

平成21年5月8日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890133  
 研究課題名（和文） 唾液分泌に対する前脳および脳幹からの抑制性制御機構に関する研究  
 研究課題名（英文） Electrophysiological and immunohistological study of the inhibitory inputs from the forebrain and brainstem to the superior salivatory nucleus in rats  
 研究代表者  
 藤井 昭仁（FUJII AKIHITO）  
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
 研究者番号：10452583

## 研究成果の概要：

唾液は脳幹（下位中枢）を介し反射性に分泌されるだけでなく、前脳（上位中枢）からの入力によっても制御されている。しかし、その制御機構は基礎および臨床研究においても、未だ具体的に明らかにされていない。本研究課題では、免疫組織学および電気生理学的手法を用い、唾液分泌に対する上位および下位中枢からの抑制性制御機構について調べた。

その結果、全ての上唾液核細胞は上位中枢から抑制性入力を受けていることが明らかとなった。このことから、唾液分泌は興奮性入力のみならず、上位中枢からの下行性抑制性入力によっても調節されてい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	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,500
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：唾液分泌、上唾液核、抑制性入力、前脳、脳幹、パッチクランプ、電気生理学、免疫組織学

## 1. 研究開始当初の背景

唾液分泌は味覚や機械刺激など反射により生じ、その神経回路は脳幹（下位中枢）に存在することが良く知られていた。逆行性色素やウィルスを用いた実験から、視床

下部外側野や孤束核など、自律神経機能全般に関与する神経核から上唾液核に入力が存在することが示唆されていた。また唾液の研究の多くは、分泌を興奮現象として着目するものであった。

しかし我々の研究グループは、上唾液核の神経活動がグルタミン酸作動性の興奮性入力のみならず、GABA およびグリシン作動性の抑制性入力によっても調節されていることを明らかにした。また、上唾液核に対する前脳（上位中枢）および下位中枢からの入力系を検索するため、片側切断除脳術と電気生理学手法を併用した新たな手法を開発し、国際学会および国際誌にて報告していた。片側切断除脳術は技術的に困難であり、国内外を含め、本研究グループ以外では行われていなかった。そこで我々は、上唾液核への抑制性入力の起源や神経回路を、免疫組織学および電気生理学的に解析し、唾液分泌に対する上位および下位中枢からの抑制性制御機構を、明らかにすることを着想するに至った。唾液の研究において、分泌を抑制機構として着目した研究は、未だ国内外を問わず皆無である。

## 2. 研究の目的

唾液分泌量の低下が、ドライマウスやう蝕など、多くの歯科疾患の原因となることは良く知られている。

唾液分泌は、下位中枢を介した反射により誘発されるだけでなく、上位中枢からの興奮性および抑制性入力により制御されることが示唆されている。しかし、その制御機構は基礎研究および臨床研究においても、具体的に明らかにされていない。そこで本研究課題では、免疫組織学および電気生理学的手法を用い、唾液分泌に対する上位および下位中枢からの抑制性制御機構を明らかにすることを目的とした。本研究により得られる新知見は、唾液分泌研究および歯科臨床における画期的な進歩に寄与するものと考えられた。

## 3. 研究の方法

(1) 生後 10 週齢の Wistar 系ラットを使用した。上唾液核ニューロンにシナプス結合するニューロンを逆行性に標識する為に、脳定位固定装置およびマイクロマニピレーター、マイクロインジェクターを用い、極細ガラスピペット付きマイクロシリッジにより、左側上唾液核に蛍光色素（2 % Fluorogold）を注入した。注入 2 日後、灌流固定を行い、厚さ約  $8 \mu\text{m}$  の連続凍結切片を作製し、Fluorogold で標識されたニューロンを観察した。また、GABA 合成酵素である glutamic acid decarboxylase (GAD) を、マウス抗ラット GAD 抗体を用い免疫染色することにより、GABA 作動性の細胞体の分布を観察した。

(2) 生後 9-14 日齢の Wistar 系ラットを使用した。鼓索-舌神経に蛍光色素を注入し、顎下・舌下腺を支配している上唾液核を逆行性に蛍光標識した。一部ラットでは色素注入と同時に、上位中枢から上唾液核への下行性入力を遮断するため、注入側と同側の脳幹部（四丘体前端部）の切断除脳を行った。除脳 2-3 日後、厚さ約  $200 \mu\text{m}$  の矢状および冠状断新鮮脳スライス標本作製し、ホールセルパッチクランプ法（電圧固定下）により以下の方法で記録を行った。正常動物でも、同様の記録を行い比較・検討を行った。

### ①GABA およびグリシンの灌流

上位中枢から上唾液核への抑制性入力を調べるため、テトロドトキシン存在下で、記録用チャンバーに様々な濃度の GABA およびグリシンを灌流し、誘発される抑制性シナプス電流を記録する。正常動物と除能動物で比較・検討する。

