

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350622

研究課題名(和文) 除皮質ラット灌流標本を用いた吸啜・咀嚼運動の生後発達変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of developmental changes in suckling and chewing using decerebrated and arterially perfused rat preparations.

研究代表者

中山 希世美 (NAKAYAMA, Kiyomi)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：00433798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：除脳灌流標本を用いて、咀嚼・吸啜のリズムを調べるための新たな実験モデルを開発することを目的に研究を行った。まず、標本の呼吸状態を観察したところ、正常呼吸状態とアシドーシス状態では舌根部や舌骨下筋群を支配する神経の活動パターンが異なっていることが示された。咀嚼、吸啜の誘発のために硬口蓋の電気刺激およびNMDA投与を行ったところ、咬筋神経、顎舌骨筋神経でリズム活動を誘発することが出来た。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we developed a new experimental model using decerebrated and arterially perfused rat preparations to investigate neuronal mechanisms generating suckling and chewing. We first observed respiratory conditions in the preparations. As a result, the activity of the upper airway muscles in hypercapnic acidosis differs from that under normocapnic conditions. We next tried induction of suckling and chewing rhythms by electrical stimulation of the hard palate or application of NMDA. The rhythmic activity was induced by electrical stimulation or NMDA application in the masseter nerve and the mylohyoid nerve alternatively.

研究分野：口腔生理学

キーワード：顎運動 舌運動 吸啜 咀嚼 呼吸 舌骨下筋群

1. 研究開始当初の背景

咀嚼、吸啜などの摂食運動のリズムは脳幹内の神経回路において作られることが知られている。この神経回路の局在についての研究には、これまで主に2種類の標本が用いられてきた。一つは、麻酔下のウサギやモルモットなどを用い、大脳皮質咀嚼野もしくは錐体路の電気刺激を行って咀嚼様リズムを誘発し、リズムの形成に必要な脳部位を調べるものである。また、もう一つは、胎生期や新生児期のラットやマウスから取り出した脳幹-脊髄摘出標本を用い、NMDAなどの薬剤投与によって誘発した吸啜様リズムに対して、リズムの誘発に必要な脳部位を調べるものである。哺乳類における摂食運動は、成長に伴って吸啜から咀嚼に変化していく。吸啜リズムから咀嚼リズムへの移行が神経レベルでどのように起こるのかは明らかになっていないが、リズムの神経回路を調べるための、これら2つの標本は、使用される動物種、リズム誘発の方法、麻酔の状態などで全く異なり、吸啜リズムと咀嚼リズムの比較をすることが難しい。

吸啜から咀嚼への移行が起こる神経機構を調べるためには、幼若動物と成熟動物で同じ標本を用いる必要がある。しかしながら、麻酔下での実験手法を、幼若動物に適用することは、麻酔や呼吸の管理の点で技術的に難しい。また、脳幹-脊髄摘出標本は、酸素化した人工脳脊髄液中に標本を置くことによって、標本への酸素供給を行っているため、実験動物の成長発達とともに、組織内部への酸素供給は阻害され、生後5日齢以降の動物への適用は難しい。このような実験技術による制約によって、咀嚼から吸啜への摂食リズムの移行がどのような神経メカニズムによって起こっているのかを調べることは、非常に困難であった。

2. 研究の目的

上記のような実験技術による制約を克服するため、本研究では、除脳灌流標本を用いて、咀嚼・吸啜のリズムを調べるための新たな実験モデルを開発することとした。この標本は、下行大動脈からポンプを使って人工脳脊髄液を送り込むことにより、既存の血管系を用いて、脳深部まで酸素を運搬するものである。標本作製後は、無麻酔となり、酸素は人工脳脊髄液により直接全身の細胞に送られるため、人工呼吸の管理も必要がない。また、呼吸の実験においては、生後6日～成体まで、様々な日齢、月齢のマウスおよびラットに適用されている。そこで、本研究では、吸啜から咀嚼への摂食リズムの移行メカニズムを調べるために、この除脳灌流標本を用いて、吸啜および咀嚼のリズムを誘発し、新たな実験モデルを作成することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

