

機関番号 : 32622
研究種目 : 若手研究 (B)
研究期間 : 2009~2010
課題番号 : 21791814
研究課題名 (和文) 新生マウス脳幹脊髄摘出標本を用いた吸啜運動に関与するプレモーターニューロンの解析
研究課題名 (英文) Analysis of the pre-motorneurons in the suckling rhythm generating network using a neonatal mouse brainstem-spinal cord preparation.
研究代表者 中山 希世美 (NAKAYAMA KIYOMI)
昭和大大学・歯学部・助教
研究者番号 : 00433798

研究成果の概要 (和文) :

生後一定期間の哺乳類では、吸啜運動によって母乳を摂取することで生体エネルギーの確保を行っている。吸啜運動は、口唇や口腔内粘膜への機会刺激によって誘発されるリズム運動で、このリズムの形成には脳幹内に存在する神経回路網が重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細については明らかにされていない。本研究では、新生マウスの脳幹-脊髄摘出標本を用いて吸啜リズムを形成する神経回路に含まれる介在ニューロンについての解析を行った。

研究成果の概要 (英文) :

Suckling movements play an important role to acquire the energy for living in the mammals during postnatal period. The suckling movements are rhythmic movement evoked by tactile stimulation of the lip or the oral mucosa. It is known that the suckling rhythm is generated in neuronal networks in the brainstem, but kinds of interneurons involved in the neuronal networks are unclear. In the present study, we analyzed interneurons involved in the suckling rhythm generator using an isolated brainstem preparation from neonatal mice.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 歯学・機能系基礎歯科学

キーワード: 吸啜、神経回路、リズム形成、マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 摂食時の顎の最も基本的な運動は、閉口筋と開口筋のリズミックな交代性収縮から成り立っている。このようなリズミックな顎運動は、出生直後から吸啜運動の形で現れる。吸啜運動は除脳動物において口唇を刺激することによって誘発することが可能であることから、吸啜リズムを形成する神経回路網が脳幹内に存在すると考えられていたが、関与する介在ニューロンや神経伝達物質を含めた詳細は明らかにされていなかった。また、吸啜運動に障害のある遺伝子改変マウスの例も報告もされていたが、そのメカニズムは明らかにされていなかった。その主な理由として、吸啜運動は幼弱動物でのみ見られる運動であり、幼弱動物での *in vivo* の電気生理学的実験が、技術的に非常に難しいということが挙げられていた。

(2) 中枢神経系の摘出標本は、幼若動物において歩行運動や呼吸運動などのリズミックな運動を司る神経回路網を解析する際に有用な手法である。

脳幹摘出標本からの顎運動様の活動は、幼若ラットにおいて、NMA (NMDA 受容体作動薬) と bicuculline (GABA_A 受容体拮抗薬) の同時投与により、三叉神経運動根から記録されていた。(Tanaka 他 3 名, Localization of oral-motor rhythmogenic circuits in the isolated rat brainstem preparation. *Brain Res.* (1999) 821(1): 190-199)。しかしながら、そのリズムは、標本を下丘から顔面神経核の吻側までという非常に限られた小さいものにし、かつ bicuculline により抑制性の入力を遮断しなければ誘発できなかった。また、薬剤を繰り返し投与することにより応答が弱まってしまい、長時間安定したリズムを繰り返し誘発することは難しかった。

我々は、最近、脳幹摘出標本において、三叉神経感覚根を電気刺激することによって、リズミックな顎運動を誘発することに成功した。この方法を用いることにより、リズムの繰り返し誘発が可能になり、リズム形成回路網に含まれる介在ニューロンの解析が可能となった。

2. 研究の目的

(1) 脳幹-脊髄摘出標本は、呼吸や血圧などの管理を行わなくてよいことから、幼弱動物の電気生理学的実験を行うために最適の標本である。中枢神経系を生体から分離して人工脳脊髄液中で生かしておくため、灌流液に神経伝達物質や受容体の拮抗薬を加えること

で、比較的容易に関係する神経伝達物質を調べることができる。本研究では、脳幹-脊髄摘出標本を用いて、三叉神経感覚根を電気刺激することによって誘発されたリズムについて解析を行った。とくに、リズム形成の神経回路網を形成する介在ニューロンが存在する部位を、標本の切断実験を行うことで明らかにした他、灌流液中への薬剤投与を行うことで、介在ニューロンネットワークに含まれる神経伝達物質を明らかにした。

