



Title	培養脳幹標本を用いた三叉神経系リズム性活動の中樞解析
Author(s)	田中, 晋
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3128972
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博 士 論 文

培養脳幹標本を用いた三叉神経系リズム性活動の中樞解析

*Analysis of neural mechanism of rhythmical jaw movement relevant to the
trigeminal motor activity using an isolated brainstem preparation in vitro*

大阪大学大学院歯学研究科歯学臨床系専攻 口腔外科学第一

田中 晋

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座（主任：松矢篤三教授）

本論文の要旨の一部は第50回日本口腔科学会総会（平成8年4月，鹿児島），第41回日本口腔外科学会総会（平成8年11月，東京），The 26th Annual Meeting of Society For Neuroscience (1996年11月，Washington, D.C.) において発表した。

緒 言

咀嚼運動や吸啜運動のような下顎のリズミカルな運動は呼吸・歩行・嚥下などと同様に、複数の筋の組織だった生体の活動であり、幾つかの開口筋及び閉口筋のリズミカルな活動の調和によって構成されている。呼吸や歩行においてはrhythm generatorが存在し、これによってペースやパターンが決定されているごとく¹⁻⁴⁾、リズミカルな顎運動についてもrhythm generatorが関っていると考えられ、多くの研究者達によって顎運動に関するrhythm generatorについての研究が重ねられてきた^{5,6)}。Nozakiら⁷⁾は脳幹内切断の実験によりその局在が旁巨大細胞網様核、巨大細胞網様核周辺に存在するとし、Chandlerら⁸⁾は三叉神経運動核から下オリーブ核の範囲にrhythm generatorが存在すると考えた。いずれにせよ脳幹内に顎運動のrhythm generatorが存在するに違いないが、これらの研究はin vivoで行われており、これ以上の探求には限界が見られる。

一方培養脳幹を用いたIn vitroの研究は、神経回路網をある程度温存したままで動物の生死に関ることなく積極的な脳幹へのアプローチが行える⁹⁾という長所があり、呼吸や歩行の研究では本手法を用いることによりrhythm generatorの様相について著しい展開をみた。すなわちrhythm generatorの局在、pacemakerと考えられる細胞の膜特性、運動核への投射の様相など詳しく解析された^{1-4,10,11)}。三叉神経系においてもKogoら¹²⁾は培養脳幹の手法を用い、脳幹という限られた中枢組織においてもリズミカルな活動を誘発し三叉神経運動根からその様相を記録した。しかも彼らは旁巨大細胞網様核、巨大細胞網様核を含んだ組織を脳幹から除外して尚且つリズミカルな活動を誘発した。すなわち菱形窩正中溝上のY字

交点（Y字交点）より吻側の組織に三叉神経系のリズムカルな活動を引き起こす神経回路が存在することを示した。このことは三叉神経系のrhythm generatorについて新しい解釈を必要とするものである。さらにY字交点より尾側脳幹の除去が培養脳幹でリズムカルな活動を誘発するのに必須であった理由についてもこれまでの研究結果では説明できない。そこで本研究では顎付培養脳幹の手法を開発しKogoらが示したY字交点より吻側の脳幹がどのような顎運動を引き起こすかについて開口筋，閉口筋の筋活動を記録解析することにより検討した。さらに脳幹内切断実験を用いてY字交点吻側組織から誘発される活動のrhythm generatorが存在する範囲について，又リズムカル活動発現に対するY字交点尾側組織の関りについても詳細な切断実験を行って追求した。

実験方法

実験には0-2日のSprague-Dawley系新生児ラットを用いた。ハロセン吸入深麻酔下（Halothane Hoechst : Hoechst Japan）で脳幹或は顎付脳幹標本を実体顕微鏡下（Stemi SV-6 : ZEISS社製）にて人工還流液（modified Krebs Ringer）で満たされたアクリル製のrecording chamber内で作製し（図1），chamber内に裏装したSylgard Resin上にピン固定した。recording chamberは95% O₂-5% CO₂混合ガスで飽和された還流液で満たされた上部構造と蒸留水で満たされた周囲・下部構造により構成されており，温度コントローラー（TC-102 : Medical System社製）により還流液の液温は25-27℃，又，pH=7.4に調節された。さらに薬剤投与時以外は還流装置（Perista Pump : ATTO社製）を用いて95% O₂-5% CO₂混合ガ

スで飽和された還流液を5-10 ml/minの割合でchamber内を還流させた。還流液の組成は以下の通りである(mM): NaCl, 128.0; MgSO₄, 1.0; KCl, 3.0; NaH₂PO₄, 0.5; NaHCO₃, 24.0; CaCl₂, 1.5; glucose, 30.0。又、薬物投与は常に一定chamber容量下 (20cc) で還流装置を止めてchamber内へ直接投与することにより行った。本研究では薬剤刺激としてNMDA-receptorのagonistであるN-methyl-D,L-aspartate (NMA), non-NMDA receptorのagonistであるKainic acid (KA), L-glutamateおよび興奮性アミノ酸のuptake inhibitorであるdihydrokainic acid (DHK), GABAA-receptor antagonistであるbicuculline methiodide (BIC), Glycine receptor antagonistであるstrychnine,そしてNMDA-receptorのantagonistであるD,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV)を適時用いた。

培養脳幹における神経活動の記録には三叉神経運動根にガラス吸引電極 (Suction Electrode : A-M System社製 ; 先端直径約100 μm) を設置し、顎付培養脳幹の筋活動の記録にはテフロンビニル吸引電極 (Suction Electrode : A-M System社製 ; 先端直径約100 μm) で顎二腹筋前腹及び咬筋の筋腹を直接吸引することにより行い、得られた活動は各種生体用前置増幅器 (DAM50 : WPI社製, AVB-11 : 日本光電社製) を介してメモリオシロスコープ (VC-11 : 日本光電社製) 上にて観察し、各記録装置 (Digital Data Recorder : SONY社製, Thermal Array Recorder : 日本光電社製) で記録を行った。さらにデータ解析のため得られた各活動波形はコンピューター上 (IMC-P5100 : IBM社製) にて解析ソフト (DATA PACK II : RUN Technologies社製) を用いて積分処理した。

実験Ⅰ : 顎付培養脳幹標本における開口筋・閉口筋の筋活動について

顎付培養脳幹標本を作製して薬剤刺激によって誘発される顎運動様相について顎二腹筋前腹（開口筋），咬筋（閉口筋）の筋活動を指標に検討を行った。顎顔面組織を持たない脳幹のみでは，これまでの研究より吻側を下丘レベル，尾側を菱形窩正中溝上のY字交点（Y字交点）で冠状断した脳幹ブロックの左右両側の三叉神経運動根よりNMA-BIC投与条件下でリズム性活動が誘発されることが明らかとされている¹²⁾（図2）。そこで顎付培養脳幹標本の作製にあたっては先ず脳幹組織を下丘レベル，Y字交点レベルでそれぞれ冠状断した。さらに顔面頸部の表層皮膚を除去し筋膜を無傷に露出した両側の顎顔面組織を脳幹を傷つけないように正中で切離したのち，脳幹組織とこれら顎顔面組織が三叉神経根付着部での連続性が保たれた状態でchamber内に固定した（図3）。この顎付脳幹標本を用いて興奮性アミノ酸であるNMAとGABAレセプターの拮抗薬（BIC）或はGlycineレセプターの拮抗薬（STR）をchamber内に投与した時の顎運動発現の有無についてCCDカメラ（olympus社製）及び開閉口筋の筋電図活動において検討し，その運動の左右の比較及び開閉口筋の関係についてコンピューター上で解析ソフト（Data packII）を用いて解析した。

実験II：脳幹ブロックの切断とリズム性活動の消長（三叉神経運動根リズム性活動発生に必要な最小神経回路について）

三叉神経運動根リズム性活動発生に必要とされる最小の神経回路を解明する為に摘出培養脳幹標本を用いて脳幹組織を周辺から徐々に削除していくことにより三叉神経運動根からリズムカル活動を誘発できる最小脳幹ブロックの作製を行った。吻側を下丘レベル，尾

側をY字交点レベルで冠状断した脳幹ブロックを基準として用い、a) 正中断、b) 尾側から吻側方向、吻側から尾側方向へ冠状断、c) 正中から外側方向に矢状断、背側から腹側方向へ水平断した場合についてそれぞれ検討し、NMA-BIC投与条件下（NMA, 20 μ M; BIC, 5 μ M）で運動根よりリズムミカル活動を誘発できる最小の領域を調べた。切断の部位は実験終了後、脳幹組織を10%ホルマリンにて固定し厚さ50 μ mでcarbol-fuchsin染色を行い確認した。

実験 III：尾側脳幹のリズム性活動に対する働き

三叉神経運動根リズム性活動発現に対するY字交点尾側の脳幹の働きについて吻側を下丘レベル、尾側をobexレベルで冠状断した脳幹ブロックを用いて検討した。NMAとBICを用いて薬剤刺激を与えながら種々の切断をこの脳幹ブロックに加え、その際の三叉神経運動根からの活動を記録して、Y字交点より尾側脳幹部の働きを三叉神経運動根リズム性活動を指標に解析した。又、切断後のブロックを実験II同様にcarbol-fuchsin染色を行い、切断領域を確認した。

結 果

実験 I：顎付脳幹標本における顎運動様相について

NMA（20-40 μ M）とBIC（5-10 μ M）を同時にchamber内に投与すると、顎付脳幹標本か

らは下顎のリズミカルな (<1 Hz) 上下運動が観察された (図 4)。運動の活動周期は chamber内のNMAの濃度の上昇に伴って短縮する傾向がみられた。

I-1) 顎運動発現に対する興奮性アミノ酸の効果について

咬筋、顎二腹筋共にNMA-BIC (NMA, $40\text{ }\mu\text{M}$; BIC, $10\text{ }\mu\text{M}$) を投与した際にはリズミカルな筋活動が観察された [顎二腹筋: $n; 8/10$ (10匹中8匹でリズミカル活動が観察された), 咬筋: $n; 7/9$]。又Glu-BIC-DHK (Glu 1 mM , BIC $10\text{ }\mu\text{M}$, DHK $100\text{ }\mu\text{M}$) 投与時にも同様にリズム性筋活動がみられた (顎二腹筋: $n; 3/5$, 咬筋: $n; 4/7$)。ところがKA-BIC (KA, $3\text{ }\mu\text{M}$; BIC $10\text{ }\mu\text{M}$) 投与時には殆どリズム性筋活動は誘発されなかった (顎二腹筋: $n; 14/15$, 咬筋: $n; 11/12$) (図 5)。

そこで次にNMAの濃度を $20\text{ }\mu\text{M}$ から $60\text{ }\mu\text{M}$ の範囲で変化させた際の筋活動変化について検討したところ、活動周期は濃度依存的に短縮される傾向がみられた。さらにNMA-BIC投与に先行してAPV $20\text{--}25\text{ }\mu\text{M}$ を投与すると筋活動の発現は抑制された (図 6)。

I-2) 両側の同名筋の筋活動関係について

NMA-BIC投与条件下 (NMA, $40\text{ }\mu\text{M}$; BIC, $10\text{ }\mu\text{M}$) で両側の顎二腹筋の筋活動を同時に記録すると両側共に $6\text{--}8\text{ Hz}$ の持続時間 (duration) が $70\text{--}120\text{ ms}$ のリズミカルな筋活動が観察された (図 7 A)。コンピューター上で片側の活動の起始点を基準として100回分の波形の重ね合わせを行うと両側の活動は同期していることが明らかとなった ($n; 5/8$) (図 7 B)。両側の咬筋の筋活動を同時に記録すると活動時間は $70\text{--}120\text{ ms}$ で、 $4\text{--}6\text{ Hz}$ の両側が同期したりズミカルな筋活動が観察された ($n; 4/7$) (図 8)。

I-3) 同側の開閉口筋の筋活動関係について

NMA-BIC投与条件下 (NMA, 20 μ M; BIC, 10 μ M) で同側の顎二腹筋, 咬筋の筋活動を比較すると, 両筋活動共に持続時間は800-1000ms, また活動周期は1000ms以上であった。顎二腹筋の活動起始点を基準として先程同様に両筋の100回の波形の重ね合わせを行うと顎二腹筋と咬筋の活動の間に同期性がみられ, しかも顎二腹筋の活動が200-400 ms常に咬筋の活動に先行して認められることが確認された (n; 3/5) (図9)。ところがNMAの濃度を20 μ Mから40 μ Mに上昇させると両筋共にリズムカルな筋活動が観察されたものの, その活動周期は顎二腹筋の方が咬筋よりも短くコンピューター上での波形の重ね合わせからも両筋の活動は同期しなかった (n; 6/6) (図10)。次にStr 10 μ M, NMA 20 μ Mを投与して同側の顎二腹筋, 咬筋の筋活動を同時に記録すると両筋のリズム性筋活動は観察されるものの両筋の活動の同期性は認められなかった (n; 4/6) (図11)。そこでBIC 10 μ M, NMA 20 μ Mを先行投与して顎二腹筋と咬筋の活動が同期している状態でStr 10 μ Mを追加投与すると, 一過性に両筋の筋活動は持続性になるものの両筋の同期性にはほとんど影響はなく, Str投与数分後には完全に周期性が回復した (n; 3/3) (図12)。これに対してStr 10 μ M, NMA 20 μ Mを先行投与して両筋のリズム性活動が同期していない状態でBIC 10 μ Mを追加投与するとBIC投与数分後に両筋の活動は同期することが認められた (n; 3/3) (図13)。

実験 II : 脳幹ブロックの切断とリズム性活動の消長 (三叉神経運動根リズム性活動発生

に必要な最小神経回路について)

II-1) 正中断

基準とした脳幹ブロックにおいては左右の三叉神経運動根より同じ活動周期を持つリズムミカルな神経活動が同期して認められた。ブロックを正中断した後も左右の活動周期、活動特性に変化はなかったものの左右の活動の活動相は明らかに異なっていた (n; 5/6) (図14)。

II-2) 尾側から吻側方向、吻側から尾側方向への連続冠状断

正中断後のブロックをY字交点から吻側方向へ冠状断した場合、Y字交点から約200-400 μm までの連続冠状断では運動根からのリズム性活動に変化は見られなかったが (n; 7/8), 約500 μm を越えて連続冠状断するとリズム性活動は消失した (n; 5/5) (図15)。

Y字交点から吻側400 μm の冠状断は三叉神経運動核尾側境界冠状断に相当していた (図17)。またブロックを吻側端から尾側方向へ冠状断した場合、三叉神経運動根基部から吻側約300-500 μm 迄の冠状断ではリズム性活動が観察された (n; 6/8) (図15)。運動根基部から吻側約300 μm の冠状断は運動核吻側境界から約1000-1200 μm での切断面に相当していた (図17)。

II-3) 正中から外側方向への矢状断、背側から腹側方向への水平断

正中断後のブロックを正中側から外側方向へ連続矢状断かつ脳幹背側表層から腹側方向へ連続水平断すると、正中から外側約1000 μm までの矢状断、脳幹腹側表層から約2000

μm までの水平断ではリズム性活動は消失しなかった ($n; 8/10$) (図16)。これは運動核

近心境界から約200-400 μm の内側切断面，運動核背側境界から約700-800 μm の背側切断面に相当していた (図17)。

すなわち三叉神経運動根からリズムカル活動を誘発できた最小ブロックは吻側は三叉神経運動核吻側境界から約1000-1200 μm ，尾側は三叉神経運動核尾側境界，内側は運動核近心境界から約200-400 μm ，背側は運動核背側境界から約700-800 μm の脳幹ブロックであった。

実験 III：尾側脳幹のリズム性活動に対する働き

III-1) 制御様式について

下丘レベルからobexまでの脳幹において背側組織を実験IIで明らかにしたリズム発生が可能なレベル迄切除したところ，三叉神経運動根より自発下で $< 1 \text{ Hz}$ の呼吸性活動が観察された ($n; 5/7$)。同脳幹に対してNMA-BIC(NMA, 20 μM ; BIC, 5 μM)を投与してもリズム性活動は観察されなかったが，Y字交点レベルで尾側脳幹を切除するとNMA-BIC投与によりリズムカルな神経活動が発現した ($n; 4/5$) (図18)。さらに背側を切除しない下丘レベルからobexまでの脳幹において左側のみ外側からY字交点まで冠状切断を加え，さらに吻側脳幹をY字交点まで正中断を行うことによって左側の吻側脳幹を分離した。この状態で両側の三叉神経運動根より記録を行うと切除側（左側）ではNMA-BIC投与によりリズム性活動が観察されたが，非切除側（右側）ではリズム性活動はみられず，右側の吻側

脳幹を尾側から切り離すことによってリズム性活動が認められた (n; 4/4) (図19)。

次に新たに作製した脳幹において正中断を加えずに外側から Y 字交点までの片側冠状断を行い、尾側脳幹を切除せずに保存しても切断側、非切断側共に NMA-BIC 投与によりリズム性活動は観察されず、吻側と尾側を両側にわたって完全に離断することで初めて両側の三叉神経運動根よりリズム性活動が発現した (n; 3/3) (図20)。

III-2) 抑制機構の局在範囲について

下丘レベルから obex までの脳幹において obex から吻側に向かって連続冠状断を行ったところ、Y 字交点から尾側 1000 μm の面までは NMA-BIC 投与条件下で三叉神経運動根よりリズム性活動は得られず (n; 10/10)，尾側約 750 μm (Y 字交点より) レベルでは 20 匹中 2 匹のみでリズム性活動が観察され、尾側 500 μm の冠状断では確実なリズム性活動の発現がみられた (n; 6/8) (図21)。さらに脳幹組織の carbol-fuchsin 矢状断切片像において 750 μm レベルは疑核吻側レベル、500 μm レベルは顔面神経核尾側境界に相当していた (図22)。

