

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592143

研究課題名 (和文)

唾液分泌神経に対する前脳および脳幹からのグルタミン酸作働性興奮性入力に関する研究

研究課題名 (英文)

Study on the glutamatergic inputs from the forebrain and brainstem to the neurons innervating submandibular salivary glands

研究代表者

美藤 純弘 (MITOU YOSHIHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20240872

研究成果の概要：

麻酔下ラット唾液分泌神経（上唾液核）にグルタミン酸バイオセンサーを挿入し、味覚や機械刺激に対する応答を分析した。正常および切断除脳を行ったラットのパッチクランプ実験で、上唾液核は口腔感覚情報を中継している下位脳幹からのグルタミン酸入力の他に、前脳からもグルタミン酸入力を受けていることが示唆された。自由行動下のラットで摂食中、摂食中枢にグルタミン酸入力をブロックする薬物を投与すると唾液分泌は減少した。よって、摂食中の唾液分泌には、下位脳幹からの興奮性入力以外に摂食中枢など前脳からの興奮性入力が必要であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔生理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード： 1. 口腔生理学 2. 上唾液核ニューロン 3. グルタミン酸作働性 4. ホールセルパッチクランプ法 5. グルタミン酸バイオセンサー 6. 脳幹 7. 前脳 8. 除脳

1. 研究開始当初の背景

これまで、唾液分泌は咀嚼に伴って発生する口腔感覚により唾液が分泌されるという、下位脳幹部を介した「咀嚼-唾液反射」の概念を中心に幾多の研究がなされてきた。しかし、近年この概念では説明できない現象をいくつも発見するに至った。例えばその発見の一例を示すと、ラットに固形食を与えたときと歯

ぎしりをしている時の唾液分泌と咀嚼筋活動を分析した。咀嚼中の唾液分泌量は豊富である一方、歯ぎしり中の咬筋は咀嚼中と同様に活動しているにもかかわらずほとんど分泌が起こらなかった。これは単純に咬筋の活動量と唾液分泌量は比例しないということを意味する(小橋ら、平成17年第47回歯科基礎医学会)。

換言すれば、唾液分泌は運動に伴う歯根膜や口腔粘膜の感覚によって、二次的に分泌されないことを示唆している。

この結果から摂食中の唾液分泌には、味覚唾液反射や歯根膜唾液反射など下位脳幹（下位中枢）を介した口腔感覚の入力が寄与していることが考えられるが、その寄与は比較的低く、前脳（上位中枢）、特に摂食中枢など視床下部からの入力による制御が重要であると考えられる。そこで、前脳の役割をより詳細に検討するために本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

顎下唾液分泌の中核である上唾液核に対して、前脳からの入力には興奮性と抑制性があることが考えられるが、本研究では興奮性入力（グルタミン酸作働性）に焦点を絞り、以下のことを分析する。

(1) 上位および下位中枢から上唾液核にグルタミン酸作働性興奮性入力がどれくらいあるのかその様式を分析する。

(2) 視床下部外側野から上唾液核に対するグルタミン酸作働性興奮性入力があるかどうか分析する。

(3) 舌を味覚または機械刺激したときの上唾液核におけるグルタミン酸作働性興奮性入力を分析する。

3. 研究の方法

(1) 上唾液核に対する上位および下位中枢からのグルタミン酸入力様式分析に関する方法

前脳からグルタミン酸入力が存在するならば、切断除脳により上唾液核ニューロンに対するグルタミン酸入力量に変化する可能性がある。生後 6-13 日の Wistar 系のラットを使用した。蛍光色素を左側鼓索-舌神経に注入することにより、上唾液核ニューロンを

逆行性に標識した。更に一部の動物は左側脳の切断除脳を行った。色素注入 2 日後、スライス標本を作製し、標識ニューロンからホールセルパッチクランプ法により記録を行った。グルタミン酸灌流または記録ニューロンの近傍を電気刺激することにより誘発される電流の大きさを比較した。

