

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792048

研究課題名 (和文) 発達期における摂食機能の神経制御機構についての組織学的解析

研究課題名 (英文) The histological research of the developing feeding center

研究代表者

大島 昇平 (OSHIMA SHOHEI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00374546

研究成果の概要 (和文) :本研究ではマウスの吸綴 (母乳を吸う) 運動がどのような神経のネットワークによって制御されているかを調べる事を目的とした。吸綴運動時に脳の中で活動している神経細胞が存在していた。その中で舌を動かす神経を制御する神経細胞がないかを調べたが、今回の研究では確認できなかった。また舌を動かす神経には胎生期 (お母さんのお腹にいる時期) に既にカルシニューリンという分子が存在している事がわかった。

研究成果の概要 (英文) :The purpose of this study is elucidation of the center of sucking reflex in mice. During suckling, particular neurons were active in the mouse brain. However, there was no active hypoglossal premotor neuron during suckling in this analysis. Mouse hypoglossal nerve expressed calcineurin in the prenatal period.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・矯正・小児歯科学

キーワード:吸綴運動 発達

1. 研究開始当初の背景

摂食行動は生命の維持に必要不可欠であり、摂食・嚥下障害は医療・介護現場の重要な課題の一つになっている。摂食・嚥下機能は生後発達期に吸綴運動から咀嚼運動へダイナミックな変化を遂げる。生後は主に原始反射による母乳の吸綴運動のみであるが、生後発達の間咀嚼運動を獲得し、口腔周囲の筋肉の動きは大きく変わる。その摂食機能の神経制御機構については国内外で研究がすすめられている。咀嚼運動時には同一なパタンのリズムカルな顎運動が見られる。大脳皮質に連続電気刺激をくわえると咀嚼運動と思われるリズムカルな顎と舌の運動を誘発する事がサルをはじめとする様々な動物種において確認され、その部位は皮質咀嚼野と命名された (Lund and Lamarre, Exp Brain Res.

19:282-299 1974)。その後錐体路を電気刺激する事によっても咀嚼運動と思われるリズムカルな顎筋の活動が誘発され、そのリズムカルな活動をする運動ニューロンへの出力は脳幹にある中枢性パターン発生器によることがモルモットを使った実験で推定された (Nozaki et al., J Neurophysiol. 55:806-825 1986)。脳幹部のみの新生仔ラットの in vitro 脳幹標本を使った実験においても中枢性パターン発生器が存在する事が確認された (Tanaka et al., Brain Res. 821:190-199 1999)。一方、吸綴運動時にもリズムカルな舌、顔面、顎筋の動きがみられる。新生仔ラットの in vitro 脳幹脊髄標本を使った実験において咀嚼運動と同様に、脳幹部には吸綴運動と思われるリズムカルな活動を舌下神経ニューロンに起こす事ができる中枢性パターン発生器が存在する事が確認

され、その中枢性パタンの発生にはグルタミン酸受容体のサブタイプである NMDA 受容体が関与している事も明らかになった(Katakura et al., Neuroreport. 5:601-604 1995)。中枢性パターン発生器によると考えられる三叉神経運動核のリズミカルな活動はラットの胎生 18 日頃からみられるようになる(Ishihama et al., Develop Brain Res.145:163-166 2003)。以上のように咀嚼運動、吸綴運動時における運動ニューロンのリズミカルな活動は脳幹部に存在する中枢性パターン発生器によるものと考えられる。しかしその中枢性パターン発生器がどのような神経ネットワークを持っているかはまだ明らかではない。また、吸綴運動と咀嚼運動では顎、舌の動きが大きく異なる事、吸綴運動と咀嚼運動では筋電図の活動パターンが明らかに異なる事、吸綴運動ではみられる原始反射は咀嚼運動時には全くみられない事、大脳皮質に吸綴野と咀嚼野がそれぞれ存在する事(Iriki et al., Develop Brain Res. 44:189-196 1988)などから、吸綴運動から咀嚼運動への発達の過程においては中枢性パターン発生器を含む神経制御機構も大きな変化がみられる事が想定される。これらの中枢性パターン発生器を含む神経制御機構がどのように変化するのか、例えば吸綴運動と咀嚼運動のもので同じものなのか、それとも関連しているのか、全く異なるものなのかを解明する事は大変興味深いと思われる。また、これまでに行われた摂食機能の神経制御機構の解析は筋電図や電気生理を用いた機能の解析によるものが多いが、形態からのアプローチも行う事も必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、吸綴運動の神経制御機構の解析を組織学手法によって行うことを目的とした。具体的には、(1)c-fos 発現を指標とした吸綴運動時に活動するニューロンの同定、(2)神経標識物質の注入による舌下神経ニューロンの premotor neuron の同定、(3) (1)と(2)を同時に行うことによって吸綴運動 premotor neuron を同定する、(4)舌下神経に発現する分子の検索を行った。