考 察

咀嚼運動や吸綴運動のような顎のリズミカルな運動は主に開口筋、閉口筋のリズミカルな活動を主体として行われるが、それを制御する中枢ネットワークを論ずるにあたって、

近年歩行や呼吸と同じく rhythm generator や burst generator の概念が用いられるようになった^{5-7,13,14})。咀嚼運動や吸綴運動には動物の進化の過程においてその種、食性によって末梢における顎運動のパターンには違いがあるものの^{5,15})、開口と閉口をリズムカルに繰り返すことは種を通じて普遍的である¹⁶)。従ってこのような三叉神経系のリズム性活動の神経メカニズムを解明するために様々な実験動物を用いることが可能である^{5,6})。さてこれまでの研究で脳皮質咀嚼領野を電気刺激することによって自然に観察される咀嚼運動時の運動パターンに酷似したリズムカルな顎運動が起こるが^{14,17-19})、この神経活動は筋弛緩剤投与後も誘発できること²⁰⁻²²)、大脳基底核、視床下部、上丘、延髄網様体といった皮質以外の部位を電気刺激あるいは薬剤刺激してもリズムカルな顎運動が誘発されることや^{20,23-25})、除脳動物においても口腔内の圧刺激や皮質下刺激によって同様に顎運動が観察されること^{20,26-28})が明らかとなっている。すなわち顎運動発現に筋感覚を初めとする末梢からの求心性情報や間脳以上の上位中枢が必須ではないと考えられ、三叉神経系におけるリズム形成、パターン形成は脳幹レベルで行われていることが推察されるに至った²⁹)。咀嚼運動に関するこうした central pattern generation (CPG) の考え方は Lund ら²⁰)に始まり、これまでそのメカニズムについて諸説が報告されてきた^{5-7,14,30})。最近 Kogo ら¹²)は in vitro における培養脳幹標本において三叉神経系の rhythm generator が三叉神経運動核近傍に存在する可能性を示唆したが、CPG に関する rhythm generator の詳細な局在及び機構は未だに確立されていない。そこで本研究では顎運動及び開口筋、閉口筋のリズム性活動を制御する rhythm generator の局在及び特性をより詳細に明らかにする目的で培養脳幹標本を用いて in

vitro下で実験を行った。

In vivoにおける実験モデルは自然により近い状態で運動を解析できる点において優れているが、麻酔の深度や不必要な体の動きをコントロールする必要がある、さらに生命維持の点から手技的にも限界がある。一方でin vitroにおける脳幹スライス標本を用いた細胞内電位記録法は単一ニューロンの膜特性、シナプス特性を解析するには非常に適した方法であり正確に調節された細胞外環境下で安定した記録が得られるが^{31,32)}スライス標本内に保たれる神経回路は非常に断片的とならざるを得ず³³⁾、機能的解析には必ずしも適しているとは言えない。

これらの実験方法に対して摘出培養脳幹脊髄の技法 (Isolated brainstem spinal-cord preparation technique in vitro) は必要最小限の神経回路網を保存できるため、運動機能に関する脳幹内のネットワークの解析に適していると考えられる。とりわけ感覚性の求心性入力の影響を極力除外出来る点や、血液-脳関門を無視して薬剤の中枢に対する影響をみる点とができる点や、外科的侵襲に対する中枢組織の壊死の可能性がin vivoの実験に比べてはるかに低い点において優れていると言える^{2,3,9)}。さらに胸郭や後肢といった末梢器官を合わせて保存することにより運動機能を視覚的また筋電図学的に解析できる^{9,34)}。これらのことから咀嚼運動においても本手法を実験系として用いることにより新しい知見を見出せると考えた。三叉神経運動系については、Kogoら¹²⁾が下丘レベル、菱形窩正中溝上のY字交点で冠状断した新生児ラットの培養脳幹標本を用いて三叉神経運動根から薬剤性に咀嚼運動様のリズムミカルな神経活動を誘発することに成功している。そこで本研究はリズム発生器の詳細な局在範囲、制御様式、さらに末梢の開閉口筋の筋活動様式を検討するに当

たり、研究手法として基本的にKogoらが用いた培養脳幹標本を採用した。実験動物の選択に当たっては、先ず培養脳幹の技法は血管系を用いず、酸素供給を含めた一連の組織代謝は脳幹・脊髄表層からの浸透性拡散に限られている為、組織が大きいと深層は嫌気性条件となり機能発現を阻害する可能性がある³⁵⁾。また同じ動物でも組織内にコラーゲンが少なく大きさが小さく且つ嫌気性条件下で代謝が可能な新生児動物がサバイバルという点で有利であった^{36,37)}。一方、新生児動物は成熟動物に比べて神経回路網が完全に出来上がっていない点や回路を構成する個々の運動ニューロンも未発達であることが考えられ、顎運動を解析する指標として必ずしも適切であるとは言えない。しかしラットでは生後直ちに顎のリズミカルな運動がみられることは既に報告されており、この運動の活動パターンは吸綴運動の一型として考えられるが成熟ラットにおける咀嚼運動の間で筋活動パターンの相似性があるとされている³⁸⁾。そこで本研究では新生児ラットを用いて三叉神経系のリズム性活動発現に関する神経機構について検討を行った。

<誘発された顎運動について>

Kogoら¹²⁾はY字交点吻側の三叉神経運動核周辺のための脳幹ブロックを用いて三叉神経運動根からリズミカルな活動を記録した。この運動が実際のリズミカルな開閉口運動かどうかを確認することはこの脳幹ブロック内にこの運動の神経回路が存在するか否かの決定的な証明を与えることになる。本研究において明らかな顎の上下運動が認められたことから開閉口に関するリズミカル運動のrhythm generatorを始めとする神経回路がこの狭い範囲に存在することは間違いないと考えられる。さてリズミカルな顎運動及び筋活動は興奮性アミノ酸とgamma aminobutyric acid (GABA) レセプターの拮抗薬の併用により薬剤性に誘発

された。中でもNMAの濃度依存性に活動周期が短くなったことやNMDAレセプターの特異的拮抗薬であるAPVの先行投与によりリズムカル活動の誘発がブロックされたことからNMDAレセプターがリズムカル活動発現に関っている可能性が高いと考えられる。このことは顎を付けないKogoらの培養脳幹の実験の結果と相違しない¹²⁾。non-NMDAレセプターの関与についてはKAで誘発されたものが27例中2例と極めて少ないため定かでない。しかしながらKogoらの結果ではKAでも運動根にリズムカルな活動が誘発されていることから顎付培養脳幹における求心性入力とその発現を抑制している可能性は否定できない。Katakuraらは各種受容器からの求心性情報がnon-NMDAレセプターと密接な関係にあることを報告している³⁹⁾。ところでGlutamateは生体内に認められる興奮性のアミノ酸であり親和性に違いがあるもののNMDA及びnon-NMDAレセプターを興奮させると言われている⁴⁰⁾。本研究では興奮性アミノ酸のup take inhibitorと共に用いることによりリズム性活動を誘発することができた。関与する神経伝達物質がGlutamateである可能性を示すものと考えらる。

顎付培養脳幹標本ではリズムカル活動の周期の延長がみられ、同じ運動を引き起こすのに高濃度の薬剤刺激が必要となった。本標本においては三叉神経感覚根が保存されており、脳幹ブロック内に三叉神経中脳路核と上核及び脊髓路核の一部が含まれていることから、下顎の運動に伴う求心性情報によってリズムカル活動が修飾を受けていることも考えられる。さらに筋肉が25-27℃という低温に保たれることから顎付培養脳幹は培養脳幹のみの場合と比較して活動が遅くなると推察される。酸素及び各種イオンの供給は浸透性拡散に頼っており、顎付培養脳幹の場合は一部頭蓋底を残すため、培養脳幹のみに比べて浸透

性拡散が悪くなると考えられた。

<開口筋と閉口筋の筋活動のリズム性活動について>

開口筋である顎二腹筋前腹、閉口筋である咬筋共に両側の活動はそれぞれ同期することが認められた。一方同側の開閉口筋の活動については同じ濃度のbicuculline存在下でNMA $20\mu\text{M}$ の時は同期し、 $40\mu\text{M}$ の時は同期しなかった。薬剤刺激濃度が適切な時は同期し、強い薬剤刺激下で活動のレベルが高くなると開口筋、閉口筋のリズム性活動がお互いにindependentとなることは開口筋、閉口筋それぞれにリズム形成回路が存在し、刺激が適正な時のみ両者が繋がりを持つと考えられた。Schwartzら⁴¹⁾が示したように咀嚼運動は運動の時間的活動パターンの変化により三相に区別されているが、開口筋、閉口筋の活動量の違いは相の間で全く独立しており、特に運動の初期には閉口筋の活動は殆どみられないことが報告されている。又、開口筋と閉口筋の解剖学的特性を考えてみても前者には筋紡錘が殆ど含まれないのに対して後者には多く存在することから⁴²⁾両者のフィードバック機構は全く異なっていると考えられる⁴³⁻⁴⁵⁾。

さて興奮性アミノ酸による刺激でも運動の誘発には常にGABAレセプターの拮抗薬やグリシンレセプターの拮抗薬を必要とした。GABAやグリシンの受容体は三叉神経運動核や運動核への投射核に広く分布していることが確認されている⁴⁶⁾。これら抑制性ニューロンは開口反射運動の調節に関与している他⁴⁷⁾、閉口筋運動ニューロンにおけるIPSPの発生機序にGABA、グリシン作動性ニューロンなどの抑制性シナプスが重要な役割を担っていると考えられている^{48,49)}。本研究でbicucullineやstrychnineをchamber内に投与することが顎運動発生に必要であったことから抑制性シナプスの解除が運動の誘発に重要であることは

明らかである。GlycineはNMDAレセプター上にも結合部位を持ちNMDAレセプターの活性にglycineが必要と考えられている。同部はGlycineレセプターの β サブユニットとされstrychnineが作用する α サブユニットと区別されており、通常 β サブユニットにはstrychnineはglycineをブロックしないと考えられている⁵⁰⁾。ところでstrychnineでは興奮性アミノ酸で顎運動を引き起こしても開口筋と閉口筋に同期性がみられないのに対し、bicuculline存在下では低濃度の興奮性アミノ酸の刺激で同期性がみられた。またStr-NMAを投与したchamber内にbicucullineを追加投与することにより開閉口筋のリズム性活動に同期性が現れたことから考えて、GABAレセプターをブロックすることと開口筋、閉口筋の活動の同期性の発現には何等かの繋がりがあることを本研究結果は示している。

<rhythm generatorの局在>

三叉神経系のリズム性活動に関するリズム発生器の局在については既にいくつかの研究が報告されている。除脳動物においてもリズムカル顎運動が誘発できることからrhythm generatorが間脳より尾側に存在していることは明らかであり^{20,51)}、又、大脳皮質や錐体路の電気刺激を用いた切断実験でその概要がある程度まで解明されつつある。Nozakiら⁷⁾は除脳モルモットの錐体路を電気刺激した際の開口筋並びに支配神経の活動を指標に脳幹を種々の部位で切断し、リズムカルな遠心性活動の発現には旁巨大細胞網様核 (PGC)、巨大細胞網様核 (GC) を含んだ内側網様体が中心的役割を果たしていると結論した。旁巨大細胞網様核、巨大細胞網様核を含んだ顔面神経核吻側から舌下神経核吻側の範囲の内側網様体を錐体路投射路を除く周囲組織から切断分離することによっても錐体路電気刺激に

より巨大細胞網様核ニューロンよりリズムカル活動が観察されることやHRP標識実験、細胞内電位記録法を用いた研究より同部から三叉神経運動核もしくはpremotoneuronに投射する網様体ニューロンが存在すること^{52,53)}をその根拠とした。一方、Chandlerら⁸⁾は下オリーブ核吻側1/3から尾側方向への正中断の後、皮質咀嚼領野電気刺激により刺激と反対側の末梢開口筋の活動には変化なかったものの同側の筋活動は消失したことから左右それぞれに独立したリズム形成機構が存在すること、さらに種々のレベルで脳幹のヘミセクションを行うことによりリズム形成機構の局在は下オリーブ核吻側から三叉神経運動核の間であることを報告した。この同定された範囲のうち腹内側1/4の範囲を電氣的に損傷することで活動が抑制されることからNozakiら同様、旁巨大細胞網様核、巨大細胞網様核を含んだ領域にリズムカル活動発生に関するoscillatorが存在するとした。さらに機械的切断や電氣的組織損傷による手法は侵襲による影響が広範囲に及ぶことを考慮し、旁巨大細胞網様核、巨大細胞網様核及び周辺の小細胞網様核に限局した領域に麻酔薬を注入することにより、皮質誘発性リズムカル顎運動の活動パターンに可逆性変化をもたらすことを明らかにしてこれまでの結果を支持した⁵⁴⁾。Nakamuraら^{7,52,53)}はリズム形成、バースト形成は内側網様体ニューロンによって同時に起こり、三叉神経運動核へ直接投射するとした。しかしながら、HRPによる標識実験^{55,56)}からは直接投射路は殆ど認められていない。又、Zimmermanら⁵⁷⁾の変性実験から大脳皮質からの投射は旁巨大細胞網様核より小細胞網様核に多いことが明らかとなっている。rhythm generatorの詳細な局在についてはこれらの研究によっても未だ明らかとはなっていないが、顔面神経核尾側から三叉神経運動核の間の範囲にあることは間違いないと考えられる。しかしin vivoの研究では切断に伴う生体への侵襲は大き

く限界があった。

今回の研究で行った切断実験では培養脳幹標本を用いたため細胞外環境を比較的一定に保つことが出来、切断に伴う脳幹組織への侵襲はin vivoでの切断実験よりはるかに少なく、切断の方向も容易に変えることができたため切断によって残るブロックの範囲を三次元的に定めることができた。実験では先ず正中断によって活動相の一致はみられなくなるものの、左右の活動周期には影響なかったことから、三叉神経運動根リズム性活動に関するリズム発生回路は従来指摘されてきたように⁸⁾左右に独立して存在することが証明された。さらに最小ブロックの吻尾境界、背側、内側境界はいずれも三叉神経運動核に近接した部位であった。尚、吻側境界については三叉神経運動根が存在するために運動根基部から吻側約300-500 μm までの冠状断が限界であったことから実際の吻側境界にはまだ余裕が残されていると考えられる。Kimら⁵⁸⁾は高濃度のNMA (100-300 μM) の存在下では三叉神経運動核の運動ニューロンから直接リズムカルな神経活動が引き起こされることを示したが、本研究でのリズム性活動は細胞外液の Ca^{++} 濃度を下げるとリズムが消失し、 Cl^{-} を下げる と興奮性アミノ酸で刺激しなくてもリズムカル活動が起こることから (未発表データ) NMAが直接的に三叉神経運動核に作用したとは考えにくい。従って本実験で認められたリズムカル活動のrhythm generatorの局在は少なくともこれまで指摘されてきた脳幹下位ではなく三叉神経運動核尾側端よりも吻側の上位レベルに存在すると考えられる。

三叉神経運動核に投射するpremotoneuronが巨大細胞網様核背外側を始めとする外側網様体に広く分布することは既に知られている^{54,59)}。この範囲に存在するpremotoneuronは単に咀嚼筋のpremotoneuronであるだけでなく、他に舌下神経や顔面神経に投射するものがあ

るといわれている⁶⁰⁻⁶²⁾。小細胞網様体の組織はこのような顎顔面全体の総合的な運動の伝達経路として存在していると考えられ三叉神経運動核周辺のrhythm generatorで形成されたリズムがこの部位を通して三叉神経運動核や舌下神経核などに伝達されることも十分考えられる。

吻側は三叉神経運動根基部から約300-500 μm 、尾側は三叉神経運動核尾側境界、内側は運動核近心境界から約200-400 μm 、背側は運動核背側境界から約700-800 μm の脳幹ブロック内には多くのpremotoneuronやinterneuronが認められている⁶³⁻⁶⁵⁾。同部に大腦皮質からの投射があることも報告されている。すなわちこの部位にrhythm generatorが存在できる条件は整っていると思われる。いずれにせよこの狭い範囲内でいかにrhythm generationを行うかというメカニズムの解析は今後の問題である。

<左右の同期性について>

正中離断により左右別々にリズム性活動が得られたということはrhythm generatorは左右に一つずつ存在することを示している。しかしながら左右の計測できた活動の殆どにおいて左右同期性がみられた。このことは左右のgeneratorが同期して活動するか一方の運動核が対側のrhythm generatorによってコントロールを受けているかのどちらかであると考えられる。呼吸では左右の同期性は左右のrhythm generatorが同期することにより得られていると考えられている。三叉神経系のリズムカル活動においても左右のrhythm generatorが同期して活動している可能性がある。

<尾側脳幹におけるrhythm generationの抑制性機構>

Kogoら¹²⁾は下丘レベルから頸髄レベルまでの脳幹脊髓標本を用いて興奮性アミノ酸を

投与したところ三叉神経運動根からは第四頸神経に同調した振幅の小さい呼吸性の神経活動(<1 Hz)が認められるものの咀嚼運動様の速いリズムカル活動(6-8 Hz)は誘発されないことを報告している。さらにY字交点尾側の脳幹組織を除去することにより三叉神経運動根より咀嚼運動様のリズムカル活動が発現することが明らかとされている。尾側脳幹を切除することによってリズムカル活動が出現することの原因として三叉神経運動核近くで脳幹を切断することにより同運動核への酸素または人工還流液の供給がよくなり同部周辺の活動が活発になること、尾側に抑制機構が存在し、それを切断することにより吻側のネットワークが興奮し易くなることの二点が考えられる。前者については脳幹の背側を除去して同じ様に浸透性を良くしてもリズムが発生しないことから考えて、浸透性供給が悪いために非切断の脳幹においてリズム性活動が起こらないということは考えにくい。一方抑制機構については両側の尾側脳幹を完全に切除した時のみリズムが発生したことから両側性に支配する抑制回路が存在することが考えられる。又、尾側脳幹の正中までの半切断によっても両側性に抑制がみられることから尾側の抑制回路はY字交点よりも吻側において対側に投射すると考えられる。

