



Title	ラット三叉神経リズム性活動に関わる神経回路の胎生期の発達
Author(s)	石濱, 孝二
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169304
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

ラット三叉神経リズム性活動に関わる神経回路の胎生期の発達

大阪大学大学院歯学研究科歯学臨床系専攻 口腔外科学第一講座

石濱 孝二

緒言

三叉神経系におけるリズムカルな活動は咀嚼や吸啜などに認められるが、この神経活動は呼吸や歩行などと同様にリズムジェネレータとバーストジェネレータが大きく関わっていると考えられる¹⁻⁴⁾。従来の研究から、除脳動物でリズムカルな三叉神経活動を誘発できること⁵⁻⁸⁾や錐体路を電気刺激してリズムカルな顎運動が認められること⁹⁾などはこれらの運動の発現には大脳皮質や感覚系フィードバックが絶対に必要なものではないことを示している。事実培養脳幹を用いても三叉神経にリズムカルな活動を誘発させることは可能である^{10,11)}。培養脳幹は動物の生死に気を使うことなく中枢神経系にアプローチでき、血液-脳関門を無視して薬物の投与を行うことができるため神経機能の研究には非常に有用であり、その手法を用いて呼吸に関する研究ではリズムジェネレータの局在やリズムジェネレータを構成するニューロンの membrane property、運動核への neurotransmission などが解明されるようになった¹²⁻¹⁸⁾。これまでの培養脳幹を用いた研究から新生仔ラット培養脳幹で起こる三叉神経リズム性活動の発現に関わるリズムジェネレータは三叉神経運動核近傍にも存在することが明らかとなっている¹⁰⁾。リズムカル顎運動の際の三叉神経運動ニューロンの活動に関し、リズムジェネレータとのつながりについて明確に示した研究は数少なく^{19,20)}、見解が分かれる部分でもあ

り、投射経路については未だ想像の域を出ない。また、リズムカル顎運動に関わる神経回路の発達、呼吸の神経回路の発達がそうであるように²¹⁻²³⁾、胎生期より始まると考えられ、胎生期の発達経緯をとらえることは神経回路を理解する上で非常に重要である。しかし過去の文献を渉獵しても胎生期のリズムカルな顎運動に関わる神経回路の発達経緯はほとんど明らかでない。

そこで本研究ではリズムジェネレータを含む培養脳幹を用いて胎生期における三叉神経リズム性活動の様相を検討することにより神経回路の発達経緯を分析した。さらに、patch clamp (current[I]-clamp whole cell recording) 法を用いることにより、新生仔と胎仔における三叉神経運動ニューロンとリズムジェネレータの関係を検討した。

方法

実験には胎生16日 (E-16) から胎生21日 (E-21) までの胎仔と生後0日 (P-0) から生後3日 (P-3) までのSprague-Dawley 系ラットを用いた。胎仔ラットについてはハロセン (Halothane: 2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane / SIGMA) 吸入深麻酔下で母獣ラットから胎仔を体外に取り出し、直ちに脳幹を摘出した。また新生仔ラットにおいてもハロセン吸入深麻酔下で脳幹を摘出した。実体顕微鏡下 (Stemi SV-6 / ZEISS 社製) にて人

工脳脊髄還流液 (artificial cerebrospinal fluid : ACSF) で満たされたアクリル製の recording chamber (図1) 内で目的の脳幹標本を作製した。ACSF は95%O₂-5%CO₂ 混合ガスで飽和され、温度は常に27℃に保たれるようにした。ACSF の組成は以下に示す通りである (mM) ; NaCl,128.0 ; MgSO₄,1.0 ; KCl,3.0 ; NaH₂PO₄,0.5 ; NaHCO₃,24.0 ; CaCl₂,1.5 ; glucose,30.0 (pH7.4) 。また、本研究では薬物刺激としてN-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor のagonist であるN-methyl-D,L-aspartate (NMA:5-50 μM) ,non-NMDA receptor のagonist であるKainic acid (KA:0.5 μM) および α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid (AMPA:0.5 μM) ,Gamma-aminobutyric acid (GABA)_A receptor のantagonist であるBicuculline methiodide (BIC:5-20 μM) ,NMDA receptor のantagonist であるD,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV:20 μM) ,non-NMDA receptor のantagonist である6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX:5 μM) を適宜用いた。三叉神経活動については三叉神経運動根にガラス吸引電極 (Suction Electrode / A-M System社製) を設置し、増幅器 (Cyber Amp 380 / Axon Instruments 社製) で信号を増幅 (×10,000) し、フィルター (300Hz~1.8kHz、3db) を通し、データ解析ソフト (Mac Lab/8s / AD instruments

社製)を用いてコンピュータ (Macintosh G3/233/Apple社製)のモニタ上で観察した。また、三叉神経運動ニューロンの膜電位の記録はPatch clamp amp (AXOPATCH 1D/Axon Instruments 社製)で増幅した後、三叉神経活動の観察と同様にデータ解析装置を介しコンピュータのモニタ上で観察した。データはアナログ→デジタル変換器 (VR-100B/INSTRUTECH 社製)を介しS-VHS video tape recorder (HV-S730/MITSUBISHI 社製)で保存した(図2)。なお、patch clampのガラス電極内部のsolutionの組成は以下の通りである (mM) ;Potassium gluconate, 120.0 ; NaCl, 5.0 ; CaCl₂, 1.0 ; MgCl₂, 1.0 ; HEPES, 10.0 ; BAPTA (tetrapotassium salt) , 1.0 ; ATP (magnesium salt) , 2.25 (pH7.30)。

記録される細胞が三叉神経運動ニューロンであるかどうかは、三叉神経運動根を100 μ sec, 60mVの単一矩形波で電気刺激することによって得られる逆方向性電位をもって同定した(図3)。

実験 I : 胎生期ラット (E-16~21) の三叉神経リズム性活動について

胎生期ラットの脳幹標本を用いて各種薬物刺激により三叉神経運動根から三叉神経リズム性活動を記録し、その活動様相を各胎齢日に分けて解析し比

較した。脳幹標本は吻側は上丘と下丘の間、尾側は脳幹背側の菱形窩正中溝のY字交点（Y-crossing point）で冠状断し¹⁰⁾（図4）、神経活動記録用の recording chamber の sylgard resine 上に脳幹腹側を上にしてピン固定し、ガラス吸引電極を三叉神経運動根に設置した。三叉神経リズム性活動誘発にはBICと、興奮性アミノ酸のNMA、KA、AMPAを用いた。薬物を投与する際はACSFの灌流を止め、recording chamber内（容積20cc）に目的の濃度になるように直接薬物を滴下した。

実験Ⅱ：新生仔ラットでの三叉神経リズム性活動における三叉神経運動ニューロンの膜電位変化について

新生仔ラット（P-0～3）の脳幹標本を用いて薬物刺激により三叉神経リズム性活動を誘発し、その活動中の三叉神経運動ニューロンの膜電位の変化を patch clamp 法のI-clamp whole cell recording で検討した。脳幹標本は実験Ⅰと同じ範囲で作製し、patch clamp 用 recording chamber 内の sylgard resin 上に尾側断面を上にしてピン固定した（図5）。ACSFは常に27℃に保たれるようにし、灌流速度は3ml/minとなるように灌流装置（Perista Pump/ATTO社製）を用いて chamber 内を灌流させた。各種薬物の投与は

ACSF に目的の濃度となるように予めACSF の入った別の容器に薬物を混入し、通常の灌流液路に三方活栓で連結し必要時に切り替え、灌流することで行った。灌流速度およびrecording chamber 内の液面の高さを一定に保つように配慮した。

同脳幹標本に対しKogoら¹⁰⁾と同様のBIC-NMA刺激により三叉神経運動根から約6Hzのリズミカルな神経活動が得られた(図6)。そこでまず、BIC-NMA刺激時の三叉神経運動根からの神経活動と、同側の三叉神経運動ニューロンの膜電位の同時記録を行い、三叉神経運動根からリズミカルな活動が発現している時の三叉神経運動ニューロンの膜電位の変化について検討した。また、BICおよびNMAのそれぞれの作用については単独投与を行い三叉神経運動ニューロンの膜電位にみられる影響を観察した。さらにBIC-NMA 刺激時において三叉神経ニューロンにリズミカルな活動電位が発現している状態で膜電位を人為的に変化させ、活動電位の周期性について検討した。

実験Ⅲ：胎仔ラット (E-18~19) での三叉神経リズム性活動における三叉神経運動ニューロンの膜電位変化について

胎生期ラット（E18～19）での三叉神経リズム性活動における三叉神経運動ニューロンの膜電位の変化について、同側の三叉神経運動ニューロンの膜電位を実験Ⅱと同じ手法を用いて三叉神経運動根からの神経活動と同時に記録した。

結果

実験Ⅰ：胎生期ラット（E-16～21）の三叉神経リズム性活動について

1-1) 各胎齢日におけるBIC $10\mu\text{M}$ -NMA $20\mu\text{M}$ 投与時の三叉神経活動

E-20～21のラットではBIC $10\mu\text{M}$ -NMA $20\mu\text{M}$ を投与すると三叉神経運動根からリズムカルな(cycle duration : mean \pm S.D. ; $155.07 \pm 30.17\text{msec}$)三叉神経活動が得られた(図7)。その活動様相は、活動の発現から消失までの間に活動が周期的に減衰する様相は示さず、新生仔ラットにおいて観察された三叉神経活動の活動様相と同様であった($n=12/12$)。

E18～19のラットではBIC $10\mu\text{M}$ -NMA $20\mu\text{M}$ を投与すると三叉神経運動根からは周期的でゆっくりとした活動(cycle duration ; $4.17 \pm 0.63\text{sec}$)が観察され、その振幅は徐々に減衰した。E-20～21のラットや新生仔ラットの活動様相とは異なった様相を呈した。投与薬物のBICとNMAの濃度を各々

変えて (BIC5-20 μ M、NMA5-50 μ M) 刺激を行ったが、活動の振幅は一定になることはなかった。BIC10 μ M-NMA20 μ M投与で得られるゆっくりとした周期の活動を解析したところ、E-20~21のラットや新生仔ラットで認められたようなリズムカルな神経活動で構成されているのが観察された (図8) (n=15/15)。このリズム性活動のcycle duration は175.49 \pm 58.80msecであった。

E16~17のラットではBIC10 μ M-NMA20 μ Mを投与すると三叉神経運動根からはE18~19のラットで得られた活動周期よりさらにゆっくりとした活動 (cycle duration は8.04 \pm 2.27sec、n=6) が観察されたが、E-20~21のラットや新生仔ラットで認められたようなリズムカルな神経活動はこの活動の中には認められなかった (図9) (n=6/8)。また、BICとNMAの濃度を各々変えて (BIC5-20 μ M、NMA5-50 μ M) 観察を行ったが、リズムカルな神経活動が得られることは無かった。

1-2) 各胎齢期におけるNMA濃度と三叉神経リズム性活動のcycle duration

30 μ MのNMAをBIC10 μ Mと同時に投与すると、E-20~21のラットでは三叉神経活動のcycle duration は139.16 \pm 28.79msecであった (n=5)。

また、E18～19のラットに対してBIC10 μ M-NMA30 μ M 投与した場合には徐々に振幅が減衰する活動様相に変化は現われなかったが、その活動を構成している速いリズムミカルな活動を解析するとcycle duration は141.21 \pm 30.02 msecであった (n=5)。これらの結果をBIC10 μ M-NMA20 μ M投与時のcycle duration と比較するとE-20～21の群とE18～19の群の両群においてNMAの濃度を20 μ Mから30 μ Mに高くすることでリズム性活動のcycle duration が有意に減少し活動周期が短縮していることが認められた (図10) (Mann-Whitney U test, p<0.01)。しかしながら、同じ濃度でE-20～21の群とE18～19の群の間の三叉神経リズム性活動のcycle duration を比較すると、BIC10 μ M-NMA20 μ M投与した場合もBIC10 μ M-NMA30 μ M 投与した場合においても両群の間には有意差は認められなかった。

1-3) 各種興奮性アミノ酸投与時の三叉神経リズム性活動

NMAの代わりにKA0.5 μ MをBIC10 μ Mとともに投与しても、E-18～19でもゆっくりとした周期的な活動の中にリズムミカルな神経活動を認め、cycle duration は171.78 \pm 41.65 msecであった (n=5)。また、E-20～21でもリズムミカルな活動の振幅はほぼ一定で平均のcycle duration は173.43 \pm

39.01msecであった (n=5)。E-16~17 についてもNMAの代りにKA0.5 μ MをBIC10 μ Mとともに投与したが、小さな不規則な活動を認めるのみで、リズムカルな三叉神経活動は認められなかった (n=6)。

同様にAMPA0.5 μ MをBIC10 μ Mとともに投与した場合も、E-18~19での活動様相はBIC10 μ M-NMA20 μ M投与時と変化はなかった。リズムカルな三叉神経活動のcycle duration は147.08 \pm 41.12msecであった (n=5)。また、E-20~21ではcycle duration は159.86 \pm 35.87msecであった (n=5) (図11)。E-16~17 については6例中4例では得られた活動は振幅が小さく、リズムカルな三叉神経活動は認められなかったが、2例においてBIC10 μ M-NMA20 μ M投与時のE-18~19で認められた活動様相を示し、リズムカルな三叉神経活動が弱いながらも観察され、NMAやKAとは少し異なった結果が認められた。

各種興奮性アミノ酸投与時に得られたリズムカルな三叉神経活動のcycle duration を解析し、E-18~19群とE-20~21群の中で有意差を検定したが、興奮性アミノ酸の違いによるリズムカルな三叉神経活動のcycle duration には影響しないことが確認できた。

実験Ⅱ：新生仔ラットでの三叉神経リズム性活動における三叉神経活動と三叉神経運動ニューロンの膜電位について

Ⅱ-1) 三叉神経リズム性活動時の三叉神経運動ニューロンの膜電位

新生仔ラットの三叉神経運動根にガラス吸引電極を設置し、それと同側の三叉神経運動核内にpatch clamp電極を刺入し、ニューロンをclampした。三叉神経運動根からの電気刺激により、clampしているニューロンが三叉神経運動ニューロンであることをantidromic testで確認した(図3)。また、I-clamp whole cell recordingに移行し、holding potential = 0で約10分間膜電位が安定していることを確認した後に、BIC10 μ M-NMA20 μ Mを混入したACSFを灌流した。三方活栓からrecording chamberまでの還流液路チューブ内の容積と灌流速度より、薬物混入のACSFがrecording chamberに到達するまでの時間を求め、薬物混入のACSFがrecording chamberに到達した時点を0分として表わしている。