3. 研究の方法

(1)生後 3 日目朝に吸綴活動をさせた仔マウスを十分なベントバルビタール麻酔下において固定した。固定液は 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝溶液を使用した。抜脳後、舌下神経核と思われる領域に DiO ペーストを注入した。その後、脳幹部の凍結切片を作成した。得られた試料について、抗 c-fos 抗体を用いた、免疫組織化学を行った。光顕での観察では DAB にて発色させた。DiO で標識されたニューロンと c-fos を発現しているニューロンとの二重標識では蛍光顕微鏡にて観察した。

(2)十分なベントバルビタール麻酔下において妊娠マウスから胎生仔マウスを取り出し、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝溶液にて固定し

た。その後頭頸部をパラフィン包埋し、舌を含む領域のパラフィン切片を作成した。得られた試料について抗カルシニューリン抗体にて免疫組織化学を行った

4. 研究成果

(1)DiO ペーストのマウス舌下神経核への注入

図1に生後3日のマウス脳幹部に注入された DiO ペーストを示す。DiO ペーストは舌下神経核に注入されているが、舌下神経核以外の領域にも DiO ペーストは注入されている。脳の固定法、マニピレーターの位置設定など、DiO ペーストの注入条件の再検討が必要と考えられた。

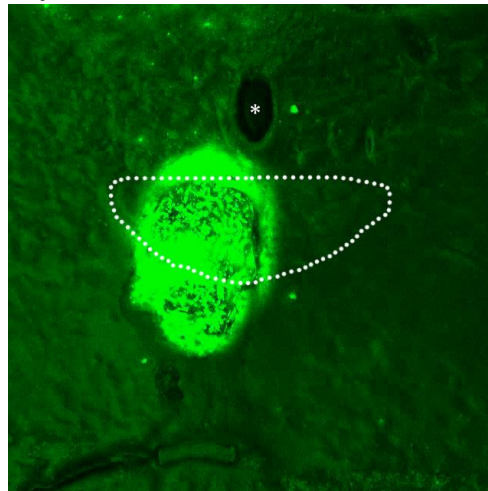


図1 生後3日の舌下神経核に注入された DiO ペースト。点線内が舌下神経核。*は延髄の中心管を示す。

