

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791373

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リズム神経回路網の解析

研究課題名（英文） Analysis of 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)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00433798

研究成果の概要：

ヒトや動物の生命維持に、食物摂取によるエネルギーの獲得は必須である。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。吸啜リズムを形成する神経回路は脳幹内に存在す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、吸啜運動のリズムを新生マウスの脳幹-脊髄摘出標本で安定して繰り返し誘発することに成功し、吸啜リズムを形成する神経回路についての研究を行うための新しい実験系を開発した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0 | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 480,000 | 3,780,000 |

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* の電気生理学の実験が、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ム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 受容体拮抗薬) 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。

2. 研究の目的

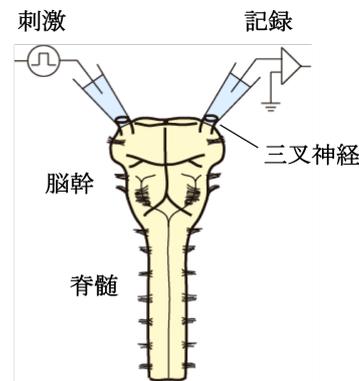
(1) 脳幹-脊髄摘出標本は、呼吸や血圧などの管理を行わなくてよいことから、幼弱動物の電気生理学的実験を行うために最適の標本である。中枢神経系を生体から分離して人工脳脊髄液中で生かしておくため、灌流液に神経伝達物質や受容体の拮抗薬を加えることで、比較的容易に関係する神経伝達物質を調べることができる。また、パッチクランプなどの電気生理学的実験に加えて、カルシウムイメージングや電位感受性色素などを用いたイメージング実験も行うことができる。さらに、スライス標本に比べて、神経回路網の破壊が少ないという利点がある。そこで本研究は、脳幹-脊髄摘出標本を用いて、吸啜運動のリズムを形成する脳幹内の神経回路網について研究を行うための新しい実験系を確立することを目的として行った。

(2) 本研究では、脳幹-脊髄摘出標本を用いて、吸啜リズムをより安定して繰り返し誘発する方法を開発することにした。生体内での顎運動時の神経活動をより忠実に再現するために、吸啜運動が口唇への触刺激によって誘発されることを利用して三叉神経感覚根の電気刺激を行い、吸啜運動のリズムを脳幹-脊髄摘出標本で誘発することを試みた。この方法では、リズムの誘発に薬剤を用いないので、薬剤に対する脱感作の影響がなくなり、より安定して繰り返しリズムの誘発が出来ることが期待された。

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。吸啜運動は口唇への触刺激によって誘発されることから、三叉神経を通る感覚神経の電気刺激により吸啜様リズムを誘発出来るかを検討した。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を通る三叉神経運動根を用いた。実際の実験は、次の三通りの方法で行った。

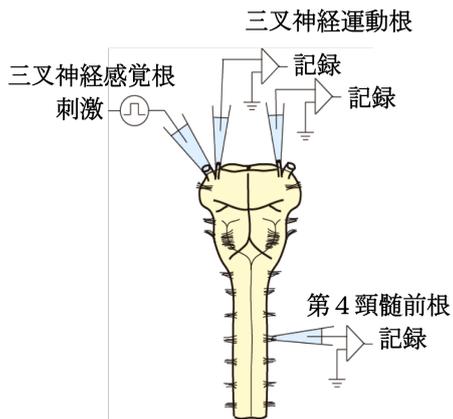
(1) 両側の三叉神経をそれぞれ吸引電極で吸引し、片側を電気刺激に用い、反対側の三叉神経に誘発された複合活動電位を記録した。



(図1) 脳幹-脊髄摘出標本と吸引電極装着の模式図。片側三叉神経を電気刺激、反対側の三叉神経から記録の場合。

(2) 脳幹-脊髄摘出標本に片側のみ顎顔面組織をつけた標本を作製した。顎顔面組織を取り除いた側の三叉神経を吸引電極内に保持し、電気刺激を行った際の顎の動きを観察した。

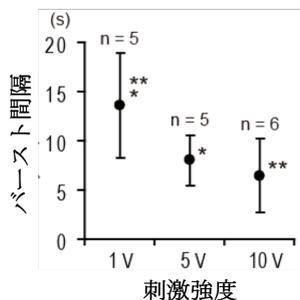
(3) 両側の三叉神経を感覚根と運動根に分け、片側の感覚根を刺激用に、両側の運動根を記録用に用いた。また、吸息活動のモニターのために、横隔神経の通る第4頸髄前根からも同時に吸引電極で記録を行った。三叉神経感覚根を電気刺激した時の、三叉神経運動根および第4頸髄前根の複合活動電位を記録した。



(図2) 脳幹-脊髄摘出標本と吸引電極装着の模式図。三叉神経感覚根を電気刺激、両側三叉神経運動根と第4頸髄前根から記録の場合。

4. 研究成果

(1)片側の三叉神経に、持続時間10 msec,10 Hz,100回の電気刺激を与えたところ、刺激終了の数秒後から、反対側の三叉神経にリズム的な神経発射が観察された。刺激強度を上げることにより、神経発射の発射頻度は上昇した[1V刺激: 13.9 ± 6.8 s interval (n = 4), 5V刺激: 9.2 ± 3.2 s interval (n = 4), 10V刺激: 6.4 ± 4.1 s interval (n = 6)]。このようなリズム的な神経発射は、シナプス入力を遮断するために、灌流液からカルシウムイオンを除去したところ消失した。このことから、片側三叉神経の刺激により反対側の三叉神経に誘発されたリズム的な神経発射の発生には、脳幹内の神経回路が関与していると考えられる。