まず、BIC10 μ M-NMA20 μ Mを同時に投与すると約2分後よりclampしている三叉神経運動ニューロンの膜電位はこのニューロンの静止電位から緩徐に脱分極するとともに5mV程度の小さな脱分極がリズムカルに出現した。

その小さな脱分極の平均の周波数を解析すると 5.5 ± 1.3 Hzであった。その

後も膜電位は徐々に脱分極を続け、またリズムミカルな小さな脱分極もさらに明瞭に出現し、約6分後には静止電位から15~30mV脱分極し、三叉神経運動根からのリズムミカルな神経活動と同期してリズムミカルな活動電位が三叉神経運動ニューロンから認められた (n=6/10)。そのリズムミカルな活動電位の周波数は 5.2 ± 0.4 Hz (n=6) であった (図12.13)。

このようにリズムミカルな三叉神経活動と同期してリズムミカルな活動電位が認められた三叉神経運動ニューロン (n=6) の膜特性を以下に示すと series resistant は 53.4 ± 12.5 M Ω 、whole cell capacitance は 0.63 ± 0.51 pF、resting potential は -51.2 ± 7.3 mV であった。

II-2) NMA20 μ M 単独投与時の三叉神経運動ニューロンの膜電位

三叉神経運動ニューロンの patch clamp の方法、および、薬物の投与方法は実験 II-1) と同様に行い、BICを投与せずにNMA20 μ Mのみ投与して三叉神経運動ニューロンの膜電位変化を検討した。薬物を投与してから約4分後より clamp している三叉神経運動ニューロンの膜電位は静止電位から徐々に脱分極し、約5mVの小さな脱分極がリズムミカルに出現した。そのリズムミカルな小さな脱分極の平均の周波数は 6.2 ± 1.3 Hz であった (n=3)。その後も

膜電位は緩徐に上昇し、またリズムミカルな小さな脱分極も明瞭に現われ、投与後約7分で膜電位は静止電位から15~25mV脱分極し、活動電位が認められた。しかしBIC10 μ M-NMA20 μ Mを同時に投与した実験II-1)の結果とは異なり、NMA20 μ Mの単独投与では活動電位は認められるものの、リズムミカルには出現しなかった(図14)。活動電位はリズムミカルに認められなかったが、小さな脱分極は活動電位が現われなかった時でも認められていた(n=3/3)。

II-3) BIC10 μ M単独投与時の三叉神経運動ニューロンの膜電位

NMAを投与せずにBIC10 μ Mのみ投与して三叉神経運動ニューロンの膜電位変化を検討した。BIC10 μ Mのみ投与すると膜電位が3~5mV脱分極しただけで、実験II-1)やII-2)でも見られたようなリズムミカルな小さな脱分極は認められず、活動電位もまったく出現しなかった(n=3/3)。

II-4) BIC-NMA 刺激時の三叉神経運動ニューロンに見られるリズムの周期性

実験II-1)と同様の方法でBIC10 μ M-NMA20 μ Mを同時に投与し、リズム

ミカルな活動電位が発現している状態（膜電位は-50mVでspike heightは約50mV、周波数は 5.9 ± 1.1 Hz、 $n=3$ ）で、三叉神経運動ニューロンの膜電位を約10mVずつ過分極させ、そのリズムミカルな活動電位やリズムミカルな小さな脱分極の周期性を検討した。

リズムミカルな活動電位が発現しているときの膜電位は-50mVであったが、holding potentialを-60mVに下げるとリズムミカルな活動電位は消失し、リズムミカルな小さな脱分極のみが観察された。そのリズムミカルな小さな脱分極の平均の周波数は 6.1 ± 1.4 Hz、膜電位の振幅は 4.0 ± 1.4 mVであった（図15）。さらに-70mVまで膜電位を下げるとリズムミカルな小さな脱分極はより明確となり（膜電位の振幅は 5.8 ± 1.2 mV）、膜電位が-60mVの時と比較すると1.45倍となることが観察された。このときのリズムミカルな小さな脱分極の周波数を解析すると 6.1 ± 1.0 Hzであり、膜電位を下げてもリズムミカルな活動電位と小さな脱分極の間の周期性は変化しないことが確認できた（図16）。

実験Ⅲ：E-18～19ラットにおける三叉神経活動と三叉神経運動ニューロンの膜電位変化について

実験Ⅱ-1)と同じ方法でBIC 10μ M-NMA 20μ M投与した際の三叉神経運

動根からの神経活動と三叉神経運動ニューロンの膜電位を同時に記録すると、薬物投与後約2分よりclampしているニューロンの膜電位は静止電位から徐々に10~15mV脱分極し、約3分後より活動電位が認められた。三叉神経運動根からの神経活動様相は本研究の実験I-1)の結果と同じくゆっくりとした周期の活動様相を示していたが、そのゆっくりとした周期の活動はcycle duration が 27.6 ± 4.0 secと長くなった。三叉神経運動根から活動が現われている間のニューロンの膜電位は静止電位から約15mV脱分極している状態で、活動電位がリズムカルに認められた。その時のリズムカルな活動電位の平均の周波数は 6.5 ± 1.5 Hzであった(n=3)。また、三叉神経活動が現われていない間のニューロンの膜電位は三叉神経活動発現時より4~6mV過分極の状態では活動電位は認められなかった。すなわち、三叉神経運動根からの約30秒周期の活動に同期して三叉神経運動ニューロンに膜電位の上下動(4~10mV)が観察され、膜電位が上昇した時にリズムカルな活動電位が発現した。一方、三叉神経活動が現われていない間は三叉神経運動ニューロンの膜電位が下がっていた。活動電位が発現していない時においても約5mVの小さな脱分極はリズムカルに常に認められた(図17.18)。その時のリズムカルな小さな脱分極の平均の周波数は 6.6 ± 1.6 Hzであった(n=3)。

考察

胎生期の顎運動は胎児エコー、電子スキャンなどで見られるが、そのほとんどが嚥下運動に連動したものである^{24,25)}。ヒトでは胎生16-17週で始めて嚥下様運動が観察されるが、咀嚼や吸啜と類似したような顎運動が観察されるのは胎生18-24週頃であるとされている。リズムカルな一連の哺乳運動、すなわちリズムカルな顎運動が認められるのはさらに遅れ、35-36週頃であると報告されている²⁶⁾。しかし、これらの機能を司る三叉神経系の神経回路の発達については未だ明らかにされていない。一方、呼吸や歩行に関するパターンジェネレータの研究やその神経回路を構成するニューロンの membrane property の研究は神経回路を含む培養脳幹法ですでに研究されている^{22,23,27)}。

培養脳幹は脳幹を動物の身体から切り離し、最小の神経回路を温存して実験に供することが出来るため、小さい範囲の神経回路の研究には適している。すでに本法を用いて、三叉神経運動核とその周辺組織のみを含むごく小さな脳幹組織に興奮性アミノ酸のNMAまたはKAとGABA_A receptor antagonist のBICを投与することによって、三叉神経に4~6Hzのリズム性活動が得られると報告されている^{10,11)}。ところで、培養脳幹で誘発されるリズム性活動

が三叉神経系の実際のどの運動にあたるのかは不明であるが、顎付培養脳幹を用いて同様の刺激を行うと、リズムカルな顎運動が誘発されることから、咀嚼に類似した運動であることは明らかとなっている^{28,29)}。また、この回路にはNMDA receptor が深く関わっていることも既に明らかとなっている¹⁰⁾。そこで、Kogo ら¹⁰⁾が新生仔ラットを用いてBIC-NMA刺激で誘発される三叉神経活動についてNMDA receptor antagonist、non-NMDA receptor antagonist を投与することでリズム発生に関わるreceptor を検討したのと同じ方法で胎生期ラットにおいて確認すると、KA、AMPA の投与前にAPV20 μ M投与するとBIC10 μ M-KA0.5 μ M、BIC10 μ M-AMPA0.5 μ M投与してもE18-21ではリズムカルな三叉神経活動は得られず、また、NMAの投与前にAPV20 μ M投与するとBIC10 μ M-NMA20 μ Mでも三叉神経活動は観察されなかったが、NMAの投与前にCNQX5 μ M投与するとBIC10 μ M-NMA20 μ Mで三叉神経活動は発現した。つまり、胎生期においてもこのリズムカルな三叉神経活動の誘発はNMDA receptor が重要な役割を果たしていることが確認できた。

胎生期ラットの脳幹は結合組織が少なく、柔らかく脆弱で破損されやすいため、在胎日数が小さいほど、三叉神経運動根からの活動の記録には技術的な困難さがあった。本研究で用いた脳幹標本には、呼吸中枢であるpre-

Botzinger complex が切断され含まれていないため、三叉神経運動根からは薬物による刺激を行わない限り、いかなる神経活動も観察されない。胎生期ラットの脳幹標本を作製するにあたっては、まず呼吸中枢を含む脳幹標本で三叉神経運動根から自発性の呼吸様神経活動を観察し、三叉神経運動根からの神経活動が記録出来ることを確認した後に、Y字交点で切断して目的の標本を作製した。実際、三叉神経運動根から呼吸様神経活動が記録できたのはE-16からであり、薬物誘発によるリズムカル三叉神経活動が検討できたのはE-16以降であった。また、胎生期ラットの呼吸様の三叉神経活動についてNMAを投与し活動周期の短縮を観察し、NMDA-receptorの機能も確認した。

さて、出生間近のE-20~21ではNMA-BICの薬物刺激により三叉神経運動根にリズム性の活動が誘発された。BIC $10\mu\text{M}$ -NMA $20\mu\text{M}$ の刺激でcycle duration が $155.07\pm 30.17\text{msec}$ と新生仔ラットでの結果と明らかな違いは認められなかった。すなわち、この時すでに本研究で目的とするリズム性活動に関わる神経回路は完成されていると考えられる。

一方、E-18~19ではリズム性活動は持続するのではなく周期的に発現することが明らかとなった。これに対し、E-16~17ではリズム性活動は発現しなかった。発達段階の神経細胞におけるNMDA receptorの数は変化することが知られている³⁰⁾。NMAの刺激濃度を上昇させてもE-20~21、E-18~19で

リズム性活動のcycle duration が短縮するのみで、E-16~17からは三叉神経リズム性活動は発現しなかった。non-NMDA receptor agonist であるKAをNMAの代りに用いてもE-16~17ではリズム性活動は得られなかった。しかしAMPAを用いた場合では6例中2例で振幅は小さいもののゆっくりとした周期性の活動のなかにリズムカルな三叉神経活動が含まれていたが、たとえばAMPAで反応していたにせよリズムジェネレーションはE-16~17では不完全な状態にあると推察せざるを得ない。また、AMPA receptor の発達がNMDA receptor の発達より早期に認められるという結論に導くまでには至らなかった。

これらの結果から、本研究で得られるリズム性活動に関わる神経回路は、E-17以前では未完成であると考えるのが妥当である。

三叉神経の運動性の活動の解析には、三叉神経運動ニューロンの膜電位の記録が重要な意味を持つ。運動ニューロンの細胞単位の膜電位の様相が三叉神経活動の基本である単なる活動電位だけでなく、活動中のEPSP、IPSPの発現を見ることは、機能する神経回路の神経伝達機構を解析する上で非常に有用となる。patch clamp 法の発達は細胞間の微小電流や細胞膜を通過するイオン電流を調べることを可能にしたが、過去の多くの三叉神経運動ニューロンに対する研究は細胞内記録法³¹⁻³³⁾やslice-patch clamp 法³⁴⁾を用いてい

た。この方法では厚さ200~300 μ m程度までの薄切標本を用いるため、大部分の神経回路は破壊され機能時の膜電位を捉えることが難しかった。これに対しblind-patch clamp 法^{35,36)}は目的とする細胞が見えない状態でpatch clamp を行うが、教科書的には厚さ500 μ m程度の標本で行うことが出来る。本研究の対象となる組織は厚さ約1000 μ mで理論上厚すぎるが、blind-patch clamp 法で運動ニューロンを捉えることが出来た。この標本を用いてのblind-patch clamp 法では神経細胞が見えないため、その神経細胞が三叉神経運動ニューロンであることを確認する必要があった。そのため同側の末梢神経（運動根）に電気刺激を与え、その逆行性の活動電位（antidromic spike）をもって三叉神経運動ニューロンと同定した（図3）。BIC-NMAの薬物刺激時に記録された三叉神経運動ニューロンの活動と、末梢の三叉神経運動根からの活動が同期していたものは新生仔ラットにおいて10例中6例であった。これは吸引電極による末梢神経の細胞外記録は必ずしも全ての三叉神経活動を捉えることが出来ない為とも考えられた。

過去に機能を持った三叉神経回路に対してpatch clamp を行った研究はほとんど無く、ほとんどがslice-patch clamp 法を用いている。そのため生後のデータと胎生期のデータを比較する必要があった。前述のごとく、新生仔ラットにおいてBIC-NMAを投与すると、リズムカルな顎運動が起こること

は既に報告されている。この運動のリズムジェネレータは三叉神経運動核の近くに存在するとされている。顎のリズミカルな運動の神経回路の解析はよく行われ、現在、そのリズムジェネレータまたはセントラルパターンジェネレータとバーストジェネレータの局在・機能について多くの議論がなされている。in vivo の実験では皮質刺激によってリズミカルな顎運動が誘発されることが分かっているが³⁷⁻³⁹⁾、このリズミカルな顎運動は内側網様体がリズムジェネレータとしての役割を果たしているとされ^{9,40)}、中でも gigantocellular や paragigantocellular reticular formation に注目が置かれている⁹⁾。

しかし、HRP標識を行った研究では内側網様体から三叉神経運動核への直接的な投射路は認められなかったという報告や^{19,20)}、運動核周辺には premotor neuron が多く存在し⁴¹⁻⁴³⁾、咀嚼様運動の際にリズミカルに活動し⁴⁴⁾、この一部は解剖学的なトレースにより運動核へ投射する last-order interneuron (premotor neuron) であるという事実が存在する⁴⁵⁾。また、運動核周辺の細胞の中に intrinsic なリズム性活動をする神経細胞も発見されている^{34,46)}。これらの事実は三叉神経運動核近くにリズムジェネレータが存在するということと矛盾しない。

