

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650141

研究課題名（和文）発達期における延髄縫線核の傷害が睡眠に及ぼす影響

研究課題名（英文） Effects of medullary raphe nuclei lesions during developmental stage on sleep

研究代表者

細貝正江 (HOSOGAI MASAE)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50032206

研究成果の概要（和文）：

脳幹正中部の縫線核群は、運動、感覚、自律神経系、記憶などの各種機能の調節に関与し、睡眠に対しても大きな役割を演じていることが知られている。本研究では、成熟ラット及び幼若ラットの延髄縫線核をカイニン酸を用いて傷害し、呼吸運動への影響を調べ、更に幼若ラットの延髄縫線核の傷害がその後の睡眠へ及ぼす影響を調べた。成熟及び幼若ラットの延髄縫線核の傷害により呼吸頻度は一時的に増加したがその後減少し、無呼吸が誘発された。幼若期にこの部位を傷害した群は、その後、正常群に比べて睡眠が浅くなった。延髄縫線核の傷害は呼吸運動に影響を及ぼし、幼若期でのこの部位の傷害はその後の睡眠へも影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Midline raphe nuclei of the brainstem have been implicated in motor function, sensory processing, autonomic neural control systems and memory. They have also played an important role in sleep. The present study was undertaken to investigate effects of kainic acid injection into the medullary raphe nuclei of young and adult rat on respiration. We also examined effect of the lesion during development on sleep. The chemical lesions of adult rat induced a transient increase in frequency of respiration, and the frequency subsequently decreased. Then, apnea was elicited. After the lesion of the medullary raphe nuclei during developing periods, the rats had light sleep compare to normal adult rats. These results suggest that lesions of medullary raphe nuclei by kainic acid change respiratory movement. Medullary raphe lesions during developing periods in rats also affect sleep patterns.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	180,000	2,280,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：身体教育学

キーワード：身体システム学、延髄縫線核

1. 研究開始当初の背景：

児童や生徒の不登校の問題が取り上げられてから久しい。学校でのいじめの関与も指摘されてきたが、不登校児童・生徒のなかには睡眠に問題をかかえているために、朝どうしても起きられず登校できないとの報告もされてきた。このような睡眠障害は、一般人の睡眠サイクルより遅く眠り、遅く起きるという状態が一ヶ月以上続き、睡眠相後退症候群と呼ばれる。この睡眠障害に罹る人は、夜更かしが原因で一度睡眠の周期がずれると、それをもとに戻せない体質を持つと考えられている。不登校に至らなくても授業中居眠りをしたり、すぐしゃがみ込む等、疲れやすい子供達も急速に増えており、これらの子供達の学力低下や不登校への移行も心配されている。不登校の子供に見られる睡眠の問題は、その原因として、親達の現代人特有の夜型生活習慣に起因するものと、周囲からの過剰な感覚および精神的刺激による子供達の慢性的疲労があげられている。このような子供達は、睡眠だけでなく体温のサイクルまでも正常者とずれてしまっていることも報告されている。睡眠・覚醒サイクルの基本は生後4ヶ月以内に形成され、その後の修正は難しく、社会性の欠如の障害に結びつく可能性があることも報告されている。

延髄縫線核群のセロトニン神経系は、睡眠一覚醒の状態に依存した活動を示し、覚醒時には規則的な発射活動をするが、睡眠状態が深くなるにつれてその活動が現弱し、レム睡眠では完全に消失する。縫線核からノルアドレナリンの起始核である青班核への投射が報告され、睡眠との関係も指摘されている。最近では、縫線核のパニック障害との関連性も指摘されている。体温調節機能をつかさどるニューロンが延髄縫線核において発見され、この部位の体温調節機能とそれに関連した交感神経機能の中枢神経機構としての役割についての研究が大きく進展するものとして期待されている。

