

ラットの手術法

片淵 俊彦

九州大学大学院医学研究院 統合生理

はじめに

ラット (*Rattus norvegicus*, Rat(s)) は、その取り扱いやすさから、生理学、特に神経生理学において、*in vivo* および *in vitro* で頻繁に用いられる実験動物の一つである。従って、ラットを用いた *in vivo* の神経生理学的実験の種類も膨大な数になると思われる。ここでは、はじめにラットの取り扱いや麻酔について述べ、神経生理学の実験に必要と思われるいくつかの方法について述べる。しかし、ここで述べる薬物注入カニューレや刺激・破壊電極の作成や植え込み、およびワイヤー電極を用いた慢性神経活動記録や経咽頭的アプローチ法は、細かい点では、個々の研究者や研究室で異なっていると思われる。従って、あくまでも筆者が経験したことや見聞きした事を中心に述べるに過ぎないという点を御承知いただきたい。また、「Freshman 技術講座」ということで、言わずもがなの常識的なことや、論文には記載されないような細かいノウハウについても、重要と思われることについてはできるだけ述べたい。

1. 取り扱い

ラットは、最近ペットとしても飼育されてきているように、元来、おとなしく、人間にも馴れやすい動物である。しかし、単独で長期間飼育していたり、床替えなどを怠っていたりすると（少なくとも一週間に一度は必要）、動きが粗暴になり、麻酔などの取り扱いに余計なストレスを与えることになる。さらに都合の悪いことには、麻酔自体が効きにくくなるような印象があり、過剰な麻酔のために手術中に死亡する確率も増えることが考えられる。

しかし、もっと大事なことは、記録電極や、カニューレなどを慢性留置した後の回復期間や、記録や薬物投与を反復する際に、ハンドリングを十分しておくことである。すなわち、記録や薬物の注入時にワイヤーやチューブを装着する必要があるが、通常はひざの上で行うことが多い。これを無麻酔で手早く行うためには、本番の前から、ラットをひざの上に乗せ、馴れさせる動作を少なくとも一日に一度は行っておくとよい。ハンドリングが十分できていないと、ラットが落ち着かずに記録や注入までに時間がかかってストレスを与えたり、留置したカニューレ等が取れてしまうなどのトラブルや、ひいてはデータのばらつきなどの原因にもなりうる。

II. 麻酔

一般に麻酔は、腹腔内投与が多いが、ハンドリングが十分でない時や馴れないうちは、結構死亡してしまうこともあり、ばかにはできない。死亡の原因としては、腹腔内や後腹膜の出血（死後、開腹すると大きな血腫を確認できる）、血管から急速に吸収された場合、皮下注射になっかなか麻酔が効かず、それが分からずに麻酔薬を追加し、過剰投与になった場合、などが考えられる。ラットは、マウスのように片手で持つことができない場合が多いので、最も確実な方法は、二人で麻酔することであろう。一人の場合には、底面に金網を張った箱を、中でラットがあまり動けないような大きさに作り、金網越し腹腔内注射するとよい。あるいは、しっぽを持ち上げて、前脚がついている状態で比較的細い針（26-7G）を用いて、素早く行うこともできる。粗暴なラットほど事故も多い。よく用いられる麻酔薬としては、

以下のものがある。

(1) Pentobarbital sodium (ネンブタール®) : 記録電極や薬物注入カニューレの慢性留置など、一時的な麻酔が必要なときに用いられる。われわれは、少なくとも1時間程度持続させるために、50 mg/kgを目安に腹腔内投与している。

(2) Carbamic acid ethyl ester (Urethane, ウレタン) : 長時間効果が持続するので、*in vivo*麻酔下の急性実験によく用いられる。20 ~ 25%溶液を用いて1 ~ 1.5g/kg前後を投与する。ウレタン単独では血糖が著明に上昇するので、高血糖を避けたい実験系ではウレタンの量を1g/kg以下に減らして、-chloralose (0.06g/kg)を混合する。ただし、-chloraloseは水に溶けにくいので、溶液を作成するときはpHを調整するためSodium Borateを加える。-chloraloseの溶解を促進するため、溶液の温度を上昇させるのは、毒性の強いアイソフォームが産生されるので避けたほうがよい。われわれは、100mlの蒸留水に、ウレタンを11.66g、-chloraloseを1.0g、Borateを1.5g溶かし、100g体重当り0.6mlで腹腔内投与している。この場合、ウレタンが0.7g/kg、-chloraloseが0.06g/kgとなる。

(3) Ketamine hydrochloride (ケタラール®) : 比較的短時間の麻酔に用いる。100mg/kgで1 ~ 2時間は持続する。一般に、Pentobarbital麻酔より神経活動の抑制が少ないので、例えば、慢性記録電極の植え込み時に、術中に確認のために神経活動を記録する必要がある場合などにも用いられる。