## ②ガラス微小電極による電気刺激

上唾液核への入力様式を調べるため、記録上唾液核細胞周囲をガラス微小刺激電極で刺激し、誘発される抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録した。得られた結果から、上唾液核への上位および下位中枢への抑制性シナプス入力について検討した。

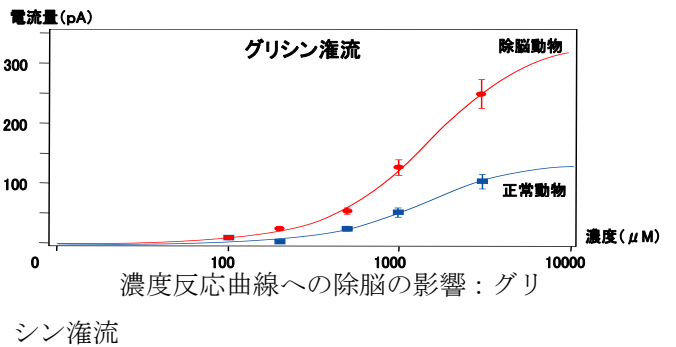
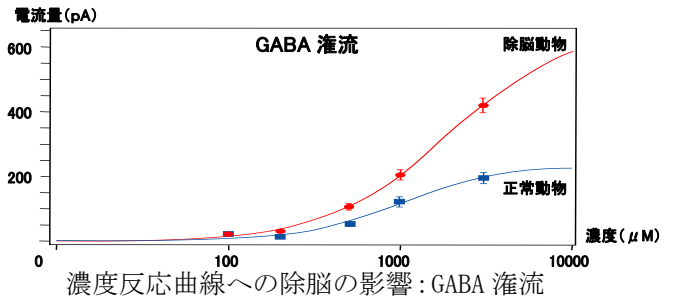
## 4. 研究成果

(1) 免疫組織学的手法を用いた、上唾液核への抑制性入力の解析：

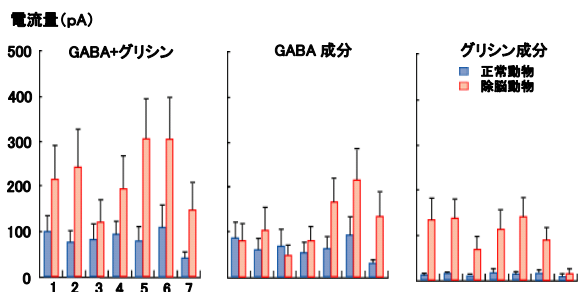
Fluorogold で標識されたニューロンは、上位中枢では、島皮質、分界状床核、視床下部外側野、扁桃体中心核に分布していた。下位中枢では、三叉神経感覚核、孤束核、網様体で観察された。GAD 陽性ニューロンは、これら全ての神経核で観察された。以上の結果から、全ての上唾液核ニューロンは、上位および下位中枢のニューロンから抑制性の調節を受けていることが示唆された。

(2) 電気生理学的手法を用いた、上唾液核への抑制性入力の解析において：

GABA およびグリシンの灌流により、除脳動物では誘発電流が大きくなっていた。このことから上位中枢からの入力が存在することが示唆された。



上唾液核周囲の電気刺激により、除脳動物の 17% (n=7/41) では上位中枢からのみ、抑制性入力を受けていることが示唆された。83% (n=34/41) では上位および下位中枢から抑制性入力を受けていることが示唆された。



刺激部位 (1,2,3:背側刺激、5,6,7:腹側刺激)  
電気刺激により誘発された抑制性シナプス後電流と刺激部位との関係

以上から全ての上唾液核細胞は上位中枢から抑制性入力を受けていることが明らかとなり、唾液分泌は興奮性入力のみならず上位中枢からの下行性抑制性入力によっても調節されていることが示唆された。

唾液の研究において、分泌を抑制機序として着目した研究は、国内外を問わず皆無

である。本研究により得られた成果は、今後随時発表を予定しており、唾液分泌研究および歯科臨床における画期的な進歩に寄与するものと思われる。

#### 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1件)

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

[学会発表] (計2件)

①植田紘貴、藤井昭仁、美藤純弘、児玉直紀、小橋基、山城隆、松尾龍二、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25日、東京

② Matsushima A, Ichikawa H, Fujita M, Fujii A, Mitoh Y, Kobashi M, Matsuo R., Distribution of GABAergic neurons projecting to the superior salivatory nucleus in rats, The 85th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2008/3/26, Tokyo.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤井 昭仁 (FUJII AKIHITO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：10452583

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

松島あゆみ (MATSUSHIMA AYUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

植田紘貴 (UEDA HIROTAKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生