実験には、生後5日から35日齢のWistarラットを用いた。イソフルランの吸入による麻酔下にて、以下に示す外科的手術を行い、標本作製した。まず、剣状突起直上付近を基点とし胸壁の皮膚を剥離し、剣状突起から鎖骨レベルまで吻尾方向に切断することにより開胸した。抗凝固剤であるヘパリン(1ml, 10 IU)を心臓に注入し、横隔膜直下で腹部を切断して下半身を離断後、氷冷した人工脳脊髄液に標本を浸漬して仮死状態にした。呼吸と心拍の停止を確認した後に開頭し、上丘前縁レベルで除脳を行った。次いで全身の皮膚の除去、両側肺実質の除去を行い、記録用チャンバーに標本を仰臥位に固定した。下行大動脈の断端からダブルルーメンカテーテルを挿入し、チュービングポンプを用いて酸素化した人工脳脊髄液をカテーテルを介して送液した。標本が自発呼吸を開始するまでは、1分間に循環血液量の3～4倍の灌流液が流れるようにし、自発呼吸開始後は、循環血液量の5～6倍程度まで、徐々に灌流液量を増加させた。人工脳脊髄液の組成は、125 mM NaCl, 3 mM KCl, 24 mM NaHCO₃, 1.25 mM KH₂PO₄, 1.25 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM glucoseとした。灌流液は95% O₂, 5% CO₂混合ガスで曝気することにより、pHが7.4になるように調整した人工脳脊髄液に、膠質浸透圧調整剤(1.25% Ficoll 70)、抗凝固剤(10 IU ヘパリン)を加えたものを使用した。灌流経路の途中にヒートコントローラーを組み込み、灌流液の温度が31℃になるように加温した。カテーテルのサブルーメンには圧トランスデューサーを接続し、血圧を常にモニターした。灌流開始後、標本が自発呼吸を再開し、呼吸運動や手足の運動が起こって来たことを確認した後、筋弛緩剤(臭化ペクロニウム 2-4 g/l, 360 μl)を加え、標本を非動化した。呼吸のモニターとして横隔神経を、顎運動を記録するために顎舌骨筋神経と咬筋神経を、また、舌運動や上気道の活動を記録するために舌下神経、上喉頭神経、第一第二頸髄神経の喉頭筋支配枝、反回神経などを剖出し、吸引電極を用いて複合活動電位を記録した。

4. 研究成果

(1) 除脳灌流標本の状態評価のための呼吸運動記録と呼吸に伴う上気道支配神経の活動

除脳灌流標本を用いて吸啜、咀嚼の誘発を試みる前に、正常状態に近い状態で機能する標本作成するため、呼吸運動をモニターに状態評価を行った。作成した除脳ラット灌流標本の状態を評価するために、すでに多くの報告がある呼吸の報告と比較し、除脳ラット灌流標本に適切な状態で呼吸が誘発されているかについて、灌流液中の二酸化炭素(CO₂)濃度を上げた時の変化などを指標に評価を行った。

通常のCO₂濃度(5%)では、横隔神経の吸

息性活動とほぼ同期して、舌根部や舌骨下筋群を支配する舌下神経、上喉頭神経、第一第二頸髄神経の喉頭筋支配枝、反回神経で神経活動が記録された。

CO₂濃度を8%に上昇させると、灌流液のpHは7.2となり、標本はアシドーシス状態となる。この時、呼吸頻度は0.32 Hzから0.27 Hzに減少し、吸息時間は1.06から0.77 sに短縮、呼息時間は2.39から3.05 sに延長した(n = 21)。また、吸息活動の振幅は記録した全ての神経で増大した。神経活動開始のタイミングを比較すると、舌根部や舌骨下筋群を支配する舌下神経、上喉頭神経、第一第二頸髄神経の喉頭筋支配枝、反回神経の活動は、横隔神経の活動に先駆けて呼息相から出現するようになり、アシドーシス状態での呼吸に関する筋活動のパターンは、正常呼吸時と異なることが示された。また、舌下神経、上喉頭神経、第一第二頸髄神経の喉頭筋支配枝、反回神経の活動を比較すると、アシドーシス状態では、声門の開閉筋を支配する反回神経のみ、他の神経に比べて神経活動の開始が遅れており、他の神経はほぼ同時に活動を開始していることも示された。このように、呼吸時の多数の上喉頭支配筋の関係を示した報告はこれまでになく、呼吸時の上喉頭の活動を知る上で重要な知見が得られた。これらの結果を、PLoS One誌に発表した。