(4) 吸入麻酔: Ether (エーテル) は、吸入麻酔剤としてよく用いられるが、持続時間が短く維持が困難な場合が多い。気管カニューレによる人工呼吸下においてHalothaneやMethoxyfluraneが用いられているが、自律神経系の実験など、麻酔深度がデータに大きく影響する場合は、麻酔の深度を一定に保つために有用である。また、Isofluraneを用い、鼻腔から吸入させる小動物用吸入麻酔器もあるが、換気には十分注意する必要がある。

III. 脳定位固定装置 (stereotaxic apparatus) と脳地図 (brain map)

神経科学の領域において、脳を扱う場合には是非とも必要になるのが脳定位固定装置を用いた手術および急性実験である。国産および外国製、さらに脊髄固定も可能なものまで様々なタイプの固定装置がある。頭部の固定について最も大事な注意点は、当然のことながら、確実なear bar (両外耳道に挿入する鋼鉄の棒)の装着である。馴れば簡単だが、最初は案外難しい。入ったときの感触を確認しながら、とにかく練習をするしかないが、きちんと入れれば頭部は1mmたりとも動かない、ということを経験しておいて妥協せずに練習する必要がある。

次に脳地図であるが、最近の論文では、Paxinos G and Watson Cの“The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates” [1]が最も多く使われているのではないだろうか。このアトラスは、1982年が初版で現在CD-ROMとともに第4版が出版されている。筆者は、扱いやすいので、やはりCD-ROM付でA4サイズの第3版を用いている。多く使われている理由として、(1) 目的とする部位のAP座標がinteraural line (両外耳道を結ぶ線)からだけでなく、プレグマからの距離が示してあり、H座標が脳表面からの距離として読み取れるため、0座標の位置 (reference)をとる必要がなく、それまでの脳地図と比較してずいぶん手間が省けること、(2) 実験に最も使用される250 ~ 350 gのラットの脳地図であること、などが考えられる。ただし注意点として、(1) incisor bar (切歯棒)の上端がinteraural lineより3.3 mm低くなるように(この時、プレグマとラムダは同じ高さ、すなわち頭蓋骨の表面は水平になっている)設定しなければならない。特に、incisor barが可動になっている固定装置が多いので、必ず確認する必要がある。また、(2) Strainにより脳がそれほど異なるとは考えにくいだが、一応、原典はWistarラットを用いている。1998年に出版されたSwanson L.W.の脳地図 [2]は315gのS-Dラットから作成されている。

その他、以前は、König & Klippel [3] や De Groot の脳地図がよく用いられていたが、0座標の位置をとる必要がある。また、König & Klippel [3] の脳地図は、150gのラットを用いている点や、incisor bar と interaural line との距離が 2.4mm である点などが異なっている。

IV. 薬物の脳室および脳実質内投与

神経科学の実験において、脳内に種々の薬物を投与することは、しばしば必要となる。ここでは、ラットの脳室（側脳室、第三脳室）、および脳実質内への薬物の微量注入法について述べる。

(1) 脳室内注入：

細かい点ではそれぞれ独自の方法があると思われるが、筆者は、基本的には、注入日の約1週間前にガイドカニューレを留置しておき、当日は薬物を先端まで満たした注入カニューレを用いて注入する。図 1a は、術後の最終的な模式図であるが、以下に手順を追って述べる。

ガイドカニューレの作製：

(a) 側脳室の場合は 21G、第三脳室の場合は 23G のステンレスチューブを、先端を少し斜めに削っ

て一定の長さにそろえる。長さは、ラットの障害にならないためにも、あるいは回復中に外れるなどのトラブルを避けるためにも、できるだけ短いにこしたことはないが、刺入用のマニプレータに取り付ける余裕が必要なので、通常側脳室の場合は 12mm、第三脳室の場合は 16mm 程度にしている。

(b) 留置した時に、頭蓋骨の直上にあたると思われる部分に、小さなハンダの球を付けておく（チューブがステンレスなのでフラックスが必要）。これがないと、デンタルセメントで固めてもカニューレが容易に脳の中に入ってしまうことがしばしばある。

植え込み：

(a) 先端がガイドカニューレからほんの少し出る長さのスタイレットを用意する。ステンレスチューブで作るときは、21G に対しては 26G、23G に対しては 30G がよい（図 1a および b）。

脳定位固定装置のマニプレータに電極固定ネジで固定するが、われわれはガイドカニューレを短くするためと、後述するように脳室へ入ったことを確認するためのスタイレットの上下を容易にす