Y字交点から尾側750 μm で尾側脳幹を冠状断すると殆ど三叉神経運動根からリズムカル活動は誘発されなかったのに対して、尾側500 μm 切断時には高い確率でリズム性活動がみられたことから、Y字交点尾側750 μm から尾側500 μm までの間に抑制回路の中心が存在すると考えられた。carbol-fuchshin染色像においてY字交点から尾側750 μm レベル切断部は疑核吻側、500 μm レベルは顔面神経核尾側境界に相当していた。この範囲には旁

巨大細胞網様核，巨大細胞網様核の他に三叉神経運動核への投射ニューロンを含む小細胞網様体，疑核の一部が存在している。この領域には主要な多くの神経回路が存在すると考えられるが，吻側のリズム性回路との関係については今後検討される問題であると考えられる。

本研究は顎付培養脳幹及び培養脳幹において顎のリズム性活動を解析し多くの新しい知見を得た（図23）。本研究法は直接的に脳幹にアプローチできるという点で非常に有用な方法であったと考える。

結 語

リズムカル顎運動に関する三叉神経運動系活動の中枢機構について顎付培養脳幹，培養脳幹をそれぞれ用いて検討を行い以下の結果を得た。

1. 下丘からY字交点レベルまでの脳幹を保存した顎付脳幹標本を作製し，興奮性アミノ酸であるNMAとGABAレセプターの拮抗薬（bicuculline）を同時投与したところ下顎のリズムミカルな上下運動が誘発された。
2. NMA-BIC投与条件下で両側の開閉口筋の筋活動を同時に記録すると，顎二腹筋，咬筋共に両側が同期したリズムミカルな活動が観察された。
3. 同側の顎二腹筋と咬筋の筋活動を同時に記録するとNMA 20 μ M, BIC 10 μ M条件下では両筋の活動は同期して観察されたが，NMAの濃度を20 μ Mから40 μ Mに上昇させると両筋の活動は同期しなかった。このことより開閉口筋のrhythm generatorはそれぞれ独立して

存在していることが示唆された。

4. NMAとグリシンレセプター拮抗薬（strychnine）の同時投与では顎二腹筋と咬筋の活動の間に同期性は認められなかった。ところがBICを追加投与すると両筋の活動は同期化した。このことより二つのリズム形成機構の繋がりにGABAレセプターが何等かの形で関与していることが推察された。

5. 下丘からY字交点レベル迄の脳幹標本を用いて正中断を行いNMA-BICを投与したところ、左右の三叉神経運動根からはリズムカルな神経活動がそれぞれみられ、左右にrhythm generatorが存在することが示された。

6. リズムカル活動発現に関する神経回路を含んだ最小脳幹ブロックは、吻側是三叉神経運動根基部から約300-500 μm 、尾側是三叉神経運動核尾側境界、内側は運動核近心境界から約200-400 μm 、背側は運動核背側境界から約700-800 μm の範囲であり、三叉神経リズムカル活動が三叉神経運動核近旁で形成されることが考えられた。

7. リズム形成回路は顔面神経核尾側から疑核吻側の間に主として存在する左右の抑制回路により両側性に制御されていることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究を命ぜられ、かつ御指導と御鞭撻を賜った大阪大学歯学部口腔外科学第一講座松矢篤三教授に深甚なる謝意を表するとともに、研究計画の立案と実験の実施に際し、終始御懇切なる御指導を賜った口腔外科学第一講座古郷幹彦助教授に心よ

り謝意を表します。さらに論文内容の推敲にあたり適切な助言を頂いたカリフォルニア大学ロサンゼルス校のS. H. Chandler 教授に深く感謝致します。あわせてこの研究の円滑な進展のために特別な御配慮を頂いた口腔外科学第一講座の教室員の方々に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Smith, J.C., Ellenberger, H.H., Ballanyi, K., Richter, D.W. and Feldman, J.L. (1991) : Pre-Botzinger complex : A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254, 726-729.
- 2) Smith, J.C., Greer, J.J., Liu, G. and Feldman, J.L. (1990) : Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J. Neurophysiol.*, 64, 1149-1169.
- 3) Smith, J.C., Feldman, J.L. and Schmidt, B.J. (1988) : Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord in vitro. *FASEB*, 2, 2283-2288.
- 4) Cazalets, J.R., Borde, M. and Clarac, F. (1995) : Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *J. Neurosci.*, 15, 4943-4951.
- 5) Lund, J.P. (1991) : Mastication and its control by the brain stem. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2, 33-64.
- 6) Nakamura, Y. and Katakura, N. (1995) : Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci. Res.*, 23, 1-19.
- 7) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. (1986a) : Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J. Neurophysiol.*, 55, 806-825.
- 8) Chandler, S.H. and Tal, M. (1986) : The effects of brain stem transection on the neuronal networks responsible for rhythmical jaw muscle activity in the guinea pig. *J. Neurosci.*, 6, 1831-1842.
- 9) Smith, J.C. and Feldman, J.L. (1987) : In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J. Neurosci. Meth.*, 21, 321-333.
- 10) Greer, J.J., Smith, J.C. and Feldman, J.L. (1991) : Role of excitatory amino acids in the

- generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J. Physiol.*, 437, 727-749.
- 11) McCrimmon, D.R., Smith, J.C. and Feldman, J.L. (1989) : Involvement of excitatory amino acids in neurotransmission of inspiratory drive to spinal respiratory motoneurons. *J. Neurosci.*, 9, 1910-1921.
 - 12) Kogo, M., Funk, G.D. and Chandler, S.H. (1996) : Rhythmical oral-motor activity recorded in an in vitro brainstem preparation. *Somatosens. Motor. Res.*, 13, 39-48.
 - 13) Chandler, S.H. and Goldberg, L.J. (1982) : Intracellular analysis of synaptic mechanisms controlling spontaneous and cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J. Neurophysiol.*, 48, 126-138.
 - 14) Lund, J.P., Sasamoto, K., Murakami, T. and Olsson, K.A. (1984) : Analysis of rhythmical jaw movements produced by electrical stimulation of sensory-motor cortex of rabbits. *J. Neurophysiol.*, 52, 1014-1029.
 - 15) Hiimae, K.M. (1978) : Mammalian mastication : a review of the activity of the jaw muscles and the movements they produce in chewing. In: P.M. Butler and K.A. Joysey (Eds.), *Development, Function and Evolution of Teeth*, Academic Press, London, 359-398.
 - 16) Lund, J.P. and Olsson, K.A. (1983) : The importance of reflexes and their control during jaw movement. *TINS*, 6, 458-463.
 - 17) Rioch, J.M. (1934) : Neural mechanisms of mastication. *Am. J. Physiol.*, 108, 168-176.
 - 18) Hines, M. (1940) : Movements elicited from the precentral gyrus of the adult chimpanzee by stimulation with sine wave currents. *J. Neurophysiol.*, 3, 442-466.
 - 19) Morimoto, T. and Kawamura, Y. (1973) : Properties of tongue and jaw movements elicited by stimulation of the orbital gyrus in the cat. *Arch. Oral Biol.*, 18, 361-372.
 - 20) Dellow, P.G. and Lund, J.P. (1971) : Evidence for central timing of rhythmical mastication. *J. Physiol.*, 215, 1-13.
 - 21) Nakamura, Y., Kubo, Y., Nozaki, S. and Takatori, M. (1976) : Cortically induced

- masticatory rhythm and its modification by tonic peripheral inputs in immobilized cats. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 23, 101-107.
- 22) Carli, G., Diete-Spiff, K. and Pompeiano, O. (1967) : Mechanisms on muscle spindle excitation. *Arch. Ital. Biol.*, 105, 273-289.
- 23) Kawamura, Y. and Tsukamoto, S. (1960) : Analysis of jaw movements from the cortical jaw motor area and amygdala. *Jpn. J. Physiol.*, 10, 471-488.
- 24) Hashimoto, N., Katayama, T., Ishiwata, Y. and Nakamura, Y. (1989) : Induction of rhythmic jaw movements by stimulation of the mesencephalic reticular formation in the guinea pig. *J. Neurosci.*, 9, 2887-2901.
- 25) 橋本信行 (1986) : モルモット中脳網様体の電氣的ならびに化学的刺激によって誘発される咀嚼リズム. *口病誌*, 53, 679-688, 昭和61.
- 26) Lund, J.P. and Dellow, P.G. (1974) : The influence of interactive stimuli on rhythmical masticatory movements in rabbits. *Arch. Oral Biol.*, 16, 215-223.
- 27) Bazett, H.C. and Penfield, W.G. (1922) : A study of the Sherrington decerebrate animal in the chronic as well as acute condition. *Brain*, 45, 185-265.
- 28) Olsson, K.A., Sasamoto, K. and Lund, J.P. (1986) : Modulation of transmission in rostral trigeminal sensory nuclei during chewing. *J. Neurophysiol.*, 55, 56-75.
- 29) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. (1983) : Localization of masticatory rhythm generator in the lower brain stem of the guinea pig. *Neurosci. Lett. Suppl.*, 13, S83.
- 30) Donga, R. and Lund, J.P. (1991) : Discharge patterns of trigeminal commissural last-order interneurons during fictive mastication in the rabbit. *J. Neurophysiol.*, 66, 1564-1578.
- 31) Eric, R.K, James, H.S. and Thomas, M.J. (1991) : *Principles of Neural Science*. ed. 3, Elsevier Science Publishing Co., New York, 788.
- 32) 山本長三郎 (1989) : 脳切片 ; 神経生理学総論 (伊藤正男、塚原仲晃編), 1 版, 医学書院, 東京, 49-53, 平元.

- 33) Andersen, P. (1981) : Brain slices - a neurobiological tool of increasing usefulness. *Trends in Neurosci.*, 4, 53-56.
- 34) Suzue, T. (1984) : Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol.*, 354, 173-183.
- 35) Okada, Y., Muckenhoff, K., Holtérmann, G., Acker, H. and Scheid, P. (1993) : Depth profiles of pH and PO₂ in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respiration Physiol.*, 93, 315-326.
- 36) Suzue, T. (1983) : Electrophysiology of reflexes in an isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *Biomed. Res.*, 4, 611-614.
- 37) Richter, D. (1955) : The metabolism of the developing brain. In *Biochemistry of the Developing Nervous System*, Academic Press, New York, 225-250.
- 38) Westneat, M.W. and Hall, W.G. (1992) : Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: An electromyographic analysis of suckling and chewing. *Behav. Neurosci.*, 106, 539-554.
- 39) Katakura, N. and Chandler, S.H. (1991) : Iontophoretic analysis of the pharmacologic mechanisms responsible for trigeminal motoneuronal discharge evoked by intra-oral afferent stimulation. *Brain Res.*, 549, 66-77.
- 40) Webster, R.A. and Jordan, C.C. (1989) : *Neurotransmitter*. ed. 1, Blackwell Scientific Publications., London, 198-210.
- 41) Schwartz, G., Enomoto, S., Valiquette, C. and Lund, J.P. (1989) : Mastication in the rabbit: a description of movement and muscle activity. *J. Neurophysiol.*, 62, 273-287.
- 42) Hosokawa, H. (1961) : Proprioceptive innervation of striated muscle in the territory of the cranial nerves. *Texas Rep. Biol. Med.*, 19, 405-464.
- 43) Kubo, Y., Enomoto, S. and Nakamura, Y. (1981) : Synaptic basis of cortically induced rhythmical masticatory activity of trigeminal motoneurons in immobilized cats. *Brain Res.*, 230, 97-110.

- 44) Goldberg, L.J., Chandler, S.H. and Tal, M. (1982) : Relationship between jaw movements and trigeminal motoneuron membrane potential fluctuations during cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J. Neurophysiol.*, 48, 110-125.
- 45) Taylor, A. and Cody, F.W.J. (1974) : Jaw muscle spindle activity in the cat during normal movements of eating and drinking. *Brain Res.*, 71, 523-530.
- 46) Turman, J. and Chandler, S.H. (1994) : Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse*, 18, 7-20.
- 47) Kidokoro, Y., Kubota, K., Shuto, S. and Sumino, R. (1968) : Reflex organization of cat masticatory muscles. *J. Neurophysiol.*, 31, 695-708.
- 48) Goldberg, L.J. (1972) : Excitatory and inhibitory effects of lingual nerve stimulation on reflexes controlling the activity of masseteric motoneurons. *Brain Res.*, 39(1), 95-108.
- 49) Enomoto, S., Katakura, N., Sunada, T., Katayama, T., Hirose, Y., Ishiwata, Y. and Nakamura, Y. (1985) : Cortically induced masticatory rhythm in masseter motoneurons after blocking inhibition by strychnine and tetanus toxin. *Neurosci. Res.*, 4, 396-412.
- 50) 遠山正彌 (1991) : 神経伝達機構, 受容体の遺伝子発現よりのアプローチ: 多様性とその機能. *ブレインサイエンス*, 2, 57-86. 平成 3.
- 51) Thexton, A.J., Griffiths, C. and McGarrick, J. (1980) : Evidence for peripheral activation of the trigeminal rhythm generator in the decerebrate rat, obtained by Fourier analysis of conditioning testing curves. *Arch. Oral Biol.*, 25, 491-494.
- 52) Nakamura, Y. (1985) : Localization and functional organization of masticatory rhythm generator in the lower brain stem reticular formation. *Neurosci. Lett. Suppl.*, 20, S3.
- 53) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. (1986b) : Role of corticobulbar projection neurons in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J. Neurophysiol.*, 55, 826-845.
- 54) Chandler, S.H., Turman, J., Salem, L. and Goldberg, L.J. (1990) : The effects of nanoliter

- ejections of lidocaine into the pontomedullary reticular formation on cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *Brain Res.*, 526, 54-64.
- 55) Mizuno, N., Yasui, Y., Nomura, S., Itoh, K., Konishi, A., Takada, M. and Kudo, M. (1983): A light and electron microscopic study of premotor neurons for the trigeminal motor nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 215, 290-298.
- 56) Landgren, S., Olsson, K.A. and Westberg, K.G. (1986) : Bulbar neurones with axonal projections to the trigeminal motor nucleus in the cat. *Exp. Brain Res.*, 65, 98-111.
- 57) Zimmerman, E.A., Chambers, W.W. and Liu, C.N. (1964) : An Experimental study of the anatomical organization of the cortico-bulbar system in the albino rat. *J. Comp. Neurol.*, 123, 301-324.
- 58) Kim, Y.I. and Chandler, S.H. (1995) : NMDA-induced burst discharge in guinea pig trigeminal motoneurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, 74, 334-346.
- 59) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. (1993) : 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.
- 60) Sahara, Y., Hashimoto, N., Kato, M. and Nakamura, Y. (1988) : Synaptic bases of cortically-induced rhythmical hypoglossal motoneuronal activity in the cat. *Neurosci. Res.*, 5, 439-452.
- 61) Borke, R.C., Nau, M.E. and Ringler, R.L. (1983) : Brain stem afferents of hypoglossal neurons in the rat. *Brain Res.*, 269, 47-55.
- 62) The Horst, G.J., Copray, J.C.V.M., Liem, R.S.B. and Van Willigen, J.D. (1991) : Projections from the rostral parvocellular reticular formation to pontine and medullary nuclei in the rat : involvement in autonomic regulation and orofacial motor control. *Neurosci.*, 40, 735-758.
- 63) Inoue, T., Masuda, Y., Nagashima, T., Yoshikawa, K. and Morimoto, T. (1992) : Properties

of rhythmically active neurons around the trigeminal motor nucleus during fictive mastication in the rat. *Neurosci. Res.*, 14, 275-294.

64) Appenteng, K., Conyers, L., Curtis, J. and Moore, J.A. (1990a) : Monosynaptic connections of single V interneurons to the contralateral V motor nucleus in anaesthetized rats. *Brain Res.*, 514, 128-130.

65) Donga, R., Lund, J.P. and Veilleux, D. (1990) : An electrophysiological study of trigeminal commissural interneurons in the anaesthetized rabbit. *Brain Res.*, 351-354.