(2) 上唾液核に対する視床下部外側野からのグルタミン酸入力の存在に関する分析の方法

Wistar系の成熟雄性ラット（体重290-310 g）をネンブタール麻酔下で、顎下腺カニューレと両側咀嚼筋筋電図用電極を装着した。また顎下腺カニューレ装着と同側の視床下部外側野（bregmaから-2.4 mm, 側方に1.7 mm, 深さは大脳表面から8.5 mm）に薬物投与用のカニューレを挿入した。回復後、摂食中に視床下部外側野に30 nM CPPおよび30 nM CNQX

（NMDAおよびnon-NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニスト）またはリンガー液を投与した時の唾液分泌量を比較した。

(3) 舌の味覚または機械刺激時の上唾液核におけるグルタミン酸濃度分析に関する方法

舌の味覚または機械刺激による感覚情報は下位脳幹を介して上唾液核に入力するならば、舌を味覚または機械刺激すると上唾液ニューロンのシナプスでグルタミン酸濃度が上昇すると考えられる。これを確かめるために、グルタミン酸を特異的に検出するグルタミン酸バイオセンサー（センサー部長さ 1 mm、太さ 180 μ m、Pinnacle 社）を上唾液核に挿入し、グルタミン酸濃度を電流として検出した。

実験毎に、グルタミン酸バイオセンサーを交換し、検量線を作製した。また、大量のアスコルビン酸を添加しても検量線の傾きに変化がないことを観察し、グルタミン酸を特異的に測定していることを確認した。グルタミン酸濃度と測定電流の関係は、次の式で表

された (n=6)。

$$y = 1.3x \quad (\text{相関係数 } 0.993)$$

y : グルタミン酸濃度 (μM)

x : 測定電流 (nA)

この式を用いてグルタミン酸を定量した。

Wistar 系雄性ラットをウレタン麻酔下で、グルタミン酸バイオセンサーを上唾液核に挿入した (bregma から -10.6 mm, 側方に 2 mm, 深さは小脳表面から 7.3 mm)。舌前方部を NaCl (0.5M)、HCl (0.01M)、塩酸キニーネ (0.01M)、シュクロース (1M) 溶液またはピンチで刺激した。

4. 研究成果

(1) 上唾液核ニューロンに対するグルタミン酸入力の様式

正常ラットでは、多くの上唾液核ニューロン (図 1 および図 2 の a, n=7/9) がグルタミン酸灌流に反応したが、少数のニューロンはグルタミン酸に反応しなかった (図 1 および図 2 の b, n=2/7)。除脳を行ったラットの上唾液核ニューロンは、正常ラットの反応と比較してグルタミン酸誘発性電流の大きさは変化しないもの (図 1 および図 2 の d, n=7/22)、増大するもの (図 1 および図 2 の c, n=11/22) と反応しないもの (図 1 および図 2 の e, n=4/22) が観察された。反応が増大

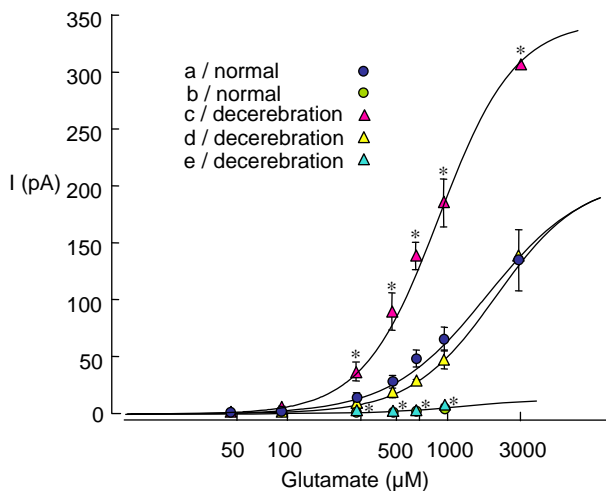


図 1 グルタミン酸灌流に対する上唾液核ニューロンの反応

する細胞は、除脳により上位脳からの下行性

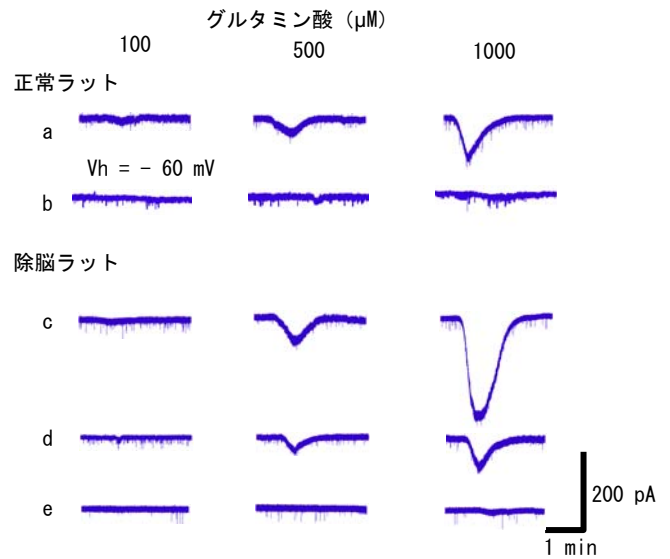


図 2 グルタミン酸灌流により上唾液核ニューロンから記録された波形の例

神経の変性が起こり、神経伝達物質の放出が減少した為、シナプス後膜の感度が上昇していることが考えられる (図 3 の A)。反応が変化しない細胞は、主に下位脳からの入力を受けていることが示唆された (図 3 の C)。電気刺激実験で、興奮性シナプス後電流 (EPSCs) の大きさは、変化しないもの (n=7/22)、増大するもの (n=8/22)、と反応がないもの (n=6/22) が観察された。反応がない細胞 (n=2/6) はさらにグルタミン酸灌流で増大した電流が観察された。このタイプの細胞は主に上位脳から興奮性入力を受けているものと考えられる (図 3 の B)。電気刺激およびグルタミン酸灌流刺激ともに反応がない細胞 (n=4/6) は、GABA およびグリシン灌流刺激に対して増大した反応を示した。このタイプの細胞は、ほとんど興奮性入力はなく、主に抑制性入力のみを受けていることが示唆された。

