

イモリ下顎皮膚面の化学的刺激に対する応答

原田秀逸・山下 智

890 鹿児島市 鹿児島大学教養部生物学教室

1977年6月20日 受領

Facial Nerve Response to Chemical Stimulation of the Skin of the Newt's Lower Jaw.
SHUITSU HARADA AND SATORU YAMASHITA (Biological Institute, College of Liberal Arts,
Kagoshima University, Kagoshima 890)

ABSTRACT Responses of the facial nerve in the newt (*Cynops pyrrhogaster*) to stimulation of the skin of the lower jaw by various chemical solutions were recorded using an integrator. Of the conventional four taste stimuli NaCl, HCl and quinine hydrochloride caused marked responses, but sucrose did not produced any responses even at 1 M concentration. Approximate thresholds were 0.01 mM for HCl and 0.1 mM for NaCl and quinine hydrochloride. KCl was similar to NaCl in the threshold and in rate of increase in the magnitude of response with increasing concentration. However, the magnitude of response to NaCl was slightly greater than that to KCl above 0.1 M. The order of the stimulating effectiveness of 0.1 M monovalent salts was $\text{NH}_4\text{Cl} \geq \text{NaCl} \geq \text{LiCl} \geq \text{KCl} \geq \text{RbCl} > \text{CsCl}$ and that of 0.03 M divalent salts was $\text{BaCl}_2 > \text{MgCl}_2 > \text{CaCl}_2 \geq \text{SrCl}_2$. Thresholds for divalent salts were rather low compared to NaCl and the responses indicated a tendency to either saturate or decline at concentrations above 0.03 M. Temporal patterns of responses to divalent salts were fairly different from responses to monovalent salts. On the skin of the lower jaw, many lateral-line organs were histologically observed, but no taste bud-like structures were detected. (*Zool. Mag.* 87: 19-25, 1978)

水棲脊椎動物である魚類, 円口類, 両生類のなかには体表面に側線器を有するものが多い。従来, 一般に, これらの側線器は機械受容器と見なされていたが, 近年になって魚類の遊離側線器 (孔器) が化学的刺激に対して応答することが電気生理学的に確認され, 側線器の化学受容器官としての可能性が示唆されるようになった (Katsuki and Hashimoto, 1969; Katsuki *et al.*, 1969, 1971)。一方, 同様な化学的刺激に対する応答は両生類 (アフリカツメガエル, ウシガエルの幼生およびネクトルス) の側線器についても報告され, 魚類側線器応答とは若干異なる点も指摘された (Onoda *et al.*, 1970; Onoda and Katsuki, 1972; Yanagisawa *et al.*, 1974; Nakagawa *et al.*, 1974)。それによると, これら両生類の側線器はすでに報告された魚類の側線器に比べると, 化学受容器としては機能的に進んだもので, その応答は一部味覚器の応答と類似する傾向を示すという (柳沢, 1975)。

本実験では, イモリを用いて側線器の構造および化学受容の基本的性質を組織学的, 電気生理学的に明らかにするとともに, それらをこれまでに報告された両生類および魚類における結果と比較考察する。

材料および方法

実験材料として体重 3.5~6.5 g の雄イモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を使用した。採集したイモリは $20 \pm 2^\circ\text{C}$ に保たれた水道水で止水飼育し, 飼育水に十分馴化させた後実験に使用した。実験材料は 10% ウレタン約 0.5 cc の腹腔内注射により麻酔し, 顔側面を切開して下顎側線器を支配する顔面神経の分枝を周囲の組織から分離した後, 中枢側を切断した。

取り出した神経束は, 切開によってできたくぼみの中で銀一塩化銀電極に乗せ, 流動パラフィン下に浸漬させた。神経インパルスは交流増幅器によって増幅した後, 積分回路 (時定数 0.3 秒) (Beidler,