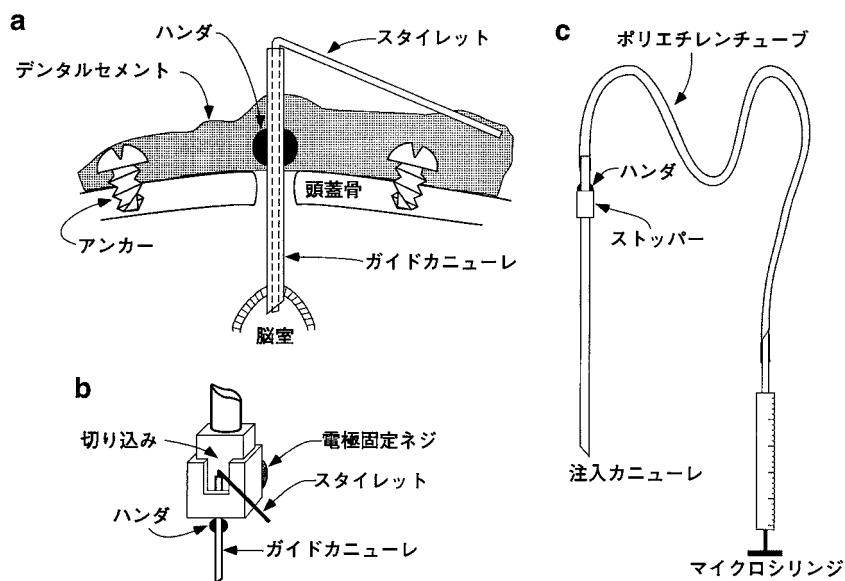


図 1. 薬物の脳室内および脳内注入法の模式図

- a. 脳室内カニューレの慢性留置. b. カニューレのマニプレータへの装着.
c. 注入用カニューレ（詳細は本文参照）.

るため、留め金を図1bのように四角に切り込んでいる。

(b) ラットを脳定位固定装置につけ、頭蓋骨を露出する。骨表面を綿花などでしっかりとこすり、結合組織などを残さないようにする。以下に述べる coordinates に従い、刺入位置の骨表面に印をつけ、骨に歯科用ドリルで穴を開ける。第三脳室の場合は、正中(L: 0mm)なので骨片を取り除く際には、上矢状静脈洞(superior sagittal sinus)に注意する。硬膜はとっておく必要はない。

(c) ガイドカニューレ先端の coordinates (Paxinos & Watson) は、側脳室が、[A: プレグマより0.8mm後ろ, L: 1.6mm, H: 脳表面より4.3~4.5mm], 第三脳室が、[A: プレグマより1.8mm後ろ, L: 0mm, H: 脳表面より7.8~8.0mm] にしている。

植え込みで最も重要なことは、脳室内に確実に入ったことを確認することである。そのために、はじめに0.3~0.5mm深いところまで入れ、少しずつ上に上げながらスタイレットを数mm上下させる。脳室に入っているとスタイレットを完全に抜いたときに髄液がガイドカニューレからあふれ出てくる。この時のHは、ほとんど上記の値になっている。側脳室の場合は、出ないときに対側を試みることもできる。しかし、第三脳室の場合は、上矢状静脈洞を貫いているので(L: 0mm)、一旦、刺入した後抜いてしまうと出血がひどい。小さな鉤を作り、静脈洞をどちらかに引っ張って刺入すると出血しないが、正中を貫いてもその直後から血液を綿花などで吸い取っていると案外早く止血するし、その後の脳浮腫もほとんどない。

(d) アンカーは、4~5mmの長さでねじ山が荒い方がよく、先端にタップを切っているものを用いている。ドリルで骨を少し削った後、たたいても全く動かないほど、しっかりと骨にくい込ませる。デンタルセメントをはけでのせていく前に、骨表面をしっかりと乾燥させておくことが重要である。スタイレットを挿入し、その末端をセメントで固定しておく(図1a)。

注入:

(a) 術後少なくとも1週間は回復期にあてる。注入カニューレは、スタイレットと同じ大きさの26または30Gのステンレスチューブで作製する。図1cに示すように、ガイドカニューレと同じチューブを短く切ったストッパーをハンダで固定する。ストッパーから先端までの距離は、ガイドカニューレより0.5mm長くする。ガイドカニューレの長さを一定にしているので、同じカニューレを複数のラットで使用できる。

(b) 無麻酔のラットを取り扱うときに共通するが、イスに座ってひざの上にタオルを載せ、軽く包み込むようにする。同様のハンドリングを回復期に十分しておくラットはおとなしい。スタイレットをニッパーで切って引き抜き、薬物が先端から出てくるのを確認した注入カニューレをガイドカニューレに差し込み、ひざの上またはホームケージに戻して薬物を注入する。

ラットの髄液の量は約300 μ lといわれているが、注入量は多くても10 μ lぐらいまでで、通常30秒~1分間に1 μ lの割合でゆっくり注入する。最後の注入後に、Pontamine Skyblueなどの色素を注入しておく、後で注入がうまくいったか確認できる。

(c) 脳室注入の変法であるが、筆者は以前、ガイドカニューレを使わずに29Gのステンレスチューブを直接第三脳室に刺入し固定した[4]。その時は、同時に視床下部に慢性記録電極を留置するため、前方から斜めにカニューレを刺入する必要があった。この場合、カニューレの先端の位置を予め0座標から計算して決めておく必要がある。しかし、ハンダやスタイレット(径100 μ mのステンレスワイヤー)を使用するなど、基本的には、同じ操作を行う。

大槽への注入および髄液の採取:

大槽(Cisterna Magna)へは、脳定位固定装置を使わずに到達できる。すなわち、先のとがったカニューレを後頭骨にそって下ろしていくと、大槽に到達し髄液が出てくる。大槽は、第四脳室とつながってはいるが、空間として大きいので、薬物の注入より髄液の採取のためにカニューレを

入れることも多い。

(2) 脳実質内注入：

脳実質内への薬物注入は、基本的には脳室内注入と同じ方法で行う。ガイドカニューレと注入カニューレは、それぞれ23および30Gを用いる。脳室内注入と異なっている点を列挙すると、

スタイレットはガイドカニューレと同じ長さにするが、ガイドカニューレの先端は、目的とする部位の1mm上に留置する。従って、注入カニューレはガイドカニューレの先端より1mm突出するようにする。ガイドカニューレによる脳組織の破壊を防ぐためである。

注入量は、よほど広い範囲を目的にしないかぎり、0.1μlくらいまでにする。薬物が脂溶性か水溶性かによるが、0.1μlでおおよそ直径1mmは広がると考えられる。0.1μlを少なくとも1分間はかけてゆっくりと注入し、注入後も数分そのままにしておく。

薬物の注入を何回も繰り返すのはよくない。筆者の経験では、血圧や自律神経活動を指標に視床下部内にグルタミン酸を注入した場合、2回目までは同じ反応が出るが、3回目は出ない場合も多い。組織のダメージが大きいと考えられる。最後は、色素を薬物と同量注入して後で注入部位を確認する。

V. 脳の電気刺激、破壊

脳局所の電氣的刺激および凝固破壊を行い、その影響を観察するのは、脳の各部位の機能を評価するためによく用いられる方法である。ただし、通電による刺激や破壊は、通過線維をも刺激破壊することを、頭に入れておかなければならない。電気刺激または破壊に用いられる電極は、大きくわけて単極 (monopolar) と双極 (bipolar) に分けられる。

(1) 単極電極 (monopolar electrode)：

単極電極は、電極の先端と通常は動物の皮膚や皮下との間で通電する (図2a)。双極電極と比較して、電極をかなり細くできるという長所はあるが、通電時の電流の広がりが大きくなる可能性がある。

(2) 双極電極 (bipolar electrode)：

双極電極はさらに、平行 (parallel) と同心 (coaxial) 電極に分けられる。平行双極電極 (図2b) は、脳表面から刺激するときなどに用いるが、筆者は後述する経咽頭的記録において下垂体茎を脳底表面から刺激する際に用いた [5]。エナメル線を2本より合わせて簡単に作ることもできる。

同心双極電極は、電極先端部に電流の湧き出しと吸い込みがあるため、電流の広がりが小さい。いずれも市販されているが、結構高価で全長が長いものが多い。急性実験で電気刺激を行うときは、脳定位固定装置につけたままなので長くても全く構わないし、他にも内筒がステンレスチューブで電気刺激と薬物注入のどちらも可能な電極など、様々なものが市販されている。しかし例えば、脳局所の刺激や破壊による自律神経活動の変化などを調べるときなどは、麻酔下ではあるが脳定位固定装置には固定せずに実験を行うことになる。このようなときは、回復期を考えて約1週間ほど前に刺激電極を脳内に固定しておく必要がある。このように、ラットに刺激電極を慢性的に留置するため、短い電極が多数必要な場合などは、自分で作製することになる。刺激電極の基本的な作り方は以下のごとくである。

(a) 26Gのステンレスチューブ (内径0.23mm) とこれにぴったり入るエナメル線を用意する。急性実験では電極が長くても構わないが、予め電極を慢性的に留置しておきたいときは、ラットに負担にならないようにできるだけ短いほうがよい。長さをそろえた後、先端の全周を斜めに削った後バリをとっておく (図2c)。

(b) エナメル線を先端から1 cmほど出るまで通し、別のエナメル線をチューブの上端にハンダで付ける。内筒のエナメル線は、被覆がはがれて外筒と短絡していないか確認しておく。

(c) 絶縁コーティングは、ポリウレタン樹脂塗料を用いる。われわれは、カシュー (株) のストロン (A液 (2) : B液 (1)) に専用シンナーを少量混ぜたものを用いている。(b)の電極をアセトンなどでよく拭き、樹脂の中に1本づつ浸して