図の説明

図1 Recording chamber模式図

摘出された脳幹或いは顎付脳幹組織は人工還流液で満たされたchamber上部のSylgard resin上にピンにて固定した。

図2 培養脳幹標本における三叉神経運動根リズムカル活動

A, Bは脳幹切断ライン (A: 矢状面, B: 背側面) を示す。小脳は除去されている。C: NMA-BIC投与後, 両側三叉神経運動根より誘発された神経活動。略語: SC; 上丘, IC; 下丘, MoV; 三叉神経運動核, VII; 顔面神経核, Amb; 疑核, Obex; 門, RT; 右側三叉神経運動根神経活動, LT; 左側三叉神経運動根神経活動。(略語は以下の図で共通)

図3 顎付培養脳幹標本模式図 (A) 及び写真 (B)

図4 顎付培養脳幹標本におけるリズムカル顎運動

NMA-BIC投与後, 下顎のリズムカルな上下運動が観察された (A)。写真上方は腹側, 下方は背側をそれぞれ示す。太線は仮想上顎平面を表す。Bは模式図を表す。細矢印(→)は右側下顎骨先端部を示す。

図5 各種興奮性アミノ酸投与時の筋活動

各種興奮性アミノ酸投与時のA: 顎二腹筋, B: 咬筋の筋活動を示す。

図6 NMA濃度変化並びにNMDA-receptor拮抗薬(APV)の顎二腹筋筋活動への影響

A: NMA濃度を変化(20-60 μ M)させた際の筋活動。

B: APV先行投与後NMA-BIC投与した際の筋活動。

図7 両側顎二腹筋の筋活動関係

A：NMA 40 μ M, BIC 10 μ M投与後観察された両側顎二腹筋の筋活動。

B：右側の筋活動起始点を基準(trigger)にコンピューター上で解析した両側波形の100回重ね合わせ。両筋の活動は同期していた。

図8 両側咬筋の筋活動関係

A：NMA 40 μ M, BIC 10 μ M投与後観察された両側咬筋の筋活動。

B：右側を筋活動起始点を基準とした両側波形の100回重ね合わせ。顎二腹筋同様に両筋の活動は同期していた。

図9 同側の開閉口筋の筋活動関係

A：NMA 20 μ M, BIC 10 μ M投与時に誘発された同側の顎二腹筋，咬筋の筋活動。

B：顎二腹筋の筋活動起始点を基準に行った両筋活動の100回の波形の重ね合わせ。

図10 同側の開閉口筋の筋活動関係

NMA 40 μ M, BIC 10 μ M投与時に誘発された同側の顎二腹筋，咬筋の筋活動（A）及び顎二腹筋の筋活動起始点を基準に行った両筋活動の100回の波形重ね合わせ（B）。

図11 同側の開閉口筋の筋活動関係

NMA 20 μ M, STR10 μ M投与時に誘発された同側の顎二腹筋，咬筋の筋活動（A）及び咬筋の筋活動起始点を基準とした両筋活動の100回の波形重ね合わせ（B）。

図12 同側の開閉口筋の筋活動関係

A : NMA20 μ M, BIC 10 μ M投与時に誘発された同側の顎二腹筋, 咬筋の筋活動。

B, C : STR10 μ M追加投与 1 分後 (B), 5 分後 (C) の両筋の筋活動変化。

図13 同側の開閉口筋の筋活動関係

A : NMA 20 μ M, STR 10 μ M投与時に誘発される同側の顎二腹筋, 咬筋の筋活動。

B : BIC 10 μ M追加投与 5 分後の両筋の筋活動変化

図14 脳幹ブロックを正中断した際の三叉神経運動根リズム性活動

A : 正中断模式図。

B : 正中断前, C : 正中断後の両側三叉神経運動根の神経活動

(NMA 20 μ M, BIC 5 μ M投与条件下)。

図15 脳幹ブロックを尾側→吻側方向へ連続冠状断した際の三叉神経運動根リズム性活動

A : 連続冠状断模式図 (点線は正中断後切断除去された領域を示す)

B : 各レベルで冠状断した際の三叉神経運動根神経活動

(NMA 20 μ M, BIC 5 μ M投与条件下)。

図16 脳幹ブロックを正中→外側方向へ連続矢状断, 背側→腹側方向へ連続水平断した際の三叉神経運動根リズム性活動

A : 矢状断, 水平断模式図 (点線は正中断後切断除去された領域を表す) 点線は各方向への切断にあたって基準としたライン, 太線は各切断方向における切断ラインを示す。

B : 切断前および脳幹腹側面から背側 2000 μ mレベルでの水平断, 正中から外側 1000 μ mレベルでの矢状断の組み合わせにより誘発された三叉神経運動根リズム性活動。

図17 最小ブロックのCarbol-Fuchsin染色像

A：矢状断像，B：冠状断像（厚さ50 μm ）（a；最小ブロック切断ライン，b；最小ブロック拡大像及び各切断ラインから三叉神経運動核までの距離をそれぞれ示す）

図18 尾側脳幹がリズム性活動に及ぼす影響

A：下丘レベル，obexレベルでの切断ライン（実線）及び背側切断ライン（点線）を示す。
B：Aの切断ブロックに対して行った尾側追加切断ライン（点線）。
C：Aの切断ブロックにて三叉神経運動根より観察された自発呼吸性活動（a），NMA 20 μM , BIC 5 μM 投与条件時の神経活動（b）及び尾側追加切断後，NMA 20 μM , BIC 5 μM 投与により観察された神経活動。

図19 尾側脳幹がリズム性活動に及ぼす影響（制御様式1）

脳幹切断ライン模式図（A）及び切断後NMA20 μM ,BIC5 μM 投与により観察された三叉神経運動根神経活動（B）（a；左側吻側脳幹離断時，b；右側吻側脳幹追加離断時）を示す。

図20 尾側脳幹がリズム性活動に及ぼす影響（制御様式2）

脳幹切断ライン模式図（A）及び切断後NMA20 μM ,BIC5 μM 投与により観察された三叉神経運動根神経活動（B）（a；右側脳幹冠状切断時，b；左側脳幹追加冠状切断時）を示す。

図21 尾側脳幹における抑制機構の局在範囲について

尾側脳幹切断ライン模式図（A），及び各レベルで切断後観察された三叉神経運動根神経活動を示す。

図22 尾側脳幹における抑制機構の局在範囲について (Carbol-Fuchsin染色像)

Y字交点尾側750 μ mレベル切断時のCarbol-Fuchsin染色脳幹矢状断切片像 (A) 及びその拡大像 (B) をそれぞれ示す (厚さ50 μ m)。

図23 リズミカル顎運動発生に関する脳幹レベルの中枢機構

RG ; rhythm generator, BG ; burst generator, IC ; inhibitory circuit (抑制回路) , O ; 開口筋運動ニューロン群, C ; 閉口筋運動ニューロン群をそれぞれ表す。影付部分は参考文献 (Lund, J.P. 1991, Fig. 7より改変) による。点線は脳幹正中を示す。

図 1

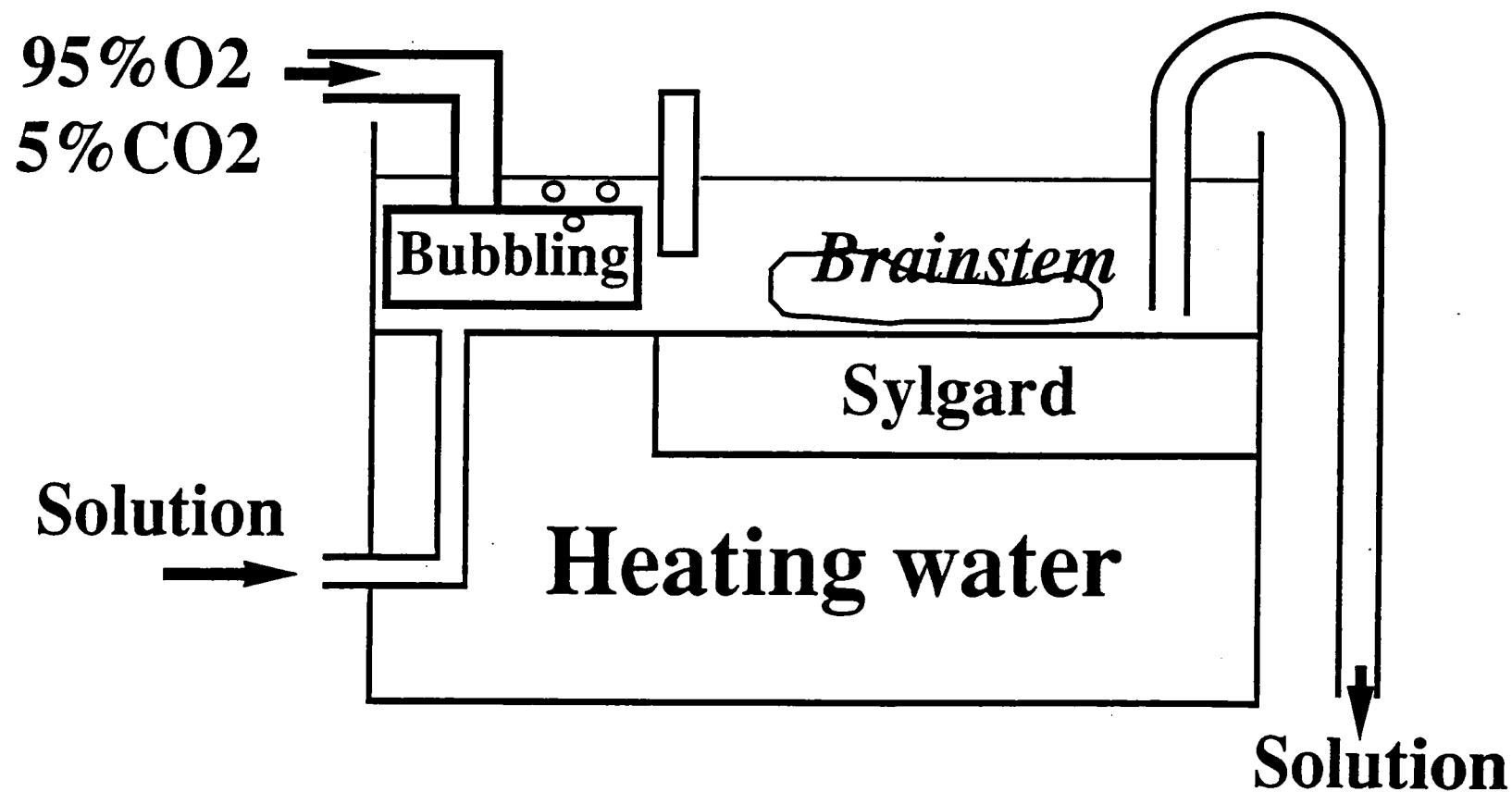


图 2

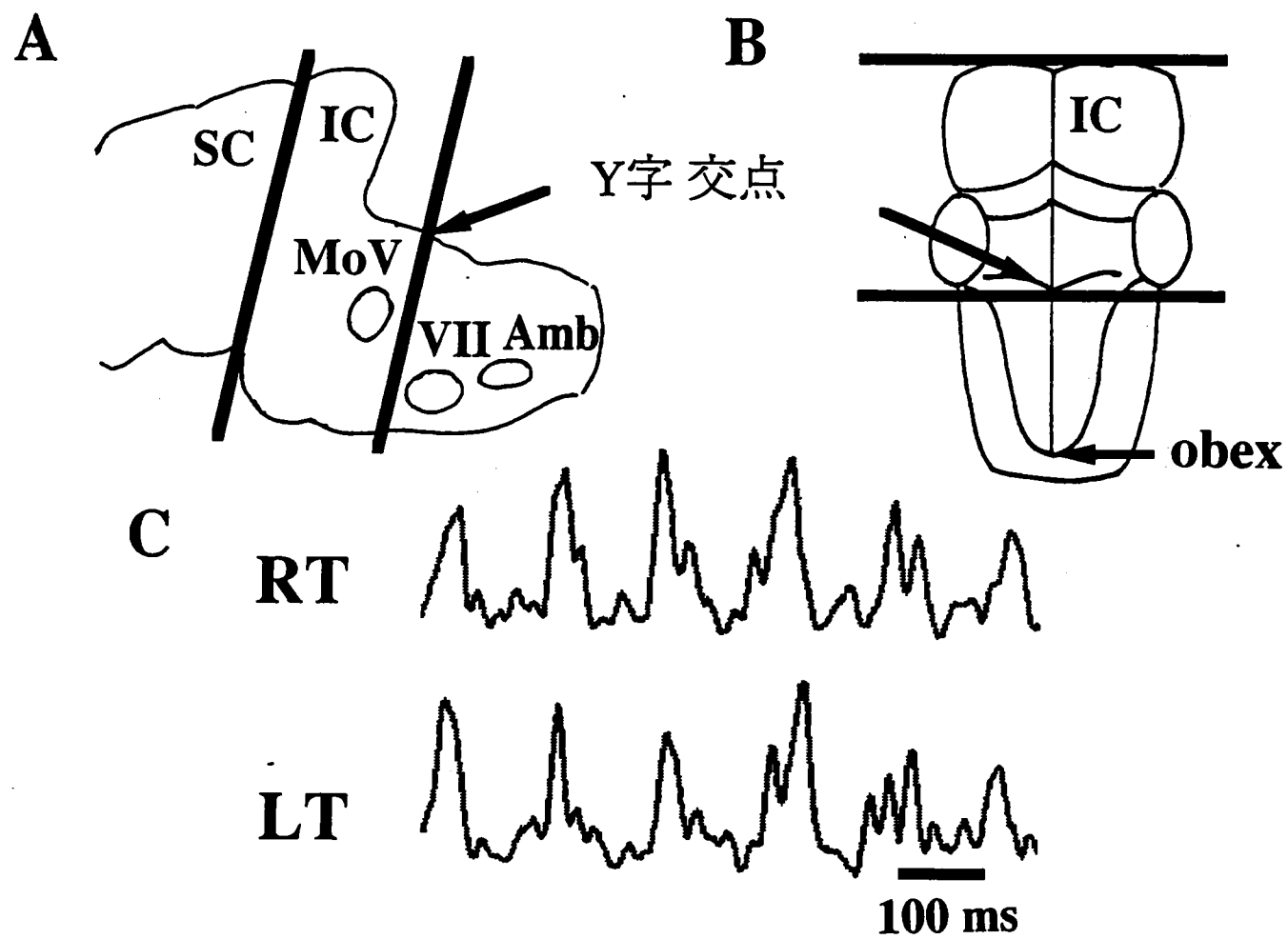


図 3

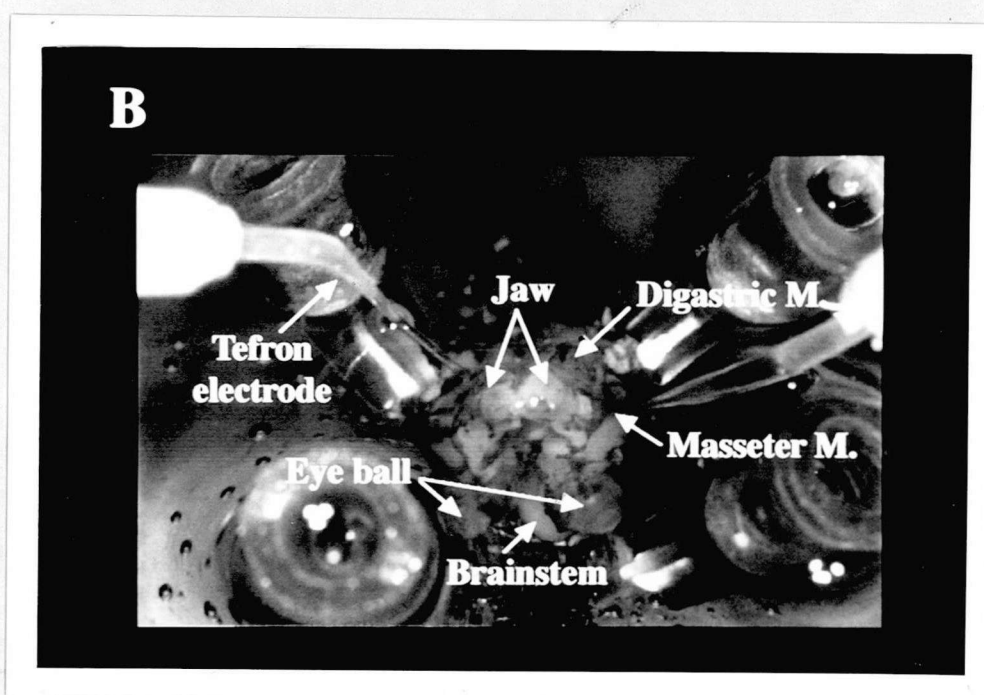
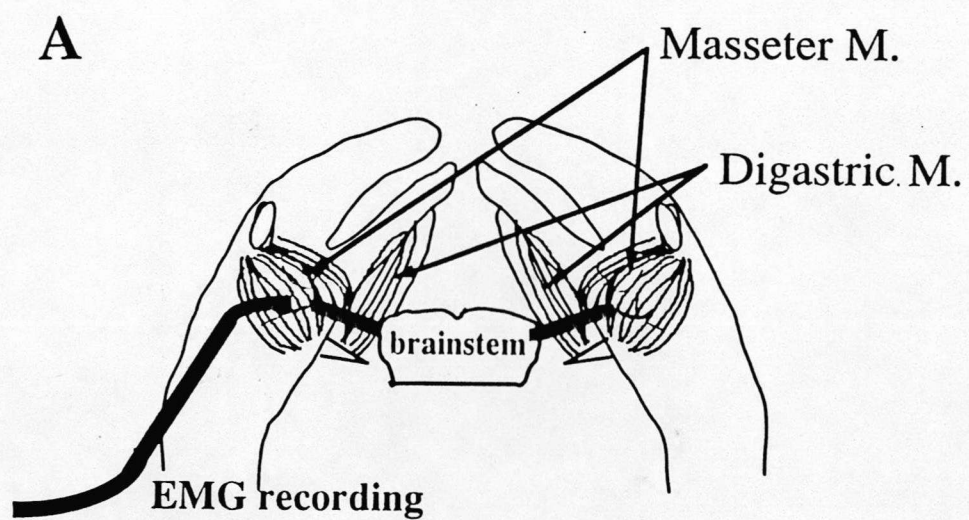
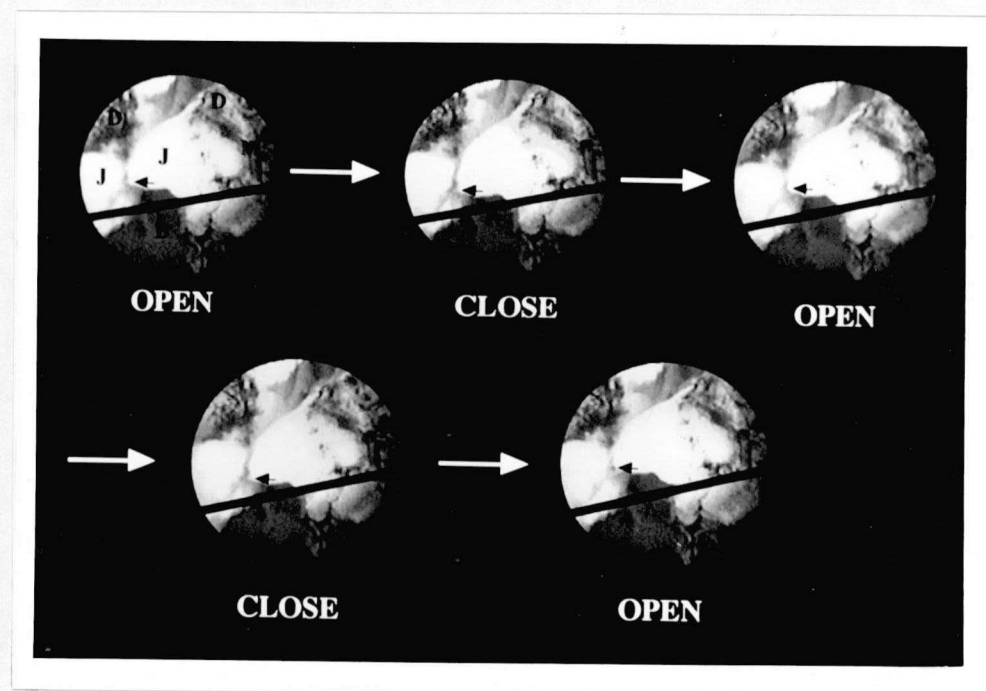


