

学位論文題名

Pre-motoneuronal inputs to postnatal developing
trigeminal motoneurons

(プレモーターニューロンから三叉神経運動ニューロンへのシナプス入力の変遷)

学位論文内容の要旨

咀嚼運動は、食物の大きさや硬さなどの咀嚼ごとに変化する物理的性状に合わせて、咀嚼力や下顎の運動方向を調節し、食物の性状に合った運動として遂行される。そのような複雑な運動パターンは脳内に存在する。つまり、食物を咀嚼する際の顎運動パターンは、食物の性状を歯根膜機械受容器や筋紡錘が感受し、それらの感覚情報や大脳皮質や扁桃体からの情報を元に脳幹にある咀嚼のパターンジェネレータが食物の性状にあった運動パターンを形成し、その運動指令は最終的にプレモーターニューロンを介して閉口筋および閉口筋運動ニューロンに伝えられる。これまで三叉神経運動核 (MoV) 周囲の網様体にプレモーターニューロンが豊富に存在し、歯根膜機械受容器や筋紡錘からの入力や大脳皮質や扁桃体からの入力を受けることが組織学的、電気生理学的に報告されてきた。我々は、三叉神経上核 (SupV) と顔面神経背外側網様体に、咬筋運動ニューロン (MMN) あるいは顎二腹筋運動ニューロン (DMN) にシナプスを送るプレモーターニューロンが存在することを示してきた。さらに、生後 1-5 日齢の新生仔ラットにおいて、三叉神経主感覚核 (PrV)、三叉神経上核、PrV の背外側網様体 (dRt) および Intertrigeminal region (IntV) からの入力が MMN と DMN に収束していることを示した。しかし、複数のプレモーター領域から単一運動ニューロンへの入力様式の変遷については未だ不明である。そこで本研究では、幼若期ラット前頭断脳幹スライス標本を用いて、MoV 周囲領域を広くレーザー光誘発性化学刺激したときの MMN および DMN の応答をホールセルパッチクランプ法を用いて記録し、プレモーターニューロンから、これらの運動ニューロンでの応答性の差異についての変遷を解析した。

実験には、生後 9-12 日齢の Wistar 系ラット (n=62) を用いた。イソフルランで深部麻酔後断頭し、氷冷したスクロース含有人工脳脊髄液 (260 sucrose, 3 KCl, 2CaCl₂, 2MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucose) 中で脳幹を摘出し、MoV とその周囲の領域を含む厚さ 400 μ m の前頭断脳幹スライス標本を作製した。MMN あるいは DMN からパッチクランプ記録を行い、あらかじめスライス標本に灌流投与した caged-glutamate (300 μ M, 600 μ M) に対して、レーザー光を照射して局所的にグルタミン酸を解離させ、遊離グルタミン酸刺激により誘発される電流応答を解析した。レーザー光は Micropoint レーザーシステム (Photonic Instrument Kawasaki) を用いて、SupV および IntV を含む MoV を囲う L 字型と PrV を含む I 字型に設定した 76 個と 40 個の格子の中心点に照射した。MMN および DMN の同定は、標本作製 1-2 日前に咬筋および顎二腹筋にローダミンあるいは alexa488 含有コレラトキシンをそれぞれ注入し、対応する運動ニューロンへの逆行性

標識により行った。今回用いたレーザー光化学刺激の空間解像度を調べるため、もっとも高確率で運動ニューロンに応答を誘発した SupV ニューロンにパッチクランプを行い、パッチクランプしたニューロンの周りに 100 個の格子を設定し、レーザー刺激を行い、ニューロンに Lucifer Yellow を注入することでニューロンの形態を確認し、実験終了後脳スライスの組織像と刺激格子を重ねることにより、刺激の空間解像度を確認した。全ての実験では、実験終了後、刺激電極より直流電流を流し、脳スライスに 3 つの穴を開け透過光像の写真を撮り、脳スライスをホルムアルデヒドで固定し、100 μ m の厚さで再切し、クリシルバイオレットで染色後、脳スライスの透過光像と組織像を CorelDRAW software 上で重ねることによって刺激部位を確認した。