延髄の正中部を刺激すると呼吸運動が変化することが報告され、この部位の呼吸調節への関与が示唆されていたが、詳細は明らかでない。本研究代表者細貝は、これまでの実験において、延髄縫線核において呼吸性ニューロンを同定し、それらのニューロンには脊髄の横隔神経核に投射するものや、炭酸ガスに対して感受性を示すものがあり、延髄縫線核が呼吸調節に関与することを明らかにしてきた(Neurosci Lett, 1993; Respir Physiol,

1998; AutonomNeurosci:Basic& Clinical, 2002)。

延髄縫線核の未発達は、睡眠時に呼吸が停止する乳幼児突然死症候群の原因になっているとの報告もあり、延髄縫線核の睡眠そのものおよび睡眠時の呼吸・循環動態への関与が示唆されている。

不登校という現象自体を単純な因果関係で説明はできないが、発達期の生育状況に起因するとの報告もあり、この現象に神経生理学的観点からアプローチしてその原因を調べることは、睡眠障害改善への第一歩となり、子供達の脳の発達と体と心を育てることに貢献すると思われる。また、延髄縫線核の呼吸運動における役割を調べることは、今なお未解明な点が多い哺乳動物の呼吸機能の神経機構に関する研究にきわめて重要な情報を提供すると思われる。

2. 研究の目的：

脳幹正中部に位置する縫線核にはセロトニン含有細胞が存在し、その軸索を中枢神経系の全域に送り、運動、感覚、自律神経系、記憶などの各種機能の調節に関与し、睡眠に対しても大きな役割を演じていることが知られている。近年、児童や生徒の不登校が社会問題にもなっているが、睡眠障害もその一因であるとの報告もある。不登校児童が持つ睡眠・覚醒のリズム障害は、固体の成長期における生物学的発達メカニズムに起因することが指摘されているが、その原因を神経生理学的手法を用いて解明しようとした試みは少ない。

本研究では、成熟動物を用いて延髄縫線核を化学的に傷害して、呼吸運動へ及ぼす影響を調べると共に、幼若期に延髄縫線核を障害して、その後の発達過程における睡眠および呼吸への影響を調べる。

3. 研究の方法：

(1) 2週齢、3週齢、8週齢のラットの延髄縫線核へカイニン酸を注入して、呼吸運動への影響を調べる。

① (急性実験)

動物 Sprague-Dawley rat を Pentobarbital Sodium (50 mg~60/kg, i. p.) で麻酔した後、自発呼吸下で実験を行った。8週齢のラットについては、心電図記録のためと呼吸運動の

指標として横隔膜筋電図記録のために、先端を剥離したエナメル被覆銅線を胸部の皮膚を切開して胸筋に、腹部を切開して横隔膜にそれぞれ挿入し固定した。動物を脳固定装置に固定し、後頭部の頭蓋骨を除去して、脳幹正中部を暴露した。obexを指標にして、Fast Greenを含んだ0.1% kainic acid (KA: 4.7 mM, pH7.4) 溶液をハミルトンシリンジに満たし、ラットの脳図譜を参考にして、延髄正中部に刺入して微量注入し、その後の経過を記録した。

2週齢および3週齢ラットについては、呼吸運動の指標として、気管切開の後挿管して差圧トランスデューサーに接続し、呼吸気流を記録して同様の実験を行った。

② (慢性実験)

2週齢および3週齢のラットを Pentobarbital Sodium (50 mg/kg, i. p.) で麻酔した後、後頭部の皮膚を切開して、延髄正中部に相当する部位にドリルで小さな穴をあけ、Fast Greenを含んだ0.1% kainic acid (KA: 4.7 mM, pH7.4) 溶液を満たしたハミルトンシリンジを挿入してカイニン酸を微量注入した。その後、穴を閉じ、皮膚を縫合し、飼育箱に戻した。その後の呼吸運動を観察しながら7週齢まで飼育した後、頭部に脳波、頸部と胸部に頸筋筋電図、心電図および肋間筋筋電図記録用電極をそれぞれ植え込んだ。術後1週間を経て回復した後、記録箱に移した。動物は9:00~18:00の間記録箱で生活し、餌と水は任意に摂取できた。15:00~18:00の間記録して睡眠状態を調べた。