(図3) 刺激頻度とバースト頻度の関係

(2)半側の顎顔面組織を残した脳幹-脊髄摘出標本において、顎顔面組織の反対側の三叉神経を電気刺激(10 msec,10 Hz,100回,10V)する

と、刺激終了後に、リズム的な口の開閉運動が見られた。この開閉口運動の頻度は、顎顔面組織のない標本で、三叉神経から記録されたリズム的な神経発射と、同程度の頻度だった。刺激により誘発された開閉口運動では、上顎はほとんど動かず、下顎が動いて開閉口しており、生体における咀嚼や吸啜時の顎運動を再現していた。

(3)通常の脳幹-脊髄摘出標本で、三叉神経を刺激用の感覚根と記録用の運動根に分け、左右のリズムの関係を観察した。片側三叉神経感覚根の刺激により誘発されるリズム的な神経発射は、左右の三叉神経運動根で同期していた。また、横隔神経が含まれる第4頸髄前根から同時に記録を行うと、刺激によって誘発された三叉神経運動根のリズムとほぼ同期して、第4頸髄前根にも神経発射が見られた。しかしながら、第4頸髄前根において自発的に出現する吸息の神経発射に比べ、刺激によって誘発された神経発射は、持続時間が短く振幅が大きかった。このことから、三叉神経感覚根の刺激によって誘発されるリズムは、吸息活動とは異なることが示唆される。

(4)以上のように、新生マウスの脳幹-脊髄摘出標本において、三叉神経感覚根を刺激することで、顎運動を司る運動ニューロンの軸索を含む三叉神経運動根に、リズム的な神経活動を誘発できた。このリズム的な神経活動は標本作成後5時間以上安定して誘発することが出来、繰り返しの刺激によっても減弱することはなかったことから、吸啜リズムの解明のための実験系として有用であると考えられる。

(5)今後は、この実験系を用いて、吸啜リズムの形成に関与する神経伝達物質や、神経回路網に含まれる介在ニューロンについて形態や電気生理学的性質の研究が進むことが期待される。また、この実験系を顎運動に異常の見られる遺伝子組み換え動物に適用することにより、リズム運動を形成する神経回路網の遺伝学的解析も進むことと思われる。

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2件)

- ① Nakamura S, Inoue T, Nakajima K, Moritani M, Nakayama K, Tokita K, Yoshida A, Maki K. Synaptic transmission from the supratrigeminal region to jaw-closing and jaw-opening motoneurons in developing rats.

Journal of Neurophysiology 査読有
(2008) 100: 1885-1896.

- ② Niwa, M., Nakayama, K. and Sasaki, S.-I. Morphological study of external oblique motor nerves and nuclei in cats. *Anatomical Science International* 査読有 (2008) 83: 17-25.

[学会発表] (計7件)

- ① Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, Inoue T. Orexin modulates neuronal activities of mesencephalic trigeminal sensory neurons in rats. *Showa University International Symposium for Life Science 5th Annual Meeting*, 2008/9/2, Tokyo.
- ② 中村史朗、中山希世美、望月文子、井上富雄、顎運動制御に關与する三叉神經上核ニューロンの電気生理学のおよび形態学的特性、第85回日本生理学会大会、2008/3/25-27、東京
- ③ 中村史朗、中山希世美、望月文子、井上富雄、顎運動制御に關与する三叉神經上核ニューロンの電気生理学のおよび形態学的特性、第39回日本顎口腔機能学会、2007/10/27、東京
- ④ 中山希世美、中村史朗、井上富雄、オレキシンによる三叉神經中脳路核ニューロン活動の調節、第30回日本神経科学大会、2007/9/10-12、横浜
- ⑤ 井上富雄、中山希世美、望月文子、中村史朗、三叉神經中脳路核ニューロンの活動はオレキシンによって調節される、第49回歯科基礎医学会学術大会、2007/8/30-31、札幌
- ⑥ 玄番晶子、中村史朗、中山希世美、吉村節、井上富雄、ラットにおける顔面神経核背側網様体から閉口筋運動ニューロンへのシナプス入力の特性、第49回歯科基礎医学会学術大会、2007/8/30-31、札幌
- ⑦ 中村史朗、中山希世美、望月文子、玄番晶子、吉田篤、森谷正之、井上富雄、下顎運動の神経制御メカニズム、第49回歯科基礎医学会学術大会、2007/8/30-31、札幌

[図書] (計1件)

- ① Nakayama K, Mochizuki, A, Nakamura S, and Inoue T. Orexin modulates neuronal activities of mesencephalic trigeminal sensory neurons in rats. *in Transmitters and Modulators in Health and Disease*. I. Homma, S. Shioda and N. Kato (Eds). Springer (2009) pp179-182.

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