今回用いたレーザー光化学刺激では、記録したニューロンの細胞体を刺激すると、活動電位が連発で誘発されるが、57 μ m 離れた部位の刺激では、小さな脱分極しか生じなかった。したがって、レーザーで解離されたグルタミン酸が刺激できる範囲はかなり局限していた。しかし、細胞体だけでなく、樹状突起に沿って活動電位が誘発される場所が広がっており、細胞体からもっとも離れた活動電位を誘発する部位と細胞体との距離を調べると、平均で 126 μ m でした。以上より、今回用いたレーザー光刺激の空間解像度は 126 μ m といえる。この結果を用い、データを解析すると、生後 1.5 日齢と同様に生後 9-12 日齢ラットでも MoV 周囲の複数のプレモーターニューロン領域刺激によって単一の MMN (23/26) および DMN (15/20) にシナプス後電流 (PSC) が誘発された。誘発された PSC は 30ms 以内の間隔で 3 発以上繰り返して高頻度に応答が誘発されるバースト状の PSC と単発や 2 つのシナプス応答の間隔が広い低頻度 PSC の 2 つに分類することができ、2 つを区別して解析を行った。PrV の刺激においても、MMN (6/8) および DMN (4/8) とも PSC が誘発された。特に SupV では PSC が誘発されやすく、MMN のほうが DMN よりも有意に高かった (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$)。さらに、1.5 日齢と異なり、9-12 日齢では、低頻度の PSC が誘発される割合がバースト状の PSC の誘発割合に比べて MMN・DMN とも高かった (Mann-Whitney U test, $P < 0.001$)。しかし、1-SupV へ刺激強度を上げるため高濃度の caged-glutamate (600 μ M) を用い刺激すると、バースト状の PSC を高確率で誘発することができた。これは、生後発達変化により、プレモーターニューロンの活動閾値が上昇したことが示唆された。

今回得られた結果より、生後発育に関わらず単一の運動ニューロンへ複数のプレモーターニューロン領域から入力収束していることが示された。また、生後発育変化により SupV 刺激時 MMN のほうが DMN より多くのプレモーターニューロンからの入力を受けていた。さらに、咀嚼中の食物の硬さの変化により、咬筋のほうが顎二腹筋より、筋紡錘や歯根膜機械受容器の影響を受け、筋活動量の促進が起こりやすく、SupV は豊富な筋紡錘や歯根膜機械受容器からの求心性の入力を受け、SupV に存在するニューロンが MoV へ軸索を送っていることが知られている。したがって、DMN と比較し、MMN が SupV から多くの入力を受けることは、咀嚼中の咬筋活動の増大が、歯根膜や筋紡錘の求心性の入力を受け SupV を介して咀嚼のコントロールを行っていることを示唆している。もうひとつ大

きな変化として、得られた PSC がバースト状から低頻度の PSC へ変化していた。これは、プレモーターニューロンが成長したことにより、ニューロン膜の膜容量が増大したことにより、生後 1-5 日齢のラットと比較し、同じ量のグルタミン酸では、バースト状の PSC を誘発することができなくなったことが考えられる。今回、caged glutamate の濃度を 2 倍にすることにより、刺激したグルタミン酸の量を増やすことでバースト状の PSC を得ることができた。これは、上記の考えを支持する。しかし、今回の実験では、生後発育変化によりプレモーターニューロンの特性に変化が生じ、バースト状の発火を生じなくなったことを完全には否定できない。これは、今後の課題となる。以上、このような三叉神経運動ニューロンへのプレモーターニューロンからの入力様式の発育変化は、吸啜から咀嚼への摂食行動転換に関与する可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横山	敦郎
副査	教授	船橋	誠
副査	特任教授	大畑	昇

学位論文題名

Pre-motoneuronal inputs to postnatal developing trigeminal motoneurons

(プレモーターニューロンから三叉神経運動ニューロンへのシナプス入力の変発育変化)

審査は、主査、副査が一堂に会し、まず論文提出者が提出論文の内容の要旨を説明し、次いで論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文要旨

