

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592831

研究課題名(和文) 生体 In vivo パッチクランプ法を用いた咬合・咀嚼と精神活動との関係の探索

研究課題名(英文) An investigation of the relationship between occlusion, mastication and mental activity using in vivo patch clamp recording method

研究代表者

坪井 明人 (Tsuboi, Akito)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：00241646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：パッチクランプ法をin vivo標本に応用するためのプローブを種々試作したが、使用に耐えるギガオームシールが確認できたプローブは得られなかった。また、プローブを目的のニューロンにまで到達させる手法についても改善すべき問題点を多く残した。製作したプローブの一部を用いて、顎口腔系の体性感覚が投射される視床後内側腹側核のニューロン活動を細胞外記録した。記録されたニューロン活動の90%が、咀嚼・咬合に関連する機械刺激に応答し、刺激による覚醒に関連を示した。この結果は、咀嚼・咬合による感覚情報が意識レベルに影響を及ぼしていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：In this project we try to provide a micropipette for the in vivo patch clamp technique. Unfortunately, few probes were obtained to allow forming the high resistance seal (giga-ohm seal). The other device was also needed to reach the objective neurons of the in vivo specimen. These micropipettes, however, allowed us performing extracellular recording. Neuronal activities responding mechanical stimulation to the oro-facial region were extracellularly recorded from the ventral posteromedial nucleus of the rabbit thalamus. Ninety percent of recorded neurons responded to mechanical stimuli associated with occluding and chewing and also related to the mental activity. These results suggested that sensory information from oro-facial region during occlusion and mastication influences on the level of consciousness.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学

キーワード：in vivo パッチクランプ 咬合感覚 精神状態 脳幹網様体 視床

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者における残存歯数と認知症に関連する海馬を含む幾つかの脳領域の容積との間には、正の相関があることが渡邊ら(2005)によって報告され、脳の高次機能の維持における顎口腔系の重要性が広く認識されるようになった。加えて、近年の脳機能画像技術の発展により、ガム咀嚼が脳を活性化することが視覚的に認識可能となってきた(Hirano et al. 2008、Sakamoto et al. 2009)。しかし、これらの報告は、咀嚼・咬合と脳機能との関係の現象面を扱っているに過ぎず、顎口腔系の特異性が強調されるのみで、その背景にある咬合・咀嚼と脳機能を結び付けるメカニズムの解明には至っていない。

一方、基本的な精神活動である覚醒や睡眠、鎮静などの意識レベルを導く情報は、まず脳幹網様体で処理され、視床で中継された後に大脳皮質に投射される(上行性網様体賦活系)。したがって、脳幹網様体ならびに視床に存在する意識レベルに関与する神経細胞の活動を記録することが、咀嚼・咬合による感覚情報が高次脳機能である精神活動に影響を及ぼすメカニズムの解明の要点となる。しかし、視床や脳幹網様体は脳深部に位置するため、従来の記録方法ではその神経細胞の活動を観察することは極めて困難であった。また、脳幹網様体は、神経細胞が神経線維間に散在するという細胞構築学的特徴を有しているため、難易度はさらに高くなる。

これまで、生体における脳局所の神経活動の記録は、微小電極を用いた細胞外記録法あるいは細胞内記録法によりなされてきた。報告者らも、これらを用いて、ウサギの三叉神経感覚核群(Tsuboi et al. Eur J Neurosci. 2003:17,229-38) 三叉神経節(Tsuboi et al. Exp Brain Res. 2009: 199(2):107-16, Nagata et al. Arch Oral Biol. 2008: 53, 1138-48)等での神経活動を記録してきた。

一方、パッチクランプ法は、微小電極法に比

較して、1)細胞内のイオン濃度を安定的に維持できる、2)電位固定法を容易に用いることができる、3)長時間安定して記録することができる、などの利点を持つことから、主に培養細胞やスライスなどの *in vitro* 標本での記録に用いられてきた。このパッチクランプ法を *in vivo* 標本での神経活動の記録(*In vivo* パッチクランプ法)に応用する試みは、近年広がりをみせ(Margrie et al. Neuron 2003: 39, 911-18, Kitamura et al. Nat Methods. 2008:5, 61-7)、脊髄後角や小脳、大脳皮質などの比較的表層に位置する神経細胞からの記録技術は、ほぼ確立されつつある。本手法は、理論的には如何なる部位の細胞活動の記録にも応用可能であると考えられるものの、これまで脳深部に位置する神経細胞活動の記録に応用した報告はないようである。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、脳幹深部に位置する神経細胞の活動を記録するためのパッチ電極(プローブ)の開発ならびにウサギ *in vivo* 標本の製作法を確立することを目指した。次いで、この *in vivo* 標本を用いて、顎口腔系ならびに四肢・体幹への感覚刺激時における脳幹網様体に位置する神経細胞のシナプス応答を生体 *In vivo* パッチクランプ法により記録し、さらに、得られた結果を分析し、咀嚼・咬合による感覚情報が高次脳機能である精神活動に影響を及ぼすメカニズムを解明することを試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) プローブ(パッチ電極)の開発

ボロシリケートガラスピペット(WPI, MTW150-F-4)を材料とし、一段引きプレー(Narishige, PE-2)あるいは、プログラム式マイクロピペットプレー(MDI, PMP-102)を用いて一段引きにて作製した。さらに、マ

イクロフォージ (Narishige, MF-77) にて、パッチ電極の先端を加熱処理し、炎光研磨した。完成したパッチ電極について、テーパ形状、先端形状および先端径等を検討した。

#### (2) in vivo 標本の作製

実験動物には、脳幹部の細胞構築学的構造が詳細に調べられている (Meessen, H. & Olszewski, J. 1949) ウサギ (日本白色種、体重 2.0~2.3kg) を用いた。麻酔は、ウレタン-クロラロース混合液を用い、耳静脈から導入麻酔、上腕静脈から維持麻酔を行った。麻酔深度は、耳および後肢へのピンチ刺激による反応、ヒゲの自発運動の有無と角膜反射を指標とした。気管カニューレを装着し、レスピレータにて呼吸をコントロールし、必要に応じて酸素を投与した。保温パッドを用いて体温を維持するとともに、直腸に温度計を挿入して持続的に体温をモニターした。記録された応答が血管拍動や呼吸によるアーチファクトである可能性を除外するため、心電図および胸郭の動きを圧トランスデューサでモニターした。ウサギを脳定位固定装置 (Narishige, RA-5) に乗せ、頭蓋骨にネジ挿入し、これを即時重合レジンにて固定した。次に、歯科用ラウンドバーにて橋直上に相当する後頭骨を削除した。この時、脳の拍動を抑制するため、削除量は 3×3mm 程度とした。刺入時のパッチ電極の破損を防ぐために、クモ膜と軟膜を残し、硬膜をピンセットと微細ハサミを用いて切開した。

#### (3) 刺激

刺激には、主に機械刺激を用いた。機械刺激 (触・圧刺激) は、エアバフ、von Frey 毛、圧迫子、機械刺激装置 (ダイヤメディカルシステム、DSP-270) 等を適宜用いて行った。刺激部位は、口腔内 (歯、歯根膜、口腔粘膜、舌等)、口腔周囲の皮膚、毛、および開閉口運動に伴う咀嚼筋群・顎関節とした。

#### (4) 脳波の記録と分析

麻酔深度ならびに大脳皮質の神経細胞の

活動状態の指標とする。

#### (5) 記録した神経細胞の同定

記録後、実験動物をペントバルビタールの過剰投与で安楽死させ、電極刺入部位 (30 μA 鉄イオンマーキング) を含む大脳を摘出した。これを 10%ホルマリンと 5%フェロシアン化カリウム混合液に浸漬することにより、組織の固定と記録部の染色を行った。その後 50 μm 間隔で組織切片を作製し、ニュートラルレッド染色にて、記録部位の同定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) パッチ電極の製作および記録法の開発

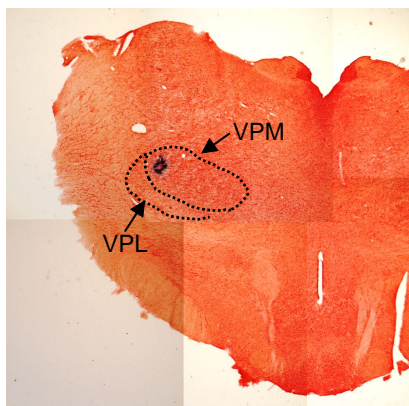
本手法を脳深部に位置する神経活動の記録に用いるには、少なくとも以下の問題を克服する必要がある。すなわち、電極刺入に伴う先端孔の目詰まり防止と電極周囲組織の破壊抑制、電極自体の破損防止である。パッチ電極は、テーパ形状、先端形状および先端径について種々試作したものの、使用に耐えうるギガオームシールを確認できたものは得られなかった。また、目的のニューロンまで到達するための電極刺入法についても改善すべき問題点が多く残った。

なお、試作したガラス電極の一部は、細胞外記録では使用可能であったため、上行性賦活系の主要構成要素であり神経細胞が脳幹網様体よりも密在している視床からのニューロン活動の記録に用いた。

#### (2) 顎口腔系の機械刺激に応答する視床後内側腹側核 (VPM) ニューロンの生理学的特性

25羽のウサギより、299個の神経応答が確認された。これらの応答は、ブレグマから尾側へ 3-5mm、正中から外側 3-5mm、大脳皮質表面から 8.5-11.5mmと VPM の全範囲から記録された。VPM ニューロンの 90%は、咬合・咀嚼に関連する機械刺激に応答した。また、自発放電を伴う VPM 機械受容ニューロンは少なく、自発放電を伴うニューロンはすべて深

部受容に関連を示した。これらのニューロンは、麻酔深度の影響を強く受けた。



本研究の結果は、咬合や噛むという動作が生きて上で重要な感覚であることを示唆している。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Takahiro Suzuki, Minoru Wakamori, Akito Tsuboi. Response properties of VPM neurons during mechanical stimulation of the maxillofacial region of the rabbit. The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science. 2014 Jan 20 - 2014 Jan 21. Sendai.

鈴木崇弘、坪井明人、渡邊誠 咬合に関連する応答を示した視床ニューロン活動の電気生理学的特徴 第23回日本全身咬合学会学術大会 2013年11月9日-2013年11月10日 東京

鈴木崇弘、若森実、田端孝義、坪井明人 顎顔面感覚入力に応答するウサギ視床ニューロン活動の電気生理学的検討 第55回歯科基礎医学会学術大会 2013年9月21日-2013年9月22日 岡山市

鈴木崇弘、若森実、吉田卓史、坪井明人 フェノール類による CRAC チャネルの遮断 第55回歯科基礎医学会学術大会 2012年9月15日-2012年9月16日 郡山市

〔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

坪井 明人 (TSUBOI AKITO)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク  
機構・教授  
研究者番号：00241646

##### (2) 研究分担者

若森 実 (WAKAMORI MINORU)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50222401

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：