1953) に導き, その波形の変化をインク書きオシログラフ (日本光電 PMP-3004) に描記した。同時に, インパルス放電の変化を陰極線オシロスコープ (日本光電 VC-7A) により常時モニターした。刺激の際積分回路を通して得られる波形の最大値を応答の大きさの尺度とした。

刺激にあたっては, 刺激液および洗浄液が常に一定の速度 4~6 ml/min でイモリの下顎皮膚表面に一樣に広がるように工夫した。刺激時間は10秒間, 刺激間隔は4~5分とし, 刺激前30秒まで蒸留水で洗浄を続けた。刺激に用いた薬品は四基本味刺激液として, HCl, NaCl, 蔗糖, 塩酸キニーネ (以下単にキニーネとする), 1価塩溶液5種 (NH_4Cl , LiCl , KCl , RbCl , CsCl), 2価塩溶液4種 (MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2), を用い, 0.1 M NaCl を適宜コントロールとして使用した。

下顎皮膚面に分布する受容器については, 下顎全体をブアン氏液で固定し, 10 μm パラフィン連続切片を作成してプロティン銀染色する方法で光学顕微鏡による観察を行った。

本実験は終始室温 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件下で行い, 刺激液の温度は室温と同温とした。

結 果

1) 側線器の分布と構造

イモリ下顎皮膚面を0.03%アニリンブルー溶液に24時間浸したのち実体顕微鏡で観察すると, 側線器は開口部が青色に染まるので容易に識別できる。側線器は上顎縁にほぼ平行な馬蹄形状の3列に並び, 下顎先端にいくに従って列の間隔がせばまり, 先端では密に分布している。

これらの側線器は縦断切片によって観察すると, 次のような特徴を示す。

Fig. 1A は大型の遊離側線器で感覚細胞の核は大きく, 円形をしていて, 細長く不規則な形をした支持細胞の核から離れて2層となり, 遊離側線器特有の特徴を示している。Fig. 1B は前者に比べやや小型であるが, 感覚細胞と支持細胞の核の形状と2層性が大型のものと類似する事からこれも同種の遊離側線器であると考えられる。Fig. 1C はイモリ舌に見られる味蕾で, 感覚細胞と支持細胞の差が明瞭ではなく, 両者を区別することが困難であるなど, 前記の側線器とは構造的にかなり異なる。更に, 大型と小型の側線器は共に感覚細胞の細胞質の遊離側が一樣に濃染するのに対して, 味蕾では感覚細胞の遊離側の細胞質に, 周囲とはやや色調の異なる銀好性