図 4

A



B

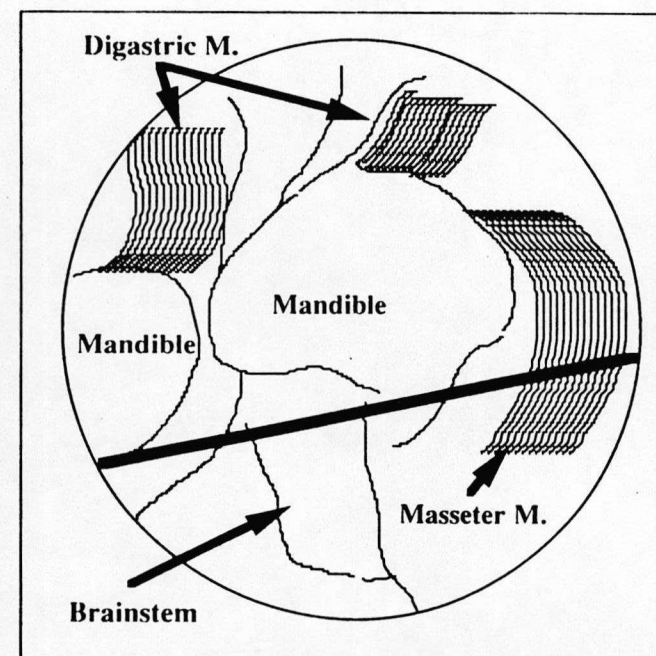


図 5

A

NMA 40 μ M

BIC 10 μ M

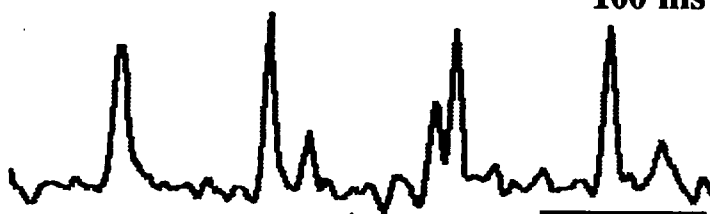


100 ms

GLU 1 mM

BIC 10 μ M

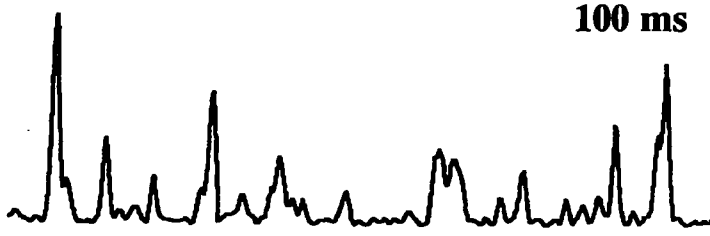
DHK 100 μ M



100 ms

KA 3 μ M

BIC 10 μ M

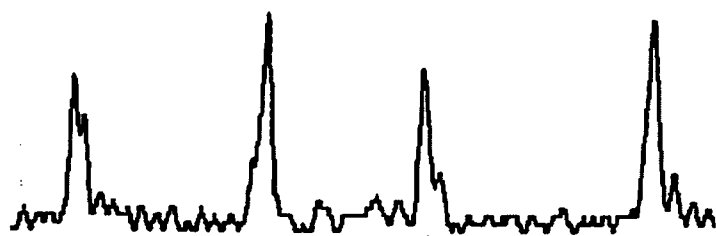


100 ms

B

NMA 40 μ M

BIC 10 μ M



100 ms

GLU 1 mM

BIC 10 μ M

DHK 100 μ M



100 ms

KA 3 μ M

BIC 10 μ M



1000 ms

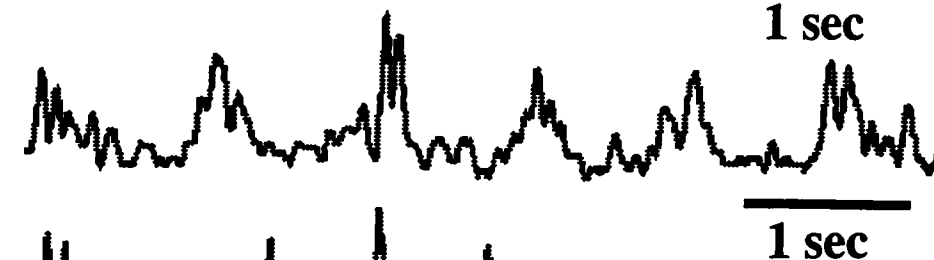
図 6

A

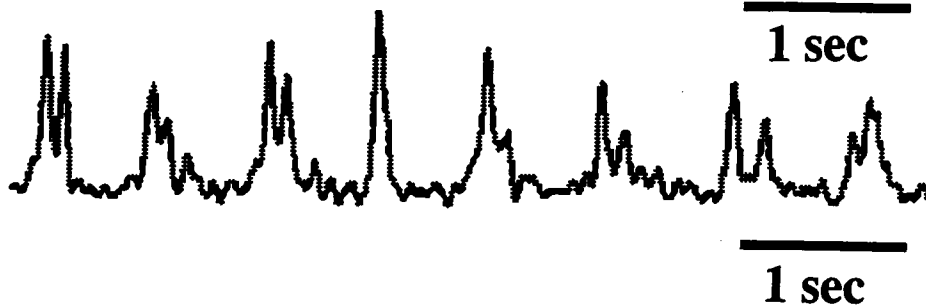
NMA 20 μ M
BIC 10 μ M



NMA 40 μ M
BIC 10 μ M



NMA 60 μ M
BIC 10 μ M



B

APV 20 μ M
NMA 40 μ M
BIC 10 μ M

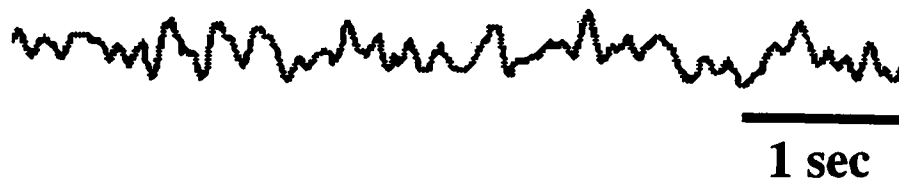