咀嚼運動は、食物の大きさや硬さなどの咀嚼毎に変化する物理的性状に合わせて、咀嚼力や下顎の運動方向を調節し、食物の性状に合った運動として遂行される。そのような複雑な運動を遂行するシステムは脳内に存在する。つまり、食物の性状を歯根膜機械受容器や筋紡錘が感受し、それらの感覚情報や大脳皮質や扁桃体からの情報を元に脳幹にある咀嚼のパターンジェネレータが食物の性状に合った運動パターンを形成し、その運動指令は最終的にプレモーターニューロンを介して閉口筋および開口筋運動ニューロンに伝えられる。また、三叉神経運動核 (MoV) 周囲の網様体には、三叉神経運動ニューロンのプレモーターニューロンが豊富に存在することが形態学的、電気生理学的に知られている。これまでに新生仔ラット (生後 1-5 日齢) において、三叉神経主感覚核 (PrV)、三叉神経上核 (SupV)、PrV の背外側網様体 (dRt) および三叉神経間領域 (IntV) からの入力単一の咬筋運動ニューロン (MMN) と顎二腹筋運動ニューロン (DMN) に収束していることが明らかにされている。しかし、複数のプレモーターニューロンから三叉神経運動核の単一運動ニューロンへの入力様式の生後発達変化についてはよくわかっていない。そこで、本研究では、幼若期ラット (生後 9-12 日齢) の前頭断脳幹スライス標本を用いて三叉神経運動ニューロンのプレモーターニューロンから MMN および DMN のシナプス入力様式の生後発達変化を電気生理学的に解析した。実験には、生後 9-12 日齢の Wistar 系ラットを用いた。吸入麻酔 (イソフルラン) を用いて深部麻酔後、断頭し、氷冷したスクロース含有人工脳脊髄液中で脳幹を摘出し、MoV とその周囲の領域を含む厚さ 400 μm の前頭断脳幹スライス標本を作製し、チャンバー内に標本を固定し

た。本研究では、caged-glutamate (300 μ M・600 μ M)を用い、レーザー光を照射してグルタミン酸を局所的に解離させることによって、プレモーターニューロンの電氣的活動を誘発し MMN あるいは DMN の電流応答を調べた。レーザー光は SupV および IntV を含む MoV を囲う L 字型に配置した 76 個の格子と PrV を含む 40 個の格子の中心点に照射した。結果は、生後 1-5 日齢ラットと同様に生後 9-12 日齢ラット (n = 62) でも MoV 周囲の複数のプレモーターニューロン領域刺激によって単一の MMN (n = 26) および DMN (n = 20) にシナプス後電流 (PSC) が誘発された。さらに、PrV の刺激においても、MMN (6/8) および DMN (4/8) とも PSC が誘発された。特に、SupV では PSC が誘発されやすく、MMN の方が DMN よりも有意に高かった (Mann-Whitney U test、 $P < 0.05$)。さらに、1-5 日齢と異なり、9-12 日齢では、低頻度の PSC が誘発される割合がバースト状の PSC の誘発割合に比べて MMN と DMN とともに高かった (Mann-Whitney U test、 $P < 0.001$)。しかし、1-SupV へ高濃度の caged-glutamate を用いた刺激では、バースト状の PSC を誘発することができた。これは、生後発達変化で、プレモーターニューロンの活動閾値が上昇したことが示唆された。以上の結果は、9-12 日齢のラットも 1-5 日齢と同様に SupV や IntV および PrV から入力収束しており、SupV からの入力の変化は、吸啜から咀嚼への転換に寄与していることが示唆される。

審査の内容

審査における各委員からの主な質問は以下の通りであった。

1. 咀嚼におけるパターンジェネレータと歯根膜の関係について
2. パッチクランプ法の手技について
3. スポットエリアの大きさ (半径) と結果の関連について
4. 活動電位のパターン (単発と 3 発) の変化の理由について
5. 生後 9-12 日において咬筋が顎二腹筋に比較し優勢な理由について
6. 吸啜期における咀嚼パターンの発現について
7. 吸啜への舌の関与について

これらの質問に対して、学位申請者から明快な回答が得られたとともに、今後の研究に対する課題と展望も示された。

本研究は、三叉神経運動ニューロンへのプレモーターニューロンからの入力様式の発育変化が吸啜から咀嚼への摂食行動転換に関与している可能性を示すものであり、その内容は高く評価された。よって学位申請者は博士 (歯学) の学位授与に値するものと判定した。