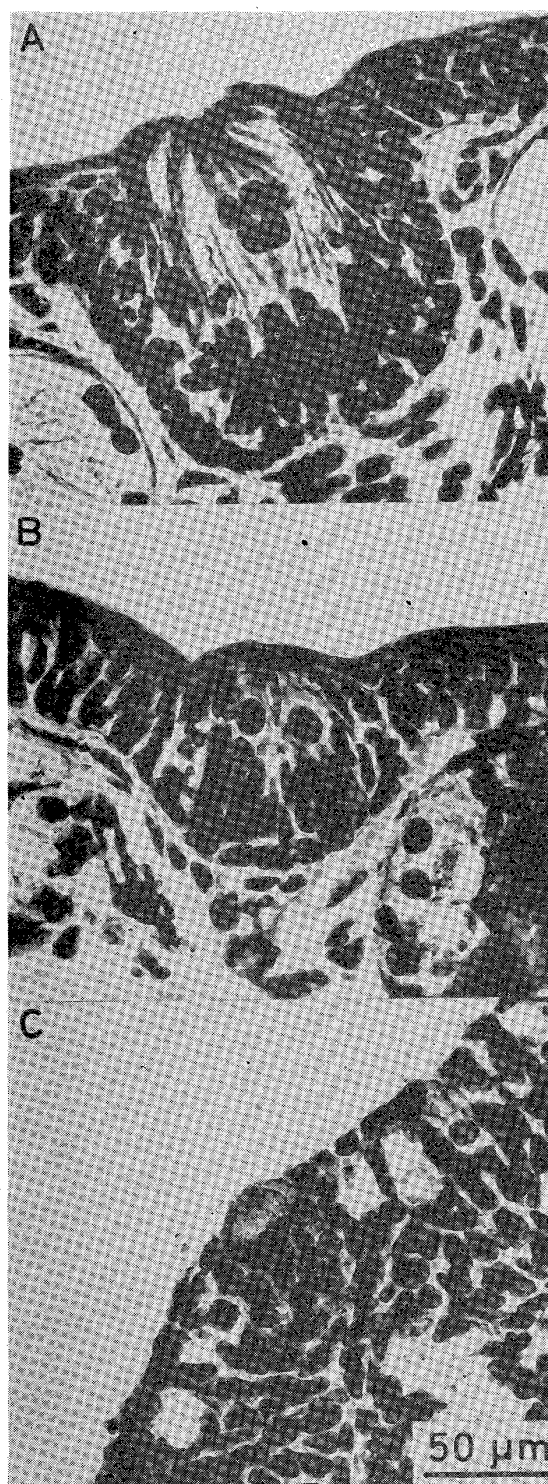


Fig. 1. (A) Large type and (B) small type of lateral-line organs on the skin of the lower jaw of a newt. (C) A taste bud on the tongue of a newt. Silver stained sections.

の顆粒状の物質が多数存在するのが認められた。このような味蕾様構造は下顎皮膚面では全く認められなかった。

連続切片において、下顎皮膚面に分布する側線器の直径を測定し、ヒストグラムを作成したものを Fig. 2 に示す。図から、観察された 36 個の側線器

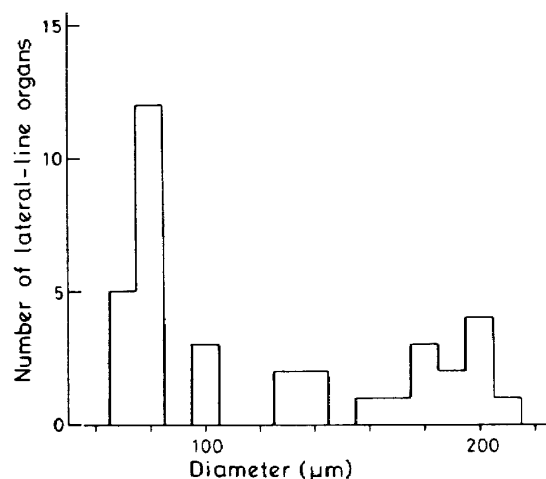


Fig. 2. Histogram of diameters of lateral-line organs as measured from serial sections made throughout the region of the lower jaw of a newt.

は、直径 $80\mu\text{m}$ 前後の比較的小型のものと、直径 $180\mu\text{m}$ 前後の大型のものとに分かれた。

2) 自発性放電と側線器の一般的性質

第 7 脳神経の下顎枝から記録される自発性放電の頻度は、下顎全体が充分水分を含む状態では極めて低く、神経束全体から記録しているにもかかわらず平均毎秒 14.5 ± 6.2 個 ($n=5$) であった。しかし、皮膚面の含水量が減ると頻度は増加し、また麻酔が浅くなっても同様な傾向を示した。剔出した神経と同側の皮膚面にある 1 個の側線器をナイロン毛で軽