図 7

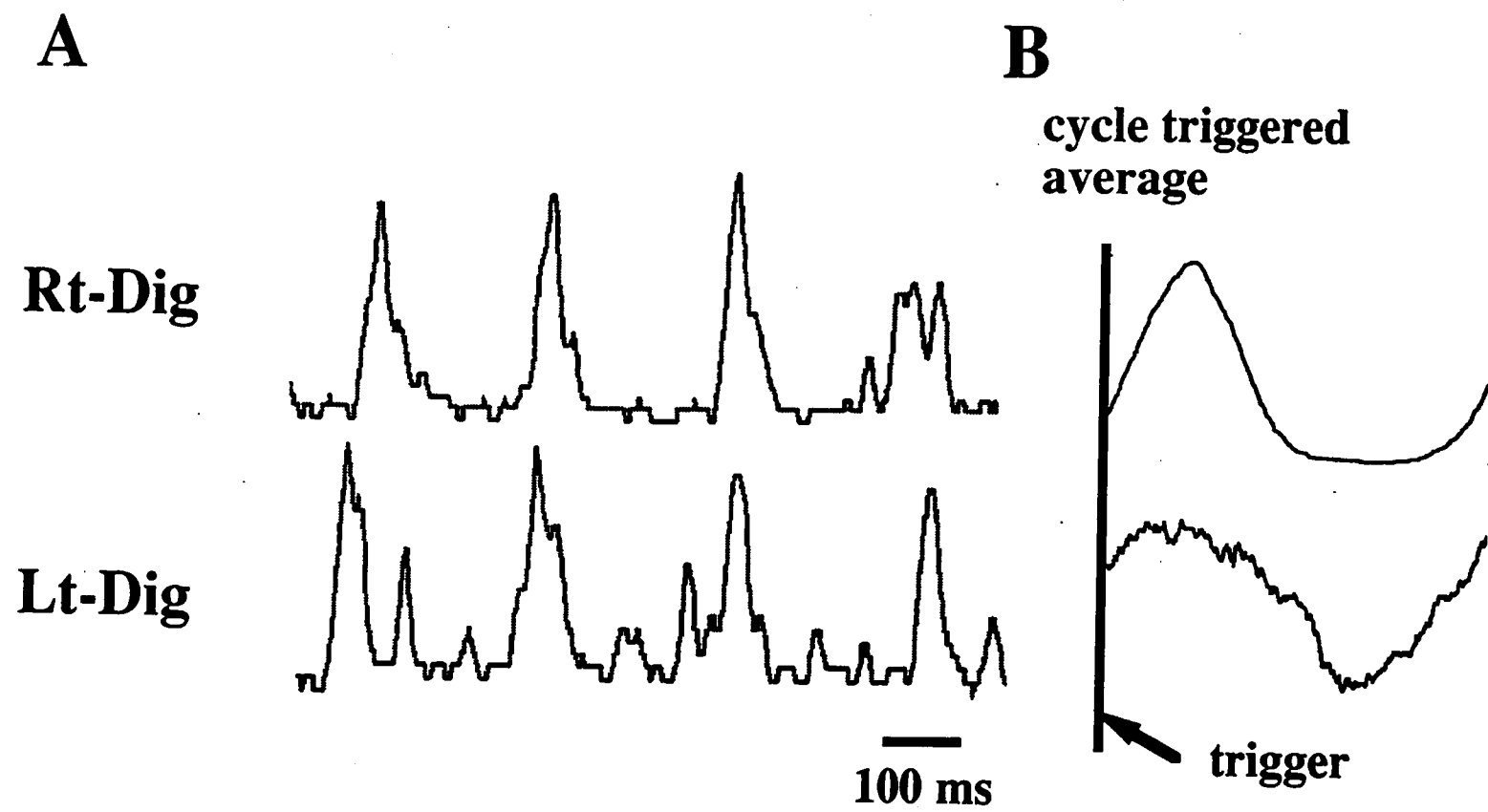


図 8

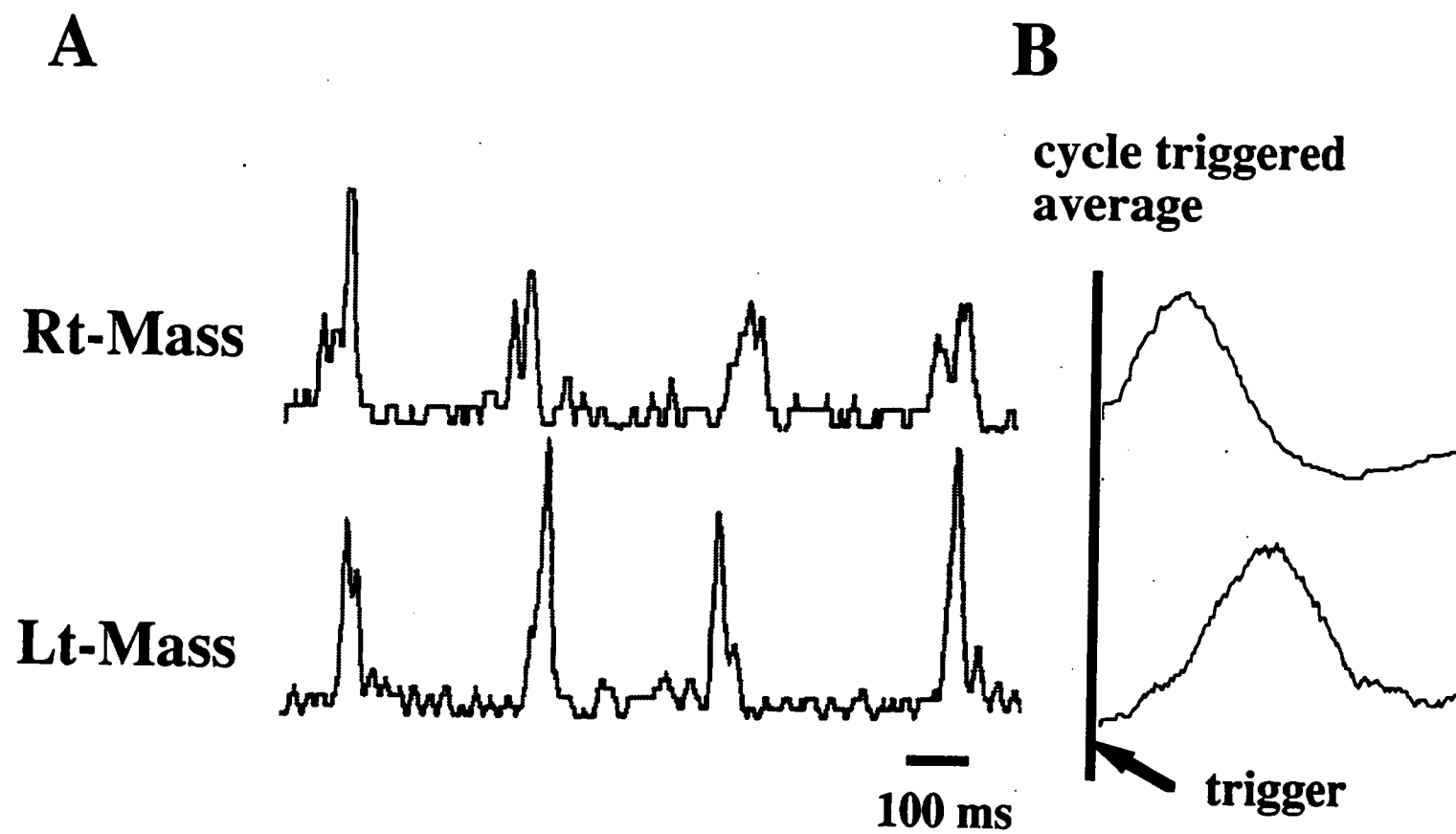


図 9

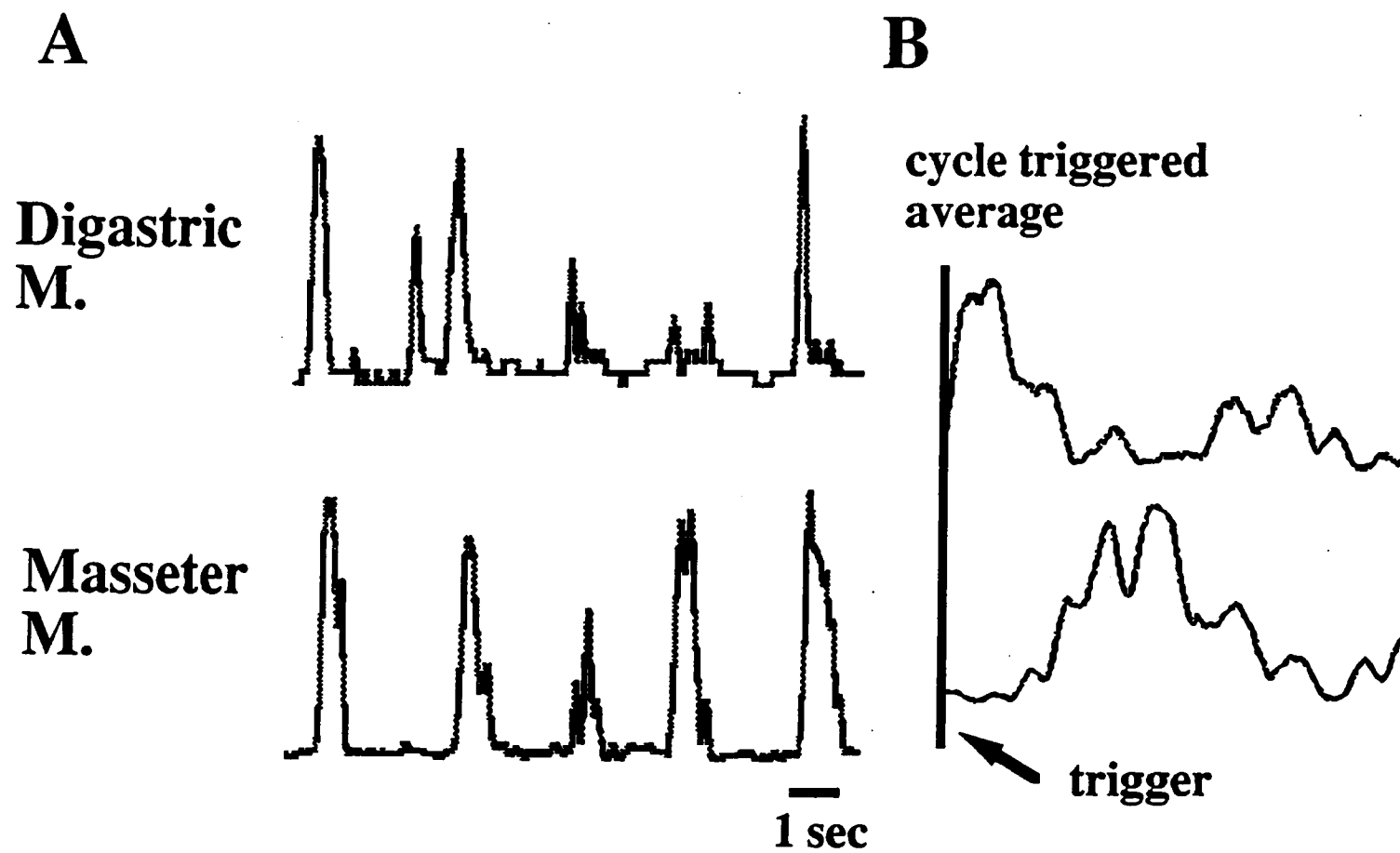


図 10

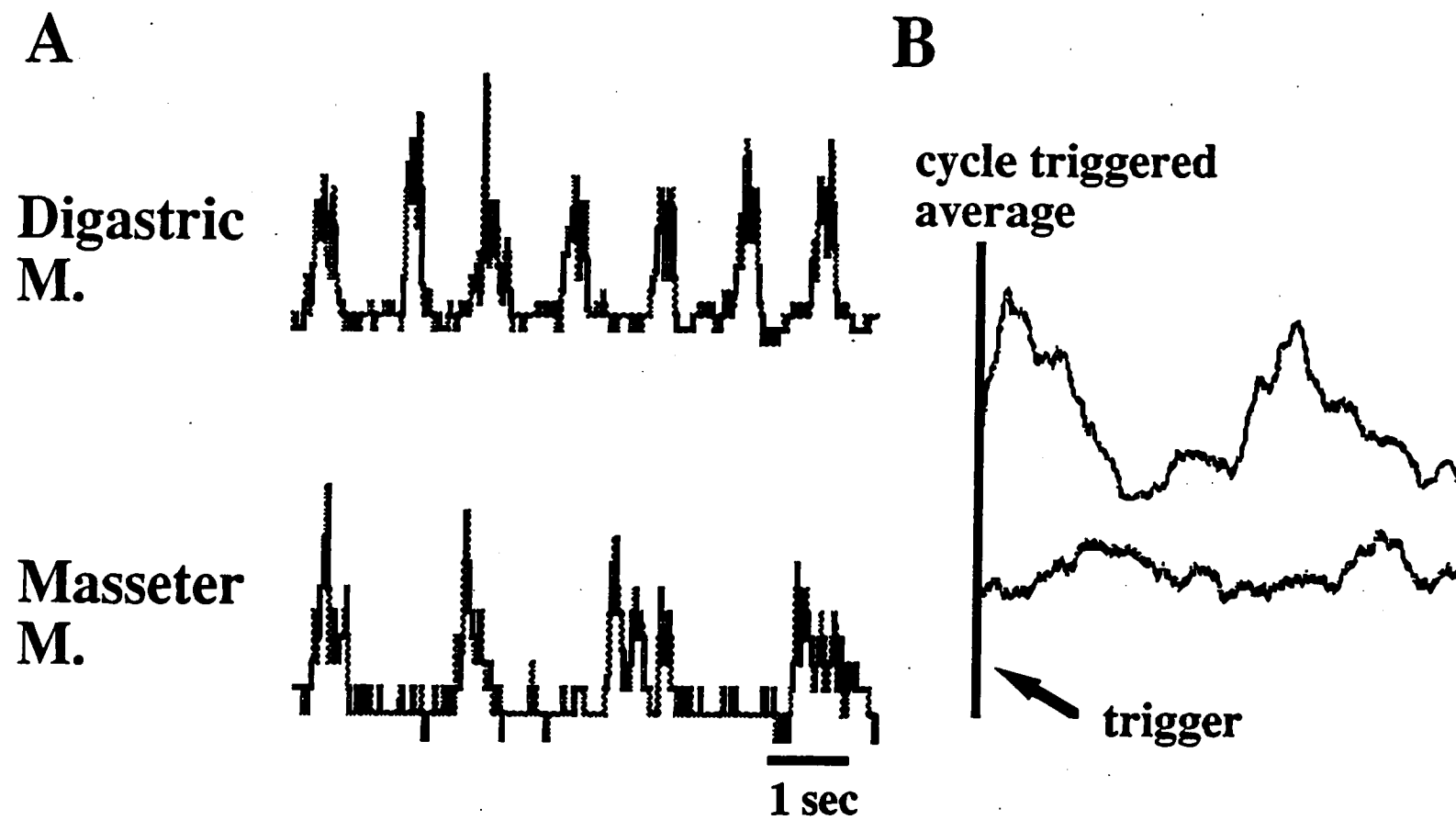
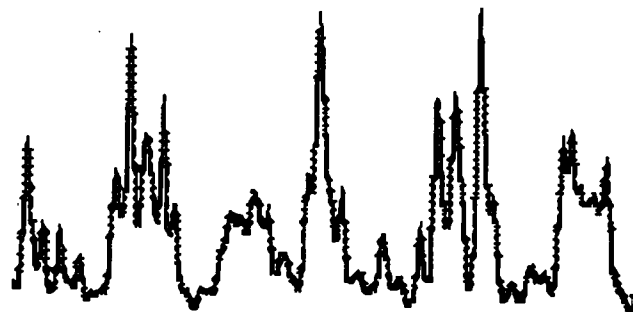


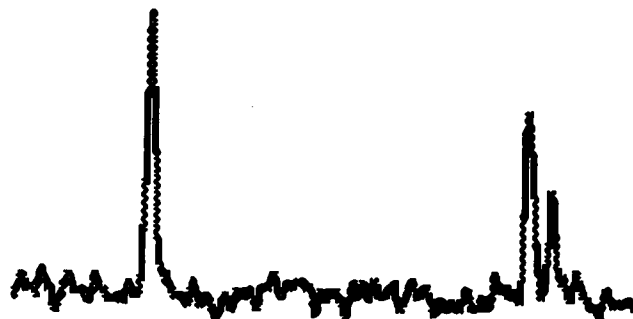
図 11

A

**Digastric
M.**



**Masseter
M.**



1 sec

B

**cycle triggered
average**

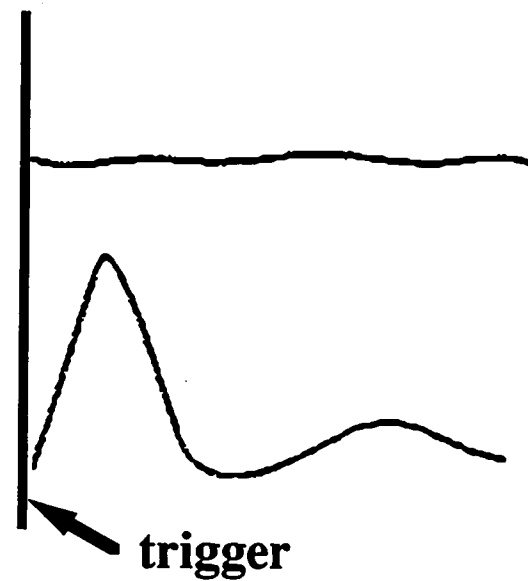


図 12

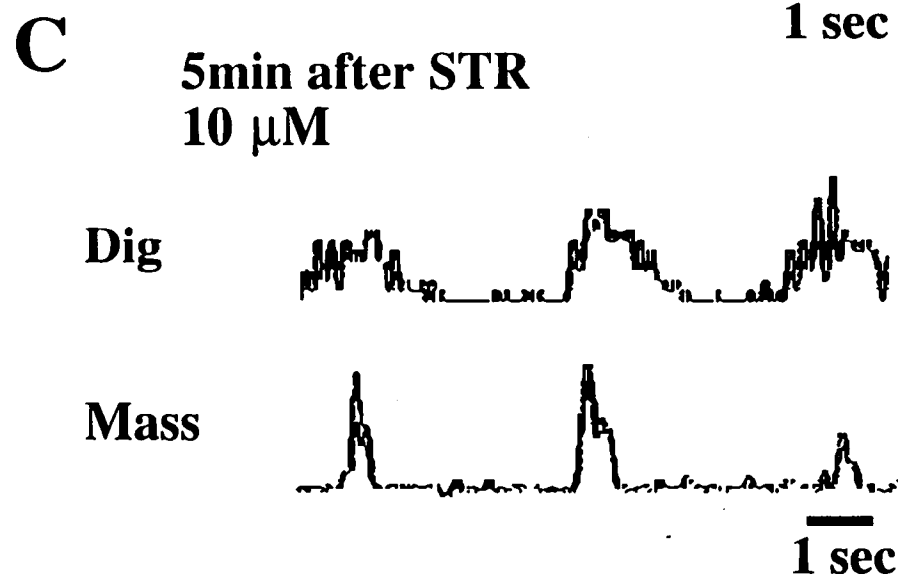
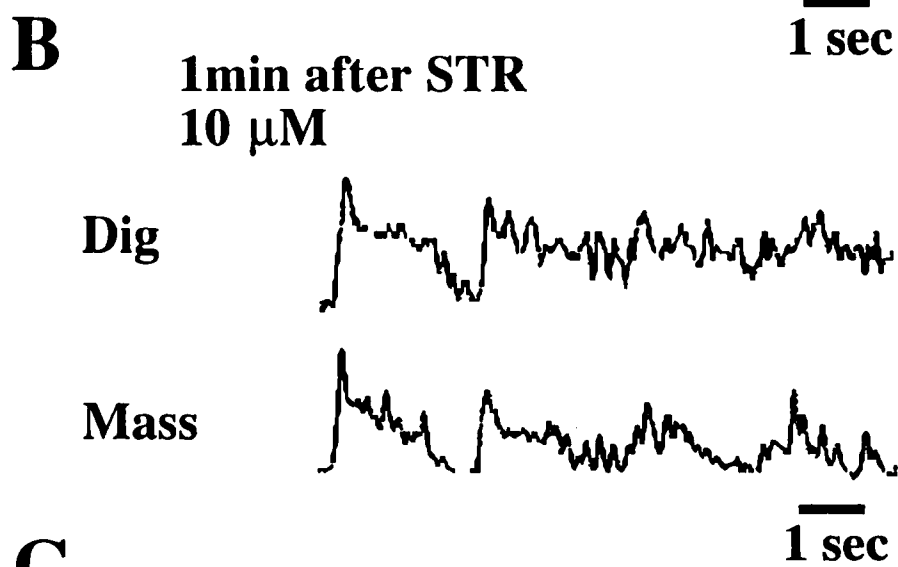
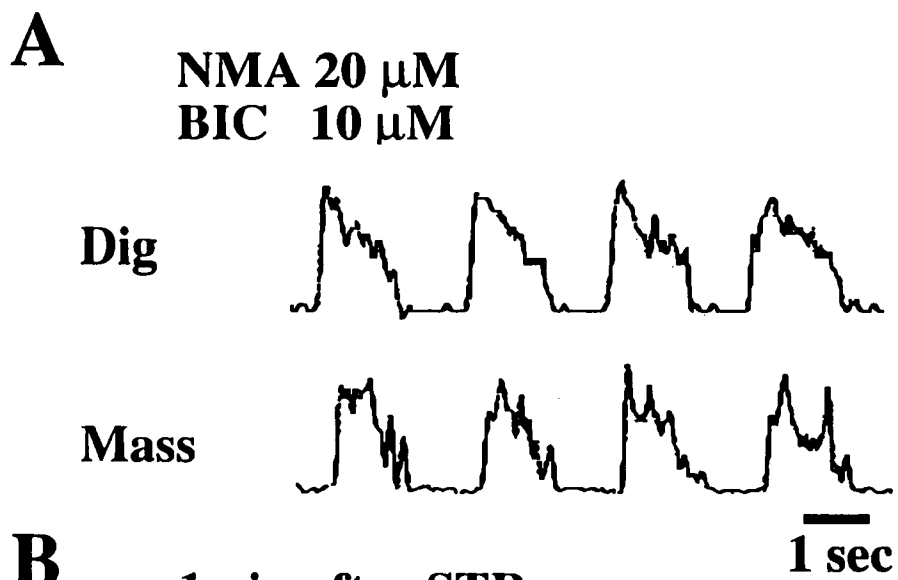
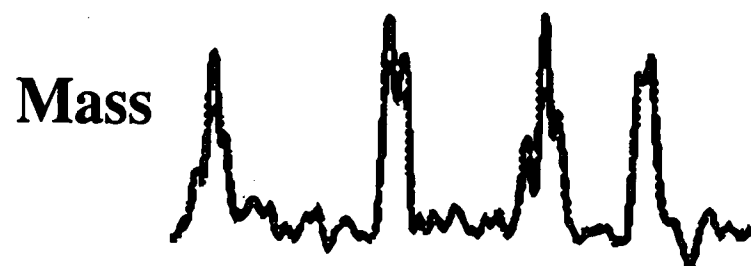
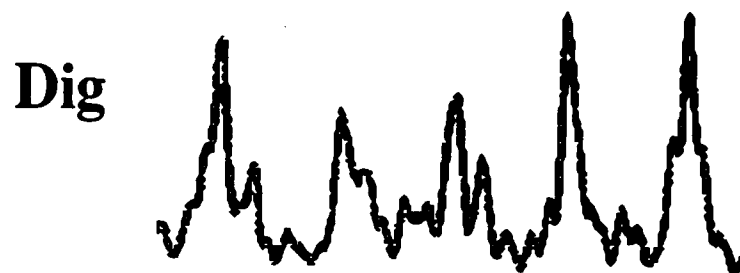


