原	著
---	---

吸啜舌運動の中枢性リズム発生器の局在

—— 新生仔ラット摘出脳幹-脊髄標本における解析 ——

劉 嘉

東京医科歯科大学歯学部口腔生理学講座（指導：中村嘉男教授）

（1997年9月29日 受付）

Localization of Central Rhythm Generator for Tongue Movements in Sucking —— Analysis of Isolated Brainstem-spinal cord Preparation from Newborn Rats ——

Liu Jia

Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Director : Prof. Yoshio Nakamura)

Localization of the central rhythm generator (CRG) for tongue movements in sucking was studied in *in vitro* brainstem-spinal cord preparations from newborn rats, using the rhythmical sucking-like activity (RSA) of the hypoglossal nerve (XII) induced by perfusion of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) as the index of sucking. Sulforhodamine 101 (S 101), a fluorescent dye taken up by neurons in an activity dependent manner, was applied to the preparations which showed only spontaneous inspiratory activity in XII without NMDA application and to those which showed NMDA-induced RSA in XII. In both preparations, the neurons labelled with S 101 were found in the hypoglossal nucleus, facial nucleus, ambiguous nucleus, solitary tract nucleus, trigeminal spinal nucleus, inferior olivary nucleus, gigantocellular, lateral and ventral reticular nuclei. More neurons were labelled more intensely in the latter preparations. The difference was particularly conspicuous in the gigantocellular reticular nucleus, suggesting that it plays an especially important role in central rhythm generation of sucking. The NMDA-induced RSA in XII persisted after removal of the dorsal medulla oblongata, the caudal pons constituting a part of the CRG for mastication, and the trigeminal spinal nucleus relaying afferents in sucking reflex. It was concluded that the CRG for tongue movements in sucking is localized in the ventromedial medulla oblongata.

I. 諸 言

吸啜および咀嚼運動は顎・舌・顔面の協調運動によって遂行されるリズム運動であり、この点で呼吸ならびに歩行などのリズム運動と共通の特徴を有している。このリズム活動の運動司令は基本的に中枢神経内で形成されており、この形成機構

は中枢性リズム発生器と呼ばれている。咀嚼運動の中枢性リズム発生器については、成熟モルモットにおける解析により、巨大細胞網様核を含む橋尾側部ならびに延髄網様体内側部に局在することが明らかにされている^{1~3)}。

母乳の吸啜から固形食物の咀嚼への転換は哺乳動物の摂食行動の生後発達の基本的特徴である

が、吸啜リズムについては、モルモット新生仔における解析によって、咀嚼と同じく、中枢神経系に内在するリズム発生器により形成されること、ならびに、このリズム形成には咀嚼のリズム発生器の局在する巨大細胞網様核を含む橋・延髄網様体の内側部が必須の役割を演ずることが明らかにされている⁴⁾。しかし、咀嚼と吸啜とが同一の中枢性リズム発生器によって形成されるのか、あるいは両者が別個のリズム発生器によって形成されるのかについては全く不明である。

哺乳動物の遊離中枢神経標本は、呼吸⁵⁻¹⁰⁾および歩行運動^{9,11-13)}のようなリズムミカルな運動の中枢性パターン形成機構の生理学的、薬理学的研究のために、きわめて価値の高い標本として用いられてきた。そして、灌流液中への興奮性アミノ酸の投与によって、下等脊椎動物^{14,15)}ならびに哺乳動物の新生仔^{9,12,13,16)}から遊離した *in vitro* 脊髄標本の前根からリズムミカルな活動が誘発されることが明らかにされている。また、後肢の筋を付けたまま遊離したラット新生仔の *in vitro* 標本で、灌流液中への NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 投与によって、歩行運動様の筋電図活動が誘発されている¹¹⁾。これまでの研究で、NMDA ならびに Kainate などの受容体の薬物による活性化によって歩行様神経活動が誘発され、NMDA 受容体は特に有効であること^{12,15,17,18)}や、quisqualate 受容体の活性化では誘発されないことが明らかにされている^{11,12,14,18,19)}。

これに対して、哺乳動物の摂食行動に関連するリズムミカルな口腔・顔面運動の中枢ニューロン機構の研究のための *in vitro* 標本は開発されていなかったが、Suzue (1984) の方法によって作成したラット新生仔の *in vitro* 脳幹-脊髄標本において、灌流液中への NMDA 投与によってリズムミカルな口腔・顔面運動に相当するリズムミカルな群発運動を舌下神経に誘発する方法が開発された²⁰⁻²²⁾。舌のリズムミカルな運動は、哺乳動物の新生仔で呼吸・吸啜・嚥下に一致して認められるが、*in vitro* 脳幹-脊髄標本への NMDA 投与によって誘発されたリズムミカルな舌下神経活動は、種々の証拠か

ら吸啜運動中のリズムミカルな活動に対応すると想定される²³⁾。

そこで、本研究では、まず NMDA で誘発した舌下神経の吸啜様リズム活動を吸啜リズム活動の指標として、その発現に一致して活性化されるニューロンを標識することによって、吸啜運動のリズム発生に関与するニューロンの局在を明らかにすることを試みた。これらの活動ニューロンの標識には、蛍光色素 Sulforhodamine 101 (S 101) が適していると思われた。その理由は、この色素によって、興奮した運動神経終末の標識²⁴⁾、*in vitro* 脳幹-小脳標本の脊髄背外側束の電気刺激により活動を示す赤核ニューロンの標識²⁵⁾に成功した報告があるからである。

次いで、この標識ニューロンの脳幹内の分布に基づいて、*in vitro* 脳幹-脊髄標本にさまざまな切断を加え、吸啜様活動の中枢性形成に関与するリズム発生器の局在を検索した。

II. 方 法

1. 標本の作製と記録

実験には生後 0-3 日のウィスター系ラット新生仔 45 匹 (体重 5-7 g) を用いた。Suzue⁹⁾ の方法に従って、エーテル麻酔下で小脳を除去し、吻側は四丘体間のレベルで除脳した後、尾側は第 8 頸髄のレベルで切断し、脳幹および脊髄を、三叉・顔面・舌下神経および頸髄前根ならびに後根とともに摘出した。次いで、この摘出脳幹-脊髄標本を記録槽中に腹側面を上にして固定し、95% O₂-5% CO₂ 混合ガスで飽和した人工脳脊髄液 (130 mM : NaCl, 3.0 mM : KCl, 1.25 mM : KH₂PO₄, 3.0 mM : CaCl₂, 1.3 mM : MgSO₄, 26 mM : NaHCO₃, 28.8 mM : glucose ; pH 7.5 ; 25-27°C) で灌流した (5 ml/min)。横隔神経に軸索を送る第 4 あるいは第 5 頸髄前根および舌下神経にガラス吸引電極を装着して、神経活動を記録した (図 1)。ガラス吸引電極の先端内径は 50-130 μ m で、内部は灌流液と同一組成の人工脳脊髄液で満たした。神経活動は 2 チャンネル前置増幅器 (日本光電 : JH-220 J, 周波数帯域 : 0.08-10

図1 実験系の構成

標本を設置する記録槽は95%O₂-5%CO₂混合ガスで飽和したpH 7.5の人工脳脊髄液で灌流する。灌流液は重力により記録槽内に導き、水流ポンプによって吸引することで灌流を行い、記録槽内の温度計によって液温をモニターし、ヒーターによって液温を25~27℃に維持する。記録は舌下神経および第4あるいは第5頸髄前根にガラス吸引電極を装着して行う。NMDAは三方活栓を用いて灌流液中加入する。

kHz)と生体電気用増幅器(日本光電:AB-651J, 周波数帯域:0.08~10 kHz)で増幅し,オシロスコープ(Kenwood:CS-8010)とサーマルレコーダ(NEC:8M36)でモニターした。またJH-220Jの出力はデータレコーダ(TEAC:RD-135T, 周波数帯域:DC~3 kHz)に入力し,実験終了後に,記録を再生してデータ処理を行った。

2. NMDAの投与

NMDA投与前,舌下神経および第4あるいは第5頸髄前根に,自発性の呼吸リズム活動が出現していることを確認した後,灌流液中にNMDA(15~20 μM)を5分間投与して,舌下神経に自発性呼吸活動と異なるリズムミカルな神経活動を誘発し,この活動を持続するためにNMDA(4~8 μM)を持続的に投与した。

3. Sulforhodamineの投与

45匹中の10匹のラット新生仔から摘出した脳幹-脊髓標本を用いた。対照として5匹でNMDAを投与せず自発性呼吸活動のみが観察される条件

で,0.001~0.0025%Sulforhodamine 101(S 101)を含む人工脳脊髄液で60~141分間灌流した。ほかの5匹ではNMDAの投与によって誘発したりズミカルな活動が出現した後,NMDA(4~8 μM)および0.001~0.0025%S 101を含む人工脳脊髄液で35~168分間灌流した。いずれの標本も,実験終了後,4%Paraformaldehyde phosphate buffer(pH 7.4)を用いて固定し,厚さ40~60 μmの前頭断の連続凍結切片を作成し,蛍光顕微鏡下でS 101で標識されたニューロンおよび線維の局在部位を組織学的に検索した。

4. 脳幹の切断

45匹中の35匹のラット新生仔から摘出した脳幹-脊髓標本を用いて,切断実験を行った。NMDA投与によって舌下神経に吸啜様リズム活動が誘発されたのを確認した後,両刃の剃刀の刃から作成した切断刀を用いて,標本に前頭面,水平面あるいは矢状面方向の切断を加えた。切断後,NMDA(15~20 μM)を再び投与し,舌下神経から,吸啜

様のリズムミカルな活動が誘発されるか否かを検討した。実験終了後、標本を 4% Paraformaldehyde phosphate buffer (pH 7.4) で固定し、厚さ 40~60 μm の前頭断あるいは水平断の凍結連続切片を作成し、cresyl violet で染色し、切断後に残存する領域を組織学的に検索した。

III. 結 果

1. NMDA 投与により発現する舌下神経のリズム活動出現に一致して活動するニューロンの局在

10 匹のラット新生仔から遊離した *in vitro* 脳幹-脊髓標本で NMDA 投与前には自発性的リズムミカルな群発活動が、横隔神経に軸索を送る第 4 あるいは第 5 頸髄前根ならびに舌下神経に出現した。図 2 A はその 1 例を示す。この群発活動は周期が 12~15 s で、舌下神経と頸髄前根に同期して出現し、持続時間 0.8~1.5 s、振幅は 100~400 μV で、急速な上昇相およびこれより緩徐な下降相から構成されていた。

この 10 例中、5 例で NMDA (5~20 μM) の投与により、舌下神経に頸髄前根の吸息活動と同期した活動に加えて、このリズム活動とは別のリズムミカルな群発活動が出現した (図 2 B 上段)。NMDA で誘発されたこの群発活動の周期は 2.5~3.0 s で吸息活動の周期より著しく短く、持続時間は 0.6~1.3 s で、上昇相および下降相ともに吸息活動より緩徐であり、振幅は 40~170 μV で、明らかに小さかった (図 2 B)。この群発活動は、吸息活動とは周期、振幅、波形によって容易に区別された。

図 3 は、NMDA 投与によって舌下神経にリズム活動が出現した 5 例中の 1 例で、S 101 によって標識されたニューロンの分布を示す舌下神経中央付近の前頭断切片の顕微鏡写真である。図 3 A で白く見える点が S 101 で標識された細胞である。図 3 B は A の白枠で囲まれた領域の強拡大の顕微鏡写真であり、舌下神経核の部位に相当している。標識された舌下神経運動ニューロンの細胞体中に S 101 が球状に集積している像が観察された。一方、下オリーブ核のニューロンのような小

図 2 NMDA の投与によって舌下神経に誘発されるリズムミカルな神経活動

A: NMDA 投与前の記録。B: 灌流液中に NMDA (6 μM) を投与した際の記録。上下 2 対の記録は、それぞれ舌下神経 (XII) と第 5 頸髄前根 (C5) のリズムミカルな群発活動を示し、それぞれの下段は群発活動の原波形、上段はその積分波形を表す。A では自発性の吸息活動が XII と C5 に見られる。B では XII に吸息活動とともにそれとは明らかに異なりリズムミカルな群発活動が出現している。

型細胞が S 101 によって数多く標識された部位や、標識された線維は弱拡大の顕微鏡写真では領域全体が瀰漫性に蛍光を示した。

図 4 A は対照として、NMDA を投与せず自発性吸息活動のみが観察された条件で S 101 の 120 分投与によって標識された脳幹ニューロンの分布の 1 例を示したものである。舌下神経核 (XIIN)、顔面神経核 (VIIN)、疑核 (AM)、巨大細胞網様核 (GC) 尾側部、孤束核 (Sol)、三叉神経脊髄核 (SpV)、下オリーブ核 (IO) などに標識された細胞体が認められた。

図 4 B は NMDA 投与によってリズムミカルな舌

図3 NMDAで誘発された舌下神経のリズム活動出現に一致してS 101によって標識された脳幹ニューロンの局在部位を示す前頭断標本の顕微鏡写真

A: 舌下神経核中央レベルにおける前頭断切片。白く見える点がS 101で標識された細胞。B: Aのなかの白枠で囲まれた舌下神経核の領域の強拡大写真

下神経活動を示した群でS 101によって標識された脳幹ニューロンの分布の1例を示している。NMDA持続投与で誘発したリズムカルな舌下神経活動出現中にS 101を140分投与したこの例では、図4Aに比べて、舌下神経核、巨大細胞網様核、孤束核、三叉神経脊髄路核などで、標識ニューロン数の増加と蛍光の強度の上昇が観察された。

表1は対照群とNMDA投与群とのS 101で標識された細胞の分布を一覧表として示したものである。標識されたニューロンは舌下神経核、顔面神経核、疑核、孤束核、三叉神経脊髄路核、下オリーブ核、外側網様核、巨大細胞網様核、延髄腹側網様核、頸髄後角などに見いだされた。薄い陰影は中等度蛍光を示す部位を示しており、顔面神経核、孤束核、外側網様核に一致し、小型ニューロンや線維も標識されていた。濃い陰影は小型ニューロンや線維が数多く標識されたため、さらに強い蛍光を示した部位を示し、舌下神経核、三叉神経脊髄路核、下オリーブ核、頸髄後角などに分布していた。

以上の結果から、NMDA投与による吸啜リズム活動の出現に対応して活動の上昇しているニューロンの存在する部位が明らかになったので、次に脳幹-脊髄標本に種々の切断を加えて、

NMDAによる舌下神経のリズム活動の誘発に必要な部位を検索した。

2. 脳幹の切断

1) 前頭面切断

図5は脳幹-脊髄標本に舌下神経根の最吻側レベルならびに延髄-脊髄境界部で前頭断(図5A)を加えた結果の1例を示す。切断後も、NMDA(6 μ M)の投与により舌下神経に吸啜リズム活動が出現し、吸息活動も残存した(図5B)。図5Cの水平断標本で見られるように、この例では切断により顔面神経核の尾側部より吻側が除去されているが、下オリーブ核の吻側端レベルより尾側は残存していた。これと同一レベルの切断を行ったほかの8例の標本においても、自発性吸息活動およびNMDA投与によるリズム活動の両者とも残存した。しかし、これより尾側のレベルで前頭断を加えた標本4例では、NMDA(6 μ M)を投与しても、舌下神経に吸啜リズム活動ならびに吸息活動は出現した例はなかった。これらの例では、組織学的な検索の結果、顔面神経核とともに、下オリーブ核および舌下神経核の一部も除去されていることが明らかにされた。

2) 水平面切断

図6は延髄-脊髄標本に水平切断(図6A)を加

図4 S101で標識されたニューロンの分布を示す脳幹前頭断面の模式図

A：NMDAを投与せず自発吸息活動のみが観察される条件でS101によって標識された脳幹ニューロンの分布。B：NMDA投与群でS101によって標識された脳幹ニューロンの分布。a, b, cは、それぞれ顔面神経核、舌下神経核中央部、C2 (A) あるいはC4 (B) レベルに相当する。黒丸は強く標識された細胞体の存在部位で、陰影を付けた部位は、標識されているが、個々の細胞体を明瞭に区別できない領域を示す。

[略語] Am：疑核, DH：後角, GC：巨大細胞網様核, IO：下オリブ核, IZ：中間層, LRN：外側網様核, MRF：延髄腹側網様核, PGC：傍巨大細胞網様核, Sol：孤束核, SpV：三叉神経脊髄路核, VH：前角, VIIN：顔面神経核, XIIIN：舌下神経核

え、背側を除いた結果の1例を示す。薄束結節と楔状束結節を含む延髄背側部を除去した後も、NMDA ($6\mu\text{M}$) の投与により、舌下神経に吸啜リズム活動と吸息活動が観察された (図6B)。組織学的検索の結果、孤束核が除去されていることが明らかになった (図6C)。図6Aと同様な水平切断を全部で10匹から得られた延髄-脊髓標本で行ったが、切断後も全例でNMDAによる吸啜リズム活動は残存した。これに対して、これより腹側のレベルで水平切断を加えた5例では、いずれの標本でも、切断後はNMDA ($6\mu\text{M}$) を投与

しても舌下神経の吸啜リズム活動も吸息活動も観察されなかった。組織学的な検索の結果、これらの例では孤束核とともに舌下神経核の一部も除去されていることが見いだされた。

3) 矢状面切断

図7は延髄-脊髓標本の外側部に矢状方向の切断 (図7A) を加えた結果の1例を示す。切断は舌下神経根が延髄から出る部位の外側に直接隣接する部位で両側性に加えた。切断後、NMDA ($6\mu\text{M}$) を投与によって舌下神経に誘発されていた吸啜リズム活動および吸息活動の両者とも残存した

表1 *in vitro* 脳幹-脊髄標本でS 101によって標識された領域

#	group	S101		Cervical Cord			Brainstem									
		ppm	min	DH	IZ	VH	XII N	VII N	Am	Sol	SpV	IO	LRN	GC	MRF	
1	N	25	35	+++	++	++	+++	+	+	+	+	+++	+++	++	++	
2		25	65	+++	++	++	+++	+	+	+	+++	+++	++	++	+	
3		25	140	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+++	+++	++	+++	+++	
4		25	110	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+++	+	+++	++	
5		10	168	+++	++	+++	+++	+	+	+	+++	+++	++	+++	+++	
6	C	25	60	++	++	++	+++	++	+	+	++	+++	++	++	++	
7		25	141	++	+	++	+++	++	+	+	++	+++	+	+	++	
8		25	120	++	+	++	+++	++	+	+	++	+++	++	+	+	
9		10	65	++	+	+	+++	+	+	+	++	+++	+		+	
10		25	60	++	+	++	+++	++	+	+	++	+++	+		+	

#：遊離脳幹-脊髄標本の番号。group, N：NMDA 投与群；C：NMDA 非投与群。S 101 の濃度は ppm, 投与時間を min で表す。切片当たり強く標識された細胞体の数は次のように示してある。+：5～9 個, ++：10～14 個, +++：15 個以上。薄い陰影を付けた部位は中等度に標識された領域, 濃い陰影は強く標識された領域を示す。

[略語]DH：後角, IZ：中間層, VH：前角, XII N：舌下神経核, VII N：顔面神経核, Am：疑核, Sol：孤束核, SpV：三叉神経脊髄路核, IO：下オリブ核, LRN：外側網様核, GC：巨大細胞網様核, MRF：延髄腹側網様核

(図7B)。この例では矢状方向の切断によって三叉神経脊髄路核は両側とも除去されていた(図7C)。これと同一の矢状方向の切断を加えた全部で7例の標本のいずれにおいても, NMDA 投与による舌下神経のリズム活動は残存した。これより内側での切断は, 舌下神経も切断してしまうため本研究では行わなかった。

IV. 考 察

1) NMDA で誘発される舌下神経のリズム活動の関与する口腔機能

舌のリズミカルな活動は, 哺乳動物では呼吸・咀嚼・吸啜・嚥下などに一致して認められる^{5,26)}。それでは NMDA によって *in vitro* 脳幹-脊髄標

本で誘発された舌下神経のリズミカルな群発活動は, これらの機能のどれに対応する活動なのだろうか? 種々の証拠から *in vitro* 脳幹-脊髄標本への NMDA 投与によって誘発されたリズミカルな舌下神経活動は, 吸啜運動中のリズミカルな舌運動に対応すると想定される²³⁾。まず, NMDA 投与によって誘発されたこのリズミカルな舌下神経活動は, 周期も群発の振幅, 時間経過のどちらも, 吸気運動に対応する群発活動とは全く相違している。次に, NMDA 投与によって誘発される舌下神経活動は, 第4あるいは第5頸髄前根から記録される吸気運動に対応する群発活動とは同期しない。また, ラットの咀嚼行動は, 生後12日頃歯の萌出と一致して出現する²⁶⁾。さらに, 舌運動のパ

図5 橋ならびに脊髄を除去するための前頭切断

A: 切断の模式図。B: 切断後、舌下神経のリズミカルな活動。高振幅の群発活動は自発性の吸息リズム活動。C: 水平断標本の顕微鏡写真。右は切断により除去された吻側部分、左は切断後の残存部分。顔面神経核の尾側端より吻側の部位が除去され、下オリーブ核の吻側端より尾側の部位が残っている。

[略語] IO: 下オリーブ核, VIIN: 顔面神経核

タンには、吸気運動と吸啜運動との間で対照的な相違が見られる。すなわち、吸気運動では、下顎の大きな下制とともに舌尖は大きく下方に移動し、舌体部は正中中部が陥凹して気道を拡張するパターンが見られるが、母乳の吸啜運動では、下顎の下制は軽度で舌尖がリズミカルに挙上し舌体が下制するパターンを示す。口腔・顔面組織を付けたまま作成した遊離脳幹-脊髄標本では、NMDA 投与によって誘発されるリズミカルな舌運動は舌尖がリズミカルに挙上し舌体が行くパターンを示し、ラット新生仔の自然の母乳吸啜行動における舌運動のパターンと実質的に同一である²²⁾。また、自然の状態では、吸啜行動に伴って嚥下が起こるが、

図6 延髄背側部を除去するための水平切断

A: 切断の模式図。B: 切断後 NMDA の投与によって舌下神経のリズミカルな活動。高振幅の群発活動は自発性の吸息リズム活動。C: 切断部位を示す前頭断組織切片の顕微鏡写真。孤束核を含めて延髄背側部が除去されている。

[略語] IO: 下オリーブ核, XIIIN: 舌下神経核

ラットの *in vitro* 標本でグルタミン酸やその作動薬の孤束核への微量注入によって嚥下を誘発することができることが報告されている²⁷⁾。したがって、NMDA を灌流液に加えることによって *in vitro* 脳幹-脊髄標本に誘発されるリズミカルな舌下神経活動は、NMDA が孤束核ニューロンに作用して誘発された嚥下運動の出現に対応する神経活動の可能性がある。しかし、嚥下運動は三叉・顔面・舌咽・舌下神経などの脳神経のみならず、上部頸髄前根を経由する脊髄神経によって支配される多数の異なった筋群の協調運動である²⁸⁾。したがって、NMDA で誘発される舌下神経のリズミカルな活動が嚥下運動に関連する神経活動であ

図7 延髄外側部を両側性に除去するための矢状面方向の切断

A: 切断の模式図。B: 切断後 NMDA の投与によって出現した舌下神経のリズミカルな活動。高振幅の群発活動は自発性の吸息リズム活動。C: 切断部位を示す前頭断組織切片の顕微鏡写真。三叉神経脊髄路核が両側性に除去されている。

[略語] IO: 下オリーブ核, XII N: 舌下神経核

れば、上部頸髄前根にも群発活動が出現するはずである。しかし、*in vitro* 脳幹-脊髄標本ではリズムミカルな舌下神経活動に伴って上部頸髄前根にこのような群発活動は出現しなかった。このようなことから、NMDA を灌流液中に加えることによって *in vitro* 脳幹-脊髄標本に誘発されるリズムミカルな舌下神経活動は、吸吸運動時の舌運動に関与する活動と考えるのが最も妥当である。

2. Sulforhodamine 101 によるニューロンの標識

Sulforhodamine 101 (S 101) は、スルホン酸基を持つ小分子量の蛍光物質であり、エンドサイトーシスによってニューロンに取り込まれると考えられている²⁵⁾。

S 101 は、興奮した運動神経終末から選択的に取り込まれること²⁴⁾、視覚皮質のてんかん様活動

を示す部位の神経線維終末に選択的に取り込まれる²⁹⁾ことや、*in vitro* 脳幹-小脳標本の脊髄刺激により活動を示す赤核ニューロンに取り込まれることが報告されている。神経-筋伝達が活性化されると、運動神経線維終末にかけるシナプス小胞の代謝回転が著しく促進される³⁰⁾ので、S 101 は活動性依存性にニューロンへ取り込まれると考えられる。しかも、ニューロンの単発あるいは少数のスパイク発射では取り込みは起こらず、取り込みにはニューロンの群発発射のような強い興奮が必要であることが、カメの *in vitro* 脳幹-小脳標本の赤核ニューロンで示されている²⁵⁾。したがって、本研究で S 101 によって標識されたニューロンは、リズムミカルな群発活動などの興奮を起こしたニューロンであることが示唆される。

Keifer ら (1992) によれば、S 101 は赤核ニューロンの軸索終末に認められる場合もあるが、ほとんどの標識は細胞体および樹状突起に存在している。しかも、S 101 は細胞質に均一的に分布しているのではなく、膜で包まれた構造に特徴的な小胞状の像を示す²⁵⁾。本研究においても、S 101 は細胞体に大量に認められ、しかも円形の小胞状の構造として認められた。

細胞体の S 101 は、シナプス前軸索終末において取り込まれた S 101 が逆行性軸索輸送によって細胞体へ運ばれたと考えることもできるが、細胞体あるいは樹状突起から直接取り込まれた可能性も否定できない。実際に、小脳プルキンエ細胞では、標識物質が樹状突起で取り込まれ、30~90 分で細胞体に到達することが示されている³¹⁾。

本研究において S 101 によって細胞体が標識されたニューロンは、顔面神経、舌下神経などの脳神経運動ニューロンのように、切断された軸索断端が開放されたままで灌流液中の S 101 と接して、断端から S 101 が拡散によって軸索内へ流入し、それが軸索輸送によって細胞体まで運ばれた可能性が除外できない。しかし、これらの脳神経運動ニューロンの細胞体の S 101 も小胞状の像を呈することを考えると、この標識物質が細胞体あるいは樹状突起から取り込まれた可能性も除外で

きないであろう。

これらの脳神経以外の S 101 で細胞体が標識された脳幹ニューロンは、いずれも軸索を脳幹内に終止するので、S 101 は軸索終末からの取り込みと細胞体あるいは樹状突起からの取り込みの可能性と、どちらの可能性も考えられる。本研究では、S 101 で瀰漫性に蛍光を呈し、個々の微細構造を識別できない領域が認められたが、このなかには S 101 を取り込んだ脳幹ニューロンの軸索終末が含まれているかもしれない。

NMDA によるリズムカルな舌下神経活動出現中に、灌流液中に加えた S 101 によって標識される脳幹ニューロンのなかには、呼吸活動をはじめとして舌下神経の吸啜様リズム活動とは直接関係のない活動と関連して活性化されたニューロンが存在するであろう。NMDA 非投与群と NMDA 投与によりリズムカルな吸啜様活動が出現した群とで、S 101 による標識の結果を比較すると、後者のほうが標識細胞の数も多く、また瀰漫性の蛍光を示す領域の蛍光の強度も高いことは、吸啜様活動の出現に対応して活性化されたニューロンの数の増加ならびに活動上昇と関連させて、一般的に理解することができよう。しかし巨大細胞網様核では、NMDA 非投与群 5 例中 2 例で S 101 で標識されたニューロンは全く認められず、残りの 3 例でも標識されたニューロンはわずかであったのに対して、NMDA 投与による吸啜様リズム活動を示した 5 例の全例で標識ニューロンが見いだされ、しかもその数も NMDA 非投与群に比して著しく多いことは、この核が吸啜様リズム活動の中枢性形成に特に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

3. 脳幹切断による吸啜様リズム活動の中枢性パタン発生器の局在部位の検索

成熟モルモットでは、咀嚼運動の中枢性リズム発生器は巨大細胞網様核を含む橋の尾側部から吻側延髄内側部に局在することが明らかにされている^{1-3,32)}。また、傍巨大細胞網様核、巨大細胞網様核などの延髄網様核内側部は、モルモット新生仔で大脳皮質刺激によるリズムカルな吸啜様顎・顔

面運動の誘発に必須の役割を果たしていることが報告されている⁴⁾。さらに、本研究における S 101 の投与により、NMDA による舌下神経の吸啜様リズム活動出現に一致して、巨大細胞網様核ニューロンが強く標識された。これらの結果は、巨大細胞網様核が吸啜様リズム活動の発現に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、本研究において、成熟モルモットで咀嚼のリズム発生器の局在部位の吻側部である顔面神経レベルの橋尾側部を前頭断によって除去しても、NMDA による吸啜様リズム活動の誘発は影響を受けなかった。このことは、新生仔ラットの吸啜リズム発生器は、成熟モルモットの咀嚼リズム発生器とは局在を異にしていることを意味している。もし成熟ラットの咀嚼リズム発生器が成熟モルモットと同じく橋尾側部と延髄吻側部に局在すると仮定すれば、生後発達過程で吸啜から咀嚼への転換に一致して、摂食運動の中枢性パタン形成機構に再構成が起こるという興味深い可能性が示唆される。晩熟動物であるラットに対して、モルモットは早熟動物であり、出生時にすでに永久歯列を有し、固形食物の咀嚼が可能であることを考えると、モルモット新生仔では、ラットの生後のこの再構成が出生前にすでに完了しているのかもしれない。

孤束核には嚥下や呼吸に関係するニューロンが存在している³³⁾。また成熟ラットにおける孤束核へのグルタミン酸局所投与により、嚥下が誘発されることから、孤束核を中心とする延髄背側領域に嚥下の中枢性パタン発生器が存在することが想定されている^{27,34,35)}。しかし、本研究では、孤束核を含む延髄背側領域を切断によって除去した後でも、NMDA によって舌下神経に吸啜様リズム活動が誘発された。このことは、新生仔の吸啜様リズムの中枢性形成機構は成熟動物の嚥下の中枢性パタン形成機構とは独立の別のニューロン集団によって構成されていることを意味している。このことは、本研究で、孤束核における S 101 によるニューロンの標識の結果が、NMDA 非投与群でも NMDA 投与によって吸啜様リズム活動が出現

している群と同様であった結果からも支持される。

三叉神経脊髄路核にはグルタミン酸受容体が豊富に存在していることが報告されている³⁶⁻³⁸⁾。本研究における S 101 投与によって、NMDA による舌下神経の吸啜様リズム活動の出現に一致して、三叉神経脊髄路核の標識の強度が明らかに上昇した。このことは、S 101 投与による舌下神経の吸啜様リズム活動の誘発に、三叉神経脊髄路核が関与する可能性を示唆しているが、遊離脳幹に矢状断を加えて、三叉神経脊髄路核を含む延髄外側部を両側性に除去しても、NMDA 投与による舌下神経の吸啜様リズム活動の誘発効果は残存した。したがって、三叉神経脊髄路核は舌下神経の吸啜様リズム活動の中枢性形成に必須の役割を果たしてはいない。

以上のことから、ラットの舌下神経の吸啜活動の中枢性リズム発生に必須の構造は、巨大細胞網様核、腹側網様核などを含む延髄腹内側領域に局在すると結論される。

V. 要 約

ラット新生仔 *in vitro* 脳幹-脊髄標本を用いて、NMDA の灌流液中への投与によって誘発される舌下神経の吸啜様リズム活動を指標にして、吸啜運動のリズムを発現させる中枢運動司令の形成に必須のニューロン集団あるいは回路（中枢性リズム発生器）の局在を探索した。

活動依存性にニューロンに取り込まれる蛍光色素 Sulforhodamine 101 (S 101) を、NMDA 投与によって吸啜様リズム活動が舌下神経に出現中に投与し、これによって標識されるニューロンの局在および数を、NMDA を投与せず自発性のリズミカルな吸気活動だけが出現している標本において標識されるニューロンの局在および数と比較した。どちらの場合にも、舌下神経核、顔面神経核、疑核、孤束核、三叉神経脊髄路核、下オリーブ核、外側網様核、巨大細胞網様核、腹側網様核などに認められた。これらの標識結果を、NMDA 投与群と非投与群とで比較すると、投与群のほう

が非投与群より、標識されたニューロンの数が多く、また蛍光も強かった。これは、吸啜様リズム活動の出現に一致して活性化されたニューロンの数ならびに活動の増加を反映するものと想定される。これらの核のなかで、巨大細胞網様核では、NMDA 非投与群では標識されたニューロンの認められなかった例が 5 例中 2 例認められたのに対して、投与群では 5 例全例で標識ニューロンが見いだされ、またその数も非投与群で標識ニューロンが認められた例に比して著しく多かった。この結果は、この核が吸啜運動の中枢性リズム形成で特に重要な役割を果たしていることを示唆している。

NMDA 投与による舌下神経の吸啜様リズム活動は、成熟動物の咀嚼リズム形成に必須の役割を果たす領域の一部を構成する顔面神経核レベルの橋尾側部、孤束核を含む延髄背側部、吸啜反射で感覚性入力伝達に関与する三叉神経脊髄路核を、脳幹に切断を加えて除去しても残存した。

以上の結果から、吸啜舌運動の中枢性リズム発生器は、巨大細胞網様核、腹側網様核を含む延髄腹内側部に局在すると結論される。

謝 辞

稿を終わるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜った東京医科歯科大学歯学部口腔生理学講座中村嘉男教授に謹んで謝意を表します。また終始、懇切なるご教示、ご校閲くださった口腔生理学講座助手片倉伸郎先生に心より感謝いたします。さらに、本研究に際し、ご協力いただきました口腔生理学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、第 75 回 IADR 学会学術大会、第 60 回ならびに第 61 回口腔病学会学術大会にて発表した。

文 献

- 1) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. : Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J. Neurophysiol.* 55 : 806-825, 1986.
- 2) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. : Role