く接触刺激するとインパルスの放電頻度は増加した。このような触応答は、刺激液の流速では惹起されない程度のものであった。下顎皮膚面に水道水をかけるとインパルスの放電頻度は増加したが、蒸留水に対しては殆んど応答を示さなかった。ところが、 0.1M 食塩溶液を極く少量ナイロン毛の先端に滴状に付着させ、1 個の側線器の開口部に触れさせると、触応答とは異なるやや持続的な応答が得られた。また、一個の側線器上とそれ以外の皮膚面上に刺激電極を軽く接触させて 100mV , 100msec の矩形波電気刺激 (出力インピーダンス 800Ω 以下) を行くと、側線器上の電極が陽極の場合には刺激開始直後にスパイク放電頻度は増加し、陰極の場合には刺激時には増加せず、終了直後に増加した。また、蒸留水の温度を皮膚温より $\pm 10^\circ\text{C}$ 変化させて下顎皮膚面全体を刺激すると、インパルス放電の頻度はわずかに増加したが、 $\pm 5^\circ\text{C}$ の変化では頻度に変化は認められなかった。

このような、機械的、化学的並びに電気的な刺激に対して応答を示した側線器はいずれも 3 列の側線器のうちの内側の 2 列で、最外側の 1 列からは応答は得られなかった。なお、この 1 列は別の第 7 脳神経分枝により支配されており、その分枝から記録し、支配される側線器に上記のような刺激を行うと同様な応答が得られる。従って、これらの側線器は支配する神経の分枝が異なるだけで機能的には類似している可能性がある。本実験では内側の 2 列の側線器についてのみ詳細に検索した。

3) 四基本味刺激液に対する応答

いわゆる四基本味刺激液に対して下顎皮膚面の側線器がどのような応答を示すかを調べた。刺激液として 10^{-1}M NaCl, 10^{-3}M HCl, $3 \times 10^{-1}\text{M}$ 蔗糖, 10^{-2}M キニーネを用いた。各刺激液に対する応答順は、5 例の平均値で $\text{NaCl} > \text{HCl} > \text{キニーネ} > \text{蔗糖}$ の順であったが、蔗糖と蒸留水に対する応答との間

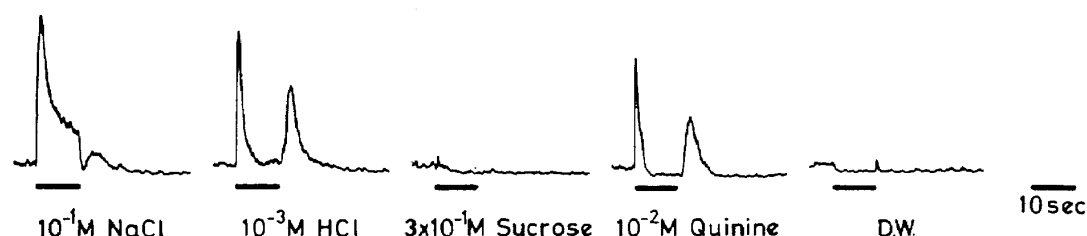


Fig. 3. Integrated responses of the newt facial nerve to the stimulation of the skin of the lower jaw with the four conventional taste stimuli and distilled water. Horizontal bars under each trace indicate the duration of stimulus.

には差がなかった。これらの応答パターンの1例を Fig. 3 に示す。図で明らかなように、NaCl, HCl, キニーネではいずれも刺激開始と同時に応答量は急激に増加するが、刺激開始後5秒までにはすでに最大値の $\frac{1}{2}$ 以下に減少している。このように、応答量は刺激開始直後に最大値を示した後一過性に減少したが、高濃度の NaCl に対する応答は初期の極大値を経た後ある一定のレベルに維持される傾向、すなわち tonic 応答を示した。また、HCl, キニーネで著明な、NaCl で微小な洗浄時応答が見られたが、この応答については別の報文で詳述する。

NaCl とキニーネに対する応答は、それぞれ 10^{-4}M 付近で現われ、濃度の増加に伴い、その対

数に対してやや直線的に増加したが、キニーネに対する応答は 10^{-3}M で飽和応答に近づく傾向を示した。HCl に対する閾値は 10^{-3}N 付近にあり、応答は 10^{-3}N で最大値に達し、それ以上の濃度では逆に減少した。特に 10^{-2}N では洗浄を続けても刺激後もとの自発性放電のレベルまで回復せず、その後の NaCl の応答（コントロール応答）値が減少した。蔗糖は全濃度にわたって明瞭な応答を示さなかった。

4) 1価塩に対する応答

陽イオンの刺激効果を調べる目的で、6種の塩類溶液 (LiCl, NaCl, KCl, RbCl, CsCl, NH_4Cl) を用いて刺激を行った。それぞれの応答パターンの1

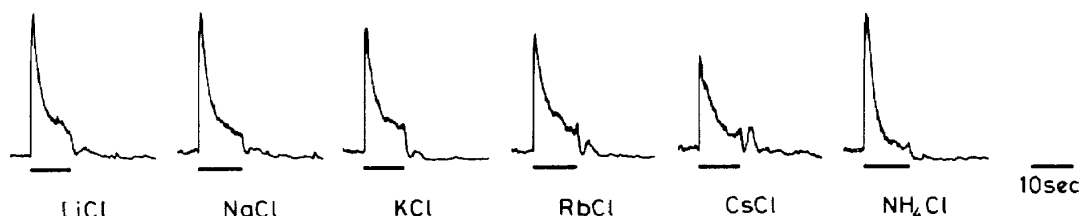


Fig. 4. Integrated responses of the newt facial nerve to the stimulation of the skin of the lower jaw with various monovalent salts of 0.1 M. Horizontal bars indicate the duration of stimulus.

例を Fig. 4 に示す。いずれも前述の NaCl に対する応答の時間経過と類似している。 10^{-1}M の各塩類溶液に対する応答の大きさの順序は Kendall の一致係数 (W) (Siegel, 1956) を用いると、 $\text{NH}_4\text{Cl} > \text{NaCl} > \text{LiCl} > \text{KCl} > \text{RbCl} > \text{CsCl}$ ($W=0.792$, $p < 0.01$, $n=5$) となったが、隣り合う2者の間で各例毎の差の検定を行うと、 $\text{RbCl} > \text{CsCl}$ ($p < 0.05$) を除いて有意差は認められなかった。しかし NH_4Cl と LiCl, RbCl, CsCl との間では $p < 0.05$, NH_4Cl , LiCl, KCl, RbCl のそれぞれと CsCl の間では $p < 0.05$ で有意差が認められた。NaCl と

KCl については更に濃度を変えて調べた結果、両応答とも閾値は 10^{-4}M 付近で、濃度の増加に伴ってその対数に対して直線的に増加し、両者の間にはほとんど差は認められなかった。ただし、 10^{-1}M 以上で多少 $\text{NaCl} > \text{KCl}$ の傾向が見られた。

5) 2価塩に対する応答

2価塩については、 MgCl_2 , CaCl_2 , SrCl_2 , BaCl_2 の4種を用いた。その典型的な応答パターンを Fig. 5 に示す。図で、NaCl に対する応答でみられた tonic な成分は SrCl_2 以外の3種に対する応答ではほとんど認められないか、あるいは極めて小さい。

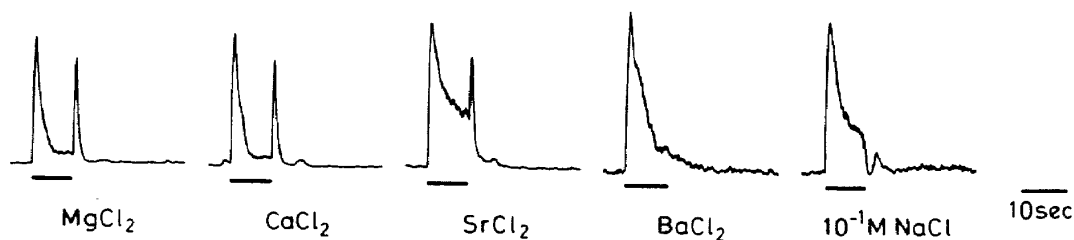


Fig. 5. Integrated responses of the newt facial nerve to the stimulation of the skin of the lower jaw with four divalent salts of 0.03 M and NaCl. Each horizontal bar indicates the duration of stimulus.

