



Title	舌運動に関わる大脳の一部を調べる
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101277
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	くれもと じゅんや 樽元 淳也	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	佐藤 文彦	所属	歯学研究科 系統・神経解剖学講座		
研究課題名	舌運動に関わる大脳の部位を調べる				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
背景 歯学部3年次の基礎配属実習で、「舌下神経核およびその周囲へ投射する小脳核ニューロン」という研究課題名でラットの脳を用いた研究を行い、運動制御に関与する小脳核ニューロン(Tsutsumi et al., 2024)は脳幹の延髄に位置し舌筋を支配する舌下神経核だけでなく、舌下神経核の運動前ニューロンが存在する舌下神経核の腹外側に位置する網様体にも投射していることが分かった。 この結果は、先行研究(Yoshida et al., 2009)で明らかになっている、ラットにおいて咀嚼運動を行う際に発生する大脳皮質運動野の運動指令は、その大部分が、脳幹網様体や運動核周辺などに存在する運動前ニューロンを経由して運動核へ投射し筋を収縮させることと類似している。このことから、咀嚼運動と協調して起こっている舌運動でも同様に、大脳皮質運動野による運動指令に関しても、舌下神経核へ直接的に投射する経路よりも、舌下神経核の運動前ニューロンが存在する網様体を経由し間接的に舌下神経核へ投射する経路の方が主なのではないかと考えた。そこで、当講座が実施してきた神経トレーサーを用いた神経回路追跡法と電気生理学的手法(Yoshida et al., 2009; Tsutsumi et al., 2018; Sato et al., 2020; Uemura et al., 2021; Tsutsumi et al., 2021; Yoshida et al., 2022; Tsutsumi et al., 2023; Tsutsumi et al., 2024)により、これら経路の分析を目指すことにした。					
目的 舌運動に関わる大脳皮質運動野からの、舌下神経核への直接的な、およびその運動前ニューロンが存在する腹外側の網様体への間接的な下行投射を調べることを目的とする。 そのための具体的な方法として、逆行性神経トレーサーを舌下神経核およびその腹外側の網様体へ注入し、逆行性に標識される神経細胞体の大脳皮質運動野での分布を記録・分析することとする。					
研究計画・方法 実験には240~340gのWistar系雄性ラットを用いた。大阪大学大学院歯学研究科動物実験指針に従い、観血的な処置は吸入麻酔薬(イソフルラン)の使用の下で行った。					

・実験方法

以下の実験方法や手技は歯学部3年次の基礎配属実習ですすでに習得済である。後述の解析を進めてゆき、必要に応じて追加実験を行った。

左側の顎下部の皮膚に局所麻酔薬を注射した後に、皮膚を切開して顎二腹筋前腹を外方へ移動させ、正中近くにある舌下神経を剖出した。電気刺激を行うため銀の双極性フック電極を舌下神経に装着した。その後ラットを脳定位固定装置に装着し、頸部背側正中に局所麻酔薬を注入してから、同部の皮膚を縦に切開した。後頭部の筋を外方に移動させ延髄を露出し脳硬膜を小さく切開して、開窓部から2.0 M クエン酸カリウム溶液を充填したガラス管微小電極を刺入した。舌下神経核の同定には左側（記録部位と同側）の舌下神経の電気刺激（持続時間 200 μ sec の矩形波, 1 Hz）に対する応答を記録した。Cholera Toxin B subunit (CTb) 1%を溶解した 0.02 M リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline : PBS, pH 7.4) を封入したガラス管微小電極に交換し、同様の方法で再刺入した。その後、同定した舌下神経核に CTb を電気泳動 (+2.0 μ A, 持続時間 300 msec, 2 Hz, 5-7 分間) にて微量注入した。トレーサー注入後、ガラス管微小電極を撤去し、刺激電極を舌下神経から取り外し、全ての皮膚切開部を縫合した。その後、鎮痛薬 (flurbiprofen axetil, 3.3 mg/kg) と抗生物質 (cefotiam hydrochloride, 66 mg/kg) を腹腔内に投与し、ケージ内で麻酔から回復させた。舌下神経の運動前ニューロンが存在する部位へのトレーサー注入については前述の通りに行った後、同定された部位より外側かつ深部へ上述と同様の方法で微量注入した。

・切片の作成

2週間後にラットをペントバルビタール (100 mg/kg) の過剰投与で上行大動脈から 0.02 M PBS (pH 7.4) 100 ml、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (Phosphate buffer : PB, pH 7.4) 100 ml、10% スクロースを含む 0.02 M PBS (pH 7.4) 100 ml、20% スクロースを含む 0.02 M PBS (pH 7.4) 100 ml を順次灌流した。脳を摘出し、20% スクロースを含む 0.02 M PB (pH 7.4, 4°C) に 2-3 日間浸漬した。脳を凍結させ、マイクロトームを用いて厚さ 60 μ m の連続冠状断切片を作成した。CTb に対する一次抗体、それに対する二次抗体を付着させ、ABC 法および DAB 法で反応し、CTb を可視化した (Yoshida et al., 2009; Tsutsumi et al., 2018; Sato et al., 2020; Uemura et al., 2021; Tsutsumi et al., 2021; Yoshida et al., 2022; Tsutsumi et al., 2023; Tsutsumi et al., 2024)。

・動物実験で得られた標本切片およびデータ分析

舌下神経核から記録された領域電位をコンピューターに保存し、PowerLab 8/30 (ADInstruments, Sydney, Australia) を用いてオフラインで解析した。舌下神経に与えた連続した 5-10 回の電気刺激に対する応答を記録部位に平均した。CTb の注入部位は明視野照明顕微鏡 (Olympus BX 50, Japan) で観察し、脳構造、トレーサーの注入部位、トレーサーで標識された神経細胞体を明視野照明顕微鏡に接続したカメラルシダ (描画装置) を使用して描画した。切片の顕微鏡写真は明視野照明顕微鏡に接続したデジタルカメラ (Olympus DP 28, Japan) を用いて撮影した。全ての写真は、Photoshop 2024 (Adobe Systems, CA) を用いて処理した。

大脳皮質運動野での標識細胞の分布を調べ、三次元的な広がりを理解するため、冠状断面上での分布を側面観あるいは背側面観に再構築した (Yoshida et al., 2009; Tsutsumi et al., 2018; Sato et al., 2020; Uemura et al., 2021; Tsutsumi et al., 2021; Yoshida et al., 2022; Tsutsumi et al., 2023; Tsutsumi et al., 2024)。

研究経過

基礎配属実習で実施した実験結果を基に引き続き追加実験を行い、研究期間内で予定通り概ね一定の成果を得ることができた。

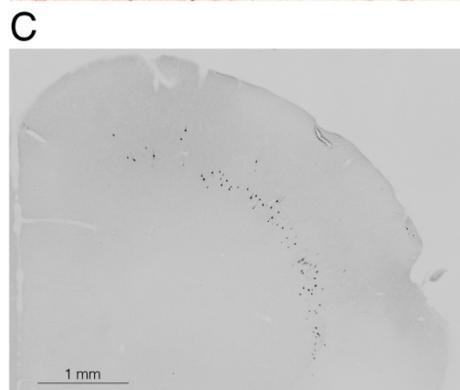
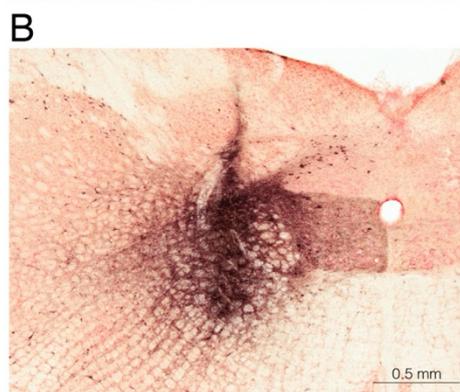
結果

舌下神経核へ逆行性トレーサーの注入が成功した例は2例であり、いずれの例においても注入の中心は舌下神経核に位置していた（代表例の写真A）。これらの例において標識細胞を大脳皮質で検索したところ、ほとんど認められなかった。

一方、舌下神経核への前ニューロンが存在するとされる、舌下神経核の腹外側部の網様体へ逆行性トレーサーの注入が成功した例は3例であり、いずれの例においても注入の中心は舌下神経核の腹外側部に位置していた（代表例の写真B）。これらの例において標識細胞を大脳皮質で検索したところ、いずれの例も大脳皮質一次運動野（M1）、大脳皮質二次運動野（M2）、大脳皮質一次体性感覚野（S1）に認められた。大脳皮質二次体性感覚野（S2）にはほとんど認めなかった。M1においては、吻側端から吻側3分の1のレベルまで標識細胞を多く認め、また、吻側2分の1のレベルまで少量の標識細胞を認めた。M1の中での内外的な分布には差は認めず、内側から外側まで途切れることなく分布していた。M2においては、ほぼ吻側端から吻側3分の1のレベルまで標識細胞を多く認め、また、吻側2分の1のレベルまで少量の標識細胞を認めた。M2の中での内外的な分布にはM1に隣接する外側部に標識細胞が多く、それに連続してM1の標識細胞が分布していた。S1においては、吻側端から吻側4分の1のレベルまで標識細胞を多く認め、また、吻側3分の2のレベルまで少量の標識細胞を認めた。S1の中での内外（背腹）的な分布には差は認めず、内側（背側）から外側（腹側）まで途切れることなく分布していた。M2、M1、S1に見られた標識細胞は連続的に並んでいた（代表例の写真C）。また、M2、M1、S1のいずれの部位においても両側性に多くの標識細胞が認められたが、注入部位と反対側の方が多かった。

まとめと考察

本研究では、大脳皮質運動野と体性感覚野から、舌下神経核よりも舌下神経核の運動前ニューロンが存在するとされる舌下神経核の腹外側部の網様体への投射が多いことが分かった。これは、当講座の先行研究で明らかになっている大脳皮質運動野（Yoshida et al., 2009）や体性感覚野（Haque et al., 2012、Tomita et al., 2012、Ikenoue et al., 2018）に順行性トレーサーであるビオチン化デキストラン



アミン (Biotinylated dextranamine : BDA) を注入した下行投射の知見により支持される。大脳皮質から直接舌下神経核に情報を送るよりも、運動前ニューロンを介することでより複雑で繊細な舌運動の発現を可能にすると考えられる。つまり、舌の運動は舌運動単独だけではなく、咀嚼運動や発声においても協調して行われるので、大脳皮質の広い範囲からの情報を受け取る必要があると考えられる。また先行研究 (Tsutsumi Y et al., 2024) では咀嚼筋筋紡錘感覚が小脳中位核 (Interposed cerebellar nucleus : Int) の背外側瘤 (Dorsolateral hump of the Int : IntDL) と小脳内側核 (Medial cerebellar nucleus : Med) の背外側隆起 (Dorsolateral protuberance of the Med : MedDL) に伝達されることが分かっており、これは基礎配属実習で得られた舌下神経核やその腹外側の網様体へ投射を与える小脳核部位と一部共通しているため、咀嚼筋筋紡錘感覚と舌運動との関連も示唆される。すなわち、舌は大脳や小脳からの情報を受け取りながら、その場面に適応した様々な運動ができると考えられる。

参考文献

- Yoshida A et al., (2009) Corticofugal Projections to Trigeminal Motoneurons Innervating Antagonistic Jaw Muscles in Rats as Demonstrated by Anterograde and Retrograde Tract Tracing. *J Comp Neurol*, 514 368-386.
- Tomita A et al., (2012) Somatotopic direct projections from orofacial areas of primary somatosensory cortex to pons and medulla, especially to trigeminal sensory nuclear complex, in rats. *Neuroscience*, 200 166-185.
- Haque T et al., (2012) Somatotopic direct projections from orofacial areas of secondary somatosensory cortex to trigeminal sensory nuclear complex in rats. *Neuroscience*, 219 214-233.
- Ikenoue E et al., (2018) Transcortical descending pathways through granular insular cortex conveying orofacial proprioception. *Brain Res*, 1687 11-19.
- Tsutsumi Y et al., (2018) Cortical and Subcortical Projections from Granular Insular Cortex Receiving Orofacial Proprioception. *Neuroscience*, 388 317-329.
- Sato F et al., (2020) Ascending projection of jaw-closing muscle-proprioception to the intralaminar thalamic nuclei in rats. *Brain Res*, 1739 146830.
- Uemura Y et al., (2021) Proprioceptive thalamus receiving forelimb and neck muscle spindle inputs via the external cuneate nucleus in the rat. *Brain Struct Funct*, 225 2177-2192.
- Tsutsumi Y et al., (2021) Widespread corticopetal projections from the oval paracentral nucleus of the intralaminar thalamic nuclei conveying orofacial proprioception in rats. *Brain Struct Funct*, 226 1115-1133.
- Yoshida A et al., (2022) Efferent and afferent connections of supratrigeminal neurons conveying orofacial muscle proprioception in rats. *Brain Struct Funct*, 227 111-129.
- Tsutsumi Y et al., (2023) The Cerebellar Cortex Receives Orofacial Proprioceptive Signals from the Supratrigeminal Nucleus via the Mossy Fiber Pathway in Rats. *Cerebellum*, 22 663-679.
- Tsutsumi Y et al., (2024) Cerebellar Nuclei Receiving Orofacial Proprioceptive Signals through the Mossy Fiber Pathway from the Supratrigeminal Nucleus in Rats. *Cerebellum*, 23 1795-1810.