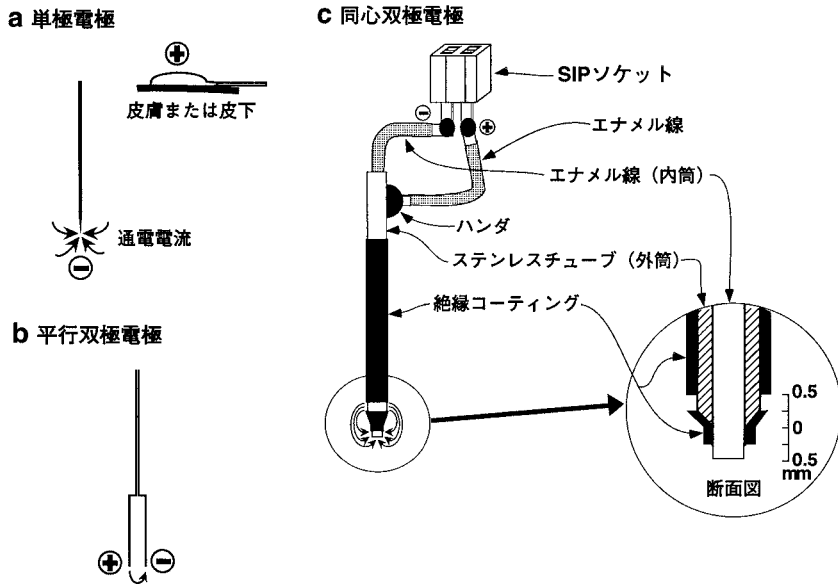


図2．刺激電極の模式図
 a. 単極電極 . b. 平行双極電極 . c. 同心双極電極 .

数分かけてゆっくり引き上げ、ムラのないようにコーティングする。数日間乾燥させた後、実体顕微鏡下でかみそりの刃を用い絶縁をはがす。

(d) 図2cの断面図に示すように、エナメル線を先端から0.5mmで切り、その先端部0.25mmだけ絶縁をはがし、ステンレスチューブは先端から0.75～1.0mmの間を帯状に樹脂をはがすと、tip separationは0.5mmになる。樹脂を帯状にはがすのは、全周にかみそりで切れ目を2本入れ、かみそりの先端ではじくようにすると、きれいにはがれる。

(e) 刺入した後、慢性的に留置する場合は、市販のSIPソケット（通常、幅3mmで20ピンが一列に並んでいる）を2ピン分だけ切って、ソケットとして用いる。エナメル線をピンにハンダ付けし、デンタルセメントで固める。もちろんアンカーは必要である。通電は、同じソケットで作ったコネクタを用いて行う。また、両側性に刺激、破壊する場合は、2本の刺激電極を平行で同じ高さにマニプレータに取り付けられ、同時に植え込むこともできる。

(3) 通電：

通電は、図2の矢印で示したように、電極の先端を陰極にして、吸い込みになるようにする。先端が目的とする部位の中心になるように植え込むので、そこが興奮したときをシミュレートしたと考えればよい。

刺激

刺激は通常矩形波で行うが、強度や持続時間は、色々と変えてみるべきである。われわれは、脳実質の神経細胞の興奮を目的とする場合は、持続0.1msec、強度0.1mAを基本とし、逆行性興奮を確認するために軸索を刺激する場合は、無髄線維であることを想定して持続時間をもっと長くしている。また、連続刺激に対する生体反応を見る場合には、100Hz程度まで変化させてみる。視床下部外側野を刺激して、副腎交感神経活動の変化を観察した実験では、0.1msec、0.1mAで5～100Hzまで変えたが、50Hz以上はほぼ同じ反応が見られた。また、視床下部外側野には、内側前脳束が通過しているが、刺激部位を前後に動かすと異なる反応が見られたことから、通電の効果は、通過線維を刺激したことによるものではないと判断した[6]。

破壊

脳の局所を凝固破壊するには、直流電流を通電する。筆者は、視床下部視索前野、腹内側核、および室傍核の破壊は0.8～1.0mAで、外側野の場合は2mAで10～15秒間通電した[6 8]。特殊な例として、刺激電極のtip separationを少し長めにし、第三脳室内の吻側部[A: プレグマより0.3mm後ろ, L: 0mm, H: 脳表面より7.3mm]に刺入して、3.0mAを20秒間通電すると、第三脳室壁前腹側領域(Anteroventral region of the third ventricle, AV3V)を破壊することができる[7]。

VI. 神経活動の記録

*In vivo*のラットにおいて脳の活動を電気生理学的に記録する方法は、脳波や誘発電位、単一神経細胞の細胞外記録、および微小電極による細胞内記録などがあり、最近では吸引電極によるパッチクランプ法も試みられている。また、テレメトリシステムを用いて、体温、血圧、脳波等だけでなく、単一神経活動も記録できる様な周波数特性をもつ送信器も開発されている。ここでは、無麻酔ラットにおけるワイヤー電極を用いた単一神経細胞活動の記録、および麻酔下ラットの経咽頭法による脳底部からのアプローチ法を中心に述べる。

(1) 無麻酔無拘束ラットの単一神経活動記録:

無麻酔ラットの単一神経細胞の活動電位を記録するための電極としては、頭部を固定している場合はガラス電極を用いることができるが、無拘束自由行動下においては、タングステンやステンレススチール電極、およびワイヤー電極がよく用いられる。前二者は、頭上にマイクロドライブをつけることによって、電極を上下に移動させることができる。一方、ワイヤー電極は通常、数本を束ねて刺入するが、記録が安定して数時間持続する一方で、電極が時間とともに脳内で動きうるので一度植え込むと、異なった何個かのニューロンの活動がとれることもある。以下に、有線による慢性記録の方法の一例[4]を述べる(図3)。