さて、生直後のラットの脳幹においてBIC-NMA の刺激を与えるとリズムカルな三叉神経活動が得られるが、三叉神経運動ニューロンの膜電位でも同様の現象が観察された。リズムカルな活動電位は薬物投与後数分で静止電位より15~30mV脱分極してから認められるが、それまでにEPSPと考えられる5mV程度のリズムカルな小さな脱分極が認められ、その周波数は後に認められるリズムカルな活動電位と一致していた。このリズムカルな小さな脱分極は膜電位を-70mVまで下げても消失することは無く、逆に増幅された。また、別の研究でlow-Ca solution を用いると活動が起こらないことが明らかとなっている。BIC を投与せず、NMA のみを投与したときでもこのEPSPと考えられる小さなリズムカルな脱分極は認められるが、BIC のみを投与したときは認められず、この小さなリズムカルな脱分極の発現にはNMDA receptor が深く関わっていると考えられた。従って、培養脳幹におけるBIC-NMA 刺激によるリズムカルな三叉神経活動は運動ニューロンのintrinsic な活動ではなく、NMA により刺激されて、まずリズムジェネレータがリズムを形成し、運動ニューロンにEPSP の形で伝達され、膜電位が上昇することにより、それに合わせるようにリズム性の活動電位が発生すると考えられた。NMAの単独投与によってリズム性活動発現まで至らない理由の1つとしては、GABA_A receptor を介する抑制のため膜電位が十分に上昇出来ないことが考えられた。

E-18～19の三叉神経運動ニューロンの膜電位の様相については、前述の末梢神経活動から予想されたように、ゆっくりとした周期の膜電位の上下動(幅4～10mV)が認められた。その周期は運動神経根の活動のみを記録した時よりも長く約30秒となった。これはpatch clampの際の薬物刺激法が静止したchamber内への直接投与ではなく、灌流によって行ったためと考えられた。すなわち、ゆっくりとした薬物濃度の上昇が直接投与による急激な上昇とは少し異なった影響を与えていることが考えられた。生直後で認められたEPSPと考えられるリズムカルな小さな脱分極は膜電位が下がっているときでも継続して認められ、膜電位が上昇した時にのみリズムカルな活動電位が発生することが観察された。すなわち、E-18～19ではすでにリズムを発生させるリズムジェネレータは機能出来る状態にあると考えられ、運動ニューロンの膜電位の上昇を継続できない何らかの理由が存在すると推察された(図19)。また、E-16～17では末梢神経からリズム性活動の発現が無いため、運動ニューロンの膜電位と神経活動の同期性が確認できず、データ採取に至ることができなかった。

以上、本研究はリズムジェネレータがE-18前後から機能することを示唆したが、リズムジェネレータの局在、E-16～17以前の状態などについては今後の課題として残された。

結語

培養脳幹の手法、patch clamp の手法をそれぞれ用いてラット三叉神経リズム性活動に関わる神経回路の胎生期の発達経緯について検討を行い、以下の結果を得た。

1) E-20~21のラットではBIC-NMAを投与すると三叉神経運動根から、cycle duration が 155.07 ± 30.17 msecのリズミカルな三叉神経活動が得られ、新生仔ラットで認められる三叉神経リズム性活動の神経回路は完成していることが分かった。

2) E18~19のラットではBIC-NMA刺激によりゆっくりとした周期の活動が観察され、その振幅は徐々に減衰する活動様相を呈した。ゆっくりとした周期の活動はcycle duration が 175.49 ± 58.80 msec のリズミカルな神経活動で構成されており、三叉神経リズム性活動の神経回路は未完成の状態であるがリズムジェネレーションは形成されていることが分かった。

3) E16~17のラットではBIC-NMAを投与してもリズミカルな神経活動は認められず、三叉神経リズム性活動の神経回路は形成されていないと考えられた。

4) BIC-NMA投与で得られるリズム性活動のcycle durationはE-20~21の群とE18~19の群の間でNMAの濃度依存的に減少し活動周期が短縮している

ことが認められ、胎生期においてもNMDA receptor が深く関与していることが確認できた。

5) 新生仔ラットで三叉神経運動ニューロンから、BIC-NMA投与時に得られる三叉神経リズム性活動と同期してリズムカルな活動電位が観察できた。また、活動電位が発現する前にリズムカルな小さな脱分極が認められた。この活動は膜電位を下げて消失することなく、リズムジェネレータからのEPSPであることが示唆された。

6) 新生仔ラットの三叉神経運動ニューロンからはNMAの投与では活動電位はリズムカルには発現しなかったが、小さな脱分極はリズムカルに認められ、リズムジェネレーションはNMAによって起こることが考えられた。

7) E18~19のラットでBIC-NMA投与時に得られる周期的でゆっくりとした活動は三叉神経運動ニューロンの膜電位の上下動と一致し、膜電位上昇時にのみ活動電位が発現していたが、膜電位降下時でも常に小さな脱分極はリズムカルに認められた。この時期におけるリズム性活動に関わる中枢性メカニズムは、三叉神経運動ニューロンの膜電位に関わる部分でE-20以降のものとは異なっている部分が存在すると考えられた。

文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Lund, J.P. (1991) : Mastication and its control by the brain stem. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2, 33-64.
- 4) Nakamura, Y. and Katakura, N. (1995) : Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci. Res.*, 23, 1-19.
- 5) 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.
- 6) Dellow, P.G. and Lund, J.P. (1971) : Evidence for central timing of rhythmical mastication. *J. Physiol.*, 215, 1-13.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.

- 10) 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.
- 11) Tanaka, S., Kogo, M., Chandler, S.H. and Matsuya, T. (1999) : Localization of oral-motor rhythmogenic circuits in the isolated rat brainstem preparation. *Brain Res.*, 821, 190-199.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.

17) 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.

18) 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.

19) Mizuno, N., Yasui, Y., Nomura, S., Itoh, K., Konishi, A., Takada, M. and Kubo, M. (1983) : A light and electron microscopic study of premotor neurons for the trigeminal motor nucleus. *J. Comp. Neurol.* 2215, 290-298.

20) 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.

21) Jansen, A.H. and Chernick, V. (1991) : Fetal breathing and development of control of breathing. *J. Appl. Physiol.*, 70, 1431-1446.

22) Pasquale, E.D., Monteau, R. and Hilaire, G. (1992) : In vitro study of central respiratory-like activity of the fetal rat. *Exp. Brain Res.*, 89, 459-464.

23) Greer, J.J., Smith, J.C. and Feldman, J.L. (1992) : Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brainstem spinal-cord in vitro. *J. Neurophysiol.*, 67, 996-999.

- 24) Grand, R.J., Watkins, J.B. and Torti, F.M. (1976) : Development of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterol*, 70, 796-810.
- 25) David, N. and Tuchman, M.D. (1989) : Cough, choke, sputter : The evaluation of the child with dysfunctional swallowing. *Dysphagia*, 3, 111-116.
- 26) Daniels, H., Casaer, P. and Devileger, H. (1986) : Mechanisms of feeding efficiency in preterm infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 5, 593-596.
- 27) Conhaim, L.Z. (1988) : Electrical properties of motoneurons in the spinal cord of rat embryos. *Developmental Biol.*, 128, 21-29.
- 28) Westneat, M.W. and Hall, W.G. (1992) : Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats : An electromyographic analysis of sucking and chewing. *Behav. Neurosci.*, 106, 539-554.
- 29) Kogo, M., Tanaka, S., Chandler, S.H. and Matsuya, T. (1998) : Examination of the relationships between jaw opener and closer rhythmical muscle activity in an in vitro brainstem Jaw-attached preparation. *Somatosens. Motor. Res.*, 15, 200-210.
- 30) Hori, Y. and Kanda, K. (1996) : Developmental alterations in NMDA receptor-mediated currents in neonatal rat spinal motoneurons. *Neurosci. Lett.*, 205, 99-102.
- 31) Chandler, S.H., Hsiao, C.F., Inoue, T. and Goldberg, L.J. (1994) : Electrophysiological properties of guinea pig trigeminal motoneurons recorded in vitro. *J. Neurophysiol.*, 71, 129-145.

- 32) Hsiao, C.F., Trueblood, P.R., Levine, M.S. and Chandler, S.H. (1997) : Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *J. Am. Physiol. Soc.* 2910-2924.
- 33) Hsiao, C.F., Del Negro, C.A., Trueblood, P.R. and Chandler, S.H. (1998) : Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J. Am. Physiol. Soc.*, 2847-2856.
- 34) Del Negro, C.A. and Chandler, S.H. (1998) : Regulation of intrinsic and synaptic properties of neonatal rat trigeminal motoneurons by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurosci.*, 18, 9216-9226.
- 35) Blanton, M.G., Lo Turco, J.J. and Kriegstein, A.R. (1989) : Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Meth.*, 30, 203-210.
- 36) Coleman, P.A. and Miller, R.F. (1989) : Measurement of passive membrane parameters with whole-cell recording from neurons in intact amphibian retina. *J. Neurophysiol.*, 61, 218-230.
- 37) Rioch, J.M. (1934) : Neural mechanisms of mastication. *Am J. Physiol.*, 108, 168-176.
- 38) Hines, M. (1940) : Movements elicited from the precentral gyrus of the adult chimpanzee by stimulation with sine wave currents. *J. Neurophysiol.*, 3, 442-466.
- 39) 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.

- 40) Nakamura, Y. (1985) : Localization and functional organization of masticatory rhythm generator in the lower brain stem reticular formation. *Neurosci. Lett. Suppl.*, 20, S3.
- 41) Donga, R., Lund, J.P. and Veilleux, D. (1990) : An electrophysiological study of trigeminal commissural interneurons in the anaesthetized rabbit. *Brain Res.*, 351-354.
- 42) Appenteng, K., Conyers, L., Curtis, J. and Moore, J.A. (1990a) : Monosynaptic connections of single V interneurons to the contralateral V motor nucleus in anesthetized rats. *Brain Res.*, 514, 128-130.
- 43) 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.
- 44) Westberg, K.G., Clavelou, P., Sandstrom, G. and Lund, J.P. (1998) : Evidence that trigeminal brainstem interneurons form subpopulations to produce different forms of mastication in the rabbit. *J. Neurosci.*, 18, 6466-6479.
- 45) 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.
- 46) Del Negro, C.A., Hsiao, C.F., Garfinkel, A. and Chandler, S.H. (1998) : Evidence for a novel bursting mechanism in rodent trigeminal neurons. *J. Biophysiol.*, 75, 174-182.

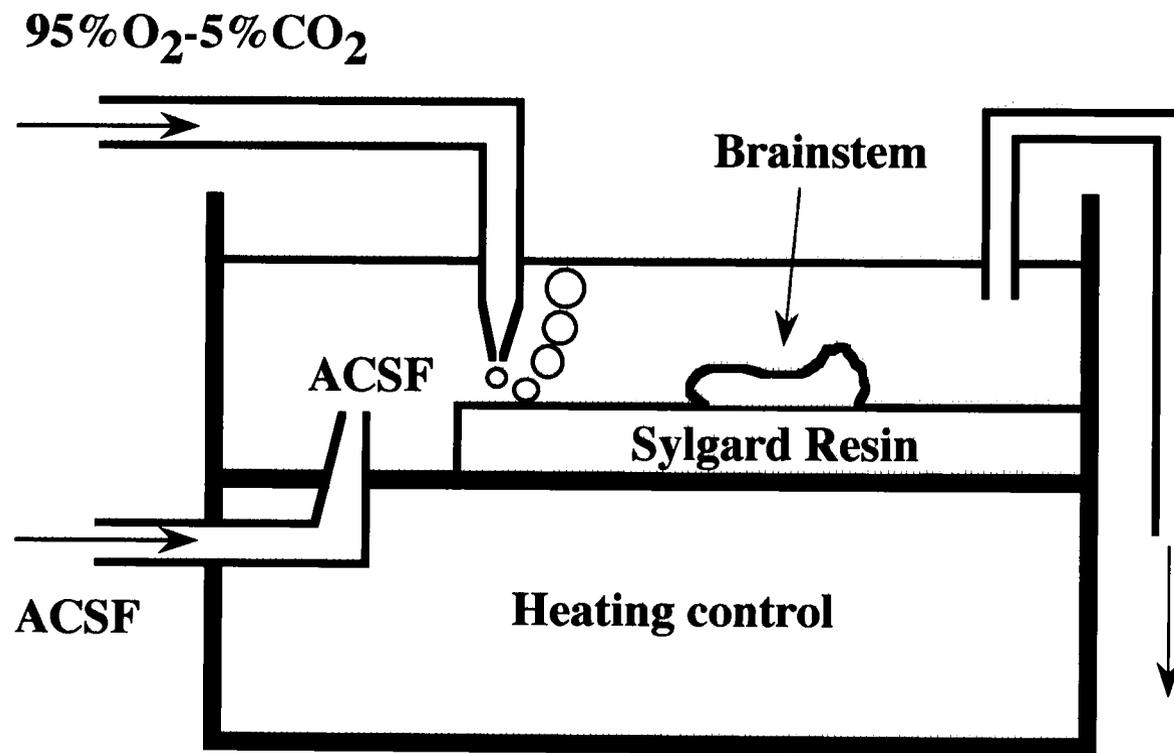


图 1

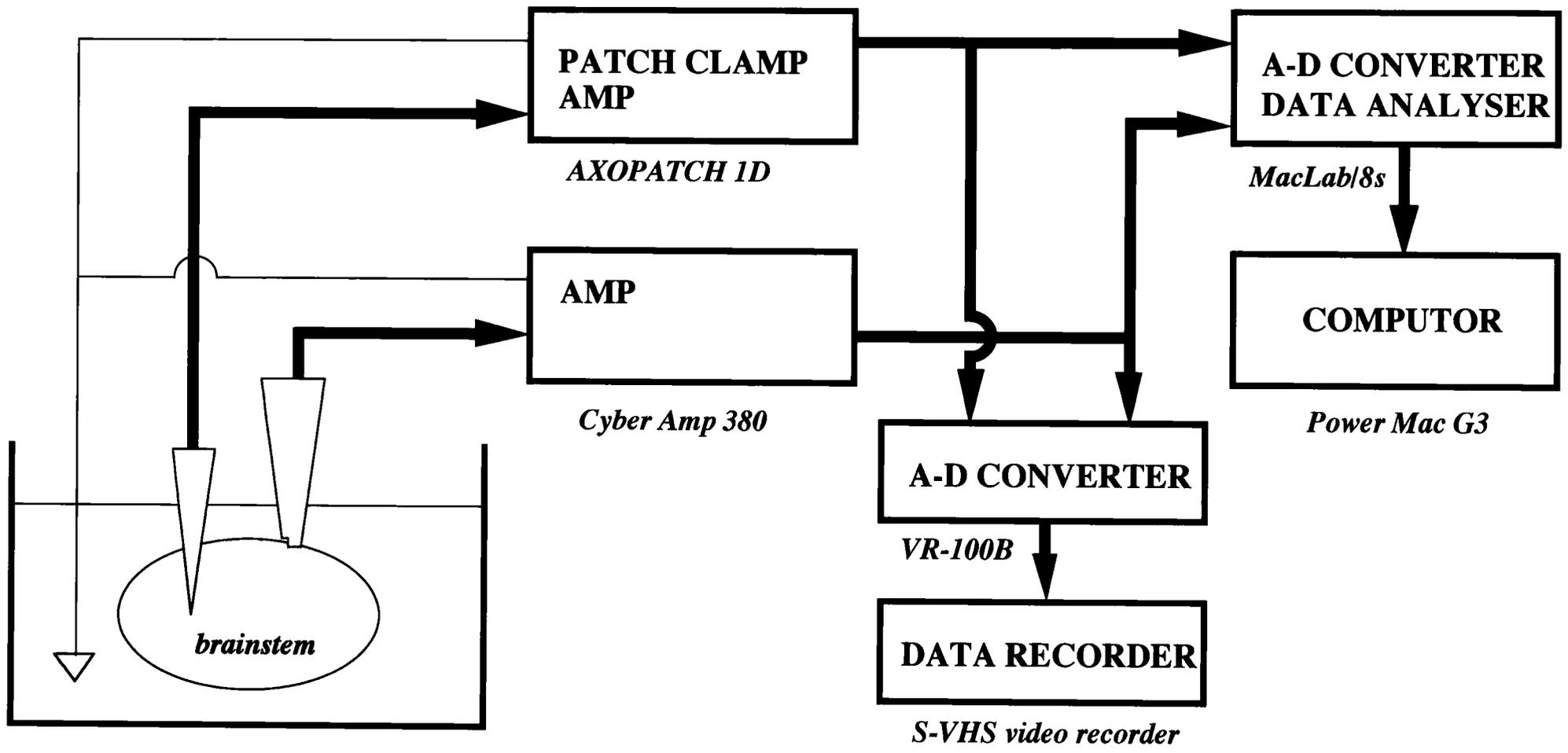


图 2

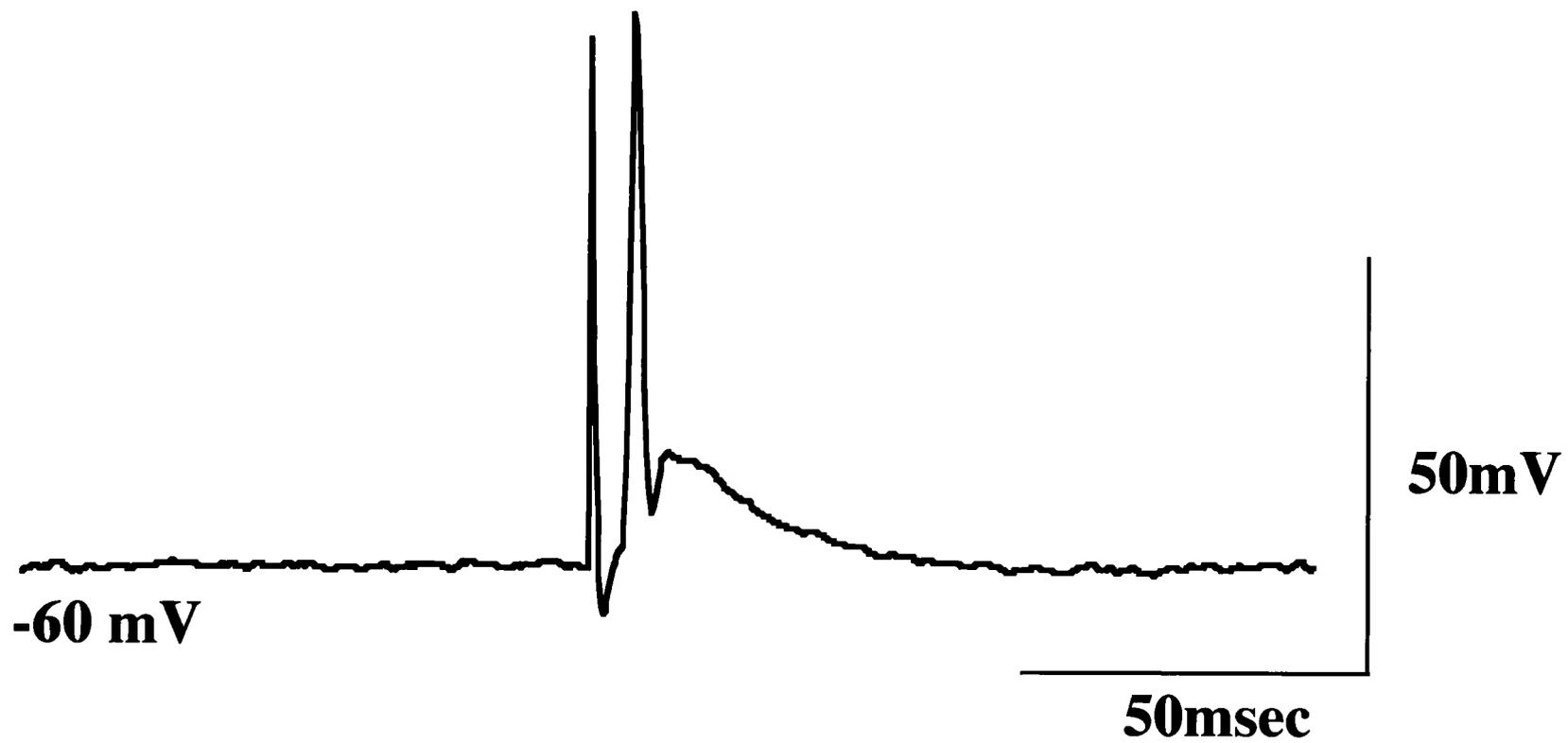
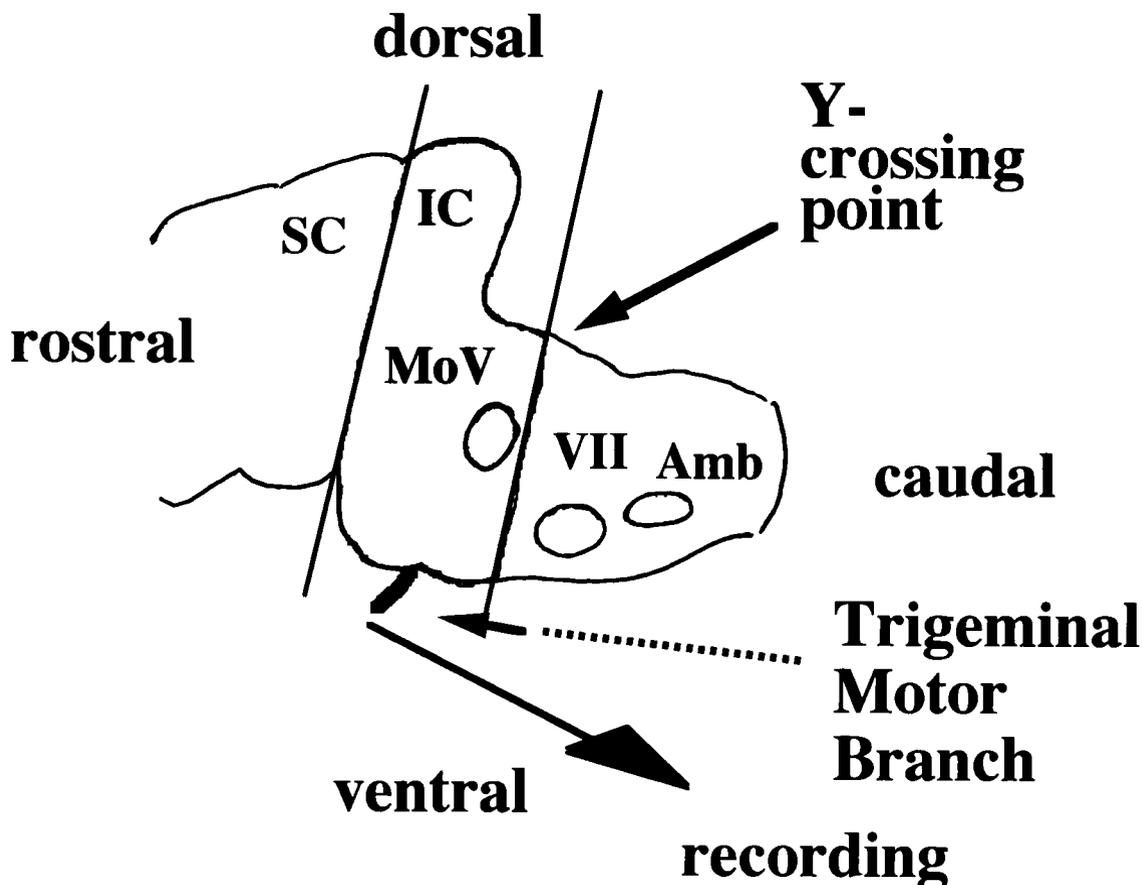


図 3

Sagittal view



Dorsal view

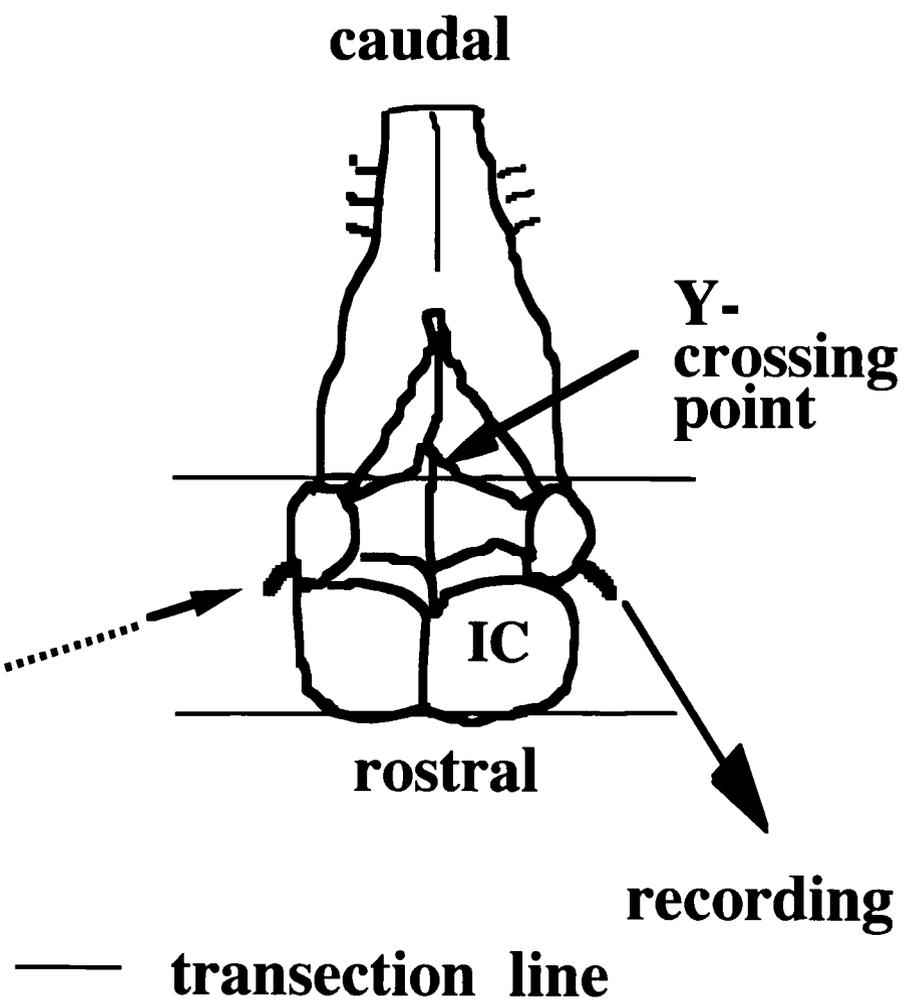
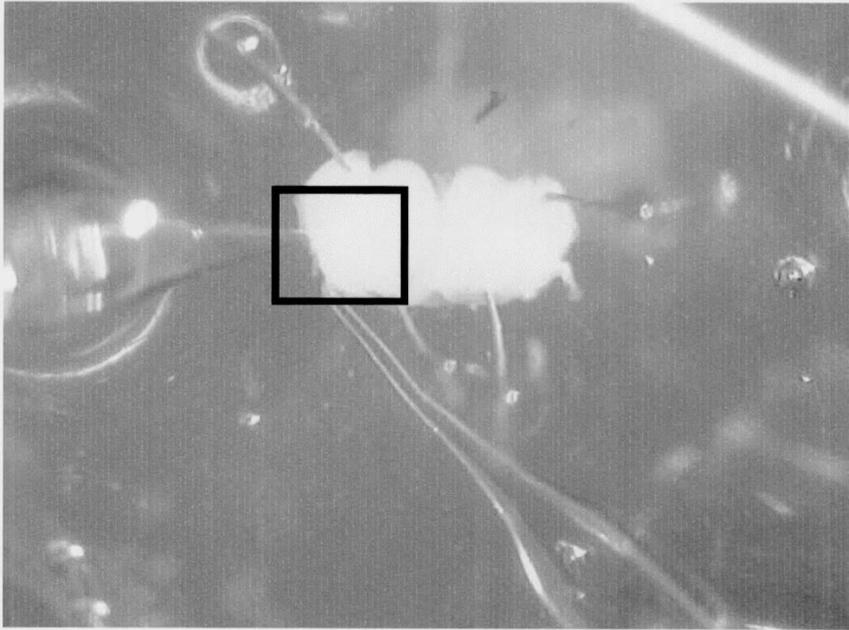
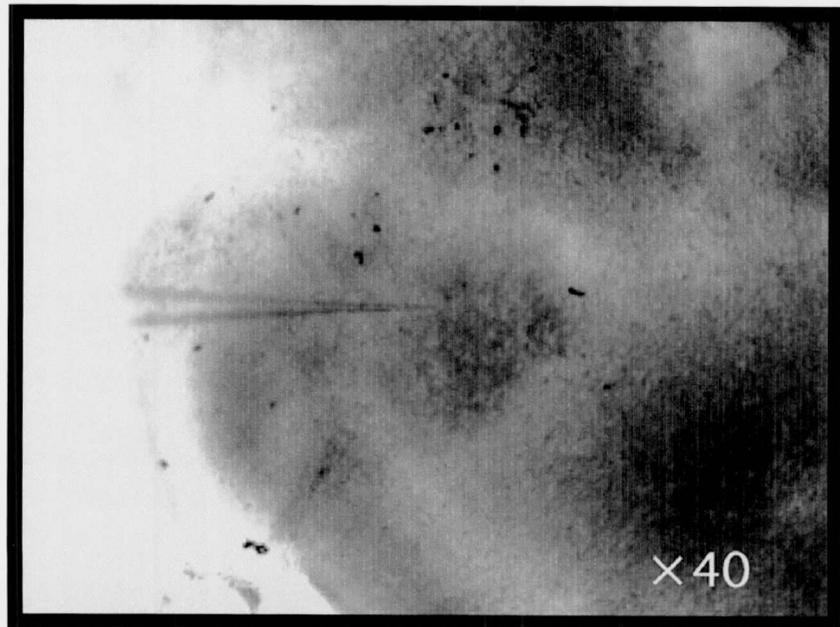


图4

A



B



C

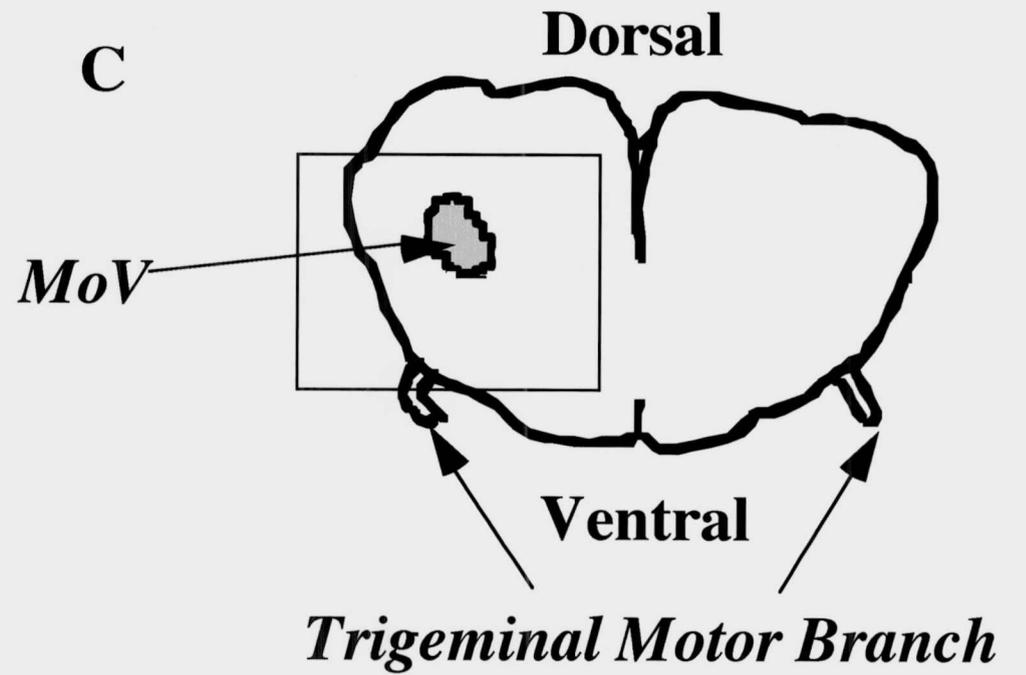
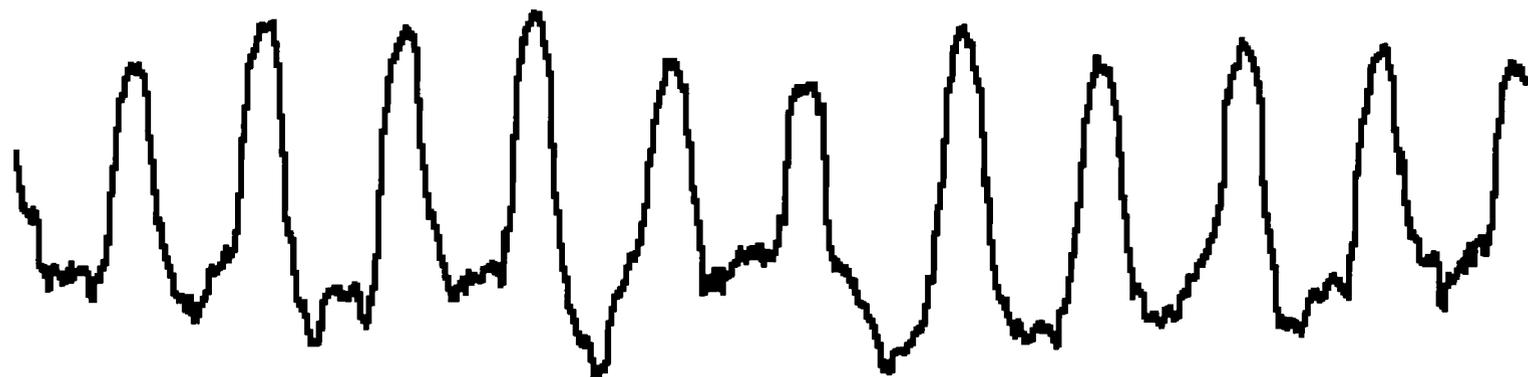


图5



ENG

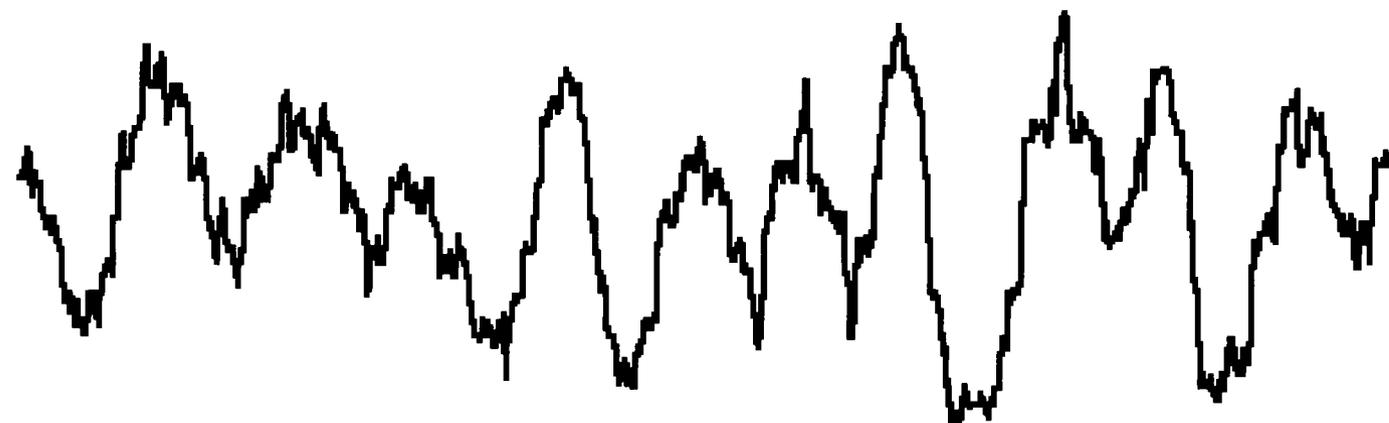


integrated



500msec

图6



500msec

图7

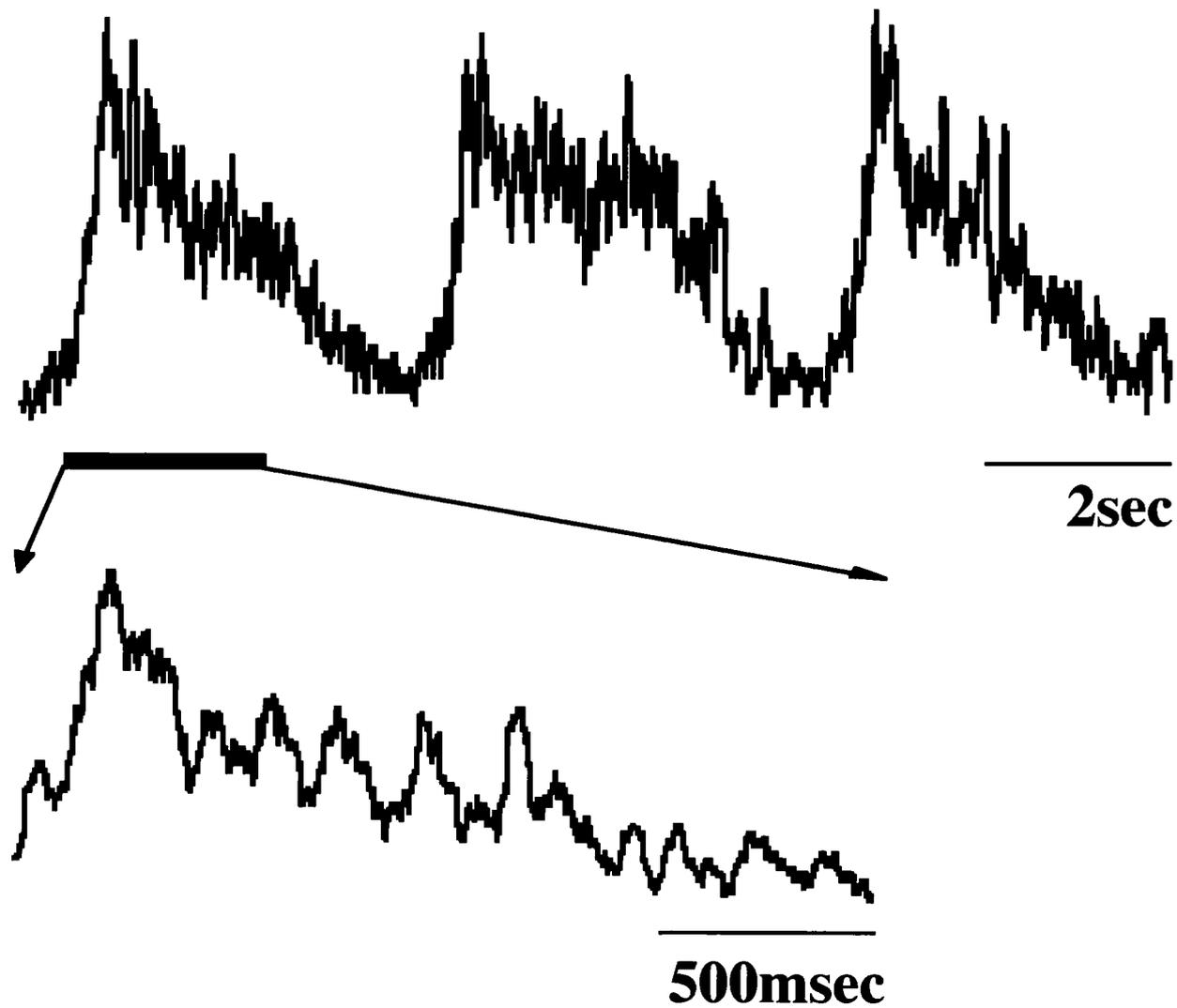


图8

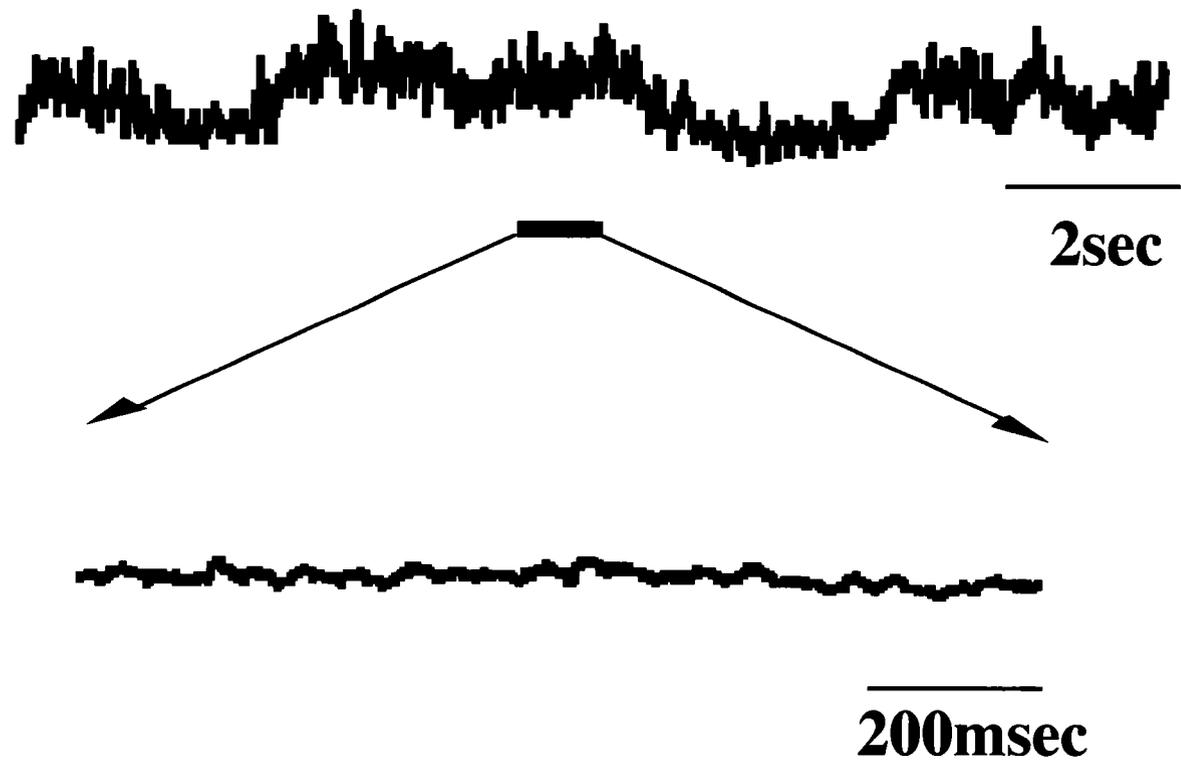


图9

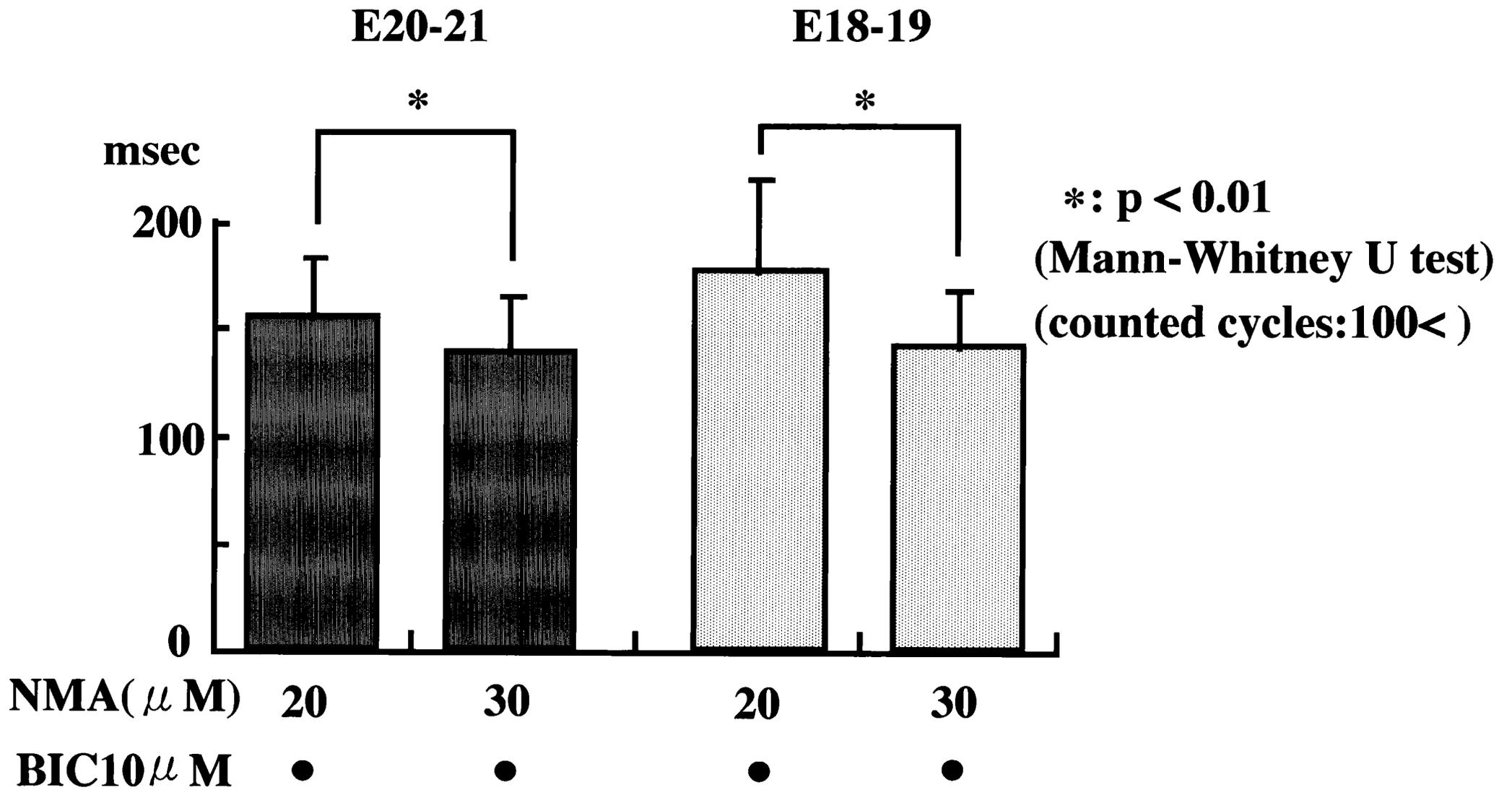


図 10

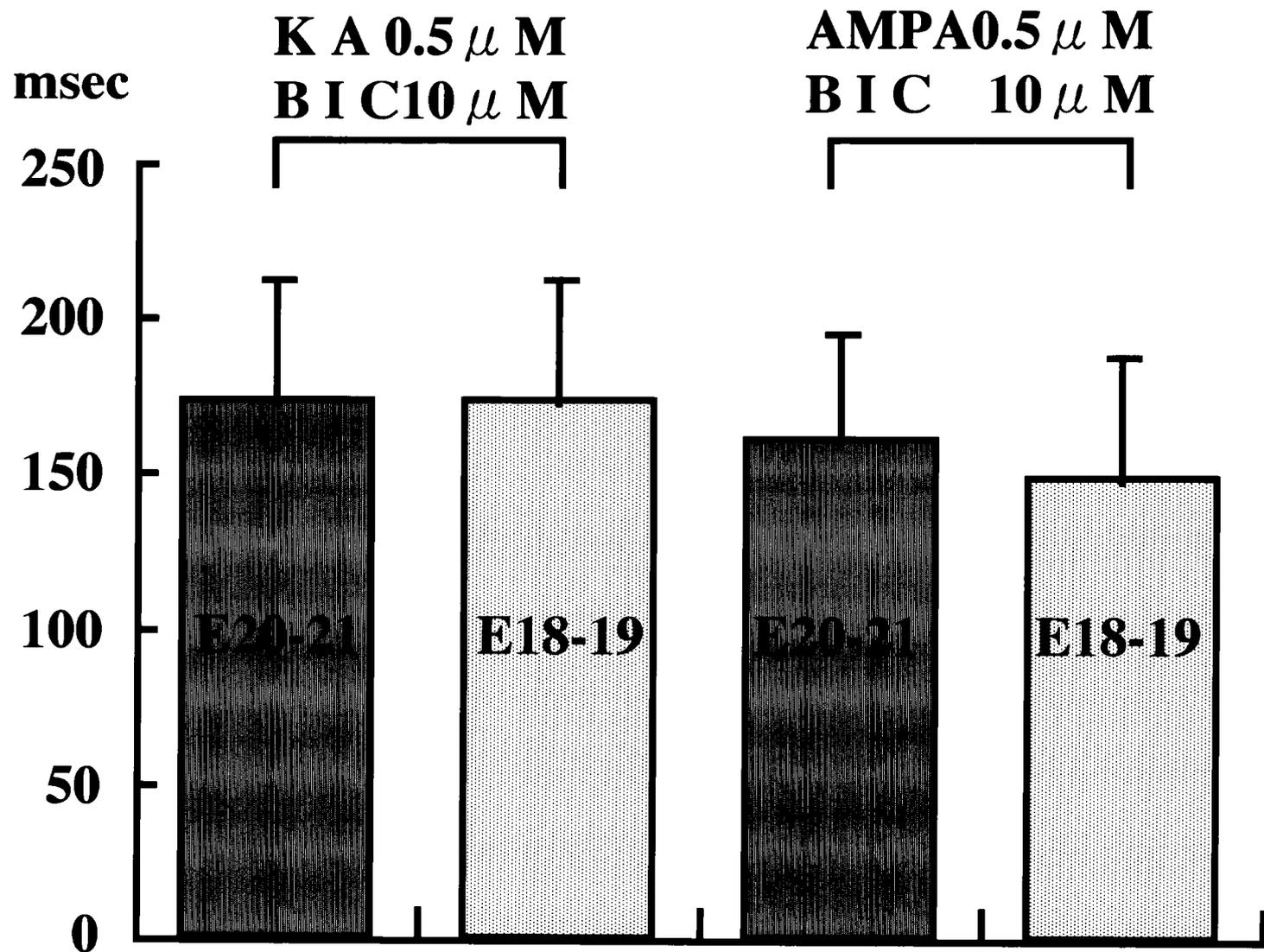


図 11



-62mV

50mV

1 min

NMA 20 μ M
BIC 10 μ M

A

图 12

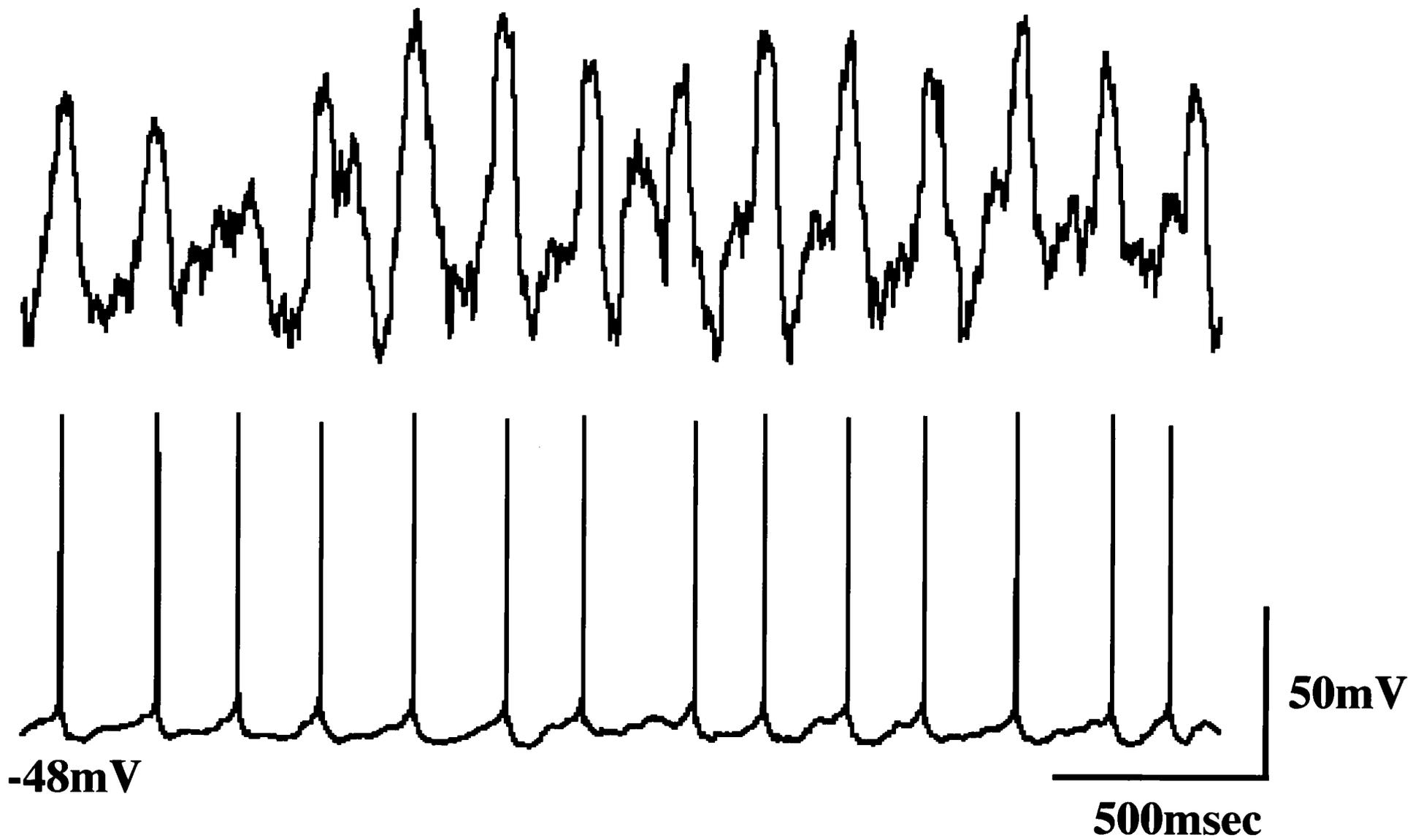
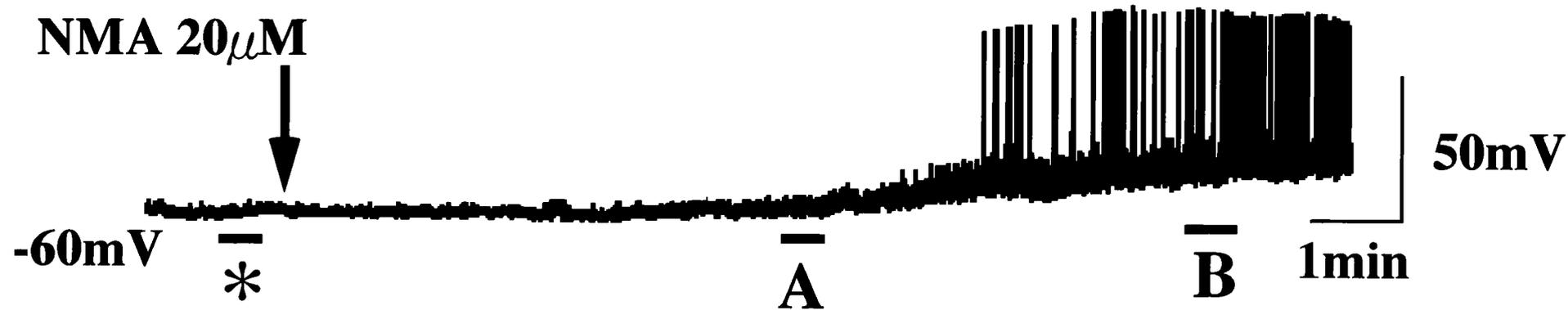