以上のことから、

(2) 摂食中に視床下部外側野にグルタミン酸受容体のアンタゴニスト投与したときの唾液分泌

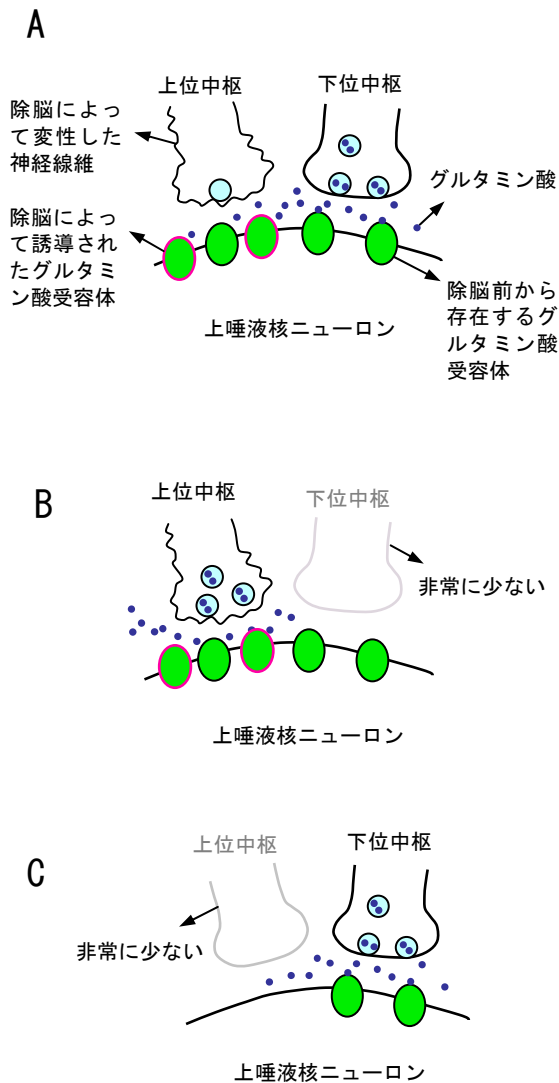


図3 上唾液核ニューロンと連絡する上位および下位中枢の神経のパターン

グルタミン酸受容体アンタゴニスト (n=3) を投与したときの唾液分泌は $18.2 \pm 4.6 \mu\text{l}$ で、コントロール (リンガー液投与) の $80.8 \pm 9.0 \mu\text{l}$ (n=3) と比較して減少する傾向にあった。この結果から、摂食行動を引き起こすに当たり、視床下部外側野ニューロンはより上位中枢の神経核からグルタミン酸入力を受けることによって興奮し、興奮性シグナルの一部を上唾液核ニューロンに送っているものと思われる。

以上の結果から、摂食中の唾液分泌に視床下部外側野は大きな役割を果たしているものと思われる。

(3) 舌の味覚または機械刺激時の上唾液核におけるグルタミン酸濃度

上唾液核にセンサー挿入後、電流が安定するまで2時間30分から3時間30分を要した。その後、舌は未刺激状態でも電流が測定された。グルタミン酸濃度に換算すると $2.6\text{--}5.2 \mu\text{M}$ であった。このことは安静時でもグルタミン酸が放出されていることを意味する。このグルタミン酸は安静時唾液に関係しているのかもしれない。味覚またはピンチ刺激は、このグルタミン酸濃度がバックグラウンドにある状態で行った。味覚刺激に用いた種々溶液の濃度は、ウレタン麻酔下のラットの鼓索神経から応答が十分に観察される濃度を使用した。しかし、味覚刺激したときの上唾液核における十分な応答は観察されなかった。ピンチ刺激したときは $8 \pm 3 \mu\text{M}$ (n=6) の応答が得られた。

味覚刺激したときに応答が得られなかったことに関しては、本当に応答が得られないのかどうか今後、刺激濃度や麻酔薬を変えてみる必要がある。しかし、ピンチ刺激の応答が得られたことから、上唾液核に下位脳幹を介するグルタミン酸入力が存在することが示唆された。

(4) 総括

本研究で明らかになったことを下記に記す。

1. ラット上唾液核ニューロンが受けているグルタミン酸作働性興奮入力、下位脳幹に由来するものばかりでなく、視床下部外側野など前脳に由来するものも含まれることが示唆された。
2. この視床下部外側野からのグルタミン酸作働性入力は、摂食中の唾液分泌に重要な枠割りを果たしていると考えられる。この点に関する報告は国内外共に無い。
3. 舌の味覚または機械刺激によるグルタミン

酸作働性入力为上唾液核ニューロンに存在するという報告も国内外共にない。

今後は例数を獲得することや実験条件を検討することにより、これらの事実の確実性を高めたい。また、上唾液核ニューロンに入力するグルタミン酸作働性神経の起源を解剖学的に明らかにする研究や、グルタミン酸分泌を調節機構に関する研究などに展開したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Kobashi M, Yanagihara M, Fujita M, Mitoh Y, Matsuo R. (2009) Fourth ventricular administration of ghrelin induces relaxation of the proximal stomach in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, R217-R223. 査読有.

② Mitoh Y, Funahashi M, Fujii A, Fujita M, Kobashi M, Matsuo R. (2008) Development of inhibitory synaptic transmission to the superior salivatory nucleus in rats. *Brain Res*, 1191, 47-54. 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

①松島あゆみ、ラット上唾液核に投射する抑制性ニューロンの分布、第 50 回歯科基礎医学会、2008 年 9 月 23 日、東京都品川区

②植田紘貴、セビメリンはラット上唾液核ニューロンの興奮性を促進する、第 50 回歯科基礎医学会、2008 年 9 月 23 日、東京都品川区

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美藤 純弘 (MITOU YOSHIHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20240872

(2) 研究分担者

松尾 龍二 (MATUO RYUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30157268

小橋 基 (KOBASHI MOTOI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80161967

(3) 連携研究者

なし