ワイヤー電極の作成

(a) 26Gのステンレスチューブ(長さは記録部位に応じて決める)にテフロン被覆白金・イリジウムワイヤー(筆者は、MedWire社製、直径35μmを用いた)を5～8本束ねて通し、先端を鋭いはさみ等で切りそろえる。

(b) ポリエチレングリコール(Polyethylene Glycol 6,000 (PEG))を60～70℃に温めて溶かし、先端が多少とがるようにワイヤーの束を固める。PEGは、室温ではすぐに固まる。電極の先端に湯気をあて、先端部からかろうじて見えるほどにワイヤーが露出するようにPEGを溶かす。結局

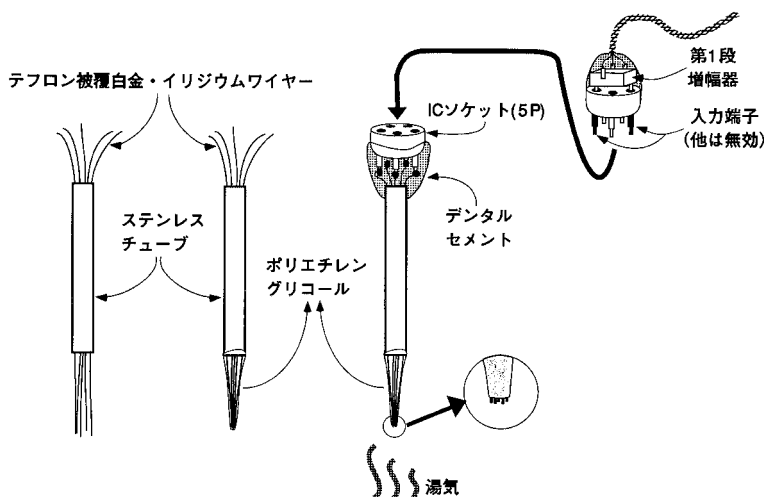


図3. ワイヤーによる慢性記録電極の作成(詳細は本文参照)。

PEGは、脳内においてすべて溶けてしまう。

(c) 電極の上部は、ワイヤーをそれぞれICソケットのピンにハンダ付けし、デンタルセメントで固める。電極の刺入は、硬膜をはがして行う。慢性留置の方法は、上述した刺激電極等の場合と同じである。

記録

(a) 電極の作成において、S/N比の良い単一神経活動を記録するためには、(1) ワイヤーは断端面のみがテフロン被覆から露出することになるので、ワイヤーの先端を切りそろえる時はできるだけ切れのいいはさみを使うこと、(2) ワイヤー電極を湯気で先端から少し露出させるのは、記録部位での組織の損傷を少なくするためであるが、露出部分が長すぎるとワイヤーが屈曲するので注意すること、などが大事なポイントになる。

(b) ラットの動きや咀嚼によるノイズをできるだけ少なくするために、束ねて刺入したワイヤー電極のうち、2本を選んで、差動増幅により活動電位を記録する。さらに、第1段の増幅器をできるだけ電極の近くに置くために、ラットの頭上のICソケットに直接つなげる。増幅器としては、以前はdual-typeのfield effect transistor (FET) を使用していたが、最近では、小型でもっと高性能のオペレーショナルアンプがある。増幅器の入力端子を同じICソケットのピン(メス)のうち2つを選んでハンダ付けし、全体をデンタルセメントで固める。

(c) 数本のワイヤー電極のうち2本を選んで記録するので、日をおいて記録すると、異なった神経細胞の活動を記録できることがある。ただし、以前に記録したものと同一ではないことを、活動電位の波形や、外界からの刺激に対する応答性などで注意深く確認する必要がある。

(d) 記録終了後、記録が目的とする部位からできているか否かを同定する必要がある。一般にタングステン電極は直流陰性電流を通电して組織を破壊したり、鉄を含むステンレススチール電極は直流陽性電流の通电により鉄イオンを溶出させ、フェリシアンカリウム等による鉄染色で記録部位が同定できる。筆者らは、白金イリジウムワイヤ

ー電極において、電極の一本に10 μ Aの直流陰性電流を10秒間通电し、直径が200 ~ 300 μ mで組織を破壊することにより記録部位を同定した[4]。

(2) 経咽頭(transpharyngealまたはventral approach)法による神経活動の記録：

麻酔下のラットから中枢神経細胞の活動を記録する場合は、脳定位固定装置を用いるのが通常であるが、視床下部室傍核や視索上核の神経内分泌ニューロンの活動を記録する方法として開発されたのが経咽頭法である。この方法は、正中隆起や下垂体を露出できるので、下垂体茎の刺激による逆行性興奮から、下垂体後葉に軸索を送る神経内分泌ニューロンの同定が可能である。また、筆者らは、第三脳室壁前腹側領域(AV3V)の神経細胞の記録も、この方法で行った[9]。