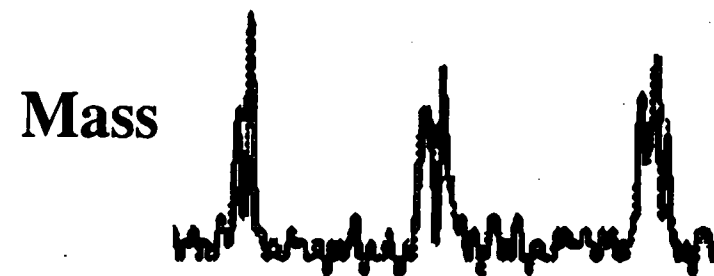
図 13

A NMA 20 μM
STR 10 μM



100 ms

B 5min after
BIC 10 μM



1 sec

図 14

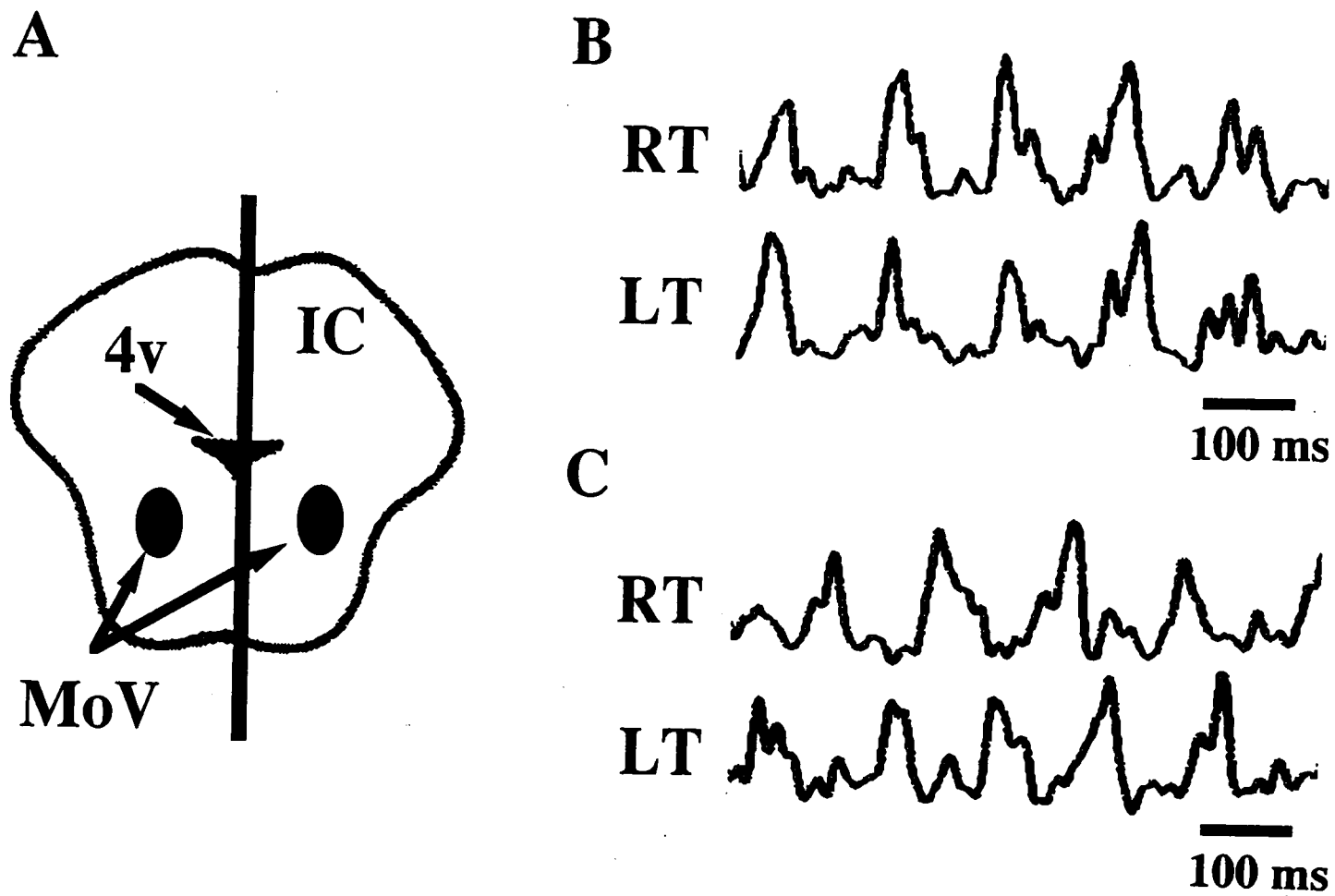


図 15

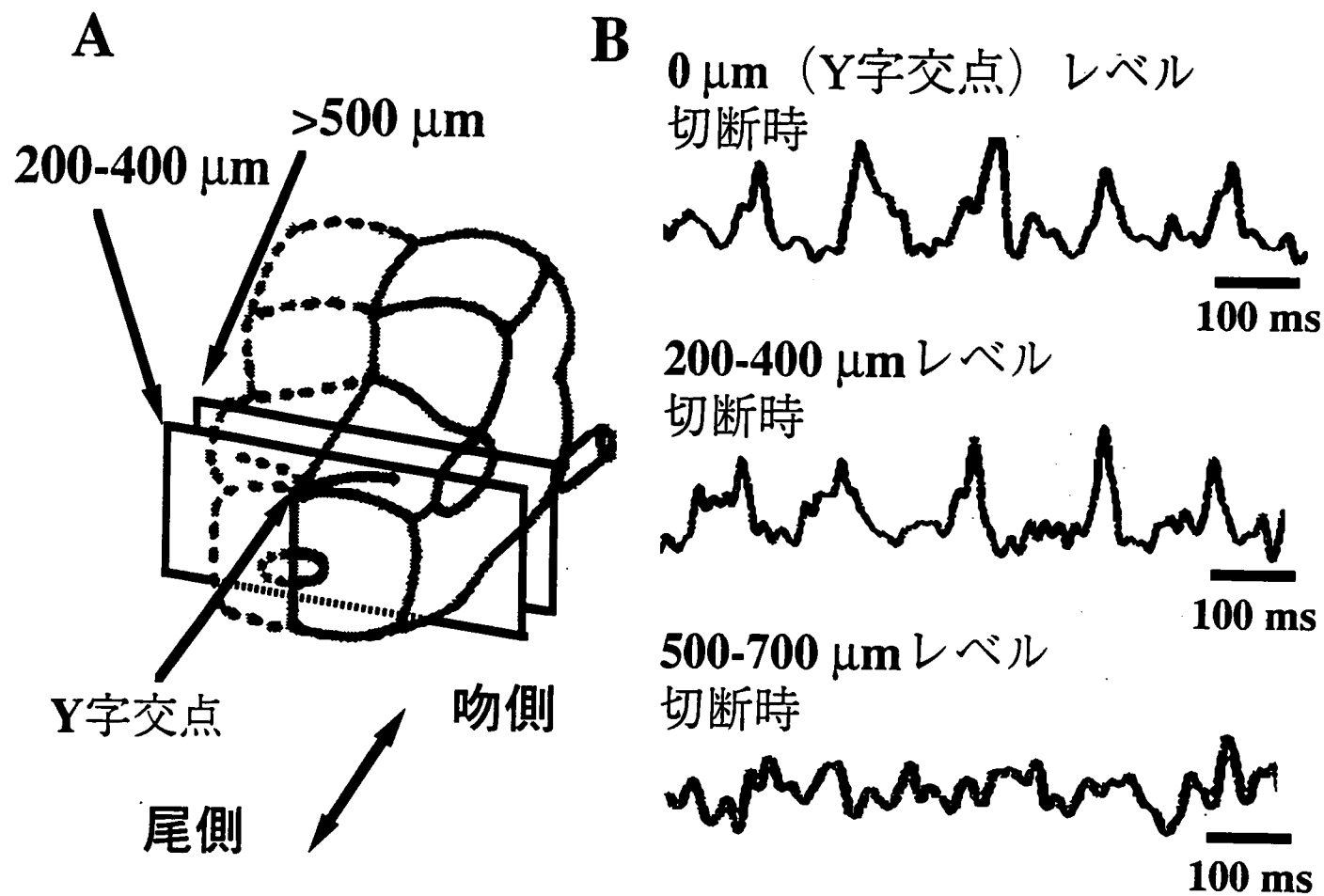
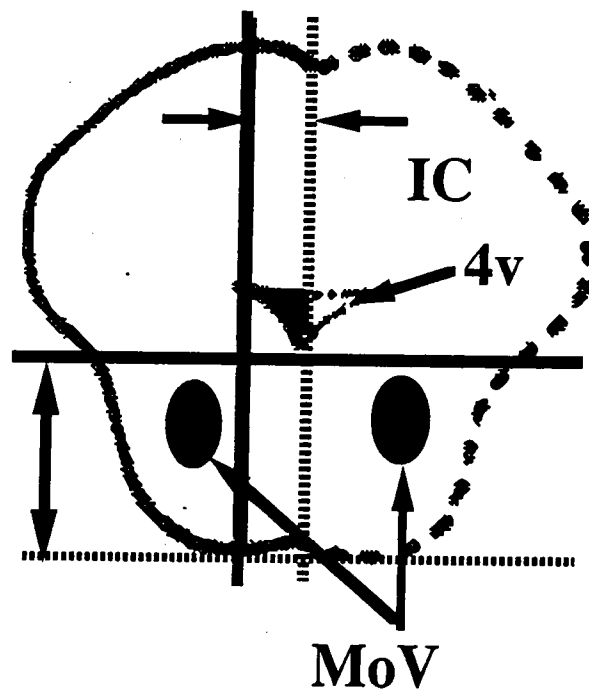


図 16

A



B

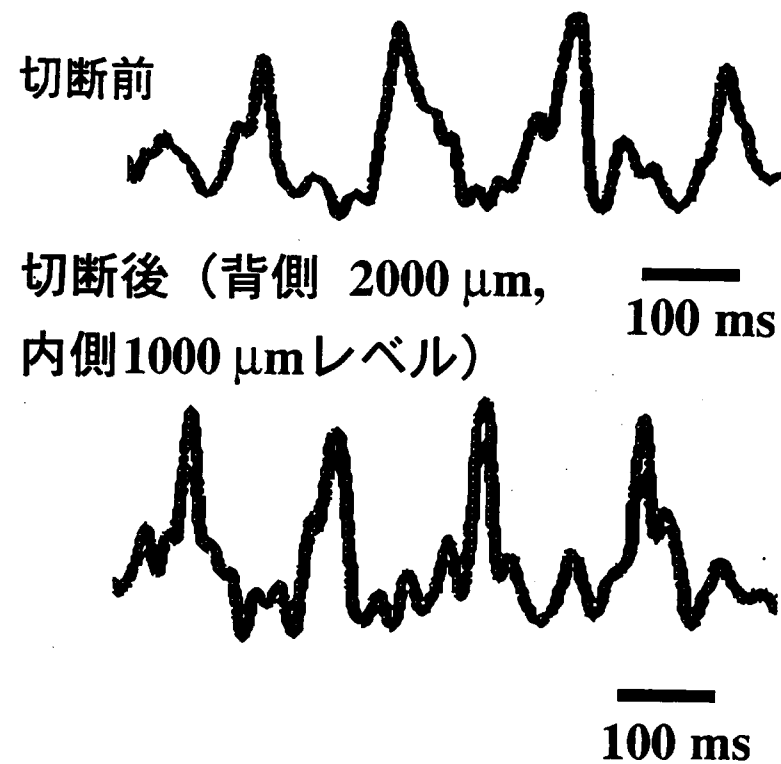


図 17

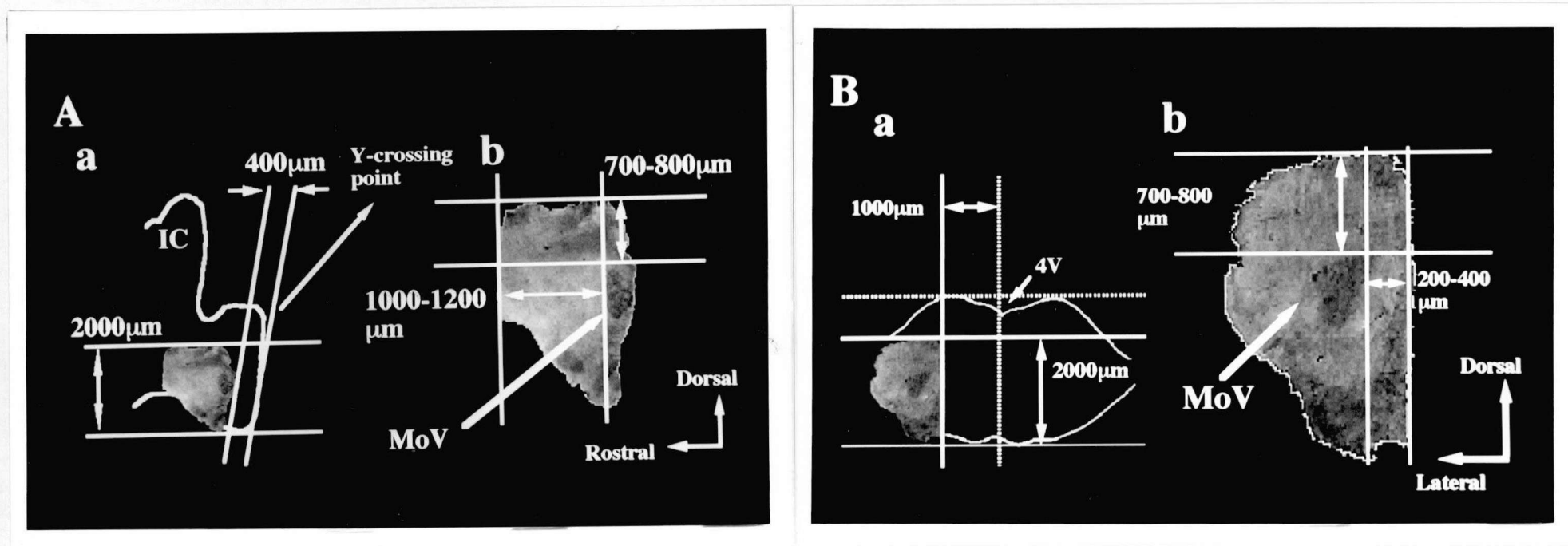


図 18

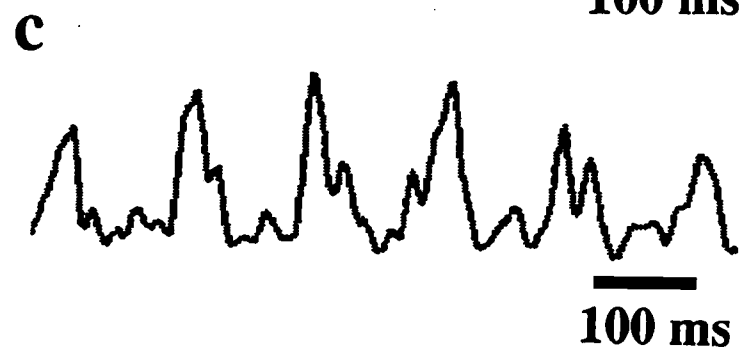
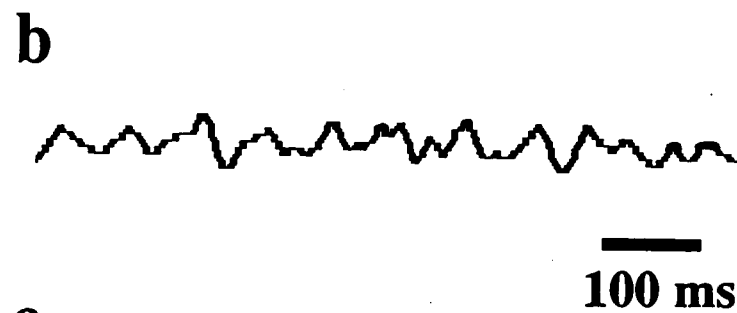
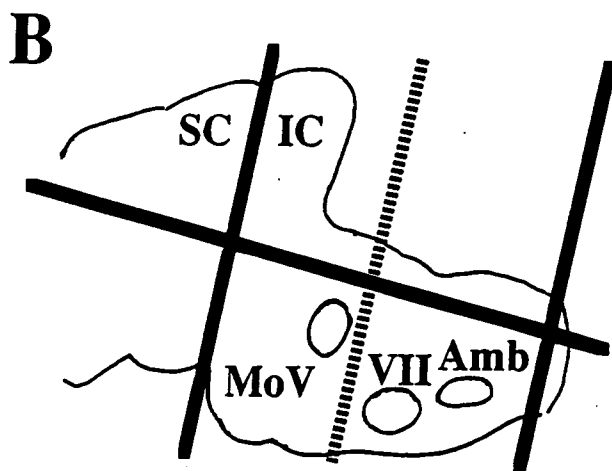
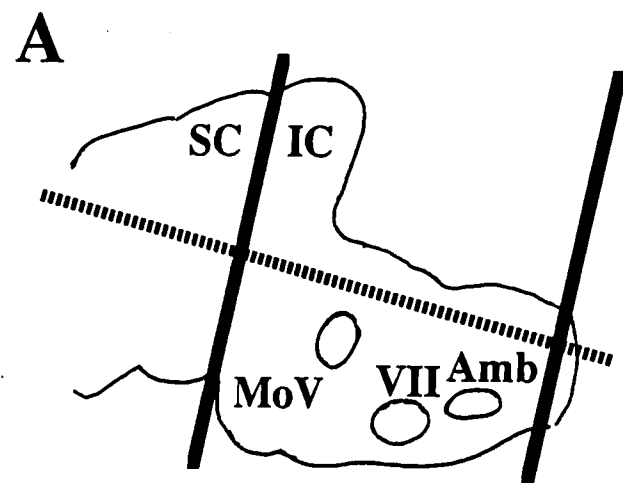


図 19

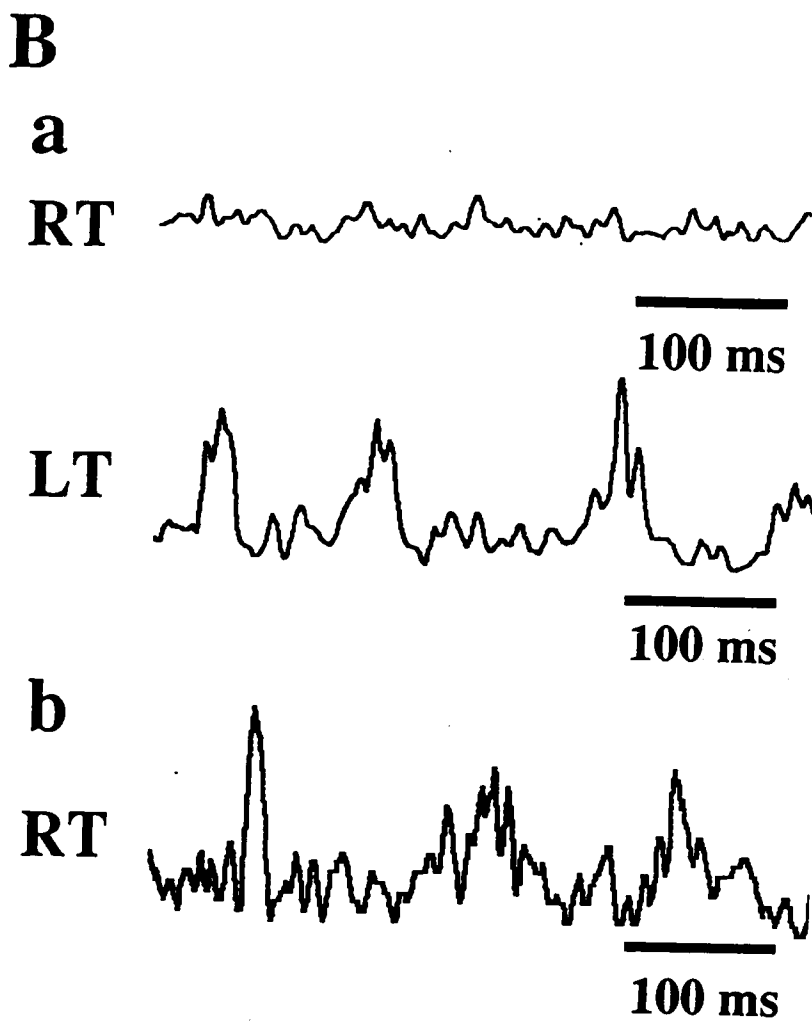
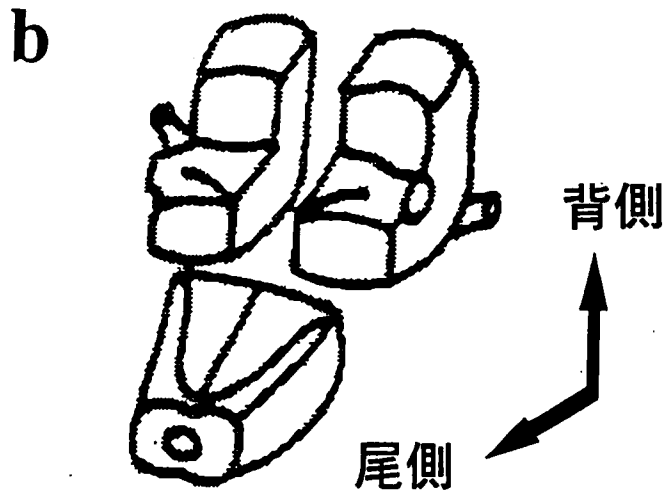
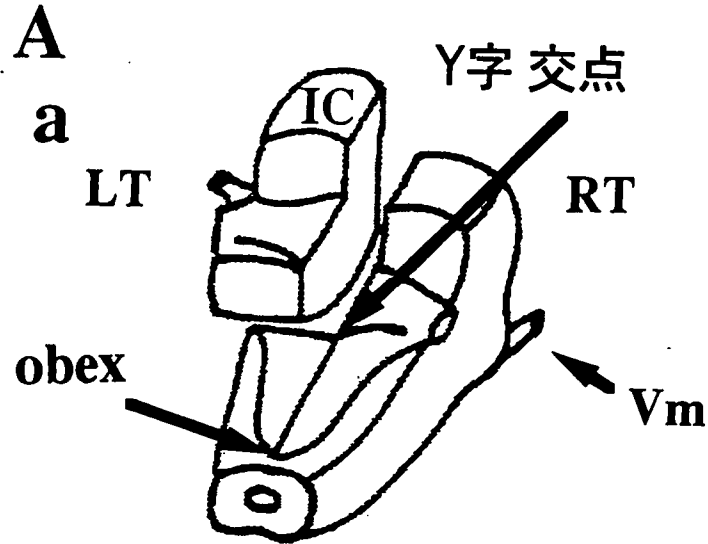