(2) 除脳灌流標本における顎運動の解析

除脳灌流標本では、ほとんどの場合、吸気の際に開口運動が見られ、舌下神経および開口筋を支配する顎舌骨筋神経の活動が、横隔神経の吸息活動と同期して現れた。このようなパターンは、実験を行った、生後5~35日までの間で変化しなかった。また、人工脳脊髄液の灌流量を変化させても、基本的な呼吸に伴う神経活動パターンは変化しなかった。しかしながら、一部の標本では、標本の作製方法が同じであるにも関わらず、横隔神経の活動と逆位相で顎舌骨筋神経の活動が見られた。これは、一部の標本では、呼息時に開口運動が起きていることを示している。このような状態になる原因を調べるために、標本の呼吸状態を変化させる実験を行った。灌流液中にシアン化合物を投与することにより、末梢および中枢の化学受容体の活動を変調させると、投与前には吸息時に見られた顎舌骨筋神経の活動が、呼息時にシフトすることが確認された。これらの結果から、呼吸状態の変化により、開口運動のパターンが変化することが示唆された。

(3) 除脳灌流標本を用いた吸嚙、咀嚼の実験モデルの開発

閉口筋の活動を調べるための咬筋神経と、開口筋の活動を調べるための顎舌骨筋神経を剖出し、複合活動電位を記録した。また、吸嚙、咀嚼に伴う舌の運動を調べるために、舌下神経も剖出し、同時に神経電位を記録し

た。呼吸のモニターとして同時記録した横隔神経の吸息活動と同期して、顎舌骨筋神経と舌下神経では神経活動が見られたが、咬筋神経には、呼吸に関連した活動は見られなかった。硬口蓋を5~10 Hzの刺激頻度で連続的に電気刺激したところ、咬筋神経、顎舌骨筋神経、舌下神経にリズム活動が誘発された。これらの活動は、横隔神経では見られなかった。リズムの頻度は2~2.5 Hzで、刺激頻度によって変化しなかった。生後7~27日齢までのWistarラットを用いてこの実験を行ったところ、生後15日齢より小さなラットで、これらのリズム活動が出現し、日齢が小さいほど、リズム活動の発生率が高く、持続時間も長かった。これらのことから、除脳ラット灌流標本を用いて、硬口蓋の電気刺激により、吸嚙様の運動を誘発できることが示唆された。

さらに、脳幹-脊髄摘出標本への投与で、吸嚙様のリズムを誘発することが知られているNMDAの投与を行った。NMDAを10~200 μMの濃度で灌流液中に溶かして標本に投与したところ、40 μM以上の濃度で、咬筋神経、顎舌骨筋神経、舌下神経にリズム活動が誘発された。咬筋神経と顎舌骨筋神経の活動は、交互に起こっていた。このNMDAにより誘発されたリズムの頻度は0.5~1.5 Hzであった。硬口蓋の電気刺激によるリズムとは異なり、生後15日以降の日齢のラットでもリズムの誘発は出来たが、やはり日齢が小さいほど、リズム活動の発生率が高く、持続時間も長かった。本研究によって、吸嚙から咀嚼の時期までの顎運動の神経機構を調べるための実験モデルを開発することが出来た。今後、摂食運動の神経メカニズムを調べる上でこの実験モデルが有用な手段となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Satoshi Tachikawa, Kiyomi Nakayama, Siro Nakamura, Ayako Mochizuki, Takehiko Iijima, Tomio Inoue, Coordinated respiratory motor activity in nerves innervating the upper airway muscles in rats, PLoS One, 査読有, 2016, 11: e0166436, DOI:10.1371/journal.pone.0166436