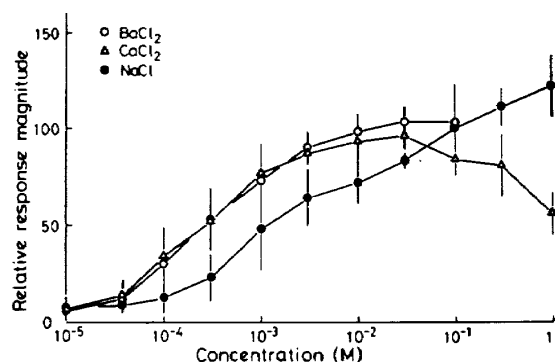


Fig. 6 Relative magnitude of responses of the newt facial nerve to various concentrations of BaCl₂, CaCl₂ and NaCl. Mean of 5 experiments. Vertical bars indicate $\pm$ S.D. of the mean.

また、MgCl₂, CaCl₂ および SrCl₂ 刺激では洗浄直後に著明な応答がみられたが、BaCl₂ では全くみられなかった。BaCl₂ および CaCl₂ に対する濃度—応答曲線を NaCl に対するそれと比較したのが Fig. 6 である。BaCl₂, CaCl₂ とともに閾値は 3×10^{-3} M 付近にあり、応答はそれぞれ 3×10^{-3} M まで濃度の対数に対して直線的に増加し、その後増加は鈍化しながら飽和応答に達する。更に 3×10^{-2} M 以上では CaCl₂ に対する応答は漸減する。これらの濃度—応答曲線はいずれも NaCl に対するそれとはかなり異っている。また、 3×10^{-2} M 以上の BaCl₂ および CaCl₂ の刺激によってその後の刺激液に対する応答は抑制され、抑制効果の維持される時間は濃度に依存していた。たとえば、1 M CaCl₂ の刺激後では抑制効果の回復に約 10 分を要し、 10^{-1} M BaCl₂ では 30~60 分間もの間その効果が持続した。

4 種の 2 価塩 (いずれも 3×10^{-2} M) の刺激効果の順序は、BaCl₂ > MgCl₂ > CaCl₂ > SrCl₂ ($W = 0.625$, $p < 0.05$, $n = 6$) であった。BaCl₂ と残りの 3 者の間および MgCl₂ と CaCl₂ の間にはそれぞれ $p < 0.05$ で有意の差が認められたが、SrCl₂ と MgCl₂, CaCl₂ との間には有意の差は認められなかった。

考 察

イモリの生体観察によって、下顎皮膚面に分布する側線器は下顎縁に沿って 1 列に並ぶものとその内側に 2 列になっているものとに分かれることがわかった。このような分布形態は Kingsbury (1905) によってイモリ類の一種 (*Diemyctylus viridescens*)

の下顎皮膚面で観察された側線器の分布形態と極めて類似している。Kingsbury は下顎縁に沿って並ぶものを oral line, その内側に 2 列に並ぶものを gular lines として区別している。また、同種およびネクトルス (*Necturus maculatus*) にみられる側線器の受容器細胞と支持細胞の形態や配置もイモリの場合と極めて類似している。側線器に特有な毛様突起やクブラは、作成した組織切片からは確認できなかった。その理由はおもに、毛様突起は構造が微細なこと、クブラは固定や脱水の過程で極めて破損し易いこと (Flock, 1967) によると考えられる。

