

機関番号：33504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800069

研究課題名（和文） 外肛門括約筋の運動ニューロンから興奮性の入力を受けるレンショウ細胞に関する研究

研究課題名（英文） The interneuron activating by recurrent collateral of pudendal motoneurons

研究代表者

村松 憲 (MURAMATSU KEN)

健康科学大学・健康科学部・講師

研究者番号：00531485

研究成果の概要（和文）：本研究は陰部神経運動ニューロンの軸索側枝から興奮性のシナプス入力を受けて発火する介在ニューロンが存在することを初めて報告するものである。これらの介在ニューロンはレンショウ細胞と異なり、運動ニューロンに抑制性のシナプス結合を形成しなかった。したがって、これらの介在ニューロンはレンショウ細胞とは異なる機能を持っていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This is the first demonstration that there are interneurons activating by recurrent collateral of pudendal motoneurons. Differenced from Renshaw cells, these interneurons didn't make synapses with motoneurons. Hence, there is a possibility that these interneurons have different functions from Renshaw cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010 年度	840,000	252,000	1,092,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,880,000	564,000	2,444,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：神経科学、運動ニューロン、陰部神経、外肛門括約筋、反回抑制

1. 研究開始当初の背景

排便に関与する筋群の中で肛門管の尾側に位置する外肛門括約筋は、内肛門括約筋と共に持続的な収縮をして蓄便を行う。特に外肛門括約筋は肛門管に存在する筋群の中で唯一の随意運動が可能な横紋筋であるために便失禁などのリハビリテーションには極めて重要な筋と言える。しかしながら、外肛門括約筋を制御する神経回路には伸張反射弓が欠如するなど、上下肢のそれとは様々な点で異なることが明らかにされ、上下肢を対象としたリハビリテーション手法を単純に適用することはできない。排泄障害のリハビリ

テーションを確立するためにも外肛門括約筋を制御する神経回路の特異性を明らかにすることは極めて重要である。

今回、私たちは外肛門括約筋を支配する運動ニューロン（以下、陰部神経運動ニューロン、PMNs）の軸索側枝の機能に注目し、研究を行った。一般的に上下肢を支配する運動ニューロンは軸索側枝を出し、大部分はレンショウ細胞という抑制性の介在ニューロンに興奮性のシナプスを形成する。レンショウ細胞は自身を興奮させる運動ニューロンプールに抑制性のシナプスを形成する（反回抑制）。また、一部の軸索側枝は同じニューロ

ンプルの運動ニューロン自身に接続する。

一方、PMNs は下肢を支配する運動ニューロンと同様に軸索側枝を出し、他の陰部神経運動ニューロンにシナプスを形成するが、陰部神経運動ニューロンからは反回抑制が観察されないために下肢と異なり PMNs の軸索側枝はレンショウ細胞などの介在ニューロンには接続しないと考えられてきた。しかし、PMNs の軸索側枝の標的細胞を電気生理学的に調べた研究はなく、検討の余地が残っていた。

2. 研究の目的

本研究は以下の2点について明らかにすることを目的に行った。

1. 細胞外記録法を用いて PMNs の軸索側枝から興奮性シナプス入力を受けて発火する介在ニューロンの存在について調べる。
2. PMNs から細胞内記録を行い、反回抑制による IPSP が観察されるか調べ PMNs の軸索側枝から興奮性シナプス入力を受けて発火するレンショウ細胞の存在について調べる。

3. 研究の方法

本研究は茨城県立医療大学動物実験委員会にて承認を受けて行った。実験には体重

2.5-3.2kg の成ネコ 12 頭を用いた。動物はペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与 (35-40mg) にて麻酔導入し、実験中は静注により麻酔の維持を行った。気管切開を行い、ミオブロックを静注して、人工呼吸で維持した。薬剤投与のためのカテーテルは腕頭動脈に留置し、大腿動脈に留置したカテーテルから血圧を計測して、最高血圧が 100mmHg 以上になるよう維持した。また、尿道にカテーテルを挿入して導尿を行った。動物の直腸より体温を計測し、温熱シートを用いて体温が 37°C になるように維持した。

背部を正中切開し、第2腰椎から第2仙椎までの椎弓切除を行い脊髄を露出させた上で流動パラフィンにて覆った。脊髄硬膜を開き、L6 から S3 までの後根を切断した。坐骨直腸窩より、陰部神経を同定して、電気刺激のカフ電極を装着した。

実験 1: 軸索側枝から興奮性シナプス入力を受ける介在ニューロンの活動電位の記録

実験には動物 5 頭を用いた。陰部神経を刺激しながら Fast Green で飽和させた 3MNaCl 水溶液を充填したガラス管微小電極を脊髄背面より刺入し、電気刺激によって順行性にスパイクが誘発される単一ニューロンのスパイクを細胞外記録した。スパイクが記録できたら陰部神経の刺激強度を徐々に強め、初めて運動ニューロンの逆行性フィールド電

位が記録できる刺激電圧を閾値とし、刺激強度は閾値の何倍かで表して、刺激強度とスパイク発射の変化を調べた。また、活動電位はデータレコーダー (PC208AX, SONY) に記録した後、PowerLab 8/30 (AD Instruments) を用いてコンピューターに取り込み解析を行った。

全ての記録が終了したら細胞外電位を記録した場所を同定するために神経細胞の活動電位が最も大きく記録できる部位で記録電極から 20 μ A の陰性直流電流を 15 分間流し、Fast Green を記録部位に沈着させた。実験終了後、深麻酔下で心臓より 10% フォルマリンで灌流固定し、L7 から S3 までの脊髄を取り出して、100 μ m の凍結連続切片を作成し、ニッスル染色を施した。