Chikako Gemba, Kiyomi Nakayama, Shiro Nakamura, Ayako Mochizuki, Mitsuko Inoue, Tomio Inoue, Involvement of histaminergic inputs in the jaw-closing reflex arc, Journal of Neurophysiology, 査読有, 2015, 113:3720-3735, DOI:10.1152/jn.00515.2014

〔学会発表〕(計12件)

永田愛, 中山希世美, 山口徹太郎, 榎宏太郎, 井上富雄, 咬筋運動ニューロンのシ

ナプス入力のセロトニンによる調節、第75回日本矯正歯科学会大会、2016/11/7-9、アスティとくしま（徳島県・徳島市）

Kiyomi Nakayama、Ayako Mochizuki、Shiro Nakamura、Tomio Inoue、Inhibition of neuronal activities in mesencephalic trigeminal sensory neurons via orexin receptor-2 in rats、17th international symposium of olfaction and taste、2016/6/7、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

立川哲史、中山希世美、望月文子、中村史朗、清本聖文、飯島毅彦、井上富雄、経動脈灌流標本を用いた上気道及び喉頭筋を支配する神経の呼吸性活動におけるアシドーシスの影響、第93回日本生理学大会、2016/3/24、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

Kiyomi Nakayama、Chikako Gemba、Shiro Nakamura、Ayako Mochizuki、Mitsuko Inoue、Tomio Inoue、Presynaptic histaminergic inhibition of synaptic transmission from mesencephalic trigeminal afferents to masseter motoneurons in juvenile rats、Society for Neuroscience 45th annual meeting、2015/10/20、Chicago (USA)

Satoshi Tachikawa、Kiyomi Nakayama、Ayako Mochizuki、Shiro Nakamura、Masaaki Kiyomoto、Takehiko Iijima、Tomio Inoue、Effects of hypercapnia on respiratory motor activity in nerves innervating the neck and tongue muscles、Society for Neuroscience 45th annual meeting、2015/10/19、Chicago (USA)

立川哲史、中山希世美、望月文子、中村史朗、清本聖文、飯島毅彦、井上富雄、除脳ラット灌流標本を用いた上気道筋群の支配神経活動へのCO₂負荷の影響、第57回基礎歯科医学会学術大会、2015/9/12、朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）

立川哲史、中山希世美、望月文子、中村史朗、清本聖文、飯島毅彦、井上富雄、除脳ラット灌流標本を用いた自発呼吸に伴う顎筋支配神経活動の解析、第54回日本顎口腔機能学会、2015/4/19、鹿児島大学（鹿児島県・鹿児島市）

Kiyomi Nakayama、Chikako Gemba、Shiro Nakamura、Ayako Mochizuki、Mitsuko Inoue、Tomio Inoue、Histaminergic modulation of oral-motor activity、Society for Neuroscience 44th annual meeting、2014/11/18、Washington DC (USA)

Gemba Chikako、Kiyomi Nakayama、Shiro Nakamura、Ayako Mochizuki、Mitsuko Inoue、Tomio Inoue、Effects of histamine on synaptic inputs from the mesencephalic trigeminal nucleus to trigeminal motoneurons、Neuroscience 2014、2014/9/12、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Itaru Yazawa、Satoshi Tachikawa、Ayako Mochizuki、Tomio Inoue、Kiyomi Nakayama、Functional interactions between the respiratory center, the upper spinal cord, and the trigeminal system、Society for Neuroscience 43rd annual meeting、2013/11/13、San Diego (USA)

Kiyomi Nakayama、Mitsuru Yokomatsu、Ayako Mochizuki、Tomio Inoue、Itaru Yazawa、Switching of lower jaw movements between the inspiratory and expiratory phases generated by chemoreceptor inputs、IUPS 2013、2013/7/25、Birmingham (England)

中山希世美、横松充、望月文子、井上富雄、矢澤格、除皮質ラット灌流標本では吸気相と同期して下顎の開口運動が起こる、第36回日本神経科学大会、2013/6/20、国立京都国際会館（京都府・京都市）

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・講師
研究者番号：00433798

(2) 研究分担者

矢澤 格 (YAZAWA Itaru)
昭和大学・医学部・兼任講師
研究者番号：40360656