本実験でインパルスの誘導を行った神経束は脳全体を露出して第 7 脳神経であることを確認した。更に、実体顕微鏡下で側線器に直接機械的、化学的および電気的刺激を与えることによって、用いた神経束は Kingsbury (1905) のいう gular lines に相当する内側の 2 列の側線器を支配していることを確かめた。また、下顎部に分布する側線器に第 7 脳神経の下顎枝が神経支配していることは他の両生類でも共通している (Kingsbury, 1905; Herrick, 1930)。これらのことから、本実験で得られた化学的刺激に対する応答は第 7 脳神経によって支配される受容器 (恐らく側線器) に由来するものであると考えられる。しかしながら応答する受容器の種類が 1 種か、あるいは 2 種ないしはそれ以上かについては本実験の結果からは何も推論できない。

いわゆる四基本味刺激液でイモリの下顎部を刺激した結果、蔗糖を除く 3 種は刺激効果のあることがわかった。両生類の側線器が NaCl に対して応答することについては、アフリカツメガエル、ウシガエルの幼生およびネクトルスですでに報告されている (Onoda *et al.*, 1970; Yanagisawa *et al.*, 1974; Nakagawa *et al.*, 1974)。しかしながらキニーネおよび HCl に対して側線器が応答したという報告はない。ただ、ナマズの体側の側線神経でキニーネによく応答するユニットが報告されているが、ナマズの体表には多数の味蕾が分布していることからキニーネに対する応答は味蕾の応答である可能性が強い (Katsuki *et al.*, 1971)。イモリの下顎皮膚面にも味蕾が分布している可能性が考えられるが、本実験で、口腔内の味蕾構造とも比較しながら下顎全域の連続切片について観察した限りでは、味蕾様の構造は認められなかった。したがって、本実験で得られた応答は側線器の応答であると推論される。側線器に対して蔗糖が刺激効果を示すという報告は今までのところ全くない。

本実験で刺激効果の比較に用いた1価塩 (0.1 M) の応答は、塩の種類に関係なく、刺激開始直後に最高値を示し、その後、初めのうちは急激に、やがてゆっくりと減少するというパターンを示した。このような応答パターンはアフリカツメガエルの単一側線神経繊維で得られた結果と極めて類似している (Onoda *et al.*, 1970)。また、イモリでは NH_4Cl に対する応答が極めて顕著であった。同様な結果はアフリカツメガエルやウシガエル幼生でも報告されている (柳沢ほか, 1972)。これらの動物がいずれも底棲型で食肉性であることから、 NH_4Cl に対する高感受性と索餌行動との間には何らかの関係があるのかもしれない。

KCl と NaCl に対する応答の大きさは濃度の対数に比例して直線的に増加し、両者の濃度—応答曲線はよく一致した。これは、Nakagawa *et al.* (1974) によるウシガエル幼生の結果と類似する。本実験では KCl と NaCl に対する濃度が 10^{-4}M 付近にあるのに対して、ウシガエルでは 10^{-2}M 前後にあり、閾値にかなりの差異がある。これに対してアフリカツメガエルの側線器では $1/16\text{M}$ あるいは $1/18\text{M}$ の NaCl による刺激で自発性放電の抑制が生じ、 $1/4\text{M}$ 以上の刺激によってはじめてインパルス放電の頻度は自発性放電のレベル以上に増加する。しかし、KCl に対する応答では自発性放電の抑制は全くみられず NaCl および KCl に対する濃度応答曲線は著しく異なっている (Onoda *et al.*, 1970)。

NaCl や KCl に対する応答が濃度の対数に比例して直線的に増加したのに対し、 CaCl_2 および BaCl_2 刺激では濃度が高まるにつれて応答は飽和し、とくに CaCl_2 刺激では高濃度でかえって減少した。 CaCl_2 に対するこのような応答性はカエルの舌で見られるものと類似している (Yamashita, 1963; Nomura and Ishizaki, 1972)。一方、アフリカツメガエルやウシガエル幼生の側線器も CaCl_2 に対して応答を示すが、上記のような高濃度での応答の減少は報告されていない。 CaCl_2 に対する閾値はアフリカツメガエルで 10^{-3}M 付近、ウシガエル幼生で 10^{-4}M 付近にあるのに対し (Onoda and Katsuki, 1972; Nakagawa *et al.*, 1974)、イモリでは $3 \times 10^{-5}\text{M}$ であった。このように両生類の側線器は CaCl_2 に対してかなりの感受性を示すが、一般に魚類の側線器においては、 CaCl_2 は抑制的にのみ働く (Katsuki and Hashimoto, 1969; Katsuki *et al.*, 1969, 1971)。したがって側線器の CaCl_2 応答は顕著な種属差を表わしていると言えよう。

謝 辞

原稿の御校閲をいただいた九州大学理学部森田弘道教授並びに鶴見大学歯学部柳沢慧二教授に心から感謝の意を表します。また、実験材料の側線器の生体並びに組織切片による観察に関して多大の御助言と御判断をいただいた弘前大学名誉教授佐藤光雄氏に対し厚く御礼申し上げます。

本研究は一部文部省科学研究費補助金によって行われた。

文 献

- BEIDLER, L. M. (1953) Properties of chemoreceptors of tongue of rat. *J. Neurophysiol.* 16: 595-607.
- FLOCK, Å. (1967) Ultrastructure and function in the lateral line organs. *Lateral Line Detectors*, ed. by P. Cahn. Bloomington, Indiana Univ. Press, pp. 163-197.
- HERRICK, C. J. (1930) The medulla oblongata of Necturus. *J. Comp. Neurol.* 50: 1-96.
- KATSUKI, Y. AND T. HASHIMOTO (1969) Chemoreception in the lateral-line system of the bony fish. *Proc. Jap. Acad.* 45: 209-214.
- KATSUKI, Y., K. YANAGISAWA, A. L. TESTER AND J. I. KENDALL (1969) Shark Pit Organs: Response to Chemicals. *Science* 163: 405-407.
- KATSUKI, Y., T. HASHIMOTO AND J. I. KENDALL (1971) The chemoreception in the lateral-line organs of teleosts. *Jap. J. Physiol.* 21: 99-118.
- KINGSBURY, B. F. (1905) The lateral line system of sense organs in some American Amphibia, and comparison with the Dipnoans. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 17: 115-146.
- NAKAGAWA, K., T. YOSHIOKA AND Y. KATSUKI (1974) Effects of metallic ions on the lateral-line organs of bullfrog tadpoles. *Proc. Jap. Acad.* 50: 658-663.
- NOMURA, H. AND M. ISHIZAKI (1972) Stimulation mechanism of water response in the frog: roles of anion in the activity of a chemoreceptor. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 13: 21-52.
- ONODA, N. AND Y. KATSUKI (1972) Chemo-

- reception of the lateral-line organ of an aquatic amphibian, *Xenopus laevis*. *Jap. J. Physiol.* 22: 87-102.
- ONODA, N., T. HASHIMOTO AND Y. KATSUKI (1970) Chemoreception of the lateral-line organ of *Xenopus laevis*. *Proc. Jap. Acad.* 46: 873-877.
- SIEGEL, S. (1956) *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, pp. 229-239.
- YAMASHITA, S. (1963) Stimulating effectiveness of cations and anions on chemoreceptor in the frog tongue. *Jap. J. Physiol.* 13: 54-63.
- 柳沢慧二 (1975) 側線器の化学受容. 生体の科学 26: 117-126.
- 柳沢慧二, 小野田法彦, 勝木保次 (1972) オタマジャクシ側線器の化学受容. 日本生理学雑誌 34: 607.
- YANAGISAWA, K., V. TAGLIETTI AND Y. KATSUKI (1974) Response to chemical stimuli in the hair cell of the lateral-line organ of mud-puppy. *Proc. Jap. Acad.* 50: 526-531.