(2) 8週齢の正常ラットについて睡眠状態を調べるために慢性動物を作成した。

動物 Sprague-Dawley rat を Pentobarbital Sodium (60/kg, i. p.) で麻酔した後、頸筋筋電図と心電図記録及び呼吸運動の指標として肋間筋筋電図記録のために、先端を剥離したエナメル被覆銅線を頸部と胸部にそれぞれ植え込んだ。動物を脳固定装置に固定し、正中の皮膚を切開して脳波記録のために頭蓋骨の bregma の前方 2mm、正中線より外側に 2mm、及び lamda より前方 2mm、正中線より外側に 2mm の位置にネジ電極を植え込んだ後、頭頂部にソケットを設置して、各電極からリード線で導きハンダづけして、まわりを歯科用セメントで固定した。術後1週間を経て回復した後、記録箱に移した。動物は9:00~18:00の間記録箱で生活し、餌と水は任意に摂取できた。15:00~18:00の間記録した。

(3) 実験終了後、色素の沈着を指標にして、カイニン酸が注入された部位を組織学的

に検索した。

4. 研究成果:

(1) 2週齢、3週齢、8週齢のラットの延髄縫線核へのカイニン酸注入による呼吸への影響

① 8週齢ラット(n=17)

カイニン酸の $2\mu\text{L}$ の注入により、注入直後、横隔膜筋電図活動はわずかに増加した後、減少し、その活動は一時的に消失したが、すぐに回復した。注入後 25 分で永久的無呼吸に至り、その後は回復しなかった (Fig. 1 and Fig. 2)。

カイニン酸の注入量を $1\mu\text{L}$ ~ $0.06\mu\text{L}$ に減らして呼吸運動に対する影響を調べた結果、obex の前方 1~3mm への $0.1\mu\text{L}$ の注入により、無呼吸が一時的に出現したが、その後回復し、 $0.1\mu\text{L}$ の追加注入により、横隔膜筋電図活動は消失して無呼吸状態が続き、回復しなかった。 $0.06\mu\text{L}$ の注入量では、注入直後横隔膜筋電図活動はわずかに増加した後、減少し、注入後 41 分に永久的無呼吸に至った。

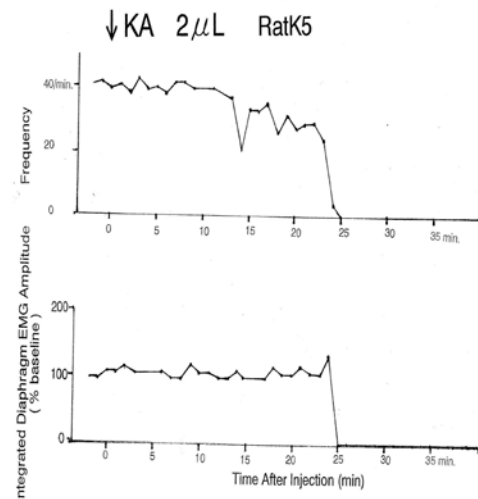


Fig.1 Example of the ventilatory response to the injection of kainic acid (KA: $2\mu\text{L}$) to the medullary raphe nucleus. Effect of the injection on respiratory frequency (top) and amplitude of the integrated diaphragm EMG activity expressed as a percent of the baseline (bottom).

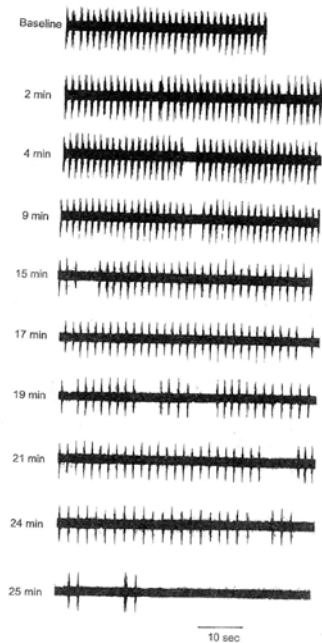


Fig.2 Effects of kainic acid(KA:2 μ L) injection on diaphragm EMG activity.