手術

(a) 麻酔したラットに気管カニューレを挿入、固定する。気管カニューレは、太めのポリエチレンチューブを用いるが、後に咽頭部を操作するので邪魔にならないように、90度以上角度をつけて曲げておく(図4a)。

(b) 両側の外頸動脈を結紮した後、仰臥位のまま、頭部を手前にして舌および下顎を正中で切断する。直ちに、切断した舌と下顎に、左右それぞれ、タコ糸をしっかりと巻き付けて止血する。

(c) 下顎から舌にかけて小型(長さ5 ~ 8cm)の開創器で広げ、開創器のアームと下顎と舌を、左右それぞれタコ糸で固定する。咽頭から気管上部までを電気メスで切開し、軟口蓋の部分の粘膜を焼灼しながら深く進んでいくと、幅が約2mm、前後が7 ~ 8mm程度の深い空間がでてくる。その表面の粘膜や結合組織を焼灼すると底部に頭蓋骨が露出される。ヒトの蝶形骨にあたると思われる。その両側には大きな静脈が存在するので傷つけない様に注意する。ここから先は、実体顕微鏡下で行う。

(d) まず底部の骨を削っていくわけであるが、骨の中にはおそらく板間静脈と思われる大きな静脈があり、いわば二重構造の様になっており、無造作にドリルを使うと、小さな穴でも大出血にな

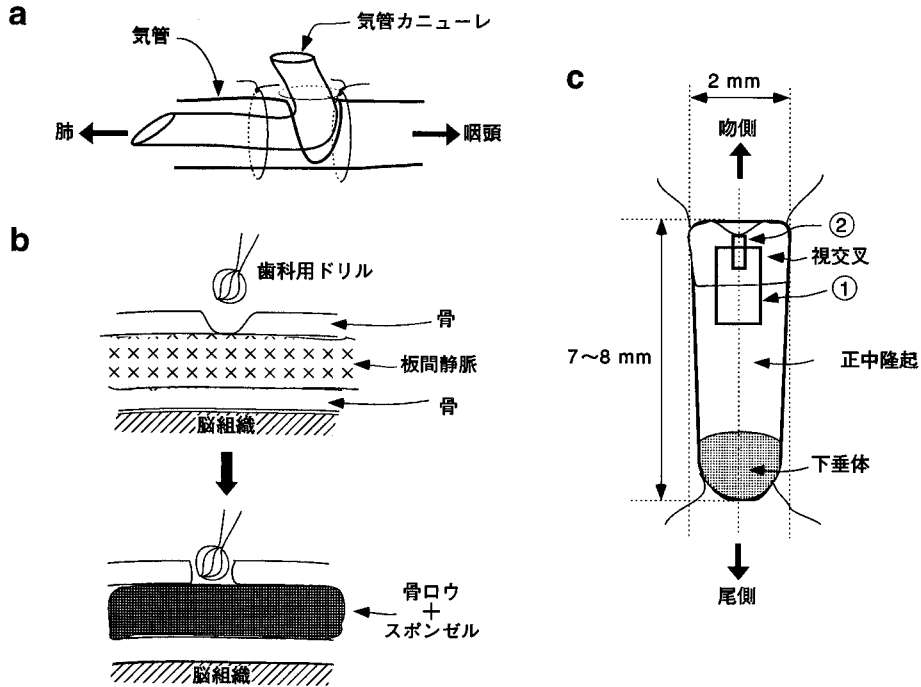


図4. 経咽頭的アプローチ法

a. 気管カニューレの模式図. b. 脳底骨の削り方の模式図. c. 脳底部の模式図, および
 : 室傍核 () および AV3V () ニューロンを記録する時の記録電極の刺入領域.

る. それを避けるために, 歯科用ドリル (径 1mm 以下) で注意深く一ヶ所を削っていき, 骨を薄く残したところで, 骨ロウと細かくちぎった スポンゼルなどをよくこねあわせたものを, 薄皮を破りながらピンセットや針で素早く押し込んでいく. かなりの量が入っていく (図 4b). ある程度抵抗があるまで埋め込んだら, ドリルで骨を削っていく.

(e) 全領域の骨を削ると, もう一度骨が現れる. その下は脳組織なので, 硬膜を傷つけないように丁寧に骨を削る. 最後に硬膜を破ると, 吻側から真っ白な視交叉, 下垂体門脈が走る正中隆起, およびややピンクがかかった下垂体が確認できる (図 4c).

記録

(a) 室傍核の神経内分泌ニューロンの記録は, 視交叉の尾側縁を中心に前後 1mm にわたり, 正中から 1mm の幅の領域 (図 4c の) から記録電極を刺入する. 正中隆起と下垂体の移行部の下垂体

茎を平行双極電極 (図 2b) で刺激しながら記録電極を進めていくと, 深さが脳底表面から 1.5 ~ 3mm で下垂体茎の刺激で逆行性興奮をするニューロンが得られる. 視交叉上核から記録する場合は, 左右をさらに 1 ~ 2mm 広げる必要がある.

