scheld, H.W. et al. Killifish hatching and orientation: experiment MA-161, Appolo-Soyuz Test Project Preliminary Scientific Report, NASA Document TM X-58173, 19-1-19-13 (1976)
- 3) 森滋夫、御手洗玄洋、高林彰、高木貞治、臼井支朗、中村哲朗、榊原学、長友友人、R. von Baumgarten, 無重力順応過程における視 - 前庭性姿勢・運動制御の研究、ふわっと'92 宇宙実験成果報告、宇宙開発事業団技術報告、NASDA-TMR-940002 Vol.1, 96-125 (1994)
- 4) Boyle, R., Mensinger, A. F., Yoshida, K., Usui, S., Intravaia, A., Tricas, T., and Highstein, S. M.: Meral readaptation to Earth's gravity following return from space. *J. Neurophysiol.* Vol 86, 2118-2122 (2001)