图 13



* :before drug application

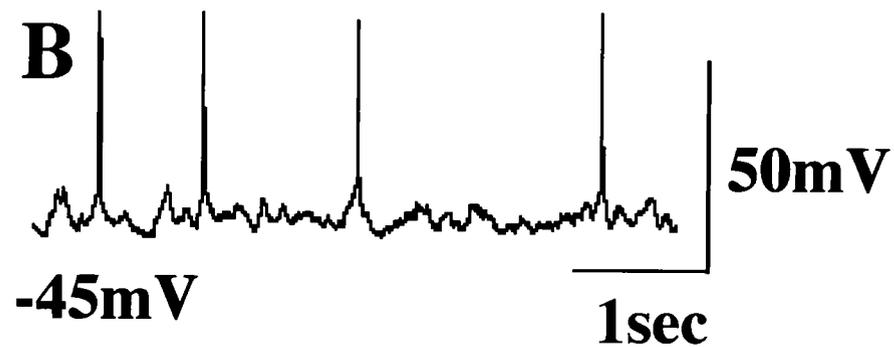
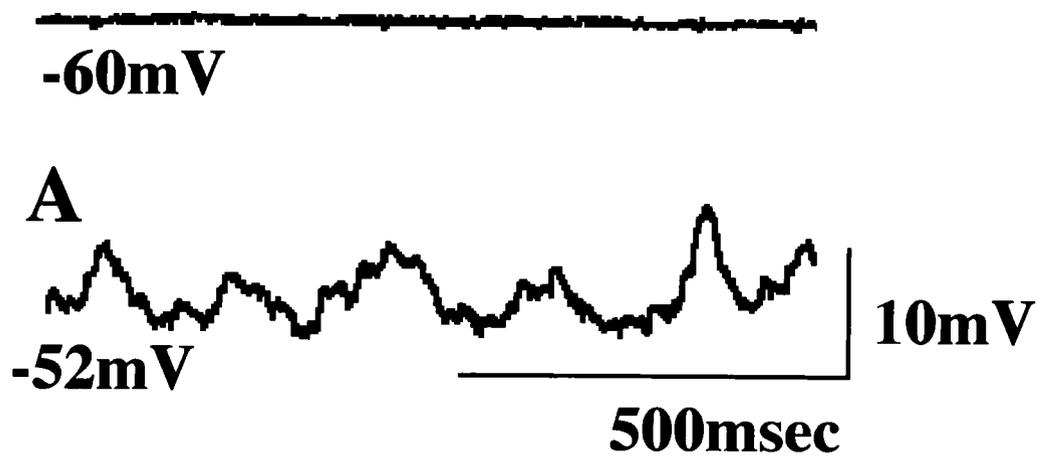
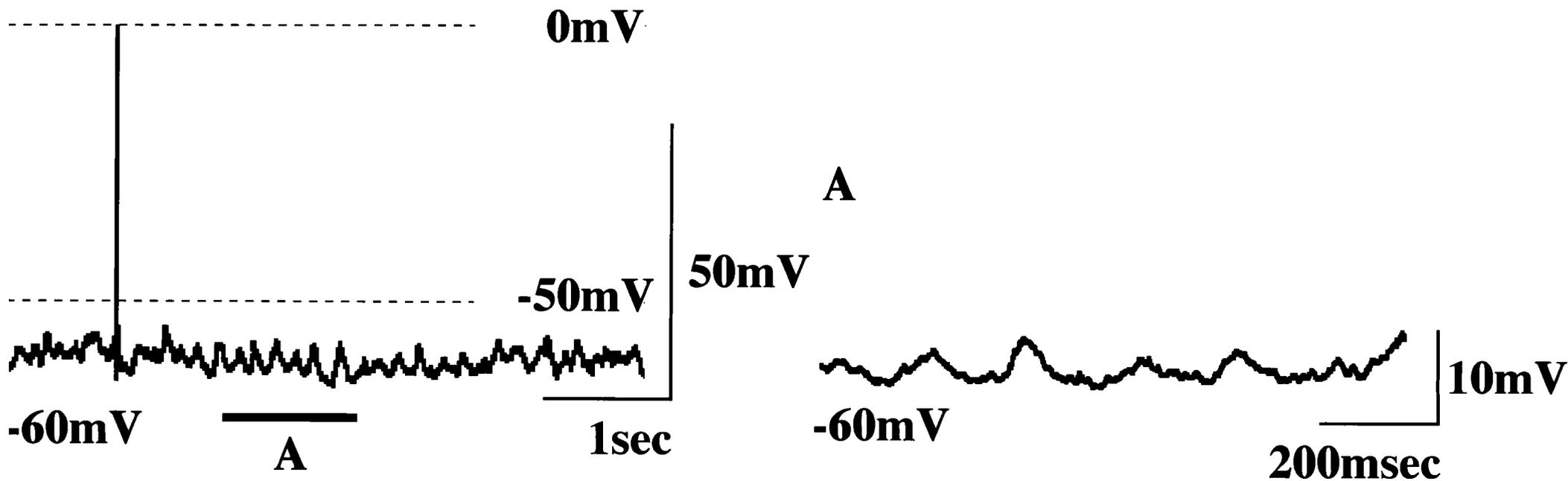
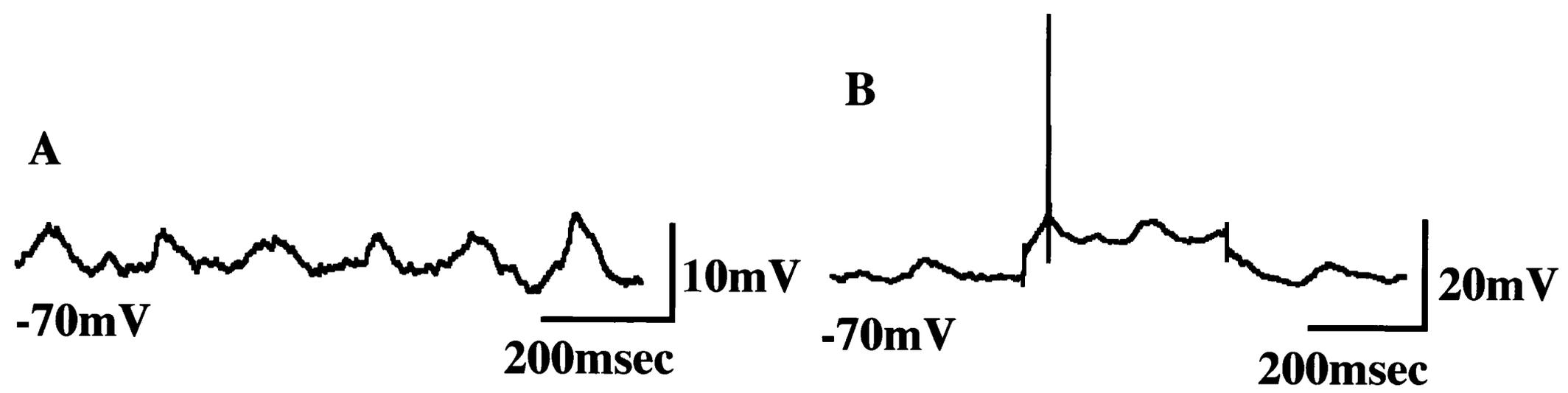
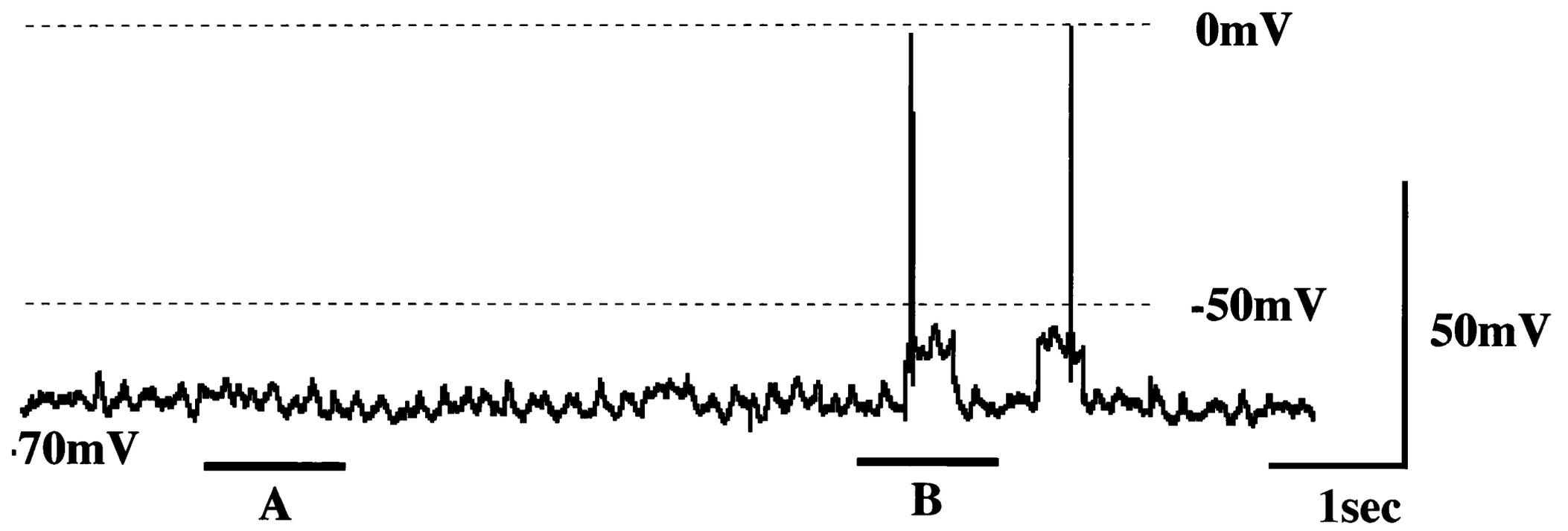