注入部位は、組織学的に検索した結果、不確縫線核及び淡蒼縫線核であることが確認された(Fig. 3)。

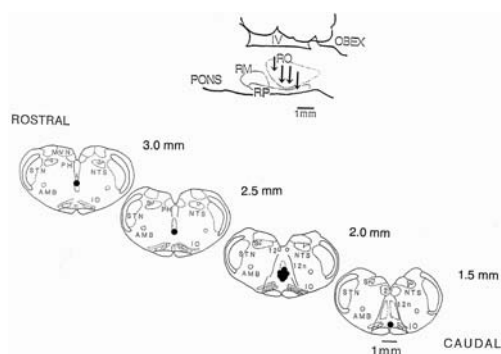


Fig.3 Location of kainic acid injection sites.

② 3週齢ラット

カイニン酸の0.02 μ Lの注入により呼吸頻度は50%減少した。0.05 μ Lの注入により無呼吸が一時的に出現し、不規則な呼吸が続いた。

③ 2週齢ラット

延髄縫線核の外科的手術による侵襲により死亡し、データが得られなかった。

(2) 幼若ラット延髄縫線核へのカイニンの注入がその後の睡眠に与える影響

3週齢ラットの延髄縫線核へカイニン酸を注入した後、8週齢時での睡眠を調べた結果(n=2)、睡眠深度が変化し、正常群に比べて軽睡眠期が増加した。

延髄縫線核のカイニン酸による傷害は、呼吸運動に影響を及ぼし、幼若期でのこの部位の傷害はその後の睡眠へも影響を及ぼすことが示唆された。

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)

(計 4 件)

① Masae Hosogai, Satoshi Matsuo: Involvement of the medullary raphe nuclei in the control of respiration. The Journal of Physiological Sciences, Vol. 63, S221-221, 2013

② Masae Hosogai, Satoshi Matsuo: Effects of medullary raphe nuclei lesions in rats on breathing. The Journal of Physiological Sciences, Vol. 62, S195-195, 2012

③ 細貝正江, 松尾 聡: 延髄縫線核の傷害による呼吸運動の変化、臨床神経生理学、第40巻、第5号、470-470, 2012

④ Masae Hosogai, Satoshi Matsuo: Properties of respiratory neurons in medullary raphe nuclei of rats. Neuroscience Research, Vol. 71, e162-e162, 2011

(計 5 件)

① 細貝正江, 松尾 聡: 呼吸運動に対する延髄縫線核の関与、第90回日本生理学会大会、2013年3月27日、タワーホール船堀(東京)

② 細貝正江, 松尾 聡: 延髄縫線核の傷害による呼吸運動の変化、第42回日本臨床神経生理学会学術大会、2012年11月8日、京王プラザホテル(東京)

③ 細貝正江, 松尾 聡: 延髄縫線核へのカイニン酸注入が呼吸に及ぼす影響、第35回日本神経科学大会、2012年9月18日、名古屋国際会議場(名古屋市)

④細貝正江、松尾 聡：ラット延髄縫線核の傷害が呼吸に及ぼす影響、第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 31 日、松本市総合体育館（松本市）

⑤細貝正江、松尾 聡：ラット延髄縫線核呼吸性ニューロン、第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、パシフィコ横浜（横浜市）

〔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：細貝正江 (HOSOGAI MASAE)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：5 0 0 3 2 2 0 6

(2) 研究分担者：松尾 聡 (MATSUO SATOSHI)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：4 0 2 1 9 3 9 0

(3) 連携研究者

()

研究者番号