筆者らは, この方法で室傍核ニューロンの *in vivo* 細胞内記録を試みたところ, 人工呼吸を行わなくても, 比較的安定した記録が得られ, 神経内分泌ニューロンの input resistance や小脳室頂核刺激に対するシナプス電位を記録することができた [5].

(b) 経咽頭法により, 第三脳室壁前腹側領域 (AV3V) ニューロンの活動が記録できる. 刺入部位は, 視交叉の尾側縁から前方 0.5mm から吻側縁までで, ほぼ正中領域 (幅 0.25mm) (図 4c の), 深さが 0.5 ~ 2.8mm であった. この実験では, 予め脳背側から室傍核および内側視索前野に刺激電極を刺入して慢性留置しておき, それらの刺激に対する応答を記録した [9]. 室傍核や

AV3V など、視床下部の脳底部領域からの記録は、電極を脳背側部から刺入しても記録できるが、経咽頭法を用いた方が、より正確に効率良く記録できると考えられる。

(c) 記録部位の同定は、ガラス電極を用いた細胞外記録の場合、Pontamine sky blue (2%) などの色素を電極液に溶かしておき、記録終了後に記録電極から直流陰性電流 (20 ~ 50 μ A, または 200 ~ 500V) を数分間流して色素のスポットを作り、後述する灌流固定後に組織切片を作成して確認する。

VII. 灌流固定

これまで述べてきた方法は、ごく通常の脳実質の刺激や破壊、および記録法であり、灌流固定後に組織切片を作成するのは、部位の同定がおもな目的である。そのために用いられる最も一般的な方法が経心腔的灌流 (transcardial perfusion) である。

ネプタール等で深く麻酔した後、開胸し心尖部を切開して、先端があまりとがっていないための針を左心室に刺入し、鉗子で心臓とともに固定する。この時、針の先端が大動脈まで入っていることを確認しておくのが、失敗を防ぐことになる。直ちに右心耳を切開し、ペリスタポンプ等を用いて 10 ~ 50ml/min 程度の流速で灌流液を流す。はじめに生理食塩水またはヘパリン 生理食塩水 (50 ~ 100ml) で血液を洗い流し、続いて 10%ホルマリンを 200ml ほど灌流する。切片を免疫組織化学的染色やその他特定の処理をする場合は、それに合わせて灌流液を変える。

ホルマリンが全身に運ばれ、灌流がうまくいっているかどうかは、ホルマリンを流した時に全身がけいれん様に動くことで容易に確認できる。取りだした脳は、10%ホルマリン液中に保存しておくが、切片を作る前は少なくとも一昼夜 30%シヨ糖液に浸けておく。切片の作成や染色の方法については、ここでは省略する。

おわりに

ラットを用いた神経生理学実験において、取り

扱いについて注意すべき点や、脳内薬物注入、および電気刺激・破壊法について基本的なことを述べた。さらに、神経活動の記録法については、やや特殊であるが、慢性記録法および経咽頭的なアプローチによる記録について述べた。結果的には、「ラットの手術法」というタイトルにしては、神経生理学的方法のみで、その中でも限られたものしか紹介できなかった。すなわち、末梢自律神経系や脊髄、および形態学的な研究法など、ここで述べられなかった重要な神経生理学的研究方法は多数ある。これらの点をふまえた上で、ここに述べたことを、これから実験を行おうとする際に、少しでも参考にいただければ幸いである。

文 献

1. Paxinos G & Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition. Academic Press, 1997.
2. Swanson LW: Brain Maps: Structure of the Rat Brain. Second Edition. Elsevier 1998.
3. König JF R & Klippel RA: The Rat Brain. A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams and Wilkins 1963.
4. Katafuchi T, Oomura Y & Yoshimatsu H: Single neuron activity in the rat lateral hypothalamus during 2-deoxy-D-glucose induced and natural feeding behavior. Brain Res 359 : 1 - 9, 1985.
5. Katafuchi T & Koizumi K: Fastigial inputs to paraventricular neurosecretory neurons studied by extra- and intracellular recordings in rats. J Physiol (Lond) 421 : 535 - 551, 1990.
6. Yoshimatsu H, Oomura Y, Katafuchi T & Nijima A: Effects of hypothalamic stimulation and lesion on adrenal nerve activity. Am J Physiol 253 : R418 - R424, 1987.
7. Katafuchi T, Oomura Y, Maruyama T & Akaike N: Hypothalamus and sodium-potassium pump activity in skeletal muscles of DOCA-hypertensive rats. Am J Physiol. 253 : R396 - R401, 1987.
8. Katafuchi T, Ichijo T, Take S & Hori T: Hypothalamic modulation of splenic natural killer cell activity in rats. J Physiol (Lond) 471 : 209 - 221, 1993.
9. Ota K, Katafuchi T, Takaki A & Hori T: AV3V neurons that send axons to hypothalamic nuclei respond to the systemic injection of IL-1. Am J Physiol 272 : R532 - R540, 1997.