(2) 吸綴運動時に脳幹で c-fos を発現するニューロンの検索

図2から図4に吸綴活動をさせた生後3日のマウス脳幹部で c-fos を発現しているニューロンを示す。

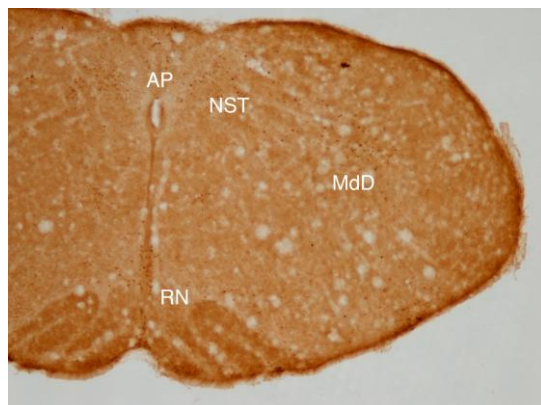


図2 吸綴活動をさせた生後3日のマウス脳幹部の c-fos の発現。AP、最後野。NST、孤束核。MdD、延髄網様体背側核。RN、縫線核

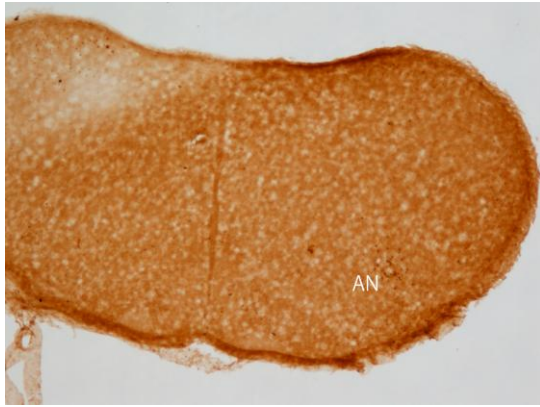


図3 吸啜活動をさせた生後3日のマウス脳幹部の c-fos の発現。AN、擬核

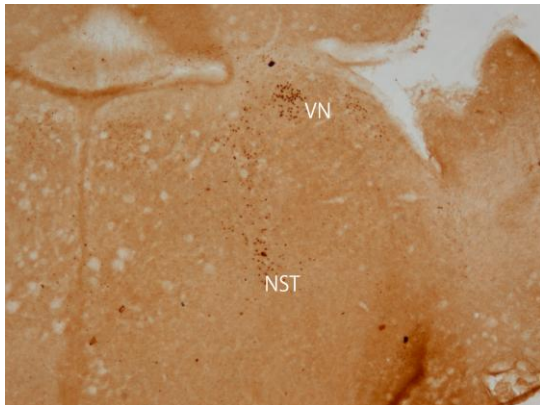


図4 吸啜活動をさせた生後3日のマウス脳幹部の c-fos の発現。NST、孤束核。VN、前庭神経核

吸啜運動時における脳幹部の c-fos 発現について調べた研究は数が少ないがラットをもちいた報告はある。その研究で c-fos の発現が報告されていた孤束核、延髄網様体背側核については本研究でも発現が確認された。また、以前の研究では報告のなかった、最後野、縫線核についてもそこで c-fos の発現がみられた。また、疑核、前庭神経核についても c-fos の発現がみられた。今回行なった解析では個体数が少なく、また、非吸啜運動群との比較も不十分のため、更なる検討が必要と思われた。

(3)c-fos と DiO とで二重標識されるニューロンの検索

図5に c-fos と DiO との二重蛍光標識を示す。今回の解析では DiO で標識された舌下神経核の premotor neuron の中で、c-fos を発現しているニューロンは認められなかった。