(2) 吸啜リズムの発生中には、左右の顎が同期して動いている。この際に、顎を動かす筋を支配する左右の運動ニューロンが、同期して活動していることが示唆される。また、左右の運動ニューロンの活動を同期させるための神経回路が脳幹内に存在すると考えられるが、その詳細は明らかでない。そこで、本研究では、脳幹-脊髄摘出標本に NMDA を灌流投与することによって三叉神経運動根に誘発したリズム活動をもちいて、左右のリズムを同期させる介在ニューロンについて調べた。

3. 研究の方法

実験には生後0-2日齢のICRマウスを用いた。ジエチルエーテルで深麻酔後断頭し、酸素を飽和させた氷冷人工脳脊髄液中で中脳下丘から第7頸髄までを摘出した。摘出した標本は、記録用チャンバーに移し、酸素を飽和させた室温(25-27°C)の人工脳脊髄液を灌流した。吸啜運動の誘発には、2つの方法を用いた。1つは、三叉神経感覚根の電気刺激による誘発法であり、もう1つは、灌流液中へのNMDAの投与による方法である。記録には、閉口筋・開口筋を支配する運動ニューロンの軸索が通る三叉神経運動根を用いた。一部の実験では、舌の運動の指標として、舌下神経からの記録を同時に行った。詳しい実験方法を以下に述べる。

(1) 三叉神経感覚根の電気刺激により誘発したリズムを形成する神経回路網の局在、および、関与する神経伝達物質の解析。

脳幹摘出標本の三叉神経を運動根と感覚根に注意深く分け、片側感覚根と両側運動根をそれぞれガラス管吸引電極で吸引した。片側感覚根に、吸引電極を介して持続時間200 μ sec, 10 Hz, 100回の連続刺激を与え、運動根から複合活動電位を記録した。

刺激によりリズミックな神経発射が見られた標本において、標本の矢状方向もしくは横断面方向への切断を行い、リズム形成に必要な部位の同定を行った。

また、関与する神経伝達物質について調べるため、NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬であるAPV、non-NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬であるCNQX、GABA_A受容体拮抗薬であるSR95531、グリシン受容体拮抗薬であるストリキニーネをそれぞれ投与し、リズム形成への影響を調べた。さらに、同じ標本においてリズム形成回路以外の神経回路へのこれらの拮抗薬の作用を調べるため、感覚根を1回刺激して運動根に誘発された反射性の応答についても薬剤の効果調べた。

(2) NMDAの灌流投与により誘発された左右のリズムの関連性の解析

脳幹摘出標本の三叉神経を運動根と感覚根に注意深く分け、両側の運動根をそれぞれガラス管吸引電極で吸引した。同時に、舌下神経もガラス管吸引電極で吸引した。NMDAを灌流液に溶解し、標本に投与することで出現するリズムについて解析した。

4. 研究成果

(1) 片側の三叉神経感覚根に、持続時間200 μsec, 10 Hz, 100回の電気刺激を与えたところ、刺激終了の数十秒後から、両側の三叉神経運動根にリズムミクな神経発射が観察された。標本を矢状方向に正中部分で完全に切断し、左右を分離させた標本においても、三叉神経感覚根の電気刺激によるリズムミクな神経発射は観察された。一方で、延髄の部分だけ正中部分を左右分離すると、刺激側では、左右分離後もリズムが見られたが、刺激の反対側ではリズムは見られなかった。これらの結果から、左右の脳幹のそれぞれにリズムを形成する神経回路網が存在すること、および、片側のリズム形成回路網から反対側の三叉神経運動ニューロンへの入力、延髄を通る交叉性ニューロンを介していることが示唆された。

(2) (1)と同様の電気刺激誘発リズムにおいて、

(3) 電気刺激により誘発されたリズムミクな神経発射は、灌流液中にNMDA型グルタミン酸受容体の拮抗薬であるAPV(20 μM)を加えることにより完全に消失した。一方、三叉神経感覚根の1回刺激により誘発された反射性応答は、APVの投与により消失しなかった。Non-NMDA型グルタミン酸受容体の拮抗薬であるCNQX(20 μM)の投与では、リズムミクな神経発射と反射性応答のどちらも完全に消失した。また、GABA_A受容体の拮抗薬であるSR95531(1 μM)の投与では、神経発射の数が188%まで増加した。一方、グ

リシン受容体の拮抗薬であるストリキニーネ(1 μM)の投与は、神経発射に有意な変化を与えなかった。以上の結果から、吸嚙リズムの神経回路網には、NMDA受容体を介する興奮性の介在ニューロンとGABA_A受容体を介する抑制性の介在ニューロンが含まれていることが示唆された。

(4) NMDAを投与したことにより誘発された神経活動を三叉神経運動根および舌下神経から記録したところ、三叉神経運動根からは、二種類のリズムミクなバースト発射が記録された。一つは、低周波数のリズムであり、左右の三叉神経で同期して活動がみられた。この低周波数のリズムは、舌下神経の活動とも同期していた。もう一つは、高周波数のリズムで、左右の三叉神経の活動は、独立していた。この高周波数のリズムに対応する活動は、舌下神経には見られなかった。脳幹-脊髄摘出標本を正中部分で完全に切断し、左右片側の標本を作製した。この場合に、三叉神経運動根では、高周波数のリズムのみが記録され、低周波数のリズムは消失した。また、脳幹-脊髄摘出標本の延髄部分のみ左右に分離した標本でも、完全に左右分離した標本と同様に、高周波数のリズムのみが観察された。この際、舌下神経では、低周波数のリズムが観察されていた。延髄の尾側部分のみを左右分離した場合には、三叉神経運動根で、低周波数と高周波数の両方のリズムが観察され、左右切断していない完全な標本で見られるリズムと同じであった。これらの結果から、低周波数のNMDA誘発リズムのリズム形成回路網から、三叉神経運動ニューロンへの入力には、延髄吻側を通る交叉性の介在ニューロンが関与していることが示唆された。

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 Matsuo E, Mochizuki A, Nakayama K, Nakamura S, Yamamoto T, Shioda S, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Inoue T. Decreased intake of sucrose solutions in orexin knockout mice. *J. Mol. Neurosci.* 査読有 (2011) 43: 217-224.
- ② Gamba-Nishimura A, Inoue T, Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Shintani S, Yoshimura S. Properties of synaptic transmission from the reticular formation dorsal to the facial nucleus to trigeminal

motoneurons during early postnatal development in rats. Neuroscience 査読有(2010) 166: 1008-1022.

developing rats. Society for Neuroscience 39th annual meeting, 2009/10/17, Chicago

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① Nakayama K, Ihara Y, Inoue T. Rhythmic motor activity evoked by electrical stimulation of the trigeminal nerve sensory root in neonatal mice. 第 88 回日本生理学会 第 116 回日本解剖学会 総会・全国学術集会 合同大会、会場での開催中止により誌上開催
- ② Ihara Y, Nakayama K, Inoue T. Left and right coordination of NMDA-induced rhythmic activities in the trigeminal nerves of neonatal mice in vitro. 第 88 回日本生理学会 第 116 回日本解剖学会 総会・全国学術集会 合同大会、会場での開催中止により誌上開催
- ③ Nakayama K, Ihara Y, Inoue T. Neuronal mechanisms generating electrical stimulation-evoked rhythmic burst activity in the trigeminal nerve of neonatal mice. Society for Neuroscience 40th annual meeting, 2011/11/13-17, San Diego
- ④ 中山希世美、望月文子、西村晶子、井上富雄、新生マウス脳幹摘出標本におけるリズムな顎運動の誘発、日本顎口腔機能学会 第 45 回学術大会、2010/11/6-7、埼玉
- ⑤ 中山希世美、伊原良明、井上富雄、新生マウス脳幹摘出標本における三叉神経刺激誘発リズムに関する神経伝達物質、第 33 回 日本神経科学大会、2010/9/2-4、神戸
- ⑥ 中山希世美、望月文子、井上富雄、三叉神経中脳路核ニューロンにおけるオレキシンの作用、第 7 回 GPCR 研究会、2010/5/11-12、東京
- ⑦ 中山希世美、伊原良明、井上富雄、新生マウス脳幹摘出標本における三叉神経刺激による顎運動の誘発、第 32 回 日本神経科学大会、2009/9/16-18、名古屋
- ⑧ 中山希世美、伊原良明、井上富雄、新生マウス脳幹摘出標本において三叉神経の電気刺激により誘発される顎運動、第 51 回 歯科基礎医学会学術大会、2009/9/10-11、新潟
- ⑨ 井上富雄、望月文子、中山希世美、オレキシンの三叉神経中脳路核ニューロン活動に対する影響、第 51 回 歯科基礎医学会学術大会、2009/9/10-11、新潟
- ⑩ Inoue T, Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, Shioda S. Effects of orexin on activities of mesencephalic trigeminal sensory neurons in

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 希世美 (NAKAYAMA KIYOMI)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：00433798