図 20

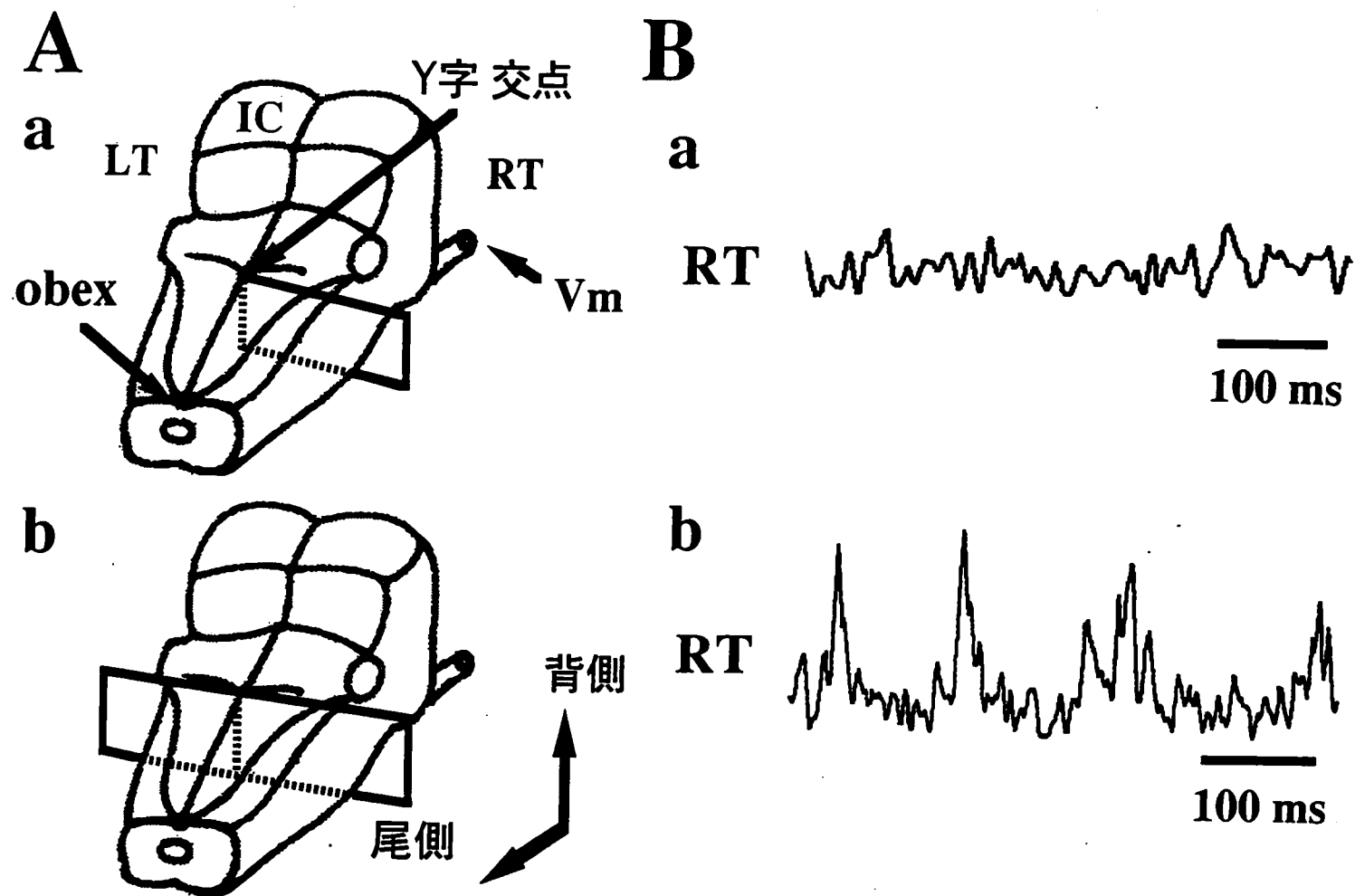


図 21

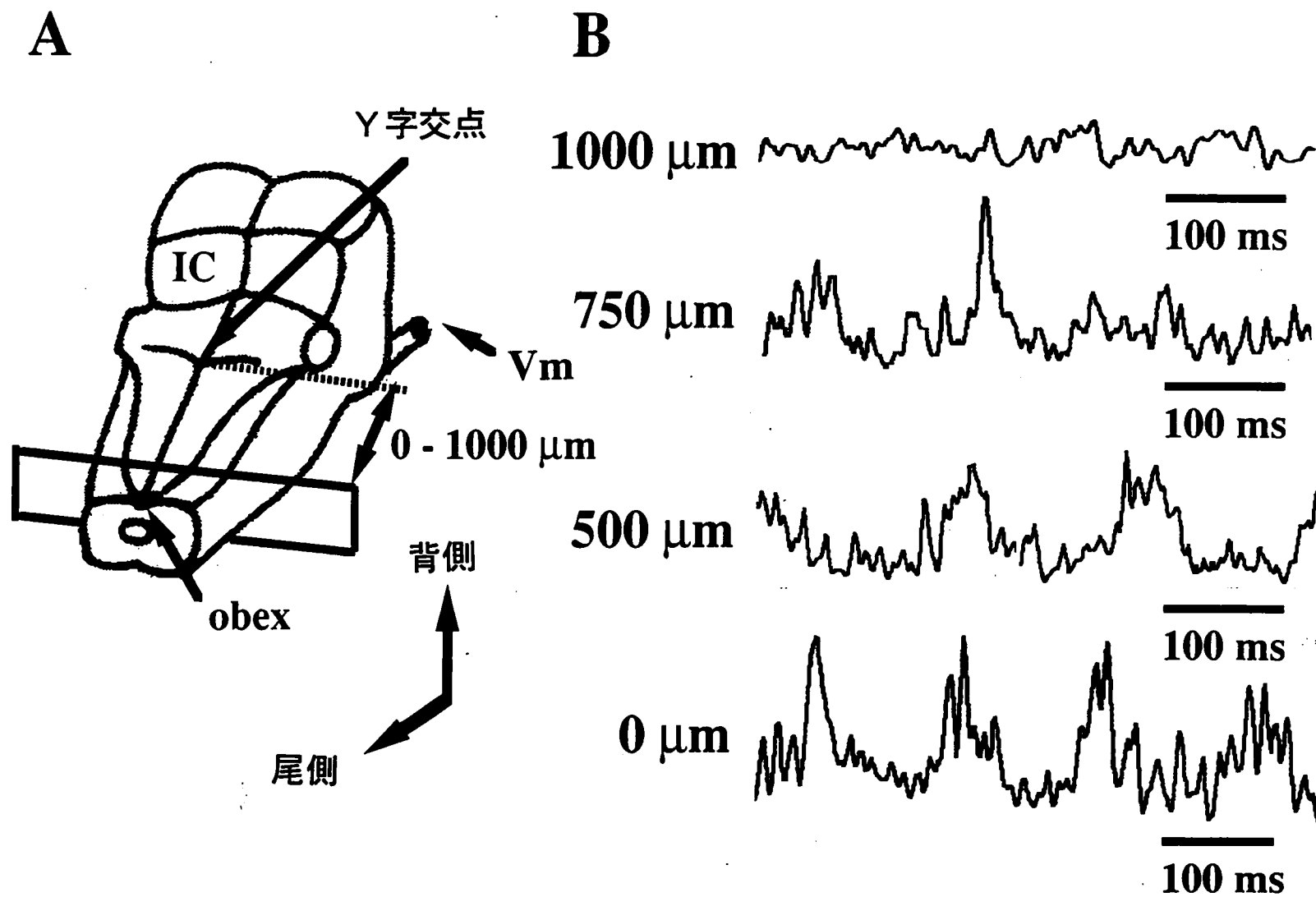


図 22

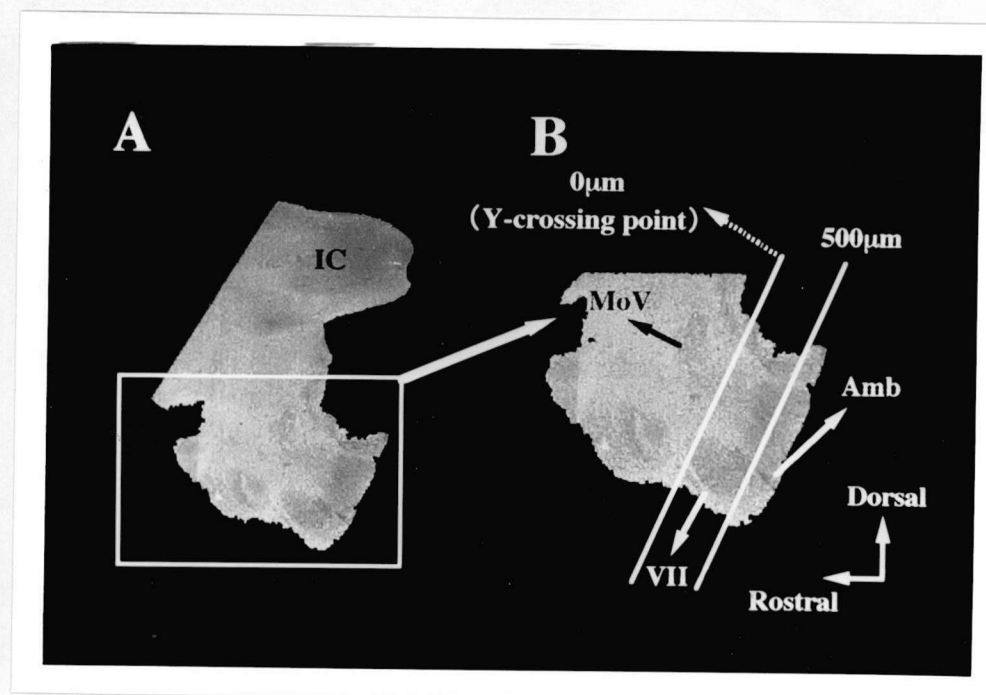
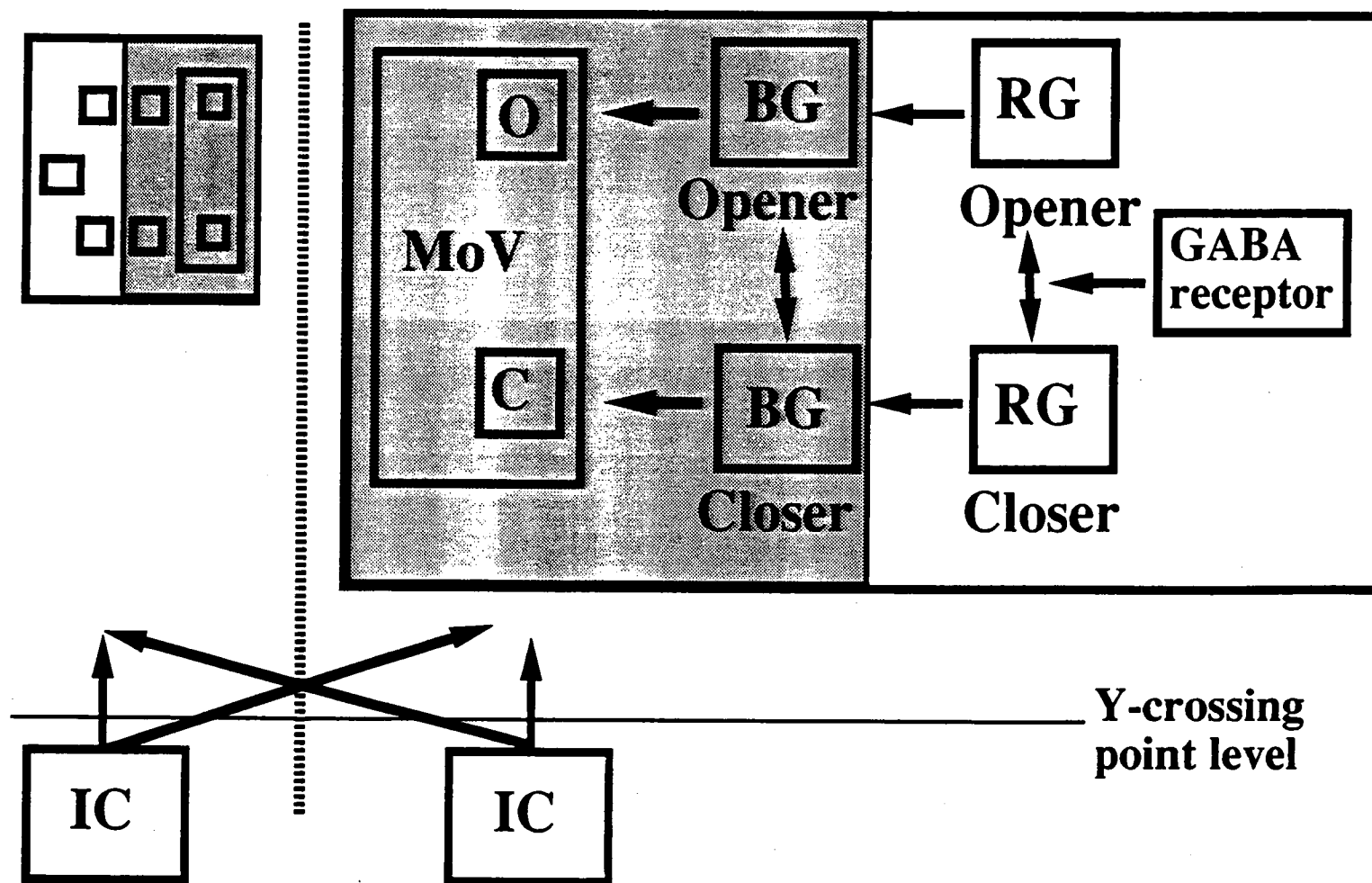


図 23



Analysis of neural mechanism of rhythmical jaw movement relevant to the trigeminal motor activity using an isolated brainstem preparation in vitro

Susumu TANAKA

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Osaka University Faculty of Dentistry

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, JAPAN

key words : trigeminal, motor activity, rhythm generation

This study was performed to analyze the neural circuitry in brainstem, related to the rhythmical jaw movement. Brainstem or jaw attached brainstem were isolated from 0-2 day old neonatal rat, and excitatory amino acids and GABA antagonist were applied to induce the rhythmical trigeminal activities or rhythmical jaw movements. The dissection of brainstem defined the location of rhythm generator, and jaw attached preparation showed the relation between the activities of jaw opener and closer muscles. Results were as follows.

1. Jaw attached brainstem preparation transected at intercollicular and Y-crossing levels could induce the rhythmical jaw movement by NMA-BIC application.
2. Bilateral synchrony was recognized in each of digastric and masseter activities. No synchrony was observed between these ipsilateral digastric and masseter activities by NMA 40 μ M and BIC 10 μ M application, but with NMA 20 μ M and BIC 10 μ M application, synchrony was obtained. This result suggested that two independent rhythm generation circuits were involved in this mechanism ; one for opener and the other for closer.
3. Bath application of NMA 20 μ M in combination with strychnine 10 μ M (Glycine receptor

antagonist) also induced rhythmical jaw movement. But no synchrony was recognized between opener and closer muscle's activities. After additional application of bicuculline 10 μ M to this bath, two muscle's activities were synchronized. GABAergic neurons supposed to be involved in the connection of two generation circuits.

4. Using brainstem preparation without jaw, after midline transection also induced trigeminal rhythmical motor activity in bilateral brainstem tissues. Further transection indicated that the independent rhythm generation circuit existed bilaterally in the brainstem, and that the location of this circuit was restricted to the region around trigeminal motor nucleus.

5. Rhythmical activity was not enhanced in the brainstem caudal to superior colliculus and rostral to obex, and only the respiratory activity was recognized. Serial transection experiments showed that inhibitory circuit existed mainly between caudal to facial nucleus and rostral half of ambiguous nucleus. Rhythm generation was supposed to be inhibited by these circuits bilaterally.