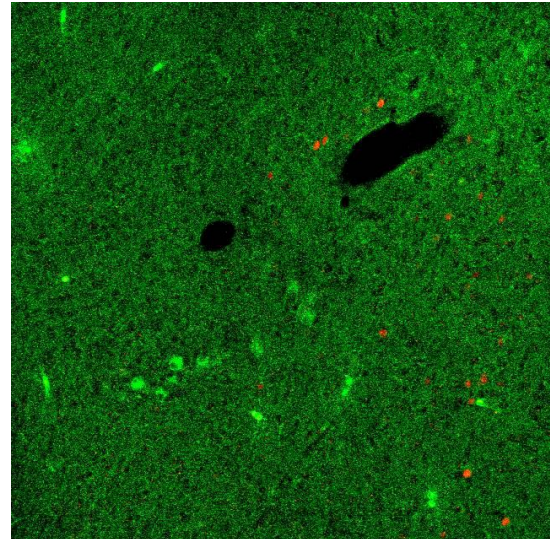


図5 舌下神経核に注入された DiO による標識(緑)と c-fos 発現(赤)による二重標識

(4)胎生期マウスの舌下神経におけるカルシニューリンの発現

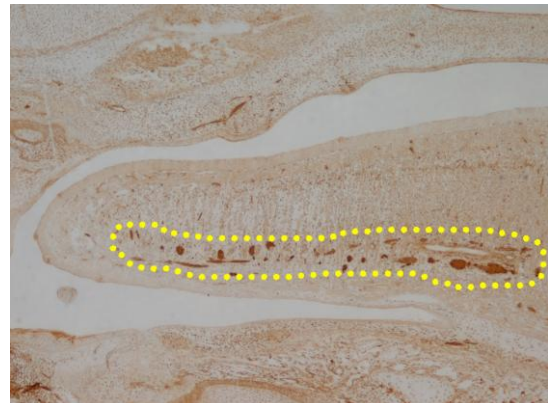


図6 胎生15日のマウス舌の抗 PGP9.5 抗体による免疫染色(点線内)

胎生15日のマウス舌の舌下神経は PGP9.5 によって識別する事が可能であった。

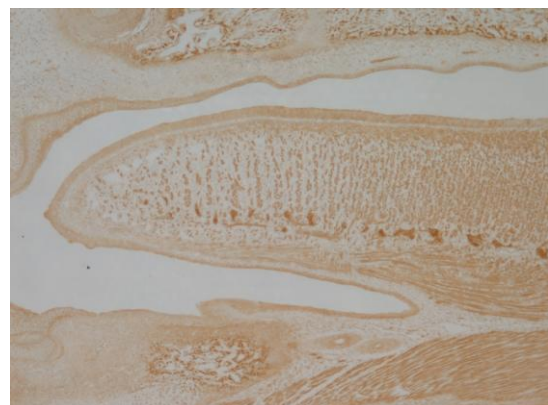


図7 胎生15日のマウス舌の抗カルシニューリンアルファ抗体による免疫染色



図8 胎生15日のマウス舌の抗カルシニューリンベータ抗体による免疫染色

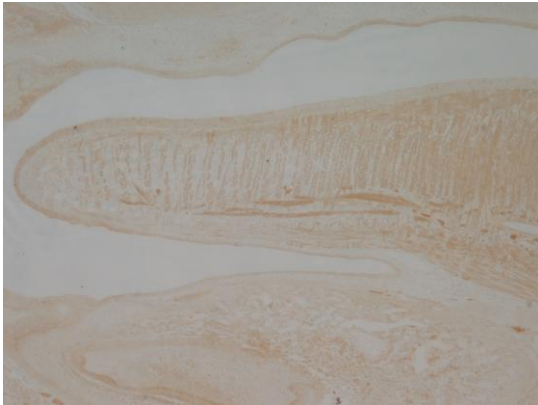


図9 胎生15日のマウス舌の抗カルシニューリンB1抗体による免疫染色

胎生15日のマウスの舌下神経にはカルシニューリンの発現が認められた。カルシニューリンは脳に豊富に発現している事が確認されており、舌の筋の神経制御の発達にも関与している事が示唆される。

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)

(1)Oshima S, Suzuki J, Yawaka Y: Idiopathic osteosclerosis in the mandible associated with abnormal tooth root formation. *Pediatric Dent. J.*, 20(1):91-94 (2010). (査読有)

[学会発表] (計2件)

(1) 大島 昇平、高崎 千尋、八若 保孝: 歯周組織におけるカルシニューリンの発現 第26回日本障害者歯科学会学術大会 H21年11月1日 名古屋国際会議場(名古屋)

(2) 大島 昇平、八若 保孝: 歯の発育過程におけるカルシニューリンの発現 第47回日本小児歯科学会大会 H21年5月15日 大阪大学コンベンションセンター(吹田)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 昇平 (OSHIMA SHOHEI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 00374546

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし