一般口演 6

除脳ラット動脈灌流標本を用いた咀嚼様リズム神経活動の誘発

Induction of masticatory rhythmic motor activity using *in situ* rat preparation○大藤拓生^{1, 2)}, 中山希世美¹⁾, 中村史朗¹⁾, 望月文子¹⁾, 壇辻昌典¹⁾, 井上富雄¹⁾Ofuji T^{1, 2)}, Nakayama K¹⁾, Nakamura S¹⁾, Mochizuki A¹⁾, Dantsuji M¹⁾, Inoue T¹⁾¹⁾ 昭和大学歯学部口腔生理学講座²⁾ 昭和大学歯学部歯周病学講座¹⁾ Department of Oral Physiology, Showa University School of Dentistry²⁾ Department of Periodontology, Showa University School of Dentistry

I. 目 的

咀嚼の基本的な顎運動パターンは、脳幹に存在する中枢性パターン発生器 (CPG) で形成されると考えられている。咀嚼の CPG の脳幹内での局在に関しては巨細胞性網様核、小細胞性網様核、中間網様核、三叉神経主感覚核、三叉神経上核など諸説あるが、未だに決定的な証拠は得られていない。咀嚼の CPG の局在の研究が進まない理由として、脳幹には呼吸や循環などの自律神経系の中核機構も存在するため、咀嚼の CPG の局在を調べるために電気刺激を行うと、同時に呼吸や循環が乱れてしまい、実験動物の状態が悪化し、実験結果を適切に評価できないという問題があった。Paton ら¹⁾ によって開発された除脳ラット動脈灌流標本は、体外循環法を用いて人工的に酸素を脳幹に供給しているため、電気刺激により標本の呼吸や循環機能が障害されても標本を長時間安定して維持することが可能である。そこで当研究室でも同様の標本を作成し^{2, 3)}、同標本の脳幹内で、連続電気刺激により顎舌骨筋神経に咀嚼様のリズムカルな神経活動が誘発される部位を検索した。

II. 方 法

実験には生後 3 - 4 週齢の Wistar ラット 50 匹を用いた。以下の外科的手術を行い、除脳ラット動脈灌流標本を作製した。まず、イソフルランの吸入による麻酔下にて、横隔膜直下で腹部を切断して下半身を離断し、水冷した人工脳脊髄液に浸漬して仮死状態にした。呼

吸と心拍の停止を確認したのち開頭し、precollicular レベルで除脳を行った。次いで、全身の皮膚の除去、両側肺実質の除去を行い、記録用チャンバーに標本を移した。下行大動脈の断端からダブルルーメンカテーテル (1317-23WG, Covidien) を挿入し、チュービングポンプを用いて人工脳脊髄液をカテーテルのメインルーメンを介して送液し、体外循環法にて標本の灌流を開始した。標本が自発呼吸を開始し、吸息時間が 1 秒未満になるまで徐々に灌流量を増加させた。人工脳脊髄液の組成は、125 mM NaCl, 3 mM KCl, 24 mM NaHCO₃, 1.25 mM KH₂PO₄, 1.25 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM glucose とした。灌流には 95% O₂-5% CO₂ 混合ガスで曝気することにより pH が約 7.4 になるように調整した人工脳脊髄液に、膠質浸透圧調整剤 (1.25% Ficoll 70)、抗凝固剤 (10IU ヘパリン) を加えたものを使用した。灌流経路の途中にヒートコントローラー (TC-324C, Warner Instruments) を組み込み、灌流液の温度が 31℃ になるようにした。カテーテルのサブルーメンは圧トランスデューサーに接続し、灌流圧を常にモニターした。

灌流開始後、呼吸が適正になったことを確認した後、筋弛緩剤 (臭化ベクロニウム 1.5-2 µg/ml) を加え、標本を非動化した。仰臥位で頭部を固定装置に固定した後、横隔神経、舌下神経、顎舌骨筋神経を剖出し、吸引電極を用いて複合活動電位を記録した。咀嚼様神経活動の誘発のため、脳幹の腹側表面を露出させ、金属微小電極を挿入して連続電気刺激 (30 Hz, 300 µs, 150-200 µA) を行った。咀嚼様神経活動の評価には、咀嚼関連

筋を支配する顎舌骨筋神経と舌下神経の活動を、標本の自発呼吸活動の記録には横隔神経および舌下神経の活動を用いた。咀嚼様のリズムミカルな神経活動が誘発された刺激部位は、直流通電（3 s, 150–300 μ A）により微小破壊した。実験終了後、脳幹を摘出し、ホルマリン固定後、厚さ 40 μ m の前頭断切片を作成し、咀嚼様神経活動の誘発部位を組織学的に同定した。

Ⅲ. 結果及び考察

脳幹への連続電気刺激により、顎舌骨筋神経に平均 2.8 Hz (2.8 ± 0.017 Hz, $n = 71$) のリズムミカルな神経活動が見られた。誘発されたリズムミカルな神経活動は以下の 4 つの異なる型に分けられた：Ⅰ型、顎舌骨筋神経と舌下神経で同期したリズムミカルな神経活動が出現し、横隔神経に逆位相の活動が出現する；Ⅱ型、顎舌骨筋神経と舌下神経で同期したリズムミカルな神経活動が出現するが、横隔神経の活動は呼吸を含めて全て消失する；Ⅲ型、顎舌骨筋神経にリズムミカルな神経活動が見られるが舌下神経の活動はなく、横隔神経にもリズムミカルな神経活動が出現する；Ⅳ型、顎舌骨筋神経にリズムミカルな神経活動が見られるが舌下神経に活動はなく、横隔神経には断続的な活動が出現する。それぞれの型の出現率は、Ⅰ型が 21%、Ⅱ型が 45%、Ⅲ型が 18%、Ⅳ型が 16% であった。刺激開始からリズムミカルな神経活動が出現するまでの潜時は、Ⅰ型で 0.053 ± 0.006 秒 ($n = 15$)、Ⅱ型で 0.074 ± 0.008 秒 ($n = 32$)、Ⅲ型で 0.108 ± 0.016 秒 (n

= 13)、Ⅳ型で 0.097 ± 0.009 秒 ($n = 11$) と、いずれも非常に短かった。これらのリズムミカルな神経活動が誘発された部位は、顔面神経核から舌下神経核吻側間の延髄網様体に存在する巨細胞性網様核に 54%、大細胞性網様核に 17%、大縫線核に 9%、後巨細胞性網様核に 6%、巨細胞性網様核腹側に 5%、その他の部位に 9% が分布していた。

以上の結果から、咀嚼のリズムの形成には、延髄網様体巨細胞性網様核および傍巨細胞性網様核を含めた延髄網様体内に存在するニューロンが関与する可能性が示唆された。

Ⅳ. 文 献

- 1) Paton, JFR. A decerebrate artificially perfused in situ preparation of rat: Utility for the study of autonomic and nociceptive processing. *J Neurosci Methods* 2006; 155: 260-271.
- 2) Tachikawa S, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Iijima T, Inoue T. Coordinated respiratory motor activity in nerves innervating the upper airway muscles in rats. *PLOS ONE* 2016; 11(11): e0166436.
- 3) Moriya T, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Ofuji T, Shirota T, Inoue T. Enhancement of swallowing motor activity by the ACE inhibitor imidapril in an arterially perfused rat preparation. *Eur J Pharmacol* 861, 15 October 2019, 172601.