図 14





⊗ 16

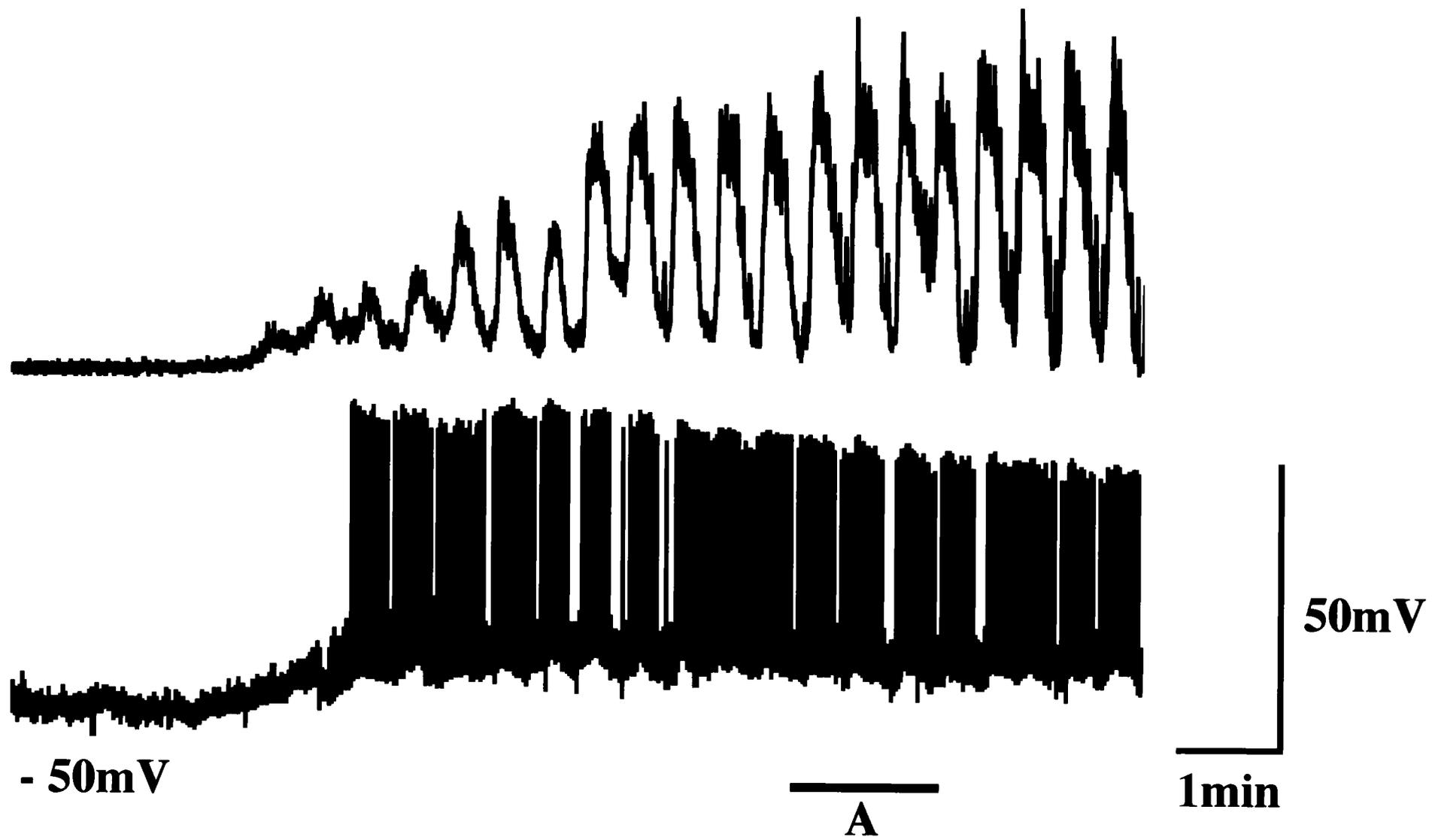


图17

A

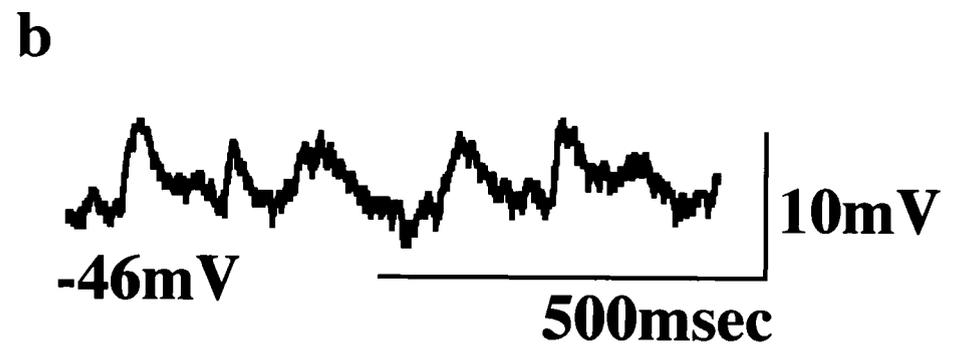
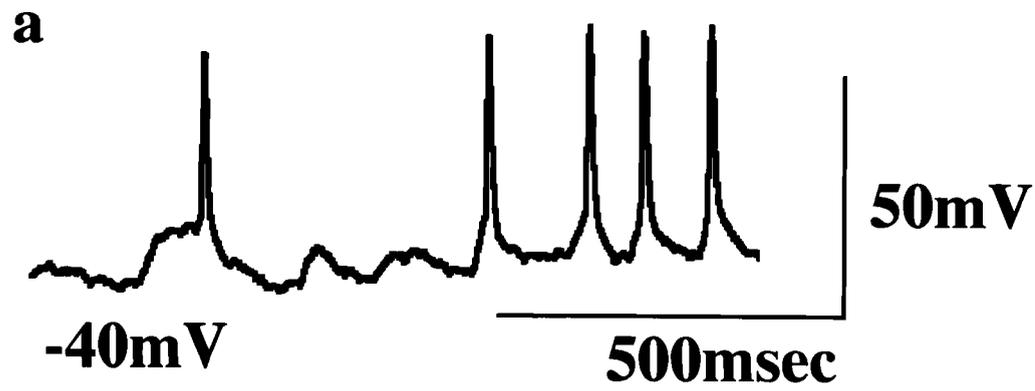
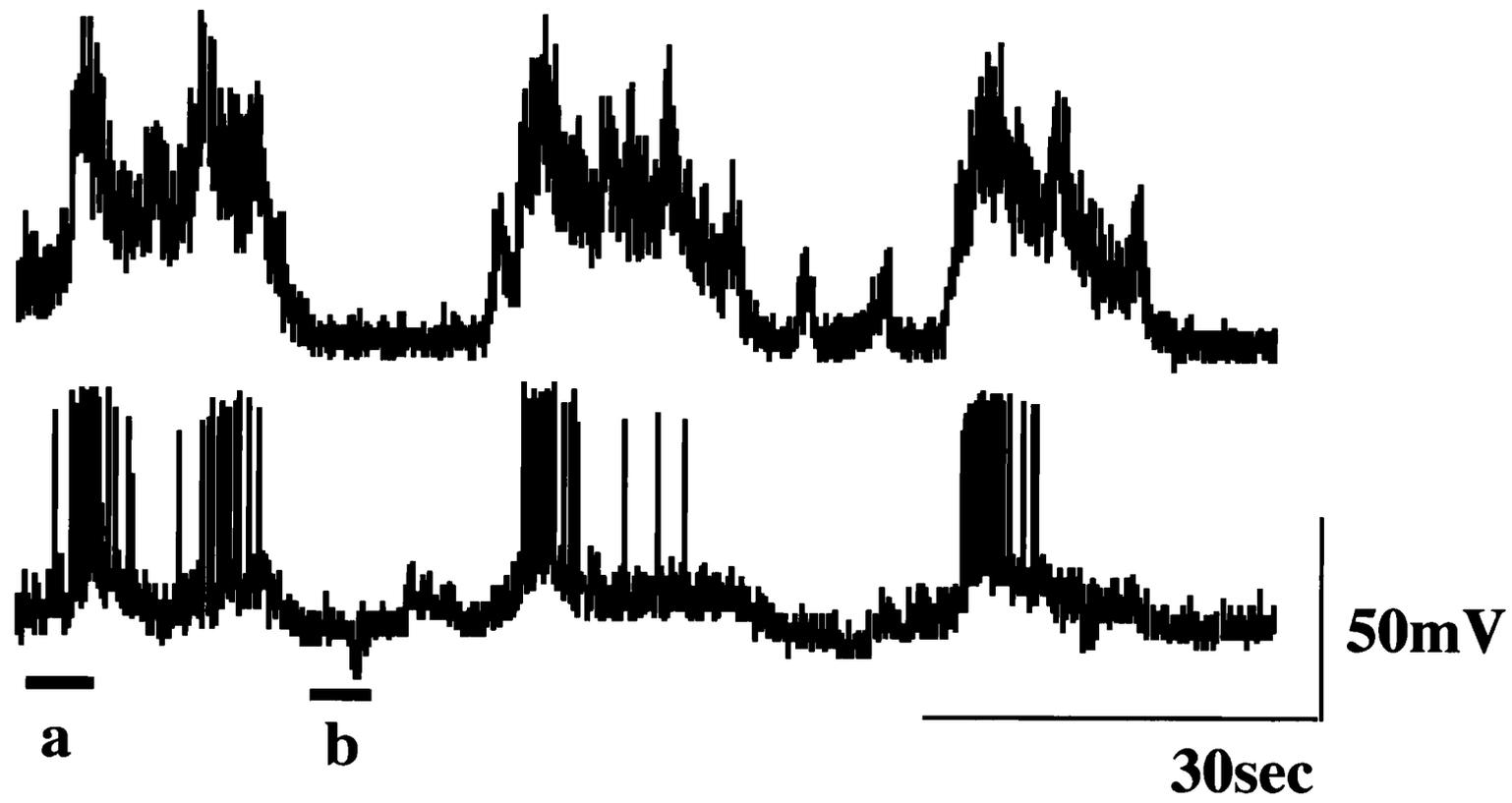


图 18

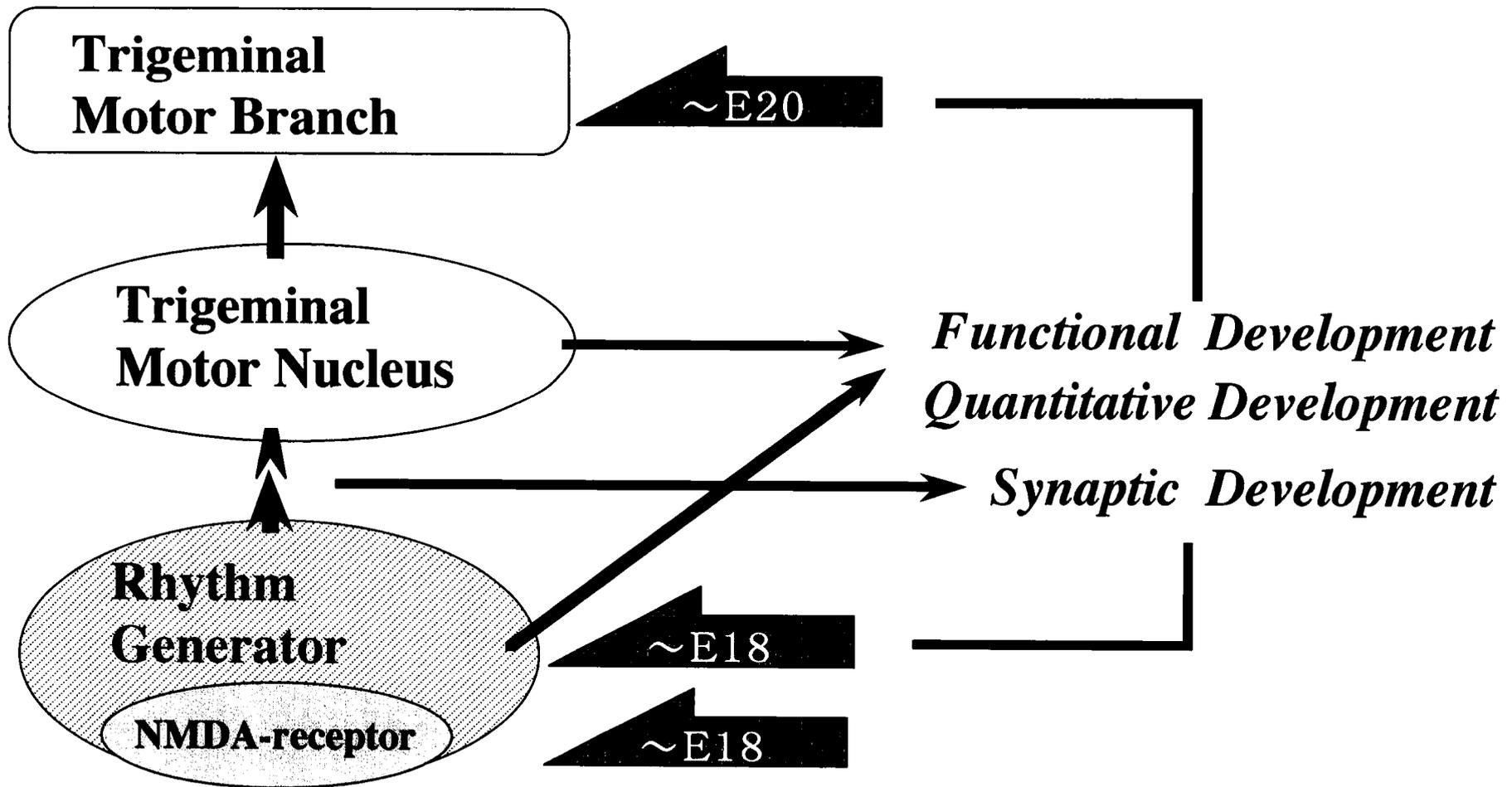


図19

図の説明

図 1、recording chamber 模式図

摘出した脳幹は95%O₂-5%CO₂混合ガスで飽和されているACSFで満たされたrecording chamberのsylgard resin上にピン固定した。chamber下部は蒸留水で満たされており、recording chamberの温度調節を行っている。

図 2、実験機器模式図

図 3、antidromic test

三叉神経運動根に60mV, 100 μ secの単一矩形波で電気刺激を与え、clampしているニューロンの逆方向性の活動電位をもって三叉神経運動ニューロンと同定した。潜時は約6msec。

図 4、脳幹の範囲

SC ; superior colliculus、IC ; inferior colliculus、MoV ; motor trigeminal nucleus、VII ; facial nucleus、Amb ; ambiguous nucleus

図 5、patch clamp

A : 脳幹を尾側断面を上に向けてピン固定し、左横からpatch clamp電極、右下からガラス吸引電極を設置した。

B : 赤外線カメラを用いて三叉神経運動核内にpatch clamp電極を刺入した (Aの黒枠内 \times 40)。

C : 脳幹標本の模式図。MoV ; motor trigeminal nucleus

図 6、新生仔ラットでのリズム性三叉神経活動

BIC10 μ M-NMA20 μ M投与時に三叉神経運動根から約6Hzの活動が得られた。上段：原波形、下段：上段の積分波形。以後、神経活動はこのような積分波

形を示す。

図7、胎齢20日（E-20）ラットのリズム性三叉神経活動

E-20～21のラットでは振幅がほぼ一定でリズムカルな三叉神経活動がBIC10 μ M-NMA20 μ Mの薬物刺激で誘発された。図の活動はE-20のものであるが、新生仔ラットの三叉神経活動と周期、様相に差は見られない。

図8、E-18のリズム性三叉神経活動

E-18～19のラットではゆっくりとした周期の（約0.25Hz）活動を示し、振幅が徐々に減衰する様相を呈した（上段）。約6Hzのリズムカルな神経活動で構成されている（下段）。図の活動はE-18の記録である。

図9、E-17のリズム性三叉神経活動

E-16～17のラットではゆっくりとした周期的な（約0.15Hz）活動はみられるが、振幅はE-18～19のラットの活動と比較すると極めて小さく（上段）、リズムカルな神経活動は含まれていない（下段）。

図10、E-18～21の三叉神経活動とNMA

E-20～21の群とE18～19の群において、それぞれBIC10 μ M-NMA20 μ M投与時とBIC10 μ M-NMA30 μ M投与時の三叉神経活動の活動周期（cycle duration）を比較した。同じ薬物刺激では両群間に有意差は認めなかったが、両群ともNMAの濃度を高くすることで活動周期は有意に（Mann-Whitney U test, $p < 0.01$ ）短縮した。

図11、各種興奮性アミノ酸とE-18～21の三叉神経活動

BIC10 μ M-KA0.5 μ M投与時とBIC10 μ M-AMPA0.5 μ M投与時の三叉神経活動の活動周期（cycle duration）についてE-20～21の群とE18～19の群を比較した。2群間および各興奮性アミノ酸間で活動周期に有意差を認める結

果は得られなかった。

図12、新生仔ラットにおける三叉神経神経活動と運動ニューロンの膜電位の比較

BIC10 μ M-NMA20 μ M投与時、静止電位である-62mVから膜電位が徐々に上昇し、リズムカルな活動電位が発現した（下段）。上段は三叉神経活動の積分波形を示している。

図13、新生仔ラットにおける三叉神経神経活動と運動ニューロンの膜電位の比較

図12の線Aの部分をtime scale 500msecで示している。この時の膜電位は-48mVまで脱分極し、上段のリズムカルな三叉神経活動と同期してリズムカルな活動電位が記録された（下段）。

図14、NMA単独投与時の三叉神経運動ニューロンの活動

NMA20 μ Mのみ投与すると静止電位である-60mVから徐々に脱分極し、線Aの部分では、5mV程度の小さな脱分極がリズムカルに（約6Hz）発現した（下段左）。薬物投与前の膜電位の様相を*で示している。その後も膜電位は上昇し、活動電位が発現したが（膜電位は-45mV）、小さな脱分極は認められるものの活動電位はリズムカルには発現していない（下段右）。

図15、リズムカルな活動電位の膜電位依存性

BIC10 μ M-NMA20 μ Mの薬物刺激で誘発されるリズムカルな活動電位がholding potential=0mVで上段に示すようにspike heightが約50mVで認められている。膜電位を10mV下げると（-60mV）、リズムカルな活動電位はみられないが約5mVの小さな脱分極が継続して認められた。線Aの部分を下段右に拡大して示している。

図 1 6、リズミカルな小さな脱分極の膜電位依存性

図 1 5 と同じ運動ニューロンで膜電位をさらに -70mV にすると、 $\text{BIC}10\ \mu\text{M}$ - $\text{NMA}20\ \mu\text{M}$ の刺激によっても小さな脱分極だけが認められた。約 7mV の小さな脱分極はこの時も膜電位降下前と同じ周期でリズミカルに発現していた（下段左）。また、線 B は step command で $+14.0\text{mV}$ の電気刺激を与えた部分を示している。

図 1 7、E-18~19 における三叉神経活動と運動ニューロンの膜電位の比較
 $\text{BIC}10\ \mu\text{M}$ - $\text{NMA}20\ \mu\text{M}$ 投与時に静止電位である -50mV から膜電位が徐々に上昇し、リズミカルな活動電位が発現し（下段）、上段のゆっくりとした周期の三叉神経活動と同期して認められた。

図 1 8、E-18~19 における三叉神経活動と運動ニューロンの膜電位の比較
上段は図 1 7 の線 A の部分を示している。ゆっくりとした周期で振幅が徐々に減衰する神経活動と同期して膜電位の上下動が見られ、膜電位が上昇した時に活動電位が認められる（線 a）。膜電位が下降している時には活動電位は認められない（線 b）。線 a の部分（下段左）は膜電位が -40mV で、小さな脱分極が発現し、さらに上段のリズミカルな三叉神経活動と同期して活動電位がリズミカルに記録された。活動が見られない部分（線 b）において、膜電位は -46mV と下降している状態で活動電位は発生していない。三叉神経活動が発現していない時であっても約 5mV の小さな脱分極は常に認められた（下段右）。

図 1 9、三叉神経リズム性活動に関わる神経回路の胎生期発達を示す模式図