- of corticobulbar projection neurons in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J. Neurophysiol.* 55 : 826-845, 1986.
- 3) 野崎修一：咀嚼リズム発見に關与する神経機構。口病誌 60 : 327-343, 1993.
 - 4) Iriki, A., Nozaki, S. and Nakamura, Y. : Feeding behavior in mammals ; corticobulbar projection is reorganized during conversion from sucking to chewing. *Brain Res.* 44 : 189-196, 1988.
 - 5) Suzue, T. : Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol.* 354 : 173-183, 1984.
 - 6) Walton, K. and Llinas, R. : An isolated *in vitro* preparation of the neonatal rat brain stem and spinal cord. *Soc. Neurosci. Abstr.* 11 : 24, 1985.
 - 7) Harada, Y., Kuno, M. and Wang, Y. Z. : Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat *in vitro*. *J. Physiol.* 368 : 679-687, 1986.
 - 8) Onimaru, H. and Homma, I. : Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* 403 : 380-384, 1987.
 - 9) Smith, J. C. and Feldman, J. L. : *In vitro* brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J. Neurosci. Methods.* 21 : 321-333, 1987.
 - 10) Onimaru, H. : Studies of the respiratory center using isolated brainstem-spinal cord preparations. *Neurosci. Res.* 21 : 183-190, 1995.
 - 11) Kudo, N. and Yamada, T. : *N*-methyl-D, L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 75 : 43-48, 1987.
 - 12) Smith, J. C., Feldman, J. L. and Schmidt, B. J. : Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brainstem-spinal cord *in vitro*. *FASEB J.* 2 : 2283-2288, 1988.
 - 13) Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y. and Clarac, F. : Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *J. Physiol.* 455 : 187-204, 1992.
 - 14) Grillner, S., McClellan, A., Sigvardt, K., Wallén, P. and Wallén, M. : Activation of NMDA-receptors elicits "fictive locomotion" in lamprey spinal cord *in vitro*. *Acta physiol. Scand.* 113 : 549-551, 1981.
 - 15) Harris-Warrick, R. M. : Chemical modulation of central pattern generators. In : Cohen, A. H., Rossignol, S. and Grillner, S. (Eds.), *Neural Control of Rhythmic Movements in Vertebrates*. New York, 1988, John Wiley, 285-331.
 - 16) Kudo, N., Ozaki, S. and Yamada, Y. : Ontogeny of rhythmic activity in the spinal cord of the rat. In : Shimamura, M., Grillner, S. and Edgerton, V. R. (Eds.), *Neurobiological Basis of Human Locomotion*. Tokyo, 1991, Japan Scientific Societies Press, 127-136.
 - 17) Poon, M. : Induction of swimming in lamprey by L-DOPA and amino acids. *J. Comp. Physiol.* 136 : 337-344, 1980.
 - 18) Brodin, L., Grillner, S. and Rovainen, C. M. : NMDA, kainate and quisqualate receptors and the generation of fictive locomotion in the lamprey spinal cord. *Brain Res.* 325 : 302-306, 1985.
 - 19) Brodin, L. and Grillner, S. : The role of putative excitatory amino acid neurotransmitters in the initiation of locomotion in the lamprey spinal cord. I. The effects of excitatory amino acid antagonists. *Brain Res.* 360 : 139-148, 1985.
 - 20) Katakura, N., Liu, J. and Nakamura, Y. : NMDA-induced rhythmical activities of the hypoglossal motoneurons in an *in vitro* brainstem-spinal cord preparation from newborn rats. *Neurosci. Res. Suppl.* 19 : S 176, 1994.
 - 21) Katakura, N., Liu, J. and Nakamura, Y. : NMDA-induced rhythmical activity in XII nerve of isolated CNS from newborn rat. *Neuroreport.* 6 : 601-604, 1995.
 - 22) Katakura, N. and Nakamura, Y. : Sucking-like activity in *in vitro* brainstem preparation from newborn rats. *J. Dent. Res.* 74 : 513, 1995.
 - 23) Nakamura, Y. and Katakura, N. : Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci. Res.* 23 : 1-19, 1995.
 - 24) Lichtman, J. W., Wilkinson, R. S. and Rich, M. M. : Multiple innervation of tonic endplates revealed by activity-dependent uptake of fluorescent probes. *Nature.* 314 : 357-359, 1985.
 - 25) Keifer, J., Vyas, D. and Houk, J. C. : Sulforhodamine labeling of neural circuits engaged in motor pattern generation in the *in vitro* turtle brainstem-cerebellum. *J. Neurosci.* 12(8) : 3187-3199, 1992.
 - 26) Westneat, M. W. and Hall, W. G. : Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats ; an

- electromyographic analysis of sucking and chewing. *Behav. Neurosci.* 106 : 539-554, 1992.
- 27) Kessler, J. P., Cherkaoui, N., Catalin, D. and Jean, A. : Swallowing responses induced by microinjection of glutamate and glutamate agonists into the nucleus tractus solitarius of ketamine-anaesthetized rats. *Exp. Brain Res.* 83 : 151-158, 1990.
 - 28) Carpenter, D. O. : Central nervous system mechanisms in deglutition and emesis. In : Wood, J. D. (Ed.), *Handbook of Physiology ; The Gastrointestinal System. Motility and Circulation 1*. Bethesda, 1989, American Physiological Society, 685-714.
 - 29) Kriegstein, A. R., Avilla, J. G. and Blanton, M. G. : Distribution of increased synaptic activity during focal and generalized epileptiform activity revealed by presynaptic uptake of fluorescent dyes. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14 : 471, 1988.
 - 30) Heuser, J. E. and Reese, T. S. : Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57 : 315-344, 1973.
 - 31) Borges, L. F., Elliot, P. J., Gill, R., Iversen, S. D. and Iversen, L. L. : Selective extraction of small and large molecules from the cerebrospinal fluid by Purkinje neurons. *Science.* 228 : 346-348, 1985.
 - 32) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. : Trigeminal premotor neurons in the bulbar parvocellular reticular formation participating in induction of rhythmical activity of trigeminal motoneurons by repetitive stimulation of the cerebral cortex in the guinea pig. *J. Neurophysiol.* 69 : 595-608, 1993.
 - 33) Kessler, J. P. and Jean, A. : Identification of the medullary swallowing regions in the rat. *Exp. Brain Res.* 57 : 256-263, 1985.
 - 34) Kessler, J. P. and Jean, A. : Inhibition of the swallowing reflex by local application of serotonergic agents into the nucleus of the solitary tract. *European J. Pharmacol.* 118 : 77-85, 1985.
 - 35) Kessler, J. P. and Jean, A. : Effect of catecholamines on the swallowing reflex after pressure injections into the lateral solitary complex of the medulla oblongata. *Brain Res.* 386 : 69-77, 1986.
 - 36) Tallaksen-Greene, S. J., Young, A. B., Penney, J. B. and Beitz, A. J. : Excitatory amino acid binding sites in the trigeminal principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat. *Neurosci. Lett.* 141 : 79-83, 1992.
 - 37) Dohrn, C.S. and Beitz, A. J. : NMDA receptor mRNA expression in NOS-containing neurons in the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.* 175(1-2) : 28-32, 1994.
 - 38) Dohrn, C.S. and Beitz, A. J. : Differential NMDA NR 1 mRNA expression among spinal trigeminal neurons that project to different targets. *Neuroreport.* 5(15) : 1857-1860, 1994.