実験 2: EAS 運動ニューロンの細胞内記録

実験は動物 7 頭を対象に行った。脊髄の背側より 2MK-citrate 水溶液を充填したガラス管微小電極を刺入し、陰部神経の電気刺激によって逆行性に発火する PMNs から細胞内記録を行った。細胞に電極を刺入したら、陰部神経の刺激強度を記録を行っている神経細胞の閾値を僅かに下回る強度まで下げ、その際に記録される膜電位を 200 回以上加算した。

4. 研究成果

4-1. 軸索側枝から興奮性シナプス入力を受ける介在ニューロンの存在について

PMNs の軸索側枝から興奮性のシナプス入力を受ける単一介在ニューロン 14 個の活動電位を細胞外記録した。図 1 に示したスパイクは陰部神経本幹を刺激した際に S1 の前角から記録を行ったもので、介在ニューロンの典型的な発火の様子である。陰部神経の刺激強度が閾値付近であるときには活動電位の発火頻度も低く、その潜時 (運動ニューロンのフィールド電位の開始時点から介在ニューロンの活動電位が発生するまでの時間とする) はゆらいでいるが、刺激強度を上昇させると活動電位の発火頻度は活動電位の発生初期で 977 ± 94.2 Hz (平均値 \pm 標準偏差) まで上昇した。逆行性に発火する運動ニューロンのフィールド電位の立ち上がりから介在ニューロンのスパイクが観察されるまでの潜時は刺激強度の増加にともなって潜時が短くなり、ゆらぎが小さくなっていった。最短の潜時は 0.5ms であり、PMNs の軸索側枝と介在ニューロン間で生じるシナプス 1 個の遅延時間にほぼ相当すると考えられるため、軸索側枝は興奮性の単シナプス結合によって介在ニューロンを興奮させていると考えられた。介在ニューロンの記録部位は主としてオヌフ核の内側領域に分布し、Rexed の分類の第 VII 層の領域であった。オヌフ核の

核内には記録部位は存在しなかった (図 2)。

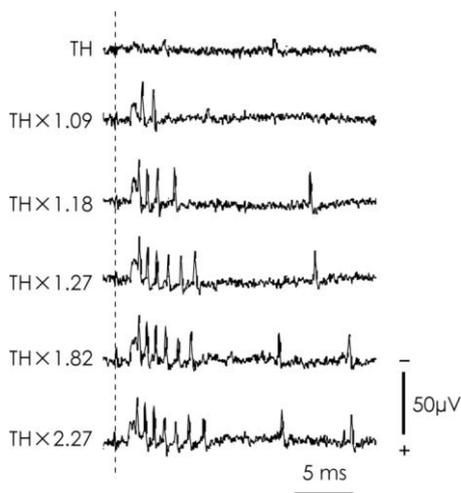


図 1. 介在ニューロンの典型的な発火様式

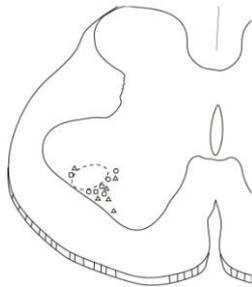


図 2. 介在ニューロンの解剖学的局在
 ○：陰部神経本幹刺激によって発火したニューロンの記録部位
 △：陰部神経肛門枝刺激によって発火したニューロンの記録部位
 □：陰茎背神経刺激によって発火したニューロンの位置
 点線：オヌフ核の範囲を示している

4-2. 陰部神経運動ニューロンの細胞内記録の結果について

14 個の PMNs の細胞内記録を行ったが、いずれのニューロンからも反回抑制による IPSP は観察されなかった (図 3)。



図 3. 細胞内記録の結果

4-3. まとめ

本研究は初め PMNs の軸索側枝から興奮性のシナプス入力を受ける介在ニューロンの存在を初めて報告するものである。現在までに

下肢の運動ニューロンの軸索側枝から興奮性シナプス入力を受ける介在ニューロンは運動ニューロンに反回抑制をかけるレンショウ細胞以外のもは知られていないため、我々が発見した介在ニューロンはレンショウ細胞であるという可能性がある。しかし、細胞内記録法を用いて 200 回以上膜電位を加算しても、PMNs からは反回抑制による IPSP が観察されなかった。従って、PMNs から興奮性のシナプス入力を受ける介在ニューロンはレンショウ細胞とは異なる機能的役割を持つ介在ニューロンである考えられる。これらの介在ニューロンの生理学的特性については今後の検討課題であると考えている。

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)

- ① 村松憲, 丹羽正利, 佐々木誠一、骨盤底筋運動ニューロンの軸索側枝から興奮性シナプス入力を受ける介在ニューロン、運動障害研究会誌、in press

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ken Muramatsu, Masatoshi Niwa, Kenji Sato, Sei-Ichi Sasaki, Properties of Renshaw cells excited by recurrent collaterals of pudental motoneurons in the cat, 第 32 回日本神経科学大会 2009.9 名古屋
 ② 村松憲, 丹羽正利, 佐々木誠一、骨盤底筋運動ニューロンの軸索側枝から興奮性シナプス入力を受ける介在ニューロン 第 41 回 運動障害研究会 2011.1 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村松 憲 (MURAMATSU KEN)
健康科学大学・健康科学部・講師
研究者番号：00531485

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：